THESE

PRESENTEE A L'UNIVERSITE D'ORLEANS

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'ORLEANS

DISCIPLINE : PALEONTOLOGIE

PAR

PHILIPPE LABROT

MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE DE MICROFOSSILES PRECAMBRIENS

SOUTENUE LE 30 NOVEMBRE 2006

MEMBRES DU JURY :

- PR. MICHEL FAURE	PRESIDENT DU JURY
- CR. JEAN-FRANÇOIS BARDEAU	RAPPORTEUR
- PR. EMMANUELLE JAVAUX	RAPPORTEUR
- DR. JEAN-NOËL ROUZAUD	EXAMINATEUR
- DR. ELISABETH VERGES	EXAMINATEUR
- DR. FRANCES WESTALL	DIRECTEUR DE THESE

Cette étude a été réalisée avec le concours du Centre National d'Etudes Spatiales et de la Région Centre.

A mes parents,

Pour avoir éveillé ma curiosité envers les choses de ce monde

Qu’elles soient minérales, animales ou végétales

Et pour m’avoir donné très tôt les moyens de l’assouvir.

MERCI !

A tout seigneur tout honneur, mes premiers remerciements seront pour Frances Westall et André Brack, sans qui rien n'aurait été possible.

C'est avec un grand plaisir que je remercie André Brack, non seulement pour les fascinantes conversations sur les origines de la vie que j'ai pu avoir avec lui, mais aussi pour son travail de vulgarisation. Il est effectivement l'un des premiers à s'être intéressé à l'exobiologie en France, et les livres qui m'ont fait découvrir ce domaine il y a plus de dix ans sont signés de sa main.

Digne héritière d'André Brack, ma directrice de thèse, Frances Westall a droit à des remerciements particulièrement appuyés. Passionnée et très impliquée dans son travail, elle n'a cessé de me fournir motivation constante et conseils avisés tout au long des trois années de cette thèse. En m'accueillant dans son équipe au sein du Centre de Biophysique Moléculaire, elle m'a non seulement permis de découvrir et d'étudier des microfossiles précambriens, objets fascinants s'il en est, mais elle m'a aussi donné la possibilité de manipuler, avec une totale liberté, l'un des microscopes les plus puissants existant en ce jour dans nos laboratoires.

Pour rester dans la partie instrumentation, ayant je l'avoue un attrait particulièrement prononcé pour les machines, je tiens à remercier Alexandre Simionovici, Laurence Lemelle, Murielle Salomé et Michel Viso. Grâce à eux, monté sur un petit vélo rouge, j'ai pu lancer un défi à quelques paquets d'électrons circulant à une vitesse folle le long de l'anneau de 844 mètres de circonférence du puissant synchrotron de Grenoble. Maggy Colas, au CRMHT, et Gilles Montagnac, de l'ENS de Lyon m'ont initié à la microspectrométrie Raman, et je les en remercie. La microscopie électronique ne fut pas en reste, et je remercie Annie Richard de l'Université d'Orléans et Jean-Gabriel Breheret de l'Université de Tours, pour m'avoir permis d'observer mes microfossiles autrement qu'avec la pointe d'un microscope à force atomique. Je remercie également l'équipe de Patrick Midoux pour m'avoir permis de mesurer l'autofluorescence de mes lames minces de roches. Je remercie aussi Anne-Marie Bonnot du LEPES, pour la dizaine de pointes AFM terminées par des nanotubes de carbone, qu'elle a gracieusement fabriqué spécialement pour cette thèse. Enfin, j'ai une pensée toute particulière pour l'équipe du Centre Pluridisciplinaire de Microscopie électronique et de microanalyse de Marseille, qui m'a offert la possibilité de découper quelques cellules fossiles avec un canon à ion, perspective fascinante quand on est comme moi fan de science-fiction.

Si l'instrumentation actuelle, de part les progrès constants de la technologie, est tournée vers le futur, les microfossiles que j'ai eu

l’occasion d’étudier regardent eux vers le passé. Ils ont en tout cas constitué l’ossature de cette thèse, et c’est pourquoi je remercie sincèrement Andrew H. Knoll, pour les magnifiques échantillons de cherts des formations Gunflint et Draken qu’il a offert à Frances Westall, et qui m’ont ensuite été confiés. Je tiens à préciser que c’est en partie grâce à la richesse fossilifère de ces échantillons que cette thèse a été rendue possible. Je remercie aussi Sylvain Janiec pour les lames polies qu’il a fabriqué à partir de ces échantillons et que j’ai utilisé presque quotidiennement pendant trois ans. Enfin, parce qu’ils m’ont permis de jeter un œil sur la nature organique de mes microfossiles, je remercie Victoria Pearson, Alexander Verchovsky et Jon Watson de l’Open University.

Quand j’étais en classe préparatoire aux grandes écoles, on nous a distribué un petit fascicule reprenant les examens des années précédentes. Sur la couverture de ces annales, on pouvait voir un étudiant absorbé dans sa tache, et derrière lui, une étudiante s’écriant : «il n’y a pas que la spectrométrie infrarouge dans la vie !». Sans détourner les yeux de son instrument, l’étudiant répondait de manière laconique «si».

Bien entendu, il n’y a pas que la microscopie à force atomique dans la vie, et cette thèse n’aurait pas été ce qu’elle a été sans les éléments vivants du Centre de Biophysique Moléculaire. Car le second étage où j’ai passé mes trois années est effectivement empli d’une vie folle. Je remercie Marylène Bertrand-Urbaniak, Annie Chabin et François Orange, de l’équipe d’exobiologie, pour l’aide qu’ils m’ont apporté, et le soutien qu’ils m’ont témoigné. Je remercie également vivement Aurélie, Béatrice, Fabienne pour les conversations intéressantes que nous avons eu, le plus souvent autour d’un savoureux gâteau. Je remercie également tout particulièrement Céline Walmacq, pour son amitié, sa bonne humeur et la grande qualité de sa cuisine. Je remercie enfin mes parents, ainsi que mon frère et ma sœur, pour leur soutien et leur patience durant ces trois années.

Enfin, rien ne peut-être réalisé sans support financier, et je remercie sincèrement le Centre National d’Etudes Spatiales (CNES), le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) et la Région Centre pour leur soutien dans ce domaine.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 9

HISTOIRE DE LA MICROPALEONTOLOGIE PRECAMBRIENNE 11
LA CONTROVERSE DES MICROFOSSILES D'APEX (3,465 MILLIARDS D'ANNEES) 14
LA CONTROVERSE DES TRACES DE VIE FOSSILES DANS LA METEORITE MARTIENNE ALH84001 16
CRITERES D'IDENTIFICATION DE MICROFOSSILES 21
Les signatures morphologiques 26
Artefacts cellulaires 27
Les signatures moléculaires 28
Les signatures isotopiques 30
Les signatures biominérales 31
CONCLUSION 31

CHAPITRE II 33

MATERIELS ET METHODES 33

MICROSCOPIE OPTIQUE 33
Principe 33
Dispositif expérimental 34
MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE 35
Les pointes 37
Laser et photodiode 42
Céramiques piézoélectriques 43
Modes de base du microscope à force atomique 43
Mode contact 43
Mode tapping 47
Mode sans contact 50
Modes d'imagerie avancés 50
Mode d'imagerie de force latérale (LFM). 50
Courbe de force et imagerie force volume 53
Courbe d'approche retrait 53
Imagerie force volume 56
Détermination de la constante de raideur des leviers 58
Imagerie de phase 60
Imagerie en milieu liquide 61
Calibration 62
Les artefacts 63
Préparation des échantillons pour la microscopie à force atomique 66
Relocalisation 70
MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE 73
Principe 73
Dispositif expérimental 74

MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION 76
Principe *76*
Dispositif expérimental *78*
MICROSPECTROMETRIE RAMAN 80
Principe *80*
Dispositif expérimental *81*
Microspectrométrie Raman et kérogènes *82*
IMAGERIE RAYONS X (SYNCHROTRON) 84
Principe *84*
L'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) *85*
Dispositif expérimental : la ligne de lumière ID21 de l'ESRF *88*
Préparation des échantillons pour la microscopie X à balayage *91*
LES CHERTS DE LA FORMATION DRAKEN 94
Stratigraphie *94*
Cherts *95*
Stromatolithes *98*
L'assemblage fossilifère de la formation Draken *99*
LES CHERTS DE LA FORMATION GUNFLINT 102
Stratigraphie *102*
Cherts *104*
Stromatolithes *106*
L'assemblage fossilifère de la formation Gunflint *107*
Gunflintia minuta 108
Huroniospora spp. 111
Eoastrion 112
Eosphaera tyleri 113
Kakabekia umbellata 113
Des microfossiles ubiquistes 114

CHAPITRE III 115

RESULTATS 115

MINERALOGIE 115
Cherts de la formation Draken *115*
Cherts de la formation Gunflint *115*
CONTENU FOSSILIFERE 117
Cherts de la formation Draken *117*
Cherts de la formation Gunflint *117*
ETUDE DE SURFACE PAR MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE AVANT ATTAQUE ACIDE. 119
Cicatrices d'arrachement et localisation des microfossiles *119*
Relocalisation des microfossiles à l'aide des défauts de polissage 122
Relocalisation des microfossiles après attaque acide 125
Imagerie de force latérale *130*
Imagerie force volume *132*
MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE APRES ATTAQUE ACIDE 135
Formation Draken *135*
Attaque acide classique 135
Attaque acide douce 135

Imagerie de phase 140
Composition des particules pariétales submicrométriques 146
Microscopie électronique en transmission 147
Formation Gunflint 149
Coupe FIB 157
Filaments pyritisés 160
Imagerie de phase 164
MICROSPECTROMETRIE RAMAN 165
IMAGERIE X DU SOUFRE 168
Formation Draken 168
Cartes du fer 168
Cartes du soufre 169
XANES 169
Cartes du silicium 170
Formation Gunflint 173
Cartes du fer 173
Cartes du soufre 173
CHAPITRE IV 176
DISCUSSION 176
LE MICROSCOPE A FORCE ATOMIQUE COMME INSTRUMENT EN MICROPALEONTOLOGIE 176
La microscopie à force atomique n'est pas une technique de détection 177
Etat de surface et polissage 179
Attaque acide 180
Le microscope à force atomique est aveugle d'un point de vue chimique 181
Les problèmes de contamination 182
Contamination des surfaces 182
Contamination des pointes 188
NIVEAU DE PRESERVATION ORGANIQUE DES MICROFOSSILES DES FORMATIONS DRAKEN ET GUNFLINT 198
Formation Draken 198
Formation Gunflint 199
Microfossiles organiques 199
Filaments pyritisés 200
Comparaison Draken / Gunflint 201
MICROSPECTROMETRIE RAMAN 204
LA RECHERCHE DU SOUFRE PAR MICROSCOPIE A RAYONS X 205
Origine du soufre organique lié aux microfossiles de la formation Draken 206
Implications de la présence de soufre dans les microfossiles de la formation Draken 207
Avantages de la microscopie à rayons X pour l'étude du soufre 210
Expérimentations futures 211
CHAPITRE V 212

PERSPECTIVES 212

MICROSCOPIE A FORCE CHIMIQUE 213
Introduction 213
Considérations théoriques sur la microscopie à force chimique 214
Production d'anticorps 214
Etude de cas : la production d'anticorps anti-stérane 216
Mesures par microscopie à force chimique 219
Résultats préliminaires 223
Sélection d'un biomarqueur 223
Production d'anticorps polyclonaux 225
Tests préliminaires avec l'acide isovalérique 225
Essais avec l'acide phytanique 226
Applications potentielles de la microscopie à force chimique pour l'étude des microfossiles de la formation Gunflint 228
Gunflintia minuta 228
Huroniospora 232
Eoastrion 234
Eosphaera 235
LE COUPLAGE AFM/RAMAN 236
APPLICATIONS SPATIALES DE LA MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE 238

CONCLUSION 241

ANNEXES 246

BIBLIOGRAPHIE 249

Chapitre I

INTRODUCTION

«La nature n'a aucune obligation envers les hommes.
Elle n'a passé aucun contrat avec eux.»
Galilée

Avant propos : cette étude sur l'utilisation d'un instrument appartenant au champ des nanotechnologies a pour objectif la caractérisation physique et chimique, à l'échelle nanométrique et micrométrique, de microfossiles très anciens. Elle se place en amont d'études similaires sur les traces de vie terrestres les plus anciennes - actuellement vigoureusement discutées au sein de la communauté scientifique -, et éventuellement sur les échantillons de roches martiennes qui seront ramenés dans un futur proche par des missions automatiques de retour d'échantillons. Ces investigations font partie du champ de l'exobiologie.

De toutes les questions scientifiques jamais posées par l'Homme, celle de l'origine de la vie est sans aucun doute la plus fascinante, la plus exaltante et aussi la plus frustrante, tant les réponses se font attendre.

La science qui s'intéresse à l'origine de la vie sur Terre a pour nom Exobiologie. Ce terme fut inventé dans les années 1960 par Joshua Lederberg. Il désigne l'étude de l'origine, de la distribution et de l'évolution de la vie dans l'Univers, ainsi que des processus et structures qui y sont associées. Domaine de recherche pluridisciplinaire par excellence, cette science n'a pas encore reçu de nom officiel, et certains auteurs parlent indistinctement d'astrobiologie, de bioastronomie et de cosmobiologie. Ces appellations multiples sont probablement dues à la jeunesse de l'exobiologie. Espérons que lorsque cette science obtiendra la légitimité et la respectabilité qu'elle mérite amplement, un consensus sera rapidement trouvé. Pour ma part, j'utiliserai le terme pionnier d'exobiologie pour la désigner.

L'exobiologie est une science extrêmement vaste qui s'appuie sur de très nombreuses disciplines : astrophysique, astronomie, climatologie et sciences de l'atmosphère, géologie, géochimie et géophysique, chimie, biochimie, microbiologie, paléontologie. Malgré la diversité de ses approches, elle s'intéresse néanmoins à un objet d'étude unique, la vie. Il est paradoxal de constater que, malgré notre propre appartenance au monde vivant, et malgré son omniprésence à la surface de notre globe,

nous nous interrogeons encore aujourd'hui sur la meilleure définition à donner à la vie.

L'exobiologie comporte trois grands volets : l'étude des origines et de l'évolution de la vie terrestre, la recherche directe de systèmes vivants ou de leurs traces sur les autres planètes et satellites du système solaire, et enfin la détection de signaux radio ou optiques provenant d'éventuelles civilisations avancées (Brack et Raulin, 1991; Heidmann, 1992; Delsemme, 1994; Shapiro, 1994; Raulin, 1994; Reeves et al., 1996; Maurel, 1997; Raulin et al., 1997; Gargaud et al., 2001; Raulin-Cerceau, 2002; Brack et Leclercq, 2003; Gargaud et al., 2003; Brack, 2004; Gargaud et al., 2005).

Actuellement, les seules formes de vie connues dans l'Univers sont terrestres. La découverte d'organismes extraterrestres, en nous offrant la possibilité d'étudier d'autres modèles, nous permettrait d'améliorer considérablement notre définition du vivant. Si nous découvrons une vie sur Mars, et si cette vie est différente de la vie terrestre, alors nous serons capables de séparer les caractéristiques universelles du monde vivant de spécificités purement terrestres ou martiennes. Contrairement à la Terre, des planètes comme Mars ont conservé des traces de la première partie de leur histoire, et offrent donc de formidables opportunités pour remonter dans le temps, vers la période cruciale où la vie est apparue. Quand à la découverte de civilisations extraterrestres avancées, un tel événement serait susceptible de bouleverser fondamentalement la civilisation humaine.

En attendant de découvrir d'éventuelles traces de vie dans le sous-sol martien, ou de rentrer en contact avec une civilisation galactique, les exobiologistes doivent se contenter de réaliser des avancées au travers de l'étude d'organismes terrestres, vivants ou morts. En cela, si l'on exclut la vie terrestre, l'exobiologie peut apparaître comme une science sans objets.

Pour comprendre les mécanismes qui ont permis à la vie d'apparaître sur notre planète, les scientifiques s'appuient sur trois démarches complémentaires. La première consiste à reproduire, en éprouvette ou sur ordinateur, les conditions qui régnaient sur la Terre primitive, dans le but de découvrir les réactions chimiques qui ont conduit à l'émergence des molécules biologiques (acides nucléiques, protéines, etc.) puis plus tard des cellules. C'est le domaine de la chimie prébiotique. La seconde approche, que l'on pourrait qualifier de réductionniste, consiste à rechercher parmi tous les organismes connus les formes les plus primitives, étant donné que ces dernières pourraient avoir conservé certaines des caractéristiques de la cellule ancestrale qui a engendré toutes les autres. La troisième, enfin, est celle qui va désormais occuper le cadre de cette thèse. Il s'agit de l'étude des plus vieilles traces de vie fossile, préservées dans les roches sédimentaires les plus anciennes de notre planète.

Les interprétations des premières traces de vie (3,8 milliards d'années à 3,3 milliards d'années) provoquent de vives discussions et débats au sein de la communauté scientifique (quelques-unes des principales controverses sont détaillées plus bas). L'arrivée, dans le domaine de la micropaléontologie précambrienne, d'une technologie capable en théorie de caractériser ces traces de vie présumées, d'un point de vue morphologique, physique voire chimique et ce à l'échelle du nanomètre, pourrait aider à trancher les nœuds gordiens de certaines controverses et à mieux expliquer la nature et le mode de vie des microorganismes primitifs fossilisés.

Histoire de la micropaléontologie précambrienne

La micropaléontologie précambrienne est une science relativement jeune. Jusqu'en 1950, les spécialistes des fossiles pensaient encore que la vie était apparue relativement tardivement dans l'histoire de la Terre, vers 550 millions d'années (Schopf, 1999). Au sein de roches plus âgées, datant du précambrien, ils étaient effectivement incapables d'y déceler le moindre fossile. Cette situation était quelque peu paradoxale, car si la théorie de l'évolution de Darwin était correcte, les êtres évolués fossilisés dans des roches du cambrien devaient impérativement avoir été précédés par des organismes plus simples et primitifs, qui auraient dû eux aussi laisser des traces nettes dans les roches sédimentaires. Or ces derniers demeuraient introuvables. Ne pouvaient-ils pas, pour une raison quelconque, être fossilisés ? Ou avaient-ils jamais existé ?

Comme l'indique Darwin lui-même dans *The Origin of Species* : "*There is another and allied difficulty which is much graver. I allude to the manner in which numbers of species of the same group, suddenly appear in the lowest known fossiliferous rocks … The case must at present remain inexplicable; and may be truly urged as a valid argument against the views herein entertained*".

La solution au paradoxe de Darwin fut trouvée en 1953, avec la mise en évidence des premiers fossiles précambriens «officiels» dans des roches siliceuses de 2 milliards d'années provenant du Canada (formation Gunflint). Si aucun fossile n'avait jamais été jusqu'à présent découvert dans les roches de cette ère, c'est simplement parce qu'ils sont majoritairement microscopiques, et que leur étude ne peut avoir lieu qu'avec un microscope (certains microfossiles du précambrien sont néanmoins macroscopiques, comme par exemple ceux de la faune d'Ediacara, constituée d'organismes multicellulaires à corps mous). Avec la découverte des microfossiles de la formation Gunflint était née une nouvelle discipline passionnante, la micropaléontologie précambrienne.

Si la naissance officielle de la micropaléontologie a eu lieu en 1953, des travaux novateurs, et dont la signification n'avait pas été perçue à l'époque, avait été réalisé par Charles Doolittle Walcott, un géologue de génie, et qui fut par la suite un administrateur très compétent. En 1820, James Hall, qui dirigeait le bureau de recherches géologiques des Etats-

Unis (USGS) découvrit des structures sédimentaires finement laminées en forme de dôme près de la ville de Saratoga dans l'Etat de New York (Schopf, 1999). Hall interpréta ces étonnantes structures, qu'il baptisa *Cryptozoom* (du grec signifiant vie cachée) comme étant des formations récifales déposées sous l'action d'algues microscopiques. En 1883, dans les strates rocheuses du Grand Canyon, Walcott découvrira des structures similaires aux *Cryptozoom*, qu'il jugera prometteuses pour la recherche d'une vie précambrienne. En 1914 et 1915, Walcott découvrira des corps cellulaires dans des structures de type *Cryptozoom*, ce qui confirmera leur nature biologique (aujourd'hui, des structures de type *Cryptozoom* seraient appelés stromatolithes).

L'une des découvertes les plus intéressantes de Walcott aura lieu en 1899. Cette année là, il mettra à jour des petits disques charbonneux de taille millimétrique dans des schistes noirs du Grand Canyon, qu'il baptisera Chuaria. A l'époque, Walcott pensait que les fossiles du précambrien devaient ressembler à ceux du phanérozoïque, et il assimila à tort ces petits disques à des restes d'un invertébré marin appartenant aux brachiopodes. S'il s'est trompé sur leur appartenance (ces disques sont des restes d'acritarches, des êtres unicellulaires planctoniques, sphériques et anormalement larges, dont la taxonomie demeure floue), Chuaria était bien le fossile d'un organisme ayant vécu au précambrien, le premier jamais découvert sur Terre (avant même ceux de la formation Gunflint). Charles Doolittle Walcott peut donc être considéré comme le fondateur de la paléontologie précambrienne. Il rentrera cependant dans l'histoire comme le découvreur d'une faune cambrienne incroyablement bien conservée dans les schistes du mont Burgess (Colombie britannique, Canada) en 1909, et qui regroupe quelques-uns des plus beaux fossiles jamais extraits des roches de notre planète.

Si la micropaléontologie précambrienne est une science captivante, elle demande également beaucoup d'efforts et de patience, car la Terre s'est effectivement ingéniée à brouiller les pistes. La période précambrienne, qui couvre 85 % des temps géologiques, est paradoxalement la période la moins bien connue de l'histoire de notre planète.

Le précambrien a été découpé en trois grandes époques (figure 1 page 13) : l'hadéen (de 4,5 milliards d'années à 4 milliards d'années), l'archéen (de 4 milliards d'années à 2,5 milliards d'années) et enfin le protérozoïque, de 2,5 milliards d'années à 543 millions d'années (Harland et al., 1990; Grotzinger et al., 1995).

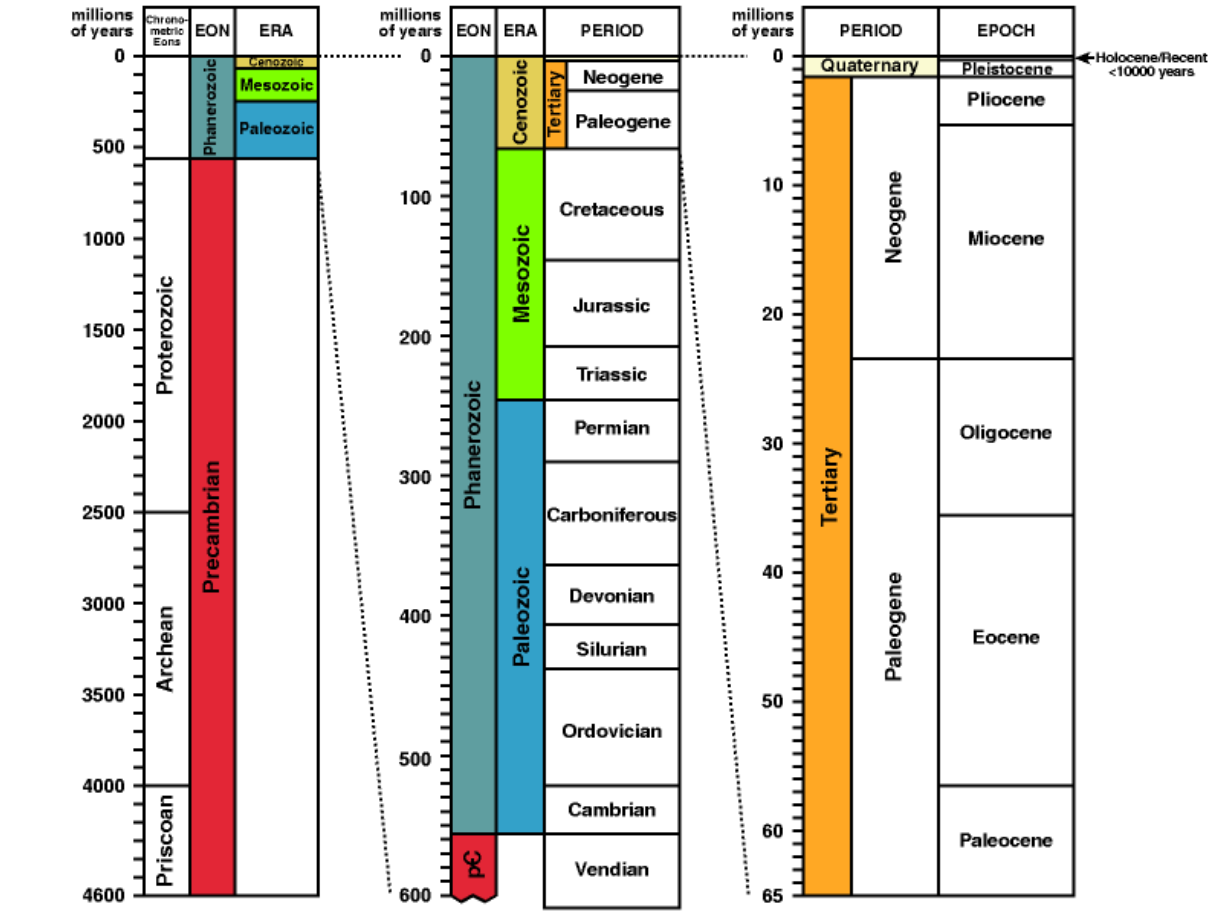


figure 1. Echelle des temps géologiques (Harland et al., 1990, modifié d'après Grotzinger et al., 1995). Le Précambrien commence à 4,5 milliards d'années et se termine à 543 millions d'années.

Les microfossiles datant de l'ère précambrienne sont particulièrement difficiles à étudier pour plusieurs raisons. Les affleurements de roches précambriennes sont rares, comparativement aux roches du phanérozoïque. Les microfossiles sont par définition microscopiques, et les restes cellulaires sont souvent fortement dégradés par le métamorphisme, qui a eu amplement l'occasion d'agir au cours des milliards d'années. Si les critères de reconnaissance permettent généralement d'identifier avec une bonne certitude des structures fossiles dans les roches du Protérozoïque, il n'en est pas de même pour celles de l'archéen (Buick, 1990), comme le démontre la controverse des microfossiles conservés dans les cherts d'Apex décrits ci dessous.

La controverse des microfossiles d'Apex (3,465 milliards d'années)

La difficulté extrême de l'identification de traces de vie fossiles dans les plus vieux sédiments de notre planète est parfaitement illustrée par la controverse provoquée suite à l'interprétation biogénique de structures carbonées emprisonnées dans les cherts de la formation d'Apex.

Les microfossiles d'Apex sont, selon le *Guinness World Records* (Dalton, 2002), les plus vieux fossiles du Monde. En fait, depuis leurs découvertes en 1987 (Schopf et Packer, 1987; Schopf, 1993), d'autres traces de vie encore plus anciennes ont été trouvées dans des roches de 3,49 milliards d'années de la formation Dresser (Ueno et al., 2001).

L'histoire de la controverse des microfossiles d'Apex est liée à des controverses similaires datant des années 1980 (Awramik et al., 1983; Buick, 1984; Awramik et al., 1988; Buick, 1988; Buick, 1990; Dalton, 2002). En 1990, afin d'éviter des interprétations erronées concernant les microfossiles précambriens, Buick défini une liste exhaustive des paramètres nécessaires pour déterminer la biogénicité d'une structure donnée (Buick, 1990, voir ci dessous).

Les microfossiles de la formation d'Apex (groupe Warrawoona) ont été découverts dans des cherts situés à proximité de la ville de Marble Bar, à l'ouest de l'Australie, dans le secteur de Chinaman Creek. En 1987, dans un premier papier, Schopf et son étudiant Bonnie Packer suggèrent que ces cherts renferment des traces fossiles de micro-organismes photosynthétiques (Schopf et Packer, 1987). Des nouveaux taxas furent ensuite décrits en 1992 (Schopf, 1992) puis en 1993 (Schopf, 1993). De part leur morphologie filamenteuse, les microfossiles d'Apex semblaient rappeler des cyanobactéries, et la découverte établissait donc l'existence de la photosynthèse oxygénique il y a 3,465 milliards d'années.

Paradoxalement, la remise en question des microfossiles de la formation d'Apex débuta avec l'annonce, par la NASA, de la découverte de traces de vie fossiles dans la météorite martienne ALH84001. Convoqué à une conférence de presse en tant qu'expert indépendant, Schopf se montra sceptique face aux preuves accumulées par l'équipe de l'agence spatiale américaine (Schopf, 1999). Ironiquement, la même année, l'équipe de Martin Brasier (Brasier et al., 2002), qui travaillait sur les mêmes lames minces de la formation d'Apex que celles utilisées par l'équipe de Schopf (et conservées au Muséum d'Histoire Naturelle de Londres), constata que certains filaments adoptaient des formes inhabituelles pour des cyanobactéries, comme des épaississements dans certaines régions des filaments, ou des bifurcations.

Cette constatation est étroitement liée au mode de préservation des microfossiles dans des cherts. Les structures sont effectivement conservées en 3 dimensions, et lors de l'observation au microscope optique, il est impossible d'obtenir une image nette de la totalité du

microfossile. Afin de pouvoir obtenir des images nettes, il est nécessaire de réaliser un collage des différentes régions mises au point, ce qui peut provoquer l'exclusion, intentionnelle ou non, de parties de filaments qui n'auraient pas l'aspect souhaité.

Utilisant un logiciel d'auto-montage spécialisé, l'équipe de Brasier (Brasier et al., 2002) put obtenir des images montrant l'aspect réel de certains microfossiles décrits par Schopf (Schopf et Packer, 1987; Schopf, 1992; Schopf, 1993). Cependant, à cause du repliement des filaments dans l'espace en 3D de la roche, cette technique n'est pas non plus à l'abri d'artefacts. Elle se révèle effectivement incapable de distinguer deux parties d'un même filament séparées dans l'espace, celles-ci apparaissant superposées sur le plan de l'image (Schopf, 2004). Ces simples considérations géométriques, et le découpage malheureux de certains microfossiles ont été la cause d'une certaine confusion dans l'affaire des cherts d'Apex.

Un autre aspect de cette controverse est lié au contexte géologique et environnemental des roches fossilifères. Sur le terrain, une reconnaissance sur le site des cherts de la formation Apex effectuée par l'équipe de Brasier (Brasier et al., 2002) mena cette dernière à la conclusion que, contrairement à ce qui avait été annoncé par Schopf (Schopf, 1993), les cherts d'Apex ne s'étaient pas déposés au fond d'une mer peu profonde, mais étaient vraisemblablement issus d'une veine de quartz hydrothermale. Ce point est particulièrement important, étant donné que les veines hydrothermales ne représentent pas des habitats plausibles pour des microorganismes photosynthétiques aérobies, et il prouve l'importance cruciale de la caractérisation du contexte géologique. L'identification de microfossiles au sein d'une roche ne peut avoir un sens que si cette dernière s'est déposée dans des conditions compatibles avec l'existence de formes de vie.

Pour l'équipe de Brasier, l'interprétation micropaléontologique des structures emprisonnées dans les cherts d'Apex était basée sur des analyses inadéquates du contexte géologique et pétrographique, ainsi que sur une étude subjective des critères morphologiques (Brasier et al., 2002; Brasier et al., 2004a). Les microfossiles d'Apex ne seraient rien d'autre que des artefacts organiques produits par des sources hydrothermales. Même la signature isotopique du carbone, qui tombait dans l'intervalle attribué au fractionnement isotopique lié à l'activité photosynthétique (plus particulièrement à la RUBISCO, ribulose 1-5 biphosphate carboxylase/oxygénase, une enzyme clé du cycle de Calvin), s'explique selon eux par une réaction de type Fischer-Tropsch.

A la suite de ces accusations, Schopf établi une collaboration avec des collègues spécialisés en microspectrométrie Raman, pour tenter d'établir par le biais de cette technique la biogénicité des structures carbonées emprisonnées dans les cherts de la formation d'Apex (Kudryavtsev et al., 2001; Schopf et al., 2002; Schopf et Kudryavtsev, 2005; Schopf et al., 2005). Cependant, cette technique permet uniquement de se prononcer

sur l'état de désorganisation d'un composé carboné fossile (Pasteris et Wopenka, 2002; Pasteris et Wopenka, 2003), et non sur l'origine – biogénique ou abiogénique – de ce dernier.

Pour pouvoir trancher entre le vivant et le non-vivant, Brasier et al. (2004) proposent qu'une preuve de l'existence d'une vie passée dans les roches les plus anciennes de la planète (archéen) ne soit pas acceptée avant que des évidences morphologiques et géochimiques frappantes ne soient présentées, et qu'une origine abiotique puisse être invalidée. Toutes les structures plus vieilles que 3 milliards d'années doivent donc être traitées par défaut comme des artefacts microscopiques d'origine prébiotique ou abiotique, à moins que le contraire ne puisse être démontré (Brasier et al., 2004). Une position qui se veut certes prudente, mais qui est aussi quelque peu extrême, étant donné qu'il est théoriquement impossible de réfuter toutes les possibilités de formation abiogénique d'une structure donnée, pour la bonne et simple raison que de nombreuses pourraient demeurer totalement inconnues. Une position plus raisonnable et intermédiaire est adoptée par d'autres chercheurs (Brasier et al., 2004; Westall, 2005; Westall et Southam, 2006) qui estiment que l'identification de microstructures biogéniques reste possible, à condition de mener des études intégrées, multidisciplinaires, et, si possible, *in-situ*. Aucune identification ne devrait être effectuée sur la base d'un seul critère, comme une valeur isotopique (Mojzsis et al., 1996; Fedo et Whitehouse; 2002), la présence d'un biomarqueur (Brocks et al., 1999) ou même des statistiques de valeurs morphométriques.

La controverse des traces de vie fossiles dans la météorite martienne ALH84001

Les difficultés liées aux études de microfossiles anciens sont soulignées par une autre controverse, cette fois-ci concernant des traces de vie présumées dans une météorite martienne. Puisque l'un des objectifs de cette thèse est d'évaluer l'importance que pourrait avoir la microscopie à force atomique pour la recherche d'éventuelles traces de vie fossiles dans des matériaux extraterrestres tels que des roches martiennes ramenées sur Terre par des missions de retour d'échantillons, il est pertinent de rappeler les principaux points de cette controverse.

Comme expliqué plus haut, la réinterprétation des structures carbonées préservées dans les cherts d'Apex fut déclenchée par les interrogations qui n'ont pas manqué d'avoir lieu après l'annonce par la NASA, le 6 août 1996, de la découverte de traces de vie fossiles dans une météorite martienne, ALH84001 (McKay et al., 1996a).

L'histoire d'ALH84001 est très complexe (Treiman, 1998), ce qui n'a rien d'étonnant pour une roche très vieille formée sur une planète active. Il y a environ 4,5 milliards d'années, une poche de magma sur Mars a commencé à refroidir dans les profondeurs de la croûte martienne. Les premiers cristaux formés, les pyroxènes, s'accumulent au fond de la chambre magmatique et se cimentent pour donner naissance à une

orthopyroxénite. Vers 4,2 milliards d'années, un astéroïde s'écrase au-dessus de la chambre magmatique. L'impact affecte violemment la croûte martienne, ainsi que la future météorite : le choc ouvre des cavités et des fissures dans la roche, tout en la rapprochant de la surface martienne. En profitant des fissures, un fluide percole dans la roche vers 3,9 milliards d'années, en déposant ici et là des minéraux derrière lui. Il y a 16 millions d'années, un deuxième impact météoritique éjecte finalement ALH84001 dans l'espace. La météorite finit par s'écraser dans les glaces de l'Antarctique au niveau de la région d'Allan Hills il y a 13 000 ans, avant d'être finalement collectée le 27 décembre 1984 (Score, 1997).

ALH84001 fut d'abord classifiée comme une diogénite en 1985 (Score et MacPherson, 1985), une classe de météorites provenant de la ceinture d'astéroïde), avant que sa nature martienne ne soit établie en 1993 (Score et Mittlefehldt 1993).

Les nombreuses cavités et fissures qui parsèment la météorite sont tapissées par endroit de globules de carbonates orangés (car colorés en partie par du fer). D'une taille variant entre 100 à 250 microns, ces petites orangettes, qui représentent seulement 0,5 % de la roche, sont délicatement stratifiées (Harvey et McSween, 1996; McKay et al., 1996a; Gleason et al., 1997). Le centre, constitué de carbonate de calcium, est ceinturé par une série de trois anneaux respectivement noir, blanc puis à nouveau noir. Les anneaux internes et externes sont composés de carbonates de fer, tandis que l'anneau central blanc est constitué de carbonate de magnésium pratiquement pur. L'anneau externe contient des grains très fins de magnétite et de sulfure. Les analyses chimiques ont montré qu'il existe une stratification manganèse/fer au sein des globules. La zonation complexe (tant du point de vue chimique que minéralogique) des carbonates laisse penser que ces derniers se sont formés par dépôts concentriques successifs de composés dissous dans un fluide hydrothermal. Si les carbonates se présentent fréquemment en globules, on peut aussi les trouver sous d'autres formes (galettes, veines, etc.). L'analogue terrestre le plus frappant des carbonates d'ALH84001 a été trouvé autour du volcan Sverrefjell dans la région de Svalbard en Norvège (Myers, 2006).

L'âge des carbonates d'ALH84001 s'est révélé très délicat à déterminer et constitue toujours un sujet de recherche, mais il est probablement de 3,9 milliards d'années (Borg et al., 1999), soit une date similaire à celle du premier impact. La précision des mesures n'est cependant pas suffisante pour savoir si les deux évènements sont liés ou non.

La température de formation des carbonates (dont dépend beaucoup de choses) est également très controversée (Harvey et McSween 1996; Valley et al. 1997). Certains chercheurs estiment que les orangettes sont apparues au dépend d'un fluide très riche en CO_2, à des températures assez élevées (700° C), peut-être au moment du premier impact. D'autres géologues ont estimé que les carbonates ont précipité dans des conditions très clémentes (entre 0°C et 80°C). Aucun composé argileux n'a été

détecté au voisinage des carbonates, alors que ces silicates hydratés devraient être abondants si les carbonates proviennent effectivement d'une altération hydrothermale.

Les carbonates secondaires d'ALH84001 renferment des éléments qui ont été considérés comme d'origine biologique (McKay et al., 1996a, 1996b). Le plus marquant est sans nul doute la présence de structures incrustées dans les carbonates et dont la morphologie rappelle celles des bactéries, exception faite de leur petite taille (20 à 100 nm). Ces hypothétiques micro-organismes martiens seraient donc jusqu'à 100 fois plus petits que leurs homologues terrestres en taille, et un million de fois inférieurs en volume.

Cette petitesse a deux conséquences. La première, c'est que les nanofossiles martiens poussent les plus puissants instruments d'analyse dans leurs retranchements. Seconde conséquence, la taille de ces fossiles défie l'entendement. Les microbiologistes considèrent effectivement qu'en dessous d'une taille de 200 nanomètres, un organisme ne saurait être viable (Schopf, 1999) : l'espace disponible pour ranger toutes les molécules nécessaires aux fonctions vitales serait tout simplement insuffisant. Les nanofossiles d'ALH84001 seraient donc trop petits pour être vrais. Avec une taille de 20 nm, ils ressemblent effectivement plus à des constituants cellulaires (comme les ribosomes, ces petites unités biochimiques qui servent à fabriquer les protéines), qu'à des cellules entières.

Les nanostructures d'ALH84001 ne constituaient qu'un indice parmi d'autres de l'existence de formes de vie passées au sein de la météorite. Au niveau des orangettes de carbonate, des cristaux de magnétite et de sulfures biogéniques, ainsi que des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), avaient également été mis en évidence. Selon McKay et al., la structure stratifiée des carbonates militerait également en faveur d'une précipitation biologique (McKay et al., 1996a).

L'article de McKay et al. (1996a) insiste sur le fait que, pris séparément, chaque indice n'est pas une preuve incontestable d'une ancienne activité biologique, mais que considérés ensemble, et compte tenu de leur étroite association spatiale, ils rendent cependant tout à fait plausible l'hypothèse biologique. Depuis, le débat a fait rage au sein de la communauté scientifique. Même si celui-ci n'est pas totalement clôt, la plupart des indices pointés par McKay et al. (1996a) n'ont pas résisté aux contre-analyses.

Pour chaque caractéristique listée par McKay et al. (1996a), une explication chimique plausible a été trouvée (voir Bradley et al., 1997 et McKay et al., 1997). Les nanofossiles d'ALH84001 pourraient n'être rien d'autres que des excroissances cristallines situées à la surface des carbonates (le long des axes cristallographiques, d'où leur alignement), ou des minéraux (petits cristaux de magnétite, bords des cristaux de pyroxènes). Ils pourraient également s'agir de protrusions liées à la

dissolution partielle de la surface des carbonates. Enfin, on ne peut exclure que certains des nanofossiles résultent d'une contamination par des bactéries terrestres, qui se seraient frayées un chemin au sein de la météorite avant d'être dégradées puis fossilisées. Des bactéries terrestres vivantes ont d'ailleurs été trouvées dans la météorite martienne Nahkla (Toporski et al., 1999). De plus, il pourrait s'agir d'artefacts liés aux procédés de préparation (métallisation) des échantillons pour l'examen au microscope électronique à balayage. Des études au microscope à force atomique ont cependant montré que les nanostructures ne sont pas des grumeaux métalliques déposés durant la métallisation (Steele et al., 1998).

Comme expliqué plus haut, les carbonates peuvent avoir été déposés à 700° C, une température évidemment incompatible avec la présence de formes de vie. Les HAP, de leur côté, sont des composés organiques simples qui possèdent soit une origine inorganique (ils se retrouvent ainsi dans des météorites de type chondrite carbonée, comme par exemple la météorite de Murchison, voir Wing et Bada, 1991), soit un stade de dégradation très avancé de biomolécules. Leur présence ne peut donc constituer en soi une biosignature. Il a été prouvé que la majeure partie des HAP (80 %) extirpés de la roche provient d'une contamination terrestre. Le doute subsiste cependant pour les 20 % restants. Il en va de même pour les acides aminés (glycine, sérine et alanine) découverts ultérieurement, ceux-ci provenant d'une contamination terrestre (Bada et al., 1998).

Le seul indice encore en discussion est la présence de cristaux microscopiques de magnétite sensés avoir été fabriqués par des micro-organismes similaires aux bactéries magnéto-tactiques terrestres (McKay et al., 1996a; Thomas-Keprta et al., 2000; Friedmann et al., 2001; Thomas-Keprta et al., 2001; Thomas-Keprta et al., 2002). Ces bactéries, qui vivent généralement dans des milieux très appauvris en oxygène, se montrent capables de trouver leur chemin grâce au champ magnétique terrestre. Grâce à de petites chaînettes de magnétite (magnétosomes), qui jouent exactement le rôle d'une boussole, elles peuvent s'orienter dans leur environnement jusqu'à trouver le gradient optimal en oxygène.

Les magnétosomes, constitués de minuscules cristaux de magnétite (entre 30 et 100 nm) enveloppés par une membrane, sont généralement alignés avec le grand axe de la cellule bactérie. Leur taille, leur rapport longueur sur largueur, leur élongation, leur système cristallin (hexaoctaédrique tronqué), leur grande pureté chimique, leur absence de défauts en font des objets tout à fait uniques (Thomas-Keprta et al., 2001).

25 % des cristaux de magnétite piégés dans la météorite ALH84001 possèdent les six propriétés listées ci-dessus (Thomas-Keprta et al., 2001). Cette population serait donc biogénique. Cependant, des cristaux ayant les mêmes propriétés ont été fabriqués en laboratoire à partir d'éléments se trouvant dans la météorite martienne (Golden et al., 2004).

Les minuscules cristaux de magnétite pourraient, à l'instar des autres structures de la météorite, être abiotiques (Treiman, 2003; Taylor et Barry, 2004). Des cristaux de magnétite similaires à la plupart de ceux rencontrés au sein d'ALH84001 peuvent par exemple se former par précipitation chimique à partir de fluides chauds au niveau de fumerolles. Les magnétites pourraient aussi provenir de la décomposition thermique (450°C environ) du carbonate de fer (sidérite) sous l'effet de la chaleur dégagée par un impact météoritique, éventuellement celui qui a éjecté la météorite de la surface martienne. En étudiant la météorite au niveau atomique, Bradley et al. (1998) ont effectivement découvert que les atomes d'oxygène de la magnétite sont alignés sur le même plan que ceux des carbonates. Ce qui tend à prouver que la magnétite est apparue directement là où on l'observe encore aujourd'hui, dans les carbonates, et non pas dans l'environnement cellulaire d'un micro-organisme martien. La magnétite se serait donc formée lors de la décomposition thermique de sidérite (carbonate de fer) au moment de l'impact qui a éjecté la météorite de la surface martienne. Ces travaux rentrent cependant en contradiction avec ceux attestant que les carbonates n'ont jamais été portés à des températures élevées, c'est-à-dire supérieures à 80°C.

Que peut-on conclure face aux nombreux travaux menés sur la météorite martienne ALH84001 ? Si la probabilité que cette dernière renferme des traces fossiles d'une vie martienne est proche de zéro, cette météorite a néanmoins provoqué une flambée d'intérêt à travers le monde pour la recherche de microfossiles dans les plus vielles roches terrestres, le développement de techniques de microanalyse toujours plus pointues et l'identification de biosignatures permettant de reconnaître avec certitude des traces de vie dans les matériaux extraterrestres.

ALH84001 a eu l'immense mérite de nous montrer à quel point nos connaissances sur les biosignatures sont naïves et fragmentaires. Après tout, n'est-il pas arrogant de prétendre reconnaître avec certitude des traces de vie dans les matériaux extraterrestres, alors que nous n'en sommes même pas capables avec les roches terrestres ?

Comme dans le cas de la controverse d'Apex, le cas ALH84001 permet de pointer les aspects critiques qui peuvent fausser la recherche d'une vie passée dans une roche donnée. Comme pour les cherts d'Apex, le contexte géologique n'est pas connu avec précision, et laisse planer de nombreux doutes sur l'environnement dans lequel la roche s'est formée, et sur l'aptitude de ce dernier a permettre le développement de formes de vie. Etant donné qu'il s'agit d'une météorite, la provenance exacte de la roche n'est effectivement pas connue (pire: il est toujours possible de douter qu'il s'agisse bien d'une météorite martienne, et seul un retour d'échantillons martiens nous fournira un véritable témoin positif permettant de valider une fois pour toute l'origine de cette famille de roches). Le problème du contexte géologique se pose en fait plus particulièrement pour les nodules de carbonates renfermant les indices

biogéniques. Comme indiqué précédemment, leur âge, ainsi que leur température de formation, sont toujours débattus.

Deuxième point, la faible taille des structures à étudier, depuis les nanocristaux de magnétite jusqu'aux nanostructures bactériomorphes. Les instruments d'analyse sont poussés dans leurs retranchements, et les mesures sont conduites aux limites. D'où l'importance de mettre au point, ou de rechercher, de nouvelles techniques d'investigations.

Troisième point, le problème de l'échantillonnage. Comme dans le cas des cherts d'Apex, les différentes équipes de recherche peuvent travailler sur des fragments de roche totalement différents. Non pas parce qu'ici l'affleurement n'a pu être retrouvé avec précision, et que les prélèvements ont eu lieu à des endroits différents (des problèmes qui se sont réellement posés dans l'étude des cherts d'Apex), mais parce que la météorite a été découpée en petits fragments, qui peuvent très bien ne pas être représentatifs de l'ensemble. Il n'est donc pas certain que chacun observe les mêmes structures. Devant les critiques soulevées par l'article de 1996 (Mckay et al., 1996a), l'équipe de McKay a par exemple indiqué que les structures mentionnées par d'autres chercheurs ne correspondaient pas aux nanofossiles décrits initialement (McKay et al., 1996b). Ainsi, les structures étudiées par d'autres équipes seraient trop nombreuses, trop bien ordonnées, trop rapprochées et trop petites, alors que les "vrais" nanofossiles martiens seraient au contraire isolés, incurvés, tout en se recoupant selon des angles variables (McKay, 1996b).

Enfin, soulignons l'important problème de la contamination, bien mis en évidence par les HAP (dont 80 % proviennent de l'antarctique, voir Jull et al., 1998) et les acides aminés.

Les deux controverses que nous venons d'évoquer ont des conséquences particulièrement profondes pour l'identification future de microfossiles dans les plus vieilles roches terrestres (archéen), ou dans des échantillons de roches extraterrestres ramenés sur Terre par des missions de retour d'échantillons. Elles ont, entre autre, permis de redéfinir certains critères d'identification de microfossiles précambriens, décrits ci dessous.

Critères d'identification de microfossiles

Depuis les années 1950, date de la découverte des premiers microfossiles précambriens, de nombreux auteurs ont tenté de dresser une liste de critères à respecter rigoureusement pour identifier des microfossiles au sein d'une roche sédimentaire donnée (Awramik et al., 1983; Awramik et al., 1988; Buick, 1983; Buick, 1988; Buick, 1990; Schopf et Walter, 1983, Westall, 1999). La liste la plus récente, basée sur Buick (1990), Schopf (1993), Schopf et al. (2004), Westall et Southam (2006), Westall et al. (2006a), sera présentée ici, son évolution au cours du temps dépassant le cadre de cette introduction.

Les critères peuvent être ventilés en deux catégories. La première, l'antiquité, adresse la problématique de l'âge de l'échantillon et des structures qu'il renferme. Il est impératif que :

- les microfossiles apparaissent dans des roches de provenance connue et pouvant être ré-échantillonnées (ce qui implique une connaissance des coordonnées géographiques de l'affleurement, et la possibilité de retrouver les affleurements une fois sur le terrain).

- les microfossiles apparaissent dans des roches dont l'âge est bien établi.

- l'indigénicité (association des microfossiles avec la roche elle-même) soit prouvée. Les microfossiles sont-ils inclus dans la matrice minérale (primaire ou secondaire), ou au contraire sont-ils uniquement présents à la surface, en tant que contaminants récents ? Des microorganismes ou des particules organiques peuvent facilement pénétrer dans la roche par le biais de vides, fractures, fissures, stylolithes ou cavités, sans compter les bactéries capables de creuser activement des galeries dans les roches. L'indigénicité est classiquement déterminée par l'examen de lames minces, qui est donc indispensable à toute étude micropaléontologique. A condition, bien entendu, que les microfossiles possèdent une taille supérieure à la limite de résolution du microscope optique.

- la syngénicité (piégeage des microorganismes durant le dépôt des minéraux primaires) soit prouvée. Les microfossiles sont-ils intimement associés avec une phase primaire, ou, au contraire, peuvent-ils avoir été introduits dans les pores et les fractures de la roche pour ensuite être pétrifiés par des minéraux secondaires ? La syngénicité est classiquement déterminée par l'examen de lames minces, qui est donc indispensable à toute étude micropaléontologique. Le principal problème lié à l'utilisation du microscope optique comme outil majeur pour l'étude de microfossiles tient bien évidemment à sa résolution optique, qui limite dramatiquement ses capacités. Au grossissement maximal (x1000), il est déjà délicat d'étudier la structure détaillée de bactéries vivantes, à moins d'utiliser certaines techniques particulières. Si les cyanobactéries possèdent bien souvent une taille supérieure à la limite de résolution du microscope optique, il n'en est pas de même pour d'autres bactéries, qui ont également pu être fossilisées. Certains chercheurs adoptent ici une position extrême, en éliminant d'entrée toutes structures ne pouvant être observées au microscope optique (Schopf, 2004), et apparaissant uniquement avec des instruments plus puissants, comme le microscope électronique à balayage (voir Westall et Southam, 2006; Westall et al., 2006a) ou le microscope à force atomique.

- le contexte géologique soit déterminé avec la plus grande précision. Les microfossiles doivent apparaître dans un contexte géologique compatible avec le développement de la vie, et dans une roche n'ayant été exposée qu'aux stades les plus faibles du métamorphisme (faciès zéolites, prehnite-pumpellyite, schistes verts).

La seconde catégorie de critères concerne la biogénicité même des microstructures, c'est à dire la détermination de leur nature biologique. La biogénicité est le critère le plus important, et la plupart des controverses sont dues à l'absence d'un système totalement fiable permettant de la reconnaître.

Peuvent être supposées d'origine biologique des microstructures qui :

- exhibent une morphologie compatible avec le vivant. Des mesures morphométriques sont indispensables pour la détermination des paramètres morphologiques et leur variation au sein de la population. Les deux principaux sont la taille et la forme (bien que d'autres paramètres, décrits plus en détail dans le paragraphe traitant de la morphologie, peuvent se révéler cruciaux). La taille doit être compatible avec la limite inférieur du vivant (200 nm, voir la controverse des nanostructures d'ALH84001), et peut également poser un problème instrumental lorsque la taille des microorganismes est située à la limite de résolution (0,2 micron pour le microscope optique). Il faut noter que la dégradation post-mortem (biologique ou diagénétique) peut parfois altérer de manière significative la gamme de morphologie exhibée par une population microbienne, et ce à une échelle spatiale qui peut-être micrométrique (Knoll, 1982; Westall et al., 2006a). De plus, certaines populations peuvent montrer un certain polymorphisme du à des facteurs biologiques (figure de division) ou environnementaux.

- sont relativement nombreux (si une cellule a été fossilisée, pourquoi pas les voisines ?), et forment les membres d'un assemblage biologique qui peut-être mono ou plurispécifique. Concernant le premier point, aucune description d'une structure unique ne devrait être acceptée. La plurispécificité n'est pas une obligation (Buick, 1990), contrairement à ce qui est défendu par certains auteurs (Schopf et Walter, 1983). Les environnements hostiles ou nouvellement colonisés sont souvent habités par une seule espèce. De plus, tous les organismes ne sont pas égaux devant la possibilité d'être fossilisé, et sur plusieurs espèces, une seule peut présenter des caractéristiques susceptibles de lui permettre d'être pétrifiée (Westall, 1997). Enfin, au moment de la fossilisation, la variabilité morphologique n'était peut-être par encore de mise (contrairement à la variabilité métabolique), et plusieurs espèces totalement différentes d'un point de vue génétique pouvaient très bien être identiques phénotypiquement parlant.

- montrent une complexité cellulaire. Les micro-organismes relativement sophistiqués d'un point de vue morphologiques comme les cyanobactéries se doivent d'exhiber une organisation cellulaire, c'est à dire une certaine complexité. D'une manière générale, les bactéries possèdent une organisation simple, et bien souvent seule la paroi est conservée.

- soient (idéalement) en partie organique. Il est effectivement appréciable que les microfossiles soient composés en partie d'un matériau carboné

(kérogènes) associé spatialement à la structure morphologique. Il existe cependant des cas ou le carbone peut avoir été totalement remplacé par des minéraux (épigénisation) ou simplement éliminé durant la diagenèse ou le métamorphisme. Pour des cyanobactéries ou des microfossiles relativement larges, comme ceux étudiés dans cette thèse, la couleur des structures doit être cohérente avec celles des particules de matière organique disséminées dans la matrice minérale (une couleur plus pâle par rapport à la matière organique particulaire indique souvent une contamination). Des mesures isotopiques (fractionnement typique de la photosynthèse par exemple pour le carbone, fractionnement typique de la sulfato-réduction pour le soufre) ou moléculaires (détection de biomarqueurs tels que les isoprénoïdes, les hopanes, les stéranes) peuvent se révéler très utiles, bien qu'elles ne puissent pas être utilisées de manière isolée. Des processus abiogéniques, tel que celui de la synthèse de Fischer-Tropsch, courant dans les systèmes hydrothermaux (Brasier et al., 2002; van Zuilen et al., 2002), peut conduire à un fractionnement du carbone similaire à celui observé dans le cas d'organismes vivants. De plus, à cause de mécanismes comme la diagenèse et le métamorphisme, il peut devenir très difficile, sinon impossible, de réaliser des analyses organiques moléculaires sur des matériaux carbonés dans des roches plus anciennes que 3 milliards d'années.

- montrent des figures de division, suggérant une capacité de reproduction.

- présentent des stades divers de préservation (variabilité taphonomique), depuis des cellules parfaitement conservées jusqu'à des cellules complètement dégradées par la diagenèse ou le métamorphisme, en passant par des structures aplaties, déformées, etc. Il est à noter que le niveau de préservation peut varier fortement à l'échelle de quelques microns, sans que l'on puisse parfois déterminer la cause de ces variations. Dans le cas de colonies microbiennes, il existe une co-existence de cellules vivantes et de cellules mortes, ces dernières, ayant généralement subi une lyse avant la fossilisation, pouvant donner naissance à des formes très dégradées, voire non reconnaissables.

- des cyanobactéries, ou des microfossiles larges, doivent exhiber une cavité remplie par une matrice minérale en leur centre. Etant donné que la paroi cellulaire ou la gaine gélatineuse, deux structures par nature plus résistantes que les autres composants de la cellule, sont bien souvent les seules à avoir été préservées, et que toute cellule est par définition un sac rempli de liquides, les microfossiles doivent présenter un vide en leur centre, vide qui est ensuite occupé par un ou plusieurs minéraux. Les fluides intracellulaires sont rarement préservés et quand ils le sont, ils n'occupent qu'une petite partie du volume interne (bille de cytoplasme dégradé). Toutes les microstructures organiques pleines ou solides doivent donc être par définition traitées avec suspicion. L'existence d'une lumière

centrale peut cependant être délicate à déterminer dans le cas de fossiles très petits.

Il est particulièrement important de noter que les méthodes établies pour les microfossiles du protérozoïque s'appliquent rarement aux roches archéennes plus anciennes. Les assemblages fossilifères préservés dans des cherts déposés dans des étendues d'eau peu profondes sont souvent relativement bien préservés. Les structures ont été perminéralisées par des fluides superficiels souvent neutres, avec un Eh modéré, dilué et plutôt froid (inférieur à 50°C). De part leur âge plus récent, ils ont subi une histoire tectonique moins intense que celle des sédiments archéens : le métamorphisme peut être resté minimal (faciès zéolites), tout comme les déformations. La préservation des microfossiles dans les roches protérozoïques peut être donc plutôt bonne, étant donné que leur histoire est plus courte, et qu'elles ont été moins exposées à des changements chimiques et cristallographiques sous l'influence de la pression et de la température (Buick, 1990).

Au contraire, dans les régions d'âge archéen, les sédiments silicifiés ont probablement été perminéralisés par des fluides hydrothermaux hautement acides, parfois réduits mais pas nécessairement (Orberger et al, 2006), très concentrés et très chauds (supérieur à 100°C).Ils ont tous invariablement été soumis à un degré de métamorphisme plus élevé que les roches protérozoïque (faciès prehnite-pumpellyite au minimum, jusqu'au stade amphibolite/granulite), et à plusieurs phases de déformation (bien que, en quelques endroits, les roches archéennes aient pu néanmoins être très bien préservées). Le contexte tectonique est également bien différent, et si la plupart des cherts d'âge protérozoïque se sont déposés dans des bassins subsidants de façon régulière et continue, et qui n'ont ensuite été soumis qu'à une déformation relativement modérée, les roches fossilifères archéennes sont associées à des ceintures de roches vertes, des bassins volcano-sédimentaires qui ont subi des phases tectoniques intenses et prolongées (Buick, 1988). Au cours de la diagenèse et du métamorphisme, les structures cellulaires subissent des altérations et finissent par adopter des formes très simples (coques ou filaments) qui rendent plus délicates l'étude morphologique. Ce processus a pris le nom d'archéanisation (Knoll et al., 1988). Ainsi, si la morphologie des microfossiles peut constituer un élément de diagnostic sûr au protérozoïque, il n'en est pas de même à l'archéen.

Enfin, il faut noter que, comme les microfossiles archéens représentent les plus vieilles traces de vie connues, les preuves nécessaires pour les reconnaître comme telles doivent être très solides, non équivoques, et un ordre de grandeur au-dessus de celles qui sont demandées pour identifier des formes plus jeunes (Buick, 1990). Comme l'a indiqué l'astronome américain Carl Sagan, «des affirmations extraordinaires requièrent des preuves extraordinaires».

Voyons maintenant un peu plus en détails les différents critères actuellement utilisés pour établir la biogénicité d'une structure donnée.

Les signatures morphologiques

De tous les critères utilisés pour déterminer la biogénicité, le plus employé est sans nul doute la morphologie. Bien qu'il semble naturel d'attendre qu'un microfossile adopte une morphologie typique du vivant, de nombreux travaux ont montré que la morphologie était un paramètre particulièrement ambigu (Francis et al., 1978).

Des mesures statistiques de différents paramètres (comme la taille) peuvent échouer à différencier des microfossiles réels d'artefacts abiogéniques (Buick, 1990). L'identification d'une organisation cellulaire peut-être très délicate, étant donné que les objets observés sont par définition très simples. A quel niveau de complexité morphologique une structure peut-être elle considérée comme étant une relique cellulaire ?

Les cellules sphériques posent un problème de simplicité morphologique, et de nombreux auteurs estiment qu'une simple coque isolée est insuffisamment complexe pour être reconnue comme indubitablement biogénique, étant donné sa ressemblance avec certains artefacts carbonés abiogéniques (qui adoptent souvent la forme d'une sphère, voir Schieber et Arnott, 2003). Seule une réelle complexité cellulaire, prouvée par la présence d'une bille de corps internes carbonés, de parois laminées, d'ornementations de surface, d'association en colonies, de texture de parois ou d'un polysaccharide extracellulaire (Westall, 1999; Westall et Southam, 2006), pourrait permettre de prouver leur ancienne nature biologique.

La situation est un peu plus simple avec les filaments. Ces derniers, surtout ceux de cyanobactéries, sont la cible de prédilection des micropaléontologistes du Précambrien : leur taille est souvent plus importante que celle des coques, et ils possèdent également souvent une structure plus complexe : enveloppes, segmentations, ornementations pariétales, cellules terminales arrondies. Cependant, la forme filamenteuse est bien loin de constituer un critère valable. Des filaments carbonés abiogéniques peuvent être simplement formés par la migration de particules de kérogènes sous l'influence du front de croissance de cristaux durant la diagenèse. La controverse qui entoure les structures carbonées des cherts d'Apex en constitue un bon exemple (Schopf, 1993; Brasier et al., 2002). Le mouvement de cristaux de pyrite dans une matrice minérale riche en kérogènes peut aussi aboutir à la formation de tubes creux de diamètre et de forme constants (Buick, 1990).

La liste ci-dessous dénombre quelques indices morphologiques secondaires pouvant être utilisés pour confirmer la biogénicité d'une structure donnée, en dehors des paramètres classiques que sont la forme et la taille :

- Les microfossiles doivent montrer des preuves de flexibilité (surtout les bâtonnets et les filaments), signe de leur consistance molle. Ils doivent donc épouser la surface rocheuse, ou être tortueux.

- Si les microorganismes sont benthiques, ils devraient être associés à des biofilms, souvent très bien préservés dans les sédiments (ce n'est pas le cas pour les espèces planctoniques).

- Lorsqu'une cellule bactérienne est soumise à des variations de pression osmotique, sa paroi a tendance à se plisser. Après la fossilisation, la cellule présentera un aspect ridé, ratatiné, caractéristique.

- Lorsqu'une cellule meurt, la paroi a souvent tendance à se rompre, ce qui permet aux fluides intracellulaires de se répandre dans le milieu extérieur. Comme un ballon de baudruche percé, la cellule se ratatine sur elle-même.

- Dans le cas de filaments, ces derniers peuvent être divisés en segments (septa), mais ce n'est pas une obligation. De la même manière, la présence d'une cellule terminale arrondie est un plus (les minéraux se terminant souvent de façon angulaire), mais le filament peut parfaitement être tronqué, ou ne représenter qu'une gaine mucilagineuse, et non pas les parois cellulaires.

Artefacts cellulaires

La diagenèse ou le métamorphisme peuvent conduire à l'apparition de structures trompeuses, qui semblent marquer une complexité cellulaire plus élaborée qu'elle ne l'est réellement. Ainsi, lors de la mort cellulaire, le cytoplasme a tendance à former une bille organique qui peut rappeler certains organites, comme un noyau ou un pyrénoïde (Francis et al., 1978; Westall et al., 1995). La croissance des cristaux lors de la diagenèse peut imprimer une ornementation factice à la surface des parois carbonées (Schopf et Klein, 1992). La croissance d'un cristal au sein d'un filament peut aboutir à un élargissement local, qui sera interprété comme une cellule spécialisée, hétérocystes ou akinètes chez les cyanobactéries par exemple (Knoll et al., 1988).

De nombreux éléments totalement abiogéniques peuvent mimer, parfois presque à la perfection, des microorganismes fossilisés, comme des sphérules de chalcédoine (Buick, 1990), ou des cristaux d'oxydes de titane. Certains cristaux bactériomorphes, en s'associant de façon particulière (maclage), peuvent même imiter une division cellulaire, et ajouter encore à la confusion. Il convient également de se méfier des pseudo-fossiles organiques. Des pelotes de molécules organiques, comme des gouttelettes lipidiques ou des microsphères prébiotiques de synthèse (Folsome et al., 1975; Fox et al., 1959), des kérogènes repoussés par la croissance des minéraux durant la diagenèse ou entourant des cavités, peuvent effectivement être fossilisées. Ces vésicules possèdent souvent une taille et une forme caractéristique du monde microbien, et il est alors particulièrement aisé de les confondre avec des coques ou des coccobacilles, d'autant plus que certaines peuvent même se scinder en deux, mimant alors une division cellulaire (Schopf et Walter, 1983).

Récemment, des filaments organo-minéraux de taille micrométrique et présentant une complexité similaire à celle du vivant ont pu être

synthétisés dans des conditions de laboratoire par la co-précipitation de sels de baryum et de silice suivi d'une condensation de matière organique abiogénique (Garcia-Ruiz et al., 2002; Garcia-Ruiz et al., 2003; Hofmann, 2004). Il s'agit cependant de structures pleines, sans lumière cellulaire, et ces dernières ne répondent donc pas à un critère de biogénicité majeur (Schopf et al., 2005). L'importance géologique des minéraux utilisés dans ces expériences est également discutable : les espèces minérales employées ne se sont sans doute pas formées sur la Terre primitive, ou ne sont pas connues comme étant capable de préserver des structures organiques (Schopf et al., 2005).

Enfin, pour compliquer le tout, la préparation même des échantillons pour l'observation au microscope électronique (Steele et al., 1998) ou au microscope à force atomique peut également donner naissance à des artefacts trompeurs.

La prudence doit donc être de mise lors de l'utilisation de la morphologie comme critère de biogénicité. C'est encore plus vrai lorsque cette dernière est employée comme marqueur du métabolisme. Chez des organismes procaryotes, la morphologie, toujours très simple, masque une étonnante diversité métabolique, et étant donné les modifications morphologiques que les microorganismes peuvent subir au cours de la diagenèse, les données morphologiques ne doivent en aucun cas être employées pour inférer l'existence d'une voie métabolique (Kempe et al., 2002). D'une manière générale, la morphologie n'indique rien sur la machinerie biochimique interne des cellules (paléophysiologie).

Les signatures moléculaires

Historiquement, la morphologie a été le premier critère utilisé, mais de nombreux travaux, dont la fameuse controverse des cherts d'Apex (Schopf, 1993; Brasier et al., 2002; Brasier et al., 2004), ont démontré son insuffisance quand elle est utilisée de manière isolée, particulièrement dans le cas de cellules sphériques. L'identification de microfossiles sur des critères morphologiques doit donc impérativement être effectuée avec une grande prudence et couplée avec d'autres indices, tels que la signature isotopique du carbone, ou, mieux, la présence de marqueurs moléculaires.

A l'heure actuelle, la signature moléculaire, c'est à dire l'identification dans des roches sédimentaires de molécules spécifiques du vivant et résistantes à la fossilisation, est vraisemblablement la technique la plus prometteuse pour la recherche de traces de vie dans des roches terrestres et extraterrestres. La grande résistance des biomarqueurs moléculaires, ainsi que leur indéniable origine biologique, en font des cibles de choix pour la recherche de traces de vie. Etant donné que personne ne remet en question pour l'instant la nature biologique des biomarqueurs moléculaires tels que les isoprénoïdes et les terpénoïdes (contrairement aux structures morphologiques, ou à la signature isotopique, qui peuvent être d'origine abiogénique), la recherche d'une signature moléculaire semble être la plus

prometteuse dans le cas ou la matière organique a pu survivre à la fossilisation. Cependant les effets de la diagenèse et du métamorphisme sur des périodes de temps géologiques contribuent à la dégradation de ces molécules biomarqueurs jusqu'à leur disparition, surtout dans des roches très anciennes comme celles de l'archéen inférieur.

Grâce à leur squelette carboné particulièrement résistant, les isoprénoïdes, les terpénoïdes des membranes lipidiques et les chaînes latérales de certains pigments (comme la chlorophylle) peuvent effectivement survivre aux dégradations biologique, diagénétique et métamorphique (Summons, 1993). La plupart de ces molécules renseignent également sur la phylogénie (identification du domaine ou du phylum), et quelques-unes signent même des voies métaboliques spécifiques (Summons, 1999). Les ratios des isomères et les coupures des chaînes latérales peuvent aussi révéler l'état d'oxydo-réduction de l'environnement diagénétique, et l'histoire thermique des roches (Summons, 1993).

Les analyses permettant de détecter des biomarqueurs moléculaires ne peuvent cependant être réalisées que sur roche totale, étant donné la très faible teneur en carbone de nombreuses roches sédimentaires archéennes ou protérozoïques (cherts). L'idéal serait de réaliser ces mesures localement, au sein même d'un microfossile, à l'image des mesures isotopiques effectuées par sonde ionique. Aucune technique actuelle ne semble cependant être en mesure de réaliser ce type d'analyses. De plus, l'hypothèse d'une contamination par des molécules plus récentes ne peut jamais être définitivement écartée.

Des biomarqueurs (en particulier des hopanes, marqueurs de cyanobactéries, des stéranes, marqueurs des eucaryotes, et des chaînes aliphatiques d'isoprénoïdes, marqueurs des archées) ont ainsi été retrouvés dans des schistes riches en kérogène, âgés de 2,7 milliards d'années et provenant du bassin de Hamersley en Australie (Mt. McRae), qui fait partie de la région la moins métamorphisée et déformée du craton de Pilbara (Brocks et al., 1999; Summons et al., 1999). Dans un premier temps, une contamination lors des analyses de laboratoire, lors du forage, par un biotope souterrain ou par des infiltrations récentes de fluides pétroliers avait été rejetée, mais la question se pose désormais de savoir si les biomarqueurs identifiés sont bien des hydrocarbures indigènes d'âge archéen supérieur, et non des contaminants.

La contamination est un problème crucial dans la recherche des plus anciennes traces de vie terrestre. Les roches archéennes, et dans une moindre mesure, les roches protérozoïques, ont été exposées pendant des milliards d'années à des percolations chimiques (fluides hydrothermaux, gaz), à des infiltrations d'eau souterraines récentes chargées de molécules organiques, sans compter qu'elles sont aussi souvent altérées et contaminées par des communautés microbiennes vivantes (Brocks et al., 2003).

Les signatures isotopiques

Comme tous les autres indicateurs de biogénicité, les signatures isotopiques ne peuvent constituer en soi un marqueur fiable et non équivoque de l'origine biologique d'une structure donnée. Cependant, dans le cas de roches très métamorphisées, il s'agit bien souvent de la seule signature encore présente. Au-delà d'un certain niveau de métamorphisme (correspondant grosso modo au faciès schistes verts, c'est-à-dire à des températures de 350°C à 500°C et des pressions supérieures à 3 kilobars), les corps cellulaires sont irrémédiablement détruits, ou altérés au-delà de toute reconnaissance. La maturation de la matière organique a été poussée à l'extrême, et le carbone n'est plus présent que sous la forme de graphite, l'information moléculaire étant alors perdue. Dans ces roches, l'identification de traces de vie dépend donc uniquement de la présence d'indicateurs isotopiques (Schidlowski, 1979).

La signature isotopique la plus pertinente est celle du carbone, tous les êtres vivants connus sur Terre étant constitués de molécules organiques. Le rapport $^{12}C/^{13}C$ est de 89 pour les carbonates marins de référence (belemnites), et de 91 à 92 pour la matière organique (Schopf et Klein, 1992). L'enrichissement de la matière organique biologique en carbone 12 par rapport au carbone 13 a longtemps été considéré comme une preuve définitive d'une activité biologique, puisqu'on ne connaissait aucun mécanisme non biologique capable de l'imiter (Schidlowski, 1988).

Les plus vielles roches jamais trouvées sur Terre sont des gneiss de la région d'Acasta au Groenland (Bowring et Williams, 1999), mais aucune biosignature isotopique ne peut avoir été préservée dans ce type de roches. Les plus anciennes signatures isotopiques ont été découvertes au Groenland, dans la région d'Isua et d'Akilia, dans des roches vieilles d'environ 3,8 milliards d'années (Schidlowski, 1988; Mojzsis et al., 1996; Rosing, 1999).

L'origine biogénique de ces signatures n'a été contestée que récemment, sur la base de plusieurs points : (1) une contamination de la roche par des matériaux carbonés récents (pouvant provenir de microorganismes endolithiques, voir van Zuilen et al., 2002; Westall et Folk, 2003) ou météoritiques (Schoenberg et al., 2002), (2) des interprétations correctes concernant le protolithe, qui doit être d'origine sédimentaire (Fedo et Whitehouse, 2002; Dauphas et al., 2004; Lepland et al., 2005), (3) une compréhension des mécanismes abiogéniques pouvant produire un matériau dont les propriétés imitent celles d'un matériau biogénique (Horita et Berndt, 1999; Holm et Charlou, 2001; van Zuilen et al., 2002; 2003) et (4) une compréhension de l'évolution du signal isotopique au cours du temps (Strauss et al., 1992). Concernant ce dernier point, rien ne prouve qu'un signal isotopique d'origine biologique puisse résister à un métamorphisme courant sur plusieurs milliards d'années.

Au vu des controverses qui entourent la signature isotopique du carbone, il parait évident que la pertinence des isotopes d'autres éléments comme le fer ou l'azote, proposés par certains auteurs comme des marqueurs du vivant, devra aussi faire l'objet d'une évaluation soignée. En résumé, les nombreux travaux, souvent contradictoires, qui ont suivi la publication de l'article original de Mojzsis en 1996 (Mojzsis et al., 1996) montrent combien est grande la difficulté de lire avec clarté les plus anciens enregistrements fossilifères isotopiques de la Terre. On y retrouve les points déjà soulevés lors des controverses entourant les cherts d'Apex et la météorite martienne ALH84001 : importance de la détermination du contexte géologique, difficultés analytiques, problématique de la contamination.

Les signatures biominérales

Les êtres vivants interagissent fortement avec le monde minéral, et cette interaction laisse souvent des traces caractéristiques, depuis des cicatrices de corrosion à la surface d'un minéral (différentes d'une corrosion purement chimique, voir Furnes et al., 2004), jusqu'à la synthèse d'espèces minérales aux propriétés bien particulières, comme la pyrite framboïdale ou la magnétite (McKay et al., 1996a; Thomas-Keprta et al., 2000; Friedmann et al., 2001; Thomas-Keprta et al., 2001).

Conclusion

Les difficultés listées dans cette introduction soulignent les piéges potentiels dans la détermination de la biogénicité des signaux structuraux et biochimiques dans des roches très anciennes. Cependant, en se basant sur l'ensemble des évidences disponibles, depuis le contexte géologique et environnemental (habitabilité) jusqu'aux biosignatures, il est néanmoins possible de parvenir à un degré de fiabilité acceptable dans l'interprétation de la biogénicité d'une structure donnée (Westall et al., 2006b; Westall et Southam, 2006).

Il est cependant clair que l'étude de biosignatures dans les roches précambriennes (et spécialement archéennes) est semée d'embûches. L'importance de la détermination du contexte géologique a été démontrée, ainsi que le problème de la contamination, que ce soit par des microorganismes ou des matériaux carbonées. Enfin, étant donné la taille micrométrique des structures étudiées, et l'importance grandissante des mesures chimiques par rapport aux critères purement morphologiques, il semble évident que de nouvelles techniques analytiques devront être employées dans le futur pour étudier les microfossiles précambriens.

