

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

La cour d'appel de Rennes

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

Traduction: Catherine Rayer

EXPERT REPORT

Applicant : M. Thierry JAMIN

Mission reminder.....	2
Methodology of the expertise.....	2
Infrared spectroscopic analysis.....	4
Infrared Acquisitions.....	6
Spectral analysis.....	6
Comparative analysis..	12
General conclusions.....	17

Mission Reminder

As part of *The Alien Project*, five samples of different mummies parts body found site of Nazca (Peru) were sent to me for examination of their molecular composition by mid-infrared spectroscopy. This technology makes it possible to identify the (bio) chemical composition of any sample made of organic matter. The present expertise aims to analyze these mummified fragments.

The analysis were conducted at the Dupuy de Lôme Research Institute (UMR CNRS 6027) in Vannes (France).

Samples were listed as follows:

- 01 – VICTORIA'S BONE (hip)
- 02 – HAND TENDON (tHREE FINGERED HAND)
- 03 – HAND BONE
- 04 – MARIA'S SACRUM
- 05 – MARIA'S HIP

Expertise Methodology

The five samples were sent in small plastic tubes or flasks. A first step was to make high magnification pictures. The shots below were obtained with a Nikon D610 camera and a NIKKOR105 1: 2.8 MACRO lens. To indicate the scale, an 8 mm diameter coin cell was systematically photographed with the objects. High-resolution shots are available as a separate compressed file from this report.



Fig.1 VICTORIA's BONE (two faces)



Fig. 2 HAND TENDON (two sides)

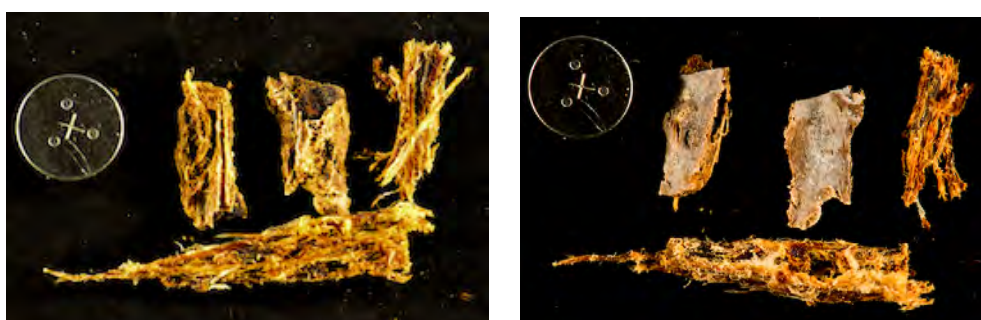


Fig. 3 HAND THREE FINGERED BONE (two sides)

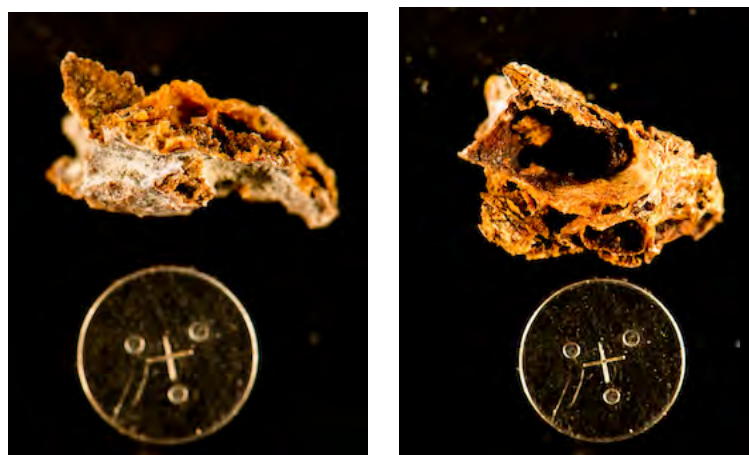


Fig. 4 MARIA'S SACRUM (two faces)

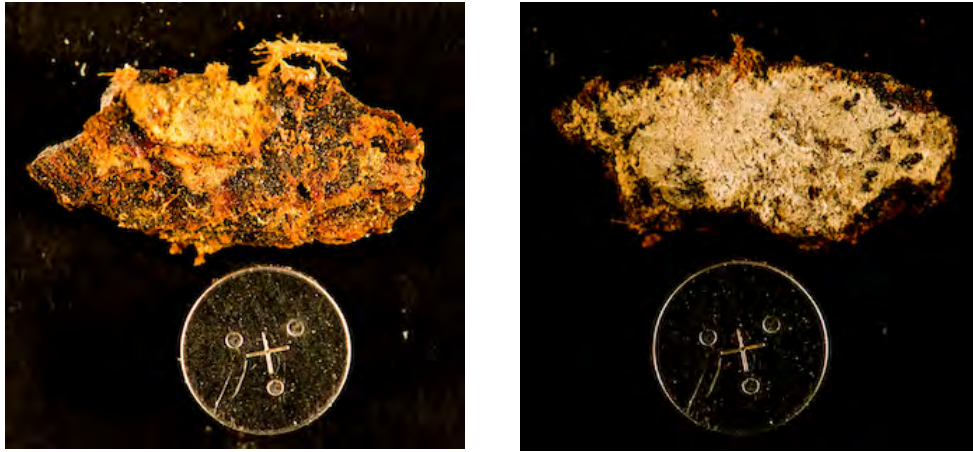


Fig. 5 MARIA's HIP (two faces)

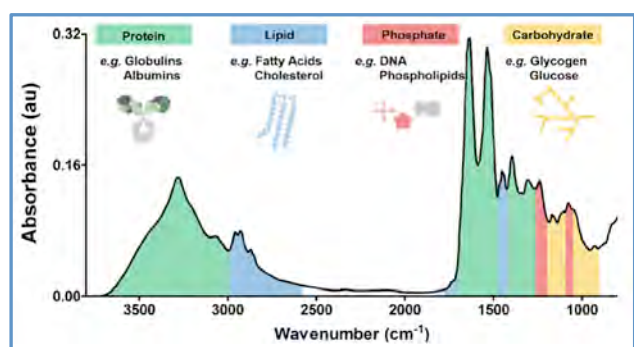
Infrared spectroscopic analysis

The samples were then analyzed in mid-infrared spectroscopy (MIR) using a Lumos (Bruker) infrared microscope in micro ATR mode.



FIG. 6 LUMOS Microspectrophotometer

Typically, this absorption spectroscopy makes it possible to identify the chemical groups present in the sample of interest through their vibrational modes. The chemical groups (O-H, C-C, N-H, C = O, etc.) have different absorption bands in their position in the spectre en fonction of



the mass of atoms being connected by a covalent chemical bond and the type of bond (single or double). The figure above shows the main spectral domains reflecting the respective contributions of proteins, lipids (fats), sugars or nucleic acids (DNA, RNA).

For comparison purposes, different "reference" samples were analyzed. These include samples of muscle, skin and chicken bones placed in a desiccator for two months and a moult of viper (*Daboia palestinae*). The corresponding snapshots are shown below.

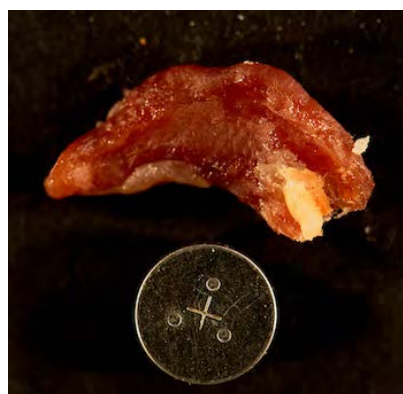


Fig. 7 Viper moult (*D. palestinae*) Fig. 8 Dehydrated chicken muscle



Fig. 9 Chicken Bones (Two sides)



Fig. 10 Dehydrated chicken skin (two sides)

Acquisitions Infrarouge

The different samples were analyzed by single-reflection ATR by MIR microspectroscopy using a Germanium crystal. The samples are brought into contact with the crystal; the sampled area is about 2000 μm^2 over a 2-3 μm thickness; It is therefore essentially a surface analysis. For each analysis, 128 spectra are averaged with a spectral resolution of 4 cm^{-1} .



Pretreatments of the spectra. In order to optimize the spectral resolution, the second derivatives of the spectra are calculated and a vector normalization is performed. This makes it possible to compensate absorbance variations only due to the material "quantity" seen by the crystal. These second derivatives are used for multivariate statistical analysis.

During the acquisitions, some of the small boiling spots that characterize evaporation of water have been noted. This phenomenon is due to the fact that the light of the microscope (lit before the MIR acquisition itself) is concentrated on a very small surface which causes a local heating. It can be deduced that there are small pockets of water trapped probably in a hydrophobic lipidic environment in the samples, therefore waterproof. Fusion of the lipids under the heat of the light would make the evaporation of the water possible.

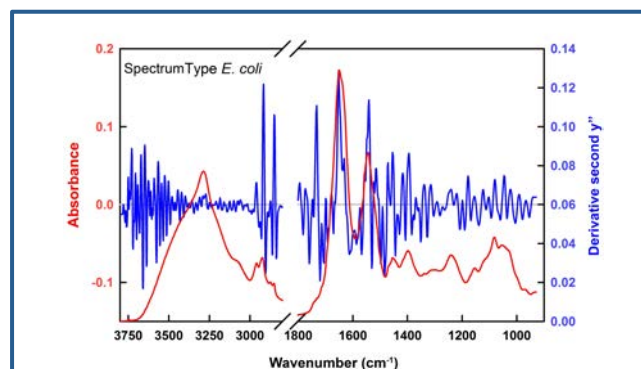
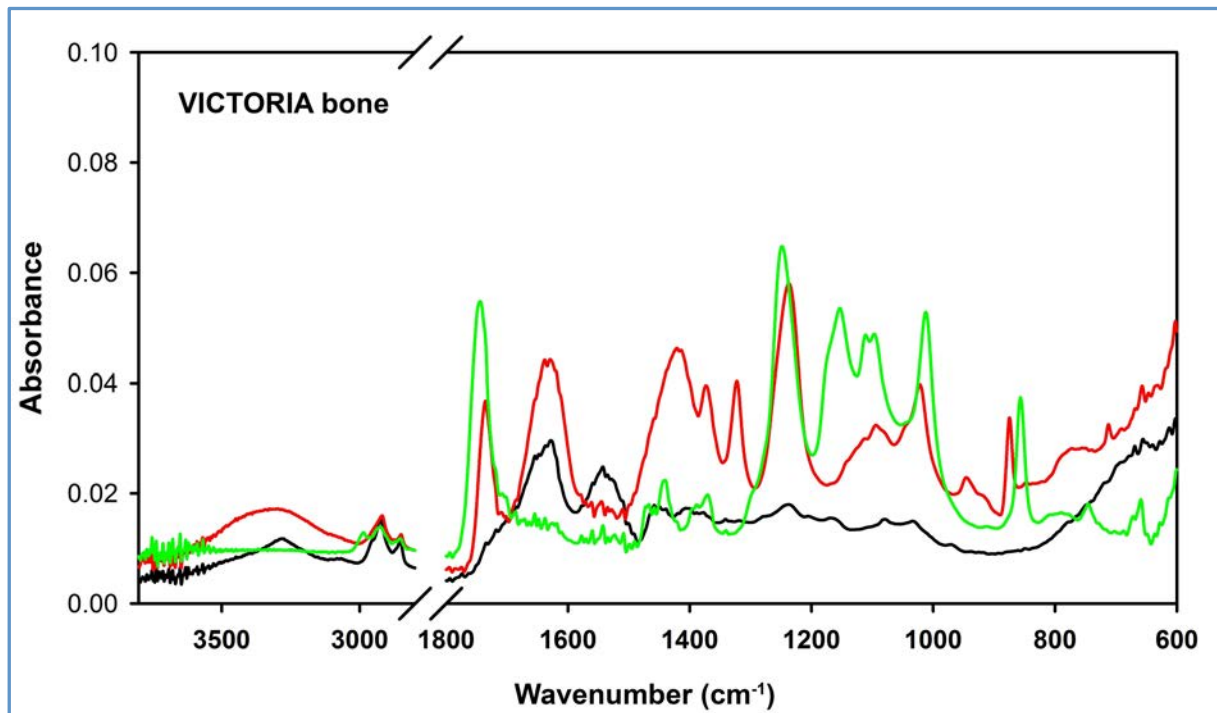


Fig. 11 Spectrum MIR type (here a bacteria) with its second derivative (in blue)

Spectral analysis

The individual spectra are first analyzed to better identify their biochemical components (proteins, fats, sugars, ...). To account for spatial heterogeneities (at mm scale), several acquisitions (3 to 5) were performed on each sample. The most representative spectra are presented. For all samples, both sides were analyzed..

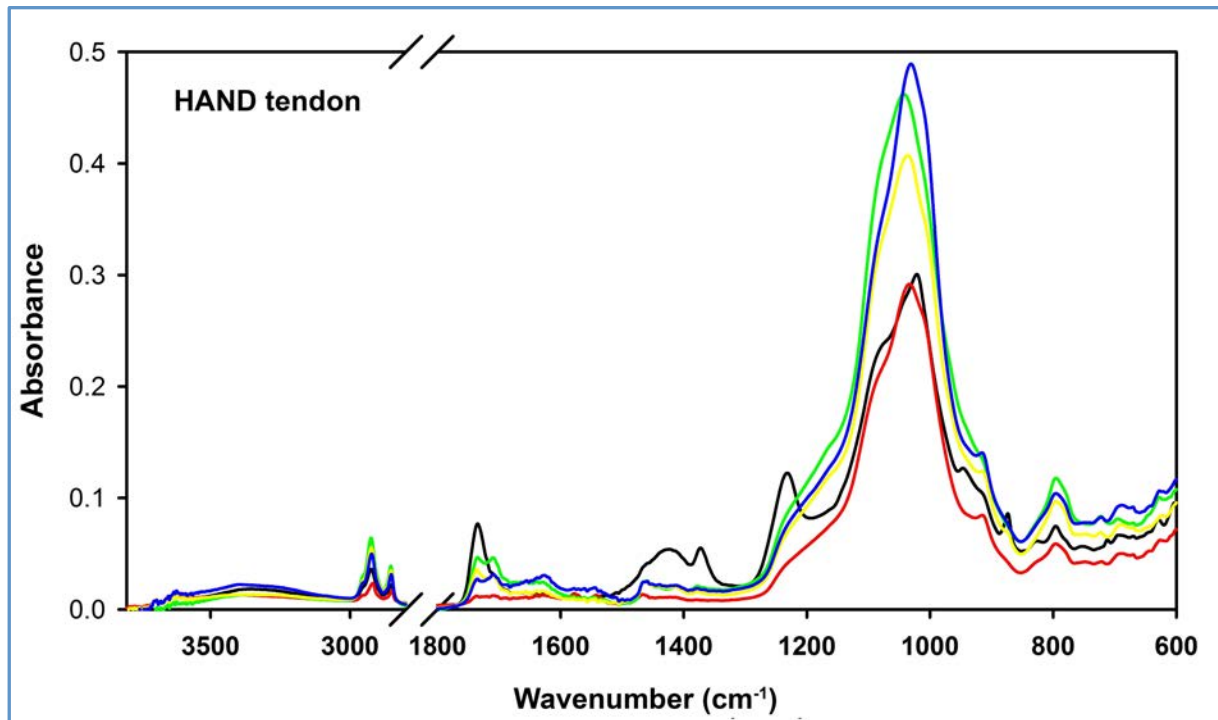
Fig. 12 VICTORIA's bone



This sample has a very irregular face (left Fig.1, black and red spectra) and a clearly alveolated face (right Fig.1, green spectrum).

The irregular face is heterogeneous with the presence of proteins (amides I and II) at 1540 and 1650 cm⁻¹, mineralized tissue (carbonate band CaCO₃⁻ at 860-870 cm⁻¹) and esterified lipids (1740, 1420, 1320 and massive 2800-3000 cm⁻¹). The honeycomb face is dominated by lipids with a very important ester band and an intense 1240 band. The 1010 band should reflect the phosphate group that is characteristic of bone tissue. The latter must be linked to the alveolar structure clearly visible in Fig.1 (right).

