

**11ème Colloque de la Société Française des Microscopies –GNMEBA
les 24 et 25 Juin 2009**

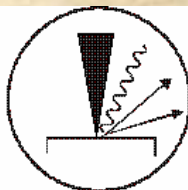
**Apport de la Microscopie Electronique à Balayage Environnementale
équipée en Microanalyse X à la détection de la tuberculose osseuse**

Jean DÜRR*, Lahcen KHOUCHAF**

*** Centre d'Études Paléopathologiques du Nord 36 rue Jules Ferry,
59127 Walincourt-Selvigny.**

**** Université Lille Nord de France, EMD, 941 rue Charles Bourseul,
BP 838 - 59508 DOUAI Cedex.**

**GN
MEBA**



**GROUPEMENT NATIONAL DE
MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE
ET DE MICROANALYSES**



En convention de coopération avec la Société Française de Physique

Plan

Introduction

Description du phénomène

Apport des rayons X

Apport du MEBE et microanalyse X

traitement à la potasse

traitement à la collagénase

Conclusions et perspectives

OBJECTIFS

Etudes antérieures

Baud et Lagier (1999) ⇒ formation de carbonate de calcium et éventuellement de la **whitlockite**



moyens de défense pour limiter l'extension de la maladie de tuberculeuse osseuse.

Blondiaux et al (1998, 1999) ⇒ possibilité de mettre en évidence la maladie



Techniques des rayons X



Transformation de l'apatite en carbonate de calcium sur des ossements archéologiques.

Etudes envisagées

⇒ Suivre l'évolution du carbonate de calcium et celle de la whitlockite et passage à



Os vivant

TECHNIQUES EXPERIMENTALES

Les méthodes classiques d'analyse par Rayons X:

- la diffraction X
- la fluorescence X

seront associées à

- la microscopie électronique à balayage environnementale dite MEBE.

TECHNIQUES EXPERIMENTALES

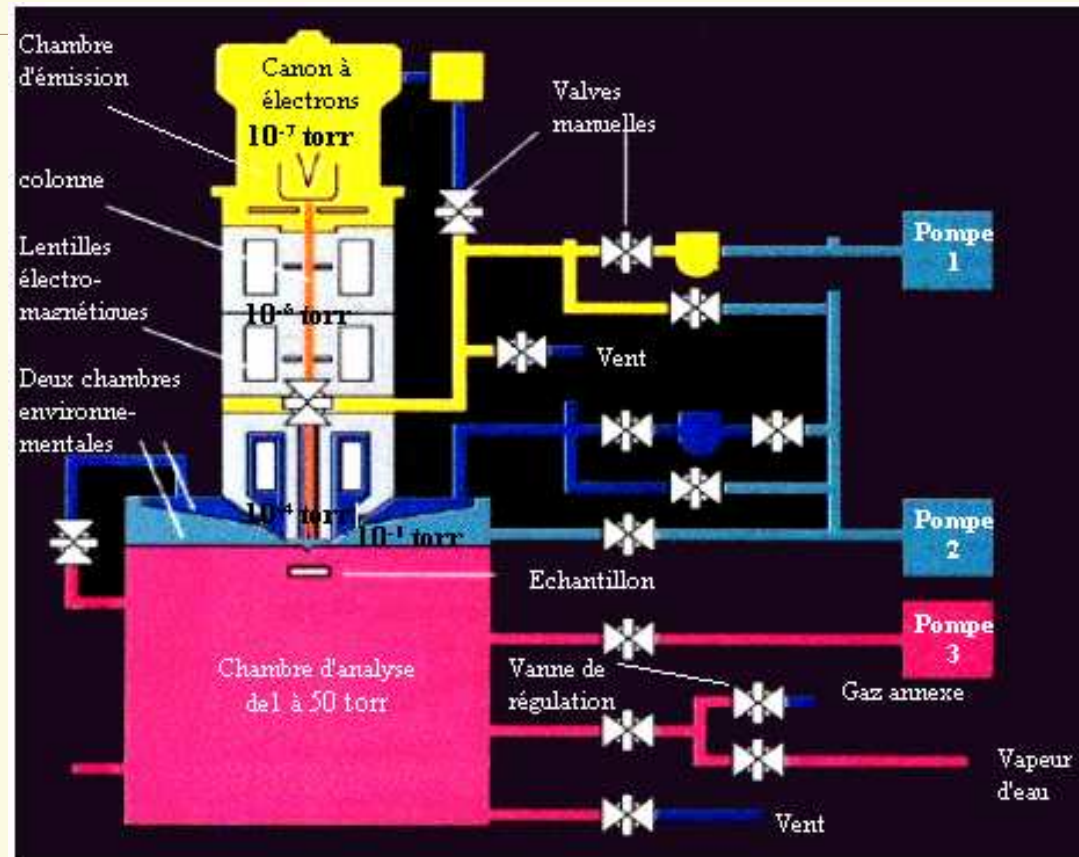


Schéma de principe du MEBE

Schéma du principe du système de microanalyse X

- ☞ Détecteur à semi-conducteur Si(Li)
- ☞ Surface 10 mm²
- ☞ Résolution 133eV à l'énergie du Mn 5895eV
- ☞ Refroidi à l'azote liquide
- ☞ Fenêtre en polymère