Ces dernières années, plusieurs techniques sont venues enrichir la boîte à outils du micropaléontologiste du Précambrien : microscopie électronique à transmission après découpe FIB (Kempe et al., 2005), microanalyse isotopique par sonde ionique (House et al., 2000), cartographie submicrométrique du carbone par microsonde électronique (Boyce et al.,

2001), analyse organique *in-situ* par micropyrolyse laser (Arouri et al., 1999; Arouri et al., 2000), microspectrométrie Raman (Arouri et al., 2000; Kudryavtsev et al., 2001; Schopf, 2002; Schopf et Kudryavtsev, 2005; Schopf et al., 2005), C-XANES (Cody et al., 1996; Boyce et al., 2002; Boyce et al., 2003) et FTIR (Marshall et al., 2005).

C'est cette approche instrumentale qui a été suivie dans le cadre de cette thèse. L'objectif des travaux présentés ici était de déterminer les potentialités offertes par une technique relativement récente, la microscopie à force atomique (Binning et al., 1986). Au moment ou ces travaux ont été lancés, seule la structure fine des parois de cellules relativement volumineuses d'acritarches avait été étudiée avec cet instrument (Kempe et al., 2002; Kempe et al., 2005). D'un diamètre de 50 microns, ces microfossiles étaient relativement aisés à localiser avec l'instrument. La majorité des mesures effectuées correspondaient à des images de hauteur (images topographiques en 3D de la surface de l'échantillon). L'analyse de courbes de force avait permis de caractériser l'adhésion des matériaux carbonés constituant la paroi des cellules d'acritarche, mais seulement le long d'une ligne.

L'objectif de cette thèse était de continuer ces études, en analysant des microfossiles plus petits que des acritarches (jusqu'à 1,5 microns), et plus représentatifs des microfossiles de l'archéen. Afin d'établir le potentiel de cette technique, des microfossiles reconnus comme tels par l'ensemble de la communauté scientifique ont été choisis comme échantillons de référence pour tester l'utilité de la microscopie à force atomique dans le domaine de la micropaléontologie précambrienne. Ces microfossiles proviennent de deux assemblages fossilifères, celui de la formation Gunflint (Tyler et Barghoorn, 1954; Barghoorn et Tyler, 1965), et celui de la formation Draken (Knoll, 1982; Knoll et al., 1991).

Outre la résolution des problèmes de localisation liés à la petite taille des micro-organismes, et l'adaptation du protocole d'attaque acide, nécessaire pour dégager les parois organiques des microfossiles, l'étude menée ici devait également permettre de déterminer l'importance potentiel de modes physiques jamais utilisé jusqu'à présent en micropaléontologie précambrienne, tel que l'imagerie de force latérale, l'imagerie force volume et l'imagerie de phase. Au vu des résultats obtenus sur les microfossiles de la formation Draken et de la formation Gunflint, une réflexion approfondie sur le potentiel de la technique dans le domaine de la micropaléontologie (terrestre et extraterrestre) devait aussi être menée.

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

«Le hasard ne favorise que les esprits préparés.»
Louis Pasteur

Microscopie optique

Principe

Le microscope optique fait partie de la famille des microscopes à champ lointain, et utilise le rayonnement transmis ou réfléchi de la lumière visible pour étudier un objet donné (alors que les microscopes en champ proche s'appuient sur une sonde, déplacée à la surface de l'objet étudié et maintenue en contact ou à très faible distance de celui-ci, au moyen d'une boucle de rétroaction).

Le microscope optique se base sur un jeu de lentilles pour obtenir une image agrandie de l'échantillon à observer. La lentille la plus proche de l'échantillon à observer, l'objectif, fournit une première image agrandie de l'objet. Celle-ci sera agrandie une seconde fois par l'oculaire.

Dans un microscope optique standard fonctionnant en transmission, la lumière (lumière ambiante réfléchie par un miroir, ou lampe électrique) arrive par le bas, et passe au travers d'un ensemble de diaphragmes et de condenseurs, avant d'arriver sur l'échantillon fixé sur une platine mobile. La lumière est alors recueillie par l'objectif (chaque microscope étant équipé de plusieurs objectifs offrant des grossissements variables et montés sur une tourelle), passe dans le tube optique, et parvient finalement à l'oculaire (qui peut-être simple ou double), où l'observateur pose son œil. L'ensemble objectif oculaire est déplacé grâce à des molettes (permettant des réglages grossiers ou fins), afin de réaliser la mise au point en amenant le plan focal de l'objectif sur l'échantillon. En mode réflexion, qui permet l'étude des surfaces, l'échantillon est éclairé par le dessus.

Si le détecteur classique en microscopie optique est l'œil humain, les microscopes sont souvent équipés d'appareils photographiques argentiques, de caméras vidéo, et désormais de capteurs CCD. Différents systèmes, tels que des filtres polarisants, peuvent augmenter les capacités analytiques de l'instrument. Le pouvoir de résolution d'un microscope optique est limité par la longueur d'onde du rayonnement employé, soit 400 nm en théorie (correspond à la longueur d'onde du violet).

Dispositif expérimental

Toutes les lames minces (30 microns d'épaisseur) taillées dans les roches des formations Draken et Gunflint ont été observées avec un microscope optique Olympus BX51. Ce microscope offre une grande variété de grossissements, de 50x à 1000x, ce dernier étant possible par l'intermédiaire d'un objectif ne nécessitant pas d'huile à immersion. L'utilisation d'un objectif 100x fonctionnant à l'air permet d'éviter la contamination des lames minces avec de l'huile à immersion. Effectivement, même si ces dernières peuvent être ensuite nettoyées par un mélange 30/70 d'éthanol et d'éther, des traces d'huile peuvent tout à fait rester sur les lames et venir perturber les mesures de surface effectuées avec le microscope à force atomique.

Le microscope Olympus BX51 fonctionne à la fois en lumière transmise et en lumière réfléchie (BX-URA2). La platine rotative, ainsi qu'un ensemble analyseur/polariseur, permet les observations en lumière polarisée, quelque soit le type d'éclairage.

Pour les prises de vue, le microscope est équipé d'une caméra CDD DP12 de 3,34 millions de pixels, contrôlable à partir d'un module de commande, ou directement depuis un ordinateur équipé du logiciel AnalySIS et connecté par liaison USB au module de contrôle. Cette configuration est celle qui offre le maximum de flexibilité. Le logiciel AnalySIS permet la capture, le traitement et l'analyse des images.

L'étalonnage du micromètre logiciel a été effectué en utilisant la cible de calibration du microscope à force atomique, constituée d'une série de puits carrés de 5 microns de côté et espacés les uns des autres de 5 microns.

Microscopie à force atomique

Introduction

Le principe du microscope à force atomique (AFM) est différent des microscopes optiques ou électroniques. L'AFM appartient à une classe de microscopes (dit à sonde locale ou à champ proche) qui ne possèdent pas de lentilles (que ce soit des lentilles de verre pour les microscopes optiques, ou des lentilles électromagnétiques dans les microscopes électroniques). Le premier instrument de cette famille, le microscope à effet tunnel, fut inventé en 1982 par Binnig et Rohrer, qui reçurent le prix Nobel de physique en 1986 pour leur découverte. La même année, Binnig et son équipe inventèrent une variante du microscope à effet tunnel, le microscope à force atomique (AFM) (Binning et al., 1986).

Par rapport à d'autres microscopes, comme le microscope optique ou électronique, l'AFM offre plusieurs avantages. Le grossissement peut-être particulièrement important, puisque dans certaines conditions (surface atomiquement plate, faible niveau de bruit, travail sous vide), l'AFM est capable d'imager des atomes. Les traitements appliqués à l'échantillon sont de plus minimes, la seule contrainte à respecter étant de produire une surface plate, les reliefs devant être de dimensions micrométriques. Ainsi, dans le cas du D3100 utilisé dans le cadre de cette thèse, les reliefs présents à la surface des lames minces de roches ne pouvaient pas dépasser 6 microns, une valeur correspondant au débattement vertical maximal des céramiques piezoélectriques du scanner (voir plus loin). Les mesures peuvent aussi bien être réalisées dans l'air, dans l'eau (ce qui rend possible l'imagerie de cellules vivantes) ou sous vide. A titre de comparaison, les microscopes électroniques nécessitent de travailler sous vide, et avec des échantillons souvent recouverts d'une pellicule métallique conductrice (de façon à pouvoir évacuer les électrons et éviter ainsi une accumulation des charges à la surface de l'échantillon).

Dispositif expérimental

Les analyses ont été effectuées avec un microscope à force atomique Dimension 3100 de la marque Veeco (figure 2 page 36). L'instrument Dimension 3100 comprend le microscope lui-même, un boîtier contrôleur 3100, un boîtier Nanoscope IIIa, ainsi qu'un boîtier Quadrex Extender Electronics Module Phase. Le microscope est monté sur une table anti-vibration à cousin d'air équipée d'un caisson acoustique (VT-103-3K), qui permet ainsi d'éliminer ou d'atténuer fortement les vibrations mécaniques et sonores. Le caisson est abaissé durant les mesures, et soulevé uniquement lorsqu'un accès à l'instrument s'impose.

Le contrôleur D3100 intègre l'illuminateur de la caméra optique du microscope, l'alimentation, la pompe à air (qui injecte de l'air sous la platine du microscope, de manière à créer un cousin d'air sur lequel la

lourde platine peut glisser), la pompe à vide (qui permet d'assurer l'adhérence de l'échantillon sur la platine du microscope) et les moteurs pas à pas. Le contrôleur Nanoscope IIIa contrôle quant à lui la tête du microscope et le scanner.

Le microscope à force atomique est commandé par l'intermédiaire d'un ordinateur de bureau équipé de deux écrans, d'un clavier, d'une souris et d'un trackball (qui permet de déplacer la platine, d'effectuer la mise au point de la caméra optique, et de modifier le grossissement). Le logiciel propriétaire utilisé pour commander le D3100 est le Nanoscope (version 5.12b49).

Pour localiser grossièrement la zone à imager, le microscope dispose d'une caméra optique fonctionnant en lumière réfléchie (410x à 1845x, pour un champ de vision de 810 microns à 180 microns). L'éclairage peut être commandé manuellement, par l'intermédiaire du contrôleur D3100, ou bien par l'ordinateur, qui sert aussi à contrôler la mise au point et le grossissement. Les images fournies par le microscope optique peuvent être capturées. Cette caméra est aussi indispensable pour localiser le levier et la pointe par rapport à la surface de l'échantillon. Ces informations sont exploitées par le microscope pour réaliser l'engagement, c'est-à-dire le contact de la pointe avec la zone désirée de l'échantillon. Le moteur de mise au point permet de placer le plan focal de 1,5 mm au dessus du levier, à 3,5 mm en dessous du levier.

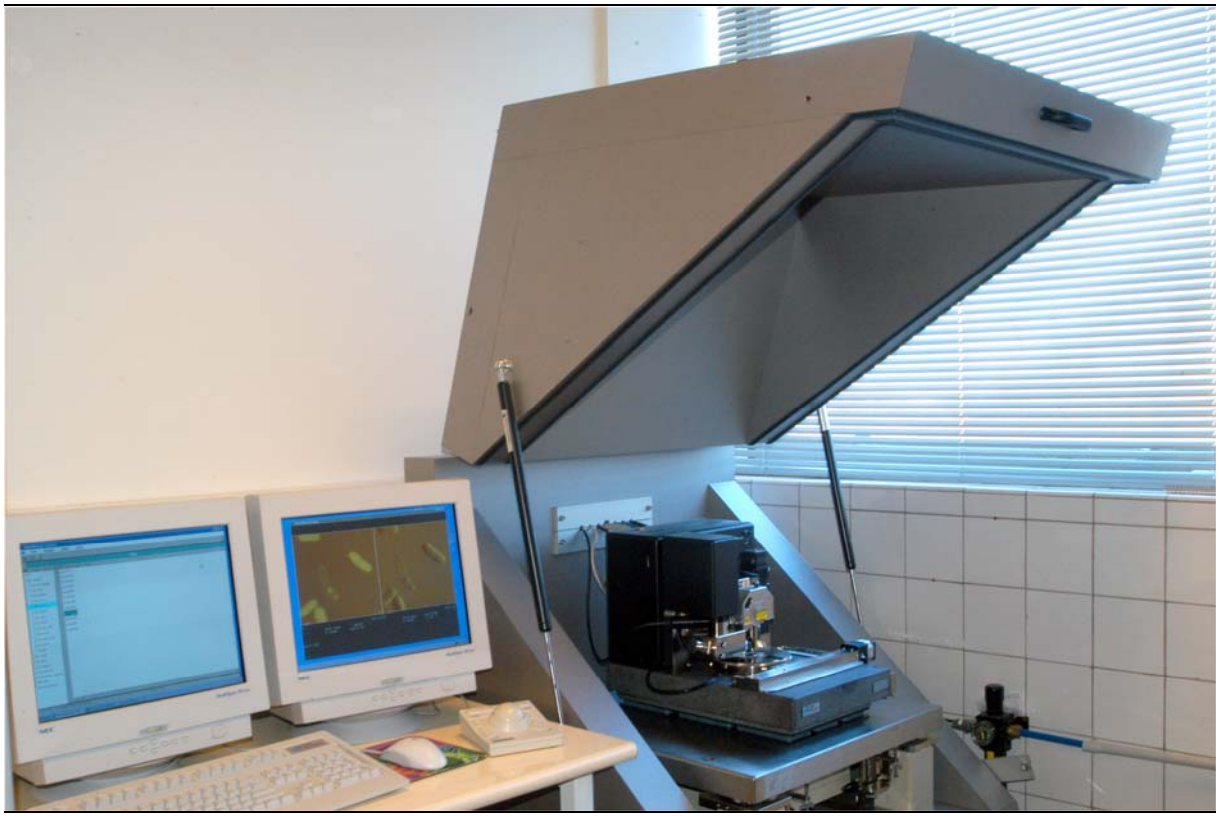


figure 2. Photo du microscope à force atomique du Centre de Biophysique Moléculaire. L'instrument lui-même (à droite) est monté sur une table anti-vibration et protégé par un

caisson acoustique. Les deux moniteurs (à gauche), reliés à un ordinateur, permettent de contrôler l'instrument.

Le moteur qui contrôle les mouvements verticaux de la tête du microscope permet d'effectuer des approches et des engagements de la pointe de manière automatique et précise. L'échantillon peut être déplacé sous la tête du microscope par l'intermédiaire d'une platine dotée de moteurs pas à pas.

La tête du microscope D3100 (scanner modèle 1760gn type G, balayage maximal 120 microns) a pour fonction de déplacer la pointe sur la surface de l'échantillon, et, grâce à un laser (d'une puissance de 1 mW à 670 nm), d'enregistrer la déflexion du levier à un instant donné. Un moteur pas à pas permet d'ajuster la hauteur de la tête du microscope par rapport à la surface de l'échantillon, avant l'engagement proprement dit.

La pointe est fixée sur la tête du scanner par l'intermédiaire d'un porte levier dont le rôle est de supporter la pointe à un angle bien défini (10 à 12°). Ce support utilisé pour l'imagerie dans l'air est remplacé par un porte-levier spécial fabriqué en verre pour l'imagerie dans l'eau (ce qui permet de maintenir le trajet optique du laser constant : la diffusion à l'interface air/eau rendrait effectivement les mesures impossibles). Le porte-levier utilisé dans l'air possède des petites céramiques piézo-électriques servant à l'excitation du levier en mode tapping. Ces céramiques étant absentes sur le porte-levier en verre, l'excitation est alors fournie par l'électrode Z de la tête du microscope.

Le D3100 est un microscope à force atomique relativement polyvalent, qui offre de nombreux modes d'imagerie. Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé les modes suivants: contact (dans l'air et dans l'eau), tapping (dans l'air et dans l'eau), imagerie de force latérale (LFM), imagerie force volume et imagerie de phase. Ces différents modes sont décrits plus loin en détail.

Les pointes

L'AFM produit des images haute résolution et en trois dimensions en balayant la surface de l'échantillon avec une pointe extrêmement fine (idéalement un seul atome, dans la pratique un rayon de courbure à l'apex d'une dizaine de nanomètres) montée sur un minuscule levier très flexible.

La pointe est habituellement taillée dans un matériau très résistant, comme le diamant, la silice ou le nitrure de silicium. Au cours de son déplacement au-dessus de l'échantillon, cette dernière est soumise à des forces infinitésimales (entre 10^{-11} et 10^{-8} newtons) qui peuvent être soit attractives (la pointe est attirée vers la surface) soit répulsive (la pointe est repoussée). L'AFM contrôle en permanence la valeur de la force à l'interface pointe-échantillon via une boucle d'asservissement, ce qui lui permet de reconstruire une image de la surface.

Les pointes (figure 3 page 40) constituent le cœur du microscope à force atomique, et leurs choix conditionnent grandement la qualité des images qui vont être obtenues. Plusieurs paramètres sont à prendre en compte dans ce choix:

- Le rayon de courbure de l'extrémité de la pointe. C'est lui qui détermine la résolution latérale de l'image, plus l'extrémité de la pointe est fine, meilleure sera la résolution. De nombreux artefacts de mesures proviennent d'une contamination de l'extrémité de la pointe, qui perd sa finesse. De nombreuses pointes ont été testées durant ces travaux, depuis des pointes possédant un rayon de courbure de 20 nm jusqu'à des nanotubes de carbone de 2 nm de diamètre. Il convient cependant de se rappeler que plus le rayon de courbure est petit, plus grande est la force que les pointes exercent sur l'échantillon, d'où une augmentation des risques de destruction de l'échantillon.

- La forme de la pointe. Comme l'indique le tableau 1, les pointes de microscopie à force atomique possèdent différentes géométries, qui peuvent grandement influencer la mesure. La rugosité maximale d'un échantillon analysable par microscopie à force atomique est avant tout conditionnée par le débattement maximal de la tête du scanner dans l'axe Z (6,7 μm dans le cas du D3100), mais la géométrie de la pointe joue également un rôle. Des pointes longues, possédant un angle d'ouverture faible (haut ratio d'aspect), devront être utilisées pour apprécier le plus justement possible l'état de surface d'un échantillon rugueux.

A cause des procédés utilisés pour leur fabrication, certaines pointes peuvent être symétriques latéralement, et asymétriques sur l'axe de déplacement. L'angle avec lequel les pointes sont montées sur le porte-levier affecte aussi l'interaction de la pointe avec la surface de l'échantillon (ainsi, pour mesurer avec précision la géométrie d'un échantillon possédant des reliefs importants, il peut être nécessaire d'utiliser l'arrière de la pointe, plutôt que l'avant).

- La constante de raideur. Il s'agit d'un paramètre fondamental permettant de calculer la force d'interaction entre la pointe et la surface de l'échantillon durant la mesure. La force à laquelle la pointe est soumise peut se calculer par la formule de Hooke : $F = -kd$, ou k représente la constante de raideur (N/m) et d la déflexion.

La constante de raideur k diminue avec la longueur du levier. Cependant, avec un instrument mesurant la déflexion de la pointe par le biais d'un laser comme le D3100, l'avantage d'utiliser une pointe longue à faible constante de raideur est contrebalancé par le fait que la déflexion du laser au niveau de la photodiode est plus faible pour un levier long que pour un levier court. Les leviers longs peuvent être utilisés pour des échantillons très rugueux de manière à limiter le déplacement du laser (avec des leviers plus courts, celui-ci sortirait de la photodiode, entraînant un arrêt immédiat des mesures).

Les leviers avec des constantes de raideur très faibles présentent l'inconvénient d'avoir des fréquences de résonance assez basses. S'ils ne risquent pas d'endommager des échantillons fragiles, ils peuvent se révéler instables durant les mesures. D'une manière générale, la fréquence de résonance devra être au moins 10 fois plus élevée que la fréquence de balayage, sous peine d'exciter la pointe et d'abaisser fortement la qualité des images obtenues.

- La fréquence de résonance. Elle dépend du matériel, de la géométrie de la pointe et de l'environnement. Les fréquences de résonance des pointes contact sont idéalement situées en dehors des plages de fréquence de résonance des bâtiments (15 à 20 Hz). La fréquence de résonance des pointes tapping (mesure à l'air) se situe entre 60 kHz et 400 kHz. Il est important de déterminer cette fréquence de résonance lorsque la pointe est au plus près de l'échantillon, car il existe souvent un décalage de fréquence lors de l'engagement. Lors du montage de la pointe sur le porte levier, le levier doit être placé contre l'un des bords du porte levier, et il convient de prendre soin d'éliminer toute poussière pouvant se loger entre le levier et le porte levier.

Les pointes ont été conservées dans des boites spéciales dont le fond est recouvert d'une couche de gel (boîtes «gel pack»). Les pointes n'ont subi aucun traitement préliminaire avant d'être utilisées.

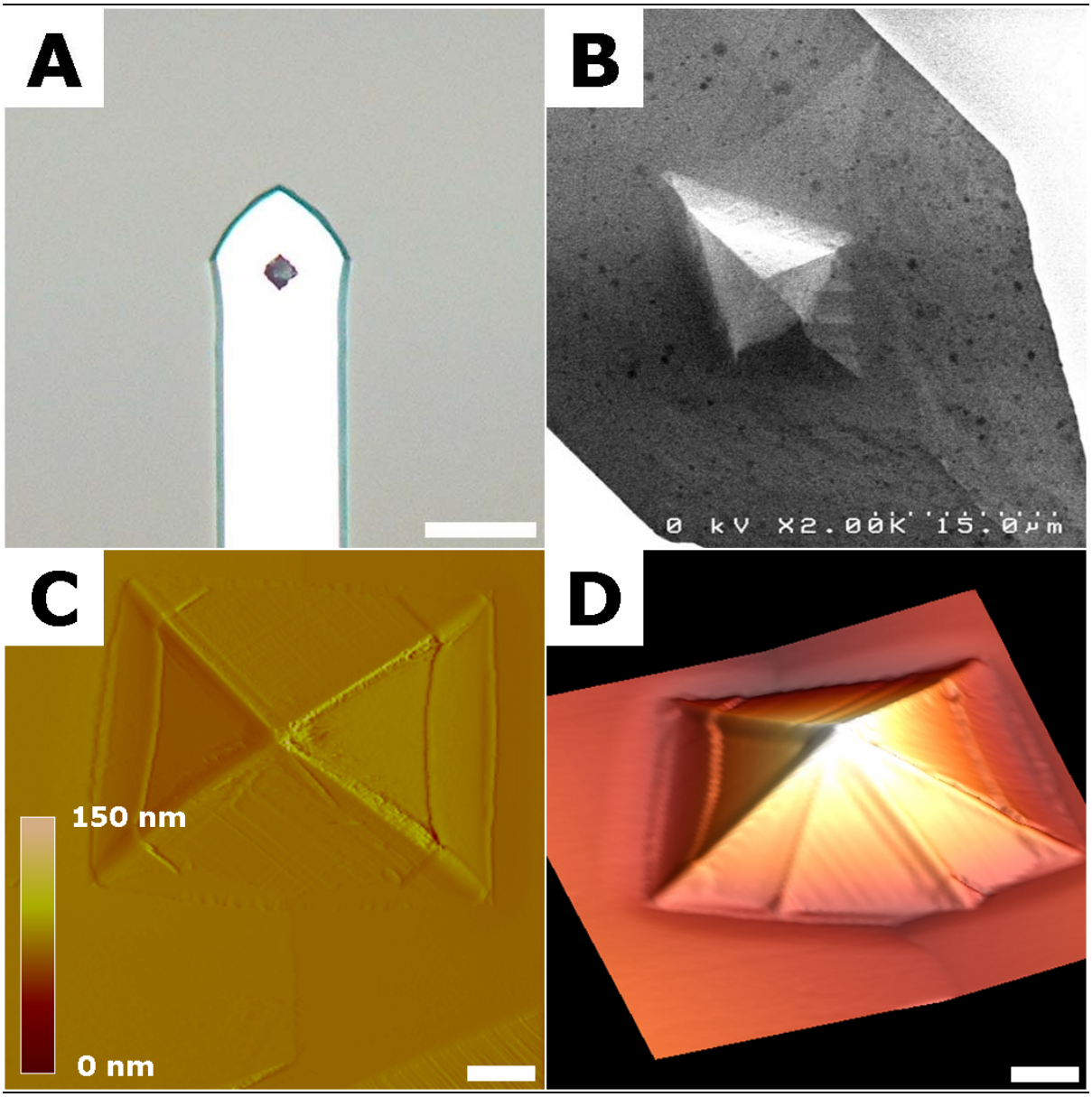


figure 3. Pointes de microscope à force atomique observées au microscope optique, électronique à balayage et à force atomique. [A] Nanoworld/NanoSenors CONTR50 vue en lumière réfléchie (x 200) au microscope optique. Le levier mesure 60 microns de largueur (échelle : 50 microns). [B] RTESP7 vue au microscope électronique à balayage (échelle : 15 microns). OTR8 vue au microscope à force atomique (échelle : 1 micron, pointe OTR8, scan rate 2 Hz). [D] Vue en 3D d'une pointe OTR8 (échelle : 1 micron, pointe OTR8, scan rate 2 Hz).

	OTR8-35	RTESP7	CONTR50	NCHR-50	HDC SSS	T-EAR M*1-15	CNT
Matériau	Si_3N_4 (oxide sharpened)	Si	Si	Si	Carbone haute densité	Carbone haute densité	Carbone
Constante de raideur (k)	0,15 à 0,57 N/m	20 à 80 N/m	0,07 à 0,4 N/m	21 à 78 N/m	21 à 78 N/m	21 à 78 N/m	?
Fréquence de résonance	24 kHz à 73 kHz	200 à 400 kHz	9 à 17 kHz	250 à 390 kHz	250 à 390 kHz	250 à 390 kHz	?
Rayon de courbure de l'apex	≤ 20 nm	≤ 10 nm	≤ 10 nm	≤ 10 nm	2-3 nm	5 nm	2 nm
Longueur du levier	200 µm et 100 µm	125 µm	450 µm	125 µm	125 µm	125 µm	125 µm
Géométrie du levier	V	Rectangulaire	Rectangulaire	Rectangulaire	Rectangulaire	Rectangulaire	Rectangulaire
Epaisseur du levier	800 nm	?	1,5 à 2,5 µm	3,5 à 4,5 µm	3,5 à 4,5 µm	3,5 à 4,5 µm	
Revêtement réflecteur	Or/Chrome	Sans	Aluminium	Aluminium	Aluminium	Aluminium	
Forme de la pointe	Pyramide à base carrée 35° côté	Pyramide allongée renversée 17,5° côté, 15° frontal, 25° arrière	Pyramide	Pyramide	Fibre 300 nm de longueur	Fibre 1 µm de longueur	Fibre 200 nm à 2 µm de longueur
Utilisation	Contact	Tapping	Contact	Tapping	Tapping	Tapping	Tapping

Tableau 1 : Liste des pointes AFM utilisées durant cette étude.

Laser et photodiode

Pour mesurer l'infime déflexion résultant des forces qu'exerce la surface sur la pointe, la majorité des AFM utilisent un faisceau laser (figure 4 page 42). Celui-ci vient se refléter sur la partie supérieure du levier (dont le pouvoir réflecteur est en général amélioré par le dépôt d'une fine couche d'or), avant de frapper une photodiode munie de quatre quadrants. L'intensité enregistrée par les quatre quadrants forme le signal SUM, utilisé lors des opérations d'ajustement du laser sur le levier, avant l'engagement. La différence d'intensité entre les deux éléments supérieurs et les deux éléments inférieurs de la photodiode fournit une mesure du niveau de déflexion du levier supportant la pointe. La différence d'intensité entre les deux éléments de gauche et les deux éléments de droite fournit une mesure du niveau de torsion du levier supportant la pointe, utile en imagerie de force latérale (LFM). Ce système relativement simple permet de déceler des courbures infimes du levier de l'ordre de l'angström. La sensibilité est cependant limitée par l'excitation thermique aléatoire du levier.

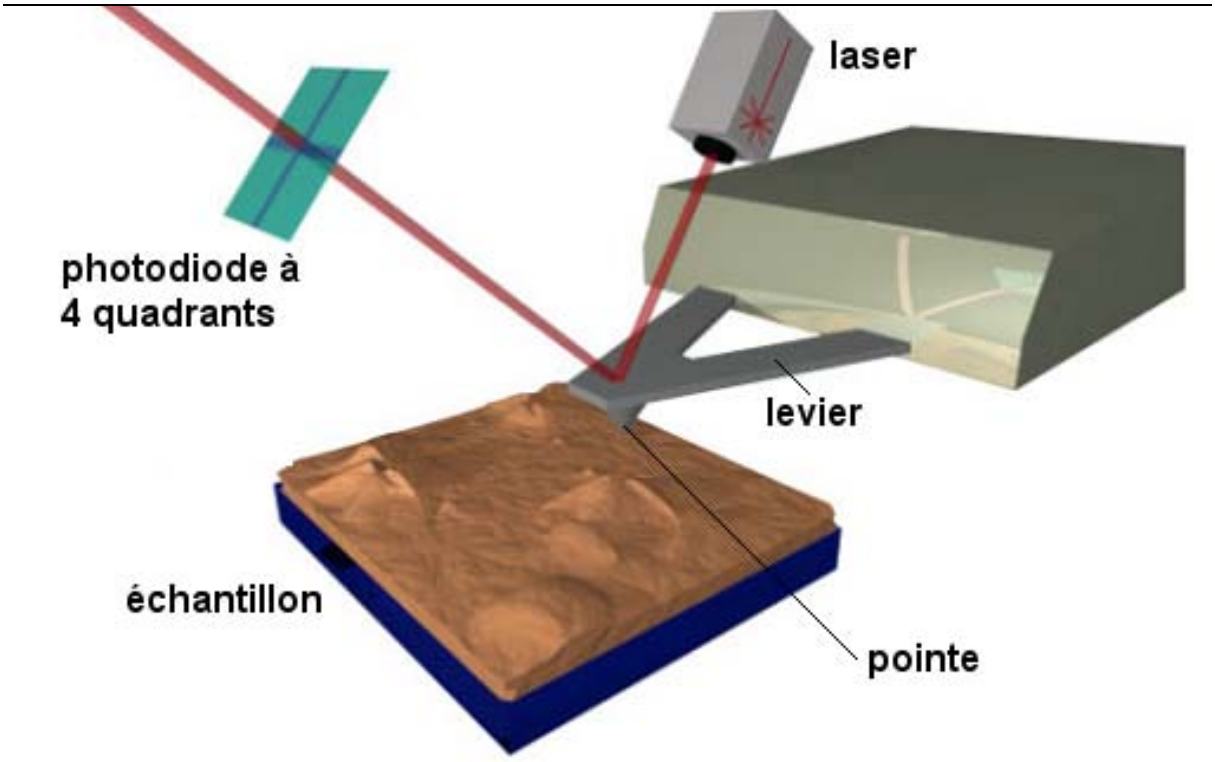


figure 4. Schéma de fonctionnement d'un microscope à force atomique. Le cœur de l'instrument est constitué d'une pointe fixée à l'extrémité d'un levier flexible. Ce dernier est fixé sur un porte levier, lui-même monté à l'extrémité d'un ensemble de céramiques piézo-électriques cylindriques. Des différences de potentiels appliquées sur les céramiques X et Y du tube piézoélectrique permettent à la pointe d'effectuer un balayage précis de la surface de l'échantillon. De la même manière, des différences de potentiels appliquées sur la céramique Z du tube piézoélectrique contrôlent le déplacement vertical de la pointe. L'interaction de la pointe avec la surface d'un échantillon provoque une déflexion du levier, mesurée par un faisceau laser.

Céramiques piézoélectriques

Le balayage de l'échantillon est assuré par un ensemble de céramiques piézo-électriques. Certains AFM déplacent la pointe, l'échantillon étant fixe, alors que d'autres déplacent l'échantillon, la pointe étant fixe. Dans le deux cas, le déplacement de la partie mobile est assuré par des céramiques piézoélectriques. Soumis à un courant électrique, ces céramiques possèdent la particularité de se déformer. En jouant sur le voltage et la polarité du courant, il est donc possible de les raccourcir ou de les allonger, ce qui permet d'assurer un déplacement précis de la pointe dans les trois axes de l'espace.

Avec le microscope D3100 utilisé dans le cadre de cette thèse, l'échantillon est fixe, tandis que la pointe est mobile. La conception du D3100 permet d'imager des échantillons de grands diamètres (qui ne pourraient être étudiés par des microscopes à force atomique plus compacts comme le multimode) ou des échantillons trop lourds (qui ne pourraient pas être déplacés sous une pointe fixe).

Modes de base du microscope à force atomique

Le microscope à force atomique fonctionne dans deux modes principaux, qui sont décrits plus en détails ci-dessous. En mode contact, la pointe reste en contact permanent avec la surface à étudier. En mode tapping, l'AFM enclenche une oscillation du levier, qui se met à vibrer plusieurs centaines de fois par seconde. La pointe ne touche alors plus l'échantillon que de façon intermittente, ce qui diminue la force exercée sur la surface, et donc les risques de rayures ou de destruction de l'échantillon.

Mode contact

Le mode contact représente en quelque sorte le mode par défaut du microscope à force atomique. Il s'agit du mode le plus simple à mettre en œuvre. Comme son nom l'indique, dans ce mode la pointe reste en contact permanent avec l'échantillon à étudier. Au cours du balayage de l'échantillon, les reliefs entraînent une plus ou moins grande déflexion de la pointe, suivant les forces qui s'exercent sur elle. Une boucle de rétroaction tente de maintenir, tout au long de l'analyse, la déflexion au niveau d'une valeur choisie par l'utilisateur (*setpoint*), en jouant sur la distance entre la pointe et l'échantillon (axe Z). L'image topographique est produite en affichant, pour chaque point de la surface, le déplacement correctif dans l'axe Z initié par la boucle de rétroaction qui a été nécessaire pour ramener la déflexion à sa valeur nominale (setpoint).

Le D3100 permet l'acquisition de plusieurs types de données. Les données de hauteur correspondent aux changements verticaux des céramiques piézoélectriques nécessaires pour maintenir la déflexion du levier constante. Ces images (figure 5 page 44) permettent de mesurer non

seulement la hauteur des objets présents en surface, mais aussi la rugosité, le diamètre ou le volume des grains. Pour collecter des données de hauteur, les paramètres de la boucle de rétroaction doivent être élevés, de manière à ce que la pointe suive du mieux possible la surface de l'échantillon avec des changements minimes de déflexion. Le gain intégral (qui indique la vitesse de la réponse), et le gain proportionnel (qui indique la quantité de la réponse) auront donc des valeurs élevées (par exemple 3 à 5 pour le gain intégral, 5 à 7 pour le gain proportionnel). Dans ce cas, les changements de hauteur des céramiques piézoélectriques refléteront les changements de hauteur de l'échantillon. Le mode de hauteur est le seul permettant d'enregistrer des données topographiques précises (figure 6 page 45), étant donné que les céramiques piézo-électriques sont le seul système calibré de l'instrument. Ce type d'imagerie permet également de s'assurer que la force qui s'exerce entre la pointe et l'échantillon reste constante tout au long de la mesure.

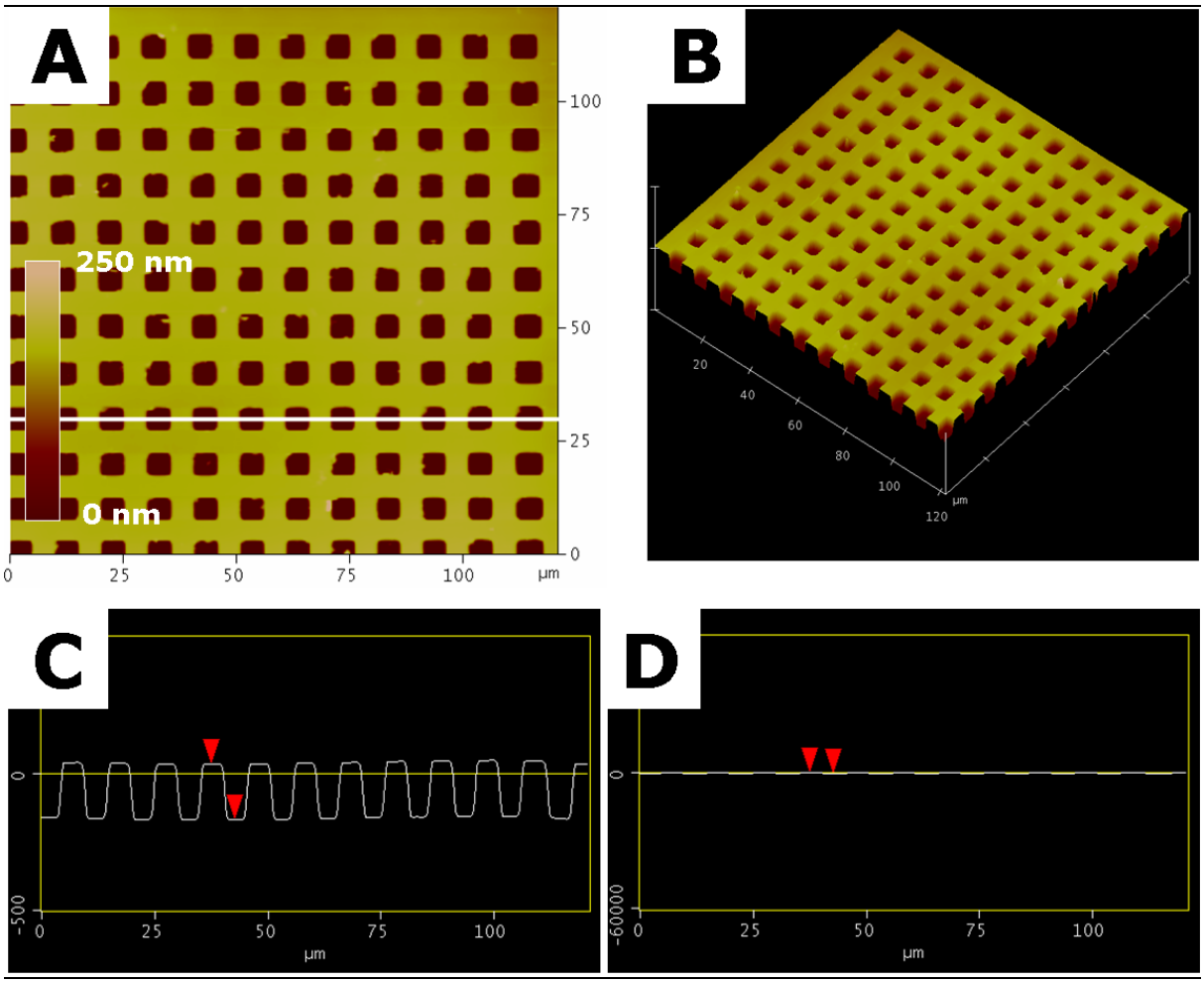


figure 5. Image de hauteur en mode contact d'une cible de calibration. [A] Image de hauteur de la surface d'une cible de calibration, constituée de puits carrés de 200 nanomètres de profondeur et de 5 microns de côtés, séparés les uns des autres par un espace de 5 microns. L'échelle de couleur indique les altitudes. Les puits carrés apparaissent en rouge sombre, et la surface de la cible apparaît en jaune. Cette grille est utilisée pour la calibration du microscope à force atomique. La région balayée est de 121 microns sur 121 microns (pointe ORT8, scan rate 2,44 Hz). [B] Vue en 3D de la cible de calibration. [C] Section effectuée le long de la ligne blanche sur l'image A. La hauteur des puits (comprise entre les

deux marqueurs rouges) est de 200 nm. [D] Même vue que précédemment, sans exagération verticale (l'échelle verticale est identique à l'échelle horizontale). Le relief de la cible de calibration (pourtant bien réel) n'est plus perceptible. Pour des raisons de clarté, la majeure partie des images topographiques obtenues par microscopie à force atomique présentent une exagération verticale des reliefs.

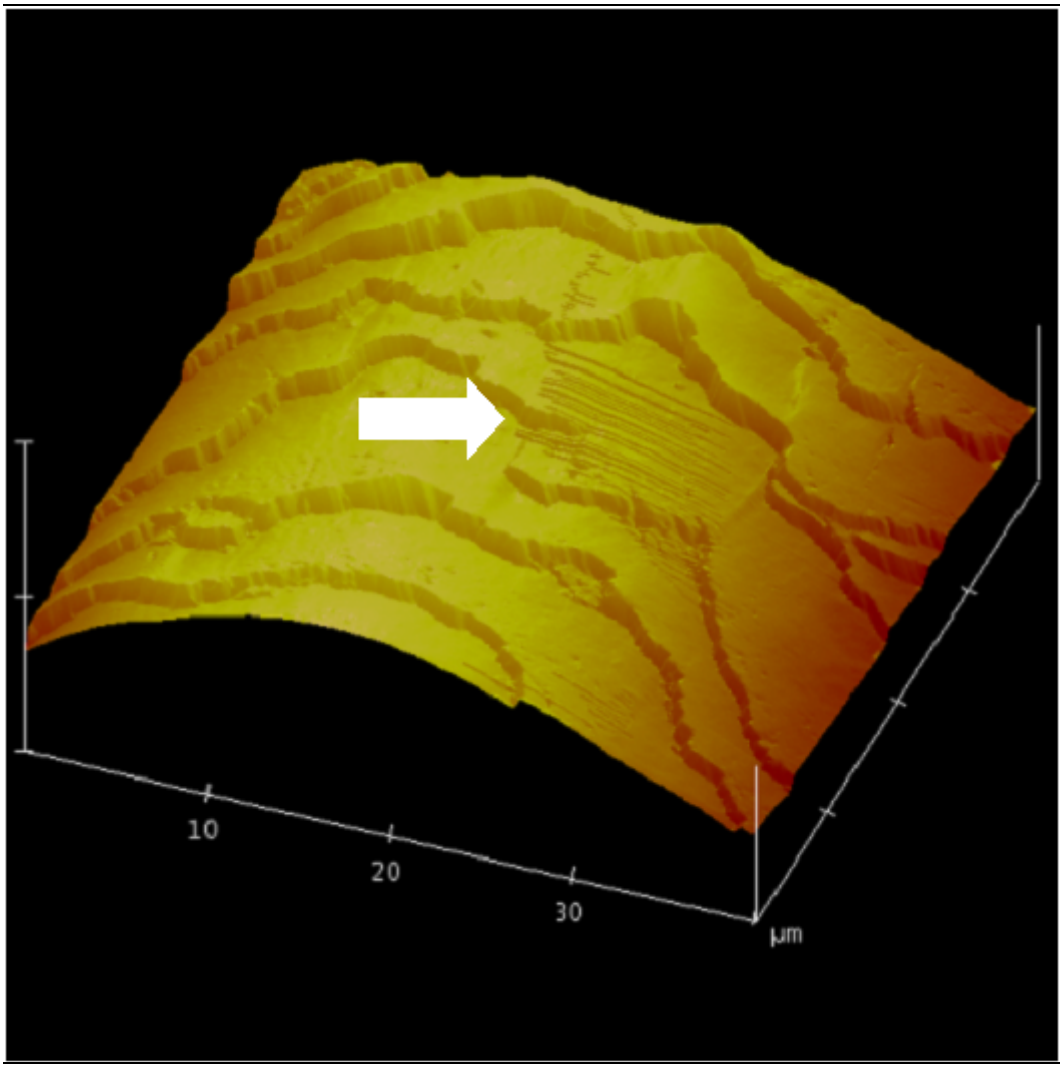


figure 6. Image en 3D de la surface d'un cheveu obtenue en mode contact. Les images de hauteur permettent de construire des vues en 3D de la surface d'un objet. L'image ci-dessus montre la surface d'un cheveu. Les écailles de kératine, imbriquées comme les tuiles d'un toit, apparaissent particulièrement bien, tout comme le rayon de courbure du cheveu. Les petites stries visibles sur l'une des écailles (flèche blanche) sont des marques d'indentation créées avec la pointe du microscope à force atomique, qui prouvent que le mode contact peut parfaitement détruire des échantillons fragiles (pointe OTR8, scan rate 1 Hz).

Le D3100 permet aussi de collecter des données de déflexion (figure 7 page 46). Les données de déflexion correspondent à la déflexion que le levier subi en temps réel pour chaque point de la surface de l'échantillon lors du balayage, et donc à la différence des signaux reçus par les segments supérieurs et inférieurs de la photodiode. La collecte des données de déflexion doit être réalisée avec une boucle de rétroaction relativement lâche, de manière à ce que les céramiques piézoélectriques restent à une position constante par rapport à la surface de l'échantillon. Dans ce cas, la pointe et le levier subissent une déflexion due aux

caractéristiques topographiques de l'échantillon. Les différences de signaux entre les segments supérieurs et inférieurs de la photodiode sont enregistrées, et la déflexion de la pointe sert à générer directement une image de la surface. S'il n'est plus possible de mesurer avec précision la topographie, l'image peut révéler des détails de surface absents des images de hauteur. Les images de déflexions sont effectivement des images de haute fréquence. La seule partie mobile est la pointe, et non plus le tube portant cette dernière, beaucoup plus lourd. L'AFM peut donc collecter beaucoup plus d'information. L'utilisation de ce mode n'a cependant de sens qu'avec des surfaces très plates, de faible rugosité. Ce type de données permet alors de visualiser des détails très fins, qui seraient masqués sur les images de hauteur classiques. Etant donné le relief important des surfaces des lames minces de roche utilisées dans cette étude (que ce soit avant ou après attaque acide), le mode déflexion a simplement été testé, mais n'a pas été utilisé de manière intensive.

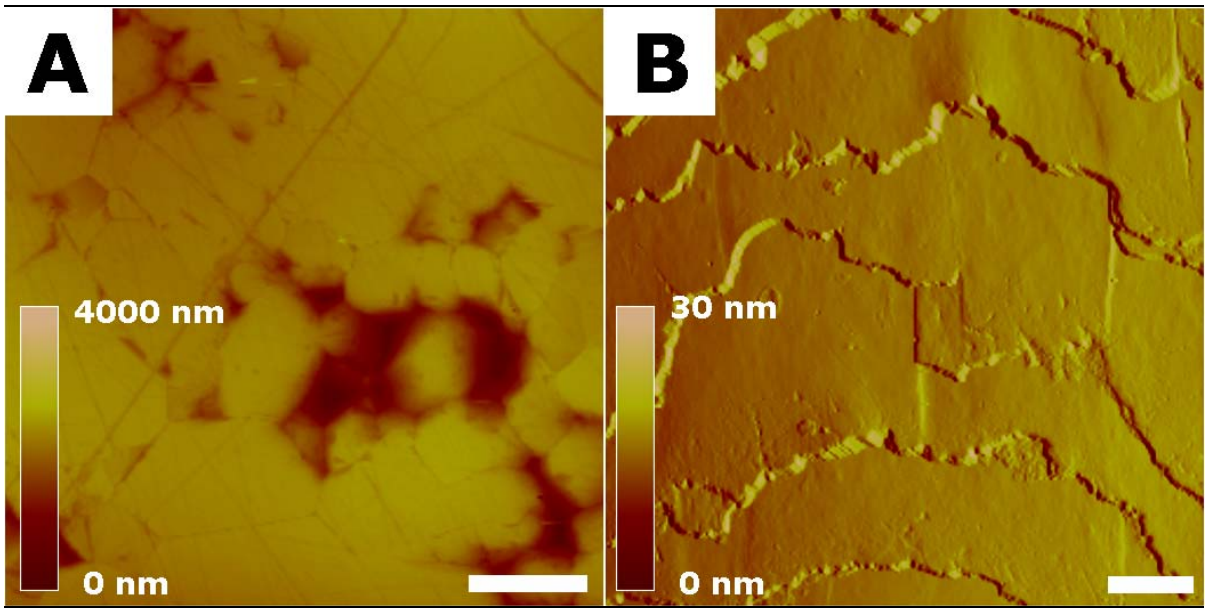


figure 7. [A] Image de hauteur en mode contact de la surface d'une roche polie (chert). Les microcristaux constituant la roche sont visibles. Ce type d'image, sur lequel il est possible de mesurer avec une grande précision les reliefs, est due au fonctionnement de la boucle de rétroaction : cette dernière ajuste en permanence la distance séparant la pointe de la surface de l'échantillon, de manière à maintenir la force d'interaction (caractérisée par une valeur de consigne ou setpoint) constante (échelle : 10 microns, pointe OTR8, scan rate 1 Hz). [B] Image de déflexion en mode contact de la surface d'un cheveu. Contrairement aux images de hauteur, ce type d'image n'autorise pas de mesures morphométriques, mais peut permettre de distinguer des détails très fins qui n'apparaissent pas sur les images de hauteur. Les images en déflexion représentent, pour chaque pixel, l'écart entre la déflexion du levier et la valeur de consigne (échelle : 5 microns, pointe OTR8, scan rate 2 Hz).

Il existe un troisième sous mode, appelé «*error mo*de», dans lequel l'instrument assure une bonne résolution pour les détails très fins (par exemple une zone réduite de la surface d'une cellule), au détriment des éléments plus grossiers (la cellule elle-même), qui sont imagés avec une qualité moindre. L'acquisition des données de déflexion avec une boucle de rétroaction ferme permet d'enregistrer le signal d'erreur, qui n'est autre que l'erreur commise de la boucle de rétroaction durant l'imagerie

par rapport à la valeur de consigne (setpoint). Ce mode n'a cependant pas été utilisé dans le cadre de cette thèse.

En mode contact, l'échantillon peut être abîmé par la pointe (figure 6 page 45). Les forces qui s'exercent entre la pointe et la surface de l'échantillon sont généralement très faibles. Cependant, comme la pointe est également très fine, et que seuls quelques nanomètres touchent la surface de l'échantillon, même de très petites forces peuvent commencer à avoir de l'influence, et la pointe peut donc aisément indenter de nombreux matériaux. De manière à limiter les dommages pouvant être causés en mode contact par la pointe de l'AFM sur l'échantillon, un ajustement de la force d'interaction pointe-surface est réalisé avant imagerie. Lors de l'engagement, le balayage latéral (X et Y) est réduit à quelques nanomètres. L'acquisition de courbes d'approche-retrait permet de régler au minimum la force d'interaction pointe-surface (obtenue en multipliant la déflexion du levier par la constante de raideur du levier, qui doit être idéalement la plus faible possible). Le balayage latéral est ensuite engagé, et des ajustements supplémentaires sont réalisés après l'obtention d'une première image, un compromis devant être trouvé entre la qualité de l'image et la force d'interaction pointe-surface. Après la mesure, il peut être très utile de re-balayer l'échantillon en mode tapping pour détecter d'éventuelles éraflures.

Mode tapping

En mode tapping (figure 8 page 48) qui oscille à une fréquence proche de sa fréquence de résonance, la pointe entre en contact avec la surface uniquement de façon intermittente, ce qui minimise les interactions entre la pointe et l'échantillon à étudier, tout en offrant une résolution similaire au mode contact. Les forces mises en jeu lors de ces modes oscillants sont à la fois attractives (Van der Walls) et répulsives. Une céramique piézoélectrique intégrée au porte-pointe excite le levier à une fréquence égale ou très proche de sa fréquence de résonance, avec une amplitude de l'ordre de 100 nm. A cause des mouvements verticaux de ce dernier, le laser réfléchit par le levier se déplace sur la photodiode d'une manière régulière, générant un signal électronique sinusoïdal.

L'approche de la pointe est réalisée automatiquement par l'instrument. Dès que la pointe commence à interagir de façon intermittente avec la surface de l'échantillon, l'amplitude des oscillations diminue (à cause de l'énergie transmise à la surface au moment du touché), et l'instrument se met en mode imagerie.

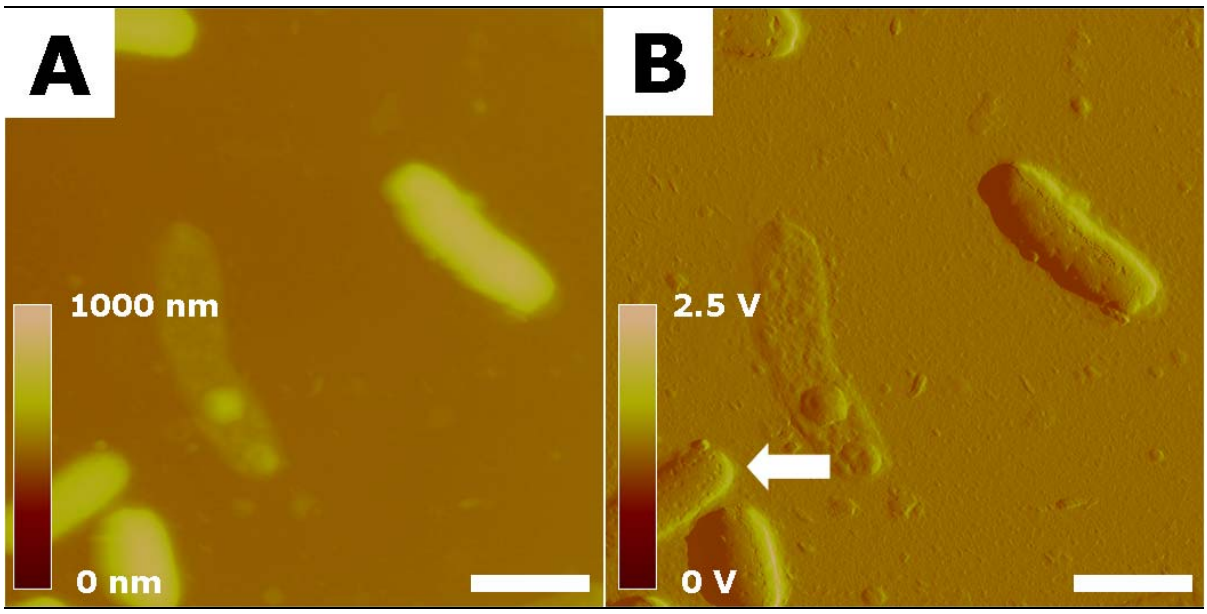


figure 8. [A] Image de hauteur en mode tapping de cellules d'*Escherichia coli* déposées sur une lame de verre (pointe RTESP7, 300 kHz). Contrairement au mode contact ou la pointe reste en contact permanent avec la surface, le mode tapping fait subir à la pointe des oscillations, et cette dernière ne rentre en contact avec la surface de l'échantillon que de manière intermittente (échelle : 2 microns, pointe RTESP7, scan rate 1 Hz). [B] Image d'amplitude en mode tapping de cellules d'*Escherichia coli* déposées sur une lame de verre. Contrairement à l'image de hauteur, ce type d'image n'autorise pas de mesures morphométriques, mais peut permettre de distinguer des détails très fins qui n'apparaissent pas sur les images de hauteur (flèche blanche). Les images en amplitude représentent, pour chaque pixel, l'écart entre l'amplitude du levier et la valeur de consigne (échelle : 2 microns, pointe RTESP7, scan rate 1 Hz).

Lorsque la pointe rentre finalement en contact avec l'échantillon, la céramique piézoélectrique continue d'exciter le levier avec la même énergie, mais celui-ci subi aussi les effets de la surface, et l'amplitude de ses oscillations est modifiée. Au cours du balayage de l'échantillon, lorsque la pointe survole un relief, la pointe voit l'espace dans lequel elle peut vibrer diminuer, ce qui réduit l'amplitude de l'oscillation. Inversement, quand la pointe aborde une dépression, elle peut osciller dans un plus grand espace, et l'amplitude augmente, jusqu'à atteindre éventuellement l'amplitude maximale observée dans l'air si le contact avec la surface est perdu. La boucle de rétroaction (qui maintenait la déflexion constante en mode contact), agit cette fois-ci sur l'amplitude des oscillations du levier. Ce paramètre étant maintenu constant quelque soit l'endroit de la surface balayée, l'AFM doit ajuster en permanence la distance entre l'échantillon et la pointe.

La fréquence d'excitation du levier est en général réglée à des valeurs plus faibles (entre 85 et 95 % de l'amplitude maximale) que la fréquence de résonance, de manière à compenser le déplacement de cette dernière lorsque la pointe approche la surface de l'échantillon (le réglage de la fréquence d'excitation est effectivement réalisé une centaine de microns au dessus de la surface avant l'engagement, et non à la surface elle-même).

La détermination et le réglage de la fréquence de résonance ont une grande importance sur la qualité des images obtenues. Si la courbe de résonance n'est pas parfaitement définie et symétrique, ou si l'on observe plusieurs pics, il est possible qu'une particule se soit logée entre le levier et le porte levier, ce qui produit des oscillations secondaires. Le porte levier doit donc être maintenu propre. Il est également préférable de placer le levier contre l'un des bords du logement du porte levier, de façon à augmenter la stabilité des oscillations. Lors du réglage de la fréquence de résonance, le D3100 offre de plus la possibilité d'évaluer le facteur qualité Q, qui doit être le plus grand possible.

La plupart des mesures tapping effectuées ont été réalisées avec une valeur de consigne (setpoint) située juste en dessous de la valeur d'amplitude à l'air du levier (0,95 à 0,90 fois la valeur de l'amplitude à l'air). Cette manière de procéder à l'avantage de dissiper très peu d'énergie au niveau de la surface de l'échantillon, et donc de protéger ce dernier contre d'éventuelles destructions. L'inconvénient est que le système met un certain temps à compenser les perturbations de l'amplitude dues à la rencontre avec des reliefs. Sur des échantillons possédant une forte rugosité, comme une surface de roche après attaque acide, ce manque de réponse peut devenir gênant. Il est possible d'améliorer le temps de réponse de la boucle de rétroaction à des variations d'amplitude causées par la surface, mais cela nécessite l'utilisation d'un setpoint plus bas, ce qui augmente les forces s'exerçant à l'interface de la pointe et de la surface.

La nature de l'échantillon dicte le choix entre temps de réponse et force appliquée à l'interface pointe surface. Etant donné la fragilité des surfaces après attaque acide, nous avons préféré diminuer les interactions pointe surface au détriment du temps de réponse. Ce dernier peut cependant être amélioré en diminuant la vitesse de balayage (dans ce cas le temps d'acquisition des images est plus important, et une dérive peut apparaître), et en augmentant les gains de la boucle de rétroaction.

Le mode tapping permet par ailleurs de s'affranchir des forces de capillarité, et diminue l'influence des forces latérales. Lorsque la pointe frappe la surface, la force imprimée par l'oscillation est effectivement suffisante pour contrer les forces d'adhésion. Comme le mouvement de la pointe s'effectue toujours de haut en bas, les forces latérales de friction sont également réduites à leur minimum.

Par conséquent, le mode tapping est particulièrement recommandé pour les échantillons fragiles, comme les lames minces de roche après attaque acide, qui pourraient être abîmées ou endommagées en mode contact.

Mode sans contact

Dans ce mode, la pointe oscillant à sa fréquence de résonance n'entre jamais en contact avec la surface de l'échantillon à étudier. Peu stable et offrant une résolution moindre par rapport aux autres modes, le mode sans contact n'a jamais été utilisé dans le cadre de cette thèse, et n'est rappelé ici qu'à titre de référence.

Modes d'imagerie avancés

L'image enregistrée par l'AFM est la plupart du temps une carte topographique de la surface. Le microscope à force atomique ne se limite cependant pas à construire une vue en relief d'une surface donnée. Il est également capable, en utilisant des modes spéciaux décrits ci-dessous, de fournir des informations essentielles sur les propriétés mécaniques des surfaces étudiées, comme leur texture, leur élasticité ou l'adhésion.

Mode d'imagerie de force latérale (LFM).

Le microscope D3100 est capable de mesurer les forces de friction à la surface d'un échantillon en utilisant un mode connu sous le nom d'imagerie de force latérale (figure 9 page 51). Dans ce mode, le levier balaye la surface latéralement, c'est-à-dire perpendiculairement à sa longueur. Le levier va subir une torsion d'autant plus importante que la pointe va rencontrer des régions caractérisées par une friction importante. Le microscope à force atomique enregistre alors non plus les déplacements verticaux du spot laser sur la photodiode, mais ses évolutions horizontales qui traduisent l'action plus ou moins grande de forces latérales (friction) de l'échantillon. La mesure relative des forces latérales qui s'exercent sur le levier permet donc de dresser une carte des régions de basse friction et de haute friction. L'imagerie de force latérale n'est disponible qu'en mode contact, ce qui empêche son utilisation sur les lames minces de roche attaquées à l'acide fluorhydrique. L'acquisition d'une image de force latérale peut s'effectuer parallèlement à celle d'une image de hauteur.

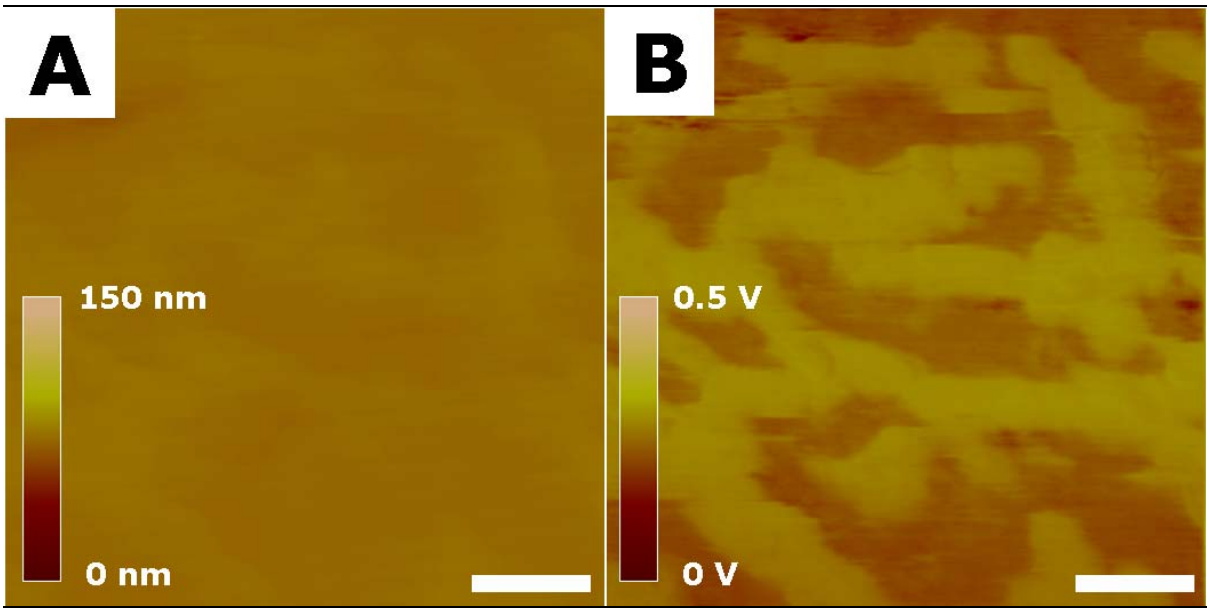


figure 9. Image de hauteur et de force latérale en mode contact de la surface d'un verre dopé. [A] Image de hauteur en mode contact de la surface d'un verre dopé, montrant une surface uniformément plate (échelle : 200 nm, pointe CONTR50, scan rate 1 Hz) [B] Image de force latérale, obtenue par un changement de 90° du sens de balayage de la pointe. Le microscope à force atomique enregistre les déplacements horizontaux du levier. Les zones de fortes frictions sont jaunes et les zones de basses frictions sont rouges (échelle : 200 nm, pointe CONTR50, scan rate 1 Hz).

L'acquisition d'une image de force latérale est assez simple, dès qu'une bonne image topographique en mode contact a été obtenue. Une fois la direction du balayage modifiée et paramétrée sur 90°, le levier devient plus sensible aux forces de friction. Comme dans le cas du mode contact, les forces qui s'exercent sur la pointe (et donc sur le levier) sont dépendantes de la valeur du setpoint. En augmentant la valeur de celui-ci, on augmente le contact entre la pointe et l'échantillon, et donc les forces de friction ou de torsion.

Les résultats obtenus en imagerie de force latérale dépendent grandement du type de pointe utilisée, en particulier de la géométrie (levier rectangulaire ou triangulaire) et de la constante de raideur du levier. Ainsi, il est préférable d'utiliser des pointes rectangulaires et non des pointes triangulaires, ces dernières étant justement conçues pour limiter les forces de torsions en imagerie de contact classique. Des leviers caractérisés par des constantes de raideur faibles seront plus sensibles aux forces de friction, mais si ces dernières se révèlent trop importantes (± 10 V de signal sur la photodiode), des leviers plus rigides devront être choisis. Sauf exception, les images de force latérale ont été acquises ici avec des pointes CONTR50 NanoSensors/NanoWorld.

En imagerie de force latérale, plusieurs tests doivent être effectués pour vérifier que les différentes régions mises en évidence par l'imagerie de force latérale sont belles et bien dues à une différence de friction s'exerçant entre la pointe et l'échantillon. Certains phénomènes peuvent effectivement conduire à l'apparition de fausses zones de friction, comme le «trébuchement» de la pointe lors du passage de certains reliefs, des

interférences optiques causées par l'existence de sources secondaires de lumière venant frapper la photodiode (laser se répandant au-delà des bords du levier, lumière transmise à travers le levier, ou lumière réfléchie par l'échantillon et revenant frapper la photodiode après être passé au travers du levier).

Ainsi, l'aspect des courbes affichées sur l'oscilloscope logiciel de l'appareil permet premièrement de vérifier que les deux tracés (aller et retour) de la pointe ne migrent pas dans la même direction dans les zones de hautes frictions (quand c'est le cas, il s'agit souvent d'un comportement du à des effets non frictionnels, comme des interférences optiques). La comparaison des données de friction avec les données de hauteur (topographie) permet également de déduire l'origine des zones présentant une forte friction. Les bordures de reliefs donnent effectivement souvent naissance à une augmentation de la friction dans les images de force latérale (effet de bord). Dans ces régions, la pointe trébuche sur la bordure du relief, ce qui produit un signal de friction dans l'image de force latérale. Enfin, l'inversion du sens de balayage dans le canal de hauteur tout en surveillant la friction dans le canal de friction est un bon moyen de vérifier l'origine des structures présentes dans l'image de friction. Si les structures qui apparaissent sur l'image de friction proviennent effectivement d'une friction différentielle s'exerçant entre la pointe et la surface de l'échantillon, alors la force du signal de friction doit elle aussi s'inverser, en entraînant une inversion de contraste entre les zones de haute friction et les zones de basse friction. Quant elles existent vraiment, les différences de friction peuvent également être masquées par une rugosité trop importante, ou par une contamination de la surface. Dans le cas de notre étude, nous avons effectué tous les tests mentionnés ci-dessus pour vérifier l'origine des zones de frictions détectées par imagerie de force latérale sur les lames minces de roche des formations Draken et Gunflint.

Courbe de force et imagerie force volume

En microscopie à force atomique, les courbes d'approche-retrait (figure 10 page 53) représentent un moyen simple de mesurer les forces d'interactions s'exerçant entre la pointe et la surface d'un échantillon, et de déterminer la valeur optimale du setpoint (et donc de la force d'interaction s'exerçant entre la pointe et la surface de l'échantillon). L'obtention de courbes d'approche-retrait sur chaque point d'une surface donnée permet de révéler de nouvelles informations concernant l'échantillon, et de réaliser des cartes de force des propriétés électriques de l'échantillon, de son adhésion, de son module élastique, ou encore de la force de liaisons chimiques.

Courbe d'approche retrait

La compréhension de l'imagerie de force nécessite la compréhension des courbes d'approche-retrait, que nous allons décrire ici succinctement. Lors de l'obtention d'une courbe d'approche-retrait, le balayage latéral est désactivé, et seule l'électrode Z du tube piézoélectrique de la tête est soumis à un courant électrique. La pointe ne fait alors que monter et descendre par rapport à la surface de l'échantillon.

Tandis que l'électrode Z fait monter et descendre la pointe, la déflexion du levier est enregistrée par l'intermédiaire de la photodiode. Les données obtenues permettent de construire une courbe d'approche-retrait, qui montre l'ampleur de la déflexion du levier par rapport au voltage appliqué sur l'électrode Z (et donc de la position de la pointe par rapport à la surface de l'échantillon).

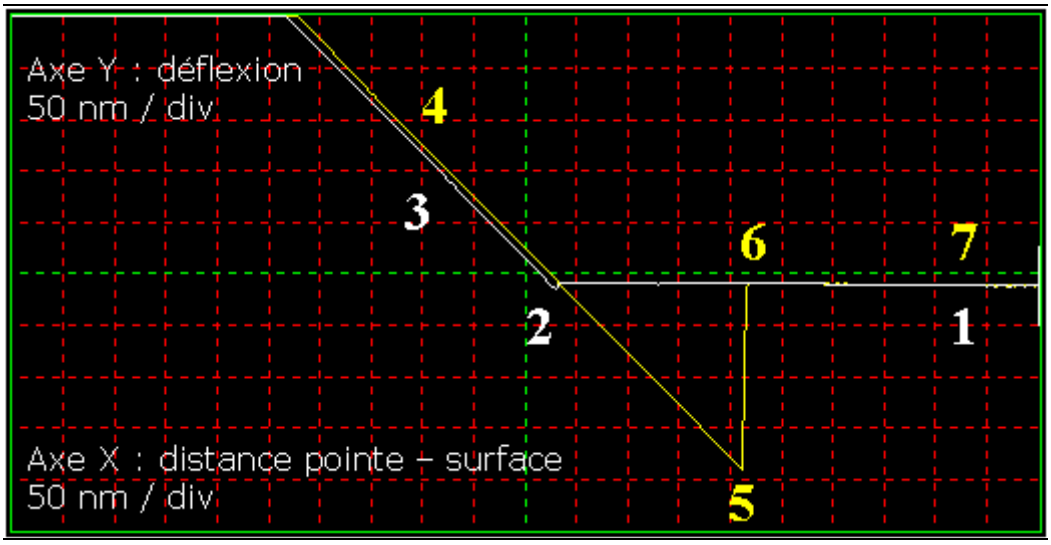


figure 10. Description d'une courbe d'approche-retrait obtenue en mode contact à l'air sur un matériau dur (lame mince de la formation Draken). L'axe des abscisses représente la distance à la surface de l'échantillon, l'axe des ordonnés la déflexion du levier. La courbe blanche représente la phase d'approche, la courbe jaune la phase de retrait. Les numéros se rapportent au texte.

Une courbe d'approche-retrait classique se décompose en plusieurs régions. Dans la première région (1), la céramique piézoélectrique se

dilate, poussant la pointe vers le bas. La distance entre la surface et la pointe étant encore importante, cette dernière ne subit aucune force, et la déflexion du levier est nulle. Comme la descente continue (2), la pointe va finalement arriver suffisamment près de la surface pour que l'influence des forces d'attraction (van der Waals) se fassent sentir. Le levier subit une déflexion vers le bas tandis que la pointe rentre brutalement en contact avec la surface de l'échantillon («*jump-to-contact*»), la plupart du temps sous l'effet d'une attraction électrostatique ou de l'existence d'une tension superficielle (force de capillarité). L'extension de la céramique piézo-électrique continuant, la pointe est pressée contre la surface (3), et le levier subit une déflexion vers le haut. Les forces sont ici de nature répulsives (coulombiennes), et résultent de la combinaison du principe d'exclusion de Pauli (non interpénétration des nuages électroniques) et d'une répulsion des noyaux. A ce stade, il est impératif d'arrêter à un moment ou un autre la descente de la tête, sous peine d'aboutir à une destruction de la pointe et du levier (et de l'échantillon, si celui-ci est fragile).

La phase d'approche étant alors terminée, l'appareil entame la phase de retrait, qui devrait en théorie être l'exact symétrique de la phase d'approche. La phase de retrait commence par la contraction de l'électrode Z du tube piézoélectrique, qui provoque une relaxation du levier (4). Arrivé au point ou la pointe était entrée en contact avec la surface de l'échantillon, la pointe devrait logiquement quitter la surface. Mais cette dernière est maintenue en contact avec la surface par des forces d'attraction (qui peuvent être minimisées par imagerie en milieu liquide, voir figure 11 page 55), et tandis que l'électrode Z continue de se rétracter, le levier se bombe vers le bas (5).

Finalement, il arrive un moment ou la force qui s'exerce sur le levier, et qui est due à la remontée des céramiques piézoélectriques, est suffisamment importante pour forcer la pointe à lâcher prise. La pointe quitte brutalement la surface, et le levier rebondit éventuellement vers le haut (6), avant de reprendre sa position d'équilibre (7). Le tube piézoélectrique continue de remonter la pointe, mais cette dernière est désormais à une distance trop grande de la surface pour ressentir des interactions, et le levier conserve sa position d'équilibre. La courbe d'approche-retrait est terminée, et un nouveau cycle peut commencer.

En connaissant la constante de raideur du levier (qu'il importe de déterminer de manière précise, voir ci-dessous), il est possible de mesurer de manière simple la force d'adhésion qui s'exerce sur la pointe durant la phase 5, selon la formule $F = kZ$, ou F représente la force en newton, K la constante de raideur du levier en N/nm et Z la déflexion subie par le levier en nm (l'instrument donne généralement la déflexion en volt, et cette dernière peut être convertie en nm par l'intermédiaire de la sensitivité, égale à la pente de la courbe de force lorsque la pointe est en contact avec la surface de l'échantillon).

De la même manière, il est possible d'accéder au module élastique de la surface en caractérisant l'ampleur de la déflexion du levier pour une descente donnée des céramiques piézoélectriques. Ainsi, si le matériau est très dur, presser la pointe vers le bas va provoquer une déflexion relativement importante du levier (figure 11 page 55). Au contraire, avec un matériau très mou, le levier va subir une déflexion moindre durant la descente (figure 12 page 55). La pente de la courbe d'approche, ainsi que sa forme, peuvent être utilisées pour estimer de manière quantitative l'élasticité d'un matériau (Radmacher et al., 1994).

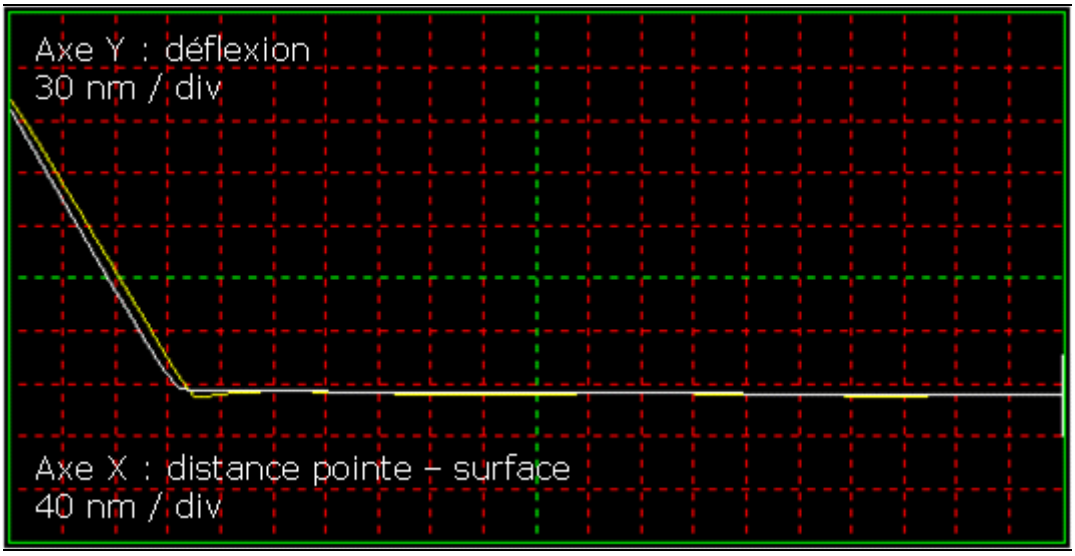


figure 11. Courbe d'approche-retrait obtenue sur un chert de Gunflint immergée dans de l'eau. L'axe des abscisses représente la distance à la surface de l'échantillon, l'axe des ordonnés la déflexion du levier. La courbe blanche représente la phase d'approche, la courbe jaune la phase de retrait. L'adhésion due à la présence d'une couche d'eau moléculaire (force de capillarité) a été éliminée (comparer avec la figure 10 page 53, obtenue à l'air).

