



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

6 16238

817299/50

UFR Sci.F.A.

L.S.M.C.L.

THESE

présentée

à l'Université de METZ

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ

Spécialité : Chimie-Physique

par

Lionel VERNEX-LOSET

**Etude des processus d'interaction laser de fibres
naturelles par spectrométrie de masse.
Application à la validation expérimentale des
critères de différenciation du cheveu.**

Soutenue le 26 novembre 1999

- Président du Jury : **Jean-François MULLER**, Professeur à l'Université de Metz, Directeur de Thèse.
- Rapporteurs : **Marie Florence GRENIER LOUSTALOT**, Directeur de Recherche CNRS, Université de Lyon I, Service Central D'Analyses.
Raymond HOURIET, Professeur à l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Laboratoire de Technologie des Poudres.
- Examineurs : **Georges HUSSLER**, Ingénieur de Recherche, L'OREAL, Aulnay Sous Bois.
Pascal KINTZ, Maître de Conférences, Institut Médicolégale, Strasbourg.
Gabriel KRIER Ingénieur de Recherche, LSMCL,

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ



022 304918 1

UFR Sci.F.A.

S/172 99/50
L.S.M.C.L.

THESE

présentée

à l'Université de METZ

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ

Spécialité : Chimie-Physique

par

Lionel VERNEX-LOSET

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	1999/465
Cote	S/M3 99/50
Loc	Magasin

**Etude des processus d'interaction laser de fibres
naturelles par spectrométrie de masse.
Application à la validation expérimentale des
critères de différenciation du cheveu.**

Soutenu le 26 novembre 1999

Président du Jury : **Jean-François MULLER**, Professeur à l'Université de Metz, Directeur de Thèse.

Rapporteurs : **Marie Florence GRENIER LOUSTALOT**, Directeur de Recherche CNRS, Université de Lyon I, Service Central D'Analyses.
Raymond HOURIET, Professeur à l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Laboratoire de Technologie des Poudres.

Examineurs : **Georges HUSSLER**, Ingénieur de Recherche, L'OREAL, Aulnay Sous Bois.
Pascal KINTZ, Maître de Conférences, Institut Médicolégale, Strasbourg.
Gabriel KRIER, Ingénieur de Recherche, LSMCL, Université de METZ

A mes parents.

A mon frère.

A Nathalie et à Pauline, mes deux rayons de soleil.

A toute ma famille et belle-famille.

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser de l'Université de Metz, dirigé par Monsieur le Professeur **Jean-François Muller**.

Je lui exprime ici toute ma gratitude, pour la confiance qu'il m'a accordée en m'accueillant au sein de son laboratoire, pour ces compétences et son expérience dont il a su me faire bénéficier tout au long de ce travail. Je le remercie également de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Mes remerciements et ma reconnaissance vont également à **Madame Marie Florence GRENIER LOUSTALOT**, Directeur de Recherche CNRS à l'Université de Lyon I, et à Monsieur le **Raymond HOURIET**, Professeur à l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, pour l'intérêt qu'ils ont accordé à mon travail en acceptant de le juger en tant que Rapporteurs.

Que Monsieur **Pascal KINTZ**, Maître de Conférences à l'Institut Médicolégale de Strasbourg, Monsieur **Georges HUSSLER** Ingénieur de Recherche à la société l'OREAL et Monsieur **Gabriel KRIER** Ingénieur de Recherche au L.S.M.C.L., soient remerciés pour l'honneur qu'ils me font, en acceptant de juger ce travail.

Pour l'amitié qu'ils m'accordent, j'adresse des remerciements tous particuliers, à **Gaby** l'ange gardien du laboratoire et à **Pierre-Jean** qui je l'espère, ne s'est pas trop arraché de cheveux en relisant ce mémoire.

Que **Sandrine Peter**, **Valérie Geoffroy** (Masson) et **Catherine Calba** (Buisset) soient aussi remerciées, car ce travail est aussi un peu le leur.

Je tiens également à remercier Madame **Martine FLERES**, une secrétaire hors pair.

A l'équipe du LSMCL : D. Muller, E. Millon, J.J. Gaumet, B. Maunit, aux étudiants : Céline, Rachel, Benoît, Marc, Frédéric, Eric et David, ainsi qu'aux anciens : Pierre, Abdel Karim, Pascal, Adam, Eric, Nouari, Christophe, Suzanna, Benoit, Nadine, Philippe, Paul-Eric, Alexandre, Patricia, Anne, Sophie, Thierry, Laurent et Laurent... à tous MERCI !

Table des matières

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE I ASPECTS TOXICOLOGIQUES ET CRIMINALISTIQUES DU CHEVEU	3
I. LES ANNEXES CUTANÉES	4
<i>I.1. Le follicule pileux.....</i>	4
I.1.1. Anatomie.....	5
I.1.2. Physiologie des sécrétions pileuses.....	8
I.1.2.1. Le cycle pileux.....	9
I.1.2.2. Croissance des poils et des cheveux.....	10
I.1.3. Composition de la tige pileux.....	11
I.1.3.1. Les kératines.....	11
I.1.3.2. Les lipides.....	13
I.1.3.3. Les pigments.....	14
I.1.3.4. Les cendres.....	15
I.1.4. Propriétés physico-chimiques des poils et des cheveux.....	16
<i>I.2. Les glandes sébacées.....</i>	16
<i>I.3. Le muscle arrecteur du poil.....</i>	18
<i>I.4. Les glandes sudoripares.....</i>	18
<i>I.5. Les glandes apocrines.....</i>	19
II. TECHNIQUES D'ANALYSE DES POILS ET DES CHEVEUX.....	19
<i>II.1. Analyse morphologique.....</i>	19
II.1.1. La couleur.....	23
II.1.2. La morphologie.....	23
II.1.3. Les poils d'animaux.....	26
II.1.4. Conclusion.....	27
<i>II.2. Résultats statistiques de la comparaison des cheveux et des poils.....</i>	27
<i>II.3. Analyse des caractères uniquement liés aux gènes.....</i>	29
II.3.1. Les Acides Désoxyribonucléiques (ADN).....	29
II.3.1.1. Les techniques d'analyse.....	30
II.3.1.2. Application au cheveu.....	33
II.3.2. Le sexe.....	34
II.3.3. Le groupe sanguin.....	34
II.3.4. Le système enzymatique.....	36
II.3.5. Conclusion.....	36
<i>II.4. Analyse de la kératine du cheveu.....</i>	37
II.4.1. Extraction.....	38
II.4.2. Composition.....	38
II.4.3. Facteurs qui peuvent influencer la composition de la kératine.....	41
II.4.3.1. L'état physiologique.....	41
II.4.3.2. La nutrition.....	42
II.4.3.3. Le soleil.....	42
II.4.3.4. Les traitements capillaires.....	43
II.4.3.5. L'ensevelissement.....	44
II.4.4. Variations et polymorphisme.....	44
II.4.4.1. Entre les espèces animales.....	44
II.4.4.2. Entre les ongles et les cheveux.....	44
II.4.4.3. Les protéines pauvres en soufre.....	45
II.4.4.4. Les protéines riches en soufre.....	46
II.4.4.5. Par électrophorèse bi-dimensionnelle.....	46
II.4.5. Etude par py-GC/MS.....	47
II.4.6. Conclusion.....	51
<i>II.5. Analyse des éléments traces.....</i>	52
II.5.1. Les éléments minéraux.....	52
II.5.1.1. Sources des éléments minéraux dans le cheveu.....	53
II.5.1.2. Sites de fixation des éléments.....	55
II.5.1.3. Nettoyage des cheveux.....	56
II.5.1.4. Objectifs de l'analyse du cheveu.....	57

II.5.2. Les composés organiques (drogues et médicaments)	60
II.5.2.1. Protocole d'analyse	60
II.5.2.2. Les voies de pénétration	62
II.5.2.4. Intérêt de l'analyse des composés organiques	68
II.5.3. Conclusion	72
III. CONCLUSION DU CHAPITRE	74
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	77

CHAPITRE II MATÉRIELS ET MÉTHODES..... 82

I. LASER ET INTERACTION LASER MATIÈRE	83
I.1. Le laser	83
I.1.1. Principes physiques	83
I.1.2. Propriétés du rayonnement laser	83
I.2. L'interaction laser-matière	84
I.2.1. Modélisation de l'ablation laser	84
I.2.2. Effet de la longueur d'onde	85
I.2.2.1. Effet de type thermique	85
I.2.2.2. Effet de type photochimique	85
I.2.3. Effet de l'irradiance	87
I.3. Conclusion	87
II. LA MICROSONDE LASER LAMMA 500	87
II.1. Les lasers	89
II.2. Le système de visualisation et la chambre d'échantillonnage	89
II.3. Le spectromètre de masse	89
II.4. Système de détection et d'acquisition des données	90
II.5. Limite de détection et quantitativité	91
II.6. Performances et limitations	92
III. LA MICROSONDE LASER FTMS	92
III.1. Descriptif expérimental de la microsonde	92
III.1.1. Le système d'introduction et de manipulation de l'échantillon	93
III.1.2. Le système de pompage	93
III.1.3. L'aimant supraconducteur	93
III.1.4. L'interface d'ionisation laser	94
III.1.5. La double cellule	94
III.2. Principes théoriques	96
III.2.1. Le piégeage des ions	96
III.2.1.1. Le champ magnétique	97
III.2.1.2. Le champ électrique	98
III.2.1.3. Bilan des forces	98
III.2.2. Séquence d'analyse	99
III.2.2.1. L'excitation	99
III.2.2.2. La détection	100
III.2.3. Séquences particulières	101
III.2.4. Performances et limitations	102
IV. PROTOCOLE D'ANALYSE DU CHEVEU PAR MICROSONDE LASER	102
IV.1. Préparation de l'échantillon	102
IV.1.2. L'épaisseur	103
IV.1.2. Le lavage	104
IV.2. La longueur d'onde	108
IV.3. L'irradiance	109
IV.4. Conclusion	111
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	113

CHAPITRE III INTERPRÉTATION DES SPECTRES DE MASSE D'UN CHEVEU..... 114

I. INTERPRÉTATION DE L'EMPREINTE « MINÉRALE »	115
I.1. Dopage des cheveux en éléments minéraux	116
I.1.1. Les alcalins	116
I.1.1.1. Le potassium	116
I.1.1.2. Le sodium	118
I.1.2. L'aluminium	119
I.1.3. Le plomb	120
I.1.4. Le chlore	121

I.1.5. Le zinc.....	123
I.1.6. Le cuivre.....	124
I.1.7. Le calcium.....	125
I.2. <i>Interprétation des pics de masse 118, 134, 150 et 166</i>	127
I.2.1. Calibration du spectre.....	127
I.2.2. Reproduction du mécanisme de formation.....	128
I.3. <i>Conclusion</i>	130
II. INTERPRÉTATION DE L'EMPREINTE « ORGANIQUE ».....	132
II.1. <i>Les acides aminés</i>	132
II.1.1. Analyse des ions positifs.....	134
II.1.2. Analyse des ions négatifs.....	136
II.2. <i>Les polypeptides</i>	137
II.3. <i>Le cheveu</i>	139
II.3.1. En ions positifs.....	140
II.3.2. En ions négatifs.....	143
II.4. <i>Les neutres</i>	145
II.4.1. Description du montage.....	145
II.4.2. Analyse d'une pastille de cheveu.....	146
II.5. <i>Conclusion</i>	149
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	151

CHAPITRE IV PROTOCOLE D'ANALYSE PROPOSÉ POUR LES EXPERTISES 152

I. LES SCELLÉS.....	153
I.1. <i>Le prélèvement</i>	153
I.2. <i>Le contenu</i>	153
II. LA MORPHOLOGIE.....	154
II.1. <i>Matériel utilisé</i>	154
II.2. <i>Le tri macroscopique</i>	155
II.3. <i>L'analyse microscopique</i>	155
III. LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE.....	160
IV. CONCLUSION.....	167

CONCLUSION GÉNÉRALE..... 169

Introduction Générale

L'intérêt scientifique pour le cheveu n'est pas récent. En effet, la première utilisation d'une étude morphologique à l'occasion d'une expertise judiciaire a été effectuée par R. Virchow à Berlin en 1861. Il remarquait que les cheveux retrouvés sur l'accusé ressemblaient à ceux de la victime. Cependant, il concluait que ces cheveux ne possédaient pas de caractéristiques suffisamment significatives pour affirmer qu'ils ne pouvaient provenir que de la tête de la victime. Les premières publications rapportant la détection d'éléments dans le cheveu datent, quant à elles, du début du siècle. Ces travaux concernaient l'analyse d'arsenic et de mercure consécutifs, respectivement à une intoxication et à un traitement contre la syphilis.

Cette curiosité vis-à-vis du cheveu a plusieurs origines. La première est très certainement sa croissance rapide, qui piège des composés dans sa matrice et les isole de l'activité métabolique du reste du corps. Elle en fait ainsi une sorte de bande enregistrant l'imprégnation de l'organisme en composés endogènes. La seconde est son prélèvement aisé et sa conservation facilitée par sa résistance aux agents biologiques. Ces raisons expliquent pourquoi de nombreux scientifiques voient en lui un bon moyen pour détecter des problèmes de pollutions, de nutriments et de conduites toxicophiles. Il constitue aussi un indice facilement accessible, dans le sens où chaque personne perd en moyenne une centaine de cheveux par jour, ce qui justifie les tentatives de caractérisation d'un individu à partir de ses cheveux.

Il faut cependant attendre le début des années 80 pour observer un regain d'attention pour le cheveu, avec le développement de nouvelles techniques d'analyse comme :

- la spectrométrie d'émission avec excitation par plasma qui permet une analyse multi-élémentaire ;
- la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse pour la détection des composés organiques ;
- la technique d'amplification génique qui rend accessible les empreintes génétiques à condition que le bulbe soit présent.

C'est dans cette logique que s'inscrit notre laboratoire, en décidant dès la fin des années 80 de lancer plusieurs programmes de recherche sur le cheveu, avec des techniques d'analyses rapides et peu consommatrices en échantillon. L'un de ces programmes était relatif à l'apport des microsondes laser couplées à la spectrométrie de masse pour étudier le cheveu à des fins discriminantes. Nous nous sommes attachés dans ce mémoire à étudier en détail les mécanismes d'interaction laser-cheveu, avec pour objectifs d'expliquer les critères de discrimination obtenus.

Le chapitre I sera consacré à une étude bibliographique du cheveu. Elle cherchera, dans une première partie, à faire ressortir la complexité de ce matériel biologique. Car, si sa structure paraît assez simple, l'interprétation des informations recueillies nécessite une bonne connaissance de sa biologie. La seconde partie sera une synthèse des connaissances actuelles sur le cheveu, permettant son utilisation dans un but toxicologique et criminalistique.

Le second chapitre présentera brièvement les phénomènes qui se déroulent lors de l'interaction laser-matière, ainsi que le fonctionnement des deux microsondes laser du laboratoire : à temps de vol (LAMMA) et à résonance cyclotronique (FTMS). Un protocole mis au point pour l'analyse spécifique des cheveux, à l'aide ces deux appareils, sera discuté plus en détail.

Au cours du chapitre III, nous étudierons les ions formés lors de l'ablation laser d'un cheveu témoin. Pour cela nous porterons successivement notre attention sur les empreintes dites « minérale » et « organique ». Cette recherche nous permettra de mieux comprendre les mécanismes de formation des ions mis en jeu. Elle facilitera ainsi l'interprétation des différences observées entre plusieurs cheveux.

Enfin, dans le quatrième et dernier chapitre, nous détaillerons un protocole d'expertise développé au sein du laboratoire pour caractériser des cheveux à des fins discriminantes. Pour cela, nous croiserons les informations apportées par l'étude morphologique et l'interprétation des spectres de masse de plusieurs cheveux.

Chapitre I

Aspects toxicologiques et criminalistiques du cheveu

Le premier chapitre va être consacré à l'étude bibliographique du cheveu. Ce travail sera plus particulièrement axé sur l'utilisation de cette fibre naturelle par les toxicologues et la police scientifique.

Nous allons montrer que, s'il apparaît à première vue comme une structure assez simple, le cheveu s'avère un élément complexe dont de nombreux points anatomiques et physiologiques restent mal compris. Pour interpréter correctement les résultats obtenus lors de l'analyse du cheveu, il est nécessaire de bien connaître sa structure, sa composition et les interactions qu'il entretient avec son environnement.

Dans une première partie nous nous familiariserons avec les aspects biologiques du cheveu. Puis nous porterons notre attention sur les différentes techniques d'analyses disponibles à des fins discriminantes et toxicologiques.

I. Les annexes cutanées [1]

La peau revêt la surface externe du corps. Elle présente un certain nombre d'annexes cutanées appelées ainsi, car elles apparaissent pendant le développement embryonnaire à partir d'invaginations épidermiques dans le derme et l'hypoderme. Nous porterons plus particulièrement notre attention sur les follicules pileux, les glandes sébacées, les muscles arrecteurs, les glandes sudoripares et les glandes apocrines (figure 1).

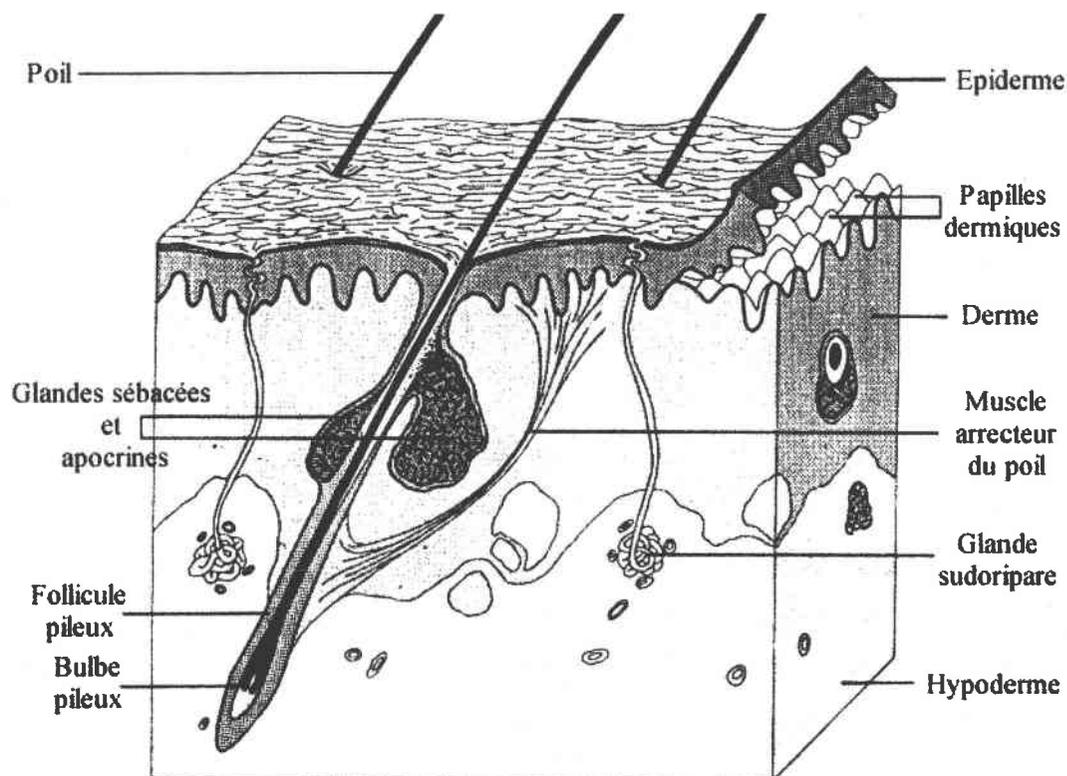


Figure 1 : les annexes cutanées [1].

I.1. Le follicule pileux

Le cheveu est constitué d'une partie apparente qui émerge de la peau, la tige pileuse et d'une partie profonde, la racine ou follicule pileux. On en dénombre entre 100 000 et 150 000 sur le crâne d'un adulte.

Si les poils ne jouent plus un rôle important de nos jours pour aider le corps à conserver sa chaleur, les follicules continuent à être essentiels pour le renouvellement de la peau suite à des brûlures ou des écorchures [2].

Les follicules pileux commencent à se former dès le troisième mois de vie du fœtus, mais il faut attendre le cinquième mois pour voir les poils fins qui constituent la lanugo¹ recouvrir toute la surface de la peau. La plupart d'entre

¹ Lanugo : du latin lana (laine).

eux tomberont avant la naissance. Plus aucun follicule pileux ne sera alors formé.

Ils pénètrent dans la peau d'environ 3 à 4 mm et sont étroitement associés aux glandes sébacées et apocrines. Leurs formes et leur nombre varient en fonction de leurs situations sur le corps et de l'âge de l'individu [1] :

- sur l'abdomen les follicules pileux sont relativement courts, dodus et rares. Les poils y sont fins et duveteux ;
- au niveau du cuir chevelu d'un individu de type Européen, les follicules sont longs et raides. Ils sont présents en forte densité (500 / cm²) mais leur nombre diminue avec l'âge ;
- dans le cas de la peau du pubis, leur densité est modérée. Ils sont orientés obliquement par rapport à la surface cutanée et sont sensibles aux hormones sexuelles. Les poils y sont le plus souvent frisés ;
- ils sont totalement absents des lèvres, de la paume des mains et de la plante des pieds.

I.1.1. Anatomie [1-5]

L'examen d'une coupe longitudinale du follicule pileux de l'extérieur vers l'intérieur montre qu'il est constitué de six couches concentriques de cellules épithéliales : la membrane vitrée, la gaine épithéliale externe, la gaine épithéliale interne, la cuticule, le cortex et la médulla (figure 2). Au niveau du bulbe les quatre dernières enveloppes fusionnent, si bien qu'il est impossible de les discerner.

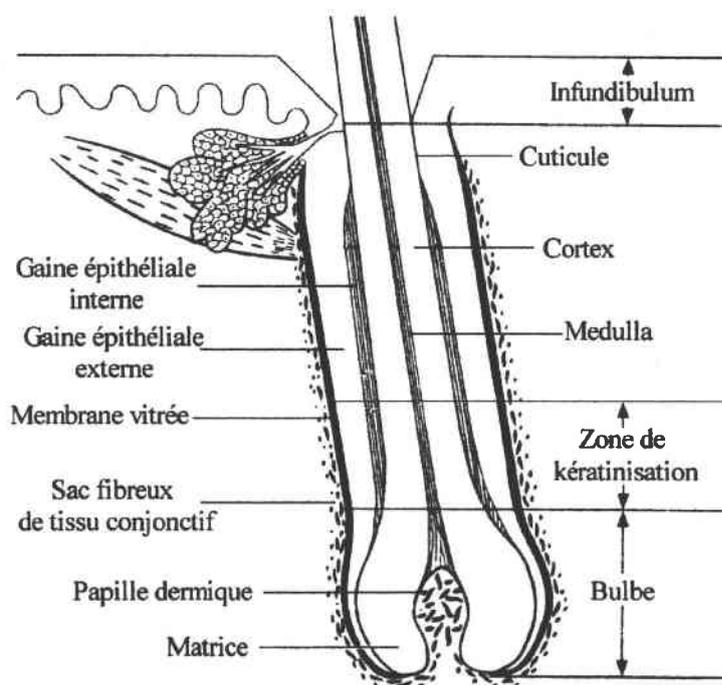


Figure 2 : diagramme d'un follicule pileux [3].

Pendant la phase de croissance du poil, la papille dermique richement vascularisée est entourée de cellules matricielles hyper-actives auxquelles se

mêlent des mélanocytes. Ces derniers élaborent des pigments avant de les confier aux cellules matricielles. Au fur et à mesure qu'elles pénètrent dans la zone de kératinisation, elles s'enrichissent en tonofilaments¹, en desmosomes² et en granules de trichohyaline³. Les quatre couches intérieures deviennent clairement identifiables. Leurs cellules vont se déshydrater, perdre leur noyau cellulaire et achever ainsi leur kératinisation, tout en progressant vers la surface.

La membrane vitrée est une membrane basale épaisse. Elle sépare le sac fibreux de tissu conjonctif entourant le follicule pileux de la gaine épithéliale externe. Cette dernière est une invagination de l'épithélium de surface, qui ne participe pas à la formation du poil.

La gaine interne se développe à partir de cellules matricielles peu kératinisées. Elle disparaît au niveau des canaux des glandes sébacées laissant un espace autour du poil : l'infundibulum. C'est dans cette zone que le sébum sera excrété, mais on y trouve aussi des cellules épithéliales desquamées ainsi que de nombreux micro-organismes. Cette gaine interne est formée de plusieurs couches. L'une d'entre elles, la cuticule, est constituée d'une seule série de cellules épithéliales imbriquées les unes dans les autres à la manière des tuiles d'un toit, leurs bords libres orientés vers le bas. Cette disposition particulière permet l'amarrage de la tige pileuse, qui elle-même se divise en trois zones : la cuticule, le cortex et la médulla.

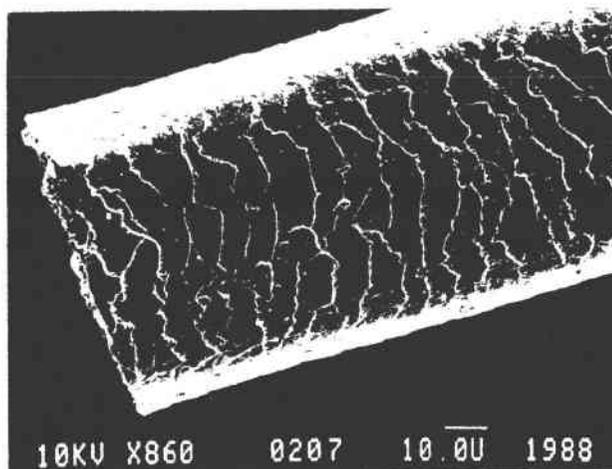


Figure 3 : photographie en microscopie à balayage des écailles formées par la cuticule de la tige pileuse.

La cuticule du cortex est constituée d'une mono-couche fine (épaisseur de 0,5 à 1µm) de cellules kératinisées. Chacune d'elles peut se diviser en trois zones de l'extérieur vers l'intérieur de la tige : la couche « A », l'exocuticule et l'endocuticule. Elles sont disposées comme celles de la gaine interne mais leurs extrémités sont cette fois dirigées vers le haut (comme des écailles : figure 3).

¹ Tonofilaments : fibrilles intracellulaires.

² Desmosome : jonctions adhérentes qui assurent mécaniquement la cohésion des cellules.

³ Granules de trichohyaline : granulations denses, basophiles.

Cet arrangement explique la difficulté d'arracher un cheveu sans entraîner une partie de la gaine épithéliale de la racine (figure 4). Grâce à sa kératine¹ « dure » la cuticule joue un rôle de protection contre les attaques du milieu extérieur. Elle peut cependant être endommagée au cours du temps par les produits chimiques, la chaleur, la lumière et les agressions mécaniques. Ce qui explique des pointes de cheveu effilées ou fourchues.

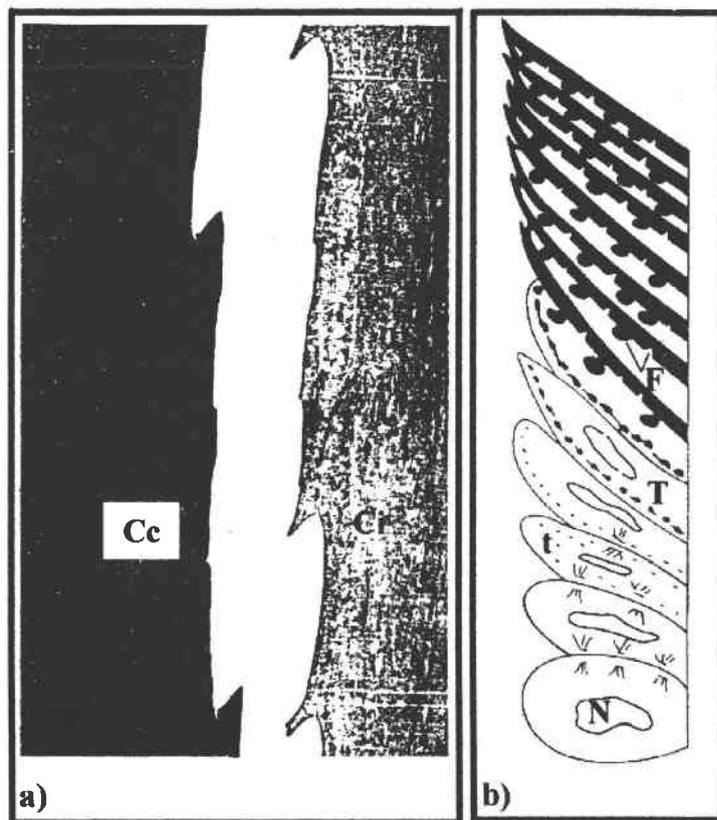


Figure 4 : a) photographie du système d'amarrage entre la cuticule de la tige pileuse (Cc) et la cuticule de la gaine épithéliale interne (Ci), X 4225, b) schéma de la kératinisation des cellules de la cuticule de la tige pileuse [4] (N : noyau, t : grains de trichoyaline, T : tonofilaments, F : bouton et invagination).

Le cortex représente la partie la plus importante du poil (environ 90 %). Il est constitué comme la cuticule de kératine « dure » formée de fibrilles liées entre elles par un ciment matriciel (voir II.3.2.). Des pigments de mélanine² sont présents à l'intérieur de ces cellules.

La médulla forme le cœur de la tige pileuse. Ses cellules subissent une kératinisation modérée contenant beaucoup moins de ponts soufrés, c'est pourquoi on parle de kératine « molle » par opposition à celle du cortex et de la cuticule. Elle contient des vacuoles qui sont peu à peu remplacées par des espaces remplis d'air. Ces interstices donnent un aspect plus sombre en

¹ Kératine : du grec keras (corne).

² Mélanine : du grec melas (noir).

microscopie du fait de la réfraction de la lumière. Cette partie centrale peut être continue, discontinue, voire inexistante dans les poils fins car c'est le vestige d'une structure isolant du froid. On y observe aussi la présence de mélanosomes¹.

I.1.2. Physiologie des sécrétions pileuses

Le follicule pileux est un organe vivant, dynamique, qui subit une activité cyclique. En effet, le cheveu passe alternativement par des phases de croissance, de repos et enfin de chute. Au cours de la vie d'un individu, il est capable de parcourir un nombre limité de cycles (figure 5).

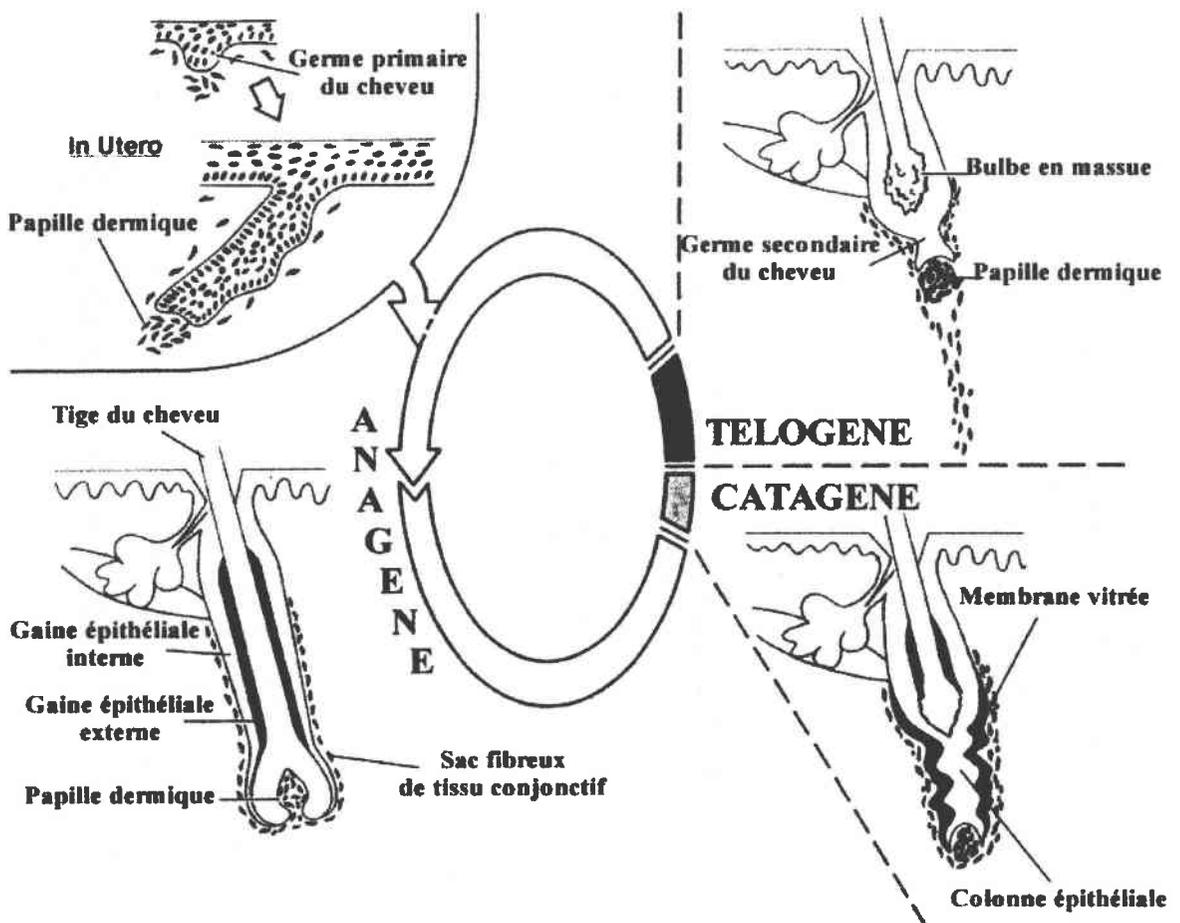


Figure 5 : cycle pileux [3].

Chez l'homme, l'évolution de chaque follicule pileux est autonome. Leurs phases d'activité et de repos ne sont pas simultanées, ce qui permet un renouvellement insensible et permanent de la population pileuse. La durée des différentes phases du cycle pileux subit l'influence de nombreux facteurs. Il en résulte d'importantes variations dans la vitesse de croissance des poils et des cheveux.

¹ Mélanosomes : grains de mélanine.

I.1.2.1. Le cycle pileux

Le cycle pileux peut donc se décomposer en trois phases : anagène, catagène et télogène (figure 5). Il est possible de préciser le stade du cycle grâce à un examen microscopique du bulbe pileux, arraché en même temps que la tige.

a) La phase anagène

C'est la période de croissance du cheveu. Elle est marquée par une intense activité mitotique des follicules pileux, seulement surpassée dans le corps humain par le tissu hématopoïétique¹. Cela explique sa sensibilité aux carences alimentaires et aux traitements médicamenteux comme la chimiothérapie. C'est aussi à ce moment que des éléments à l'état de trace ou des drogues pourraient être incorporés à la tige pileuse.

Elle dure en moyenne entre 2 et 3 ans, mais elle peut atteindre jusqu'à 7 ans chez certains individus. Ce laps de temps est aussi fonction de l'emplacement du follicule sur le corps ; il dure par exemple trois mois pour les sourcils. La phase anagène est donc le principal facteur qui limite la longueur maximum des cheveux.

Le pourcentage de follicules pileux dans cet état dépend du sexe, de l'âge et de son emplacement sur le corps :

- 83 % pour les cheveux d'un homme ;
- 88 % pour les cheveux d'une femme ;
- 90 % pour les cheveux d'un enfant ;
- 45 % pour les poils des jambes.

b) La phase catagène

C'est la phase pendant laquelle, sous l'action d'un signal dont la source et la nature sont encore mal connues, l'activité de la matrice s'interrompt. La mitose et la mélanogénèse s'arrêtent ; les poils deviennent plus fins et clairs, la papille se sépare du bulbe pileux. Elle dure environ 2 à 3 semaines et concerne moins de 1 % des cheveux.

c) La phase télogène

C'est une période de repos qui dure de 3 à 6 mois. Le cheveu maintenant complètement mort est condamné à tomber, son bulbe prend la forme caractéristique d'une massue. Il est progressivement délogé par un nouveau poil en phase anagène issu du même follicule.

On estime qu'un individu perd une centaine de cheveux par jour. Cette chute est plus importante d'octobre à décembre car un rythme saisonnier a été observé ; en effet le pourcentage de cheveu en phase télogène est maximum entre août et octobre.

¹ Tissu hématopoïétique : tissu de la moelle osseuse où se forment les cellules sanguines.

I.1.2.2. Croissance des poils et des cheveux [5]

Il est habituellement admis que le cheveu pousse de 1,2 cm par mois. Mais une valeur précise de sa vitesse de croissance est difficile à obtenir car de nombreux paramètres peuvent l'influencer.

a) Les facteurs génétiques

Nous avons déjà signalé que des modifications génétiques de la durée de la phase anagène pouvaient provoquer des variations importantes de la longueur maximum des cheveux entre deux individus. Des variations entre les races ont également été observées ; ainsi les personnes de type Caucasiens¹ ont des cheveux qui poussent plus vite que les Asiatiques.

b) Les facteurs hormonaux

La pousse pileaire est essentiellement sous commande hormonale. Les androgènes stimulent la pousse des poils sexuels, la production de sébum et la chute de certains cheveux. Les œstrogènes quant à eux ont l'effet opposé. Leurs présences en quantité différente dans l'organisme expliquent pourquoi les femmes ont des cheveux qui poussent en moyenne plus vite que ceux des hommes : 0,45 contre 0,44 mm/jour.

c) L'emplacement des poils et cheveux sur le corps

Dans ce paragraphe, nous nous contenterons de donner quelques exemples (tableau 1) qui montrent les variations de la vitesse de pousse de la tige pileaire en fonction de la position sur le corps du follicule pileux.

Emplacement sur le corps		Vitesse de pousse en mm/jour
Cheveux	Vertex	0,44
	Tempes	0,39
Poils	Poitrine	0,40
	Barbe	0,27
	Aisselle	0,42
	Pubis	0,20

Tableau 1 : vitesse moyenne de pousse des tiges pileaires d'un homme en fonction de leur localisation sur le corps [6].

d) Les facteurs nutritifs

La malnutrition perturbe la plupart des métabolismes, mais elle atteint surtout l'anabolisme² protidique, ce qui entraîne une

¹ Type caucasien : il comprend les Européens et Américains blancs, les Mexicains et les habitants du Moyen-Orient.

² Anabolisme : phase du métabolisme comprenant les phénomènes d'assimilation.

dégénérescence rapide du système pileux. Les poils et les cheveux poussent moins vite, deviennent plus fins, perdent leur pigmentation et tombent.

Les principaux composés dont la carence altère la croissance de la tige pileuse sont : les acides aminés soufrés (cystéine, cystine et méthionine), certains acides gras insaturés (acide linoléique, linoléique et arachidonique), les vitamines (A, C, B₅ et H) et les éléments comme le zinc ou le cuivre.

I.1.3. Composition de la tige pileuse

Après avoir détaillé dans les paragraphes précédents l'anatomie et la physiologie des cheveux, nous allons maintenant nous intéresser à leurs compositions. Une analyse grossière de la tige pileuse montre qu'elle est constituée de [6] :

- 85 à 93 % de protéines ;
- 4 à 13 % d'eau ;
- 2 à 3 % de lipides ;
- 0,23 à 0,80 % de cendres.

Cette composition souligne que les poils et les cheveux sont essentiellement constitués de protéines fibreuses insolubles : les kératines. Nous pouvons donc les considérer comme des polymères naturels complexes.

I.1.3.1. Les kératines [7]

Les kératines sont les principales protéines fibreuses assurant la protection externe des vertébrés. Elles constituent la presque totalité du poids sec des cheveux, mais aussi de la laine, des ongles, des plumes, des cornes et de la région externe de la peau.

L'unité de base de la sécrétion pileuse est donc une chaîne polypeptidique. La disposition la plus simple qu'elle peut adopter avec ses liaisons peptidiques rigides, est une structure hélicoïdale : nommée hélice α (figure 6). C'est une conformation stable, préférentielle car elle permet à des liaisons hydrogène de se former entre : l'atome d'hydrogène attaché à un atome d'azote de la liaison peptidique et un atome d'oxygène du carbonyle électronégatif du 4^{ième} aminoacide situé au-dessous de lui dans l'hélice. La formation de cette structure dépend de la composition en acides aminés de la kératine, mais surtout de leur enchaînement car certaines contraintes peuvent apparaître :

- répulsion électrostatique entre deux acides aminés dont la chaîne latérale est chargée ;
- encombrement de chaînes latérales adjacentes ;
- présence de résidus de proline qui sont des noyaux rigides et ne permettent pas la formation de liaison hydrogène intrachaine.

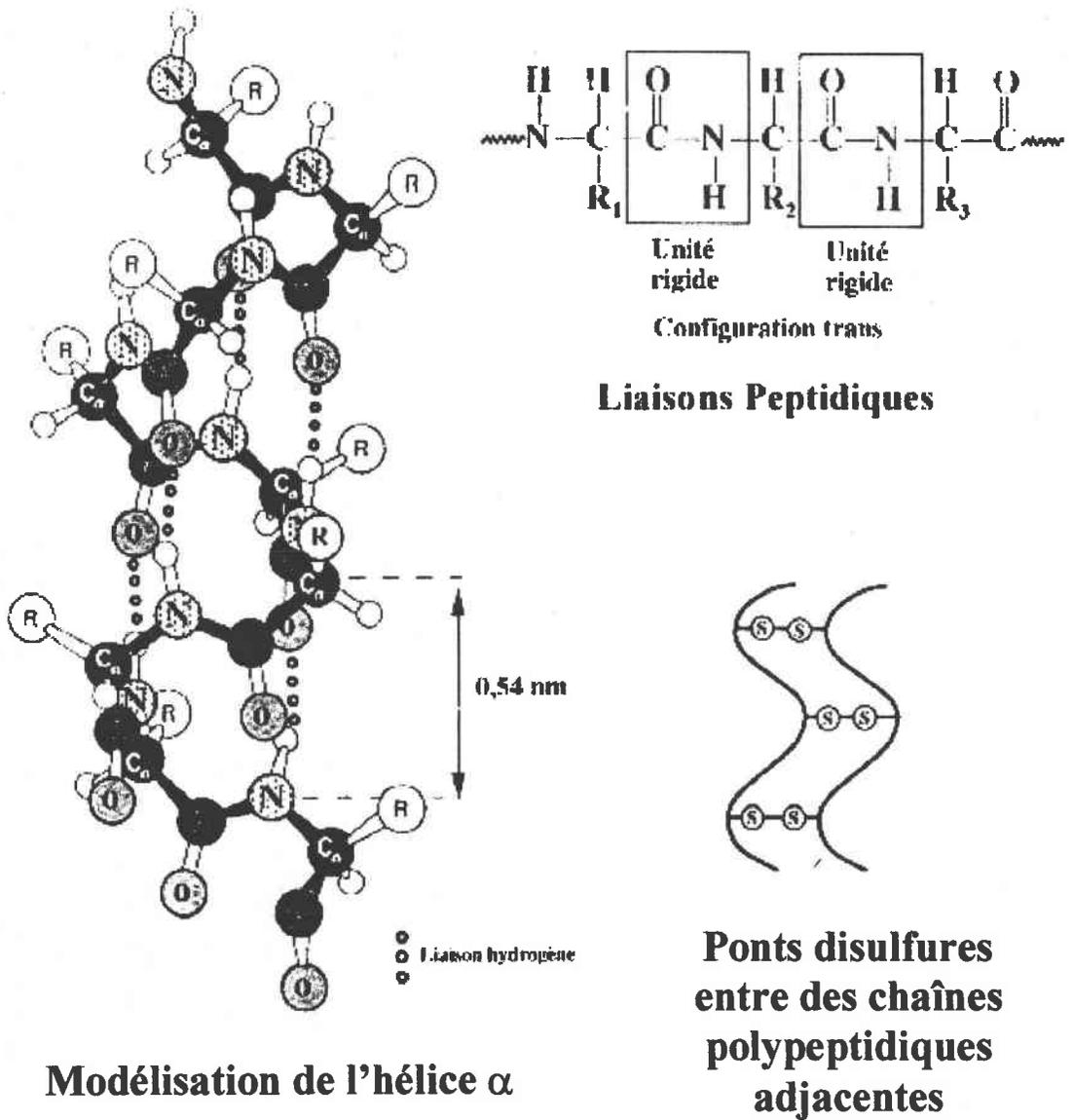


Figure 6 : représentation de l'hélice α , des liaisons peptidiques et des ponts disulfures [7].

L'insolubilité de ce type de protéine est en partie liée à la présence de nombreuses chaînes latérales hydrophobes exposées à l'eau, sur la zone externe des fibrilles. La grande puissance de cohésion et la résistance aux enzymes protéolytiques des fibres de kératine sont dues à leur richesse en résidus de cystine qui fournissent des liaisons covalentes (ponts disulfures) entre les hélices. Trois chaînes hélicoïdales α forment une structure en cordage à trois brins super-enroulés et onze de ces structures constituent une microfibrille (figure 7).

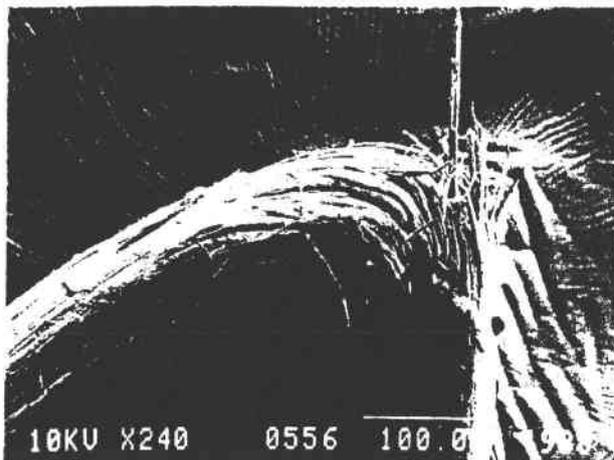


Figure 7 : photographie en microscopie à balayage des macro et microfibrilles du cortex d'un cheveu [8].

La présence de deux fois plus d'acides aminés à chaînes latérales acides que basiques confère une charge globalement négative au cheveu. Cela explique l'affinité des tensioactifs cationiques utilisés dans les shampooings pour sa surface.

I.1.3.2. Les lipides [9-11]

Les scientifiques ont remarqué que la composition des lipides extraits des cheveux à l'aide de solvants (chloroforme, méthanol, éthers de pétrole ...) était similaire à celle du sébum sécrété par les glandes sébacées [9]. Ce qui s'explique par le fait que la tige pileuse est constamment enduite à sa base par du sébum.

Cependant P.W. Wertz et D.T. Downing ont montré qu'une quantité significative de lipides (0,7 à 1,3 % du poids du cheveu) était étroitement liée au cheveu et nécessitait préalablement une hydrolyse alcaline des cheveux, car très résistante à l'extraction par des solvants [10, 11]. Ils représentent les véritables lipides constitutifs des cellules du cheveu (tableau 2).

Lipides	Quantité en mg/g de cheveu
Acides gras	4,0
Sulfate de cholestérol	2,9
Céramides ¹	0,6
Cholestérol	0,5
Alcools	0,1

Tableau 2 : composition des lipides constitutifs du cheveu [10].

Les acides gras sont constitués à 40,5 % de l'acide 18-méthyl-eicosanoïque (tableau 3). Ils sont très certainement liés à la surface des cellules par des liaisons esters ou thioesters, alors que le sulfate de cholestérol est plutôt

¹ Céramides : sphingosine (aminoalcool) liée à un acide gras par sa fonction amine [12].

sous la forme d'un sel insoluble. La composition des lipides constitutifs de la tige pileuse de nombreux mammifères est similaire.

Chaîne carbonée	Pourcentage (%)
14 : 0	0,8
15 : 0	0,4
16 : 0	18,3
16 : 1	1,9
17 : 0 ra	5,5
17 : 0	1,9
18 : 0	7,0
18 : 1	3,9
19 : 0 ra	7,3
19 : 0	0,2
20 : 0	3,5
21 : 0 ai	40,5
Autres	8,8

Tableau 3 : composition en acides gras [10], ra : ramifié, ai : anteiso.

I.1.3.3. Les pigments

Les pigments du cheveu, comme ceux de la peau sont constitués de polymères biologiques : les mélanines. Leur quantité n'en fait pas l'élément majoritaire de la tige, mais c'est par contre l'un des plus visible car il donne aux poils et aux cheveux leur couleur.

Les mélanines sont produites sous forme de mélanosomes par les mélanocytes de la matrice du follicule pileux. Ils sont formés d'un squelette de protéine recouvert de mélanine [13]. Cette protéine a une composition différente de la kératine. Dans son état natif, elle serait chargée positivement ce qui favoriserait la fixation des mélanines possédant une charge négative [14]. Les grains de pigment migrent ensuite vers les cellules du cortex et de la médulla, où leur distribution est à l'origine de l'intensité de la coloration. Ils jouent un rôle de protection contre le rayonnement solaire ultraviolet.

Les différentes couleurs des cheveux sont dues à la présence de deux classes de mélanines (figure 8) :

- l'eumélanine responsable du brun et du noir a comme précurseur la tyrosine qui subit des transformations pour donner la dopa¹ puis le 5,6 dihydroxyindole;

- la phaeomélanine à l'origine du rouge et du jaune est formée à partir d'une réaction de condensation entre la dopa et la cystéine pour donner la cystéinyldopa.

¹ Dopa : 3,4-dihydroxyphénylalanine.

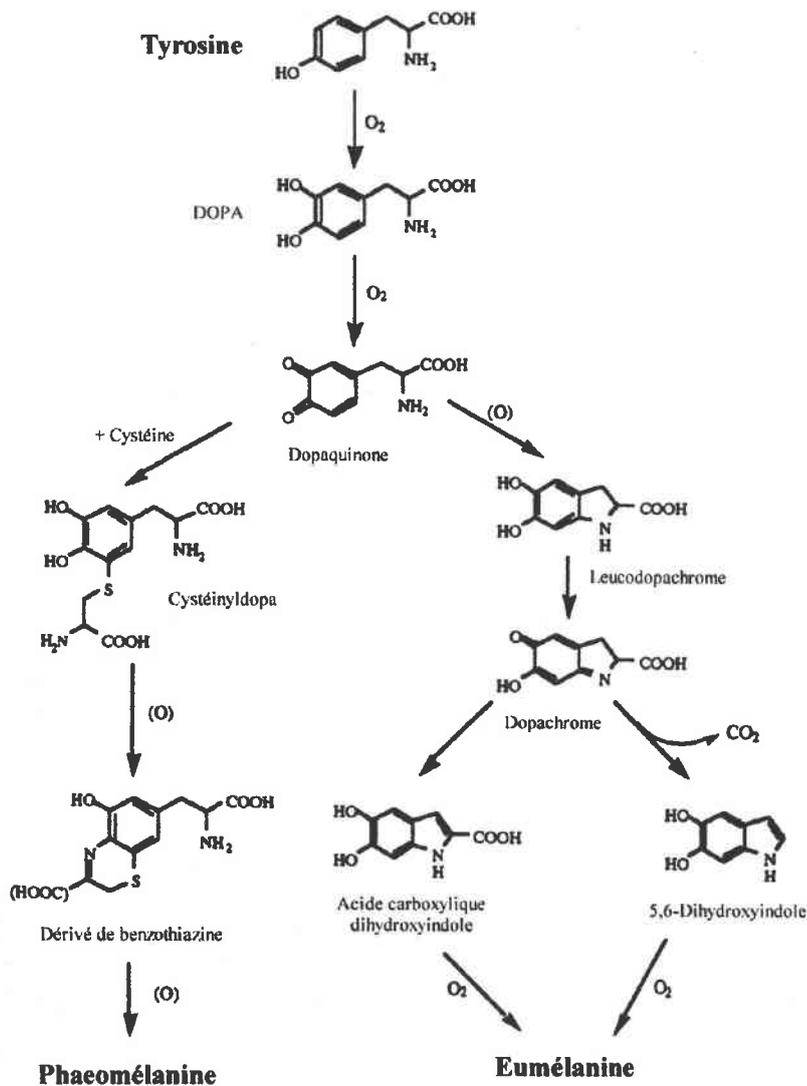


Figure 8 : synthèse de l'eumélanine et de la phaeomélanine.

Elles sont souvent associées à des cations divalents (calcium, magnésium, manganèse, fer, zinc et cuivre) qu'elles complexent [15-17].

L'albinisme s'explique par une interruption de la transformation de la tyrosine en mélanines. Alors que le blanchissement des cheveux est dû à une perte d'activité de la synthèse des mélanocytes à fabriquer la tyrosinase ou à un manque de cuivre.

I.1.3.4. Les cendres [6]

Les cendres sont les résidus de la combustion du cheveu. Elles sont constituées essentiellement d'éléments minéraux (Ca, Zn, P, Mg, K, Na, Cu...) et représentent moins de 1 % de la masse d'un cheveu. Il est difficile de déterminer si ces composés inorganiques proviennent d'une pollution externe ou d'une incorporation lors de la synthèse de la tige pileuse. Dans le cheveu, ils sont certainement liés par de liaisons ioniques salines ou sous forme de complexes,

avec les chaînes latérales des protéines ou avec les pigments. Nous verrons plus loin dans le chapitre qu'il est possible d'observer quasiment tous les éléments du tableau périodique dans le cheveu.

I.1.4. Propriétés physico-chimiques des poils et des cheveux [5]

La résistance aux agents mécaniques (charge de rupture et écrasement) est remarquable. Une chevelure de 100 000 cheveux pourrait soutenir un poids de 500 kg.

L'élasticité est une des propriétés essentielles de la tige pileuse. En dessous d'une certaine limite de traction ou de déformation, elle reprend sa longueur ou sa forme de départ. A sec, un cheveu peut être allongé de plus de 30 %, humide de plus de 100 %.

La résistance à la chaleur est faible ; la dénaturation induite après un certain seuil est irréversible. Cette déformation est maximale lorsqu'on applique au cheveu une chaleur humide qui rompt les liaisons hydrogène des protéines.

Les capacités d'absorption de l'eau sont très importantes. Près de 75 % du taux d'humidité maximum est obtenu après 4 minutes de contact avec l'eau. L'humidification augmente l'élasticité, induit des déformations en longueur et en diamètre de la tige pileuse (le crin de cheval a été utilisé dans la fabrication des premiers baromètres). Du fait de cette grande affinité pour l'eau, les produits en solution aqueuse peuvent pénétrer et imprégner les différentes parties du poil.

La résistance aux agents biologiques et notamment aux processus de putréfaction est très grande. Des mèches de cheveux ont été conservées intactes pendant des siècles ; c'est le cas par exemple de celles appartenant à des momies péruviennes du XII^e siècle ou à Napoléon Bonaparte.

La résistance aux agents chimiques est par contre moins importante. Si les poils et les cheveux résistent assez bien à l'action des acides, à froid, ils se montrent sensibles à l'action des bases, des oxydants ou des réducteurs. Ceux-ci modifient la cohésion de la structure des tiges pileuses en agissant sur les ponts disulfures de la kératine.

Les propriétés électriques varient avec l'état d'hydratation. Un cheveu mouillé devient conducteur du courant. La friction des cheveux détermine leur charge en électricité statique. Le pouvoir d'électrisation est variable suivant les individus.

I.2. Les glandes sébacées [1,2 et 8]

Le follicule pileux est toujours entouré par une ou plusieurs glandes sébacées. Elles sont présentes sur toute la surface du corps à l'exception de la paume des mains et de la plante des pieds. Leur nombre est plus important au niveau du crâne, des sourcils et de la barbe. Elles forment des grappes de type

acineuses. Chaque acinis¹ convergent vers un canal excréteur qui se déverse dans l'infundibulum. Les glandes sébacées sécrètent une substance grasse appelée sébum qui joue un rôle de protection contre le froid et la sécheresse de l'épiderme en limitant l'évaporation. Il serait aussi un bactéricide et un fongicide. L'activité des glandes sébacées est contrôlée par les hormones mâles ce qui explique une faible production avant la puberté pour les deux sexes puis, une sécrétion plus importante chez les hommes que chez les femmes.

Le sébum humain est essentiellement constitué de lipides [18] :

- des triglycérides (57,5 %), en partie hydrolysés en acides gras libres par des bactéries (jusqu'à 30 % des lipides recueillis à la surface de la peau : tableau 4). Cette hydrolyse est spécifique à l'espèce humaine ;
- des cires (26 %), composées de mono-esters d'acides gras et d'alcools à longues chaînes hydrocarbonées ainsi que des traces de diesters formés entre les acides gras et un alcanediol à longue chaîne ;
- du squalène (12 %), hydrocarbure aliphatique insaturé à 30 carbones ;
- du cholestérol libre (1,5 %) ou estérifié (3 %).

Longueur de la chaîne carbonnée	% total d'acides gras libres	% d'acides gras libres insaturés de cette chaîne
7	0,07	-
8	0,15	-
9	0,20	-
10	0,33	-
11	0,15	-
12	3,50	4
13	1,40	3
14	9,50	15
15	6,00	25
16	36,00	50
17	6,00	67
18	23,00	80
20	8,50	85
22	2,00	-
Résidu	4,00	-

Tableau 4 : composition en acides gras libre du cheveu [8].

Il ne faut cependant pas croire que la composition du sébum est uniforme, elle varie beaucoup en fonction des espèces animales [10, 19]. Chez l'être humain des modifications ont été observées en fonction de l'âge ; le taux de cholestérol et de squalène est ainsi plus faible chez les enfants que chez les adultes. Certains traitements capillaires peuvent aussi l'influencer ; ceux qui

¹ Acinis : du latin acinus (grain de raisin, baie).

contiennent par exemple du disulfide de sélénium ou du pyrithione de zinc augmentent la sécrétion de sébum et réduisent la microflore responsable de l'hydrolyse des triglycérides en acides gras libres.

I.3. Le muscle arrecteur du poil [1,2]

Il est fixé d'une part sur la gaine fibreuse des follicules, juste sous les glandes sébacées, et d'autre part il s'insère dans la couche papillaire du derme. La contraction du muscle se fait sous l'action de la peur ou du froid. Elle entraîne le redressement du poil (phénomène de «chair de poule») et elle augmente la sécrétion de sébum. Le premier effet à pour but chez l'animal de le faire paraître plus gros ou de le protéger du froid en emprisonnant une couche d'air. Le second limite les déperditions caloriques en recouvrant le corps d'un film gras.

I.4. Les glandes sudoripares [1,2,6]

Se sont des glandes cutanées que l'on trouve presque partout (3000/cm² sur la paume des mains). Elles sécrètent une solution aqueuse, hypotonique par rapport au plasma. La sueur contient outre des quantités importantes d'ions sodium, potassium et chlore, d'autres ions à l'état de traces (fer, cuivre...), de l'urée et des métabolites de faible masse moléculaire (tableau 5).

Constituants	Concentration dans la sueur (mg.l ⁻¹)	
	minimum	maximum
Chlorures	178	4680
Phosphates	400	800
Calcium	1	240
Potassium	150	1260
Sodium	69	3120
Urée	30	1500
Ammoniaque	9	160
Acide lactique	700	3000
Protéines	200	770
Glucose	120	200
Acide pyruvique	6	70
pH	4,00	8,00

Tableau 5 : constituants principaux de la sueur [6].

Cette sécrétion sudorale peut être considérée comme un mode mineur d'excrétion. Par son évaporation, elle joue un rôle important dans la

thermorégulation du corps. Sa production est stimulée non seulement par une température excessive mais également par la sensation de peur.

I.5. Les glandes apocrines [1,2]

Elles siègent essentiellement dans les régions axillaires et génitales. Elles produisent une sécrétion laiteuse et épaisse, qu'elles déversent dans l'infundibulum du follicule pileux. Cette substance devient odorante après action des bactéries commensales¹ de la peau. Les glandes apocrines deviennent fonctionnelles à la puberté. Leur contraction peut être provoquée lors d'excitations ou d'émotions.

II. Techniques d'analyse des poils et des cheveux

Un grand nombre de techniques d'analyse est utilisé pour étudier les cheveux et les poils. Nous allons essayer de rassembler dans la suite de ce texte les informations obtenues à partir de ces techniques, qui peuvent être exploitées lors d'enquêtes de police ou d'études toxicologiques.

II.1. Analyse morphologique

La microscopie est certainement la technique d'analyse du cheveu la plus rapide et la moins chère, mais c'est aussi l'une des plus discutée. Elle a d'ardents défenseurs comme B.D. Gaudette [20], mais elle en laisse d'autres plus dubitatifs comme J. Robertson [21].

Il n'empêche que c'est l'étape préliminaire à toute expertise, car elle permet de savoir si la fibre découverte sur le lieu du délit est bien un poil ou un cheveu. Il suffit pour cela de procéder à une analyse morphologique grossière, qui consiste à observer quelques-uns de ses aspects comme la présence d'une racine, d'un canal médullaire ou d'écailles. Pour un échantillon présent en quantité importante, il est possible de confirmer rapidement l'origine synthétique des fibres, en brûlant l'extrémité de l'une d'elles avec une flamme. En effet la manière de brûler, la couleur de la fumée et l'odeur dégagée sont généralement très différentes de celles d'un polymère naturel riche en cystine comme le cheveu.

Si le cheveu ou le poil possède une racine, la deuxième étape consiste à la regarder avec plus d'attention. La détermination de la phase du cycle pileaire (anagène, catagène et télogène) dans laquelle le cheveu se trouvait avant sa chute, est importante (figure 9 [22]).

¹ Commensale : parasite.

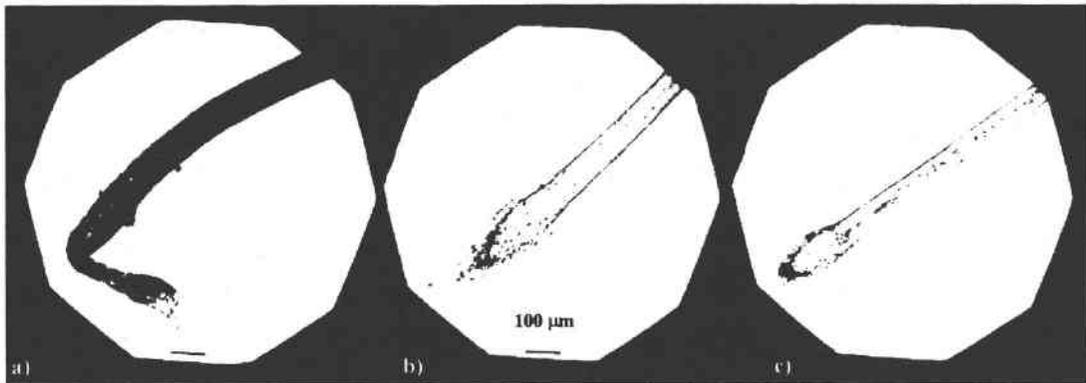


Figure 9 : photographies de racines de cheveux dans différentes phases du cycle pileux : a) anagène, b) catagène, c) télogène [22].

Au stade anagène la racine est déformée, les pigments sont présents sur toute sa longueur. Elle est accompagnée habituellement d'une partie de la gaine épithéliale et de la membrane vitrée, car le cheveu a dû être arraché pour tomber. L'analyse rapide de ces cellules épithéliales rend possible la détermination du groupe sanguin, du sexe, de l'activité enzymatique et même de l'empreinte génétique de son propriétaire. La phase catagène est une étape intermédiaire pendant laquelle la racine du poil perd sa pigmentation et commence à prendre la forme d'un bulbe. Enfin lors de l'étape télogène, la racine présente une forme caractéristique en massue, sans pigment et avec une diminution du diamètre de la tige. Dans tous les cas, la présence d'une racine est importante car elle permet l'analyse de l'ADN nucléaire¹ (empreinte génétique). La qualité des résultats dépendra de la rapidité avec laquelle l'expertise sera effectuée, car le matériel génétique est fragile.

L'étape suivante consiste à caractériser les échantillons par une analyse microscopique fine des caractères morphologiques. Le tableau 6 extrait d'une publication de B.D. Gaudette [20] et présenté ci-dessous, donne une vision exhaustive des critères de comparaisons utilisés.

Groupe	Caractère	Type	N°
A	Couleur ^a	Gris	1
		Jaune	2
		Jaune brun	3
		Rouge	4
		Brun	5
		Noir	6
B	Densité des pigments ^b	Absente	7
		Eparse	8
		Légère	9
		Moyenne	10
		Forte	11
		Opaque	12

¹ ADN nucléaire : acides désoxyribonucléiques du noyau cellulaire.

C	Taille des pigments^f	Fine	13
		Moyenne	14
		Large	15
D	Distribution des pigments^a	Uniforme	16
		Périphérique	17
		Autour de la médulla	18
		D'un côté	19
		En amas	20
		Grisée	21
E	Texture du cortex^b	Fine	22
		Moyenne	23
		Epaisse	24
F	Traitement^a	Non visible	25
		Coloration	26
		Décoloration	27
G	Médulla^a	Absente	28
		Continue et opaque	29
		Continue et translucide	30
		Continue, opaque et translucide	31
		Fragmentaire et opaque	32
		Fragmentaire et translucide	33
H	Diamètre maximum^b	Fin (< 0,04 mm)	35
		Moyen (0,04-0,08 mm)	36
		Epais (> 0,08 mm)	37
		< 0,167	38
		0,167-0,250	39
I	Indice médullaire^b	> 0,250	40
		Diamètre constant	41
		Faible variation du diamètre	42
J	Tige^b	Large variation du diamètre	43
		Brusque variation	44
		Plates	45
K	Ecailles de la cuticule^c	Légèrement dentelées	46
		Dentelées	47
		Présentes	48
L	Vacuoles^c	Absentes	49
		En bulbe	50
M	Racine^a	En ruban	51
		Pointe^b	52
N	Pointe^b	Effilée naturellement	53
		Coupée depuis moins de 7 jours	54
		Coupée depuis environ 14 jours	55
		Coupée depuis environ 21 jours	56
		Coupée depuis environ 28 jours ou plus	57
		Arrondie et effilée	58
		Divisée et effilée	59
		Ecrasée	59

O	Longueur^b	< 2,5 cm	60
		2,5 à 7,6 cm	61
		7,6 à 15,2 cm	62
		15,2 à 30,4 cm	63
		> 30,4 cm	64
P	Nombre d'écailles^c	Serré (> 26 pour 0,2 mm)	65
		Moyen (22 à 26 pour 0,2 mm)	66
		Large (< 22 pour 0,2 mm)	67
Q	Contour de la section^b	Rond	68
		Elliptique	69
		Ovale	70
		En rein	71
		Triangulaire	72
R	Section de la cuticule^c	Large	73
		Moyenne	74
		Etroite	75
S	Couleur de la section^a	Grise	76
		Jaune	77
		Jaune-brun	78
		Rouge	79
		Brune	80
		Noire	81
T	Densité de pigments de la section^b	Absente	82
		Faible	83
		Moyenne	84
		Forte	85
		Opaque	86
U	Taille des pigments de la section^c	Fine	87
		Moyenne	88
		Large	89
V	Distribution des pigments de la section^c	Uniforme	90
		Périphérique	91
		Autour de la médulla	92
		D'un coté	93
		En amas	94
W	Texture de la section du cortex^a	Homogène	95
		Granuleuse	96

Tableau 6 : tableau des caractères morphologiques de comparaison des cheveux et des poils [20]. a : caractère majeur, b : caractère mineur si leurs numéros se suivent sinon majeur, c : caractère mineur.

Une exploitation efficace de tous ces critères nécessite de l'expérimentateur une grande habitude. Pour faciliter son observation au microscope, le cheveu peut-être emprisonné dans une résine [23, 24]. Malheureusement, cela n'est pas toujours possible, car le fixateur peut induire une pollution organique ou minérale du cheveu et empêcher ensuite son étude par d'autres techniques.