TRAITEMENT DES ECHANTILLONS

Autoclave

Solution de potasse KOH

Concentrations molaires 1M à 5M

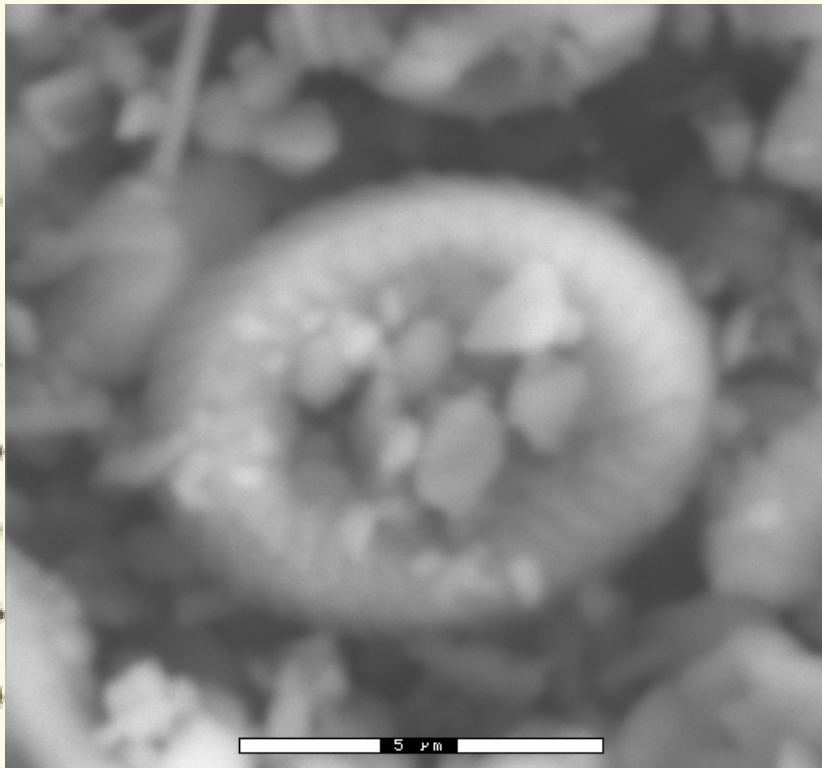
T = 105 °C

Durée 2h

Lavage à l'eau

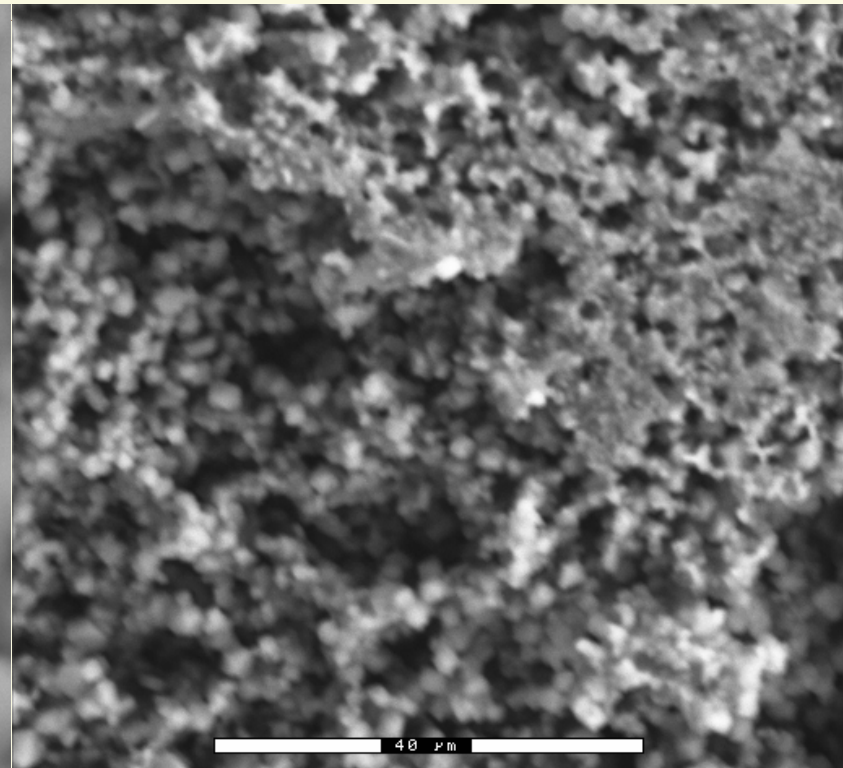
séchage

images MEBE



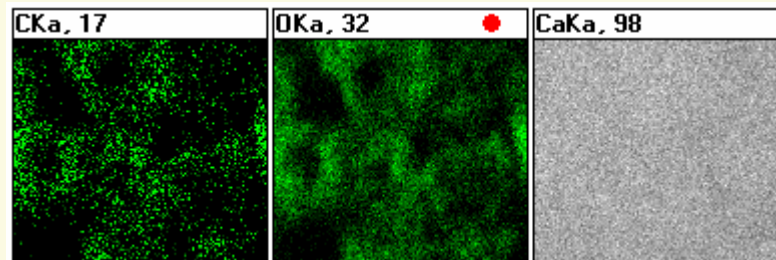
20.kV 8000x BSED
Ecole des Mines CRBRUT2.TIF 19.0mm 0.9T
99/11/03 17:28

CaCO3 brute

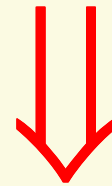


20.kV 1150x BSED
Ecole des Mines CRKOH1MA.TIF 18.7mm 0.9T
99/11/03 18:16

CaCO3 traitée par KOH 5M



Cartographie X du carbonate de calcium brut



Superposition des éléments C, O et Ca

Résultats de la Microanalyse X

molarité KOH	C % masse	O% masse	Ca% masse	P % masse	C% atom	O% atom	Ca% atom	P% atom
0 M	12	53.4	34.3	0	19.3	64	16.5	0
5 M	2.8	35.9	45.2	0	5.7	55.8	28.1	0

⇒ Diminution de la teneur en carbone

⇒ Augmentation de la teneur en calcium



Changement de la structure du carbonate de calcium ou apparition de nouvelles phases

-

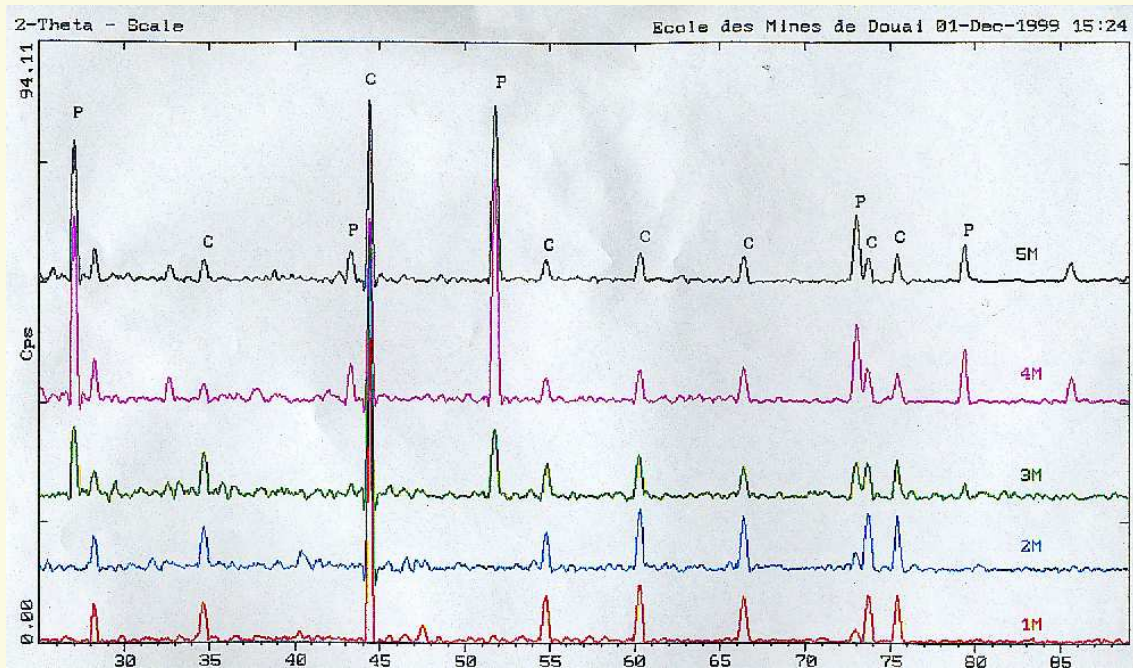
Résultats de Diffraction X

Evolution des diffractogrammes du carbonate de calcium en fonction de la concentration en KOH.