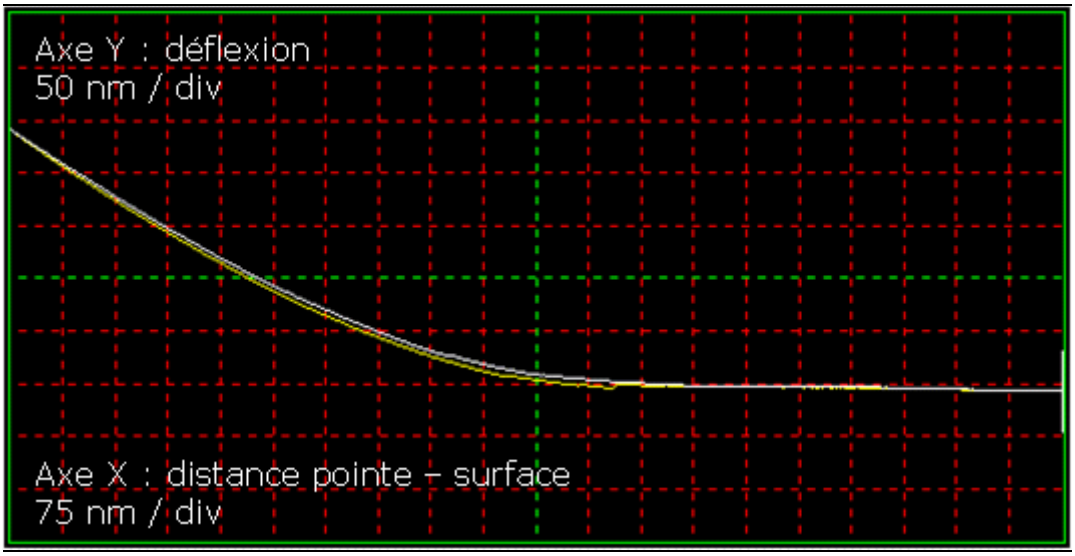


figure 12. Courbe d'approche-retrait obtenue sur une bille d'agarose. L'axe des abscisses représente la distance à la surface de l'échantillon, l'axe des ordonnés la déflexion du levier. La courbe blanche représente la phase d'approche, la courbe jaune la phase de retrait. La forme de la courbe, bien différente de celle obtenue sur des matériaux durs (figure 11 page 55), témoigne de l'élasticité du matériau.

Imagerie force volume

L'imagerie force volume (figure 13 page 57) peut être utilisée pour mesurer et afficher des courbes d'approche-retrait en des milliers de points de la surface d'un échantillon durant un seul balayage. Ce mode combine la spectroscopie de force avec l'imagerie topographique. Un jeu de données force volume peut être utilisé pour cartographier les forces d'interaction entre la pointe et la surface de l'échantillon (adhésion, élasticité, forces électrostatiques, forces magnétiques, liaisons chimiques dans le cas de l'utilisation de pointes fonctionnalisées), et corréler ces données avec les informations fournies par l'image topographique. Un jeu de données force volume est cependant long à acquérir (1h30) et peut-être particulièrement délicat à obtenir sur de petites surfaces (quelques microns^2) en raison des dérives des céramiques piézoélectriques. De manière à garder des temps d'acquisition raisonnables (une à deux heures) et de respecter la taille maximale du fichier de données autorisé par le logiciel (Nanoscope 5.12b49) contrôlant le D3100 (1Mo), il est nécessaire de trouver un compromis entre le nombre de points collectés pour chaque courbe de force, le nombre de courbes de force acquises pour chaque ligne de balayage (qui définit ainsi la résolution XY de l'image force volume), et le nombre de pixel par ligne de l'image de hauteur (qui définit ainsi la résolution XY de l'image topographique). De manière à corréler au mieux la topographie avec la carte de force, il est nécessaire de choisir une résolution identique pour l'image de hauteur et l'image de force.

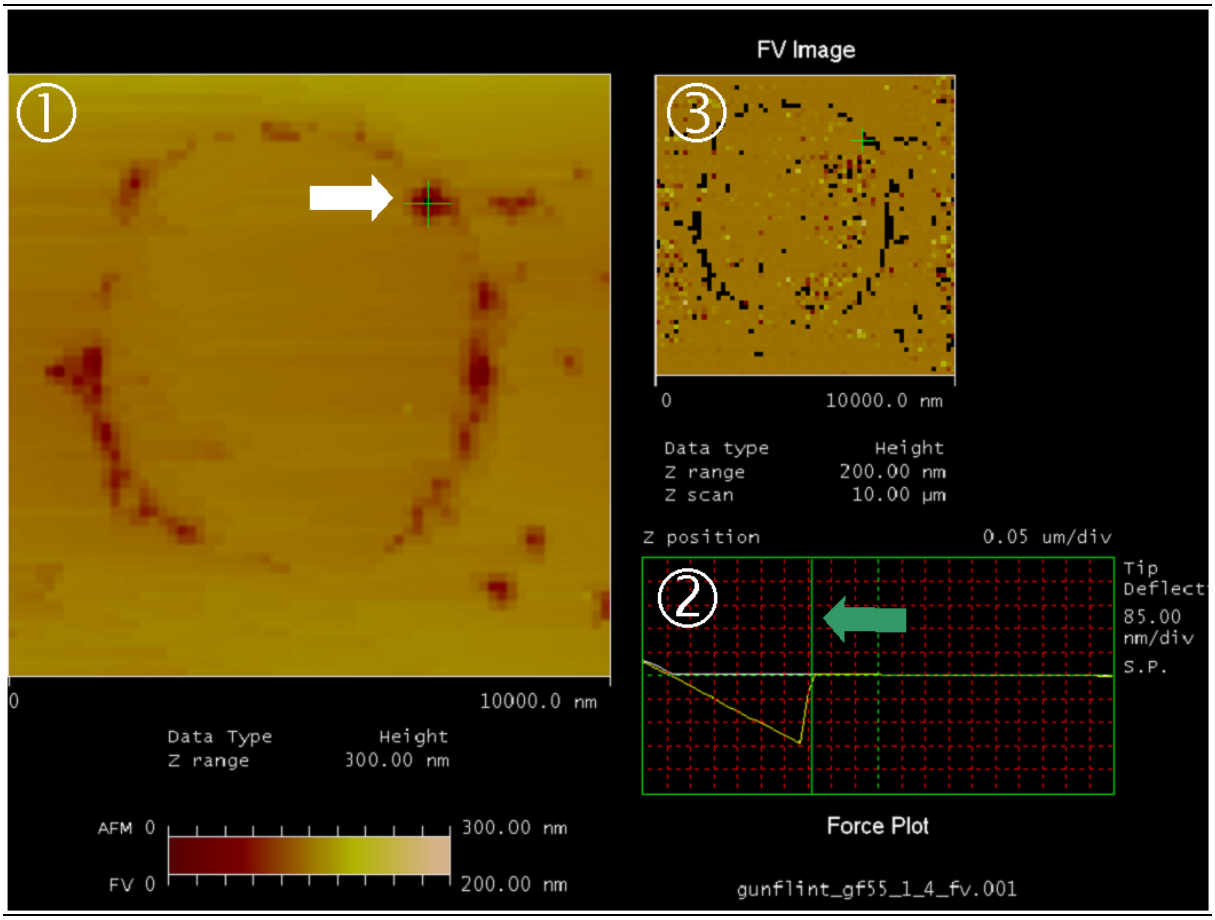


figure 13. Image montrant l'acquisition d'un jeu de données force volume sur une cellule individuelle d'*Huroniospora* (spécimen #01-4). ① Image de hauteur de la cellule d'*Huroniospora*. La paroi cellulaire apparaît en rouge. La flèche blanche indique le point correspondant à la courbe de force. A chaque pixel de l'image de hauteur est associé une courbe de force ② Courbe de force correspondant au point indiqué par une flèche blanche sur l'image de hauteur. ③ Carte d'adhésion non calibrée (la constante de raideur du levier n'est effectivement pas prise en compte dans cet affichage) construite d'après les données force volume. Les pixels noirs représentent des forces d'adhésion supérieures à la force «plancher» indiquée dans la courbe de force par la flèche verte.

La résolution et la vitesse de balayage déterminent le temps nécessaire à l'acquisition d'une image force volume complète. Doubler la résolution latérale a pour effet de quadrupler le temps de mesure. Doubler la vitesse de balayage, cependant, ne fait que diminuer par deux le temps de mesure.

Pour toutes les mesures en mode force volume, les paramètres suivants furent choisis :

- «Number of samples»: 64
- «Force per line» : 64
- «Samples per line» : 64

Les mesures force volume ont été effectuées sur des régions de quelques microns^2 de surface, subdivisées en 64x64 pixels, le total des courbes d'approche-retrait étant ainsi de 4096. Chaque courbe a été obtenue avec une fréquence de 2Hz, un intervalle de déplacement dans l'axe z de 200

nm, et une limite de déflexion relative de 20 nm, de manière à limiter au maximum la force appliquée par le levier à la surface de l'échantillon.

Le choix du levier est très important pour l'interprétation des données générées par le mode force volume. Un levier rigide pourra permettre un meilleur contrôle lors de la mesure de forces importantes, et sera moins sensible à un piégeage par des forces de tension superficielle. Cependant, il ne permettra pas la détection de forces très faibles. Inversement, un levier souple sera plus sensible à des petites forces, et endommagera moins la surface de l'échantillon. Cependant, il répondra à une myriade de petites forces, ce qui générera du bruit, et aura tendance à sauter vers la surface lors de l'approche finale, si des forces d'attraction importantes sont présentes. Bien entendu, la détermination de la constante de raideur des leviers est indispensable pour pouvoir interpréter les courbes d'approche-retrait et utiliser les cartes force volume.

Détermination de la constante de raideur des leviers

La détermination de la constante de raideur des leviers est l'une des préoccupations majeures d'un microscopiste travaillant avec un microscope à force atomique. La connaissance de ce paramètre est indispensable pour pouvoir extraire des courbes d'approche-retrait la valeur de la force d'interaction entre la surface de l'échantillon et la pointe, connaissant la déflexion du levier. La force en newtons (N) est obtenue simplement en multipliant la valeur de la déflexion (en nanomètres) par la constante de raideur (en newtons par nanomètre).

Les microscopes à force atomique les plus récents permettent généralement de déterminer automatiquement ce paramètre, le plus souvent par la méthode dite thermique (Sader et al., 1995; Sader, 1998; Sader et al., 1999). Cependant, cette technique, qui repose sur la capacité de déterminer le spectre de vibration thermique, est absente du D3100 utilisé au cours de cette étude.

Chaque fabriquant de pointes fourni généralement une constante de raideur pour chaque lot de leviers, mais les valeurs sont généralement très approximatives (en partie à cause de la difficulté de contrôler l'épaisseur du levier au cours des processus de fabrication) et sont données seulement à titre indicatif. Elles ne peuvent être utilisées pour réaliser des mesures de forces précises, et la constante de raideur doit donc être déterminée individuellement pour chaque levier. De plus, le dépôt de films minces employés pour modifier les propriétés de surface (comme des films réfléchissant, utilisés pour améliorer la réflexion du laser sur le levier) peut aussi modifier la constante de raideur de manière significative.

De nombreuses techniques ont été mises au point, et sont décrites dans la littérature (Burnham et al., 2003). Certaines ont rapidement été écartées, à cause des difficultés de mise en œuvre (comme celle consistant à alourdir le levier avec de petites masses, cf. Cleveland et al., 1993), ou parce qu'elles nécessitaient l'acquisition d'appareils de mesure

additionnels (tel qu'un signal access module – SAM -, un module de service permettant d'extraire du microscope un certain nombre de signaux bruts, qui sont visualisés sur oscilloscope).

La constante de raideur peut également être calculée directement, connaissant le module élastique de Young et la géométrie du levier. Cependant, si la longueur et la largeur du levier ne varient pas d'un levier à l'autre, et peuvent facilement être mesurés par microscopie optique, il n'en est pas de même de l'épaisseur, variable au sein d'un même lot de leviers. De la même manière, le module de Young n'est pas précisément connu, et peut varier d'un facteur 2 d'un lot à un autre. Etant donné que la constante de raideur est directement proportionnelle au module élastique et au cube de l'épaisseur, des erreurs de 100 % dans l'estimation de ce paramètre ne sont pas inhabituelles (Tortonese et Kirk, 1997).

La technique choisie est relativement simple à mettre en œuvre, et offre une bonne précision (inférieur à 20 % pour un intervalle de 0,1 à 10 N/m). Cette technique consiste à mesurer la déflexion d'un levier donné lorsque celui-ci est mis en contact d'une surface infiniment dure, puis avec l'extrémité libre d'un levier de référence dont la constante de raideur est connue avec précision (Gibson et al., 1996; Tortonese et Kirk, 1997; Burnham et al., 2003). La mesure nécessite l'acquisition de seulement deux courbes de force. La constante de raideur du levier (Ktest) peut alors être calculée de la manière suivante :

$$K_{test} = K_{ref} * (\sigma tot - \sigma test / \sigma test \cos \theta)$$

avec K_{test} : constante de raideur du levier

K_{ref} : constante de raideur du levier de référence

σtot : déflexion du levier sur surface de dureté infinie

$\sigma test$: déflexion du levier sur le levier de référence

θ : angle d'interaction entre le levier de référence et le levier à tester

Comme leviers de référence, nous avons utilisé ceux fournis par Veeco (CLFC-NOBO). Chaque puce comporte trois leviers, dont les constantes de raideur sont respectivement de 0,711 N/m, 4,655 N/m et 26,125 N/m. De manière à obtenir la meilleure précision, il est nécessaire que la constante de raideur du levier à tester et la constante de raideur du levier de référence soient similaires (moins d'un ordre de magnitude de différence). La source d'erreur la plus importante de ce type de mesure est la détermination de la pente des courbes de force avec le logiciel Nanoscope (Tortonese et Kirk, 1997).

Il convient de noter que la connaissance de la constante de raideur d'un levier, bien que fondamentale pour les courbes d'approche-retrait et l'imagerie force volume, n'a pas non plus à être déterminée avec une précision trop grande. Durant la mesure, la forme de la pointe joue un

grand rôle, et seule la pression en dessous de la pointe est réellement importante. Ainsi la connaissance de la constante de raideur avec une précision de 1% n'est pas d'une grande aide, si le rayon de courbure des différentes pointes utilisées varie du simple au double. Ainsi, la précision fournie par la technique utilisée au cours de nos travaux (20 %) est acceptable. Une autre technique plus précise de détermination des constantes de raideur devra cependant être utilisée dans le futur pour réaliser des mesures par force chimique.

Imagerie de phase

L'imagerie de phase est une extension du mode tapping, et permet de révéler à l'échelle nanométrique des structures de surface qui ne sont pas (ou difficilement) accessibles par d'autres techniques (figure 14 page 60). En enregistrant le décalage de la phase des oscillations du levier par rapport au signal transmis aux céramiques piézoélectriques excitatrices durant le balayage de la surface, l'imagerie de phase permet de détecter des variations de composition, d'adhésion, de friction, de viscoélasticité, voire d'autres propriétés physiques. Les matériaux doivent cependant présenter des propriétés assez éloignées (exemple bille métallique incluse dans un polymère) pour pouvoir être visualisés par imagerie de phase.

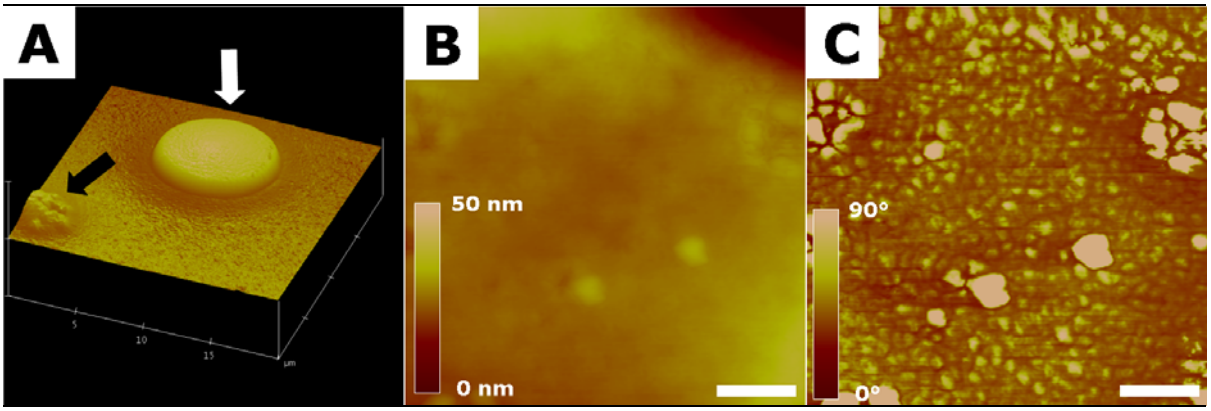


figure 14. Image de hauteur et de phase en mode tapping de la surface d'un globule rouge. [A] Image 3D d'un globule rouge (flèche blanche) et d'un globule blanc (flèche noire) (zone balayée : 20 microns, pointe RTESP7, scan rate 0,5 Hz). [B] Image de hauteur en mode tapping de la surface d'une hématie, montrant une surface pauvre en détails (échelle : 200 nm, pointe RTESP7, scan rate 1 Hz) [C] Image de phase, construite à partir du décalage existant entre la phase des oscillations du levier, et la phase du signal excitateur. Ce type d'imagerie est sensible aux propriétés physiques des surfaces. Ici, il met en évidence des structures d'environ 50 nm de diamètre de nature inconnue (échelle : 200 nm, pointe RTESP7, scan rate 1 Hz).

L'imagerie de phase peut se révéler utile pour identifier des contaminants (globule de matière organique sur une surface minérale), cartographier différents composants dans des matériaux composites, différencier des régions de fortes ou faibles adhésion ou dureté (exemple silice pure et silice salie par de la matière organique). Ce mode peut compléter l'imagerie de force latérale, qui peut parfois fournir des images de plus faible contraste, ou endommager l'échantillon (il s'agit effectivement d'une

extension du mode contact), ce qui conduit à une diminution de la résolution.

Sur le D3100, l'imagerie de phase nécessite l'Extender Electronics Module. L'acquisition d'images de phase peut se faire simultanément à l'obtention d'images de hauteur. Le D3100 utilise un détecteur synchrone simplifié, et les données de phase sont uniquement valables quand la phase dépasse les 20° (elles ne sont plus significatives en dessous).

L'imagerie de phase comporte un certain empirisme. Il n'y a effectivement pas de corrélation entre le décalage de phase mesuré et une propriété donnée du matériel étudié, surtout dans les matériaux très hétérogènes. Dans certains cas, l'imagerie de phase fournit des images là ou aucun contraste n'était anticipé, de part les propriétés de l'échantillon, sans que l'on puisse véritablement expliquer le phénomène.

Le décalage de phase est une contribution de la phase topographique (modification de la phase avec la topographie) et de la phase «vraie» (modification de la phase due à des différences de propriétés physiques des matériaux étudiés). Plus la valeur de consigne de l'amplitude sera élevée (setpoint), plus la phase réelle prendra le pas sur la phase topographique. Un ajustement du setpoint au cas par cas est nécessaire pour l'obtention d'image de phase interprétables, les paramètres fonctionnant dans un cas pouvant ne pas convenir pour un autre.

L'imagerie de phase peut aussi être utilisée comme simple technique d'amélioration du contraste. L'imagerie de phase est effectivement sensible aux bordures, mais n'est pas affectée par les différences de hauteur à grande échelle, ce qui lui permet de révéler des structures fines, comme les limites d'un grain cristallin, qui seraient obscurcies ou absentes dans l'image de hauteur.

Imagerie en milieu liquide

La procédure d'imagerie en milieu liquide (eau, éthanol, etc.) est la même que celle utilisée pour l'imagerie à l'air, à ceci près que le support de la pointe est différent, et que des ajustements doivent être réalisés pour corriger les effets de réfraction du laser lorsque celui-ci franchi l'interface air/fluide (figure 11 page 55 et figure 15 page 62). Le support du levier est un petit bloc de verre qui fournit une interface bien caractérisée, ce qui permet au laser de passer au travers du liquide sans subir des distorsions dues à une surface instable. Ce dernier ne dispose pas de céramiques piézoélectriques. L'excitation permettant à la pointe d'osciller en mode tapping est donc fournie par les céramiques piezoélectriques de la tête du microscope (paramètre «Z modulation» sur «On»). Les pointes utilisées en mode tapping sont les mêmes que celles utilisées en mode contact (les fréquences de résonance sont en général comprises entre 8 et 20 kHz, à comparer aux 300 kHz des pointes tapping utilisées dans l'air).

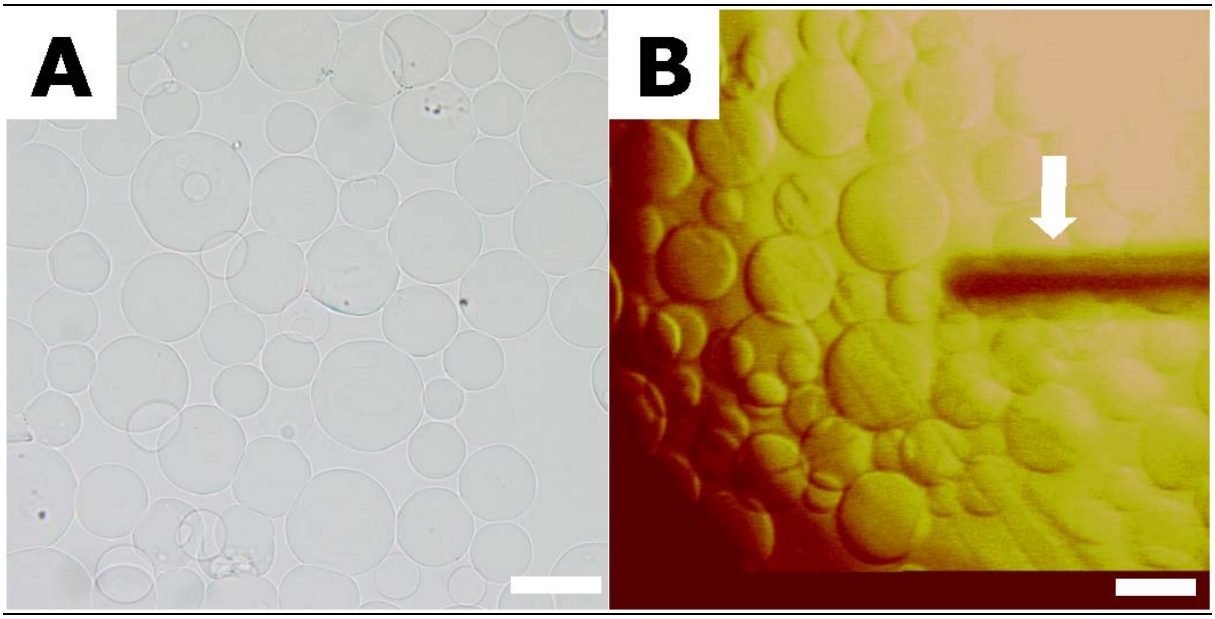


figure 15. Imagerie en milieu liquide. [A] Billes d'agarose observées au microscope optique en lumière transmise (grossissement x200) (échelle : 100 microns). [B] Image acquise par la caméra optique du microscope à force atomique (D3100) durant l'acquisition de courbes de force sur des billes d'agarose en milieu liquide (voir figure 11). La flèche indique le levier (échelle : 100 microns).

Tous les modes d'imagerie décrits jusqu'à présent (imagerie de hauteur en mode contact et tapping, imagerie de force latérale, spectrométrie de force, imagerie force volume, imagerie de phase) peuvent être réalisés en milieu liquide. La capacité de réaliser des images en milieu liquide offre certains avantages. Elle permet par exemple de minimiser les forces d'interaction entre la pointe et la surface, les forces attractives dues aux tensions de surface étant éliminées. Elle est également indispensable en microscopie à force chimique. Ce mode utilise des pointes fonctionnalisées, c'est à dire recouvertes d'un matériau susceptible d'interagir avec la surface de l'échantillon. Il est alors possible de quantifier l'attraction spécifique entre le ligand fixé sur la pointe et un récepteur présent sur la surface. L'utilisation de ligands tels que des anticorps nécessitent des mesures en milieu liquide (solutions tampons).

Calibration

Une calibration du D3100 a été effectuée tous les six mois tout au long de cette thèse. La calibration est réalisée en imageant une cible présentant des reliefs de dimensions connues. La séquence de calibration, nommée autocalibration au niveau du logiciel Nanoscope, est automatique. La cible utilisée est un substrat de silicium, présentant des puits carrés de 200 nanomètres de profondeur et de 5 microns de côté, espacés de 5 microns chacun (figure 5 page 44). La surface est recouverte de platine. D'autres types de cibles peuvent être utilisés, comme le virus de la mosaïque du tabac (dont les dimensions sont parfaitement connues), ou une surface atomiquement plate de mica ou de graphite, si l'appareil doit être utilisé en résolution atomique.

Durant la calibration, le microscope à force atomique réalise différents balayages, et l'utilisateur n'intervient que pour définir les distances entre les structures de la cible de calibration. Les valeurs générées par cet exercice permettent de comparer les dimensions des reliefs de la cible de calibration estimées par l'instrument, avec les valeurs réelles. La précision atteinte durant une calibration automatique, sans modification des paramètres manuellement, est de 2 % environ. La résolution est typiquement de 2 à 10 nm pour les axes X et Y, et peut dépasser 0,1 nm pour l'axe Z.

La détermination du bruit a également été effectuée de manière périodique sur un échantillon atomiquement plat (mica fraîchement clivé). Les paramètres utilisés sont les suivants : «scan size» 1 nm, gain intégral 0,01. Un «flatten» d'ordre 0 est réalisé sur l'image, puis la rugosité, qui indique le niveau de bruit, est extraite. L'outil PSD est utile pour détecter certaines fréquences perturbatrices.

Les artefacts

La microscopie à force atomique est une technique connue pour générer un grand nombre d'artefacts. Une partie importante du travail d'un microscopiste à force atomique est de prévenir, détecter et combattre ces artefacts.

Certains artefacts sont dus aux comportements des céramiques piézoélectriques du scanner:

- Lors du déplacement sur les deux axes horizontaux (x et y), les céramiques décrivent un tracé en arc de cercle plutôt qu'en ligne droite. Ce comportement a pour effet de faire apparaître une surface plane comme celle d'une sphère. Cet artefact («bow» ou «eyeballing») est pris en compte par le logiciel Nanoscope durant la phase de calibration, ou par traitement électronique après obtention des images.

- Le déplacement des céramiques piézo-électriques suivant le voltage appliqué n'est pas linéaire (cycle d'hystérésis). Cette non linéarité n'est pas un problème pour les faibles déplacements, mais le devient lorsque la distance à parcourir est importante (par exemple balayage de 100 microns). Les céramiques ne sont pas non linéaires suivant la vitesse de balayage, et elles peuvent aller plus vite dans une direction (par exemple x) par rapport à l'autre (par exemple y). Cet artefact est corrigé par la calibration.

- Phénomène de «creep» : il est lié à une relaxation des céramiques sous une contrainte constante et génère des décrochements dans l'image.

- D'une manière générale, les propriétés électriques et physiques des céramiques changent avec l'age, ce qui nécessite des calibrations à intervalles réguliers.

De nombreux artefacts sont également dus aux pointes, ou aux différentes forces s'exerçant entre la pointe et la surface de l'échantillon.

- Géométrie de la pointe : selon leur géométrie, les pointes ne donnent pas une image correcte de parois proches de la verticale. Il est, par exemple, impossible d'imager des parois dont l'angle avec l'horizontale dépasse l'inclinaison des parois de la pointe. Au delà d'une certaine limite, c'est les côtés de la pointe, et non plus les parois de l'échantillon, qui sont imagés. Des pointes fibres à haut ratio d'aspect (exemple nanotubes) permettent de corriger ces effets. Avec un rayon de courbure de 1 à 2 nm et une forme cylindrique, les nanotubes portent la résolution latérale bien au delà de ce qu'il est possible de faire avec des pointes classiques.

- Force de capillarité : de part ses dimensions, l'extrémité de la pointe forme un excellent noyau de condensation pour les molécules d'eau présentes dans l'air. De plus, la surface de l'échantillon va également avoir tendance à se couvrir d'une couche d'eau mono-moléculaire. Lorsque la pointe touche l'échantillon, les deux couches fusionnent et forment un ménisque, qui va littéralement engluer la pointe à la surface de l'échantillon, entraînant une perte considérable en résolution, ainsi que du «*gain ripple*» qui pourront parfois être impossible à éliminer. Le mode tapping a été mis en point en partie pour éliminer ces forces de capillarité. Celles-ci peuvent également être éliminées en imageant l'échantillon en milieu liquide, mais certains matériaux au comportement hydrophobe ne se prêtent pas bien à ce type d'analyse (la fragilité d'un matériau peut également s'accroître en présence d'eau). Lors de l'imagerie en milieu liquide, il est à noter que l'utilisation d'éthanol diminue considérablement (d'un facteur 100) les forces adhésives par rapport à l'eau seule. L'éthanol a également l'avantage de nettoyer la pointe de contaminants organiques.

- Force électrostatique : la présence de charges à la surface de l'échantillon et sur la pointe peut conduire à l'apparition de forces électrostatiques, qui représentent alors un facteur d'adhésion supplémentaire.

- Force d'adhésion : Lorsque la pointe est émoussée, ou lorsqu'elle traîne avec elle des contaminations, une force adhésive peut se développer. Celle-ci est particulièrement visible lors de l'établissement d'une courbe force-distance : les deux tracés (avant et arrière) sont alors fortement dissymétriques (figure 10 page 53). L'adhésion réduit la résolution des images, peut endommager l'échantillon et la pointe, et, dans les cas extrêmes, peut même générer des artefacts (dont le plus spectaculaire est l'effet de double pointe). Le niveau de l'adhésion est fonction du rayon de courbure de la pointe : des pointes très fines permettent de réduire son influence. Les particules accrochées à la pointe peuvent éventuellement être éliminées par un balayage rapide, ou mieux, un passage de la pointe aux ultraviolets et à l'ozone.

- «Gain ripple» : Lorsque les paramètres de réglage de la boucle de rétroaction (gain intégral et proportionnel) sont amenés à des valeurs

élevées, des oscillations peuvent apparaître (elles sont particulièrement bien visibles sur les images de déflexion, ainsi que sur l'oscilloscope logiciel). Cet artefact apparaît souvent sur le bord des objets très larges (cristaux).

- «Tip broadening» : L'extrémité des pointes est plus ou moins arrondie, et les images obtenues avec le microscope à force atomique représentent toujours une combinaison de la forme de l'apex de la pointe et de la surface de l'échantillon. Si l'extrémité de la pointe grossit, les images obtenues ne seront plus représentatives de la surface. Dans le cas d'échantillon très rugueux, les parois verticales sont une image miroir des côtés de la pointe, plutôt qu'une image des parois elles-mêmes (ce phénomène définit également des zones aveugles qui ne pourront être imagées). Dans le cas d'objets symétriques, il est préférable de réaliser les mesures dans l'axe Z (mesure du diamètre d'un brin d'ADN dans l'axe Z par exemple). Cet artefact peut être corrigé dans une certaine mesure par des procédures de déconvolution.

- «Despike pixel» : au sein d'une image, des pixels blancs (parfois un seul) peuvent apparaître. Ils résultent souvent du décollage brutal de la pointe lors du balayage, après que celle-ci ait été retenue par des forces adhésives. Lors du saut, la pointe atteint une hauteur souvent plus importante que tous les reliefs, ce qui explique la couleur blanche. Ces pixels peuvent être éliminés par traitement digital après obtention de l'image.

- Pointe double («double tip») : Ce phénomène, souvent facile à repérer sur les images, est du à une altération de la pointe ou à l'accrochage de contaminants que la pointe traîne alors avec elle durant le balayage. Tous les reliefs apparaissent dédoublés, tandis qu'un alignement dans une direction préférentielle se met en place. Il est parfois possible de résoudre ce problème en effectuant un balayage très rapide pour décrocher les éventuels contaminants. Dans certains cas cependant, il n'est pas possible de faire l'économie d'un changement de pointe.

- Dérive thermique : avant de réaliser des mesures, il est recommandé d'établir un équilibre thermique entre les différentes parties de l'instrument et l'échantillon, en laissant l'ensemble au repos pendant 30 minutes à 2 heures. Des hétérogénéités de température peuvent affecter le microscope à force atomique de diverses manières. Par exemple, si la couche d'or réflective qui recouvre la partie supérieure de la pointe est trop épaisse, celle-ci peut se comporter comme un thermocouple, en se courbant plus ou moins avec les sautes de température.

Préparation des échantillons pour la microscopie à force atomique

Pour conduire les études au microscope à force atomique, des lames minces pétrographiques polies (4,5 cm sur 3 cm), d'une épaisseur standard de trente microns, ont été exclusivement utilisées.

La préparation des lames minces polies a été effectuée par le laboratoire de litholamellage de l'Université d'Orléans de la manière suivante. La roche est d'abord taillée à la scie de manière à obtenir un parallélépipède communément appelé "sucre". L'une des faces du sucre est ensuite surfacée par différentes méthodes (carbure de silicium ou grilles à plots diamantés), de manière à augmenter sa rugosité. Une lame de verre dépolie est alors collée sur la face du "sucre" avec de la résine époxy, avant d'être placée sous presse. Une fois la résine polymérisée, l'échantillon est amené à une épaisseur d'environ 150 micromètres grâce à une rectifieuse à meule à grains moyens puis à environ 40 micromètres grâce à une rectifieuse à meule à grains fins. L'épaisseur adéquate (30 micromètres) est obtenue par une finition à la polisseuse, avec différents draps de polissage jusqu'à obtention d'un poli de qualité optique. La rugosité constatée avec le microscope à force atomique sur de telles surfaces est d'environ 30 RMS.

Le procédé consistant à préparer des macérations palynologiques (réalisation d'un concentré de matières organiques après élimination de la fraction minérale par des acides minéraux) a été écarté, au vu des nombreux inconvénients que présente cette technique par rapport à des observations *in-situ*. Non seulement les microfossiles ne peuvent pas être observés en place, dans la roche, mais les structures peuvent facilement subir des altérations morphologiques très importantes. De plus, le risque d'une contamination par des corps étrangers (fibres de tissu, bactéries) augmente très fortement (Cloud et Hagen, 1965). Les techniques de macérations palynologiques apparaissent donc peu adaptées à l'étude de microfossiles préservés en 3D dimensions dans des cherts, et ne peuvent produire les résultats obtenus sur des compressions de microfossiles dans des schistes noirs. De plus, le relief des fragments organiques dégagés serait rédhibitoire pour une étude en microscopie à force atomique.

Le protocole décrit ci-dessous a été entièrement mis au point au Centre de Biophysique Moléculaire, et consiste en une version largement améliorée du protocole décrit par Kempe et al. (2002). Par rapport à ce dernier, ce protocole utilise un marquage par indentation mécanique permanent (et non pas un marquage à l'encre labile), utilisable quelque soit les traitements effectués sur les lames minces –lavage, métallisation -, et quelle que soit le microscope employé. Ce protocole comprend également une observation des lames avant attaque à l'acide fluorydrique, étape très utile pour pouvoir localiser des microfossiles très petits après attaque acide, et pour pouvoir réaliser des mesures en mode contact,

indispensables pour l'imagerie de force latérale et l'imagerie force volume (voir le chapitre résultat).

La sélection des microfossiles en vue de leur étude par le microscope à force atomique nécessite impérativement un examen préalable des lames minces au microscope optique. Nous avons utilisé pour cela le microscope pétrographique Olympus BX51 décrit ci-dessus.

Dans un premier temps, la minéralogie, ainsi que la richesse en microfossiles des lames minces est déterminée. La phase suivante consiste à sélectionner les microfossiles les plus prometteurs selon deux critères : l'état de préservation, estimé ici d'après des standards «optiques» (il sera expliqué plus loin que la microscopie optique peut en fait donner une idée relativement fausse de l'état réel de préservation organique d'un microfossile) et l'exposition du microfossile à la surface de la lame mince de roche.

Concernant l'état de préservation, les microfossiles sélectionnés ne doivent pas être déformés, et d'une manière plus générale leur morphologie doit être très proche de celle des holotypes. D'un point de vue taphonomique, les microfossiles présentant des parois dégradés, plissées ou à texture granulaire sont rejetés (figure 16 page 68). Les microfossiles doivent également présenter une paroi organique bien individualisée, une coloration typique de l'état de maturation de la roche (par exemple, dans le cas de la formation Draken, les microfossiles possédant une paroi organique noire sont évités en faveur de cellules ayant des parois colorées en jaune-brun). Le niveau de maturation de la matière organique est déterminé avec l'aide de l'index TAI (Thermal Alteration Index).

Remarque : Avec l'augmentation de l'altération post-mortem, les microfossiles convergent morphologiquement vers des formes plus simples similaires à celles décrites dans certains cherts de l'archéen (Knoll et al., 1988). Cette "archéanisation" diagénétique des microfossiles a d'importantes implications pour la recherche de traces de vie dans les plus vieux sédiments terrestres et pose certains problèmes de reconnaissance. Certains microfossiles très dégradés ne peuvent effectivement plus être distingués de particules organiques d'origine inconnue disséminées dans la matrice. Seuls des microfossiles parfaitement identifiables ont donc été sélectionnés dans le cadre de cette étude.

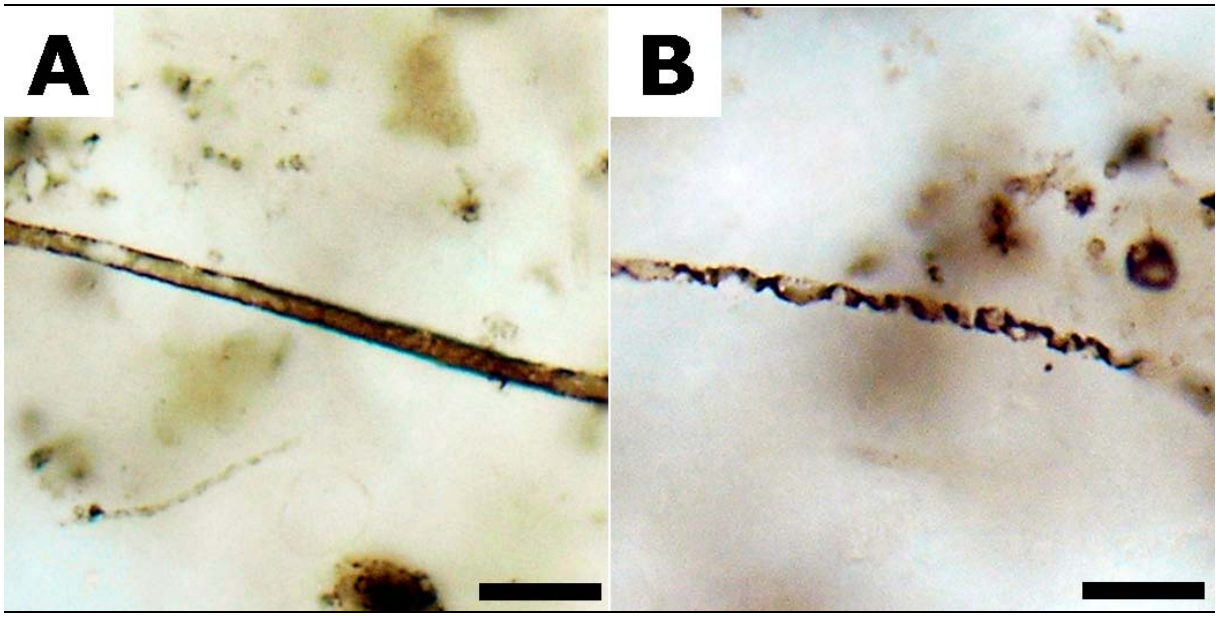


figure 16. Préservation de filaments de *Gunflintia minuta* dans les cherts de la formation Gunflint. [A] Filament imagé avec un microscope optique (grossissement x1000) en lumière transmise. Les parois cellulaires sont continues et bien individualisées (échelle : 10 microns). [B] Filament imagé avec un microscope optique (grossissement x1000) en lumière transmise. Bien qu'il soit possible que ce filament ait possédé à l'origine une structure en spirale, il est plus probable que l'aspect de la paroi soit d'origine diagénétique (échelle : 10 microns).

Concernant la troncature des cellules à la surface de la lame mince, celle-ci est entièrement liée au hasard lors de la réalisation de la lame mince. Dans le protocole mis en place par Kempe et al. (2002), le plan au niveau duquel le microfossile était sectionné pouvait être contrôlé à quelques microns près, mais cette technique, surtout utile dans le cas d'échantillons très pauvres en microfossiles, a l'inconvénient d'être très lourde à mettre en œuvre (une fois un microfossile sélectionné, la surface de la lame est abaissée par polissage, une vérification étant réalisée à chaque étape de polissage). Les deux formations retenues dans le cadre de cette thèse présentaient l'avantage d'être très riches en microfossiles, et sur une lame mince donnée, il existait statistiquement plusieurs spécimens (au moins une dizaine) correctement sectionnés par le polissage initial, et présentant de surcroît un état de préservation optimal.

Le type de section recherché dépend de la morphologie du microfossile. Pour les filaments, une section transversale est idéale. Les sections longitudinales peuvent également se révéler très intéressantes, mais sont beaucoup plus rares. Dans le cas de cellules sphériques, la section idéale est une section équatoriale.

Lorsqu'un microfossile est découvert, ses coordonnées sont notées grâce à la platine graduée du microscope BX51, et des photographies sont effectuées en lumière transmise, et à différent grossissements (x200, x500 et x1000). Un objectif indenteur doté d'une pointe diamantée (Leica M25) est ensuite utilisé pour marquer la position du microfossile. Cette marque permettra ainsi la localisation du microfossile avec tous les

microscopes utilisés dans cette étude (optique, à force atomique, et électronique, et ce même après métallisation).

Les marqueurs à encre classiques n'ont pas été utilisés dans ces travaux pour empêcher la contamination de la surface par de très petites particules d'encre, et également parce que l'encre ne supporterait pas les étapes d'attaque acide et de lavage.

L'objectif indenteur M25 (figure 17 page 70) permet de graver des cercles d'un diamètre allant de 150 microns à 4 millimètres environ. Si l'axe de rotation de la platine est parfaitement aligné avec l'axe optique, après indentation, le microfossile se situe exactement au centre du cercle. Bien entendu, plus le cercle est petit, plus le microfossile sera facile à retrouver (sachant que ce dernier, même de 150 microns, constituera toujours un repère immanquable sous les différents microscopes utilisés). Cependant, lors du marquage, une grande quantité de particules microscopiques de quartz sont générées, et de nombreuses retombent à l'intérieur du cercle. Certaines pourront être éliminées ensuite durant l'étape de lavage, mais d'autres ne pourront pas être délogées, et rendront alors la surface bien plus rugueuse qu'elle ne l'était initialement. De manière à limiter au maximum la contamination par ces particules de la zone entourant le microfossile, des cercles de 250 à 500 microns sont donc préférés à un cercle de 150 microns. La distance entre le microfossile (qui doit idéalement être au centre) et les bords du cercle est alors suffisante pour éviter les retombées de particules de quartz au niveau de la région centrale où se situe le microfossile. Dans le souci d'éviter une contamination, les observations à fort grossissement sont également effectuées avec un objectif x1000 sans immersion. Il est effectivement impossible de nettoyer totalement une lame mince avec des solvants organiques (éthanol, éther), après utilisation d'huile à immersion. Cette dernière a tendance à mouiller la surface rocheuse et à s'infiltrer dans toutes les micro-infractuosités de la lame, devenant par la même une source de contamination lors des observations au microscope à force atomique, en particulier celles effectuées avant attaque acide.

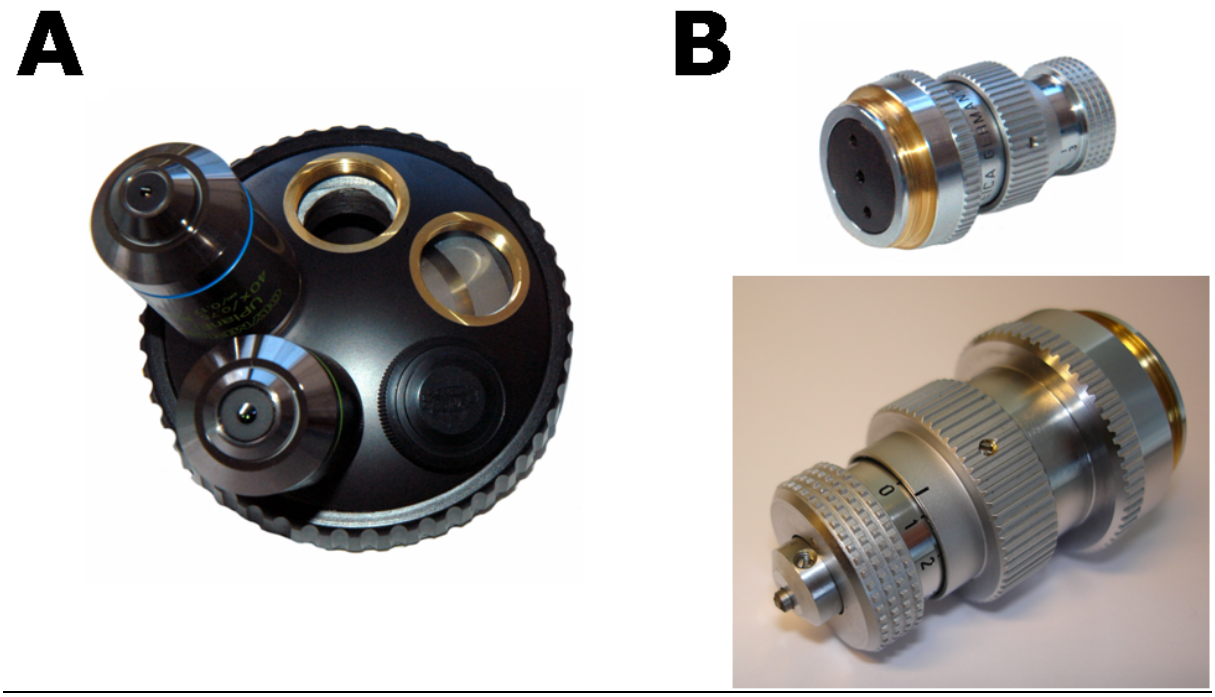


figure 17. [A] Vue de la tourelle du microscope Olympus BX 51. Deux objectifs classiques sont montés sur cette dernière. [B] L'objectif indenteur M25 de marque Leica, visible à droite, ne possède aucune lentille (en haut), mais se termine par une pointe au diamant (en bas) qui permet de tracer des cercles de différents diamètres (de 4 mm à 150 microns environ).

Après le marquage de tous les microfossiles potentiellement intéressants, la lame mince est lavée sous pisette à l'eau ultrapure pour ôter les particules minérales créées par le marquage. Des photographies en lumière réfléchie effectuées à divers grossissements (x200, x500 et x1000) serviront de références pour pouvoir localiser les microfossiles avec le microscope à force atomique ou le microscope électronique.

Relocalisation

Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse nécessitent de pouvoir relocaliser précisément un microfossile donné sur les images obtenues avec la batterie de microscopes utilisés (microscope optique, microscope à force atomique, microscope électronique). Etant donné leur petite taille (de 20 microns à 1,5 microns environ), les microfossiles des formations Gunflint et Draken ne peuvent pas être localisés directement avec la caméra intégrée au microscope à force atomique D3100. Cependant, avec l'aide des cercles tracés grâce à l'objectif indenteur, des défauts naturels des surfaces polies et des images prises en lumière réfléchie avec le microscope optique BX-51, il est possible de positionner avec une précision relativement grande (de l'ordre d'une dizaine de microns) la zone contenant le microfossile sous la pointe de l'AFM. Si la localisation d'une cellule donnée est généralement aisée avant attaque acide, la difficulté augmente néanmoins après l'attaque acide à cause des reliefs

crées par cette étape, d'ou l'importance des images de hauteur acquises avant cette étape (voir chapitre résultats pour plus de détails).

Protocole d'observation au microscope à force atomique

Les microfossiles tronqués à la surface des lames minces sont d'abord étudiés directement avec le microscope à force atomique en mode contact (voir ci-dessous), de façon à produire des images de hauteur, ainsi que des cartes de friction et d'adhésion grâce aux modes d'imagerie de force latérale et d'imagerie force volume. Pour l'obtention de la première image, le balayage est fixé à 50 ou 100 microns. Une fois le microfossile localisé, ce dernier est réduit entre 30 microns et 500 nm, suivant le grossissement désiré.

Les lames minces sont ensuite attaquées par de l'acide fluorhydrique (5% durant 10 à 20 minutes pour les lames de la formation Gunflint, contre 1% durant 30 à 40 minutes pour celles de la formation Draken), de manière à exposer en bas relief les parois organiques des microfossiles. La force de l'attaque acide pour les deux formations a été déterminée après de multiples observations, et sont celles qui ont donné les meilleurs résultats (voir chapitre résultats). L'attaque acide utilisée pour les lames minces de la formation Gunflint peut-être considérée comme standard, la concentration de l'acide et le temps d'attaque étant similaires aux valeurs de la littérature (Kempe et al., 2002). Pour les échantillons de Draken, une attaque acide beaucoup plus douce est réalisée, étant donné qu'avec la concentration d'acide normale (5 %) et quelque soit le temps, la surface de la roche est très vite attaquée et se caractérise par une rugosité très importante (qui complique les mesures). De plus, les reliefs masquent toute différence topographique entre la paroi et la matrice minérale et empêchent également l'utilisation du mode de phase pour repérer les parois cellulaires.

Après attaque acide, les lames minces sont lavées abondamment à l'eau ultra-pure durant 5 heures et sous agitation, de manière à éliminer totalement l'acide fluorhydrique, ainsi que les particules de quartz libérées par l'attaque acide et à dissoudre les éventuels dépôts de sels (fluorure) produits par l'acide fluorhydrique durant l'attaque. Les lames sont ensuite séchées dans une chambre à vide, puis imagées avec le microscope à force atomique en mode tapping.

Une première étude de la surface est réalisée avec des pointes silicium standard (nanodevices rotated tapping mode etched RTESP et nanosensor NCHR), caractérisées par un grand angle d'ouverture et un faible ratio d'aspect. Les structures intéressantes sont ensuite imagées en détails à haute résolution avec des pointes à haut ratio d'aspect et à faible rayon de courbure, fabriquées en carbone (nanotools HDC SSS et T-EAR M* 1-15, nanotubes de carbone).

Le traitement informatique des images est réduit à sa plus simple expression. Quand il est nécessaire, seules des fonctions permettant d'éliminer certains artefacts, ou de nettoyer l'image sont appliquées («planefit» et «flattening» pour corriger la planéité de l'image et enlever des distorsions, filtrage des basses fréquences pour éliminer le bruit haute fréquence, effacement d'une ligne de balayage pour éliminer les lignes affectées par la présence d'un débris).

Microscopie électronique à balayage

Comme il a été expliqué plus haut, la microscopie à force atomique est une technique connue pour le nombre d'artefacts qu'elle peut générer. Les artefacts dus à la géométrie de la pointe peuvent être compensés par des techniques de déconvolution (aveugle, ou mieux après caractérisation de la forme de la pointe par l'utilisation de cibles de test), ou en employant une autre technique de surface, telle que la microscopie électronique à balayage, pour vérifier la fidélité de l'image obtenue avec l'AFM. La déconvolution aveugle n'étant pas satisfaisante, il a d'abord été envisagé de déconvoluer les images après caractérisation de la forme de la pointe.

Cependant, cette technique est extrêmement lourde d'un point de vue opérationnelle (à chaque suspicion d'artefacts, les mesures doivent être interrompues pour permettre d'imager la cible de test). De plus, l'image de la pointe n'est valable qu'au moment même de sa mesure. Dès que le balayage de l'échantillon reprend, la géométrie de la pointe peut à nouveau varier, ce qui rend obsolète la caractérisation de la géométrie de la pointe acquise précédemment. La déconvolution n'étant pas satisfaisante, une autre technique d'analyse de surface, la microscopie électronique à balayage (MEB), a été choisie, de manière à pouvoir vérifier la réalité des surfaces observées.

Principe

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique d'imagerie basée sur des interactions électrons matière. Un faisceau d'électrons balaie la surface de l'échantillon à analyser qui émet certaines particules en retour. Ces dernières sont collectées par différents détecteurs, qui permettent alors de reconstruire une image de la surface.

Les électrons sont produits par un canon à électrons (thermoïonique ou à effet de champ), et le faisceau est focalisé grâce à des lentilles électromagnétiques, qui jouent le même rôle que des lentilles de verre en microscopie photonique. Le balayage est assuré par le jeu de bobines disposées perpendiculairement à l'axe du faisceau, et montées, comme les lentilles électromagnétiques, dans la colonne du microscope. Un vide poussé est maintenu dans l'instrument.

L'interaction entre les électrons primaires et l'échantillon, monté sur une platine porte-objet mobile, génère des particules tels que des électrons secondaires et des électrons rétro diffusés (ainsi que des rayons X utilisés lors des analyses EDX), qui sont recueillis par des détecteurs spécialisées. A chaque point d'impact correspond ainsi un signal électrique, dont l'intensité dépend à la fois de la nature de l'échantillon et de sa topographie. Les images sont actuellement enregistrées sous forme numérique, mais dans le passé, elles étaient formées sur l'écran phosphorescent d'un tube cathodique, et enregistrées sur un film photographique.

Dispositif expérimental

Les observations au MEB ont été effectuées à l'Université d'Orléans (Hitachi S4200 FEG-SEM et Hitachi S4500 FEG-SEM) et à la faculté de médecine de Tours (ZEISS DSM 982 Gemini) à bas voltage (1 to 15 keV) et sans dépôt de matériau conducteur quand cela était possible. Si l'accumulation des charges était trop importante, l'échantillon était alors recouvert d'or ou de platine, mais uniquement après que toutes les mesures de microscopie à force atomique aient été obtenues. L'AFM étant une technique d'extrême surface, le dépôt d'une couche de métal sur la surface de l'échantillon n'est en aucun cas anodin (figure 18 page 75). Si les principaux reliefs peuvent toujours aisément être distingués après dépôt d'or ou de platine avec l'AFM, dès que la résolution augmente, les petits globules métalliques dus à la métallisation (d'une taille variant entre 10 et 30 nm) deviennent visibles. Les données obtenues dans les modes physiques (imagerie de force latérale, imagerie force volume, imagerie de phase) perdent également toutes significations après métallisation.

Si le dépôt d'un film métallique sur la surface d'un échantillon donné signe la fin des mesures avec l'AFM, il rend du même coup possible l'utilisation d'autres techniques complémentaires, comme la microanalyse par dispersion d'énergie des photons X (EDX), ou la préparation de coupes FIB pour observation au microscope électronique en transmission (TEM).

Un autre inconvénient lié à l'utilisation du microscope électronique à balayage est la contamination de la surface de l'échantillon par accumulation de carbone sous le faisceau d'électrons, particulièrement durant des mesures s'étalant sur plusieurs heures, comme des cartographies élémentaires EDX.

Ce type de contamination a principalement été observé avec les roches de la formation Draken. Ainsi, la figure 19 page 75 illustre la contamination de surface ayant eu lieu suite à une cartographie élémentaire de plusieurs heures sur un spécimen de *Myxococcoides* de la formation Draken. La paroi des microfossiles préservés dans les cherts de la formation Draken étant particulièrement pauvre en carbone (voir partie résultats), des temps de comptage de plusieurs secondes par pixel ont été jugés nécessaires, d'où la durée particulièrement longue des cartographies. Très rapidement, une contamination fut observée sous le faisceau d'électrons, pour prendre des proportions spectaculaires au fil des heures, comme le montre la figure 19 page 75. La contamination se produit suite à la mobilisation puis au dépôt de carbone par le faisceau d'électrons, celui-ci provenant d'hydrocarbures présents à la surface de l'échantillon. Les conglomérats de la formation Draken étant plus poreux que les cherts de Gunflint, il est possible que des hydrocarbures se soient infiltrés dans la partie la plus superficielle des lames minces. Au vu des basses performances de cette technique de détection, et de l'importante contamination liée aux mesures dans cette étude, le recours à la cartographie Raman a été jugé indispensable, et la cartographie EDX a été abandonnée au cours des travaux présentés ici.

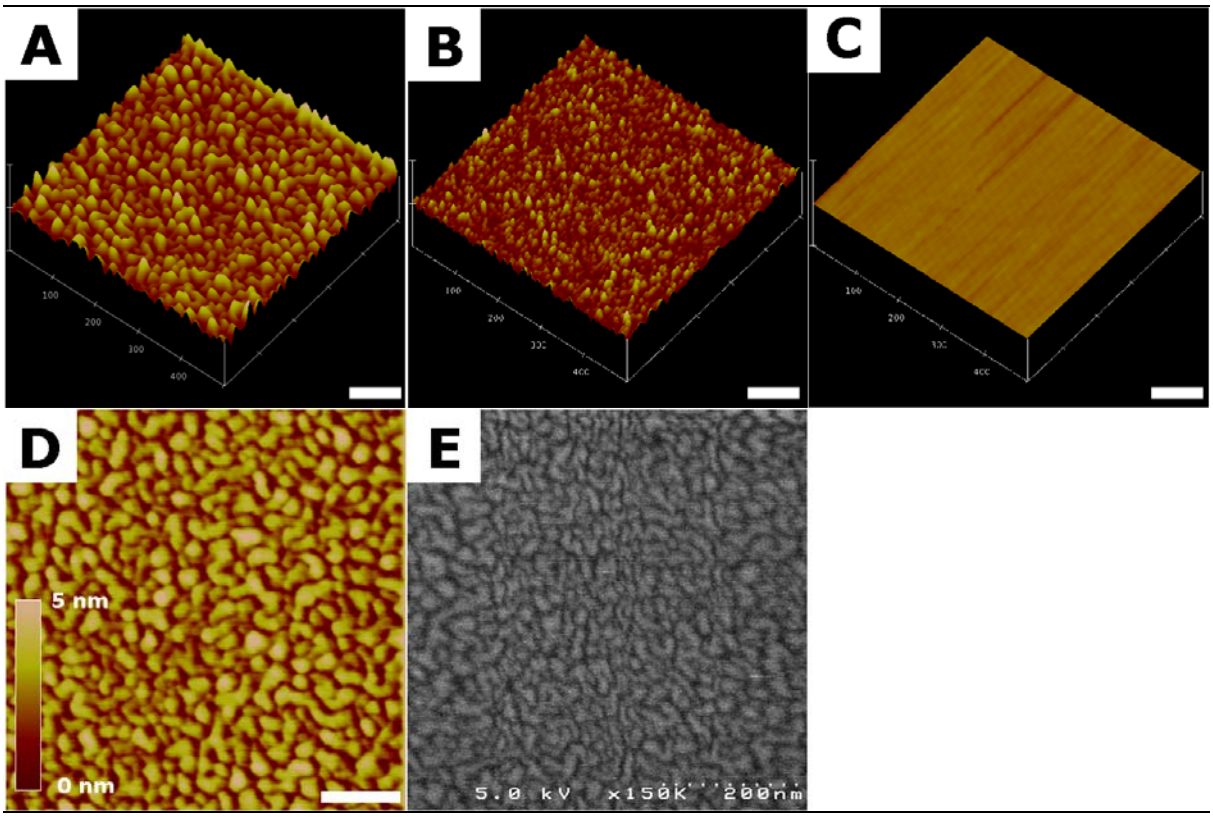


figure 18. Effet de la métallisation sur une surface de mica. [A] Vue 3D de globules d'or déposés sur une surface atomiquement plate de mica (échelle : 400 nm, contact, pointe CONTR50, scan rate 5 Hz). [B] Vue 3D de globules de platine déposés sur une surface atomiquement plate de mica (échelle : 400 nm, tapping, pointe RTESP7, scan rate 1 Hz). [C] Vue 3D obtenue au microscope à force atomique d'une surface de mica atomiquement plate (échelle : 400 nm, pointe RTESP7, scan rate 1 Hz). [D] Image de hauteur obtenue en mode contact de globules d'or déposés sur une surface atomiquement plate de mica (échelle : 100 nm, contact, pointe CONTR50, scan rate 5 Hz). [E] Image en microscopie électronique à balayage d'une région similaire à celle illustrée sur l'image C (échelle : 200 nm).

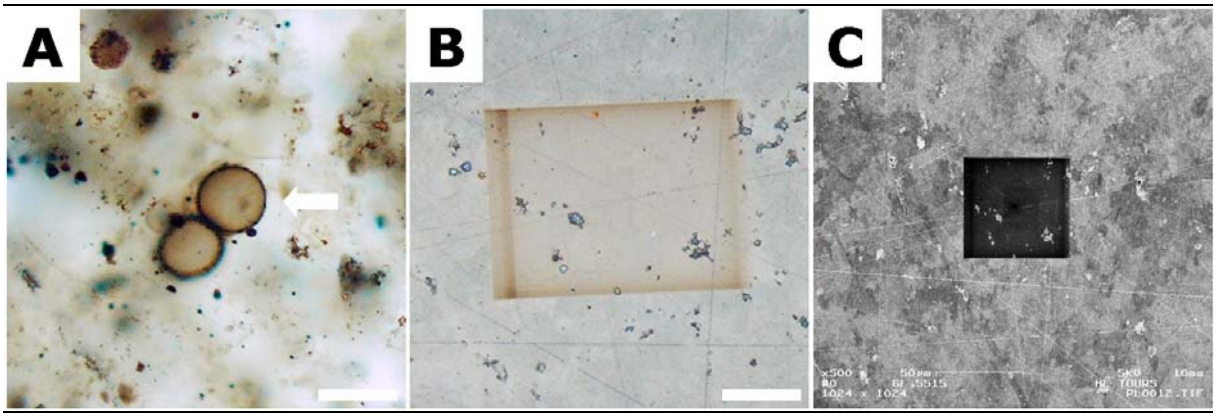


figure 19. Un exemple de contamination par accumulation de carbone sous le faisceau d'électrons du microscope électronique à balayage. [A] Vue au microscope optique de deux cellules de *Myxococcoides (spécimen #hum-tw)*. Une cartographie élémentaire EDX (aluminium, carbone, oxygène et silicium) a été effectuée durant la nuit sur la cellule indiquée par la flèche blanche (échelle : 20 microns). [B] Image en lumière réfléchie de la même région que l'image précédente : la zone de balayage du faisceau d'électrons est fortement contaminée (échelle : 20 microns). [C] Image au microscope électronique à balayage de la même région que l'image B : la contamination est également bien visible (échelle : 50 microns).

Microscopie électronique en transmission

La microscopie à force atomique étant par définition une technique d'extrême surface, il a semblé important de valider les résultats obtenus en surface par des données obtenues dans le *volume* de l'échantillon. L'observation au microscope électronique en transmission de coupes ultraminces produites par la technique FIB est apparue comme idéale pour atteindre cet objectif.

Principe

Le microscope électronique en transmission (TEM) est une technique d'imagerie utilisant une source d'électrons pour observer un échantillon extrêmement fin. Les électrons, produits par un canon à électrons, sont focalisés par des lentilles électromagnétiques. Ils traversent alors l'échantillon, avant d'être collectés par des détecteurs.

Le microscope électronique en transmission permet d'obtenir soit une image de l'échantillon, soit un cliché de diffraction. Dans le mode d'imagerie, les électrons qui traversent l'échantillon vont être plus ou moins absorbés selon l'épaisseur, la densité ou la nature chimique de ce dernier. Le détecteur, placé dans le plan image, renvoie donc une vue par transparence de l'échantillon. Le mode de diffraction s'appuie quant à lui sur le comportement ondulatoire des électrons. Lorsque les électrons rencontrent de la matière organisée (cristaux), ils vont être diffractés, c'est-à-dire déviés dans certaines directions dépendant de l'organisation des atomes. Le faisceau est diffracté en plusieurs petits faisceaux qui forment une figure de diffraction. Le détecteur est placé dans le plan focal. L'image ou la figure de diffraction peut être vue sur un écran fluorescent, enregistrée sur un film photographique ou bien détectée par un capteur CCD.

Certains microscopes électroniques en transmission (HR-TEM) sont capables de produire des images à très haute résolution. Les images haute résolution résultent de figures d'interférence entre les électrons transmis en ligne directe et ceux diffractés. Il est alors possible de visualiser directement l'organisation des atomes et d'apercevoir des défauts tels que des joints de grain, des dislocations...

Le microscope électronique à balayage par transmission (STEM) est un type de microscope électronique dont le principe de fonctionnement allie certains aspects du microscope électronique à balayage et du microscope électronique en transmission. Une source d'électrons génère un faisceau d'électrons focalisés qui traverse l'échantillon, un système de lentilles électromagnétiques permettant à ce faisceau de balayer la surface de l'échantillon à analyser. Le principal avantage de cette technique est de pouvoir réaliser une analyse élémentaire des rayons X émis par les atomes sous l'effet des électrons, et de dresser ainsi une cartographie chimique de la région analysée.

La phase de préparation des échantillons pour une observation au microscope électronique en transmission est très importante, et détermine en partie la qualité des résultats obtenus. Le faisceau d'électrons devant traverser l'échantillon, son épaisseur doit être la plus faible possible, idéalement quelques dizaines ou centaines de nanomètres.

Les matériaux à analyser étant particulièrement durs, la technique de coupe par microtome, couramment utilisée en biologie, ne pouvait être employé ici. L'objectif étant d'obtenir des tranches perpendiculaires à la surface analysée par microscopie à force atomique, la technique d'amincissement ionique ne pouvait pas non plus être retenue. Les lames ultraminces ont donc été préparées par la technique du FIB (focused ion beam), selon la procédure décrite par Wirth (2004). Cette technique offre l'avantage de pouvoir choisir très précisément, au micron près, l'emplacement de la zone à découper (figure 20 page 79).

L'instrument utilisé pour cette technique est similaire à un microscope électronique à balayage, et se révèle d'ailleurs capable de fournir des images de la surface grâce à un détecteur d'électrons secondaires (figure 20A page 79). Le cœur de l'instrument est cependant composé d'une source d'ions (généralement du gallium), accélérés à des énergies allant de 10 à 40 keV, et focalisés sur l'échantillons par des lentilles électromagnétiques. Quand le faisceau d'ion rencontre la surface, cette dernière subit une ablation. Il est ainsi possible d'excaver une grande quantité de matériau, et de réaliser des lames ultraminces dans un matériau donné.

Pour cette opération, la surface correspondant à l'emplacement de la lame ultramince est recouverte d'une couche protectrice métallique (platine par exemple) d'épaisseur micrométrique (figure 20B page 79). Une vapeur d'un composé métallo-organique est introduite dans la chambre à vide, et s'adsorbe à la surface de l'échantillon. Le faisceau d'ions est alors utilisé pour décomposer le composé au niveau de la région à protéger. La partie organique, volatile, s'échappe, tandis que la partie non volatile (métal) reste à la surface de l'échantillon. Le faisceau est ensuite utilisé pour excaver la matière de part et d'autre de la région recouverte de platine (figure 20C page 79). L'excavation se fait par étape, en créant des marches d'escaliers, qui descendent progressivement vers la lame ultramince en cours de réalisation.

La technique FIB est hautement destructive, et la surface est totalement détruite sur plusieurs dizaines de microns tout autour de la région de découpe. De plus, des atomes de gallium sont implantés dans les premiers nanomètres de la surface, qui peut alors devenir amorphe. La surface peut cependant être nettoyée après l'opération par amincissement ionique («ion milling») si le besoin s'en fait sentir.

Dispositif expérimental

Les coupes FIB ont été effectuées au Centre Pluridisciplinaire de Microscopie Electronique et de Microanalyse (CP2M) de l'Université d'Aix-Marseille. Les lames minces destinées à subir une découpe sont recouvertes d'une couche d'or conductrice, de manière à éviter les phénomènes de charge sous le faisceau d'ions, et lors des observations avec le microscope électronique intégré au dispositif FIB.

Les coupes ont été réalisées avec un Philips FIB 200 TEM. Un faisceau d'ions gallium, accélérés à 30 kV a été utilisé. Sous le contrôle d'un détecteur d'électrons secondaires adjoint à la chambre de préparation, un mince film de platine d'un micron d'épaisseur est déposé sur la région à découper, de manière à la protéger du bombardement ionique (figure 20B page 79, figure 34F page 138). Les microfossiles exposés à la surface des lames minces par le polissage sont localisées exactement de la même manière qu'avec un microscope électronique classique : recherche du cercle tracé par l'objectif équipé d'une pointe au diamant (M25 Leica), et comparaison des images de surface avec celles effectuées au microscope à force atomique.

Le matériel situé en dessous et au dessus de la bande de platine est ensuite excavé par le faisceau d'ions. A l'issue de l'opération, une coupe ultramince mesurant en général 10 à 15 microns de longueurs pour 5 à 7 microns de profondeur et 100 à 200 nm d'épaisseur (figure 20B page 79, figure 35I page 141) est obtenue. La section est coupée à sa base et sur les côtés par le faisceau d'ions, ce qui a pour effet de la libérer. Il peut arriver que sous l'effet de charges électrostatiques, la section quitte brusquement son logement pour aller se redéposer plus loin. Dans ce cas, elle est généralement considérée comme perdue. Etant donné la nature isolante du quartz, nous avons été exposés à ce problème plusieurs fois, et une attention toute particulière a dû être portée à l'étape de «libération» de la section ultramince.

Une fois que le microscope électronique du FIB a permis de confirmer que la section est restée dans sa cavité (figure 20E page 79), la lame mince est retirée puis placée sous un microscope optique muni d'un micromanipulateur. Une fibre de verre extrêmement fine est placée à l'extrémité du bras du micromanipulateur, puis amenée au contact de la section ultramince, qui, par le jeu de forces adhésives, se retrouve collée sur la fibre de verre. La section ultramince est alors transportée sur une grille de cuivre de microscope électronique en transmission, recouverte d'un film très mince de polymère. Ce dernier joue le rôle de support pour la coupe FIB. La position de la section ultramince sur la grille de TEM est documentée, pour faciliter son repérage ultérieur au TEM.

Les observations TEM ont été effectuées au CP2M, avec un microscope électronique à transmission haute résolution (JEOL JEM 2010F) et un microscope électronique à balayage en transmission (Philips EM 4005 STEM).

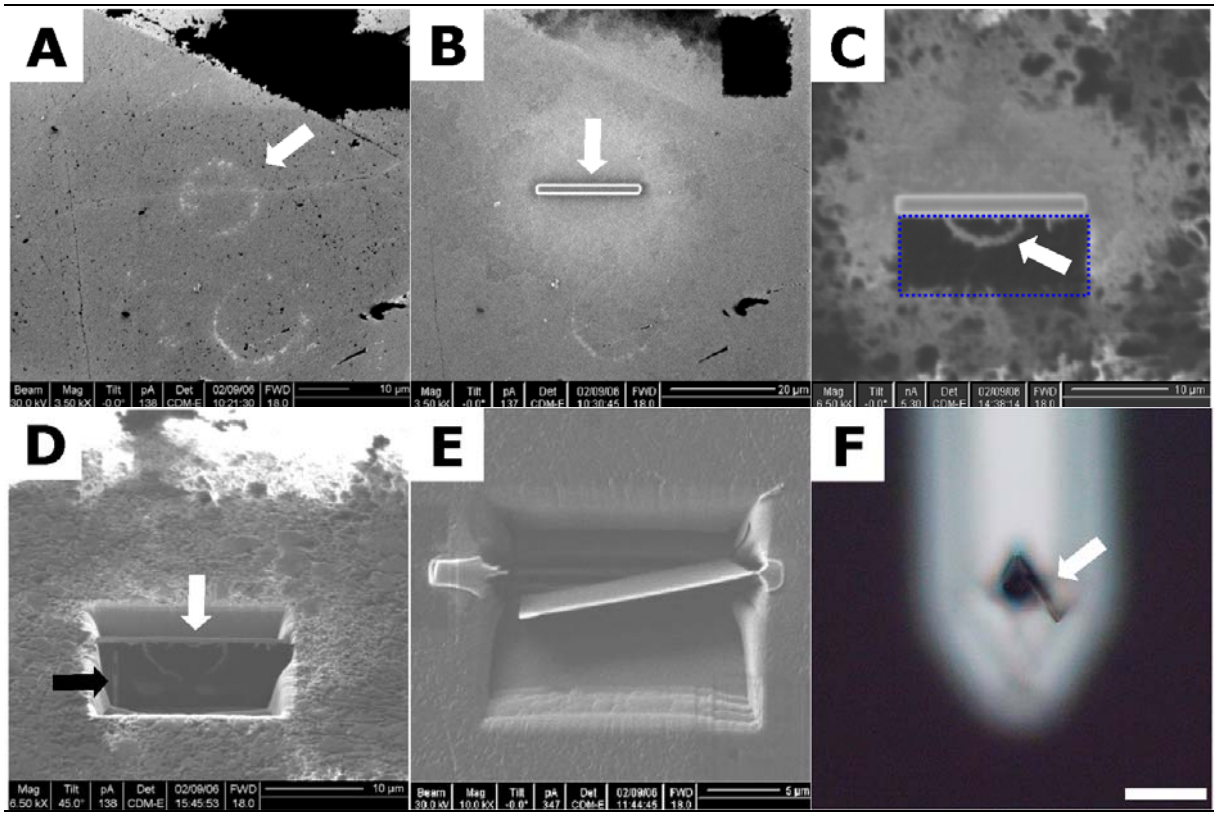


figure 20. Découpe de lames ultra-minces dans des échantillons de cherts des formations Draken et Gunflint. [A] Image fournie par le détecteur d'électrons secondaires de l'instrument Philips TEM 200. La surface de la lame mince taillée dans un conglomérat de la formation Draken a été métallisée à l'or. Deux cellules de *Myxococcoides* sont tronquées en surface, dont celle du spécimen #tr3 (flèche blanche, voir figure 35) (échelle : 10 microns). [B] Dépôt d'une bandelette de platine de 1 micron d'épaisseur sur la région à découper (flèche blanche) (échelle : 20 microns). [C] Début des opérations d'excavation par un faisceau d'ions de gallium sur un échantillon de chert de la formation Gunflint (spécimen #01-4). Le rectangle pointillé bleu indique la région en cours de creusement. La paroi organique réfractaire de la cellule d'*Huroniospora* (flèche blanche) résiste à l'ablation ionique, et est encore visible sur cette image (elle ne tardera cependant pas à disparaître) (échelle : 10 microns). [D] Même échantillon que précédemment, une fois l'excavation finie. La lame ultra-mince est indiquée par une flèche blanche. Il est possible d'apercevoir la paroi organique de la cellule d'*Huroniospora*. Trois entailles doivent désormais être réalisées par le faisceau d'ion pour libérer la lame ultra-mince de sa cavité. Celle de gauche (flèche noire) est en cours (échelle : 10 microns). [E] La lame ultra-mince, une fois libérée de sa cavité (échelle : 5 microns). [F] Image en microscopie optique d'une lame ultra-mince adhérant à une pointe AFM. La lame est visible par la tranche (flèche blanche) (échelle : 20 microns).

Microspectrométrie Raman

Principe

La spectrométrie Raman est une technique de diffusion permettant de caractériser la composition et la structure d'un matériau, par l'étude de l'interaction lumière matière. La méthode consiste à focaliser un faisceau de lumière monochromatique laser sur l'échantillon à étudier et à analyser la lumière diffusée en retour grâce à un détecteur. Le dispositif expérimental est constitué de trois parties principales : une source excitatrice (idéalement monochromatique, intense et polarisée linéairement), un système dispersif et un système de détection.

Excités par les photons laser, les liaisons chimiques se mettent à vibrer, avant de réémettre de l'énergie sous la forme de photons. Les raies Raman sont caractéristiques de la composition chimique du matériau, de sa structure cristalline ainsi que de ses propriétés électroniques. Il est en particulier possible d'obtenir des informations sur la nature des liaisons chimiques, sur le type de mouvement de ces liaisons (rotation, étirement, etc.), sur l'anisotropie éventuelle du matériau, et sur l'environnement atomique direct (matériaux sous contrainte, dopés, etc.). Il est ainsi possible d'identifier des minéraux ou des composés chimiques organiques.