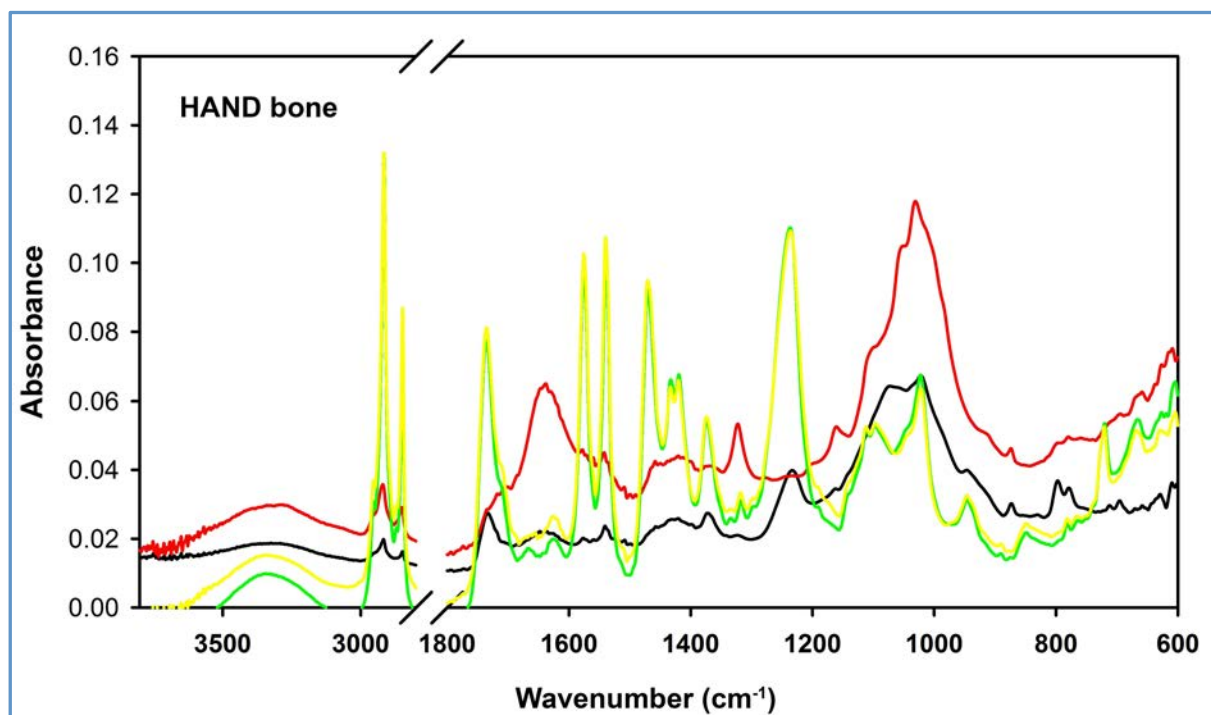
Fig. 13 Hand Tendon



The "Hand tendon" spectra (Fig.2) collected on each of the faces (blue-green-yellow vs black-red) are qualitatively close except a stronger contribution of the phosphocalcic matrix. (Mass at 1030 cm⁻¹ and band at 800 cm⁻¹) Lipids are detectable at 1740 and 2800-3000 cm⁻¹. The 1230 cm⁻¹ band cannot be uniquely assigned.

The lack of signature of the characteristic tendon proteins (collagen and elastin) suggests that these constituents have been destroyed or that the sample does not specifically correspond to this tissue but rather to bone tissue.

Fig. 14 Hand Three Fingered Bone



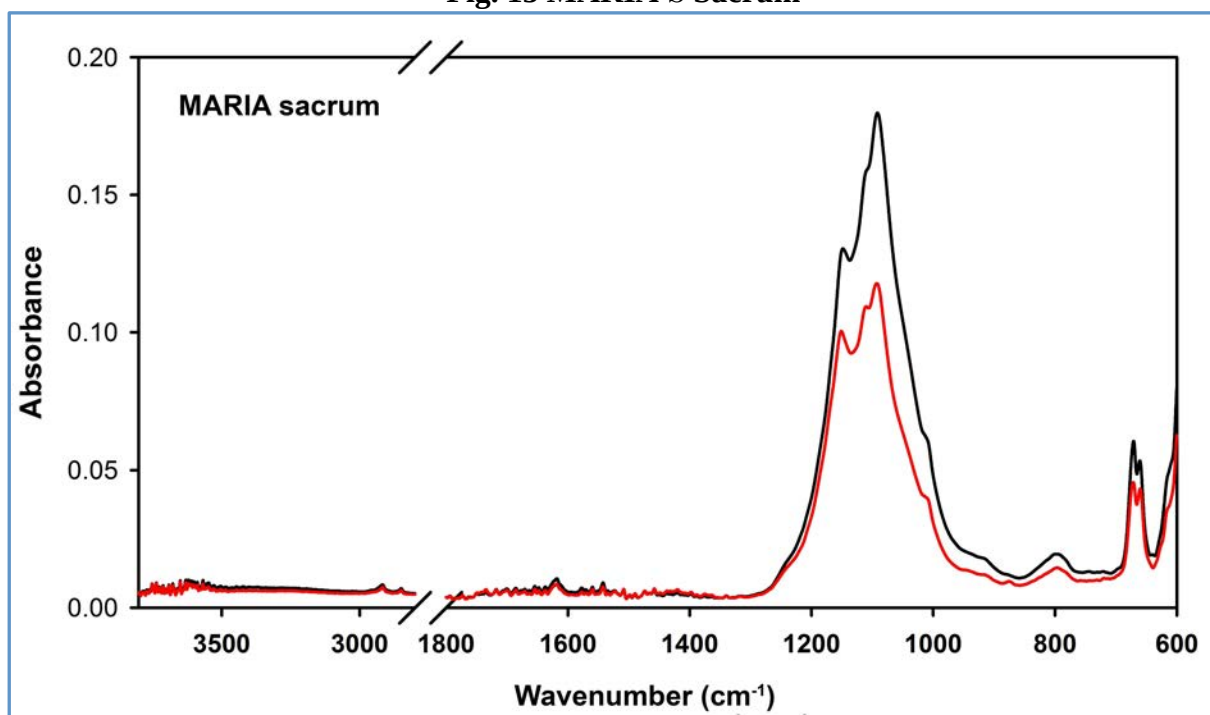
This sample (FIG. 3) has a relatively unified and smooth appearance on one of these faces for two fragments, whereas the opposite face has a fibrous appearance. We will consider that the smooth side corresponds to the external surface of the bone, the fibrous aspect to the internal face.

The black and red spectra correspond to the external face. These spectra are dominated by a broad and intense band (1030 cm^{-1}) representing the vibration of the phosphate groups (PO_4^{3-}) characteristic of the phosphocalcic mineral matrix of the bone. The shoulder and small peak around 880 cm^{-1} reflect carbonates. The 1640 cm^{-1} band is representative of collagen, which is the most abundant protein in bone. The band at 1320 cm^{-1} (visible on the red spectrum) and the bands between 2800 and 3000 cm^{-1} reflect lipids (fats).

Spectra acquired on the inner side of the bone are in turn largely dominated by lipids, which are the major constituents of the bone marrow. Presence of triglycerides in high concentrations is signed by intense bands between 2800 and 3000 cm^{-1} (methylene groups CH_2 and methyl CH_3 fatty acids) and at 1740 cm^{-1} (bond $\text{C}=\text{O}$ ester glycerol-fatty acid triglycerides). There is also an intense band at 1240 cm^{-1} which signals the asymmetric vibration of CH_2 in phospholipids.

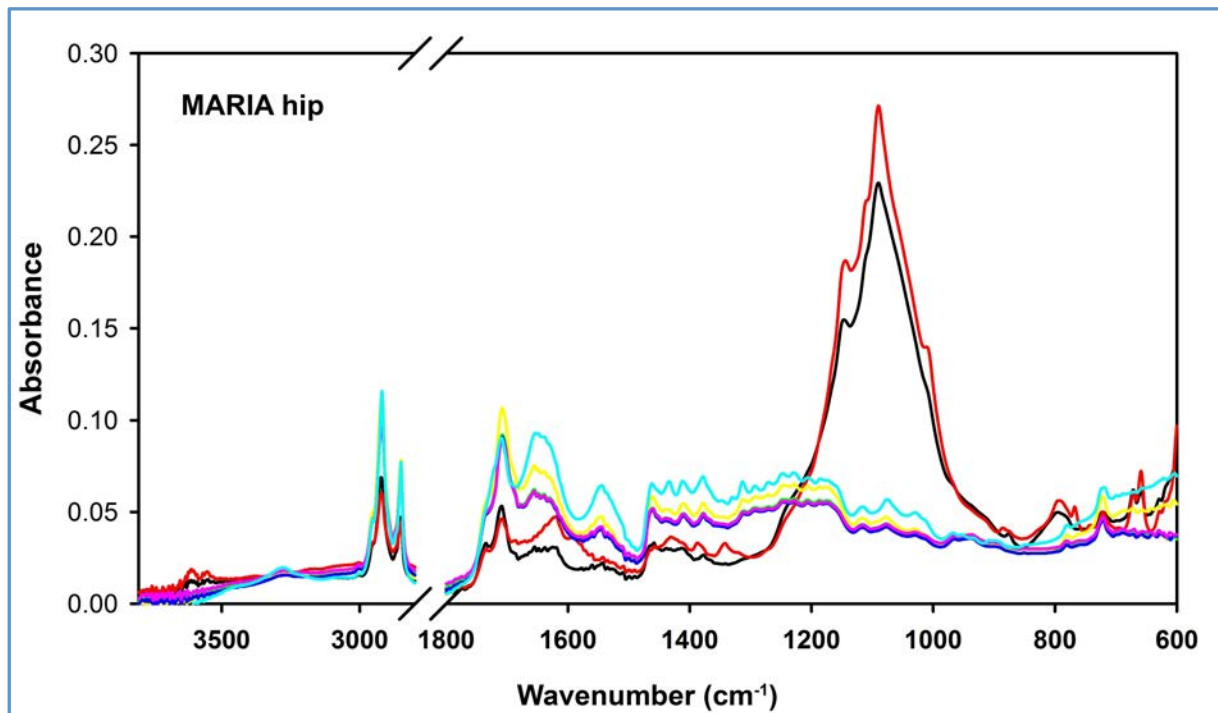
In contrast to the outer surface, the proteins are virtually absent while the phosphocalcic band (1030 cm^{-1}) is twice less intense.

Fig. 15 MARIA'S Sacrum



The MIR spectrum of this sample (Fig.4) is dominated by the massive at 1030 cm⁻¹ which shows the bone tissue. No trace of lipids or proteins is detected. It is worth mentioning a doublet at 660-670 cm⁻¹ which is generally attributed to the sulfur group S=O. Presence of sulfur is not recorded in the mineral part of the bone. This attribution may therefore be subject to caution.

Fig. 16 MARIA'S Hanche



This sample has two faces of different aspects. The face shown in FIG. 5 (right) is mainly characterized by a phosphocalcic band at 1030 cm⁻¹ (black and red spectra) with a visible lipid contribution between 2800 and 3000 cm⁻¹. The other side (yellow, cyan, magenta and blue spectra) is essentially lipidic nature (2800-3000 and 1710 cm⁻¹) with a presence of proteins visible by amide I (1640 cm⁻¹) and II (1540 cm⁻¹) characteristics of these macromolecules.

We thus find the characteristics of the bone tissue with one side essentially mineral and the other marked by the lipids of the bone marrow.

Comparative analysis

In order to have reference tissues as close as possible to the samples, different tissues (chicken and snake moults) were analyzed. The chicken tissues were previously placed in a vacuum desiccator for two months in the presence of silica gel. The snake moults were analyzed as their own. The different spectra obtained are presented below.