A partir de 3M

la teneur de la calcite décroît

Apparition d'une nouvelle phase Ca(OH)_2



CONCLUSION SUR L'ETUDE DU CARBONATE DE CALCIUM

-

Les conditions d'attaque retenues provisoirement seront donc

2M de KOH pendant 2H à 105 °C

+

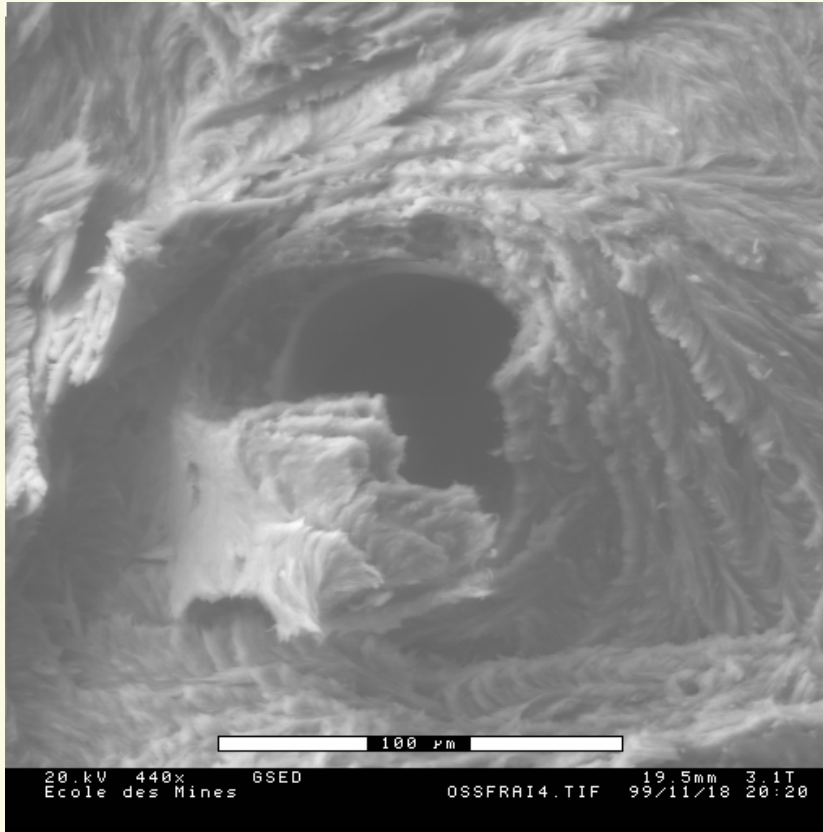
lavage à l'eau

+

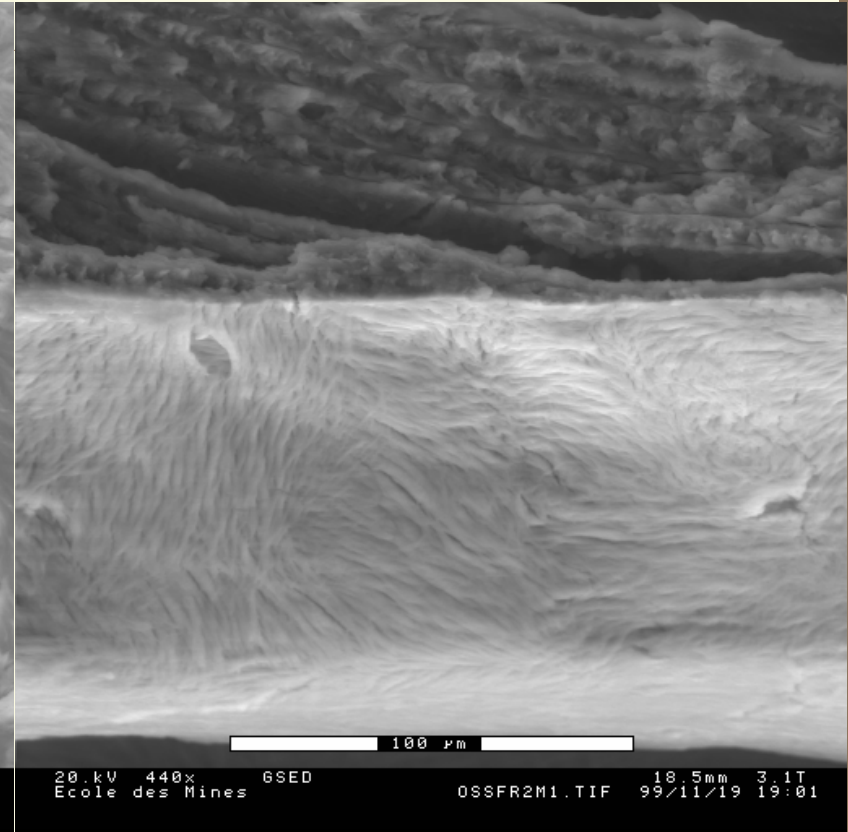
séchage à 60 °C.