Lorsqu'un échantillon transparent est exposé à une onde électromagnétique monochromatique (comme la lumière d'un laser), la majeure partie du faisceau incident est soit transmise, soit réfléchie, soit absorbée pour être transformée en chaleur (principe de la spectrométrie infrarouge), et seule une petite partie de la lumière est diffusée.

La diffusion de la lumière résulte principalement de quatre effets portant le nom de leurs découvreurs : Tyndall, Rayleigh, Brillouin et Raman. Ils peuvent être rangés en deux catégories : diffusion élastique, si la composante diffusée est de même longueur d'onde que le faisceau incident, et diffusion inélastique si la composante diffusée possède une longueur d'onde différente de celle du faisceau incident, ce qui est le cas de la diffusion Raman. La diffusion inélastique est très faible, et son intensité est dix millions de fois plus faible que celle de la lumière incidente.

Lors de l'excitation, le photon incident va placer la molécule frappée dans un état énergétique virtuel, qui ne correspond pas à un état propre de la molécule. A partir de ce niveau virtuel, la molécule va subir une désexcitation, qui peut se produire de trois manières différentes :

- retour sur un niveau d'énergie initial par émission d'un photon de même énergie que le photon incident, c'est la diffusion Rayleigh.
- retour sur un niveau d'énergie vibrationnel supérieur par émission d'un photon de plus basse énergie que le photon incident, c'est la diffusion Raman Stokes.

- retour sur un niveau d'énergie vibrationnel inférieur par émission d'un photon de plus grande énergie que le photon incident, c'est la diffusion Raman anti-Stockes. Cette diffusion est moins probable que la diffusion Raman Stokes, le niveau de départ étant effectivement situé à une énergie supérieure à celle du niveau d'arrivée.

La mesure de l'intensité du rayonnement diffusé après dispersion conduit à un spectre. Véritable empreinte vibrationnel du composé étudié, celui-ci représente l'intensité de la diffusion Raman en fonction de la différence de fréquence entre celle de la raie excitatrice et celles des raies de diffusion, exprimée en cm^{-1}. La surface sondée par le microspectromètre Raman est d'environ 1 $micron^2$, pour une pénétration dans le volume qui peut varier entre 0,1 micron et 1 micron.

Le fait que l'intensité Raman diffusée soit indépendante du volume de l'échantillon a permis le développement de la microspectrométrie Raman. Avec cette technique, le faisceau laser est focalisé sur l'échantillon par l'intermédiaire de l'objectif d'un microscope conventionnel, et la lumière Raman diffusée est collectée par ce même objectif. La microspectrométrie Raman confocale a permis d'améliorer grandement la résolution spatiale, puisque ce type de microscope permet de mesurer l'intensité lumineuse réfléchie par une toute petite partie de l'échantillon. La contribution au signal Raman provient essentiellement de la couche située dans le plan focal, la lumière due aux régions situées hors du plan focal étant fortement atténuée (à cause précisément des propriétés offertes par le système confocal). Ce système permet d'analyser des volumes de l'ordre d'un micron cube.

Dispositif expérimental

Les spectres Raman obtenus sur des microfossiles individuels des formations Draken et Gunflint ont été réalisés au Centre de Recherche sur les Matériaux à Haute Température (CRMHT) d'Orléans. Un laser à argon/krypton continu (INNOVA 70C SPECTRUM Coherent), délivrant un faisceau laser monochromatique de longueur d'onde à 514,532 nm est couplé à un triple monochromateur Jobin-Yvon T64000 pouvant être utilisé en mode simple monochromateur, triple additif ou triple soustractif. Seul le premier mode a été utilisé.

La détection est effectuée au moyen d'un capteur CCD 2000 (Spectrum One) refroidi sous azote liquide, et chargé de mesurer entre autre l'intensité du signal en fonction de sa longueur d'onde. Un blanc est effectué avant chaque mesure pour caractériser le bruit de fond (bruit noir, du à une réponse non nul du capteur en l'absence de lumière incidente), et les mesures sont doublées pour éliminer les problèmes liés aux rayons cosmiques ou électroniques (qui peuvent venir frapper à tout instant l'un des pixels du capteur CCD).

Les analyses ont été effectuées à 514,532 nm (vert), avec une puissance de 150 mwatts à la sortie du laser, et une puissance de 0,5 mwatts sur la lame mince. Le diaphragme confocal a été fermé au maximum, de manière à analyser le plus petit volume possible (1 micron cube), et les mesures ont été effectuées avec un temps d'acquisition variant de 20 secondes à 90 secondes. Les spectres sont déconvolués avec le module Peak Fitting d'ORIGIN.

L'imagerie Raman 2D ont quant à elles été obtenues grâce à la plateforme de microspectrométrie Raman nationale de l'Institut National des Sciences de l'Univers (INSU), située au laboratoire des Sciences de la Terre à l'Ecole Normale Supérieure (ENS) de Lyon. Un spectromètre DILOR XY/LABRAM, équipé avec un dispositif optique confocal utilisant un objectif x100 et une caméra CCD refroidie à l'azote liquide a été utilisé. Les analyses ont été effectuées avec un laser argon à une longueur d'onde de 514,532 nm (vert) et une puissance de 0,5 mwatts sur la lame mince. Les cartes ont été obtenues en déplaçant l'échantillon d'un pas de 0,1 micron, grâce à des moteurs pas à pas couplés avec la platine porte-objet.

Microspectrométrie Raman et kérogènes

L'objectif des mesures Raman était de pouvoir confirmer la présence de carbone dans les parois des microfossiles des formation Draken et Gunflint, les analyses EDX exposant les échantillons à des risques de contamination (figure 19 page 75). Un autre objectif était de déterminer précisément la distribution des kérogènes, de manière à pouvoir éventuellement comprendre la nature de certaines structures observées au microscope à force atomique.

Cependant, la microspectrométrie Raman a été récemment présentée comme une technique capable de déterminer l'origine, biogénique ou non, de matériaux carbonés fossiles, le spectre d'un kérogène présentant certaines particularités absentes du spectre de matériaux abiogéniques : présence d'une épaule dans la partie basse fréquence du pic D, absence de décalage du pic D avec un changement de la longueur d'onde excitatrice du laser, absence d'un pic de second ordre pour la bande G (Kudryavtsev et al., 2001, Schopf, 2002; Schopf et Kudryavtsev, 2005; Schopf et al., 2005). La confirmation de ces résultats par l'analyse des spectres obtenus sur les microfossiles de la formation Draken et Gunflint dépassait le cadre de cette thèse. De plus, la capacité du Raman à établir la nature biogénique d'un composé carboné fossile donné, bien que fascinante en théorie, est loin d'être prouvée, et ne s'appuie sur aucun modèle théorique.

Effectivement, la microspectrométrie Raman offre seulement un moyen de distinguer les différents types de liaisons entre des atomes de carbone (sp2, sp3). Elle peut simplement donner des indications sur la plus ou moins grande cristallinité d'un matériel carboné (carbone désordonnée, c'est à dire un réseau discontinu de cycles aromatiques ou graphite), et

permettre de relier la distribution d'un matériau carbonée avec la morphologie d'un microfossile (Pasteris et Wopenka, 2002; Pasteuris et Wopenka, 2003).

En spectrométrie Raman, les kérogènes donnent des spectres similaires à ceux d'un matériel carboné désordonné. Cependant, les spectres obtenus ne peuvent être différenciés de ceux de matériaux abiogéniques obtenus par des processus divers et variés. L'origine du matériel carboné désordonné ne peut donc être déduite des données Raman (Pasteris et Wopenka, 2002; Pasteuris et Wopenka, 2003).

Si la spectrométrie Raman se révèle précieuse pour l'étude des roches (identification de minéraux) ou de la matière organique moderne immature (identification de groupements fonctionnels, de molécules), son intérêt décroît considérablement dès qu'il s'agit d'analyser des kérogènes. Les spectres Raman obtenus sur ce type de matériel ne permettent finalement que de distinguer un matériau carboné désordonné (carbone plus ou moins amorphe) d'un matériau ordonné (graphite).

L'identification de carbone amorphe ne signe en aucun cas la présence de kérogène, et donc une origine biogénique du matériel étudié (le contraire est aussi vrai : des particules de graphite peuvent tout à fait avoir une origine biologique, le graphite étant le stade final de la maturation thermique de matière organique). Aucun groupe fonctionnel ne peut être identifié dans des kérogènes par spectrométrie Raman, et cette technique n'est pas non plus apte à identifier des molécules individuelles tels que des biomarqueurs. Seule, la spectrométrie Raman ne fourni donc que peu d'informations, et les résultats doivent être impérativement complétés par des analyses complémentaires (GC-MS, H/C, TEM et SEM avec EDX).

Imagerie rayons X (synchrotron)

Principe

Un synchrotron est un dispositif composé d'un tore (ou anneau de stockage) dans lequel des particules (électrons ou positons), accélérées à une vitesse proche de celle de la lumière, sont injectées (figure 21 page 84). A certains points du tore, des aimants modifient la trajectoire des particules, qui émettent en retour une onde électromagnétique, le rayonnement synchrotron. Celui-ci possède des caractéristiques exceptionnelles par comparaison à d'autres sources de lumière: son spectre d'émission peut s'étendre de l'infrarouge aux rayons X, et ce avec une brillance très grande. La lumière synchrotron est collectée à différents points de l'anneau, au niveau d'un dispositif appelé ligne de lumière (figure 22 page 85). Chaque ligne possède des lentilles, miroirs et monochromateurs permettant de modifier les caractéristiques du faisceau. Les particules, générées par l'interaction du faisceau incident avec l'échantillon monté à l'extrémité de la ligne de lumière sont recueillies par des batteries de détecteurs (figure 23 page 88).

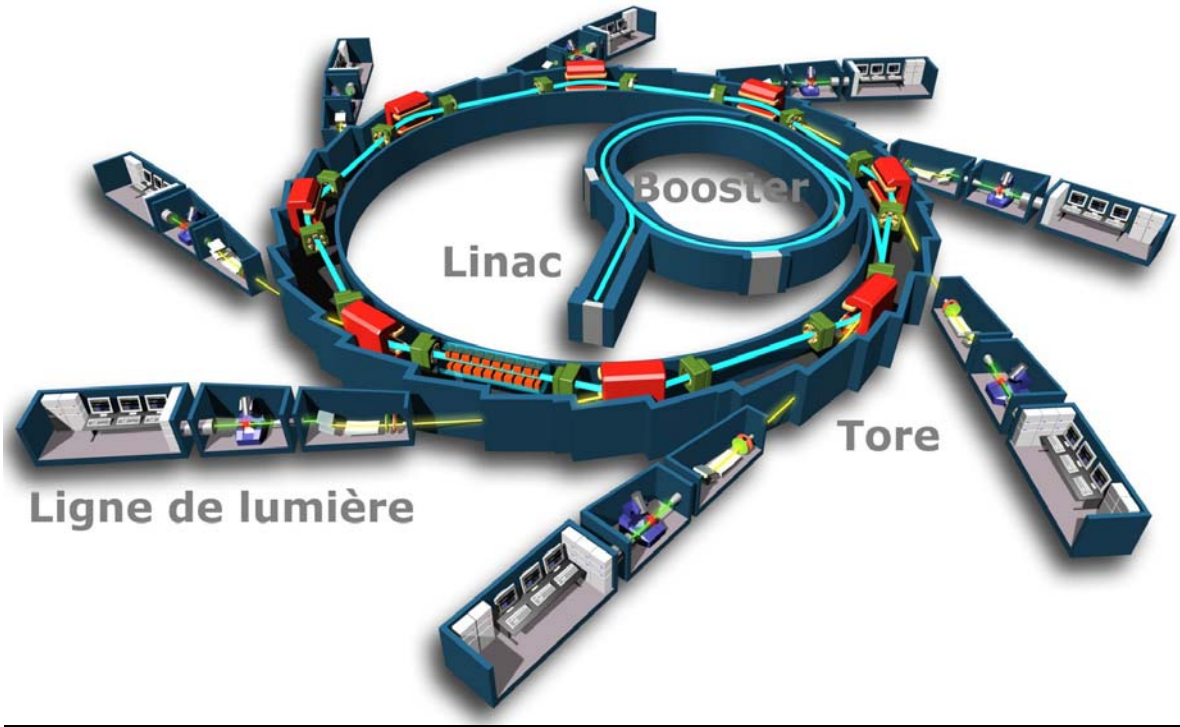


figure 21. Schéma de principe de l'ESRF. Les électrons sont d'abord accélérés dans un accélérateur linéaire, le LINAC, avant d'être envoyé dans un accélérateur circulaire (le booster). Une fois à la bonne énergie, ils sont libérés dans un anneau de stockage (le tore), qu'ils parcourent à une vitesse proche de celle de la lumière. A différents points de l'anneau, les électrons subissent des changements de trajectoires et émettent un rayonnement synchrotron d'une brillance exceptionnelle.

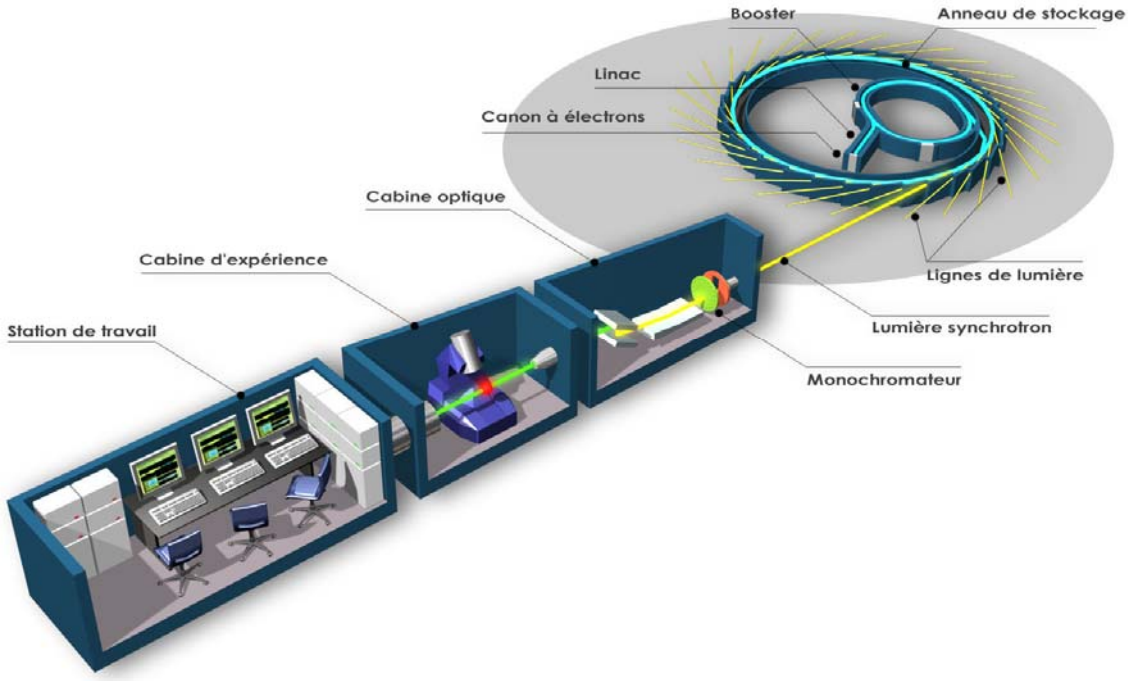


figure 22. Schéma d'une ligne de lumière de l'ESRF. Branchées à intervalles réguliers sur l'anneau de stockage, des lignes de lumière collectent la lumière synchrotron émise par les électrons en circulation dans le tore. Chaque ligne est généralement composée de trois cabines : une cabine optique, qui renferme les dispositifs optiques (lentilles, miroirs, monochromateurs) permettant de modifier les caractéristiques du faisceau de lumière, une cabine d'expérience ou l'échantillon est exposé au rayonnement synchrotron, et une cabine de contrôle qui accueille les opérateurs.

L'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF)

Les mesures effectuées dans le cadre de cette thèse ont été réalisées sur la ligne de lumière ID21 du synchrotron européen de Grenoble (ESRF, European Synchrotron Radiation Facility), capable de délivrer un faisceau extrêmement brillant de rayons X, issu du freinage d'électrons de très haute énergie (6 GeV).

Les synchrotrons de troisième génération, comme l'ESRF, peuvent produire un rayonnement synchrotron de grande qualité, dont de nombreuses caractéristiques, comme la brillance, le spectre, la polarisation, la cohérence et la taille peuvent être contrôlées. Ces synchrotrons permettent ainsi d'étudier des spécimens plus épais, d'accéder au seuil K d'éléments plus lourds que ceux traditionnellement étudiés en microscopie X, et de cartographier des éléments traces par fluorescence X.

Emis par un canon à électron, les électrons sont d'abord injectés dans un accélérateur linéaire (LINAC), avant d'être envoyés dans un accélérateur circulaire, ou ils sont accélérés jusqu'à atteindre une énergie très importante (6 milliards d'électrons volts dans le cas de l'ESRF). Les particules sont alors injectées dans un anneau de stockage. D'un diamètre particulièrement important (844 mètres pour l'ESRF), ce dernier constitue

la structure la plus visible du synchrotron. Les électrons vont alors y circuler dans le vide, à une énergie plus ou moins constante, pendant environ 12 heures.

L'anneau de stockage possède à la fois des sections droites et des sections courbes. Le long de leur trajectoire, les électrons vont rencontrer différents types d'aimants. Les aimants de focalisation, placés dans les sections droites de l'anneau de stockage, vont servir comme leur nom l'indique à focaliser le faisceau d'électrons, pour que ce dernier soit le plus fin possible. Seul un pinceau bien défini d'électrons pourra produire les rayons X extrêmement brillants nécessaires aux expérimentations conduites dans les lignes de lumière.

Les deux autres types d'aimants vont servir à dévier les électrons de leur trajectoire, de manière à leur faire produire de la lumière synchrotron. Les aimants de courbure, placés dans les sections courbes, permettent de dévier les électrons de leur trajectoire initiale de plusieurs degrés. Quant aux ondulateurs, constitués d'un ensemble complexe de petits aimants, ils forcent les électrons à suivre une trajectoire sinusoïdale. Les rayons X émis à chaque nouvelle courbure de la trajectoire s'entrecroisent et interfèrent les uns avec les autres pour générer un faisceau de lumière synchrotron bien plus intense que celui fournis par les aimants de courbure.

Le rayonnement synchrotron émis par les deux types d'aimant (courbure et ondulateur) est envoyé vers l'une des nombreuses lignes de lumière entourant l'anneau de stockage (quarante lignes de lumière dans le cas de l'ESRF). Chaque ligne de lumière comprend une cabine optique, renfermant tous les systèmes permettant de modifier le faisceau de rayons X pour lui donner les caractéristiques nécessaires à l'expérience; une cabine expérimentale ou l'échantillon est exposé, dans un environnement approprié, au faisceau de lumière X (un ou plusieurs détecteurs se chargeant d'enregistrer l'interaction, porteuse d'informations, entre l'échantillon et les rayons X); et enfin une salle de contrôle, qui permet aux expérimentateurs de contrôler l'expérience et de collecter les données.

De part ses propriétés intrinsèques, la lumière synchrotron permet de mener de nombreuses expérimentations, et ce dans des domaines très variés. Ce rayonnement a ici été mis à profit pour réaliser de la micro-imagerie X, plus particulièrement des cartes de fluorescence et de la spectrométrie d'absorption des rayons X. Ces mesures reposent sur la détermination de l'absorption de rayons X. Le flux transmis à travers l'échantillon peut-être mesuré directement, mais cette technique ne convient que pour des échantillons ultraminces, ou pour des énergies élevées. Pour des énergies plus faibles, des détecteurs mesurent la fluorescence, ou le courant des électrons éjectés du matériau (électrons Augier). Quand le rayonnement X correspond à l'énergie de transition d'un électron depuis un niveau du cœur de l'atome vers un niveau du continuum, on observe un seuil d'absorption. Les énergies sont spécifiques

à une espèce atomique donnée, ce qui permet d'identifier les éléments constituants l'échantillon. L'établissement du spectre d'absorption à proximité du seuil d'absorption (XANES) permet de plus d'obtenir des informations sur l'environnement atomique.

La micro-imagerie X utilisant la lumière synchrotron s'est révélée être une technique de prédilection pour caractériser chimiquement des microfossiles étudiés par microscopie à force atomique. Elle a ici été mise à profit pour rechercher des traces de soufre et cartographier cet élément dans les parois organiques des microfossiles des formations Draken et Gunflint. D'autres éléments intéressants, comme le carbone, peuvent également êtres étudiés par cette technique (Cody et al., 1996; Boyce et al., 2002; Boyce et al., 2003).

Si d'autres techniques, beaucoup moins contraignantes du point de vue de la mise en œuvre, auraient pu être utilisées pour rechercher des traces de soufre dans la paroi organique des microfossiles (microsonde électronique, voir Boyce et al., 2001), la micro-imagerie X synchrotron présente des avantages de taille, qui ont conduit à sa sélection. Ceux-ci sont brièvement rappelés ci-dessous :

Par rapport à la microsonde électronique (EPMA, Electron Probe MicroAnalysis), la micro-imagerie X utilisant le rayonnement synchrotron possède plusieurs avantages. Premièrement, l'imagerie X est non destructive et non invasive, et, excepté le polissage, elle ne requière pas de techniques spéciales de préparation d'échantillons tel que le sectionnement, l'amincissement ou le dépôt de films conducteurs en surface. La sensibilité de détection est d'un ou deux ordres de grandeur plus important que celle de la microsonde électronique, ce qui permet de mesurer et même de cartographier des éléments traces (au seuil du soufre, la limite de détection est de 10 à 100 ppm). Les dommages dus aux interactions des photons avec la matière sont quasiment inexistants pour des éléments de $Z > 11$. Bien que faible (10 microns pour une matrice de silice au seuil du soufre), la pénétration du faisceau est malgré tout supérieure à celle du faisceau d'électrons d'une microsonde, ce qui rend possible l'étude de structures inclues dans la masse. Enfin, la résolution spatiale au seuil du soufre est approximativement comprise entre 100 et 300 nm, à comparer au micron de résolution effective de la microsonde électronique.

Enfin, l'imagerie X permet d'obtenir des informations sur l'environnement immédiat de l'élément étudié. Seul le XANES du soufre a été abordé au cours de cette étude. Contrairement au XANES du carbone qui nécessite une déminéralisation de l'échantillon par des acides minéraux et la réalisation de lame ultramince de 100 nanomètres d'épaisseur (Cody et al., 1996; Boyce et al., 2002; Boyce et al., 2003), le XANES du soufre peut-être réalisé directement sur des lames minces de roche. La détection de la fluorescence au seuil du soufre est effectuée en réflexion, ce qui élimine les contraintes d'épaisseur maximale nécessaires pour les mesures en transmission.

Dispositif expérimental : la ligne de lumière ID21 de l'ESRF

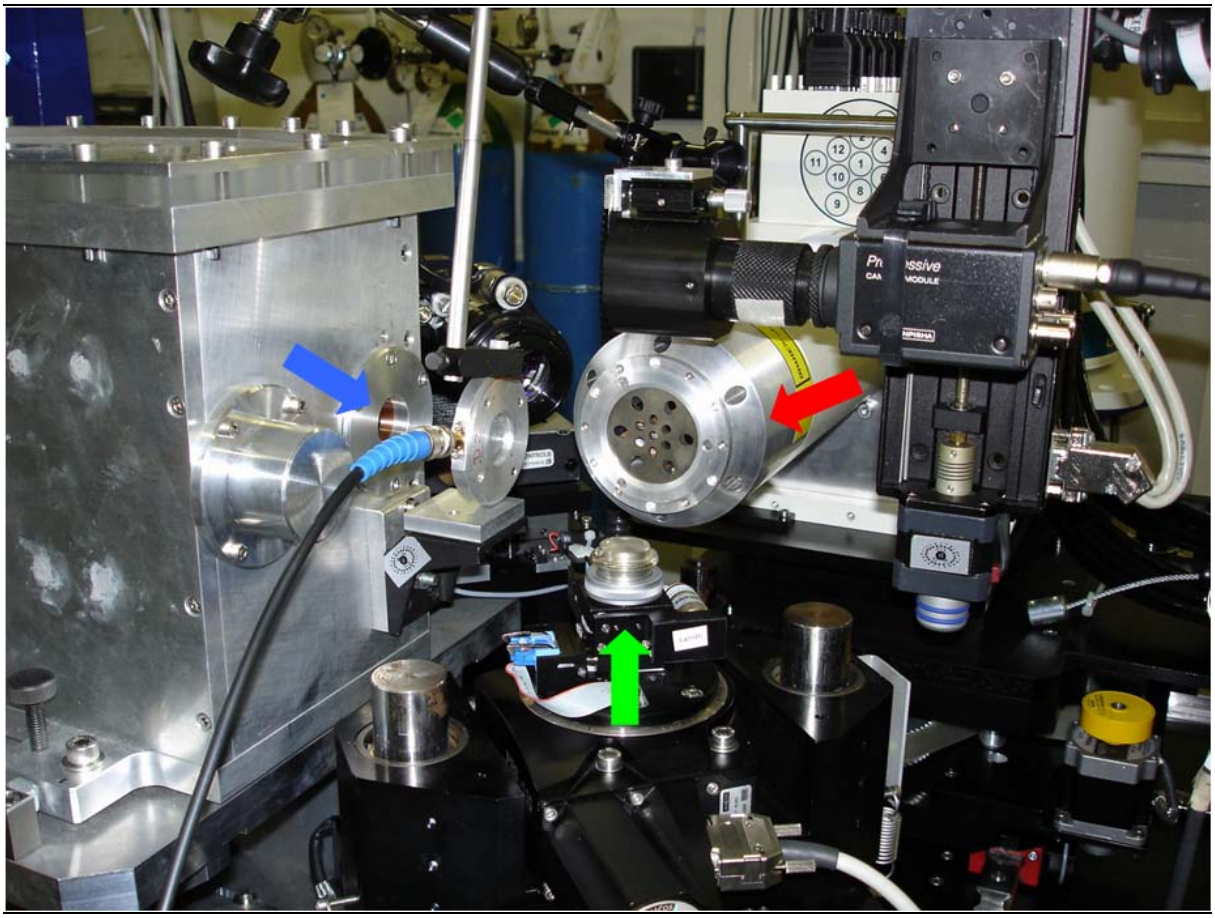


figure 23. Les détecteurs (situés dans la cabine d'expérimentation) de la ligne de lumière ID22, adjacente à la ligne de lumière ID21. La flèche bleue indique l'arrivée du faisceau X, la flèche verte la platine porte-échantillon et la flèche rouge le détecteur. L'énergie du faisceau X étant bien supérieure à celle d'ID21 (jusqu'à 72 keV), les mesures peuvent être réalisées à l'air, alors que le vide est nécessaire pour ID21.

La ligne ID21 de microscopie X de l'ESRF comprend deux microscopes, un microscope à balayage (SXM) et un microscope à transmission plein champ (TXM). Ces deux instruments sont alimentés par un ondulateur.

Le microscope à balayage (SXM) est conçu pour être employé sur une gamme relativement large d'énergie, allant de 0,2 keV à 8 keV, ce qui permet d'accéder au seuil d'absorption d'une large gamme d'éléments (seuil K du phosphore au fer). De part sa grande résolution spatiale (0,5 microns) et spectrale (0,5 eV), il excelle particulièrement dans la microspectrométrie au seuil du soufre (imagerie de fluorescence et balayage en énergie du faisceau primaire de rayons X pour l'imagerie XANES). Le faisceau de rayons X émis par le dispositif d'insertion est focalisé sur une zone inférieure à un micron de diamètre. Les différents signaux résultant de l'interaction des rayons X avec l'échantillon (absorbance, fluorescence) sont détectés avec une résolution spatiale inférieur au micron. Les échantillons sont analysés sous vide.

De son côté, le microscope à transmission (TXM) fonctionne dans un domaine d'énergie plus étroit que celui du microscope à balayage (2,5 keV

à 8 keV). Le faisceau de lumière X est envoyé sur l'échantillon et un objectif à haute résolution spatiale grossit l'image sur un détecteur. Le microscope a été conçu pour prendre une image entière d'un échantillon sur un temps très court (de la seconde à la minute), avec une très haute résolution spatiale, typiquement en dessous de la centaine de nanomètres. En dehors de l'imagerie de contraste, le TXM offre des possibilités de microspectrométrie pour la cartographie d'éléments et le XANES.

Durant les expérimentations conduites à l'ESRF, nous avons exclusivement utilisé le microscope à balayage SXM. Sur cet instrument, un ensemble de deux miroirs parallèles en silicium réfléchissant les rayons X dans le plan horizontal avec un angle d'incidence de 8 mrad sont utilisés pour éliminer les harmoniques. Le balayage en énergie est réalisé par un monochromateur à deux cristaux possédant une résolution spectrale de 0,5 eV. Les rayons X sont focalisés par une lentille de Fresnel en tantale, qui produit un spot de taille submicrométrique avec un flux de photons de 4.10^8 photons s^{-1}. La surveillance de l'intensité du faisceau entrant, qui est essentiel pour normaliser les spectres XANES et corriger les fluctuations de l'intensité du faisceau au niveau des images, est effectuée par une photodiode placée dans le faisceau. Dans cette configuration, l'instrument a été utilisé pour acquérir des cartes de microfluorescence au seuil d'énergie du fer (7112 eV) et au seuil d'énergie du soufre (2472 eV).

Le microscope à balayage SXM de la ligne de lumière ID21 a d'abord été utilisé en mode non focalisé, en utilisant une ouverture circulaire de 200 microns, pour acquérir des spectres de références grâce à un jeu de standards possédant différents états d'oxydation du soufre. Toutes les énergies ont été mesurées par rapport à la position de la ligne blanche (pic de transition s->p) du spectre au seuil K du soufre du sulfate de calcium, assigné arbitrairement à une énergie de 2482,5 eV. Les composés de référence (Sigma) utilisés sont les suivants (tableau 2) : sulfure inorganique (pyrite), thiol (glutathion), alkyl-monosulfure (méthionine), alkyl-disulfure (cystine), aryl-monosulfure (poly-phénylène sulfure), aryl-disulfure (phénylène sulfure), sulfure hétérocyclique (dibenzothiophène et thianthrène) et sulfate ($CaSO_4$). Ces composés de référence ont été utilisés à la fois pour la calibration en énergie du monochromateur, et comme références pour l'identification des composés soufrés au niveau des échantillons. Pour la détermination de la spéciation du soufre, un balayage en énergie compris entre 2540 eV et 2530 eV, avec des pas de 0,2 eV, a été réalisé.

L'étude des microfossiles est réalisée en mode focalisé. Dans ce mode, une lentille diffractive est déplacée le long du faisceau durant le balayage en énergie pour compenser les changements de focale, qui dépend de l'énergie, et pour maintenir l'échantillon au point. Les cartes de composition élémentaire sont obtenues en balayant point par point l'échantillon. Avant la cartographie à haute résolution spatiale et l'utilisation de temps de comptage long (pas de 0,5 à 2 microns, temps de

comptage de 2 à 5 secondes), des cartes basse résolution à faible temps de comptages sont effectuées pour sélectionner les objets les plus prometteurs dans une zone d'environ 100 microns carrés. Les photons de fluorescence émis par l'échantillon sont collectés par un détecteur au germanium (Princeton Gamma-Tech). Pour chaque pixel de l'image, la totalité du spectre de fluorescence est enregistré, ce qui permet la reconstitution de cartes donnant la distribution de différents éléments présents dans l'échantillon.

Pour vérifier que la photoréduction est un processus négligeable, des spectres XANES sont obtenus en sommant les spectres collectés avec des temps de comptage faibles. Chaque spectre XANES est traité comme suit : le spectre est d'abord corrigé de la valeur I0, qui représente l'intensité du faisceau avant que ce dernier n'arrive sur l'échantillon. Cela permet de compenser la lente décroissance de l'intensité du faisceau d'électrons dans l'anneau de stockage au cours du temps, ainsi que des fluctuations rapides d'intensité durant l'acquisition. La région située avant le pic est fittée par une ligne droite qui est soustraite en temps que ligne de base. Cela fixe la région de basse énergie du spectre XANES à une absorbance zéro et redresse le spectre à l'horizontale.

Pour analyser les échantillons des formations Draken et Gunflint, une première carte est d'abord réalisée au seuil d'énergie du fer, de manière à cartographier de nombreux éléments, dont les plus intéressants sont le fer (pyrite), le soufre (pyrite et soufre organique), et le silicium (permettant de repérer «en négatif» la position de la paroi organique). Le microscope est ensuite basculé au seuil du soufre, ce qui permet une cartographie beaucoup plus précise de cet élément, ainsi que sa quantification. Des spectres XANES sont ensuite acquis au niveau des régions intéressantes contenant du soufre (minéral ou organique). De manière à obtenir les meilleurs spectres possibles, et étant donné la faible quantité de soufre organique détecté dans les parois des microfossiles, cette mesure, effectuée en mode point, est réalisée dans les régions présentant les plus fortes concentrations (paroi épaisse, ou zone de jonction entre deux parois). Le problème ne se pose pas pour acquérir des spectres sur les cristaux de pyrite, qui sont suffisamment larges.

Pour développer une technique d'analyse du soufre semi-quantitative, un étalon épais (3 mm) contenant de multiples éléments (NIST SRM 620 Soda Lime, Flat) a été utilisé comme matériau de référence. Ce standard a été choisi pour sa ressemblance chimique avec la matrice siliceuse dans laquelle sont inclus les microfossiles de la formation Draken et Gunflint, et s'est révélé être dans la pratique un choix très judicieux. La concentration en soufre est de 0,28% en poids de SO_3 avec une incertitude de 0,02 %. La composition de ce verre est la suivante : SiO_2 72,08 ± 0,08; Na_2O 14,39 ± 0,06; CaO 7,11 ± 0,05; MgO 3,69 ± 0,05; Al_20_3 1,8 ± 0,03; K_2O 0,41 ± 0,03; SO_3 0,28 ± 0,02; As_2O_3 0,056 ± 0,003; Fe_2O_3 0,043 ± 0,004; TiO_2 0,018 ± 0,002 %.

Les spectres obtenus ont été traités par un programme de l'ESRF (PYMca) permettant une analyse non linéaire des moindres carrés. Le pic K est normalisé d'après les valeurs d'intensité du faisceau. Les spectres de référence des parois cellulaires et de la matrice minérale sont obtenus soit en moyennant des spectres collectés à des positions bien précises après une cartographie cellulaire, soit en moyennant après les mesures des spectres intéressants extraits d'une carte construite avec le logiciel de l'ESRF Artemis.

Préparation des échantillons pour la microscopie X à balayage

Les mesures ont été effectuées à partir de lames minces de roches préalablement étudiées par les autres techniques (microscopie optique, microscopie à force atomique, microspectrométrie Raman), et soumise à l'attaque acide. Dans le cas de la microscopie à force atomique, l'attaque acide est indispensable pour exposer les parois organiques des microfossiles. Dans le cas de l'imagerie X, l'attaque acide est surtout mise à profit pour éliminer la contamination de surface qui ne manque pas de se produire, surtout si les échantillons sont conservés dans des boites en bois ou en plastique (figure 52 page 184). L'acide fluorhydrique utilisé ne contenait que des traces de soufre (Riedel de Haën, SO_3 0,0002 %, SO_4 0,0002 %). Cependant, de manière à vérifier que ce réactif n'est pas responsable de l'incorporation de soufre au niveau des parois organiques des microfossiles durant l'attaque acide, des tests ont été réalisés avec des échantillons non attaqués.

Les portes échantillons de la ligne de lumière ID21 ne permettant pas de monter des lames minces entières, ces dernières ont du être découpées à la scie à diamant, pour produire des petits fragments carrés d'environ un centimètre de côté, le microfossile intéressant étant idéalement situé au centre de ce dernier.

Même si elle est réalisée avec beaucoup d'attention, la découpe à la scie des lames minces de roches fait subir certains dommages aux échantillons. Si l'échantillon a été attaqué à l'acide fluorhydrique, les vibrations lors de la découpe peuvent déloger une multitude de cristaux de quartz micrométrique, ce qui augmente en retour la rugosité de surface. Un lavage intensif pourra faire partir certains de ces cristaux, mais d'autres continueront d'adhérer à la surface. La découpe doit donc être effectuée après les mesures par microscopie à force atomique, qui risquent sinon d'être particulièrement délicates.

Durant la découpe, la lame de verre qui supporte la lame mince de roche peut également avoir tendance à se fendiller. Une fois la découpe réalisée, l'observation des microfossiles en lumière transmise peut devenir problématique, étant donné que les multiples défauts créés par la découpe de la lame de verre entraînent des réflexions parasites. L'image obtenue au microscope optique est floue, et certains détails très fins peuvent devenir invisibles. Comme dans le cas de la microscopie à force atomique,

l'étude au microscope optique doit être complétée avant la découpe. Les petits fragments de lames minces sont posés sur des portes échantillons spéciaux réalisés en plastique ultrapur (Peek, un matériau libre de toutes traces de fer et de soufre) par les ateliers techniques de l'ESRF, et fixés avec un scotch double face adapté.

La profondeur de pénétration des rayons X au seuil du fer et du soufre étant inférieur à 30 microns, la lame de verre supportant la lame mince de roches ne peut pas interférer avec la mesure. Cependant, des mesures ont également été réalisées avec les coupes ultraminces préparées par la technique du FIB. Dans ce cas, un porte échantillon spécial, possédant des logements pour les grilles de cuivre, est utilisé. La face inférieure du porte échantillon est d'abord recouverte d'ultralène, un polymère totalement transparent aux rayons X. La grille est ensuite délicatement déposée dans son logement, avant d'être recouverte d'un autre film d'ultralène. Les portes échantillons étant montés en position verticale sur le microscope, ces films empêchent la petite grille de quitter son logement. Le risque que la coupe ultramince quitte le film carboné de la grille de cuivre pour aller se coller sur le film d'ultralène n'est pas nul, surtout lors de la phase de démontage des échantillons. Cependant, nous n'avons pas rencontré de problème à ce niveau, et les coupes ultraminces ont pu être récupérés sans problème après les mesures.

Les standards pour le XANES sont quant à eux finement réduit en poudre dans un mortier, et placés entre deux feuilles d'ultralène. Le standard utilisé pour la quantification du soufre (NIST SRM 620 Soda Lime, Flat) est simplement monté sur les porte-échantillons avec le scotch double face.

La ligne ID21 est équipée d'une petite caméra fonctionnant en transmission et réflexion, qui permet de localiser aisément le cercle tracé avec l'objectif indenteur (M25 Leica) autour de chaque microfossile. Cependant, si les microfossiles de la formation Draken sont directement visibles, il n'en est pas de même pour les cellules de la formation Gunflint. De plus, le fendillement de la lame de verre supportant la lame mince de roche lors de la découpe nécessaire au montage des échantillons (voir ci-dessous) rend les images floues, ce qui ajoute à la difficulté de localiser une cellule donnée.

Pour rendre la phase de localisation la plus sure possible, seuls les microfossiles présentant, dans leur voisinage immédiat (quelques dizaines de microns), des cristaux de pyrite affleurant en surface ont été sélectionnés. Ces cristaux, de part leur taille, leur forme, et leur position relative, sont utilisés comme marqueur pour s'assurer que le microfossile souhaité est bien présent dans le champ de vision de l'instrument. La technique de localisation consiste à réaliser une première carte au seuil d'énergie du fer, avec un temps d'intégration court (une seconde par pixel), de manière à faire ressortir les pyrites qui servent alors de marqueurs topographiques.

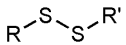
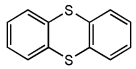
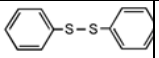
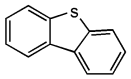
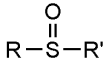
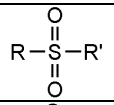
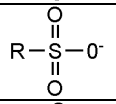
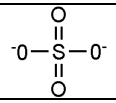
Forme du soufre	Formule	Etat d'oxydation	Composé utilisé	Energie de la ligne blanche (pic)	
				(1)	(2)
Soufre élementaire	S	0			
Sulfure inorganique	S_2^{2-}	-1	Pyrite	2472,0 eV	
Thiol		+ 0,5	Glutathione	2473,2 eV	
Alkyl-monosulfure		+ 0,5	Methionine	2473,3 eV	
Alkyl-disulfure		+0,2	Cystine	2472,6 eV	
Aryl-monosulfure		+ 0,5	Poly-phenylène sulfure (PPT)		
		+ 0,5	Thianthrène		
Aryl-disulfure		+ 0,2	Phenylène sulfure		
Thiophène		+ 1	Dibenzothiophène (DBT)		
Sulfoxydes		+ 4			2475,8 eV
Sulfone		+ 5			2480,2 eV
Sulfonates		+ 6			2481,3 eV
Sulfates (référence)		+6	Sulfate de calcium $CaSO_4$	2482,6 eV	2482,5 eV

Tableau 2 : Energies des lignes blanches pour le soufre présent dans différents composés réduits (1) analysés avec la ligne de lumière ID21 de l'European Synchrotron Radiation Facility. Les valeurs pour les composés oxydés (2) sont tirées de la littérature (Prietzel et al., 2003).

Les cherts de la formation Draken

Abondants, divers et superbement bien préservés, les microfossiles de la formation Draken présentent un grand intérêt pour l'étude de la vie au Précambrien, et constituent par la même d'excellents microfossiles de référence pour une étude méthodologique comme celle qui est menée ici avec la microscopie à force atomique. Le contenu fossilifère de la formation Draken est également remarquable au sens où il a permis l'étude de la distribution microbienne et des hétérogénéités écologiques au sein d'un environnement unique du Précambrien (Knoll, 1982; Knoll et al., 1991; Knoll et al., 1993).

Les échantillons étudiés dans le cadre de ces travaux proviennent du Spitsbergen, une île située au nord de la Norvège, et qui constitue la principale masse rocheuse de l'archipel du Svalbard. Celle-ci, qui était rattachée au Groenland à l'époque de sa formation, était située sous les tropiques, et s'est ensuite déplacée vers les pôles durant le paléozoïque et le mésozoïque, pour atteindre sa latitude actuelle il y a environ 100 millions d'années. Avec l'ouverture de l'océan atlantique, elle finit se détacher de sa contrepartie groenlandaise (Knoll, 1982).

Les roches de la formation Draken se sont déposées en bordure d'une mer tropicale il y a 700 à 800 millions d'années, dans un environnement lagunaire soumis à des tempêtes occasionnelles. Au Spitsbergen, elles sont parfaitement exposées, et ont subi une altération très faible. Il n'est pas certain qu'elles aient été aussi bien conservées si la masse rocheuse était restée à plus basse latitude (Knoll, 2003).

Stratigraphie

Les roches pré-calédoniennes de l'archipel du Svalbard sont considérées comme appartenant à la séquence Hecla Hoek. Dans la région ouest du Spitsbergen, les terrains sont métamorphisés et structurellement complexes, ce qui n'est pas le cas au niveau de la région centrale de l'île (Knoll, 1982). Quatre groupes distincts ont été identifiés : une séquence basale dominée par des sédiments détritiques (groupe de Veteranen) et surmontée par des dépôts épais de carbonates (groupe d'Akademikerbreen, auquel appartient la formation Draken). Une séquence caractérisée par des tillites et des micrites riches en matière organique recouvre ensuite les carbonates (groupe de Polarisbreen), avant de laisser place à une séquence composée de quartzite et de carbonates (groupe d'Oslobreen) contenant des fossiles cambriens et ordoviciens (Knoll, 1982).

La formation Draken constitue une formation distincte à l'intérieur du groupe d'Akademikerbreen, d'une épaisseur de 150 mètres à 250 mètres (Knoll et al., 1991). Les strates rocheuses sont largement dolomitiques (doloarénites, dolorudites, dolomicrites), avec ici et là des intercalations de quartzite et de silice. Les stromatolithes, les oolites et les pisolites sont

fréquentes, et comme l'indique le nom complet de la formation, les conglomérats abondent.

L'existence de stromatolithes indique que la profondeur d'eau ne devait pas dépasser 18 mètres, profondeur au-delà de laquelle les rayons du soleil ne peuvent plus atteindre le fond. Les roches de la formation Draken ont été déposées durant l'un des niveaux marins le plus bas du groupe Akademikerbreen. Les dolomicrites marquent le dépôt d'une boue carbonatée («whiting», précipitation instantanée et massive de très fins cristaux de carbonates autour de nucleus) au sein d'un lagon protégé (Knoll et al., 1991; Fairchild, 1991).

L'âge de la formation Draken, déterminée par des méthodes biostratigraphiques et chemostratigraphiques, serait d'environ 700 à 800 millions d'années (Knoll, 1982; Knoll et al., 1991).

Cherts

Les microfossiles de la formation Draken sont emprisonnés dans des éclats de cherts, une roche sédimentaire dure composée d'une multitude de cristaux de quartz de très petite taille (de 100 nm à quelques microns), étroitement imbriqués les uns dans les autres. Les cherts peuvent exhiber une grande gamme de couleur, depuis un gris clair jusqu'au noir foncé, en passant par le rouge ou le vert. Les cherts fossilifères sont généralement noirs. Bien que cette coloration soit souvent due à une abondance de matière organique, elle peut aussi refléter la nature crypto cristalline de la roche.

Les cherts sont des roches très dures qui résistent relativement bien aux ravages de l'érosion. De plus, leur résistance les protége de la déformation tectonique, mais seulement jusqu'à un certain niveau de pression (ainsi les cherts de la formation d'Isua au Groenland – datée à 3,7-3,8 milliards d'années - sont déformés). Les cherts sont également relativement imperméables, ce qui soustrait leur contenu de l'influence de fluides extérieurs. Ils constituent donc des roches de choix pour la recherche de microfossiles, qui peuvent ainsi être parfaitement préservés pendant des milliards d'années. Grâce à la grande résistance mécanique des cherts, les microfossiles préservés dans ces roches ne sont généralement pas déformés, et sont donc conservés en 3 dimensions, contrairement aux microfossiles aplatis que l'on retrouve dans des roches plus malléables et ductiles comme les schistes argileux.

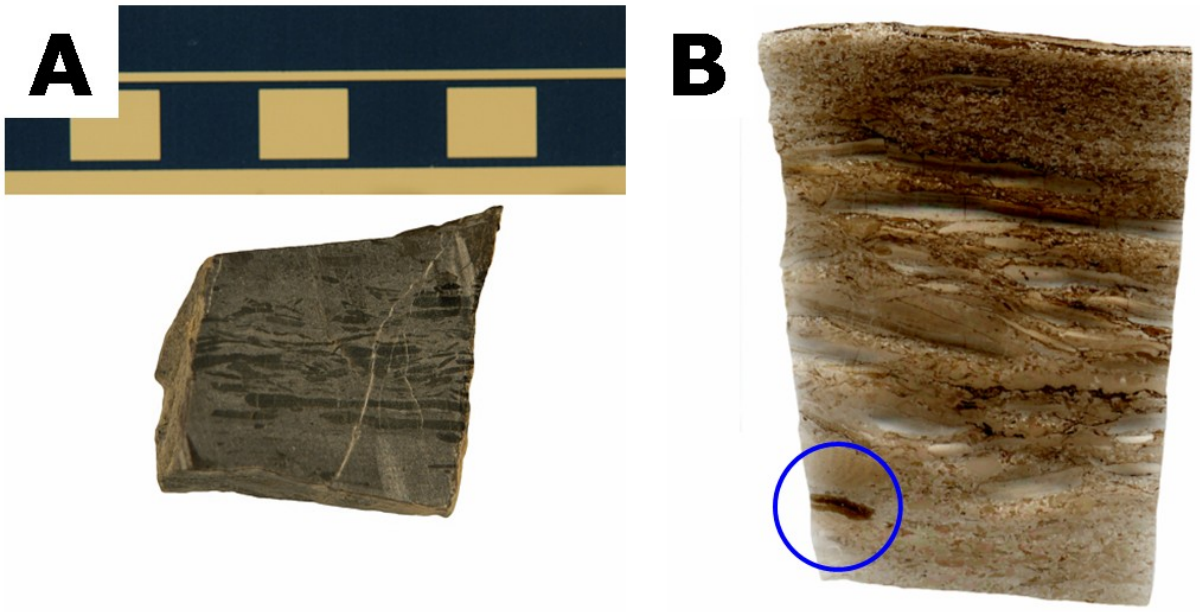


figure 24. Cherts de la formation Draken. [A] Un fragment de conglomérat de la formation Draken. Les clasts horizontaux situés au centre de la face polie contiennent de nombreux microfossiles (échelle : un carreau égal un centimètre). [B] Lame mince taillée dans les conglomérats de la formation Draken. Un clast siliceux fossilifère brun est bien visible en bas à gauche (cercle bleu).

Dans les roches de la formation Draken, les cherts forment des petits nodules noirs dispersés au sein de lits carbonatés (figure 24 page 96), bien qu'ils puissent aussi donner naissance à des moulages internes de microfossiles en forme de vase ou de filaments microbiens, ou des micronodules nucléés sur des particules de matières organiques (Knoll et al., 1991). De quelques centimètres de longueur à généralement moins d'un centimètre de hauteur, les éclats de cherts sont associés à une matrice composée de clasts dolomicritique plus ou moins arrondis, et de taille variable (de 100 microns à une dizaine de millimètres). Les clasts dolomicritiques sont souvent entourés par une auréole diagénétique (10 à 15 microns d'épaisseur) de cristaux de carbonates. De larges cristaux de dolomites automorphes sont communs dans les interstices, tout comme un ciment siliceux (Knoll, 1982). Certains clasts dolomicritiques ont été remplacés par de la silice diagénétique très peu de temps après le dépôt, et les nodules de cherts noirs sont eux-mêmes des fragments de mats microbiens silicifiés (Knoll, 1982).

Les nodules de cherts noirs se sont formés dans le sédiment, et non pas directement au niveau du plancher océanique, comme c'est probablement le cas pour les cherts de la formation Gunflint décrits ci-dessous. Il est effectivement souvent possible d'observer des laminations qui traversent à la fois les nodules siliceux et les carbonates situés aux alentours (Knoll, 1982). Les nodules montrent également des textures typiquement associées à des carbonates (oolithes, mats microbiens, etc.). Des

courbures, ainsi que des perturbations au niveau des laminations dues à la charge de sédiments prouvent que les fragments de mats étaient encore relativement flexibles lors de la formation du conglomérat (Knoll, 1982). Dans la plupart des cas, les nodules siliceux se sont formés par des processus diagénétiques précoces très peu de temps après le dépôt, avant la compaction provoquée par l'enfouissement (Knoll, 2003).

Les mats microbiens préservés au niveau des nodules de cherts noirs se sont probablement formés dans un environnement subtidal, au sein d'une étendue d'eau peu profonde et calme, probablement un lagon séparé de la mer par une barrière récifale, et quelque peu confiné (comme le prouve l'absence d'acritarches planctoniques caractéristiques d'espaces ouverts) (Knoll, 1982). Des tempêtes occasionnelles arrachaient des fragments de mats, qui étaient ensuite transportés sur une faible distance avant de se déposer avec les clasts dolomicritiques (Knoll, 1982). Des périodes calmes et des périodes turbulentes ont du se succéder de nombreuses fois durant le dépôt des conglomérats. L'arrêt rapide de la dégradation de la matière organique, vraisemblablement causée par une baisse rapide de la concentration en oxygène dans le sédiment, ainsi qu'un enfouissement rapide lié aux tempêtes et une silicification précoce, ont contribué à la préservation exceptionnellement des microfossiles pétrifiés dans les roches de la formation Draken (Knoll, 1982).

Au sein de la formation Draken, les microorganismes sont distribués de manière aléatoire, dans les clasts siliceux, des carbonates et des schistes. Seuls les microfossiles préservés dans les cherts ont été étudiés dans le cadre de cette thèse. Le fait que les plus beaux spécimens de microfossiles soient situés dans des clasts redéposés complique quelque peu les interprétations paléoenvironnentales. Cependant, dans la partie supérieure de la formation, des carbonates silicifiés ont préservés un enregistrement *in-situ* des communautés microbiennes, ouvrant ainsi une clé pour l'interprétation des différents types de clasts dispersés dans la formation, et leur positionnement le long du gradient supratidal/subtidal (Knoll et al., 1991). Cinq biofaciès distincts, correspondant à autant d'environnements, ont été identifiés (Knoll et al., 1982).

Les cherts formés dans la zone supratidal contiennent généralement une seule espèce dominante, éventuellement accompagnée d'une ou deux espèces secondaires (plus l'environnement est hostile, plus le nombre d'espèces diminue). Ces assemblages monospécifiques se retrouvent aujourd'hui dans certaines régions comme les Key West, les Bahamas, le golfe persique ou la côte ouest de l'Australie (Knoll, 2003). Il faut cependant noter que cette faible diversité biologique peut aussi être le reflet d'une dégradation post-mortem différentielle (Knoll, 1982).

En allant vers l'océan, la diversité biologique augmente de manière remarquable (Knoll, 1991). Les schistes noirs, accumulés dans la zone subtidale calme située au-delà de la barrière récifale, renferment des cyanobactéries, mais aussi des microorganismes eucaryotes de formes

variées (structures en forme de vase, cellules ornementées de spicules), ainsi que des algues multicellulaires.

Pour la formation Draken, en allant de la zone supratidale vers la zone submergée en permanence, on observe donc une augmentation de la diversité microbenthique, une augmentation de l'abondance et de la diversité des éléments allochtones (planctoniques), ainsi qu'une diminution de l'épaisseur des enveloppes, phénomène ayant de sérieuses conséquences taphonomiques, les enveloppes fines étant vulnérables à la dégradation (Knoll et al., 1991).

Stromatolithes

La plupart des microfossiles étudiés durant ces travaux (figure 25 page 101) étaient associés à des textures stromatolithiques, présentées brièvement ci-dessous.

Les stromatolithes sont des structures organo-sédimentaires, le plus souvent finement stratifiées, visibles à l'œil nu et souvent carbonatées, produites par l'activité de communauté bactériennes sécrétant des mucilages, ces communautés étant la plupart du temps constituées par des bactéries filamenteuses capables d'effectuer la photosynthèse tels que les cyanobactéries. D'autres espèces, comme des bactéries photosynthétiques ou hétérotrophes anaérobies, et dans certains cas des cellules eucaryotes (algues, cryptogames) peuvent aussi être présentes (Knoll, 1982). Dans les stromatolithes récentes, les différentes lamines sont organisées le long d'un gradient décroissant d'oxygène et de lumière (Knoll, 1982).

En ce qui concerne les stromatolithes de la formation Draken, les seuls micro-organismes préservés sont les cyanobactéries, ainsi que quelques espèces allochtones (cellules planctoniques transportées par les courants et déposées au niveau des mats, la plupart du temps dans la zone subtidale, plus rarement dans les zones intertidales et supratidales), ainsi que des espèces qui vivent au sein du microenvironnement de surface, mais qui ne contribuent pas à l'érection du stromatolithe. Les espèces situées dans les couches plus profondes, les bactéries photosynthétiques et les hétérotrophes anaérobies, ne sont pas préservées, ou n'ont pas été détectées par microscopie optique à cause de leur petite taille (Knoll, 1982).

Dans les secteurs hostiles tels que la zone supratidale (dessiccation, salinité très variable), les cyanobactéries secrètent une enveloppe polysaccharidique très résistante, qui se fossilise extrêmement bien (contrairement à la cellule elle-même qui a tôt fait de disparaître) et qui joue un rôle important dans la tolérance du microorganisme à la dessiccation et à l'irradiation solaire.

Même si l'orientation spatiale et la densité peuvent permettre de reconnaître, au sein d'un stromatolithe fossile, les constructeurs, leur

identification peut cependant être délicate, voire impossible (Knoll, 1982). La distinction entre les espèces opportunistes et les cellules allochtones planctoniques peut également être ardue, même si le problème peut parfois être résolu en étudiant la distribution spatiale des cellules (Knoll, 1982). Les cellules allochtones se rencontrent ainsi dans des fragments non stromatolithiques, ce qui n'est pas le cas des espèces opportunistes. De plus, ces dernières sont souvent de formes sphériques, et révèlent peu de chose quant à leur reproduction (pas de figures de division) (Knoll, 1982).

L'assemblage fossilifère de la formation Draken

Vingt huit espèces différentes ont été initialement décrites par Knoll dans les conglomérats de la formation Draken (Knoll, 1982). Cinq ont été identifiées comme étant des cyanobactéries (trois constructeurs principaux, et deux secondaires) et six comme des espèces opportunistes. Neuf espèces ont été identifiées avec certitude comme étant planctoniques. Trois autres espèces sont probablement planctoniques (Knoll, 1982). D'autres taxas ont été ajoutés à cette liste qui comprend désormais 42 taxas (Knoll et al., 1991).

Comme dans beaucoup d'assemblages fossilifères protérozoïques, la majorité des microfossiles benthiques présents dans les cherts de la formation Draken se sont révélés être des cyanobactéries. Les éclats siliceux montrent un réseau de filaments très serrés, interprétés comme étant des enveloppes polysaccharidiques de cyanobactéries filamenteuses (Knoll, 2003). La plupart des cyanobactéries emprisonnées dans les cherts de la formation Draken possèdent une morphologie, un cycle de vie et une physiologie comparable à celles d'espèces modernes (Knoll, 2003).

Comme décrit plus haut, il est pratiquement certain que d'autres organismes, tels que des bactéries photosynthétiques anaérobies, des bactéries hétérotrophes ou des bactéries méthanogènes, aient vécu en association avec ces cyanobactéries, mais on n'en retrouve aucune trace, peut-être parce qu'elles ont disparu, ou qu'elles sont trop petites pour être détectées en microscopie optique. La population de microorganismes préservés dans les cherts de Draken ne représente donc qu'un échantillon limité des microorganismes qui vivaient sur ces rivages protérozoïques (Knoll, 1982; Knoll, 1991).

Parmi les microorganismes planctoniques, le genre *Myxococcoides* domine (ce dernier pouvant à la fois représenter soit des cyanobactéries, soit des algues nucléés). Ces cellules, isolées ou en groupe, sont distribuées aléatoirement dans les différents types de mats microbiens, ainsi que dans les dolomicritiques ne présentant pas de textures stromatolithiques (Knoll, 1982). Pour la plupart, il n'est pas possible de conclure quant à la nature de la cellule (procaryote ou eucaryote), alors que la plus grande majorité des espèces benthiques sont clairement procaryotes. De plus, aucune

cyanobactérie n'a pu être identifiée de manière certaine parmi la population de microorganismes planctoniques (Knoll, 1982).

Aucun biomarqueur moléculaire pertinent n'a pour l'instant été identifié dans les cherts de la formation Draken (Knoll, 2003). Le fractionnement isotopique du carbone est d'environ -28 ‰, une valeur typique de l'activité photosynthétique, et celui du soufre (mesuré sur la pyrite) indique également l'influence de la sulfato-réduction (Knoll, 2003).

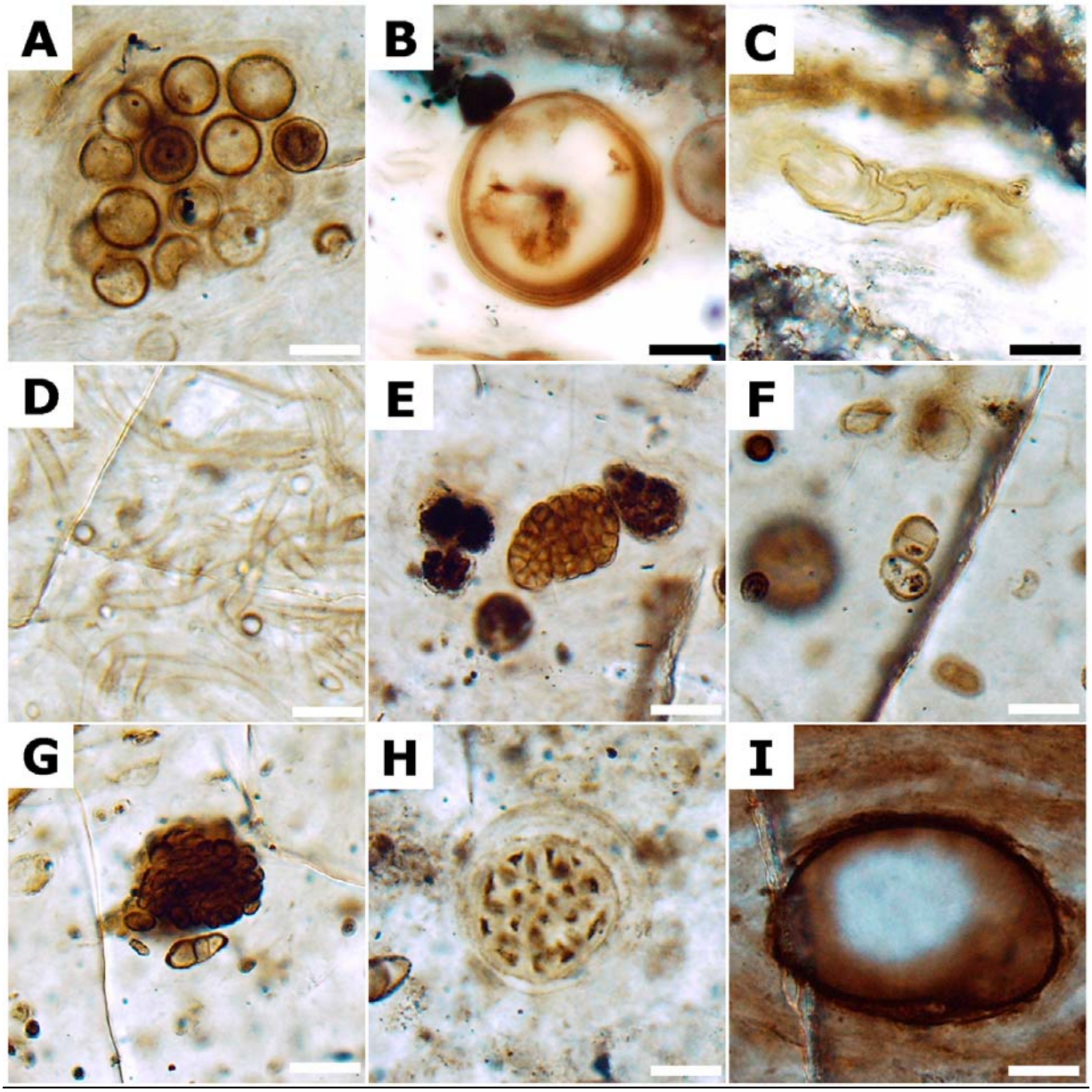


figure 25. Vues au microscope optique à transmission de quelques microfossiles de la formation Draken. [A] Un groupement de cellules sphériques de *Myxococcoides* (échelle : 20 microns). [B] Une cellule de *Polybessurus bipartitus*. On distingue nettement la paroi, ainsi que plusieurs lamines correspondant à des couches de polysaccharides extracellulaires (échelle : 20 microns). [C] Structure mucilagineuse appartenant à *Polybessurus bipartitus* (échelle : 20 microns). [D] Filaments entrelacés de *Siphonophycus* (échelle : 20 microns). [E] Un amas cellulaire de *Synodophycus* (échelle : 20 microns). [F] Une paire de cellules de *Gloeodiniopsis* en division (échelle : 20 microns). [G] Un amas cellulaire dont l'identité taxonomique n'a pu être déterminé avec certitude (échelle : 20 microns). [H] Structure organique dont l'identité taxonomique n'a pu être déterminé (échelle : 20 microns). [I] *Trachyhystrichosphaera*, un acritarche de grande dimension (échelle : 20 microns).

Les cherts de la formation Gunflint

A l'image des microfossiles de la formation Draken, qui comptent parmi les cellules les mieux préservées du Précambrien, les microfossiles de la formation Gunflint occupent une place spéciale en micropaléontologie précambrienne. Historiquement parlant, il s'agit des premiers microfossiles du Précambrien à avoir été décrits.

Cette formation a été abondamment étudiée durant les cinquante dernières années, et les microfossiles qu'elle contient ont été décrits de manière méticuleuse par de nombreux micropaléontologistes. Cette communauté de microfossiles filamenteux et sphériques extrêmement bien conservés au vu de leur grand âge (2 milliards d'années) est considérée comme étant d'une importance paléontologique majeure, et compte parmi les assemblages fossilifères les plus diversifiés du Précambrien. Les principaux centres d'intérêt de cette formation sont :

- Une excellente datation géochronologique.

- Des lithologies différentes et variées.

- Un métamorphisme régional faible à négligeable le long de la majorité de l'affleurement, et un métamorphisme de contact restreint autour de dikes et de sills.

- Une stratigraphie connue avec précision, due en partie à des affleurements courants sur une large région.

- Un assemblage complexe et varié de microfossiles souvent très bien préservés.

Le choix de la formation Gunflint comme référence pour une étude méthodologique tel que celle menée ici était donc évident.

Stratigraphie

La géologie régionale de la formation Gunflint est connue depuis les rapports de Broderick (1920) et Gill (1924), mais l'un des traits les plus marquants de cette formation, sa nature cyclique, ne sera mis en évidence qu'en 1956 par Goodwin. La formation Gunflint est l'un des trois membres du groupe Animikie. Elle est située entre les conglomérats de Kakabeka et les schistes de la formation Rove.

En tant que séquence de bassin, la formation Gunflint est peu épaisse et relativement continue, depuis le lac de Gunflint à la frontière entre le Minnesota et l'Ontario jusqu'à sa disparition au niveau du lac supérieur dans la zone de Schreiber Beach à 275 kilomètres de distance. Son épaisseur varie de 100 à 180 mètres, pour une valeur moyenne de 122 mètres (Goodwin, 1956, Fralick et al., 2002). Sa nature (lacustre, marine, hydrothermale) continue d'être débattue. L'hypothèse la plus communément admise est que la formation Gunflint s'est déposée dans un environnement côtier orienté vers le sud (Awramik et Barghoorn,

1977; Fralick et al., 2002), au niveau d'un bassin marin (Barghoorn et al., 1977). Contrairement aux interprétations de certains auteurs (Randazzo et Markun, 1980), l'environnement de Gunflint ne semble pas avoir présenté de conditions évaporitiques (Sommers et al., 2000).

La formation Gunflint est découpée en quatre membres : le conglomérat basal (appelé parfois Kakabeka Conglomerate), le lower Gunflint, l'upper Gunflint et l'upper limestone. Les deux membres appartenant réellement à la formation Gunflint furent à leur tour scindés en quatre sous membres, promu depuis au statut de membre à part entière : «algal chert», «tuffaceous shale» (riche en pyrite), «taconite», et «banded chert-carbonate» (Goodwin, 1956).

Goodwin défini deux ensembles sédimentaires (inférieur et supérieur) caractérisés par des séquences de faciès très similaires (Goodwin, 1960). L'ensemble inférieur comprend des cherts algaires à la base, suivi par des cherts-taconite et des cherts carbonatés, et enfin par des grès. L'ensemble supérieur comprend en plus des schistes noirs et des lits de cendres volcaniques. Ces deux ensembles définissent deux épisodes de transgression.

Les cherts du lower algal member sont déposés sur le conglomérat basal, ou directement sur le substratum archéen (Winter et Knauth, 1992). La signification paléo-environnementale du conglomérat n'est pas clair, mais les quartzites Pokegama situées sous la formation Biwabik sont interprétées comme des grès de plateforme continentale ayant subi l'influence de marées (Winter et Knauth, 1992). L'équivalent américain de la formation canadienne de Gunflint est appelé Biwabik Iron Formation. Celle-ci est située entre les Pokegama quartzite et la Virginia Formation (Fralick et al., 2000). La formation supérieure Rove est composée de schistes carbonés et de grès qui possèdent des textures sédimentaires caractéristiques des turbidites. Etant donné que les unités rocheuses adjacentes à la formation Gunflint sont d'origine marine, il est fort probable que cette dernière le soit aussi (Simonson, 1985).

L'âge de la formation Gunflint a été un point de désaccord entre les différents auteurs. En étudiant les rapports K/Ar et Rb/Sr d'un mélange argileux illite-montmorillonite, Hurley et al. (1962) ont estimé l'âge de la formation Gunflint à 1,6 milliards d'années, plus ou moins 70 millions d'années. En affinant cette valeur pour tenir compte de la perte en argon radiogénique (estimée à 15-20 %), ils ont proposé un âge corrigé de 1,9 milliards d'années plus ou moins 200 millions d'années. Même si cette valeur a été revue dans les décennies suivantes, les études les plus récentes ont prouvé qu'elle était tout à fait correcte. L'étude la plus récente a été réalisée par Fralick et al. (2002) sur des zircons extraits de lits volcanoclastiques provenant du membre supérieur de la formation Gunflint. La méthode U/PB a fourni un age de 1878,3 millions d'années ± 1,3 millions d'années.

La formation Gunflint a connu un métamorphisme régional peu élevé, et qui décroît du sud-ouest au nord-est (Goodwin, 1956; Barghoorn et Tyler, 1965). La température maximale atteinte par la formation Gunflint serait comprise entre 100°C et 130°C (Miyano, 1987).

Plusieurs observations suggèrent que la formation Gunflint a été exposée à des conditions thermiques de faible ampleur (Winter et Knauth, 1992) :

- formation relativement peu déformée.

- absence de complexes intrusifs étendus.

- présence de calcédoine et de quartz microcristallin sans preuve d'une recristallisation importante.

- présence de greenalite, qui est le principal silicate de fer (ce dernier est généralement converti en d'autres silicates de fer lors d'un métamorphisme même peu prononcé lié à un enfouissement).

- absence d'altération hydrothermale, de zones de minéralisation ou de zones d'enrichissement supergènes. Winter et Knauth (1992) indiquent qu'il n'y a aucune évidence isotopique, minéralogique, pétrographique, ainsi qu'aucune preuve au niveau du terrain attestant d'une circulation de fluides hydrothermaux au niveau de la formation Gunflint. Sommers et al. (2000) notent cependant les stromatolithes de l'upper algal chert member sont peut-être le résultat d'une activité hydrothermale, et pourraient être en partie abiogéniques.

Le niveau de métamorphisme le plus élevé est situé dans la région du lac Gunflint, là ou les sédiments ont été intrudés par les gabbros de Duluth. Plus à l'est, des épisodes de métamorphisme sont restreints à des intrusions de sills et de dikes d'age Keweenawan (1120 - 1140 millions d'années) (Barghoorn et al., 1977).

Cherts

La plupart des microfossiles de la formation Gunflint ont été décrits dans les cherts algaires de l'ensemble inférieur (lower algal chert member). En règle générale, seuls les cherts noirs ou gris sombre présentent un niveau de préservation correct des microfossiles. Les cherts noirs doivent leur couleur à la cristallinité (micrométrique) du quartz, ainsi qu'à la présence d'éléments opaques ou sombres (pyrite, kérogènes brun et noir). Les microfossiles préservés dans les cherts noirs se retrouvent le long du même horizon stratigraphique sur 190 kilomètres de distance (Cloud, 1965), bien que la région de Schreiber Beach offre la meilleure préservation. D'autres microfossiles, très souvent remplacés par des oxydes de fer, ont été trouvés dans des cherts rouges (jaspes) (Schelble et al., 2004). Les microfossiles sont plus rares dans les cherts gris blanc qui alternent avec les couches de carbonates riches en fer (Frustration Bay).

Les échantillons de cherts noirs étudiés ici appartenant au faciès lower algal chert (figure 26 page 107). Ils ont été prélevés sur la bordure nord du lac supérieur, à environ 4 kilomètres à l'ouest de Schreiber Beach et à 6,5 kilomètres ouest/sud-ouest de la ville de Schreiber, à l'opposé de Slate Island (ou Flint Island). A cet endroit, on trouve des petits dômes stromatolithiques de cherts noirs, qui reposent sur un conglomérat, lui-même situé sur des pillows andésitique (à certains endroits, le conglomérat peut-être absent). Les cherts sont recouverts par un horizon de schistes noirs, qui affleurent au niveau de Slate Island.

Les cherts de la formation Gunflint sont communément interprétés comme des sédiments chimiques primaires, au vu de la très forte prédominance de la silice d'un point de vue minéralogique, de la très bonne préservation des microorganismes, et de l'absence de carbonates primaires (Sommers et al, 2000). Si cette hypothèse est exacte; les cherts de Gunflint ont une origine différente de la plupart des autres cherts fossilifères connus du protérozoïque, ou les microfossiles ont été préservés par des carbonates remplacés ensuite par de la silice (Sommers et al., 2000).

Pour Cloud (1965), les micro-organismes de la formation Gunflint ont été recouverts par un gel de silice dense, qui s'est déposé alors que les cellules étaient encore vivantes, ou très peu de temps après leur mort. La silice a d'abord du précipiter sous la forme d'un gel amorphe. En se déshydratant, ce dernier a donné naissance à de l'opale, qui s'est transformée en quartz alpha et en chalcédoine.

En l'absence d'organismes tels que les diatomées, les radiolaires et les éponges (qui maintiennent le niveau de silice dissoute dans les océans et mers actuelles à un seuil très bas, en dessous du niveau de saturation), la silice devait être très concentrée dans les océans du protérozoïque, et sa précipitation par des processus abiogéniques devait donc être aisée (Knoll et Barghoorn, 1976). Pour Winter et Knauth (1992), la pétrographie, les observations sur le terrain et le delta ^{18}O (21,3 à 24,7 ‰) indiquent une formation primaire pour tous les cherts de la formation Gunflint.

La précipitation de la silice ne serait pas due à des conditions évaporitiques (Winter et Knauth, 1992; Sommers et al., 2000), ni à l'interaction d'une eau de mer avec une eau météoritique (Winter et Knauth, 1992). Etant donné que le solubilité de la silice est indépendante du pH lorsque celui-ci est inférieur à 10, et que les effets de la pression sont faibles, la précipitation s'expliquerait principalement par un changement de température (Winter et Knauth, 1992), lors du passage d'eaux saturées en silice venant de régions profondes du bassin vers la plateforme continentale. La température de cristallisation des cherts eux-mêmes a été estimée à 55-76°C, sur un intervalle de température faible (20°C).

La nature primaire de la silice des cherts de la formation Gunflint a cependant été remise en question par Sommers et al., 2000, après l'étude détaillée d'un échantillon provenant de la région de Whitefish Falls (lower

algal chert member), et présentant une préservation exceptionnelle de carbonates. L'extrapolation de cette hypothèse à l'ensemble des cherts de la formation Gunflint reste cependant difficile à déterminer. Il est très probable que les observations effectuées à Whitefish Falls ne peuvent pas s'appliquer à d'autres affleurements du Lowel Algal Chert Member (en particulier à l'affleurement de Schreiber Beach, qui a fourni les microfossiles les mieux préservés de toute la formation Gunflint), et, à fortiori, à d'autres membres de cette même formation. Les arguments en faveur d'une origine primaire des carbonates dans les cherts stromatolithiques de Schreiber Beach sont moins convaincants que ceux applicables à Whitefish Falls. Il est donc peu probable que la majorité des cherts de la formation Gunflint soient des carbonates ayant subi ultérieurement une silicification secondaire, même si l'histoire sédimentaire et diagénétique du lower algal chert member de la formation Gunflint pourrait être assez complexe (Sommers et al.; 2000).

Ces auteurs rajoutent que l'excellent niveau de préservation d'une population de microfossiles n'indique pas toujours que le minéral dans lequel les structures fossiles sont prisonnières est le minéral primaire a avoir précipité à partir d'une solution aqueuse, si la silicification secondaire intervient dès le début de la diagénèse (Sommers et al., 2000).

Stromatolithes

Dans la région de Schreiber Beach, les cherts noirs font partie intégrante de dômes algaires, de quelques centimètres à un demi mètre de diamètre, et de 15 à 45 centimètres de hauteur (Hofmann, 1969; Hofmann, 1971; Cloud, 1965). Ces dômes reposent souvent sur le conglomérat basal. Au niveau de leur structure, ils sont constitués d'un empilement de couches claires et irrégulières composés de grains grossiers de quartz et de couches à grains fins de cherts noirs.