Nous allons maintenant donner quelques exemples d'informations apportés par l'analyse microscopique des cheveux ou des poils.

II.1.1. La couleur

La couleur est la première chose que l'on remarque. C'est cependant une notion difficile à décrire qui est fonction de la perception de l'individu. Un nouvel appareil, le chromamètre permet de définir la couleur des cheveux de manière objective selon trois axes (a^* , b^* , L^*) [25]. A chacun d'eux correspondent deux couleurs : +a rouge, -a vert, +b jaune, -b bleu, $L = 0$ blanc et $L = 100$ noir. Il nécessite cependant une surface de 5 mm^2 , mais des améliorations techniques sont envisageables dans un proche avenir, soit en réduisant la surface minimum d'analyse, soit en passant par l'intermédiaire d'un microscope et d'un traitement informatique. L'importance à donner à cette observation de la couleur est fonction de sa fréquence dans la population. Un roux naturel (quelques % de la population) ou une couleur bleu (à la mode actuellement) sera plus intéressant pour un policier que le brun qui est très courant.

Le cheveu humain ne subit pas naturellement de variation de couleur. Celle du côté de la racine est donc la teinte normale. Il existe différentes techniques pour déterminer si la coloration du cheveu est naturelle ou non. Le test avec du bleu de méthylène sur un cheveu blond ou blanc permet ainsi de le savoir. En effet, les traitements décolorants altèrent la cuticule protectrice du cheveu, qui laisse alors pénétrer le colorant. Ce type de cheveu reste teint en bleu même après un rinçage à l'eau (figure 10).

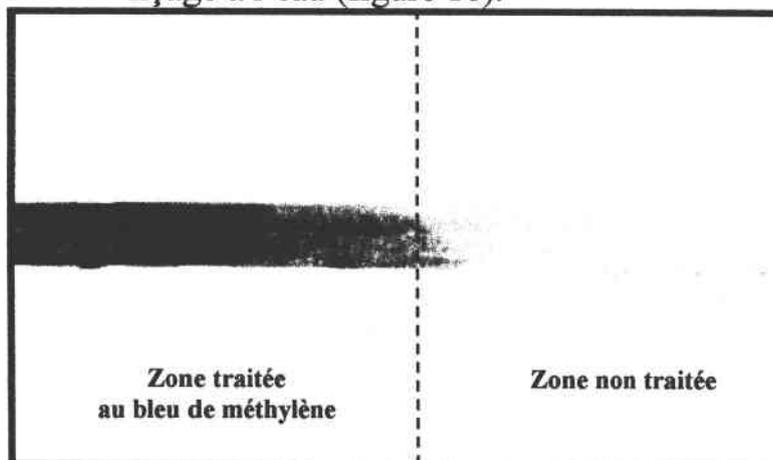


Figure 10 : photographie d'un cheveu décoloré, traité au bleu de méthylène et rincé à l'eau, x 89.

II.1.2. La morphologie

L'aspect de la pointe peut indiquer si la personne a été récemment chez un coiffeur. En effet, l'extrémité du cheveu sectionné s'arrondit au fur et à mesure que le temps passe. Une coupure à 90° est due à l'utilisation de ciseaux alors que celles causées par rasoir forme un angle de 45° . Une pointe effilée associée à une longueur courte ou moyenne est assez caractéristique d'un poil.

L'observation des écailles à un fort grossissement rend possible la visualisation de différents traitements capillaires (après shampooing, mousse, laque...), car ils modifient leur aspect et les rendent moins nettes [26].

L'empoisonnement par certains éléments minéraux (cadmium, thalium) provoquent la chute des cheveux. Leurs racines présentent alors un aspect particulier (figure 11) [8].

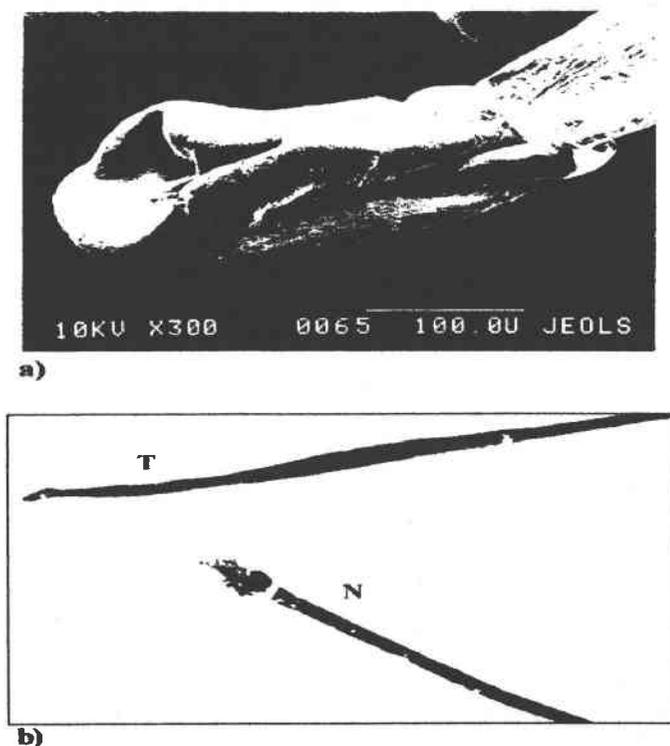


Figure 11 : a) photographie de la racine morte d'un cheveu exposé à du cadmium, b) photographie d'une racine saine (N) et celle pointue et conique d'une racine exposée au thalium (T) [8].

Des paramètres comme le diamètre, la longueur et l'indice médullaire¹(IM) fournissent quant à eux des informations sur l'origine de la tige pileaire [27] (tableau 7).

	Diamètre (μm)	Longueur (cm)	Indice médullaire (IM)
Poil du pubis	> 90	0,1-10	> 0,2
Cheveu	30 à 100	0,1 à plus de 30	0 à 0,2
Duvet	< 40	< 2	0

Tableau 7 : origine possible de la tige pileaire en fonction de son diamètre, de sa longueur et de son indice médullaire.

L'observation de la section du cheveu [28 et 29] et de ses écailles [30] apportent deux types d'informations : l'une sur l'aspect général du cheveu et l'autre sur l'ethnie possible de son propriétaire [2, 31 et 32]. Ainsi une section en

¹ Indice médullaire : $IM = \text{diamètre du canal médullaire} / \text{diamètre de la tige pileaire}$.

forme de rein et des écailles en chevrons sont associées à des cheveux frisés d'individus de type Négroïde ou à des poils du pubis. Les sections plutôt ovales sont liées à des cheveux ondulés et à des personnes de type Caucasien. Alors que les sections rondes correspondent à des cheveux raides et à des individus de type Mongoloïde¹ (figure 12).

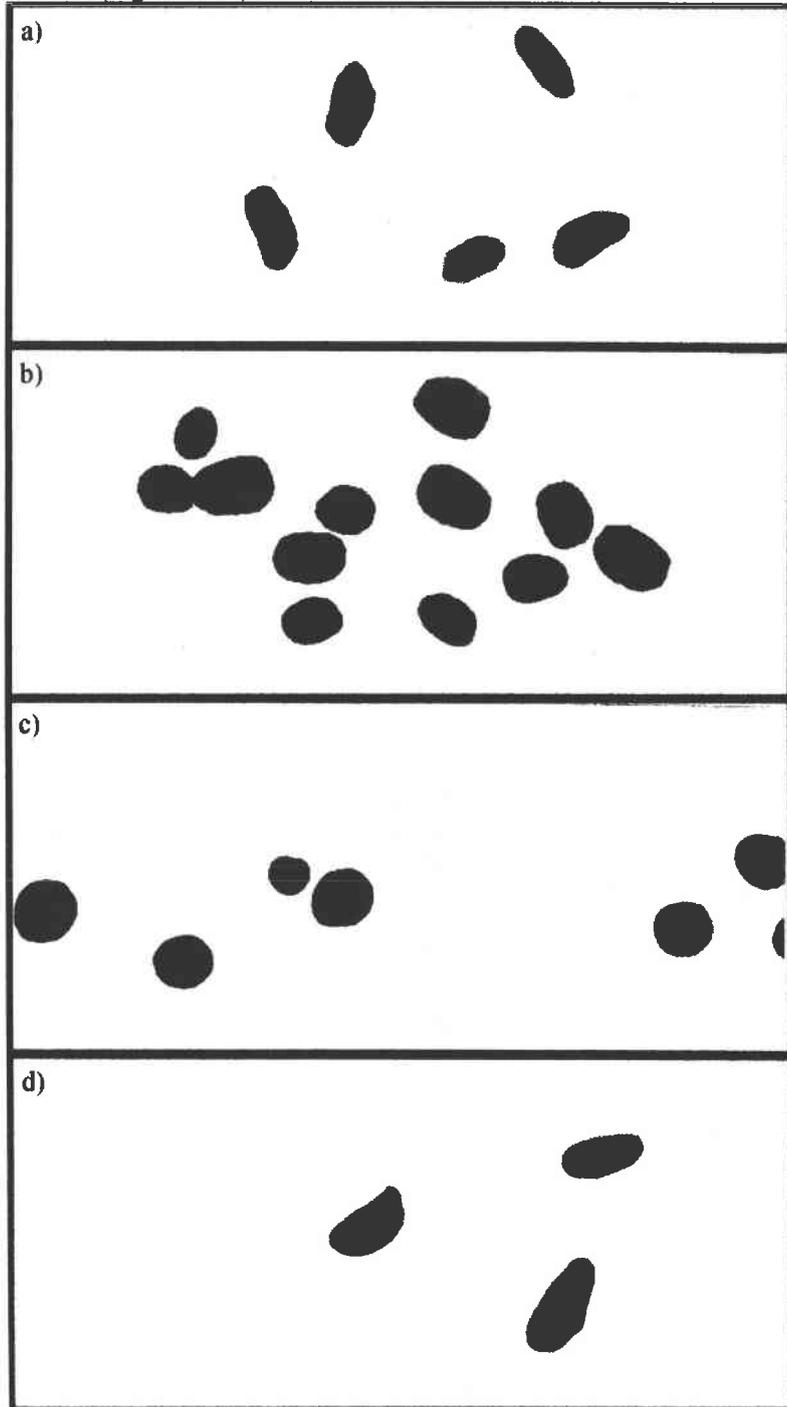


Figure 12: photographie de la section de différents types de cheveux, a) Africain, b) Caucasien, c) Asiatique et d) poil de type Caucasien (x 89).

¹ Mongoloïde : regroupe les Asiatiques et les Indiens d'Amérique.

L'analyse de la tige pileaire peut mettre en évidence des affections du cheveu [33] : bulles, nœuds (trichonodosis), aspect en bambou (trichorrhexis invaginata)...

II.1.3. Les poils d'animaux

Les caractères morphologiques permettent aussi de différencier un cheveu humain d'un poil animal. L'indice médullaire humain est toujours inférieur à 0,3 [34]. L'aspect du canal médullaire (treillis, échelle, globulaire...), des écailles (mosaïque, chevron...), de la forme de la racine ainsi que de la coloration (continue, discontinue, intermittente) peuvent être caractéristiques d'une espèce [35-38] (figure 13). Des études plus approfondies ont montré qu'il était possible de caractériser par microscopie des poils de chien, de races différentes [39], mais aussi de plusieurs individus d'une même race [40].



Figure 13 : photographies de canaux médullaires de : a) cerf, b) rat musqué, c) vison, d) raton laveur, e) phoque, f) lapin et d'écailles de : g) lapin et h) renard (l'échelle noire égale 20 μm) [35].

II.1.4. Conclusion

Ces quelques exemples montrent bien l'intérêt de l'analyse morphologique. Bien entendu la valeur du caractère discriminant de toutes ces informations est très variable. Même si prises individuellement elles ne sont pas très importantes, mises bout à bout elles peuvent en relation avec celles obtenues par les enquêteurs, réduire de manière significative le champ des investigations. Il faut pour cela bien connaître la morphologie et la physiologie des cheveux, le mode de vie des suspects et surtout confronter les différents résultats.

II.2. Résultats statistiques de la comparaison des cheveux et des poils. [20, 41-52]

La première question posée par un juge à un expert qui analyse des cheveux dans un but criminalistique, concerne l'importance à donner aux informations ainsi obtenues. Autrement dit, qu'elle est la probabilité que deux cheveux déclarés « identiques » appartiennent à une seule et même personne.

Si de nombreux travaux ont été réalisés pour essayer de caractériser le cheveu dans un but discriminant, peu ont été consacrés à une véritable étude statistique. Les seules publications concernant ce sujet ont été basées sur les analyses macro et microscopiques de cheveux.

En 1974 B.D. Gaudette et E.S. Keeping [20], observent des lots d'une centaine de cheveux provenant de cent individus différents de race Caucasienne. Après un premier tri macroscopique, ils définirent pour chaque lot entre 6 et 11 cheveux représentatifs (les standards). Ceci, afin d'alléger le travail de comparaison entre cheveux. Après une analyse comparative des standards (861 cheveux en tout), seul neuf paires ont été trouvées indiscernables sur les 366 630 comparaisons effectuées. Ils en ont conclu que la probabilité (P), pour qu'un cheveu choisi au hasard sur un individu A, soit identique à au moins un cheveu appartenant au standard d'un individu B (en moyenne 9 cheveux différents), était de $1/4500$ ($P = 1 - (1-p)^n$ avec $n = 9$ et $p = 9/366\ 630$). Deux ans après, B.D. Gaudette [41], effectua une étude du même type sur des poils de pubis de 60 individus de race caucasienne. Il arriva à une probabilité de $1/800$. Il y remarque aussi que les caractères étudiés sont moins variables pour des cheveux de race Africaine ou Asiatique. La probabilité d'avoir deux cheveux indiscernables doit donc être plus forte. Malgré cela, P. Lamb et L.G. Tucker [42] ont montré qu'il était possible d'utiliser l'analyse morphologique discriminantes sur une population Afro-Antillaise.

Suite à ces deux premiers travaux, B.D. Gaudette [43] décide de montrer la faisabilité de sa technique, en formant trois stagiaires pendant un an. Il leur demanda de trouver dans un lot de cent cheveux d'individus différents, celui correspondant à un standard. Les résultats furent positifs, puisque les trois examinateurs trouvèrent entre deux et trois cheveux pouvant lui être associés,

dont à chaque fois le bon. De même, dans une publication, R.A. Wickenheiser et D.G. Hepworth [44], ont indiqué que tous les cheveux que leurs expérimentateurs avaient considérés comme indiscernables lors d'analyses, provenaient bien de mêmes individus, mais toutes les associations possibles n'étaient pas faites.

En 1982, P.D. Barnett et R.R. Ogle [45] critiquèrent les probabilités données. Ils soulevaient quatre points : la validité de l'application à la vie réelle, l'influence de certaines informations sur l'examineur, l'utilisation d'un système de carte code pour le pré-tri, et le traitement statistique des données. Dans la même revue, B.D. Gaudette [46] répondait à ses détracteurs et clarifiait ces quatre objections. Pas suffisamment cependant, en ce qui concerne l'influence d'informations sur l'expérimentateur, selon R.A. Wickenheiser et D.G. Hepworth [44]. Ils proposèrent comme solution de laisser le chercheur dans l'ignorance du nombre d'individus sur lequel a été prélevé le lot de cheveux à comparer au standard (plusieurs cheveux peuvent ainsi provenir d'une même personne). En 1987, C.G. Girdwood Aitken et J. Robertson [47] indiquaient qu'il fallait être très prudent dans l'utilisation de ces résultats, car fortement dépendant de la technique, de l'habileté de l'examineur et du fait d'un traitement statistique des données à leur avis limité (il ne tient pas compte par exemple du pourcentage de chaque type de cheveux formant le standard).

Si il est maintenant reconnu qu'une personne perd environ une centaine de cheveux par jour, ses modes de transferts restent encore mal connus. B.D. Gaudette en 1987 [48] a effectué un travail qui résume ce qui a déjà été écrit sur ce sujet. Il y apporte de nouvelles informations, comme la prépondérance du transfert secondaire des cheveux lors d'une lutte. Le cheveu perdu de cette manière ne provient pas directement d'une tête, mais par exemple d'un vêtement où il est resté accroché. Il peut même ne pas appartenir à celui qui l'a perdu sur le lieu du délit. Ainsi, après une simulation d'assaut, 80% des cheveux marqués par fluorescence et déposés sur la veste de l'agresseur ont été transférés (8,5% à un autre endroit sur le vêtement, 16% sur la victime, et 65% sur le sol). C.M. Ashcroft, S. Evans et I.R. Tebbett [49] ont, quant à eux, étudié la persistance de fibres acryliques ou de laines (d'un masque de carnaval par exemple) sur les cheveux d'un individu. Ils détectent leur présence jusqu'à six jours après la contamination si les cheveux n'ont pas été lavés. Cette persistance a été confirmée par M.T. Salter et R. Cook [50].

En conclusion, tous ces travaux et d'autres [51, 52], ont souligné à la fois les limitations et les possibilités de l'observation microscopique du cheveu en criminalistique. L'exploitation des rares données statistiques (une chance sur quatre mille cinq cents de trouver un cheveu de type Caucasien pris au hasard sur un individu A identique à au moins un cheveu du standard d'une personne B

par exemple) reste liée à la seule utilisation d'une analyse microscopique minutieuse. On peut penser que d'autres techniques complémentaires pourraient augmenter leur fiabilité et leur sensibilité. En attendant, leur utilisation demande de la part de l'examineur beaucoup de circonspection et un certain nombre de précautions lors de l'analyse :

- les lots doivent être constitués d'une centaine de cheveux entiers (racines et pointes) provenant de cinq endroits différents sur la tête, pour avoir un panel représentatif d'un individu (victimes et suspects). On effectue après, un pré-tri macroscopique (couleur, taille, diamètre, forme...), afin de séparer pour chacun des lots une dizaine de cheveux différents qui formeront le standard ;

- l'examineur doit être expérimenté, procéder par exclusion des cheveux comparés un par un. Il effectue la totalité de l'analyse statistique ;

- ces critères de comparaison doivent être le plus proche possible de ceux utilisés par B.D. Gaudette et se faire sur toute la longueur du cheveu.

En tout état de cause, la spécificité de l'analyse microscopique du cheveu pour la criminalistique en terme statistique, peut-être considérée comme moins bonne que les empreintes digitales et génétiques, mais meilleure que le système ABO du sang.

II.3. Analyse des caractères uniquement liés aux gènes

Dans les paragraphes qui vont suivre, nous allons détailler les caractères uniquement liés aux gènes observés à partir des cheveux (l'ADN, le sexe, les groupes sanguins et les enzymes). Pour la plupart, leur caractérisation nécessite : un minimum de contaminations pendant le prélèvement, un stockage dans un milieu sec et froid, et des analyses rapides, car se sont des matériaux biologiques très fragiles.

II.3.1. Les Acides Désoxyribonucléiques (ADN)

Chaque individu diffère de son voisin par des caractères morphologiques, biologiques, etc...

Ces différences sont portées par la molécule de l'hérédité : l'ADN. Ces acides nucléiques sont des polymères constitués d'unités appelées nucléotides qui peuvent être hydrolysés en trois constituants : base hétérocyclique azotée (Adénine, Thymine, Guanine et Cytosine), désoxyribose et acide phosphorique. La molécule d'ADN est formée de deux chaînes polydésoxyribonucléotidiques enroulées pour former une double hélice. Elles sont liées entre elles par des liaisons hydrogène entre les bases complémentaires Adénine, Thymine et Guanine, Cytosine (figure 14) [53].

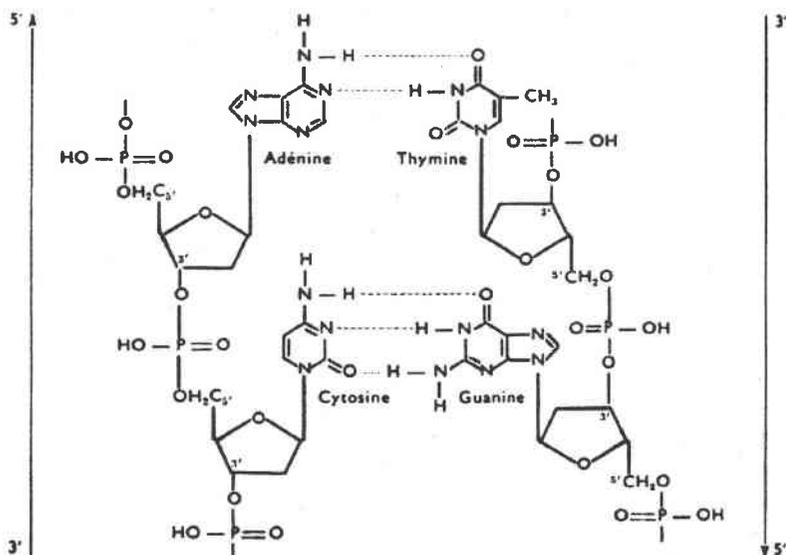


Figure 14 : liaisons hydrogène entre les paires de bases complémentaires d'un fragment de molécule bicatenaire d'ADN [53].

L'ADN est constitué de zones codantes (gènes) qui sont séparées par des régions non codantes, redondantes. Dispersées dans ces portions redondantes du génome, de courtes séquences d'ADN sont répétées en tandem un nombre hypervariable de fois d'un individu à l'autre ; ce sont les « minisatellites » ou VNTR (variable numbers of tandem repeats). Ces séquences répétées, séparées par électrophorèse en fonction de leur taille, puis révélées, constituent les empreintes génétiques caractéristiques des individus.

L'ADN est présent principalement dans le noyau (ADNn) des cellules mais aussi dans les quelques centaines de mitochondries (ADNmt) qui leur servent d'usine énergétique. Cet ADNmt est plus petit que l'ADNn, il présente donc moins de variations. De plus, c'est un ADN hérité uniquement de la mère. Sa caractérisation sera donc moins utile à l'occasion d'affaires impliquant une famille (impossibilité de différencier des individus de la même lignée maternelle). L'analyse de l'ADNmt s'est cependant avérée intéressante lors de l'expertise de neuf squelettes retrouvés à Ekaterinburg (Russie). En effet, elle a permis d'associer ces corps à ceux du Tsar et de sa famille exécutée pendant la révolution [54].

II.3.1.1. Les techniques d'analyse [55-61]

Si l'échantillon est trop dur (dent, os), il est préalablement réduit en poudre. Puis il est placé pendant une nuit ou plus, dans un tampon d'extraction contenant entre autres, une protéinase. Après centrifugation, l'ADN extrait est rincé. Il est alors dénaturé sous l'action de la chaleur, c'est à dire que les deux brins de la double hélice d'ADN sont séparés. Il est maintenant possible de mettre en évidence une séquence particulière grâce à un ADN de référence qui

se liera sur son complémentaire. Nous parlerons alors de sonde (technique de Southern) ou d'amorce (analyse par amplification).

Ensuite, le type d'analyse utilisée va dépendre de la quantité et de la qualité de l'ADN ainsi que la rapidité avec laquelle l'analyse doit être effectuée :

- si l'ADN est en bon état, en quantité suffisante (plus de 25 ng) [61] et si les résultats de l'analyse ne sont pas urgents (une semaine), la technique utilisée sera la RFLP (Restriction Fragment-Length Polymorphism). Elle consiste à fragmenter directement l'ADN par des enzymes de restriction¹, puis à séparer ces fragments par électrophorèse sur gel. Les bandes formées sont transférées sur une membrane (technique dite de Southern Blotting), mises en contact avec une sonde marquée radioactivement, rincées et révélées à l'aide d'un film.

- si l'ADN est détérioré, en faible quantité (1 à 2 ng) [61] ou si l'analyse doit être faite rapidement (48 heures), la technique utilisée sera l'analyse PCR (Polymerase Chain Reaction) d'amplification génique. Elle consiste en une répétition d'un cycle à trois étapes :

- dénaturation de l'ADN par chauffage (~ 90°C) ;
- hybridation (fixation) des amorces à chacune des deux extrémités de la séquence à amplifier (50 à 65°C) ;
- synthèse des nouveaux brins d'ADN en présence d'ADN Polymérase et de nucléotides (~70°C).

Après 20 cycles, le fragment d'ADN désiré est multiplié plus d'un million de fois. La détection peut se faire par incubation de ces fragments sur une membrane, où des sondes spécifiques ont été fixées en différents points. Si ces fragments se fixent sur l'une d'elles, ils seront détectés par coloration enzymatique. L'inconvénient de cette technique est sa sensibilité aux contaminations par des ADN étrangers (bactérien par exemple), elle nécessite donc un protocole très strict.

Le pouvoir discriminant (DP) sera donc fonction de la sonde utilisée et du degré de variabilité du minisatellite étudié (tableau 8). Il existe deux types de sondes : multilocus et monolocus. Les sondes multilocus sont capables de se fixer sur différents satellites, elles révéleront un plus grand nombre de bandes sur une empreinte génétique (figure 15). Elles sont donc plus discriminantes mais elles nécessitent un ADN non dégradé et présent en plus grande quantité que pour les sondes monolocus. Ces dernières ont des séquences de nucléotides plus longues, elles sont plus spécifiques et révèlent des empreintes plus simples. Il est possible de les utiliser sur de l'ADN altéré. Le pouvoir discriminant peut être amélioré en utilisant plusieurs sondes monolocus. Le choix de la sonde monolocus va dépendre de l'affaire traitée. Par exemple dans le cas d'une recherche en paternité, il faudra travailler avec une sonde qui a une faible

¹ Enzymes de restriction : enzyme qui coupe le brin d'ADN en des points particuliers.

variabilité allélique¹ dans la population (pour éviter des mutations entre génération) [56].

	Sonde multilocus	Sonde monolocus
- Nombre de bandes révélées	20	2
- Fréquence d'apparition d'une bande dans la population	Environ 25 %	Environ 2 % pour les plus polymorphes
- Probabilité que deux empreintes soient identiques	1 sur 1000 milliards	1 sur 2500

Tableau 8 : estimation de la probabilité d'avoir deux empreintes identiques à partir de sonde mono et multilocus [56].

Les loci les plus couramment étudiés sont le D1S80 et le (HLA) DQ α ; ils permettent ainsi, de réaliser des études statistiques et de créer des banques de données entre différents laboratoires et pays [61].

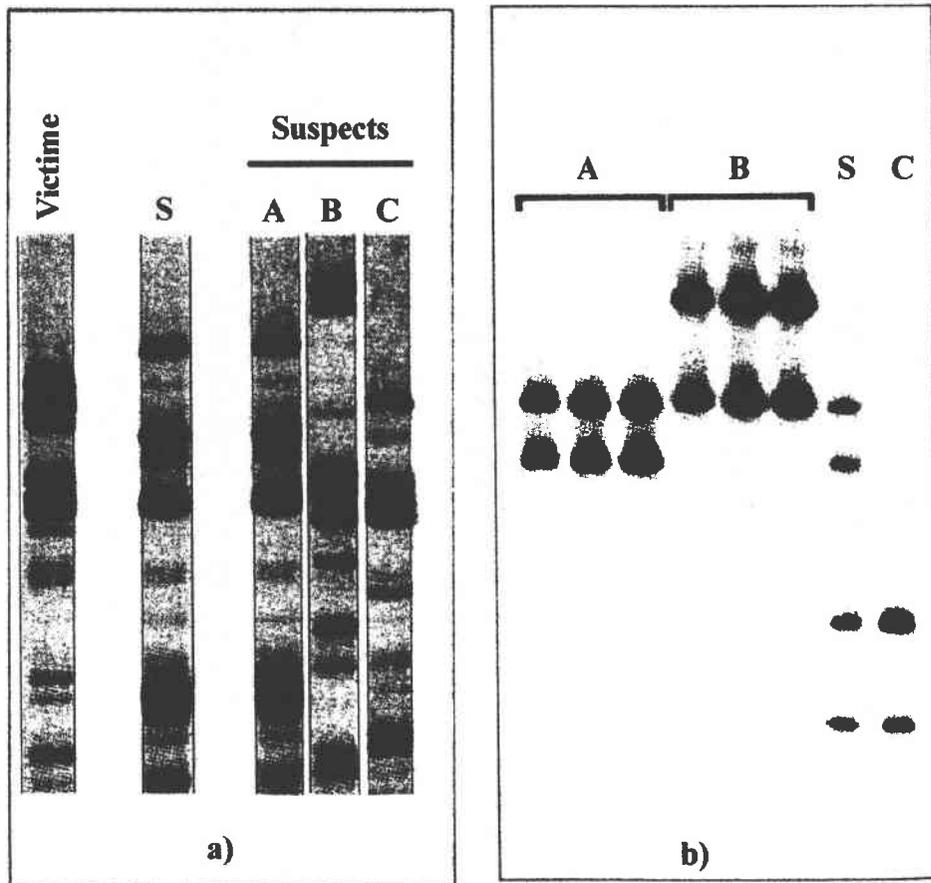


Figure 15 : empreintes génétiques (S : ADN inconnu. A, B, C ADN des suspects) obtenues à l'aide d'une sonde a) multilocus : A est le coupable b) monolocus : A et C sont les coupables (les trois séries de bandes pour A et B correspondent à l'analyse de sang, de sperme et de cheveu) [56].

¹ Allèle : gènes de même fonction et d'action dissemblable occupant la même place dans une paire de chromosomes.

II.3.1.2. Application au cheveu

Comme nous l'avons remarqué plus haut il existe deux sources d'ADN dans le cheveu : l'ADN nucléaire et l'ADN mitochondrial. Lors du processus de kératinisation des cellules de la tige pileuse, il y a destruction des organites cellulaires. La probabilité de retrouver de l'ADNn (unique et volumineux) intacte dans le cheveu sera plus faible que celle de l'ADNmt. L'analyse de l'ADNn se fera soit sur la racine des cheveux où la kératinisation n'est pas achevée, soit sur les cellules de la gaine épithéliale. Tandis que celle de l'ADNmt sera effectuée sur tout le cheveu.

Des publications ont montré qu'il était cependant possible d'extraire de l'ADN de haut poids moléculaire de tiges pileuses (> 250 mg) [55, 62]. La quantité d'ADN obtenue varie en fonction des espèces étudiées de 20 ng à 2 µg, ce qui est suffisant pour faire une analyse directe (RFLP). J. Kalbe et col. ont aussi mis en évidence que l'ADN détecté ne provenait pas des bactéries présentes à la surface des cheveux humains ; grâce à l'utilisation d'une sonde marquée d'origine humaine qui ne se fixait pas sur l'ADN bactérien [55].

Divers travaux ont montré qu'il était possible de détecter l'ADN mitochondrial et nucléaire d'un seul cheveu avec racine, grâce à l'amplification génique (PCR) [57, 63]. R. Uchihi et col. indiquent qu'ils obtiennent la même empreinte électrophorétique du locus (HLA) DQA1, entre les prélèvements de sang et de racine de cheveu de 12 individus. Les variations observées pour ce locus sont présentées dans le tableau 9. Par contre, seulement 3 analyses de tige pileuse ont correctement fonctionné. Ils expliquent que la mélanine extraite en même temps que l'ADN inhibe l'amplification génique (15 ng de mélanine synthétique bloque complètement une solution de 100 µl d'analyse PCR).

DQA1 allèle	Population				
	Japonaise		Caucasienne (n = 826)	USA (n = 410)	GB (n = 156)
	(n = 580)	(n = 184)			
*0101	11,0	8,7	13,7	13,9	...
*0102	16,2	12,0	19,7	20,7	39,0
*0103	19,5	22,8	8,5	3,4	
*0201	0,4	0,5	10,9	10,5	9,0
*0301	40,7	44,6	20,1	21,2	35,0
*0401	4,0				
*0501	6,6	11,4	27,1	30,2	18,0
*0601	1,7				
DP	0,91	0,88	0,94	0,92	0,85

Tableau 9 : distribution (%) des allèles du (HLA) DQA1 [57]. n : nombre d'allèles dans l'échantillonnage. DP : pouvoir discriminant.

K.M. Sullivan et col. [58] ont mis en évidence le risque de la contamination bactérienne lors de l'analyse d'ADNmt par PCR, d'échantillons prélevés sur un cadavre. En effet cette technique d'amplification génique est très sensible. Elle copie sans distinction tous les fragments d'ADN où se sont fixées

les amorces. Ils remarquent ainsi que l'analyse fluorométrique indique la présence de 0,5 mg d'ADN par mg de cheveu alors que la quantité observée avec une sonde d'origine humaine est inférieure à 200 pg. Il faut donc si c'est possible, analyser plus d'un échantillon d'un même individu, faire des blancs, passer des étalons connus, et toujours travailler dans des conditions très strictes.

II.3.2. Le sexe [64 et 65]

De nombreux travaux ont montré qu'il était possible de déterminer le sexe d'un donneur, à partir d'un matériel biologique comme le sang, la salive et le cheveu.

Dans le cas du cheveu, il faut extraire les cellules de la gaine épithéliale de sa racine, sous l'action d'une solution d'acide acétique et d'un traitement physique (mécanique ou micro-onde). Puis, on leur fait subir un traitement qui permet de révéler sous microscope, le corpuscule de Barr présent seulement dans les noyaux de cellules appartenant aux femmes ou le chromosome Y présent dans les leucocytes¹ des hommes.

W. Suszczewski et col. indique de plus, qu'il est possible par leur méthode de détecter la présence du chromosome Y sur des échantillons conservés plus de trois mois [65].

II.3.3. Le groupe sanguin [66-68]

Chez les êtres humains, le groupe sanguin est déterminé en fonction des substances présentes à la surface des globules rouges appelés « antigènes ».

Ils sont regroupés en « systèmes ». Dans le système ABO, il existe quatre groupes sanguins possibles : A, B, AB et O. Dans le système Rhésus (Rh), la présence ou l'absence de substance « D » à la surface du globule rouge détermine si on est Rh+ ou Rh-. Certains groupes sanguins sont plus rares que d'autres (tableau 10), de plus leurs pourcentages peuvent varier en fonction des pays et des races.

	Rhésus positif (Rh+)	Rhésus négatif (Rh-)	Total
Groupe O	O+ : 39 %	O- : 7 %	46 %
Groupe A	A+ : 36 %	A- : 6 %	42 %
Groupe B	B+ : 7,5 %	B- : 1,5 %	9 %
Groupe AB	AB+ : 2,5 %	AB- : 0,5 %	3 %
Total	85 %	15 %	

Tableau 10 : pourcentages des différents groupes sanguins dans la population Canadienne.

Dès 1963, des chercheurs se sont aperçus qu'il était possible de déterminer le groupe sanguin d'un individu à partir de ses cheveux. F.

¹ Leucocyte : globule blanc.

Wynbrandt et J. Chisum [66] ont ainsi réussi à observer le groupe sanguin de 50 personnes d'âge, de sexe et de races différentes, à partir de 3 cm de cheveu lavé (afin d'éviter des interférences avec des composés présents à sa surface) et écrasé pour améliorer la réaction. Ils notaient juste une variation de la quantité d'antigènes qui réagissaient en fonction des individus.

Les techniques immunohistochimiques (technique d'anticorps non marqué (PAP¹) immunoperoxydase) ont permis de situer les substances portant les antigènes du groupe sanguin dans le cheveu. Elles se trouvent majoritairement dans la zone non kératinisée de la racine et dans la médulla [68].

Pour y accéder, il suffit donc de situer en microscopie la médulla dans la tige [67]. Puis, de travailler sur des coupes longitudinales de 3 mm ou des sections de moins de 10 µm (figure 16), ce qui permet de faire plusieurs analyses sur un même cheveu. L'observation de la réaction immunochimique est améliorée pour les cheveux foncés en les décolorant légèrement avant l'analyse.

Comme nous allons le voir, cette technique peut être appliquée à des cheveux avant d'analyser leur composition en kératine.

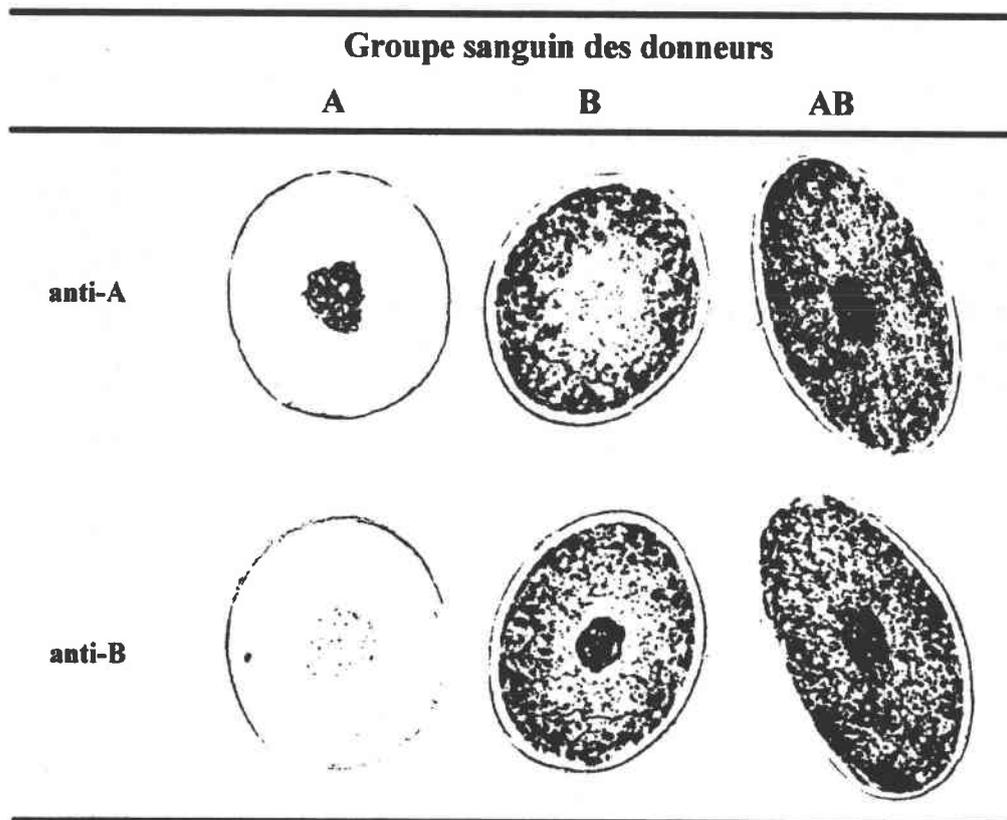


Figure 16 : détermination du groupe sanguin d'individus par immunohistochimie sur la section d'un de leur cheveu (8 µm d'épaisseur) [68].

¹ PAP : Peroxydase-Anti Peroxydase.

II.3.4. Le système enzymatique [69-72]

De nombreuses variations génétiques peuvent s'exprimer en terme de variations de protéines. Par exemple, les antigènes qui déterminent le groupe sanguin (ABO) présents à la surface des globules rouges, différent par la composition de leur structure en carbohydrates. Cette modification est dictée par la présence ou l'absence de certaines enzymes (protéines) qui interviennent lors de leur fabrication [69].

Si l'analyse est effectuée rapidement, un certain nombre d'enzymes peuvent être mis en évidence à partir des cellules de la gaine épithéliale des bulbes pileux : Adénylate Kinase (AK), Estérase D (EsD), Glyoxalase (GLO), Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase (G6PD), Phosphohexose Isomérase (PHI), Phosphoglucomutase (PGM) et 6-Phosphogluconate déshydrogénase (6PGD) (tableau 11).

Par électrophorèse, la détection de toutes ces enzymes ne peut pas se faire en même temps, il faut donc faire un choix. Cependant, il est possible de travailler sur :

- des sections de la gaine épithéliale [71], mais cela limite d'autant la quantité d'enzyme analysée ;
- certains groupes simultanément (groupe I : GLO I, PGM-1 et EsD).

Bien évidemment, plus nous pourrons en analyser et plus nous aurons un pouvoir discriminant important (DP). A.M. Gambel et col. [72] ont ainsi montré que le DP était de 0,90 pour les blancs et de 0,89 pour les noirs, lors de l'analyse de GLO I puis de PGM-1 par focalisation isoélectrique. Cette étude se fait sans séparer la racine du cheveu, ce qui permet d'effectuer ensuite l'analyse microscopique. L'utilisation d'une résine pour emprisonner le cheveu altère de façon plus ou moins importante la détection des enzymes [71, 72].

Enzymes	Frais	3 semaines	7 semaines	Pouvoir discriminant
AK	+	-	-	0,139
EsD	+	+	-	0,327
GLO	+	+	+	0,629
G6PD	+	+	+	
PHI	+	+	+	0,02
PGM	+	+	+	0,526
6PGD	+	+	Faible	0,081

Tableau 11 : période pendant laquelle les enzymes sont analysables à partir des cellules de la gaine épithéliale conservées à température ambiante (+ : détecté, - : non détecté) [70].

II.3.5. Conclusion

Si le cheveu arraché possède une racine en bon état de conservation, il est possible de déterminer le groupe sanguin, le sexe, l'activité enzymatique et l'empreinte génétique de son propriétaire. A l'occasion d'une recherche

discriminante, l'ADN reste l'outil le plus performant. En effet, chaque individu a une empreinte génétique unique (sauf de vrai jumeau). Pour donner un ordre d'idée, la probabilité d'avoir deux résultats identiques pour deux individus différents est :

- de quelques pour-cent pour l'analyse des enzymes ;
- de un pour mille dans les cas favorables pour l'analyse de l'ADN mitochondriale ;
- de un pour quelques milliards pour l'analyse de l'ADN nucléaire.

Bien entendu, le pouvoir discriminant de l'analyse dépend du type et du nombre de caractères étudiés mais aussi de la technique employée. Grâce à l'analyse PCR (Polymerase Chain Reaction), nous pouvons travailler sur de très petites quantités de matière : une racine de cheveu suffit. Mais c'est une technique très sensible à la contamination par de l'ADN étranger (bactérien) et qui est inhibée par une trop forte concentration en mélanine. Le protocole doit donc être très strict.

Lorsque la racine est très abîmée ou absente, l'ADN n'est pas toujours exploitable. Il faut alors se contenter de l'ADNmt moins discriminant (plus petit et hérité seulement de la mère) mais plus persistant (plus nombreux) ou de l'analyse du groupe sanguin si la tige pileuse possède une médulla.

L'analyse du cheveu permet donc dans certaines conditions d'accéder à des informations liées uniquement aux gènes et indépendantes de l'âge, de l'alimentation, de l'environnement et du mode de vie de son propriétaire. Ce qui n'est pas le cas des kératines du cheveu comme nous allons le voir.

II.4. Analyse de la kératine du cheveu

Rappelons que les cheveux, poils, ongles, cornes et épidermes, sont tout comme les plumes, essentiellement constitués de kératine (nom générique d'un ensemble de protéines). Chez l'être humain, il en existe au moins 24 sortes [73]. Elles sont classées en deux groupes, la kératine « molle » de l'épiderme et la kératine « dure » des cheveux, poils et ongles (termes liés à la solubilité plus ou moins grandes des kératines).

Après extraction, elles sont étudiées par électrophorèse sur gel mono ou bi-dimensionnelle, techniques qui séparent les différentes protéines en fonction de leur masse et/ou de leur point isoélectrique¹(PI). Cependant, la kératine représente environ 90 % de la masse du cheveu. Nous pouvons donc considérer, que c'est elle que nous étudions lors de l'analyse directe d'un poil par pyrolyse

¹ Point isoélectrique : pH pour lequel la protéine a une charge globalement neutre.

couplée à un chromatographe en phase gazeuse associée à un spectromètre de masse (py-GC/MS).

II.4.1. Extraction [73-88]

Du fait de sa structure, la kératine « dure » est insoluble dans les tampons et solvants habituels. Pour la solubiliser, différentes méthodes sont possibles : réduction, oxydation, extraction alcaline ou acide, et protéolyse.

Les cheveux sont tout d'abord nettoyés par des bains successifs, dans de l'éther de pétrole et dans de l'éthanol afin d'éliminer les acides gras (délipidisation). La technique de solubilisation la plus fréquemment employée, est la réduction sous azote des ponts disulfures qui lient entre elles les protéines du cheveu. Pour cela, du 2-mercaptoéthanol (ME) ou du dithiothréitol (DTT) est utilisé, dans de l'urée (6 à 10 M), à un pH variant de 8,5 à 10,5 et à une température de réaction oscillant entre 20°C et 50°C, suivant les expérimentateurs.

La kératine en solution est recueillie après ultracentrifugation ou filtration. Afin d'éviter que les protéines réduites s'oxydent à l'air et reforment des ponts disulfures, elles sont stabilisées par alkylation avec de l'iodoacétate (carboxyméthylation : Scm) ou de l'iodoacétamide (carbamoyleméthylation : Scam). Cette dernière technique, permet d'avoir un poids moléculaire apparent, après analyse, plus proche du poids réel [74]. En effet, la carboxyméthylation joue davantage sur la charge et la mobilité électrophorétique des protéines. R.C. Marshall indique ainsi, que le poids moléculaire apparent des protéines riches en soufre (RS), est 75 à 150 % supérieur au poids moléculaire réel pour et de 12 à 30 % supérieur pour les protéines pauvres en soufre (PS) [75]. Il est cependant possible d'analyser directement par électrophorèse les protéines réduites, en agissant rapidement sous atmosphère réductrice, et/ou en incorporant du sodium dodécyl sulfate (SDS) qui évite le repliement des chaînes peptidiques.

Comme nous allons le voir dans les prochaines pages, la quantité de kératine extraite peut varier d'un échantillon à un autre [76-78,89]. Cependant, nous pouvons supposer que cela n'affecte pas les investigations effectuées sur les empreintes électrophorétiques des protéines solubles, si les conditions expérimentales sont identiques pour tous les échantillons.

II.4.2. Composition

En moyenne la kératine du cheveu est constituée de 18 acides aminés différents (tableau 12) dont la quantité évolue en fonction de la situation et du rôle de la protéine dans le cheveu.

Acides Aminés	Cheveu brun Caucasienn		Ac. Aminés de la cuticule / Ac. Aminés du cheveu
	µM/g	% moyen	
Alanine	345 – 475	4,95	1,4
Arginine	466 – 534	6,03	0,4
Ac. Aspartique	407 – 455	5,20	0,6
Ac. Cystéique	22 – 58	0,48	3,0
½ Cystine	1268 – 1608	17,34	1,2
Ac. Glutamique	868 – 1053	11,58	0,8
Glycine	450 – 544	5,99	1,8
Histidine	56 – 70	0,76	0,6
Isoleucine	188 – 255	2,67	0,8
Leucine	442 – 558	6,03	0,8
Lysine	178 – 220	2,40	1,4
Méthionine	8 – 54	0,37	0,9
Phénylalanine	124 – 150	1,65	0,7
Proline	588 – 753	8,08	1,2
Sérine	851- 1076	11,62	1,0
Thréonine	542 – 654	7,21	0,5
Tyrosine	126 – 194	1,93	0,7
Valine	405 - 542	5,70	1,6

Tableau 12 : composition en acides aminés de cheveux bruns Caucasienn (µM/g et % moyen) et rapport du contenu en acides aminés de la cuticule (extraction par voie chimique) sur leur quantité dans la tige pileaire [89].

L'intérieur de la tige est préservé des agressions physico-chimiques par la cuticule, qui contient par exemple plus d'acides aminés soufrés que le cortex et bien plus que la médulla. Les trois zones qui constituent la cuticule ont également une composition en protéines qui varie. En effet, la couche « A » et l'exocuticule sont beaucoup plus riches en cystine que l'endocuticule, contenant plus d'acides aminés à chaîne latérale acide ou basique. C'est très certainement cette dernière qui va se gonfler au contact de l'eau et écarter les écailles du cheveu [8, 30].

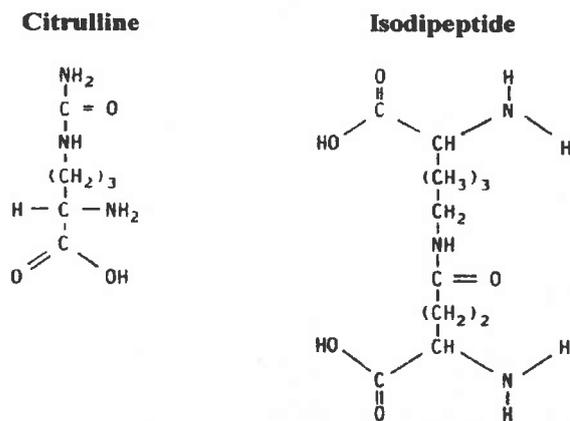


Figure 17 : citrulline et isodipeptide.

La liste du tableau 8 ne tient pas compte de la citrulline (figure 17) présente

seulement dans la médulla [74], ni du tryptophane qui est cité comme un des composants de la kératine du cheveu par quelques auteurs [9,18 et 90].

Il faut remarquer à ce stade que plusieurs facteurs peuvent influencer la composition moyenne en acides aminés du cheveu [89] :

- son diamètre, car il modifie le rapport masse de la cuticule sur masse du cortex ;
- la présence ou non de la médulla qui est pauvre en cystine et riche en acide glutamique [9] ;
- l'action du climat et des traitements capillaires (cet aspect sera détaillé après).

La kératine « dure » se divise en trois groupes de protéines, dont le poids moléculaire apparent, le nombre de composés révélés et le point isoélectrique (PI) varient en fonction des protocoles expérimentaux (figure 18, annexe 1) :

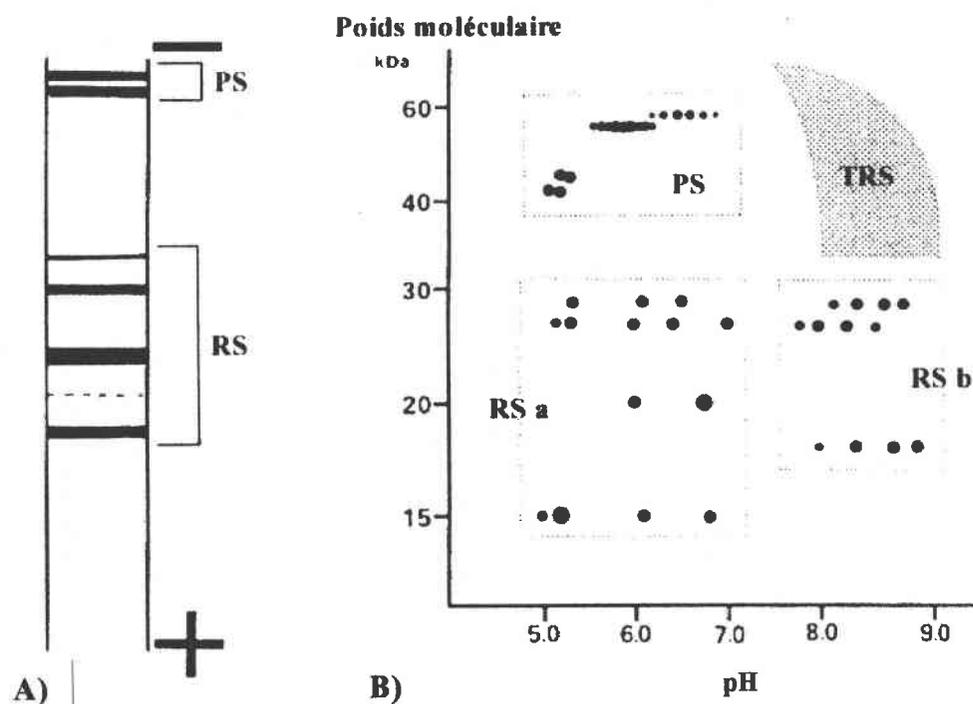


Figure 18 : exemples d'électrophorèses mono (A) [86] et bi-dimensionnelles (B) [74] des kératines du cheveu. PS : pauvres en soufre, RS : riches en soufre, a : plus acides, b : plus basiques, TRS : très riches en soufre.

- les protéines « pauvres » en soufre (PS) constituent les filaments. Elles sont formées de 5 à 7 demi-cystines pour 100 résidus [79]. Elles ont des poids moléculaires compris entre 35 et 94 kDa¹;

- les protéines « riches » en soufre (RS) forment la matrice. Elles sont constituées de 25 à 30 demi-cystines pour 100 résidus [79] et leurs poids moléculaires varient entre 10 et 45 kDa ;

- les protéines très riches en soufre (TRS) sont composées d'un tiers de résidus demi-cystine [80]. Elles se trouvent en plus grande proportion dans la

¹ kDa : kilo Dalton unité de mesure des protéines.

cuticule du cheveu et ont un poids moléculaire supérieur à 30 kDa.

Les deux premiers groupes sont les plus étudiés (PS et RS), ils peuvent se subdiviser en deux : les protéines plus acides (a) et celles plus basiques (b).

	Pauvre en soufre (PS)		Riche en soufre (RS)	Très riche en soufre (TRS)
	I	II		
Alanine	5,5	6,0	3,1	2,1
Arginine	7,1	7,2	3,5	5,6
Ac. Aspartique	6,9	8,3	4,3	2,4
Scam-Cys^a	12,5	9,5	18,4	26,7
Ac. Glutamique	14,2	15,8	9,5	8,4
Glycine	5,6	4,9	8,3	5,6
Histidine	1,0	0,9	1,6	1,0
Isoleucine	3,1	3,5	2,3	1,7
Leucine	7,6	9,3	5,6	3,0
Lysine	2,7	3,2	1,1	0,7
Méthionine	0,4	0,5	0,4	1,5
Phénylalanine	1,8	1,9	2,1	1,2
Proline	5,6	4,6	11,2	10,7
Sérine	11,1	10,1	12,9	13,7
Thréonine	6,5	5,9	9,6	10,3
Tyrosine	2,3	2,5	1,4	1,4
Valine	5,7	5,8	4,1	4,1

Tableau 13 : pourcentages en acides aminés des différentes fractions de protéines constitutives du cheveu [74], a : S-carbamoylméthylcystéine.

Le tableau 13 ci-dessus montre bien la richesse en cystine des protéines de la matrice (RS) par rapport à celles des fibrilles (PS). Nous remarquons aussi que le pourcentage de proline est deux fois plus important dans les protéines qui contiennent beaucoup de cystine (RS et TRS).

L'ensemble de ces protéines est stabilisé par des liaisons disulfures, mais aussi dans la cuticule et la médulla par des liens isodipeptidiques (liaison covalente créée entre les chaînes latérales de l'acide glutamique et de la lysine : figure 17). Ces liaisons contribuent aux qualités physico-chimiques des kératines : souplesse, résistance, insolubilité, etc..

II.4.3. Facteurs qui peuvent influencer la composition de la kératine

II.4.3.1. L'état physiologique

En 1988 R.C. Marshall [80] n'a pas observé de variations entre les cheveux d'un même individu se trouvant dans des phases de croissances différentes (anagène, télogène).

M. Gerhard et M. Hermes [76 et 78] et B. Miyake [81] n'ont quant à eux, pas remarqué de différence entre le profil électrophorétique de la kératine de cheveu et de poils d'un même individu.

II.4.3.2. La nutrition

L'importance des acides aminés contenant du soufre sur la régulation de la laine est bien connue. L'apport d'un léger supplément en cystine et en méthionine accélère la croissance du poil et modifie la composition de sa kératine [80].

Mis à part des carences importantes [91], il est peu probable que chez l'homme, des variations significatives des protéines du cheveu résultent d'un changement d'alimentation. Ainsi, aucune modification n'a été observée sur l'empreinte électrophorétique de la kératine d'un individu, dans un intervalle de un [78] à cinq ans [75 et 81].

II.4.3.3. Le soleil

Le blanchiment des cheveux sous l'action du rayonnement solaire est un phénomène connu, qui est accentué lorsque le pourcentage d'humidité dans l'air augmente (bord de mer). Cela est dû à la dégradation des mélanines (photooxydation) qui absorbent une grande partie des rayons ultraviolets (UV) et piègent les radicaux libres, grâce à leurs groupements carbonyles conjugués et à leurs doubles liaisons [89, 92 et 93].

Mais d'autres altérations ont lieu. Sous l'action du soleil, une baisse du pourcentage de résidus de demi-cystine¹ et une dégradation de l'histidine, de la lysine et de la proline sont mises en évidence dans le cheveu [9, 77, 80, 89, 92 et 93]. R.C. Marshall et J.M. Gillespie [80] remarquent ainsi une diminution du nombre de résidus de demi-cystine, entre des cheveux prélevés au début du printemps (17 % de $\frac{1}{2}$ cystine) et ceux prélevés à la fin de l'été : à la racine (15 % de $\frac{1}{2}$ cystine) et à la pointe (10 % de $\frac{1}{2}$ cystine). Ce phénomène est d'autant plus accentué que le cheveu est faiblement pigmenté (figure 19) [89].

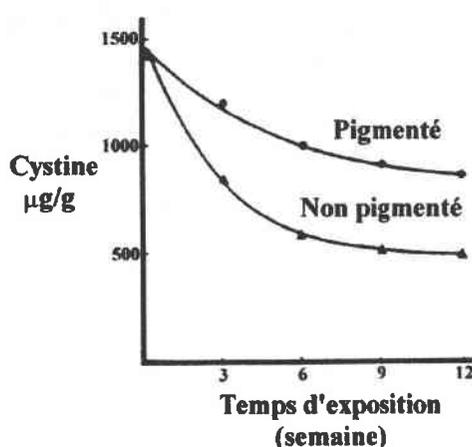


Figure 19 : quantité de cystine présent dans un cheveu pigmenté et non pigmenté en fonction du temps d'exposition au soleil [89].

¹ $\frac{1}{2}$ Cystine : cystine dont le pont disulfure a été réduit et stabilisé par alkylation, conduisant à la formation de deux fragments.

C. Nappe et M. Kermici en 1989 [77] remarquent aussi, que la quantité de kératine solubilisée (dosage par la méthode de Bradford) diminue de 87 %, après une exposition prolongée au soleil. Ils n'observent plus de protéines PS. Ce phénomène augmente en s'approchant de la pointe du cheveu. En outre, plus le cheveu est clair, moins on solubilise de protéines (blond : 0,3 % et noir : 19,5 %), et moins on observe de protéines de type PS.

Ces observations indiquent que la kératine, surtout lorsqu'elle n'est plus protégée par les pigments, est sensible aux rayonnements UV. Parmi les trois types d'UV : A (400-320 nm), B (320-280nm) et C (< 280 nm), les UVB sont les plus aptes à agir sur les principaux chromophores de la chaîne polypeptidique que sont la tyrosine, le tryptophane et les ponts disulfures [94]. Ils provoquent la formation des radicaux libres qui peuvent réagir avec l'eau présente dans le cheveu pour former des radicaux hydroxy très réactifs [89]. Ces derniers sont peut-être à l'origine de nouvelles liaisons qui rendent la kératine moins soluble dans le mélange DTT-urée. Les UV provoquent aussi la rupture des ponts soufrés au niveau de la liaison -C-S- et la formation d'acide cystéique et de sulfonate [92]. C'est pourquoi les industriels cherchent à protéger le cheveu du rayonnement UV en le recouvrant de composés photoprotecteurs comme l'octyl diméthyl PABA¹.

II.4.3.4. Les traitements capillaires

Dès 1979, J. Chao et col. montrent que le pourcentage de résidus de demi-cystine diminue après une permanente et une décoloration [83]. Simultanément, la quantité d'acide cystéique augmente (tableau 14).

	Pas de traitement	Permanente	Décoloration
½ cystine	15,6 %	14,1 %	13,5 %
Acide cystéique	0 %	0,5 %	2,7 %

Tableau 14 : effet de différents traitements capillaires sur le pourcentage de 1/2 cystine et d'acide cystéique contenu dans un cheveu [83].

En 1988, R.C. Marshall remarque que de tels traitements modifient les propriétés électrophorétiques bi-dimensionnelles de beaucoup de protéines et tout spécialement celles riches en soufre [80]. Ceci est sûrement dû à l'étape d'oxydation, qui ferait varier la charge et la taille des protéines. L. J. Wolfram indique que ces traitements fragilisent le cheveu et le rendent plus sensible au rayonnement solaire [89].

M. Gerhard et M. Hermes, quant à eux, notent une simple altération des bandes signalant les protéines en électrophorèse mono-dimensionnelle [76]. Par contre, B. Miyake [82] lors de son étude des protéines RS n'observe pas de modifications après une permanente, une coloration ou une décoloration modérées du cheveu.

¹ PABA : acide p-aminobenzoïque.

II.4.3.5. L'ensevelissement

En 1989 B. Miyake [82] a étudié l'effet d'un ensevelissement expérimental de cheveu pendant 0,5 et 1 an ; ainsi que ceux provenant de cadavres enterrés depuis 0,5, 2, 2,5 et 200 ans. L'analyse par électrophorèse mono-dimensionnelle de leurs protéines RS, n'a pas mis en évidence de variations sur les cheveux ensevelis depuis moins de 2 ans. Après, l'empreinte perd en intensité. Il suspecte une dégradation de ces protéines en molécules de plus petites tailles.

II.4.4. Variations et polymorphisme

Nous parlons de polymorphisme quand la modification observée est liée au gène et si ce n'est pas le cas : de variation.

II.4.4.1. Entre les espèces animales

Du fait de son intérêt économique, la laine a été plus étudiée que le cheveu. Dès 1965 J.M. Gillespie et A.S. Inglis [84] observent par électrophorèse des variations entre les protéines RS de kératine d'espèces différentes, mais aussi entre des laines d'origines diverses. De même, M.H Lynch et col. [73] remarquent des variations entre plusieurs espèces, après marquage des protéines kératiniques par des anticorps. En 1987, A. Carracedo et col. [85] étudient par focalisation isoélectrique la kératine des poils de plusieurs animaux (félins, singes, etc.). Ils concluent, que plus deux espèces sont phylogénétiquement proches et plus leurs empreintes électrophorétiques sont ressemblantes. De même des variations significatives de la composition en acides aminés sont observées entre différentes espèces [84 et 95] : le mohair¹ contient par exemple 4 % de résidus de demi-cystine en moins que le cheveu humain et 7 % de moins par rapport au poil de lapin.

II.4.4.2. Entre les ongles et les cheveux

Dans une publication de 1983, R.C. Marshall [75] indique que les profils électrophorétiques bi-dimensionnels des protéines du cheveu et de l'ongle sont très similaires, bien que leurs proportions soient différentes. Le cheveu contient environ 50 % de protéines RS, alors que l'ongle n'en possède que 20 %. Les seules variations qu'il observe par électrophorèse bi-dimensionnelle (pH = 3 ou pH = 8,9 et SDS) entre les deux kératines sont la présence :

- d'un polypeptide PS, de poids moléculaires apparents 61 kda pour le cheveu uniquement ;
- d'une protéine PS de 50 kda pour les cheveux et ongles d'un individu sur les quatre étudiés ;
- de polypeptides RS mineurs, de poids moléculaire apparent 38,5 et 32 kDa pour l'ongle.

¹ Mohair : poil de chèvre.

M. Lynch et col. indiquent aussi, en 1986, que les protéines majeures de l'ongle sont similaires à celles du cheveu, aussi bien par leur mobilité électrophorétique mono-dimensionnelle, que par leur immunoactivité [73]. Ils observent de plus la présence de kératine « molle » dans l'ongle (10 à 20 % et de poids moléculaire apparent 48, 50, 56 et 58 kDa).

II.4.4.3. Les protéines pauvres en soufre

En 1975 H.P. Baden et col. [86] sont les premiers à observer une variation de l'empreinte électrophorétique mono-dimensionnelle du cheveu chez cinq individus sur 96 étudiés (dont quatre familles). Elle consistait en une augmentation de l'intensité d'une des taches, retrouvée aussi dans la kératine d'ongle et de poil. L'analyse de la composition en acides aminés n'a pas montré de différences significatives entre les différentes kératines. Ils n'ont pas réussi à l'associer à un caractère morphologique ou physico-chimique du cheveu. Ils ont conclu à un polymorphisme transmis de manière autosomale¹.

Suite à ce travail, D.H. Hrdy et col. [87] en 1977 remarquent cette modification de l'intensité d'une bande des protéines PS, pour six individus de type Caucasien sur 150 (soit 4 %). Ils l'associent à la superposition de bandes (protéines) supplémentaires. De plus, ils n'ont pas retrouvé ce polymorphisme, lors de l'analyse de cheveux de Japonais, d'Indiens, de noirs Américains. Sauf dans deux cas ; ce qu'ils expliquent par des mariages mixtes entre races.

M. Gerhard en 1987 [78] observe quant à lui, par analyse mono-dimensionnelle sur des protéines non alkylées, (dites PS du fait de leur poids moléculaire compris entre 45 et 68 kDa), 8 phénotypes différents parmi les 445 allemands étudiés (figure 20, tableau 15).

Phénotype	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	Indéfini	Total
Nombre d'individus	353	35	28	5	2	2	1	1	18	445
Pourcentage relatif	79,3	7,8	6,3	1,1	0,4	0,4	0,2	0,2	4,0	99,97

Tableau 15 : différents phénotypes de la kératine de cheveu observés pour un échantillon de 445 Allemands [78].

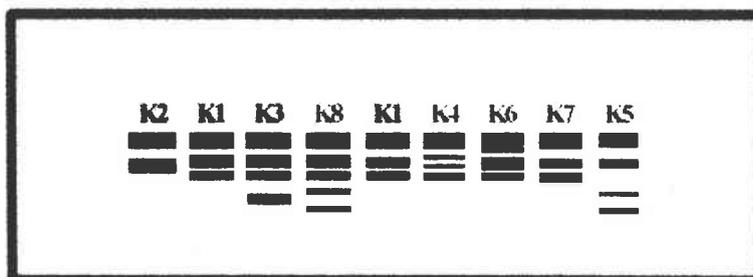


Figure 20 : représentations schématiques de l'empreinte électrophorétique des phénotypes K1 à K8 [78].

¹ Autosomale : gène qui ne se trouve pas sur un chromosome sexuel.

Les 3 majeurs (K1, K2 et K3) représentent 79, 8 et 6 % de la population considérée et les 5 autres réunis (K4 à K8) 3 %. Malgré la bonne reproductibilité des résultats, on peut penser que des réactions ont pu se produire, car les polypeptides ne sont pas stabilisés après réduction. Cela expliquerait qu'il ne détecte pas de protéines RS qui, du fait de leur richesse en soufre, ont pu s'oxyder, reformer des ponts disulfures, et donner des agrégats de masses plus importantes.

Dans une autre publication [76], il a montré que sa technique était utilisable sur des échantillons ayant servi à l'analyse du groupe sanguin (ABO).

II.4.4.4. Les protéines riches en soufre

En 1978 L.D. Lee et col.[79] observent par analyse mono-dimensionnelle, deux profils électrophorétiques qui présentent des variations (notés V1 et V2). Ils se caractérisent par l'apparition d'une bande supplémentaire parmi les protéines RS (figure 21), chez 4 % des 300 individus de type caucasien étudiés pour V1, et chez 1 % pour V2. Une autre variation est observée sur 1 % de la population étudiée, elle consiste en une diminution de l'intensité de la première bande.

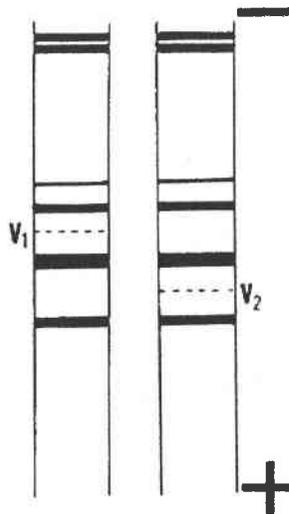


Figure 21 : électrophorèse des deux types de protéines RS variants (V₁ et V₂), observés par Lee et col. [79].