ETUDE D'UN OS SAIN

Aspects au MEBE

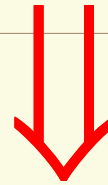


Os sain non traité

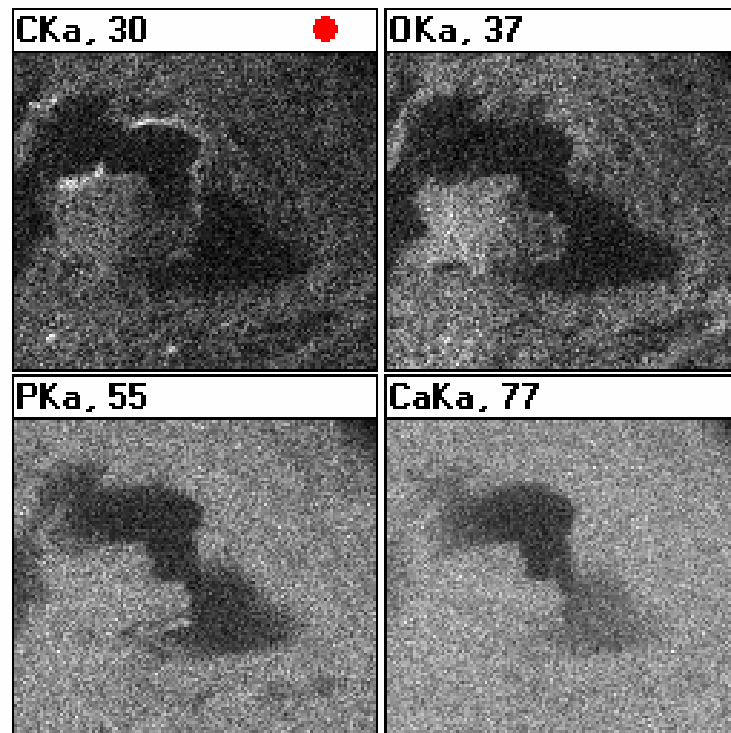


Os sain traité à 2M

Cartographies X des éléments C, O, P et Ca dans l'os sain non traité



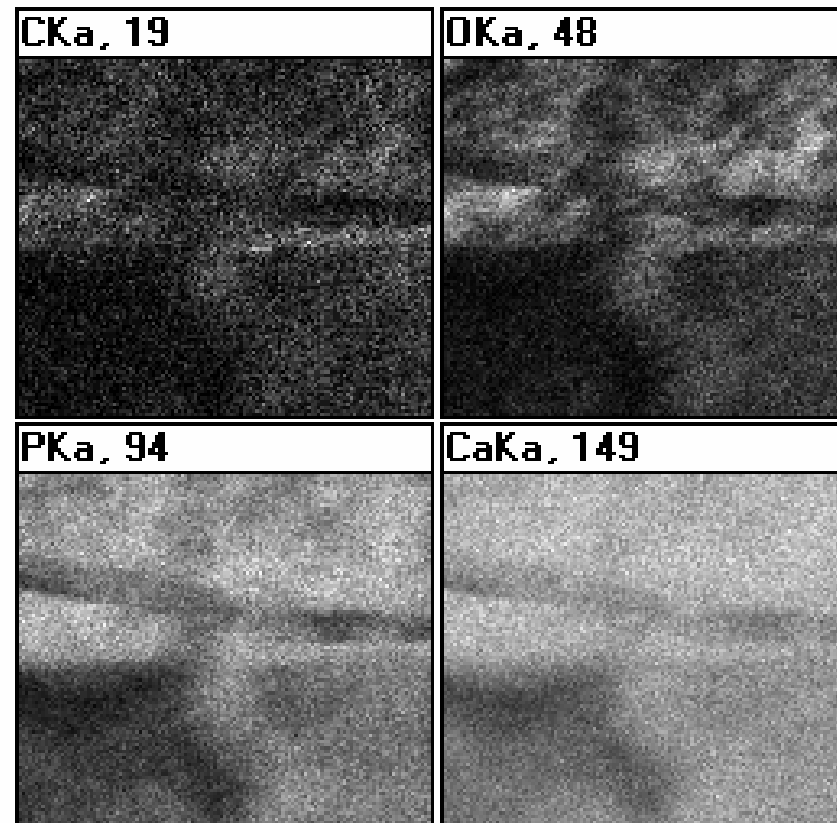
Superposition des éléments C, O, P et Ca