Les cherts noirs sont caractérisés par la présence de piliers discontinus et anastomosés, orientés perpendiculairement à la structure du dôme. D'un point de vue dimensions, les piliers possèdent un diamètre variant d'une fraction de millimètres à un centimètre, une longueur pouvant dépasser les 4 centimètres, et une hauteur de 10 centimètres ou plus (Cloud, 1965). Les microfossiles s'observent exclusivement au niveau des piliers stromatolithiques.

Les dômes montrent des structures radiales formées de petits doigts noirs, composés d'un empilement de couches convexes, qui se courbent pour devenir tangents à la paroi verticale des piliers. Ces colonnes stromatolithiques, parfois anastomosées, sont intercalées avec des piliers généralement plus clairs (de 1 à 10 millimètres de large), remplis d'oolithes et de fragments détritiques de matériaux volcaniques inclus dans une matrice à grains grossiers de quartz. Ces éléments se sont

vraisemblablement accumulés entre les piliers lors de la croissance de ces derniers.

Les oolithes retrouvées au niveau des interstices suggèrent un certain hydrodynamisme. Les cherts se sont sans doute déposés dans un étendue d'eau peu profonde (comme le prouve les clasts, les oolithes et les stromatolithes), à une profondeur influencée par l'action des vagues et des courants, et au niveau de la zone photique, vraisemblablement à une profondeur où le rayonnement ultraviolet (non filtré par une couche d'ozone, comme c'est le cas actuellement) ne pouvait plus pénétrer (Cloud, 1965).

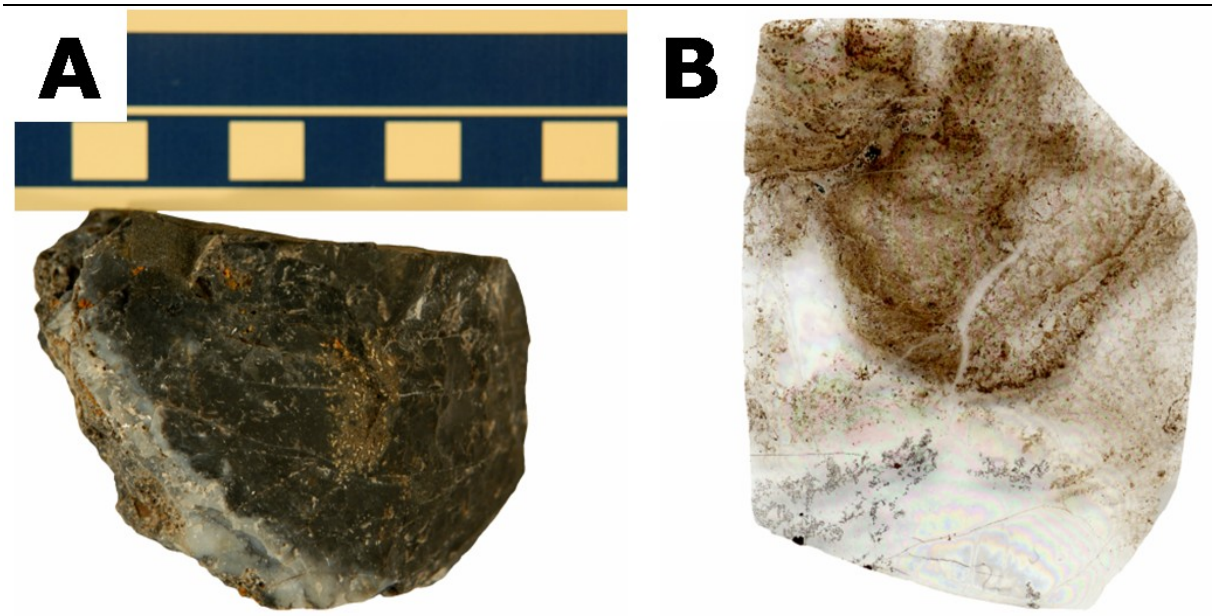


figure 26. Cherts de la formation Gunflint. [A] Un fragment de chert noir de la formation Gunflint appartenant au faciès lower algal chert. Une veine de quartz secondaire blanc traverse la roche. La surface de l'échantillon est couverte par de nombreux lichens, d'où l'importance de tailler des lames minces dans la masse (échelle : un carreau égal un centimètre). [B] Lame mince taillée dans les cherts noirs de la formation Gunflint. La partie supérieure de la lame est caractérisée par des lamines organiques brunes (textures stromatolithiques) contenant de nombreux microfossiles. La partie inférieure est occupée par de la silice pure, qui est généralement dévolue de microfossiles, à l'exception d'agrégats irréguliers de filaments épigénisés en pyrite.

Les cherts-carbonates ont été déposés sous une tranche d'eau plus importante. Les indices signant un dépôt sous une étendue d'eau de faible profondeur sont absents, et l'abondance de la pyrite et de la sidérite a été interprétée comme indiquant des condition stagnantes dans la partie centrale d'un bassin de dimensions restreintes (Goodwin, 1956).

L'assemblage fossilifère de la formation Gunflint

La première description de structures étranges dans les roches précambriennes qui affleurent au niveau du lac supérieur en Ontario au

Canada est due au géologue français Lucien Cayeux (1911), mais le rapport est cependant très concis, et ne comporte aucune illustration.

La flore de Gunflint (figure 27 page 110) a été étudiée pour la première fois par Tyler et Barghoorn (1954), qui décrivent cinq types morphologiques distincts, dont certains, comme les colonies "globose" (des agrégats coloniaux de filaments courts inclus dans une masse globulaire de consistance gélatineuse) ne seront plus jamais mentionnés, probablement à cause de leur nature abiogénique.

Une première étude systématique des microfossiles de Gunflint (Barghoorn et Tyler, 1965) documente 12 espèces différentes de microorganismes. Les microfossiles décrits proviennent d'échantillons collectés à différents endroits au niveau de Thunder Bay et à l'ouest de Nolalu (Ontario), et appartenant au lower algal chert member.

L'assemblage fossilifère de Gunflint est principalement constitué de deux espèces : des filaments (*Gunflintia minuta*) et des coccoides (*Huroniospora spp.*). Ces deux types de microfossiles sont accompagnés par des cellules plus rares, comme des microfossiles en forme d'étoile (*Eoastrion sp.*) et des microfossiles en forme de parapluie (*Kakabekia umbelatta*). La plupart des microfossiles de Gunflint sont organiquement préservés, même si certains spécimens peuvent être épigénisés en oxydes ou en sulfures de fer.

La majorité des microfossiles de l'assemblage de Gunflint ont été décrits d'après l'étude de lames minces pétrographiques au microscope optique à transmission. Une première étude au microscope électronique a été réalisée dès 1965 par Cloud et Hagen.

Gunflintia minuta

Gunflintia minuta (figure 27D page 110) est l'espèce la plus abondante dans les cherts noirs de la formation Gunflint. Il s'agit de filaments possédant un diamètre généralement égal à 1,5 microns (mais pouvant varier de 0,5 microns à 6 microns), et pouvant mesurer plusieurs centaines de microns de longueur. Le diamètre demeure très souvent constant tout au long du filament. Dans leur description originale de *Gunflintia minuta*, Barghoorn et Tyler (1965) indiquaient que les filaments sont cloisonnés, mais il est clair qu'aucun des filaments de *Gunflintia minuta* observé, ou décrit dans la littérature, ne présente cette propriété.

La plupart des filaments sont organiquement préservés et sont constitués par un matériel carboné de couleur brun sombre à noir. Il est probable que la structure carbonée préservée dans les cherts de Gunflint correspond à une paroi ou à une gaine mucilagineuse. Des études de fossilisations effectuées sur des cyanobactéries modernes ont effectivement montré qu'il s'agit de l'élément présentant la plus grande résistance aux phénomènes de dégradation post-mortem (Knoll, 2003). Dans les secteurs de la formation Gunflint riches en jaspe, les filaments de *Gunflintia minuta* sont souvent remplacés par des oxydes de fer. Barghoorn et Tyler (1965) notent également la présence de filaments

totalement remplacés par de la pyrite dans certaines lames minces (sans les illustrer toutefois), et soulignent leur rareté par rapport à des filaments simplement soulignés ou répliqués par des cristaux de pyrite, ou des filaments épigénisés en hématite. Aucun filament de la formation Gunflint totalement remplacé par de la pyrite, comme ceux décrits dans le cadre de cette étude (voir chapitre résultat) n'a encore été illustré dans la littérature.

La préservation des filaments est très variable, et peut varier à l'échelle de la centaine de microns, ce qui atteste de l'existence de microenvironnements plus ou moins favorables à la préservation de corps cellulaires. Trois types de processus semblent impliqués dans la dégradation diagénétique des restes cellulaires organiques : une remobilisation du matériel organique et son déplacement le long des cristaux de quartz (les limites du microfossile devenant diffuses), une granularisation de la matière organique (condensation en petites particules submicrométrique et subsphériques, ce qui donne une texture granulaire aux parois), et enfin une maturation thermique caractérisée par un changement de couleur, qui évolue depuis un jaune d'ambre pâle jusqu'au noir (Knoll et al., 1988).

D'autres filaments très similaires d'un point de vue morphométrique à ceux de *Gunflintia minuta* ont été identifiés dans d'autres formations, comme la formation Duck Creek en Australie (Knoll et *Barghoorn, 1976; Knoll et al., 1988),* ce qui laisse penser que *Gunflintia minuta* était une espèce répandue au protérozoïque.

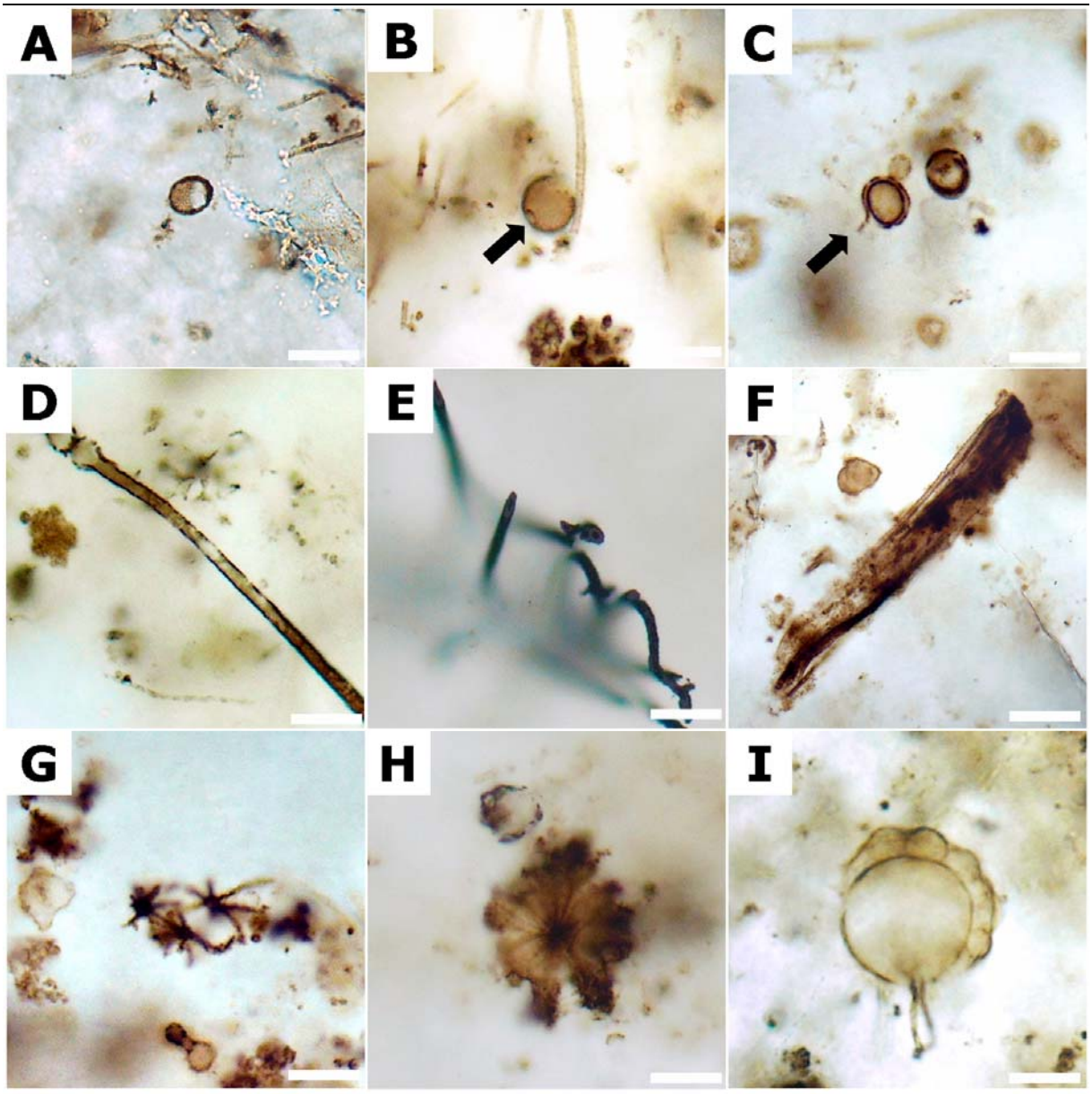


figure 27. Vues au microscope optique de microfossiles de la formation Gunflint. [A] Une cellule ovoïde d'*Huroniospora*. Outre la paroi, une partie du contenu intracellulaire a été organiquement préservée (échelle : 20 microns). [B] Une cellule parfaitement sphérique d'*Huroniospora*, plus rare que la forme ovoïde. Notez l'opercule (flèche noire) en bas à gauche (échelle : 10 microns) [C] Deux cellules d'*Huroniospora*. Celle située à gauche présente une double paroi (flèche noire) parfaitement visible (échelle : 10 microns). [D] Un filament de *Gunflintia minuta*, qui avec *Huroniospora*, domine l'assemblage fossilifère des cherts de Gunflint. Le filament mesure 1,5 microns de diamètre. Il présente, dans sa partie supérieure, deux élargissements de 3 microns de diamètre (échelle : 10 microns). [E] Si la grande majorité des filaments de *Gunflintia minuta* sont organiquement préservés, des spécimens entièrement remplacés par de la pyrite ont été découverts dans nos échantillons (échelle : 10 microns). [F] Cette structure organique, qui comporte apparemment des structures filamenteuses très similaires à *Gunflintia minuta*, pourrait être un fragment de mats bactériens. (échelle : 10 microns). [G] Trois petites cellules étoilés d'*Eoastrion*. De nombreux auteurs ont noté la ressemblance avec *Metallogenium*, une bactérie en forme de rosette capable d'oxyder le fer et le manganèse (échelle : 10 microns). [H] L'ombrelle organique de *Kakabekia umbellata*, l'un des microfossiles les plus étranges de la formation Gunflint (échelle : 20 microns). [I]. Spécimen incomplet d'*Eosphaera tyleri*, une structure qui par sa taille et sa complexité, pourrait être d'origine eucaryote (échelle : 10 microns).

Huroniospora spp.

Le terme *Huroniospora* (figure 27A, figure 27B, figure 27C page 110) désigne des petites cellules sphériques ou ellipsoïdales d'un diamètre variant généralement entre 3 et 15 microns, presque toujours isolées. Les paires sont très rares, et peuvent de plus s'expliquer par une juxtaposition fortuite. La distribution des cellules d'*Huroniospora* au sein des lames minces semble aléatoire (Strother et Tobin, 1987).

Trois espèces ont été définies d'après l'épaisseur de la paroi et la présence d'ornementations plus ou moins fines à leur surface : *Huroniospora macroreticulata*, *Huroniospora microreticulata* et *Huroniospora psilata*. Cependant, cette classification a été jugée suspecte par Awramik et Barghoorn (1977). Ces deux auteurs estiment en effet que la texture de la surface des cellules d'*Huroniospora* peut résulter d'un effet diagénétique (empreinte des cristaux de quartz sur la paroi organique par exemple), sans avoir de lien direct avec la biologie. Les analyses statistiques effectuées par Strother et Tobin (1987) montrent l'absence de corrélation entre la forme des cellules et la texture des parois (ou la présence ou l'absence d'ouverture à une extrémité). Les deux auteurs en déduisent que la structure de la paroi est vraisemblablement plus liée à la qualité de la préservation qu'à une différence biologique intrinsèque.

Etant donné l'association presque exclusive des cellules d'*Huroniospora* avec les filaments de *Gunflintia minuta*, et leur absence dans les zones non stromatolithiques, il est probable qu'*Huroniospora* fasse partie du benthos (Awramik et Barghoorn, 1977).

Les microfossiles baptisés *Huroniospora* représentent sans doute plus d'une espèce biologique. En étudiant la distribution des tailles, Schopf et al. (1976) ont émis l'hypothèse qu'*Huroniospora* englobe trois populations d'organismes (1 à 2 microns, 3 à 8 microns et 9 à 19 microns). Awramik et al. (1977) confirment la présence d'au moins deux populations d'individus, mais ajoute que la troisième population de Schopf et al. (9 à 16 microns) ne pourrait être rien d'autre que la limite supérieure de la population médiane (3 à 8 microns). Strother et Tobin (1987) trouvent une distribution bimodale, avec des modes situés à 4 et 7 microns. Ces ensembles ne représentent vraisemblablement pas différentes étapes dans le cycle de vie du microorganisme, mais bel et bien une hétérogénéité dans la population, qui pourrait donc être constituée d'au moins deux microorganismes distincts.

Licari et Cloud (1968) notent que certaines cellules d'*Huroniospora* semblent avoir été fossilisées en pleine division (cinq cas sont illustrés dans l'article de 1968). Pour Licari et Cloud, ces figures de division montrent que le groupe d'*Huroniospora* renfermerait plus que de simples spores de microorganismes. Cependant, il est toujours très délicat de différencier deux cellules accolées au hasard d'un microorganisme en cours de division. De plus, ces paires sont très rares, alors qu'elles devraient être plus nombreuses si elles représentaient une division au sein

d'une population. Il est donc préférable de considérer que les cellules d'*Huroniospora* accolées sont le résultat d'une juxtaposition fortuite, et non d'une division cellulaire (Strother et Tobin, 1987).

Un tiers des cellules d'*Huroniospora* présente une ouverture, circulaire ou non, à l'une de leurs extrémités (Strother et Tobin, 1987). La nature circulaire de certaines ouvertures (4 % environ) est vraisemblablement d'origine biologique (l'attaque de la paroi par des bactéries hétérotrophes, sa lyse par des enzymes après la mort du microorganisme, ou sa dégradation par des facteurs abiogéniques sont effectivement peu probables dans le cas d'ouverture parfaitement circulaire) (Strother et Tobin, 1987).

Strother et Tobin (1987) ont également mesuré le rapport axial d'un vaste échantillon de cellules d'*Huroniospora*. Ce dernier varie de 0,46 (cellule très elliptique) à 1 (cellule sphérique), avec un valeur moyenne de 0,89 (subsphérique). La composante ellipsoïde est unimodale, contrairement à la composante sphérique, bimodale (4 microns et 6-7 microns). Celle-ci est donc peut-être constituée de deux espèces différentes, l'une pouvant éventuellement adopter une forme elliptique.

D'après Strother et Tobin (1987), les spécimens les mieux préservés d'*Huroniospora* semblent se situer dans des régions riches en matière organique diffuse. Des groupes de microfossiles présentant des parois épaisses apparaissent dans des régions qui sont deux à quatre fois plus opaques que les régions dominées par des cellules avec des parois fines. Les deux auteurs notent également qu'un pourcent environ des cellules d'*Huroniospora* présentent des vésicules internes (déjà observées par Cloud en 1965). Cette structure interne est interprétée par Strother et Tobin (1987) comme étant une cellule végétative enveloppée par une paroi protectrice, ou une endospore formée à l'intérieur d'une cellule mère. Il pourrait aussi s'agir plus simplement de la préservation du cytoplasme collapsé (Westall et al., 1995).

Eoastrion

Eostrion - l'étoile de l'aube -, désigne une structure formée d'un nombre variable de filaments, ramifiés ou non, attachés à un corps central et orientés radialement (figure 27G page 110). Le diamètre des filaments est d'environ 1,5 microns, leur longueur pouvant varier entre 3 et 18 microns. Le grand axe du corps central mesure entre 2 et 8 microns de longueur. Deux espèces ont été décrites : *Eoastrion simplex* et *Eoastrion bifurcatum*.

Les cherts-carbonates qui affleurent au niveau du secteur de «Frustration Bay» sont dominés par *Eoastrion*, accompagné de *Galaxiopsis melanocentra* et d'*Huroniospora spp.* Quelques rares cellules sphériques probablement planctoniques, *Leiptoteichos golubicii*, ainsi que quelques filaments de *Gunflintia minuta* complètent l'ensemble. Les cellules d'*Eoastrion* de ce secteur dépassent souvent 20 microns de diamètre (jusqu'à 40 microns pour certains spécimens), alors qu'elles sont plus

petites au niveau du lower algal chert member (Knoll et Barghoorn, 1976).

Eosphaera tyleri

Eosphaera tyleri est sans doute l'un des microfossiles les plus bizarres jamais trouvés dans des roches terrestres précambriennes (figure 27I page 110). En 3D, et fortement agrandi, sa structure serait la suivante : un ballon de football recouvert de manière incomplète par une couche de balles de golf, le tout placé à l'intérieur d'un ballon de basket. La sphère externe mesure généralement entre 14 et 15 microns de diamètre, contre 10 à 12 microns pour la sphère interne. Les balles de golf sont distribuées sur toute la surface de la sphère interne, sans dessiner de motifs géométriques. Kazmierczak (1976) note que la sphère externe pourrait correspondre au bord d'une couche de mucilage entourant et protégeant les petites cellules périphériques, et qu'il ne s'agirait donc pas d'une véritable paroi.

D'après Barghoorn et Tyler (1965), *Eosphaera tyleri* ne se rencontre que dans les cherts de la localité de Schreiber Beach, et même dans ces roches, il est très rare (155 spécimens identifiés sur plusieurs centaines de lames minces par ces deux auteurs). Ce microfossile n'a pas d'équivalent terrestre actuel, et bien que répandu il y a 1,9 milliards d'années, il a aujourd'hui totalement disparu. Les micropaléontologues spéculent sur sa structure et son mode de vie. Le ballon de football était-il la cellule centrale, les balles de golf des cellules reproductives, et le ballon de basket une enveloppe protectrice ? (Schopf, 1999)

Contrairement aux espèces dominantes de l'assemblage fossilifère de Gunflint, *Eosphaera tyleri* était probablement un organisme planctonique, étant donnée sa forme sphérique, et l'absence de lien entre sa distribution et celles des autres microorganismes. Après leur mort, les cellules d'*Eosphaera tyleri* ont vraisemblablement sédimenté au fond de l'étendue d'eau dans laquelle elles vivaient, avant d'être fossilisées avec les microorganismes benthiques.

Kakabekia umbellata

Tout comme *Eosphaera tyleri, Kakabekia umbellata* est l'une des bizarreries de la formation Gunflint. Ce microfossile ressemble à un parapluie miniature (figure 27H page 110). La cellule comporte effectivement une ombrelle qui mesure entre 5 et 30 microns de diamètre, dotée de baleines et reliée à une structure en forme de noix par une tige très mince. La "noix" est probablement une spore, qui en germant donne naissance à la tige et à l'ombrelle. L'ensemble évoque tout à fait un parasol. Aucun organisme vivant sur Terre ne ressemble à *Kakabekia*, et ce dernier s'est probablement éteint sans donner de descendance (Schopf, 1999).

Des microfossiles ubiquistes

L'association *Gunflintia minuta*/*Huroniospora spp.* n'est pas seulement typique des cherts de Gunflint, et se rencontre dans d'autres formations d'âge similaire à celle de Gunflint, comme les carbonates ferrugineux de la formation Odjick, les cherts de la formation Tyler, les minerais de fer rubanés de la formation Frere, les dolomites de Duck Creek ou encore les roches de Belcher (Knoll et al., 1988). Bien que l'assemblage de Gunflint ait pu être spécialisé d'un point de vue écologique, il semble avoir été très répandu au protérozoïque, ce qui lui donne une certaine importance du point de vue biostratigraphique.

Dans la formation de Duck Creek (Australie), plusieurs microfossiles extrêmement semblables à ceux de la formation Gunflint ont ainsi été décrits : *Eoastrion*, *Huroniospora spp.*, *Gunflintia minuta*, ainsi que des cellules sphériques dénommées *Leiptoteichos* (Knoll et al., 1988). L'étude des relations spatiales des microfossiles de Duck Creek tend à montrer que l'assemblage n'était pas de nature stromatolithique, mais que les microfossiles représentaient les restes d'une communauté benthique, dont l'apparente diversité aurait pu être augmentée par le transport de fossiles (éventuellement planctoniques) provenant d'autres environnements (Knoll et al., 1988).

CHAPITRE III

RESULTATS

«Des affirmations extraordinaires nécessitent des preuves extraordinaires.»
Carl Sagan

Minéralogie

Cherts de la formation Draken

Les échantillons de la formation Draken utilisés dans cette étude se présentent sous la forme de conglomérats. Les cherts eux-mêmes se présentent sous la forme d'éclats tabulaires noirs, de quelques centimètres de longueur pour moins d'un centimètre d'épaisseur, et plus ou moins alignés les uns avec les autres. Ces éclats sont dispersés dans une matrice mal triée de débris plus ou moins arrondis, et de dimensions variables (100 microns à quelques millimètres) constitués d'une boue dolomitique. Les grains dolomitiques présentent parfois un anneau diagénétique d'une dizaine de microns de large, constitué de cristaux de carbonates à croissance radiale. Les interstices entre les grains sont occupés par des cristaux automorphes de dolomite, et par un ciment siliceux.

Les éclats de cherts ne sont rien d'autres que des fragments de mats microbiens silicifiés (Knoll, 1982). Le fait que certains de ces éclats soient courbés, ainsi que la présence de perturbations au niveau des lamines dues à une charge importante de sédiments prouvent que les mats microbiens étaient flexibles au moment du dépôt, ce qui indique que la silicification a vraisemblablement eu lieu après la formation du conglomérat. De rares fragments de mats microbiens non silicifiés (carbonatés) confirment cette hypothèse.

Cherts de la formation Gunflint

Les échantillons de la formation Gunflint utilisés dans cette étude se présentent sous la forme de cherts noirs massifs à texture

stromatolithique (figure 26 page 107). Les colonnes convexes stromatolithiques de dimensions centimétriques sont intercalées avec des piliers étroits (quelques millimètres de large) et clairs de silice grossièrement cristallisée et renfermant des oolithes, quelques fois colorées par des oxydes de fer, ainsi que des fragments détritiques. L'orientation des échantillons par rapport au plan de sédimentation n'a pas pu être déterminée avec certitude, étant donné qu'aucune marque ne figurait sur ces derniers. Cependant, la courbure des lamines organiques stromatolithiques a pu parfois donner des indications sur l'orientation des échantillons.

Sous le microscope optique, les cherts de la formation Gunflint sont principalement constitués de silice cryptocristalline (les cristaux mesurant en moyenne entre 5 à 10 microns) et de chalcédoine fibreuse interstitielle. Des cristaux automorphes rhomboédriques de carbonates et des agrégats irréguliers d'oxyde de fer sont disséminés dans la matrice minérale. Les fractures sont remplies par de gros cristaux de silice secondaire.

Contenu fossilifère

Cherts de la formation Draken

Les cherts de la formation Draken présentent un assemblage fossilifère plus varié que celui de la formation Gunflint, mais, un choix étant nécessaire, l'un des microfossiles les plus communs, *Myxococcoides,* a été choisi pour cette étude. D'autres microfossiles, comme ceux présentés dans la figure 25 page 101 (*Polybessurus bipartitus*, *Siphonophycus*, *Synodophycus*, *Trachyhystrichosphaera*) ont été observés, mais les études en microscopie à force atomique ont d'abord et avant tout porté sur le genre *Myxococoides*.

Deux espèces principales de *Myxococcoides* ont été observées dans les échantillons : *Myxococcoides Cantabrigiensis* se présente sous la forme de cellules sphériques d'un diamètre pouvant atteindre 20 microns, et présentant une paroi d'une épaisseur approximative de 1 micron, et dont l'état de préservation est variable. La coloration de la paroi varie du brun clair au brun très sombre. Ces cellules peuvent être isolées, ou regroupées au sein d'amas pouvant contenir plus d'une dizaine d'individus. Le mucilage externe est souvent absent, et aucune structure organique interne n'est observée (ce critère est cependant d'un intérêt taxonomique limité, étant donné qu'il est souvent lié à la diagenèse).

La seconde espèce de *Myxococcoides* observée est *Myxococcoides Chlorelloidea*. Cette dernière se présente sous la forme de vésicules d'un diamètre variant entre 15 et 25 microns en moyenne, certaines pouvant contenir des vésicules internes (de 10 à 15 microns) en paire ou tétrades. La paroi, brun jaune à brun sombre, possède une épaisseur moyenne de 0,5 microns, et son état de préservation est variable. Les vésicules internes ou les cellules sphériques peuvent contenir une petite bille organique plissée.

Si la plupart des cellules de *Myxococcoides* observées appartenaient soit à l'espèce *Myxococcoides Cantabrigiensis*, soit à l'espèce *Myxococcoides Chlorelloidea*, de nombreuses cellules sphériques n'ont pu être clairement associées à une espèce donnée, à l'image de la cellule sphérique d'un diamètre de 33 microns, et possédant une paroi noire anormalement épaisse de plusieurs microns d'épaisseur, illustrée dans la figure 28 page 121.

Cherts de la formation Gunflint

Le contenu fossilifère des cherts de la formation Gunflint étudiés ici est dominé par deux espèces : des filaments (*Gunflintia minuta*) et des coques ovoïdes ou plus rarement sphériques (*Huroniospora spp.*), ce qui est cohérent avec les travaux précédents (Barghoorn et Tyler, 1965; Cloud, 1965; Awramik et Barghoorn, 1977).

Bien que des microfossiles plus rares aient été rencontrés, comme *Eoastrion*, *Kakabekia umbellata* ou *Eosphaera*, seules les deux espèces dominantes ont été intensivement étudiées.

Les filaments de *Gunflintia minuta* possèdent un diamètre de 1 à 1,5 microns, pour une longueur variant entre une dizaine de microns et une centaine de microns pour les spécimens les plus longs. Droits ou courbés, ils ne sont pas segmentés et ne présentent pas de bifurcations. Un spécimen particulier présentait deux zones élargies de 3,8 microns de diamètre en position subterminale (figure 41A page 156). L'orientation des tubules est quelconque et n'apparaît pas reliée en aucune façon avec la texture stromatolithique.

Les cellules d'*Huroniospora* sont généralement ovoïdes, plus rarement sphériques, la longueur du grand axe étant comprise entre 6 à 10 microns (figure 38A page 151 et figure 40A page 155). Elles sont toujours isolées, à quelques rares exceptions près. La paroi cellulaire est souvent lisse, parfois réticulée, et occasionnellement, quelques individus montrent une petite ouverture plus ou moins circulaire à l'extrémité la plus aplatie (figure 27B page 110), et, encore plus rarement, une vésicule interne ou un amas interne (figure 27A page 110).

D'après la coloration brun noir des parois cellulaires, presque toutes les structures étudiées apparaissent organiquement préservées d'un point de vue optique, c'est-à-dire composée d'un matériau carboné. Quelques rares spécimens de filaments ont cependant été totalement remplacés par des sulfures de fer (figure 43 page 161). Ces derniers sont localisés dans des régions de quartz très claires, en dehors des zones stromatolithiques. Ils forment souvent des agrégats irréguliers, et sont toujours emprisonnés dans une matrice de quartz très claire, constituée de cristaux grossiers. L'opacité des minéraux (oxydes ou sulfures) de fer rend généralement les observations en microscopie optique très difficiles, mais ici, la matrice de silice transparente en microscopie à transmission a grandement facilité leur étude.

Etude de surface par microscopie à force atomique avant attaque acide

Cicatrices d'arrachement et localisation des microfossiles

Selon le protocole décrit par Kempe et al. (2002; 2005), les observations en microscopie à force atomique sont à effectuer uniquement après attaque acide. Or, de manière à caractériser la qualité du polissage des lames minces, il a été décidé, dès le début de cette thèse, d'acquérir des images avant cette étape.

Dès les premières observations effectuées, pour des raisons de facilité, sur les plus grosses cellules de la formation Draken (dont un acritarche, figure 53 page 185), il est apparu évident que les cellules tronquées à la surface des lames minces laissaient une empreinte parfaitement visible en microscopie à force atomique, et ce avant même attaque acide. Malgré un poli de qualité optique, la paroi des microfossiles est en effet invariablement marquée par des cicatrices d'arrachement d'une centaine à quelques dizaines de nanomètres de profondeur, vraisemblablement liées aux différences de propriétés mécaniques entre la paroi elle-même et la matrice minérale. Les kérogènes, plus tendres que les cristaux de quartz, auraient effectivement tendance à se fragmenter durant le polissage des lames minces. La comparaison des figure 38D et figure 38E page 151, ainsi que des figure 40D et figure 40E page 155 montre clairement que l'interruption fortuite de la paroi carbonée d'une cellule d'*Huroniospora* correspond à une absence de défaut mécanique à la surface polie de la lame mince de roche.

La présence de cicatrices d'arrachement dans des régions correspondants à la paroi semble être un caractère général pour les microfossiles carbonés préservés dans une matrice de silice, d'après les observations réalisées ici à la fois sur la formation Draken et la formation Gunflint. La profondeur de cette tranchée est généralement plus importante pour les microfossiles de la formation Gunflint (100 à 200 nm, voir figure 29B page 125 et figure 29D page 125), que pour ceux de la formation Draken (50 nm en moyenne, voir figure 28A page 121 et figure 29A, figure 29C page 125). Les cicatrices apparaissent quelque soit l'épaisseur et l'état de maturité de la matière organique constituant la paroi, comme le montre la figure 28 page 121 pour des microfossiles de la formation Draken.

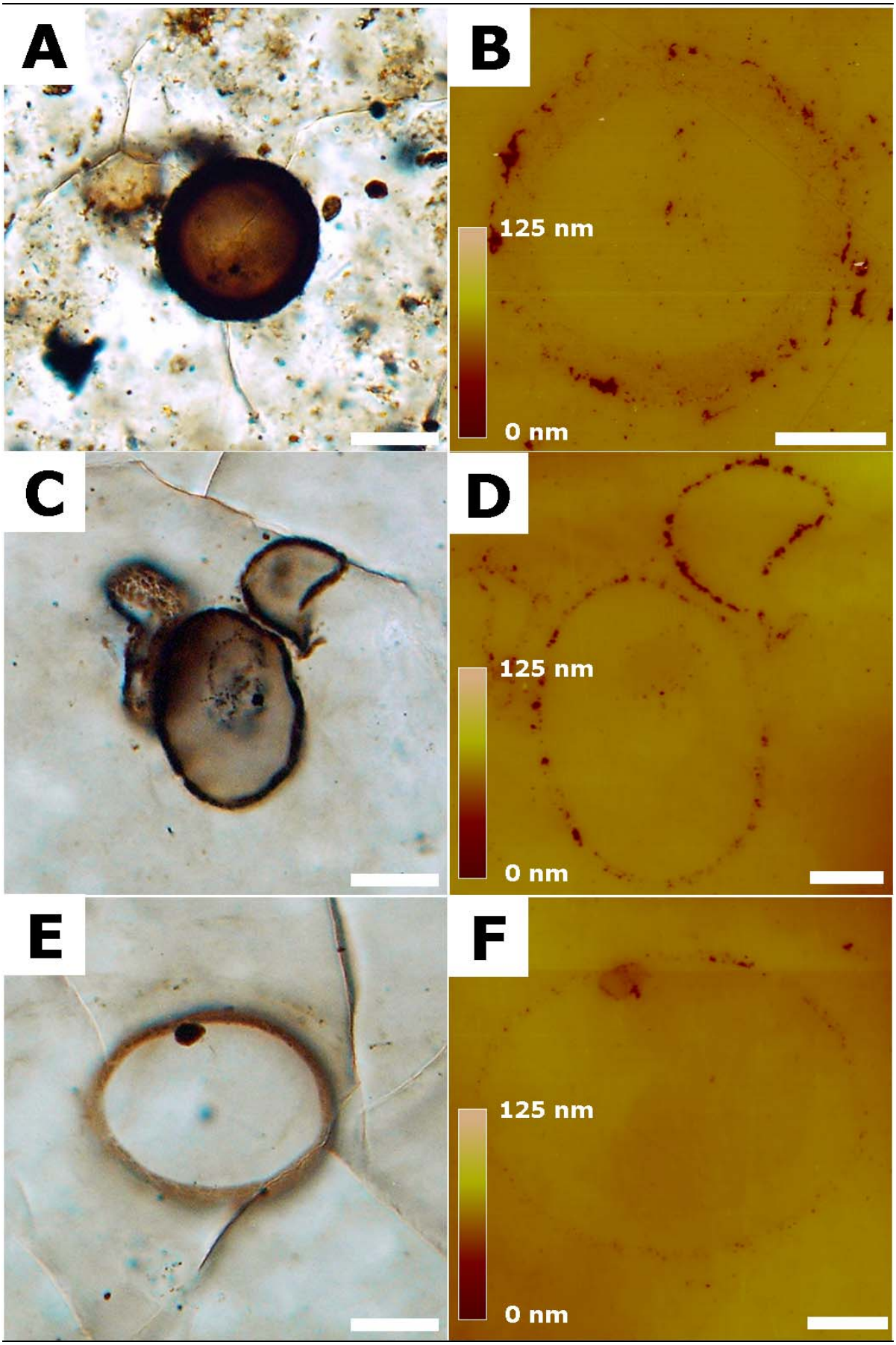

A
B
125 nm
0 nm
C
D
125 nm
0 nm
E
F
125 nm
0 nm

figure 28. Observations effectuées sur des cellules non identifiées de la formation Draken. [A] Cellule sphérique (diamètre 33 microns) imagée au microscope optique (grossissement x500) en lumière transmise. La paroi, constituée d'un matériel organique très mature, est ici anormalement épaisse (de 4 à 5 microns). Cette dernière pourrait être similaire au *Myxococcoides sp. D* décrit par Knoll et al. (1991) (échelle : 20 microns). [B] Image de hauteur obtenue en mode tapping de la cellule exposée à la surface de la lame mince polie. Les altitudes sont représentées par une échelle de couleur, le rouge indiquant les régions les plus basses, et le jaune les régions les plus hautes. La région correspondant à la paroi organique est marquée par des cicatrices d'arrachement, liées à la désagrégation de la matière organique durant le polissage de la surface de la lame mince. Deux types de cicatrices sont visibles ici : des cicatrices profondes, situées principalement sur le pourtour extérieur (profondeur moyenne : 100 nanomètres), et des défauts beaucoup plus ténus, qui délimitent parfaitement la surface occupée par la paroi (profondeur moyenne : 5 nanomètres) (échelle : 10 microns, pointe RTESP7, scan rate 0,25 Hz). [C] Groupe de trois cellules déformées (probablement des *Myxococcoides*) imagées au microscope optique (grossissement x500) en lumière transmise (diamètre de la plus importante : 29 microns). La paroi est constituée d'un matériel organique très mature et très sombre, mais sa largueur est inférieure à celle du microfossile précédent (échelle : 20 microns). [D] Image de hauteur obtenue en mode contact des trois cellules exposées à la surface de la lame mince polie. Les régions correspondant à la paroi organique sont marquées par des cicatrices d'arrachement (échelle : 10 microns, pointe CONTR50, scan rate 1 Hz). [E] Cellule ovoïde de nature inconnue imagée au microscope optique (grossissement x500) en lumière transmise (diamètre 47 microns sur 37 microns). Contrairement aux microfossiles précédents, la paroi est ici plus diffuse, et constituée d'un matériel organique moins mature de couleur brun clair. Un cristal de pyrite est accolé à la paroi au sommet du microfossile (échelle : 20 microns). [F] Image de hauteur obtenue en mode contact de la cellule exposée à la surface de la lame mince polie. La région correspondant à la paroi organique est également marquée par des cicatrices d'arrachement, mais ces dernières sont plus petites et moins profondes que dans le cas du microfossile précédent (l'empreinte laissée par le cristal de pyrite est également bien visible). La comparaison entre la partie supérieure et inférieure du microfossile montre que plus la paroi est diffuse sur les images optiques, plus les cicatrices d'arrachement sont ténues (ces dernières restant cependant quand même visibles). Ainsi, après polissage, des cicatrices d'arrachement marquent la paroi des microfossiles de la formation Draken, quelque soit l'épaisseur et l'état de maturité de la matière organique constituant la paroi (échelle : 10 microns, pointe CONTR50, scan rate 1 Hz). Dans cette figure, les échelles de hauteur sont identiques pour les images B, D et F.

Relocalisation des microfossiles à l'aide des défauts de polissage

Même si la «tranchée» liée au départ de la matière organique durant le polissage peut parfois s'interrompre (en général parce que la paroi elle-même est interrompue, voir figure 38D et figure 38E page 151 et figure 40D et figure 40E page 155), elle délimite en général très bien la position de la paroi du microfossile, qui peut alors être identifié uniquement d'après sa forme sur les images de hauteur. Ces cicatrices d'arrachement se sont révélées très utile pour localiser sous le microscope à force atomique des microfossiles de petites dimensions (en dessous de la dizaine de micromètres), invisibles avec la caméra optique équipant l'instrument (figure 30 page 126).

Effectivement, la méthode de localisation mise au point durant cette thèse consiste à graver autour de chaque microfossile, à l'aide d'une pointe au diamant montée sur un objectif, un cercle de 250 à 500 microns de diamètre. Avec l'aide de la caméra optique (fonctionnant en lumière réfléchie) du microscope à force atomique, la pointe est amenée au-dessus du centre du cercle. Les cellules de tailles imposantes (diamètre supérieur à 20 microns) sont souvent visibles avec la caméra, et la pointe peut donc être placée au-dessus de l'objet à étudier avec une relativement bonne précision (à ± 20 microns près). En procédant ainsi, et sauf erreur grossière de manipulation, l'opérateur est pratiquement assuré d'avoir dans le champ de vision de l'instrument (50 à 10 microns de côté) le microfossile en question (figure 54F page 189). Notons que les seules études réalisées jusqu'à présent avec le microscope à force atomique sur des microfossiles précambriens concernaient des acritarches de taille respectable (diamètre avoisinant les 50 microns), et donc aisément localisables avec la caméra optique équipant l'AFM (Kempe et al., 2002; Kempe et al., 2005).

La localisation devient plus problématique avec des microfossiles d'un diamètre inférieur à 20 microns, car ces derniers sont invisibles sous la caméra optique de l'AFM. Cependant, grâce aux cicatrices d'arrachement délimitant leurs parois, ils peuvent toujours être identifiés avec le microscope à force atomique sur des images de hauteur. Une fois la pointe positionnée au centre du cercle de marquage, la procédure consiste à réaliser l'engagement avec un balayage relativement large (50, voire 100 microns), et à rechercher des cicatrices d'arrachement correspondant à la forme du microfossile telle qu'elle a été observée en microscopie optique. Une fois le microfossile identifié avec certitude, la zone de balayage peut être diminuée, ce qui a pour effet d'augmenter le grossissement de l'image AFM.

La présence de ces cicatrices d'arrachement est d'autant plus importante que, comme il est indiqué dans le paragraphe suivant, il est plus difficile (et dans certains cas impossible) de parvenir à localiser les parois d'un microfossile après attaque acide. L'attaque acide modifie considérablement le relief de la surface de la lame mince, et sauf cas exceptionnel, ou la paroi du microfossile est totalement dégagée, et

apparaît clairement en relief par rapport aux «plaines» environnantes de silice, le microfossile peut souvent être masqué parmi les reliefs. La relocalisation est particulièrement délicate dans le cas des microfossiles de la formation Draken : les cristaux de quartz sont effectivement d'un ordre de grandeur plus petits que ceux de la formation Gunflint (0,1 micron contre 1 micron), et la surface est donc nettement plus rugueuse (les cristaux micrométriques des cherts de la formation Gunflint forment plus de plateaux, et la superficie occupée par des zones plates est donc plus importante que dans le cas des cherts de la formation Draken, ce qui donne des images de hauteur plus lisibles, et facilite les mesures, voir figure 29E page 125 et figure 29F page 125). De plus, comme il sera démontré plus loin, les microfossiles de la formation Draken ne possèdent pas de paroi organique solide et continue, capable de donner naissance à des édifices en relief comme c'est le cas pour les microfossiles de la formation Gunflint. La figure 31 page 127 illustre parfaitement la difficulté de relocation des microfossiles de la formation Draken, et la problématique de relocalisation des microfossiles après attaque acide est décrite plus en détail ci-dessous.

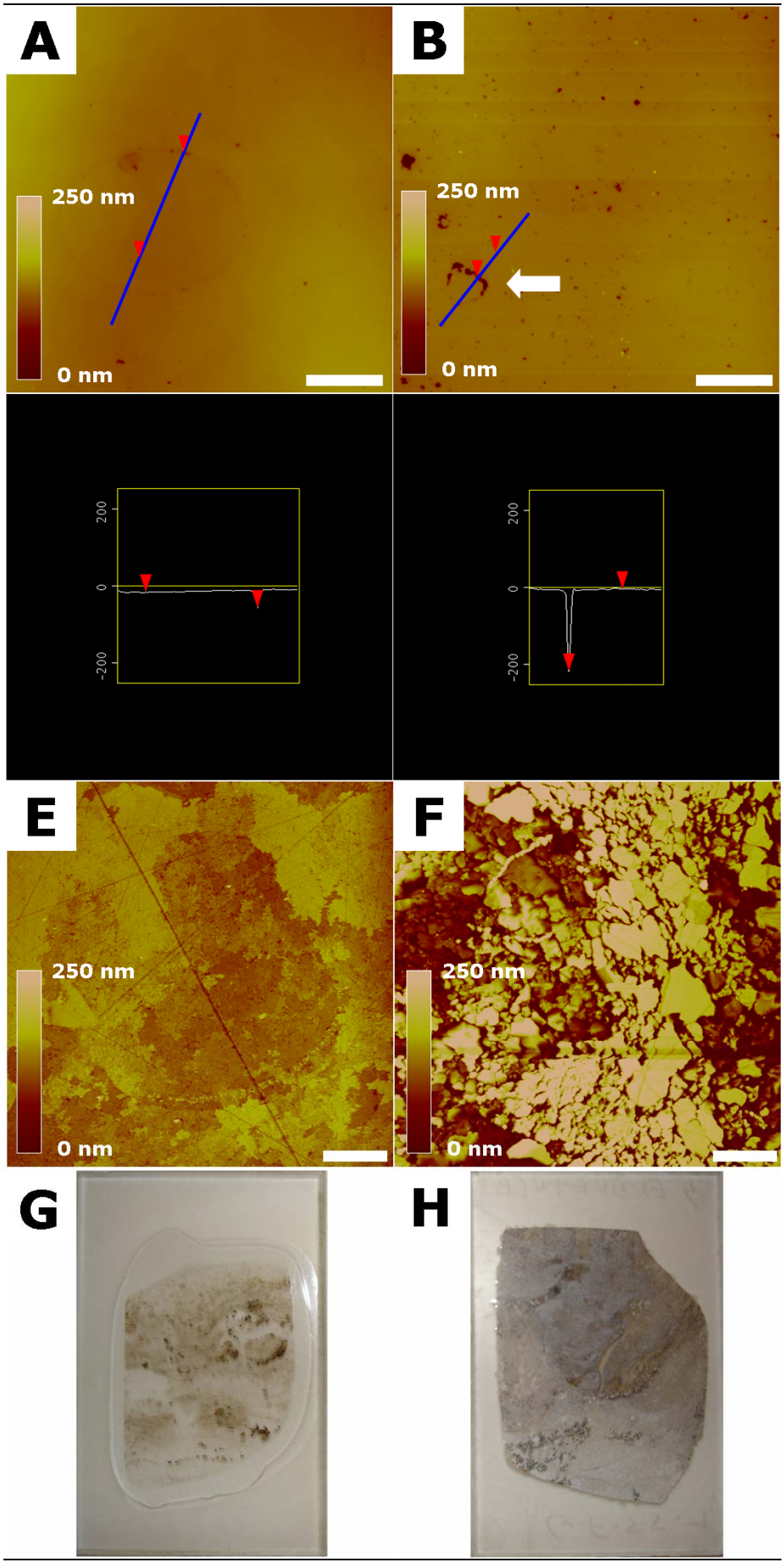

A
250 nm
0 nm
B
250 nm
0 nm
200
0
-200
200
0
-200
E
250 nm
0 nm
F
250 nm
0 nm
G
H

figure 29. Images de hauteur sur des surfaces minérales des cherts des formations Draken et Gunflint avant et après attaque acide. [A] Image de hauteur obtenue en mode contact de la surface d'un chert de la formation Draken. Les altitudes sont représentées par une échelle de couleur, le rouge indiquant les régions les plus basses, et le jaune les régions les plus hautes. Les régions en creux correspondent généralement à des endroits ou des matériaux fragiles, telle que la matière organique particulaire ou pariétale, ont été ôtés durant le polissage de la surface de la lame mince de roche. Comme le montre cette image, la surface est généralement plate, à l'exception de petites cicatrices d'arrachement, et hormis la profondeur des cicatrices d'arrachement, plus grande dans le cas de la formation Gunflint (B), rien ne distingue les surfaces des deux formations. La ligne bleu indique la position du profil illustré en C. (échelle : 20 microns, pointe CONTR50, scan rate 1 Hz). [B] Image de hauteur obtenue en mode contact de la surface d'un chert de la formation Gunflint (même échelle spatiale et verticale que l'image précédente). Les régions en creux correspondent généralement à des endroits ou des matériaux fragiles, telle que la matière organique particulaire ou pariétale, ont été ôtés durant le polissage de la surface de la lame mince de roche. La flèche blanche marque l'emplacement d'une cellule déformée d'*Huroniospora* (spécimen #jer). Comme le montre cette image, la surface est généralement plate, à l'exception de petites cicatrices d'arrachement. La ligne bleu indique la position du profil illustré en D. (échelle : 20 microns, pointe CONTR50, scan rate 0,5 Hz). [C] Profil vertical établi le long de la ligne bleu sur l'image A. L'échelle verticale est graduée en nanomètres. La distance verticale entre les deux marqueurs triangulaires rouges (reportés sur l'image A) est de 50 nm. [D] Profil vertical établi le long de la ligne bleu sur l'image B. L'échelle verticale est graduée en nanomètres. La distance verticale entre les deux marqueurs triangulaires rouges (reportés sur l'image B) est de 200 nm, ce qui démontre une plus forte profondeur des cicatrices d'arrachements sur les cherts de la formation Gunflint, par rapport aux cherts de la formation Draken. [E] Image de hauteur de la surface d'un chert de la formation Draken corrodée à l'acide fluorhydrique (1%) pendant 40 minutes. La corrosion a créée une surface très hétérogène, et les cristaux de quartz de dimension submicrométrique (difficilement visibles à ce grossissement) ont donné naissance à une très forte rugosité globale, qui complique fortement les mesures au microscope à force atomique (échelle : 5 microns, tapping, pointe RTESP7, scan rate 0,25 Hz). [F] Image de hauteur de la surface d'un chert de la formation Gunflint corrodée à l'acide fluorhydrique (5%) pendant 20 minutes. Comparée à l'image précédente, la corrosion est également intense, mais les cristaux de quartz de dimension micrométrique peuvent former des plateaux qui diminuent la rugosité globale, et facilitent les mesures au microscope à force atomique (échelle : 5 microns, tapping, pointe RTESP7, scan rate 0,25 Hz). [G] Photographie d'une lame mince taillée dans les cherts de la formation Gunflint, avant attaque acide. [H] Photographie d'une lame mince taillée dans les cherts de la formation Gunflint, après attaque acide de 20 minutes à 5%. Par rapport à l'image G, les modifications de l'état de surface sont bien visibles : la surface est devenue blanchâtre, et la résine excédentaire présente sur les bords de la lame mince a disparu.

Relocalisation des microfossiles après attaque acide

La relocalisation des microfossiles avec le microscope à force atomique se complique considérablement après la phase d'attaque acide. Durant cette thèse, les microfossiles de la formation Draken furent préférés aux microfossiles de la formation Gunflint pour les premiers essais d'attaque acide. La première tentative a eu lieu avec le microfossile #alpha. Comme le montre la figure 31 page 127, après une attaque acide de 40 minutes à 5 %, la cellule était particulièrement difficile à localiser.

La caméra optique équipant le microscope à force atomique, utile pour des microfossiles de taille relativement importantes (20 microns) tels que ceux de la formation Draken, voit son intérêt diminuer, à cause des phénomènes de diffusion liés à la modification de l'état de surface de

l'échantillon suite à l'attaque acide (figure 29H page 125 et figure 30 page 126).

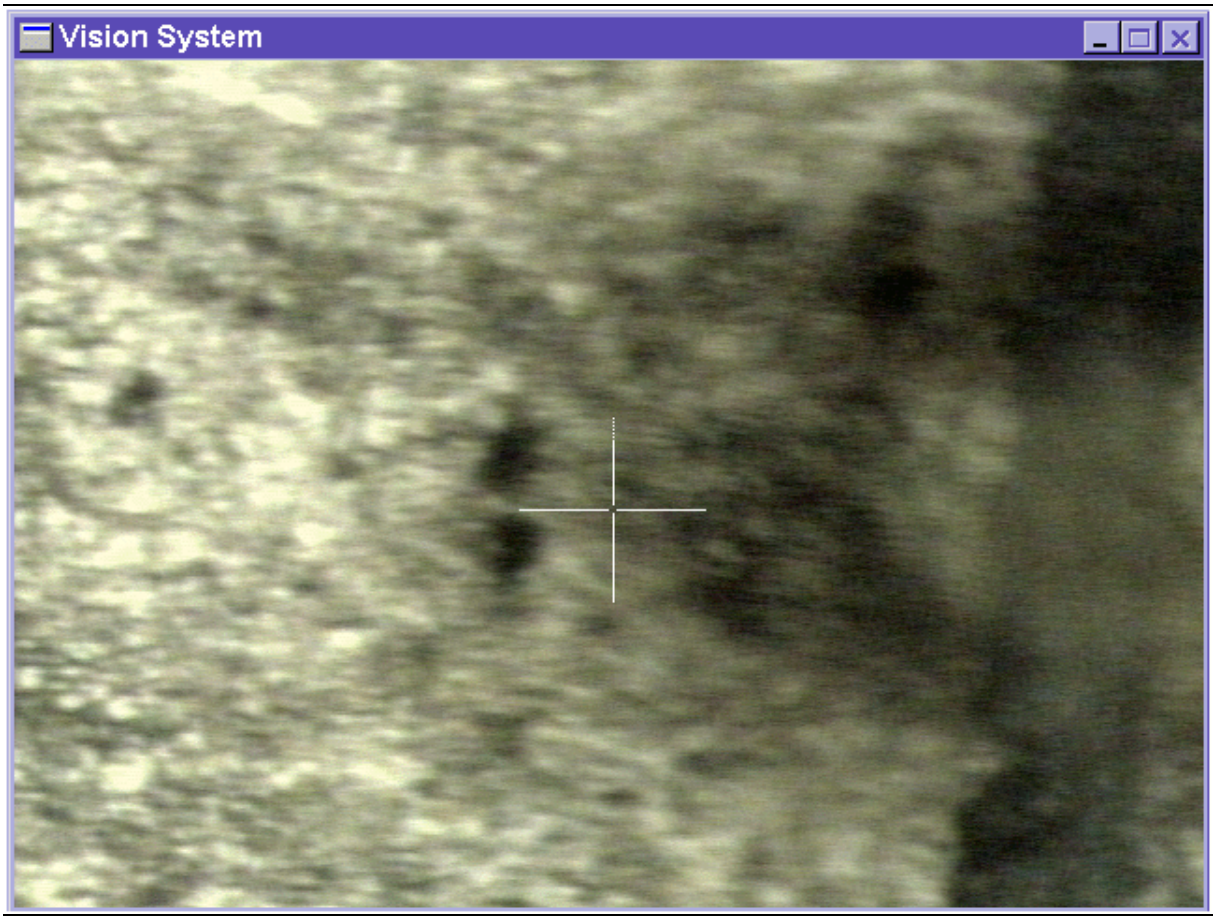


figure 30. La vision fournie par la caméra optique équipant le microscope à force atomique Dimension 3100. La croix marque l'emplacement exact (à dix microns près) d'une cellule d'*Huroniospora* (spécimen #01-4) sur une surface attaquée à l'acide fluorydrique (20 minutes à 5%). Cette dernière est totalement invisible en optique, du fait de sa petite taille, de la faible qualité de l'optique de la caméra, et des phénomènes de diffusion liée à l'état de surface de la lame mince polie de roche. La situation se complique encore lorsque l'échantillon est imagé dans l'eau, et non dans l'air comme c'est le cas ici.

L'utilisation du mode contact pour produire les images de hauteur, le seul maîtrisé à cette période, n'a pas non plus facilité les choses, étant donné l'importance du phénomène de contamination sur des surfaces attaquées (voir aussi figure 53C page 185 et figure 54B page 189). Devant l'absence de résultats, l'hypothèse qui fut alors considérée à l'époque était que la paroi n'avait pas été suffisamment dégagée par l'attaque acide. De nouvelles attaques furent donc menées sur le microfossile. Après 60 minutes à 5%, ce dernier était devenu totalement impossible à imager avec le microscope à force atomique.

Un examen au microscope électronique à balayage permis rapidement de comprendre pourquoi (figure 31D et figure 31E page 127). Premièrement, la surface de la lame mince était devenue très rugueuse. La rugosité était alors bien trop importante pour permettre des mesures au microscope à force atomique. Deuxièmement, aucune structure typique d'une paroi

cellulaire n'était apparue après 60 minutes d'attaque acide. Les mesures élémentaires en mode point (EDX) confirmaient bien la présence de traces de carbone au niveau de la paroi, et quelques particules de nature organique ont bien été aperçues sur les images en mode rétrodiffusé, mais globalement, l'ensemble de la surface était constituée de cristaux submicrométriques de quartz, le microfossile apparaissant comme une forme fantôme sur cette surface (figure 31D page 127).

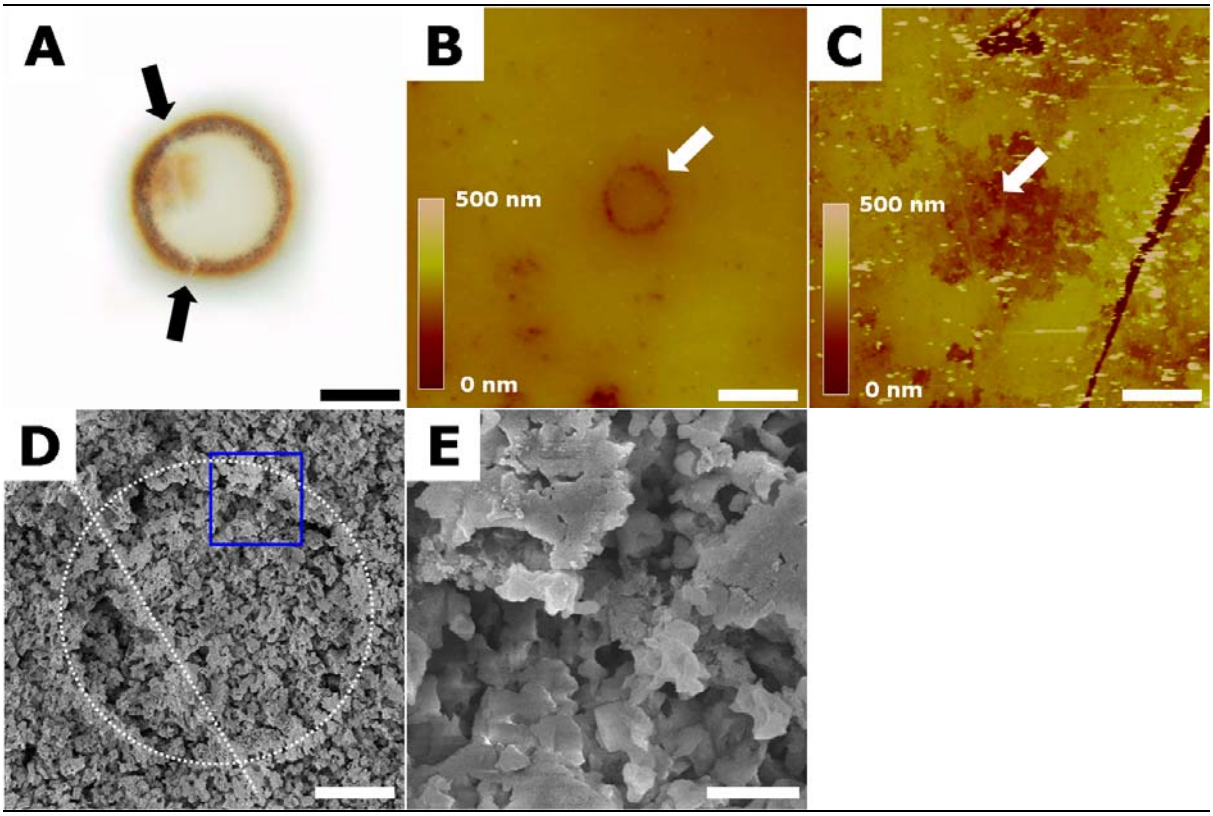


figure 31. Difficulté de relocation des microfossiles de la formation Draken après attaque acide conventionnelle [A] Cellule sphérique de *Myxococcoides* imagée au microscope optique (grossissement x1000) en lumière transmise (spécimen #alpha). La paroi organique de couleur brune est bien visible. Le microfossile est recoupé par une fracture (flèche noire) (échelle : 10 microns). [B] Image de hauteur obtenue en mode contact de la cellule exposée à la surface de la lame mince polie. Les altitudes sont représentées par une échelle de couleur, le rouge indiquant les régions les plus basses, et le jaune les régions les plus hautes. La région correspondant à la paroi organique est marquée par des cicatrices d'arrachement (échelle : 20 microns, pointe CONTR50, scan rate 1 Hz). [C] Image de hauteur obtenue en mode contact de la même région, après une attaque à l'acide fluorhydrique (40 minutes à 5%). La cellule est très difficilement localisable (flèche blanche), non seulement à cause de l'utilisation du mode contact (il s'agissait du premier essai d'attaque acide en milieu liquide), mais également à cause de la rugosité très importante crée par l'attaque acide (échelle : 20 microns, pointe OTR8, scan rate 0,5 Hz). [D] Image au microscope électronique à balayage de la surface après une attaque acide de 60 minutes à 5 %. Le microfossile est difficilement repérable, et la position de la paroi (ainsi que de la fracture recoupant le microfossile) est souligné par des lignes pointillées. Des analyses EDX en mode point ont permis de détecter de légères traces de carbone dans la paroi, et quelques particules de matière organique ont été découvertes dans la région correspondant à la paroi. Cependant, la plus grande majorité de la surface semble constituée de cristaux submicrométriques de quartz. Le rectangle bleu indique la région observée à plus fort grossissement dans l'image E (Hitachi S4200 FEG-SEM, métallisation à l'or, échelle : 5 microns). [E] Zoom sur la région indiquée dans l'image précédente par un rectangle bleu. La

surface est devenue extrêmement rugueuse suite à l'attaque acide, et toute mesure par microscopie à force atomique est devenue très difficile, voire impossible (Hitachi S4200 FEG-SEM, métallisation à l'or, échelle : 1 micron).

De nouvelles tentatives furent réalisées avec les microfossiles de la formation Gunflint. Des résultats intéressants furent obtenus rapidement, en dépit de la taille plus faible des cellules fossiles. Fort de l'expérience acquise sur les microfossiles de la formation Gunflint, les travaux sur Draken reprirent, mais en diminuant l'intensité de l'attaque acide. L'objectif était de conserver quelques cicatrices d'arrachement profondes après attaque acide pour pouvoir relocaliser plus facilement la cellule (figure 32 page 129). Des attaques acides douces (20 à 40 minutes à 1 %) furent alors effectuées, et donnèrent de bons résultats, les microfossiles étant généralement aisément repérables sur les images de hauteur obtenues en mode tapping.

Les cicatrices d'arrachement, créées durant l'étape de polissage, et correspondant à l'enlèvement de particules de matériaux carbonés provenant des parois organiques du microfossile, peuvent être utilisées pour optimiser l'étape d'attaque acide, par rapport à la difficulté potentielle de relocalisation d'un microfossile après cette dernière. De manière à faciliter au mieux cette étape, il peut effectivement être très intéressant d'ajuster l'attaque acide de manière à préserver les parties les plus profondes des cicatrices d'arrachement, qui constitueront ainsi un guide topographique permettant la relocalisation après attaque acide (figure 32 page 129). Les cicatrices d'arrachement qui ont le plus de chances de résister à l'attaque acide sont les plus profondes. Cependant, il convient d'éviter certains défauts trop profonds, susceptibles de conduire à une contamination de la pointe lors de leur imagerie (comme le montre par exemple les figures 37J et 37K). Il est à noter que certaines structures, comme des cristaux de pyrite (figure 32 page 129) peuvent aussi servir de marqueur pour la localisation des cellules sous le microscope à force atomique.

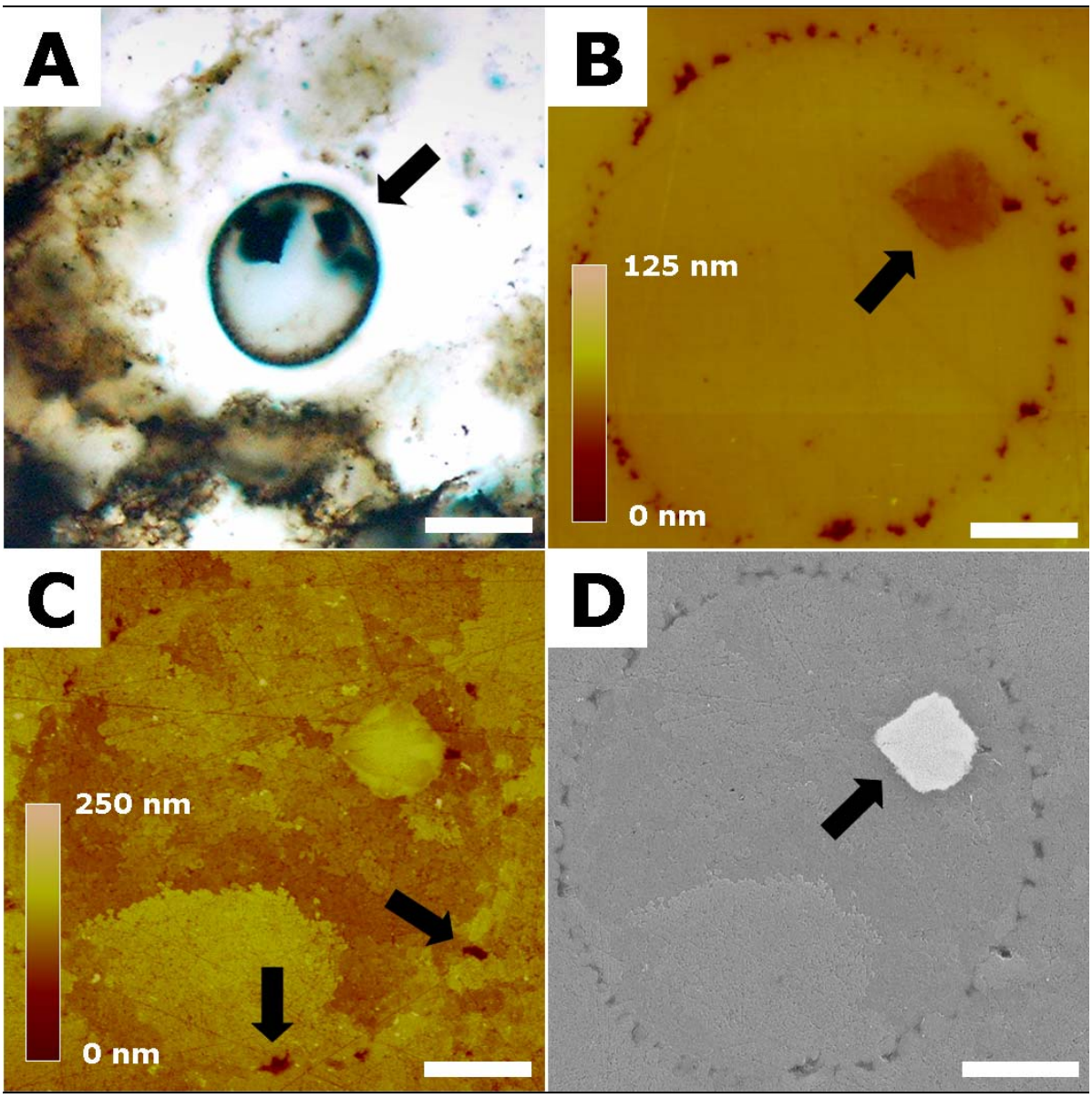


figure 32. Observations effectuées sur une cellule de *Myxococcoides* de la formation Draken (spécimen #col_G). [A] Cellule de *Myxococcoides* imagée au microscope optique (grossissement x500) en lumière transmise. La cellule mesure 28 microns de diamètre. Des cristaux de pyrite, indiqués par la flèche noire, sont présents dans la lumière cellulaire (échelle : 20 microns). [B] Image de hauteur obtenue en mode contact de la cellule exposée à la surface de la lame mince polie avant attaque acide. Les altitudes sont représentées par une échelle de couleur, le rouge indiquant les régions les plus basses, et le jaune les régions les plus hautes. Les régions correspondant à la paroi organique sont marquées par des cicatrices d'arrachement, liées à la désagrégation de la matière organique durant le polissage de la surface de la lame mince. La flèche noire pointe un cristal de pyrite affleurant à la surface de la lame mince de roche (échelle : 5 microns, pointe CONTR50, scan rate 1 Hz). [C] Image de hauteur obtenue en mode tapping de la même cellule, après une attaque acide très douce (30 minutes à 1%). L'objectif était d'attaquer la surface de la lame mince, tout en conservant les cicatrices d'arrachement (flèches noires), qui servent ainsi d'indicateur pour faciliter la relocalisation de la cellule après attaque acide (comparer avec l'image précédente B) (échelle : 5 microns, pointe RTESP7, scan rate 0,25 Hz). [D] Image au microscope électronique à balayage de la même région que l'image C, montrant les cicatrices d'arrachement, ainsi que le cristal de pyrite (flèche noire). Comparer avec l'image précédente C (Hitachi S4200 FEG-SEM, 10 000 x, sans métallisation) (échelle : 5 microns).

Cependant, même avec une attaque acide douce (20 à 40 minutes à 1%), et une conservation éventuelle d'une partie des cicatrices d'arrachement créées durant le polissage de la lame mince de roche, la relocalisation des microfossiles de la formation Draken après attaque acide reste difficile et délicate, étant donné l'aspect très hétérogène de la surface, du à une corrosion différentielle à l'échelle (sub)micrométrique. Comme nous le verrons plus loin, seule l'imagerie de phase, ou le relief est gommé, permet de repérer avec certitude la position de leurs parois (figure 37 page 144).

Les cicatrices d'arrachements créées durant le polissage des lames minces ont un dernier avantage. En permettant de localiser un microfossile donné avant attaque acide, ces dernières permettent aussi d'effectuer des mesures en mode contact, et donc de profiter de modes d'observation comme l'imagerie de force latérale, ou le mode force volume (et dont les résultats sont présentés ci-dessous). La surface étant fragilisée par l'attaque acide, le mode contact ne peut effectivement pas être employé après l'étape d'attaque acide, sous peine d'assister à une détérioration de la surface, et surtout à une contamination rapide et très importante de la pointe, entraînant une baisse dramatique de résolution (voir le chapitre discussion).

Imagerie de force latérale

Avant attaque acide, les images de hauteur produites par le microscope à force atomique n'ont pas d'autres utilités que de permettre une étude morphométrique de l'empreinte que le microfossile a laissé à la surface de la section polie, ou de caractériser l'éventuelle contamination de la surface de la lame mince (voir figure 52 page 184).

Il est cependant possible de distinguer les différences de propriétés physiques existant entre la paroi du microfossile et la matrice minérale dans lequel il est inclus grâce à l'imagerie de force latérale.

Les images de force latérale n'ont jamais été concluantes sur les microfossiles organiquement préservés de la formation Draken et Gunflint. Aucune différence relative de friction/torsion n'a pu être clairement démontrée au niveau de la région correspondant à la paroi organique, par rapport à la matrice minérale. Les effets de friction parasites liés au relief des cicatrices d'arrachement étaient effectivement trop importants, et ont pu noyer un signal véritablement du à une différence de friction entre la matière organique fossile et la matrice de quartz.

L'utilité de l'imagerie de force latérale a cependant pu être démontrée dans le cas des filaments pyritisés de la formation Gunflint. La caractéristique de ces cellules particulières était de présenter une topographie relativement plate et homogène au niveau des parois cellulaires, sans la présence des cicatrices d'arrachement typiques des parois organiques. Il est probable que l'absence d'une topographie

prononcée a permis au signal de force latérale de ressortir plus facilement.

La figure 43 page 161 montre une carte de friction de deux filaments coalescents de *Gunflintia minuta*, dont la paroi organique a été remplacée par un sulfure de fer, et qui possèdent un diamètre sensiblement supérieur (2,5 microns) à ceux des filaments organiquement préservés de *Gunflintia minuta* (1,5 microns en moyenne). Cet élargissement est certainement à mettre sur le compte de processus diagénétiques (Schopf et Walter, 1983). Le filament de gauche est complet, tandis que le filament situé à droite a été partiellement détruit. La carte fournie par l'imagerie de force latérale indique que la paroi du microfossile se comporte comme un site de haute friction, par rapport à la matrice de quartz environnante et le matériau remplissant la lumière de la cellule. La différence de propriété mécanique, liée ici à des différences de minéralogie, était déjà visible durant l'acquisition de l'image de hauteur (figure 43C page 161). Etant très mou, le matériau constituant la paroi du microfossile a effectivement été enlevé et transporté par la pointe du microscope à force atomique, avant de s'accumuler sur les bords de la zone balayée par la pointe en formant un petit bourrelet, bien visible sur l'image de hauteur (figure 43C page 161).

Le microscope à force atomique n'est pas capable de reconnaître par lui-même la composition du matériel constituant la paroi de la cellule, mais il prouve que ce matériel n'est pas similaire, d'un point de vue de sa composition, à la matrice environnante, ainsi qu'au matériau remplissant la lumière cellulaire. Des observations optiques en lumière réfléchie (figure 43A page 161) et des analyses EDX (figure 43H page 161) supportent ce résultat, et montrent que les filaments sont effectivement remplacés par des sulfures de fer, la lumière cellulaire étant comblée par de la silice. Les cartes EDX n'ont pas permis de déceler du carbone au niveau de la paroi pyritisée à cause de la faible sensibilité du mode de cartographie, mais des analyses plus sensibles en mode point ont clairement montré la présence de carbone au sein des sulfures de fer. Des analyses Raman n'ont pas été effectuées sur cet échantillon. Il pourrait être intéressant de les réaliser dans l'avenir, de manière à vérifier si le signal du aux kérogènes peut être détecté dans un spectre qui sera dominé par la pyrite et la silice.

Il est intéressant de noter que des images LFM réalisées sur des baguettes de pyrite de 1,5 microns de diamètre incluses dans les cherts de la formation Gunflint et ressemblant fortement aux filaments pyritisés (à l'exception de la section en forme d'étoile, qui signe leur nature minérale) ne montrent aucune zone de forte friction (figure 44 page 163). Il est donc possible de penser que la friction enregistrée dans le cas des filaments pyritisés est due à une propriété de la pyrite qui a remplacé la matière organique. Celle-ci semble être plus tendre que la pyrite des baguettes abiogéniques, peut-être parce qu'elle contient encore des traces de matériaux organiques.