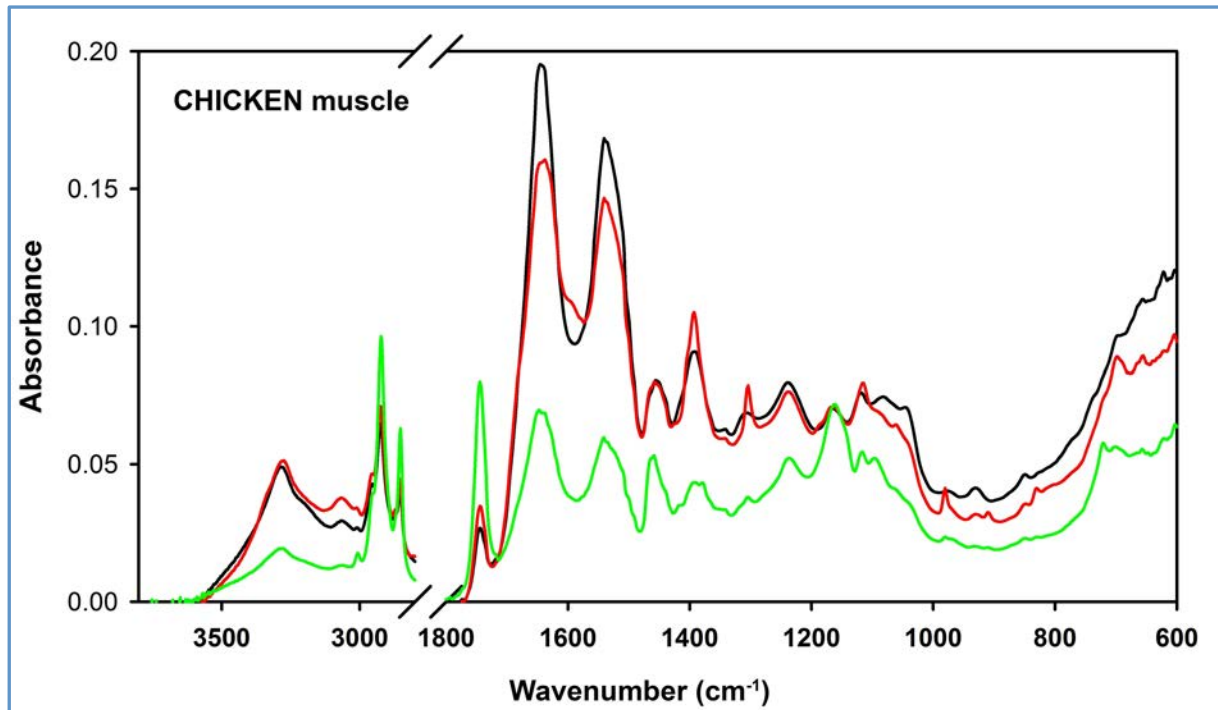


Fig. 17

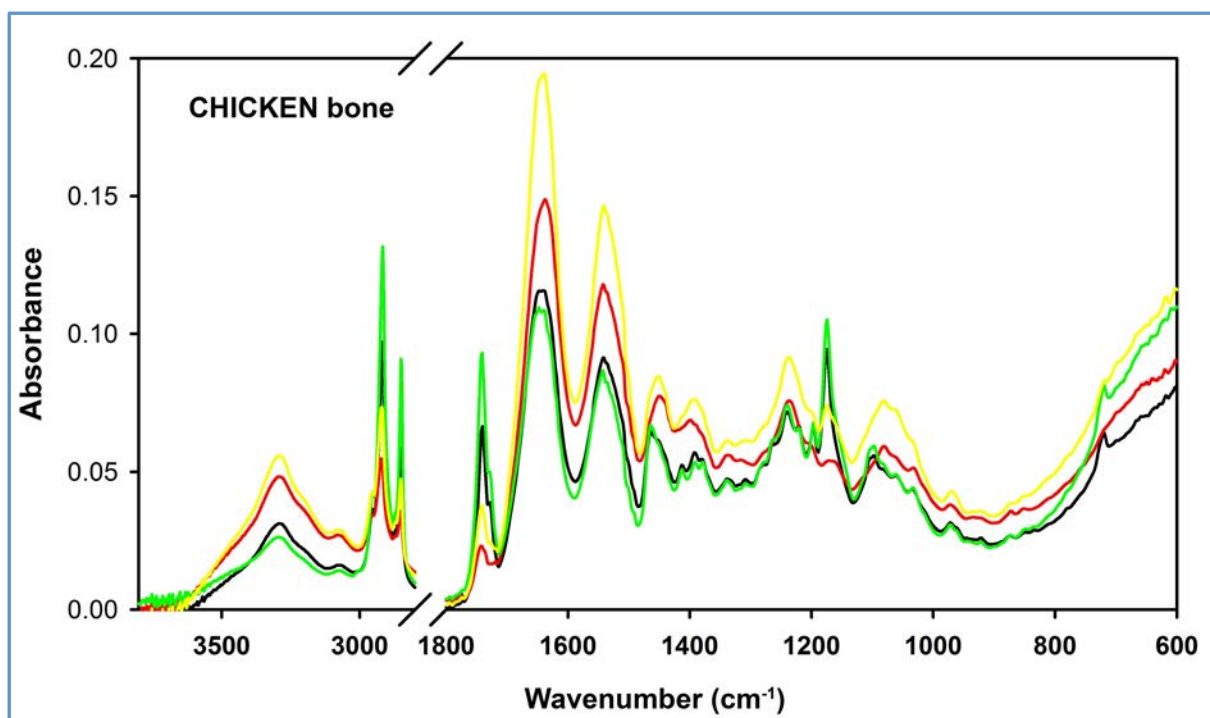


Fig. 18

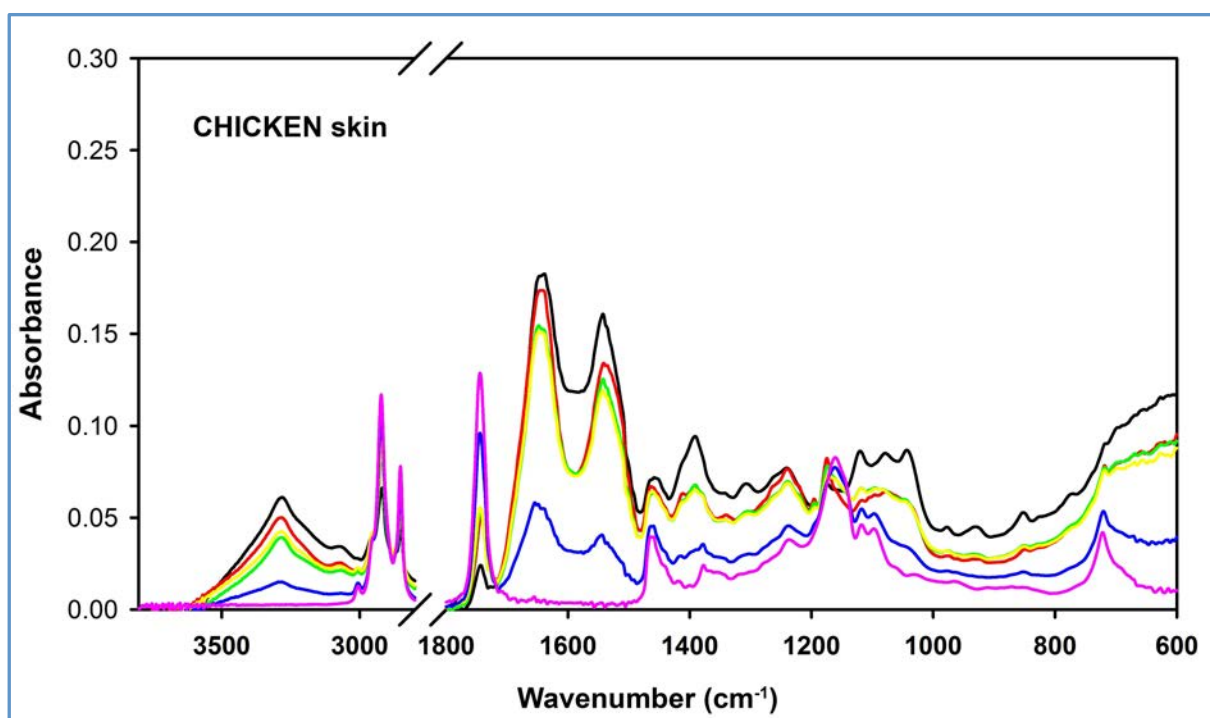


Fig. 19

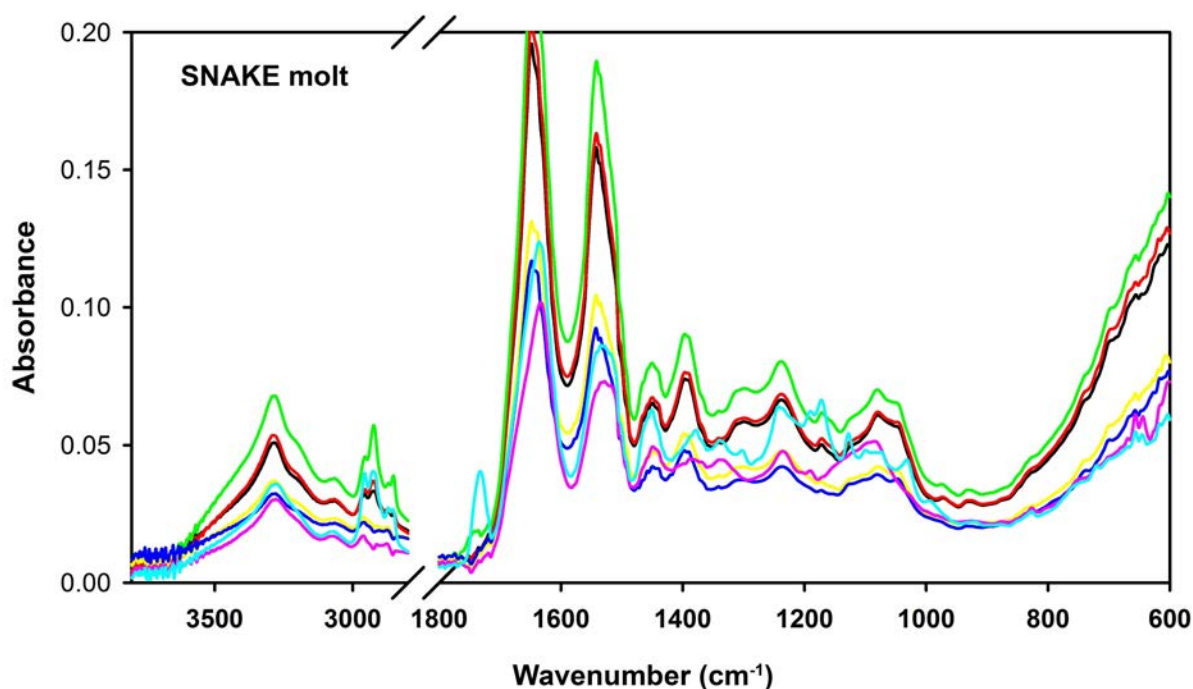


Fig. 20

The highlight of these comparisons between mummy samples and *reference* samples is the near absence (or low concentration) of the proteins found in the mummy samples. This fact could be explained by a chemical degradation of the proteins which would result in a lysis of the peptide bonds which connect the amino acids to each other (a protein is a polymer of amino acids). Indeed, as mentioned above, the peptide bond absorbs in MIR at 1640 and 1540 cm^{-1} . These "Proteins" bands are only visible in samples from Maria and Victoria's hip.

It will also be noted that the internal faces of the analyzed bones have a honeycomb structure.

In order to highlight the similarities and di-similarities between samples, a principal component analysis (PCA) was performed. This analysis, by making it possible to reduce the dimensionality of the MIR spectra, makes it possible to calculate an "Euclidean distance" between two spectra represented in a space (here) with two dimensions. The distance between two bipoints reflects the greater or lesser proximity between two samples. The figures below, called factorial maps, show the distribution of individuals (spectra).

Samples codes:

VH E/I	Victoria's Bone (hip) External face/ Internal
MT	Hand Tendon
MO E/I	Hand Bone Facial External / Internal
MS	Maria's Sacrum
MH E/I	Maria's hip External face / Internal

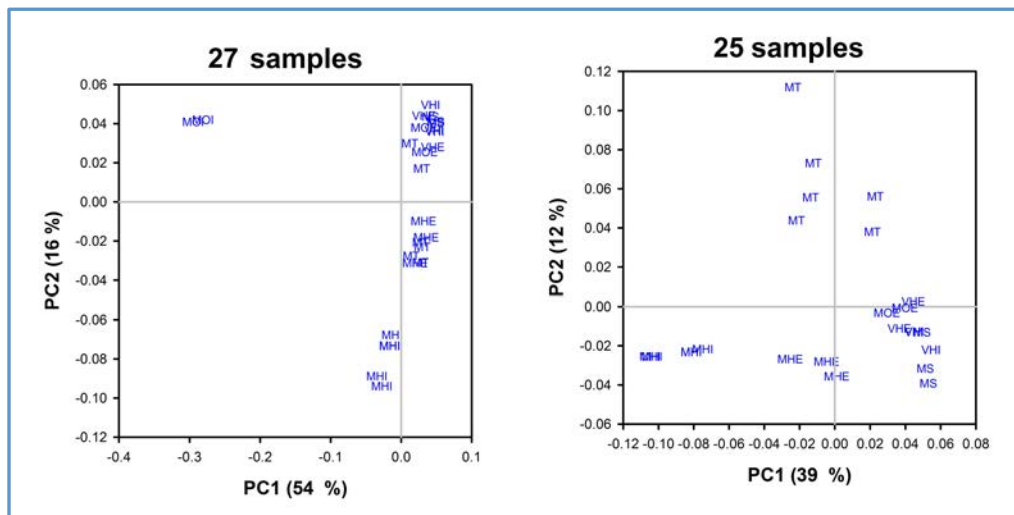


Fig. 21

Figure 21 (Left) shows the factorial map of all samples from the mummies. It is very clear that the MOI (Hand Bone internal face) samples are very different from all the others. These differences are evident when comparing their negative (x-coordinate) scores (about -0.3) to the zero-scores of the other samples. The percentage displayed on each axis represents the % variability represented by a given main component; 54% for PC1 and 16% for PC2 in this case.

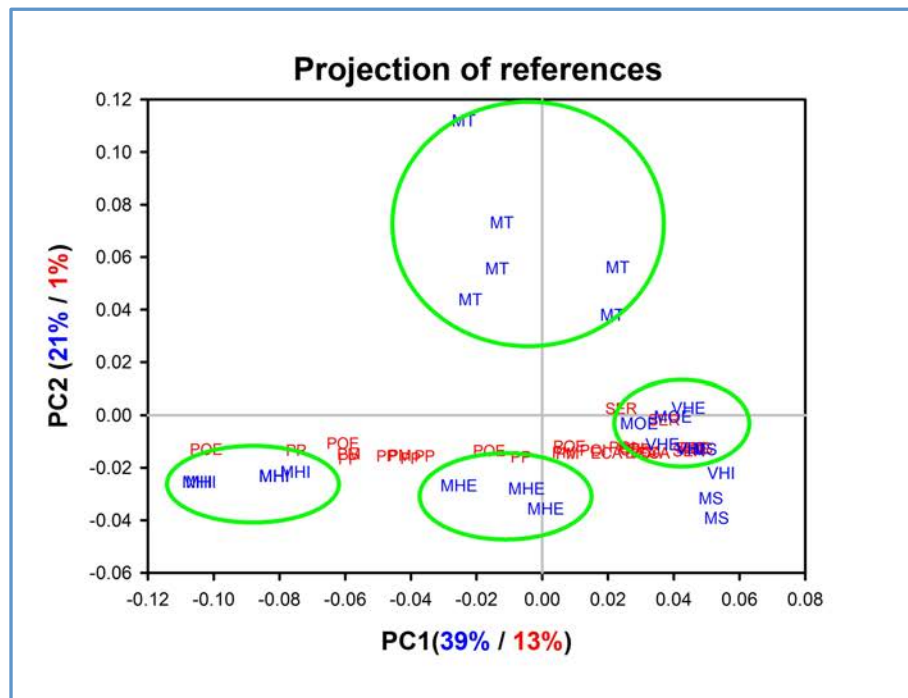
A second PCR was therefore performed to "dilate" the other samples; this is what Figure 21 right represents. The MT samples form a distinct cloud (or cluster), as well as the MHI and MHE samples. The MOE, VHE / VHI and MS samples are close to each other.

A first observation is that Maria's and Victoria's hip samples are distinct. Secondly the outer side of the tridactyl Hand Bone (MOE) is close to HEV, a little less than MS..

To locate these samples against a set of "references" the dehydrated samples of chicken and snake moults were projected on the factorial map constructed from the only samples from the mummies.

For references, the codes are:

PO E / I	Chicken Bone Face
External/ Internal PP	Chicken Skin
PM	Chicken muscle
ECA	Scale moults of viper
TEG	Tegument moults of viper
SER	Internal face of the viper moults



These "references" are here projected in red. We see that they have very low scores along the PC2 (y) axis and that this axis only shows 1% of the variability of these references. This means that these samples are poorly described by the PC2 model. This is not the case with PC1 although the representativeness of CP1 remains low (13%).

Although these "reconciliations" are unreliable, we note the proximities of the MOE (Hand External Bone) sample with viper moult samples.

General conclusions

1. The spectral analysis carried out in the context of the present report demonstrate beyond any doubt that the samples submitted correspond to highly dehydrated biological samples.
2. Only the nature of the tissue corresponding to Hand Tendon seems to correspond more to bone tissue than to a tendon, this type of tissue being essentially composed of proteins, collagen for the most part. This may be similar to bone tissue which, as noted, has low or non-detectable levels of protein.
3. Attempts to reconcile with dehydrated samples in the laboratory are inconclusive. It would be interesting to be able to compare the viper moult spectra with a skin sample of the reptilian species.
4. The Hand Bone (MOE) sample seems to be closer to Victoria's (HEV) than Maria's; this point is to be checked because the expert is not aware that the Hand Bone sample has been identified as belonging to a particular species.
5. If more precise assignments are needed, they should be based on a larger number of samples with a precise knowledge of the type of tissue. This applies to the samples of the mummies because, as we have seen, the comparison with dehydrated samples in the laboratory is inconclusive.
6. The point about proteins, very little present, would also be to invest on proven samples like muscle.

Fait à Vannes, le 30 juillet 2019
Olivier SIRE
Expert

Olivier SIRE, expert près la cour d'appel de Rennes
La cour d'appel de Rennes
En Analyses physico-chimiques, biologiques et Industries-Agro-Alimentaires

RAPPORT D'EXPERTISE

Demandeur : M. Thierry JAMIN

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

Rappel de la Mission

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

La présente expertise vise donc à analyser ces fragments momifiés.