Cartographies X des éléments C, O, P et Ca dans l'os sain traité

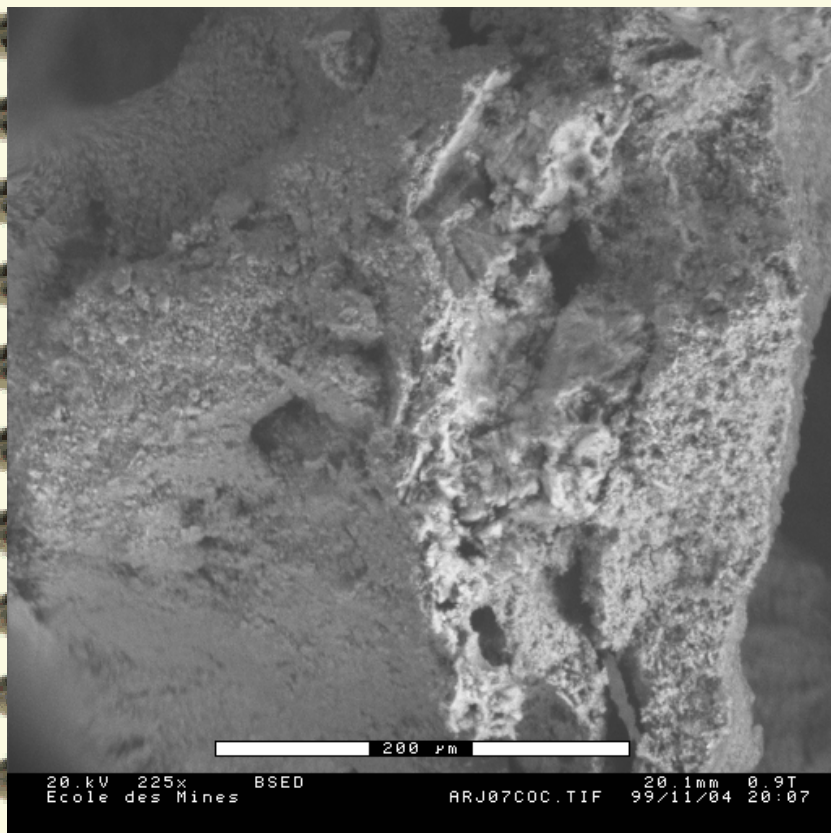


Superposition des éléments C, O P et Ca

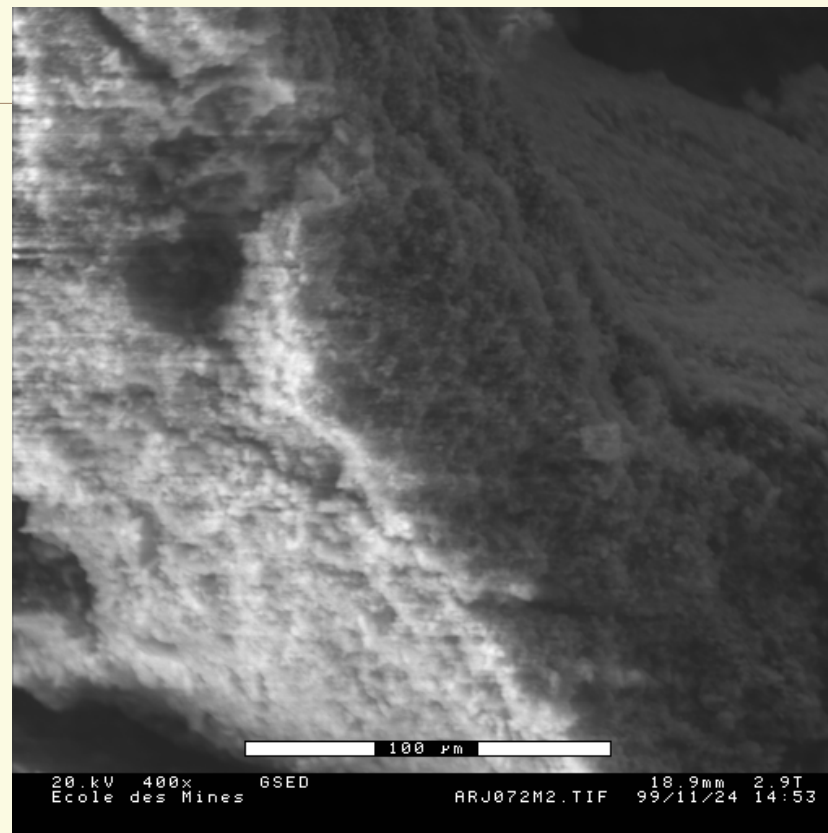


ETUDE D'UN OS TUBERCULEUX

Aspects au MEBE

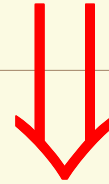


Os tuberculeux non traité

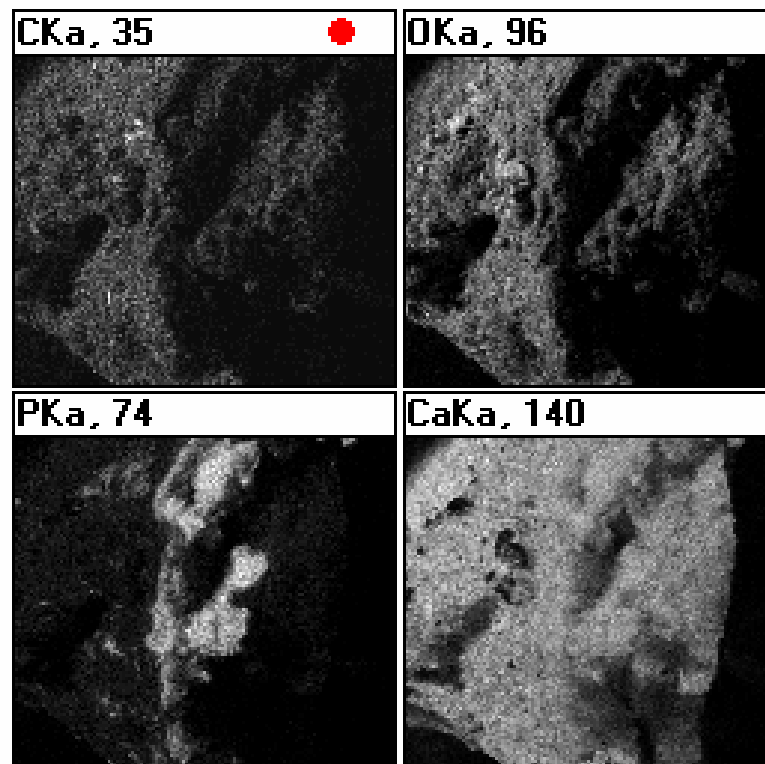


Os tuberculeux traité à 2M

Cartographies X des éléments C, O, P⁻ et Ca dans l'os tuberculeux non traité



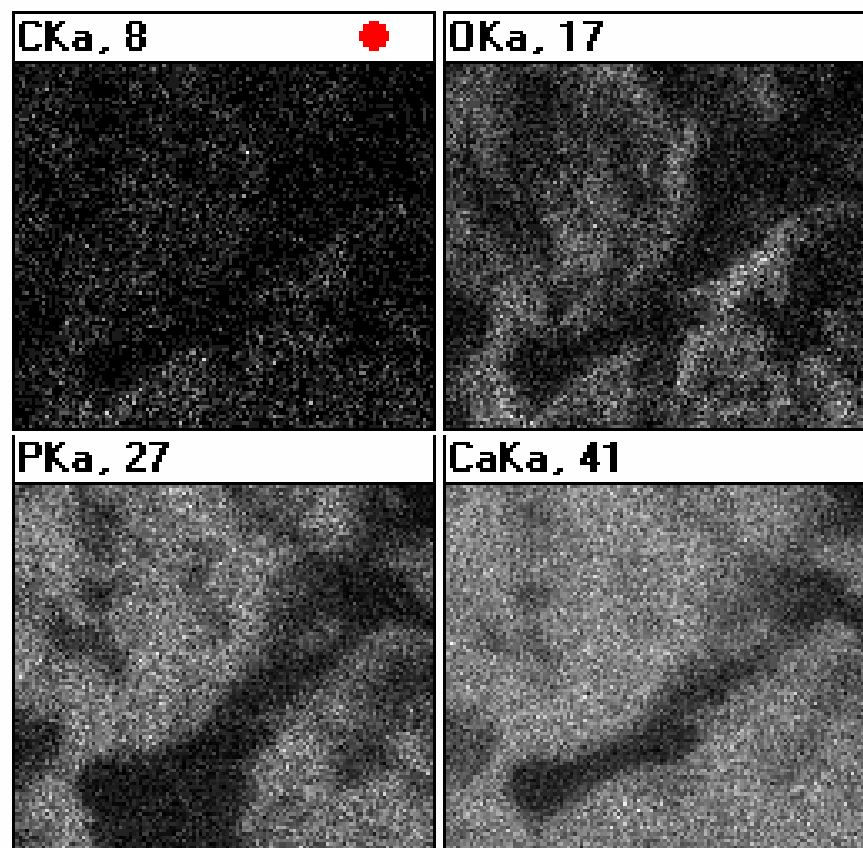
Superposition des éléments C, O, P et Ca



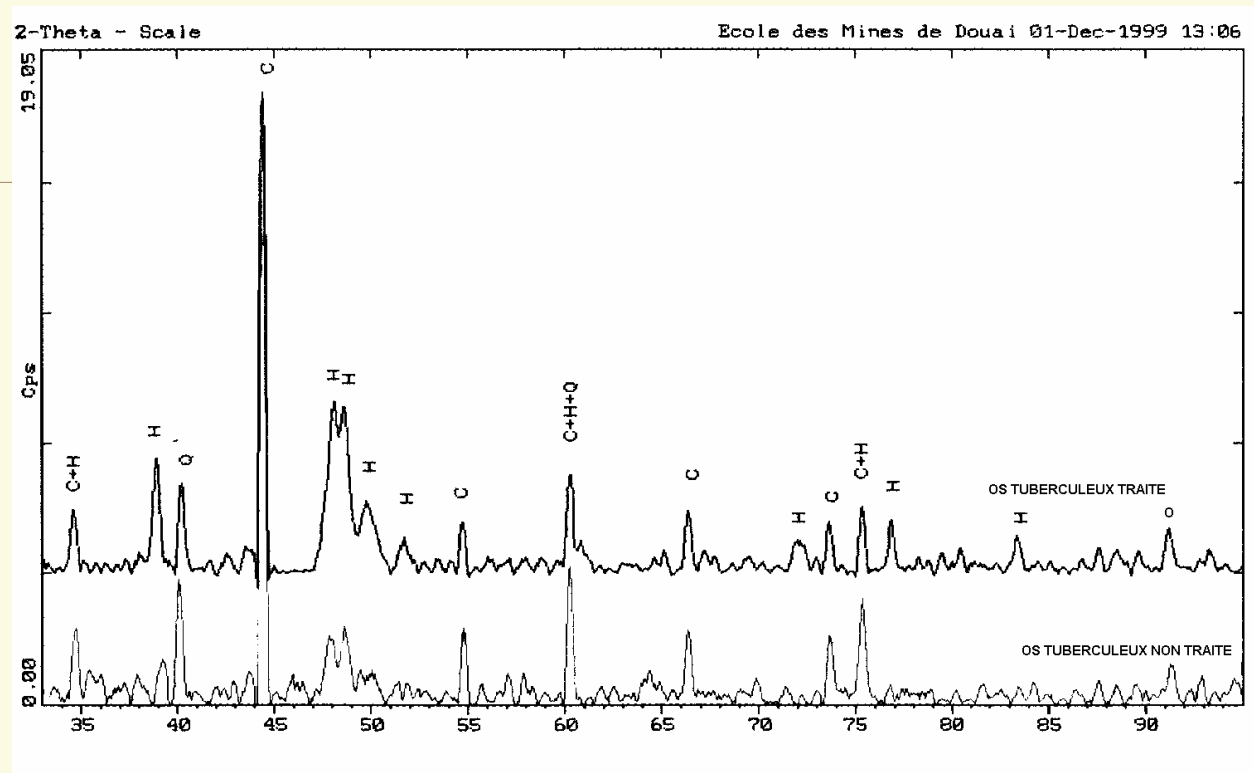
Cartographies X des éléments C, O, P et Ca dans l'os tuberculeux traité



Superposition des éléments C, O et Ca



OS TUBERCULEUX



Evolution des intensités des pics.

⇒ Augmentation de l'intensité de la phase hydroxylapatite

⇒ Diminution de l'intensité de la phase carbonate de calcium



Conservation partielle seulement du carbonate de calcium après traitement par KOH.