L'imagerie de force latérale telle qu'elle a été mise en œuvre ici peut-être utilisée pour réaliser des cartographies à force chimique. Ce mode a par exemple été employé par Frisbie et al. (1994) pour cartographier les forces de friction existant entre une pointe fonctionnalisée (fonction CH_3 ou COOH), et une surface présentant des motifs géométriques recouverts de groupements chimiques bien définis (CH_3 ou COOH). L'étude a montré qu'il était ainsi possible de produire des images de friction correspondant à la distribution spatiale de groupes fonctionnels sur une surface donnée. Dans ce travail, la friction entre la pointe et la pyrite est due à des interactions non spécifiques, mais ce résultat montre néanmoins que l'imagerie de force latérale peut être choisie comme technique d'imagerie pour la microscopie à force chimique, pour l'étude de microfossiles précambriens, quand des pointes fonctionnalisées par des sondes dirigées contre des biomarqueurs moléculaires seront disponibles (voir chapitre perspectives).

Imagerie force volume

L'imagerie de force latérale peut seulement fournir une mesure qualitative des forces latérales subies par le levier lors du balayage de la surface de l'échantillon. L'avantage offert par le mode force volume est la possibilité de réaliser des mesures quantitatives des forces (importante pour la microscopie à force chimique, la détermination de la spécificité d'une interaction pointe surface nécessitant des mesures quantitatives) qui s'exercent entre la pointe du microscope à force atomique et un point donné de la surface analysée.

La figure 38H page 151 montre une carte 2D des forces subies durant le balayage d'une cellule d'*Huroniospora* (spécimen #01-4). Le jeu de données force volume acquis durant la mesure a été traité de manière à extraire la force d'adhésion, due à des interactions non spécifiques entre la surface et la pointe, au moment de la rétraction de cette dernière. La carte couvre une région d'une surface de 10 microns^2. L'axe vertical indique la force d'adhésion en nanonewtons (nN). La carte montre clairement que les régions correspondant à la force d'adhésion maximale sont localisées exactement au niveau de la position topographique de la paroi carbonée du microfossile. La force d'adhésion maximale enregistrée durant la mesure est de 13 nN. La figure 39H page 153 montre une carte d'adhésion similaire, obtenue cette fois au niveau de la section d'un filament de *Gunflintia minuta*. La force d'adhésion maximale enregistrée durant la mesure est de 200 pN.

Les cartes d'adhésion, comme celles présentées au niveau des figure 38H page 151 et figure 39H page 153 prouvent que le matériau carboné constituant les parois des microfossiles de la formation Gunflint est plus adhésif que la matrice de quartz environnante, comme Kempe et al. (2002) l'avait déjà noté sur un transect 1D effectué au travers de la paroi d'un acritarche. La capacité 2D de l'imagerie force-volume démontre que

des corrélations intéressantes peuvent être effectuées entre l'image topographique d'un microfossile, et des cartes de force telle que l'adhésion.

Aucune corrélation paroi/carte d'adhésion n'a été notée au niveau des microfossiles de la formation Draken (seul un très faible signal d'adhésion a été noté pour le spécimen #ppo). Contrairement aux microfossiles de la formation Gunflint, qui sont sauf exception tous caractérisés par une paroi continue et solide de kérogènes, la paroi des microfossiles de la formation Draken est principalement constituée de silice, la matière organique n'étant présente qu'à l'état de traces, sous la forme de films recouvrant des cristaux de quartz (voir ci-dessous). Dans le cas des microfossiles de la formation Draken, il est donc possible que la quantité de kérogènes ne soit pas suffisante pour laisser sa signature dans les cartes force volume.

Au vu des observations que nous avons effectué, les résultats du mode force volume dépendent d'un certain nombre de paramètres :

- Nature du matériau possédant les propriétés adhésives : si les kérogènes présentent manifestement une adhésion plus importante que la matrice de quartz, ce n'est pas le cas d'autres matériaux. Ainsi, aucune différence d'adhésion n'a été notée pour les filaments de la formation Gunflint remplacés par la pyrite, et ce, malgré leur comportement en imagerie de force latérale.
- Concentration du matériau : le signal d'adhésion obtenu dans le mode force volume semble dépendant de la concentration du kérogène. Ainsi, l'adhésion la plus forte a été observée pour des microfossiles de la formation Gunflint possédant une paroi organique intègre, composée presque entièrement de kérogènes. Par opposition, pour la majorité des microfossiles de la formation Draken, caractérisés par une paroi majoritairement composée de silice (la matière organique n'étant présente qu'en petite quantité), aucun signal, ou des signaux très faibles, ont été enregistrés dans le mode force volume.
- Le niveau d'adhésion moyen de l'échantillon. Toute surface exposée à l'air se couvre d'une couche moléculaire d'eau, qui peut engluer la pointe en mode contact, et donner un signal d'adhésion plus ou moins fort. Dans certains cas, il peut arriver que l'adhésion enregistrée au niveau de la matrice soit extrêmement forte, et qu'elle s'approche de la limite maximale de détection du microscope à force atomique. Dans ce cas, il peut être difficile, voire impossible, d'obtenir des valeurs d'adhésion dans les zones correspondantes à la paroi organique, la limite de détection étant dépassée.

L'adhésion enregistrée dans le mode force volume pour les microfossiles de la formation Gunflint n'est manifestement pas due à un effet topographique. Effectivement, l'échantillon n'ayant encore pas subi d'attaque acide, la surface analysée est encore très plate. De plus, des cicatrices d'arrachement possédant une géométrie similaire à celle de la

tranchée qui marque la position de la paroi organique, et situées au niveau de la matrice minérale, ne donnent pas de signal d'adhésion. Enfin, les régions présentant un fort signal d'adhésion sont presque toujours caractérisées avant attaque acide par des cicatrices d'arrachement créées par le polissage de la lame mince, et par une paroi carbonée après attaque acide.

En permettant d'imager le contraste existant entre des régions de faibles adhésions et de fortes adhésions à la surface d'un échantillon, le mode force volume s'est montré capable de distinguer la position de la paroi carbonée d'un microfossile, parce que cette dernière présente des propriétés adhésives plus importantes que la matrice de quartz environnante (sauf si cette dernière est salie par de nombreuses particules de matières organiques). Le mode force volume peut donc être directement utilisé pour confirmer l'exposition de la paroi organique d'un microfossile à la surface d'une lame mince de roche lors de l'étape du polissage, avant toute attaque acide ou autres traitements. Un tel microfossile sera ainsi considéré comme une cible de choix pour les études post-etching.

Comme l'imagerie de force latérale, le mode force volume est utilisable pour la cartographie par microscopie à force chimique. Comparé au premier, qui enregistre uniquement la valeur de friction pour un point donné de la surface, le mode force volume enregistre une courbe de force complète pour chaque point de la surface, qui peut ensuite être utilisée pour extraire précisément la valeur de l'adhésion.

L'imagerie de force latérale et l'imagerie force volume prouvent que la microscopie à force atomique peut être utilisée pour étudier des microfossiles précambriens directement après polissage de la lame mince, et que l'étape d'attaque acide, capable d'exposer les parois organiques des cellules, n'est donc pas obligatoire, contrairement à ce que certains auteurs indiquent (Schopf, 2004).

Microscopie à force atomique après attaque acide

Formation Draken

Attaque acide classique

Comme décrit plus haut, une attaque acide conventionnelle (10 à 40 minutes avec de l'acide fluorhydrique à 5%) change considérablement l'état de surface des lames minces polies taillées dans les cherts de la formation Draken. L'effet de corrosion est très hétérogène, certaines régions étant fortement excavées, alors que d'autres restent plus ou moins intactes (figure 31C page 127 et figure 32C page 129). La taille des cristaux de quartz (200 à 500 nanomètres en moyenne) donne naissance à une rugosité plus importante que celle observée dans le cas des cherts de la formation Gunflint. Effectivement, dans le cas de cette dernière, les cristaux sont de dimensions micrométriques. Etant donné que le sommet de chaque cristal est une zone plus ou moins aplatie, la surface occupée par des régions favorables aux mesures AFM est plus importante dans le cas des cherts de Gunflint que dans le cas des cherts de Draken. La rugosité très importante après attaque acide a de plus tendance à masquer la position exacte de la paroi organique des microfossiles de Draken, et les cellules sont généralement difficilement localisables. Dans le pire des cas, la rugosité empêche toute mesure par microscopie à force atomique (figure 31 page 127).

Aucun résultat pertinent n'a donc pu être obtenu sur des lames minces de la formation Draken attaquées selon le protocole classique, hormis le fait que, contrairement à ce qui est observé avec les microfossiles de la formation Gunflint, la paroi semble constituée presque exclusivement de cristaux submicrométriques de quartz, sans montrer de structure particulière (figure 31 page 127).

Attaque acide douce

Une diminution de l'intensité de l'attaque acide (20 à 40 minutes à 1%) a cependant permis d'étudier les microfossiles de la formation Draken par microscopie à force atomique.

Après corrosion, la grande majorité des régions balayées par la pointe du microscope apparaît composée de cristaux submicrométriques de quartz (200 à 500 nanomètres en moyenne), étroitement imbriqués les uns dans les autres, et formant un dallage caractéristique, qui se retrouve sur toutes les images de hauteur. Ce type d'observation avait déjà été réalisé lors des attaques acides classiques.

La principale différence de l'attaque douce par rapport aux attaques classiques est d'avoir permis la mise en évidence de petites particules submicrométriques, qui apparaissent en relief sur les images de hauteur dans des régions corrodées, et qui semblent se situer dans un secteur pouvant correspondre à celui de la paroi des microfossiles (figure 33G

page 136, figure 34D page 138, figure 35G page 141 et figure 36E page 143).

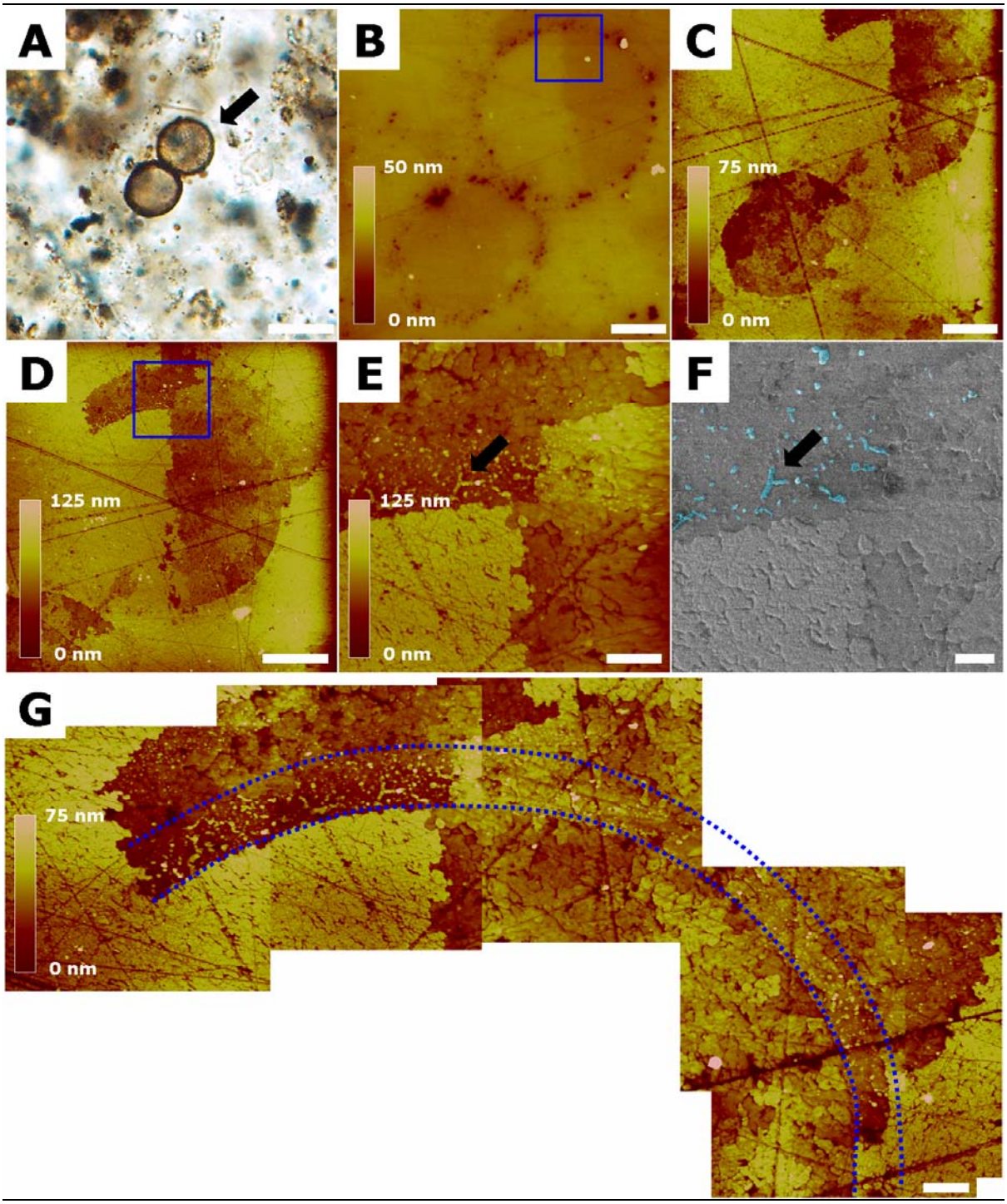


figure 33. Observations effectuées sur une cellule de *Myxococcoides* de la formation Draken (spécimen #hum-tw). [A] Deux cellules de *Myxococcoides* imagées au microscope optique (grossissement x500) en lumière transmise. La cellule supérieure (indiquée par une flèche noire) mesure 16,5 microns de diamètre. Il s'agit de la cellule étudiée après attaque acide en D, E, F et G (échelle : 20 microns). [B] Image de hauteur obtenue en mode tapping des deux cellules de l'image précédente, exposées à la surface de la lame mince polie. Les altitudes sont représentées par une échelle de couleur, le rouge indiquant les régions les plus basses, et le jaune les régions les plus hautes. Les régions correspondant à la paroi organique sont marquées par des cicatrices d'arrachement, liées à la désagrégation de la matière organique

durant le polissage de la surface de la lame mince. Le rectangle bleu délimite la région observée après attaque acide et à plus fort grossissement en E (échelle : 5 microns, pointe RTESP7, scan rate 0,5 Hz). [C] Image de hauteur obtenue en mode tapping des deux cellules après attaque acide (30 minutes à 1 %). Comme le montre l'image, l'attaque acide a été particulièrement inégale. La partie gauche de l'intérieur de la cellule supérieure a résisté à la corrosion, ce qui n'est pas le cas de la partie droite, qui a été fortement attaquée (échelle : 5 microns, pointe RTESP7, scan rate 0,25 Hz). [D] Zoom sur la cellule supérieure après attaque acide. L'hétérogénéité de l'attaque est encore une fois bien visible. Dans la partie supérieure de la cellule, des petites particules semblent délimiter la position de la paroi cellulaire. Le rectangle bleu délimite la région observée après attaque acide et à plus fort grossissement en E (échelle : 5 microns, pointe RTESP7, scan rate 0,25 Hz). [E] Région correspondant aux rectangles bleus sur les images B et D. Dans ce secteur, la partie correspondant à la paroi cellulaire est caractérisée par la présence de nombreuses particules d'un diamètre de 100 à 200 nm. Ces dernières sont réelles, et ne sont pas dues à un artefact provoqué par un émoussement ou une contamination de la pointe, comme le prouve l'image suivante. La flèche noire pointe sur une particule en forme de Y, bien reconnaissable sur cette image et l'image suivante (échelle : 1 micron, pointe RTESP7, scan rate 0,25 Hz). [F] Même région que E, observée au microscope électronique à balayage avec un grossissement a peu près équivalent. Les particules situées dans la région correspondant à la paroi cellulaire sont bien visibles (elles sont ici indiquées en fausses couleurs, pour des raisons de clarté). La flèche noire pointe sur une particule en forme de Y, bien reconnaissable sur cette image et l'image précédente (échelle : 500 nm). [G] Mosaïque constituée de six images obtenues en mode tapping après l'attaque acide, et montrant les portions de parois caractérisées par la présence de particules submicrométriques (échelle : 1 micron, pointe T-EAR M*1-15, scan rate 0,25 Hz).

Ce résultat a été confirmé au fil des observations, non seulement sur les images de hauteur acquises sur de nombreux microfossiles individuels, mais surtout grâce aux images de phase (figure 36 page 143 et figure 37 page 144), qui permettent de gommer le relief et qui font particulièrement bien ressortir les petites particules submicrométriques.

Contrairement aux microfossiles de la formation Gunflint, qui possèdent une paroi organique continue et cohérente que l'on peut suivre de bout en bout, les particules qui marquent l'emplacement de la paroi des microfossiles de la formation Draken n'apparaissent qu'à certains endroits de la paroi. Effectivement, leur apparition est conditionnée par l'intensité de la corrosion. Seules les régions de la paroi ayant été corrodées laissent entrevoir ces particules, qui apparaissent alors en relief par rapport à un fond rouge. Dans les régions non corrodées, ces particules ne sont pas visibles. Elles sont pourtant présentes, mais ne peuvent pas apparaître, étant donné que le contraste topographique sur lequel elles peuvent se détacher est absent. Dans ce cas, la localisation précise de la paroi du microfossile peut être délicate, sinon impossible (figure 34D page 138).

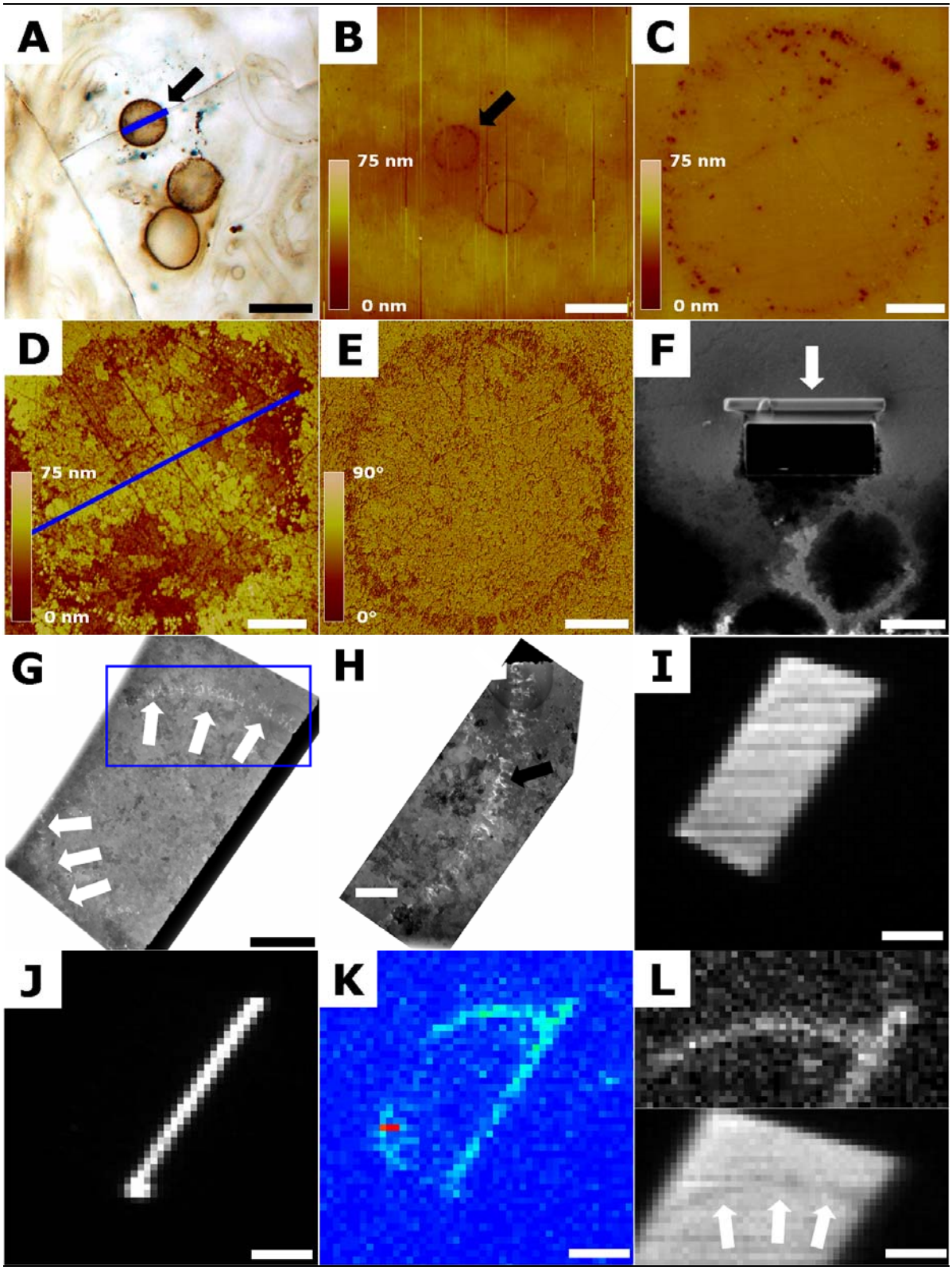


figure 34. Observations effectuées sur une cellule de *Myxococcoides* de la formation Draken (spécimen #tr3). [A] Cellules de *Myxococcoide* imagées au microscope optique (grossissement x500) en lumière transmise. La cellule indiquée par la flèche noire, et qui sera étudiée dans cette figure, mesure 14 microns de diamètre. Elle est préservée dans un clast de chert, qui renferme aussi de nombreux filaments de cyanobactéries. La paroi organique brune est bien visible. La ligne bleue indique l'endroit ou la coupe ultra-mince (FIB) a été effectuée (échelle : 20 microns). [B] Image de hauteur obtenue en mode contact de la région imagée en A. Les

altitudes sont représentées par une échelle de couleur, le rouge indiquant les régions les plus basses, et le jaune les régions les plus hautes. La région correspondant à la paroi organique de la cellule fléchée est marquée par des cicatrices d'arrachement, liées à la désagrégation de la matière organique durant le polissage de la surface de la lame mince. Ces cicatrices sont également visibles sur la cellule possédant une forme en citron, et située en bas à droite (échelle : 20 microns, pointe CONTR50, scan rate 1 Hz). [C] Image de hauteur obtenue en mode contact de la cellule indiquée par une flèche noire dans les deux images précédentes. Notez les cicatrices d'arrachement qui délimitent la paroi cellulaire, ainsi que les deux fractures pratiquement orthogonales qui traversent la cellule (échelle : 3 microns, pointe CONTR50, scan rate 2 Hz). [D] Image de hauteur obtenue en mode tapping de la même cellule, après une attaque acide douce (40 minutes à 1%). La corrosion de la surface par l'acide fluorhydrique est ici vraiment hétérogène, et il est particulièrement difficile de distinguer la position de la paroi du microfossile. La cellule n'a pu être retrouvée après attaque acide qu'en utilisant les défauts de polissage visibles sur les images de hauteur avant attaque acide, sans lesquelles la relocalisation n'aurait sans doute pas été possible. La paroi est caractérisée par endroit par la présence de particules arrondies de 100 à 200 nanomètres de diamètre. En dehors de ces particules, la surface est composée presque exclusivement de cristaux de quartz de 200 à 500 nanomètres. La ligne bleue indique l'endroit ou la coupe ultra-mince a été effectuée (échelle 3 microns, pointe RTESP7, scan rate 0,25 Hz). [E] Image de phase du microfossile après attaque acide. Les différences de hauteur (topographiques) sont gommées, et le microfossile est désormais clairement visible (échelle : 3 microns, pointe RTESP7, scan rate 0,25 Hz). [F] Image obtenue par le biais du microscope électronique à balayage équipant le système FIB. La région sélectionnée pour la découpe (indiquée par une ligne bleue sur les images A et D) a été protégée par le dépôt d'une couche micrométrique de platine (flèche blanche), et l'excavation avec les ions gallium a commencé en dessous de cette région. Notez que le dépôt de platine a révélé clairement les parois organiques des deux microfossiles situés en dessous de la cellule découpée, et visibles sur l'image A. Ce phénomène confirme la grande affinité de la matière organique fossile pour les éléments métalliques (échelle : 10 microns). [G] Coupe ultra-mince (15,7 microns de largueur pour 6 microns de hauteur et 100 nm d'épaisseur) observée au STEM. Les cristaux submicrométriques de quartz apparaissent en gris foncé, tandis que la matière organique apparaît en gris clair. La zone rectangulaire noire correspond au dépôt de platine. Le rectangle bleu indique la région observée à plus fort grossissement en H (échelle : 1 micron). [H] Image montrant la paroi organique cellulaire tel qu'elle apparaît au STEM. Contrairement à ce qui peut être interprété à partir des images de hauteur AFM, le matériel carboné ne forme pas des particules submicrométriques, mais se présente sous la forme d'un film ultramince, adhérant aux cristaux de quartz et remplissant les cavités entre les cristaux. Un des aspects remarquables de cette image est que les films organiques semblent orientés radialement le long de la paroi (cette orientation est soulignée par des flèches sur l'image précédente). Malgré le fait que la matière organique fossile soit totalement amorphe, elle a conservé une orientation spatiale. Son origine est inconnue, mais pourrait provenir du remplissage antérieur de la cellule par de la calcite fibreuse, avant la silicification. Les cercles sombres visibles sur l'image sont des régions de contamination créées lors des analyses élémentaires au microscope électronique en transmission à haute résolution (HR-TEM). [I] Carte de fluorescence obtenue à 2,5 keV sur la ligne ID21 de l'ESRF montrant la distribution du silicium sur la coupe ultramince (FIB) découpée dans le spécimen #tr3 (échelle : 5 microns). [J] Carte de fluorescence obtenue à 2,5 keV sur la ligne ID21 de l'ESRF montrant la distribution du platine déposé à la surface de la lame ultramince (FIB) avant la découpe (échelle : 5 microns). [K] Carte de fluorescence obtenue à 2,5 keV sur la ligne ID21 de l'ESRF montrant la distribution du soufre sur la coupe ultramince (FIB) découpée dans le spécimen #tr3. Des traces de soufre sont clairement présentes au niveau de la paroi organique du microfossile. L'énergie du pic du platine étant très proche de celui du soufre, le dépôt de platine apparaît aussi sur cette carte (échelle : 5 microns). [L] Carte de fluorescence obtenue à 2,5 keV sur la ligne ID21 de l'ESRF montrant en détail la distribution du soufre (en haut) et du silicium (en bas) au niveau de la paroi organique du microfossile #tr3. Les flèches blanches indiquent une déplétion en silicium correspondant à la position de la paroi organique du microfossile (échelle : 2,5 microns).

Cependant, même quand la région correspondant à la paroi n'est pas corrodée, il est parfois possible de reconnaître l'emplacement du microfossile, la lumière cellulaire pouvant être effectivement plus excavée par l'acide que la matrice de quartz externe. Ainsi, on reconnaît parfaitement la forme sphérique du microfossile #r1 (figure 35D page 141), quand bien même les particules submicrométriques ne marquent qu'un petit arc de la paroi. Il est à noter que la différence de corrosion peut parfois donner naissance à des phénomènes remarquables. Ainsi, dans le cas du microfossile #hum-tw (figure 33D page 136), l'acide fluorhydrique a dégagé le côté droit de la lumière cellulaire, tout en laissant intact le côté gauche : la cellule semble avoir été découpée au couteau. Le même phénomène a touché l'une des cellules du groupe #ppo (figure 36E page 143). Le côté supérieur droit de la cellule a été totalement évidé, alors que le côté inférieur gauche ne l'est que partiellement, ce qui donne naissance à un contraste spectaculaire. Seule cette cellule a bénéficié de ce phénomène, les trois autres microfossiles du groupe étant pratiquement impossible à distinguer sur les images de hauteur (figure 36C page 143).

Quelle peut-être la nature des particules submicrométriques qui délimitent parfois la paroi organique des microfossiles de la formation Draken ? Etant donné leur taille, très similaire à celles des cristaux submicrométriques de quartz qui constituent la matrice et qui remplissent la lumière cellulaire, il pourrait s'agir de particules de quartz, qui pour une raison ou une autre ont résisté à la corrosion. Cependant, leur résistance à l'attaque acide semble suggérer qu'elles sont constituées d'un matériau différent du quartz, ou qu'il s'agit de cristaux de quartz recouverts par une pellicule d'un matériau autre que le quartz.

Imagerie de phase

L'utilisation de l'imagerie de phase, sensible aux différences de propriétés physiques locales des matériaux constituant l'échantillon, montre clairement que ces particules sont constituées d'un matériau différent du quartz. Sur les images de phase (figure 37 page 144), les différences topographiques sont gommées (plus ou moins parfaitement), et la seule structure mise en contraste correspond à la paroi. Les figure 34E page 138 et figure 35E page 141 fournissent également une excellente illustration de ce phénomène. Alors qu'il est particulier délicat de distinguer les contours des microfossiles sur les images de hauteur, ces derniers apparaissent clairement sur les images de phase acquises simultanément.

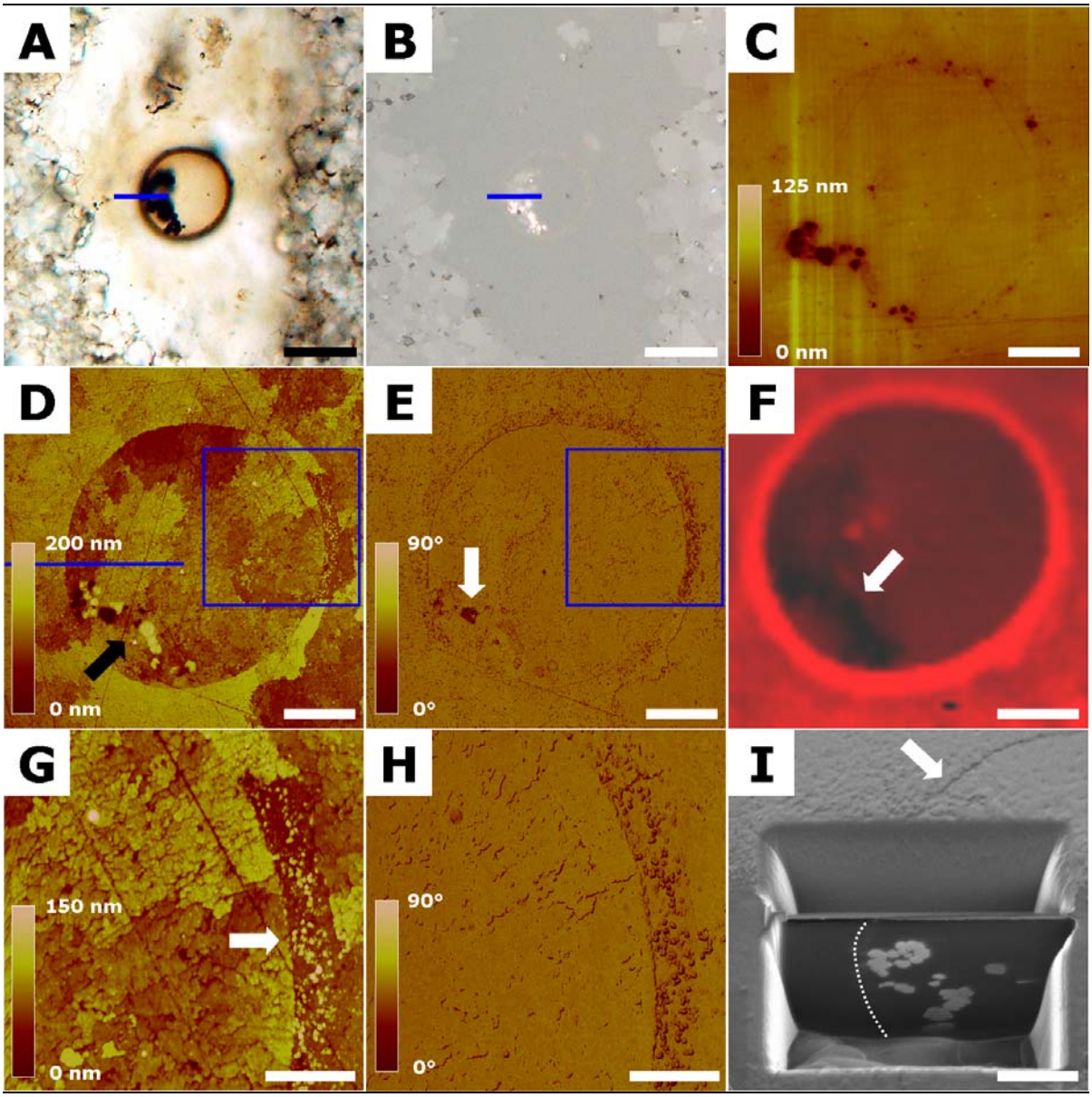


figure 35. Observations effectuées sur une cellule de *Myxococcoides* de la formation Draken (spécimen #r1). [A] Cellule de *Myxococcoide* imagée au microscope optique (grossissement x500) en lumière transmise. La cellule mesure 23 microns de diamètre, et est préservée dans un clast de chert. La paroi organique brune est bien visible, et des cristaux de pyrite sont visibles dans la lumière cellulaire. La ligne bleue indique l'endroit ou la coupe ultra-mince (FIB) a été effectuée (échelle : 20 microns). [B] Même microfossile, observé cette fois au microscope optique (grossissement x500) en lumière réfléchie. Des défauts mécaniques de la surface polie (surtout visibles lors des observations directes, et difficiles à photographier) soulignent la position de la paroi organique, et les cristaux de pyrite affleurant en surface sont bien visibles (échelle : 20 microns). [C] Image de hauteur obtenue en mode contact de la cellule exposée à la surface de la lame mince polie. Les altitudes sont représentées par une échelle de couleur, le rouge indiquant les régions les plus basses, et le jaune les régions les plus hautes. Les régions correspondant à la paroi organique sont marquées par des cicatrices d'arrachement, liées à la désagrégation de la matière organique durant le polissage de la surface de la lame mince (échelle : 6 microns, pointe CONTR50, scan rate 1 Hz). [D] Image de hauteur obtenue en mode tapping de la même cellule, après une attaque acide douce (40 minutes à 1%) qui a enlevé en moyenne 90 nm de matériel de la surface de la lame mince. Malgré une corrosion hétérogène de la surface (certains régions sont fortement attaquées, tandis que d'autres sont intactes), il est possible de reconnaître le contour arrondi du microfossile. La région correspondant à la paroi organique cellulaire est

particulièrement bien visible sur la droite (rectangle bleu), et est caractérisée par la présence de particules arrondies de 100 à 200 nanomètres de diamètre. En dehors de ces particules, la surface est composée presque exclusivement de cristaux de quartz de 200 à 500 nanomètres. Des cristaux de pyrite, résistants à l'acide fluorhydrique et situés dans la lumière cellulaire, sont visibles en bas à gauche (flèche noire). Le rectangle bleu indique la région observée avec un plus fort grossissement en G. La ligne bleue indique l'endroit ou la coupe ultra-mince a été effectuée (échelle : 6 microns, pointe RTESP7, scan rate 0,25 Hz). [E] Image de phase du microfossile après attaque acide. L'imagerie de phase, en étant sensible aux différences de propriétés physiques des matériaux de surface, révèle la position de la paroi organique du microfossile, qui possède des propriétés différentes de la matrice minérale. L'un des avantages du mode de phase est que la topographie est gommée, ce qui donne des images plus claires. La flèche blanche indique une cavité créée par le départ d'un cristal de pyrite durant le polissage de la lame mince (déjà visible en C & D). Il s'agit du seul relief véritablement visible sur cette image de phase, la plupart des hétérogénéités liées à l'attaque acide étant masquées. Le rectangle bleu indique la région observée avec un plus fort grossissement en H (échelle 6 microns, pointe RTESP7, scan rate 0,25 Hz). [F] Carte montrant la distribution de la matière organique obtenue par microspectrométrie Raman. L'échelle de couleur code l'intensité de la bande G à 1600 cm^{-1}. Comme le montre cette carte, la paroi du microfossile est clairement enrichie en matière organique, comparée à la matrice environnante, qui n'est cependant pas dépourvue de carbone. Notez l'absence de signal (zone noire) dans les régions correspondant aux cristaux de pyrite (flèche blanche) (échelle : 6 microns). [G] Image de hauteur de la région indiquée par un rectangle bleu dans l'image D. Dans ce secteur, la presque totalité de la paroi est caractérisée après attaque acide par des particules submicrométriques. Une petite partie de la paroi (flèche blanche) a cependant résisté à l'attaque acide, et dans ce secteur, ses limites sont à peine visibles (échelle : 2,5 microns, tapping, pointe RTESP7, scan rate 0,25 Hz). [H] Image de phase de la région indiquée par un rectangle bleu dans l'image E. Dans ce secteur, la presque totalité de la paroi est caractérisée après attaque acide par des particules submicrométriques (échelle : 2,5 microns, tapping, pointe RTESP7, scan rate 0,25 Hz). [I] Image obtenue au microscope électronique à balayage d'une coupe ultra-mince (15 microns de largueur, 5,5 microns de hauteur et 100 nm d'épaisseur), découpée par la technique FIB le long de la ligne bleue indiquée sur les images A et D. La coupe n'a pas encore été extraite, et demeure en place dans sa cavité creusée par le faisceau d'ions. La coupe montre que des cristaux de pyrite (petites structures gris clair) sont bien présents non seulement en surface, mais aussi plus en profondeur, dans le volume interne délimité par la paroi organique. La position de cette dernière est marquée par un nuage blanc très diffus, surligné ici en pointillé (échelle : 4 microns).

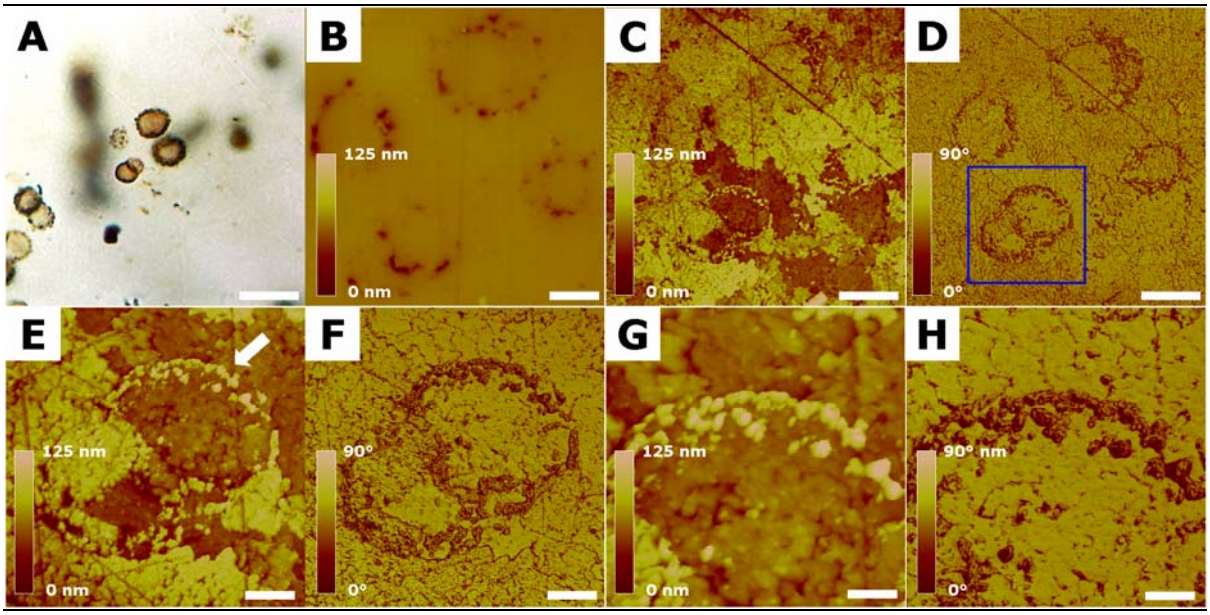


figure 36. Observations effectuées sur un groupe de cellules de la formation Draken (spécimen #ppo), vraisemblablement des spécimens dégradés de *Gloeodiniopsis Mikros*. [A] Groupe de quatre cellules imagées au microscope optique (grossissement x1000) en lumière transmise. Les individus mesurent entre 3 et 4 microns de diamètre en moyenne. La paroi organique brune apparaît par endroit fortement dégradée (granularisation) (échelle : 10 microns). [B] Image de hauteur obtenue en mode contact des cellules exposées à la surface de la lame mince polie. Les altitudes sont représentées par une échelle de couleur, le rouge indiquant les régions les plus basses, et le jaune les régions les plus hautes. Les régions correspondant à la paroi organique sont marquées par des cicatrices d'arrachement, liées à la désagrégation de la matière organique durant le polissage de la surface de la lame mince (échelle : 2 microns, pointe CONTR50, scan rate 2 Hz). [C] Image de hauteur obtenue en mode tapping de la même région, après une attaque acide douce (40 minutes à 1%). La corrosion est très hétérogène et, excepté la cellule située en bas à gauche, la localisation des parois cellulaires est difficile (échelle : 5 microns, pointe RTESP7, scan rate 0,25 Hz). [D] Image de phase correspondant à l'image de hauteur précédente. L'empreinte des quatre cellules tronquées à la surface de la lame mince de roche apparaît désormais clairement, en raison de la sensibilité de la phase aux différences de propriétés physiques entre la paroi organique et la matrice minérale. La topographie est totalement gommée. Le rectangle bleu indique la cellule observée à plus haute résolution sur les images E, F, G et H (échelle : 5 microns, pointe RTESP7, scan rate 0,25 Hz). [E] Zoom sur la cellule encadrée par un rectangle bleu sur l'image suivante, qui a été fossilisée en cours de division. L'attaque acide a corrodée le microorganisme de manière inégale. La lumière de la cellule inférieure est encore partiellement obstruée par de la silice, alors que la cellule supérieure a été totalement évidée par l'attaque acide, faisant ainsi ressortir la paroi cellulaire, indiquée par une flèche blanche (échelle : 1 micron, pointe RTESP7, scan rate 0,25 Hz). [F] Image de phase correspondant à l'image de hauteur précédente. La paroi cellulaire, caractérisée par la présence de particules arrondies de 100 à 200 nanomètres de diamètre, ressort parfaitement sur l'image (échelle : 1 micron, pointe RTESP7, scan rate 0,25 Hz). [G] Zoom sur la paroi cellulaire indiquée par une flèche blanche sur l'image E. Cette dernière apparaît en relief, et est composée de particules arrondies de dimensions submicrométriques (échelle : 500 nm, pointe RTESP7, scan rate 0,25 Hz). [H] Image de phase correspondant à l'image de hauteur précédente. Les particules composant la paroi ressortent nettement par rapport à la matrice minérale environnante (échelle : 500 nm, pointe RTESP7, scan rate 0,25 Hz).

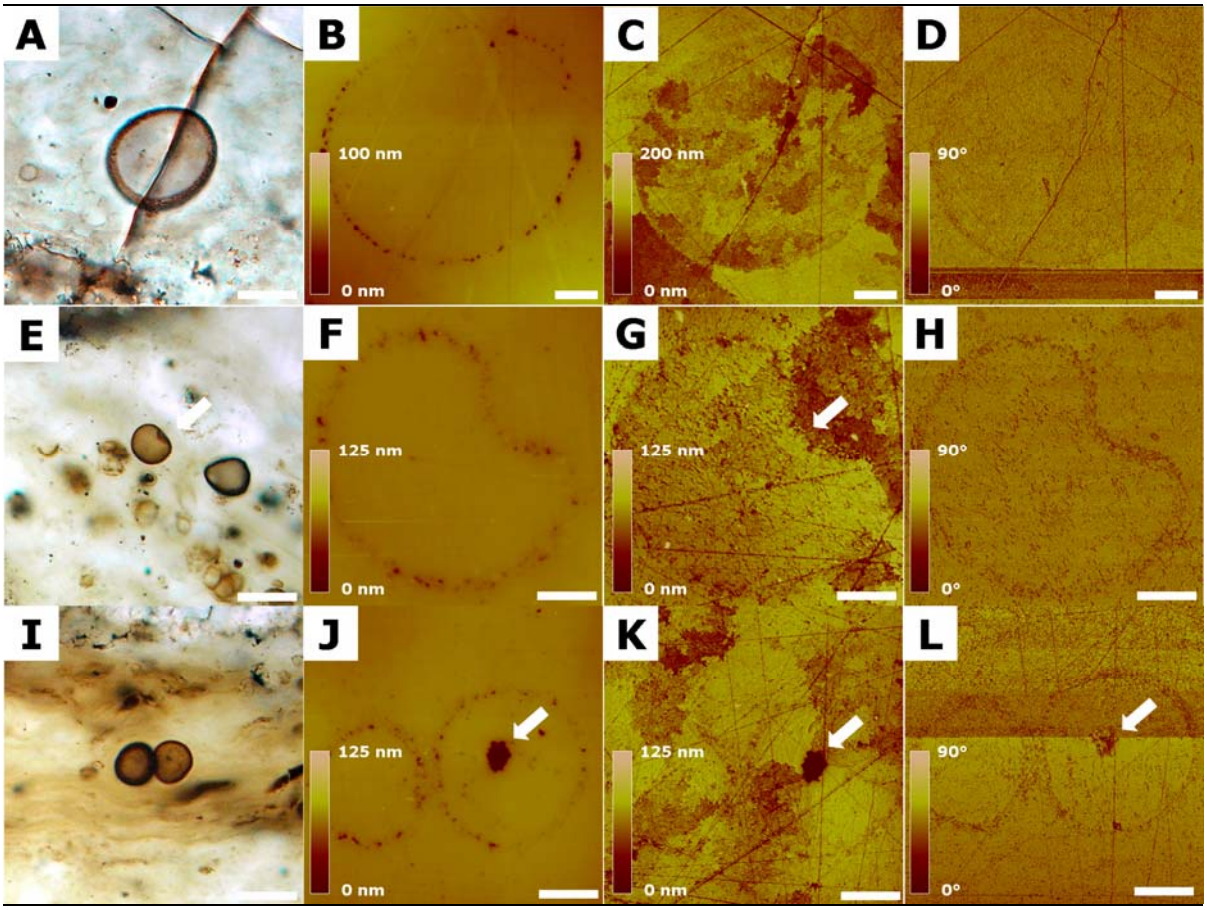


figure 37. Observations montrant l'importance de la phase pour le repérage des parois cellulaires des microfossiles de la formation Draken après attaque acide douce. [A] Cellule ovoïde imagée au microscope optique (grossissement x500) en lumière transmise. La paroi organique de couleur brune est bien visible. Le microfossile est recoupé par une fracture (échelle : 20 microns). [B] Image de hauteur obtenue en mode contact de la cellule exposée à la surface de la lame mince polie. Les altitudes sont représentées par une échelle de couleur, le rouge indiquant les régions les plus basses, et le jaune les régions les plus hautes. La région correspondant à la paroi organique est marquée par des cicatrices d'arrachement, liées à la désagrégation de la matière organique durant le polissage de la surface de la lame mince (échelle : 5 microns, pointe CONTR50, scan rate 1 Hz). [C] Image de hauteur obtenue en mode tapping de la même cellule, après une attaque acide douce (40 minutes à 1%). La corrosion de la surface est hétérogène, mais l'on continue de distinguer les contours de la cellule (échelle : 5 microns, pointe RTESP7, scan rate 0,25 Hz). [D] Image de phase correspondant à l'image de hauteur précédente. L'empreinte de la cellule tronquée à la surface de la lame mince de roche apparaît, en raison de la sensibilité de la phase aux différences de propriétés physiques entre la paroi organique et la matrice minérale. Comme le montre la comparaison avec l'image précédente, la topographie est totalement gommée (échelle : 5 microns, pointe RTESP7, scan rate 0,25 Hz). [E] Cellule de *Myxococcoides* en forme de grains de «haricot» imagée au microscope optique (grossissement x500) en lumière transmise. La paroi organique de couleur brune est bien visible (échelle : 20 microns). [F] Image de hauteur obtenue en mode contact de la cellule exposée à la surface de la lame mince polie. La région correspondant à la paroi organique est marquée par des cicatrices d'arrachement (échelle : 3 microns, pointe CONTR50, scan rate 2 Hz). [G] Image de hauteur obtenue en mode tapping de la même cellule, après une attaque acide douce (40 minutes à 1%). La corrosion de la surface est hétérogène, mais l'on continue de distinguer les contours de la cellule. Des petites particules submicrométriques semblent délimiter la position de la paroi dans la région indiquée par une flèche blanche (échelle : 3 microns, pointe RTESP7, scan rate 0,25 Hz). [H] Image de phase correspondant à l'image de hauteur précédente. L'empreinte de la cellule tronquée à la surface de la lame mince de roche apparaît plus

distinctement que sur l'image de hauteur, en partie parce que la topographie est masquée (échelle : 3 microns, pointe RTESP7, scan rate 0,25 Hz). [I] Deux cellules de *Myxococcoides* accolées (peut-être suite à une division cellulaire) imagées au microscope optique (grossissement x500) en lumière transmise. La paroi organique de couleur brune est bien visible (échelle : 20 microns). [J] Image de hauteur obtenue en mode contact des deux cellules exposées à la surface de la lame mince polie. La région correspondant à la paroi organique est marquée par des cicatrices d'arrachement. Un défaut profond, indiqué par une flèche blanche, se trouve au centre de la cellule de droite (échelle : 5 microns, pointe CONTR50, scan rate 1 Hz). [K] Image de hauteur obtenue en mode tapping de la même cellule, après une attaque acide douce (40 minutes à 1%). La corrosion de la surface est très hétérogène, et il est particulièrement difficile de discerner le contour des deux cellules. Le défaut (flèche blanche) situé au centre de la cellule de droite (voir image précédente) est ici très utile pour confirmer que les deux microfossiles sont effectivement bien présents dans la zone balayée par la pointe du microscope à force atomique (échelle : 5 microns, pointe RTESP7, scan rate 0,25 Hz). [L] Image de phase correspondant à l'image de hauteur précédente. L'empreinte des deux cellules tronquées à la surface de la lame mince de roche apparaît plus distinctement que sur l'image de hauteur. La différence d'aspect entre la partie supérieure et la partie inférieure de l'image est due à une contamination de la pointe lors du balayage au niveau du défaut (flèche blanche), ce qui a changé les propriétés de la pointe, et donc le signal de phase enregistré par cette dernière. Cette figure illustre l'inconvénient des défauts profonds, qui, s'ils se révèlent très utiles pour la relocalisation d'un microfossile après attaque acide (à cause de leur profondeur, ils ne sont pas effacés par la corrosion), peuvent aussi devenir des sources de contamination importante (échelle : 5 microns, pointe RTESP7, scan rate 0,25 Hz).

Lorsque le grossissement est augmenté, la phase montre que la paroi n'est pas formée d'une seule structure, mais est constituée de particules submicrométriques (100 à 200 nanomètres) qui sont exactement les mêmes que celles visibles sur les images de hauteur (comparer la figure 36E page 143 et la figure 36F page 143, ainsi que la figure 36G page 143 et la figure 36H page 143). L'imagerie de phase se révèle donc particulièrement utile dans le cas des microfossiles de la formation Draken pour mettre en évidence les parois cellulaires, quand l'absence de structures cohérentes ne permet pas une reconnaissance aisée de la position de la paroi sur les images de hauteur. Il faut noter que la reconnaissance de la paroi sur les images de phase est facilitée par la faible rugosité de l'échantillon (elle-même due à une intensité d'attaque acide faible), qui diminue la contribution de la topographie dans les images de phase, et favorise l'apparition de la contribution «physique».

Composition des particules pariétales submicrométriques

Malgré son utilité pour imager la paroi des microfossiles de la formation Draken après attaque acide, le mode de phase ne donne cependant aucun renseignement sur la nature chimique des particules submicrométriques pariétales, sinon qu'elles sont constituées d'un matériau différent du quartz.

La coloration des parois en microscopie optique (brun jaune à noir) indique la présence de composés carbonés, dont la présence est clairement confirmée par la microspectrométrie Raman. Les spectres obtenus (figure 45 page 166) montrent la présence des deux bandes vibrationnelles à 1350 cm^{-1} et 1600 cm^{-1} caractéristiques des matériaux carbonés fossiles. Etant donné que la microspectrométrie Raman confirme l'association spatiale de matériaux carbonés avec la position topographique de la paroi, il est tentant de conclure que les particules pariétales submicrométriques révélées par la microscopie à force atomique sont de nature carbonée.

Des tentatives de détection du carbone ont également été effectuées par MEB-EDX, mais à cause d'une accumulation significative de carbone sous le faisceau d'électrons (voir matériels & méthodes), cette dernière a été abandonnée en faveur de la microspectrométrie Raman. Les observations au microscope électronique à balayage ont cependant permis de confirmer la réalité des particules submicrométriques pariétales, qui ne sont donc pas des artefacts produits par l'émoussement ou une contamination des pointes AFM (comparer la figure 33E et figure 33F page 136).

Si la microscopie optique et la microspectrométrie Raman indiquent clairement la présence de carbone dans la paroi des microfossiles de la formation Draken, ces deux techniques sont limitées par leur résolution spatiale assez basse. Elles ne permettent pas de prouver de manière définitive que les particules pariétales submicrométriques observées en microscopie à force atomique sont des structures composées de carbone.

Microscopie électronique en transmission

Des observations au HR-TEM ont donc été réalisées sur des coupes ultraminces réalisées par la technique FIB. Ces coupes, normales à la paroi cellulaire, ont été obtenues sur des microfossiles préalablement caractérisés par microscopie optique, microspectrométrie Raman et microscopie à force atomique (figure 34G et figure 34H page 138 et figure 35I page 141). L'avantage principal de la technique du FIB est d'éviter une extraction des microfossiles de leur matrice minérale, et de pouvoir réaliser des observations et des analyses sur les microfossiles *in-situ*. Comme illustré par la figure 35I page 141, l'observation des sections ultra-minces en place (c'est-à-dire avant extraction par le micro-manipulateur) permet déjà de réaliser des observations intéressantes, comme la présence de cristaux de pyrite dans le volume délimité par la paroi cellulaire, ou encore la position de la paroi, marquée par une zone diffuse blanche, typique d'un composé organique (figure 35I page 141, ligne en pointillée).

Les images, ainsi que des analyses chimiques en mode point ou en mode cartographie montrent que le quartz est le composant principal des parois cellulaires. Le carbone est seulement présent sous la forme de films ultra-mince recouvrant les cristaux de quartz, ou remplissant les cavités entre les cristaux de quartz. Le carbone est amorphe, et aucune structure cristalline n'a pu être identifiée (figure 34H page 138).

Sur deux coupes ultra-minces prélevées sur des cellules de *Myxococcoides*, les films organiques semblent présenter une disposition radiale le long de la paroi organique. Dans le cas de la figure 34G page 138, cette orientation, bien visible pour la paroi droite, est confirmée par l'orientation des films organiques sur la petite portion de la paroi gauche incluse dans la section ultra-mince. L'origine de cette orientation est inconnue, mais est peut-être liée au remplissage de la cellule par de la calcite fibreuse avant la silicification (voir Knoll et al., 1992). Une autre hypothèse est de considérer que la cellule possédait une paroi avec une ultrastructure radiale, qui a été conservée durant la fossilisation en dépit de la maturation chimique des matériaux organiques. Cependant, cette hypothèse est peu vraisemblable, étant donné le remplacement presque total de la matière organique par le quartz, et l'histoire diagénétique relativement complexe des microfossiles de la formation Draken.

Les observations au microscope électronique en transmission confirment donc les données obtenues au microscope à force atomique, à ceci près que, contrairement aux images de hauteur et de phase, la matière organique se présente sous la forme non pas de particules globulaires, mais de films étirés sur les images TEM. Les particules pariétales submicrométriques, visibles sur les images de hauteur et particulièrement bien mises en évidence sur les images de phase, sont soit des amas de kérogènes (qui occupaient des interstices avant l'attaque acide), ou, plus probablement, des particules de quartz recouvertes d'un film carbonée (ce

qui leur permet d'apparaître comme différentes des particules de quartz «nues» de la matrice sur les images de phase).

Formation Gunflint

Après attaque acide classique, la plus grande majorité des microfossiles de la formation Gunflint dévoile, à l'emplacement exact de la paroi cellulaire, une structure différente, de forme et d'aspect, des microcristaux de quartz constituant la matrice, ou remplissant la lumière cellulaire (figure 38 page 151, figure 39 page 153, figure 40 page 155, figure 41 page 156 et page figure 43 page 161). Cette structure peut être exposée en bas relief, quand la matrice de quartz environnante a été dissoute par l'acide fluorhydrique. Il s'agit alors d'un édifice fragile d'une centaine de nanomètres de hauteur pour quelques centaines de nanomètres d'épaisseur (figure 40 page 155 et figure 41 page 156). Les lames minces doivent alors être manipulées avec grande précaution, sous peine de voir l'édifice collapser au moindre choc. Dans d'autres cas, l'attaque acide n'a fait que révéler les limites des microcristaux de quartz, sans les corroder. La structure, d'une largeur de 70 à 300 nanomètres, est alors entourée par la matrice de cristaux de quartz micrométrique, qui joue un rôle protecteur (figure 38F page 151). Dans ce cas, la structure est mécaniquement plus solide, et résiste mieux aux chocs. L'inconvénient majeur de cette conformation est que la structure est située dans un canyon encaissé, ce qui peut compliquer son étude. Ainsi, durant une cartographie EDX, les photons X émis suite au bombardement électronique peuvent être absorbés par les murs de silice qui l'entourent, conduisant à une atténuation de son signal intrinsèque.

La manière dont la structure est exposée prouve qu'elle est constituée d'un matériau résistant à l'acide fluorhydrique, contrairement à la matrice de quartz, un comportement cohérent avec la nature organique d'une paroi cellulaire. Par lui-même, le microscope à force atomique ne peut pas identifier la composition des matériaux qui passent sous la pointe. Cependant, la coloration brune de la paroi des microfossiles en microscopie optique à transmission indique déjà la présence de matière organique fossile, hypothèse confirmée par la microspectrométrie Raman (figure 46 page 166) et les microanalyses EDX effectuées en microscopie électronique à balayage (figure 38J page 151). Etant donné que la majorité des microfossiles de la formation Gunflint apparaissent organiquement préservés, que cette matière organique est presque toujours concentrée dans la paroi cellulaire, que la structure visible au microscope à force atomique se situe à l'emplacement de la paroi, tout en montrant une résistance à l'acide fluorhydrique caractéristique des kérogènes, il ne fait aucun doute que cette dernière correspond à une paroi cellulaire.

En microscopie optique, la paroi des microfossiles de la formation Gunflint présente un aspect ininterrompu, confirmé par les images de hauteur obtenues après attaque acide de la surface des lames minces. Effectivement, dans la plupart des cas, la paroi apparaît après attaque acide comme un édifice solide, cohérent, contrairement à la paroi

discontinue, composée de films ou de particules carbonées dispersées dans une matrice de quartz, comme celle des microfossiles de la formation Draken, ou des acritarches néoprotérozoiques étudiés par Kempe et al. (2005).

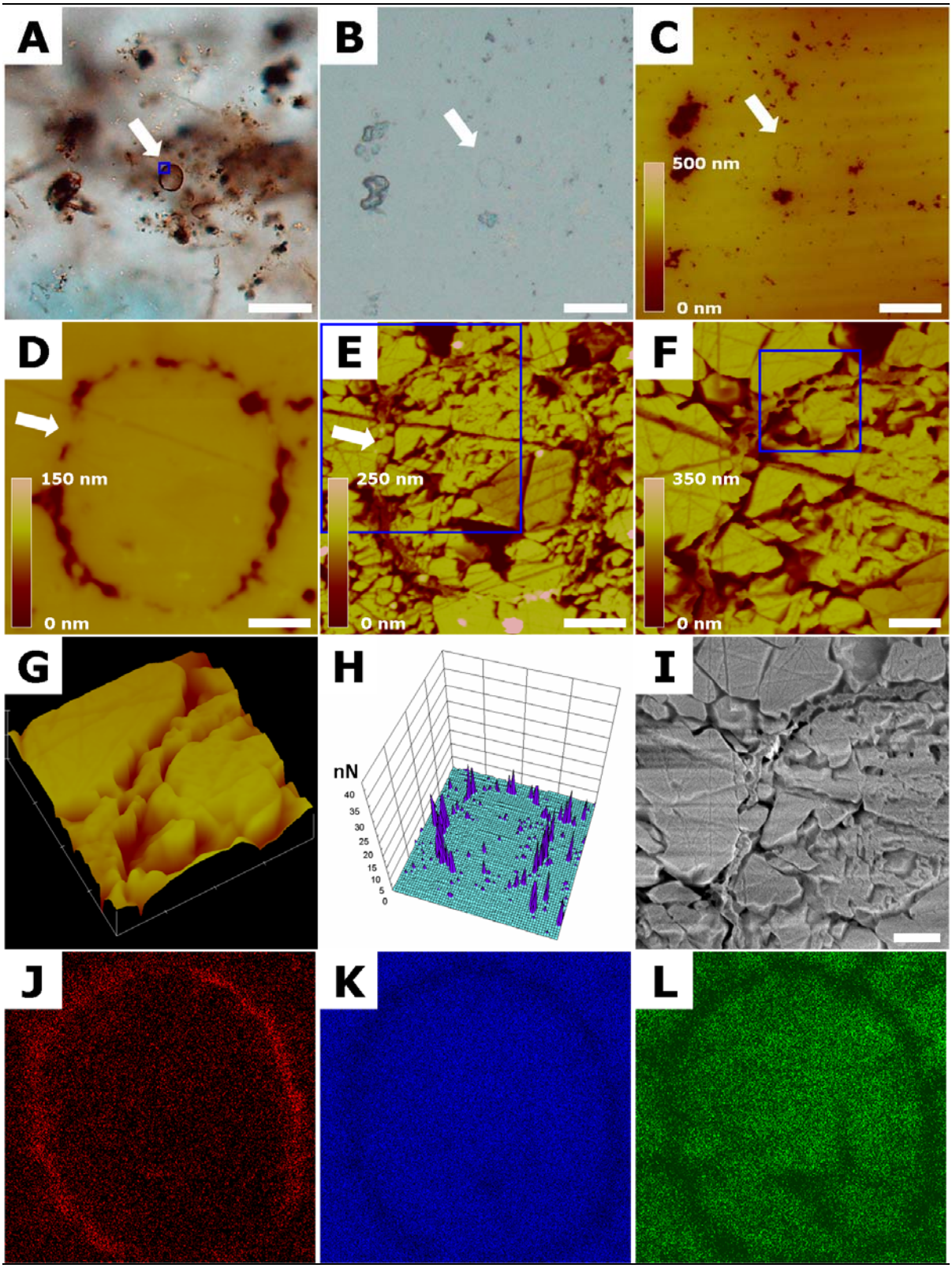


figure 38. Observations effectuées sur une cellule d'*Huroniospora* de la formation Gunflint (spécimen #01-4). [A] Cellule d'*Huroniospora* imagée avec un microscope optique (grossissement x500) en lumière transmise (flèche blanche). La cellule, légèrement ovale, mesure 8,8 microns dans son grand axe pour 8,1 microns dans son petit axe. Le rectangle bleu indique la région observée à plus fort grossissement avec le microscope à force atomique en G (échelle : 20 microns). [B] Même microfossile, observé cette fois en lumière réfléchie (grossissement x500). Les défauts mécaniques de la surface polie sont bien visibles (échelle : 20 microns). [C] Image de hauteur obtenue en mode contact de la cellule exposée à

la surface de la lame mince polie. Les altitudes sont représentées par une échelle de couleur, le rouge indiquant les régions les plus basses, et le jaune les régions les plus hautes. Les défauts mécaniques de la surface polie sont là aussi bien visibles, et peuvent être utilisés, par comparaison avec l'image acquise en lumière transmise (B) pour localiser le microfossile de manière précise et reproductible (échelle : 20 microns, pointe OTR8, scan rate 1 Hz). [D] Image de hauteur obtenue en mode tapping de la cellule exposée à la surface de la lame mince polie à plus fort grossissement, et avant attaque acide. La région correspond à la paroi organique du microfossile est visible, car marquée tout du long par des cicatrices d'arrachement liées à la désagrégation de la matière organique durant le polissage de la surface de la lame mince. La flèche blanche indique une zone sans défauts, où la paroi organique s'avérera être absente après attaque acide, comme le montre l'image suivante (échelle : 2 microns, pointe RTESP7, scan rate 1 Hz). [E] Image de hauteur obtenue en mode tapping de la cellule exposée à la surface de la lame mince polie après attaque à l'acide fluorhydrique (20 minutes à 5 %). Suite à l'attaque acide, les cristaux de quartz sont maintenant visibles, tout comme la paroi organique. Le rectangle bleu indique la région observée à plus fort grossissement avec le microscope à force atomique en F (échelle : 2 microns, pointe RTESP7, scan rate 0,5 Hz). [F] Image de hauteur obtenue en mode tapping obtenue avec une pointe à faible rayon de courbure et ratio d'aspect élevé (HDC SSS). Le rectangle bleu indique la région observée à plus fort grossissement avec le microscope à force atomique en G, et dans la figure 55 page 191. La comparaison avec l'image de la même région obtenue au microscope électronique à balayage prouve que toutes les structures observés sont réelles (échelle : 1 microns, scan rate 0,5 Hz). [G] Vue en 3D de la paroi organique du microfossile (zone balayée : 2 microns, pointe HDC SSS, scan rate 0,5 Hz). [H] Carte d'adhésion de la zone ou le microfossile est exposé, obtenue par imagerie force volume. L'axe vertical est gradué en nanonewtons (nN). La carte montre que la paroi du microfossile est plus adhésive que la matrice de silice (zone balayée : 10 microns). [I] Même région que F, examinée cette fois-ci au microscope électronique à balayage (Hitachi S4200 FEG-SEM, 1 kV, x25 000, sans métallisation). La paroi organique mesure dans ce secteur entre 70 et 300 nanomètres de large (échelle : 1 micron). [J,K,L] Cartes élémentaires EDX du carbone, silicium et oxygène du microfossile (Hitachi S4500 FEG-SEM, 15 kV, métallisation au platine, x10 000).

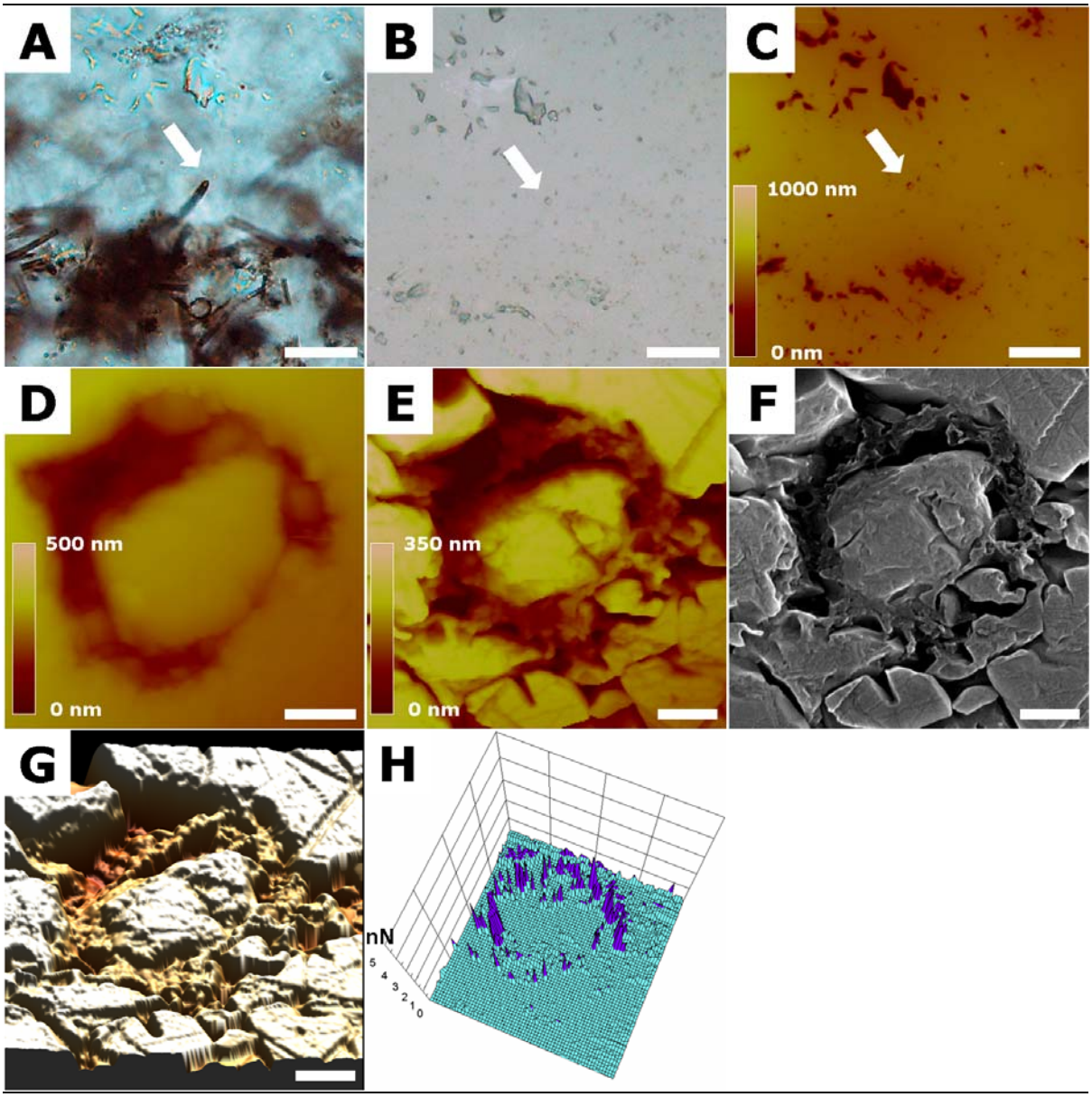


figure 39. Observations effectuées sur une cellule filamenteuse de *Gunflintia minuta* de la formation Gunflint (spécimen #01-5). [A] Cellule de *Gunflintia minuta* imagée avec un microscope optique (grossissement x500) en lumière transmise (flèche blanche). Le diamètre du filament est de 1,5 microns (échelle : 20 microns). [B] Même microfossile (flèche blanche), observé cette fois en lumière réfléchie (grossissement x500). Les défauts mécaniques de la surface polie sont bien visibles (échelle : 20 microns). [C] Image de hauteur obtenue en mode contact de la cellule exposée à la surface de la lame mince polie (flèche blanche). Les altitudes sont représentées par une échelle de couleur, le rouge indiquant les régions les plus basses, et le jaune les régions les plus hautes. Les défauts mécaniques de la surface polie sont là aussi bien visibles, et peuvent être utilisés, par comparaison avec l'image acquise en lumière transmise (B) pour localiser l'empreinte micrométrique que le microfossile laisse en surface (échelle : 20 microns, pointe OTR8, scan rate 1 Hz). [D] Image de hauteur obtenue en mode contact de la section du filament avant attaque acide. La région correspond à la paroi organique du microfossile est visible, car marquée tout du long par des cicatrices d'arrachement liées à la désagrégation de la matière organique durant le polissage de la surface de la lame mince (échelle : 500 nanomètres, pointe CONTR50, scan rate 2 Hz). [E] Image de hauteur obtenue en mode tapping du filament exposé à la surface de la lame mince polie après attaque à l'acide fluorhydrique (10 minutes à 5 %). La pointe utilisée pour réaliser cette image est une HDC T-EAR M* 1-15, caractérisée par un ratio

d'aspect très élevé, ce qui lui permet de sonder en profondeur les cavités de la surface (échelle : 500 nm, scan rate 0,25 Hz). [F] Même région que E, examinée cette fois-ci au microscope électronique à balayage (ZEISS DSM 982 Gemini, 15 kV, distance de travail 16 mm, x20 000, métallisation au platine). [G] Représentation en 3D du microfossile (zone balayée : 3 microns, barre d'échelle 500 nm, pointe T-EAR M*1-15, scan rate 0,25 Hz). [H] Carte d'adhésion de la zone ou le microfossile est exposé, obtenue par imagerie force volume. L'axe vertical est gradué en nanonewtons (nN). La carte montre que la paroi du microfossile est plus adhésive que la matrice de silice (zone balayée : 2,5 microns).

Les deux élargissements subterminaux de 3 microns environ de diamètre du filament de *Gunflintia minuta* visible sur la figure 41 page 156 ont été étudiés après attaque acide. Cependant, trop peu de fragments de la paroi organique cellulaire ont résisté à l'attaque acide pour savoir si ces deux élargissements sont d'origine biologique (des structures similaires ont été interprétées comme des cellules spécialisées telles que des hétérocystes ou des akinètes par Licary et Cloud (1968), une hypothèse qui renforçait l'appartenance de *Gunflintia minuta* au groupe des cyanobactéries), ou si elles résultent de la déformation de la paroi cellulaire par la croissance de cristaux de quartz durant la diagenèse (pour une discussion détaillée sur le sujet, voir Knoll et al., 1988).

A fort grossissement, la seule structure visible sur les parois organiques dégagées par l'attaque acide se présente sous la forme de petits globules de 70 à 100 nanomètres de diamètre (figure 55 page 191). Si, au cours des mesures, certains de ces globules se sont révélés être des artefacts de pointe (voir le chapitre discussion pour un exposé des problèmes de contamination de pointe), d'autres sont tout à fait réels, et peuvent aussi bien être imagés par microscopie à force atomique que par microscopie électronique à balayage (figure 55 page 191). Ces globules apparaissent similaires aux sphérules de quartz de 200 à 500 nm de diamètre associées aux kérogènes et documentées par Moreau et Sharp (2004), dans une étude de microfossiles organiquement préservés de la formation Gunflint effectuée par microscopie électronique en transmission. Ces globules semblent également similaires en taille et forme aux sphérules d'opale formées à la surface de bactéries silicifiées artificiellement (Ferris et al., 1988; Westall et al., 1995).