B. Miyake [81] remarque par analyse mono-dimensionnelle des kératines d'ongles et de cheveux, un polymorphisme (poids moléculaire apparent 30 kDa) au niveau des polypeptides riches en soufre. Il l'observe sur 43 individus d'une population de 150 Japonais (soit 29 %) et sur une personne de type caucasien sur 21. Il émet l'hypothèse que ce polymorphisme correspond à la variation V2 observée par L.D. Lee et col. Sa fréquence d'apparition serait donc fonction de la race. Il montre aussi qu'il est transmis de façon autosomale.

II.4.4.5. Par électrophorèse bi-dimensionnelle

L'analyse bi-dimensionnelle a permis d'améliorer la séparation des différentes protéines constituant la kératine. En 1982, R.C. Marshall [88]

observe par cette méthode, huit taches ou groupes de taches, qui subissent des variations, aussi bien pour les protéines PS que RS. Deux d'entre elles sont des polymorphismes, il s'agit des taches 3 PS et 6 RS (figure 22).

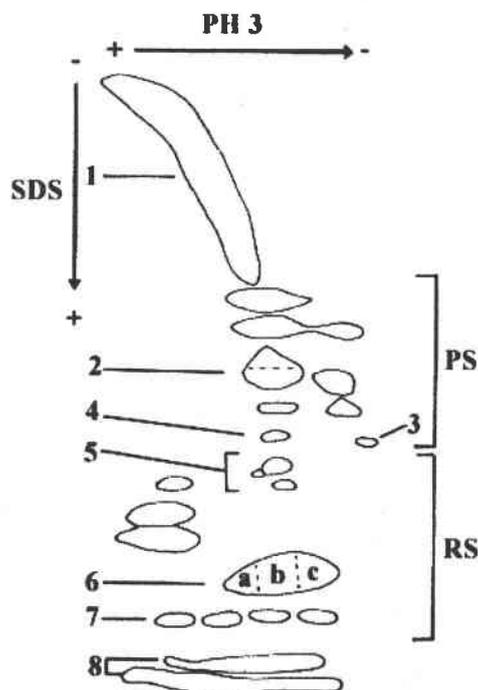


Figure 22 : diagramme schématisé de l'empreinte électrophorétique bi-dimensionnelle d'un cheveu [88].

K. Katsuumi et col. [74] ont étudié la présence de variations entre les protéines RS a (figure 18 B) de 15 individus. Trois types différents ont été observés. Le premier voit apparaître une tache en plus, il est très certainement transmis de façon autosomale. Les deux autres variations voient disparaître 2 ou 3 taches.

En 1989 C. Napp et M. Kermici [77] écrivent, qu'ils n'ont quant à eux pas remarqué de modifications du profil électrophorétique bi-dimensionnelle de cheveux d'individus appartenant à des groupes ethniques différents. Ils observent plutôt des variations d'intensité, qu'ils associent à la quantité variable de protéines solubilisées. Ils expliquent cela par l'effet de la lumière et du complexe eumélanine-phaeomélanine, qui modifieraient les liaisons entre les polypeptides, les rendant plus insolubles. Des études faites sur la composition en acides aminés des cheveux d'individus appartenant à différentes races n'ont pas montré de variations significatives [77 et 89].

II.4.5. Etude par py-GC/MS

Cette technique d'analyse fait l'objet d'un paragraphe particulier car elle part du postulat suivant : lorsque nous pyrolysons un cheveu nous étudions sa kératine. En effet, cette protéine représente la majeure partie de la tige pileuse. Bien entendu, elle aurait pu être appliquée à des kératines extraites mais à ma

connaissance cela n'a pas été fait dans le cadre d'une utilisation par la police scientifique. L'objectif était plutôt de mettre au point une analyse rapide, sans les traitements préalables du cheveu qui sont des facteurs possibles d'erreur.

La pyrolyse GC/MS consiste à vaporiser l'échantillon par une montée très rapide en température (20°C/ms), à séparer les produits ainsi formés par chromatographie gazeuse et à les caractériser par spectrométrie de masse. Cette technique est déjà très utilisée pour distinguer de nombreux polymères synthétiques [96, 97]. C'est la raison pour laquelle la combinaison py-GC, puis py-GC/MS est apparue comme une alternative prometteuse.

Les premiers résultats ont été obtenus par P.R. De Forest (1966) [98] puis par C. Fouweather et J. Porter (1973) [99]. Ils ont montré qu'un petit fragment de cheveu fournissait un pyrogramme très dense. Cependant, le pouvoir de résolution des colonnes n'était pas suffisant à l'époque pour permettre une exploitation significative des résultats.

Conscients de cette limitation, T.O. Munson et J. Vick [100], du FBI Laboratory Division, ont eu l'idée en 1985 de coupler deux colonnes capillaires. Dans ces conditions, le couplage py-GC²/MS leur a permis d'améliorer la séparation des pics du pyrogramme et de faire progresser, par spectrométrie de masse, l'identification des 185 composés formés lors de la pyrolyse (750°C) de 80 µg de cheveu. Ils ont observé des variations d'intensité de pics ainsi que cinq composés qui par leur présence ou leur absence permettaient de caractériser le pyrogramme de cheveux de trois individus. Parmi ces molécules, trois pouvaient être associées à la pyrolyse d'acides aminés, tandis que les deux autres avaient certainement une origine autre que la kératine : sébum, traitement capillaire, pigments, etc..

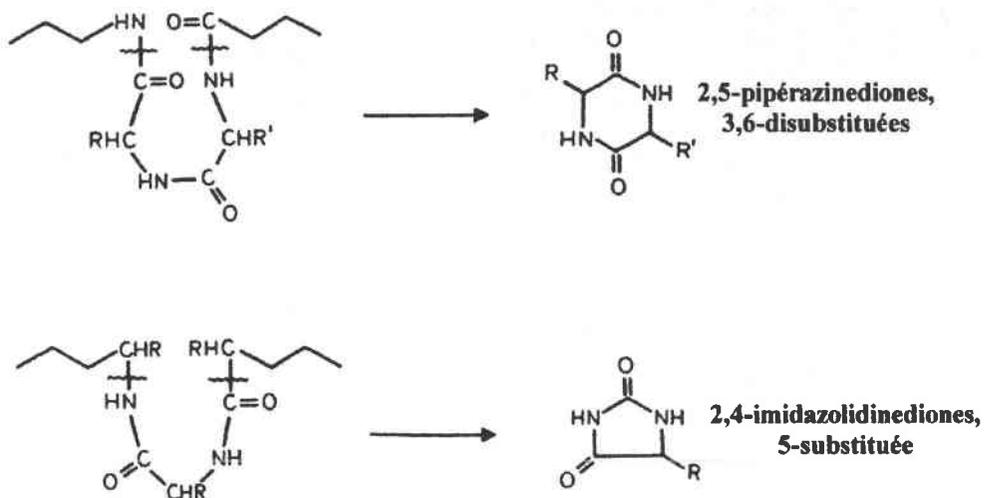


Figure 23 : proposition des mécanismes de formation de composés cycliques par rupture des liaisons peptidiques d'une protéine [100].

Dans le même temps ils ont remarqué la présence de composés cycliques provenant certainement de la rupture des liaisons peptidiques des protéines (figure 23). Comme ils ne pouvaient pas être certains de l'origine protéique de tous les composés, ils ont décidé de porter leur attention sur ces molécules cycliques. Ceci afin d'avoir des informations qui proviennent seulement du caractère génétique de la kératine des différents individus. Pour cela, en 1987, T.O. Munson et D.D. Fetterolf [101], utilisent cette fois les capacités d'un triple quadropôle opérant en mode MS/MS pour les caractériser, avec comme précédemment, une source d'ionisation par impact électronique ou par ionisation chimique.

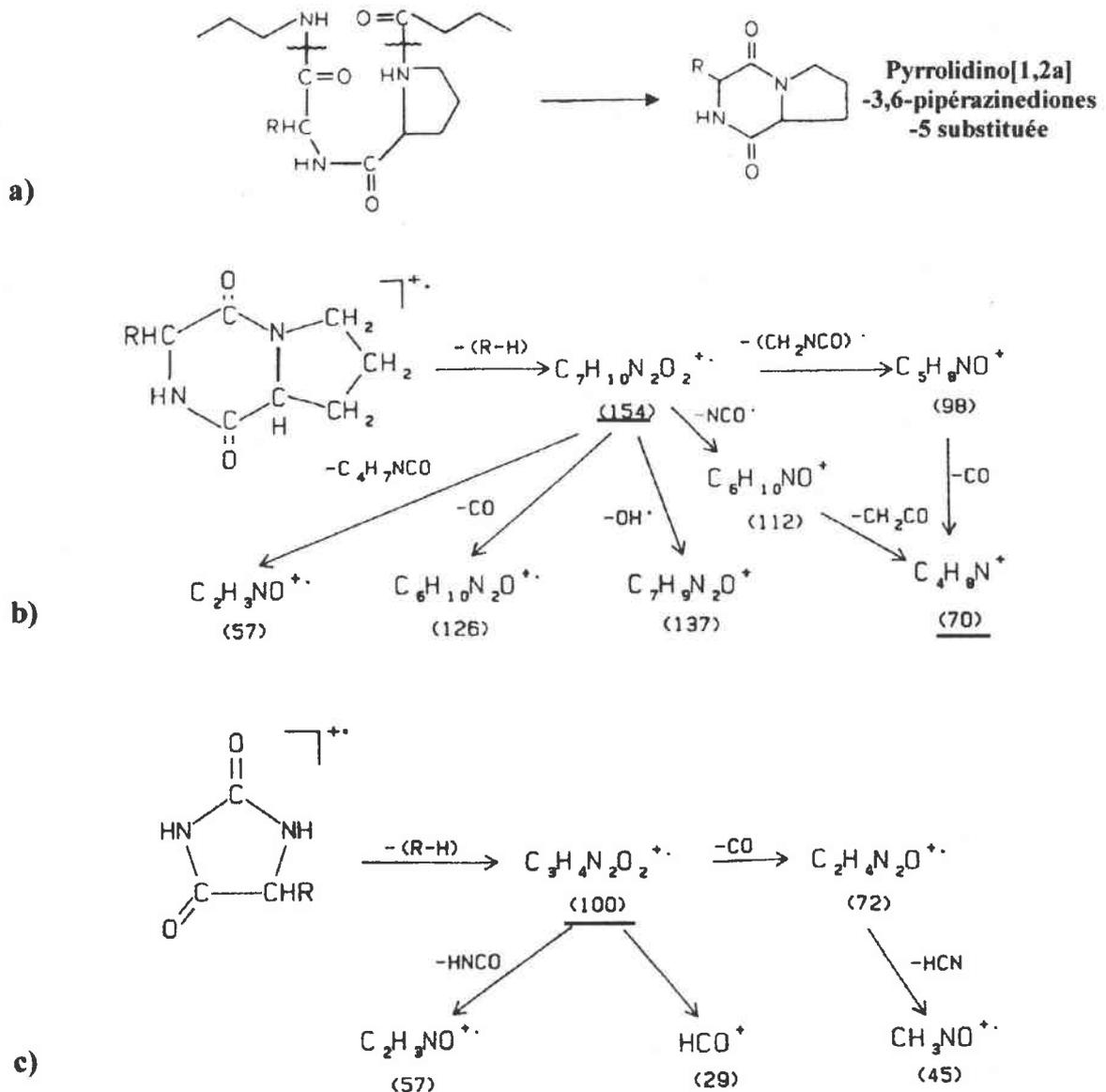


Figure 24 : a) proposition du mécanisme de formation de la pyrrolidino[1,2a]-3,6-pipérazinediones 5-substituée, b) et c) proposition de chemin de fragmentation par impact électronique de la pyrrolidino[1,2a]-3,6-pipérazinediones 5-substituée et de la 2,4-imidazolidinediones 5-substituée [101].

Ils remarquent que la plupart de ces pics comportent dans leur spectre, les masses $m/z = 100$ et 154 (figure 24). La proline semble favoriser la formation de pipérazinediones à partir de la chaîne polypeptidique.

Leur étude a montré que les molécules cycliques provenant de la rupture des liaisons peptidiques de la kératine ne permettait pas de caractériser des individus différents. Ils en concluaient, qu'il n'était pas possible de trouver des différences entre des personnes, à l'aide de composés issus de la pyrolyse dérivant de moins de trois amino-acides.

Un travail mené par F. Ishizawa et S. Misawa [102] par pyrolyse (600°C) couplée à la GC des composés à faible point d'ébullition (colonne chromatographique non polaire, montée en température jusqu'à 140°C seulement), montre que les proportions de benzène, de toluène et de styrène varient d'un individu à l'autre. Sur les cheveux de 16 personnes, ils n'ont noté qu'une seule paire de cheveux indiscernables. Ils indiquent aussi que ces concentrations ne varient pas significativement sur des prélèvements effectués à 18 mois d'intervalle.

De même S.Y. Choi et col. [103] ont porté leur attention sur les composés soufrés formés par pyrolyse (590°C) des acides aminés soufrés (méthionine, cystine et cystéine) et de la kératine. Ils observent des variations importantes du rapport $\text{H}_2\text{S}/\text{CH}_3\text{SH}$ et $\text{H}_2\text{S}/\text{CH}_3\text{SCH}_3$, à la fois entre des cheveux d'individus différents et entre des poils d'animaux.

Des travaux effectués par S. Peter [18] et moi-même [104] sur la pyrolyse (650°C) du cheveu ont permis d'associer un grand nombre de composés formés à des acides aminés ou à la chaîne polypeptidique (figure 25).

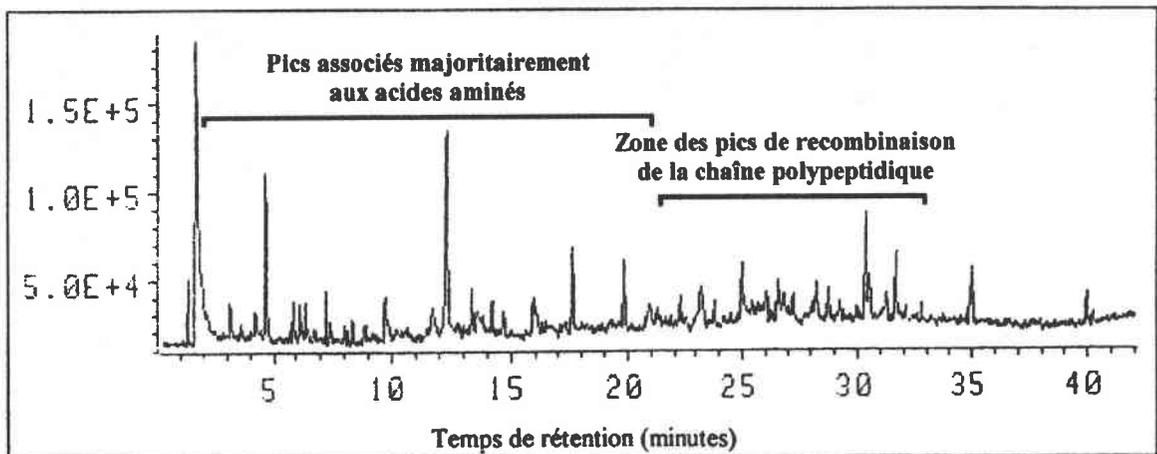


Figure 25 : pyrogramme de poudre de cheveux (650°C).

S. Peter a confirmé ainsi les travaux de T.O. Munson et col., et réussi à caractériser les cheveux de neuf individus, grâce à la présence ou l'intensité de 11 pics de leur pyrogramme par py-GC. Elle soupçonne cependant que trois de ces molécules auraient une origine exogène.

II.4.6. Conclusion

L'analyse de la composition en acides aminés des cheveux humains a un très faible pouvoir discriminant, il y a une perte d'informations du fait d'une trop grande fragmentation des protéines. Le pourcentage des 18 acides aminés ne varie pas significativement d'un individu à l'autre [86].

Cette recherche bibliographique a permis de voir que la technique d'analyse par électrophorèse sur gel est sensible au protocole expérimental et au type de cheveu (clair ou foncé...), ce qui rend difficile la comparaison des différentes études.

Cependant, un certain nombre de variations ont déjà été observées. Certaines, sont sans doute des polymorphismes [74, 75, 78, 79, 81 et 87] transmis par un gène ne se trouvant pas sur un chromosome sexuel, tandis que les autres sont dues à d'autres facteurs : cosmétique, soleil, etc. [76, 77 et 85].

La méthode qui apporte la meilleure séparation est l'électrophorèse bi-dimensionnelle. Celle qui est la plus sensible utilise comme détection la fluorographie et moins de 5 cm de cheveu [88]. Le protocole le plus rapide est très certainement celui utilisé par M. Gerhard [78]. De plus, il peut être directement effectué sur un échantillon qui a servi à la détection du groupe sanguin ABO, sans qu'il y ait de modification de l'empreinte électrophorétique [76].

Cette technique permet d'accéder à de nouvelles informations liées aux gènes, et ceci sur de petites quantités de cheveu. Elle nécessite encore, avant d'être pleinement utilisée en criminalistique, la mise au point d'un protocole de routine, sensible, reproductible et d'un grand nombre d'analyses pour fournir des données statistiques [105].

Pour sa part, la py-GC/MS a permis de caractériser des cheveux d'individus différents [18, 100, 102 et 103]. Cependant, il est difficile d'affirmer que ces variations sont dues uniquement à la kératine. T.O. Munson et col. ont montré que les seuls composés qui pouvaient être associés avec certitude à la chaîne polypeptidique, n'avaient pas un pouvoir discriminant suffisant [101]. Les autres sont des fragments de plus petits poids moléculaires, ils peuvent être associés aux acides aminés des protéines. Cependant, nous avons vu que la composition en acides aminés varie très peu d'un individu à un autre. Les variations observées sont certainement dues à des interactions lors de la pyrolyse entre les différentes kératines et d'autres éléments comme le sébum, les mélanines ou les traitements capillaires.

Les informations apportées par la py-GC/MS ne sont donc pas uniquement liées aux caractères génétiques (kératine, pigments...) mais aussi au comportement social de l'individu (traitements capillaires, drogues...). Il n'est pas toujours facile de les interpréter, mais elles peuvent apporter des informations discriminantes tout comme l'analyse microscopique du cheveu.

II.5. Analyse des éléments traces

Comme nous l'avons vu, le cheveu a une croissance rapide et assez régulière (1,2 cm par mois). Cette forte activité constitue une voie d'élimination des éléments traces, organiques et minéraux présents dans le sang. Son utilisation comme une bande enregistrant l'imprégnation de l'organisme à un moment donné, paraît donc séduisante. Pour cela les cheveux sont prélevés sur l'arrière du crâne (vertex supérieur), car c'est dans cette zone que leur vitesse de pousse est la plus rapide et la plus constante. Ils y sont aussi moins sujets aux influences de l'âge et du sexe (hormone). De plus, le cheveu a d'autres avantages :

- prélèvement aisé et non traumatisant ;
- conservation pratiquement illimitée et sans problème particulier;
- facile à transporter.

Cette facilité de prélèvement et de conservation, ainsi que l'information temporelle qu'il peut apporter, explique l'intérêt des scientifiques pour le cheveu dans des domaines aussi variés que la médecine, l'écologie et la police scientifique.

II.5.1. Les éléments minéraux [106-113]

L'analyse des éléments minéraux présents dans le cheveu a commencé très tôt, puisque les premières publications datent du début du siècle. Elles concernaient les intoxications à l'arsenic (As) (empoisonnement) et la présence de mercure (traitement de la syphilis) [8]. La plus connue concerne la recherche d'arsenic dans les cheveux de Napoléon Bonaparte.

Depuis 1970, les techniques d'analyses des éléments en solution (spectroscopie d'absorption atomique (mono-élémentaire), électrophorèse capillaire (EC), spectrométrie d'émission avec excitation par plasma (ICP), etc.) ou directement dans un solide (activation neutronique, microsonde X, microsonde PIXE (Proton Induced X ray Emission), microsonde laser couplée à la spectrométrie de masse, etc.) n'ont pas cessé de s'améliorer. Les plus utilisées pour l'étude des cheveux nécessitent la mise en solution des éléments minéraux. Pour cela les cheveux sont placés dans un mélange d'acide nitrique et d'eau oxygénée (la digestion peut être accélérée sous micro-ondes). Elles permettent pour certaines, une détection multi-élémentaire, à des concentrations inférieures au ppm¹, sur quelques millimètres de cheveu. Cela explique, l'intérêt des scientifiques qui voient le cheveu comme un bon échantillon pour :

- caractériser un individu [114] ;
- l'utiliser comme un dosimètre des polluants de l'environnement [115-130] ;
- suivre des problèmes de nutrition et faire un bilan de santé [131-133] ;

¹ ppm : partie par million.

- étudier certaines maladies en relation avec d'autres organes et tissus [134-137] ;

- déterminer un empoisonnement [138-141].

En dépit du développement important des techniques d'analyses, la nature et les propriétés du cheveu ne sont pas encore totalement comprises. Cela implique que la signification des résultats de nombreuses publications restent sujettes à caution. Pour lever ce doute, il faut identifier les sources et les procédés d'incorporation des éléments dans le cheveu.

II.5.1.1. Sources des éléments minéraux dans le cheveu

Les éléments minéraux retrouvés dans les cheveux peuvent avoir deux origines : endogène (éléments provenant directement de l'individu) et exogène (contamination par le milieu extérieur).

a) Endogène

- La matrice cellulaire : la base du follicule pileaire est le centre d'une intense activité métabolique où se forme la tige pileaire. Elle est en contact avec la papille dermique où circulent sang et lymphe. Les minéraux dissous dans ces liquides biologiques vont être incorporés aux protéines constitutives de la future kératine.

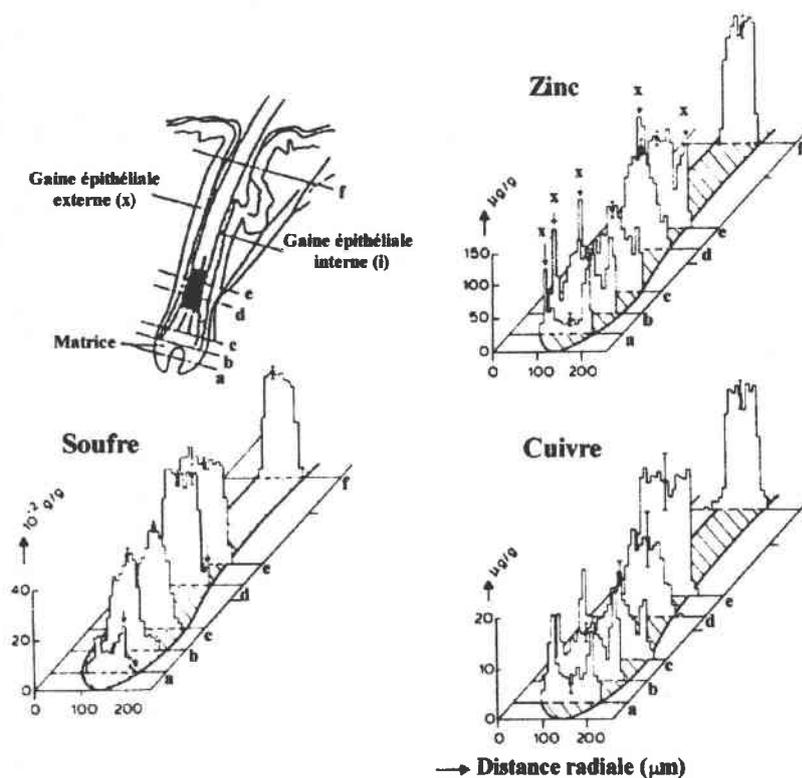


Figure 26 : distribution du soufre, du zinc et du cuivre sur le diamètre des sections (a,b,c,d,e,f représentées sur le schéma du bulbe pileaire) de la racine d'un cheveu par PIXE [142].

- La gaine épithéliale : A.J.J. Bos et col. [142] ont analysé par PIXE (Proton Induced X-ray Emission) des sections successives de la racine d'un cheveu. Ils remarquent que des éléments comme le cuivre (Cu) et le zinc (Zn) sont répartis de façon homogène dans la tige pileaire tandis qu'ils sont davantage concentrés sur l'extérieur de la racine (figure 26). Ils émettent l'hypothèse que ces éléments traversent les cellules de la gaine épithéliale pour rejoindre le cortex. Vu le nombre de barrières cellulaires à franchir, le passage dans la tige via cette voie transversale se fait certainement plus lentement. Ce phénomène pourrait expliquer ce que M.B. Rabinowitz et col. [143] ont observé chez des individus alimentés avec un supplément de ^{204}Pb , à savoir un délai de 35 jours entre sa détection dans le sang et son apparition dans les cheveux.

- La sueur : nous avons vu que la sueur était composée d'un certain nombre de sels en solution et d'éléments traces (voir I.4., page 16). A. Pineau [6] a montré en dopant une sueur synthétique avec des éléments, qu'il y avait des échanges entre la sueur et les cheveux. Le sens de la migration varie en fonction de l'élément et du pH de la solution. A un pH de 6,2, tous les échanges ont lieu en direction de la tige pileaire.

- Le sébum : c'est une substance grasse qui recouvre le cheveu. Il pourrait avoir deux actions opposées : favoriser la fixation de particules et dissoudre les éléments qui s'y trouvent ou protéger la tige pileaire en l'imperméabilisant.

- La sueur apocrine : sécrétée dans les régions axillaire et périnéale, elle pourrait être une autre source de contamination.

- Les cellules de l'épiderme : lorsqu'elles desquament, elles deviennent une source mineure de contamination en se fixant sur le cheveu grâce au sébum.

b) Exogène

- L'eau : de nombreux auteurs remarquent des concentrations supérieures en brome (Br) ou en cuivre sur les cheveux d'individus qui vont régulièrement à la piscine [106, 113]. Il y a donc bien un échange entre l'eau de la piscine contenant ces sels et le cheveu.

- Les poussières atmosphériques : l'effet d'un tel mode de contamination est mis en évidence par plusieurs observations. La première note une augmentation de la teneur en éléments minéraux de la racine vers la pointe [6 et 144] (figure 27). La seconde, remarque que les cheveux prélevés dans un milieu exposé au plomb (Pb) sur des femmes turques, ont une concentration plus faible que ceux prélevés sur des allemandes. Pourtant leur taux de Pb dans le sang est identique. Cette différence s'explique par le fait que les femmes turques travaillent avec un foulard qui protège leurs cheveux [8]. Enfin, A. Pineau [6] a démontré que lorsque des cheveux étaient mis en contact avec de la poussière et de la

sueur, il y avait un passage des éléments contenus dans les particules vers la tige pileaire.

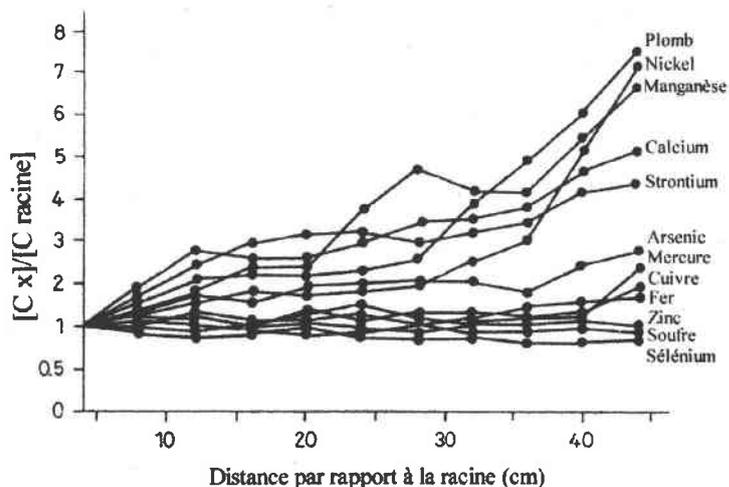


Figure 27 : augmentation de la concentration en éléments (x) de la racine vers la pointe d'un cheveu [144].

- Les produits cosmétiques : de nombreux éléments sont apportés par les traitements capillaires (pyrithione de zinc, acide borique, sulfate de magnésium, acétate de plomb par exemple) [137]. Ils expliquent bien souvent les concentrations plus élevées retrouvées sur certains cheveux [113 et 145].

II.5.1.2. Sites de fixation des éléments

La structure particulière en écaille de la cuticule et la présence de sébum, favorisent la fixation physique des particules à la surface des cheveux.

Les protéines riches en acides aminés soufrés qui constituent la kératine du cheveu (18 % des acides aminés) sont autant de sites possibles de fixation pour des métaux. Ces derniers sont connus pour avoir généralement une forte affinité pour les composés soufrés. La force de ces liaisons soufre-métal est fonction de l'élément, celles avec le mercure et le cuivre sont par exemple très stables par rapport à celles avec le zinc. Des cheveux plongés dans une solution à 1 % d'acide nitrique pendant 21 heures ont ainsi, un pourcentage d'extraction du Cu (33 %) plus faible que celui du Zn (89 %) [146].

Les groupements carboxyliques libres peuvent aussi jouer un rôle important dans la fixation des métaux sur le cheveu. De nombreux travaux montrent que la tige pileaire adsorbe plus de métaux en solution à un pH de 6 que pour un pH de 4 [6, 146 et 147]. Les groupements carboxyliques étant plus protonés pour de faible pH, ils sont moins libres pour former des liaisons ioniques avec les cations métalliques ; mais ils fixent mieux les composés anioniques (comme les halogénures). C. Rostaing et col. [147] indiquent aussi que les cheveux décolorés chimiquement ont une plus grande capacité à capturer des cations pour de faible pH que des cheveux non traités.

La structure et la composition de la cuticule (couches riches en composés soufrés ou en acides aminés à chaîne latérale acide et basique) sont certainement à l'origine des concentrations en éléments minéraux plus importantes dans cette zone que dans les autres parties du cheveu. C'est aussi la région la plus exposée aux contaminations exogènes (traitement capillaire [148], figure 28).

Enfin il ne faut pas oublier le rôle particulier des mélanines qui complexent certains éléments. Par exemple, les cheveux blonds sont en général moins riches en manganèse et en fer que les cheveux bruns ou roux [16, 144]. Ces minéraux peuvent aussi intervenir lors de la synthèse de ces pigments.

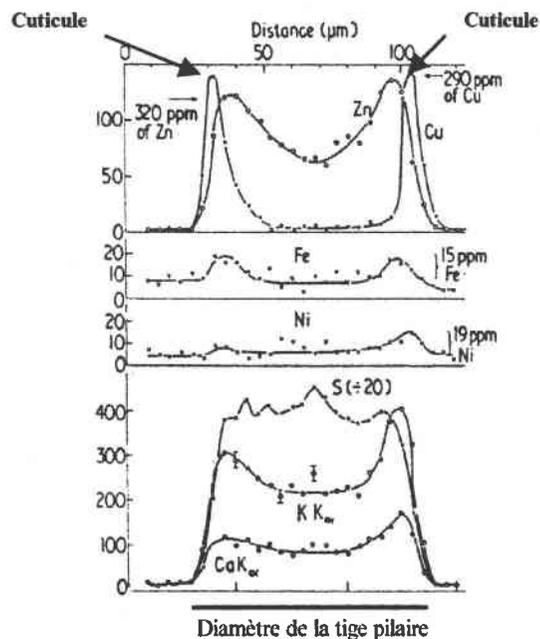


Figure 28 : distribution d'éléments sur le diamètre d'une tige pileaire [148].

II.5.1.3. Nettoyage des cheveux

Le nettoyage des cheveux avant leur analyse est un épineux problème. Car il a pour objectif de séparer les éléments endogènes de ceux exogènes. Les liquides utilisables pour le lavage peuvent se répartir en cinq groupes : l'eau, les solvants organiques (méthanol, acétone, hexane...), les détergents (lauryl-sulfate, Triton X100), un agent complexant (l'EDTA) et l'acide nitrique.

Les expériences montrent que l'utilisation d'un ou de plusieurs de ces liquides entraînent des fractions variables d'éléments [6, 106 et 107]. Il est de plus difficile de déterminer la partie endogène de la partie exogène, car il n'existe pas de témoin non contaminé.

A. Pineau [6] a résolu le problème de l'échantillon témoin en utilisant des poils de barbes coupés avec un rasoir électrique et donc exposés le moins possible au milieu extérieur. De son étude, il conclue que la technique de nettoyage qui respecte le plus les constituants endogènes du cheveu est

l'utilisation de bains successifs d'acétone, d'eau et d'acétone. Cependant, elle est surtout efficace pour éliminer des particules atmosphériques déposées sur un cheveu sec.

Il est donc aberrant de vouloir comparer des taux d'éléments traces, quand les échantillons de cheveux ou de poils ont été lavés selon des protocoles différents.

II.5.1.4. Objectifs de l'analyse du cheveu

a) Police scientifique

L'utilisation de l'analyse élémentaire des cheveux pour prouver un empoisonnement par l'arsenic, le thalium (Tl), le mercure (Hg) et le plomb (Pb) a fait ces preuves. A.S. Curry et C.A. Pounds ont montré qu'il était aussi possible de déterminer la date approximative du début d'un empoisonnement à l'As [141] (figure 29).

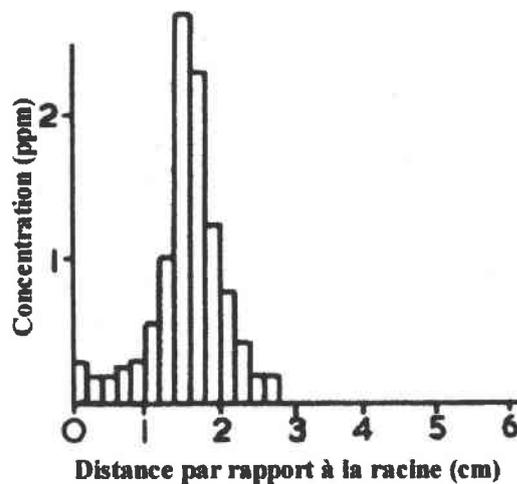


Figure 29 : observation de la présence d'As dans un cheveu 41 jours après l'ingestion [141].

En 1993 J.F. Muller et col. remarquent que la présence d'un élément inhabituel dans un cheveu peut avoir un fort pouvoir discriminant. Ils donnent l'exemple d'une forte concentration en lithium (Li) détecté sur les trois poils d'origine inconnue retrouvés sur le lieu d'un délit. Les cheveux des suspects ne contenaient pas de Li, donc les poils devaient appartenir à une autre personne. Ils ont montré que ce taux important pouvait provenir de la prise d'un médicament, comme le gluconate de lithium utilisé pour le traitement des états dépressifs cyclothymiques [149].

R. Cornelis et A. Speecke [145 et 150] ont étudié les variations de la concentration en éléments minéraux des cheveux de deux frères, sur une

période de 25 ans. Ils remarquent que les concentrations en Zn et en Cu varient peu. Ce qui n'est pas le cas de Hg, de As, de l'antimoine (Sb) et du manganèse (Mn). Ils concluent que la discrimination des deux frères à l'aide de la composition élémentaire de leur cheveu est faible car ils sont génétiquement proches et vivent dans le même environnement. Pour y arriver, ils devraient peut-être étudier un plus grand nombre d'éléments. S.Y. Cho et col. [114] aboutissent eux à la conclusion qu'il est possible d'utiliser l'activation neutronique (technique non destructive) pour caractériser les cheveux d'un individu. En observant 17 éléments, ils indiquent une probabilité 10^4 à 10^6 fois supérieure pour associer un cheveu à ceux de son propriétaire plutôt qu'à ceux d'un étranger. En pratique il faut être très prudent sur ce résultat, car nous avons vu que le cheveu est très facilement contaminé par le milieu extérieur (sur le lieu de sa découverte par exemple).

b) Médecine

L'intérêt de l'analyse élémentaire en médecine est basé sur deux notions (figure 30) [151] :

- élément trace non essentiel : composé dont l'organisme peut se passer et qui devient toxique au-dessus d'une certaine concentration (Pb, Hg...);

- élément trace essentiel : composé qui doit être présent dans une fourchette de concentration pour un bon fonctionnement de l'organisme (Zn, Cu...).

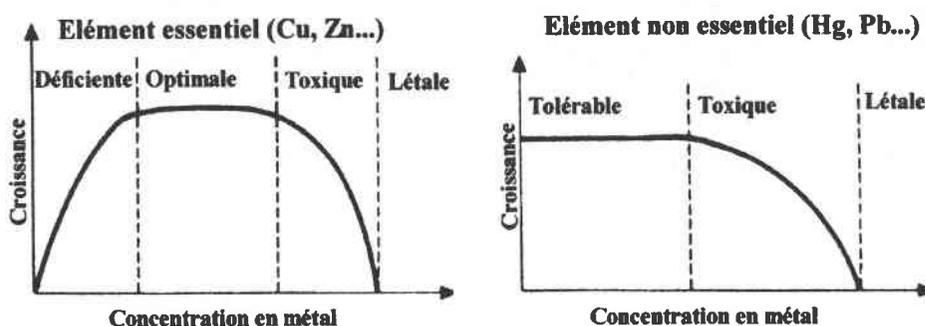


Figure 30 : effet de la concentration en élément trace essentiel et non essentiel sur la croissance d'une cellule [151].

Le tableau 16 donne une idée des taux normaux de certains éléments présents dans le cheveu [131]. L'exploitation de telles informations en nutrition est difficile car les proportions d'éléments endogènes et exogènes ne sont pas connues. De plus, les résultats doivent être confrontés avec ceux d'autres analyses (sang, urine...). En effet une concentration trop faible ou trop importante ne veut pas obligatoirement

dire qu'il y a carence ou excès en élément, mais peut être un problème d'assimilation par l'organisme.

Eléments	Minimum (ppm)	Maximum (ppm)
Calcium (Ca)	500	1500
Magnésium (Mg)	40	100
Phosphore (P)	100	200
Potassium (K)	100	200
Sodium (Na)	150	400
Zinc (Zn)	120	220
Fer (Fe)	14	30
Cuivre (Cu)	16	45
Manganèse (Mn)	0,8	2,5
Sélénium (Se)	3,5	6,0
Chrome (Cr)	0,6	1,5
Cobalt (Co)	0,4	1,5
Nickel (Ni)	0,6	2,0
Molybdène (Mo)	0,6	1,5
Vanadium (V)	0,5	1,5
Plomb (Pb)	-	12
Cadmium (Cd)	-	1,5
Aluminium (Al)	-	15
Mercure (Hg)	-	5,0
Arsenic (As)	-	6,0

Tableau 16 : plage de concentration normale en éléments présent dans le cheveu [131].

Les tentatives pour corréler le taux de certains éléments dans le cheveu avec ceux des tissus ou des organes sont bien souvent contradictoires ou impossibles [135 et 136].

En médecine du travail, c'est une bonne technique pour observer une exposition à un élément polluant (personne travaillant en aciérie ou dans une cristallerie par exemple).

c) Ecologie

Sur des populations importantes, les analyses de la composition élémentaire du cheveu permettent par exemple :

- de délimiter des zones industrielles à risques (proximité de mine d'or polluée par le Hg au Brésil [117]) ou géologique (eau contaminée par de l'As [152])
- d'observer des comportements à risques (consommation de poisson pollué au Hg dans certaines régions du Japon [123])

II.5.2. Les composés organiques (drogues et médicaments)

Tout comme les éléments minéraux, les composés organiques peuvent être piégés dans la tige pileaire. Leur stabilité dans la matrice du cheveu est bonne, car M.J. Welch et col. [153] rapportent la présence de métabolites de la cocaïne dans des cheveux de momies sud-américaines vieilles de plus de 4 000 ans. Cependant, pour des raisons techniques le développement de ce type d'analyse date de la fin des années 70 avec la détection d'héroïne et de morphine par A.M. Baumgartner et col. [154].

Contrairement à l'étude des éléments minéraux, celle des drogues et des médicaments nécessite un protocole d'analyse plus élaboré car ces molécules sont plus fragiles. Les benzodiazépines sont par exemple dégradées par une extraction en milieu alcalin [155-157]. Nous allons donc détailler dans le paragraphe qui suit, la méthode d'analyse de ces xénobiotiques.

II.5.2.1. Protocole d'analyse

Pour une analyse il faut entre 10 et 50 mg de cheveux prélevés sur l'arrière du crâne. Elle se déroule généralement en quatre étapes : la préparation, l'extraction, la purification et la détection.

a) La préparation

La première phase est la décontamination des composés qui ont pu se déposer sur les cheveux. Si cette pollution est moins courante que celle des éléments minéraux présents partout, elle reste possible. C'est surtout le cas pour des conduites toxicophiles, mais aussi pour des personnes exposées à des fumées (crack¹ [158], cannabis ou tabac par exemple), nous parlerons alors de contamination passive. Le nombre important de procédures de lavage utilisées, expriment la difficulté rencontrée pour éliminer la pollution externe sans toucher aux composés endogènes [153]. Elles utilisent des solvants organiques (méthanol, éthanol, acétone, dichlorométhane...), de l'eau, des tampons, des détergents non-ioniques ou des combinaisons de ceux-ci. Au vu des nombreux résultats, il est raisonnable de penser qu'il faut adapter le lavage aux drogues ou médicaments recherchés. Il s'avère, qu'un nettoyage efficace à 100 % semble très difficile à obtenir.

La deuxième phase consiste à réduire en poudre le cheveu dans un broyeur à boulet pour faciliter l'extraction des composés piégés.

b) L'extraction [157, 159-162]

Il existe cinq grands types d'extraction :

¹ Crack : dérivé de la cocaïne insoluble dans l'eau. L'origine de son nom vient du bruit qu'il produit en chauffant lorsqu'on le fume.

- en milieu basique, c'est certainement la moins utilisée car nous l'avons vu, elle dégrade un certain nombre de molécules ;
- en milieu acide, c'est la technique la plus employée car elle est assez polyvalente. Elle ne revient pas chère ;
- par digestion enzymatique, elle donne de très bons résultats mais nécessite un protocole plus élaboré avec l'utilisation de composés qui se manipulent avec précaution (groupement thiol). Son coût est plus élevé ;
- dans un solvant (méthanol, eau) ;
- en phase super critique, cette technique est encore peu utilisée, mais elle fournit de bons résultats pour les opiacés et la cocaïne. Elle nécessite moins de temps comparée aux autres extractions, une trentaine de minutes au lieu de 5 à 24 heures.

c) La purification

Elle est obligatoire pour les trois premières catégories d'extraction (base, acide et enzyme). La purification consiste en des étapes successives de centrifugation (qui élimine par exemple les grains de mélanines), d'extraction sur phase solide, d'évaporation et de reprise dans un solvant.

d) La détection [163-164]

Elle se fait à l'aide de l'une de ces quatre techniques :

- la GC/MS, c'est la plus utilisée car elle sensible, sélective et spécifique (surtout en MS/MS). Mais, elle nécessite pour certains composés une phase de dérivation (PFPA+HFIP¹, BSTFA+TCMS², TFAA³, BSA⁴) afin de permettre leur analyse. La sensibilité est augmentée en détectant seulement un ion (SIM) ;
- la chromatographie liquide haute performance (HPLC) est surtout utile pour les composés polaires ou thermolabiles ;
- l'électrophorèse capillaire (CE) a les mêmes capacités que la technique précédente, mais elle est d'un coût plus faible et nécessite de très petits volumes de prélèvements pour l'analyse (nanolitre). Pour des problèmes de sensibilité, elle reste encore peu utilisée [163] ;
- l'immunologie, avec par exemple la radio-immunologie (RIA) qui est un moyen simple et sensible mais nécessitant l'utilisation d'éléments radioactifs ou l'enzymo-immunologie (EIA).

Les protocoles d'analyse possibles sont donc nombreux. L'étape la plus critique est certainement celle de l'extraction qui peut influencer sur la concentration des composés détectés, mais aussi sur leur composition. Une

¹ PFPA+HFIP : acide pentafluoropropionique anhydride + hexafluoroisopropanol pour la cocaïne.

² BSTFA+TMCS : bis (méthylsilyl) acétamide + triméthylchlorosilane pour le cannabis.

³ TFAA : acide trifluoroacétique anhydride pour les amphétamines.

⁴ BSA : bis (triméthylsilyl) acétamide pour la morphine.

hydrolyse trop acide ou basique transforme par exemple la 6-monoacétylmorphine (6-MAM) en morphine [159]. Le choix du protocole doit se décider en fonction des propriétés physico-chimiques du médicament ou de la drogue analysés. Nous allons maintenant détailler les différents mécanismes d'incorporation de ces molécules dans le cheveu.

II.5.2.2. Les voies de pénétration [165-169]

Tout comme l'incorporation des éléments dans le cheveu, celle des composés organiques est soumise à de nombreux paramètres physiologiques et physico-chimiques.

a) Le sang

Y. Nakahara et col. [167] observent dans le cheveu une concentration plus importante en cocaïne (COC) par rapport à ses métabolites¹ (benzoyl ecgonine (BE) et ecgonine méthyl ester (EME)) (figure 31). Alors que l'inverse est constaté dans le plasma (figure 32). L'incorporation dans le cheveu se ferait donc plus facilement pour les composés les plus hydrophobes. Cet échange entre les capillaires sanguins et la matrice du bulbe pileux, est considéré comme le plus important pour l'incorporation des composés organiques.

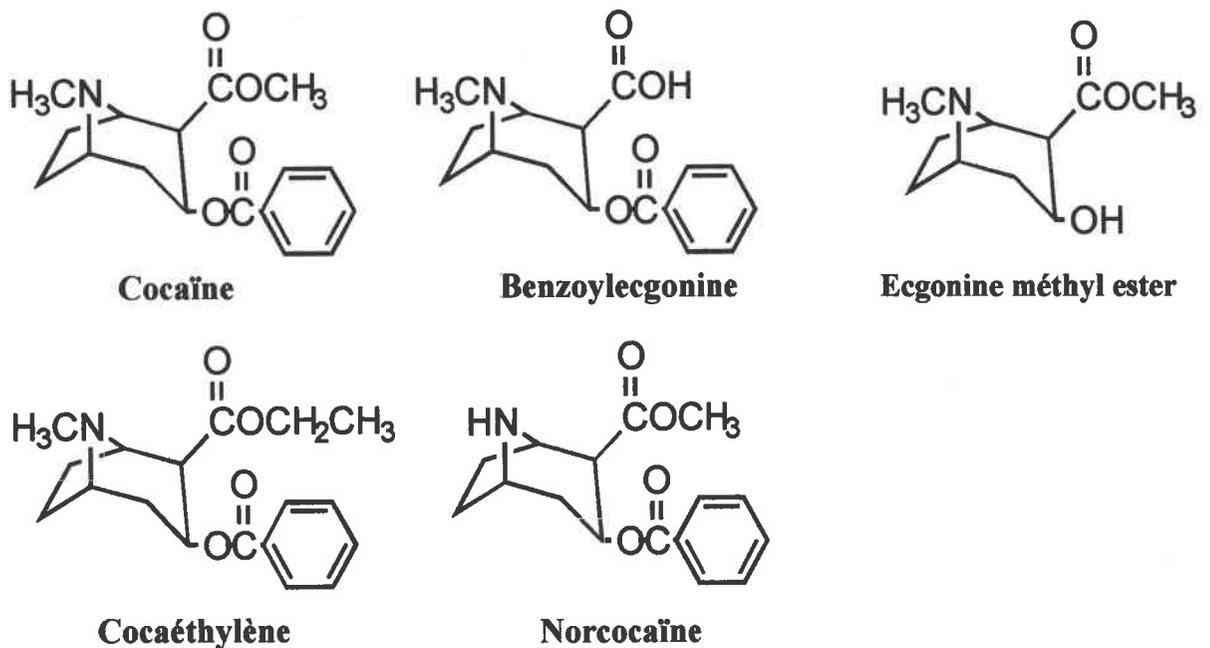


Figure 31 : représentation des molécules de la cocaïne et de ses métabolites.

¹ Métabolite : produit de la transformation d'un composé dans l'organisme.

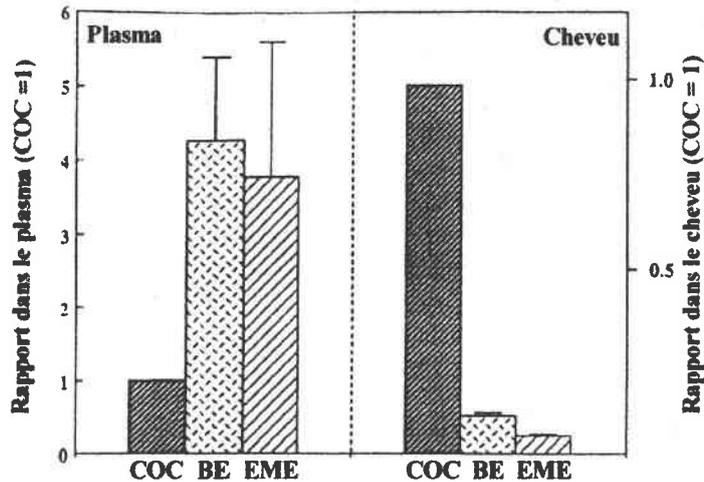


Figure 32 : Rapport de concentration, de la cocaïne (COC) et de ses métabolites (benzoyl ecgonine (BE) et ecgonine méthyl ester (EME)) dans le plasma et le cheveu [167].

Les drogues, les médicaments ainsi que leurs métabolites sont distribués dans le corps principalement par transport passif¹ via le sang. Leur distribution est généralement facilitée par une forte solubilité dans les lipides, par de faibles liaisons aux protéines et par des facteurs physico-chimiques favorisant une forme neutre de ces composés dans le sang.

W.A. Baumgartner et col. [170] ont montré chez la souris une relation linéaire entre les doses injectées et la concentration en drogue (héroïne, cocaïne, etc.) retrouvée dans les poils. Cependant, chez l'être humain si cette relation reste possible, elle n'est pas aussi simple car de nombreux paramètres sont à prendre en compte (transpiration, pigmentation...). Les résultats de Y. Nakahara et col. [171] indiquent que pour une même dose ingérée, la quantité de méthoxyphénamine² (MOP) fixée dans le cheveu varie d'un individu à l'autre. La concentration de MOP détectée coté racine est supérieure à celle de la pointe. Ils l'expliquent par un effet plus important des lavages successifs sur la zone du cheveu la plus abîmée ou par une décomposition graduelle du médicament dans le cheveu. Ils remarquent cependant pour une même personne une bonne corrélation entre la dose absorbée et la quantité retrouvée dans les trois premiers centimètres du cheveu.

M.R. Harkey [31] rapporte deux expériences avec de la cystine et du glucose marqué par des isotopes radioactifs. Elles indiquent que le premier composé est davantage présent dans la zone de kératinisation alors que le second est concentré au niveau de la matrice du cheveu. Il

¹ Transport passif : par opposition au transport actif qui nécessite de l'énergie.

² Méthoxyphénamine : composé bronchodilatateur.

existerait donc plusieurs voies de pénétration des composés organiques dans la racine du cheveu. G.L. Henderson [166] observe quant à lui dans les cheveux de certains individus, l'apparition de cocaïne deutérée huit heures après l'injection. Il doit donc exister d'autres voies de pénétration que la diffusion passive au niveau de la papille dermique.

b) La sueur

Les traces de nombreuses drogues ont été retrouvées dans la sueur. Pour la cocaïne et l'héroïne, P. Kintz [172] remarque que la sueur comme le cheveu, a une concentration en métabolites inférieure à celle du composé parent. Il n'est donc pas exclu qu'une partie des molécules retrouvées dans le cheveu proviennent de la sueur. Cette hypothèse est confirmée par G.L. Henderson [166]. En effet, il a démontré un transfert de cocaïne deutérée d'un toxicomane à un échantillon de cheveu sain, que le sujet a tenu dans sa main pendant 30 minutes. Le nettoyage qu'il a pratiqué après n'a pas permis d'éliminer toute trace de drogue, ce qui prouve aussi une fixation significative au cheveu.

c) Le sébum

Le sébum est peu étudié, mais nous pouvons considérer que c'est une source potentielle de contamination. E.J. Cone [165] rapporte la présence de terbinafine (agent antifongique synthétique) dans le sébum de personnes traitées par voie orale. De plus, il favorise la fixation de particules contaminantes, qui pourront transférer une partie de leurs composés dans la tige pileaire.

d) La peau

Malgré son rôle protecteur, la peau laisse pénétrer certains composés très liposolubles. Ils vont ainsi atteindre la circulation sanguine générale, c'est le cas par exemple de la nicotine contenue dans les patches pour arrêter de fumer.

e) L'environnement [153 et 158]

Comme nous l'avons déjà signalé le cheveu peut être contaminé par son environnement. C'est le cas pour les fumeurs passifs (fumée) ou pour un trafiquant en contact fréquent avec de la drogue (particule). Cet échange avec le milieu extérieur est probablement augmenté dans certaines conditions : si une sueur abondante favorise la solubilisation des composés ou si le cheveu est abîmé par des traitements capillaires qui le rendent plus perméable. Ce type de pollution posera donc un problème lors de l'analyse de certaines drogues ou composé comme la nicotine, mais elle sera quasi inexistante pour le suivi de traitements médicamenteux.

II.5.2.3. Propriétés physico-chimiques des composés organiques

Comme nous l'avons remarqué précédemment, les concentrations des composés organiques varient en fonction du milieu. La cocaïne est plus concentrée que ses métabolites dans le cheveu, tandis que c'est l'inverse dans le sang. Cette différence de réactivité peut s'expliquer par des propriétés physico-chimiques différentes. Deux phénomènes paraissent importants, la fixation des composés dans le cheveu et le passage des membranes cellulaires.

a) Le taux d'incorporation

Le taux d'incorporation (TI) d'un composé est obtenu en comparant sa concentration dans le sang à celle des cheveux. Quelques résultats obtenus par Y. Nakahara et col. [173] sont présentés dans le tableau 17. Ces travaux ont été effectués sur des rats (remarque : ils ne transpirent pas) auxquels ils injectaient une certaine dose de produits pharmaceutiques (cocaïne (COC), benzphétamine (BZP), phencylidine (PCP), acide diéthylamide lysergique (LSD), méthoxyphénamine (MOP), 6-monoacétylmorphine (6-MAM), ecgonine méthyl ester (EME), morphine (MO), benzoylecgonine (BE), acide 11-nortétrahydrocannabinol-9-carboxylique (THCA)).

Les composés peuvent être divisés en trois groupes, ceux qui ont un fort, un moyen et un faible taux d'incorporation. Le TI est par exemple 3600 fois plus élevé pour la COC que pour le THCA, une telle différence est certainement due à des propriétés physico-chimiques différentes.

Groupe	Composés	TI	Affinité pour la mélanine (k.10 ⁵)	Pouvoir lipophile (log P)
Fort	COC	3,600	3,450	3,35
	BZP	3,000	2,480	4,05
	PCP	2,300	2,240	4,31
Moyen	LSD	0,400	0,994	1,95
	MOP	0,360	0,960	1,28
	6-MAM	0,210	0,464	1,48
Faible	EME	0,010	0,410	0,72
	MO	0,030	0,250	0,50
	BE	0,003	0,200	0,44
	THCA	0,001	0,160	7,95

Tableau 17 : ce tableau présente différents composés avec leur taux d'incorporation (TI) dans le cheveu, ainsi que leur affinité pour la mélanine et leur pouvoir lipophile [173].

b) L'affinité pour la mélanine [174-177]

Des publications rapportent une concentration plus importante en drogue dans les cheveux [175] ou poils animaux [174 et 176] pigmentés par rapport à ceux non pigmentés du même individu. S.P. Gygi et col.

[174] observent ainsi 2,47 ng/mg de codéine dans les poils blancs d'un rat et 111,93 ng/mg dans ses poils noirs. Dans son étude *in vitro* sur des mélanines synthétiques, Y. Nakahara [173] (tableau 17) observe un coefficient de corrélation de 0,947 entre le TI et l'affinité des composés analysés pour la mélanine. Les mélanines jouent donc un rôle important dans la fixation des composés organiques. Il doit cependant exister un autre moyen de les bloquer car ils sont aussi détectés dans des poils sans pigment. Peut-être sont-ils simplement piégés dans la matrice protéinique.

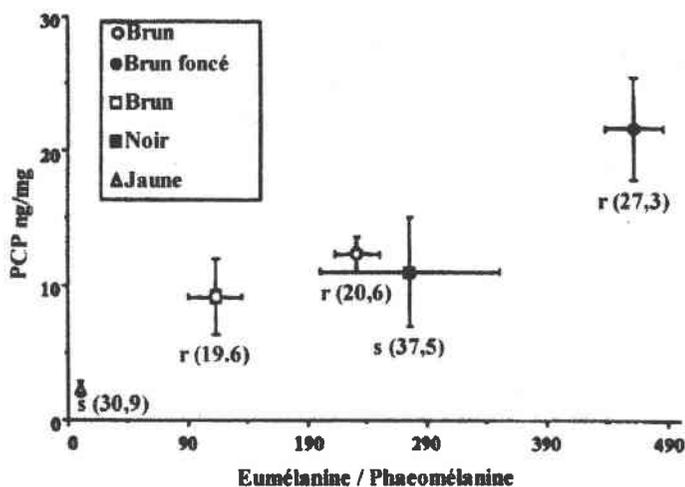


Figure 33 : concentration de phencyclidine (PCP) en fonction du rapport des mélanines dans les poils de souris (s) et de rats (r). Les chiffres entre parenthèses correspondent à la quantité total de pigments en µg/mg.

M.H. Slawson et col. [176] se sont intéressés au rôle joué par les différentes mélanines (voir I.1.3.3) dans la fixation de la phencyclidine (PCP) aux poils de rats et de souris (figure 33). Ils constatent que l'incorporation de PCP est liée à la concentration en eumélanine plutôt qu'en phaeomélanine, ainsi la souris jaune et le rat brun plus riche en phaeomélanine fixe moins de PCP que les autres. Ils proposent de normaliser la concentration des drogues en utilisant le rapport eumélanine / phaeomélanine et non pas la quantité de cheveu. La fixation des composés organiques avec les mélanines serait donc fonction de leur aptitude à former des liaisons ioniques avec les pigments chargés négativement. S'il n'y a pas de problèmes stériques entre les molécules, la fixation peut être consolidée par des forces non électrostatiques de type van der Waal's entre des noyaux aromatiques.

Suite à ces constatations, K.M. Höld et col. [177] se sont demandés si une certaine quantité de produits piégés dans le cheveu n'était pas perdue lors du protocole d'extraction (notamment pendant l'élimination des grains de mélanines par centrifugation). Ils ont montré que cela n'était

pas le cas pour la cocaïne après une extraction enzymatique sur les cheveux, suivi d'une extraction acide sur les grains de mélanine.

c) Propriété lipophile

Le travail de Y. Nakahara et col. [173] indique une bonne corrélation entre l'aspect lipophile des composés organiques et leur taux d'incorporation dans le cheveu (coefficient de corrélation égal à 0,770 sans le THCA). Cependant cet aspect à lui seul n'est pas suffisant. En effet, l'acide 11-nortétrahydrocannabinol-9-carboxylique très lipophile ($\log P = 7,95$) a un TI très faible ($TI = 0,0005$). D'autres propriétés physico-chimiques de la molécule influent donc sur son passage au travers des membranes cellulaires ou sur sa fixation. Ils remarquent que les molécules basiques ont un meilleur TI que les composés acides.

d) Perméabilité membranaire [157, 173 et 178]

Les membranes sont constituées d'une double couche lipidique qui les rendent imperméables aux ions, mais perméables aux molécules hydrophobes (benzène...) et aux petites molécules polaires non chargées (urée, eau, glycérol...). Il existe cependant des protéines liées aux membranes qui transfèrent des petites molécules spécifiques (ions, oses, acides aminés...) à travers les membranes cellulaires. Le transport peut se faire de deux manières [178] :

- passif : il est influencé par le gradient de concentration et le gradient électrique total à travers la membrane. Ils constituent ensemble le gradient électrochimique. En fait, il existe un gradient de tension sur toutes les membranes plasmiques, la face interne étant chargée négativement par rapport à l'extérieur. Cela facilite le passage vers l'intérieur des molécules chargées positivement mais s'oppose à celles chargées négativement ;

- actif : il nécessite alors un apport d'énergie pour aller à l'encontre du gradient électrochimique.

Le passage des macromolécules et des particules se fait par endocytose et exocytose (processus de fusion membranaire). Une partie des drogues et médicaments fixés dans le cheveu pourraient y être introduit avec les mélanosomes (grains de mélanine) fabriqués dans les mélanocytes.

La migration des composés organiques va donc être fonction de leur pouvoir lipophile mais aussi des gradients de concentration et de pH de part et d'autre de la membrane. Différents auteurs [157 et 173] rapportent un pH_i de $3,67^1$ pour le cheveu et de 7,40 pour le sang. Ce gradient pourrait en partie expliquer le passage préférentiel des composés

¹ $pH_i = 3,6$: point isoélectrique déterminé à partir de la mobilité électrophorétique de particules de cheveu mises en suspension dans des séries de tampons.

basiques ; le faible taux d'incorporation des molécules acides étant compensé par une concentration plus importante dans le sang.

Avec le transport passif, la quantité d'un composé organique qui passe la barrière membranaire doit être identique pour tous les cheveux pigmentés ou non d'un même individu. Mais nous avons vu que ce n'est pas le cas. Il peut y avoir trois raisons à cela :

- les pigments changent le pH du cheveu et donc la perméabilité membranaire ;

- les composés pénètrent de la même manière dans la matrice du cheveu. S'ils n'ont pas pu se fixer aux pigments, une partie d'entre eux ressort au moment où le gradient de concentration entre le sang et le cheveu s'inverse ;

- une partie des molécules organiques est introduite en même temps que les mélanosomes dans les cellules de la matrice.

II.5.2.4. Intérêt de l'analyse des composés organiques [179-186]

Depuis les années 1980 l'intérêt pour la détection des composés organiques dans le cheveu n'a pas cessé d'augmenter. Malgré un coût plus élevé et des temps d'analyse plus longs (tableau 18), elle est devenue une technique complémentaire aux analyses d'urine et de sang. Ce succès parfois médiatique (procès de M. Barry, maire de Washington) est dû à plusieurs raisons, dont la plus importante est certainement une longue période de détection des composés (plusieurs mois). D'autres milieux comme la sueur [172] et les ongles [186] sont étudiés avec des objectifs similaires

	Urine	Sueur	Cheveu
Cocaïne (COC)	BE>EME>COC	COC>EME>BE	COC>BE>EME
Héroïne (HER)	MO>6-MAM	6-MAM>HER>MO	6-MAM>MO
Période de détection	2-3 jours	1 semaine	Des mois à des années
Prélèvement	Invasif	Non invasif	Non invasif
Conservation	+4°C, -20°C	T° ambiant	T° ambiant
Durée de l'analyse	+	+++	+++
Coût	+	+++	+++
2^{ème} prélèvement	Non	Non	Oui
Risque de falsifications	+++	?	+

Tableau 18 : principales caractéristiques des différents milieux permettant le suivi des conduites toxicophiles. Concentration relative de la cocaïne, de l'héroïne et de leur métabolites dans les urines, la sueur et le sang.

a) Clinique

L'analyse du cheveu permet de s'assurer qu'une personne prend correctement un traitement thérapeutique. P. Kintz et P. Mangin [185] ont montré qu'il est possible de suivre la consommation d'un médicament

comme le bêtaxolol (bêtabloquant). Il suffit de couper le cheveu en segments de 1 cm et de déterminer la concentration des composés organiques qui y sont piégés. La figure 34 indique que le patient A possède un taux de bêtaxolol constant preuve de prises régulières, ce qui n'est pas le cas de B. Cette technique est particulièrement intéressante pour le suivi du traitement d'individus à risques comme les dépressifs ou les personnes âgées (prise irrégulière, auto médication...).

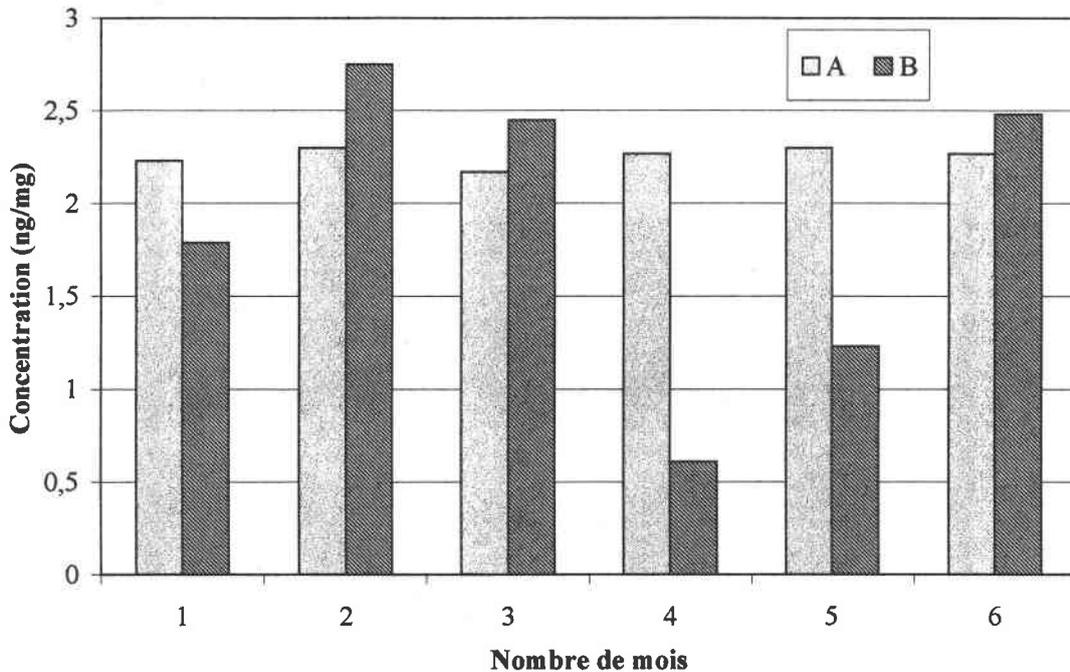


Figure 34 : suivi capillaire du bêtaxolol chez deux hypertendus. A) bonne observance du traitement ; B) mauvaise observance du traitement [181].

La détection de la nicotine peut être utilisée comme un marqueur du tabagisme passif. Celui-ci est responsable d'une augmentation de la fréquence des interventions O.R.L., de l'asthme et de toux chronique. Cette technique rend possible l'ouverture d'un dialogue et la sensibilisation des familles en ce qui concerne les risques encourus par les enfants.

Un des autres intérêts, est la mise en évidence d'une exposition du fœtus à des toxiques, des médicaments ou des stupéfiants pendant la grossesse. De tels comportements peuvent être à l'origine d'accouchement avant terme et de bébé dépendant à un stupéfiant comme l'héroïne.

b) Médecine médico-légale

Comme nous l'avons fait remarquer au début de ce paragraphe, le principal avantage des cheveux par rapport à l'urine et au sang, est de permettre la détection des composés organiques sur une période de temps

beaucoup plus longue. Avant leur utilisation, il suffisait d'arrêter de consommer une drogue ou un produit dopant quelques jours avant l'analyse d'urine pour que le test soit négatif. Il est aussi possible de la fausser, en utilisant des molécules masquantes ou en buvant beaucoup (dilution).

L'analyse du cheveu a cependant un inconvénient, il peut être contaminé par son environnement (fumée, poussière...), ce qui provoque des résultats faussement positifs. Malheureusement, il n'existe pas de méthode de lavage efficace pour éliminer les contaminants. Contrairement aux éléments minéraux, il est possible de contourner ce problème car les composés organiques qui pénètrent dans l'organisme sont rapidement métabolisés. Il suffit donc d'observer les métabolites pour savoir s'il y a eu consommation ou contamination. Les scientifiques considèrent par exemple la présence de 6-MAM comme suffisante pour affirmer une consommation d'héroïne et celle d'anhydro ecgonine méthyl ester (AEME) comme spécifique du crack. Il faut cependant prendre quelques précautions, car comme le souligne la figure 35, des composés différents peuvent donner le même métabolite. Ainsi l'héroïne et la codéine conduisent à la morphine.