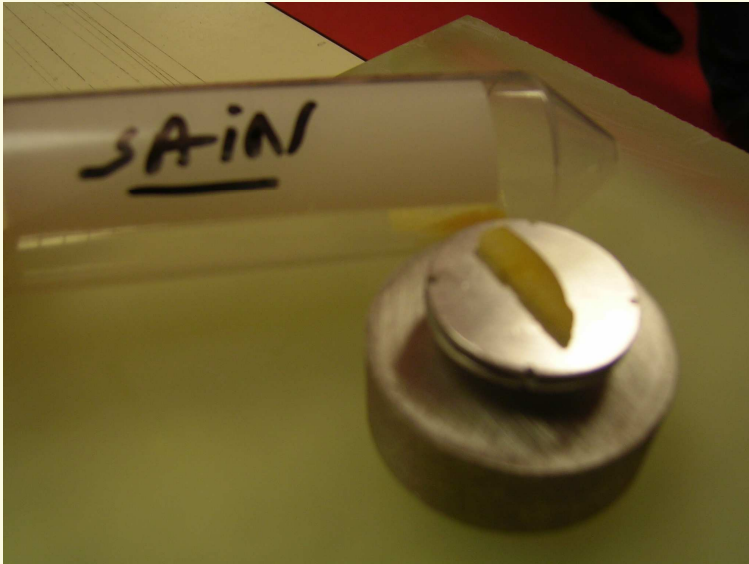
Traitement à l'enzyme collagénase.

Des échantillons d'os humain provenant de collections anatomiques ont été prélevés sur des vertèbres n'ayant jamais séjourné dans le sol.

Ces échantillons ont subi un traitement classique (kit de traitement d'extraction de l'ADN).

Ils sont simplement rincés à l'eau pure puis conservés au réfrigérateur.

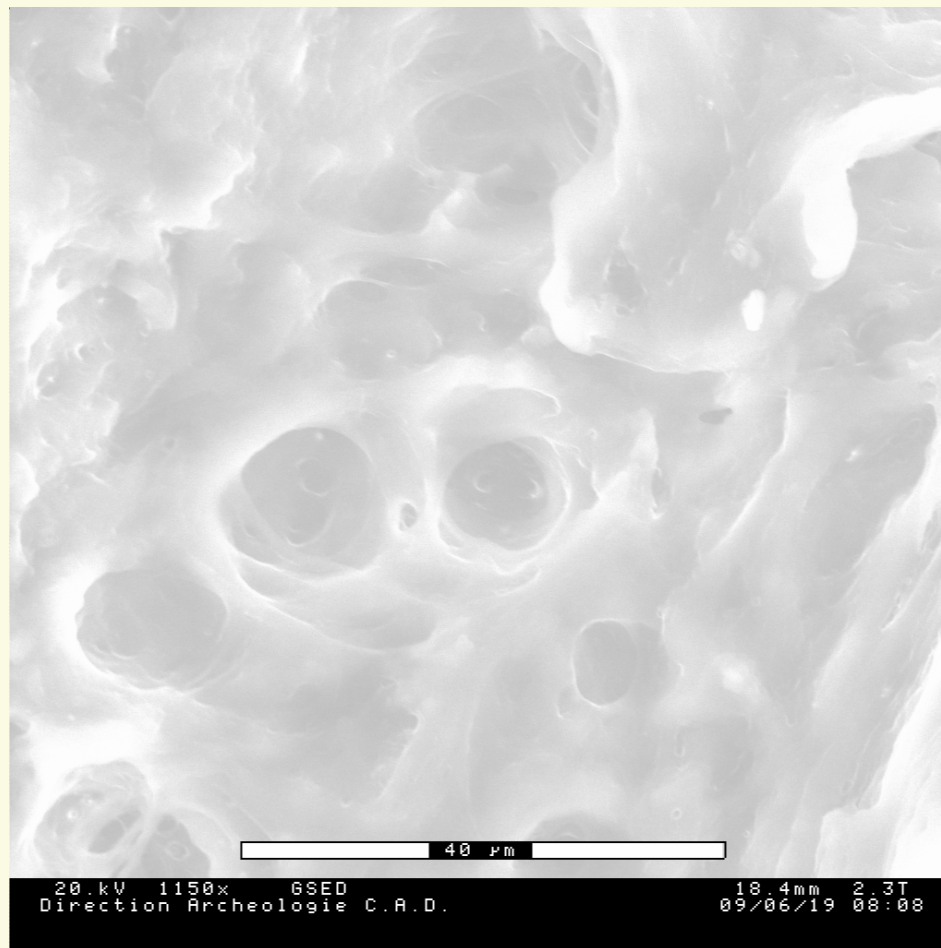
OS TRAITÉ á LA COLLAGÉNASE.



ÉTUDE DE L'OS SAIN.