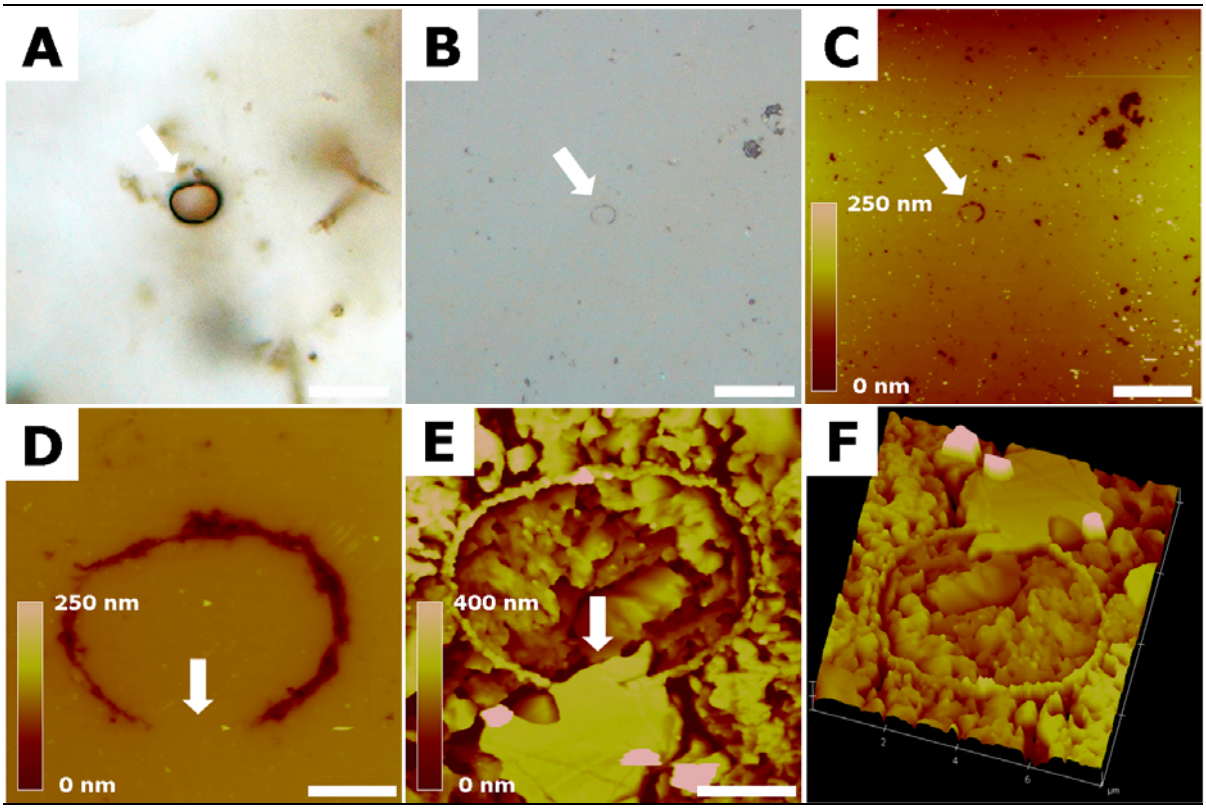


figure 40. Observations effectuées sur une cellule d'*Huroniospora* de la formation Gunflint (spécimen #en-fr). [A] Cellule d'*Huroniospora* (flèche blanche) imagée avec un microscope optique (grossissement x1000) en lumière transmise. La cellule, légèrement ovale, mesure 6,3 microns dans son grand axe pour 5 microns dans son petit axe (échelle : 10 microns). [B] Même microfossile, observé cette fois en lumière réfléchie (grossissement x500). Les défauts mécaniques de la surface polie sont bien visibles (échelle : 20 microns). [C] Image de hauteur obtenue en mode contact de la cellule exposée à la surface de la lame mince polie. Les altitudes sont représentées par une échelle de couleur, le rouge indiquant les régions les plus basses, et le jaune les régions les plus hautes (échelle : 20 microns, pointe CONTR50, scan rate 0,5 Hz). [D] Image de hauteur obtenue en mode contact de la cellule exposée à la surface de la lame mince polie à plus fort grossissement et avant attaque acide. La région correspondant à la paroi organique du microfossile est visible, car marquée tout du long par des cicatrices d'arrachement liées à la désagrégation de la matière organique durant le polissage de la surface de la lame mince. La flèche blanche indique une zone sans défauts, où la paroi organique s'avérera être absente après attaque acide, comme le montre l'image suivante (échelle : 2 microns, pointe CONTR50, scan rate 1 Hz). [E] Image de hauteur obtenue en mode tapping de la cellule exposée à la surface de la lame mince polie après attaque à l'acide fluorhydrique (20 minutes à 5 %). La paroi organique du microfossile a été exposée par l'attaque acide et apparaît en relief. En comparaison, l'intérieur de la cellule a été corrodé, tout comme la matrice environnante, à l'exception du grand cristal de quartz visible dans la partie inférieure de l'image. Ce dernier correspond d'ailleurs à la région marquée par une flèche blanche dans l'image précédente (échelle : 2 microns, pointe T-EAR M*1-15, scan rate 0,25 Hz). [F] Vue en 3D de la paroi organique du microfossile (zone balayée : 8 microns, pointe T-EAR M*1-15, scan rate 0,25 Hz).

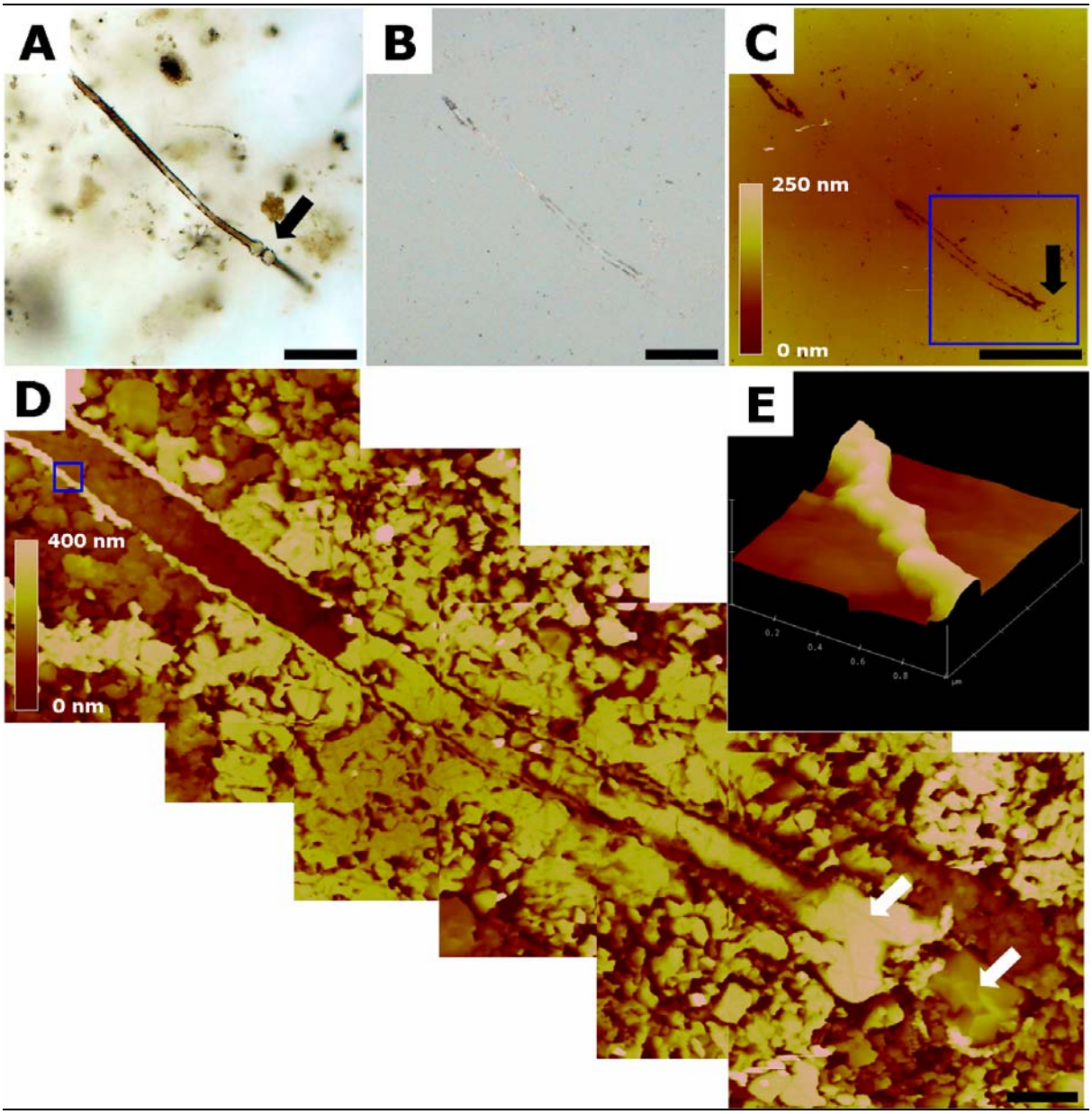


figure 41. Observations effectuées sur une cellule filamenteuse de *Gunflintia minuta* de la formation Gunflint sectionnée longitudinalement (spécimen #en-nb). [A] Cellule de *Gunflintia minuta* imagée avec un microscope optique (grossissement x500) en lumière transmise. Le diamètre du filament est de 1,5 microns. La flèche noire indique des élargissements subterminaux (échelle : 20 microns). [B] Même microfossile, observé cette fois en lumière réfléchie (grossissement x500). Les défauts mécaniques de la surface polie sont bien visibles (échelle : 20 microns). [C] Image de hauteur obtenue en mode contact de la cellule exposée à la surface de la lame mince polie. Les altitudes sont représentées par une échelle de couleur, le rouge indiquant les régions les plus basses, et le jaune les régions les plus hautes. Le rectangle bleu indique la région observée à plus fort grossissement avec le microscope à force atomique en D (échelle : 20 microns, pointe CONTR50, scan rate 0,5 Hz). [D] Mosaïque constituée de six images de hauteur obtenues en mode tapping du filament exposé à la surface de la lame mince polie après attaque à l'acide fluorhydrique (20 minutes à 5 %). La paroi organique est parfaitement visible. Dans certains secteurs, l'intérieur du filament a été évidé par l'attaque acide (en haut à gauche), alors que dans d'autres (en bas à droite), la lumière est toujours occupé par des cristaux de quartz. Les deux élargissements subterminaux (flèches blanches), déjà visible dans l'image optique, ont été interprétés par certains auteurs comme des cellules spécialisées (akinètes, hétérocystes). Cette image

montre qu'ils sont remplis par des cristaux de quartz micrométriques. Cependant, les fragments pariétaux organiques ayant résisté à l'attaque acide sont trop peu nombreux pour savoir si ces deux structures résultent d'une déformation de la paroi organique suite à la croissance des cristaux de quartz durant la diagenèse, ou s'ils sont d'origine biologique. Le rectangle bleu indique la région observée à plus fort grossissement avec le microscope à force atomique en E (échelle : 2 microns, pointe T-EAR M*1-15, scan rate 0,25 Hz). [E] Vue en 3D de la paroi organique du filament de *Gunflintia minuta*, parfaitement exposée par l'attaque acide. Aucune structure particulière n'apparaît au niveau de la paroi (zone balayée : 1 micron, pointe T-EAR M*1-15, scan rate 0,25 Hz).

L'état amorphe de la matière organique des parois des microfossiles de la formation Gunflint peut sembler en contradiction avec les mesures Raman (figure 45 page 166 et figure 46 page 166) qui documentent clairement une certaine cristallinité des kérogènes composant la paroi des microfossiles de la formation Gunflint, puisque qu'un pic G est visible dans les spectres. Il faut cependant noter que sur un matériel aussi désordonné qu'un kérogène, la signification réelle des pics D et G n'est pas connue avec certitude.

Coupe FIB

La résolution des cartes EDX et Raman n'étant pas suffisante pour déterminer la nature chimique des globules micrométriques inclus dans les parois organiques de certains microfossiles de la formation Gunflint, une coupe FIB a alors été réalisée dans la paroi d'une cellule d'*Huroniospora* (spécimen #01-4). La coupe confirme les analyses d'extrême surface effectuée par microscopie à force atomique, et prouve que les mesures réalisées en surface sont extrapolables aux volumes. Des cristaux de quartz d'une taille similaire à ceux observés par microscopie à force atomique sont visibles, tout comme la paroi, dont la morphologie (continuité, largeur) est semblable à celles exposées à la surface des lames minces de roche polies après attaque acide. Il est tout à fait possible de corréler les cristaux de quartz visibles en surface sur les images de hauteur avec ceux situés au sommet de la coupe FIB. En fait, il est même possible de savoir avec une grande précision ou la coupe FIB a été réalisée dans le microfossile, en comparant le profil topographique de la partie supérieure de la coupe (juste sous la couverture de platine, qui apparaît en noir sur la figure 42 page 159) avec les profils des images AFM. La seule véritable différence provient justement des globules (figure 55 page 191): ceux-ci sont totalement absents (figure 42 page 159).

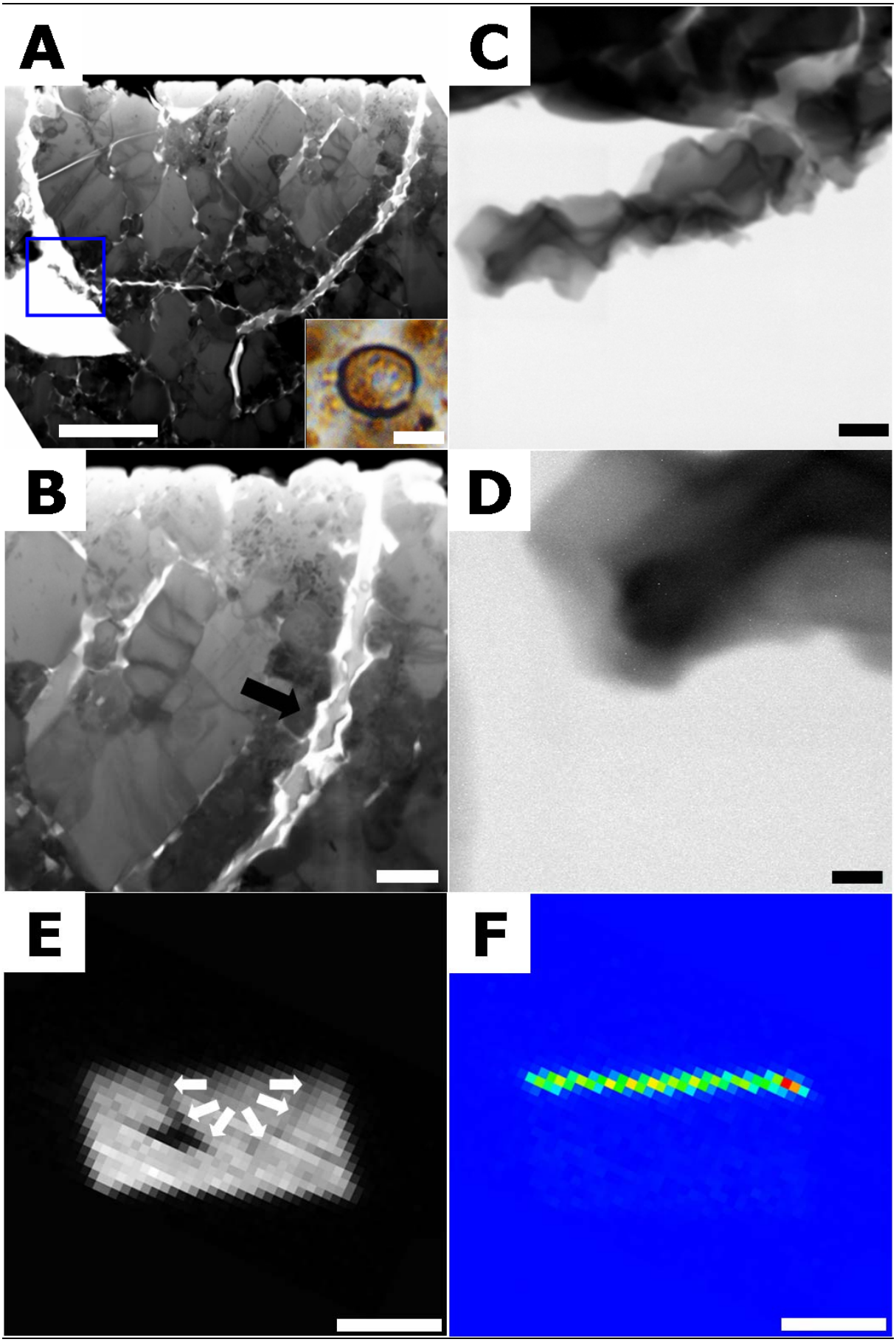

A
C
B
D
E
F

figure 42. Observation au microscope électronique à balayage d'une coupe FIB ultramince effectuée au niveau de la paroi organique d'une cellule d'*Huroniospora* (spécimen #01-4). [A] Image STEM de la coupe FIB taillée dans une cellule d'*Huroniospora* (vignette en bas à droite, grossissement x1000, échelle 5 microns). Le rectangle bleu indique la région observée à plus fort grossissement avec le microscope à force atomique en C et D. L'image confirme les mesures morphométriques de surface effectuées avec le microscope à force atomique, que ce soit sur les cristaux de quartz ou la paroi organique. Cette dernière est complète, à l'exception de la partie inférieure (échelle : 2 microns). [B] Zoom sur la paroi organique (flèche noire), imagée au microscope à force atomique après attaque acide sur la figure 38 page 151 (échelle : 500 nm). [C] Image STEM haute résolution de la paroi cellulaire indiquée par un rectangle bleu dans l'image A. Durant la réalisation de la lame FIB, la matrice de quartz qui entourait la paroi carbonée a été ôtée, et dans cette région, la paroi est parfaitement exposée, ce qui permet de mesures chimiques EDX sans interférence de la matrice de quartz environnante. Des mesures ponctuelles élémentaires montrent que la paroi est principalement composée de carbone et de silice. Notez la nature ondulée de la paroi carbonée, qui semble responsable de la présence de structures globulaires de 100 nanomètres de diamètre. Ces structures pourraient être les mêmes que celles imagées après attaque acide avec le microscope à force atomique. Au vu de leur composition (ils sont constitués de carbone, comme l'ensemble de la paroi), ils sont différents des sphérules de quartz recouvertes de kérogènes décrits par Moreau et Sharp (2004) (échelle : 100 nm). [D] Image STEM haute résolution de l'extrémité de la paroi carbonée protubérante. Aucune ultra-structure nanométrique n'est visible. Des images obtenue par microscopie électronique à transmission haute résolution (1,3 nanomètres) confirment la nature amorphe du matériel constituant la paroi d'*Huroniospora*, et l'absence de structures d'échelle nanométrique (échelle : 50 nanomètres). [E] Carte de fluorescence obtenue à 2,5 keV sur la ligne ID21 de l'ESRF montrant la distribution du silicium au niveau du microfossile. La déplétion (très ténue, marquée ici par des flèches blanches) correspond à la paroi organique cellulaire (échelle : 5 microns). [F] Carte de fluorescence obtenue à 2,5 keV sur la ligne ID21 de l'ESRF montrant la distribution du soufre au niveau du microfossile. Cet élément n'est pas présent dans la paroi cellulaire, et seul le platine déposé durant la préparation de la lame ultra-mince (et dont l'énergie de fluorescence est proche de celle du soufre) ressort distinctement (échelle : 5 microns).

La coupe FIB découpée dans la cellule d'*Huroniospora* (#01-4) présente une particularité. Lors de l'amincissement de la lame avec le faisceau d'ion, une partie de la matrice micrométrique de quartz est partie, exposant parfaitement un fragment de paroi cellulaire. Cette situation est idéale, puisque la paroi n'étant plus entourée par une matrice de quartz, des analyses chimiques sont possibles sans qu'il y ait interférence des éléments environnants. De plus, à cet endroit, la paroi est très fine (bien que son épaisseur réelle n'ait pas été déterminée), ce qui facilite les observations en microscopie électronique en transmission haute résolution.

Cette portion de la paroi cellulaire organique d'une cellule d'*Huroniospora* a été étudiée à haute résolution. Les images de la figure 42 page 159 montrent que la paroi possède une texture particulière, marquée par de nombreuses ondulations, et que l'on peut distinguer des formes globulaires d'un diamètre avoisinant les 100 nanomètres. Ces globules semblent constitués exactement du même matériau que la paroi elle-même, et leur existence semble seulement due à la texture ondulée de cette dernière. Observée à très haute résolution (1,3 nanomètres de résolution), la paroi ne montre aucune frange signant une certaine cristallinité, ni aucune ultrastructure nanométrique similaire à celle notée par Kempe et al. (2002; 2005) dans la paroi d'un acritarche

néoprotérozoique (voir également Javaux et al., 2004). Que ce soit en microscopie à force atomique ou en microscopie électronique en transmission, la paroi organique de l'un des microfossiles dominants (*Huroniospora spp.*) de la formation Gunflint apparaît totalement amorphe. Aucune coupe FIB n'a pu être réalisée dans un filament de *Gunflintia minuta* par manque de temps, mais étant donné la nature amorphe des parois organiques de ces filaments en microscopie à force atomique, il est probable que la paroi de *Gunflintia minuta* apparaisse également sans aucune structure en microscopie électronique en transmission (voir à ce sujet Moreau et Sharp, 2004).

Filaments pyritisés

De tous les microfossiles de la formation Gunflint analysés dans le cadre de cette thèse, seuls un petit nombre (figure 43 page 161) n'étaient pas organiquement préservés. Possédant une paroi remplacée par de la pyrite, ces filaments de *Gunflintia minuta* se sont montrés résistants à l'attaque acide, la pyrite n'étant pas dissoute par l'acide fluorhydrique. Comme le montre la figure 43 page 161, la matrice de quartz a été préférentiellement corrodée par rapport aux cellules épigénisées en pyrite. Les filaments semblent cependant entourés par une zone plus dense de cristaux de quartz plus résistants, de quelques microns d'épaisseur. La lumière des filaments semble également occupée par une matrice de silice qui a réagi de manière différente à l'attaque acide, si on la compare à la matrice entourant les filaments. Sa surface présente effectivement un aspect adouci inhabituel. Il s'agit peut-être d'un seul cristal sali par des traces de matière organique, ce qui expliquerait sa réaction à l'attaque acide comparée aux autres cristaux plus purs de la matrice.

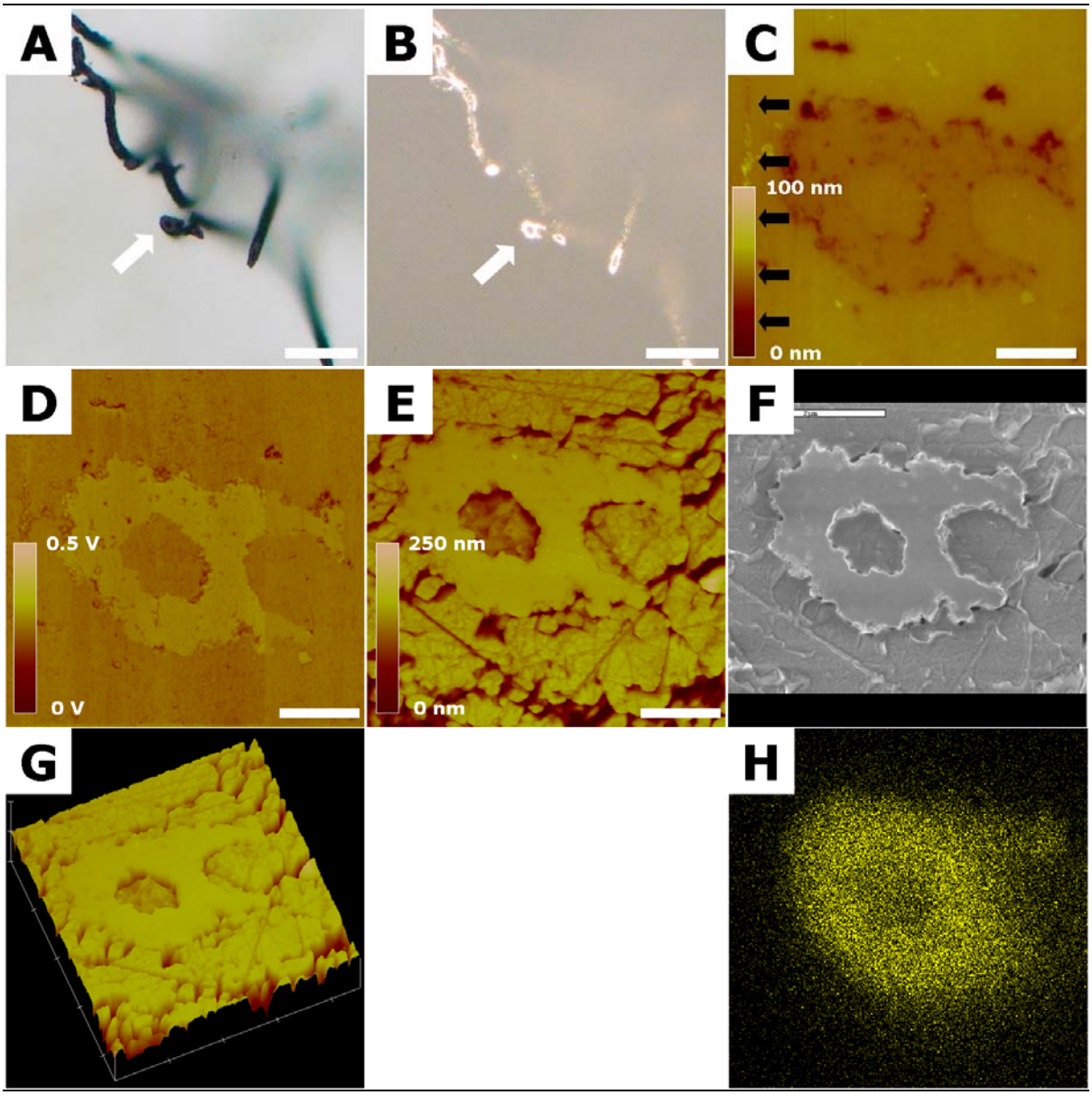


figure 43. Observations effectuées sur une cellule filamenteuse de *Gunflintia minuta* de la formation Gunflint épigénisée en pyrite (spécimen #eag-he). [A] Cellule de *Gunflintia minuta* imagée avec un microscope optique (grossissement x1000) en lumière transmise et réfléchie. Le diamètre des filaments est approximativement de 2,5 microns. La flèche indique deux cellules coalescentes, dont la section à la surface de la lame mince ressemble à un 8. La cellule de gauche est intacte, tandis que celle de droite est partiellement détruite (échelle : 10 microns). [B] Même microfossile, observé cette fois uniquement en lumière réfléchie (grossissement x1000). Les défauts mécaniques de la surface polie sont bien visibles. Le microfossile apparaît comme un tube creux dont la paroi serait constitué de pyrite (échelle : 10 microns). [C] Image de hauteur obtenue en mode contact de la cellule exposée à la surface de la lame mince polie (flèche blanche, image A) avant attaque acide. Le diamètre des filaments (2,5 microns) est supérieur à celui des filaments organiquement préservés de *Gunflintia minuta* (1,5 microns, pointe CONTR50, scan rate 2 Hz). La lumière centrale possède un diamètre de 1 micron. Des détails fins sont visibles au niveau de la paroi elle-même. Le matériau constituant cette dernière est mou, comparé à la matrice de quartz. Effectivement, la ligne jaune indiquée par les flèches noires à gauche de l'image correspond à du matériel déplacé par la pointe lors du balayage précédent, avant que le champ de vision ne soit légèrement décalé sur la gauche. Etant donné que ce phénomène n'a été observé que sur les filaments pyritisés, il y a de fortes chances que le matériau déplacé soit justement la pyrite (échelle : 1 micron). [D] Image du même microfossile réalisé en imagerie de force

latérale. Les forces de friction sont plus importantes au niveau du matériau constituant la paroi, par comparaison à celles enregistrées au niveau de la matrice ou de la lumière centrale (échelle 1 micron, pointe CONTR50, scan rate 2 Hz). [E] Image de hauteur obtenue en mode tapping des deux filaments exposés à la surface de la lame mince polie après attaque à l'acide fluorhydrique (10 minutes à 5 %). La pointe utilisée pour réaliser cette image est une pointe silicium standard (nanodevices rotated tapping mode etched RTESP7). Comme le montre l'image, la matrice est composée de quartz microcristallin mais la lumière des deux microfossiles semble être remplie par un matériau différent, au vu de son aspect (échelle : 1 micron, scan rate 0,25 Hz). [F] Même région que E, examinée cette fois-ci au microscope électronique à balayage (Hitachi S4500 FEG-SEM, 25000 x, 1 keV, sans métallisation). [G] Vue en 3D du microfossile (zone balayée : 4,5 microns, pointe RTESP7, scan rate 0,25 Hz). [H] Carte élémentaire EDX du soufre (Hitachi S4500 FEG-SEM, 20 000 x, 15 keV, métallisation à l'or).

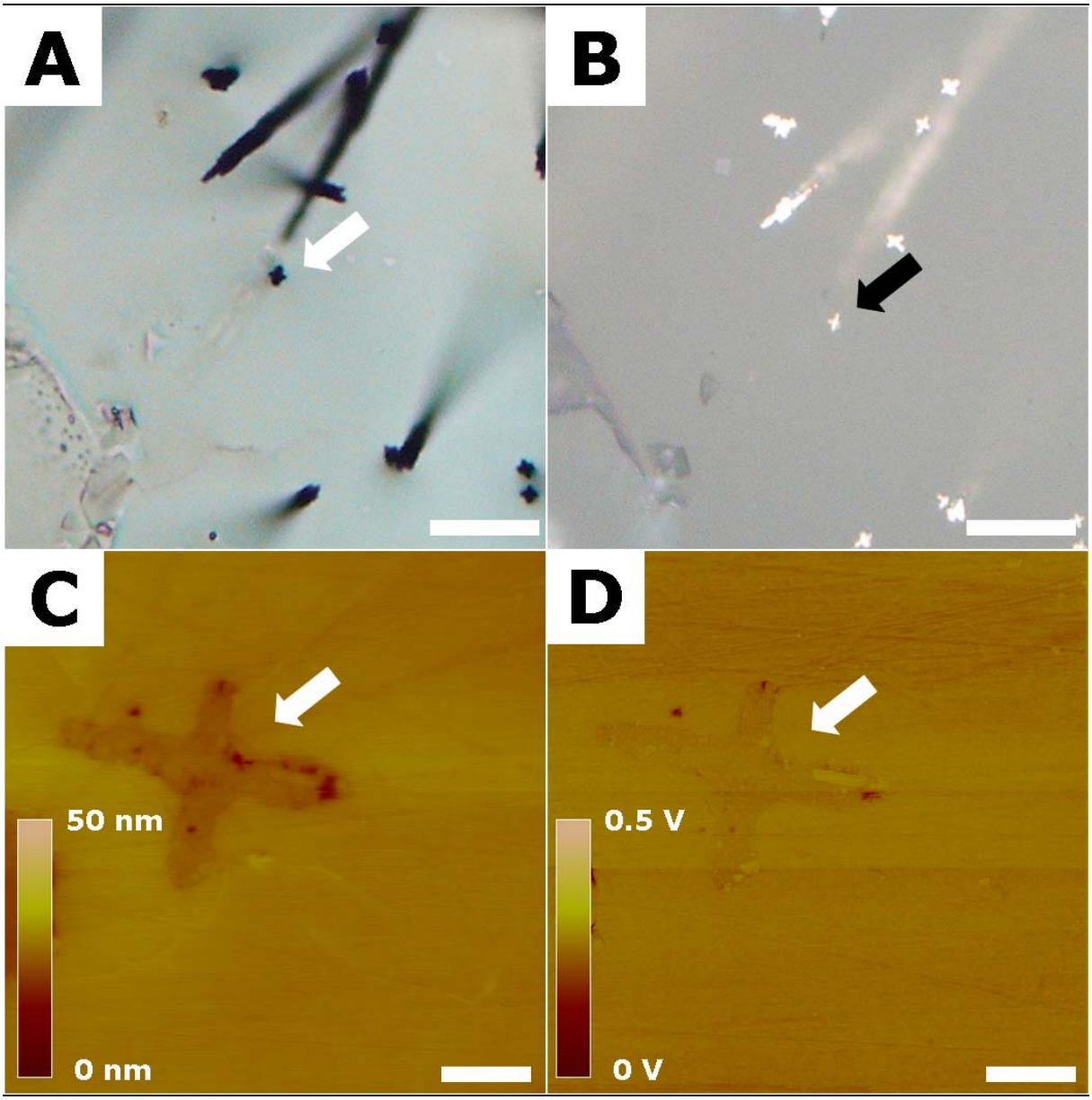


figure 44. Observations réalisées sur des baguettes de pyrite présentant une section en forme d'étoile et incluses dans les cherts de la formation Gunflint. [A] Baguettes imagées avec un microscope optique (grossissement x1000) en lumière transmise. Le diamètre des sections est approximativement de 1,5 microns, soit un diamètre similaire à celui des filaments organiques de *Gunflintia minuta*. La flèche indique la baguette observée au microscope à force atomique dans les images C et D (échelle : 10 microns). [B] Baguettes imagées avec un microscope optique (grossissement x1000) en lumière réfléchie. La flèche indique la baguette observée au microscope à force atomique dans les images C et D (échelle : 10 microns). [C] Image de hauteur obtenue en mode contact de la baguette indiquée par une flèche blanche sur les images A et B (échelle : 500 nm, pointe CONTR50, scan rate 1 Hz). [D] Image de force latérale obtenue en mode contact de la baguette indiquée par une flèche blanche sur les images A et B. Aucune différence nette de friction n'apparaît entre la baguette de pyrite et la matrice minérale siliceuse, contrairement à ce qui a été observé avec les filaments de *Gunflintia minuta* épigénisés en pyrite (figure 43 page 161). Une échelle de couleur identique entre cette figure et la figure 43 page 161 est utilisée (échelle : 500 nm, pointe CONTR50, scan rate 1 Hz).

Imagerie de phase

Des images de phase ont été acquises pour chaque microfossile de la formation Gunflint, avant et après attaque acide. Cependant, malgré la sensibilité de ce mode aux différences de propriétés mécaniques locales (Stark et al., 2001), aucune distinction n'a pu être observée entre la paroi carbonée d'un microfossile et la matrice de quartz environnante. Dans le cas des microfossiles de la formation Gunflint, que ce soit avant ou après attaque acide, il semble que la composante topographique du signal de phase est trop importante, cette dernière masquant alors la composante «physique» due aux différences de propriétés mécaniques des kérogènes par rapport à la silice. L'imagerie de phase s'est cependant montrée utile comme méthode d'augmentation de contraste, en soulignant des structures subtiles non visibles sur les images de hauteur.

Microspectrométrie Raman

A l'origine, la caractérisation chimique des microfossiles des formations Draken et Gunflint étudiés par microscopie à force atomique devait être réalisée par spectrométrie des rayons X par dispersion d'énergie (EDX) lors des analyses au microscope électronique à balayage.

Cependant, au vu des problèmes importants de contamination liés à une accumulation de carbone sous le faisceau d'électrons rencontrés dans le cas des cherts de la formation Draken (figure 19 page 75), cette technique a rapidement été abandonnée au profit de la microspectrométrie Raman.

La microspectrométrie Raman offre plusieurs avantages sur la spectrométrie des rayons X par dispersion d'énergie. Outre le fait que les problèmes de contamination sont éliminés, les analyses ne nécessitent pas de travailler sous vide, et ne demandent pas de métallisation préalable de la surface (ou le dépôt d'un film de carbone), nécessaire pour empêcher l'accumulation des charges sous le faisceau d'électrons du microscope électronique à balayage. Il est donc possible d'effectuer des analyses Raman à n'importe quel moment, alors que la spectrométrie des rayons X par dispersion d'énergie ne pouvait avoir lieu qu'après toutes les études par microscopie à force atomique.

L'objectif des études Raman était de confirmer la nature organique de la paroi des microfossiles étudiés dans le cadre de cette thèse, par l'intermédiaire de spectres Raman (figure 45 page 166 et figure 46 page 166) ou de cartographie 2D (figure 35I page 141).

Les spectres obtenus sur les cellules de *Myxococcoides* des cherts de la formation Draken (figure 45 page 166) montrent les deux caractéristiques spectrales prédominantes des kérogènes (pics à 1350 cm^{-1} et 1600 cm^{-1}), qui correspondent respectivement à de la matière organique désordonnée (D) et de la matière organique graphitisée (G). Le pic G est particulièrement bien défini, tandis que le pic D, assez large, présente un épaulement dans la partie gauche. Les spectres n'ont pas été déconvolués, mais plusieurs composants doivent participer au pic D.

Les spectres obtenus sur les cellules d'*Huroniospora* des cherts de la formation Gunflint (figure 46 page 166) montrent également les deux pics à 1350 cm^{-1} et 1600 cm^{-1}. Le pic G est encore une fois bien défini, tandis que le pic D, assez large, présente un épaulement et un sommet aplati. Les spectres obtenus sur les cellules de *Gunflintia minuta* montrent aussi les deux pics à 1350 cm^{-1} et 1600 cm^{-1}, le pic G étant encore une fois bien défini, et le pic D très aplati. Les spectres n'ont pas non plus été déconvolués, mais il semble également évident que plusieurs composants participent au pic D. Les résultats obtenus sur les microfossiles de la formation Gunflint sont cohérents avec ceux obtenus par d'autres auteurs (Kudryavtsev, 2001; Schopf et Kudryavtsev, 2005; Schopf et al., 2005).

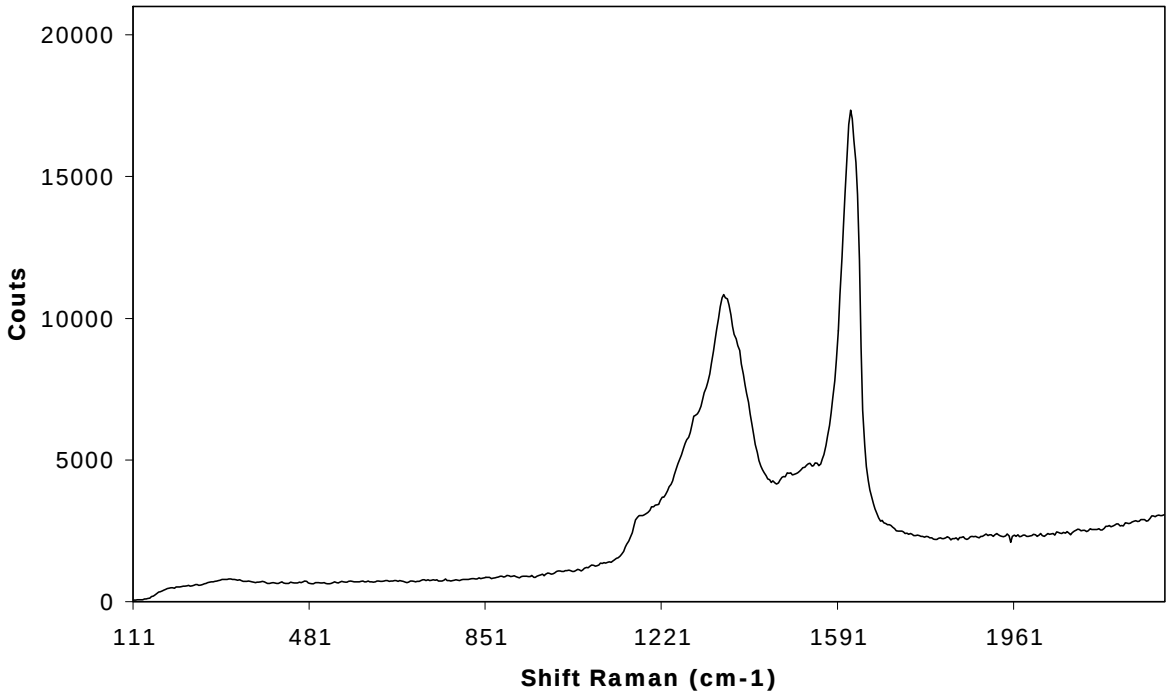


figure 45. Spectre Raman obtenu sur la paroi d'une cellule de *Myxococcoides* (spécimen #r1, figure 35 page 141). L'axe des abscisses indique le décalage spectral en cm^{-1}, et l'axe des ordonnés le nombre de photons reçus par le détecteur. Le spectre montre les deux pics caractéristiques des kérogènes, un pic D situé à 1350 cm^{-1} environ et un pic G situé à 1600 cm^{-1} environ. Le pic D possède un épaulement dans sa partie gauche, et le pic G est très bien défini.

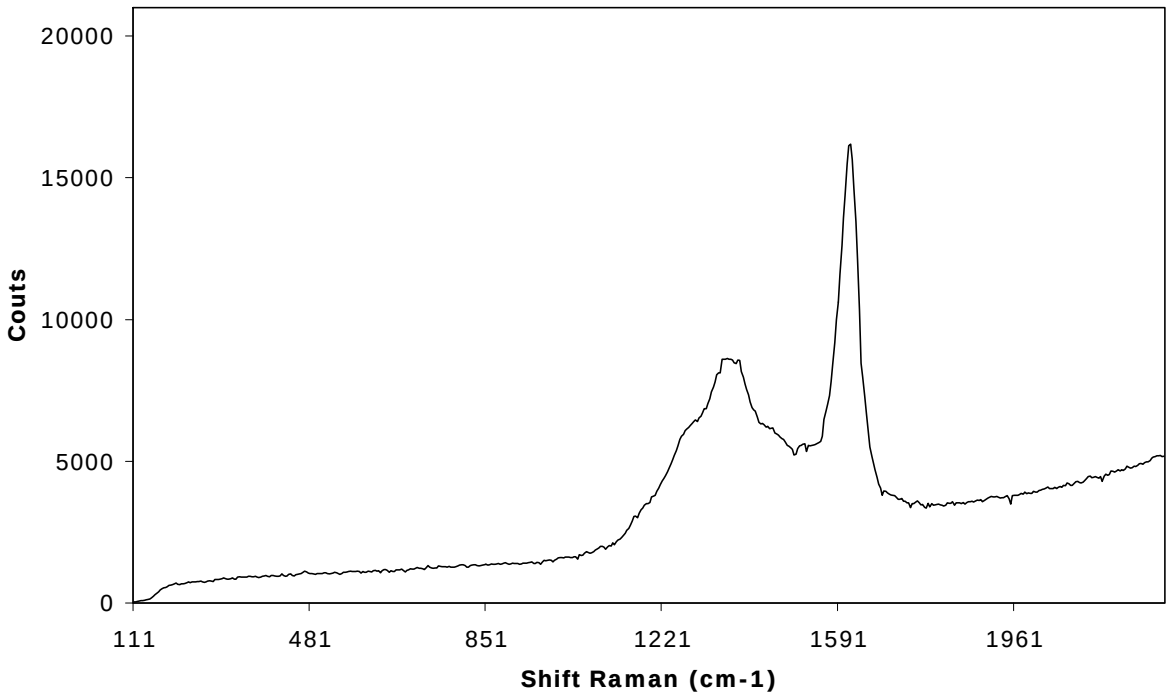


figure 46. Spectre Raman obtenu sur la paroi d'une cellule d'*Huroniospora* (spécimen #dl, figure 27C page 110). L'axe des abscisses indique le décalage spectral en cm^{-1}, et l'axe des

ordonnés le nombre de photons reçus par le détecteur. Le spectre montre les deux pics caractéristiques des kérogènes, un pic D situé à 1350 cm^{-1} environ et un pic G situé à 1600 cm^{-1} environ. Le pic D apparaît plus symétrique que celui obtenu sur les microfossiles de la formation Draken, et possède un épaulement dans sa partie gauche. Le pic G est très bien défini.

D'après les spectres Raman obtenus, la matière organique pariétale des microfossiles des formations Draken et Gunflint apparaît constituée de macromolécules aromatiques reliées entre elles et formant un réseau plus ou moins régulier (Durand, 1980; Vandebroucke, 2003)

Par rapport à son objectif premier (caractériser chimiquement les microfossiles étudiés parallèlement par microscopie à force atomique), la microspectrométrie Raman a parfaitement joué son rôle. Comparée à des cartes élémentaires du carbone obtenues par spectrométrie des rayons X par dispersion d'énergie (figure 38J page 151), elle apporte plus d'informations, puisqu'elle permet non seulement d'étudier la distribution du carbone avec une résolution micrométrique, tout en fournissant des informations sur l'état de désordre des matériaux carbonés. Elle s'est montrée très sensible aux kérogènes, et même à très faible puissance (0,5 mwatts), un signal très fort a pu être obtenu pour tous les microfossiles étudiés, y compris ceux de la formation Draken, pourtant très pauvres en matière organique. Le signal provenant des filaments de *Gunflintia minuta* est certes relativement faible par rapport aux autres microfossiles, mais cela est dû à la petite taille (1,5 microns) de ces structures.

Si la microspectrométrie Raman a surtout été utilisée ici pour documenter la présence et la distribution du carbone en 2D (la 3D étant possible, voir Schopf et Kudryavtsev, 2005), des informations intéressantes peuvent théoriquement être tirés des spectres. Ces derniers peuvent par exemple servir à estimer l'état de maturation de la matière organique (grâce en particulier à la largueur à demi hauteur du pic G), cette information pouvant se révéler cruciale durant l'établissement de la syngénicité d'un microfossile (Roberts et al., 1995; Quirico et al., 2005). Cette technique peut également servir à étudier la minéralogie de la matrice minérale encaissante, et les spectres obtenus sur les microfossiles des formations Draken et Gunflint montrent par exemple des pics caractéristiques du quartz et de la pyrite.

Imagerie X du soufre

De manière à améliorer la caractérisation chimique des microfossiles étudiés par microscopie à force atomique, des études par micro-imagerie X ont également été entreprises. Le carbone étant couvert par la microspectrométrie Raman, le soufre fut choisi comme élément cible pour ces études.

Bien qu'étant le troisième élément par ordre d'abondance dans la matière organique sédimentaire (Tissot et Welte, 1984), il existe paradoxalement peu de travaux concernent l'étude du soufre dans la paroi organique de microfossiles précambriens. Ce dernier joue pourtant un rôle important dans la préservation de la matière organique (Durand et Monin, 1980), et contribue de manière significative à la formation des kérogènes (Brassell et al., 1986). La détermination de l'abondance et de l'état d'oxydoréduction du soufre dans la paroi organique d'un microfossile peut en particulier être utilisée pour obtenir des informations sur l'état de préservation des composés carbonés. Boyce et al. (2001) ont également proposé que la quantité de soufre, incorporé dans des microfossiles bien préservés, puisse fournir une indication du type de composés moléculaires initialement présents au niveau de la paroi de la cellule vivante.

Etant donné la faible teneur potentiel en soufre des kérogènes constituant la paroi des microfossiles des formations Draken et Gunflint, une des techniques les plus prometteuses pour détecter cet élément est la combinaison de la micro-imagerie de fluorescence avec la microspectrométrie d'absorption au seuil du soufre (S-XANES) en utilisant un pinceau focalisé de lumière X synchrotron (Pickering et al., 1998; Susini et al., 2002; Prietzel et al., 2003). La micro-imagerie X et le C-XANES ont déjà été utilisées avec succès pour étudier des structures fossiles tels que des végétaux fossiles perminéralisés d'âge dévonien (Boyce et al., 2002; Boyce et al., 2003) ou des charbons (Cody et al., 1996). La question était de savoir si l'extension au soufre de cette technique pouvait apporter des résultats nouveaux et compléter les analyses morphologiques et physiques effectuées par microscopie à force atomique.

Formation Draken

Cartes du fer

Pour les microfossiles de la formation Draken (que ce soit sur les fragments de lames minces ou les coupes ultra-minces), les cartes de fluorescence établies au seuil énergétique du fer (7,2 keV) montrent que le fer est localisé uniquement dans des particules minérales, identifiées par leurs spectres XANES au seuil énergétique du soufre. Ces spectres montrent un pic à 2472 eV, caractéristique de la pyrite.

Les cristaux de pyrite sont généralement dispersés dans la matrice silicatée, et leur présence à proximité des microfossiles étudiés a justement été utilisée pour les localiser. La pyrite est aussi associée aux microfossiles eux-mêmes : il est effectivement courant de rencontrer des pyrites dans la lumière cellulaire (figure 35I page 141), ou à proximité immédiate des parois organiques cellulaires (figure 47 page 171). Cependant, hormis au niveau des grains de pyrite, le fer n'a jamais été détecté dans les parois carbonées, quelque soit le temps d'intégration utilisé.

Cartes du soufre

Les cartes de fluorescence réalisées au seuil énergétique du soufre (2,5 keV) sur des temps d'intégration longs (quelques secondes par pixel) montrent que les plus grandes concentrations de soufre correspondent aux cristaux de pyrite, déjà mis en évidence par les cartes effectuées au seuil du fer (figure 47 page 171 et figure 48 page 172). Cependant, de petites quantités de soufre ont également été détectées dans la paroi organique des microfossiles, dans des régions totalement dénuées de fer (figure 47 page 171 et figure 48 page 172). La présence de soufre dans les parois organiques des microfossiles de la formation Draken a été confirmée par les analyses chimiques effectuées sur les coupes FIB découpées dans les microfossiles #tr3 (figure 34 page 138) et #r1 (figure 35 page 141).

D'un point de vue quantitatif, après comparaison avec le standard SRM, la concentration maximale du soufre compris dans la paroi des *Myxococcoides* de la formation Draken a été estimée à 290 ppm (± 30 ppm). Les différents tests effectués montrent que la teneur en soufre dans des structures submicrométriques comme la paroi organique de microfossiles précambriens est plus efficacement estimée par une approche en deux étapes consistant à imager rapidement le microfossile avec des faibles taux de comptage, et à moyenner ensuite à posteriori le spectre de fluorescence émis par des zones d'intérêts après la mesure (spectres tirés de cartes reconstruites avec le logiciel ARTEMIS et traités avec le logiciel PyMca), plutôt que de réaliser de longs temps d'acquisition en mode point. Cela s'explique par la dérive spatiale de l'échantillon sur des temps d'acquisition suffisamment longs pour que les données soient représentatives.

XANES

Au niveau des parois, le soufre détecté n'est pas lié au fer, et il est donc possible de conclure qu'il s'agit probablement de soufre organique. Cette hypothèse a été confirmée par les analyses XANES (figure 49 page 173) obtenues en mode point sur les parois organiques des microfossiles. Les énergies des lignes blanches des standards sont indiquées dans le tableau 2.

Etant donné la résolution en énergie de 0,2 eV, le pic de la pyrite (2471,9 eV) est identique, que ce soit en mode focalisé ou non focalisé, à la valeur

de référence. L'énergie correspond à la ligne blanche (pic) des composés soufrés présente une différence positive de 1,9 ± 0,1 eV par rapport au soufre inorganique des grains de pyrite, qui représente la principale forme de soufre dans ces échantillons.

Au vu des différents standards que nous avons utilisé, cette valeur (2473,8 ± 0,1 eV) semble pointer vers des composés soufrés hétérocycliques (thiophène). Il ne peut s'agir d'alkyl-polysulfures, étant donné qu'ils possèdent une ligne blanche toujours inférieure à 2472,5 eV. Il ne peut également pas s'agir de thiols et d'alkyl-monosulfure : l'énergie de la ligne blanche du glutathion et de la méthionine étudiés ici est de 2473,3 ± 0,1 eV. Les valeurs reportées par Sarret et al. (1999) pour les alkyl-monosulfures varient dans un intervalle de 0,2 eV et possèdent une énergie de ligne blanche maximale de 0,9 eV par rapport à la DL-cystine (soit 2473,4 eV avec nos valeurs de calibration). Les valeurs reportées pour les composés thiophéniques varient dans un intervalle de 0,5 eV et possèdent une valeur minimale de 2473,5 eV. L'énergie minimale pour les sulfoxydes est de 2475,6 eV (Sarret et al. 1999; Prietzel et al. 2003). L'énergie de la ligne blanche du soufre contenu dans la paroi des cellules de *Myxococcoides* de la formation Draken (2473,8 ± 0,1 eV) est significativement plus élevée que celle des alkyl-sulfures (inférieure à 2473,4 eV) et plus faible que celles des sulfoxydes. La probabilité est donc forte que ce soufre soit un soufre hétérocyclique de nature thiophénique. L'aspect élargi de la partie haute énergie du pic principal, ainsi que les pics secondaires dans le domaine EXAFS (2475 à 2480 eV), semblent indiquer une certaine diversité des composés thiophéniques présents dans les parois cellulaires. Il est cependant possible que d'autres formes réduites du soufre, comme des disulfures, des alkyl-sulfures et aryl-sulfures, soient également présentes en tant qu'espèces mineures, mais n'aient pas été détectées à cause de leur très faible concentration. Aucune contribution de soufre élémentaire ou de formes oxydées n'a été détectée.

Les résultats présentés ci-dessus sont en accord avec bon nombre d'observations effectuées sur le soufre dans la matière organique fossile tels que les kérogènes (Sarret et al., 2002), les asphaltènes (Sarret et al., 1999), les pétroles, les charbons (Spiro et al., 1984) et les schistes bitumineux (Olivella et al., 2002).

Cartes du silicium

Bien qu'anecdotiques, les cartes du silicium (établies à 7,2 eV) montre une déplétion de cet élément (formant une empreinte sombre en «négatif») dans la région correspondant à la paroi cellulaire (figure 47F page 171 et figure 48B page 172), ce «vide» indiquant la présence d'un autre élément (principalement carbone).

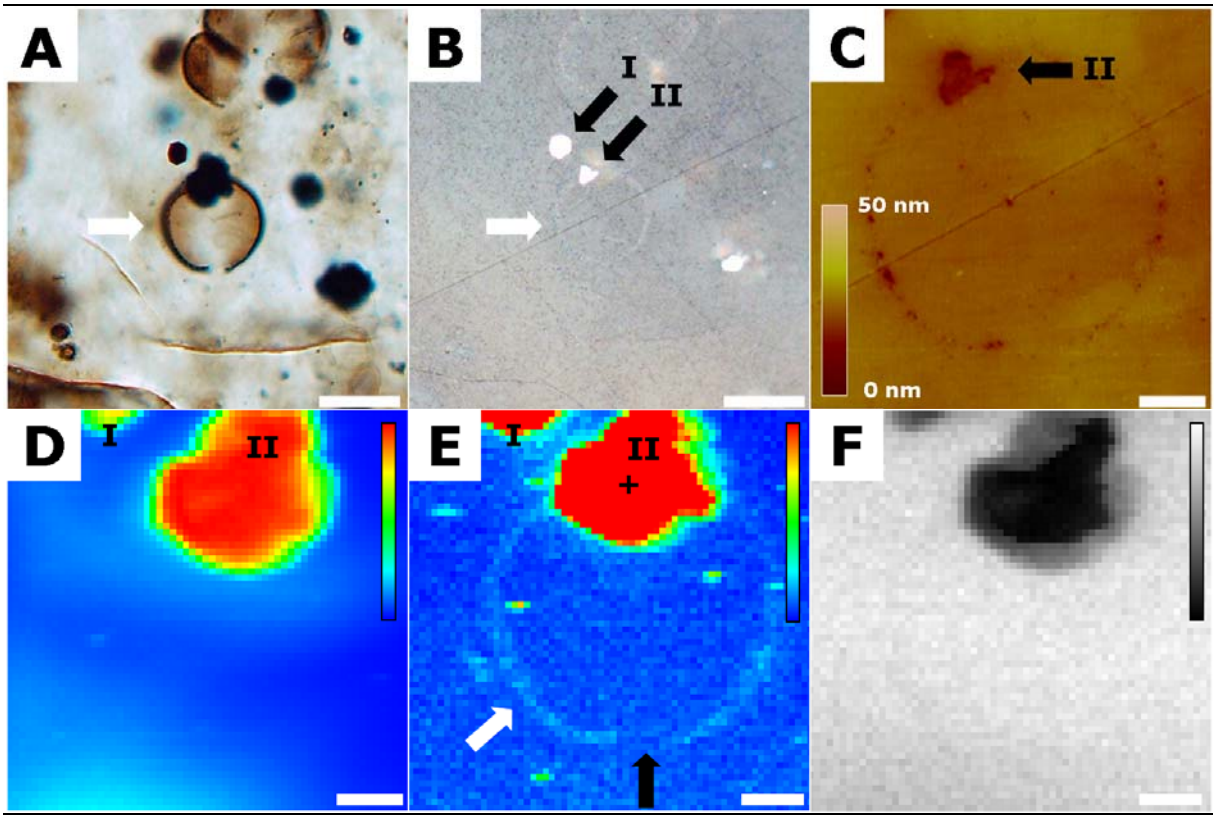


figure 47. Une cellule de *Myxococcoides chlorelloidea* de la formation Draken. Cellule imagée au microscope optique (grossissement x500) en lumière transmise. La cellule située au centre de l'image (flèche blanche) mesure 24 microns de diamètre, et a été identifiée comme appartenant à une population de *Myxococcoides chlorelloidea*. Des cristaux noirs de pyrite sont associés avec la paroi organique dans la partie supérieure du microfossile. La paroi organique est interrompue à l'extrémité inférieure de la cellule (échelle : 10 microns). [B] Même cellule (flèche blanche) imagée au microscope optique (grossissement x500) en lumière réfléchie. Deux cristaux de pyrites (libellés I et II, flèches noires) affleurent à la surface de la lame mince de roche (échelle : 20 microns). [C] Image de hauteur obtenue en mode contact de la cellule indiquée par une flèche blanche dans l'image A, et exposée à la surface de la lame mince. Notez les cicatrices d'arrachement qui délimitent la paroi cellulaire. Ce type d'image est utile pour détecter une contamination de surface, ici absente. La flèche noire indique le cristal de pyrite libellé II (échelle : 5 microns, pointe CONTR50, scan rate 1 Hz). [D] Carte de fluorescence obtenue à 7,2 keV sur la ligne ID21 de l'ESRF montrant la distribution du fer, qui est présent uniquement dans les cristaux de pyrite I et II. Temps d'intégration 4 secondes par pixel (échelle : 5 microns). [E] Carte de fluorescence obtenue à 2,5 keV sur la ligne ID21 de l'ESRF montrant la distribution du soufre, présent à la fois au niveau des cristaux de pyrite (I et II), mais aussi au niveau de la paroi organique cellulaire du microfossile. Temps d'intégration 4 secondes par pixel. Notez l'absence de soufre dans la région indiquée par une flèche noire, et correspondant à l'interruption de la paroi organique. La croix noire indique la région sélectionnée pour les micro-analyses XANES au seuil du soufre (échelle : 5 microns). [F] Carte de fluorescence obtenue à 2,5 keV sur la ligne ID21 de l'ESRF montrant la distribution du silicium au niveau du microfossile. La déplétion (très ténue) correspond à la paroi organique cellulaire (échelle : 5 microns).

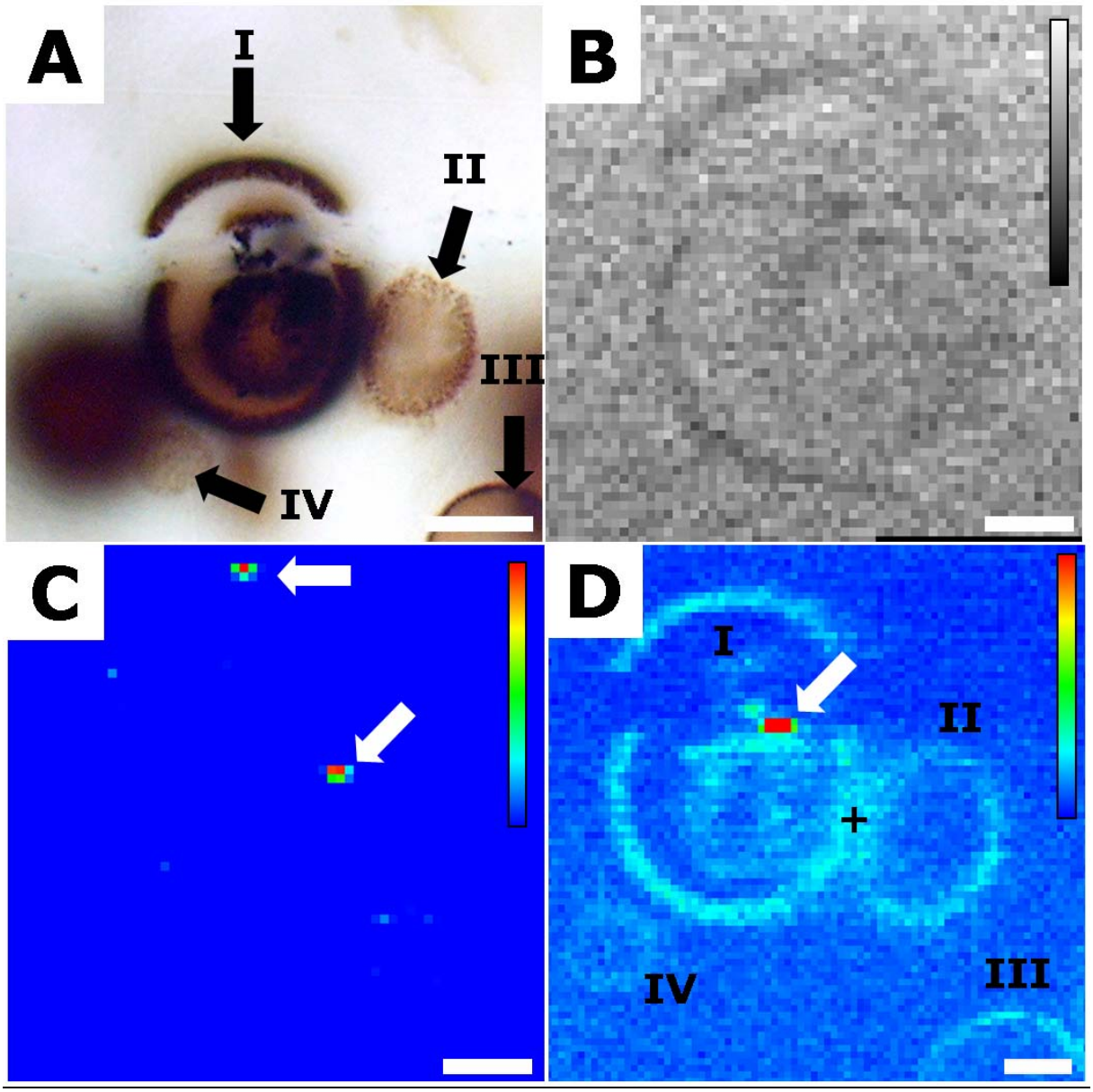


figure 48. Un groupe de microfossiles de la formation Draken. [A] Cellules fossiles imagées au microscope optique (grossissement x1000) en lumière transmise. La cellule principale (I, spécimen #bmg), située au centre de l'image, mesure 23,5 microns de diamètre, et a été identifiée comme étant une *Myxococcoides chlorelloidea*. Elle possède une vésicule interne, un globule de matière organique excentré, et a été partiellement déchirée par une fracture remplie de quartz secondaire. Le microfossile est accompagné par d'autres cellules organiquement préservées, libellées II, III et IV (échelle : 10 microns). [B] Carte de fluorescence obtenue à 2,5 keV sur la ligne ID21 de l'ESRF montrant la distribution du silicium au niveau du microfossile I. La déplétion correspond à la paroi organique cellulaire (échelle : 5 microns). [C] Carte de fluorescence obtenue à 7,2 keV sur la ligne ID21 de l'ESRF montrant la distribution du fer, qui est présent uniquement dans les cristaux de pyrite, indiqués par des flèches blanches. Temps d'intégration 3 secondes par pixel (échelle : 5 microns). [D] Carte de fluorescence obtenue à 2,5 keV sur la ligne ID21 de l'ESRF montrant la distribution du soufre, présent à la fois au niveau des cristaux de pyrite (la flèche blanche indique le cristal de pyrite situé en bas sur l'image précédente), mais aussi au niveau de la paroi organique cellulaire des microfossiles I, II, III et IV. Temps d'intégration 3 secondes par pixel. La croix noire indique la région sélectionnée pour les micro-analyses XANES au seuil du soufre (échelle : 5 microns).

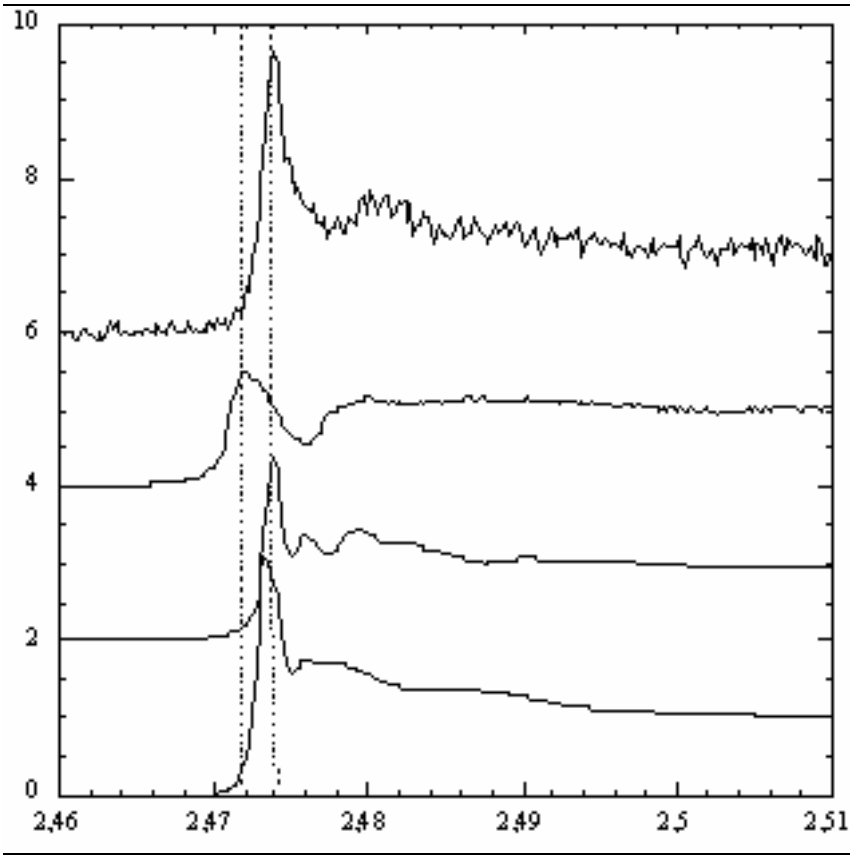


figure 49. Spectre XANES obtenus sur les composés de référence et une cellule de *Myxococcoides* de la formation Draken. L'axe des abscisses indique l'énergie en keV, l'axe des ordonnées l'intensité du signal. De bas en haut : méthionine, dibenzothiophène (DBT), pyrite et paroi organique d'une cellule de *Myxococcoides* (#bmg). La correspondance est presque parfaite entre le DBT et le soufre organique contenu dans la paroi du microfossile.

Formation Gunflint

Cartes du fer

Pour les microfossiles de la formation Gunflint (*Huroniospora spp.* et *Gunflintia minuta*), les cartes de fluorescence établies au seuil énergétique du fer (7,2 keV) sur les fragments de lames minces ou les coupes ultra-minces n'ont pas permis de détecter du fer, hormis dans le cas des filaments de *Gunflintia minuta* épigénisés en pyrite.

Cartes du soufre

Les cartes réalisées au seuil du soufre (2,5 keV) sur des temps d'intégration longs (lames minces ou coupes FIB, quelques secondes par pixel) n'ont pas permis de détecter du soufre (figure 42E et figure 42F page 159), hormis dans le cas des filaments de *Gunflintia minuta* épigénisés en pyrite (figure 50 page 174), ou de baguettes abiogéniques de pyrite (figure 51 page 175). L'absence de soufre au niveau des parois organiques des deux microfossiles dominants de la formation Gunflint (*Huroniospora spp.* et *Gunflintia minuta*) semble être confirmée par les analyses chimiques de la coupe FIB découpée sur le spécimen

d'*Huroniospora* #01-4 (figure 42 page 159), qui n'ont pas permis de déceler cet élément.

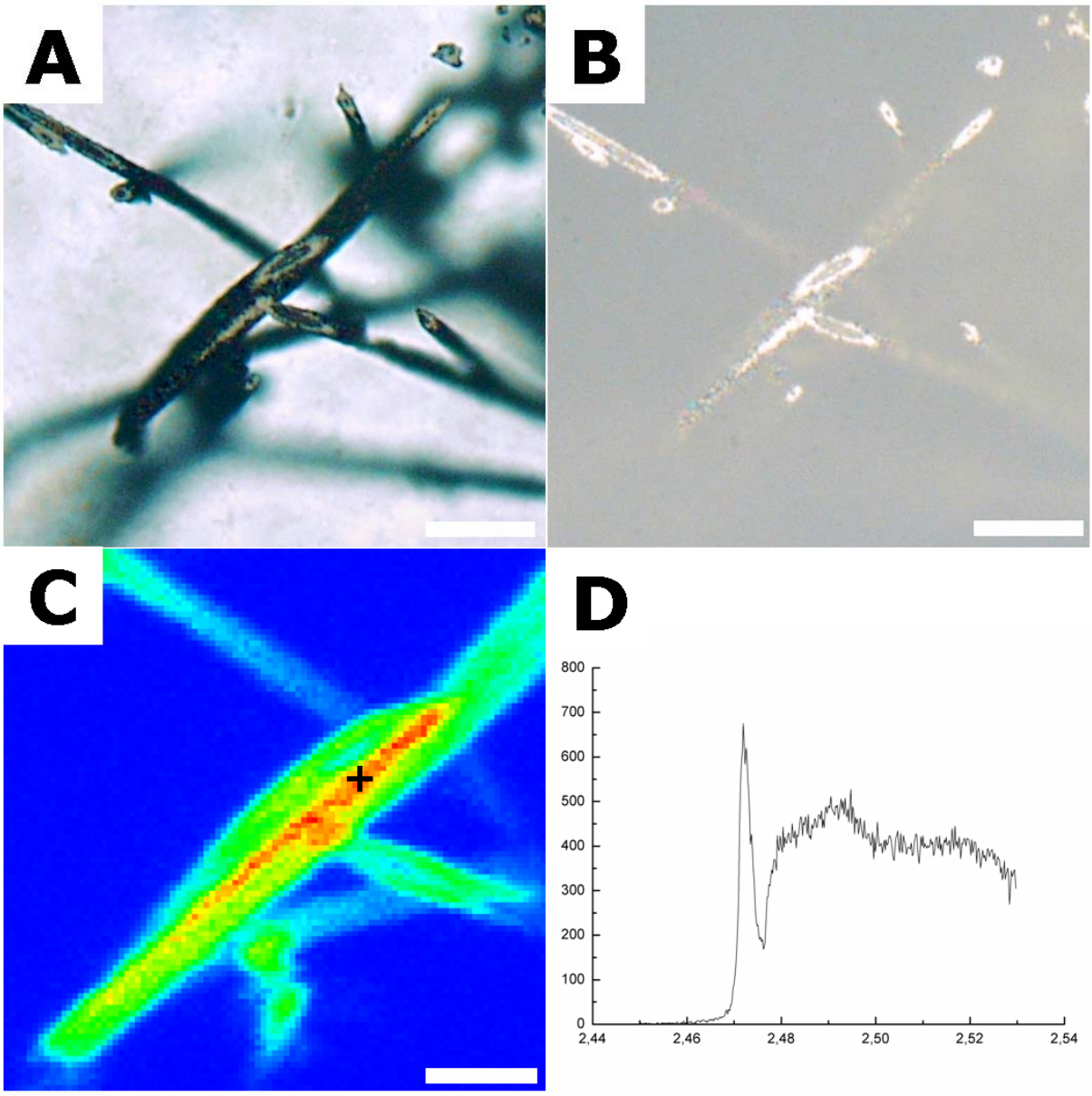


figure 50. Observations effectuées sur des filaments pyritisés de *Gunflintia minuta* inclus dans la matrice siliceuse des cherts de la formation Gunflint. [A] Filaments imagés avec un microscope optique (grossissement x1000) en lumière transmise (échelle : 10 microns). [B] Même région, observée cette fois en lumière réfléchie (grossissement x1000). Les sections obliques des filaments laissent entrevoir la lumière cellulaire centrale remplie de silice (échelle : 10 microns). [C] Carte de fluorescence obtenue à 2,5 keV sur la ligne ID21 de l'ESRF montrant la distribution du soufre. La croix noire indique la région sélectionnée pour les micro-analyses XANES au seuil du soufre (échelle : 5 micron). [D] Spectre XANES obtenu sur l'une des baguettes pyritisées (croix noir sur l'image C). L'axe des abscisses indique l'énergie en keV, l'axe des ordonnées l'intensité du signal. L'énergie de la ligne blanche est caractéristique de la pyrite.

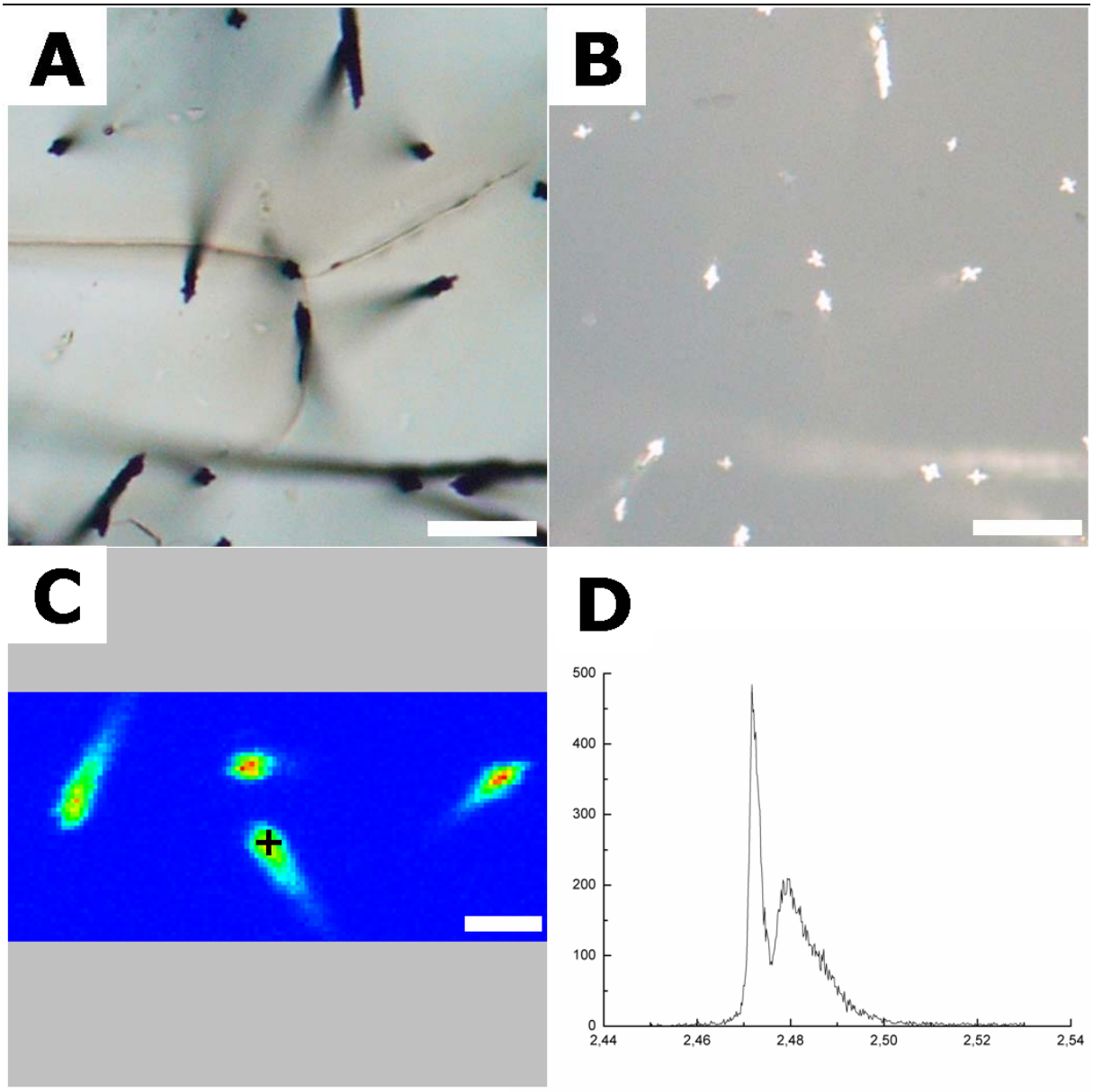


figure 51. Observations effectuées sur des baguettes abiogéniques pyritiques présentant une section en forme de croix (texture squelettique) incluses dans la matrice siliceuse des cherts de la formation Gunflint. [A] Baguettes imagées avec un microscope optique (grossissement x1000) en lumière transmise. La section d'une baguette mesure 1,5 microns (échelle : 10 microns). [B] Même région, observée cette fois en lumière réfléchie (grossissement x1000). La forme en croix des sections est particulièrement bien visible (échelle : 10 microns). [C] Carte de fluorescence obtenue à 2,5 keV sur la ligne ID21 de l'ESRF montrant la distribution du soufre. La croix noire indique la région sélectionnée pour les micro-analyses XANES au seuil du soufre (échelle : 3 micron). [D] Spectre XANES obtenu sur l'une des baguettes pyritisées (croix noire sur l'image C). L'axe des abscisses indique l'énergie en keV, l'axe des ordonnées l'intensité du signal. L'énergie de la ligne blanche est caractéristique de la pyrite. La partie haute énergie du spectre n'est pas exploitable, car l'échantillon a subi une dérive durant la mesure, ce qui empêche les comparaisons avec les filaments pyritisés de *Gunflintia minuta*.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

«La maladie principale de l'homme est la curiosité inquiète des choses qu'il ne peut savoir.»

Pascal

Le microscope à force atomique comme instrument en micropaléontologie

Les observations effectuées dans le cadre de cette thèse sur des microfossiles individuels préservés dans les cherts des formations Draken et Gunflint montrent que le microscope à force atomique est un outil utile en micropaléontologie précambrienne.

Le microscope à force atomique permet d'étudier des cellules de dimensions micrométriques exposées à la surface de lames minces de roches, et ce avant ou après attaque acide. La petite taille des microfossiles n'est pas un problème en soit, si un protocole efficace de relocalisation est mis en place (observation avant attaque acide de l'empreinte topographique du microfossile à la surface de la lame mince, liée au départ de la matière organique durant l'étape de polissage, et si nécessaire, ajustement de l'intensité corrosive de l'attaque acide pour préserver une partie de l'empreinte qui servira alors de marqueur sur la surface attaquée).