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

Les prélèvements étaient répertoriés comme suit :

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

Méthodologie de l'expertise

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



Fig.1 VICTORIA HUESO (deux faces)



Fig. 2 MAIN TENDON (deux faces)

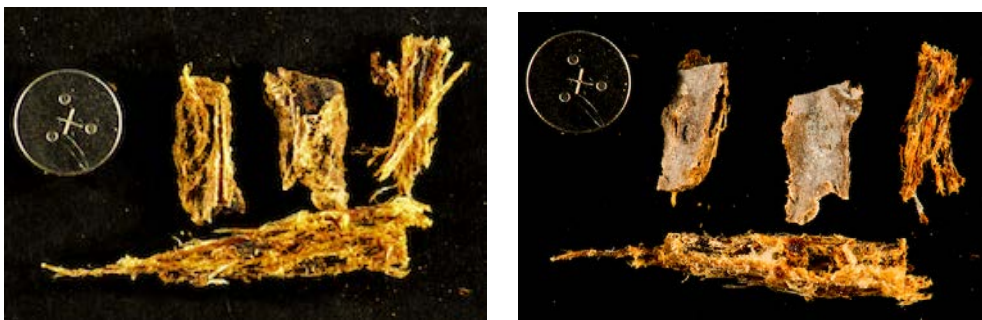


Fig. 3 MAIN OS TRIDACTYLE (deux faces)

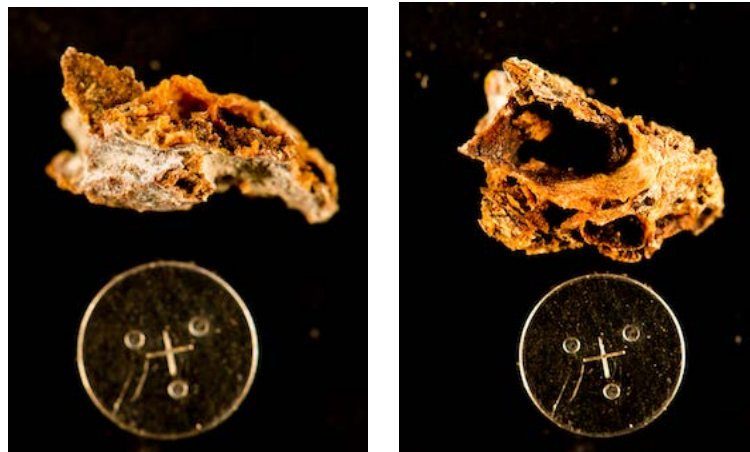


Fig. 4 MARIA SACRUM (deux faces)

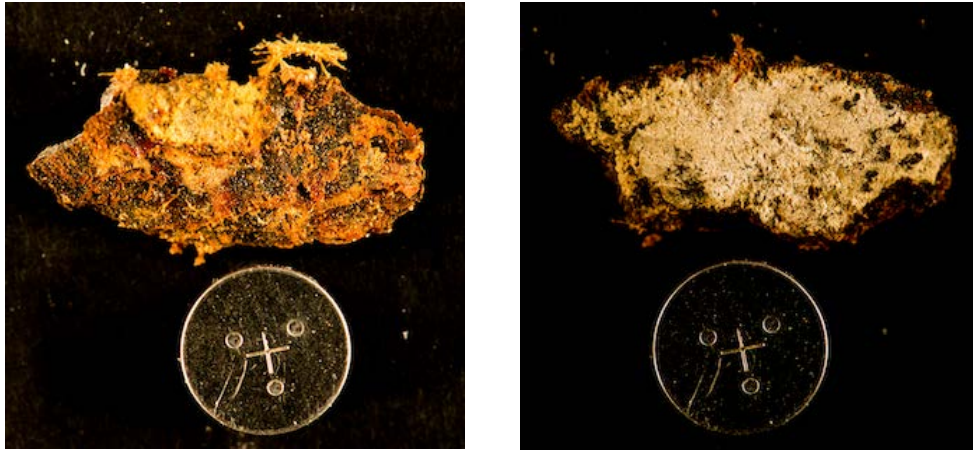


Fig. 5 MARIA HANCHE (deux faces)

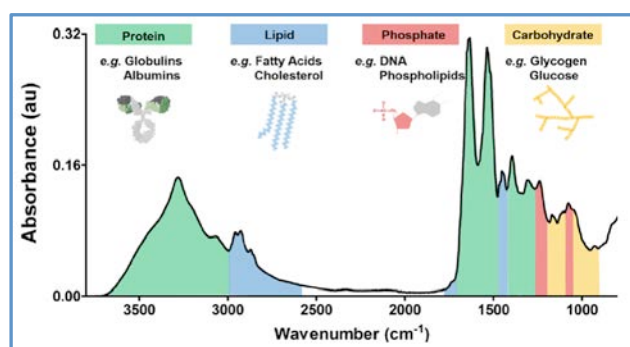
Analyses spectroscopiques infrarouge

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



FIG. 6 Micropsectrophotomètre LUMOS

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



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

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



Fig. 7 Mue de vipère (*D. palestinae*)



Fig. 8 Muscle déshydraté de poulet



Fig. 9 OS de Poulet (Deux faces)



Fig. 10 Peau déshydratée de poulet (deux faces)

Acquisitions Infrarouge

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

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

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

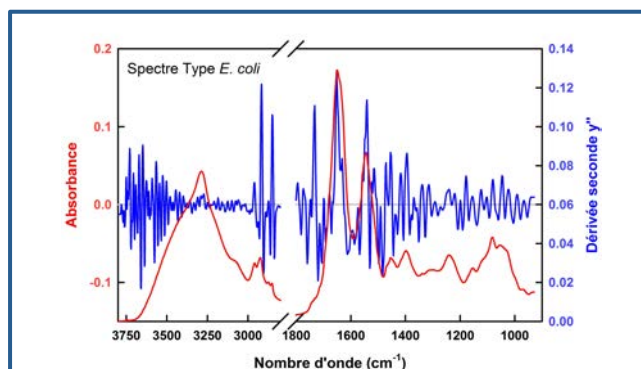
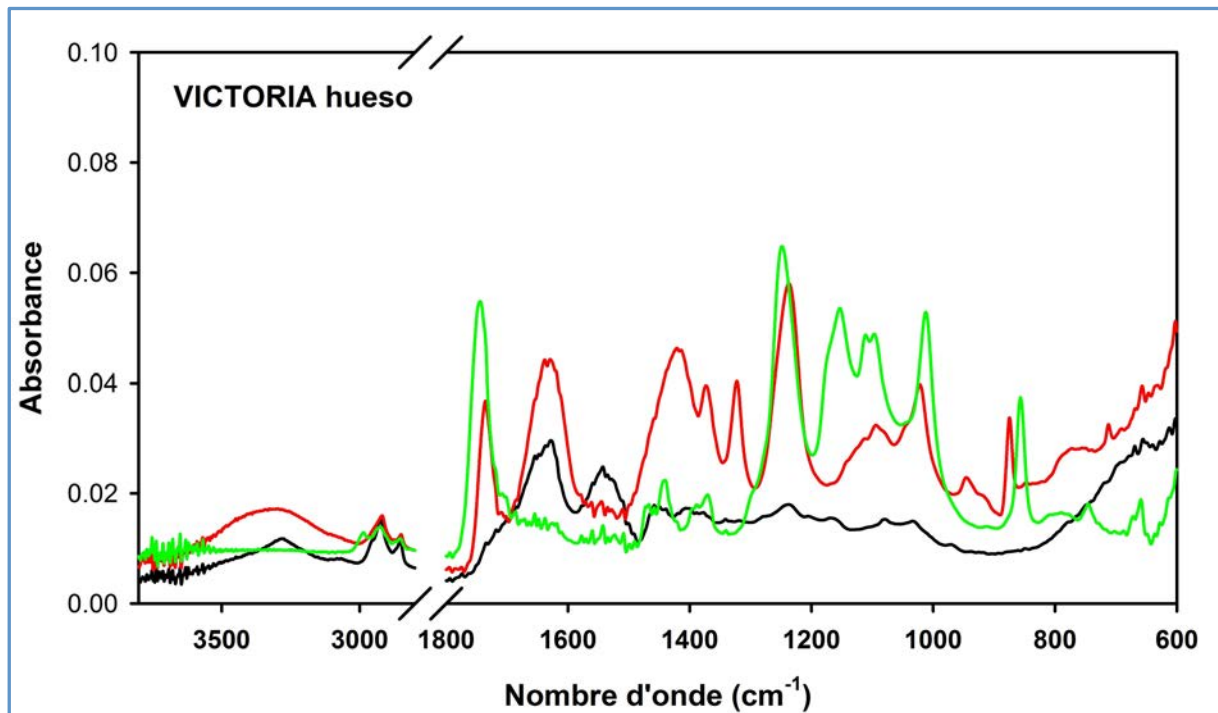


Fig. 11 Spectre MIR type (ici de bactérie) avec sa dérivée seconde (en bleu)

Analyses Spectrales.

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

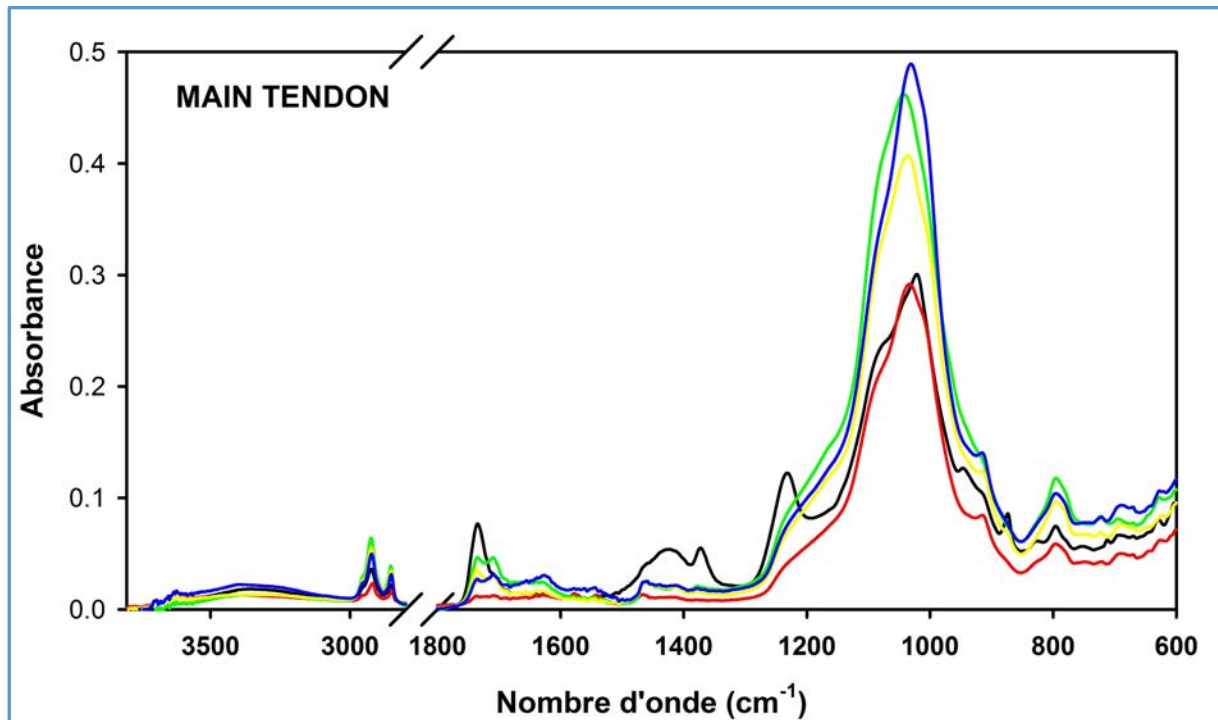
Fig. 12 VICTORIA Hueso



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

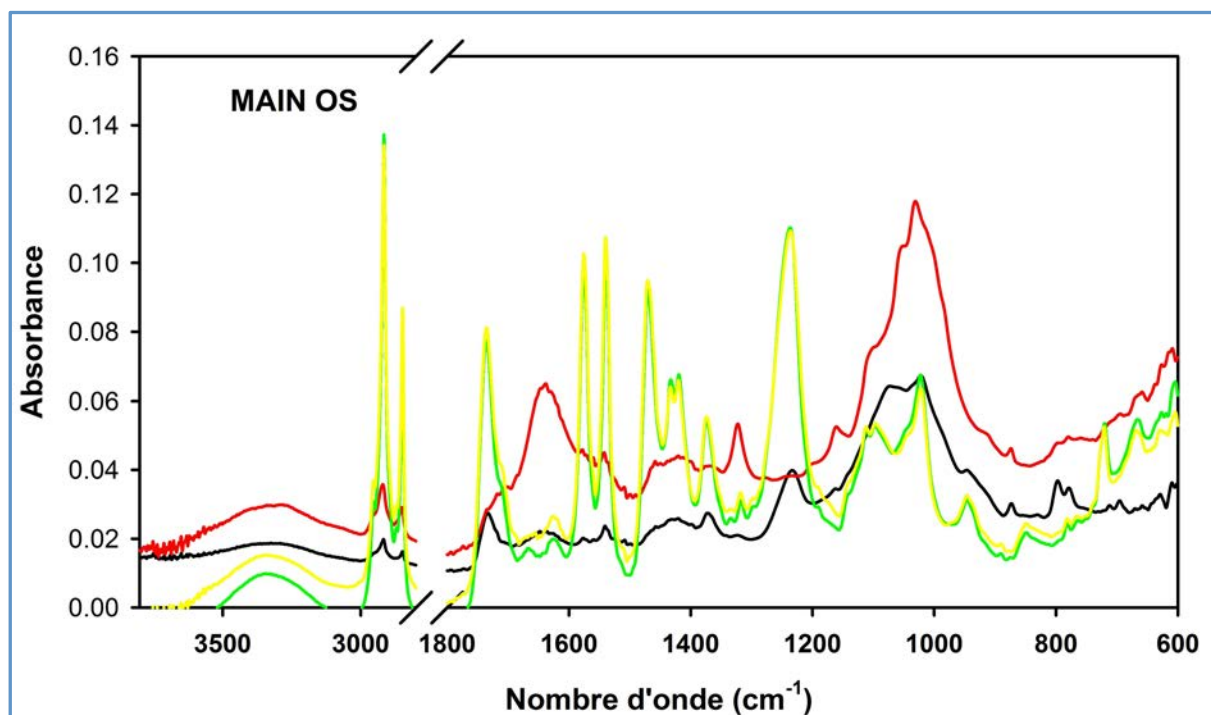
La face irrégulière est hétérogène avec présence de protéines (amides I et II) à 1540 et 1650 cm⁻¹, de tissu minéralisé (bande des carbonates CaCO₃ à 860-870 cm⁻¹) et des lipides estérifiés (1740, 1420, 1320 et massif 2800-3000 cm⁻¹). La face alvéolée est dominée par les lipides avec une bande ester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

Fig. 13 Main Tendon



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

Fig. 14 Main Os tridactyle



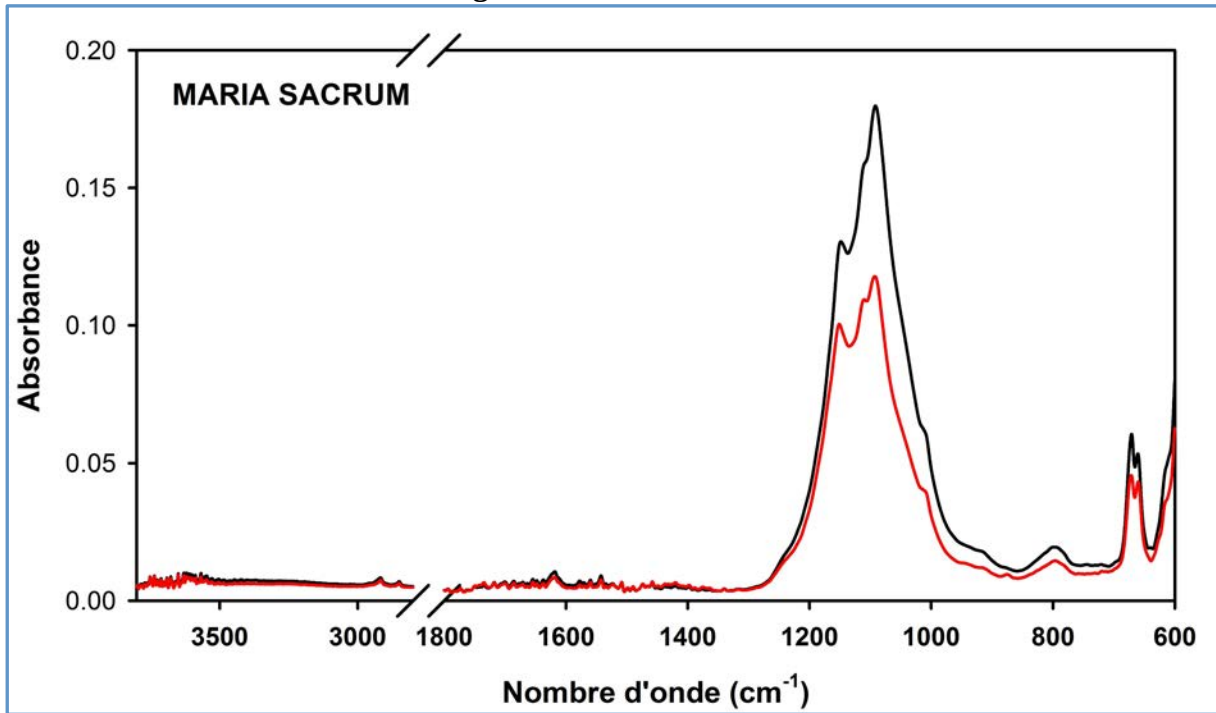
Cet échantillon (Fig.3) présente un aspect relativement uni et lisse sur une de ces faces pour deux fragments, tandis que la face opposée a un aspect fibreux. On considèrera que la face lisse correspond à la face externe de l'os, l'aspect fibreux à la face interne.