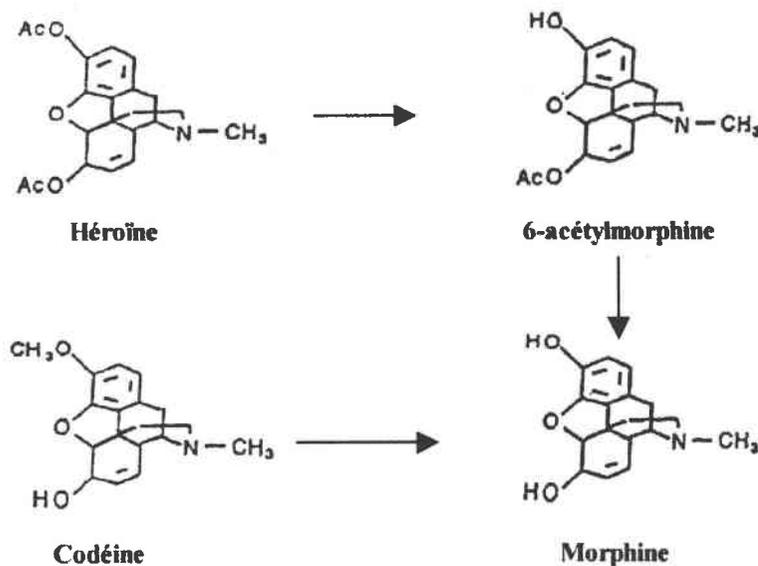


Figure 35 : métabolisme de l'héroïne et de la codéine [183].

De plus, la cocaïne peut être transformée en benzoylecgonine (BE) par une hydrolyse alcaline, due à l'utilisation régulière d'un shampoing ou d'un autre traitement capillaire. Il est nécessaire dans ce cas d'observer un autre métabolite comme l'EME ou de déterminer un seuil minimum. G. Pépin et Y. Gaillard [155] ont proposé avec leur protocole d'analyse un

rapport BE / COC égal à 9 %. Ils considèrent que tous les résultats supérieurs sont significatifs de l'usage de cocaïne. Pour éviter les risques de faux positif, des seuils de positivité ont été déterminés à partir des résultats de nombreuses analyses (tableau 19).

Composé	Seuil de positivité (ng/mg)
6-MAM	0,5
Cocaïne	1 ou 0,5 (si preuve complémentaire)
THCA	0,05
Amphétamine	0,5 pour tous les dérivés

Tableau 19 : seuils de positivité retenus à l'I.M.L. de Strasbourg [180].

En plus d'être qualitative, l'analyse du cheveu contrairement à l'urine est semi-quantitative (degré d'exposition). La figure 36 représente les concentrations détectées dans les tronçons de cheveu, d'un consommateur de crack. Nous observons un véritable calendrier historique des consommations. Il indique une nette diminution des prises durant les six derniers mois. Cependant du fait des variations inter-individus, il paraît impossible de déterminer la dose journalière exacte à partir d'une analyse capillaire.

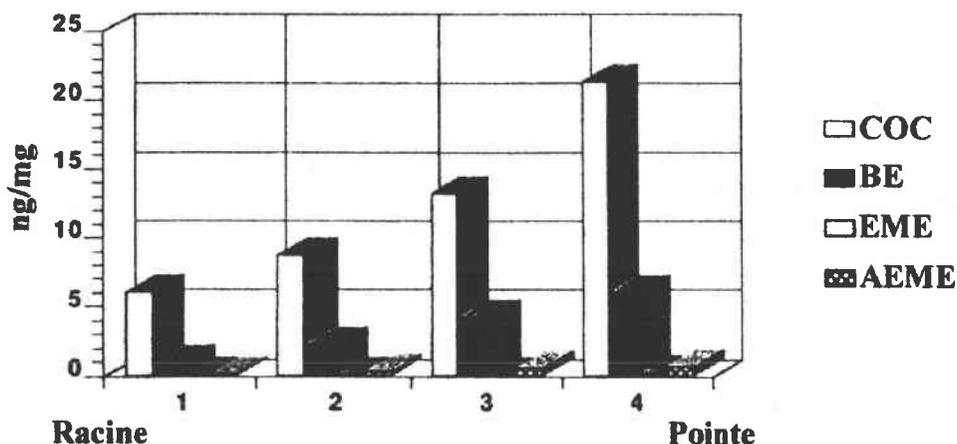


Figure 36 : analyse des sections de cheveux d'une personne qui fume du crack. Chaque section représente 2 cm. COC, cocaïne ; BE, benzoylecgonine ; EME, ecgonine méthyl ester ; AEME, anhydro ecgonine méthyl ester [172].

C'est pourquoi, l'analyse des composés organiques contenus dans les cheveux ou les poils est utilisée en médecine médico-légale dans de nombreux cas :

- pour différencier un revendeur d'un consommateur. Le vendeur risque de la prison ferme alors que le consommateur (habituel ou occasionnel) risque le plus souvent une injonction thérapeutique ;
- les trafics de drogue en prison ;
- le dopage chez les sportifs ;
- le contrôle vétérinaire des animaux destinés à la consommation ;
- pour déterminer la cause d'un décès (empoisonnement, overdose...) ;
- le suivi d'une cure de sevrage ou des toxicomanes. Le remplacement de l'héroïne par des substances de substitutions comme la méthadone nécessite un suivi analytique. Pour cela des analyses d'urines sont effectuées deux fois par semaines, elles peuvent être remplacées par un prélèvement de cheveu par mois. L'analyse de cheveu a comme autres avantages : un programme d'analyse modulable et la possibilité de refaire un deuxième prélèvement s'il y a le moindre doute, ce qui n'est pas possible avec les urines.

II.5.3. Conclusion

L'exploitation des informations contenues dans le cheveu date véritablement de la fin des années 1970. Elle est étroitement liée au développement des techniques d'analyses qui se poursuit encore actuellement. L'objectif est de travailler sur des quantités de plus en plus petites et avec un minimum de traitements préalables de l'échantillon. Ainsi S.B. Wainhaus et col. [187] ont réussi à détecter de la cocaïne dans 1 mm de cheveu par extraction thermique GC/MS (l'échantillon est introduit dans l'injecteur qui est rapidement monté à 250°C), tandis que S.F. Durrant et N.I. Ward [188] utilisent le couplage ablation laser ICP/MS pour doser les éléments minéraux de la tige pileaire.

Comme l'analyse du sang et des urines, celle du cheveu apporte des informations intéressantes pour un diagnostic. Cependant, elle n'est pas toujours suffisante et ne remplace pas un examen complet. Dans des conditions normales, les éléments sont incorporés de manière chronologique. Mais dès que la tige pileaire sort du follicule pileux, elle est exposée à un environnement potentiellement contaminant. Les voies de pénétrations des éléments minéraux et organiques dans le cheveu sont multiples (figure 37).

L'incorporation peut se faire :

- par le sang directement au niveau de la matrice du cheveu (1) ;
- par voie transverse entre la gaine épithéliale et la tige pileaire (2) ;
- indirectement, par excrétion via les glandes sudoripares (3), la peau (5) et les glandes écrines (6) ;
- par contamination externe avec par exemple, des poussières, des fumées, de l'eau ou des traitements capillaires (4). Elle se fait soit directement sur la tige pileaire ou indirectement en traversant la peau vers le sang.

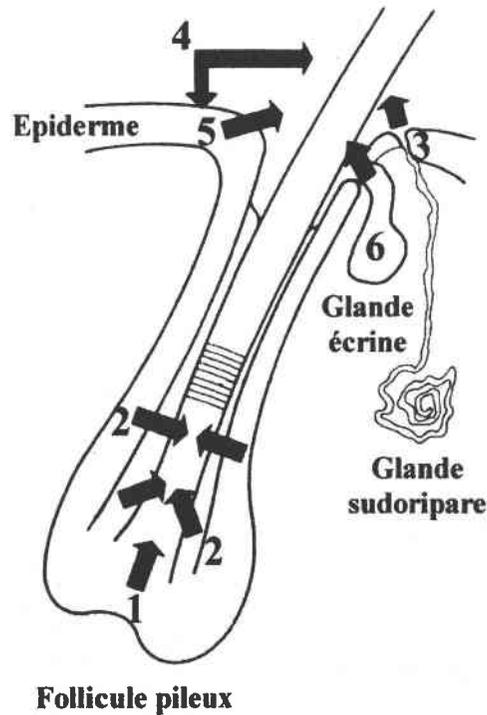


Figure 37 : voies de pénétration des éléments traces dans le cheveu [142].

Le passage des composés dans le cheveu est fonction de leurs propriétés physico-chimiques (charge, encombrement stérique, pouvoir lipophile, concentration...). Leur fixation dans cette matrice protéinique complexe dépend aussi de plusieurs paramètres : affinité pour les mélanines et pour les composés soufrés, quantité présente de pigments et de protéines soufrées, du pH, des réactions de compétition entre les différentes molécules.

L'exploitation des résultats nécessite de déterminer l'influence du milieu extérieur (traitements capillaires, fumées, pollution...) et de quelle manière il affecte les résultats de l'analyse. Par exemple une augmentation est qualitativement valable, car elle traduit l'exposition à un environnement anormalement pollué. Par contre, quantitativement elle ne l'est pas, car elle ne fait pas la différence entre l'élimination et la contamination. Ce problème est en partie résolu pour les composés organiques, car ils sont métabolisés dans l'organisme ce qui prouve leur passage par le sang. C'est donc les métabolites qui sont observés en priorité. Par contre pour les éléments minéraux la difficulté reste entière et malheureusement il n'existe pas de protocole de décontamination véritablement efficace.

L'application des résultats d'une personne à une autre paraît difficile, car de nombreux paramètres individuels vont influencer la fixation des éléments traces dans le cheveu. Nous pouvons citer par exemple :

- les cheveux riches en eumélanine qui fixent plus de composés organiques (cocaïne, 6-MAM...) que ceux sans pigment ;
- la sueur à pH = 6 qui favorise la fixation des cations par rapport à une autre plus acide.

L'interprétation des résultats nécessite une fois de plus une bonne connaissance du cheveu, de son environnement, des composés détectés et des techniques d'analyses. Néanmoins, l'analyse du cheveu a prouvé son efficacité dans de nombreux cas : mise en évidence de conduite toxicophile, empoisonnement, suivi d'un traitement médicamenteux, délimitation de zones industrielles à risque, etc..

III. Conclusion du chapitre

Comme cette étude bibliographique nous l'a montré, le cheveu est un élément complexe tant par sa composition que par sa structure. Pendant sa phase de croissance, la matrice pileuse est le lieu d'une intense activité mitotique qui fait croître le cheveu d'environ 1,2 cm par mois. Au bout de trois à quatre ans, après une phase de repos, il tombe. On estime qu'un individu perd une centaine de cheveux par jour. La constitution particulièrement riche en acides aminés soufrés des kératines (85 à 93 % du poids total), rend le cheveu insoluble et résistant aux agents biologiques. Ils sont ainsi retrouvés sur des momies vieilles de plus de quatre mille ans.

Les qualités du cheveu peuvent se résumer par trois idées :

- prélèvement aisé et non traumatisant ;
- conservation et transport facile ;
- bande enregistrant l'imprégnation de l'organisme.

Elles expliquent l'intérêt croissant des scientifiques pour le cheveu, dans des domaines aussi variés que la médecine, l'écologie et la criminalistique.

L'analyse morphologique, même grossière, est bien souvent la première étape d'une étude du cheveu. En procédant par exclusion, la police criminelle l'utilise comme un moyen pour réduire le champ de ses investigations (nombre de suspects). En effet, les informations fournies sont très rarement caractéristiques d'un seul individu. Dans leurs travaux de B.D. Gaudette et col. ont estimé que la probabilité d'observer deux cheveux indiscernables entre deux personnes de type Caucasien était de 1/4500. De tels résultats nécessitent un échantillonnage représentatif et des chercheurs expérimentés.

Suivant l'état du cheveu (racine bien conservée, canal médullaire...), il est possible d'accéder à un certain nombre de caractères génétiques indépendants de l'âge, de l'environnement et du mode de vie de son propriétaire, comme le groupe sanguin, le sexe, l'activité enzymatique et l'ADN. Le caractère qui apporte le maximum d'informations discriminantes est l'empreinte génétique de l'ADN nucléaire (ADNn) [56], tandis que les plus persistantes sont le groupe sanguin et l'ADN mitochondriale (ADNmt) [189]. La technique la plus sensible

est l'analyse PCR (Polymerase Chain Reaction) de l'ADN, mais il faut faire attention aux contaminations bactériennes et à la quantité de pigment présent.

Les kératines constitutives du cheveu sont aussi liées aux gènes, mais leurs structures peuvent être modifiées par différents facteurs : ensoleillement, traitement capillaire. L'analyse de leur composition en acides aminés ne permet pas de différencier des individus. Par contre, par électrophorèse sur gel des variations voire des polymorphismes ont été détectés. Certaines empreintes électrophorétiques ne sont observées que sur quelques pour-cent d'une population. L'analyse par pyrolyse couplée à la chromatographie en phase gazeuse présente des pyrogrammes parfois différents entre les cheveux de deux personnes. Mais elle reflète à la fois l'aspect génétique (kératine, pigments...) et le comportement social d'un individu (traitement capillaire, drogues...).

La figure 38 présente une estimation de la probabilité d'obtenir les mêmes résultats sur deux individus, en fonction des caractères étudiés. Le pouvoir discriminant de l'information recueillie est bien évidemment fonction :

- du nombre et du type des caractères étudiés ;
- de la population d'origine des échantillons (européenne ou africaine par exemple) ;
- du protocole d'analyse.

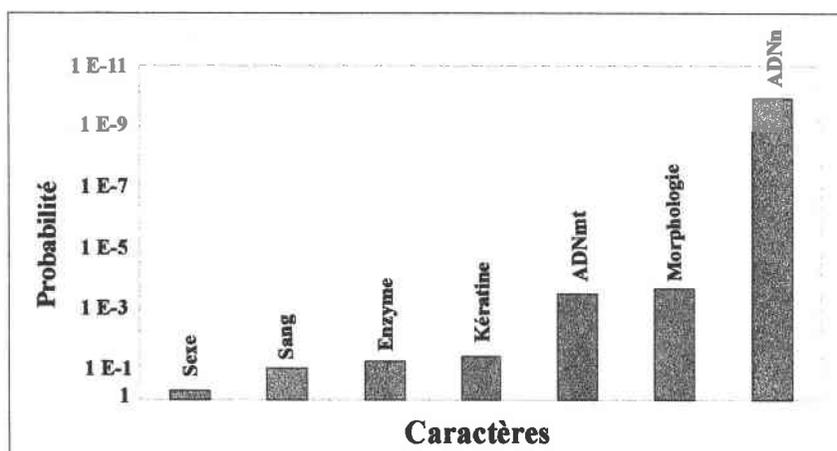


Figure 38 : ordre d'idée de la probabilité d'obtenir les mêmes résultats lors de l'analyse des cheveux de deux individus, en fonction du caractère étudié (mt : mitochondriale, n : nucléaire).

Le cheveu est un mode d'excrétion des éléments contenus dans l'organisme. En se comportant comme une bande enregistrante, il permet un suivi dans le temps de la concentration des composés organiques et minéraux présents dans le corps. Cependant, leurs voies de pénétrations dans la matrice pilaire sont multiples. Nous pouvons les diviser en deux origines : interne (sang, sueur, sébum...) et externe (fumée, traitement capillaire, pollution...). Leur concentration est fonction de leurs propriétés physico-chimiques (solubilité,

charge, pouvoir lipophile, concentration...) et de leur capacité à se fixer dans la tige (affinité pour les mélanines, formation de liaisons soufrées ou ioniques...). L'interprétation des résultats nécessite de faire la différence entre les éléments d'origines internes qui reflètent l'imprégnation de l'organisme et ceux d'origines externes (pollution). Ce problème est surtout critique pour les composés minéraux, car il n'existe pas de protocole de lavage réellement efficace. Dans le cas des molécules organiques, il est possible de connaître leur origine en étudiant leurs métabolites. En effet, ils sont la preuve du passage des composés dans l'organisme. Ce qui explique l'intérêt croissant des médecins mais aussi des vétérinaires.

Cette étude montre que si le cheveu est un matériel de choix pour les toxicologues et la police judiciaire, il reste une matrice complexe, qui nécessite beaucoup d'expérience de la part du chercheur. Les techniques d'analyses sont nombreuses, mais elles apportent chacune des informations fragmentaires (soit biologique, soit organique, soit minérale). Elles sont de plus assez longues à mettre en œuvre (quelques jours) et consommatrices en échantillon (quelques milligrammes).

C'est pourquoi, nous avons voulu étudier le cheveu à l'aide d'une microsonde laser couplée à la spectrométrie de masse. Equipement qui combine : sensibilité, résolution spatiale (de l'ordre du μm) et vitesse d'analyse. De plus, cette technique a déjà fait ses preuves lors de la détection d'éléments traces ou toxiques dans des coupes histologiques, comme la détection de baryum dans les pigments des photorécepteurs de vertébrés [190] ou de plomb dans des tissus biologiques (foie, os...) [191]. Elle s'est aussi avérée efficace pour différencier plusieurs souches de bactéries en fonction de leurs empreintes spectrales [192]. Ces différents aspects soulignent le potentiel discriminant de ce type d'analyse sur des échantillons complexes comme les cheveux, qui possèdent des composants organiques et minéraux. Ils nous ont encourager à entreprendre ce travail de recherche.

Références bibliographiques

- [1] P.R. Wheeler, H.G. Burkitt et V.G. Daniels, extrait de « Histologie fonctionnelle », éd. par MEDSI/MC Graw-Hill, 1987, 116.
- [2] A.W. Ham et D.H.Cormack, extrait de « Histology », éd. par J.B. Lippincott Company, Philadelphia and Toronto, 1977, 614.
- [3] L.C. Sperling, *J. Am. Acad. Derma.*, 1991, 25, 1, 1.
- [4] K. Hashimoto, *Clin.Derma.*, 1988, 6, 4, 7.
- [5] J.L. Bonafé et A. Dupré, extrait de « Précis de physiologie cutanée », éd. par Porte Verte, Paris, 1980, 101.
- [6] A. Pineau, Thèse de pharmacie, Nantes, 1987.
- [7] A.L. Lehninger, extrait de «Principes de biochimie », éd. par Flammarion médecine sciences, 1989, 149.
- [8] K. Bencze, extrait de « Handbook on metals in clinical and analytical chemistry », éd. par M. Dekker, 270 Madison Ave, New York, 1994, 201.
- [9] C.R. Robbins, extrait de « Chemical and physical behavior of human hair », éd. par Springer Verlag, New-York, 1988, 38.
- [10] P.W. Wertz et D.T. Downing, *Lipids*, 1988, 23, 878.
- [11] P.W. Wertz et D.T. Downing, *Comp. Biochem. Physiol.*, 1989, 92B, 759.
- [12] G. Hussler, G. Kaba, A.M Francois et D. Saint-Leger, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 1995, 17, 197.
- [13] V. Boudier, Thèse de Chimie-Physique, Clermont-Ferrand, 1989.
- [14] K. Hall et L.J. Wolfram, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1975, 26, 247.
- [15] L. Zecca, C. Mecacci, R. Seraglia et E. Parati, *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, 1138, 6.
- [16] G.C. Cotzias, P.S. Papavasiliou et S.T. Miller, *Nat.*, 1964, 201, 21, 1228.
- [17] K. Takaya, *Cell Tiss. Res.*, 1977, 178, 169.
- [18] S. Peter, Thèse de Chimie-Physique, Metz, 1996.
- [19] J.K. Grant, extrait de « Comparative biochemistry », éd. par Acade. Press, New-York and London, Volume III, 1962, 163.
- [20] B.D. Gaudette et E.S. Keeping, *J. Forens. Sci.*, 1974, 19, 3, 599.
- [21] J. Robertson, *J. Forens. Sci. Soc.*, 1982, 22, 390.
- [22] N. Petraco, C. Fraas, F.X. Callery et P.R. De Forest, *J. Forens. Sci.*, 1988, 33, 1, 68.
- [23] P.R. De Forest, B. Shankles, R.L. Sacher et N. Petraco, *Microscope*, 1987, 35, 249.
- [24] N. Petraco, *Microscope*, 1986, 34, 341.
- [25] W.A. Gerrard, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 1989, 11, 97.
- [26] C. Vignaud, L. Coiffard, C. Claire, A. Derrien, Y. De Roeck-Holtzhauer, *Nouv. Dermatol.*, 1994, 13, 146.
- [27] J.M. Riggott et E.H. Wyatt, *J. Forens. Sci. Soc.*, 1983, 23, 155.
- [28] N. Petraco, *J. Pol. Sci. Admi.*, 1981, 9, 4, 448.
- [29] C.E. Barna et S.F. stoeffler, *J. Forens. Sci.*, 1987, 32, 3, 761.
- [30] J.A. Swift, *Inter. J. Cosmet. Sci.*, 1991, 13, 143.
- [31] M.R. Harkey, *Foren. Sci. Int.*, 1993, 63, 9.
- [32] H.R. Elden, *Cosmet. Sci. Techno. Series*, 1990, 8, 93.
- [33] R.J. Caserio, *Cutis*, 1987, 40, 265.
- [34] J.L. Clement, A. Lepareux et P.F. Ceccaldi, *J. Forens. Sci. Soc.*, 1982, 22, 396.
- [35] N. Petraco, *Microscope*, 1987, 35, 83.
- [36] J.E. Moore, *J. Forens. Sci. Soc.*, 1988, 28, 335.
- [37] A.J. Peabody, R.J. Oxborough, P.E. Cage et I.W. Evett, *J. Forens. Sci. Soc.*, 1983, 23, 121.
- [38] C. Palenik, *Microscope*, 1990, 38, 415.
- [39] T.W. Suzanski, *Can. Soc. Forens. Sci. J.*, 1989, 22, 4, 299.

- [40] T.W. Suzanski, *Can. Soc. Forens. Sci. J.*, **1988**, 21, 1-2, 19.
- [41] B.D. Gaudette, *J. Forens. Sci.*, **1976**, 21, 3, 514.
- [42] P. Lamb et L.G. Tucker, *J. Forens. Sci. Soc.*, **1994**, 34, 177.
- [43] B.D. Gaudette, *J. Forens. Sci.*, **1978**, 23, 4, 758.
- [44] R.A. Wickeinheiser et D.G. Hepworth, *J. Forens. Sci.*, **1990**, 35, 6, 1323.
- [45] P.D. Barnett et R.R. Ogle, *J. Forens. Sci.*, **1982**, 27, 2, 272.
- [46] B.D. Gaudette, *J. Forens. Sci.*, **1982**, 27, 2, 279.
- [47] C.G. Girdwood Aitken, J. Robertson, *J. Forens. Sci.*, **1987**, 23, 3, 684.
- [48] B.D. Gaudette et A.A. Tessarolo, *J. Forens. Sci.*, **1987**, 32, 5, 1241.
- [49] C.M. Ashcroft, S. Evans, I.R. Tebbett, *J. Forens. Sci. Soc.*, **1988**, 28, 289.
- [50] M.T. Salter et R. Cook, *Forens. Sci. Int.*, **1996**, 81, 211.
- [51] B.D. Gaudette, *Crime Laboratory Digest*, **1985**, 12, 3, 44.
- [52] J. Robertson et C.G.G. Aitken, *J. Forens. Sci.*, **1986**, 31, 563.
- [53] J.H. Weil, extrait de « *Biochimie générale* », éd. par Masson, Paris, **1987**.
- [54] P. Gill, P.L. Ivanov, C. Kimpton, R. Piercy, N. Benson, G. Tully, I. Evett, E. Hagelberg et K. Sullivan, *Nat. Gen.*, **1994**, 6, 130.
- [55] J. Kalbe, R. Kuroпка, L.S. Meyer-Stork, S.L. Sauter, P. Loss, K. Henco, D. Riesner, H. Höcker et H. Berndt, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **1988**, 369, 413.
- [56] L. Flandroy et C. Nouaille, *Biofutur*, **1989**, oct., 22.
- [57] R. Uchihi, K. Tamaki, T. Kojima, T. Yamamoto et Y. Katsumata, *J. Forens. Sci.*, **1992**, 37, 3, 853.
- [58] K.M. Sullivan, R. Hopgood et P. Gill, *Int. J. Leg. Med.*, **1992**, 105, 83.
- [59] C. Ginther, L. Issel-Tarver et M.C. King, *Nat. Gen.*, **1992**, 2, 135.
- [60] R. Piercy, K.M. Sullivan, N. Benson et P. Gill, *Int. J. Leg. Med.*, **1993**, 106, 85.
- [61] D. Noble, *Anal. Chem.*, **1995**, 1, 613A.
- [62] A. Schreiber, E. Amtmann, V. Storch et G. Sauer, *Fed. Euro. Biochem. Soc.*, **1988**, 230, 1-2, 209.
- [63] R. Higuchi, C.H. von Beroldingen, G.F. Sehsabaugh et H.A. Erlich, *Nat.*, **1988**, 332, 543.
- [64] L.A. King et R. Wigmore, *J. Forens. Sci. Soc.*, **1980**, 20, 263.
- [65] W. Suszczewski, A. Tucholska et J. Wujec, *Forens. Sci. Int.*, **1994**, 67, 141.
- [66] F. Wynbrandt et W.J. Chisum, extrait de « *Seminar of the California Association of Criminalists* », San Jose, **1967**, 201.
- [67] S. Miyasaka, M. Yoshino, H. Sato, B. Miyake et S. Seta, *Forens. Sci. Int.*, **1987**, 34, 85.
- [68] R. Tanabe, I. Ishiyama et Y. Itakura, *J. Forens. Sci.*, **1988**, 33, 3, 767.
- [69] G.F. Sensabaugh, extrait de « *Forensic science handbook* », éd. par R. Saferstein, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, **1982**, 338.
- [70] J.G. Sutton, C.M. Bosley et P.H. Whitehead, *J. Forens. Sci. Soc.*, **1982**, 22, 199.
- [71] M.E. Lawton et J.G. Sutton, *J. Forens. Sci. Soc.*, **1982**, 22, 203.
- [72] A.M. Gambel, B. Budowle et L. Terrell, *J. Forens. Sci.*, **1987**, 32, 5, 199
- [73] M.H. Lynch, W.M. O'Guin, C. Hardy ; L. Mak et T.T. Sun, *J. Cell Bio.*, **1986**, 103, 6, 2593.
- [74] K. Katsuumi, M. Ito, T. Kazama et Y. Sato, *Arch. Dermatol. Res.*, **1989**, 281, 495.
- [75] R.C. Marshall, *J. Investi. Dermatol.*, **1983**, 80, 6, 519.
- [76] M. Gerhard et M. Hermes, *Electropho.*, **1987**, 8, 490.
- [77] C. Napp et M.Kermici, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **1989**, 40, 91.
- [78] M. Gerhard, *Electropho.*, **1987**, 8, 153.
- [79] L.D. Lee, K. Ludwig et H.P. Baden, *Forens. Sci.*, **1978**, 11, 115.
- [80] R.C. Marshall et J.M. Gillespie, extrait de « *The biology of wool and hair* », éd. par G.E. Rogers et al, **1988**, 117.
- [81] B. Miyake, *Jpn. J. Legal Med.*, **1989**, 43, 1, 1.

- [82] B. Miyake, *Jpn. J. Legal Med.*, **1989**, 43, 1, 9.
- [83] J. Chao, A.E. Newsom, I.M. Wainwright et R.A. Mathews, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **1979**, 30, 401.
- [84] J.M. Gillespie et A.S. Inglis, *Comp. Biochem. Physio.*, **1965**, 15, 175.
- [85] A Carracedo, J.M. Prieto, L. Concheiro et J. Estefania, *J. Forens. Sci.*, **1987**, 32, 1, 93.
- [86] H.P. Baden, L.D. Lee et J.Kubilus, *Am. J. Hum. Genet.*, **1975**, 27, 472.
- [87] D.B. Hrdy, H.P. Baden, L.D. Lee, J. Kubilus et K.W. Ludwig, *Am. J. Hum. Genet.*, **1977**, 29, 98.
- [88] R.C. Marshall et J.M. Gillespie, *J. Forens. Sci. Soc.*, **1982**, 22, 377.
- [89] L.J. Wolfram, extrait de « Hair Research », éd. par Orfanos. Montagna. Stuttgart Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **1981**, 479.
- [90] A.G. Matoltsyl, extrait de « Comparative biochemistry », éd. par M. Florin et H.S. Mason, Academic Press, New York and London, **1962**, 343.
- [91] E. Menefee et M. Friedman, *J. Pro. Chem.*, **1985**, 4, 5, 333.
- [92] A.C.W. Georgalas, extrait de « Sunscreens : development, evaluation and regulatory aspect », éd. par N.J. Lowe, N.A. Shaath et M.A. Pathak, **1997**, 15, 399.
- [93] S. Nacht, extrait de « Sunscreens : development, evaluation and regulatory aspect », éd. par N.J. Lowe, N.A. Shaath et M.A. Pathak, **1997**, 15, 445.
- [94] C.M. Pande et J. Jachowicz, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **1993**, 44, 109.
- [95] L. D. Lee et H. P. Baden, *Int. J. Derma.*, **1975**, 14, 161.
- [96] W.J. Irwin, « Analytical pyrolysis : a comprehensive guide », éd. par M. Dekker, New York, **1982**.
- [97] S.A. Liebman et E.J. Levy, « Pyrolysis and GC in polymer analysis », éd. par M. Dekker, New York, **1985**.
- [98] P.R. De Forest, PhD thesis, Berkley (Californie, USA), **1969**.
- [99] C. Fouweather et J. Porter, CRE report n°98, **1973**, Home office central research establishment aldermaston.
- [100] T.O. Munson et J. Vick, *J. Anal. App. Pyrol.*, **1985**, 8, 493.
- [101] T.O. Munson et D.D. Fetterolf, *J. Anal. App. Pyrol.*, **1987**, 11, 15.
- [102] F. Ishizawa et S. Misawa, *J. Forens. Sci. Soc.*, **1990**, 30, 201.
- [103] S.Y. Choi, M.G. Kim, H. Inoue, *J. Anal. App. Pyrol.*, **1995**, 32, 127.
- [104] L. Vernex-Loiset, DEA, Université de Metz, **1992**.
- [105] B.Miyake et S.Seta, *Foren. Sci. Rev.*, **1990**, 2, 1, 26.
- [106] G. Chittleborough, *Sci. Total Environ.*, **1980**, 14, 53.
- [107] M. Wilhelm et H. Idel, *Zbl. Hyg.*, **1996**, 198, 485.
- [108] H.C. Hopps, *Sci. Total Environ.*, **1977**, 7, 71.
- [109] J. Robertson, *Trends Anal. Chem.*, **1987**, 6, 3, 65.
- [110] M. Lamand, *Eurobiologiste*, **1994**, 209, 17.
- [111] B. Forslind, *Nouv. Dermatol.*, **1990**, 9, 3, 273.
- [112] K. Bencze, *Fres. J. Anal. Chem.*, **1990**, 337, 867.
- [113] A. Gordus, *J. Radioanal. Chem.*, **1973**, 15, 229.
- [114] S.Y. Cho, S.G. Jang et Y.S. Chung, *J. Radioanal. Chem.*, **1998**, 229, 1-2, 143.
- [115] A. Al-Hashimi, S.S. Krishnan et R.E. Jervis, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **1992**, 161, 1, 171.
- [116] L. Gerhardsson, V. Englyst, N.G. Lundström, G. Nordberg, S. Sandberg et F. Steinvall, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **1995**, 9, 136.
- [117] O. Malm, M.B. Castro, W.R. Bastos, F.J.P. Branches, J.R.D. Guimaraes, C.E. Zuffo et W.C. Pfeiffer, *Sci. Total Environ.*, **1995**, 175, 127.
- [118] A. Pazirandeh, A.H. Brati et M.Ghannadi Marageh, *Appl. Radiat. Isot.*, **1998**, 49, 7, 753.

- [119] B. Nowak et H. Kozlowski, *Biol. Trace Elem. Res.*, **1998**, 62, 213.
- [120] M.T. Ponzetta, S. Nardi, I. Calliari et M. Lucchese, *Biol. Trace Elem. Res.*, **1998**, 62, 199.
- [121] G. Lal, N.P.S. Sidhu, I. Singh, V.K. Mittal et H.S. Sahota, *Nucl. Med. Biol.*, **1987**, 14, 5, 499.
- [122] V. Bencko, T. Geist, D. Arbetova, D.M. Dharmadikari et E. Svandova, *J. Hyg. Epid. Microbiol. Immuno.*, **1986**, 30, 1, 1.
- [123] R. Nakagawa, *Chemosphere*, **1995**, 30, 1, 127.
- [124] R. Nakagawa, *Chemosphere*, **1995**, 30, 1, 135.
- [125] A.A. Rauf, R.E. Jervis, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **1992**, 161, 1, 201.
- [126] S. Caroli, O. Senofonte, N. Violante, L. Fornarelli et A. Powar, *Microchem. J.*, **1992**, 46, 174.
- [127] M.S. Nagara, B.S. Pallah, G.P.S. Sahota, H. Singh et H.S. Sahota, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **1992**, 162, 2, 283.
- [128] A. Franzblau, L. Rosenstock et D.L. Eaton, *Environ. Res.*, **1988**, 46, 15.
- [129] I. Siraj Jamall et R.A. Jaffer, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **1987**, 39, 608.
- [130] Y. Takagi, S. Matsuda, S. Imai, Y. Ohmori, T. Masuda, J.A. Vinson, M.C. Mehra, B.K. Puri, A. Kaniewski, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **1986**, 36, 793.
- [131] C. Pham, L.M.M. Médecine du sud-est, **1989**, 17-18, 12621.
- [132] D.M. Meideros, A. Mazhar et E.W. Brunett, *Nutri. Res.*, **1987**, 7, 1109.
- [133] E. Contiero et M. Folin, *Biol. Trace Elem. Res.*, **1994**, 40, 151.
- [134] R.S. Gibson et I.L. Gibson, *Sci. Total Environ.*, **1984**, 39, 93.
- [135] J. Yoshinaga, H. Imai, M. Nakazawa, T. Suzuki et M. Morita, *Sci. Total Environ.* **1990**, 99, 125.
- [136] G. Zhuang, Y. Chen, M. Tan, Y. Wang et M. Zhi, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **1991**, 149, 2, 305.
- [137] L.M. Klevay, B.R. Bistrain, R. Fleming et C.G. Neumann, *Am. J. Clin. Nutr.*, **1987**, 46, 233.
- [138] V.P. Guinn, M. Gavrilas-Guinn et R. Demiralp, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **1994**, 179, 2, 365.
- [139] C.H. Tay et C.S. Seah, *Med. J. Aust.*, **1975**, 2, 424.
- [140] J. Yoshinaga, Y. Shibata et M. Morita, *Clin. Chem.*, **1993**, 39, 8, 1650.
- [141] A.S. Curry et C.A. Pounds, *J. Forens. Sci. Soc.*, **1977**, 17, 37.
- [142] A.J.J. Bos, C.C.A.H. van der Stap, R.D. Vis et H. Verheul, *Sci. Total Environ.*, **1985**, 42, 157.
- [143] M.B. Rabinowitz, G.H. Hetherill et J.D. Kopple, *Arch. Environ. Health*, **1976**, 31, 220.
- [144] H.H. Sky-Peck, *Clin. Physiol. Biochem.*, **1990**, 8, 70.
- [145] R. Cornelis, *J. Radioanal. Chem.*, **1973**, 15, 305.
- [146] T.A. Hinnners, W.J. Terrill et J.L. Kent, *Environ. Health Perspec.*, **1974**, 8, 191.
- [147] C. Rostaing, M. Caude, F. Leroy et D. Bauer, *Analisis*, **1990**, 18, 476.
- [148] J.A. Cookson et F.D. Pilling, *Phys. Med. Biol.*, **1975**, 20, 6, 1015.
- [149] J.F. Muller, G. Krier, S. Peter, L. Vernex-Loiset, B. Maunit et N. Sanchez, *Analisis*, **1993**, 21, 255.
- [150] R. Cornelis et A. Speecke, *Forens. Sci. Soc.*, **1971**, 11, 29.
- [151] J.W. Copius Peereboom, *Sci. Total Environ.*, **1985**, 42, 1.
- [152] G. Bozsai, *Microchem. J.*, **1992**, 46, 159.
- [153] M.J. Welch, L.T. Sniegowski, C.C. Allgood et M. Habram, *J. Anal. Toxicol.*, **1993**, 17, 389.
- [154] A.M. Baumgartner, P.F. Jones, W.A. Baumgartner et C.T. Black, *J. Nucl. Med.*, **1979**, 20, 748.

- [153] M.J. Welch, L.T. Sniegowski, C.C. Allgood et M. Habram, *J. Anal. Toxicol.*, **1993**, 17, 389.
- [154] A.M. Baumgartner, P.F. Jones, W.A. Baumgartner et C.T. Black, *J. Nucl. Med.*, **1979**, 20, 748.
- [155] G. Pépin et Y. Gaillard, *Toxicorama*, **1996**, 8, 1, 29.
- [156] M. Yegles, F. Mersch et R. Wennig, *Forens. Sci. Inter.*, **1997**, 84, 211.
- [157] Y. Gaillard et G. Pépin, *J. Chromatogr. A*, **1997**, 762, 251.
- [158] G. Koren, J. Klein, R. Forman et K. Graham, *J. Clin. Pharmacol.*, **1992**, 32, 671.
- [159] P. Edder, C. Staub, J.L. Veuthey, I. Pierroz et W. Haerdi, *J. Chromatogr. B*, **1994**, 658, 75.
- [160] J.L. Veuthey, P. Edder et C. Staub, *Analisis*, **1995**, 23, 258.
- [161] L.T. Sniegowski et M.J. Welch, *J. Anal. Toxicol.*, **1996**, 20, 242.
- [162] M. Chiarotti, *Forens. Sci. Inter.*, **1993**, 63, 161.
- [163] F. Tagliaro, F.P. Smith, Z. De Battisti, G. Manetto et M. Marigo, *J. Chromatogr. B*, **1997**, 689, 261.
- [164] F. Tagliaro et F.P. Smith, *Trends Anal. Chem.*, **1996**, 15, 10, 513.
- [165] E.J. Cone, *Ther. Drug Monit.*, **1996**, 18, 4, 438.
- [166] G.L. Henderson, *Forens. Sci. Int.*, **1993**, 63, 19.
- [167] Y. Nakahara, T. Ochiai et R. Kikura, *Arch. Toxicol.*, **1992**, 66, 446.
- [168] W.A. Baumgartner et V.A. Hill, *Forens. Sci. Int.*, **1993**, 63, 121.
- [169] D.A. Kidwell et D.L. Blank, *Forens. Sci. Int.*, **1993**, 63, 137.
- [170] W.A. Baumgartner, V.A. Hill et W.H. Bland, **1989**, *J. Forens. Sci.*, 34, 6, 1433.
- [171] Y. Nakahara, M. Shimamine et K. Takahashi, *J. Anal. Toxicol.*, **1992**, 16, 253.
- [172] P. Kintz, *Ther. Drug. Monit.*, **1996**, 18, 4, 450.
- [173] Y. Nakahara, K. Takahashi et R. Kikura, *Biol. Pharm. Bull.*, **1995**, 18, 9, 1223.
- [174] S.P. Gygi, R.E. Joseph, E.J. Cone, D.G. Wilkins et D.E. Rollins, *Drug Meta. Dispo.*, **1996**, 24, 4, 495.
- [175] N. Takayama, S. Tanaka, R. Kizu et K. Hayakawa, *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **1998**, 44, 116.
- [176] M.H. Slawson, D.G. Wilkins et D.E. Rollins, *J. Anal. Toxicol.*, **1998**, 22, 406.
- [177] K.M. Höld, D.L. Hubbard, D.G. Wilkins et D.E. Rollins, *J. Anal. Toxicol.*, **1998**, 22, 414.
- [178] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts et J.D. Watson, extrait de « *Biologie moléculaire de la cellule* », éd. par Flammarion médecine sciences, **1986**, 286.
- [179] M.R. Moeller, *Ther. Drug. Monit.*, **1996**, 18, 444.
- [180] P. Kintz, *Analisis*, **1996**, 24, 5, M18.
- [181] P. Kintz et P. Mangin, *J. Méd. Strasbourg*, **1991**, 22, 9, 518.
- [182] P. Kintz, A. Tracqui et P. Mangin, *J. Méd. Légale Droit Médi.*, **1992**, 35, 2/3, 121.
- [183] W. Arnold et H. Sachs, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1994**, 348, 484.
- [184] J.P. Goullé et P. Kintz, *Rev. Méd. Interne*, **1996**, 17, 826.
- [185] M.A. Mc Phillips, J. Strang et T.R.E. Barnes, *British J. Psychia.*, **1998**, 173, 287.
- [186] V. Cirimele, P. Kintz et P. Mangin, *Arch. Toxicol.*, **1995**, 70, 68.
- [187] S.B. Wainhaus, N. Tzanani, S. Dagan, M.L. Miller et A. Amirav, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1998**, 9, 1311.
- [188] S.F. Durrant et N.I. Ward, *Food Chemis.*, **1994**, 49, 317.
- [189] M.M. Holland et T.J. Parsons, *Foren. Sci. Rev.*, **1999**, 11, 21.
- [190] J.L. Van Reempts, M. Borgers, S.R. De Nollin, T.C. Garrevoet et W.A. Jacob, *J. Histochem. Cytochem.*, **1984**, 32, 788.
- [191] P.F. Schmidt et K. Ilsemann, *Scanning Electron Microsc.*, **1984**, I, 77.
- [192] U. Seydel et B. Lindner, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **1981**, 308, 253.

Chapitre II

Matériels et méthodes

C'est avec l'apparition des lasers pulsés que l'étude des solides par ionisation laser s'est développée. Les premiers travaux concernant le couplage d'une microsonde laser à un spectromètre de masse datent du milieu des années 1960. Mais il faut attendre 1978 pour voir la première microsonde laser commercialisée par la société Leybold-Heraeus sous le nom de LAMMA¹500. Initialement conçue pour l'analyse des oligo-éléments présents dans des coupes biologiques fines, elles permettent maintenant l'étude de l'ensemble des composés organiques ou minéraux non volatiles.

Nous allons présenter dans ce deuxième chapitre l'interaction laser-matière et détailler plus particulièrement les deux microsondes lasers utilisées lors de ce travail : le LAMMA et le FTMS². Nous terminerons par le protocole mis au point pour l'analyse spécifique des cheveux.

¹ LAMMA : Laser Microprobe Mass Analysis.

² FTMS : Fourier Transform Mass Spectrometry.

I. Laser et interaction laser matière

Les microsondes lasers LAMMA 500 et FTMS analysent les ions formés dans le plasma, lors de l'application d'un faisceau laser sur un échantillon solide.

I.1. Le laser [1 et 2]

Le mot « laser » est l'acronyme de « Light Amplification by Stimulated Emission of Radiations », c'est à dire « Amplification de Lumière par Emission Stimulée du Rayonnement ».

I.1.1. Principes physiques

Un laser est composé de trois éléments fondamentaux :

- le **milieu actif** : base atomique du système, qui peut être un liquide (colorant), un solide (Nd-YAG¹) ou un gaz (excimère). Il possède une structure appropriée de niveaux d'énergie, s'excitant facilement et possédant la capacité de stocker l'énergie reçue.

- le **pompage** : pour avoir une émission stimulée importante, il faut que la population de l'état excité soit supérieure à celle de l'état fondamental. L'inversion de population est réalisée, hors équilibre thermique, par une excitation extérieure (pompage). Pour cela, plusieurs méthodes sont employées : pompage optique (lampe flash), électronique (décharge électrique)...

- la **cavité résonante** : elle est constituée de deux miroirs hautement réfléchissants, parallèles, placés face à face. Ils renvoient l'onde électromagnétique en de multiples passages aller-retour dans le milieu actif, amplifiant ainsi le champ électromagnétique dans la cavité (émission stimulée). Le couplage optique vers l'extérieur se fait en rendant un des miroirs transparents.

I.1.2. Propriétés du rayonnement laser

- **Cohérence** : la conséquence des propriétés de l'émission stimulée et de la présence d'une cavité résonante est l'identité de phase (et de longueur d'onde) des différents photons émis par le laser.

- **Directivité** : elle se traduit par une faible divergence du faisceau ce qui permet l'utilisation de nombreux composants optiques.

- **Monochromaticité** : les lasers donnent des couleurs très pures, c'est à dire que le faisceau émis a une longueur d'onde dont la largeur de raie est très étroite (0,01 à 0,3 nm).

- **Brillance spectrale** : elle représente la puissance émise par unité de surface, de fréquence et par stéradian. Dans le cas d'un laser, elle est très élevée.

¹ Nd-YAG : cristal de Grenat d'Aluminium et d'Yttrium dopé en Néodyme.

I.2. L'interaction laser-matière

Suivant l'état de l'échantillon cible (gaz, solide, liquide) les caractéristiques de l'interaction laser-matière sont très différentes. En phase solide les processus sont complexes et difficiles à modéliser. Ils résultent de l'absorption des photons émis par le faisceau laser et d'une succession de phénomènes physiques ultra-rapides (tableau 1).

$t < 1\text{ps}$	Absorption non linéaire des photons	Emission de photo-électrons
$t < 0,01\text{ ns}$	Formation d'excitons Emission thermo-ionique	Apparition de charges en surface
$t < 0,1\text{ ns}$	Ionisation de surface	Emissions d'électrons secondaires
$1\text{ ns} < t < 5\text{ ns}$	Formation d'une phase gazeuse	Emissions d'ions, de radicaux, d'atomes et de molécules neutres. Emission de photons
$5\text{ ns} < t < 100\text{ }\mu\text{s}$	Expansion du nuage gazeux ou du plasma si l'ignition est atteinte ($T > 5\text{ 000 K}$)	Réactions ion / molécule Emissions d'agrégats neutres et ionisés

Tableau 1 : principaux phénomènes mis en jeu lors de l'interaction laser-matière en fonction du temps. t : temps, T : température.

I.2.1. Modélisation de l'ablation laser

En 1982 D.M. Hercules et col. [3] ont proposé un modèle représentant les phénomènes qui interviennent au cours de l'interaction laser-solide (figure 1).

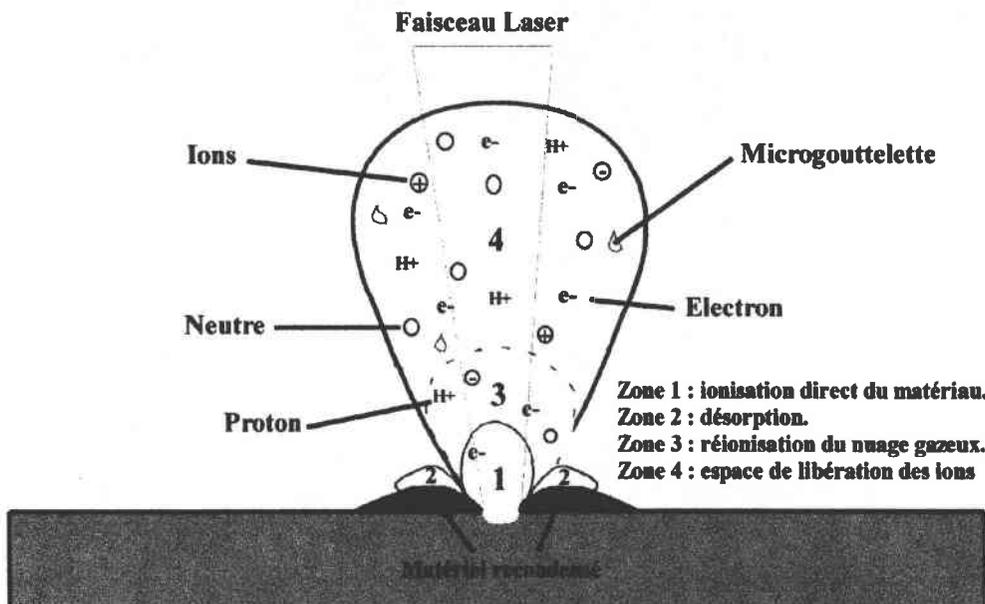


Figure 1 : schéma général de l'ablation laser.

Ils proposent quatre types de mécanismes, correspondant chacun à une zone géographique située autour du point d'impact :

- la zone 1 est l'endroit où se produit l'impact laser. Elle se caractérise par une ionisation directe du matériau solide. La température peut atteindre 3 000 à 6 000 K selon les cas. Dans ces conditions, seuls des ions atomiques et quelques fragments moléculaires sont émis.

- la zone 2 voisine subit l'onde de choc issue de l'impact laser. C'est une zone de désorption d'ions de haut poids moléculaire, de molécules neutres, mais aussi d'un certain nombre d'ions résultant de réaction en phase gazeuse.

- la zone 3 correspond à la réionisation du nuage gazeux par le flux photonique (effet d'écran).

- la zone 4 représente l'espace de libération des ions.

Le volume de matière ablatée par le tir laser dépend notamment de la longueur d'onde et de l'irradiance du faisceau ionisant.

I.2.2. Effet de la longueur d'onde

L'énergie des photons émis étant fonction de leur longueur d'onde, il est facile de comprendre que les mécanismes d'ablation peuvent être très différents en fonction du rayonnement. En simplifiant, nous pouvons dire que dans l'infrarouge les mécanismes sont de type thermique, alors que dans l'ultraviolet ils sont plutôt photochimiques.

$$E = \frac{h \times c}{\lambda} \text{ avec } h = 4,135669 \cdot 10^{-15} \text{ eV.s et } c = 2,99792458 \cdot 10^8 \text{ m/s.}$$

ex : pour $\lambda = 193 \text{ nm}$ les photons ont une énergie $E = 6,42 \text{ eV}$

pour $\lambda = 1064 \text{ nm}$ les photons ont une énergie $E = 1,16 \text{ eV}$

I.2.2.1. Effet de type thermique

L'énergie apportée par le laser infrarouge se disperse dans le matériau par conduction thermique. Les photons ne sont pas assez énergétiques pour réaliser une ionisation photochimique de la cible. Par contre ils provoquent un échauffement de la surface par chocs successifs, ce qui entraîne une fusion et une vaporisation de la zone irradiée. Ce phénomène peut être grossièrement comparé à l'effet d'une source de chaleur déposée à la surface ou à l'impact d'un projectile sur une cible. Il s'en suit une propagation du front de chaleur plus ou moins importante en fonction des propriétés conductrices du matériau. Lorsque l'irradiance est très élevée ($> 10^{10} \text{ W/cm}^2$), il peut y avoir une « explosion de phase ». Elle génère une onde de choc qui parcourt le solide et éjecte de la matière de zones n'ayant pas subi l'irradiation.

I.2.2.2. Effet de type photochimique

D'après R. Srinivasan et B. Braren [4], le processus d'ablation d'un polymère se décompose en trois étapes successives (figure 2) : absorption des

photons UV par le matériau ; rupture des liaisons les plus faibles ; ablation du matériau.

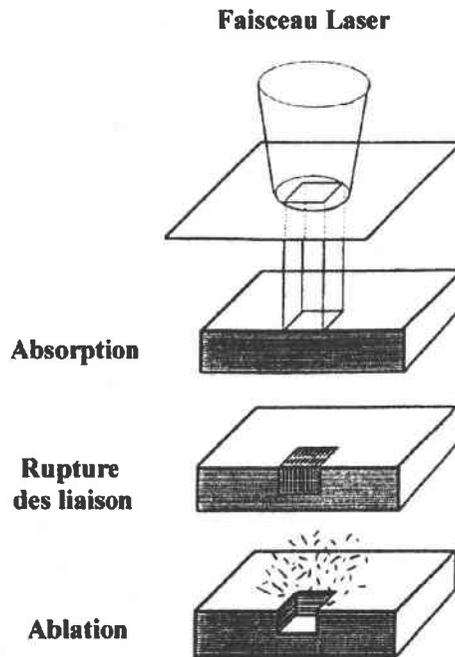


Figure 2 : principe de l'ablation des polymères selon R. Srinivasan et B. Braren [4].

L'absorption des photons UV par le matériau conduit à des transitions entre les états électroniques de la molécule (notamment pour les polymères). La décomposition de la cible est considérée comme ablative. R. Srinivasan et B. Braren décrivent trois mécanismes pouvant conduire à ce phénomène :

- l'absorption de photons UV amène les molécules cibles à des niveaux d'énergie supérieurs jusqu'à leur dissociation. Cette étape purement photochimique extrêmement courte ($\ll 1$ ns) conduit à l'ablation du substrat ;

- l'absorption des premiers photons UV provoque un échauffement de la surface ce qui conduit au peuplement des états vibrationnels excités des molécules. Si la durée de vie de cet état vibrationnel est suffisamment longue pour qu'il y ait absorption d'un second photon (ou davantage) provenant de la même impulsion laser, il est possible de constater une dissociation photochimique des molécules ;

- les molécules excitées, mais non ablatées, se relaxent par redistribution de l'excès d'énergie (mouvement rotationnels et vibrationnels) aux molécules voisines. Lorsque l'irradiance est élevée, ces phénomènes provoquent un échauffement brutal et localisé de l'échantillon. L'absorption de plusieurs photons successifs dans une même zone permet d'atteindre des températures suffisantes pour provoquer la décomposition thermique des molécules au niveau de leurs liaisons les plus faibles (liaisons hydrogène, interactions ioniques...).

Si le nombre de liaisons rompues par l'ensemble de ces processus est suffisant, on assiste à une augmentation brutale de la pression locale conduisant à une éjection de matière sous forme gazeuse.

I.2.3. Effet de l'irradiance

L'énergie déposée par un tir laser à la surface d'un échantillon est caractérisée par l'irradiance (I_r), elle s'exprime en W/cm^2 .

$$I_r = \frac{E \times a}{\tau \times S}$$

E : énergie par impulsion (J)
a : coefficient d'atténuation des composants optiques
 τ : durée de l'impulsion (s) et S : surface (cm^2)

Avec nos microsondes laser, l'irradiance peut varier entre 10^5 et 10^{11} W/cm^2 . La plupart des ions analysés se forment lors de la phase d'expansion du nuage gazeux induit par l'impact laser. La nature de ce nuage est différente selon l'irradiance déposée sur la cible. Il apparaît ainsi que le rapport ions / neutres formés lors d'une impulsion laser varie. Il est supérieur à 10^{-3} pour $I_r > 10^9$ W/cm^2 et inférieur à 10^{-5} pour $I_r < 10^8$ W/cm^2 .

Nous pouvons classer les processus d'ablation / ionisation en fonction de l'irradiance sur l'échantillon [5] :

- à irradiance faible, c'est à dire pour $I_r < 10^7$ W/cm^2 , le processus de désorption laser domine : au point le plus chaud de l'impact laser, les ions élémentaires sont formés. Ils réagissent avec les molécules organiques de la surface, désorbées à la couronne du point chaud par effet thermique, pour donner des ions moléculaires : M^{+o} , pseudomoléculaires : $[M+H]^+$, $[M-H]^-$ ou cationisés $[M+Na]^+$... ;
- à irradiance moyenne : $10^7 < I_r < 10^9$ W/cm^2 , les ions élémentaires sont présents, accompagnés d'agrégats ionisés (clusters), on parle d'ablation laser ;
- à très forte irradiance : $I_r > 10^9$ W/cm^2 , les ions élémentaires sont majoritaires.

I.3. Conclusion

Cette première partie nous a montré l'importance de bien contrôler les paramètres laser des microsondes comme l'irradiance et la longueur d'onde. En effet, selon le type de matériau, la nature et le nombre d'ions formés dans le plasma peuvent évoluer.

II. La microsonde laser LAMMA 500 [6-10]

La microsonde LAMMA 500 permet l'analyse en transmission de composés solides. Le laser ionisant frappe l'arrière de la cible et génère un

microplasma vers l'avant (figure 3). L'échantillon est généralement traversé de part en part, c'est donc une poudre ou un film de faible épaisseur ($< 1 \mu\text{m}$). Le principe repose sur l'excitation photonique jusqu'au passage à l'état ionisé d'une partie du micro volume (de l'ordre de $1 \mu\text{m}^3$) vaporisé par le laser. Les ions ainsi formés sont extraits et accélérés dans un spectromètre de masse à temps de vol.

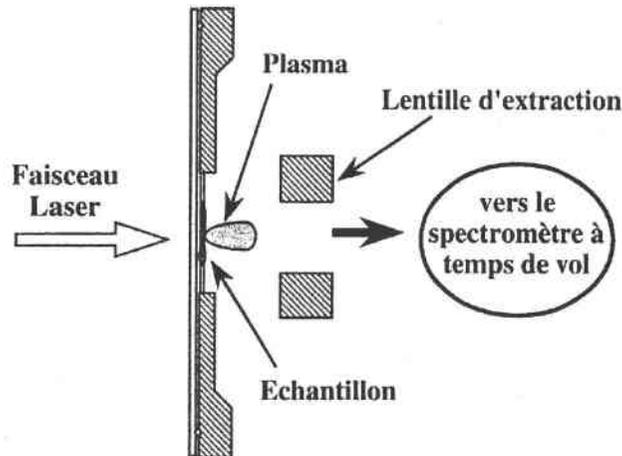


Figure 3 : géométrie en transmission.

Cet instrument peut se décomposer en cinq parties (figure 4) :

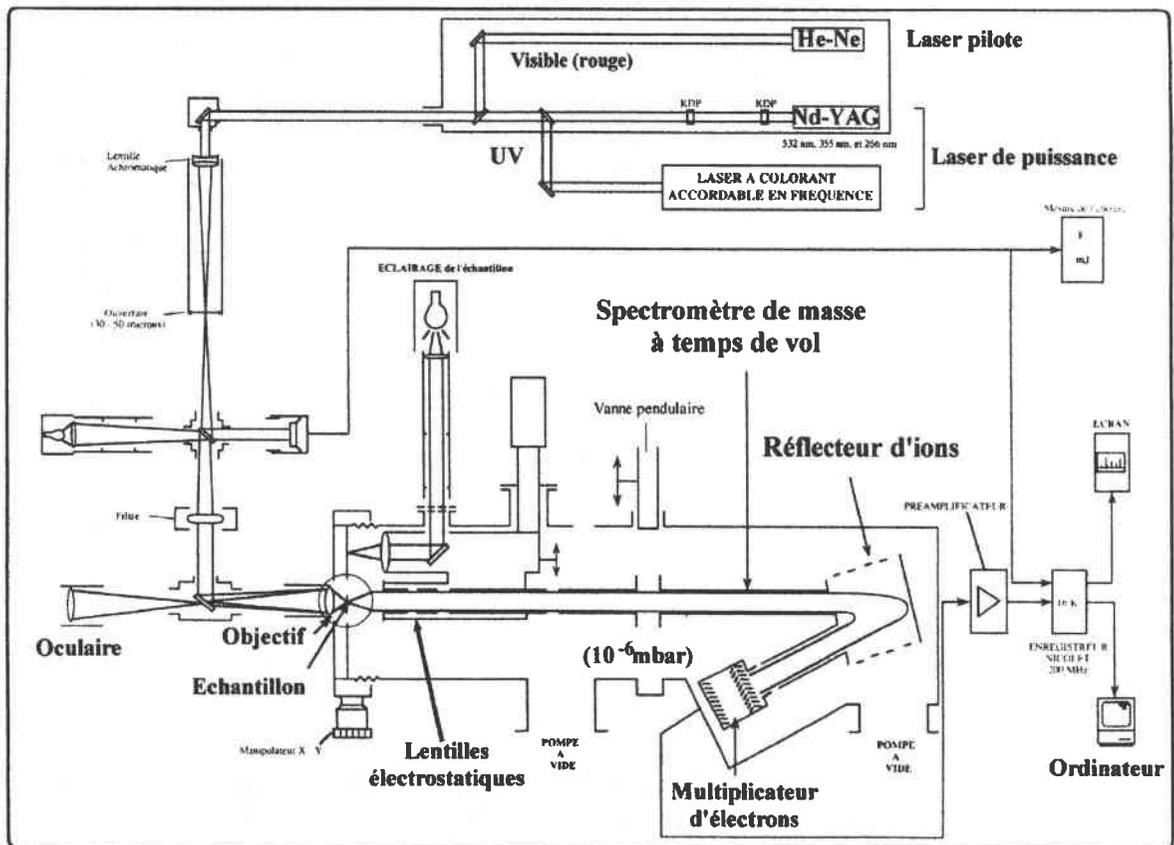


Figure 4 : schéma de la microsonde LAMMA 500.

- un laser de puissance et un laser pilote ;
- un système de focalisation et de visualisation ;
- une chambre d'échantillonnage ;
- un spectromètre à temps de vol et un réflecteur ;
- un système de détection et d'acquisition des données.

II.1. Les lasers

La microsonde est équipée de deux types de laser. Le laser pilote, de faible puissance, est un Hélium-Néon qui émet en continu dans le rouge (632,8 nm). Colinéaire au laser de puissance (U.V.), il permet la visualisation de la zone d'impact sur la cible.

Le laser de puissance est un Nd-YAG quadruplé ($\lambda = 266\text{nm}$) ou un laser accordable en fréquence (la longueur d'onde est fonction du colorant utilisé). Son rôle est de vaporiser et d'ioniser une partie de l'échantillon. L'irradiance maximale est de 10^{10} W/cm^2 , mais elle peut être réduite en utilisant des filtres ou en défocalisant l'objectif.

II.2. Le système de visualisation et la chambre d'échantillonnage

Un microscope optique, muni de trois objectifs (grossissements x100, x320 et x1000) permet de visualiser l'échantillon et de focaliser les faisceaux lasers de guidage et d'ionisation. Le diamètre de l'impact laser est modulable, ainsi pour le grossissement x320, il varie entre $3 \mu\text{m}$ et une centaine de microns en mode défocalisé.

La chambre d'échantillonnage est située entre le microscope et le spectromètre de masse. Elle est isolée du temps de vol par une vanne pendulaire ce qui permet un changement rapide des échantillons. Ce dernier est déposé sur une grille de microscope électronique d'un diamètre de 3 mm, avant d'être fixé sur une platine micrométrique de déplacement XY. Un mince opercule de quartz recouvre la grille et sert à la fois de fenêtre optique et de joint d'étanchéité. Le vide est obtenu à l'aide de pompes primaire et turbomoléculaire (10^{-6} mbar).

II.3. Le spectromètre de masse

Un vide de $5 \cdot 10^{-7}$ mbar est maintenu dans le temps de vol par une pompe à palette et une pompe ionique.

Les ions générés lors de l'impact laser sont introduits dans le spectromètre de masse à l'aide d'une tension d'accélération U . Ils sont ensuite focalisés sur le détecteur à l'aide d'un système de lentilles électrostatiques (Einzel-Lens) qui sert de collimateur. A l'intérieur du tube, les ions les plus légers arrivent en premier au détecteur. Cette discrimination et dispersion des masses résultent de l'équation de la conservation de l'énergie. Par approximation, l'énergie

cinétique de l'ion due au processus d'ionisation laser est négligée. L'énergie potentielle (E_p) fournie à l'ion par les lentilles d'accélération est convertit en énergie cinétique (E_c) selon l'équation :

$$E_p = E_c$$

$$qU = \frac{1}{2}mv^2 \Leftrightarrow qU = \frac{1}{2}m\left(\frac{L}{t}\right)^2$$

$$t = k\sqrt{\frac{m}{q}} \text{ avec } k = \frac{1}{2\sqrt{U}}$$

avec $q = z.e$ ($z =$ charge de l'ion, $e = 1,6 \cdot 10^{-19}$ C)
 $L =$ longueur du tube (m)
 $t =$ temps de vol de l'ion (s)
 $v =$ vitesse de l'ion ($m.s^{-1}$)
 $U =$ potentiel d'accélération (V)

Le temps de vol d'un ion est donc directement proportionnel à la racine carrée de son rapport masse sur charge. Le facteur de proportionnalité k dépend des potentiels appliqués, il devra donc être calculé chaque fois que l'un d'eux sera modifié. En analyse LAMMA, les ions portent généralement une seule charge, sauf parfois pour des éléments métalliques à forte irradianance.

Un réflecteur électrostatique est placé sur le trajet des ions afin de corriger leur dispersion en énergie cinétique. La résolution en masse du spectromètre est ainsi améliorée.

La résolution en masse d'un paquet d'ions de masse m est donnée par la relation :

$$R = \frac{m}{\Delta m} \text{ avec } \Delta m = \text{largeur du pic de masse à mi-hauteur.}$$

La résolution de la microsonde LAMMA 500 est de 700 à la masse 208 u. du plomb (remarque : la résolution diminue lorsque la masse de l'ion augmente). Il est donc possible de distinguer les isotopes de tous les éléments du tableau périodique.

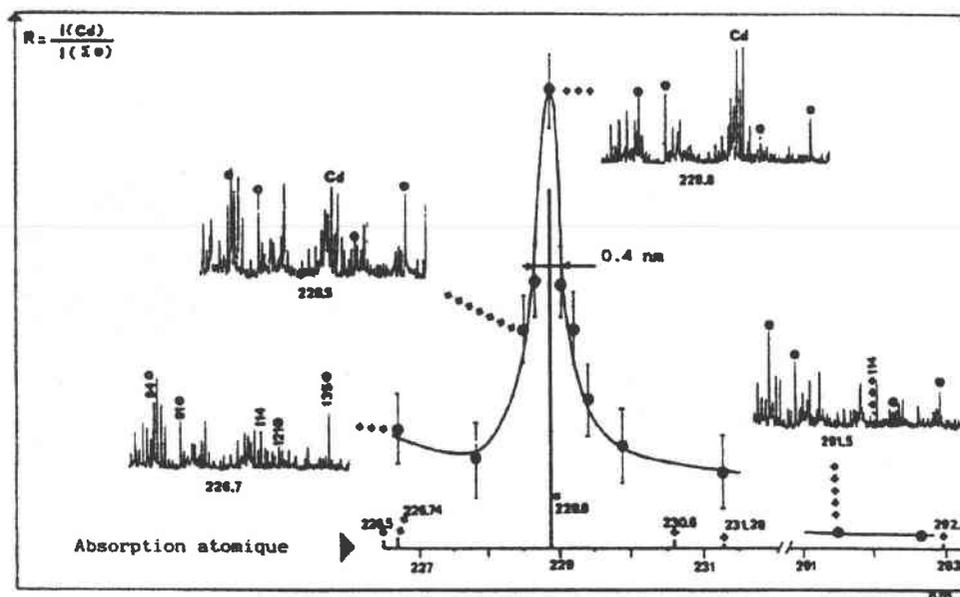
II.4. Système de détection et d'acquisition des données

Les ions sont détectés à l'aide d'un multiplicateur d'électrons, composé de 17 dynodes en cuivre-béryllium (le signal de départ est amplifié 10^6 fois). Les impulsions électriques ainsi obtenues sont visualisées sur un oscilloscope à mémoire, lui-même interfacé par un ordinateur. Une série de programmes permettent alors de traiter les données brutes : calibration, linéarisation...