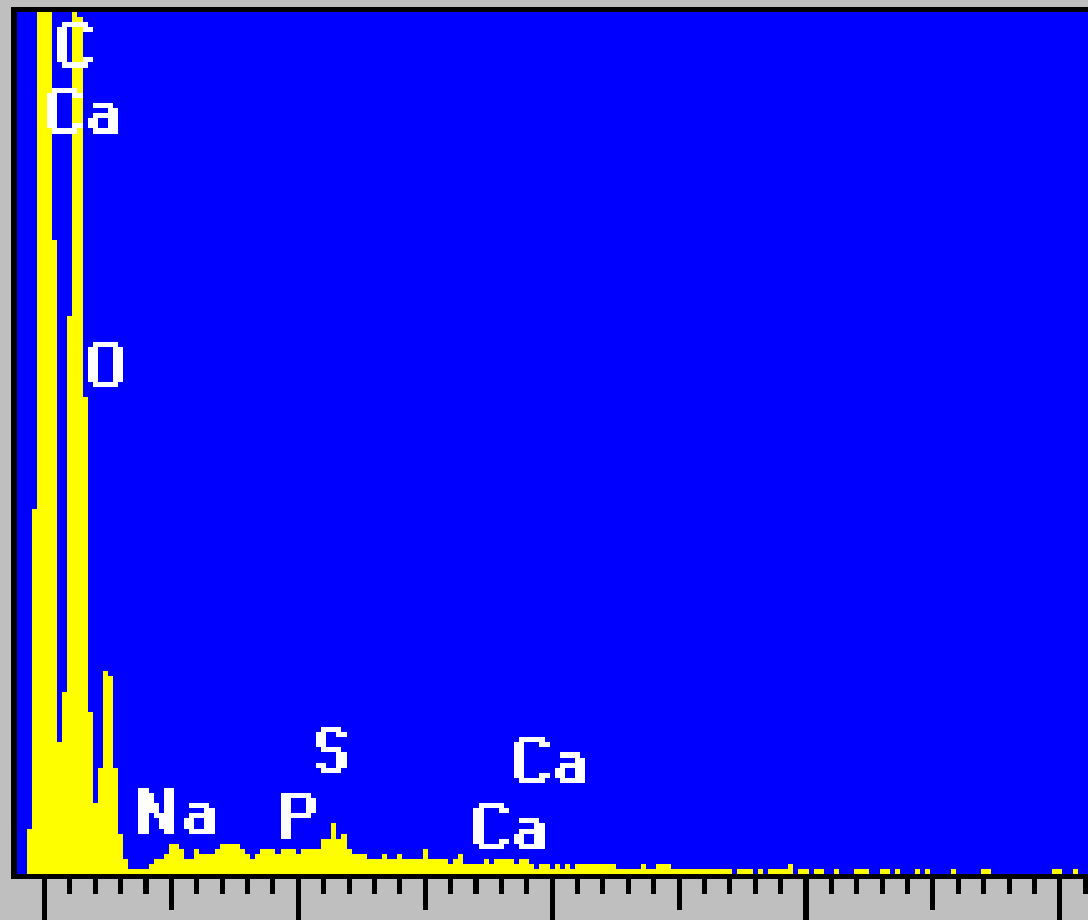


Osses traités à la collagénase

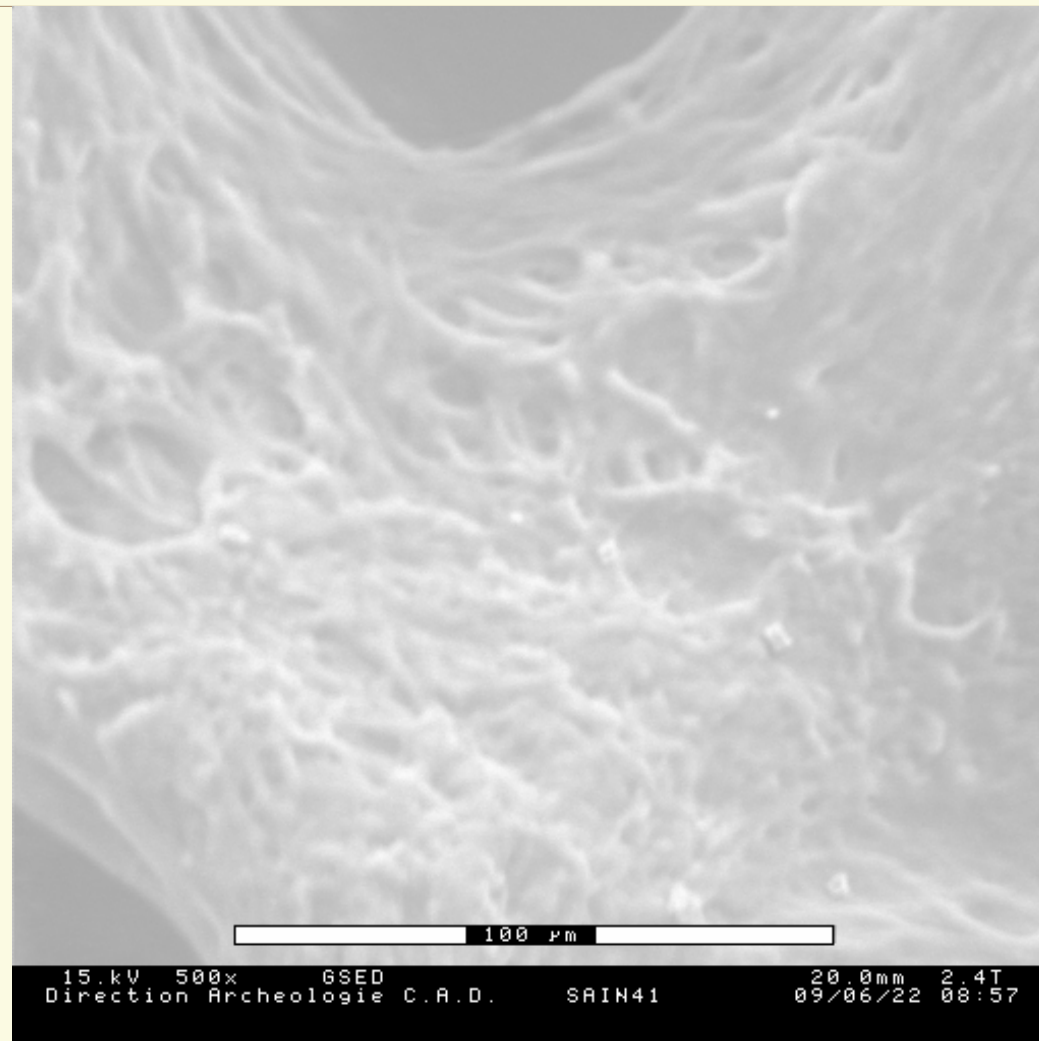


On s'attendait à trouver du phosphate de calcium.
Où est il ?