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

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

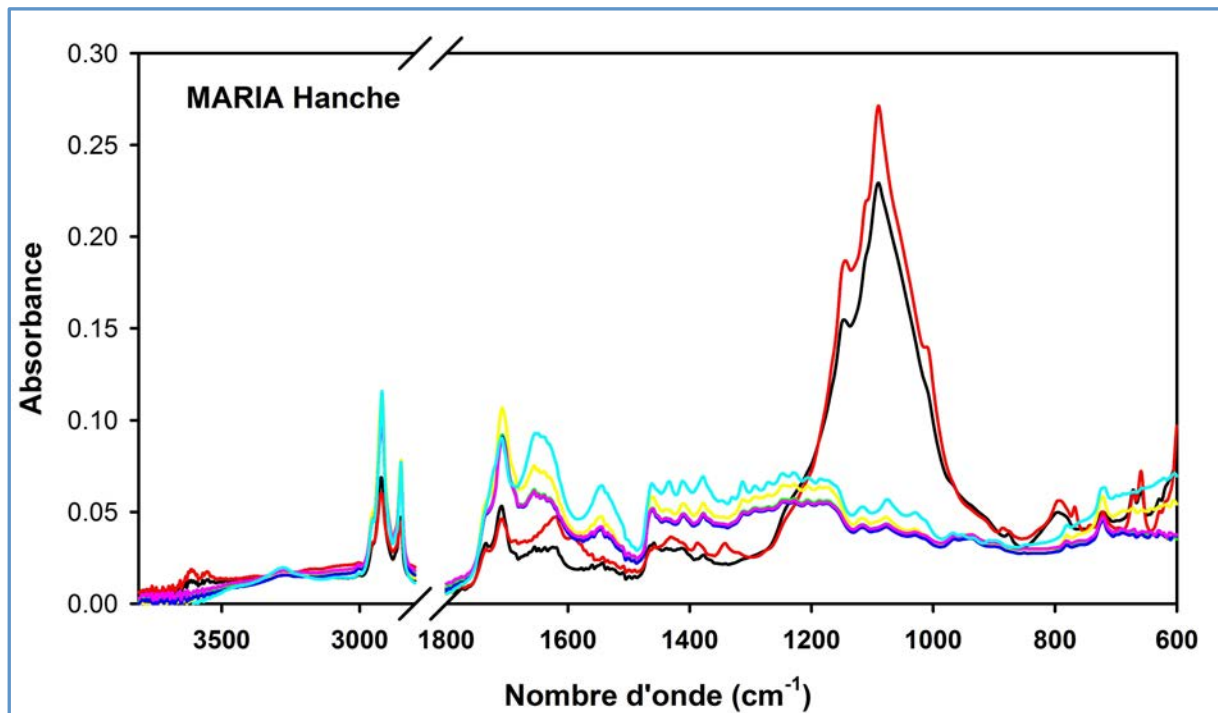
Par contraste avec la face externe, les protéines sont virtuellement absentes tandis que la bande phosphocalcique (1030 cm^{-1}) est deux fois moins intense.

Fig. 15 MARIA Sacrum



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

Fig. 16 MARIA Hanche



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

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

Analyses comparatives

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

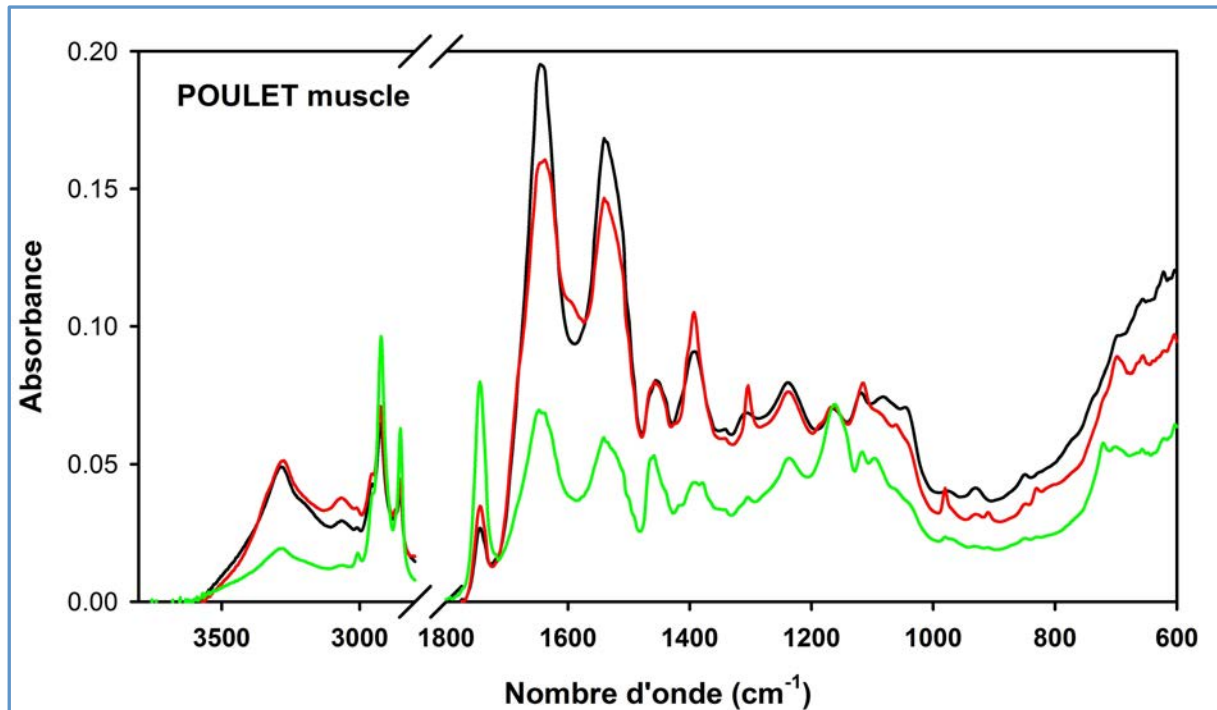


Fig. 17

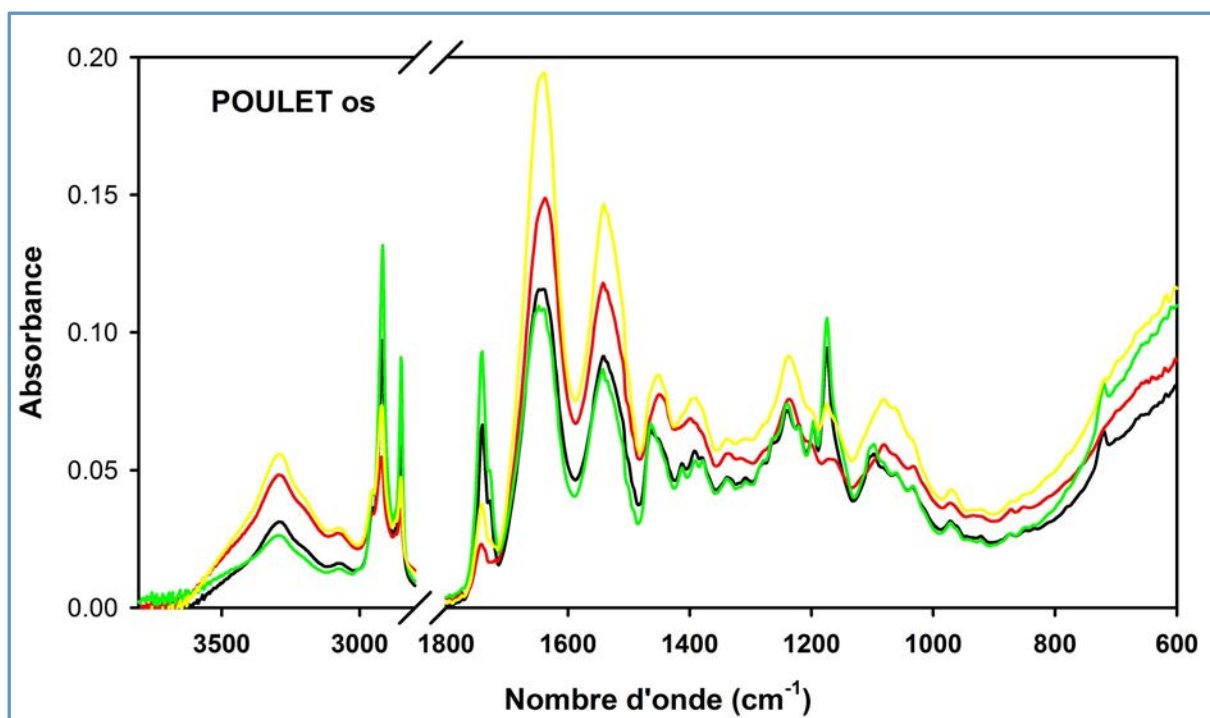


Fig. 18

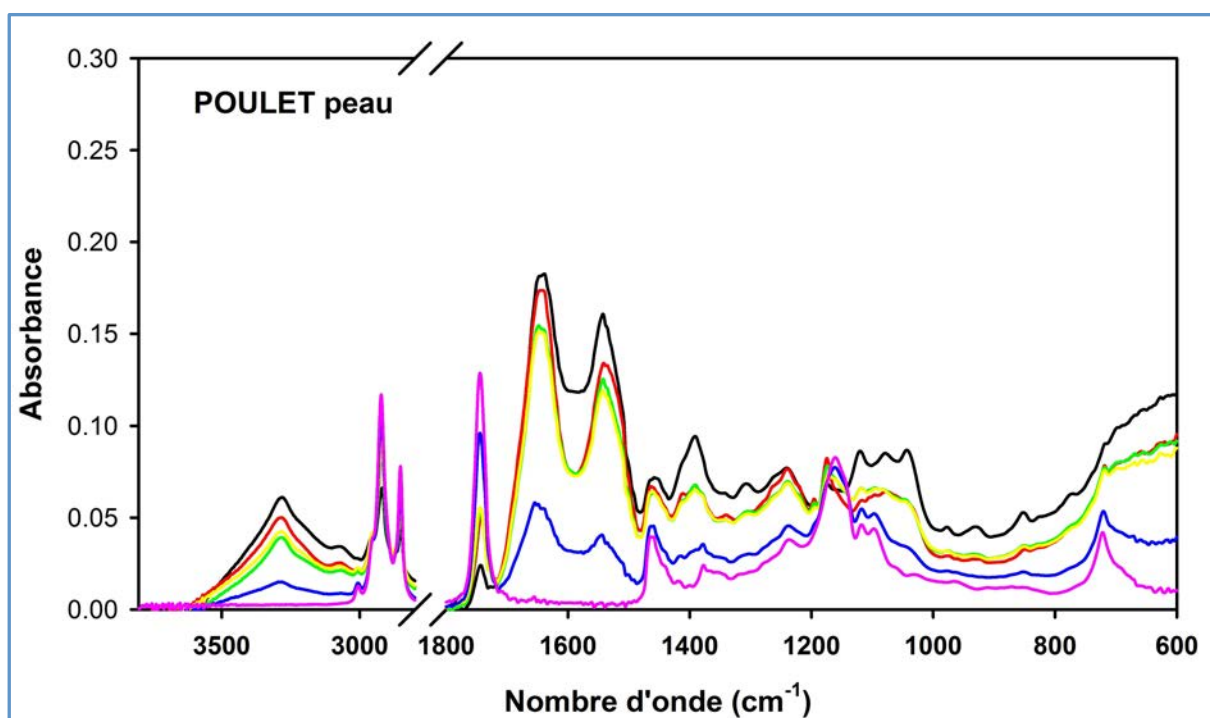


Fig. 19

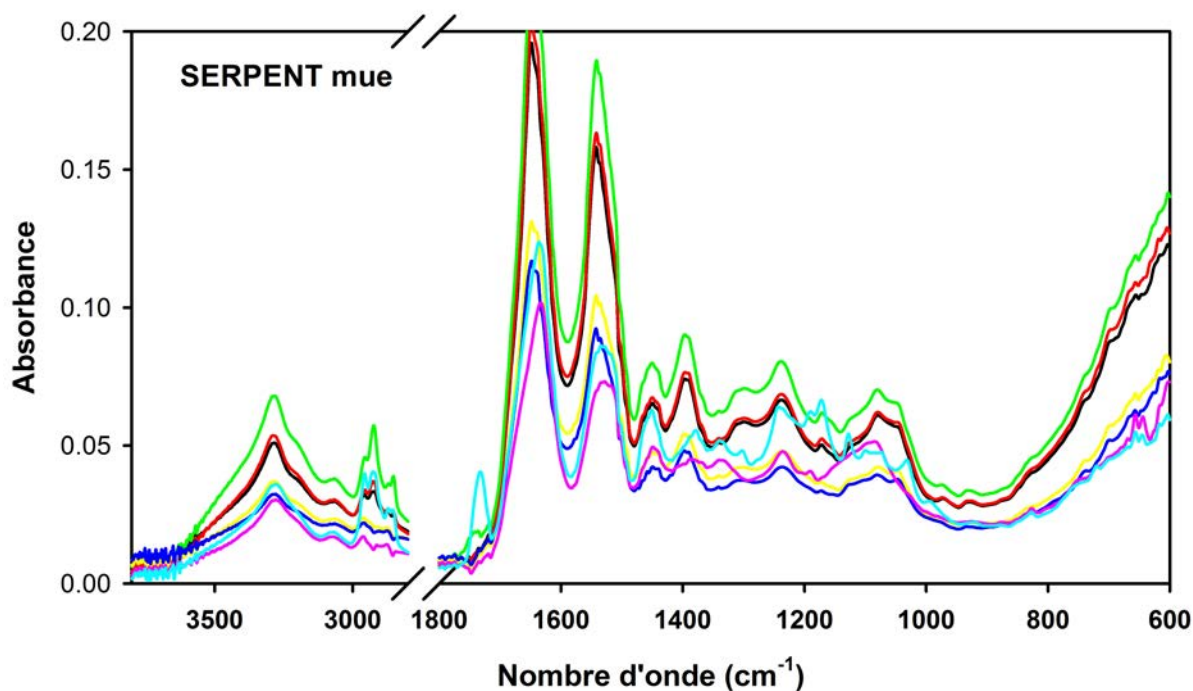


Fig. 20

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

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

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

Codes échantillons :