II.5. Limite de détection et quantitatvité

La sensibilité dépend de nombreux paramètres :

- du potentiel d'ionisation pour les ions positifs et de l'affinité électronique pour les ions négatifs. Il est ainsi plus facile de détecter le sodium qui a un potentiel d'ionisation (PI) de 5,13 eV que le zinc (PI = 9,39 eV) ;
- des liaisons entre le composé et la matrice qui l'entoure. La limite de détection du cuivre est par exemple de 2 ppm dans le Spurr¹ et de 11 ppm dans l'araldite [10] ;
- de la force des liaisons des molécules organiques ;
- de la stabilité des ions générés ;
- de la longueur d'onde et de l'irradiance du laser. Le seuil de détection (SD) d'un élément peut être fortement diminué, lorsqu'on travail avec une de ses raies de résonances (figure 5). Ce processus favorise l'ionisation de l'élément recherché au détriment des autres. Pour $\lambda = 266$ nm le SD du Cadmium est de 1000 ppm alors que pour $\lambda = 228,8$ nm, $SD_{Cd} = 43$ ppm [10-11].



l'échantillon, influence de la matrice, propriétés physico-chimiques de l'élément... Il y a cependant une relation linéaire entre l'intensité du pic de masse d'un élément et sa concentration.

II.6. Performances et limitations

Performances :

- sensible aussi bien pour les espèces minérales qu'organiques (ppm) ;
- la surface analysée est d'environ $3 \mu\text{m}^2$;
- temps d'analyse très court (30 min) ;
- tous les éléments de la classification périodique et leurs isotopes peuvent être détectés ;
- c'est une technique d'analyse particulièrement adaptée aux composés de basses masses solides ($m/z < 800$) ;
- possibilité de spéciation des éléments [12] ;
- analyse des ions positifs et négatifs.

Limitations :

- géométrie à transmission : obligation de travailler avec des échantillons de faible épaisseur ;
- analyse destructrice ;
- résolution en masse $m/\Delta m$ limitée ;
- méthode semi-quantitative ;
- limitation en masse ($m/z < 2\ 000$).

III. La microsonde laser FTMS

La microsonde laser FTMS du laboratoire est un prototype unique, développé à partir d'un système FTMS 2 000 commercialisé par la société Nicolet (maintenant Finnigan). A l'origine, cet appareil était équipé d'un canon à électrons pour ioniser les molécules. De nombreuses transformations ont été nécessaires pour aboutir au couplage avec l'ionisation laser, dont certaines on fait l'objet de brevets [13-16].

III.1. Descriptif expérimental de la microsonde

Cet instrument (figure 6) se compose d'une double cellule logée dans une chambre sous ultravide, centrée dans un champ magnétique élevé (3,04 Teslas) et très homogène. Un système optique permet la visualisation et la focalisation du laser sur un échantillon placé au bout d'une canne motorisée. Tandis qu'un système informatique et électronique permet la programmation et l'exécution des séquences d'analyse, ainsi que le traitement des données.

III.1.1. Le système d'introduction et de manipulation de l'échantillon

L'échantillon est déposé sur un porte-substrat métallique non ferromagnétique, puis fixé à l'extrémité d'une canne de transfert, qui coulisse de la cellule d'échantillonnage à la chambre d'analyse. L'échantillon se retrouve alors à l'intérieur de la première cellule dite « source ».

Un système motorisé permet le déplacement de la canne en x, y et z. La surface ainsi balayée est de $1,5 \text{ cm}^2$ avec un pas de $5 \mu\text{m}$. L'ensemble est piloté à distance par un ordinateur.

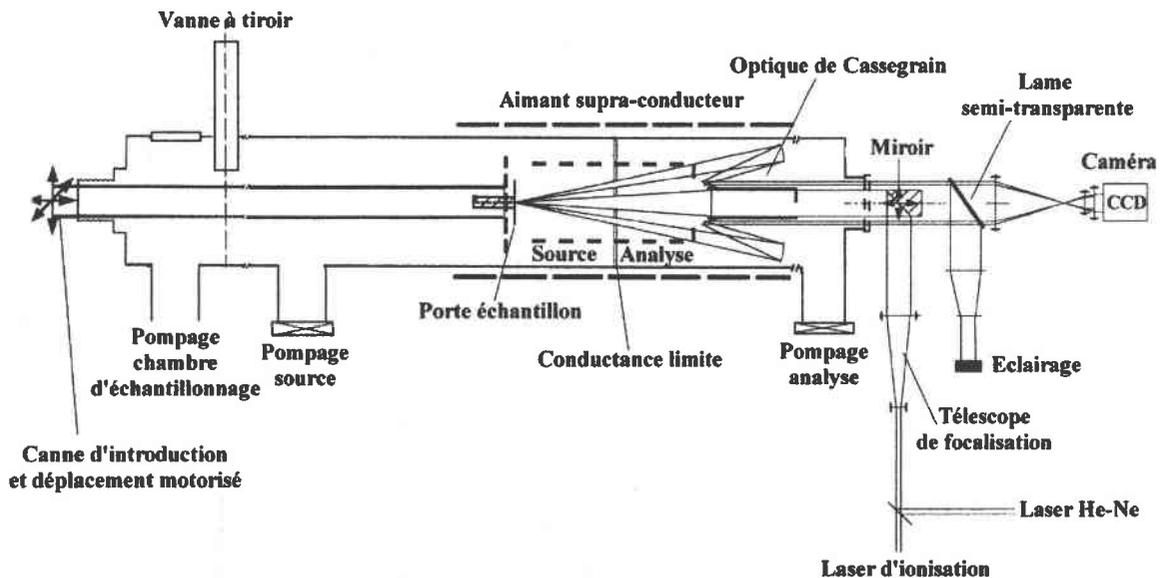


Figure 6 : schéma de la microsonde laser FTMS.

III.1.2. Le système de pompage

Les performances de la microsonde FTMS sont très dépendantes de la qualité du vide. La chambre d'échantillonnage qui est soumise à des remises à l'air fréquentes, est isolée du spectromètre de masse par une vanne à tiroir. Le vide y est fait à l'aide d'une pompe à palette (débit $35 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$) et d'une pompe turbo-moléculaire (débit $400 \text{ l} \cdot \text{s}^{-1}$). Ce groupe de pompage permet d'atteindre en une quinzaine de minutes un vide de l'ordre de 10^{-6} mbar .

La chambre du spectromètre, quant à elle, est pompée au moyen de deux pompes primaires (débit $16 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$) et de deux pompes à diffusion d'huile (débit $650 \text{ l} \cdot \text{s}^{-1}$). Le vide ainsi obtenu est compris entre $5 \cdot 10^{-8}$ et $5 \cdot 10^{-9} \text{ mbar}$.

III.1.3. L'aimant supraconducteur

L'appareil est équipé d'un aimant solénoïde supraconducteur, constitué d'un bobinage en alliage niobium/titane plongé dans un bain d'hélium liquide. Une enceinte contenant de l'azote liquide l'entoure et maintient un gradient de température avec l'extérieur. Notre aimant délivre un champ de 3,04 Teslas, très

homogène dans la zone où est placée la double cellule. Celle-ci est centrée sur l'axe du champ magnétique.

III.1.4. L'interface d'ionisation laser

La pièce maîtresse de l'interface d'ionisation laser est une optique de Cassegrain inversée [13] qui permet la focalisation du laser sur la cible, l'éclairage et la visualisation de l'échantillon. Cette optique est située à l'intérieur de la chambre du spectromètre. La position des lentilles centrales est réglable de l'extérieur afin d'ajuster le point focal sur l'échantillon, en fonction de la longueur d'onde du laser utilisé (190 à 400 nm).

Trois lasers sont couplés à la microsonde. Il s'agit d'un laser excimère (193 ou 248 nm), d'un laser Nd-YAG (266 ou 355 nm) et d'un laser accordable (longueur d'onde variable et fonction du colorant). Le faisceau laser utilisé est amené à l'entrée d'un télescope situé à l'extérieur de l'appareil au moyen d'un montage optique. Le télescope est ajustable pour permettre de faire varier le diamètre de l'impact laser sur l'échantillon et donc l'irradiance (tableau 2).

Longueur d'onde (nm)	Irradiance maximale (W/cm ²)	Irradiance minimale (W/cm ²)
193	2,0 10 ⁹	3,0 10 ⁵
248	3,0 10 ⁹	4,0 10 ⁵
266	3,0 10 ¹⁰	5,0 10 ⁶
355	3,0 10 ¹⁰	7,0 10 ⁶

Tableau 2 : gammes d'irradiances accessibles pour différentes longueurs d'onde.

A la sortie du télescope, le faisceau est renvoyé par un miroir à travers le hublot d'entrée vers les lentilles centrales de l'optique de Cassegrain inversée. Il est ensuite focalisé sur l'échantillon à travers les deux orifices qui percent la plaque de piégeage de la cellule d'analyse et la conductance limite. Le plasma formé va se développer à la normale de l'échantillon (celui-ci peut donc être massif), on parle de géométrie en réflexion (figure 7). Le faisceau laser frappe l'échantillon avec un angle de 90°, ce qui permet un contrôle de l'énergie déposée optimal.

Parallèlement au faisceau laser, la partie périphérique de l'optique de Cassegrain transmet la lumière d'une source située à l'extérieur du spectromètre sur l'échantillon et renvoie l'image vers une caméra CCD. Un téléobjectif équipe cette caméra, ce qui offre une visualisation avec un grossissement de 300 x sur le moniteur vidéo.

III.1.5. La double cellule

Il s'agit de deux cellules cubiques (5 cm de côté) constituées de plaques en acier inoxydable amagnétique à structure en nid d'abeille (figure 8). Les deux cellules partagent une plaque pleine commune, la conductance limite, qui possède un orifice en son milieu pour laisser passer le faisceau laser et les ions.

Cette plaque permet un pompage différentiel entre les deux cellules (vide coté source 10^{-8} mbar et coté analyse 10^{-9} mbar). Une partie de la conductance limite est constituée d'une couronne de quartz recouverte d'un treillis métallique très fin [13]. Elle laisse pénétrer la lumière de l'éclairage et permet la visualisation de l'échantillon. Chaque cellule possède une plaque de piégeage perpendiculaire au champ magnétique appliqué, ainsi que deux plaques d'excitation et deux de réception opposées. La conductance limite joue le rôle de plaque de piégeage pour les deux cellules.

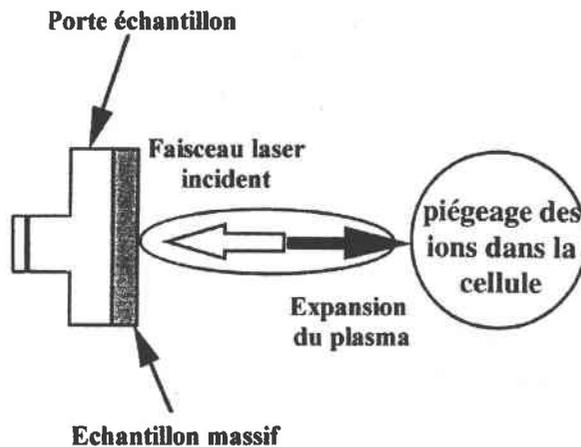


Figure 7 : géométrie en réflexion.

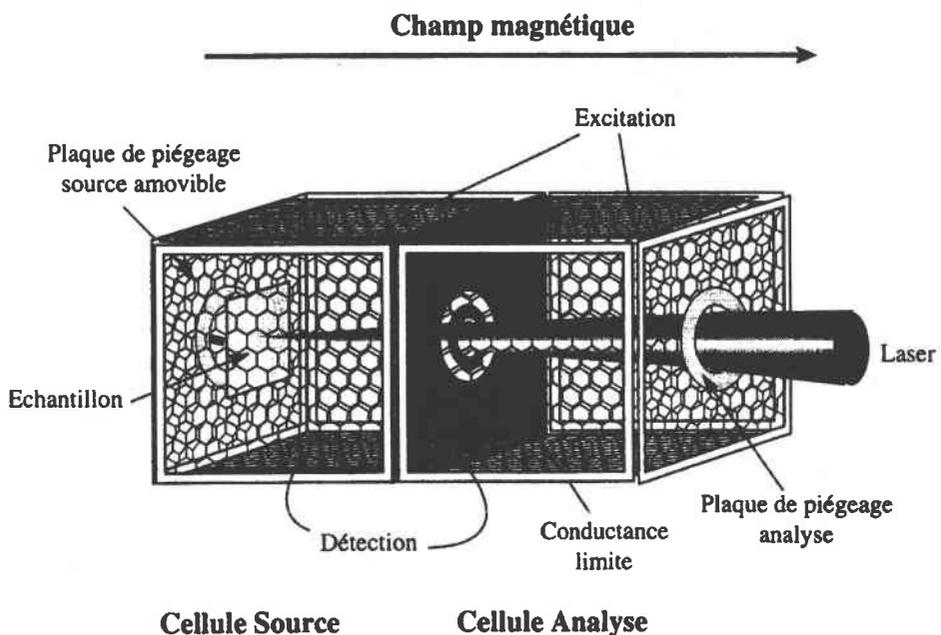


Figure 8 : schéma de la double cellule.

III.2. Principes théoriques

Le principe fondamental de la résonance cyclotronique des ions a été décrit pour la première fois en 1930 par E.O. Lawrence, l'inventeur de l'accélérateur de particule (cyclotron). Il faut attendre J.A. Hipple et col. en 1940 pour voir sa première application à la spectrométrie de masse. Enfin, c'est en 1974 que M.B. Comisarow et A.G. Marshal [17 et 18] réalisent les premières expériences de spectrométrie de masse avec résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier (FTMS), grâce à une méthode d'excitation large bande et de détection simultanée de toutes les fréquences. Dans cette partie, nous allons essayer d'expliquer clairement les mécanismes qui interviennent lors d'une analyse par FTMS.

Cette technique repose sur la détermination de la masse des ions piégés dans un champ magnétique, par mesure des fréquences cyclotroniques engendrées. L'organe principal du spectromètre de masse est constitué par une cellule cubique placée au centre d'un aimant (figure 9).

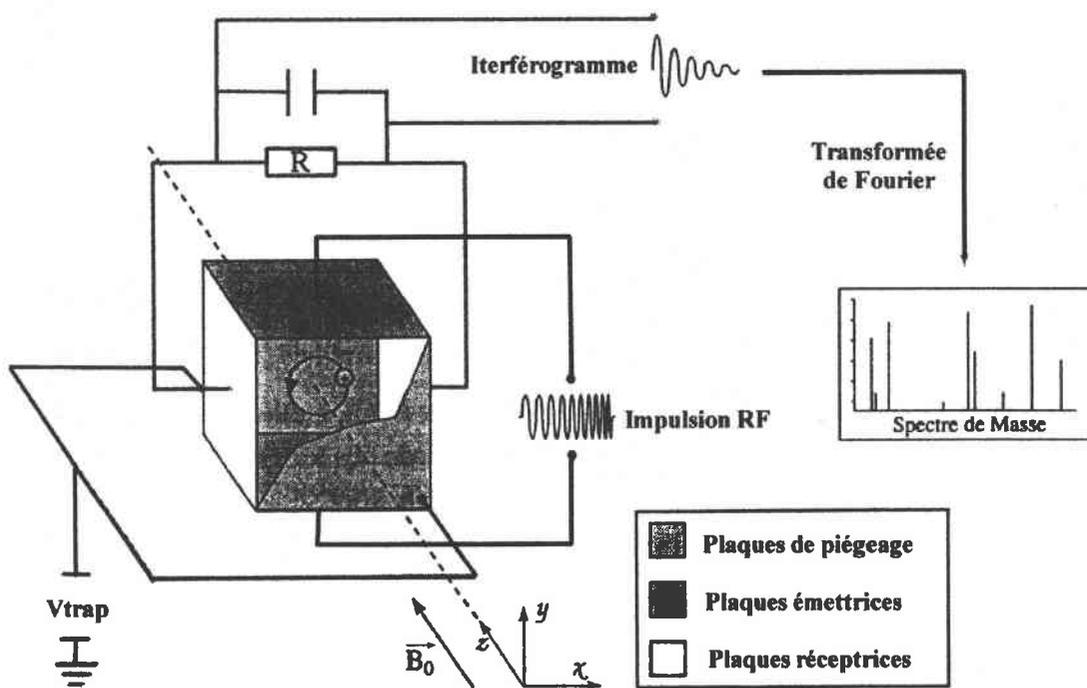


Figure 9 : schéma de principe d'un spectromètre de masse à résonance cyclotronique et à transformée de Fourier.

III.2.1. Le piégeage des ions

Les ions générés vont être piégés par l'action simultanée du champ magnétique et d'un champ électrique.

III.2.1.1. Le champ magnétique

Sous l'action de la force de Lorentz (L) une particule de charge q dans un champ magnétique adopte une trajectoire circulaire de période fixée dont le rayon dépend de sa vitesse initiale :

$$|\vec{L}| = q \cdot v \cdot B_0$$

Avec : q = charge de l'ion (C)
 v = vitesse de l'ion ($m \cdot s^{-1}$)
 B_0 = force du champ magnétique (T)

Du fait de cette trajectoire circulaire l'ion subit en réaction une force centrifuge (F) :

$$|\vec{F}| = \frac{mv^2}{r}$$

Avec : m = masse de l'ion (kg)
 r = rayon de la trajectoire circulaire (m)

A l'équilibre, nous avons l'égalité suivante :

$$|\vec{F}| = |\vec{L}| \Rightarrow \frac{m \cdot v^2}{r} = q \cdot v \cdot B_0$$

Nous pouvons alors déterminer la vitesse angulaire du mouvement :

$$\omega_c = \frac{v}{r} \Rightarrow \omega_c = \frac{q \cdot B_0}{m}$$

Avec : ω_c = vitesse angulaire ($rad \cdot s^{-1}$)

La fréquence du mouvement de l'ion ou fréquence cyclotronique s'écrit donc :

$$\nu_c = \frac{\omega_c}{2\pi} \Rightarrow \nu_c = \frac{q \cdot B_0}{2\pi \cdot m}$$

Avec : ν_c = fréquence cyclotronique (Hz)

La fréquence cyclotronique d'un ion est donc inversement proportionnelle à son rapport masse sur charge. Par exemple, dans un champ magnétique de 3 T, un ion de masse 18 u. aura une fréquence $\nu_c = 2,6$ MHz alors qu'un ion de masse

3000 u. aura une fréquence cyclotronique $\nu_c = 15,6$ KHz. Cela implique aussi que la résolution diminue lorsque la masse augmente (pour un Δm donné, $\Delta \nu_c$ diminue lorsque m augmente, donc les pics se rapprochent). De plus, c'est le rayon du mouvement cyclotron qui détermine la limitation en masse (r doit être inférieur la moitié de la largeur des plaques de la cellule pour être piégé).

III.2.1.2. Le champ électrique

L'application d'un potentiel de même signe que la charge des ions sur les deux plaques de piégeage, a pour effet de confiner ces ions le long de l'axe du champ magnétique. Les ions ont un mouvement d'oscillation le long de cet axe.

D'après la loi de Gauss, le champ axial dirigé vers l'intérieur de la cellule doit également avoir une composante radiale dirigée vers l'extérieur. Cette dernière crée une force qui s'oppose à la force du champ magnétique. Les ions acquièrent ainsi un mouvement magnétron.

III.2.1.3. Bilan des forces

La figure 10 résume les forces qui s'appliquent à un ion piégé dans un spectromètre de masse à résonance cyclotronique.

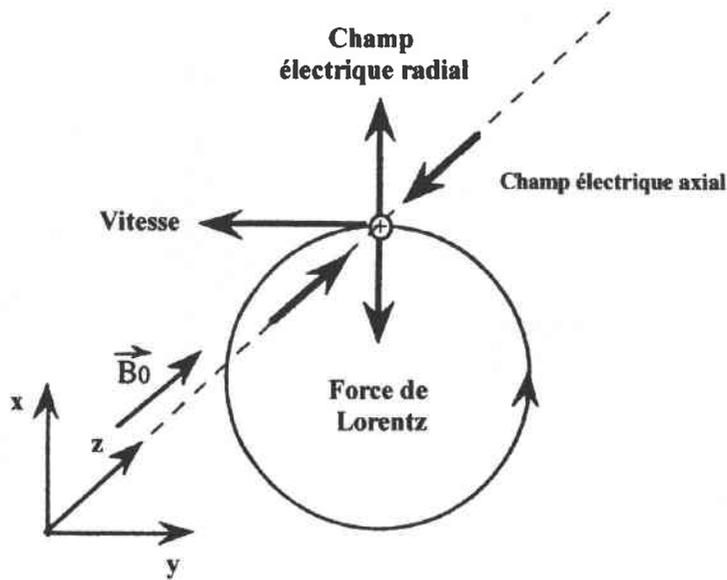


Figure 10 : bilan des forces qui s'exercent sur l'ion soumis aux deux champs de piégeage.

L'action de ces forces sur les ions est une trajectoire complexe, qui est une combinaison de trois mouvements oscillatoires : le mouvement cyclotronique, les oscillations de piégeage et le mouvement magnétron (figure 11). Pour plus de précisions, on pourra se référer à la thèse de C. Masselon [19] ou au livre de A.G. Marshall et F.R. Verdun [20].

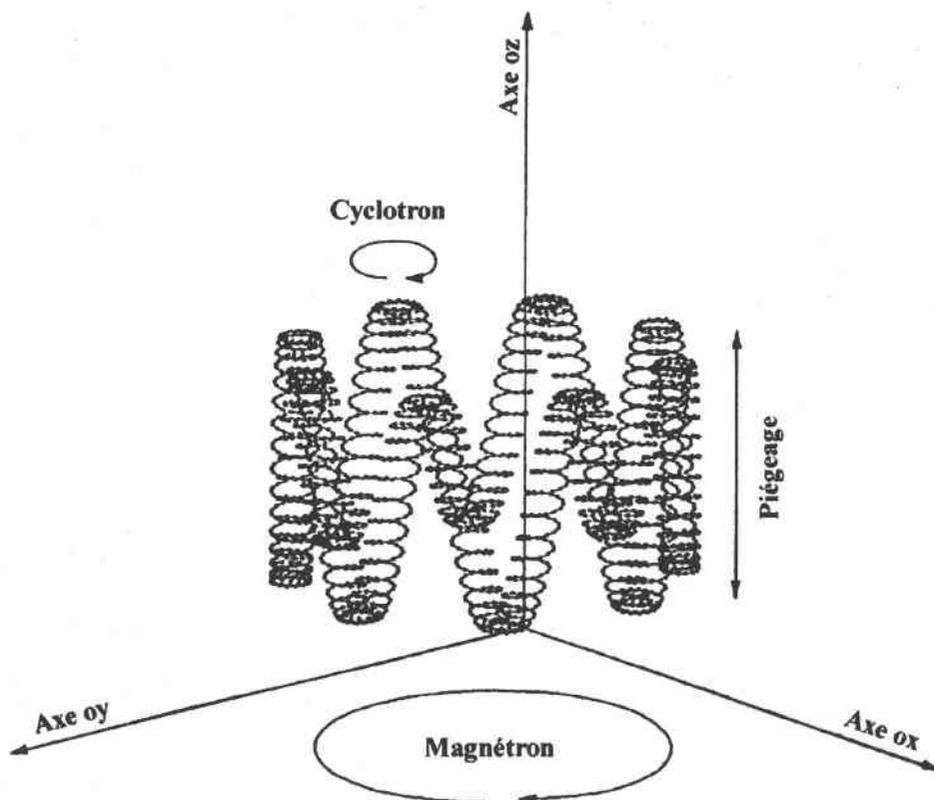


Figure 11 : combinaison des trois mouvements naturels d'un ion dans la cellule FTMS : cyclotron, magnétron et oscillation de piégeage.

III.2.2. Séquence d'analyse

La séquence d'analyse par FTMS se déroule en cinq étapes successives : l'ionisation et le piégeage des ions dans la cellule (voir ci-dessus), l'éjection (facultative), l'excitation, la détection et le nettoyage de la cellule de tous les ions encore présents (figure 12). Le nettoyage est effectué en appliquant un potentiel de piégeage de signe opposé aux ions analysés.

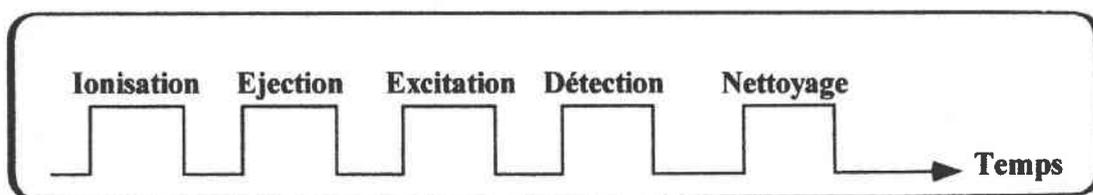


Figure 12 : étapes d'une séquence d'analyse par FTMS.

III.2.2.1. L'excitation

Après le piégeage, les ions de même rapport masse sur charge ont une fréquence cyclotronique identique, mais leur position reste aléatoire dans la cellule. Leur rayon de giration (r) est trop faible pour générer un signal sur les plaques de réception.

Afin de regrouper les ions en nuage d'ions cohérents, on applique une impulsion de radiofréquence sur les plaques émettrices. Quand la fréquence de l'impulsion est égale à la fréquence cyclotronique de l'ion, celui-ci absorbe de l'énergie, son énergie cinétique (E_c) augmente, c'est la résonance cyclotronique.

$$E_c = \frac{1}{2} m \cdot v^2 = \frac{1}{2} m \cdot \omega_c^2 \cdot r^2 \Rightarrow r = \frac{\sqrt{2m \cdot E_c}}{q \cdot B_0}$$

La masse, la charge et le champ étant constants, le rayon de giration augmente. Une fois l'excitation terminée, les paquets d'ions ayant la même masse sont en phase et ont la même trajectoire (figure 13 a).

Ce phénomène de transfert d'énergie a deux applications :

- emmener les ions près des plaques de détection : c'est l'excitation ;
- éjecter les ions du piège en leur faisant acquérir un rayon de giration supérieur aux dimensions de la cellule : c'est l'éjection. Cette application est utilisée pour éliminer des ions trop nombreux qui perturbent la détection des espèces minoritaires par effet de charges d'espace (répulsions coulombiennes).

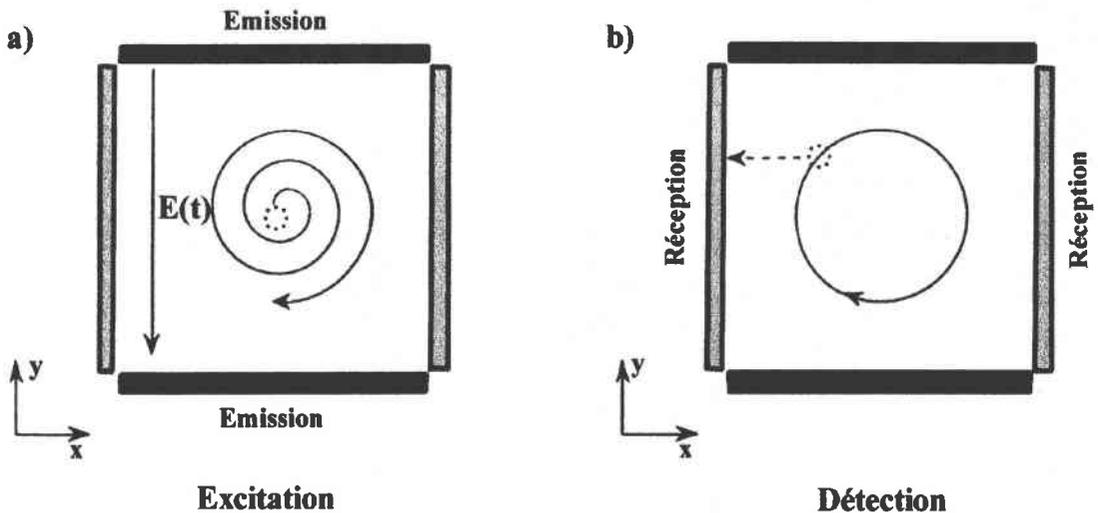


Figure 13 : schémas de principe a) de l'excitation et b) de la détection des ions par FTMS.

III.2.2.2. La détection

Les ions animés maintenant d'un mouvement orbital cohérent, sont confinés entre les deux plaques d'une capacité (plaques de détections) [20]. Si un paquet d'ions positifs, par exemple, approche une de ces deux plaques, il attire les électrons. Continuant à se déplacer, il se rapproche de la deuxième plaque de réception dont il attire les électrons. Le mouvement de ce paquet d'ions en cohérence de phase induit un courant image, dont la fréquence est

égale à la fréquence cyclotronique des ions et dont l'amplitude est proportionnelle au nombre d'ions présents (figure 13 b).

Le courant image total est la superposition des influences de tous les ions excités. Il est collecté en tant que courant transitoire (ou interférogramme), converti en différence de potentiel et numérisé par ordinateur. L'interférogramme est traité par transformée de Fourier en ses composantes de fréquences. Chaque fréquence est ensuite associée à une masse par étalonnage. Le résultat est un spectre de masse.

III.2.3. Séquences particulières

Le fait de piéger les ions avant de les analyser permet d'élaborer des séquences d'analyse plus complexes.

- Contrôle du nombre d'ions piégés : le volume limité de la cellule limite le nombre d'ions qu'elle peut piéger sans qu'il y ait perturbation de leur trajectoire par répulsions coulombiennes. Pour contrôler leur nombre, nous pouvons jouer sur le potentiel de piégeage pendant l'analyse ou éjecter les ions majoritaires ; ce qui améliore la sensibilité mais aussi la résolution.

- Le mode hétérodyne : il consiste à mélanger aux fréquences détectées une fréquence de référence et à enregistrer le phénomène de battement obtenu. Le signal est ensuite passer par un filtre passe bas. Le signal enregistré est alors une sinusoïde amortie de fréquence égale à la différence entre la fréquence cyclotronique de l'ion et la fréquence de référence. Cette méthode permet de détecter pendant un temps beaucoup plus long, car on s'intéresse à des basses fréquences. Il est ainsi possible d'obtenir de très hautes résolutions sur de petites plages de masse (quelques unités de masse).

- Transfert vers la cellule analyse : comme nous l'avons décrit précédemment notre cellule est double, avec un vide plus poussé coté analyse. En mettant à la masse pendant un court instant la conductance limite, il est possible de transférer une partie des ions formés dans la cellule source vers la cellule analyse [21]. La sensibilité est diminuée, car nous ne travaillons plus que sur environ la moitié des ions (équilibre entre les deux cellules). Mais, la résolution est améliorée par un meilleur vide et par une plus grande cohérence des paquets d'ions.

- Dissociation des ions : cette méthode permet d'obtenir des informations sur la structure d'un ion par MS^2 . Pour cela :

- nous ne gardons dans la cellule que l'ion parent (éjection de tous les autres ions) ;

- nous introduisons un gaz de collision (azote) ;

- nous excitons légèrement l'ion qui rentre en collision avec le gaz et se fragmente. Le degré de cette fragmentation dépend de leur énergie cinétique. Nous obtenons ainsi un spectre de masse d'ions fils.

On appelle cette technique la dissociation induite par collision (Collision-Induced Dissociation : CID).

III.2.4. Performances et limitations

Les performances et limites que nous donnons sont ceux de notre appareil.

Performances :

- la très haute résolution, $R > 200\ 000$;
- le temps d'analyse court dans des conditions standards (moins d'une heure) ;
- la détection non destructive des ions ;
- la possibilité d'étudier les réactions ion/molécule ou de faire de la MS^n ;
- la géométrie en réflexion permet l'analyse d'échantillons massifs ;
- le contrôle de l'énergie déposée sur l'échantillon.

Limitations :

- en masse, elle est théoriquement de 5 000 u. pour un aimant de 3,04 T (dans nos conditions de travail 2 500 u.) ;
- la sensibilité à l'énergie cinétique des ions. Les ions qui ont une énergie cinétique trop importante (hautes masses) sortiront de la cellule ;
- l'utilisation de fluides cryogéniques (hélium et azote) pour maintenir l'aimant supraconducteur à 4 Kelvins ;
- la vaporisation dans l'enceinte des composés à tension de vapeur trop faible ;
- l'analyse semi-quantitative ;
- le prix d'achat et le coût d'entretien élevé.

IV. Protocole d'analyse du cheveu par microsonde laser

Le protocole mis au point a pour objectif d'utiliser la microsonde laser LAMMA 500 comme une technique d'analyse du cheveu à des fins discriminantes. Elle a été préférée à la microsonde laser FTMS, du fait de sa rapidité d'analyse et de sa plus grande facilité de mise en œuvre. Nous allons donc aborder dans cette partie les problèmes liés à l'échantillon, au choix de la longueur d'onde et au contrôle de l'irradiance. En effet ces paramètres influencent la formation des ions, mais aussi la reproductibilité des résultats. Celle-ci d'un tir laser à l'autre est typiquement inférieure à 20 % pour l'analyse d'un élément présent dans une matrice organique [7].

IV.1. Préparation de l'échantillon

A l'origine, la microsonde laser LAMMA 500 par sa géométrie en transmission est conçue pour l'analyse d'échantillons de faibles épaisseurs (films de moins d'un micron d'épaisseur ou poudres). Le premier problème posé

concernait donc l'épaisseur du cheveu, généralement comprise entre 40 et 100 μm .

IV.1.2. L'épaisseur

La découpe de section de cheveu emprisonnée dans une résine (0,5 μm d'épaisseur) par mirotome n'a pas été retenue pour trois raisons :

- la préparation de l'échantillon est beaucoup plus longue ;
- elle augmente les risques de contamination ;
- le fragment de tige pilaire n'est ensuite plus utilisable pour d'autres techniques d'analyse.

Pour limiter le temps de préparation des échantillons, nous avons choisi d'effectuer des essais sur un fragment de cheveu inséré dans une grille sandwich en cuivre (G 50/50) classiquement utilisée en microscopie électronique (figure 14).

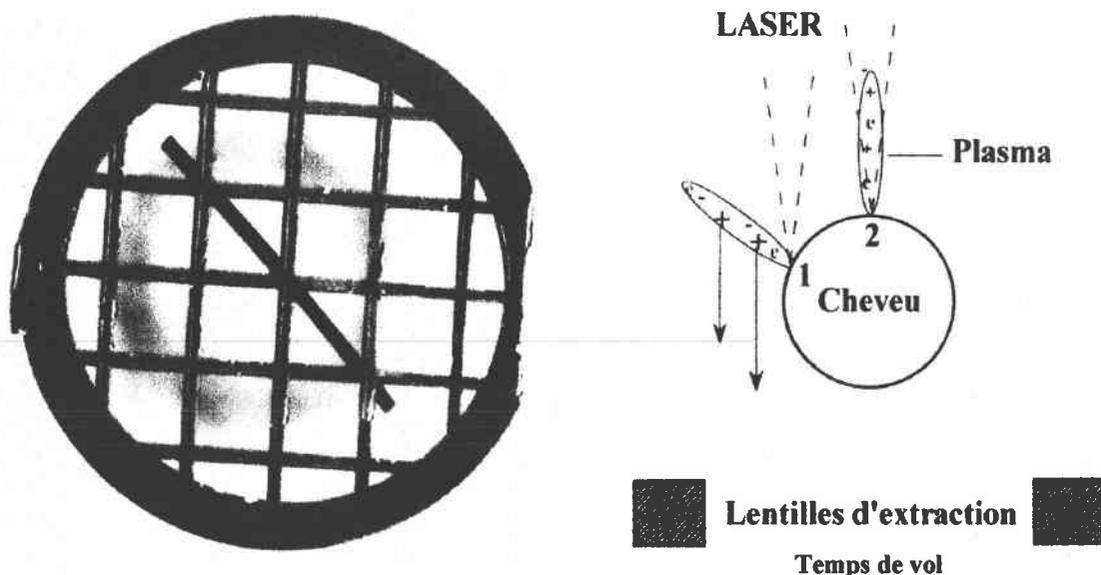


Figure 14 : fragment de cheveu dans une grille de microscopie électronique (3 mm de diamètre) et schéma d'extraction des ions formés par analyse LAMMA d'un cheveu : (1) possible, (2) impossible.

En analyse FTMS, ce type d'échantillonnage ne pose pas de problème, car sa géométrie de fonctionnement est en réflexion. Il est donc possible d'obtenir par ablation photochimique contrôlée des informations sur sa constitution de surface mais aussi interne.

En revanche, cela n'est pas possible sur des échantillons massifs en LAMMA. Le seul moyen, pour obtenir un spectre de masse est de frapper le bord du cheveu (1) avec le faisceau laser (figure 14). Dans ces conditions, nous ne sommes plus dans une configuration en transmission, mais en « pseudo-réflexion », car le plasma se développe à la normale de l'échantillon. Les lentilles d'extraction de l'appareil arrivent encore à extraire les ions, ce qui n'est

plus le cas si l'on frappe directement sur la tige pileaire (2) (pas de spectre de masse).

La figure 15 présente des photographies d'impacts laser sur un cheveu après une analyse LAMMA (pseudo-réflexion) et FTMS (réflexion).

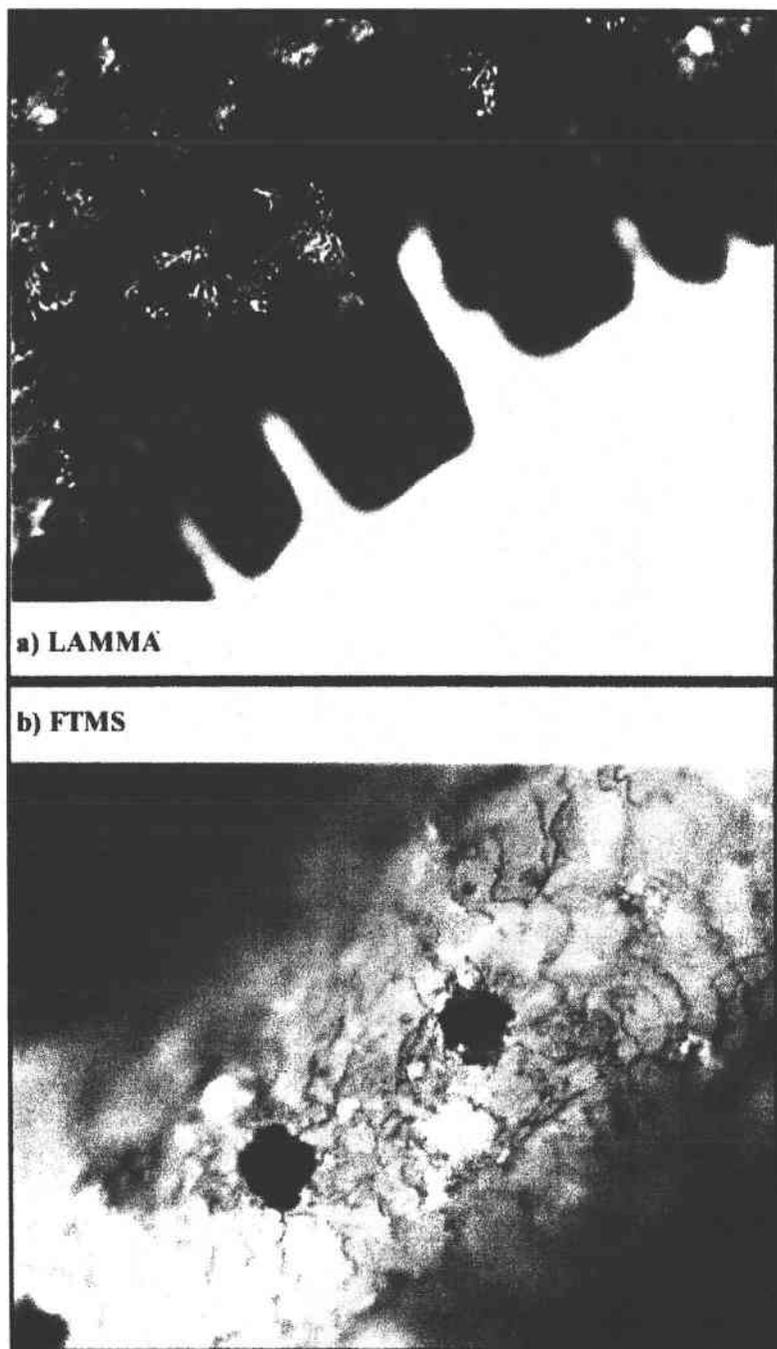


Figure 15: photographies (x 820) d'impacts lasers focalisés sur le cheveu par a) LAMMA 500 (ablation sur le coté) et b) FTMS (cratère de 12 μm de diamètre).

IV.1.2. Le lavage

Dans le premier chapitre de ce travail, nous avons remarqué qu'il n'existait pas de protocole de nettoyage éliminant avec certitude les seuls

éléments contaminants (pollutions exogènes). Pour une analyse élémentaire, la méthode préconisée était trois bains successifs dans l'acétone, l'eau bidistillée et de nouveau l'acétone [22]. Tandis que pour l'analyse des composés organiques, on utilisait plutôt le dichlorométhane comme solvant [23].

Comme notre objectif est d'analyser rapidement à la fois la partie organique et la partie minérale du cheveu, nous avons décidé d'étudier l'effet d'un simple nettoyage avec de l'eau bidistillée. L'eau étant le solvant le plus couramment en contact avec le cheveu, nous espérons influencer le moins possible sa composition. L'échantillon est placé dans un bain à ultrasons pour améliorer l'efficacité du lavage (élimination des particules).

Le protocole de lavage est le suivant :

- le cheveu inséré dans sa grille (2 mm de tige pileaire soit environ 20 μg), est placé deux fois de suite dans un bain de 5 ml d'eau bidistillée sous ultrasons pendant 30 min ;

- pour 300 mg de cheveux coupés (longueur 5 cm) la quantité d'eau bidistillée utilisée est de 800 ml.

La figure 16 présente le résultat d'une analyse par microsonde laser LAMMA 500 d'un cheveu non traité dit « brut » puis « lavé ».

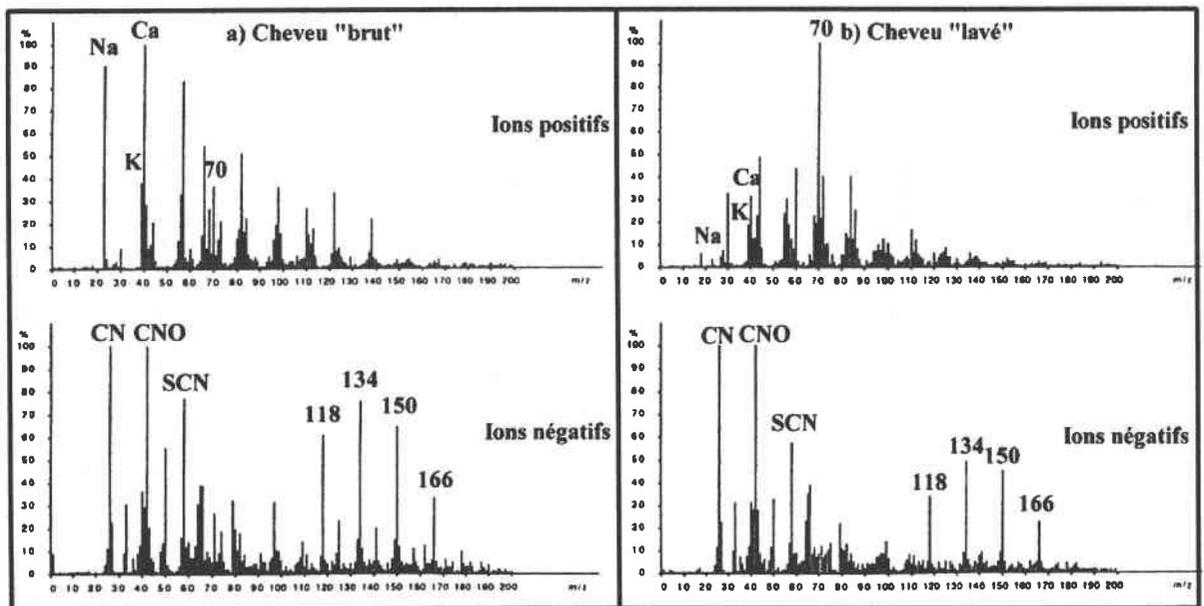


Figure 16: analyse par LAMMA ($\lambda = 266 \text{ nm}$, $I_r = 5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$), d'un cheveu a) "brut" et b) "lavé" pendant 60 min à l'eau bidistillée.

L'analyse en ions positifs souligne l'efficacité du protocole de lavage. Les pics de masse associés aux alcalins et alcalino-terreux (Na, K et Ca) disparaissent presque totalement. La nouvelle empreinte spectrale est centrée autour d'un pic $m/z = 70$ majoritaire, qui appartient certainement à la matrice biologique du cheveu. Par contre, en ions négatifs l'action du nettoyage est limitée. Nous pouvons expliquer ce phénomène par une pollution en éléments anioniques moins importante et par une fixation au cheveu plus faible du fait de

sa charge globalement négative. Cette empreinte est essentiellement d'origine organique ou organo-métallique.

Nous parlerons dans le cas des spectres de masse de cheveux « bruts » d'empreinte minérale, par opposition à ceux des cheveux « lavés » qualifiée d'organique.

L'étude des effets du lavage a été poursuivie par des analyses élémentaires en ICP/AES¹ de 300 mg de cheveu. Deux lots de cheveux « bruts » et « lavés » ont été envoyés dans un premier laboratoire, calcinés à 450°C et les cendres récupérées dans HNO₃, avant d'être analysés. Tandis qu'un second lot a été nettoyé dans un autre laboratoire à l'acétone puis à l'eau bidistillée et analysé après solubilisation dans un mélange (HNO₃ et H₂O₂). Les résultats sont résumés dans le tableau 3. Ils confirment que le protocole d'analyse influe sur les résultats. Il est donc difficile de comparer des données obtenues sur des échantillons traités différemment. En seconde analyse, nous remarquons que l'extraction des composés par notre procédure de lavage varie d'un élément à un autre. Les alcalins (Na, K) sont fortement éliminés, les alcalino-terreux (Ca, Mg) un peu moins et les métaux comme le zinc et le cuivre ne varient pas. Ces phénomènes s'expliquent par une pollution de surface et par une fixation dans la matrice du cheveu, plus ou moins importantes. Le sodium et le potassium peuvent provenir, comme nous l'avons vu de la sueur ou de shampooings, de plus leur rapport rayon atomique (A°) sur charge portée ne favorisent pas leur fixation. En effet, si nous comparons par exemple le potassium : 2,35/1 au calcium : 1,74/2, le rapport favorise la fixation de ce dernier plus petit et plus chargé. La stabilité des concentrations en Cu et en Zn confirme bien les données bibliographiques qui les présentent comme répartis de façon homogène dans le cheveu [24] et donc moins accessibles au traitement. Ce sont de plus des éléments qui se fixent facilement aux protéines soufrées car ce sont des éléments chalcogènes.

Eléments (ppm)	S	P	Ca	Na	K	Fe	Mg	Zn	Cu
Cheveu « brut »	-	-	2 700	290	31	60	120	188	12
Cheveu « lavé ^a »	-	-	1600	4	8	20	71	185	13
Cheveu « lavé ^b »	38 503	451	779	82	4	19	101	168	14

Tableau 3 : étude par I.C.P. de la composition élémentaire (concentration relative exprimée en ppm) de 300 mg de cheveu. a : cheveu lavé à l'eau bidistillée, b : cheveu lavé avec de l'acétone puis de l'eau bidistillée et analysé dans un laboratoire différent des deux premiers échantillons.

¹ ICP/AES : torche à plasma couplée à la spectrométrie d'émission atomique.

Enfin, nous avons analysé par LAMMA (en ions positifs) un fragment de cheveu à différents moments de son lavage. Nous avons noté les variations d'intensité des pics de masse $m/z = 23$ (Na^+), 39 (K^+), 40 (Ca^+) et 70 (figure 17).

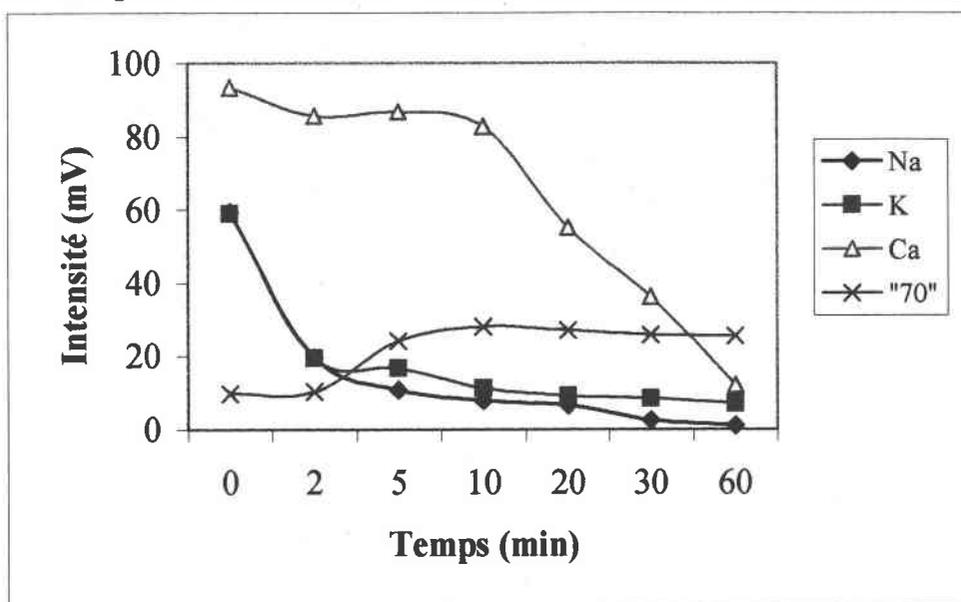


Figure 17: suivi dans le temps de l'effet du protocole de lavage sur l'intensité des pics du Na, du K, du Ca et $m/z = 70$, par analyse LAMMA ($\lambda = 266 \text{ nm}$, $\text{Ir} = 510^8 \text{ W/cm}^2$) en ions positifs (chaque point correspond à une moyenne réalisée sur 30 mesures).

Cette analyse confirme que les cinétiques d'extraction du sodium et du potassium sont beaucoup plus rapides que celle du calcium. Ce dernier doit être mieux fixé et réparti de façon plus homogène dans la matrice pilaire, ce qui explique une vitesse d'élimination plus lente. Ces résultats corroborent ceux de K.M. Attar et col [25]. Par contre le signal du calcium disparaît presque totalement en analyse LAMMA, alors que l'analyse par I.C.P. indique une diminution de moins de la moitié de sa concentration de départ. Nous pouvons expliquer cela par une efficacité accrue du lavage sur un petit fragment de cheveu que l'eau pénètre plus facilement. Ce phénomène est utilisé pour l'extraction des drogues dans un solvant, en effet le rendement est amélioré en réduisant les cheveux en poudre.

Si nous considérons le pic de masse $m/z = 70$ comme le marqueur de l'empreinte « organique », nous remarquons qu'elle peut être masquée par la présence excessive de certains cations et de leurs agrégats associés. Le sodium, le potassium et le calcium ont des potentiels de première ionisation faibles (respectivement 5,1 ; 4,3 et 6,1 eV), ils s'ionisent préférentiellement au détriment des autres espèces. Le potentiel d'ionisation d'un composé organique est généralement compris entre 8 et 10 eV. Lorsque la concentration de ces cations diminue, l'intensité du pic $m/z = 70$ triple. Cette observation implique, qu'il est nécessaire de pratiquer un lavage, si l'on veut étudier les variations de la composition organique des cheveux. Au bout de 10 min. de lavage, les alcalins ont quasiment disparu. Mais, il faut attendre 60 min. pour que le

calcium ait une intensité suffisamment faible, pour que son empreinte ne perturbe pas l'observation des pics de masse organique.

IV.2. La longueur d'onde

Nous avons vu précédemment que la longueur d'onde du faisceau laser conditionne le type et le nombre d'ions formés dans le plasma. C'est pourquoi, nous avons étudié le spectre d'absorption U.V.-Visible-Proche I.R. de trois mèches de cheveux différents (figure 18), à l'aide d'un spectromètre (Lambda 14 de Perkin-Elmer) équipé d'une sphère d'intégration (Labsphere).

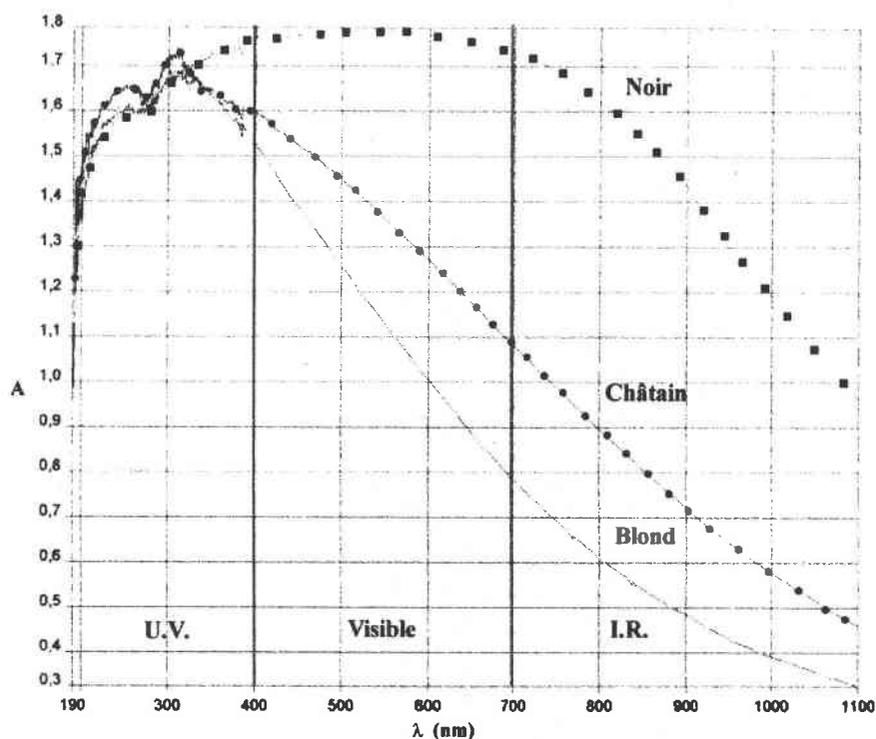


Figure 18 : spectres d'absorption de trois mèches de cheveux : noir, châtain et blond décoloré.

Les variations observées concernent principalement la zone du visible et du proche I.R.. Si nous considérons la mèche de cheveu blond décoloré comme un témoin de la kératine (sans mélanine). Nous pouvons déterminer, par simple soustraction, la participation des pigments sur la composition des spectres. Plus la pigmentation est importante et plus l'absorbance est forte dans le rouge.

Par contre, dans la gamme de longueur d'onde couverte par nos lasers (190 nm à 355 nm) les spectres sont sensiblement comparables, présentant chacun une absorbance maximum. Cette observation, en plus du fait que nous utilisons une irradiance relativement forte ($I_r = 5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$) ne favorise pas le développement de phénomènes photochimiques différents. C'est certainement la raison pour laquelle, nous n'avons pas observé de variations significatives de l'empreinte des spectres de masse, d'un cheveu à 193, 266 et 355 nm.

Cependant, il ne fait pas de doute que si nous nous étions placé à une raie de résonance d'un élément donné, nous aurions favorisé sa détection [10].

IV.3. L'irradiance

L'énergie déposée sur l'échantillon divisée par la surface et la durée du tir laser, ou irradiance, est le deuxième paramètre laser qu'il faut maîtriser, si l'on veut contrôler les espèces formées lors de l'ablation laser.

Avant chaque analyse, l'énergie laser est mesurée à l'aide d'une cellule pyroélectrique (Gentec ED 200). Le faisceau laser qui frappe sa surface est transformée en chaleur, celle-ci traverse une céramique avant d'arriver à un dissipateur calorifique. L'échauffement de la céramique provoque alors une variation de tension proportionnelle à la variation moyenne de sa température. La conversion entre la différence de potentiel lue à l'oscilloscope et l'énergie déposée sur la cellule est donnée par étalonnage : $1 \text{ mV} = 90 \mu\text{J}$. Les fluctuations d'énergie observées sur 50 tirs sont comprises entre 5 et 10 % pour les lasers utilisés. La forme et l'homogénéité des faisceaux lasers peuvent être contrôlées finement à l'aide d'un profilomètre (Exitech) ou plus grossièrement avec un papier photosensible. Nous vérifions ainsi que l'énergie est uniformément répartie.

Pour réaliser cette étude de la variation des spectres de masse en fonction de l'irradiance, nous avons décidé d'utiliser la microsonde laser FTMS. En effet, l'énergie déposée sur l'échantillon peut être modifiée plus facilement et contrôlée avec précision, grâce à sa géométrie en réflexion et au réglage du télescope (tableau 4).

Position du télescope (nombre de tour)	0	1	2	3	4	5	6
Energie entrée hublot (mV)	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5
Energie en μJ sur l'échantillon	188	188	188	188	188	188	188
Diamètre de l'impact (μm)	15	30	60	120	180	240	300
Irradiance (W/cm^2)	$2,5 \cdot 10^{10}$	$6,2 \cdot 10^9$	$1,5 \cdot 10^9$	$3,9 \cdot 10^8$	$1,7 \cdot 10^8$	$9,7 \cdot 10^7$	$6,2 \cdot 10^7$

Tableau 4 : étalonnage de l'irradiance laser FTMS à 266 nm.

Pour éviter les perturbations dues aux caractéristiques du cheveu (structure non plane, et étroite), nous avons travaillé sur une pastille de poudre de cheveu (« human hair CRM 397 » [26]). La pastille de 1 cm de diamètre a été préparée en plaçant 1 mg de poudre sous une presse pendant 10 min à une pression de 5 tonnes. Ainsi, l'énergie déposée sur cette surface

parfaitement plane est homogène (bon contrôle des ions formés). Le rayon important de la pastille permet l'utilisation d'un impact laser de diamètre supérieur à 100 μm en FTMS. Nous pouvons ainsi atteindre efficacement la même gamme d'irradiance que le LAMMA ($I_r = 5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$).

Nous avons été amenés pendant cette analyse à éjecter partiellement le calcium et le potassium en ions positifs et l'ion CN^- en négatif, car leur présence en excès dans la cellule du FTMS perturbait la détection des autres espèces. Nous nous sommes volontairement arrêtés à une irradiance de $1,7 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$ car le diamètre de l'impact laser de 180 μm devenait largement supérieur celui d'un cheveu. De plus, pour des irradiances inférieures à 10^8 W/cm^2 , le signal enregistré devient très faible et l'empreinte polymérique très complexe (annexe 2).

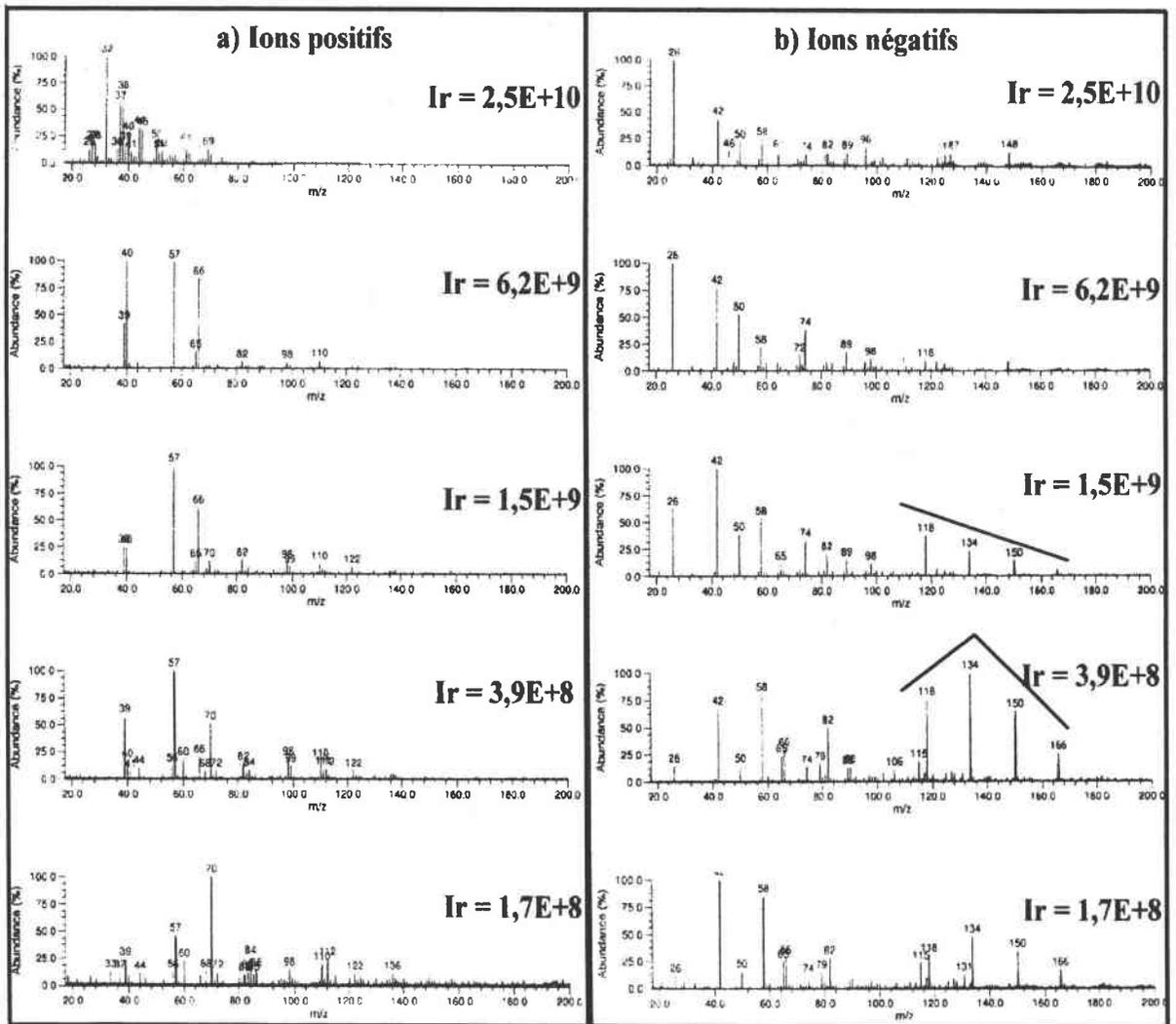


Figure 19 : spectre de masse FTMS (25 tirs cumulés) de poudre de cheveu à une longueur d'onde de 266 nm et à différentes irradiances (I_r en W/cm^2), a) en ions positifs avec éjection partielle du calcium ($m/z = 40$) et du potassium ($m/z = 39$), b) en ions négatifs avec éjection partielle du CN^- ($m/z = 26$).

La figure 19 apporte trois informations essentielles :

- à très forte irradiance ($2,5 \cdot 10^{10} \text{ W/cm}^2$) : la fragmentation de l'échantillon est très importante. Nous favorisons la détection de petits agrégats d'ions, par exemple en ions positifs C_3H^+ , HCN^+ ... ou d'éléments organiques comme le pic de masse $m/z = 32$ du soufre issu de la kératine. L'observation des composés métalliques est plus difficile car leur présence est minoritaire par rapport à la matrice organique (99/1). De plus, la création d'un plasma très dense favorise les pertes de charge par collision avec les espèces organiques, ce qui explique leurs signaux assez faibles. Dans ces conditions, il est très difficile d'utiliser la partie organique pour caractériser le cheveu car sa structure de base est trop fragmentée ;

- à une irradiance comprise entre $7 \cdot 10^9$ et 10^9 W/cm^2 : l'empreinte en ions positifs est essentiellement due au calcium et à ses agrégats $m/z = 57$ (CaOH^+), 66 (CaCN^+) et 82 (CaCNO^+). L'énergie déposée n'est plus largement excédentaire et l'effet du potentiel d'ionisation devient important en ions positifs. Il favorise ici les alcalins et alcalino-terreux. En ions négatifs il y a peu de variation. On remarque cependant la diminution de l'ion CN^- formé et l'apparition d'une série de pics de masse $m/z = 118, 134$ et 150 ;

- l'irradiance $3,9 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$ correspond à un compromis entre les espèces organiques représentées par le pic de masse $m/z = 70$ et minérales avec par exemple K, Ca, CaOH en ions positifs. L'effet du potentiel d'ionisation s'équilibre avec celui des rapports de concentration (organique/minéral). En ions négatifs, nous observons l'empreinte caractéristique en « parapluie » des pics de masse $m/z = 118, 134, 150$ et 166 d'un spectre LAMMA (figure 15) à $5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$.

Cette expérience nous a montré, qu'il est possible de déterminer l'irradiance déposée sur le cheveu en analyse LAMMA, grâce à la présence de certains pics de masse : $m/z = 70$ en ions positifs et $118, 134, 150$ et 166 en ions négatifs. Un meilleur contrôle des ions formés, garant d'une meilleure reproductibilité des résultats, sera donc possible. De plus, l'irradiance de $5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$ semble être un bon compromis pour l'analyse simultanée de la partie organique et minérale d'un cheveu, tout en conservant un signal suffisamment intense. A irradiance identique, nous obtenons les mêmes spectres de masse en LAMMA et en FTMS.

IV.4. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons présenté l'interaction laser-matière, ainsi que les principaux appareils que nous allons utiliser. La complexité des phénomènes mis en jeu a été ainsi montrée. Puis nous avons mis au point le protocole d'analyse du cheveu par microsonde laser LAMMA 500, en tenant compte de la longueur d'onde et de l'irradiance du laser, ainsi que de la spécificité de l'échantillon.

Le cheveu est analysé à 266 nm, avec une irradiance de $5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$, car elle en permet l'analyse minérale et organique. Un lavage du cheveu à l'eau bidistillée pendant 60 min. est effectué pour exalter l'empreinte organique du cheveu.

Avant de passer au protocole d'expertise, nous allons étudier plus précisément les ions formés pendant l'ablation laser d'un cheveu témoin. Ce travail permettra une interprétation plus pointue des spectres de masse.

Références bibliographiques

- [1] J. Hecht, « The laser guidebook », éd. par Mc Gaw Hill, New York, 1992, Seconde édition.
- [2] O. Svelto, « Principles of lasers », éd. par Plenum, New York, 1989, Third edition.
- [3] D.M. Hercules, R.J. Day, K. Balasanmugan, T.A. Dang et C.C.P. Li, *Anal. Chem.*, 1982, 54, 280 A.
- [4] R. Srinivasan et B. Baren, *Chem. Rev.*, 1989, 89, 1303.
- [5] J.F. Muller, *Revue de métallurgie*, 1982, 482.
- [6] H. Vogt, H.J. Heinen, S. Meier et R. Wechsung, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 1981, 308, 195.
- [7] F. Hillenkamp et R. Kaufmann, extrait de « Laser applications in medicine and biology », éd. M.L. Wolbarsht, Plenum, 1989, 59.
- [8] A.H. Verbueken, F.G. Bruynseels et R.E. Van Grieken, *Biomed. Mass Spectrom.*, 1985, 12, 9, 438.
- [9] P.F. Schmidt et R.H. Barckhaus, *Progress Histo. Cytochem.*, 1991, 23, 342.
- [10] F.R. Verdun, thèse de chimie moléculaire, Metz, 1991.
- [11] G. Krier, F.R. Verdun et J.F. Muller, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 1985, 322, 379.
- [12] A. Hachimi, thèse de chimie moléculaire, Metz, 1993.
- [13] J.F. Muller, F. Tollite, G. Krier et M. Pelletier, Brevet n° 88-09438, Protection France, Suisse, Allemagne, Japon et Grande Bretagne.
- [14] J.F. Muller, F. Tollite, G. Krier, M. Berveiller, A. Eberhardt et S. Dominiak, Brevet n° 86-18244 publié le 24 juin 1988 sous le n° 608837.
- [15] J.F. Muller, M. Pelletier, G. Krier, D. Weil et J. Campana, *J. Proceeding of the 24th Conference of Microbeam Analysis Society-Ashville, San Francisco press*, 1989, 311.
- [16] M. Pelletier, G. Krier, J.F. Muller, D. Weil et M. Johnston, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1988, 2, 146.
- [17] M.B. Comisarow et A.G. Marshall, *Chem. Phys. Lett.*, 1974, 25, 282.
- [18] M.B. Comisarow et A.G. Marshall, *J. Mass Spectrom.*, 1996, 31, 581.
- [19] C. Masselon, thèse de chimie moléculaire, Metz, 1997.
- [20] A.G. Marshall et F.R. Verdun, *Fourier Transform in NMR, Optical an Mass Spectrometry*, Elsevier scientific, Amsterdam, 1990.
- [21] C. Giancaspro, F.R. Verdun et J.F. Muller, *Int. Mass Spectrom. Ion Proc.*, 1986, 72, 63.
- [22] A. Pineau, thèse de pharmaceutique, Nantes, 1987.
- [23] P. Kintz, *Ther. Drug. Monit.*, 1996, 18, 4.
- [24] A.J.J. Bos, C.C.A.H. van der Stap, R.D. Vis et H. Verheul, *Sci. Total Environ.*, 1985, 42, 157.
- [25] K.M. Attar, M.A. Abdel-Aal et P. Debayle, *Clin. Chem.*, 1990, 36, 3, 477.
- [26] B. Griepink, P. Quevauviller, E.A. Maier, K. Vercoutere et H. Muntau, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1992, 343, 335.