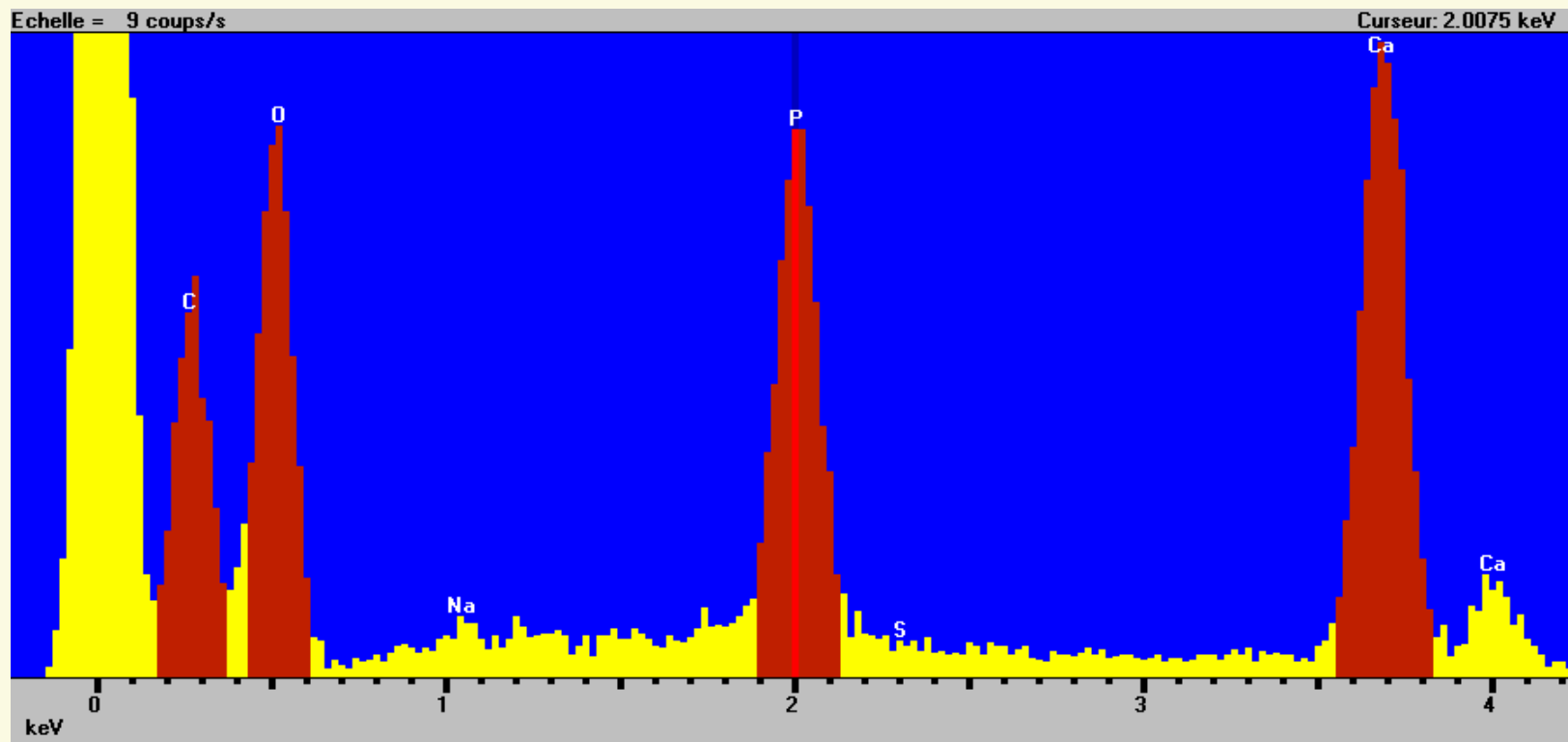
Echelle = 22 cps



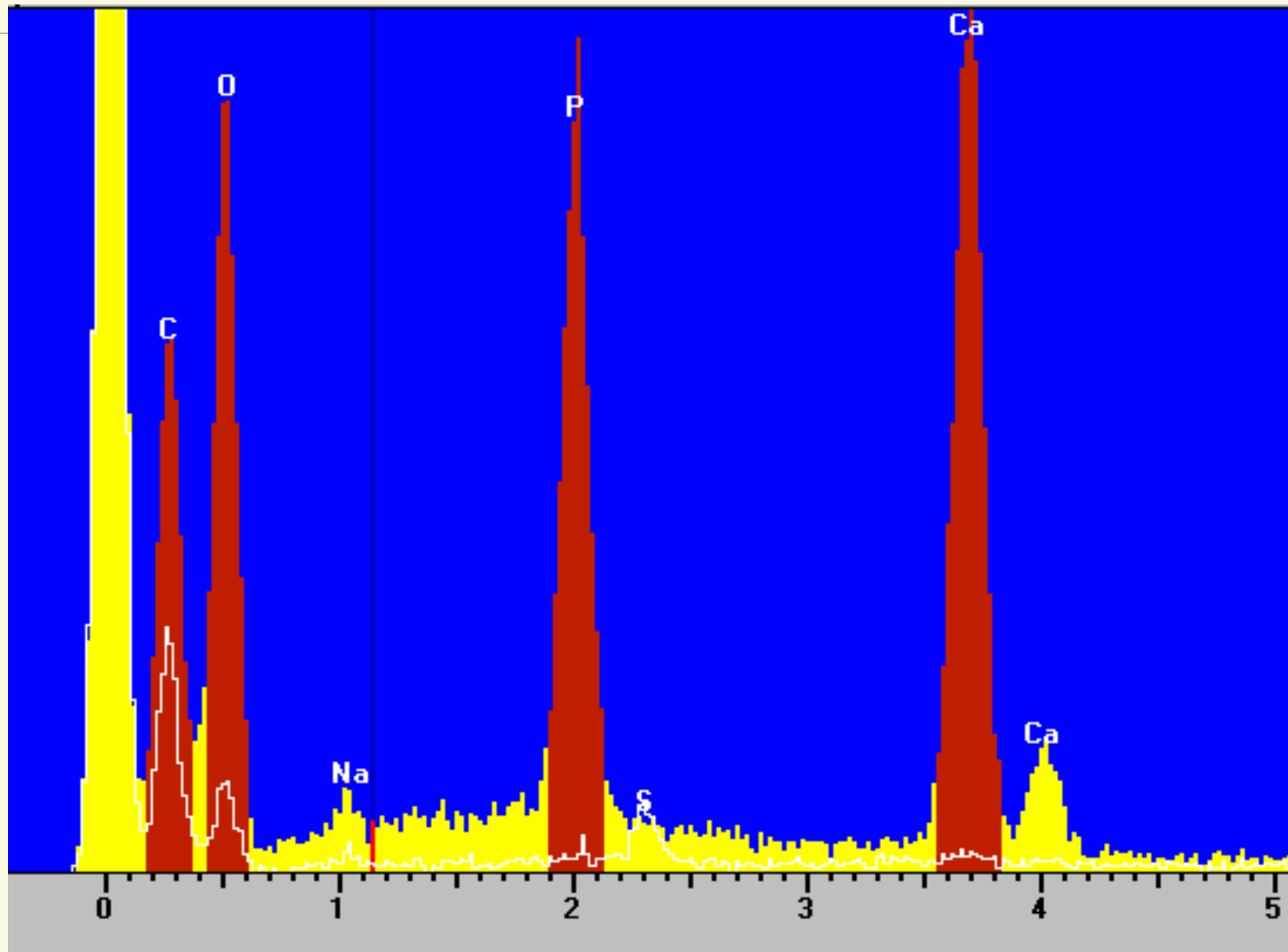
On casse la lamelle d'os sain et l'on regarde la fracture.



Spectre d'os sain dans la fracture.



Comparaison des spectres : - de collagène (en trait blanc)
- de la charpente en phosphate de Ca.

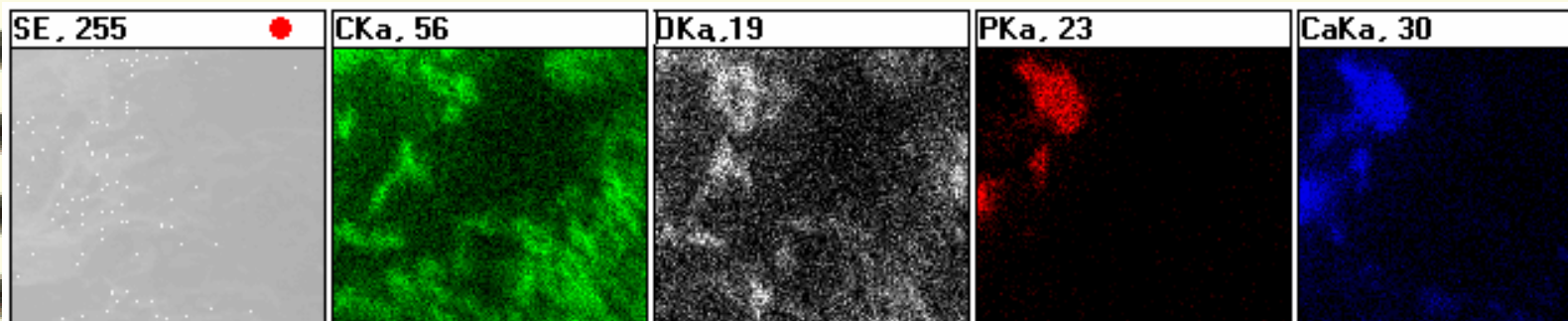


Os tuberculeux traité à la collagénase.

Cartographies de répartition des éléments: C, O, P et Ca

Des plages de l'échantillon, pauvres en phosphore, sont riches en carbone, oxygène et calcium.

La présence de carbonate de calcium est très probable.



CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.

⇒ Mise en évidence très probable de la présence du carbonate de calcium dans l'os tuberculeux traité à la collagénase.

⇒ Difficulté de la mise en évidence de la whitlockite.

⇒ Conservation partielle du carbonate de calcium après le traitement à la potasse.

Le traitement à l'enzyme colagénase est prometteur et doit encore être affiné.

⇒ Rôle du MEB environnemental dans le domaine de la médecine.

⇒ Utilisation de la technique EXAFS sous rayonnement synchrotron pour l'étude de la structure locale et de l'environnement du calcium

Remerciements

L'étude a été menée avec la collaboration de:
Au C. E. P. N

- J. Blondiaux
- P.M. Danze
- R-M. Flipo
- E. Huvenagel
- T. Colar

A la Direction de l'Archéologie de Douai :

- P. Demelon
- A. Kabil