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

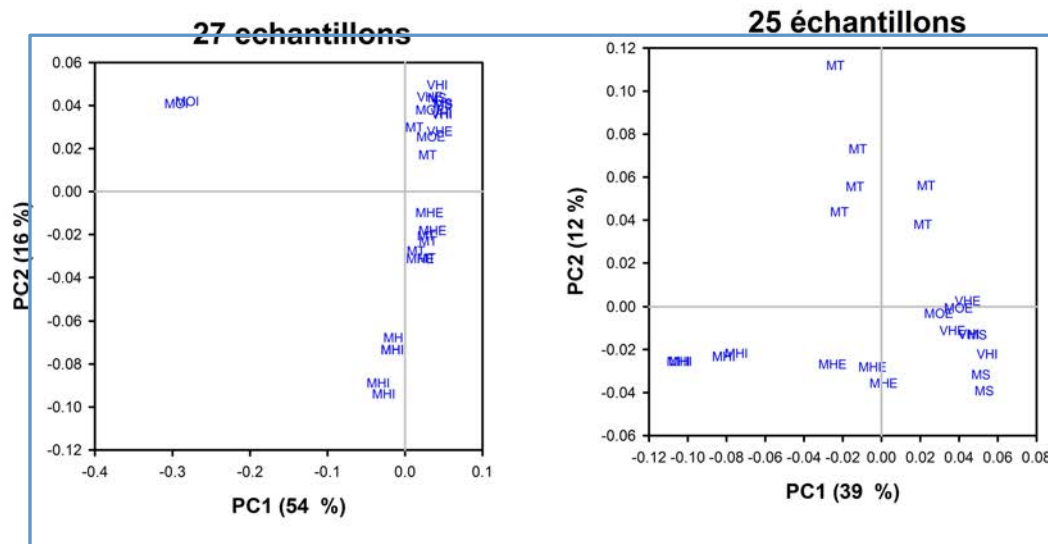


Fig. 21

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

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

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

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

Pour les références, les codes sont :

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

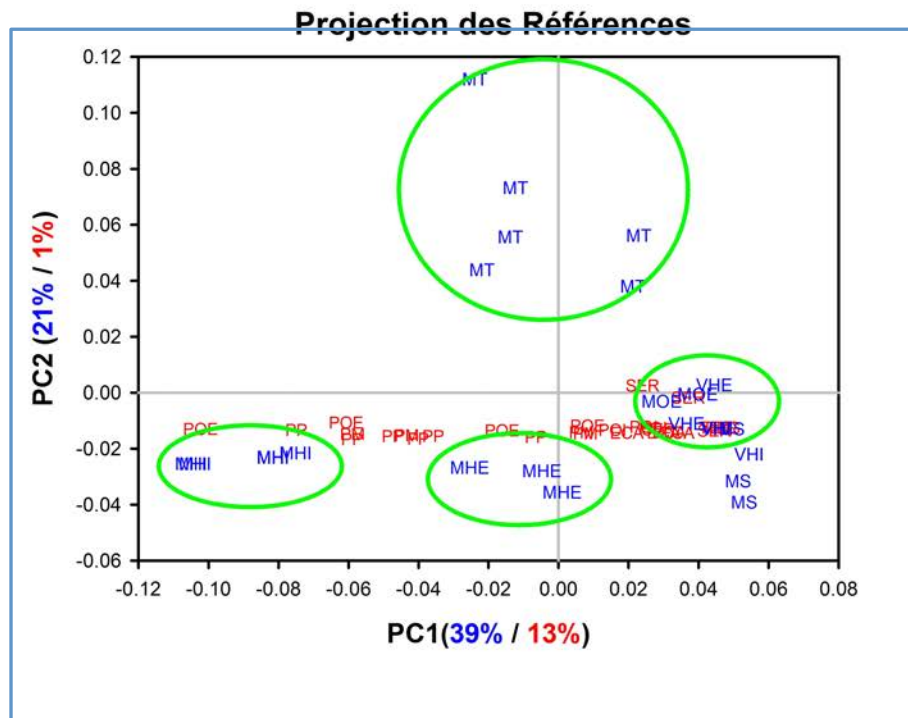


Fig. 22

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

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

Conclusions générales

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

Fait à Vannes, le 30 juillet 2019
Olivier SIRE
Expert

Olivier SIRE, Perito en el Tribunal de Apelación de Rennes
El Tribunal de Apelación de Rennes
En Análisis Psicoquímico, Biológico y Alimentario-Industrial

Traduction: Antoine Bruno

INFORME PERICIAL

Solicitante : Sr. Thierry JAMIN

Recordatorio de Misión.....	2
Metodología de peritaje.....	2
Análisis espectroscópicos por infrarrojos.....	4
Adquisiciones por infrarrojos.....	6
Análisis espectral.....	6
Análisis comparativos.....	12
Conclusiones generales.....	17

Recordación de la Misión

Como parte de "The Alien Project", cinco muestras de diferentes partes del cuerpo de momias encontradas en el sitio de Nazca (Perú), me fueron enviadas para examinar su composición molecular mediante espectroscopia infrarroja media. Esta técnica identifica la composición (bio)química de cualquier muestra compuesta de materia orgánica. Por lo tanto, esta experiencia tiene como objetivo analizar estos fragmentos momificados.

Los análisis se llevaron a cabo en el Instituto de Investigación Dupuy de Lôme (UMR CNRS 6027) en Vannes, Francia.

Las muestras se enumeraron de la siguiente manera:

- 01 - VICTORIA HUESO (cadera)
- 02 - MANO TENDÓN (tridáctila)
- 03 - MANO HUESO
- 04 - MARIA SACRO
- 05 - MARIA CADERA

Metodología de peritaje

Las cinco muestras se enviaron en pequeños tubos o viales de plástico. Un primer paso fue hacer fotos de gran aumento de ellos. Las fotos de abajo fueron obtenidas con una cámara Nikon D610 y un objetivo MACRO NIKKOR105 1:2.8. Para indicar la escala, se fotografió sistemáticamente una pila de botón de 8 mm de diámetro con los objetos. Las imágenes de alta resolución están disponibles en un archivo comprimido separado de este informe.



Fig.1 VICTORIA HUESO (dos lados)



Fig.2 MANO TENDÓN (dos lados)



Fig. 3 MANO HUESO TRIDÁCTILA (dos lados)

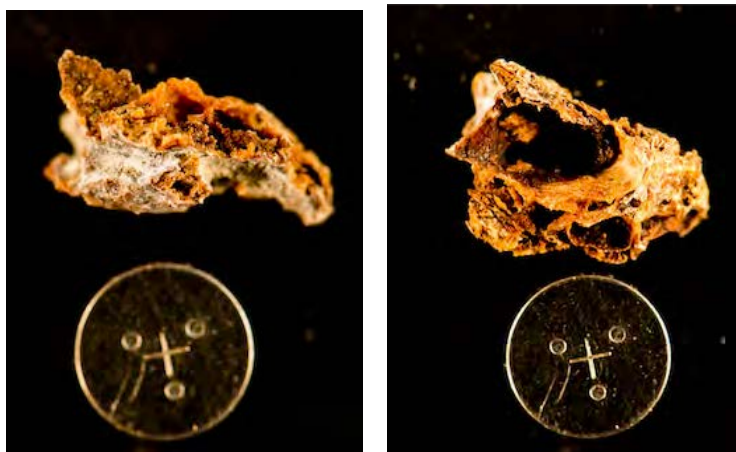


Fig. 4 MARIA SACRO (dos lados)



Fig. 5 MARIA CADERA (dos lados)

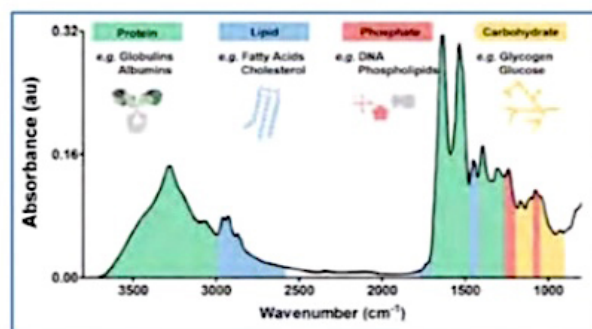
Análisis espectroscópicos infrarrojos.

Las muestras se analizaron luego en espectroscopía de infrarrojo medio (MIR) utilizando un microscopio infrarrojo Lumos (Bruker) en modo micro ATR.



FIG. 6 Microspectrofotómetro LUMOS

Típicamente, esta espectroscopia de absorción permite identificar los grupos químicos presentes en la muestra de interés a través de sus modos vibracionales. Los grupos químicos (O-H, C-C, N-H, N-H, N-H, C=O, etc....) tienen diferentes bandas de absorción en su posición en el espectro en función de la masa de los átomos que están conectados por un enlace químico



covalente y del tipo de enlace (simple o doble). La figura anterior muestra los principales dominios espectrales que reflejan las contribuciones respectivas de proteínas, lípidos (grasas), azúcares o ácidos nucleicos (ADN, ARN).

Para fines de comparación, se analizaron diferentes muestras de "referencia". Estas incluyen muestras de músculo, piel y hueso de pollo colocadas en un desecador durante dos meses y una muda de víbora (*Daboia palestinae*). Las imágenes correspondientes se muestran a continuación.



Fig. 7 Muda de víbora (*D. palestinae*) Fig. 8 Músculo de pollo deshidratado



Fig. 9 Huesos de pollo (dos lados)



Fig. 10 Piel de pollo deshidratada (dos lados)

Adquisiciones de infrarrojos

Las distintas muestras se analizaron mediante microspectroscopia MIR en modo ATR de reflexión simple utilizando un cristal de germanio. Las muestras entran en contacto con el cristal; el área de muestreo es de unos $2.000\text{ }\mu\text{m}^2$ sobre un espesor de $2\text{-}3\text{ }\mu\text{m}$; por lo tanto, se trata esencialmente de un análisis de superficie.

Para cada análisis, se promedian 128 espectros con una resolución espectral de 4 cm^{-1} .

Pre-procesamiento de espectros. Para optimizar la resolución espectral, se calculan los segundos derivados de los espectros y se realiza la normalización vectorial, que permite compensar las variaciones de absorbancia debidas simplemente a la "cantidad" de material visto por el cristal. Estos segundos derivados se utilizan para análisis estadísticos multivariados.

Durante las adquisiciones, se observaron pequeños puntos de ebullición en algunas muestras que caracterizan la evaporación del agua. Esto se debe a que la luz del microscopio (que se enciende antes de la adquisición del MIR) se concentra en un área muy pequeña, lo que provoca un calentamiento local. Podemos deducir que hay pequeñas bolsas de agua en las muestras que probablemente están atrapadas en un ambiente hidrofóbico, y por lo tanto impermeable, lípido. La fusión de los lípidos bajo el calor de la lámpara permitiría la evaporación del agua.

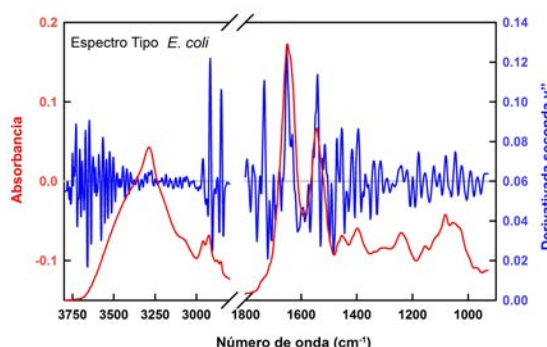
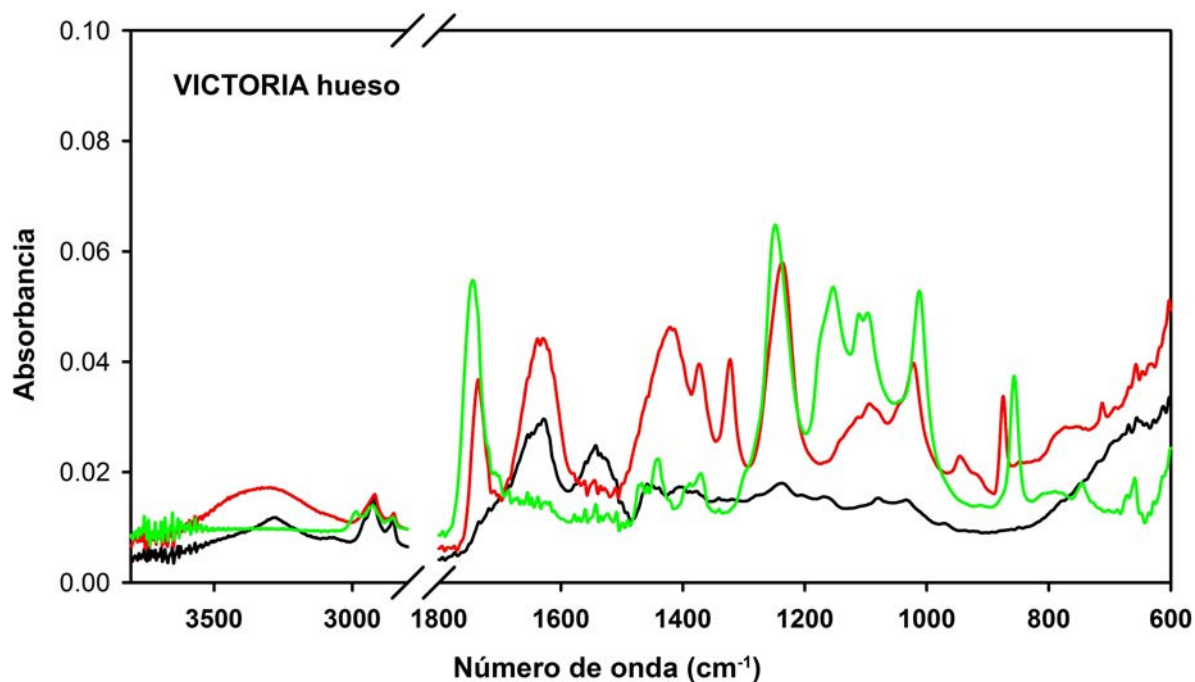


Fig. 11 *Spectrum tipo MIR (aquí de bacterias) con su segunda derivada (en azul)*

Análisis espectral.

Los espectros individuales se analizan en primer lugar para identificar sus componentes bioquímicos (proteínas, grasas, azúcares,...). Para tener en cuenta las heterogeneidades espaciales (en la escala de mm), se realizaron varias adquisiciones (de 3 a 5) en cada muestra. Se presentan los espectros más representativos. Para todas las muestras, se analizaron ambos lados.

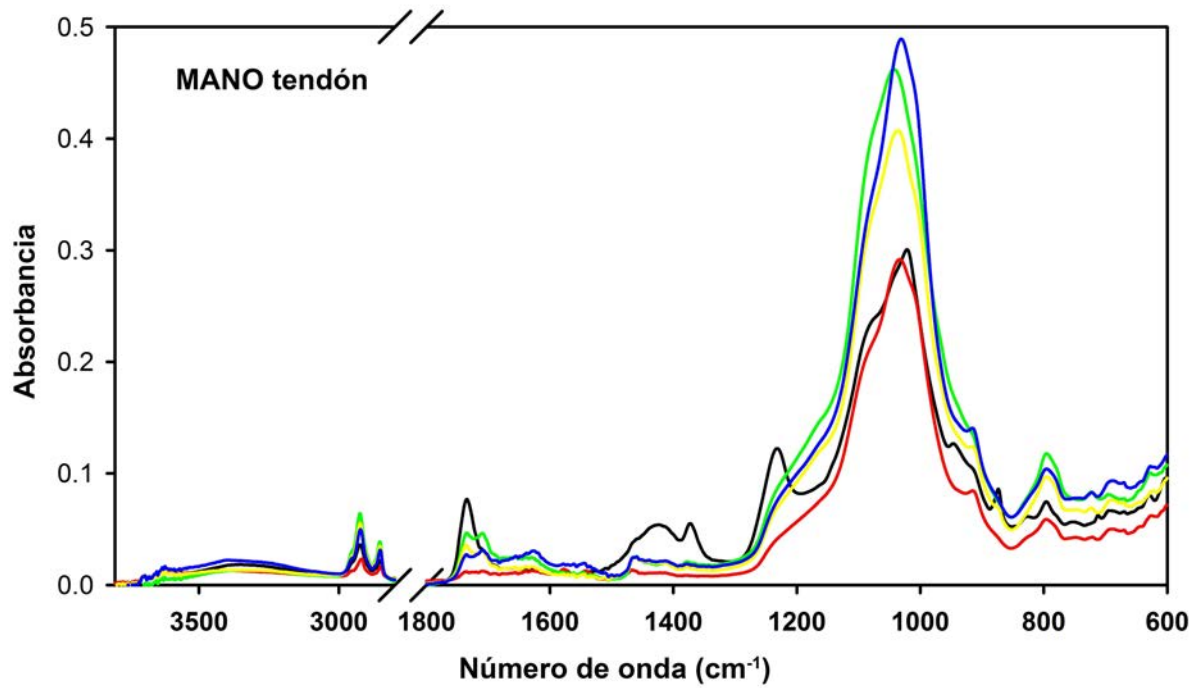
Fig. 12 VICTORIA Hueso



Esta muestra tiene una cara muy irregular (Fig.1 izquierda, espectros negros y rojos) y una cara claramente alveolada (Fig.1 derecha, espectro verde).