Chapitre III

Interprétation des spectres de masse d'un cheveu témoin

Nous avons montré dans le chapitre précédent la complexité des phénomènes mis en jeu lors de l'ablation laser d'un échantillon et l'importance du contrôle des paramètres laser. La difficulté de l'analyse d'une tige pileaire est augmentée par sa nature à la fois organique et minérale. La figure 1 rappelle l'empreinte plutôt minérale d'un cheveu « brut » et plutôt organique d'un cheveu « lavé ».

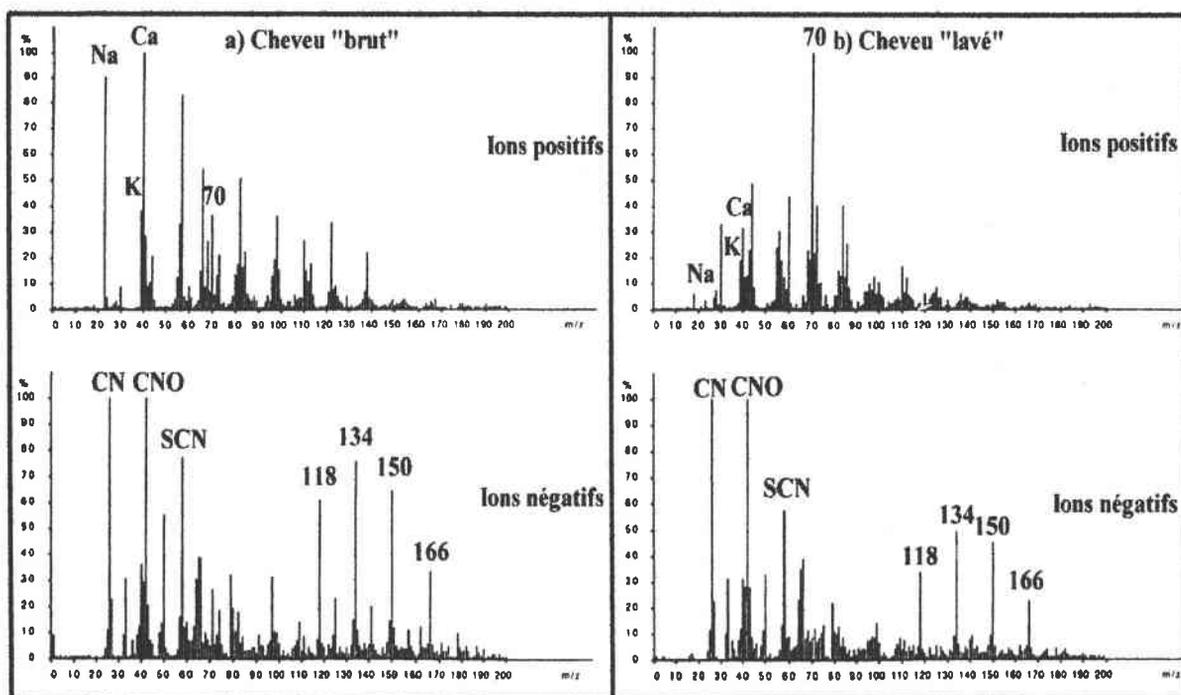


Figure 1 : spectres de masse LAMMA en ions positifs et négatifs à 266 nm pour une irradiance de $5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$ d'un cheveu a) "brut" et b) "lavé".

Nous constatons que le lavage a pour effet, en ions positifs, de modifier profondément le spectre. Les éléments majoritaires (Na, K et Ca) diminuent considérablement, pour laisser place à un ion $m/z = 70$ majoritaire. A l'inverse, l'empreinte en ions négatifs est peu influencée par le protocole de nettoyage. Nous pouvons donc penser que ces pics ont une origine organique.

A notre connaissance, aucun travail sur le cheveu n'a été effectué par microsonde laser couplée à la spectrométrie de masse. C'est pourquoi, nous avons cherché à comprendre l'origine et les mécanismes de formation des ions, afin d'interpréter par la suite les différences observées entre les spectres de masse de plusieurs cheveux. Pour cela, l'étude est divisée en deux étapes :

- le dopage de cheveux « lavés » par des composés minéraux et l'observation de leurs interactions avec la matrice organique ;
- le passage d'étalons biologiques (acides aminés et polypeptides) et l'analyse des mécanismes de fragmentation de la matrice organique du cheveu.

I. Interprétation de l'empreinte « minérale »

Les principaux travaux étudiant la formation des ions lors d'un impact laser, concernent généralement des composés simples. Après l'analyse des résultats bibliographiques obtenus sur des composés minéraux, nous avons retenu trois grands mécanismes :

- l'agrégation des petites particules (ions et neutres) formées dans la partie dense du plasma en ions de plus grandes tailles appelés agrégats ou clusters [1]. Elle explique l'existence d'espèces associant des composés physiquement séparés dans l'échantillon. Ainsi A. Hachimi [2] rapporte que Wurster et coll. ont observé la formation d'agrégats de type $Ag_nCu_m^+$, en frappant simultanément sur une feuille d'argent et sur une feuille de cuivre par laser ;

- la fragmentation des clusters formés. Elle se produit à cause d'un excès d'énergie interne ou par collisions lors de la phase d'expansion du plasma. Les ions les plus gros ont normalement une abondance plus faible. X.G. Zhang et col. [3] observent cependant en irradiant du $K_3[Fe(CN)_6]$ des agrégats ionisés $[K(KCN)_n]^+$ plus stables que d'autre, avec par exemple $n = 4, 13, 22, 37$. Ils parlent alors de nombres magiques. En fait, ce sont des structures énergétiquement favorisées ;

- l'éjection directe de fragments ionisés dont la masse ne varie plus, à partir du moment où ils quittent la surface de la cible. Leur stoechiométrie est similaire à celle de l'échantillon [4]. Cette réaction se déroule principalement dans la zone de « désorption » du plasma, où les ions ont moins d'excès d'énergie interne et moins de risque de collision.

Dans notre cas, pour être représentatif des phénomènes mis en jeu, il n'est pas possible de travailler sur les seuls composés minéraux. Pour simplifier les observations, nous avons préféré travailler sur des cheveux témoins lavés, donc en principe débarrassés de leurs éléments majoritaires (non chalcogènes). Ces mêmes cheveux ont été ensuite dopés successivement avec chacun des principaux éléments rencontrés. Nous effectuons ainsi le chemin inverse du processus de lavage en passant d'une empreinte « organique » à une empreinte « minérale » simplifiée. L'expérience est considérée comme positive lorsque l'élément dopant est détecté, ainsi que le pic de masse $m/z = 70$. En effet ce

dernier prouve que la matrice organique est irradiée par le laser en même temps que le composé polluant.

I.1. Dopage des cheveux en éléments minéraux.

Le dopage a été réalisé sur deux centimètres de cheveu témoin lavé, puis déposés dans 5 ml d'une solution dopante pendant 24 heures. Avant d'être analysé, le fragment de tige pilaire est rincé trois fois dans de l'eau bidistillée et séché à l'étuve (60°C). Nous avons commencé le dopage à partir de solutions saturées, puis diluées ($v_{\text{saturée}}/v_{\text{eau}} = 1/2$ ou $1/4$), jusqu'à l'obtention du signal attendu (présence du pic $m/z = 70$) sur le spectre de masse.

Comme nous l'avons vu dans les chapitres I et II, la tige pilaire peut piéger l'ensemble des éléments du tableau périodique. Il n'était pas possible, ni vraiment utile de tous les étudier. Le choix des éléments dopants devaient répondre à trois critères essentiels :

- couvrir l'ensemble du spectre de masse habituel d'un cheveu (1 à 220 u.) ;

- se situer dans des colonnes différentes du tableau périodique, afin d'avoir des réactivités physico-chimiques différentes.

- avoir un intérêt particulier et s'insérer dans l'étude spécifique du cheveu.

A partir de ces critères, huit éléments ont été sélectionnés :

- le sodium et le potassium, car se sont des polluants habituels qui peuvent notamment être apportés par la sueur ;

- l'aluminium et le plomb, pour leurs aspects toxicologiques ;

- le chlore qui est l'halogène le plus courant ;

- le zinc et le cuivre car ils sont toujours présents de façon homogène dans le cheveu ;

- le calcium, car l'analyse par ICP a montré que c'était l'élément minéral majoritaire du cheveu.

I.1.1. Les alcalins

I.1.1.1. Le potassium

Le cheveu a été trempé dans une solution diluée au $1/2$ de chlorure de potassium, à partir de la solution saturée (tableau 1, figure 2).

En ions positifs, nous remarquons la présence des doublets de pics : $m/z = (39, 41), (104, 106), (113, 115)$ et $(120, 122)$. Nous avons vu que la formation des ions pouvait être due à l'agrégation d'ions (positifs ou négatifs) et de neutres de plus petites masses, formés au sein du plasma. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés aux ions négatifs majoritaires : les pics $m/z = 26$ et 42 . Ils sont souvent associés pour des composés biologiques à CN^- et CNO^- , ce qui est parfaitement plausible au vu de la constitution du cheveu et de l'irradiance laser utilisée. Nous pouvons donc supposer que les ions négatifs majoritaires se lient

au potassium (K^+) pour former : $[K_2CN]^+$ ($m/z = 104, 106$) et $[K_2CNO]^+$ ($m/z = 120, 122$). Cela explique que le rapport d'intensité des pics (104/106) et (120/122) est inférieur au rapport isotopique du potassium ($^{39}K = 93$ et $^{41}K = 7$ %), la probabilité de trouver un isotope ^{41}K dans l'agrégat étant multiplié par deux. La présence de chlore permet la formation de $[K_2Cl]^+$ ($m/z = 113, 115$).

Le potassium ayant un degré d'oxydation de +1, l'agrégat ionisé positivement, pour être stable, doit être composé de deux cations (potassium) et d'un anion (Cl^- , CN^- et CNO^-).

Pics de masse en ions +	104 et 106	113 et 115	120 et 122	Pics de masse en ions -	91	107	123
Composition proposée	K_2CN	K_2Cl	K_2CNO		$K(CN)_2$	$KCNCNO$	$K(CNO)_2$

Tableau 1 : pics de masse associés à la présence de potassium (K).

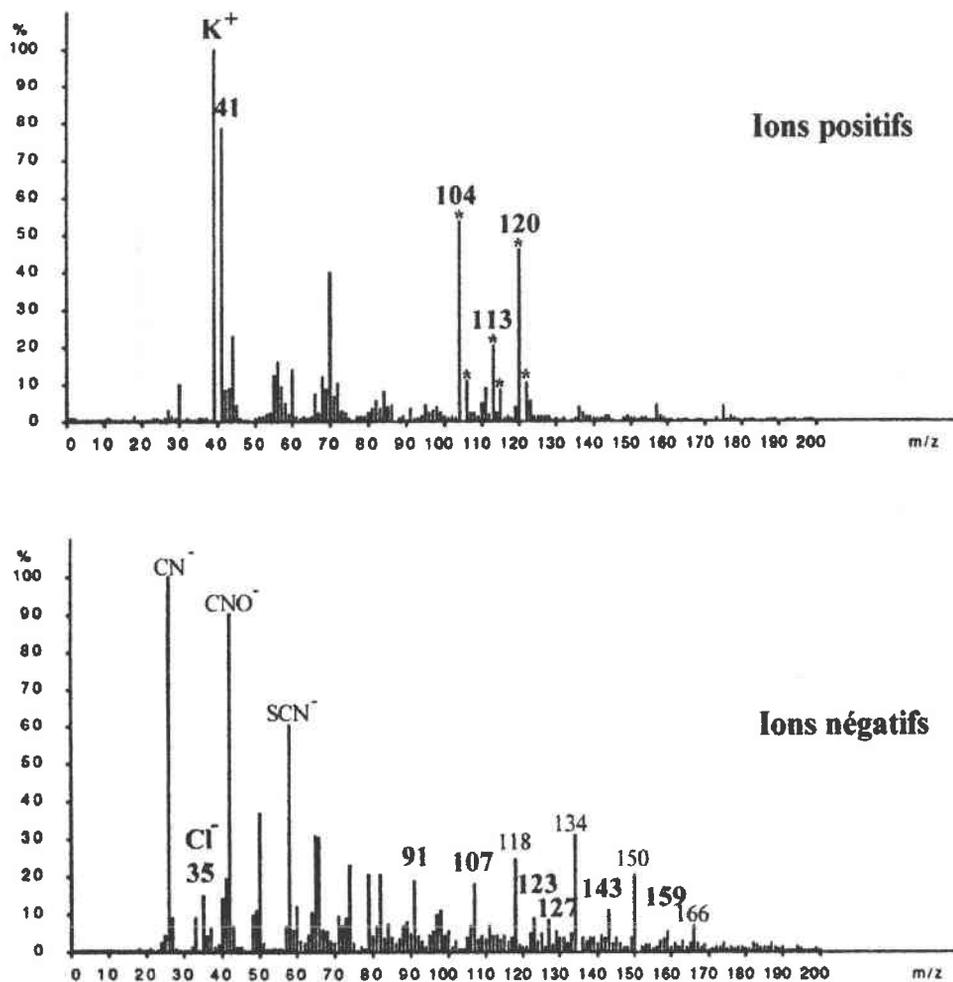


Figure 2: spectres de masse LAMMA en ions positifs et négatifs d'un cheveu dopé avec du chlorure de potassium ($\lambda = 266$ nm, $I_r = 5 \cdot 10^8$ W/cm²).

En ions négatifs, le phénomène inverse se produit : l'agrégat ionisé négativement, pour être stable, doit être composé de deux anions et d'un cation. Ainsi, nous observons les pics $m/z = 91, 107$ et 123 , très certainement dus aux ions $[K(CN)_2]^-$, $[K(CN)(CNO)]^-$ et $[K(CNO)_2]^-$. Nous ne détectons pas significativement les pics correspondant aux clusters associés à K^{41} , car ils ne sont pas intenses. La détection en ions négatifs nécessite deux charges négatives pour un cation de degré d'oxydation +1. Nous remarquons aussi la présence des pics de masse $m/z = (35, 37)$ du chlore et $127, 143, 159$.

I.1.1.2. Le sodium

Le cheveu a été plongé dans une solution diluée au $\frac{1}{2}$ de chlorure de sodium. La figure 3 et le tableau 2 présentent les résultats obtenus.

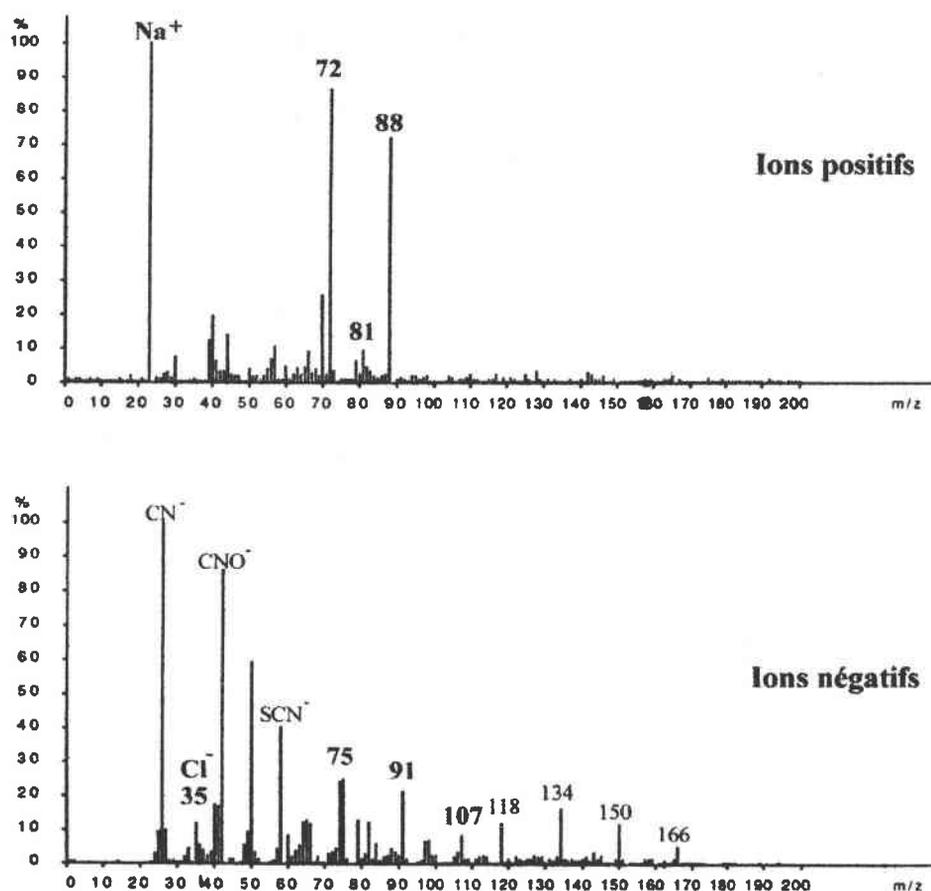


Figure 3 : spectres de masse LAMMA en ions positifs et négatifs d'un cheveu dopé avec du chlorure de sodium ($\lambda = 266 \text{ nm}$, $I_r = 5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$).

Pics de masse en ions +	72	81	88	Pics de masse en ions -	75	91	107
Composition proposée	Na_2CN	Na_2Cl	Na_2CNO		$\text{Na}(\text{CN})_2$	NaCNCNO	$\text{Na}(\text{CNO})_2$

Tableau 2 : pics de masse associés à la présence de sodium (Na).

Le comportement du chlorure de sodium est similaire à celle du chlorure de potassium. Les agrégats d'ions observés sont du même type, en ions positifs : $[\text{Na}_2\text{CN}]^+$, $[\text{Na}_2\text{Cl}]^+$, $[\text{Na}_2\text{CNO}]^+$ et en ions négatifs : $[\text{Na}(\text{CN})_2]^-$, $[\text{Na}(\text{CN})(\text{CNO})]^-$ et $[\text{Na}(\text{CNO})_2]^-$. Cette similitude est logique, car le potassium et le sodium appartiennent à la classe des alcalins, ils ont donc des propriétés physico-chimiques très proches.

Nous remarquons que le sodium provoque, tout comme le potassium la formation en ions négatifs d'ions de masse $m/z = 91$ et 107 . La résolution de l'appareil LAMMA 500 ($R = 700$) ne permet pas leur différenciation. Cette observation montre qu'il faut être prudent lors de l'interprétation de spectre LAMMA, un pic pouvant être la somme des signaux d'ions isobariques en unité de masse atomique (de même masse mais de composition différente).

I.1.2. L'aluminium

Le dopage du cheveu a été effectué à l'aide d'une solution saturée de nitrate d'aluminium ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3, 9 \text{H}_2\text{O}$). La figure 4 présente les résultats de l'analyse LAMMA.

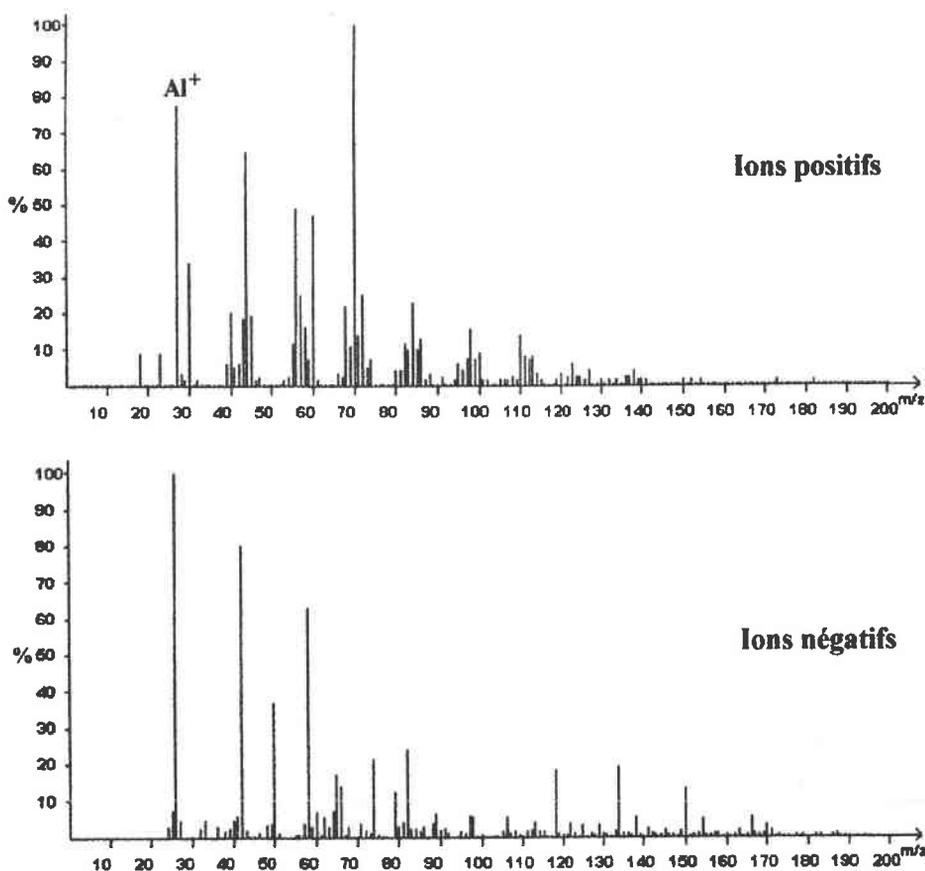


Figure 4 : spectres LAMMA en ions positifs et négatifs d'un cheveu dopé en Al. $\lambda = 266 \text{ nm}$ et $\text{Ir} = 5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$.

Même lorsque son signal est saturé, l'aluminium ($m/z = 27$) ne forme pas d'agrégats ionisés dans nos conditions d'analyse. Son degré d'oxydation important +3 ne doit pas favoriser la formation d'ions stables de plus hautes masses. La zone du spectre occupé par l' Al^+ a une faible densité de pics, ce qui le rend plus facilement identifiable. En effet, les agrégats de même masse qui peuvent interférer sur le signal sont de compositions limitées et en général de faible intensité : $C_2H_3^+$ et CHN^+ .

En ions négatifs, aucun pic lié aux nitrates (NO_2^- ou NO_3^-) n'a été détecté, bien qu'ils soient présents en plus grand nombre que l'aluminium. Cela est peut être dû aux propriétés physico-chimiques du cheveu qui ne favorisent par leur fixation. En effet, dans une solution aqueuse de pH supérieur à 3,7, la surface du cheveu est chargée négativement.

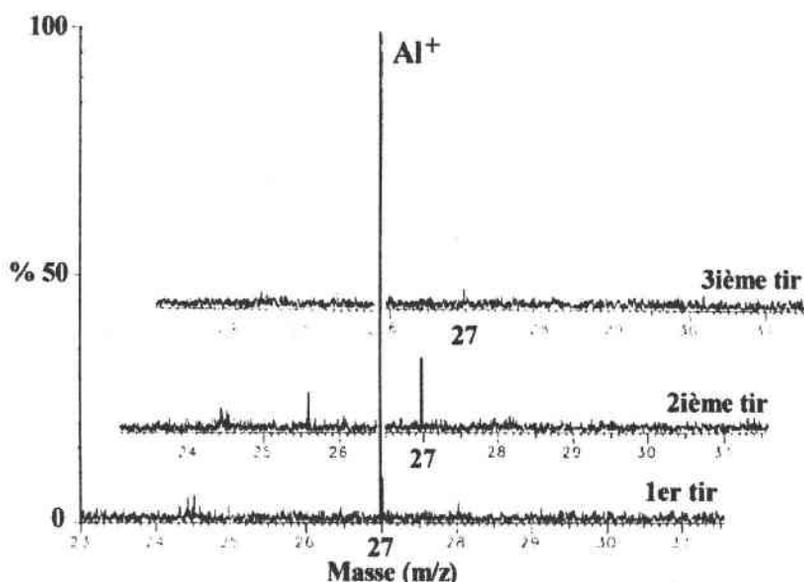


Figure 5 : spectres FTMS de trois tirs lasers successifs sur un cheveu dopé en Al. $\lambda = 248 \text{ nm}$, $I_r = 1,5 \cdot 10^9 \text{ W/cm}^2$.

Nous avons profité de ce dopage pour observer par FTMS si l'aluminium pénétrait profondément dans le cheveu (figure 5). Au bout du troisième impact laser, il n'est plus détecté. Il est donc dû, comme l'indique le protocole utilisé, à une pollution de surface. Bien que la tige pileaire ait passé 24 heures dans une solution saturée, la diffusion de l'aluminium vers l'intérieur se fait difficilement. Pour un cheveu en bon état, la détection d' Al^+ sur toute sa section serait donc le signe d'une origine endogène.

1.1.3. Le plomb

Les résultats obtenus par LAMMA sur un cheveu dopé à l'aide d'une solution saturée de chlorure de plomb sont présentés dans la figure 6.

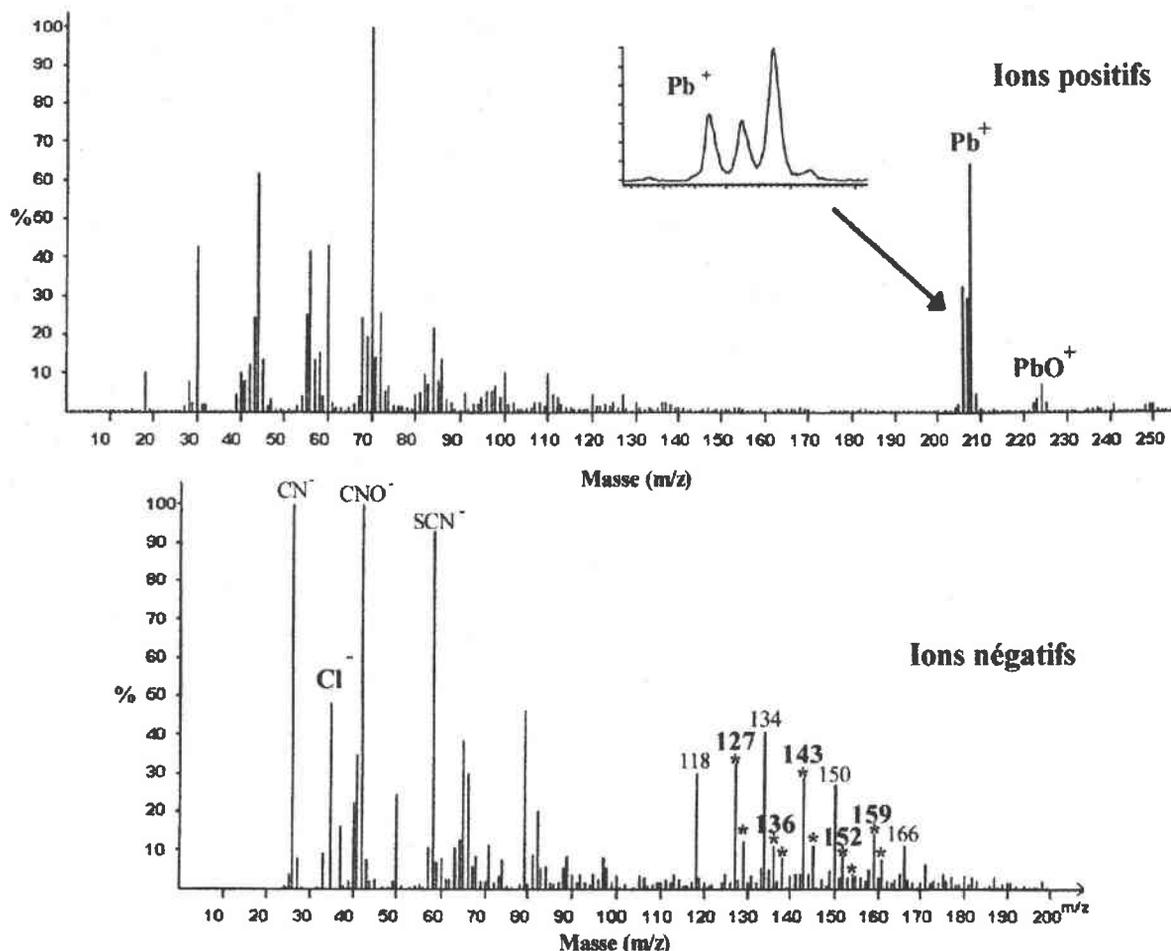


Figure 6 : spectres LAMMA en ions positifs et négatifs d'un cheveu dopé en chlorure de plomb. $\lambda = 266 \text{ nm}$, $I_r = 5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$.

L'identification du plomb sur un spectre de masse de cheveu est facilitée par ses isotopes ($^{204}\text{Pb} = 1 \%$, $^{206}\text{Pb} = 25 \%$, $^{207}\text{Pb} = 21 \%$ et $^{208}\text{Pb} = 52 \%$). Mais aussi par sa zone de détection, qui est très pauvre en ions « organiques » pouvant interférer sur son signal. Nous remarquons la présence du pic $m/z = 224$ relatif à l'ion PbO^+ .

En ions négatifs nous observons deux séries de doublet :

- I : (127-129), (143-145) et (159-161) ;
- II : (136-138) et (152-154).

Au vu de leur rapport d'intensité, ils contiennent au moins un chlore, car le rapport isotopique est en général respecté ($^{35}\text{Cl} = 76$ et $^{37}\text{Cl} = 34 \%$). Cette hypothèse est confirmée par l'expérience suivante.

I.1.4. Le chlore

La figure 7 présente le résultat LAMMA en ions négatifs, du dopage d'un cheveu dans une solution saturée de chlorure de fer. Le spectre en ions positifs n'est pas présenté ici, car il fait apparaître le pic du fer ($m/z = 56$) sans autres agrégats.

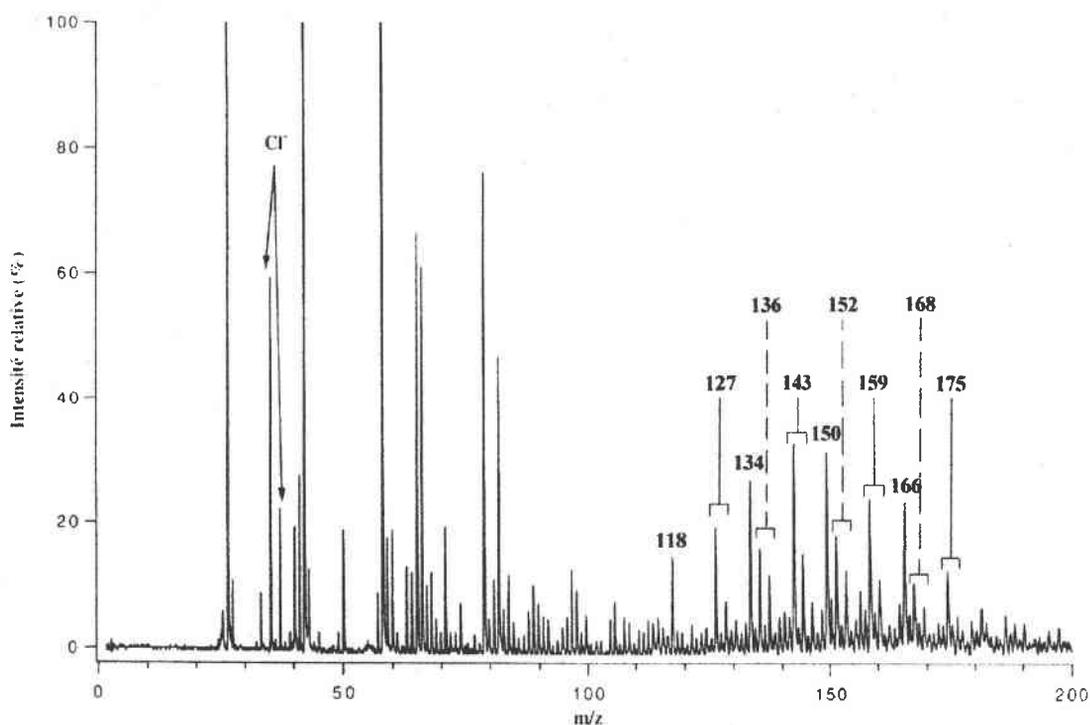


Figure 7 : spectre LAMMA en ions négatifs d'un cheveu dopé en chlore. $\lambda = 266$ nm, $I_r = 5 \cdot 10^8$ W/cm².

Dans la même zone du spectre de masse apparaissent trois séries :

- 118, 134, 150 et 166 : série I ;
- (127-129), (143-145), (159-161) et (175-177) : série II ;
- (136-138), (152-154) et (168-170) : série III.

La première série est caractéristique du cheveu, les deux autres apparaissent de manière plus ou moins intense lorsque nous utilisons un chlorure. L'écart régulier de 16 unités de masse entre les pics de chacune des séries ainsi qu'une empreinte générale similaire, implique qu'elles sont certainement liées. Le chlore doit rentrer en compétition avec un composant de la première série (I).

En calculant la différence entre le premier pic de la série I et ceux des deux autres séries, nous obtenons un écart de +9 et de +18 unités de masse atomique : $127-118 = 9$ et $136-118 = 18$. Si un chlore remplace un composant chargé de la première série, nous avons alors : $35-9 = 26$ et $35-18 = 17$. Les masses 26 et 17 seraient donc celles de l'ion substitué par le chlore (Cl⁻). Dans notre cas, il peut s'agir de CN⁻ et de OH⁻. Cependant si cette hypothèse paraît correcte pour la seconde série (départ de CN⁻ remplacé par Cl⁻) car le rapport isotopique du chlore est respecté, cela n'est plus le cas pour la troisième série. Il correspondrait plutôt au rapport isotopique de deux chlores, mais l'intensité du signal est trop faible pour en être certain. Ce qui nous donnerait : $(35)_2-18 = 52$ soit deux Cl⁻ à la place de deux CN⁻.

Cette expérience met en évidence des phénomènes de compétition entre les ions négatifs au sein du plasma. Elle indique aussi que les pics de masse $m/z = 118, 134, 150$ et 166 sont constitués d'au moins un CN^- et d'oxygène, ce qui explique l'intervalle de 16 u. entre chaque pics de masse du massif. Il est cependant difficile d'aller plus en avant dans leur constitution, sans procéder à leur analyse en haute résolution par FTMS.

I.1.5. Le zinc

Le cheveu placé dans une solution saturée de chlorure de zinc n'est pas rincé avant l'analyse, sinon il n'est pas détecté. Les spectres de masse LAMMA sont présentés figure 8.

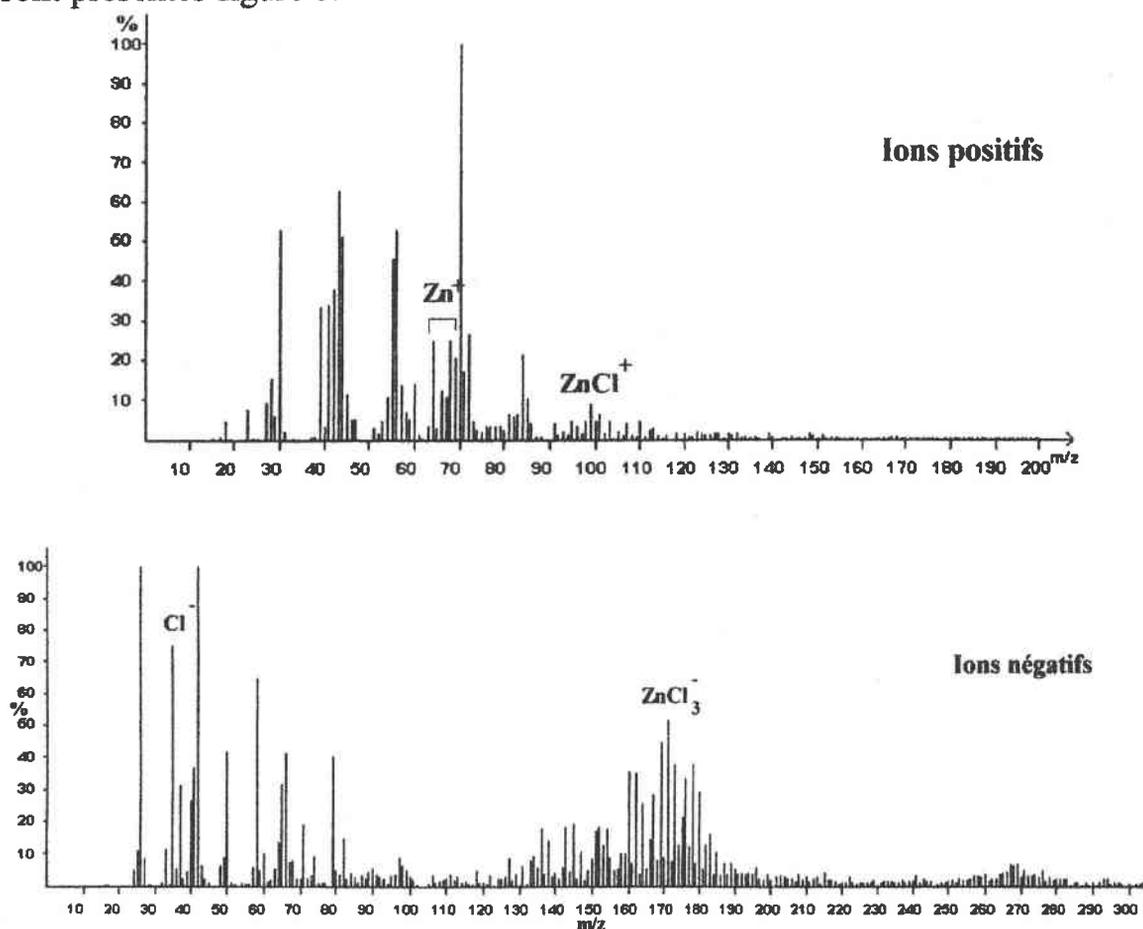


Figure 8 : spectres LAMMA en ions positifs et négatifs d'un cheveu dopé en chlorure de zinc. $\lambda = 266 \text{ nm}$, $I_r = 5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$.

Malgré une solubilité dans l'eau très importante du $ZnCl_2$ (432 g / 100 cc), il est très difficile de détecter significativement le zinc en ions positifs. Son potentiel de première ionisation étant élevé ($PI = 9,39 \text{ eV}$), l'ion Zn^+ est difficilement formé dans le plasma. De plus, il apparaît avec ses principaux isotopes ($^{64}Zn = 49 \%$, $^{66}Zn = 28 \%$, $^{67}Zn = 4 \%$ et $^{68}Zn = 19 \%$) dans une zone du spectre riche en ions de la matrice organique, qui ne favorise pas son identification. Les pics de masse $m/z = 99, 101$ et 103 sont certainement dus à l'ion $ZnCl^+$.

En ions négatifs nous observons un amas de pics particulièrement intense preuve que le dopage est important. Centré autour du pic $m/z = 169$, il est très certainement dû à l'ion ZnCl_3^- et à la contribution des isotopes du Zn et du Cl, mais aussi à d'autres ions comme ZnCl_2CN^- ($m/z = 160$) ou $\text{ZnCl}(\text{CN})_2^-$ ($m/z = 151$). Les structures des ions négatifs paraissent plus stables que celles des ions positifs.

I.1.6. Le cuivre

Le cheveu a été plongé dans une solution saturée de sulfate de cuivre. Les résultats de l'analyse LAMMA sont présentés dans la figure 9.

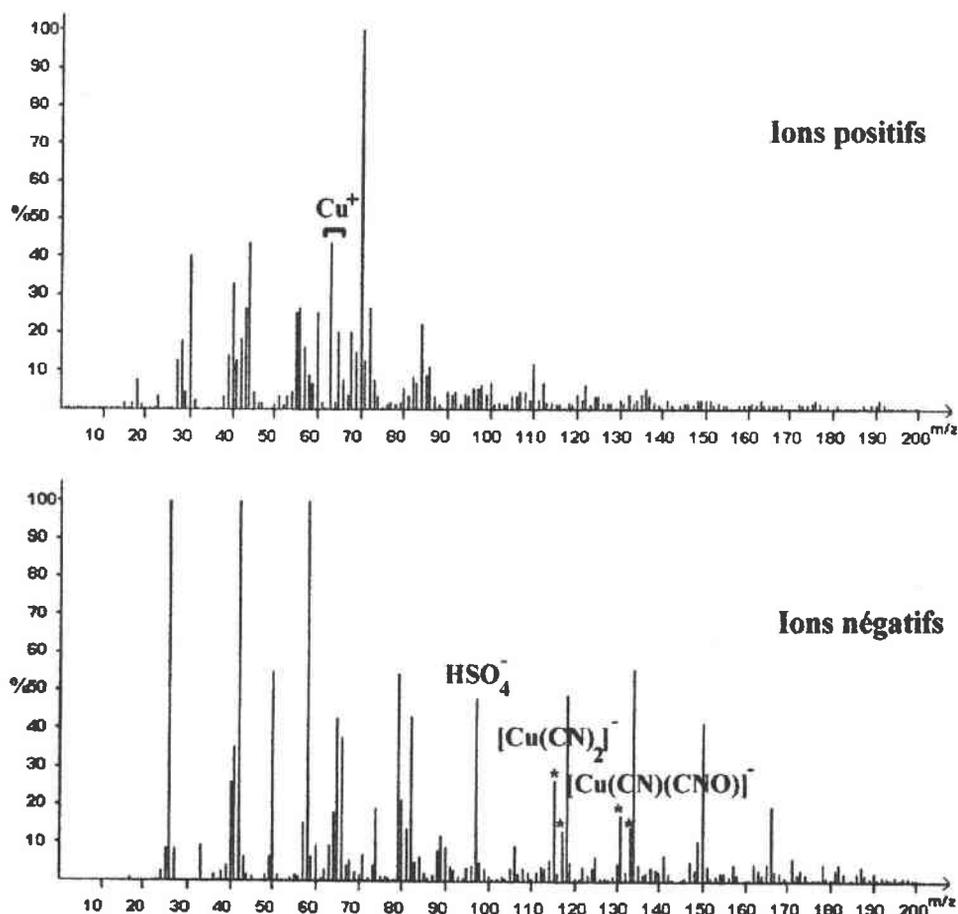


Figure 9 : spectres LAMMA en ions positifs et négatifs d'un cheveu dopé en sulfate de cuivre. $\lambda = 266 \text{ nm}$, $I_r = 5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$.

La présence de cuivre est reconnaissable grâce à ses deux isotopes $m/z = 63$ et 65 , dont l'abondance est respectivement de 69 et 31 %. Il apparaît dans une zone située entre deux amas de pics « organiques », ce qui facilite sa détection.

C'est seulement en ions négatifs que nous observons des agrégats liés au cuivre : $m/z = (115, 117)$ et $(131, 133)$ respectivement attribués à $[\text{Cu}(\text{CN})_2]^-$ et $[\text{Cu}(\text{CN})(\text{CNO})]^-$. Ce type d'ions est caractéristique d'un degré d'oxydation de +1. Le cuivre réagit logiquement comme les alcalins, compte tenu de sa

conformation électronique. Mais contrairement à eux, ce sont les agrégats négatifs qui semblent les plus stables. Cette observation s'explique peut-être par une tendance du cuivre à gagner un électron pour saturer sa couche électronique $3d^{10}4s^1$ en $3d^{10}4s^2$. Les alcalins quant à eux, donneront plus facilement un électron pour acquérir la configuration électronique du gaz rare qui les précède. La présence des sulfates est mise en évidence par l'augmentation significative du signal de l'ion $m/z = 97$ (HSO_4^-).

I.1.7. Le calcium

Dans le cas chlorure de calcium nous avons utilisé une solution diluée au $\frac{1}{4}$. La figure 10 présente les spectres LAMMA obtenus en ions positifs et négatifs.

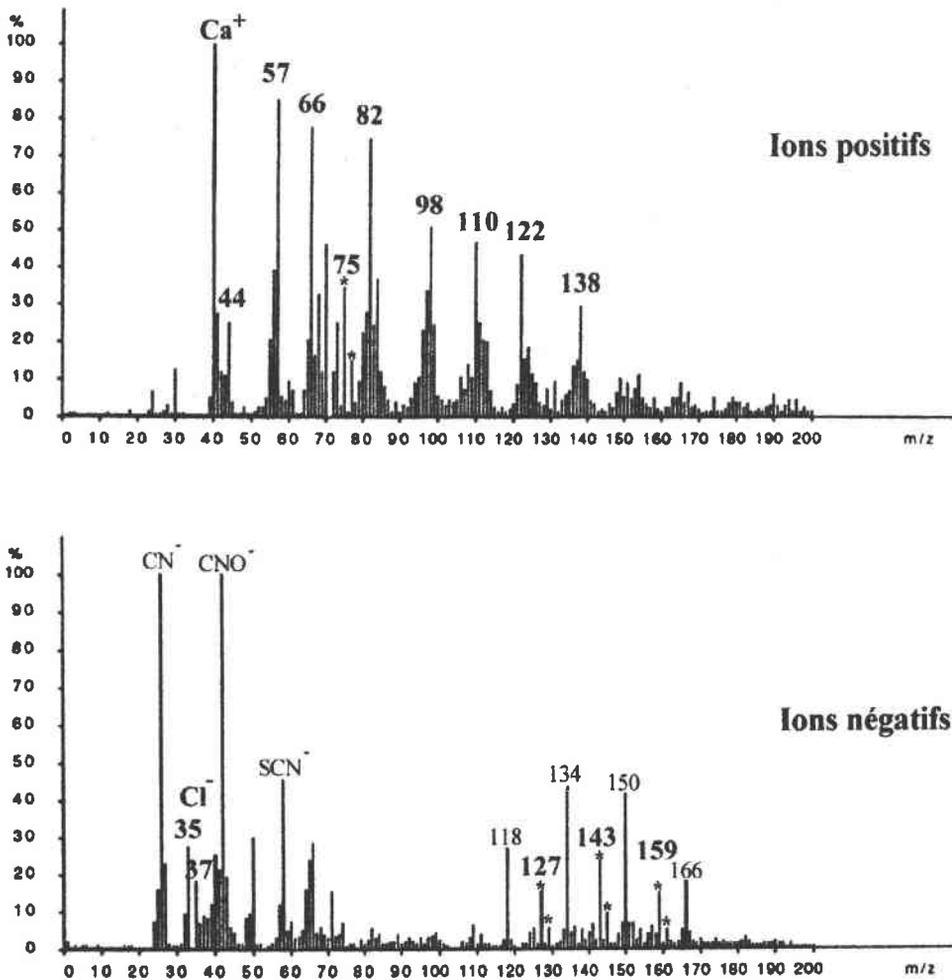


Figure 10 : spectres de masse LAMMA en ions positifs et négatifs d'un cheveu dopé avec du chlorure de calcium ($\lambda = 266 \text{ nm}$, $I_r = 5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$).

Par comparaison avec l'empreinte du même cheveu lavé, nous observons l'apparition de nombreux pics de masse associés au produit dopant (tableau 2).

Le spectre en ions positifs est beaucoup plus fourni que ceux des autres éléments analysés.

Pics de masse en ions +	40	57	66	75 et 77	82	98	110	122	138
Composition proposée	Ca	CaOH	CaCN	CaCl	CaCNO	CaSCN ?			

Tableau 3 : pics de masse associés à la présence de calcium (Ca).

Dix pics de masse sont liés à la présence de calcium : $m/z = 40, 57, 66, 75, 77, 82, 98, 110, 122,$ et 138 . Les pics $m/z = 40$ et le couple $(75, 77)$ sont respectivement attribués au calcium (Ca^+) et à l'ion $[\text{CaCl}]^+$; le rapport isotopique dû au chlore étant en général respecté ($^{35}\text{Cl} = 76$ et $^{37}\text{Cl} = 34\%$). Pour les autres composés, quelques hypothèses ont été émises : $[\text{CaCN}]^+$ (66), $[\text{CaCNO}]^+$ (82) et $[\text{CaSCN}]^+$ (98), la charge positive s'explique ici par la valence +2 du calcium. Quant au pic $m/z = 57$, l'expérience montre qu'il est dû à l'ion CaOH^+ . Ces structures sont confirmées par analyse FTMS, sauf $[\text{CaSCN}]^+$ (tableau 4) qui, compte tenu de la calibration, conduit à un écart de masse trop important (470 ppm). Pourtant, comme nous le verrons plus loin, la présence significative de SCN^- ($m/z = 58$) a été confirmée en ions négatifs. Le pic $m/z = 98$ semble appartenir à une deuxième famille d'agrégats $m/z = 98, 110, 122$ dont la composition exacte n'est pas clairement définie à ce jour. Leur structure comporterait plus d'atomes carbonés ce qui expliquerait l'écart de 12 unités de masse observé entre eux.

Calculée (m/z)	Mesurée (m/z)	Erreur (ppm)	Ions positifs proposés
39,962042	C	0,363	Ca
56,964782	C	-0,037	CaOH
65,965116	C	-2,519	CaCN
81,960031	C	2,429	CaCNO
97,937186	97,983302	470,872	CaSCN

Tableau 4 : calibration du spectre FTMS en ions positifs, d'un cheveu riche en Ca. C : pics de calibration.

En ions négatifs, les variations du spectre sont faibles comparées à l'analyse en positifs. Nous remarquons seulement l'apparition des pics de masse $m/z = (35, 37), (127, 129), (143, 145)$ et $(159, 161)$ déjà observés en présence de chlore. Cependant, au vu des résultats précédents obtenus pour les autres atomes et des mécanismes d'agrégations observés, nous pouvons nous demander si les pics $m/z = 118, 134, 150$ et 166 ne sont pas dus à : $[\text{Ca}(\text{CN})_3]^-$, $[\text{Ca}(\text{CN})(\text{CNO})]^-$, $[\text{Ca}(\text{CN})(\text{CNO})_2]^-$ et $[\text{Ca}(\text{CNO})_3]^-$.

I.2. Interprétation des pics de masse 118, 134, 150 et 166

Nous avons vu précédemment que les pics de masse 118, 134, 150 et 166 étaient présents à la fois sur l'empreinte minérale et sur l'empreinte organique du cheveu. Ils sont constitués en partie de CN^- et d'oxygène. Pour déterminer avec certitude leur composition, nous avons procédé à l'étude FTMS d'une pastille de cheveu dopé en oxyde de cuivre. En effet, le cuivre forme des agrégats de masse $m/z = 115, 117, 131$ et 132 de $[\text{Cu}(\text{CN})_2]^-$ et $[\text{Cu}(\text{CN})(\text{CNO})]^-$. Ils vont nous permettre de calibrer avec précision la zone du spectre de masse qui nous intéresse.

I.2.1. Calibration du spectre

L'oxyde de cuivre est mis en suspension dans de l'eau bidistillée, puis une goutte de la solution est déposée sur la pastille de cheveu. La figure 11 présente le spectre FTMS en ions négatifs de cette préparation.

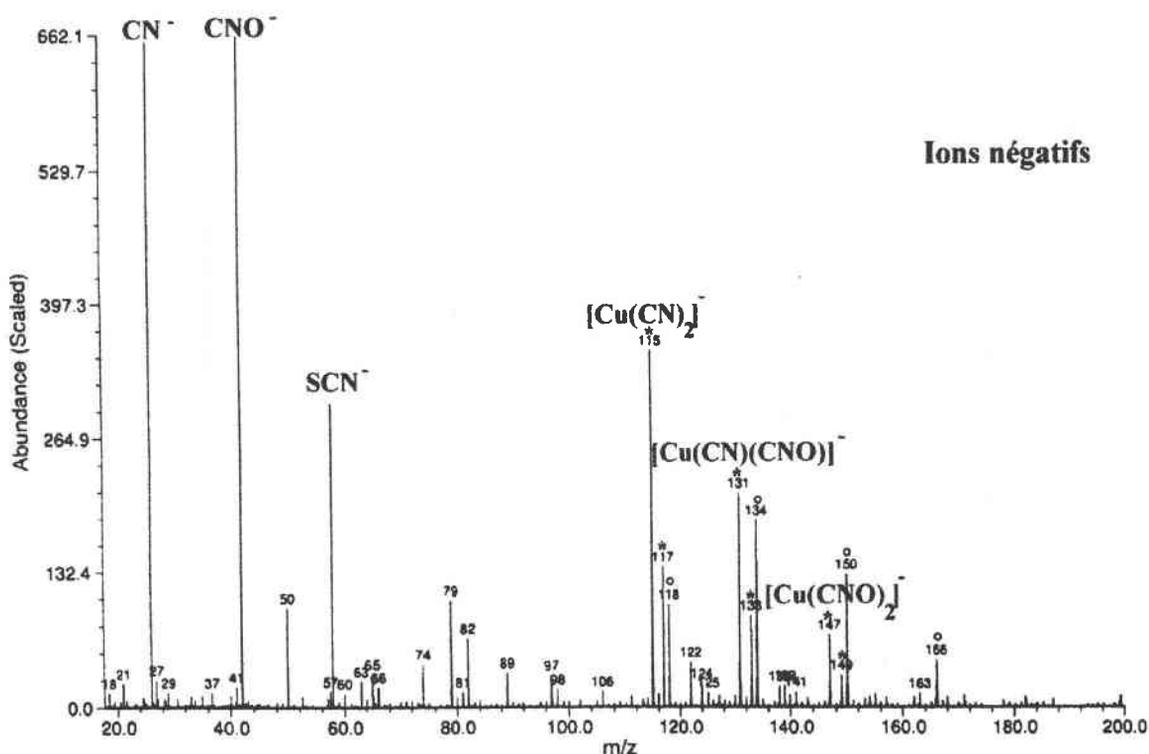


Figure 11 : spectre FTMS en ions négatifs d'une pastille de cheveu dopée en oxyde de cuivre. $\lambda = 266 \text{ nm}$, $I_r = 5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$.

Nous observons dans ces conditions un nouvel agrégat $[\text{Cu}(\text{CNO})_2]^-$ qui complète logiquement la série. Pour obtenir plus de résolution nous avons travaillé en mode hétérodyne sur une plage de masse de 113 à 128 u. (figure 12).

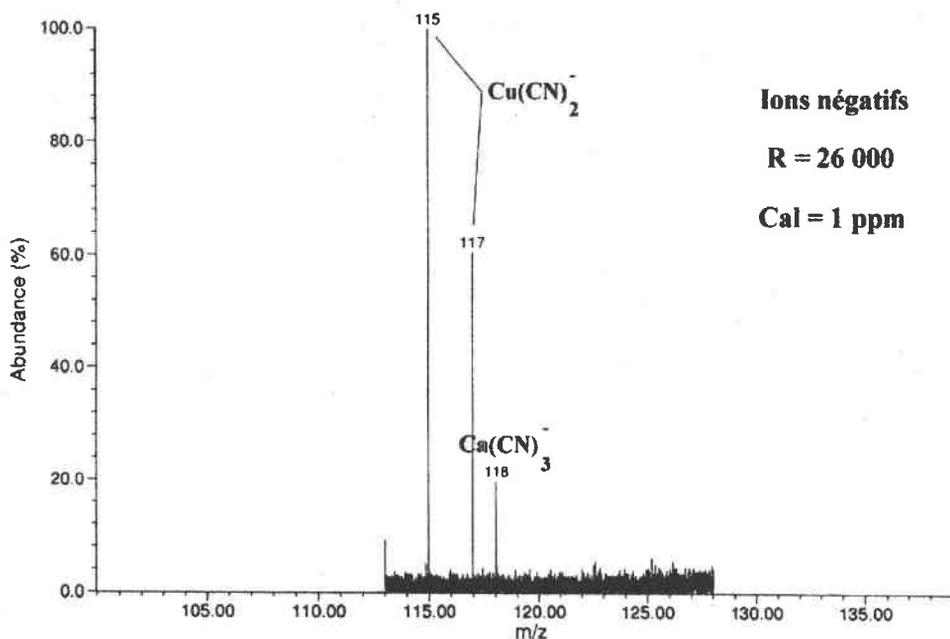


Figure 12 : spectre FTMS haute résolution en ions négatifs, d'une pastille dopée en oxyde de cuivre. $\lambda = 266 \text{ nm}$; $I_r = 5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$.

Calculée (m/z)	Mesurée (m/z)	Erreur (ppm)	Ions positifs
114, 936291	C		$^{63}\text{Cu}(\text{CN})_2$
116, 934490	C		$^{65}\text{Cu}(\text{CN})_2$
117, 972362	117,972012	-2,969	$\text{Ca}(\text{CN})_3$

Tableau 5 : Calibration du pic $m/z = 118$ à partir des ions de $\text{Cu}(\text{CN})_2^+$. C : pics de calibration.

La résolution de 26 000 et la calibration (tableau 5) sur les deux pics connus de $\text{Cu}(\text{CN})_2^-$, nous donnent comme composition de l'agrégat $m/z = 118$ $[\text{Ca}(\text{CN})_3]^-$. Une fois ce spectre calibré, nous obtenons une erreur absolue moyenne de 0,97 ppm sur ces trois pics. Cette formule peu paraître surprenante, car nous avons remarqué précédemment, que le cheveu lavé ne présentait presque plus de Ca^+ , alors que les ions $m/z = 118, 134, 150$ et 166 restaient intenses. Cependant, cette interprétation respecte le degré d'oxydation +2 du calcium et complète logiquement les résultats déjà obtenus.

I.2.2. Reproduction du mécanisme de formation

Pour confirmer cette formation d'agrégat, nous avons mélangé du calcium ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) avec un acide aminé : la glycine ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$), ainsi nous apportons tous les éléments nécessaires à la formation des agrégats d'ions $m/z = 118, 134, 150$ et 166 . L'expérience est concluante (tableau 6 et figure 13) et les ions 118, 134 et 150 correspondent donc bien à $[\text{Ca}(\text{CN})_3]^-$, $[\text{Ca}(\text{CN})(\text{CNO})]^-$ et $[\text{Ca}(\text{CN})(\text{CNO})_2]^-$.

Calculée (ppm)	Mesurée (ppm)	Erreur (ppm)	Ions négatifs
26,003623	C		CN
74,024753	C		C ₂ H ₄ O ₂ N
117,972362	117,973096	-6,924	Ca(CN) ₃
133,967277	133,966397	-6,566	Ca(CN) ₂ CNO
149,962192	149,964090	12,659	CaCN(CNO) ₂

Tableau 6 : tableau de calibration du mélange calcium-glycine. C : pics de calibration.

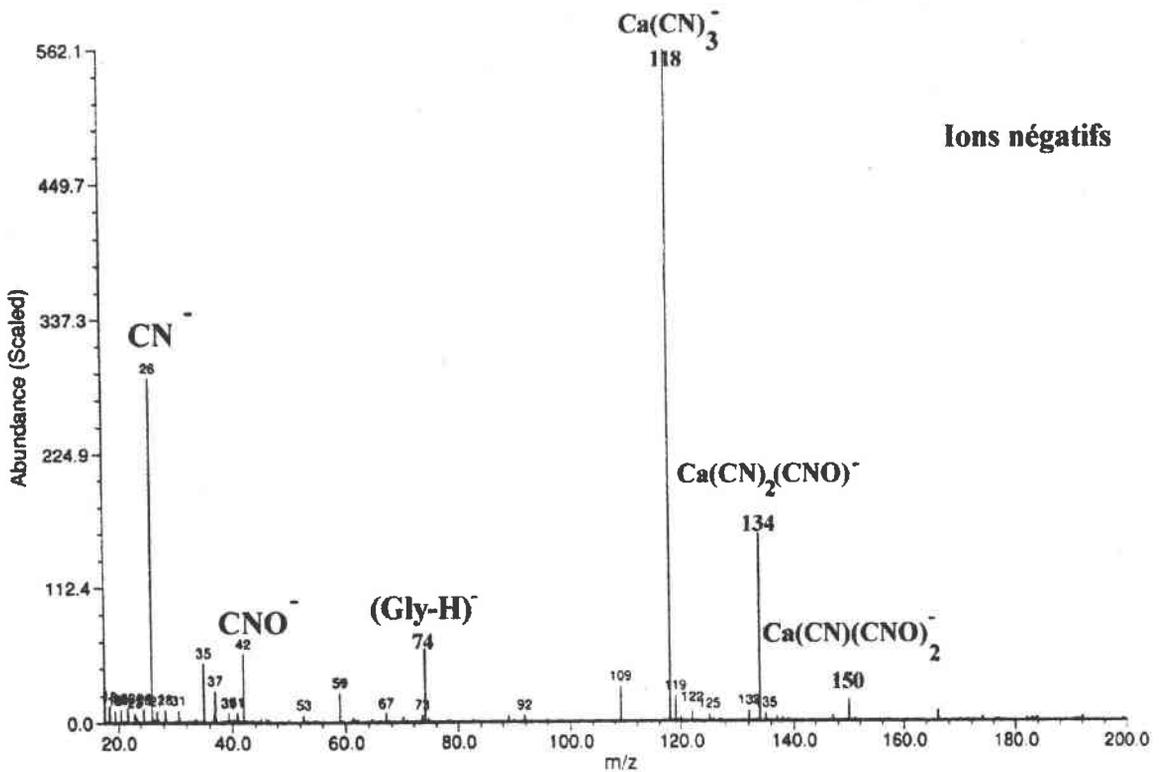


Figure 13 : spectre FTMS en ions négatifs d'un mélange de glycine et de Ca(OH)₂. $\lambda = 266 \text{ nm}$, $I_r = 5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$.

Nous remarquons cependant que, pour la même irradiance, l’empreinte de cet amas de pics est différent de celle en forme de « parapluie » observée sur le cheveu. Nous pouvons l’expliquer par une production de l’anion CNO⁻ plus faible dans le cas de notre mélange. La glycine ne réagissant pas exactement de la même manière qu’un polypeptide.

Cette variation de l’empreinte est aussi observée sur le cheveu lorsqu’on fait varier l’irradiance (voir figure 19 chp. II.). Elle s’accompagne d’une modification du rapport [CN⁻]/[CNO⁻], qui augmente avec l’énergie déposée sur l’échantillon. C’est une conséquence logique d’une fragmentation plus importante des gros agrégats, due à un excès d’énergie interne et aux nombreuses collisions à plus forte irradiance.

Ces analyses montrent que, sous certaines conditions, le seuil de détection d'un élément peut être diminué en observant un de ses agrégats. Nous pouvons donner comme explications à ce phénomène :

- une plus grande stabilité de l'agrégat ;
- des concentrations dans le plasma en ions CN^- et CNO^- qui restent importantes par rapport au calcium qui est éliminé par le lavage.

Nous avons également montré, en dopant un cheveu avec du carbonate de baryum, le remplacement du cation Ca^{2+} par Ba^{2+} (figure 24) dans les agrégats ionisés ($m/z = 118, 134, 150$ et 166) avec l'apparition des ions négatifs $m/z = 216, 232, 248$ et 264 . Le baryum se comporte exactement de la même manière que le calcium, en formant le même type d'ions positifs et négatifs.

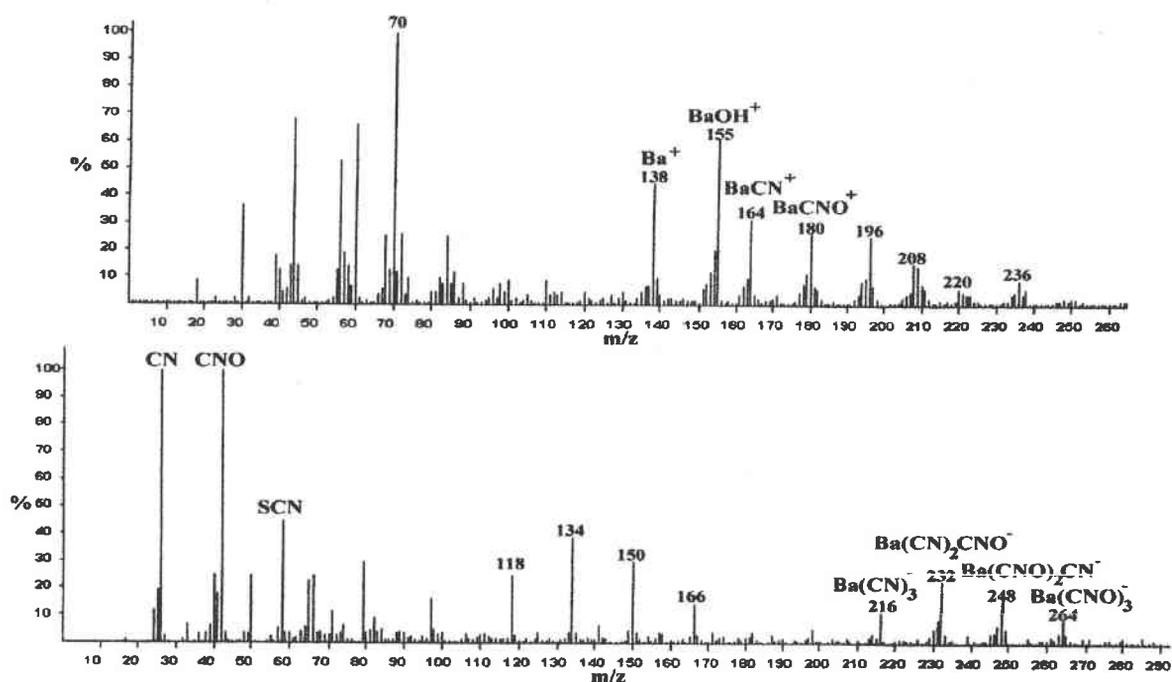


Figure 14 : spectres de masse LAMMA en ions positifs et négatifs d'un cheveu dopé avec du carbonate de baryum ($\lambda = 266 \text{ nm}$, $I_r = 5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$)

I.3. Conclusion

Ces expériences, nous ont permis d'observer le comportement dans le plasma de différents éléments formés lors de l'ablation laser d'un cheveu. Pour cela nous avons comparé les spectres de masse d'un cheveu lavé à ceux d'un cheveu dopé. Il a été alors possible d'associer avec certitude la présence de certains pics de masse à celle d'un élément. Le dopage s'est effectué dans des conditions « douces » afin de toujours détecter le pic de masse $m/z = 70$ en ions positifs, preuve de l'action de la matrice organique dans le plasma.

Elles ont souligné qu'il existe sur le spectre de masse des zones de détections favorisées, où peu de pics interfèrent avec le signal de l'élément recherché. C'est le cas par exemple pour l'aluminium et le plomb. De plus, la

caractérisation d'un élément est facilitée lorsqu'il possède des isotopes ou qu'il forme des agrégats.

L'analyse FTMS de l'aluminium indique que notre protocole de dopage ne provoque qu'une pollution de surface. En effet, le signal de l'aluminium disparaît au bout du troisième impact laser.

En ce qui concerne le comportement des éléments minéraux dans le plasma, nous observons trois comportements très différents :

- une détection facile, mais sans formation de clusters, comme pour l'aluminium (PI = 5,9 eV) ;
- l'agrégation avec des ions provenant de la matrice organique, comme pour le cuivre (PI = 7,7 eV) ;
- enfin une détection très difficile du fait d'un potentiel d'ionisation élevé, par exemple le zinc (PI = 9,3 eV).

Le composant anionique de l'élément dopant est généralement peu ou pas détectés, c'est le cas par exemple des nitrates. Leur fixation à la surface du cheveu doit être défavorisée par sa charge globalement négative. Les anions sont donc éliminés plus efficacement lors du rinçage. En revanche, quand il subsiste, le chlore entre en compétition avec les ions organiques de la matrice du cheveu pour former des agrégats.

Grâce à la résolution de la microsonde laser FTMS et à la calibration des spectres de masse sur des agrégats connus, nous avons pu lever une indétermination sur la série d'ions négatifs $m/z = 118, 134, 150$ et 166 . Cette famille de pics correspond à $[\text{Ca}(\text{CN})_3]^-$, $[\text{Ca}(\text{CN})(\text{CNO})]^-$, $[\text{Ca}(\text{CN})(\text{CNO})_2]^-$ et $[\text{Ca}(\text{CNO})_3]^-$. Leur formation a été reproduite par impact laser sur deux composés simples mélangés : la glycine et le $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

Nous avons mis en évidence la formation d'agrégats d'ions stables entre les cations minéraux et les anions organiques majoritaires (CN^- et CNO^-). Leur structure est fonction du degré d'oxydation du métal. Nous observons ainsi en ions positifs et négatifs des clusters de types (avec C = Cation et A = Anion CN^- et ou CNO^-) :

- $[\text{C}_2.\text{A}]^+$ pour un cation monovalent (ex : $2\text{K}^+ + \text{CNO}^- \rightarrow [\text{K}_2(\text{CNO})]^+$) ;
- $[\text{C}.\text{A}]^+$ pour un cation divalent (ex : $\text{Ca}^{2+} + \text{CN}^- \rightarrow [\text{Ca}(\text{CN})]^+$) ;
- $[\text{C}.\text{A}_2]^-$ pour un cation monovalent (ex : $\text{Na}^+ + (\text{CN})_2^- \rightarrow [\text{Na}(\text{CN})_2]^-$) ;
- $[\text{C}.\text{A}_3]^-$ pour un cation divalent (ex : $\text{Ba}^{2+} + (\text{CN})_2^- + \text{CNO}^- \rightarrow [\text{Ba}(\text{CN})_2(\text{CNO})]^-$).

De plus, des résultats qui n'ont pas été présentés ici, indiquent l'apparition dans des conditions de très forte pollution en calcium des séries d'ions de type $[\text{C}_2.\text{A}_3]^+$ et $[\text{C}_2.\text{A}_5]^-$.

La réactivité dans le plasma des alcalino-terreux (calcium et baryum) est donc différente de celle des alcalins (potassium et sodium). Des mélanges ont été effectués (Na+Ca, Na+K, Ca+K et Na+Ca+K). Dans nos conditions expérimentales, ils n'ont pas mis en évidence de réactivité entre les différents cations.

II. Interprétation de l'empreinte « organique »

Après avoir analysé le comportement des éléments minéraux lors de l'ablation laser d'un cheveu, nous allons porter notre attention sur l'empreinte « organique ». Celle-ci est obtenue suite au protocole de nettoyage de la tige pileaire. Nous la nommons ainsi, car les pics liés aux agrégats minéraux sont absents sur les spectres de masse. Dans le premier chapitre, nous avons remarqué que la matrice protéique représentait environ 90 % de la masse du cheveu, elle devient donc la principale source d'ions.

C'est pourquoi, au cours de cette étude nous nous sommes intéressés aux acides aminés puis aux polypeptides. Nous augmentons ainsi progressivement la complexité de l'échantillon pour ce rapprocher de la composition du cheveu.

Les acides aminés et les polypeptides ont déjà donné lieu à de nombreux travaux par des techniques très variées : py-GC/MS [5], LMS (Laser Mass Spectrometry) [6-10], FD (Field Desorption) [11], SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry) [12], PDMS (Plasma Desorption Mass Spectrometry) [13, 14], ESI (Electrospray ionization) [15], FAB (Fast Atom Bombardment) [16, 17] et CID (Collision-Induced Dissociation) [18-21]. Ces expériences ont généralement pour but d'étudier la fragmentation des peptides et leurs enchaînements en acides aminés. C'est pourquoi, l'énergie transmise aux molécules est réduite, afin de ne pas trop les fragmenter et garder ainsi une information sur leur structure.

Nos conditions d'ablation directe de l'échantillon sont certainement assez éloignées de cet optimum. En effet, l'irradiance de $5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$ associée à une longueur d'onde inférieure à 355 nm sont des paramètres assez sévères pour l'analyse des composés biologiques. Il était donc intéressant d'observer leurs comportements avec un tel protocole d'analyse. Ceci afin de comprendre les mécanismes mis en jeu, lors de la formation des ions et des neutres par ablation laser du cheveu.

II.1. Les acides aminés

Notre étude a été effectuée par microsonde laser LAMMA et FTMS sur les 17 principaux acides aminés constitutifs de la kératine. Leur composition est rappelée dans le tableau 7. Plutôt que d'analyser la cystéine (Cys), nous avons choisi la cystine (notée Cys²), car c'est sous cette forme qu'elle est présente dans le cheveu. Les groupements thiol de deux Cys sont oxydés en un pont soufre pour relier des chaînes polypeptidiques adjacentes.

Tous ces composés ont été achetés chez SIGMA-ALDRICH S.a.r.l.. Pour effectuer les analyses par microsonde laser LAMMA, les poudres ont été fixées sur des grilles G 200 utilisées en microscopie électronique. Tandis que pour la FTMS, elles étaient immobilisées sur une bande adhésive.

L'objectif de ce travail est de caractériser les acides aminés dans nos conditions d'analyses, sans approfondir leurs mécanismes de fragmentations qui ont déjà donné lieu à de nombreuses publications. C'est pourquoi notre nomenclature se bornera à indiquer seulement le signe de la charge et non sa nature.

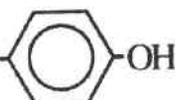
Acide aminé	Abréviation	aa-R	Masse (u.)
Glycine	Gly, G	aa-H	75
Alanine	Ala, A	aa-CH ₃	89
Valine	Val, V	aa-CH(CH ₃) ₂	117
Leucine	Leu, L	aa-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	131
Isoleucine	Ile, I	aa-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	131
Serine	Ser, S	aa-CH ₂ OH	105
Thréonine	Thr, T	aa-CH(OH)CH ₃	119
Méthionine	Met, M	aa-CH ₂ CH ₂ SCH ₃	149
Cystine	Cys ² , C ²	aa-CH ₂ S-SCH ₂ -aa	240
Acide glutamique	Glu, E	aa-CH ₂ CH ₂ COOH	147
Acide aspartique	Asp, D	aa-CH ₂ COOH	133
Lysine	Lys, K	aa-(CH ₂) ₄ -NH ₂	146
Arginine	Arg, R	aa-(CH ₂) ₃ -NHC(NH ₂)NH ₂	174
Proline	Pro, P		115
Phénylalanine	Phe, F	aa-CH ₂ - 	165
Tyrosine	Tyr, Y	aa-CH ₂ - 	181
Histidine	His, H	aa-CH ₂ - 	155

Tableau 7 : formules chimiques des principaux acides aminés présents dans le cheveu. aa = fonction acide aminé (H₂N-CH-COOH), R = chaîne latérale.

Les résultats obtenus pour les ions positifs et les ions négatifs sont résumés respectivement dans les tableaux 8 et 9. Nous n'y avons pas reporté la présence de sodium, de potassium et de chlore, observée sur la presque totalité des composés.

Dans nos conditions d'analyse, nous n'observons pas de pics de masse au-delà de $m/z = 300$. Les quelques ions de masse supérieure à celle de l'acide aminé de départ sont majoritairement dûs à des molécules cationisées $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M-H+2Na]^+$ ou à des agrégats multi-moléculaires comme $[M_2+H]^+$,

$[M_2-H]^-$. Pour illustrer ces observations, nous présentons figure 15 le spectre de masse FTMS de la sérine en ions positifs.

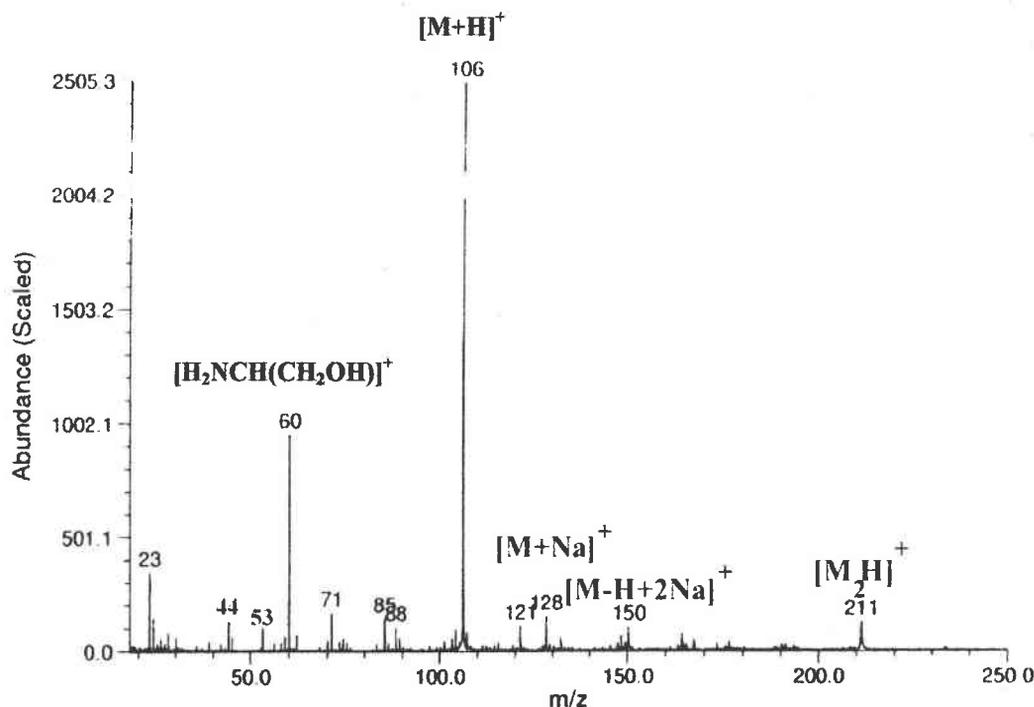


Figure 15 : spectre FTMS en ions positifs de la sérine. $I_r = 5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$. $M = \text{Ser}$.

II.1.1. Analyse des ions positifs

Le point commun de tous les acides aminés en ions positifs est la formation de leur ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$. Nous observons aussi leurs ions immonium (I) formés par la perte de leur fonction carboxylique à partir de la molécule protonée :



Le seul acide aminé qui déroge à cette règle est la lysine.

Après analyse du tableau 8, nous pouvons regrouper les acides aminés en six groupes :

- 1 : les acides aminés à chaîne latérale aliphatique (Gly, Ala, Val, Leu, Ile) qui présentent tous des ions $[I-H_2]^+$;
- 2 : l'ablation laser des acides aminés aromatiques (Phe, Tyr et His) forme des ions caractéristiques de leur chaîne latérale. Ces ions « benzyliques » correspondent à $m/z = 91$ (C_7H_7) pour le phénylalanine, 107 (C_7H_6OH) pour la tyrosine et 81 ($C_4H_5N_2$) pour l'histidine ;

Nom	MH	MH-NH ₃	MH-H ₂ O	I	MH - 63	MH - 64	I-H ₂	MH-CO ₂	Autres pics de masse (m/z)
Gly	<u>76</u>			30			28		179, 133, 58
Ala	<u>90</u>			44			42		235, 189, 156, 140, 98, 86, 63
Val	<u>118</u>			72			70	74	91, 70, 63, 44, 30
Leu	<u>132</u>			86			84		154, 98, 74
Ile	<u>132</u>			86			84		91, 74, 61
Phe	<u>166</u>			120					293, 220, 204 , 107, 91, 77
Tyr	<u>182</u>	165		<u>136</u>					163, 95, 83, 82, 81
His	<u>156</u>			<u>110</u>				112	
Pro	<u>116</u>			70			68	72	
Ser	106		88	<u>60</u>					211, 150, 128, 121, 85, 71, 53, 44
Thr	120		102	74		56			261, 239, 178, 164, 149, 142, 30
Asp	134		116	<u>88</u>		70			<u>156</u> , 44
Glu	148		130	<u>102</u>		84			
Cys ²	241			195					153, 152, 122, 121, 88, 76, 64, 44, 32
Met	150	133		104					194, 172, 131, 116, 83, 44, 32
Lys	147	130			84				<u>191</u> , <u>169</u> , 56, 30
Arg	175			129	112			131	197, 114, 70, 60, 30

Tableau 8 : principaux pics de masse des spectres FTMS et LAMMA d'acides aminés, en ions positifs ($\lambda = 266 \text{ nm}$ et $\text{Ir} = 5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$). Les masses indiquées en gras correspondent au pic majoritaire de chaque spectre. Les masses soulignées représentent les intensités relatives supérieures à 40 %. I = ion immonium.

- 3 : la structure cyclique de la proline produit un spectre de masse très simple, centré autour de son ion immonium intense (figure 16) ;

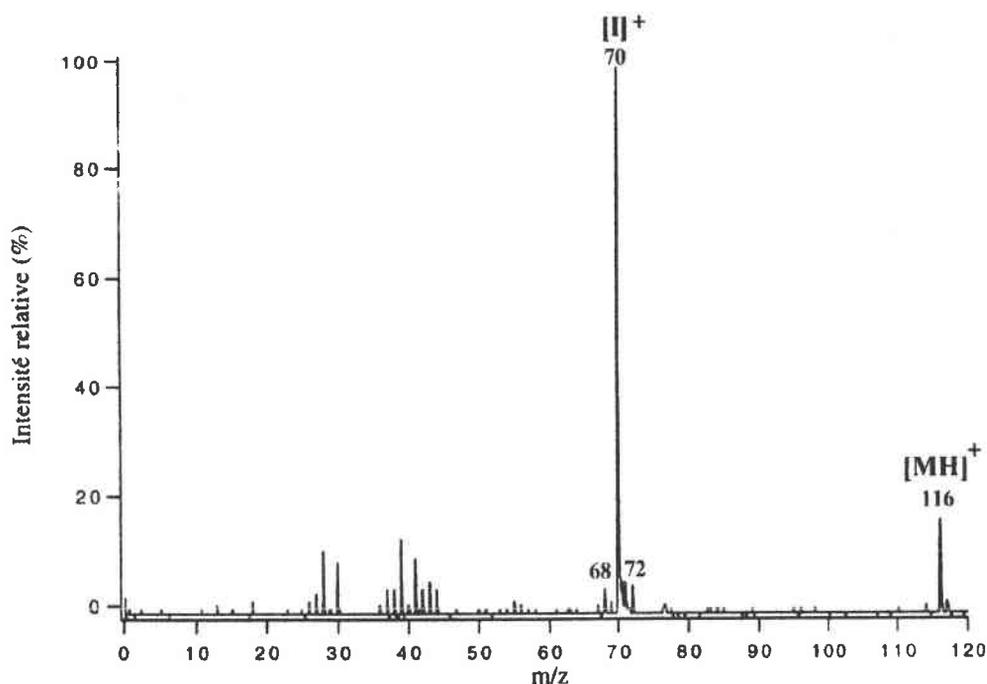


Figure 16 : spectre LAMMA en ions positifs de la proline. $\text{Ir} = 5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$ et $\lambda = 266 \text{ nm}$.

- 4 : la serine, la thréonine, l'acide aspartique et l'acide glutamique montrent une forte tendance à perdre une molécule d'eau. Cette perte est soulignée par la présence des ions $[MH-H_2O]^+$ et $[MH-64]^+$ qui peut correspondre à au moins deux types de fragmentations $[I - H_2O]$ ou à $[MH - H_2O - CH_2O_2]^+$;

- 5 : les spectres de masse des acides aminés soufrés (Met et Cys²) sont caractérisés par un pic de masse $m/z = 32$ (S) très intense. La cystine se scinde en deux et forme les ions caractéristiques de la cystéine : $m/z = 122$ (MH) et 76 (I) ;

- 6 : les deux acides aminés à chaîne latérale basique Arg et Lys forment l'espèce $[MH - 63]^+$ qui peut être associé à : $[MH-NH_3-H_2O-CO]$ et $[I-NH_3]^+$. Cette perte de la fonction amine est d'autant plus visible sur la lysine, qui forme l'ion $[MH-NH_3]^+$. Elle confirme la première hypothèse pour la formation de $[M-63]$ dans le cas de la Lys.

II.1.2. Analyse des ions négatifs

En ions négatifs, les spectres sont peu fournis en pics, et il ne se dégage pas de véritable mécanisme de fragmentation. Contrairement aux spectres de masse d'ions positifs, ils ne présentent pas d'ion équivalent à l'ion immonium. Le plus représentatif de l'acide aminé reste son ion pseudo-moléculaire $[M-H]^-$. Les autres pics détectés sont essentiellement les ions $m/z = 26$ (CN⁻), 42 (CNO⁻), 50 (C₃N⁻) : tableau 9.

Nom	M-H	M-COOH	M ₂ -H	Autres pics de masse (m/z)
Gly	<u>74</u>			50, 42, 26
Ala	<u>88</u>			42, 26
Val	<u>116</u>		233	147, 50, 26
Leu	<u>130</u>			65, 50, 26
Ile	130			50, 26
Pro	<u>114</u>			74, 60, 50, 42, 26
Phe	164			60, 26
Tyr	180			60, 50, 26
His	154		309	90, 77, 65, 50, <u>26</u>
Ser	<u>104</u>		209	42, 26
Thr	118	<u>74</u>		<u>26</u>
Cys ²	239			207, 152, <u>120</u> , <u>103</u> , 76, 64, <u>58</u> , 33, 26
Met	148			82, <u>58</u> , 50, 47, 33, 26
Lys	145			26
Arg	173			131, 66, 50, 26
Asp	132	88		71, 50, <u>26</u>
Glu	146	102		168, <u>128</u> , 42, <u>26</u>

Tableau 9 : principaux pics de masse des spectres FTMS et LAMMA d'acides aminés, en ions négatifs ($\lambda = 266$ nm et $Ir = 5 \cdot 10^8$ W/cm²). Les masses indiquées en gras correspondent au pic majoritaire de chaque spectre. les masses soulignées représentent les intensités relatives supérieures à 40 %.

Les acides aminés sulfurés (Cys² et Met) se distinguent quant à eux, par la présence des ions : $m/z = 33$ (SH⁻), 58 (SCN⁻) et 82 (SC₃N⁻). Ils confirment seulement la présence de soufre (figure 17).

Les acides aminés à chaîne latérale acide et la thréonine se différencient des autres par la formation d'un ion [M-COOH]⁻.

Les informations apportées par ces spectres de masse sont pauvres et il est peu probable, qu'elles nous soient utiles pour l'interprétation de composés plus complexes comme les polypeptides.

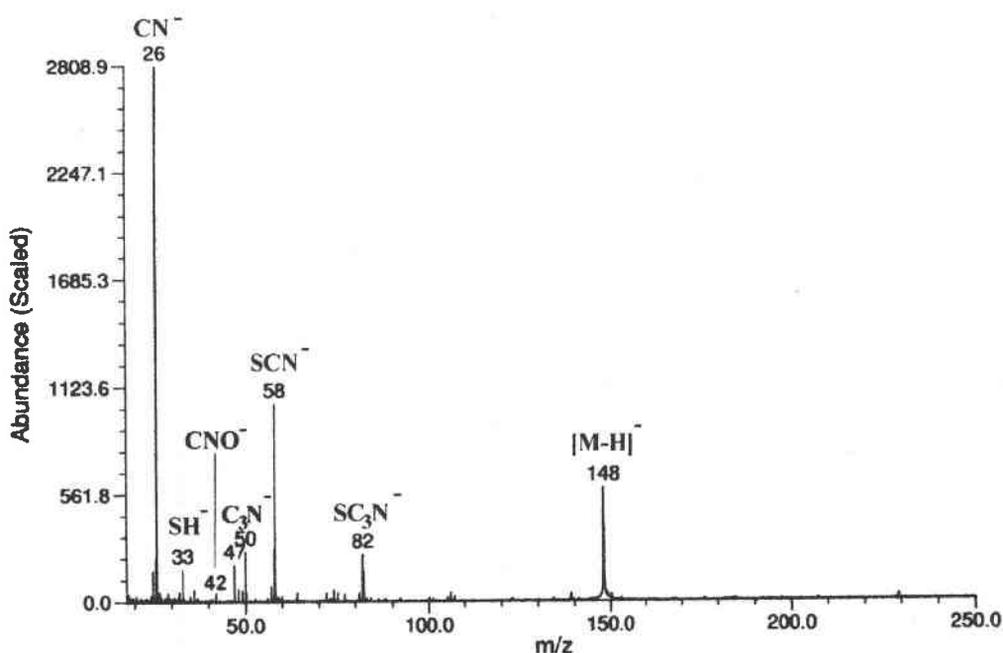


Figure 17 : spectre FTMS en ions négatifs de la méthionine. $I_r = 5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$

II.2. Les polypeptides

A l'occasion de cette étude, huit polypeptides différents ont été analysés : Angiotensine III¹, Substance P², Bradykinine³, Melittine⁴, Hydrapptide 7-11⁵, PolyLeu, Pro-Gly-Pro, Gly-Gly-Tyr-Arg (achetés chez SIGMA-ALDRICH S.a.r.l.).

A partir des résultats obtenus sur l'ablation des acides aminés (tableaux 8 et 9), nous avons recherché dans ces spectres de masse les ions caractéristiques de chaque acides aminés constitutifs du polypeptide. Les figures 18 et 19

¹ Angiotensine III : Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe.

² Substance P : Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂.

³ Bradykinine : Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg.

⁴ Melittine : NH₂-Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-CONH₂.

⁵ Hydrapptide 7-11 : Lys-Val-Ile-Leu-Phe.

présentent comme exemple, les résultats des analyses LAMMA de l'Angiotensine III en ions positifs et négatifs.

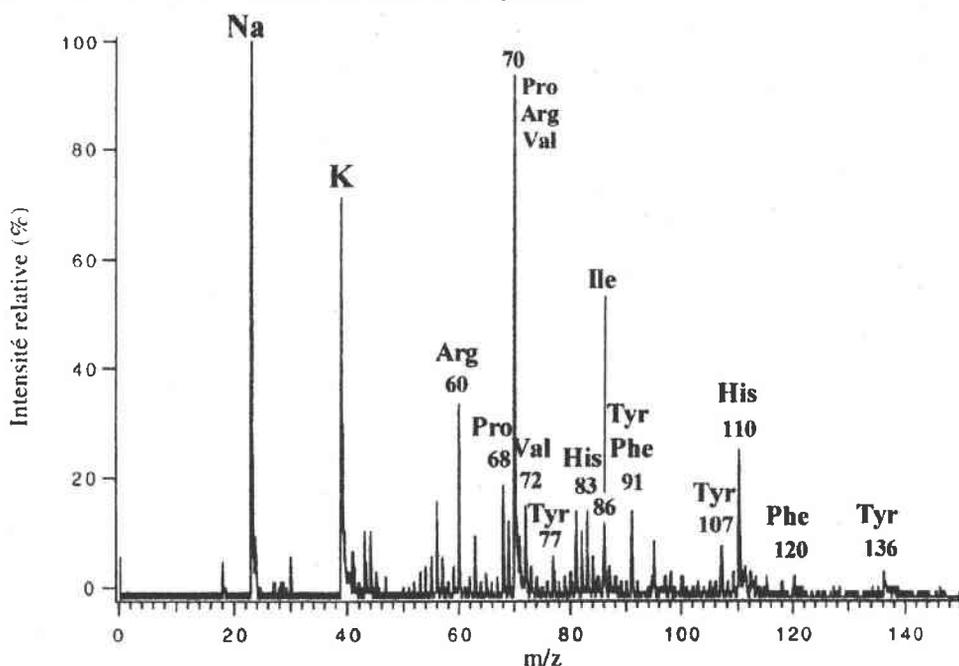


Figure 18 : spectre LAMMA en ions positifs de l'angiotensine III (Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe), $I_r = 5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$.

Comme nous nous y attendions, l'ablation laser des polypeptides dans nos conditions d'irradiance ($5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$) ne permet pas la détection du pic moléculaire, ni celle de fragments associant plusieurs acides aminés. Il n'est donc pas possible d'étudier la séquence peptidique.

L'étude des ions positifs (figure 18) de basses masses est un bon indicateur de la présence ou de l'absence de certains acides aminés dans un peptide. Cette caractérisation est essentiellement liée à la présence de leurs ions immoniums respectifs et à quelques autres pics de masse inférieure, rassemblés dans le tableau 10.

Ions (m/z)	Commentaires
68, 70	Si l'ion $m/z = 70$ est intense, c'est un bon indicateur de la présence de Pro.
60, 70, 112	L'Arg peut être présente dans la séquence peptidique.
56, 84	Intenses, ils donnent une bonne indication de la présence de Lys.
84, 86	Leu ou Ile sont peut-être présents.
81, 82, 83, 110	L'His est présente dans le polypeptide.
91, 120	Associés, ils indiquent la présence de Phe.
77, 91, 107, 136	La Tyr est présente dans la séquence peptidique.
60	S'il est intense et qu'il n'y a pas d'Arg, il peut indiquer la présence de Ser.

Tableau 10 : pics de masse permettant de diagnostiquer la présence de certains acides aminés dans un polypeptide (en gras pic le plus intense).

Cette analyse montre que les acides aminés comportant un cycle ou une chaîne latérale basique sont plus facilement détectés.

En ions négatifs (figure 19), comme le laissaient présumer les résultats obtenus, il n'est pas possible d'associer la présence d'un pic à un acide aminé. Tous les spectres de masse sont assez similaires à celui de l'Angiotensine III. Ils présentent les ions $m/z = 26$ (CN^-), 42 (CNO^-), 50 (C_3N^-), 74 (C_5N^-) et 98 (C_7N^-) observés sur la plupart des acides aminés.

Une des rares informations apportées est l'apparition d'un pic $m/z = 58$ (SCN^-), lorsqu'un acide aminé soufré est présent dans la séquence du peptide.

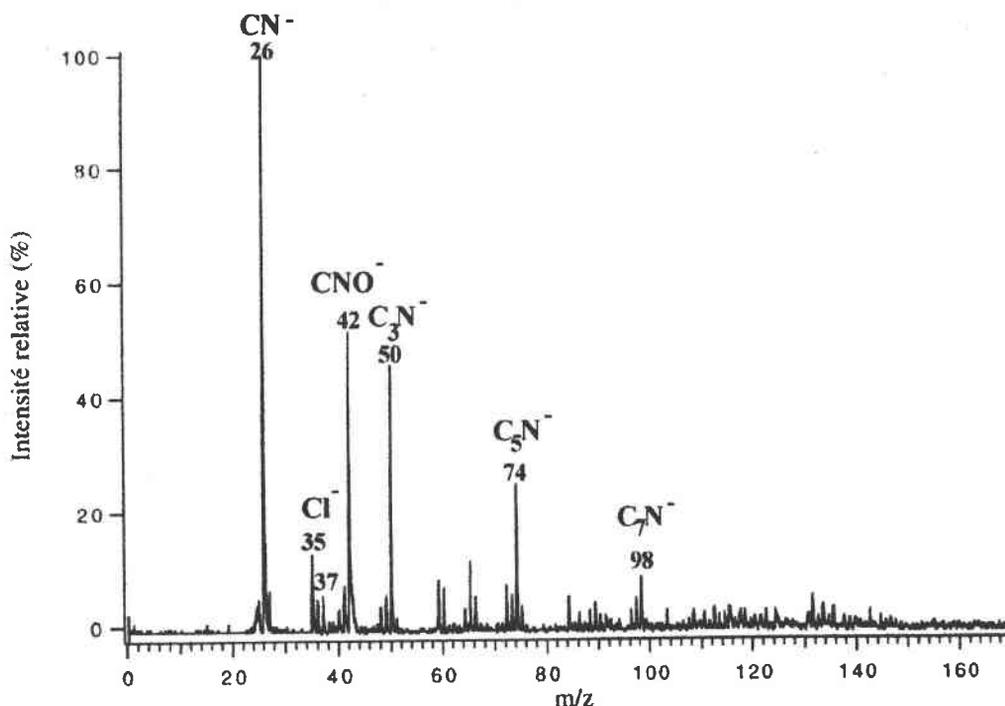


Figure 19 : spectre LAMMA en ions négatifs de l'angiotensin III (Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe), $I_r = 5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$.

II.3. Le cheveu

Pour bénéficier d'une meilleure résolution, l'étude de l'empreinte « organique » a été effectuée par microsonde laser FTMS sur des pastilles de poudre de cheveu. La résolution moyenne en routine est de 3 000 entre $m/z = 20$ et 200. Ce travail, s'est divisé en deux étapes :

- calibration du spectre de masse de poudre de cheveu « brut », à partir des agrégats minéraux caractérisés au début de ce chapitre et détermination de la composition élémentaire de certains pics liés à la matrice organique ;
- utilisation des ions organiques analysés précédemment, pour calibrer l'empreinte de poudre de cheveu ayant subi le protocole de nettoyage.

II.3.1. En ions positifs

Comme nous l'avons fait remarquer précédemment, le spectre de masse en ions positifs d'un cheveu est très sensible au protocole de nettoyage. Pour calibrer un spectre masse de l'empreinte « organique », il nous fallait préalablement déterminer avec précision la composition d'un certain nombre d'ions caractéristiques.

Pour cela, nous sommes partis de l'analyse de poudre de cheveu contenant du calcium et du plomb (figure 20). Les agrégats d'ions du calcium étant connus et le plomb facilement reconnaissable grâce à ses isotopes, nous avons pu calibrer avec précision le spectre. La calibration a été effectuée sur les pics de masse $m/z = 57$ (CaOH^+), 66 (CaCN^+) et 208 ($^{208}\text{Pb}^+$). Le résultat de cette calibration donne une erreur moyenne sur la masse de ces trois ions égale à $0,035$ ppm pour notre exemple. L'interprétation des pics qui a suivi, a été réalisée à l'aide d'un programme informatique (Odyssey version 3.1). Celui-ci a calculé à partir de la masse mesurée de l'ion, la composition élémentaire la plus proche (écart inférieur à 20 ppm). Pour cela, nous lui avons donné la possibilité d'utiliser les éléments suivant : 6 O, 12 C, 6 N, 20 H, 3 S, 3 P, 2 Ca, 2 K et 2 Na.

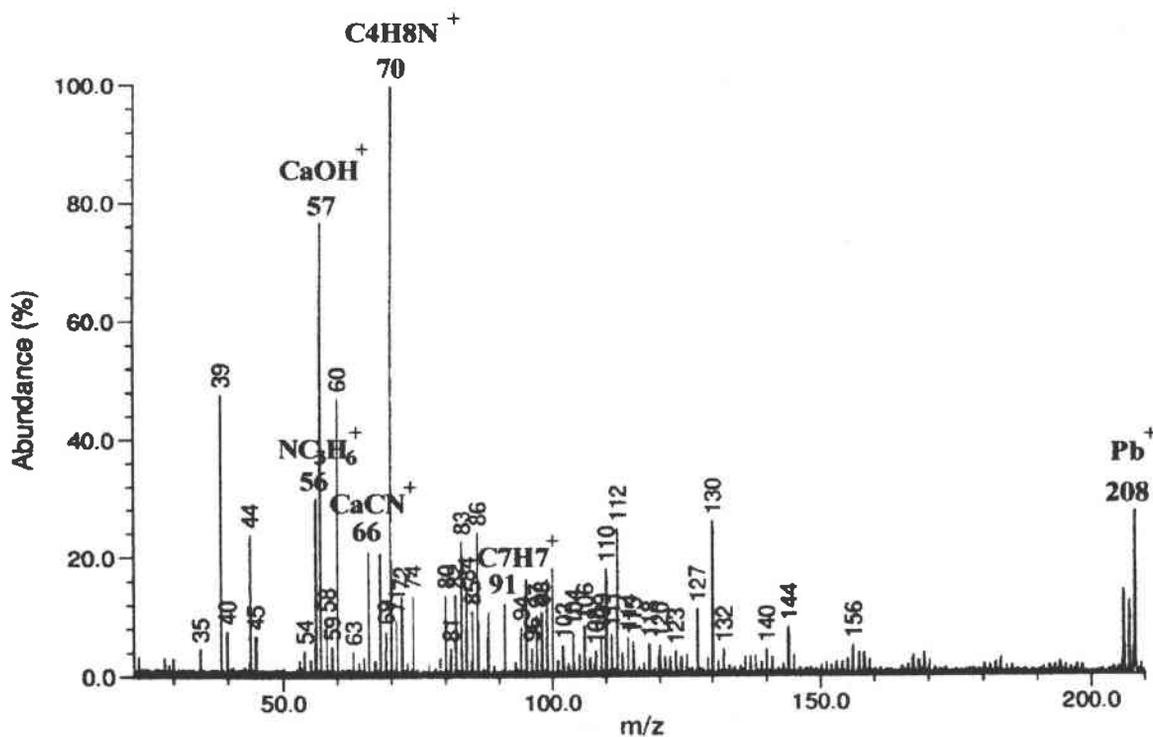


Figure 20 : spectre FTMS en ions positifs de poudre de cheveu contenant du plomb. 25 tirs laser cumulés, $I_r = 5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$, $\lambda = 266 \text{ nm}$, éjection de $m/z = 37$ à 43 .

Nous avons choisi trois pics de masse qui couvrent de façon homogène le spectre (tableau 11) :

Calculée m/z	Mesurée m/z	Erreur (ppm)	Ion positif proposé
56,049475	56,049502	0,490	C ₃ H ₆ N
70,065125	70,065036	-1,271	C ₄ H ₈ N
91,054226	91,054413	2,058	C ₇ H ₇

Tableau 11 : composition des ions positifs choisi pour calibrer les spectres de masse de l'empreinte « organique » du cheveu.

- m/z = 56 (C₃H₆N)⁺ car c'était le pic organique détecté de plus basse masse avec m/z = 44. Mais ce dernier pouvait être perturbé par l'éjection large bande effectuée pour éliminer l'excès de calcium et de potassium, aussi nous ne l'avons donc pas retenu ;

- m/z = 70 (C₄H₈N)⁺ parce qu'il est toujours le plus intense ;

- m/z = 91 (C₇H₇)⁺ car c'est un ion caractéristique des composés aromatiques, situé dans une zone du spectre assez pauvre en pics.

Calculée (m/z)	Mesurée (m/z)	Erreur (ppm)	Ions positifs proposés	Origines possibles
30,033825	30,033886	2,027	CH ₄ N	Gly
44,049475	44,049255	-4,993	C ₂ H ₆ N	Ala
56,049475	C		C ₃ H ₆ N	Thr, Lys
58,065125	58,064901	-3,851	C ₃ H ₈ N	
60,055623	60,055346	-4,608	CH ₆ N ₃	Arg
68,049475	68,049492	0,243	C ₄ H ₆ N	Pro
70,065125	C		C ₄ H ₈ N	Pro, Arg, Val, Leu
72,055623	72,054785	-11,633	C ₂ H ₆ N ₃	
72,080775	72,081721	13,124	C ₄ H ₁₀ N	Pro, Val
74,071273	74,071438	2,223	C ₂ H ₈ N ₃	
80,049475	80,049573	1,225	C ₅ H ₆ N	
83,060374	83,061308	11,244	C ₄ H ₇ N ₂	
84,080775	84,079915	-10,231	C ₅ H ₁₀ N	Leu, Lys
86,071273	86,071140	-1,549	C ₃ H ₈ N ₃	
86,096425	86,096980	6,442	C ₅ H ₁₂ N	Leu, Ile
91,054226	C		C ₇ H ₇	Phe, Tyr
95,060374	95,061105	7,686	C ₅ H ₇ N ₂	
96,080775	96,081499	7,532	C ₆ H ₁₀ N	
97,076024	97,075977	-0,489	C ₅ H ₉ N ₂	
100,086923	100,087783	8,595	C ₄ H ₁₀ N ₃	
106,065125	106,064049	-10,141	C ₇ H ₈ N	
110,071273	110,071595	2,931	C ₅ H ₈ N ₃	His
112,086923	112,086650	-2,436	C ₅ H ₁₀ N ₃	Arg
115,085246	115,084052	-10,372	C ₃ H ₉ N ₅	
120,080775	120,081298	4,356	C ₈ H ₁₀ N	Phe
130,065125	130,065083	-0,319	C ₉ H ₈ N	Tryptophane

Tableau 12 : compositions et origines possibles des ions positifs de l'empreinte « organique ». C : pic de calibration.

Comme l'indique le tableau 12 et la figure 22, certains ions peuvent être associés en raison de leur composition à un ou plusieurs acides aminés. Nous remarquons que toutes les compositions d'ions données sont du type $C_xH_yN_z$.

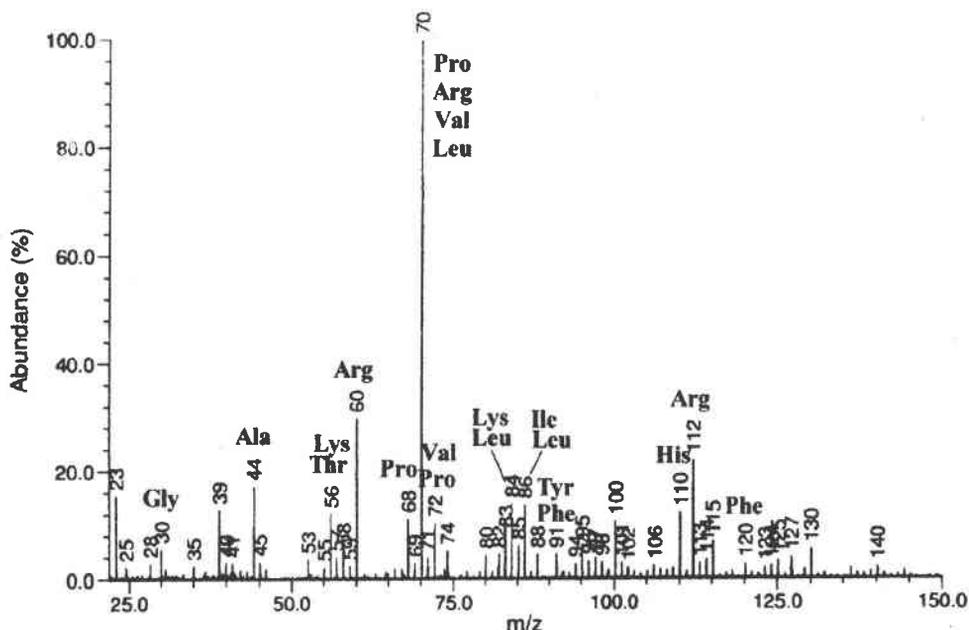


Figure 22 : spectre de masse FTMS de l'empreinte « organique » de poudre de cheveu. 25 tirs laser cumulés, $I_r = 5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$, $\lambda = 266 \text{ nm}$.

L'affinité des composés azotés pour les protons favorise certainement leurs détections en ions positifs. Cela rend plus difficile toutes associations aux acides aminés comportant sur leur chaîne latérale un hétéroatome (O, S). Celle faite dans le tableau 12 entre le pic $m/z = 56$ (C_3H_6N)⁺ et la thréonine est seulement une possibilité qui n'est pas confirmée par la présence de son ion immonium ($m/z = 74$ (C_3H_8NO)). Un tel ion peut être dû, au vu de la composition de la kératine à d'autres fragmentations d'acide aminé comme la lysine (figure 21).

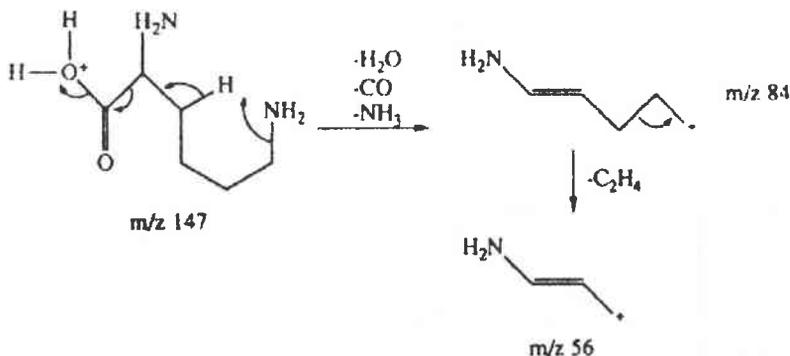


Figure 21 : fragmentation de l'ion $[Lys+H]^+$, [14].

Plusieurs pics de masse sont associés à plus d'un acide aminé. Il est parfois possible de confirmer la présence de l'un d'entre eux en se basant sur son intensité et sur la présence d'un autre fragment significatif. Prenons par exemple le cas de l'ion $m/z = 84$ ($C_5H_{10}N$)⁺ qui a pour origine possible la Lysine et la Leucine. Si nous nous référons au tableau 10, le fait qu'il soit aussi intense que le pic $m/z = 86$ ($C_5H_{12}N$)⁺ prouve qu'il n'est pas seulement lié à Leu. De plus, la présence de l'ion $m/z = 56$ (C_3H_6N)⁺ confirme qu'il est constitué en partie de Lys.

Le pic $m/z = 70$ (C_4H_8N)⁺ est le plus intense du spectre, c'est aussi celui qui a le plus grand nombre d'origines possibles (Val, Leu, Arg, Pro). Vu son intensité et la présence des ions $m/z = 68$, 112 et 60, nous pouvons penser qu'il est dû à l'arginine et surtout à la proline (voir tableau 10). Cet aspect sera détaillé un peu plus loin dans le chapitre.

L'ion $m/z = 130$ (C_9H_8N)⁺ pourrait provenir de la présence de groupement indole dû par exemple au tryptophane, qui formerait l'ion quinolinium. Il faut cependant remarquer que cet acide aminé est d'après la littérature pas ou très peu présent dans la kératine.

II.3.2. En ions négatifs

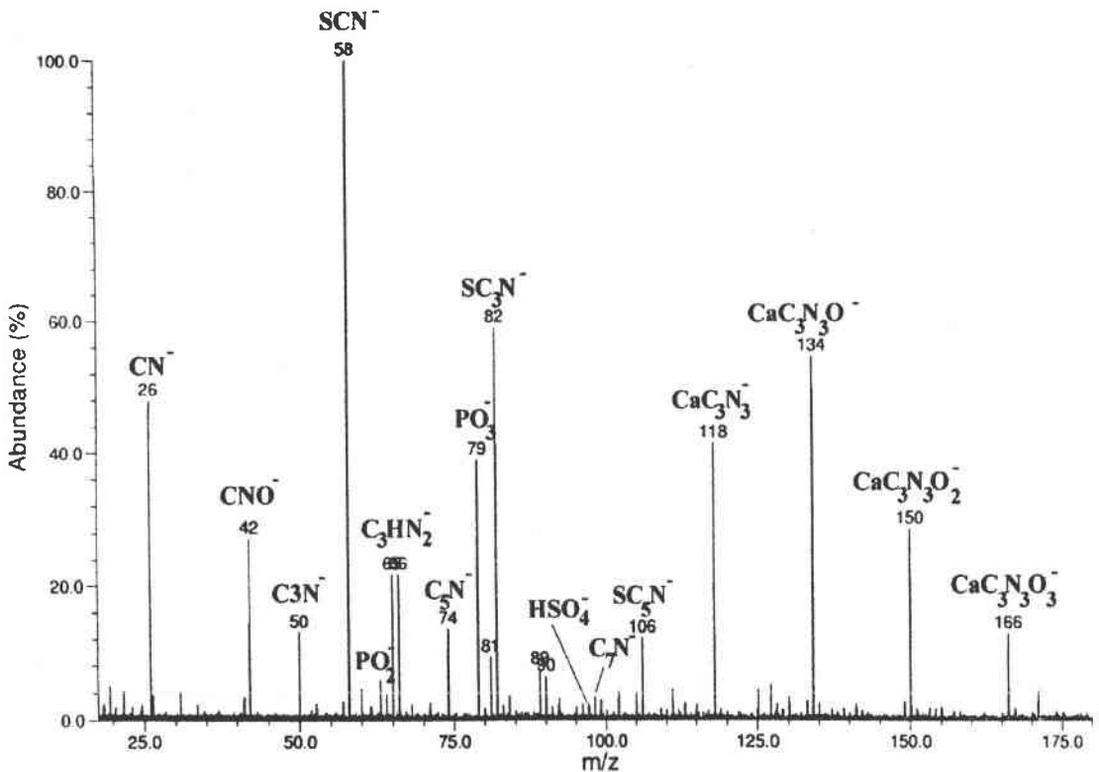


Figure 23 : spectre FTMS en ions négatifs de poudre de cheveu lavée. $I_r = 5 \cdot 10^8$ W/cm², $\lambda = 266$ nm, éjection large bande de $m/z = 24$ à 44.

La calibration des spectres négatifs pose moins de problèmes, car nous possédons déjà des points de repère. En effet, nous connaissons la composition de certains ions $m/z = 26$ (CN^-), 42 (CNO^-), 58 (SCN^-), 117 ($\text{Ca}(\text{CN})_3^-$), 134 ($\text{Ca}(\text{CN})_2\text{CNO}^-$), 150 ($\text{CaCN}(\text{CNO})_2^-$) et 166 ($\text{Ca}(\text{CNO})_3^-$) (figure 23). Nous remarquons cependant, que les agrégats liés au calcium sont beaucoup moins intenses après le protocole de nettoyage effectué sur la poudre de cheveu (l'intensité de $m/z = 82$ est supérieure à $m/z = 134$). Cette plus grande efficacité du lavage s'explique par la taille des fragments de tige pileaire (inférieur à $80 \mu\text{m}$). Elle augmente la surface de contact et donc l'extraction par l'eau bidistillée des éléments minéraux.

La calibration des spectres FTMS en ions négatifs a été faite à partir de trois pics $m/z = 26$, 58 et 118 . L'erreur moyenne sur leur masse est de $0,760$ ppm dans notre exemple. Le tableau 13 présente la composition des ions obtenue à l'aide d'un programme informatique (atomes sélectionnés pour le calcul : 6 O , 12 C , 6 N , 20 H , 3 S , 3 P , 2 Ca).

Calculée (m/z)	Mesurée (m/z)	Erreur (ppm)	Ions négatifs proposés
26,003623	C		CN
32,980444	32,980484	1,226	SH
41,998538	41,998426	-2,663	CNO
50,003623	50,003528	-1,897	C_3N
56,980444	56,980230	-3,761	SC_2H
57,975663	C		SCN
60,000549	60,000090	-7,655	C_5
62,964141	62,964031	-1,740	PO_2
65,014522	65,014441	-1,249	C_3HN_2
65,998538	65,999089	8,353	C_3NO
74,003623	74,003527	-1,293	C_5N
78,959056	78,959058	0,025	PO_3
79,957364	79,957718	4,432	SO_3
	80,978398		
81,975693	81,975450	-2,967	SC_3N
	89,025640		
	90,007093		
96,960104	96,960542	4,515	HSO_4
98,003623	98,003681	0,589	C_7N
105,975693	105,976385	6,526	SC5N
117,972362	C		CaC_3N_3

Tableau 13 : composition et origine possibles des ions négatifs de l'empreinte "organique". C : pic de calibration.

L'analyse des ions négatifs permet d'observer des pics de masse liés à la série C_xN ($x = 1, 3, 5$ et 7). Celle-ci joue un rôle important sur la formation des ions en réagissant avec l'oxygène et le soufre (C_xNO et C_xNS).

Le spectre négatif semble être constitué d'agrégats d'ions plutôt que de fragments de la matrice protéique. La matière est trop fragmentée, ce qui explique la pauvreté des informations apportées.

Nous pouvons juste confirmer la présence de soufre et de phosphates (PO_2 , PO_3) dans la matrice du cheveu.

II.4. Les neutres

Les espèces neutres formées lors de l'ablation laser sont majoritaires dans le plasma, mais les microsondes laser habituelles ne permettent pas leur analyse, car elles détectent seulement les ions. Suite à plusieurs travaux [5 et 22], un nouveau couplage d'ablation laser associé à un spectromètre de masse, a été développé au laboratoire pour les étudier. Ce système breveté donnera lieu à la thèse de B. Courrier en l'an 2000.

II.4.1. Description du montage

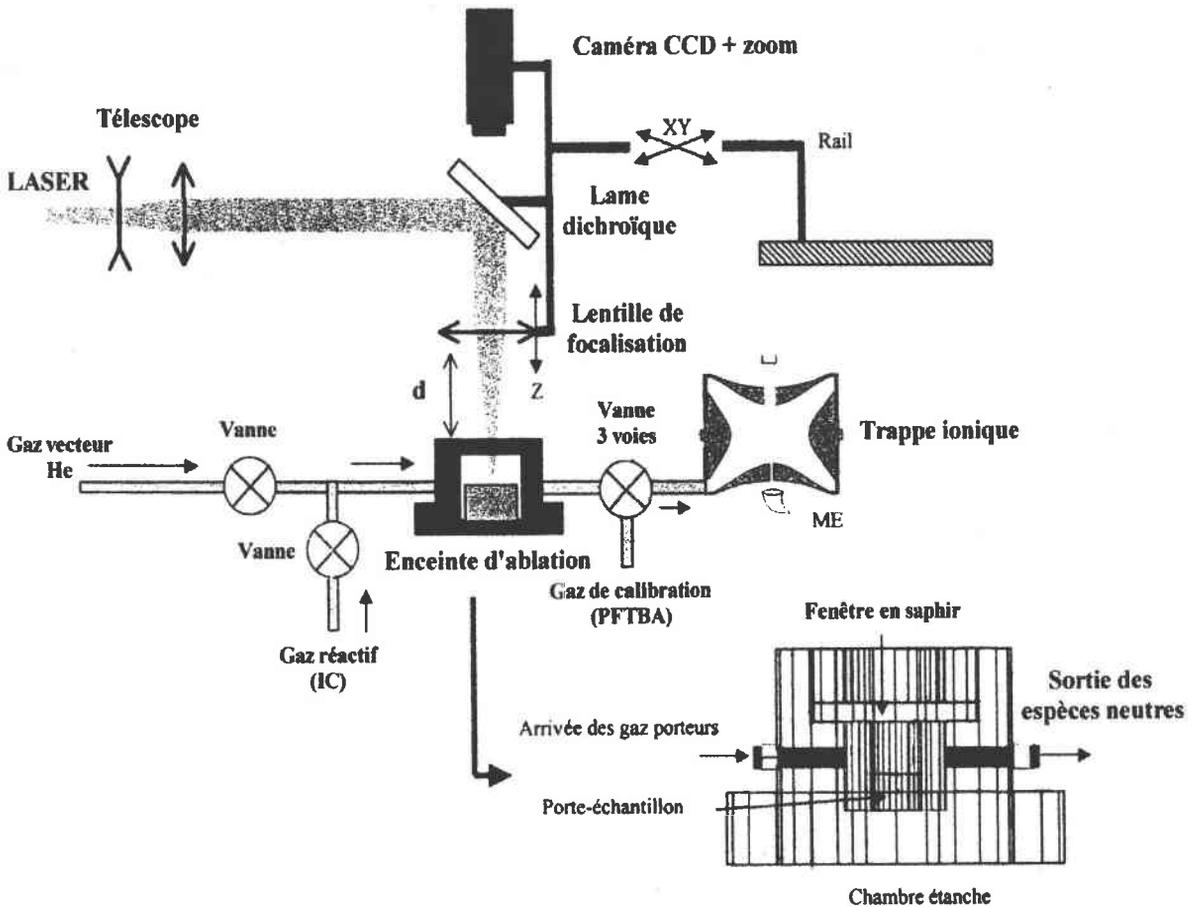


Figure 24 : schéma du couplage d'ablation laser – trappe ionique.

L'échantillon est placé dans une enceinte d'ablation balayée par un flux d'hélium (1,5 ml/min). Les espèces formées par tir laser sont entraînées vers une

trappe ionique (Saturn 4D de chez Varian), où elles sont ionisées par impact électronique et ensuite détectées (figure 24).

Un système optique constitué d'un télescope et d'une lentille de focalisation, permet de faire varier l'irradiance déposée, tandis que des platines micrométriques motorisées bougent l'ensemble lame dichroïque et lentilles. De cette manière le faisceau laser est déplacé sur la cible, qu'il frappe de façon normale comme en FTMS. Une caméra CCD avec zoom rend possible la visualisation de l'impact laser. Des vannes permettent le contrôle des débits et l'entrée des gaz : de balayage (He), réactif (acétonitrile pour l'ionisation chimique) et de calibration (PFTBA : perfluorotributylamine).

Nous avons voulu observer à l'aide de ce système les espèces neutres formées lors de l'ablation laser d'une pastille de cheveu « brut ». La figure 25 présente le courant d'ions total recueilli en impact électronique (70 eV), après 1 et 9 impacts laser à 1 Hz. Elle met en évidence un phénomène de traîne due au trajet des neutres poussés par le gaz jusqu'à la trappe ionique.

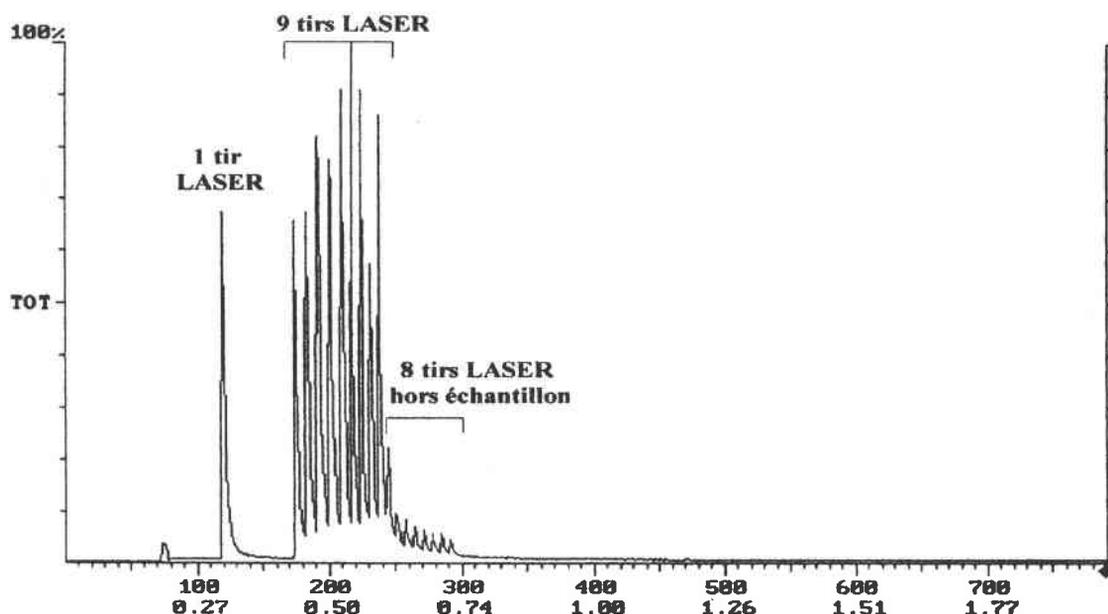


Figure 25 : courant d'ion total piégé dans la trappe ionique pendant une série de tirs LASER (1 Hz) sur une pastille de cheveu ($I_r = 5 \cdot 10^9 \text{ W/cm}^2$, $\lambda = 266 \text{ nm}$).

II.4.2. Analyse d'une pastille de cheveu

En ionisant directement les espèces formées par impact électronique (70 eV), le spectre de masse est dense et les ions de petites masses, ce qui prouve que la fragmentation est importante (figure 26). Cette empreinte se rapproche plus de celle observée en FTMS, pour une irradiance de 10^{10} W/cm^2 . Si les agrégats neutres liés aux composés minéraux (Ca, K, Na) sont produits dans ces conditions expérimentales, ils ne sont pas détectés. Cela est peut être dû :

- à l'énergie importante des électrons qui cassent ces espèces et neutralisent en même temps les ions positifs minéraux formés. Ces derniers

retournent ainsi à leur état d'énergie le plus stable (remarque : les ions négatifs ne peuvent pas être détectés avec cet appareil) ;

- à leur déposition sur les parois du montage au cours du trajet.

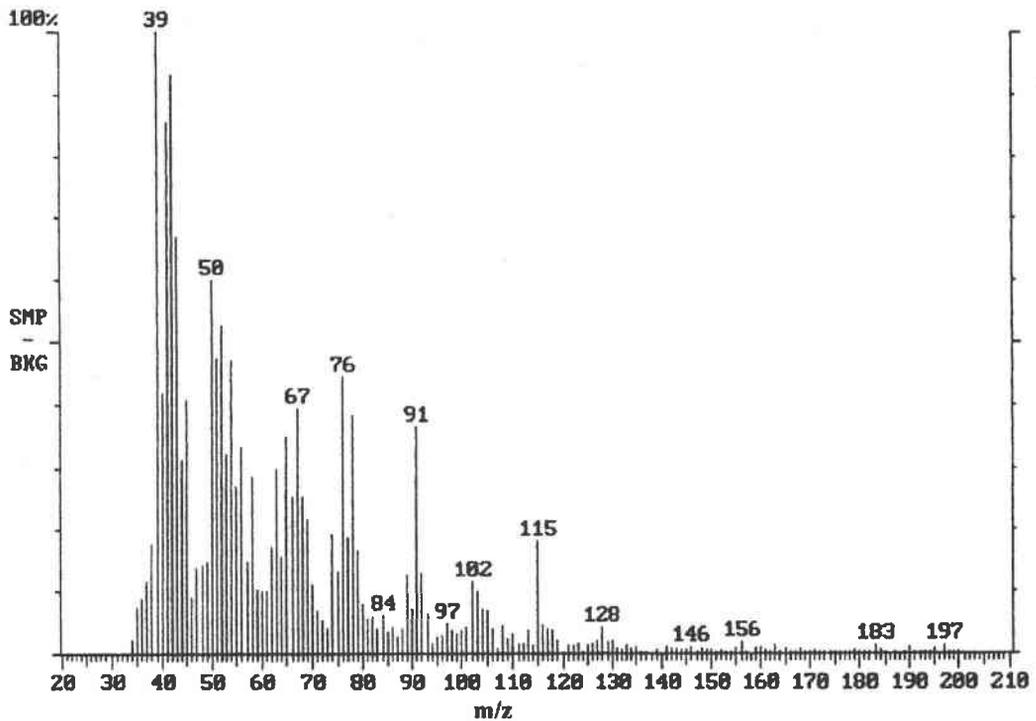


Figure 26 : spectre de masse par trappe ionique des espèces formées lors de l'ablation laser d'une pastille de cheveu. $I_r = 5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$, $\lambda = 266 \text{ nm}$ et ionisation par impact électronique (70eV).

C'est pourquoi nous avons effectué la même expérience en ionisation chimique. Cette technique consiste à introduire un gaz réactif en excès dans la trappe ionique. Il va subir le choc de l'impact électronique et former des espèces chargées. Celles-ci vont réagir avec les espèces neutres que l'on veut analyser, en échangeant généralement un proton par différence d'affinité. Cette ionisation est dite « douce », elle conduit à la détection des ions pseudo-moléculaires $[M+H]^+$.

Pour des raisons pratiques, notre choix s'est porté sur l'acétonitrile (CH_3CN) qui forme les espèces réactives $m/z = 40$ (CH_2CN^+), 42 (CH_4CN^+) et 54 ($\text{C}_3\text{H}_4\text{N}^+$) [23]. Pour la réaction d'ionisation, seule l'espèce 42 était piégée afin d'avoir uniquement une capture de proton par nos neutres.

Le résultat de l'ablation laser d'une pastille de cheveu « brut », suivi d'une ionisation chimique des neutres formés, est présenté figure 27. Nous retrouvons l'empreinte caractéristique d'un cheveu lavé analysé par microsondes laser LAMMA et FTMS, avec le pic $m/z = 70$ majoritaire.

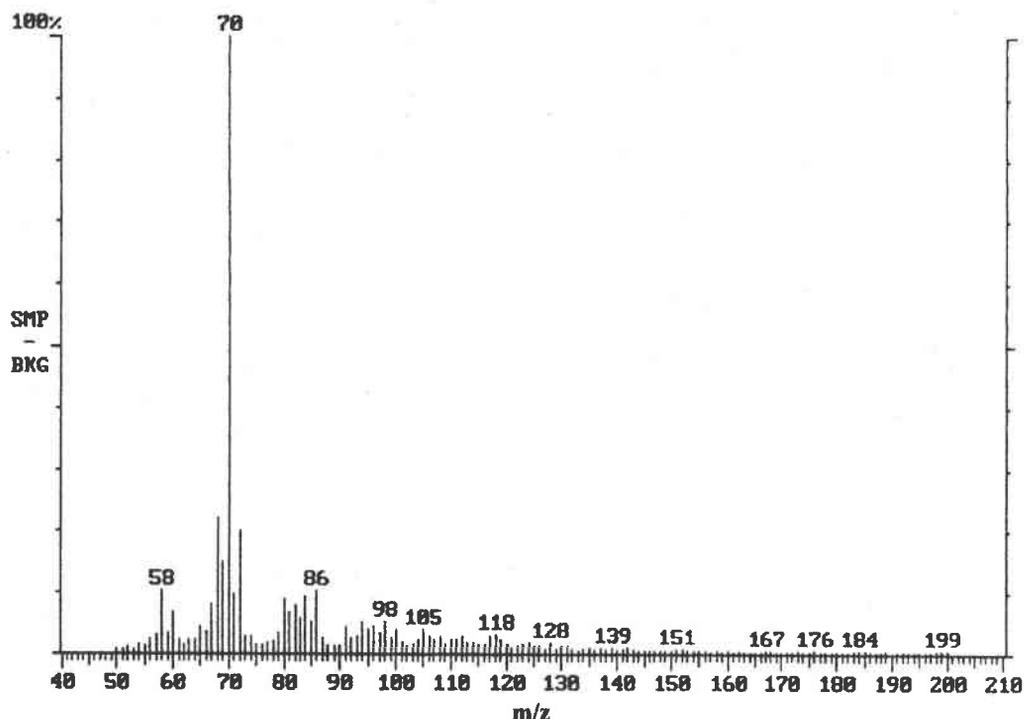


Figure 27 : spectre de masse par trappe ionique des espèces formées lors de l'ablation laser d'une pastille de cheveu. $I_r = 5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$, $\lambda = 266 \text{ nm}$, ionisation chimique par l'acétonitrile et détection des ions à partir de la masse $m/z = 50$.

La première remarque que nous pouvons faire, est l'absence des ions caractéristiques des agrégats minéraux. Leurs neutres semblent peu enclins à se protoner (faible affinité protonique) ou peut être n'arrivent-ils pas jusqu'à la trappe à ions. Cette technique peut donc s'avérer intéressante pour étudier directement des composés organiques mélangés à une matrice minérale.

Cette expérience souligne de nouveau la prépondérance du pic $m/z = 70$ dans le spectre de masse des cheveux. Il est ici formé à partir d'un neutre de masse 69 u. qui capte un proton, sa formule ($\text{C}_4\text{H}_7\text{N}$) peut être déduite des analyses FTMS.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'ion de masse $m/z = 70$ peut avoir quatre origines : Pro, Arg, Leu, Val. Les observations faites lors de l'ablation des polypeptides indiquent que l'intensité de cet ion est essentiellement liée à la présence d'arginine (figure 28) et surtout de la proline (voir tableau 10). Ils représentent environ 14 % en masse de la kératine du cheveu, ce qui n'est pas suffisant pour expliquer une telle prépondérance. Celle-ci est certainement due à un ensemble de phénomène :

- stabilité de l'ion ;
- forte affinité protonique du neutre à cause du doublet libre de l'azote et de la double liaison qui lui est accolée dans le cycle, hypothèse vérifiée par l'expérience d'ionisation chimique ;

- des travaux montrent de plus [15] que la rupture de la liaison amide liée à la proline est souvent dominante lors de la fragmentation d'un polypeptide ;
- la structure de la proline n'est pas compatible avec la formation de la structure hélicoïdale α des kératines. En effet, son atome d'azote fait partie d'un noyau rigide qui empêche toute rotation de la liaison N-C et ne permet pas la formation de liaison hydrogène intra-chaîne. Ce qui en fait très certainement un maillon faible de la structure protéique.

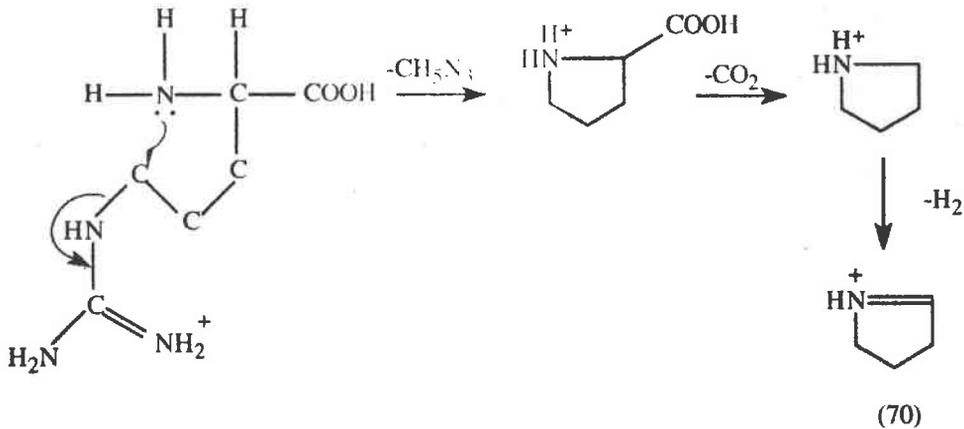


Figure 28 : formation de l'ion immonium de la proline à partir de l'arginine.

II.5. Conclusion

Les expériences faites sur les acides aminés et les peptides nous ont permis de mieux comprendre les phénomènes mis en jeu lors de l'ablation laser du cheveu.

Grâce à la résolution de la microsonde laser FTMS et à la calibration des spectres à partir d'ions connus, nous avons pu déterminer la composition élémentaire de tous les principaux pics de masse de l'empreinte « organique » du cheveu.

Dans nos conditions d'irradiance ($5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$), la kératine du cheveu est fragmentée en ions de petites masses. En ions positifs, ils peuvent être associés à la présence de certains acides aminés (essentiellement ceux possédant une chaîne latérale basique ou comportant un cycle aromatique). L'analyse des spectres négatifs apporte peu d'information, si ce n'est la présence de soufre et de phosphore dans le cheveu. Les ions observés sont généralement des agrégats liés à l'espèce réactive CN^- .

L'analyse des neutres formés par le couplage d'ablation laser / trappe ionique développé au laboratoire, a confirmé la prépondérance de l'ion $m/z = 70$ ($C_4H_8N^+$). Il correspond très certainement à l'ion immonium de la proline qui peut être formé à partir de proline mais aussi de l'arginine.

Cette intensité s'explique certainement par la stabilité de l'ion formé mais aussi par une fragilité de la liaison amide lié à la proline due à la structure cyclique de l'acide aminé.