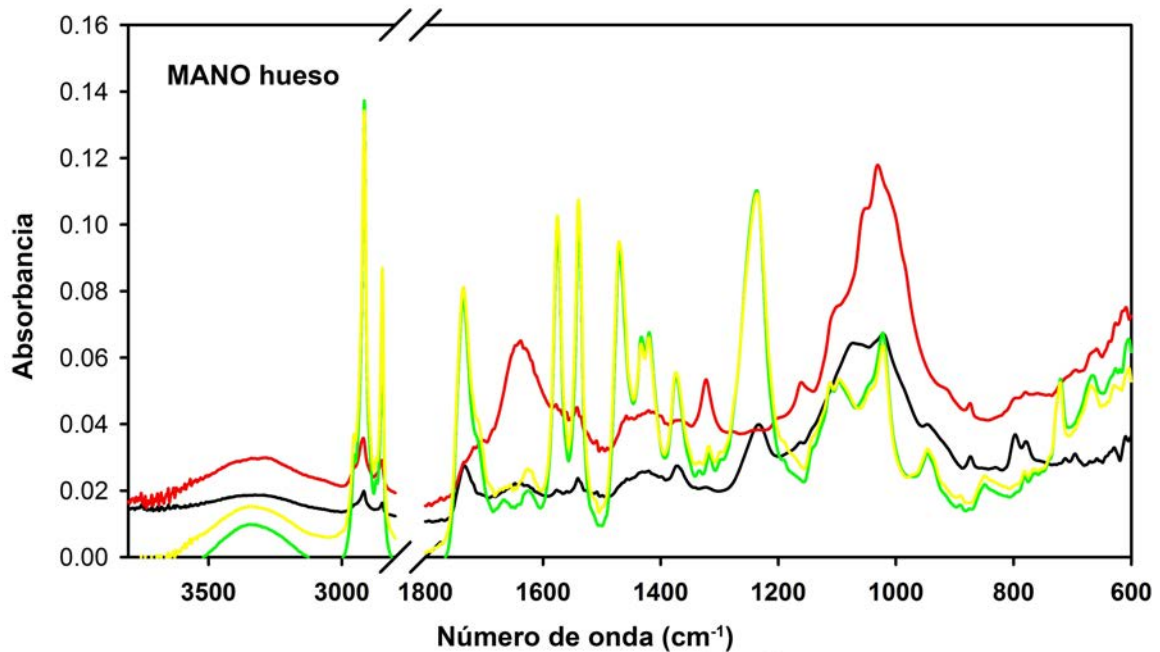
La cara irregular es heterogénea con la presencia de proteínas (amidas I y II) a 1540 y 1650 cm⁻¹, tejido mineralizado (banda de carbonato CaCO₃ a 860-870 cm⁻¹) y lípidos esterificados (1740, 1420, 1320 y masivo 2800-3000 cm⁻¹). La cara alveolada está dominada por lípidos con una banda de éster muy importante y una banda intensa de 1240. La banda 1010 debe reflejar el grupo fosfato que es característico del tejido óseo. Este último debe estar vinculado a la estructura alveolar claramente visible en la figura 1 (derecha).

Fig. 13 Mano Tendón



Los espectros "mano tendón" (Fig. 2) recogidos en cada lado (azul-verde-amarillo vs. negro-rojo) son cualitativamente cercanos si no una contribución más fuerte de la matriz fosfocálcica. (sólido a 1030 cm^{-1} y banda a 800 cm^{-1}) Los lípidos son detectables a 1740 y $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ La banda de 1230 cm^{-1} no puede asignarse de forma exclusiva. La ausencia de firma de las proteínas tendinosas características (colágeno y elastina) sugiere que estos componentes han sido destruidos o que la muestra no corresponde específicamente a este tejido sino al tejido óseo.

Fig. 14 Mano Hueso tridáctila



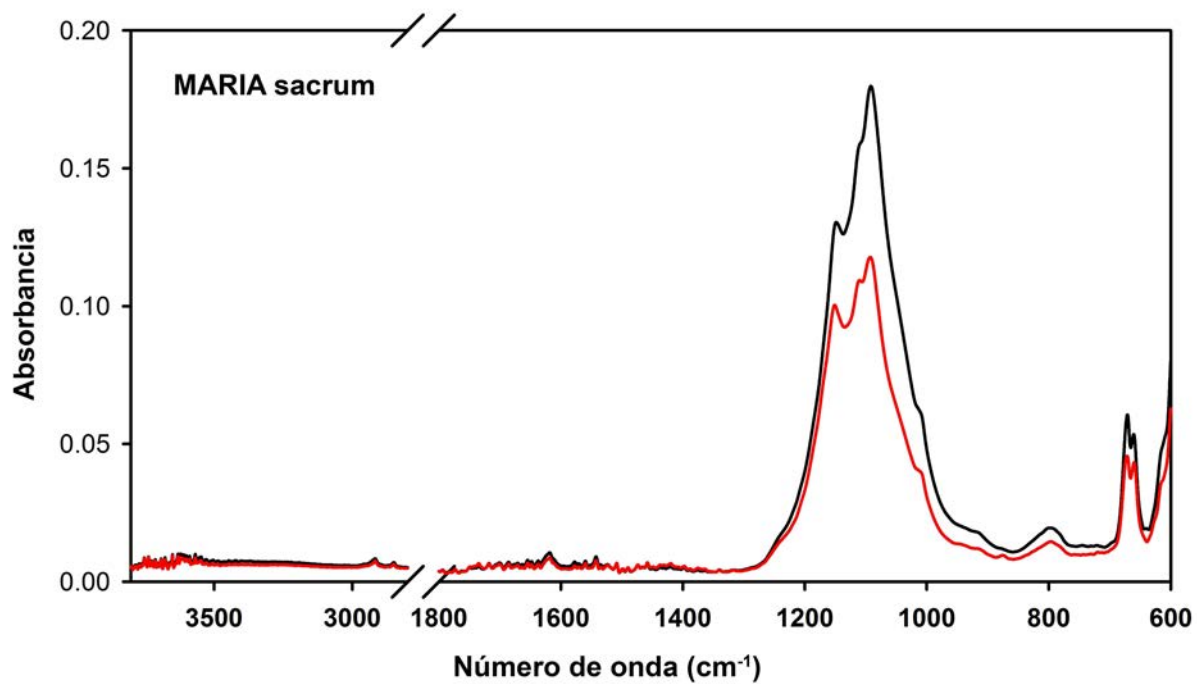
Esta muestra (Fig. 3) tiene una apariencia relativamente unida y lisa en uno de estos lados para dos fragmentos, mientras que el lado opuesto tiene una apariencia fibrosa. Consideraremos que el lado liso corresponde al lado externo del hueso, el aspecto fibroso al lado interno.

Los espectros negro y rojo corresponden al lado exterior. Estos espectros están dominados por una banda ancha e intensa (1030 cm^{-1}) que representa la vibración de los grupos de fosfato (PO_4^{3-}) característicos de la matriz mineral fosfocálcica del hueso. El hombro y el pico pequeño alrededor de 880 cm^{-1} reflejan los carbonatos. La banda de 1640 cm^{-1} es representativa del colágeno, que es la proteína más abundante en el hueso. La banda de 1320 cm^{-1} (visible en el espectro rojo) y las bandas entre 2800 y 3000 cm^{-1} reflejan los lípidos (grasas).

Los espectros adquiridos en la superficie interna del hueso están dominados en gran medida por los lípidos, que son los principales componentes de la médula ósea. La presencia de triglicéridos en altas concentraciones se manifiesta por bandas intensas entre 2800 y 3000 cm^{-1} (grupos de ácidos grasos methylene CH_2 y methyl CH_3) y 1740 cm^{-1} (C=O ester glycerol - aglutinante de triglicéridos de ácidos grasos). También hay una banda intensa a 1240 cm^{-1} que indica la vibración asimétrica de CH_2 en los fosfolípidos.

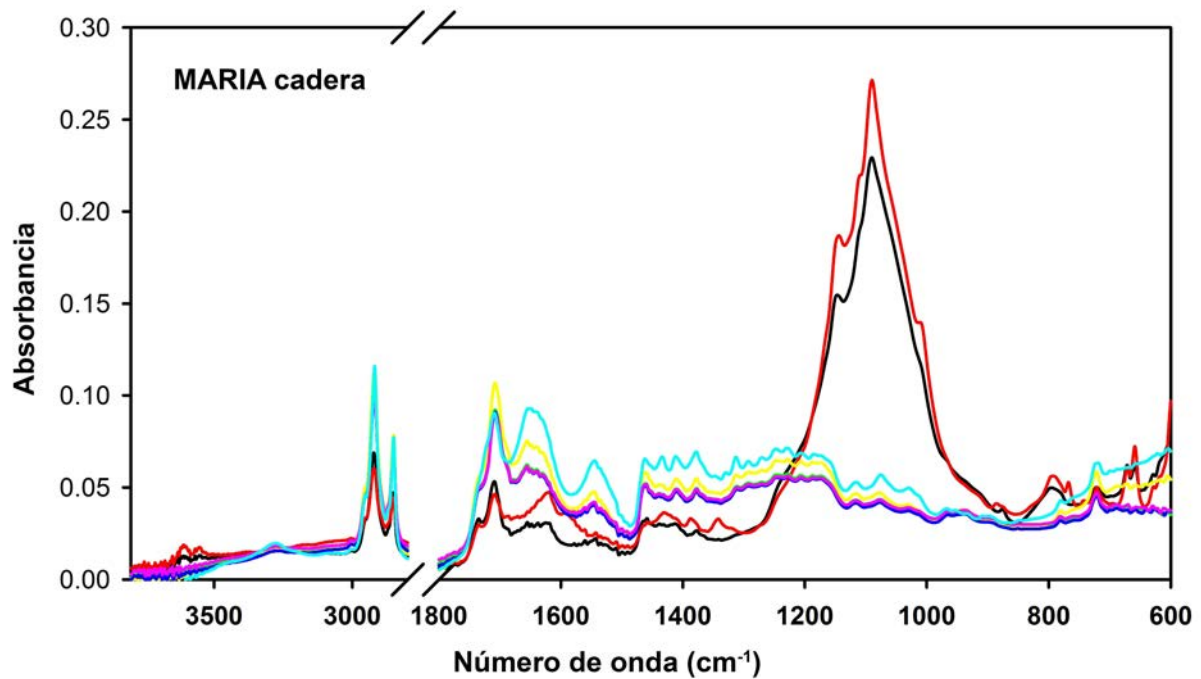
En contraste con la superficie exterior, las proteínas están prácticamente ausentes, mientras que la banda fosfocálcica (1030 cm^{-1}) es la mitad de intensa.

Fig. 15 MARIA Sacro



El espectro MIR de esta muestra (Fig. 4) está dominado por el masivo a 1030 cm⁻¹ que traduce el tejido óseo. No se detectan rastros de lípidos o proteínas. Vale la pena mencionar un doblete a 660-670 cm⁻¹ que generalmente se atribuye al grupo de azufre S = O. La presencia de azufre no se registra en la parte mineral del hueso. Por lo tanto, esta atribución puede estar sujeta a precaución.

Fig. 16 MARIA Cadera



Esta muestra tiene dos lados de diferentes aspectos. El lado mostrado en la figura 5 (derecha) se caracteriza principalmente por una banda fosfocálcica a 1030 cm⁻¹ (espectros negro y rojo) con una contribución visible de lípidos entre 2800 y 3000 cm⁻¹. El otro lado (espectros amarillo, cian, magenta y azul) es de naturaleza esencialmente lipídica (2800-3000 y 1710 cm⁻¹) con una presencia de proteínas visibles por la amida I (1640 cm⁻¹) y II (1540 cm⁻¹) características de estas macromoléculas.

Así, encontramos las características del tejido óseo con un lado esencialmente mineral y el otro marcado por los lípidos de la médula ósea.

Análisis comparativo

Con el fin de tener los tejidos de "referencia" lo más cerca posible de las muestras, se analizaron diferentes tejidos (pollo y muda de serpiente). Los tejidos de pollo fueron colocados previamente en una secadora al vacío durante dos meses en presencia de gel de sílice. La muda de serpiente ha sido analizada tal como está. Los diferentes espectros obtenidos se presentan a continuación.