Références bibliographiques :

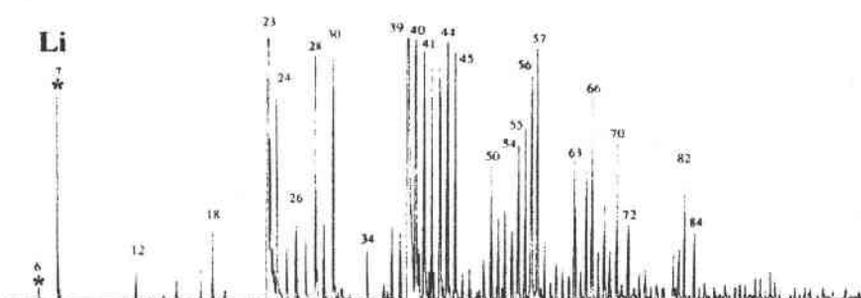
- [1] J.K. Gibson, *J. Appl. Phys*, **1995**, 78, 2, 1274.
- [2] A. Hachimi, thèse de chimie moléculaire, Metz, **1993**.
- [3] X.G. Zhang, H.Y. Li, C.S. Ma, X.Y. Wang, J.L. Bai, G.Z. He et N.Q. Lou, *Chem. Phys. Letters*, **1997**, 274, 115.
- [4] X.H. Liu, X.G. Zhang, Y. Li, X.Y. Wang et N.Q. Lou, *Chem. Phys. Letters*, **1998**, 288, 804.
- [5] S. Peter, thèse de chimie-physique, Metz, **1996**.
- [6] C.F. Schiller, diplom-physikerin, Frankfurt am Main, **1980**.
- [7] C.F. Schiller, K.D. Kupka et F. Hillenkamp, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **1981**, 308, 304.
- [8] M. Karas, D. Bachmann et F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, **1985**, 57, 2935.
- [9] C.D. Parker et D.M. Hercules, *Anal. Chem.*, **1985**, 57, 698.
- [10] S.T. Fountain et D.M. Lubman, *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 1257.
- [11] J.J. Zwinselman, N.M.M. Nibbering, J. van der Greef et M.C. Ten Noever de Brauw, *Orga. Mass Spectrom.*, **1983**, 18, 12, 525.
- [12] D.S. Mantus, B.D. Ratner, B.A. Carlson et J.F. Moulder, *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 1431.
- [13] B.T. Chait, W.C. Agosta et F.H. Field, *Inte. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, **1981**, 39, 339.
- [14] S. Bouchonnet, J.P. Denhez, Y. Hoppilliard et C. Mauriac, *Anal. Chem.*, **1992**, 64, 743.
- [15] J.A. Loo, C.G. Edmonds et R.D. Smith, *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 425.
- [16] R.B. Cole, S. LeMeillour, J.C. Tabet, *Anal. Chem.*, **1992**, 64, 365.
- [17] I.A. Papayannopoulos, *Mass Spectrom. Reviews*, **1995**, 14, 49.
- [18] R.S. Johnson et K. Biemann, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **1989**, 18, 945.
- [19] A.M. Falick, W.M. Hines, K.F. Medzihradzky, M.A. Baldwin et B.W. Gibson, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1993**, 4, 882.
- [20] K.M. Downard et K. Biemann, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1994**, 5, 966.
- [21] N.N. Dookeran, T. Yalcin et A.G. Harrison, *J. Mass Spectrom.*, **1996**, 31, 500.
- [22] A.El Ouachini, thèse de chimie physique, Metz, **1998**.
- [23] G. Moneti, G. Pieraccini, D. Favretto et P. Traldi, *J. Mass Spectrom.*, **1998**, 33, 1148.

Chapitre IV

Protocole d'analyse proposé pour les expertises de cheveux

Dès le milieu des années 80, il était apparu que par sa configuration, la microsonde LAMMA 500 était bien adaptée pour caractériser les cheveux. C'est à la suite de premiers essais et d'une première expertise, que les potentialités pressenties de cette technique se confirmaient. Ainsi, au cours de cette expertise, la présence de lithium (Li) dans des cheveux de « questions » retrouvés sur le lieu du délit, avait permis d'exclure leur appartenance à trois suspects. Les cheveux de ces derniers ne révélaient aucune trace de lithium. Des travaux complémentaires montrèrent que ces cheveux pouvaient provenir d'un individu traité avec des sels de lithium (par exemple le gluconate de lithium, médicament connu pour traiter les états dépressifs d'origine cyclothymiques : figure 1).

a)



b)

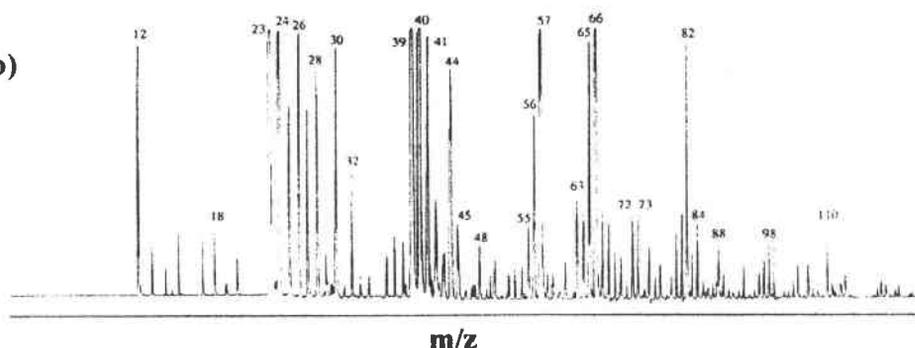


Figure 1 : spectres LAMMA en ions positifs d'un cheveu d'une personne traitée médicalement avec des sels de lithium (a) comparé à celui d'un individu standard (b).

Depuis, les connaissances acquises sur le cheveu ont beaucoup évolué, tant sur le comportement biologique (physiologie, morphologie, interaction avec

l'environnement...) que sur les espèces formées lors de l'ablation laser. Elles nous ont permis de développer un protocole d'expertise des cheveux, basé sur la confrontation des informations apportées par les analyses morphologiques et la spectrométrie de masse.

I. Les scellés

La première étape d'une expertise consiste à faire l'inventaire des scellés réceptionnés. Celui-ci peut paraître anodin, mais il conditionne grandement la validité et l'importance des résultats qui seront obtenus par la suite.

I.1. Le prélèvement

Il est effectué sur le lieu du délit ou à l'institut médico-légal pour les cheveux de « question », appelés ainsi car ils sont d'origines inconnues et prêtent donc à question. Les cheveux de « comparaison » sont quant à eux prélevés en un lieu qui permet de s'assurer de leur origine, généralement sur la tête des suspects ou des victimes, mais aussi sur un objet personnel (brosse à cheveux...) lorsque le corps n'a pas été retrouvé. Ce lieu de prélèvement est clairement indiqué sur les scellés.

Même si, comme nous l'avons vu, la conservation et le transport du cheveu ne posent pas de problèmes particuliers, le prélèvement doit éviter toutes contaminations extérieures. Il se fait avec des gants ou des outils propres. L'utilisation de bande adhésive est donc à proscrire. Le cheveu est ensuite conservé dans un milieu sec et sans poussières (enveloppe, sac ou boîte en plastique...).

I.2. Le contenu

Dans un premier temps, le contenu de chaque scellé est détaillé avec précision afin de s'assurer de la bonne correspondance avec les informations portées sur le procès-verbal. Puis, en fonction de ces dernières, l'exploitation optimale de notre protocole d'analyse est examinée. Pour cela, les échantillons doivent répondre à plusieurs critères :

- les cheveux de « comparaison » doivent être représentatifs de la chevelure de leur propriétaire : environ une cinquantaine de cheveux, prélevés à différents endroits du crâne et arrachés ou coupés à ras de la peau (la présence de la racine permet l'analyse de l'ADN) ;
- ne pas être contaminés lors du prélèvement et du stockage ;
- comprendre les cheveux de « question », ceux des suspects, mais aussi ceux des victimes.

Ces trois points seront discutés au fur et à mesure de ce chapitre.

Si l'un de ces critères n'est pas respecté, le juge d'instruction est contacté afin d'avoir si possible, un complément d'échantillon et ou d'information.

II. La morphologie

L'analyse morphologique effectuée a deux objectifs principaux :

- la caractérisation des cheveux à des fins discriminantes ;
- l'optimisation du travail, en réduisant le nombre d'échantillons à analyser par spectrométrie de masse. En effet, dans certaines affaires judiciaires le nombre de cheveux et de poils dépasse plusieurs centaines. L'analyse par microsonde laser LAMMA de l'ensemble des scellés rendrait alors le travail très long et coûteux.

II.1. Matériel utilisé

L'observation des cheveux et des poils est effectuée à l'aide de trois appareils différents :

- un binoculaire WILD M3Z (objectif x 1,5) avec éclairage annulaire. Il permet la comparaison des cheveux deux à deux sur fond clair.

- un microscope LEITZ Metallux 3 (objectif x 10 ou x 50) avec un éclairage en transmission (par en dessous) ou en réflexion (par au-dessus). Il est utilisé pour l'observation des écailles de la cuticule (figure 2) et de la médulla en mode transmission (figure 3).

- une caméra CCD SONY DXC 107 PAL couplée à une imprimante couleur SONY UR 3000P et à un moniteur couleur. Ils permettent l'acquisition de photographies pour les rapports d'expertises et la mesure de certains paramètres : diamètre de la tige pilaire, nombre d'écailles...



Figure 2 : photographie des écailles d'un cheveu en microscopie (x 850).



Figure 3: photographie du canal médullaire d'un poil en microscopie (x 850).

II.2. Le tri macroscopique

La première étape de l'analyse morphologique, consiste à observer à l'œil nu chacun des scellés contenant les cheveux de « comparaison » (suspects et victime). Il permet par un tri en fonction de la couleur, de la longueur et du diamètre, de définir un lot de plusieurs cheveux étalons caractéristiques de la chevelure d'un individu.

Pour être vraiment représentatif, ce travail nécessite un échantillonnage suffisamment important (supérieur à cinquante cheveux) et prélevé à différents endroits du crâne. En effet, il n'est pas rare de voir des personnes avec des mèches de couleurs différentes ou avec les tempes grisonnantes, qu'un prélèvement insuffisant ou localisé au même endroit pourrait occulter.

Ce tri macroscopique diminue le temps de travail de l'étape suivante en réduisant le nombre d'observations.

II.3. L'analyse microscopique

L'analyse microscopique consiste à observer méthodiquement l'ensemble des échantillons de « question » ainsi que les lots étalons des cheveux ou poils de « comparaison ». Pour cela l'échantillon est placé entre deux lames de verre avant d'être observé à l'aide d'un binoculaire, ou simplement déposé sur une lame pour microscope. La totalité des caractères étudiés sont indiqués dans le tableau 1.

Groupe	Caractère	Type	N°
A	Couleur ^a	Blanc	1
		Gris	2
		Doré	3
		Jaune	4
		Jaune Brun	5
		Brun	6
		Rouge	7
		Noir	8
B	Nombre de changements de couleur ^a	0	9
		1	10
		> 1	11
C	Densité de pigment ^b	Absente	12
		Légère	13
		Moyenne	14
		Forte	15
D	Distribution des pigments ^a	Uniforme	16
		Périphérique	17
		D'un coté	18
E	Traitement ^a	Non visible	19
		Coloration	20
		Décoloration	21
F	Médulla ^a	Absente	22
		Fragmentaire	23
		Continue	24
G	Diamètre maximum ^b	Fin (< 0,04 mm)	25
		Moyen (0,04 à 0,08 mm)	26
		Epais (> 0,008 mm)	27
H	Indice médullaire ^b	< 0,167	28
		0,167 à 0,250	29
		> 0,250	30
I	Tige ^c	Diamètre constant	31
		Diamètre variable	32
J	Longueur ^b	< 2,5 cm	33
		2,5 à 7,6 cm	34
		7,6 à 15,2 cm	35
		15,2 à 30,4 cm	36
		> 30,4 cm	37
K	Écailles de la cuticule ^c	Plates	38
		Légèrement dentelées	39
		Dentelées	40
L	Nombre d'écailles ^c	Serré (> 26 pour 0,2 mm)	41
		Moyen (22 à 26 pour 0,2 mm)	42
		Large (< 22 pour 0,2 mm)	43
M	Orientation des écailles ^c	Perpendiculaires	44
		Obliques	45

N	Racine^c	Présente	46
		Absente	47
O	Pointe^b	Coupée	48
		Arrondie	49
		Effilée	50
		Fourchue	51
P	Contour de la section^b	Rond	52
		Ovale	53
		En rein	54

Tableau 1 : tableau des caractères de comparaison des cheveux et des poils. a : caractère majeur, b : caractère mineur si les numéros du même groupe se suivent sinon majeur, c : caractère mineur.

Le principal objectif de cette analyse est de définir l'origine des échantillons de « question », qui peut être :

- synthétique : absence de racines et d'écailles, contours de la section particuliers... ;
- animale : indice médullaire supérieur à 0,3, aspect particulier du canal médullaire et des écailles, plusieurs changements de couleur... ;
- humaine.

L'interprétation de l'ensemble des caractères des cheveux ou des poils humains est alors affinée pour apporter des informations supplémentaires.

Nous déterminons ainsi, si l'échantillon est plutôt un poil ou un cheveu à l'aide par exemple du tableau 2.

	Diamètre (μm)	Longueur (cm)	Indice médullaire	Contour de la section
Poil du pubis	> 90	<10	> 0,2	En forme de rein variable
Cheveu	30-100	variable	0-0,2	
Duvet	< 40	< 2	0	

Tableau 2 : origine possible de la tige pileaire en fonction de certains caractères.

Il est aussi possible d'estimer si la personne qui a perdu le cheveu a été récemment chez le coiffeur. Pour cela, nous observons l'aspect de la pointe du cheveu qui présente une coupure nette, puis arrondie, et enfin effilée au fur et à mesure que le temps passe. De même, en mesurant la distance entre la racine (en phase anagène) et le début d'une coloration sur la tige pileaire (le cheveu pousse en moyenne de 1,2 cm par mois), il est possible de faire une estimation du temps qui s'est écoulé depuis le traitement.

L'aspect de la coiffure et le groupe racial peuvent être déterminés à partir de la forme de la section du cheveu (tableau 3)

Contour de la section	Coiffure	Groupe racial
Rond	Raide	Mongoloïde
Oval	Ondulée	Caucasien
En rein	Frisée	Negroïde

Tableau 3 : informations apportées par le contour de la section d’un cheveu.

L’analyse microscopique des écailles de la cuticule permet aussi la mise en évidence de pollution de surface : présence de sang ou de particules, d’un après-shampooing qui rend le contour des écailles moins net, de laque qui forme des gouttelettes translucides ou d’un shampooing colorant qui altère la structure du cheveu (figure 4). Ces informations s’avèrent importantes lors de l’analyse par spectrométrie de masse car elles peuvent expliquer l’apparition d’ions inhabituels.



Figure 4 : photographie d’un cheveu traité avec un shampooing colorant en microscopie (x 850).

Une fois que les échantillons sont caractérisés, les cheveux sont comparés deux à deux, par analyse de leur tableau de caractères (exemple tableau 4, cheveux 1 et 2 de « comparaison », cheveu 3 de « question »), mais aussi par une observation au binoculaire (figure 5).



Figure 5 : photographie au binoculaire (x 89) de deux cheveux mis côte à côte, de type mongoloïde (au dessus) et caucasien (en dessous).

Groupe	A	B	C	D	E	G	N	P
	Couleur	Changement de couleur	Densité de pigment	Distribution des pigments	Traitement	Diamètre maximum	Racine	Contour de la section
Cheveu 1	8	9	15	16	19	27	47	52
Cheveu 2	5	9	14	16	19	26	47	53
Cheveu 3	5	9	14	16	19	25	46	53

Tableau 4 : tableau de comparaison partiel des caractères de trois cheveux. En grisé les caractères majeurs.

La première étape de l'analyse du tableau 4 consiste à observer les caractères principaux ; dans notre exemple : A (couleur), B (nombre de changements de couleur), D (distribution des pigments) et E (traitement). Le cheveu 1 présente un de ces quatre caractères majeurs différents des deux autres cheveux : une couleur (A) noire. Le travail se poursuit pour les cheveux 2 et 3 par l'observation des autres caractères (C (densité de pigment), G (diamètre maximum), N (racine) et P (contour de la section)), leurs numéros sont similaires ou se suivent immédiatement. Ces caractères sont donc mineurs et ne permettent pas de différencier les deux cheveux.

Si nous affinons les résultats en observant les caractères dans leur ensemble, nous pouvons dire que le cheveu 1 présente les caractères d'une origine mongoloïde (section ronde (P), noir (A), épais (G)). Il se différencie clairement des deux autres cheveux qui sont plutôt de type caucasien (section ovale (P)). En première analyse, notre conclusion est que le lot de trois cheveux appartient à au moins deux individus, peut être d'origine ethnique différente. De plus nous ne pouvons pas exclure que le cheveu 2 de « comparaison » et le cheveu 3 de « question » proviennent d'une même personne.

Cette étude deux à deux des échantillons apporte deux sortes de résultats :

- soit aucun cheveu de « question » ne peut être associé de façon nette aux divers cheveux de « comparaison » d'un individu. Nous excluons alors, qu'ils aient une même origine. Le travail sur ces cheveux de « comparaison » s'arrête là.

- soit un cheveu de « question » est associé à au moins un des cheveux de « comparaison » d'un individu et nous ne pouvons pas exclure qu'ils appartiennent à une seule et même personne. Nous poursuivons donc l'analyse par microsonde laser LAMMA, avec en appui si nécessaire d'autres techniques telles que la pyrolyse GC/MS ou la spectroscopie U.V. en réflectance.

Nous procédons ainsi par exclusions successives, la spectrométrie de masse affine alors les résultats en augmentant le nombre et le type de caractères discriminants.

III. La spectrométrie de masse

Une fois le premier tri des échantillons effectué par analyse morphologique, seul les cheveux de « question » et les cheveux des individus qui ont pu être associés à au moins l'un d'entre eux, sont analysés par spectrométrie de masse.

Tous les cheveux de « question » ainsi que trois cheveux de chacune des personnes non exclues, sont expertisés par microsonde laser LAMMA. Le nombre de cheveux de « comparaison » est plus important pour s'assurer de la reproductibilité des empreintes spectrales. Les deux millimètres d'échantillon sont prélevés au centre de la tige pileaire, car sur des fragments de cheveu, il n'est pas toujours possible de déterminer le côté de la pointe qui est le plus sensible aux pollutions exogènes. Enfin, le cheveu est placé dans une grille propre en cuivre (lavée préalablement dans trois bains successifs d'eau bidistillée, d'acétone et d'eau bidistillée).

Le protocole respecte quatre règles :

- avant toutes expertises, un cheveu étalon du laboratoire est analysé pour calibrer l'appareil et vérifier le signal.

- les échantillons d'un même individu ne sont jamais passés à la suite les uns des autres pour s'assurer de la reproductibilité des résultats.

- l'analyse en ions positifs et négatifs est tout d'abord effectuée sur les cheveux « bruts », puis sur ces mêmes cheveux « lavés » suivant notre protocole. La tige pileaire insérée dans la grille sandwich, est placée deux fois de suite dans 5 ml d'eau bidistillée sous ultrasons pendant 30 minutes.

- pour limiter l'effet d'une pollution ponctuelle, les spectres de masse présentés sont une moyenne de dix tirs laser, effectués à différents endroits sur le fragment de cheveu.

Comme nous l'avons écrit dans le chapitre II, l'analyse par microsonde laser LAMMA n'est pas considérée comme quantitative. Aussi, nous nous contentons d'observer l'apparition ou la disparition de pics de masse significatifs, ainsi que l'empreinte générale formée par plusieurs ions. C'est une des manières qui nous permet de contrôler notre irradiance d'ablation ($5 \cdot 10^8$ W/cm²), en portant notre attention sur les pics de masse $m/z = 118, 134, 150$ et 166 en ions négatifs, lorsqu'ils sont présents.

Quand l'ensemble des cheveux ont été analysés par spectrométrie de masse, nous procédons comme pour l'analyse morphologique à une description systématique des empreintes en ions positifs et négatifs des cheveux « bruts » et « lavés ». Pour cela nous nous appuyons sur les résultats obtenus au cours du chapitre III. Ils nous ont permis d'associer un certain nombre d'agrégats d'ions à des éléments et d'identifier les pics de masse habituels des spectres de masse d'un cheveu.

L'aspect général de l'empreinte des cheveux « bruts » est habituellement provoqué par les éléments alcalins et les alcalino-terreux. La présence de leurs agrégats respectifs (tableau 5, 6 et 7) et leurs intensités en ions positifs et négatifs, nous permettent d'estimer, s'ils sont présents en forte, moyenne ou faible concentration (exemple figure 6). Bien évidemment, moins ces éléments sont concentrés et plus les pics de masse liés à la matrice organique (ex : $m/z = 70$ ($C_4H_8N^+$)) deviennent prépondérants (cheveu « lavé »). C'est ce que nous appelons les critères d'état du cheveu.

Pics de masse en ions +	104 et 106	113 et 115	120 et 122	Pics de masse en ions -	91	107	123
Composition proposée	K_2CN	K_2Cl	K_2CNO		$K(CN)_2$	$KCNCNO$	$K(CNO)_2$

Tableau 5 : pics de masse associés potassium suite au dopage d'un cheveu par du KCl.

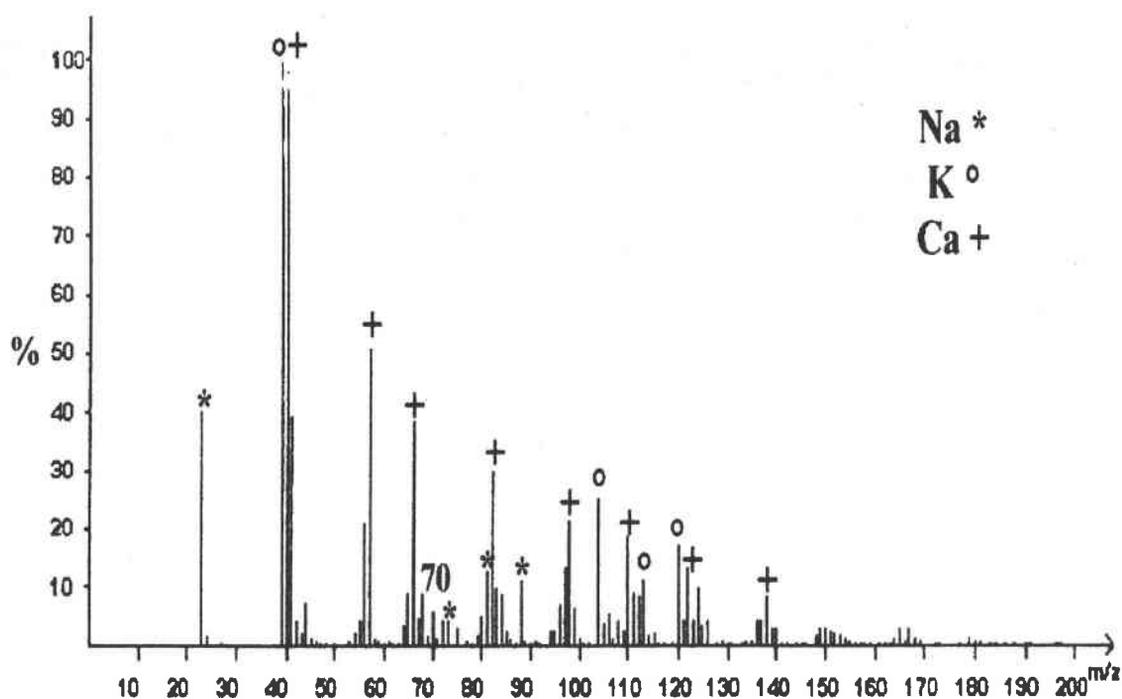
Pics de masse en ions +	72	81	88	Pics de masse en ions -	75	91	107
Composition proposée	Na_2CN	Na_2Cl	Na_2CNO		$Na(CN)_2$	$NaCNCNO$	$Na(CNO)_2$

Tableau 6 : pics de masse associés au sodium suite au dopage d'un cheveu par du NaCl.

Pics de masse en ions +	40	57	66	75 et 77	82	98	110	122	138
Composition proposée	Ca	$CaOH$	$CaCN$	$CaCl$	$CaCNO$				

Pics de masse en ions -	118	134	150	166
Composition proposée	$Ca(CN)_3$	$Ca(CN)_2(CNO)$	$Ca(CN)(CNO)_2$	$Ca(CNO)_3$

Tableau 7 : pics de masse associés au calcium suite au dopage d'un cheveu par du $CaCl_2$.



Eléments	Na	K	Ca
Concentration	faible	moyenne	forte

Figure 6 : exemple d'estimation de la concentration en éléments (Na, K, Ca), d'un spectre LAMMA en ions positifs de cheveu "brut" ($I_r = 5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$, $\lambda = 266 \text{ nm}$).

Ces critères, peuvent ainsi mettre en évidence une contamination du cheveu par la sueur (figure 7). Le cheveu « brut » présente alors une empreinte spectrale positive riche en sodium ($m/z = 23, 72, 88$), en potassium ($m/z = 39, 41, 88, 104, 120$) et en agrégats d'ions chlorés ($m/z = (81, 83), (97, 99)$ et $(103, 105)$). Les ions $m/z = 97$ et 98 correspondent certainement à NaKCl^+ . Ils prouvent que pour des pollutions importantes, il peut y avoir dans le plasma association entre des cations de différentes origines. De la même manière en ions négatifs, nous observons une trace significative de ces trois éléments (Na, K et Cl) avec les ions $m/z = 75, 91, 107, 123, (143, 145)$ et $(159, 161)$. La présence de ces trois éléments en proportion notable, indique ici une contamination par la sueur (voir chapitre I : la composition de la sueur). Elle disparaît complètement après le protocole de lavage du cheveu. Ce type d'empreinte ne peut pas être utilisé pour différencier deux cheveux. Mais, elle apporte tout de même une information : l'individu qui a perdu le cheveu transpirait abondamment, ce qui est une réaction couramment associée à la peur.

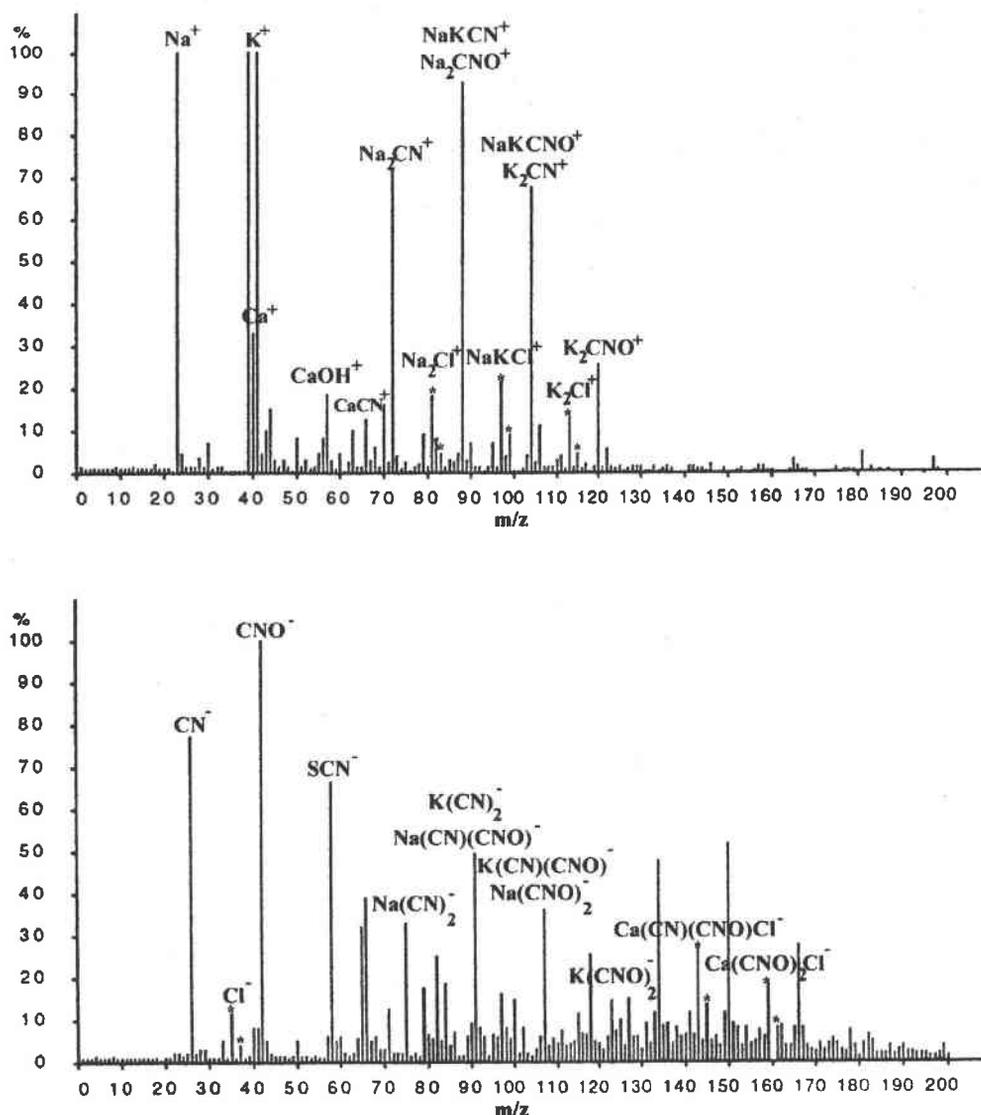


Figure 7 : spectres LAMMA en ions positifs et négatifs d'un cheveu contaminé par la sueur ($I_r = 5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$, $\lambda = 266 \text{ nm}$).

La seconde étape de l'interprétation des spectres de masse consiste à rechercher des critères plus spécifiques au cheveu analysé. Ceux-ci peuvent prendre des formes très diverses, qu'il est difficile de prévoir. Nous pouvons cependant les classer en trois grandes catégories :

- apparition d'un pic de masse inhabituel par sa présence ou par son intensité. La figure 8 présente par exemple, la détection sur un cheveu « brut » puis « lavé », d'un ion $m/z = 27$. Il s'agit probablement d'aluminium (une vérification peut être effectuée en haute résolution par FTMS). Celui-ci continue à être détecté après le nettoyage du cheveu, ce qui conforte l'idée d'une origine endogène. Dans l'état actuel de nos connaissances, il est cependant difficile de l'affirmer, car nous n'avons pas reçu de renseignements sur son propriétaire, qui puisse expliquer cette présence (traitements médicamenteux, pollution industrielle...). Le fait que cet élément soit inhabituel dans un spectre de masse,

le rend caractéristique du cheveu analysé et le différencie d'un cheveu « normal ».

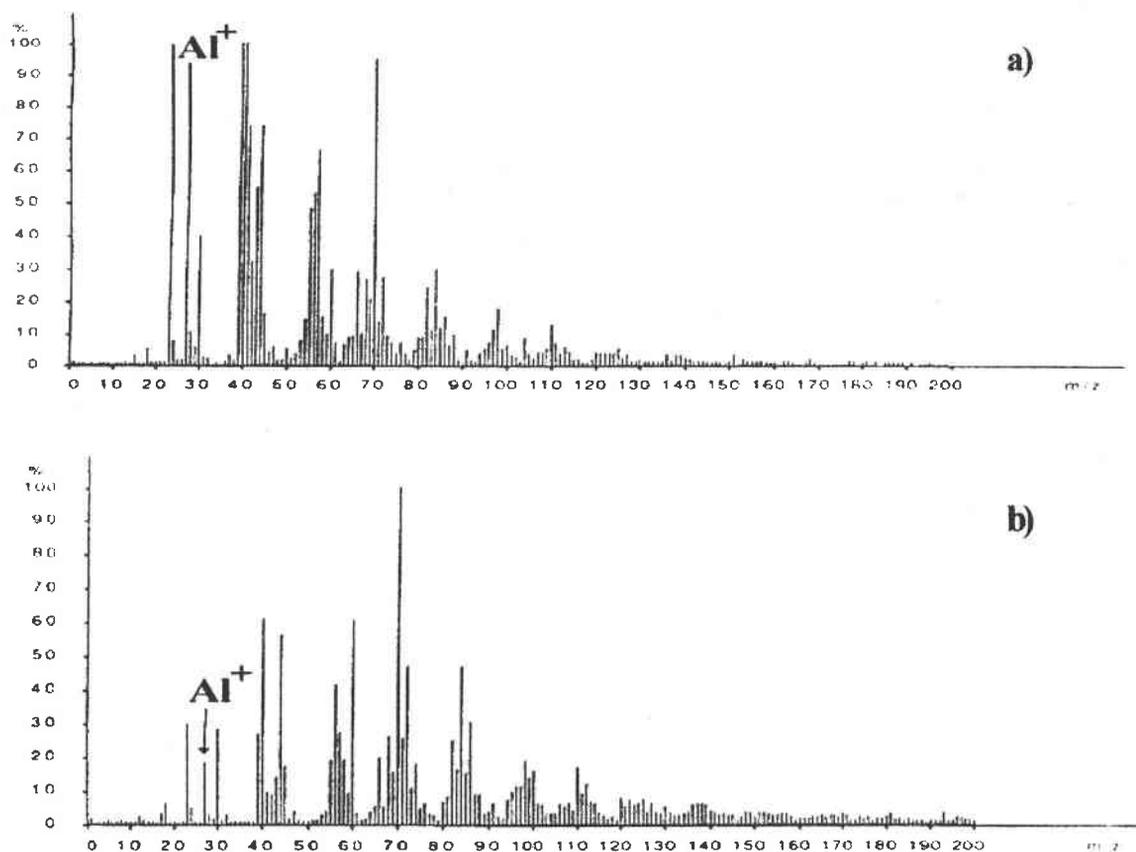


Figure 8 : détection par LAMMA en ions positifs d'aluminium sur un cheveu a) « brut » et b) « lavé » ($I_r = 5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$, $\lambda = 266 \text{ nm}$).

Nous pouvons parfois confirmer l'identification de l'élément par la présence de ses isotopes, comme dans le cas du baryum (^{138}Ba 71%, ^{137}Ba 11%, ^{136}Ba 8% et ^{135}Ba 6%) ou par les agrégats d'ions qu'il forme (figure 9).

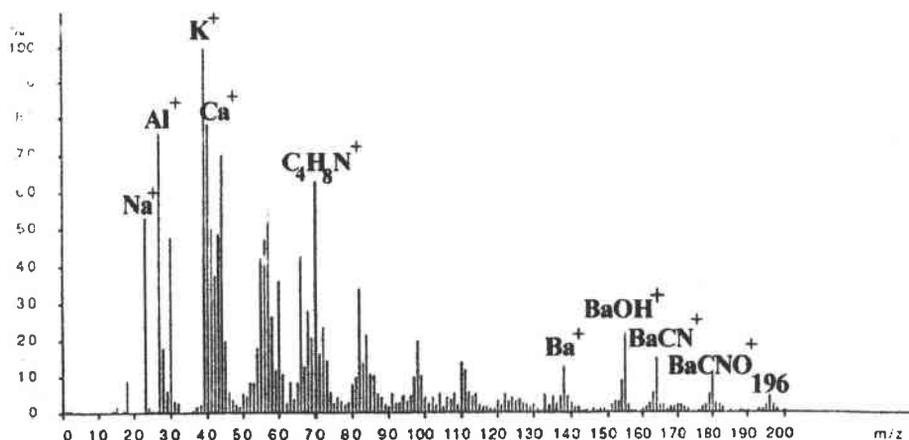


Figure 9: détection par LAMMA en ions positifs de baryum sur un cheveu ($I_r = 5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$, $\lambda = 266 \text{ nm}$).

La simple présence de l'ion $m/z = 138$ ne serait pas suffisante pour affirmer que le cheveu contient du baryum, car nous avons vu que le calcium formait aussi un agrégat de masse 138. L'intensité de cet ion n'est pas non plus suffisante pour observer significativement les isotopes du baryum. Heureusement, cet ion forme des agrégats $BaOH^+$, $BaCN^+$ et $BaCNO^+$ qui confirment sa présence. Il faut remarquer ici, qu'il n'est pas toujours possible d'émettre une hypothèse sur la nature de ces ions significatifs, car leurs origines sont multiples (pollution minérale et ou organique...). Ils sont alors signalés en fonction de leur rapport masse sur charge.

- variations significatives du rapport des intensités d'ions habituellement présents. La figure 10 montre un exemple de différenciation en ions négatifs de deux cheveux, à partir de ce type de critère. La tige pileaire a) présente, contrairement à b), un ion $m/z = 79$ plus intense que $m/z = 80$. Ils sont certainement liés à la présence respective de phosphates (PO_3^-) et de sulfates (SO_3^-) dans les cheveux. Ces variations sont considérées comme caractéristiques lorsqu'elles sont détectées à la fois sur les cheveux « bruts » et sur les cheveux « lavés ».

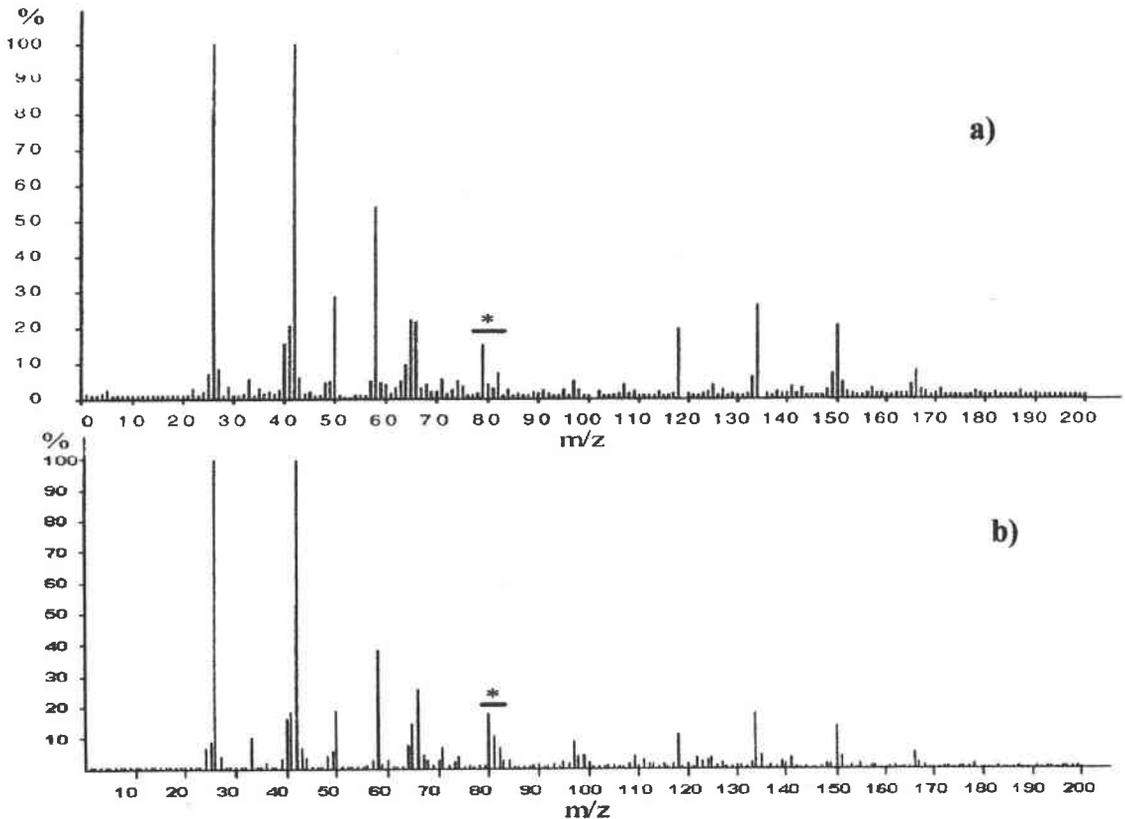


Figure 10 : caractérisation de spectres LAMMA en ions négatifs de deux cheveux « lavés » ($I_r = 5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$, $\lambda = 266 \text{ nm}$), à partir de l'intensité de deux pics : a) $m/z = 79 > 80$ et b) $m/z = 80 > 79$.

- comportement particulier du cheveu au protocole de lavage. Nous observons dans certain cas, pour des cheveux de même diamètre, une efficacité plus ou moins importante du nettoyage. En effet, pour des intensités similaires d'agrégats d'ions du calcium sur les spectres de masse de deux cheveux « bruts », l'élimination du calcium est parfois très variable après leur lavage (figure 11). Ces variations s'expliquent soit par une complexation plus forte du calcium dans la tige pileuse, soit par une microstructure plus poreuse du cheveu qui favoriserait l'extraction des éléments par l'eau bidistillée.

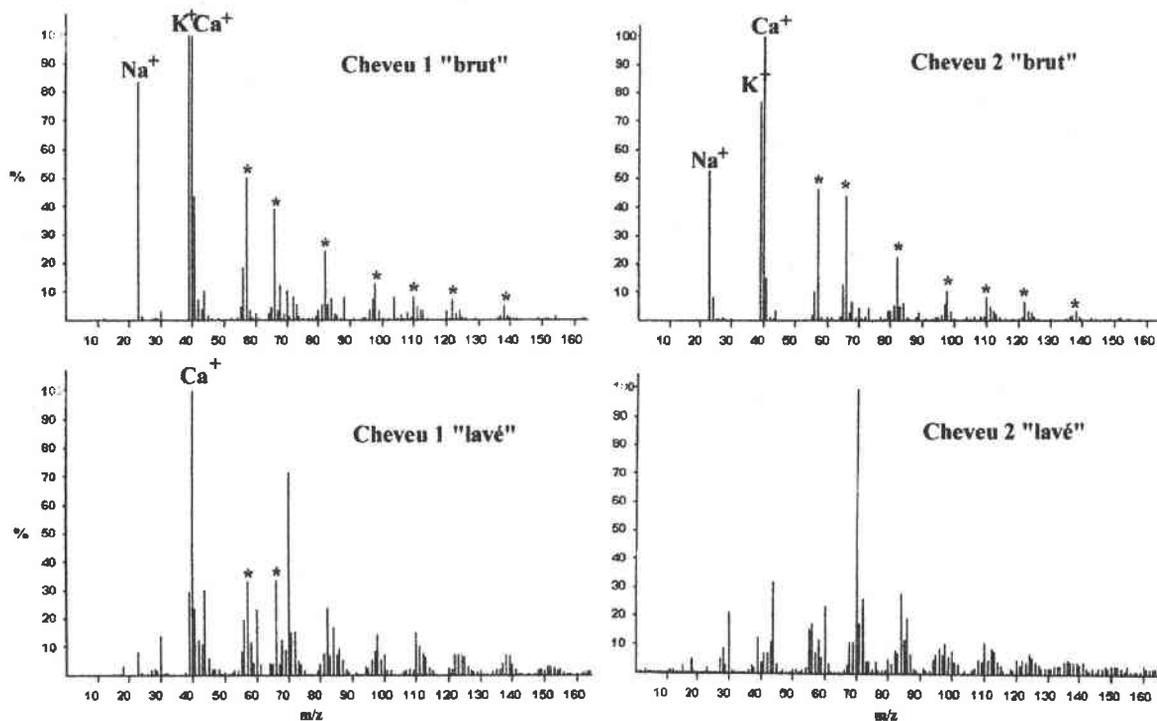


Figure 11: spectres LAMMA en ions positifs de deux cheveux 1 et 2 « bruts » et « lavés » ($I_r = 5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$, $\lambda = 266 \text{ nm}$). * : agrégats d'ions associés au calcium.

Quand la caractérisation de tous les spectres de masse des cheveux est terminée, nous confrontons les résultats sous forme d'un tableau présentant les critères d'états et les critères significatifs. Si à la fin de cette interprétation, un ou plusieurs cheveux ne peuvent pas être différenciés d'un cheveu de « question », nous admettons qu'il n'est pas exclu qu'ils appartiennent à une seule et même personne.

La diversité des expertises qui nous sont proposées, nous amène parfois à employer d'autres techniques, que nous avons développées parallèlement au sujet traité dans ce mémoire. C'est le cas par exemple de la pyrolyse GC/MS, que nous utilisons plus particulièrement à l'occasion d'affaire concernant des fibres synthétiques. La figure 12 montre ainsi, que nous pouvons clairement différencier deux cheveux synthétiques différents.

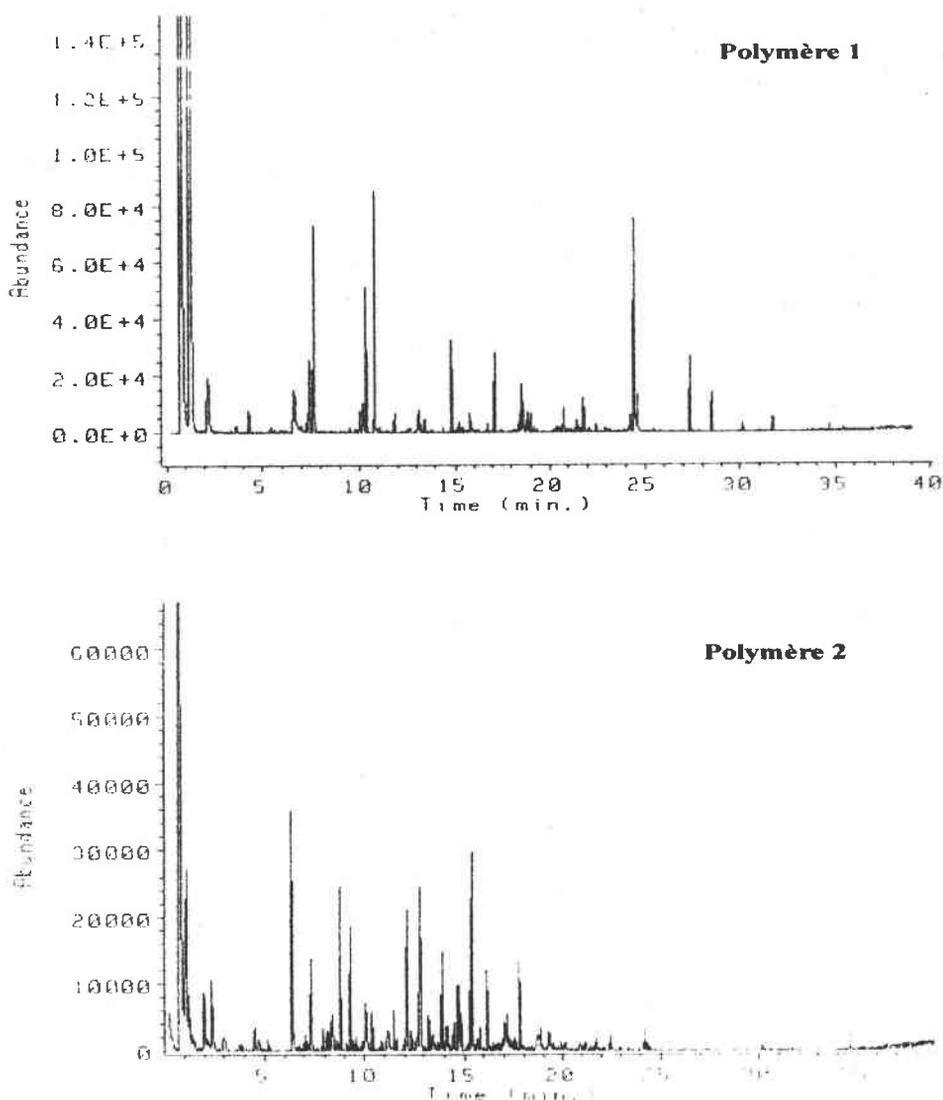


Figure 12 : pyrolyse GC/MS de deux cheveux synthétiques différents : polymère 1 et 2 (température de pyrolyse 500°C, 150 µg d'échantillon).

IV. Conclusion

Pour que l'efficacité du protocole mis au point au laboratoire soit optimale, elle nécessite des prélèvements rigoureux et des échantillons de « comparaison » représentatifs de tous les protagonistes de l'affaire (suspects et victimes).

Le protocole utilisé dans notre laboratoire est le résultat d'un long travail de recherche et de l'expérience acquise au cours de 35 expertises criminalistiques, représentant plus de 500 cheveux analysés. Il se déroule en deux étapes complémentaires. L'analyse morphologique trie les cheveux en fonction de 16 caractères différents. Elle a pour rôle de caractériser les cheveux à des fins discriminantes et d'optimiser le travail en réduisant le nombre d'analyses par spectrométrie de masse. Pour cela, nous excluons de l'étape suivante tous les individus dont aucun cheveu de « comparaison » n'a pu être

associé à un cheveu de « question ». Enfin, la microsonde laser LAMMA permet d'affiner les résultats en accédant à de nouveaux caractères liés à la composition minérale et organique du cheveu.

Si à la fin de toutes ces analyses, un cheveu de « question » et au moins un cheveu de « comparaison » d'un individu restent indiscernables, alors il n'est pas possible d'exclure qu'ils aient la même origine.

Le principe d'une analyse par critères de comparaison successifs est d'autant plus significative que leur nombre est élevé. Ainsi, si l'on se réfère aux travaux de B.D. Gaudette et aux nombreux autres auteurs (voir page 27 et 28 du chapitre I) sur le sujet, il apparaît clairement qu'il est difficile, à l'heure actuelle, de définir une approche statistique rigoureuse à ces analyses. En effet, selon le contexte de chaque affaire, un critère de comparaison, qu'il soit morphologique ou spectroscopique peut avoir une signification plus ou moins grande. L'importance à donner aux résultats est fonction des caractères qui différencient ou associent deux cheveux. L'observation sur la tige pileuse de nœuds (trichonodosis) ou de lithium sera très révélateur car peu fréquent. Malheureusement, il est impossible de préjuger de la valeur des résultats avant d'avoir effectué les analyses.

En ajoutant les critères de comparaison spectroscopiques aux 16 critères morphologiques, nous diminuons les chances pour que deux cheveux pris au hasard soient indiscernables. Donner un chiffre précis dans les conditions actuelles serait hasardeux : l'ordre de grandeur devrait cependant être compris entre 1 pour cent et un pour mille, selon les critères significatifs observés.

Toutefois, si dans le cadre d'une affaire, il s'avère qu'après une analyse séparée des mêmes échantillons par morphologie/spectroscopie et par empreinte de l'ADN mitochondrial, il est toujours impossible de différencier deux cheveux, alors les probabilités sont multipliées, puisque ces deux méthodes sont totalement indépendantes.

Il apparaît donc clairement que l'analyse physico-chimique des cheveux est complémentaire de celle de l'ADN mitochondrial. Ces techniques offrent à la justice un degré de pertinence beaucoup plus élevé, en cas de conclusions identiques.

Conclusion générale

Le travail bibliographique a montré les potentialités du cheveu, qui se comporte comme une bande enregistrant l'imprégnation de l'organisme par divers composés : drogues, médicaments, éléments minéraux. Cependant, leur détection peut être perturbée par de nombreux phénomènes : contamination exogène, concentration en pigment, pH de la sueur... L'interprétation des résultats nécessite donc une connaissance approfondie du cheveu et des interactions avec son environnement.

Les différentes techniques d'analyse du cheveu sont généralement longues à mettre en œuvre et consommatrices en échantillon. De plus, elles ne rapportent qu'une série limitée d'informations biologique, organique ou minérale. C'est pourquoi nous avons développé au laboratoire un protocole d'analyse par microsonde laser LAMMA. Elle permet, pour une longueur d'onde située dans l'U.V. (193 à 355 nm) et une irradianance de $5 \cdot 10^8 \text{ W/cm}^2$, d'accéder rapidement à une information générale sur la composition de quelques millimètres de cheveu.

Afin d'interpréter correctement les spectres de masse enregistrés, nous avons étudié la formation des ions lors de l'ablation laser du cheveu. Pour cela, le travail s'est divisé en deux étapes avec l'analyse des éléments minéraux puis de la matrice organique.

Nous avons montré que la détection des éléments était fonction de leur potentiel d'ionisation, mais aussi de leur degré d'oxydation. La formation d'agrégats d'ions stables entre les cations minéraux et les anions organiques majoritaires (CN^- et CNO^-) a été démontrée. Leur structure est étroitement liée à la valence du métal, à leur réactivité dans le plasma et à leur classification dans le tableau périodique. Ces analyses ont aussi souligné la difficulté d'observer la partie anionique du composé dopant. Nous expliquons ce phénomène par notre protocole d'étude (rinçage du cheveu à l'eau bidistillée) et par la charge négative

en solution du cheveu, qui ne favorisent pas la fixation de tels composés à la surface.

Grâce au passage de nombreux échantillons témoins dans nos conditions d'analyse, nous avons pu interpréter l'empreinte « organique » obtenue après lavage du cheveu. Les ions positifs proviennent de la fragmentation de la chaîne polypeptidique des kératines, il est ainsi possible d'associer un certain nombre d'entre eux à la présence d'acides aminés (surtout ceux possédant une chaîne latérale basique ou comportant un cycle). La prépondérance du pic $m/z = 70$ ($C_4H_8N^+$) a été confirmée par l'étude des neutres. Elle s'explique certainement par la stabilité de l'ion formé à partir de la proline et de l'arginine, mais aussi par une fragilité de la liaison amide liée à la proline qui favorise son ionisation. Les informations apportées par l'analyse des ions négatifs sont assez limitées, elles concernent seulement la présence de composés soufrés et phosphatés.

Enfin, nous avons exposé le protocole d'expertise tel qu'il a été développé dans notre laboratoire. Celui-ci se déroule en deux étapes :

- une analyse morphologique des échantillons basée sur l'observation de 16 critères. Elle fournit des informations d'ordre général comme : l'origine des cheveux (synthétique, animal, humain), l'aspect probable de la coiffure ou une estimation du temps qu'il s'est écoulé depuis que les cheveux ont été coupés pour la dernière fois. Toutefois, elle permet aussi un premier tri en associant ou non certains cheveux, ce qui réduit le nombre d'analyse à effectuer par microsonde laser LAMMA ;

- une analyse par spectrométrie de masse de tous les cheveux retenus lors de la première étape. Cette étude est réalisée en ions positifs et négatifs sur les cheveux « bruts » et « lavés ». Chaque spectre est caractérisé en fonction : d'une part de critères d'état qui donnent une vision générale de l'aspect de l'empreinte et, d'autre part, de critères significatifs (pics inhabituels, variation d'intensité et comportement particulier au protocole de lavage) qui caractérisent plus finement le cheveu.

L'objectif est donc d'augmenter progressivement le nombre et le type de critères d'analyses, afin qu'une comparaison deux à deux des résultats de chaque cheveu, puisse exclure ou non l'appartenance à une seule et même personne. Nous sommes conscients que cette conclusion ne répond que partiellement aux attentes des juges d'instruction, qui recherchent de plus en plus une preuve matérielle absolue (empreinte digitale par exemple). Néanmoins, notre méthodologie complétée par une analyse d'ADN mitochondrial, offre une pertinence qui peut être beaucoup plus élevée. Notre conclusion s'insère dans une enquête comme un indice supplémentaire (conclusions négatives ou positives), dont l'importance est très variable, car fonction des critères particuliers observés (l'exclusion étant beaucoup plus significative que la non exclusion).

Suite à toutes nos études, il paraît peu probable que la technique d'analyse par microsonde laser couplée à la spectrométrie de masse, telle qu'elle est utilisée, puisse apporter d'autres critères de différenciation que ceux décrits dans ce mémoire. En effet, nous avons voulu privilégier une vision générale à la fois minérale et organique du cheveu. Elle ouvre cependant des possibilités intéressantes, si nous décidons de concentrer nos efforts sur des axes particuliers. Ainsi, il sera peut-être possible de détecter *in situ* la présence de drogues ou de médicaments. Pour cela, nous pourrions irradier un cheveu dans des conditions énergétiques plus douces (irradiance inférieure à $5 \cdot 10^7$ W/cm² ou selon la méthode dite de désorption/ionisation assistées par matrice (MALDI¹)), avec une étape de post-ionisation ou de détection des neutres par couplage avec une trappe ionique.

¹ MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization.

Annexes

Annexe 1 :

Type de protéines	Traitement stabilisant	Poids moléculaire en KDa	P I	éf.	Ori gine
PS	Scm	40,0 - 58,0		[79]	Cheveu
PS	Scm	55,5 - 76,0	4,9 - 5,4	[75]	Cheveu Ongle
PS	Scm	45,0 - 94,0		[81]	Cheveu Ongle
PS	Scm	35,0 - 75,0		[77]	Cheveu
PS a		44,0 - 46,0	<5	[73]	Cheveu
PS b		56,0 - 60,0	6,4 - 6,7		Ongle
PS	Scam	41,5 - 59,0	5,1 - 6,8	[74]	Cheveu
RS	Scm	10,0 - 28,0		[79]	Cheveu
RS	Scm	26,5 - 43,0	3,2 - 3,5	[75]	Cheveu Ongle
RS	Scm	20,0 - 45,0	3,2 - 3,5	[81]	Cheveu Ongle
RS	Scm	14,0 - 30,0		[77]	Cheveu
RS		10,0 - 25,0		[73]	Cheveu Ongle
RS a	Scam	15,0 - 28,0	5,0 - 7,0	[74]	Cheveu
RS b		18,5 - 28,0	7,8 - 8,8		

Tableau : protéines pauvres (PS) et riches (RS) en soufre. Scm : carboxyméthylation, Scam : carbamoylméthylation PI : point isoélectrique.

Annexe 2 :

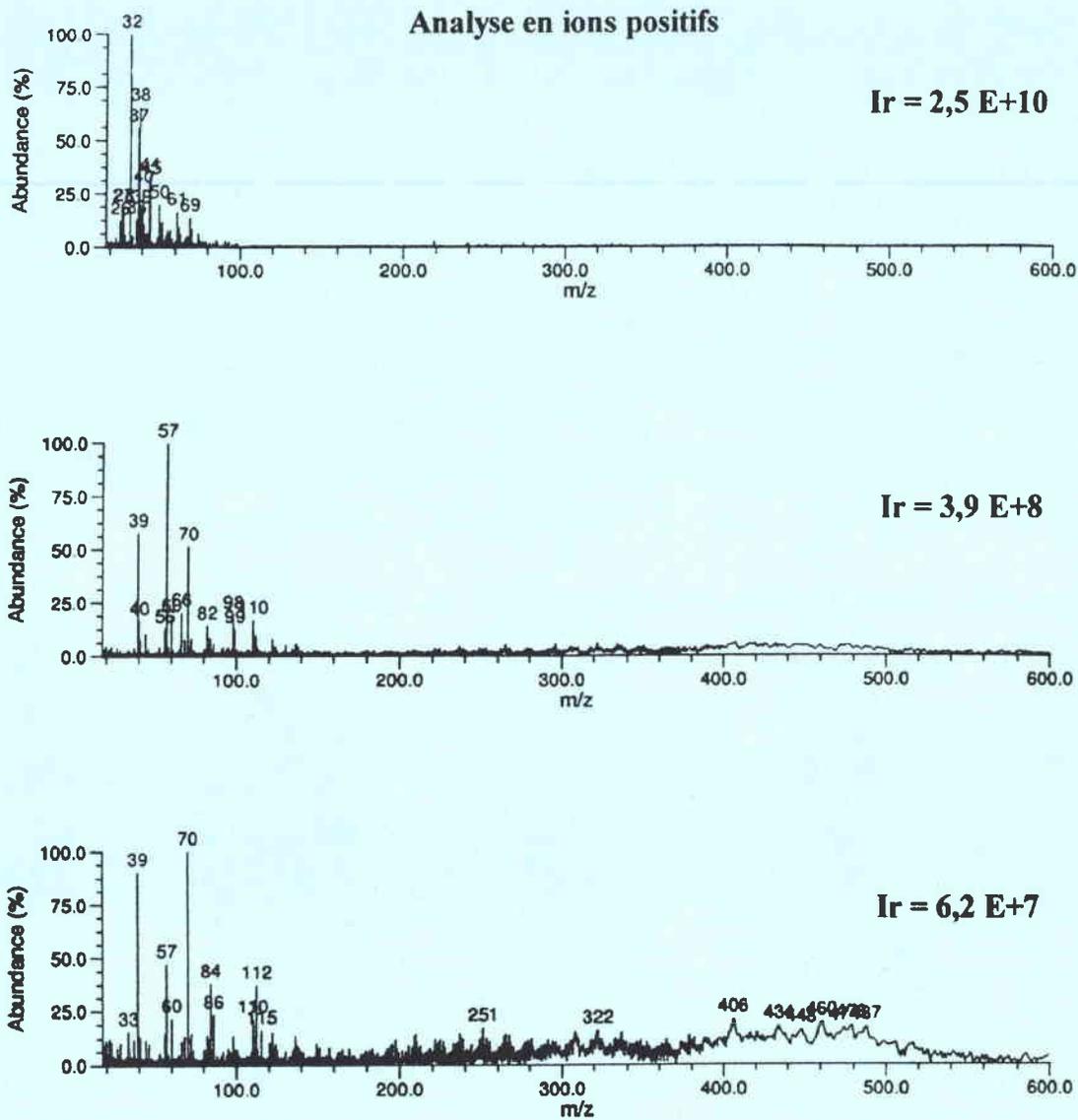


Figure : spectre FTMS de 25 tirs laser cumulés d'une pastille de cheveu, en ions positifs, à 266 nm et à différentes irradiances (Ir en W/cm²).

Annexe 2 bis :

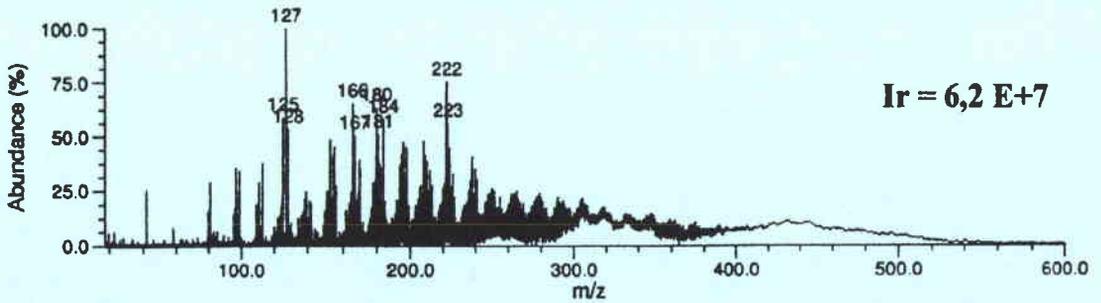
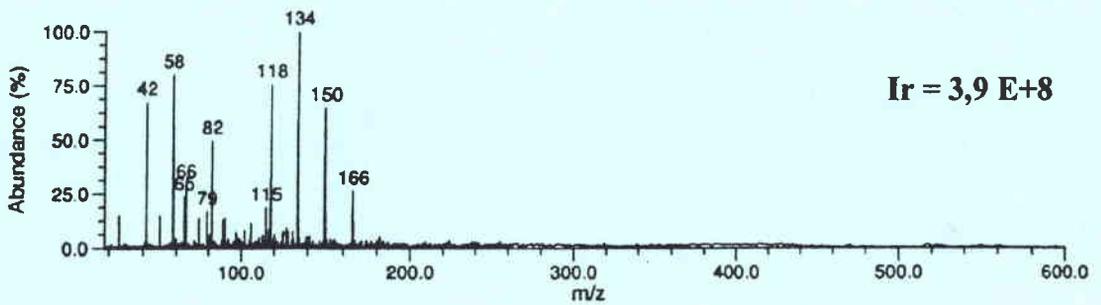
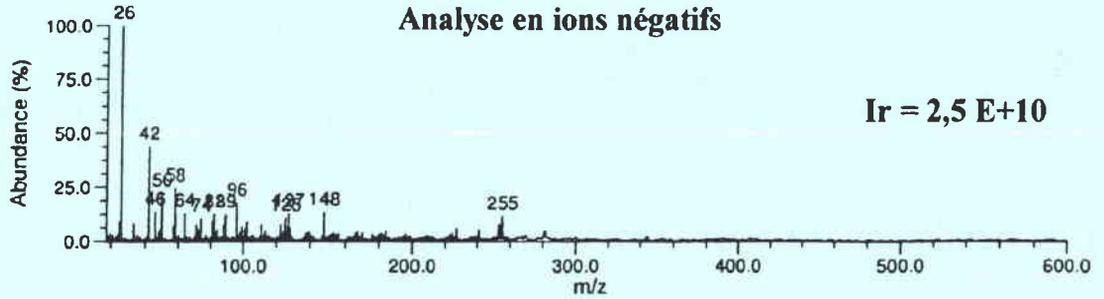


Figure : spectre FTMS de 25 tirs laser cumulés d'une pastille de cheveu, en ions négatifs, à 266 nm et à différentes irradiances (Ir en W/cm²).

Résumé

Le cheveu suscite l'intérêt de nombreux scientifiques, car il se comporte comme une bande enregistrant l'imprégnation de l'organisme par divers composés : drogues, médicaments, éléments minéraux... Cependant, comme le montre notre travail bibliographique, l'interprétation des résultats obtenus nécessite une connaissance approfondie du cheveu et des interactions avec son environnement.

Les différentes techniques d'analyse du cheveu sont généralement longues à mettre en œuvre et consommatrices en échantillon. C'est pourquoi, nous avons étudié dans ce mémoire une méthode de caractérisation des cheveux à l'aide des microsondes laser couplées à la spectrométrie de masse : LAMMA et FTMS. En effet, elles permettent une analyse rapide sur seulement quelques millimètres de tige pileaire.

Les ions formés lors de l'ablation laser d'un cheveu témoin (irradiance = $5 \cdot 10^8$ W/cm², longueur d'onde = 266 nm) ont été caractérisés afin de faciliter l'interprétation des spectres de masse. Pour cela, nous avons effectué des calibrations en haute résolution et travaillé sur des cheveux dopés en éléments minéraux ou lavés pour observer la matrice organique. Ces analyses montrent que l'empreinte "minérale" est due à l'agrégation des cations minéraux avec les anions organiques majoritaires (CN⁻ et CNO⁻), tandis que l'empreinte "organique" est principalement liée à la fragmentation de la chaîne polypeptidique des kératines.

Enfin, nous exposons le protocole d'expertise discriminante des cheveux, tel qu'il a été développé dans notre laboratoire. Dans ce contexte, nous effectuons des analyses morphologiques et par spectrométrie de masse LAMMA. Nous augmentons ainsi le nombre de critères d'analyses, pour qu'une comparaison deux à deux des résultats de chaque cheveu, puisse exclure ou non l'appartenance à une seule et même personne.

Mots clés : cheveu, ablation laser, spectrométrie de masse, police scientifique, discrimination.

Abstract

Scientists take an interest in hair, because it acts like a physiological « tape recording » which traps mineral elements or drugs. Nevertheless, the literature shows that, in order to interpret the hair analysis results, a basic understanding of hair biology is necessary.

Most of hair technical analyses take time and a lot of samples. That's why we have decided to use a new method of hair comparison with two laser microprobes mass analysers : LAMMA and FTMS. They allow fast analysis with only few millimeters of hair shaft.

Ions, created during laser ablation of reference hair (irradiance = $5 \cdot 10^8$ W/cm², wavelength = 266 nm), were characterized to make mass spectral interpretation easier. Thus, we studied hair doped with mineral elements or washed to observe organic matrix and we calibrated high resolution spectra. Mineral spectra are due to clusters formed between mineral cations and principal organic anions (CN⁻ and CNO⁻), while the organic mass spectra is created by fragmentation of polypeptidic bonds.

Finally, we expose hair comparisons protocol used in our laboratory. First, we carry out a morphological analysis of hair and, then a mass spectrometry analysis (LAMMA). Thus, we increase the number of characteristics and the possibility to differentiate hair compared in pairs, in order to exclude or not the fact that hair belongs to the same individual.

Keywords : hair, laser ablation, mass spectrometry, forensic science, discrimination.

Title : study of natural fibres laser interaction process by mass spectrometry. Experimental validation of characteristics used for hair comparisons.