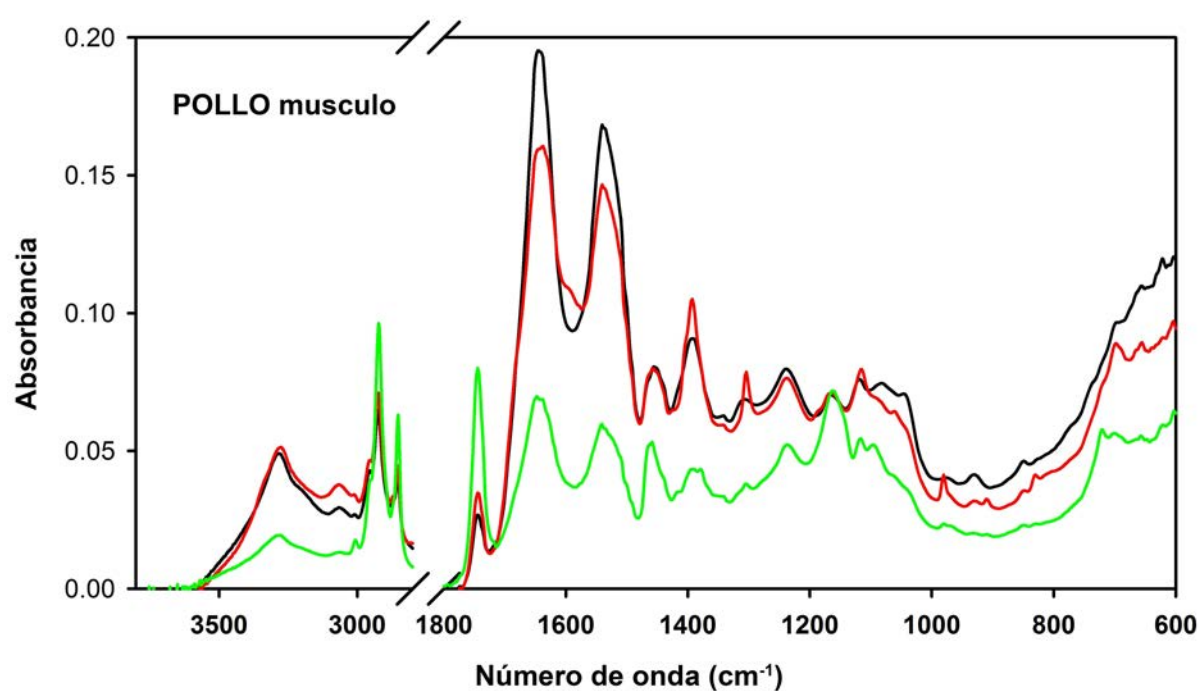


Fig. 17

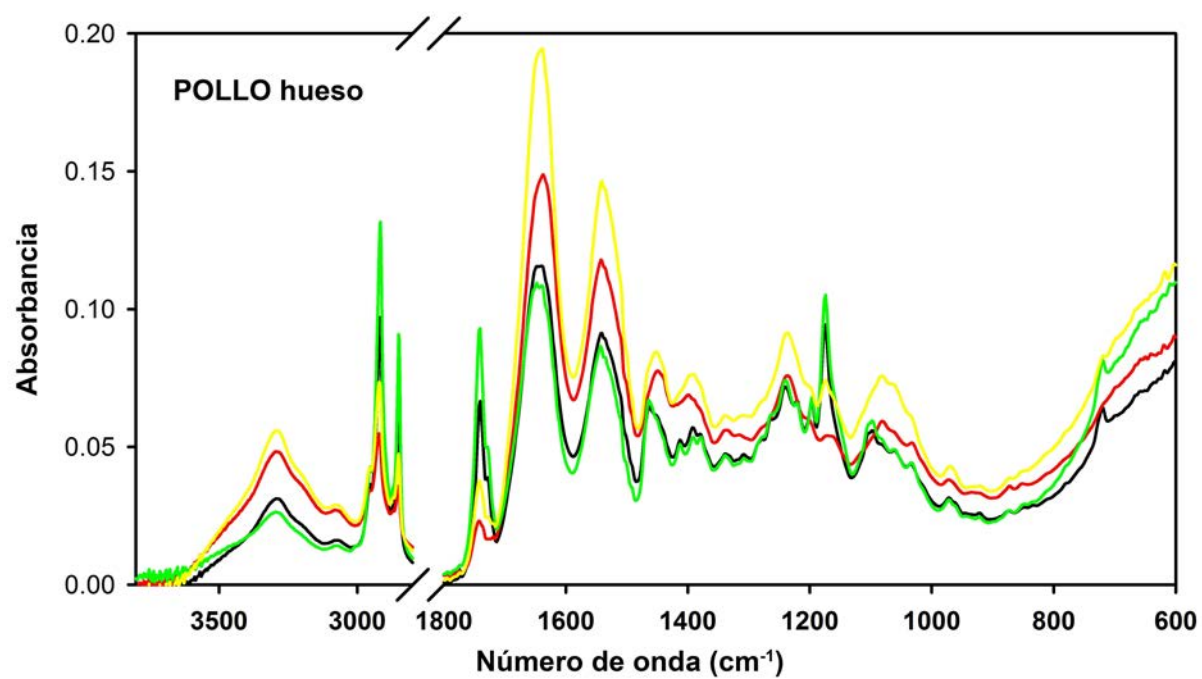


Fig. 18

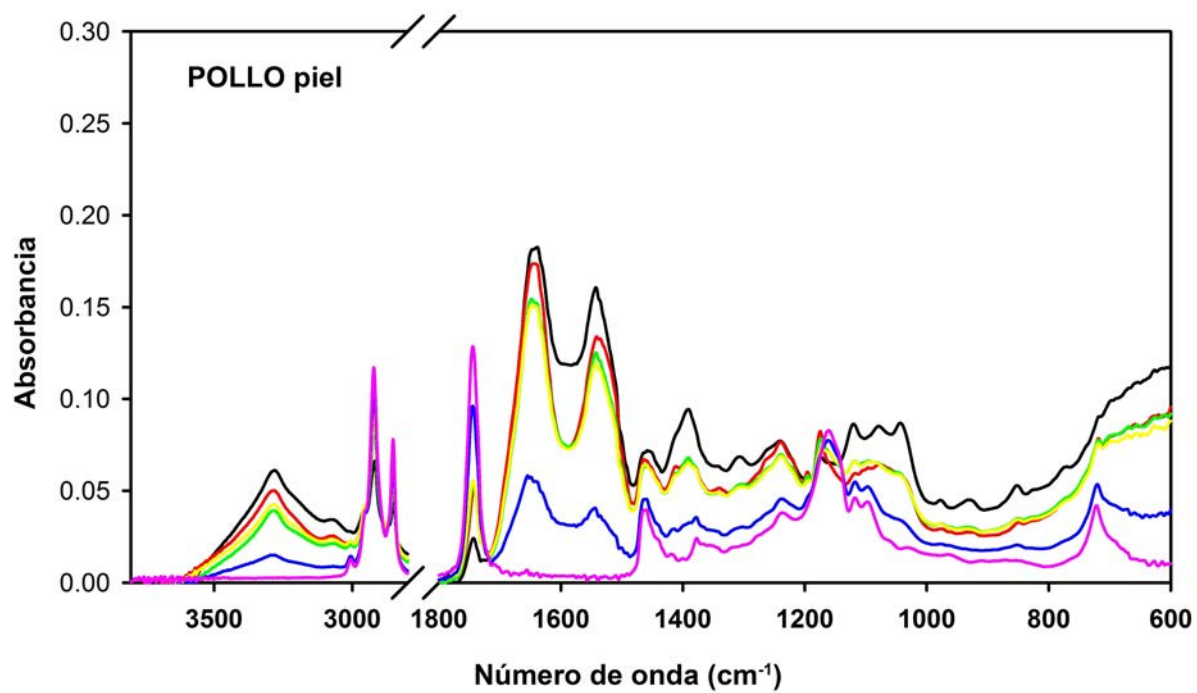
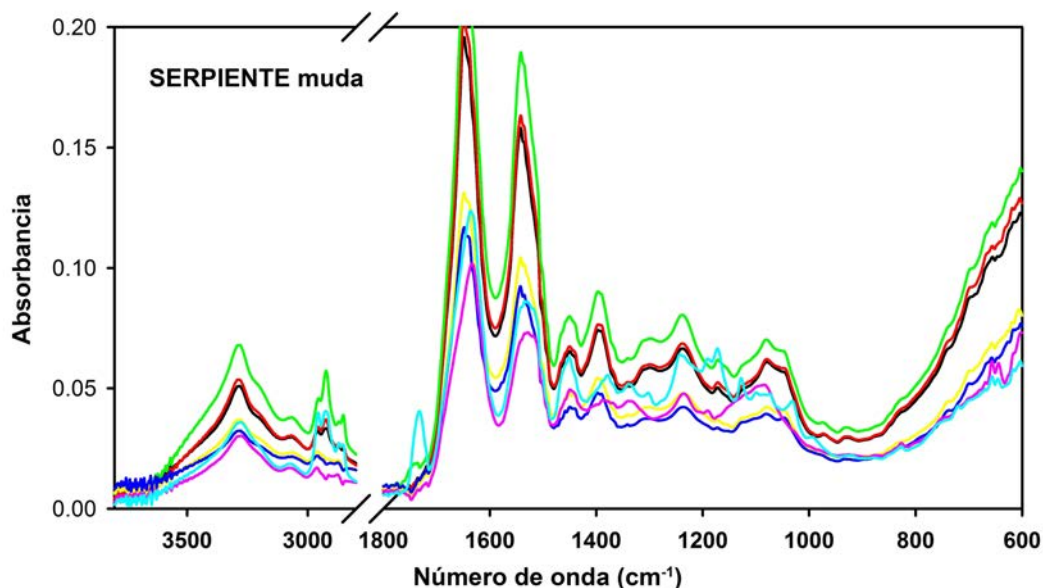


Fig. 19



El punto culminante de estas comparaciones entre las muestras de momias y las muestras de referencia es la casi ausencia (o baja concentración) de proteínas encontradas en las muestras de momias. Esto podría explicarse por una degradación química de las proteínas que resultaría en una lisis de los enlaces peptídicos que unen a los aminoácidos (una proteína es un polímero de aminoácidos). De hecho, como se mencionó anteriormente, el enlace peptídico absorbe en MIR a 1640 y 1540 cm^{-1} . Sin embargo, estas bandas de "proteínas" sólo son visibles en muestras de la cadera de María y Victoria.

También hay que tener en cuenta que los lados internos de los huesos analizados tienen una estructura alveolar.

Con el fin de resaltar las similitudes y disimilitudes entre las muestras, se realizó un análisis de componentes principales (PCA). Este análisis, al reducir la dimensionalidad del espectro MIR, permite calcular una "distancia euclídea" entre dos espectros representados en un espacio (aquí) bidimensional. La distancia entre dos bipuntos refleja la proximidad de dos muestras. Las siguientes figuras, llamadas mapas factoriales, muestran la distribución de los individuos (los espectros).

Códigos de muestra :

VH E/I	Victoria Hueso (cadera) lado Externo/Interno
MT	Mano Tendón
MO E / I	Mano Hueso lado Externo / Interno
MS	Maria Sacro
MH E / I	Maria Cadera lado Externo / Interno

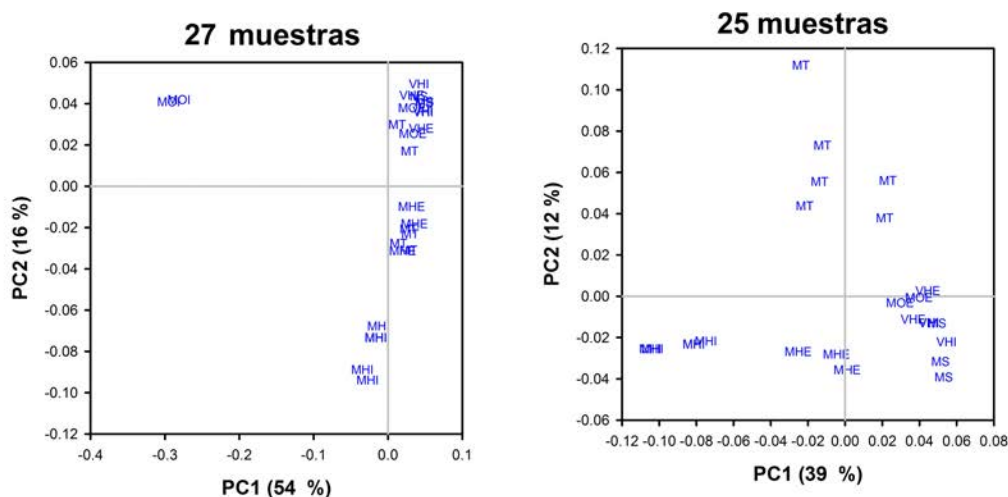


Fig. 21

La figura 21 (izquierda) muestra el mapa factorial de todas las muestras de las momias. Está muy claro que las muestras de MOI (Mano Hueso lado interno) son muy diferentes de todas las demás. Estas diferencias son evidentes al comparar sus puntuaciones (similar a las coordenadas x) negativas (aproximadamente -0.3) con las puntuaciones cercanas a cero de las otras muestras. El porcentaje que se muestra en cada eje representa el % de variabilidad representado por un componente principal dado ; 54% para PC1 y 16% para PC2 en este caso.

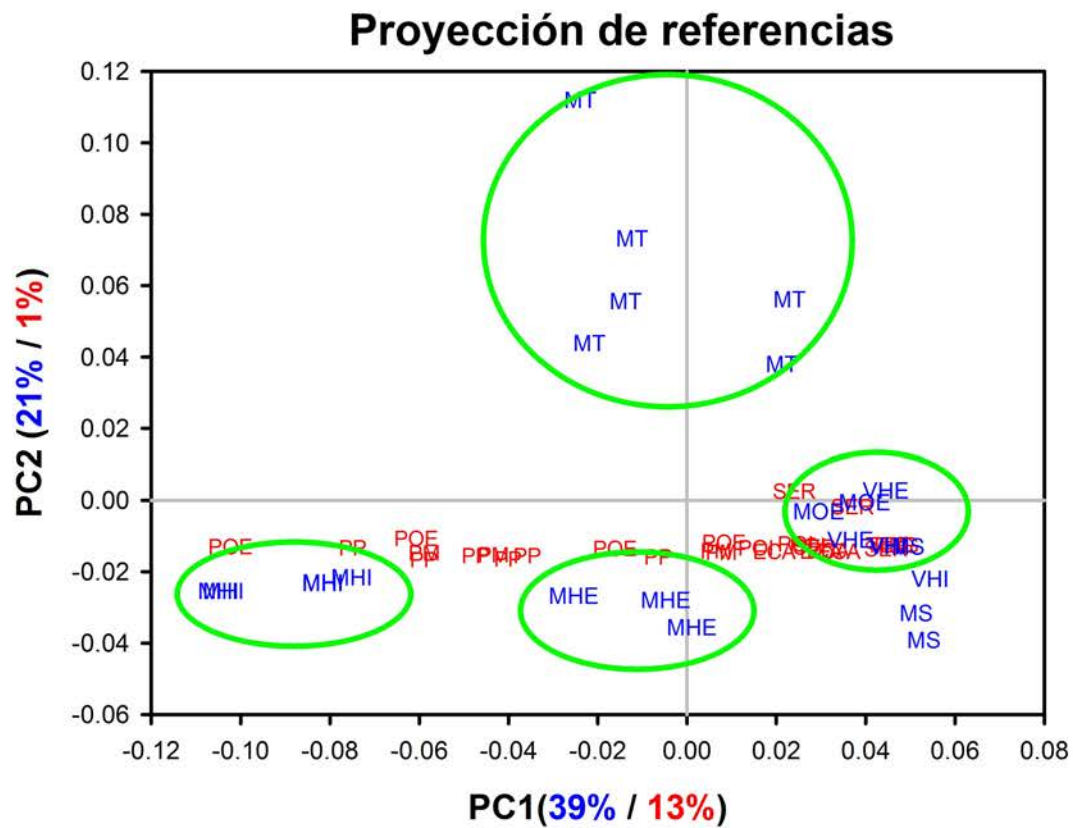
Por lo tanto, se realizó una segunda ACP para "dilatarse" las otras muestras; esto es lo que representa la Figura 21 derecha. Las muestras MT forman una nube distinta (o Clúster, agrupación), así como las muestras MHI y MHE. Las muestras MOE, VHE / VHI y MS están cercanas entre sí.

Una primera observación es que los hisopos de cadera de María y Victoria son distintos. Un segundo es que el lado externo de la Mano Hueso (MOE) tridactila está cerca del HEV, un poco menos que el MS.

Para situar estas muestras frente a un conjunto de "referencias", las muestras deshidratadas de pollo y muda de serpiente se proyectaron en el mapa factorial construido a partir de las únicas muestras de las momias.

Para las referencias, los códigos son:

PO E/I	Pollo hueso lado externo/interno
PP	Pollo Piel
PM	Pollo Músculo
ECA	Escama muda de víbora
TEG	Tegumento muda de víbora
SER	Lado interno de la muda de víbora



Conclusiones generales

1. Los análisis espectrales realizados en el contexto del presente informe demuestran sin lugar a dudas que las muestras enviadas corresponden a muestras biológicas altamente deshidratadas.
2. Solo la naturaleza del tejido correspondiente a Mano Tendón parece corresponder más al tejido óseo que a un tendón, este tipo de tejido está compuesto esencialmente de proteínas, colágeno en su mayor parte. Esto puede ser similar al tejido óseo que, como se señaló, tiene niveles bajos o no detectables de proteína.
3. Los intentos de conciliar con muestras deshidratadas en el laboratorio no son concluyentes. Sería interesante poder comparar los espectros de muda de víbora con una muestra de piel de la especie reptil.
4. La muestra Mano Hueso (MOE) parece estar más cerca de Victoria (HEV) que de María ; este punto debe verificarse porque el perito no es consciente de que la muestra Mano Hueso se ha identificado como perteneciente a una especie en particular.
5. Si se necesitan tareas más precisas, deben basarse en un mayor número de muestras con un conocimiento preciso del tipo de tejido. Esto se aplica a las muestras de las momias porque , como hemos visto, la comparación con las muestras deshidratadas en el laboratorio no es concluyente.
6. El punto relativo a las proteínas , que están muy poco presentes, también debería investigarse en muestras que hayan demostrado ser músculo.

Hecho en Vannes, el 30 de julio de 2019

Olivier SIRE

Perito