Excepté l'attaque acide nécessaire pour ôter la gangue minérale et exposer au mieux les parois organiques, l'observation de microfossiles au microscope à force atomique ne nécessite aucun traitement particulier. La lame mince doit simplement être déposée sur la platine du microscope, et les observations peuvent immédiatement commencer. Ainsi, si l'on excepte la problématique de relocalisation et la nécessité d'avoir des surfaces plates et très propres, il est aussi simple de lancer des observations avec un microscope à force atomique qu'avec un microscope optique, le bénéfice du premier étant un grossissement bien supérieur au second, limité par le phénomène de diffraction.

Après attaque acide, les comparaisons d'images acquises avec le microscope à force atomique et le microscope électronique à balayage (figure 38 page 151) montrent clairement que le microscope à force atomique est capable de fournir des images possédant une résolution égale à celle du microscope électronique à balayage, sans avoir à travailler sous vide ni à recouvrir l'échantillon d'une couche métallique conductrice. Le microscope à force atomique possède de plus des capacités d'imagerie 3D, qui permettent de réaliser des mesures morphométriques avec une précision nanométrique de n'importe quel type de structure, que ce soit un cristal de quartz ou la paroi carbonée d'un microfossile (figure 38 page 151). L'appréciation des reliefs est donc bien supérieure à celle possible avec un microscope électronique à balayage.

En ce qui concerne les critères (décrits en introduction) permettant l'identification d'un microfossile donné dans une roche, le microscope à force atomique est capable de prouver l'indigénicité d'une structure donnée, c'est-à-dire le fait que le microfossile est inclus dans la matrice minérale, et n'est pas un contaminant superficiel de surface. Cette démonstration nécessite la taille d'une lame mince au cœur d'un échantillon rocheux, dans une région considérée comme propre, non traversée par des fractures, puis une attaque acide.

Enfin, il semble important de rappeler que, contrairement au microscope optique et au microscope électronique à balayage, le microscope à force atomique possède la capacité de déterminer les propriétés physiques des matériaux constituants l'échantillon, comme l'ont montré l'imagerie de force latérale (sur les filaments épigénisés en pyrite), l'imagerie force volume (sur les microfossiles organiquement préservés de la formation Gunflint) et l'imagerie de phase (sur les microfossiles organiquement préservés de la formation Draken). Les deux premiers modes, imagerie de force latérale et imagerie de force volume, permettent de plus d'accéder à la cartographie à force chimique, qui, comme il sera expliqué plus loin, est sans conteste l'utilisation la plus prometteuse de la microscopie à force atomique dans le domaine de la micropaléontologie précambrienne.

Si, comme il vient d'être précisé, le microscope à force atomique possède de nombreux avantages parfaitement exploitables dans le domaine de la micropaléontologie précambrienne, il souffre aussi d'un certain nombre de limitations, décrites ci-dessous, dont il faut tenir compte.

La microscopie à force atomique n'est pas une technique de détection

La première limitation, très importante, tient au fait que l'instrument ne peut absolument pas être employé comme technique de détection de microfossiles dans une lame mince de roche. Son utilisation en micropaléontologie implique effectivement l'identification préalable de microfossiles exposés à la surface d'une lame mince de roche par microscopie optique (pour la majorité des microfossiles du protérozoïque)

ou par microscopie électronique (dans le cas de microfossiles possédant une taille inférieure à la résolution spatiale d'un microscope optique).

L'un des inconvénients connexes de l'instrument est qu'il se limite à l'analyse de l'extrême surface d'un échantillon. Il ne peut donc analyser que des microfossiles situés à la surface d'une lame mince de roche, et est parfaitement incapable de conduire une recherche dans le volume de cette dernière. De plus, même si l'on considère qu'il serait possible d'identifier un microfossile exposé en surface en recherchant des cicatrices d'arrachement de formes particulières (cercle pour les microorganismes sphériques sectionnés selon n'importe quel plan, ou pour les filaments sectionnés de façon normale; cylindrique pour les filaments sectionnés longitudinalement), le balayage de la totalité de la surface d'une lame mince prendrait un temps extrêmement long. Effectivement, la tête de l'instrument que nous avons utilisé au cours de cette thèse (D3100) peut balayer au maximum une région de 120 microns de côté (figure 5 page 44). L'examen d'un autre secteur nécessite de désengager la tête, de se déplacer avec la platine motorisée sur une distance suffisante, puis de procéder à un réengagement. Correctement programmé, le D3100 peut réaliser cette opération de manière automatique, mais dans la pratique, il s'agit d'un mode de fonctionnement peu commode. Ainsi, en admettant que le temps nécessaire au balayage d'une zone carrée de 100 microns de côté demande 10 minutes, que la surface d'une lame mince à étudier soit de 6 cm^2 (3 cm sur 2 cm), que la pointe ne s'émousse ni ne se contamine (de manière à avoir une qualité d'image égale sur la totalité du jeu d'images), et que le taux de recouvrement des images soit de 10 % (pour permettre leur assemblage), il faudrait à l'appareil environ 52 jours pour réaliser les mesures et couvrir la totalité de la surface de la lame mince de roche.

Bien entendu, au terme de l'acquisition, rien ne dit que les cicatrices d'arrachement prometteuses identifiées correspondent exactement à des cellules sectionnées à la surface de la lame mince (il serait possible d'augmenter les chances de reconnaissance en réalisant, simultanément à l'image topographique, une carte d'adhésion, mais l'obtention de cette dernière augmente considérablement la durée de balayage d'un seul champ, qui se compte désormais non plus en minutes, mais en heures). Enfin, aucune information minéralogique d'aucune sorte n'apparaît sur les images. Au microscope optique, la même opération ne prend que quelques heures, fourni de nombreuses informations structurales et minéralogiques, et, sur des formations connues, permet d'identifier avec certitude les microfossiles. Ainsi, le microscope à force atomique permet seulement d'effectuer des mesures complémentaires sur des microfossiles ou des groupes de microfossiles préalablement identifiés et localisés par microscopie optique.

Etat de surface et polissage

Le deuxième inconvénient est également lié au mode de fonctionnement de l'instrument. Comme nous l'avons vu, ne pouvant réaliser que des mesures de surface, un microfossile donné doit obligatoirement être exposé en surface d'une lame mince polie pour être analysable par microscopie à force atomique. La densité des microfossiles joue ici un grand rôle dans la mesure. Pour une roche riche d'un point de vue fossilifère, il y aura toujours statistiquement, sur un jeu de lames minces, quelques spécimens intéressants tronqués en surface. Dans notre cas, nous avons utilisé la chance statistique pour trouver des cellules d'*Huroniospora* et de *Myxococcoides*, ainsi que des filaments de *Gunflintia minuta*, sectionnés de manière normale ou longitudinale.

Par contre, si la roche sédimentaire se révèle pauvre en microfossiles, il faudra utiliser la technique mise en œuvre par Kempe et al. (2002), qui consiste à travailler avec des lames minces plus épaisses (200 microns), à localiser dans le volume une cellule intéressante, et à abaisser par polissage la surface de la lame mince pour exposer le microfossile en surface. Cette opération est longue, contraignante, et présente des risques. Si le polissage n'est pas suffisant, le microfossile ne sera pas analysable par le microscope à force atomique. Si le polissage est trop important, le microfossile risque la destruction. Il faut noter que cette technique se serait révélée nécessaire pour l'étude de microfossiles de la formation Gunflint autres que les deux espèces dominantes (*Gunflintia minuta* et *Huroniospora*), comme *Eosphaera* par exemple. Notons de plus que la lame mince pétrographique doit posséder un poli d'une qualité suffisante, sous peine de compliquer les mesures (le polissage manuel final demandant une certaine habitude).

La présence de cicatrices d'arrachements le long de la paroi d'un microfossile (que ce soit ceux de la formation Draken ou Gunflint) prouve qu'une désagrégation mécanique de la matière organique a eu lieu durant le polissage, ce qui confirme la sensibilité des matériaux carbonés aux opérations liées à la préparation de l'échantillon. Comme l'ont montré plusieurs auteurs (Pasteris, 1989; Wang et al., 1989; Beyssac et al., 2003), le polissage peut aussi provoquer une réorganisation structurale significative à l'échelle atomique des feuillets aromatiques polycycliques dans la partie superficielle de la matière organique. Malgré l'enlèvement d'une certaine quantité de matériel de la surface d'une lame mince pétrographique durant l'attaque acide (silice mais aussi matière organique), rien ne prouve avec certitude que la paroi exposée par cette étape et étudiée par microscopie à force atomique n'a pas été affectée par le polissage, et que des informations structurelles originales n'ont pas été oblitérées (même si cela semble peu probable en ce qui concerne la formation Gunflint: excepté les globules, la ressemblance entre la paroi observée par microscopie à force atomique et celle étudiée après découpage d'une coupe FIB par microscopie électronique en transmission

est frappante). Ainsi, étant donné que la microscopie à force atomique est une technique d'extrême surface, il convient de garder à l'esprit les dommages potentiels que le polissage peut faire subir à des matériaux fragiles tel que la matière organique.

Attaque acide

Le troisième inconvénient est lié à l'aspect presque obligatoire de l'attaque acide, dès que la paroi organique doit être dégagée de sa gangue de silice. Certes, contrairement aux travaux précédents (Kempe et al., 2002; Kempe et al., 2005), cette étude a montré que le microscope à force atomique peut parfaitement fournir des données intéressantes sans attaque acide, grâce à des types d'imagerie s'appuyant sur le mode contact, comme l'imagerie de force latérale ou l'imagerie force volume. Cependant, l'étape d'attaque acide est essentielle dans la mesure ou elle permet de dégager la paroi et de la rendre visible sans la moindre ambiguïté, ce qui permet d'affiner son étude.

L'étape d'attaque acide peut cependant avoir des effets négatifs, et créer des structures qui n'existaient pas auparavant. On peut par exemple se demander si ce n'est pas le cas de certains des globules associés à la paroi organique des microfossiles de la formation Gunflint. Si, comme expliqué plus loin dans le chapitre sur la contamination, certaines structures globulaires découvertes dans les parois d'*Huroniospora* et de *Gunflintia minuta* sont clairement des artefacts, d'autres globules sont tout à fait réels, étant donné qu'ils apparaissent aussi bien sur les images de hauteur (figure 55 page 191), quelque soit le type de pointes utilisé, et qu'ils sont aussi visibles sur les clichés de la même région pris au microscope électronique à balayage (figure 55 page 191). L'une des explications est de considérer que ces globules sont similaires aux sphérules de silice associées aux kérogènes et mis en évidence par Moreau et Sharp (2004) après une étude au microscope électronique à transmission des parois organiques des microfossiles de la formation Gunflint. Cependant, aucune structure minérale sphérique n'apparaît sur les images de microscopie électronique en transmission obtenues sur une coupe FIB découpée dans la paroi organique du spécimen #01-4 (figure 42 page 159). Dans un secteur particulièrement mince de cette coupe FIB, la paroi exhibe une structure ondulante, qui semble donner naissance à des structures globulaires d'un diamètre de 100 nanomètres environ. Il n'y a cependant aucune preuve que ces formes globulaires, causées par la nature ondulée de la paroi, et indissociables, d'un point de vue de la composition, du reste de la paroi (figure 42 page 159), soient les globules imagés par microscopie à force atomique et microscopie électronique à balayage. Cependant, il n'y a aucune preuve du contraire, c'est-à-dire du fait que les globules observés par microscopie à force atomique et microscopie électronique à balayage ne sont pas les mêmes que ceux observés en microscopie électronique en transmission. Il existe malgré tout une possibilité que les sphérules associés à la paroi organique des

microfossiles de la formation Gunflint soient des artefacts causés par la corrosion de l'acide fluorhydrique sur les kérogènes, et qu'ils ne soient donc pas une caractéristique naturelle de ce dernier. Des travaux supplémentaires sont donc nécessaires pour comprendre pleinement tous les effets potentiels qu'une attaque acide peut avoir sur la paroi organique d'un microfossile.

Le microscope à force atomique est aveugle d'un point de vue chimique

Enfin, le dernier inconvénient majeur de la microscopie à force atomique est son incapacité, du moins avec les modes conventionnels, de réaliser des mesures chimiques. Certes, les modes sensibles aux propriétés mécaniques des matériaux, comme l'imagerie de force latérale, l'imagerie force volume ou l'imagerie de phase, peuvent permettent de distinguer des matériaux possédant des compositions chimiques différentes, sur la base de leurs propriétés physiques. Mais ils ne peuvent pas, surtout sur des matériaux aussi hétérogènes que des échantillons géologiques, identifier des matériaux et des minéraux.

Par conséquent, étant donné que le microscope à force atomique ne peut analyser que la surface d'un échantillon, et qu'il ne peut fournir à lui seul des informations sur la minéralogie, il ne peut permettre d'apprécier le contexte pétrographique de l'environnement d'un microfossile. Ainsi, la syngénicité (le fait que la fossilisation ait été contemporaine de la sédimentation), un critère essentiel pour prouver la biogénicité d'une structure donnée (Buick, 1990), ne peut être établie.

D'autres instruments doivent donc être utilisés pour déterminer la minéralogie de l'environnement local d'un microfossile donné. Le microscope optique, déjà indispensable pour identifier et localiser un microfossile avant son étude par microscopie à force atomique, peut fournir de nombreuses informations sur le microfaciès et le contexte pétrographique. Des analyses élémentaires et moléculaires peuvent aussi être réalisées par EDX, microspectrométrie Raman, microspectrométrie infrarouge, microsonde électronique, sonde ionique, microscopie à rayons X. Cependant, étant donné que la résolution spatiale du microscope à force atomique est généralement bien supérieure à la résolution spatiale de ces instruments (en général un micromètre, sauf dans le cas de la NanoSIMS et de la microscopie X au seuil du carbone, ou la résolution spatiale avoisine les 50 nm), il peut être difficile de réaliser une corrélation pixel par pixel entre les informations topographiques et physiques fournies par le microscope à force atomique, et les informations chimiques (élémentaires, isotopiques, moléculaires) fournies par les autres instruments.

Dans l'avenir, il ne fait aucun doute que le microscope à force atomique finisse par être capable de réaliser des mesures chimiques. L'une des manières de procéder serait de lui adjoindre un autre instrument, tel

qu'un microspectromètre Raman. Comme expliqué dans le chapitre perspectives, il existe déjà dans le commerce des instruments hybrides Raman/AFM (commercialisés par différentes sociétés) qui permettent de réaliser des images de hauteur avec une résolution nanométrique, tout en collectant des spectres Raman avec une résolution spatiale plus ou moins importante, selon qu'il s'agit d'un Raman champ lointain ou champ proche. En temps réel, l'opérateur est ainsi capable d'avoir des informations chimiques sur la surface que le microscope à force atomique est en train de caractériser.

L'autre possibilité, pour doter le microscope à force atomique de capacité de reconnaissance chimique, est de mettre en œuvre la cartographie à force chimique, dont le principe et les applications potentielles en micropaléontologie précambrienne sont décrits plus loin.

Les problèmes de contamination

Le microscope à force atomique étant un appareil d'extrême surface, il est extrêmement sensible à la contamination, que ce soit une contamination de la surface de l'échantillon ou une contamination de l'extrémité de la pointe. Nous allons aborder ces deux types de contamination, en commençant par celles des surfaces minérales.

Contamination des surfaces

Les centaines d'analyses, effectuées sur des lames minces de roche à différents moments dans le temps, depuis la première analyse effectuée juste après le polissage, jusqu'aux analyses effectuées plusieurs mois après, ont montré l'importance et l'omniprésence du phénomène de contamination des surfaces.

D'une manière générale, et sauf exception, il convient d'effectuer les analyses pré-etching juste après le polissage. C'est à ce moment là que la lame mince est la plus propre, et si des molécules organiques, naturellement présentes dans l'air, ont sans doute déjà commencé à se déposer sur la surface, la contamination reste négligeable. Bien entendu, il convient de prendre le maximum de précaution pour manipuler la lame mince de roche.

Le niveau de contamination va ensuite dépendre de l'environnement dans lequel la lame mince est conservée en attendant l'étape d'attaque acide. Les observations ont montré qu'une contamination importante a lieu si les lames sont conservées dans des petites boîtes en plastique, ou pire, dans des boîtes en bois, pourtant couramment utilisées en microscopie optique. Il ne fait aucun doute que les matériaux tels que le bois ou le plastique dégazent, et que les molécules émises se redéposent sur la lame mince, avec une préférence pour les régions riches en composés organiques, tel que la paroi des microfossiles.

De manière à limiter au maximum la contamination de surface, il convient de conserver les lames minces dans des boites en verre parfaitement

nettoyées, des boites de pétri en verre blanc faisant parfaitement l'affaire. Il peut être intéressant de les sceller avec du parafilm, de manière à éviter les échanges d'air, mais étant donné que le parafilm lui-même peut dégazer, il n'a pas été employé au cours de cette étude.

La contamination de la surface d'une lame mince se détecte facilement au microscope à force atomique. Après polissage, les lames minces présentent toutes le même aspect: une surface uniformément plane (qui apparaît dans des tons de jaune avec l'échelle de couleur utilisée), parsemée ici et là de cicatrices d'arrachements de couleur rouges, dues à l'enlèvement, lors du polissage, de matériaux plus malléables que la matrice de quartz environnante.

Sur cette surface standard, la contamination peut prendre deux formes, suivant qu'elle se dépose sur la surface de base, ou dans les cicatrices d'arrachements. Quand elle se dépose sur la surface de base, elle prend la forme de tâches, qui apparaissent en relief sur les images de hauteur (figure 52 page 184). Ces dernières sont souvent arrondies, ce qui permet de les différencier aisément de microcristaux de quartz, qui se seraient détachés de la lame mince pour venir reposer à sa surface (figure 55E page 191). C'est sous cette forme que sa détection est la plus aisée. En général, les taches possèdent également un pouvoir d'adhésion élevé, et accrochent facilement la pointe du microscope à force atomique lors des balayages, ce qui génère des artefacts («streaks»), bien visibles par exemple en haut à droite de l'image B de la figure 52 page 184, région ou se situe la tache la plus importante. On comprend donc que la détection d'une contamination est particulièrement importante avant l'utilisation de modes sensibles aux forces d'adhésion, comme l'imagerie de force latérale ou l'imagerie force volume.

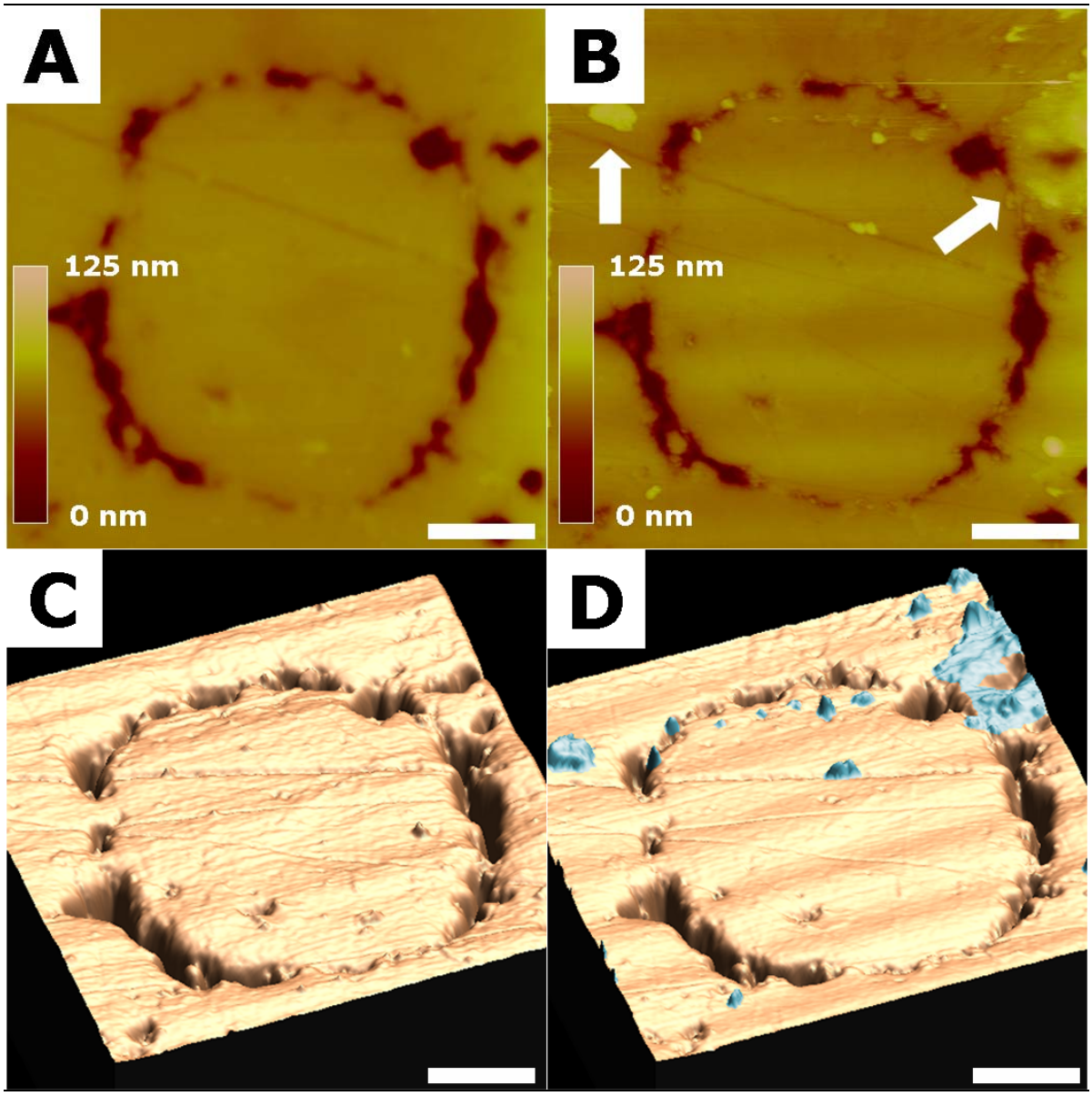


figure 52. Contamination de surface après repos des lames minces. [A] Image de hauteur d'une cellule d'*Huroniospora* (spécimen #01-4) avant attaque acide en mode tapping. La région correspondant à la paroi organique de la cellule est marquée par des défauts mécaniques crées durant le polissage de la lame mince de roche. La surface de cette dernière est propre (échelle : 2 microns, pointe RTESP7, scan rate 1 Hz). [B] Image de hauteur d'une cellule d'*Huroniospora* (spécimen #01-4) avant attaque acide en mode tapping, acquise trois semaines après la fin des observations pré-etching. La lame mince a été stockée dans une boite en plastique. La surface n'est plus propre et plusieurs taches de contamination (de 250 à 800 nm de diamètre pour une hauteur de 20 à 50 nm), indiquées par une flèche blanche, apparaissent de manière visible (échelle : 2 microns, pointe RTESP7, scan rate 1 Hz). [C] Image en 3D de la région observée en A (échelle : 2 microns). [D] : Image en 3D de la région observée en B. La contamination, indiquée ici dans des tons bleu pales, est évidente. La capacité du microscope à force atomique à détecter des traces d'une contamination de surface peut être très importante lors d'études complémentaires d'extrême surface, comme celles réalisées avec une NanoSims (échelle : 2 microns).

La contamination peut aussi remplir les cicatrices d'arrachements, en particulier celles localisées au niveau des parois organiques des microfossiles, et sa détection est alors plus délicate : elle n'est

effectivement bien souvent possible que par comparaison avec des images acquises précédemment, quand la surface était propre. Lorsque la contamination se produit, la profondeur des cicatrices d'arrachement diminue, et ces dernières deviennent moins visibles sur les images de hauteur. Elles finissent par disparaître presque totalement (ce qui peut rendre très délicate la relocalisation du microfossile). Enfin, si la contamination se poursuit, la quantité de matériaux qui se déposent est tel que la zone correspondant à la paroi du microfossile, et qui était précédemment marquée par une cicatrice d'arrachement, fini par apparaître en relief (comparer la figure 53E et figure 53F page 185).

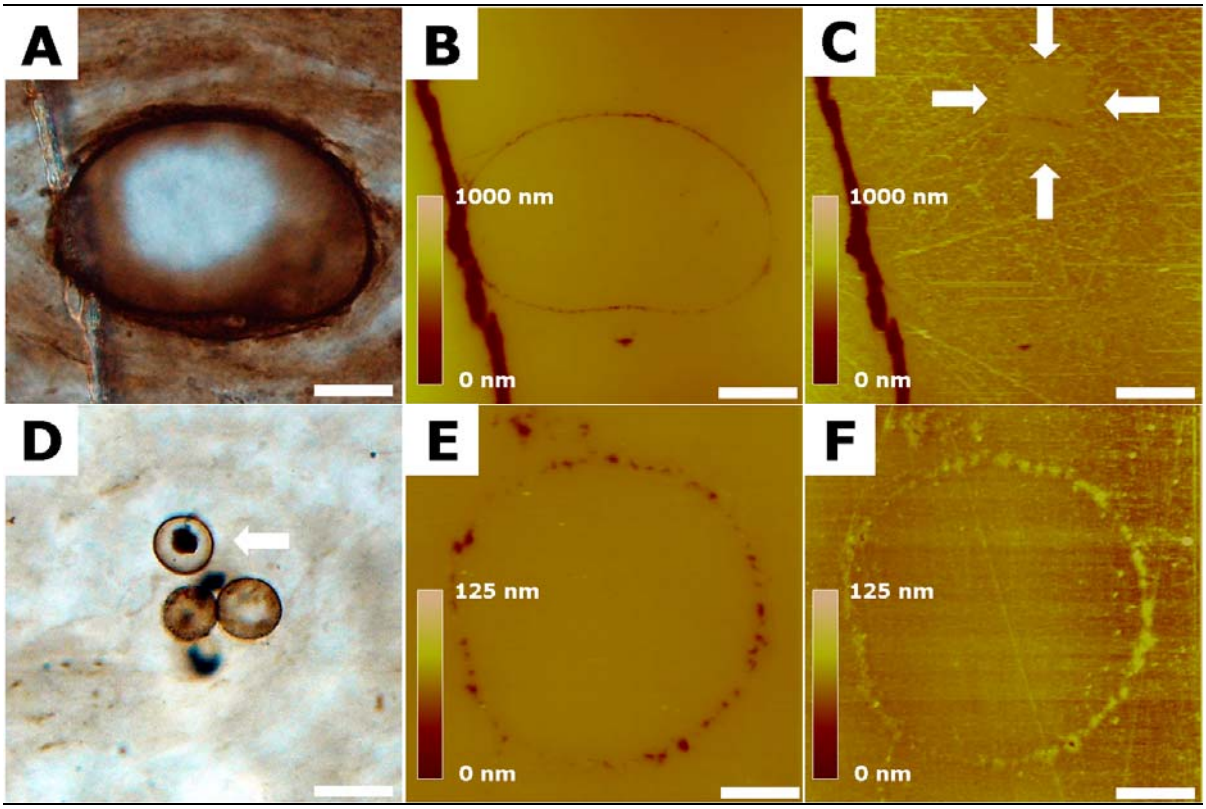


figure 53. Contamination des surfaces. [A] Un acritarche de la formation Draken observé en lumière transmise (500x). La cellule, légèrement aplatie, mesure 80 microns de longueur, pour un peu moins de 60 microns de hauteur (échelle : 20 microns). [B] Image de hauteur obtenue en mode contact de l'acritarche exposé à la surface d'une lame mince polie d'un fragment de conglomérat de la formation Draken. Les variations de hauteur sont codées par une échelle de couleur, le rouge représentant les régions les plus basses, et le jaune les régions les plus hautes. Une cicatrice d'arrachement marque la position de la paroi de l'acritarche : elle est due au départ, au cours du polissage de la lame mince, du matériau carbonée constituant la paroi. Une fissure, déjà visible en microscopie optique (A), est aussi visible dans la partie gauche de l'image (échelle : 20 microns, pointe OTR8, scan rate 0,5 Hz). [C] Même région que précédemment, observée en mode contact après une attaque acide en phase vapeur (5 minutes à 48%). Bien qu'ayant subie une attaque acide (certes bien moins vigoureuse que l'attaque en milieu liquide, qui sera préférée à l'attaque en phase vapeur dans la suite des travaux), les cicatrices d'arrachement marquant la paroi de l'acritarche ont presque totalement disparu, masquées par un dépôt issu de l'attaque acide, et qui n'a pas été éliminé par un lavage trop sommaire. Les quatre flèches marquent l'effet d'un balayage de 19,6 microns sur la surface en question (voir figure 54B page 189) : la surface balayée se détache nettement du reste de l'image, et une partie des cicatrices d'arrachements délimitant la paroi de l'acritarche est réapparue. La pointe a effectivement nettoyé la couche déposée par l'attaque acide, tout en se contaminant (échelle : 10 microns,

pointe OTR8, scan rate 0,5 Hz). [D] Un groupe de *Myxococcoides* de la formation Draken observé en lumière transmise (500x). La flèche blanche indique la cellule étudiée par microscopie à force atomique. Son diamètre est de 12 microns (échelle : 20 microns). [E] Image de hauteur obtenue en mode contact d'une cellule de *Myxococcoides* exposée à la surface d'une lame mince polie d'un fragment de conglomérat de la formation Draken. Une cicatrice d'arrachement délimite la position de la paroi organique de la cellule (échelle : 3 microns, pointe CONTR50, scan rate 3,9 Hz). [F] Même région que précédemment, ré-observée un mois après. Une importante contamination, de nature inconnue, s'est déposée sur la lame mince. La paroi organique, marquée précédemment par une zone en dépression, est désormais en relief. Les cicatrices d'arrachements sont effectivement devenues des piéges pour la substance contaminante, qui s'est accumulée jusqu'à les remplir, conduisant à une véritable inversion de relief. Une telle contamination ne peut être éliminée que par attaque acide (échelle : 3 microns, contact, pointe CONTR50, scan rate 1 Hz).

Seul le microscope à force atomique est capable d'imager cette contamination. Vraisemblablement constituée de matériaux organiques très frais et donc transparents (par opposition à la matière organique fossile fortement colorée), ce type de contamination n'est pas détectable avec le microscope optique, que ce soit en transmission ou en réflexion, et ceci même quand elle recouvre une surface de plusieurs micromètres carrés.

La contamination de surface est un phénomène qui doit impérativement être détecté, et ce pour plusieurs raisons. Premièrement, comme indiqué plus haut, le remplissage des cicatrices d'arrachements par des matériaux contaminants peut venir compliquer le processus de relocalisation.

Deuxièmement, le microscope à force atomique étant uniquement sensible à la couche la plus superficielle d'une surface, cette contamination va perturber les mesures. La nature des matériaux contaminants n'a pas pu être déterminée avec précision au cours de cette étude, étant donné que le microscope à force atomique n'est pas doté de capacités de reconnaissance chimique. Cependant, il est fort probable que ces contaminants sont de nature organique, au vu de leurs propriétés physiques. Ainsi, sauf exception, toutes les zones contaminées avaient tendance à retenir fortement la pointe et se comportaient comme des zones de haute friction. En cas de contamination, l'acquisition d'une image de hauteur peut alors devenir problématique, étant donné que la pointe ne cesse de ripper sur les régions contaminées, ce qui dégrade la qualité de l'image.

L'influence de la contamination est bien entendu encore plus importante dans le cas des mesures physiques, comme celles effectuées en imagerie de force latérale (LFM) ou en imagerie force volume. Etant donné que les contaminants recouvrent la surface à imager, ils vont empêcher le microscope à force atomique d'atteindre le matériau constituant véritablement les microfossiles. Les données physiques obtenues révéleront ainsi non plus les propriétés physiques des microfossiles, mais les propriétés du ou des matériaux contaminants. D'autant plus que, étant donné que ceux-ci présentent presque toujours de fortes propriétés adhésives, ils vont laisser une signature très nette dans les images de

force latérale ou les mesures force volume, signature qu'il ne faudra en aucun cas confondre avec celle d'un microfossile.

Finalement, le problème de la contamination pourrait n'être qu'un simple désagrément s'il était possible d'éliminer facilement cette dernière par lavage. Malheureusement, les observations conduites au cours de cette étude ont montré qu'il est très difficile, lorsqu'une contamination s'est produite, de nettoyer la lame mince pour lui redonner son aspect initial.

Les dépôts de matériaux contaminants semblent adhérer très fortement à la lame mince, et résistent la plupart du temps à un lavage vigoureux. L'immersion pendant 5 heures dans de l'eau ultrapure sous agitation n'élimine pratiquement rien. Les lavages à l'aide de solvants organiques comme l'éthanol, l'acétone ou l'éther n'améliorent pas non plus la situation. Si ces solvants ne sont pas d'une grande pureté, ils aggravent en général la contamination, en salissant encore plus la surface de la lame mince. Quant aux solvants possédant une pureté «spectroscopique», ils ne parviennent souvent pas à ôter tous les contaminants (il convient également de noter que les solvants peuvent attaquer la résine collant la lame mince de roche sur la lame de verre). La sonication a également été testée, sans succès. Un nettoyage à l'ozone (préparé par l'action d'UV sur l'oxygène de l'air dans une enceinte spéciale, comme le Bioforce Nanosciences UV-TipCleaner) aurait pu se révéler intéressant, mais elle n'a pas été employée dans le but d'éviter les éventuels dommages causés par les ultraviolets sur la matière organique fossile.

Finalement, la seule technique véritablement efficace pour éliminer des contaminants déposés sur une lame mince de roches est un traitement à l'acide fluorhydrique. Malheureusement, dès le moindre contact de ce dernier avec la roche, l'attaque acide commence et la surface commence à changer. Ainsi, l'acide fluorhydrique permet de récupérer une lame contaminée pour que les études post-etching puissent être effectuées. Cependant, si la contamination s'est produite avant l'obtention des données pré-etching (image de hauteur, imagerie de force latérale, imagerie force volume), ces dernières ne pourront pas, sauf exception, être obtenues, et il faudra passer directement à l'analyse post-etching, sans pouvoir bénéficier des données pré-etching.

L'idéal est donc d'éviter au maximum la contamination des surfaces, ce qui implique de manipuler avec beaucoup de précaution les lames minces de roche, et de conserver ces dernières dans des boites en verre.

Il est important de noter que le problème de la contamination des lames minces ne concerne pas uniquement le microscope à force atomique, mais toutes les techniques d'analyse d'extrême surface, comme la NanoSIMS. Cet instrument est une sonde ionique de nouvelle génération, développée dans le but de permettre des analyses de traces et des analyses isotopiques sur des structures très fines. La NanoSIMS peut analyser de très petites surfaces ou volumes (50 nm de résolution latérale pour le césium, et 150 nm pour l'oxygène), tout en offrant une forte sensibilité en

terme de résolution de masse. L'appareil est également capable de déterminer plusieurs masses en parallèle, ce qui permet l'obtention de plusieurs cartes élémentaires d'un même objet.

La NanoSIMS commence à être utilisée pour étudier des microfossiles du Précambrien. Ainsi, des cartes du carbone, de l'azote ou du soufre d'une cellule d'*Huroniospora* de 5,3 microns de diamètre (maladroitement baptisée *Mainaucula epixebon*) de la formation Gunflint ont été réalisées (Robert et al., 2005). Sur les cartes obtenues, la matière organique est principalement localisée dans la lumière de la cellule, ainsi qu'en de nombreuses petites taches de dimensions submicrométriques disséminées sur la surface analysée, plutôt qu'au niveau de la paroi organique de la cellule. L'image de cette dernière en microscopie optique ne laisse pourtant aucun doute quand à la localisation de la matière organique fossile : seule la paroi de la cellule d'*Huroniospora* présente une coloration brune, typique des kérogènes, et aucune accumulation n'est présente au voisinage de la cellule, ni en son centre. Il est donc hautement probable que le matériel cartographié par Robert et al. (2005) ne soit pas indigène, mais représente une contamination de surface, similaire à celle illustrée par la figure 52 page 184. Cette hypothèse semble confirmée par le fait qu'aucune trace de soufre n'a été détectée lors des analyses effectuées en microscopie X ou par microscopie électronique à transmission, après réalisation d'une coupe FIB (figure 42 page 159), sur des cellules d'*Huroniospora* de la formation Gunflint, alors que les analyses effectuées par Robert et al. (2005) documentent la présence de soufre (ainsi que d'azote). Il apparaît donc clairement que le microscope à force atomique est une excellente technique pour estimer l'état de propreté d'une surface donnée avant la réalisation d'analyses d'extrême surface, ou pour confirmer les données obtenues après analyse, si une contamination de surface est suspectée.

Contamination des pointes

Lors de l'étude d'une roche par microscopie à force atomique, la surface de la lame mince n'est pas la seule à pouvoir éventuellement subir une contamination. L'extrémité de la pointe, qui rentre en contact de façon permanente ou intermittente avec la surface suivant le mode d'analyse utilisé (contact ou tapping), peut elle aussi souffrir d'une contamination, avec des conséquences particulièrement importantes.

L'altération de la forme de la pointe (par contamination ou par émoussement) est le problème le plus important en microscopie à force atomique. Effectivement, l'image délivrée par le microscope n'est autre qu'une convolution entre la surface réelle de l'échantillon, et l'extrémité de la pointe entrant au contact avec la surface. La résolution latérale est étroitement liée à la finesse (caractérisée par le rayon de courbure de l'apex) de la pointe. Si le rayon de courbure augmente brusquement, suite à l'adhésion d'un contaminant sur la pointe, la résolution latérale va fortement diminuer (figure 54C, figure 54D et figure 54E, page 189). Dans les cas extrêmes, l'image qui apparaîtra ressemblera alors à une

mosaïque, constituée de la répétition d'une forme, qui est en fait la nouvelle forme de l'extrémité de la pointe. Ainsi, dans la figure 54B page 189, l'image est marquée par la répétition d'une structure triangulaire, qui est vraisemblablement un cristal de quartz qui s'est détaché de la surface pour adhérer à la pointe, et qui entre désormais en contact avec la surface en jouant le rôle de pointe, à la place de l'extrémité de la pointe originale (l'émoussement de la pointe, dû à une force trop importante exercée entre la pointe et la surface, peut aussi produire ce genre d'artefacts).

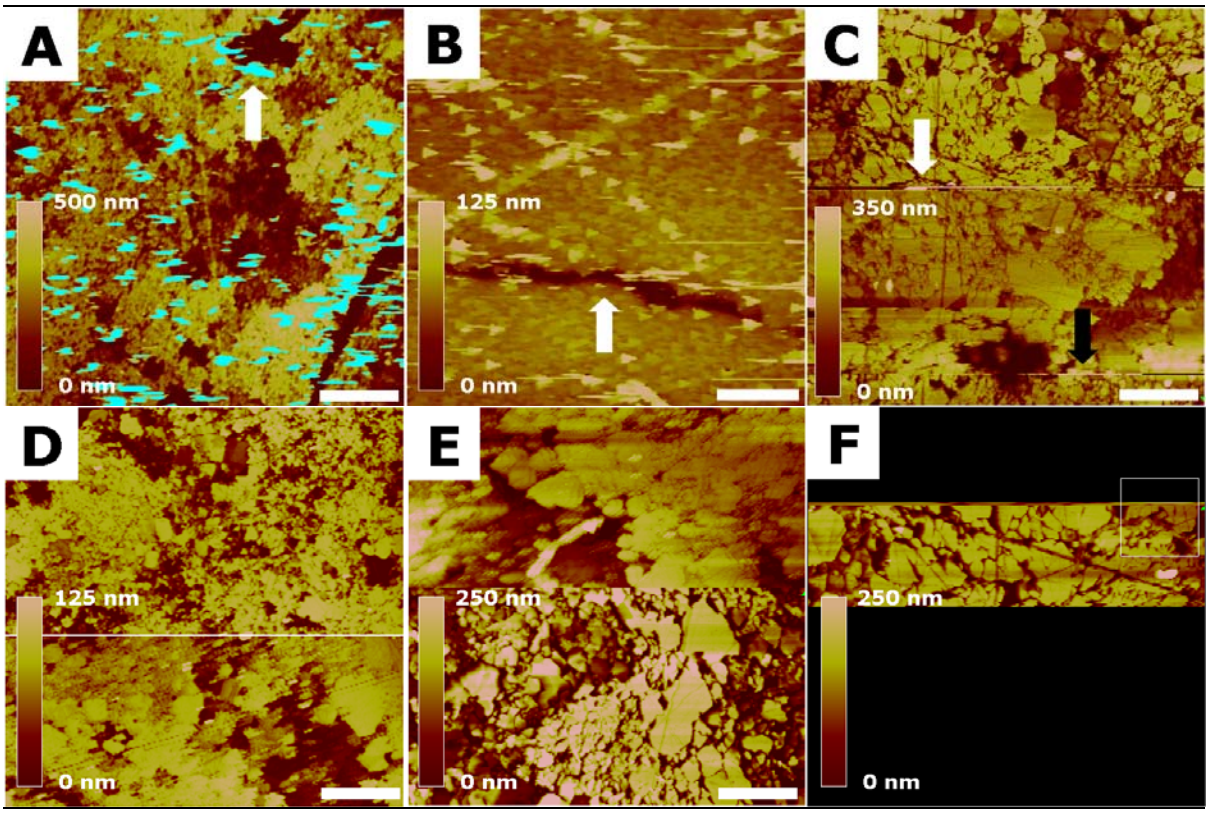


figure 54. Contamination des pointes. [A] Surface d'une lame mince taillée dans un fragment de conglomérat de la formation Draken, étudiée en mode contact après une attaque acide de 40 minutes à 5%. La surface a été fortement corrodée, et l'utilisation du mode contact provoque un véritable labourage de la surface, ce qui explique les innombrables structures apparaissant en relief (colorées ici en bleu). Il s'agit de cristaux de quartz délogés par la pointe. La position de ces structures varie d'une image sur l'autre, ce qui montre qu'ils sont en fait déplacés par la pointe au cours du balayage (échelle : 10 microns, pointe OTR8, scan rate 0,5 Hz). [B] Image de hauteur obtenue en mode contact d'une portion de la paroi de l'acritarche illustré dans la figure 53C page 185. La zone carrée indiquée dans la figure 53C page 185 par des flèches blanches correspond à la zone balayée pour produire cette image. Suite au balayage, la cicatrice d'arrachement est redevenue visible (flèche blanche), alors qu'elle avait disparue suite au dépôt d'une couche de matériau lors de l'attaque acide, couche non éliminée par un lavage sommaire de la lame. Si la pointe est parvenue à ôter une partie de ce dépôt, comme le montre l'image précédente, elle a été contaminée en retour, ce qui explique la forte convolution de l'image. Cette dernière est effectivement composée d'une multitude de triangles, qui correspondent à l'extrémité de la pointe (échelle : 4 microns, pointe OTR8, scan rate 2 Hz). [C] Image de la surface d'une lame mince de roche de la formation Gunflint, imagée en mode tapping après une attaque acide de 20 minutes à 5 %. L'objectif était de rechercher une cellule d'*Huroniospora* (spécimen #01-4), située ici au centre à droite. La partie supérieure de l'image est parfaitement nette, mais au niveau de la flèche blanche, la pointe subi une contamination (vraisemblablement un cristal micrométrique de quartz), ce qui provoque une diminution drastique de la résolution de

l'image. Alors que le balayage vertical est presque terminée, le contaminant quitte la pointe (flèche noire), ce qui permet de retrouver une qualité d'image correcte (échelle : 6 microns, pointe RTESP7, scan rate 0,25 Hz). [D] Image de la surface d'une lame mince de roche de la formation Gunflint, imagée en mode tapping après une attaque acide de 10 minutes à 20 %. L'objectif était de rechercher une cellule d'*Huroniospora*. La partie supérieure de l'image, très nette, laisse soudain la place, à partir de la ligne blanche, à une image floue, due à une contamination brutale de la pointe (échelle : 10 microns, pointe RTESP7, scan rate 0,25 Hz). [E] Image de la surface d'une lame mince de roche de la formation Gunflint, imagée en mode tapping après une attaque acide de 20 minutes à 5 %. L'objectif était de rechercher une cellule d'*Huroniospora*. A cause d'une importante contamination de la pointe, la partie supérieure de l'image est très floue et totalement inexploitable. Par un heureux hasard, l'objet qui contaminait la pointe a fini par tomber, un événement marqué par l'obtention immédiate d'une image parfaitement nette (échelle : 6 microns, pointe RTESP7, scan rate 0,25 Hz). [F] Image de la surface d'une lame mince de roche de la formation Gunflint, imagée en mode tapping après une attaque acide de 20 minutes à 5 %. L'objectif était de rechercher une cellule d'*Huroniospora* (spécimen #01-4), située ici à droite. La cellule a été identifiée avec rapidité, et n'a nécessité que le balayage d'un quart du champ de vision. Le petit carré blanc mesure 4 microns de côté. Une relocalisation rapide d'un microfossile, sans avoir à balayer la totalité du champ ni à se déplacer plusieurs fois, diminue les probabilités de contamination de la pointe avant même que l'objet ne soit localisé (pointe RTESP7, scan rate 0,25 Hz).

Causes principales de la contamination de la pointe

Quelles sont les causes de la contamination d'une pointe ? La première concerne la lame mince de roche elle-même : si cette dernière est sale, la pointe le deviendra aussi forcément, d'où l'importance d'avoir une lame mince aussi propre que possible.

D'une manière générale, la contamination se produit surtout après l'étape de l'attaque acide. Comme le montre la figure 55E page 191, après attaque acide, des cristaux de quartz de dimensions micrométriques peuvent se détacher de la surface, avec deux conséquences importantes. La première, c'est que la rugosité de la surface augmente : une dépression apparaît à l'emplacement précédemment occupé par le cristal de quartz, et un relief apparaît à l'endroit ou ce dernier repose désormais. L'augmentation de la rugosité n'est guère appréciable en microscopie à force atomique, étant donné qu'elle complique le parcours de la pointe, qui doit désormais effectuer plus de montées et plus de descentes. De plus, l'amplitude du débattement de la pointe du microscope à force atomique dans l'axe vertical (z) a ses limites : 6 microns dans le cas du Dimension 3100 utilisé dans le cadre de cette thèse. Un cristal de plus de 6 microns d'envergure se détachant de la surface peut devenir un obstacle infranchissable pour la pointe. Cette dernière va alors rentrer en collision avec le cristal, et finir pulvérisée.

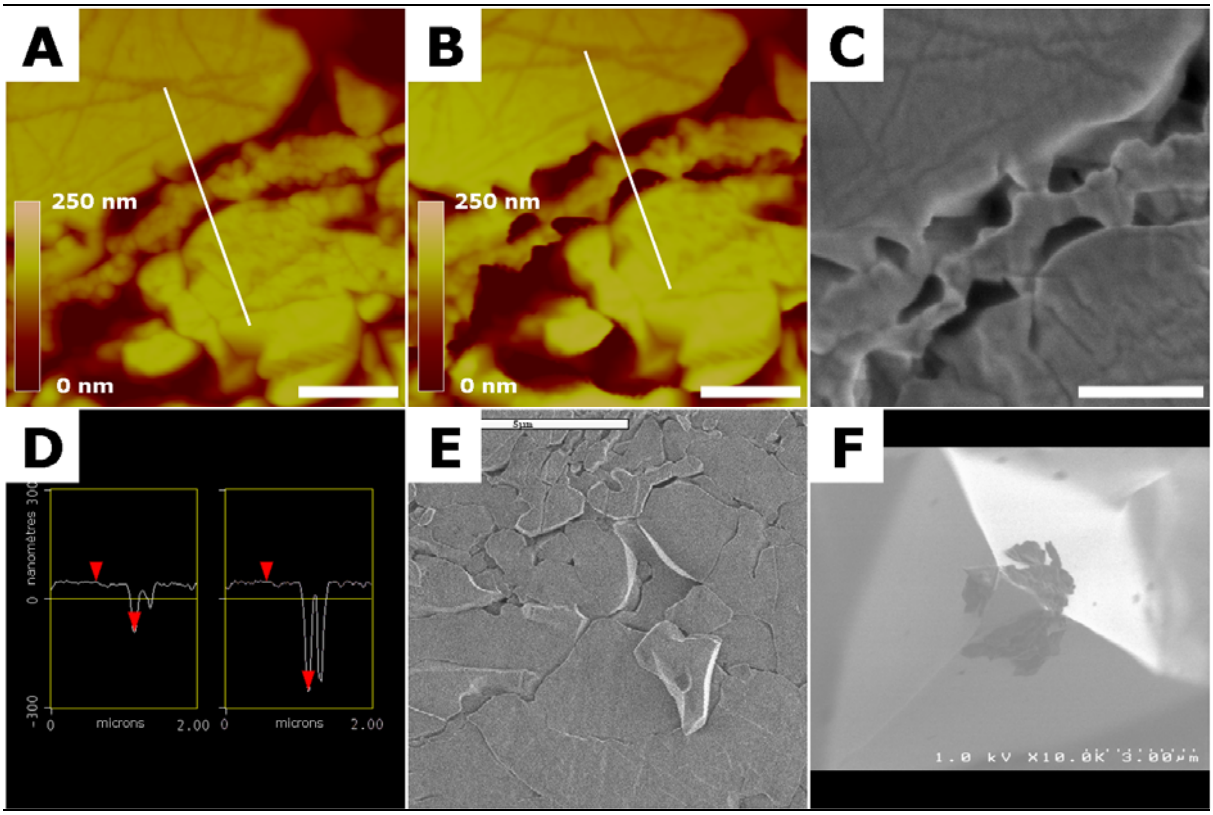


figure 55. Contamination des pointes. [A] Image de hauteur d'une cellule d'*Huroniospora* (spécimen #01-4) imagée avec une pointe standard en silicium (nanodevices rotated tapping mode etched RTESP). La ligne blanche indique la position du profil illustré en D. La paroi cellulaire apparaît composée d'un grand nombre de petits globules qui possèdent un diamètre de 60 à 80 nm, certains étant des artefacts dus à la convolution de l'extrémité de la pointe avec la surface réelle de l'échantillon (échelle : 500 nm, scan rate 0,5 Hz). [B] Région identique à celle de l'image précédente, imagée cette fois avec une pointe à faible rayon de courbure et possédant un ratio d'aspect élevé (nanotools HDC SSS). La résolution latérale est bien meilleure et les globules imagés ne sont plus des artefacts de convolution. La pointe peut aussi suivre le relief de l'échantillon avec une efficacité bien meilleure. La ligne blanche indique la position du profil illustré en D (échelle : 500 nm, scan rate 1 Hz). [C] Image obtenue au microscope électronique à balayage de la région imagée en A et B (ZEISS DSM 982 Gemini, 1 kV, distance de travail 6 mm, x50 000, sans métallisation). La comparaison de cette dernière avec l'image A montre que de nombreux globules ne sont en fait pas réels, mais sont dus à la convolution de la pointe (échelle : 500 nm). [D] Profil vertical établi le long des lignes blanches sur les images A et B. La distance verticale entre les deux marqueurs triangulaires rouges est de 139 nm à gauche (image A), contre 306 nm à droite (image B), ce qui démontre une meilleure pénétration de la pointe à ratio d'aspect élevé utilisée pour réaliser l'image B. [E] un cristal de quartz de deux microns s'est détaché de la surface d'une lame mince de roche de la formation Gunflint après l'attaque acide (Hitachi S4200 FEG-SEM, 10 000 x, sans métallisation). Ce type de particule de quartz est responsable d'une augmentation de la rugosité de surface de la lame mince, ce qui rend les examens au microscope à force atomique plus délicats. Dans le pire des cas, ces particules peuvent contaminer la pointe par le jeu d'interactions électrostatiques. [F] Une pointe de microscope à force atomique fortement contaminée après un examen en mode contact de la surface d'une lame mince de roche attaquée à l'acide fluorhydrique (Hitachi S4200 FEG-SEM, 10 000 x). L'utilisation du mode tapping est obligatoire sur des surfaces fragilisées par l'attaque acide.

La seconde conséquence liée aux détachements des cristaux micrométriques de quartz suite à l'attaque acide est encore plus importante. Les cristaux qui reposent sur la surface peuvent effectivement

décider de sauter sur la pointe, lorsque cette dernière arrive dans leur voisinage. Ce phénomène est principalement dû à des interactions électrostatiques. Il est incontrôlable étant donné qu'il dépend de nombreux facteurs influençant la charge, comme la conductivité de la surface de l'échantillon, les propriétés de la particule et le potentiel du levier. Il a été particulièrement bien mis en évidence par Gautsch (2002).

Cet auteur a travaillé sur la mise au point de leviers pour le microscope à force atomique (FaMars) qui fait partie intégrante du package scientifique MECA et qui devrait être lancé en 2007 sur l'atterrisseur martien américain Phoenix. L'objectif de FaMars est de caractériser les particules micrométriques de poussière présentes à la surface de Mars, ainsi que celles qui sont en suspension dans l'atmosphère. Bien que la poussière martienne soit sans doute constituée d'oxydes de silicium et d'oxydes de fer, et issue de la désagrégation de roches ferromagnésiennes volcaniques, les caractéristiques de pointes furent déterminés sur des cristaux micrométriques de quartz pur, très similaires en forme, taille et composition aux cristaux libres reposant à la surface des lames minces de cherts. Dans sa thèse (2002), Gautsch montre très clairement que ces cristaux peuvent facilement venir contaminer la pointe, cette dernière pouvant être littéralement ensevelie sous des dizaines de cristaux de quartz (voir Gautsch, 2002, en particulier la figure 3-15). Comme indiqué précédemment, une fois que la contamination s'est produite, l'image est fortement marquée par le débris situé à l'extrémité de la pointe, et n'est plus représentative de la topographie des structures fines de la surface. L'image apparaît composée de la répétition d'une structure (représentant la pointe elle-même), alignée le long d'une direction générale.

Les cristaux micrométriques de quartz ne sont pas les seuls à adhérer à la pointe. Dégagée par l'attaque acide, et donc exposée en relief la plupart du temps, présentant des propriétés adhésives, la paroi organique du microfossile peut aussi devenir une source de contamination. Des petites particules de kérogènes peuvent effectivement se détacher après plusieurs passages de la pointe, et adhérer à l'extrémité de celle-ci.

Il est évident, au vu des observations réalisées dans le cadre de cette thèse, que la surface d'une lame mince attaquée par l'acide fluorhydrique est fortement fragilisée par rapport à la surface polie initiale. Après attaque acide, l'utilisation du monde contact est absolument exclue. Effectivement, en mode contact, la pointe laboure l'échantillon, et parvient à déloger une grande quantité de cristaux micrométriques de quartz, qui se retrouvent alors à la surface, et peuvent facilement contaminer la pointe (figure 54A page 189). De la même manière, lors du passage sur les parois organiques des microfossiles, une désagrégation peut se produire, avec production de nombreuses particules organiques qui sont autant de sources de contamination. C'est pourquoi le mode contact est uniquement employé sur des lames minces de roches non traitées, et que seul le mode tapping peut être utilisé pour observer des surfaces corrodées à l'acide fluorhydrique. La qualité du lavage de la lame mince

après attaque acide est également très importante. Comme indiqué dans la partie matériels & méthodes, les lames sont lavées intensément pendant 5 heures dans de multiples bains d'eau ultrapure, et ce sous agitation. Lors des premiers essais, le lavage était moins drastique, et un dépôt recouvrait la surface de la lame, allant jusqu'à masquer les cicatrices d'arrachement correspondant à la paroi organique des microfossiles (comparer la figure 53B et la figure 53C page 185). De plus, ce dépôt pouvait facilement contaminer les pointes, en particulier en mode contact. La figure 53C page 185 montre comment un balayage de 20 microns est parvenu à nettoyer la surface : dans la zone de balayage, les cicatrices d'arrachement de la paroi sont de nouveau visibles, et la surface carrée correspondant au balayage se détache du reste de l'image.

La problématique de la contamination implique une surveillance constante de la part de l'opérateur du microscope à force atomique. Une contamination pouvant survenir à n'importe quel moment, il est particulièrement important de pouvoir la détecter, de manière à stopper les mesures, et éventuellement de s'en débarrasser.

Quand une contamination a lieu, l'un des moyens de nettoyer la pointe consiste à augmenter grandement la vitesse de balayage (par exemple passer de 0,25 microns par seconde à 2 voire 5 microns par seconde). En augmentant la vitesse de la pointe, on augmente les chances de collision de cette dernière avec la surface, et parfois, le choc peut faire chuter l'objet qui adhérait à la pointe, et restaurer une résolution acceptable. Bien entendu, rien ne prouve qu'une fois l'objet parti, la pointe ait véritablement retrouvé son état initial.

Le nettoyage de la pointe par des UV et de l'ozone (en utilisant un Tip Cleaner, comme le Bioforce Nanosciences UV-tip cleaner) peut également se révéler efficace si le contaminant est d'origine organique (par exemple fragments de kérogènes provenant de la paroi). Il est beaucoup moins utile dans le cas de cristaux de quartz adhérant à l'extrémité de la pointe, sauf si ces derniers sont collés par l'intermédiaire d'un film organique, et non par interactions électrostatiques. Si les tentatives de décrochement par augmentation de la vitesse de balayage, ou le nettoyage par les ultraviolets et l'ozone se révèle inefficace, la seule solution est de changer la pointe, puis de reprendre les mesures.

Dans certains cas, un doute peut subsister quand à la présence d'une contamination. Cette dernière peut également être trop subtile pour être détectée immédiatement, tout en masquant des détails très fins de la surface. Ainsi, lors de l'obtention d'images importantes, il a été considéré comme une nécessité absolue de vérifier l'état de la pointe dès qu'une contamination est suspectée. Celle-ci peut être réalisé par microscopie électronique à balayage (figure 55F page 191), ou en utilisant des cibles nanométriques spéciales comme la TGT01 (non utilisée dans le cadre de cette thèse en raison de son coût prohibitif).

Plus important encore, quand une structure fine est découverte par microscopie à force atomique, il est impératif de confirmer son existence réelle en observant l'échantillon à l'aide d'une technique de surface comme la microscopie électronique à balayage. Une telle observation implique bien souvent de recouvrir l'échantillon d'une couche métallique conductrice, mais permet en contrepartie de s'assurer que l'image enregistrée est bien représentative de la réalité.

Ainsi, l'image A de la figure 55 page 191 montre une portion de la paroi organique d'une cellule d'*Huroniospora* (spécimen #01-4). Cette dernière semble constituée d'un grand nombre de petits globules, d'un diamètre avoisinant les 100 nm. Comme l'ont montré des images prises avec d'autres pointes (figure 55B page 191), ainsi que des images obtenues au microscope électronique à balayage (figure 55C page 191), certains de ces globules sont des artefacts de convolution. L'image enregistrée par le microscope à force atomique est toujours une convolution entre l'extrémité de la pointe et la surface elle-même, la résolution dépendant étroitement du rayon de courbure de la pointe. Quand le grossissement est augmenté de manière trop importante, le rayon de courbure de la pointe n'est plus négligeable devant la taille des structures de la surface, et ces dernières vont prendre un aspect arrondi (l'extrémité de la pointe étant par défaut sphérique). Ce phénomène est particulièrement ennuyant quand il s'agit d'imager des petits objets ronds, comme les sphérules inclues dans la paroi organique d'un microfossile, des coques submicrométriques, ou encore des structures potentiellement biogéniques dans des météorites (Steele et al., 1998).

L'opérateur ne dispose que de peu de moyens pour empêcher ou plutôt retarder la contamination de la pointe. Etant donné que cette dernière apparaît de manière inévitable au bout d'un certain temps, il est déjà très utile de diminuer le temps de balayage préliminaire permettant de retrouver le microfossile. L'idéal est effectivement de pouvoir connaître la position du microfossile après seulement quelques lignes de balayage. Si la localisation du microfossile prend beaucoup de temps, cela augmente les chances que la pointe soit déjà contaminée, une fois ce dernier trouvé (figure 54F page 189).

L'utilisation de pointes spéciales peut aussi empêcher une contamination précoce. De bons résultats ont été obtenus avec des pointes fibres présentant un faible rayon de courbure, un ratio d'aspect longueur sur diamètre élevé, et taillé dans un matériau autre que le silicium. Un rayon de courbure très faible (par exemple 2 nm pour les nanotubes de carbone «single wall», ou les pointes HDC supersharp fabriquées par Nanotools) apporte un gain de résolution par rapport aux pointes conventionnelles caractérisées par un rayon de courbure de 10 nm (figure 55B page 191). La finesse de ces pointes leur permet également de suivre de façon plus efficace une surface très rugueuse, et de pénétrer beaucoup plus en profondeur dans l'échantillon. Les profils établis sont ainsi plus représentatifs de la réalité. La diminution de la surface de la partie active

de la pointe (c'est-à-dire de la partie rentrant effectivement en contact avec l'échantillon) permet également vraisemblablement de diminuer la contamination, étant donné que les microcristaux de quartz ont beaucoup moins de surface à laquelle s'attacher. Un cristal micrométrique de quartz adhérera moins sur le cylindre de 2 nm de diamètre d'un nanotube de carbone (figure 56 page 196), que sur la face de dimensions micrométriques d'une pointe silicium conventionnelle (figure 55F page 191). Enfin, la composition même de la pointe pourrait jouer un rôle, les pointes fabriquées en carbone (HDC Nanotools, nanotube) étant peut-être moins sensibles à la contamination que les pointes fabriquées en silicium. Sans pouvoir précisément déterminer le facteur clé à l'oeuvre, les observations effectuées ont clairement montré que des pointes fabriquées en carbone et possédant un faible rayon de courbure et un fort ratio d'aspect (HDC Nanotools, nanotube) pouvait dramatiquement améliorer la résolution, et ce sur la durée. Ces pointes se montrent bien supérieures (figure 55B page 191) aux pointes conventionnelles pour imager des surfaces de lames minces de roche corrodées à l'acide fluorhydrique. Elles sont cependant aussi bien plus coûteuses.

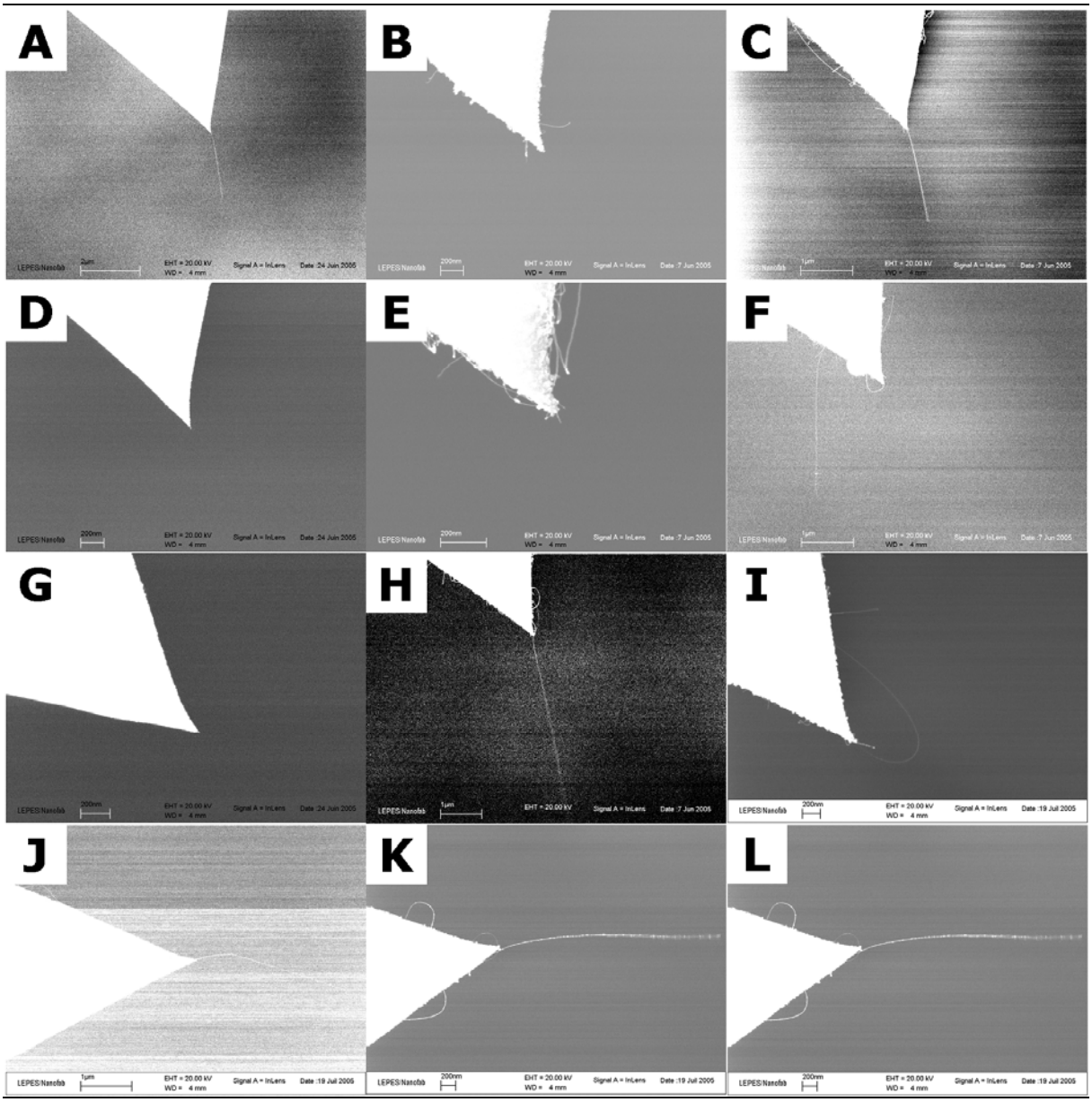


figure 56. Pointes AFM terminées par des nanotubes de carbone fabriquées par le LEPES pour cette thèse et observées au MEB (images Anne-Marie Bonnot). [A] Longueur du nanotube : 2 µm. [B] Longueur du nanotube : 10 nm. [C] Longueur du nanotube : 10 nm. [D] Longueur du nanotube : 100 nm. [E] Longueur du nanotube : 50 nm. [F] Longueur du nanotube : 3-4 µm [G] Longueur du nanotube : 1,5 µm. [H] Longueur du nanotube : 2-2,5 µm. [I] Longueur du nanotube : 200 nm, présence d'une boucle parasite. [J] Longueur du nanotube : 500 nm et 1 µm, présence d'une cassure. [K] Longueur du nanotube : 2,5µm. [L] Longueur du nanotube : 2 µm.

Une autre technique, constituant à modifier le potentiel électrique de la pointe, pourrait se révéler utile pour diminuer les interactions électrostatiques entre la pointe et la surface de l'échantillon. D'un point de vue théorique, le changement de potentiel du levier pourrait repousser les particules contaminantes, qui quitteraient alors la pointe pour retomber à la surface de l'échantillon. Cette technique n'a pas été testée dans le cadre de cette thèse, les modes de mesures électriques n'ayant pas été

utilisés sur le Dimension 3100. Testée à plusieurs reprises par Gautsch (2002), cette technique n'a pas donné les résultats escomptés.

Avantages de la contamination

Aussi étrange que cela puisse paraître au vu de ce qui a été annoncé ci-dessus, la contamination des pointes pourrait présenter quelques avantages dans le futur.

Quand une contamination se produit, la masse totale du levier est légèrement augmentée, à cause de la masse additionnelle de la particule adhérant à la pointe, ce qui se traduit par une diminution de la fréquence de résonance du levier.

$$\Delta M = K/(0.72\pi^2) * (1/f1^2 - 1/f2^2)$$

ΔM : changement de masse

K : constante de raideur du levier

f1 : fréquence de résonance initiale

f2 : fréquence de résonance finale

Ce paramètre peut d'ailleurs être utilisé pour détecter ou confirmer une contamination de la pointe. Il existe une relation mathématique (Gautsch, 2002) entre le changement de masse du levier, et les fréquences de résonance initiale et finale.

Ainsi, la contamination d'une pointe peut paradoxalement être regardée comme un avantage si l'objectif est de prélever des quantités extrêmement faibles (quelques picogrammes) de matériaux provenant d'un microfossile individuel. En forçant le contact entre une pointe propre, et la paroi organique collante d'un microfossile, il serait effectivement possible de venir volontairement contaminer la pointe avec des particules organiques, dont la masse pourrait être estimée par la réduction de la fréquence de résonance du levier (Gautsch, 2002), et qui pourraient ensuite être analysées dans le futur.

Niveau de préservation organique des microfossiles des formations Draken et Gunflint

Formation Draken

Il est possible de tirer plusieurs conclusions des observations réalisées au microscope à force atomique et au microscope électronique en transmission sur les microfossiles de la formation Draken. Si l'on se réfère aux images optiques, ainsi qu'aux cartographies Raman 2D (figure 35A et figure 35F page 141), il est possible de conclure que le matériau organique est distribué de façon continue et homogène au sein des parois cellulaires. Or les images de hauteur et de phase obtenues au microscope à force atomique semblent prouver le contraire, tout comme les images TEM. Dans les microfossiles de la formation Draken (en particulier pour les cellules de *Myxococcoides* étudiées ici), le carbone ne forme donc pas de structures stables, solides et continues, comme c'est le cas pour les microfossiles de la formation Gunflint (voir ci-dessous), mais se présente sous la forme d'un réseau lâche de structures étirées d'une centaine de nanomètres d'envergure.

Les techniques photoniques, comme la microscopie optique ou la microspectrométrie Raman, peuvent donc être trompeuses quant à la détermination de la quantité de matière organique fossile préservée au sein d'un microfossile donné (voir aussi Kempe et al., 2005). En microscopie optique, la présence d'une paroi de couleur sombre, dense et ininterrompue est le signe d'une excellente préservation organique. Rien n'indique que la paroi peut être en réalité discontinue à l'échelle submicrométrique, et que la teneur en carbone peut être très faible (le Raman pouvant d'ailleurs permettre de réaliser des mesures quantitatives, possibilité qui n'a pas été employée dans le cadre de cette thèse).

Il ne fait aucun doute, au vu des résultats obtenus, que la paroi des microfossiles de la formation Draken est en majorité constituée de quartz. Cela explique certainement pourquoi l'imagerie force volume ne s'est pas montrée capable de détecter une adhésion significative au-dessus des parois cellulaires, comme dans le cas des microfossiles de la formation Gunflint. Le signal Raman obtenu sur les microfossiles de Draken est certes très fort pour une puissance très faible (0,5 mwatts) du faisceau laser excitateur, mais ce résultat s'explique par la grande sensibilité de la technique à des quantités très faibles de kérogènes.

La microscopie optique, et la microspectrométrie Raman, se montrent donc très sensibles vis-à-vis de la matière organique fossile préservée dans un microfossile. Ce dernier point est particulièrement important au regard des analyses complémentaires qui peuvent être effectuées sur des échantillons.

Devant une concentration très faible de matériau organique, comme celle des microfossiles de la formation Draken, des analyses organiques *in-situ*,

comme la micropyrolyse laser (Arouri et al, 1999; Arouri et al, 2000) pourraient être particulièrement délicates. De plus, dans le cas d'analyse sur roche totale, le risque est grand que des matériaux organiques particulaires, dispersés dans la matrice minérale et pas nécessairement liés à un microfossile donné ou même d'origine biologique, masquent la petite quantité de kérogènes provenant effectivement de la paroi des microfossiles. Une investigation complète de la structure des parties organiques des microfossiles, avec des techniques haute résolution comme la microscopie à force atomique ou la microscopie électronique en transmission, apparaît donc essentielle pour l'interprétation d'analyses organiques effectuées sur roche totale.

Formation Gunflint

Microfossiles organiques

Comme l'ont montré les observations effectuées sur les microfossiles de la formation Gunflint, la presque totalité des cellules d'*Huroniospora* et de *Gunflintia minuta* sont organiquement préservées. Sous le microscope à force atomique, électronique à balayage et électronique en transmission, ces derniers révèlent effectivement une paroi compact et solide, composée en majorité de carbone.

A très haute résolution, la paroi organique des microfossiles ne présente aucune ultrastructure nanométrique, et la matière organique semble totalement amorphe, comme le montre la paroi d'un filament de *Gunflintia minuta* (figure 41E page 156), imagé avec une résolution digitale de 1 nanomètre et une résolution physique (réelle) de 2-3 nm. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par Moreau et Sharp (2004), qui rapportent la présence de carbone amorphe dans les parois de microfossiles de la formation Gunflint (par HR-TEM après amincissement ionique), sans observer aucune structure typique de la micro texture d'une matière organique très mature en voie de graphitisation (voir Oberlin et al., 1980; Rouzaud et Oberlin, 1983; Beny-Bassez et Rouzaud, 1985). L'absence de nanostructure dans les images des parois organiques obtenues avec le microscope à force atomique semble donc refléter une propriété originale de cette dernière, et n'est pas à mettre sur le compte d'un manque de résolution au cours des investigations effectuées dans le cadre de cette thèse.

L'absence de structures nanométriques, et l'aspect amorphe des parois de kérogènes de microfossiles de la formation Gunflint est intéressante à la lumière des données obtenues par Kempe et al. (2002; 2005). Ces auteurs documentent la présence de feuillets composés de couches de carbone amorphe de 10 à 20 nanomètres d'épaisseur dans la paroi d'acritarches néoprotérozoique. Kempe et al. (2002; 2005) notent que l'origine de cette texture laminée est inconnue, et qu'elle pourrait être aussi bien d'origine biologique que taphonomique ou diagénétique. Dans le cas des microfossiles de la formation Gunflint, dont la biogénicité n'est

pas discutée, le kérogène ne présente aucune structure. Il est donc possible que les lamines observées par Kempe et al. (2002; 2005) soient plus liées à des processus taphonomiques ou diagénétiques que des processus biologiques. Cependant, les organismes étudiés étant bien différents (bactéries engainées ou cyanobactéries d'un côté, acritarche de l'autre, bien que la dénomination acritarche soit elle-même également vague), il est également possible que ces lamines représentent un caractère biologique chez les acritarches étudiés par Kempe et al. (2002; 2005), mais soient absentes chez les microfossiles de la formation Gunflint, leurs parois présentant une composition et/ou une ultrastructure différente.

Filaments pyritisés

Les filaments pyritisés illustrés dans les figure 43 page 161 et figure 50 page 174 représentent la seule exception à la préservation organique des microfossiles de la formation Gunflint.

L'existence de filaments remplacés par des sulfures de fer dans la formation Gunflint avait déjà été notée par Barghoorn et Tyler (1965). Les auteurs notaient la présence de filaments et de coccoïdes totalement remplacés par de la pyrite dans certaines lames minces (mais aucune photographie ne fut publiée) et indiquaient la rareté de ces formes pyritisées par rapport à des filaments simplement soulignés ou répliqués par des cristaux de pyrite, ou des filaments épigénisés en hématite.

Des microfossiles similaires à ceux dont il est question ici, appelés, *Ferrimonilis sp*, ont également été décrits par Schopf et Walter (1983) dans la formation de 2 milliards d'années de Duck Creek (Australie). Certains des filaments pyritisés observés par Schopf et Walter (1983) étaient partiellement remplacés par de l'hématite à une extrémité, celle-ci présentant un diamètre moins important que la partie remplacée par la pyrite. Ces auteurs en avait donc conclu qu'il s'agissait sans doute de filaments similaires à *Gunflintia minuta,* d'un diamètre d'environ un micron, minéralisées par de la pyrite et de l'hématite. Comparés aux filaments organiquement préservés, qui possèdent un diamètre a peu près constant de 1,5 microns, le diamètre plus important des portions remplacées par de la pyrite (2,5 microns) serait une conséquence de la diagenèse, les portions de *Ferrimonilis sp* substituées par de l'hématite ayant conservé un diamètre proche de l'original (Schopf et Walter, 1983).

Il est donc possible que les filaments que nous avons observé et décrit (figure 43 page 161 et figure 50 page 174) dans la formation Gunflint soit des filaments de *Gunflintia minuta* remplacés par de la pyrite. Si les filaments de *Gunflintia minuta* épigénisés par des oxydes de fer abondent dans les secteurs de la formation Gunflint riches en jaspe (Schelble et al., 2004), les filaments remplacés par des sulfures de fer sont plus rares. Aucun microfossile similaire aux filaments entièrement pyritisés décrits ici dans les cherts noirs de la formation Gunflint n'a été pour l'instant illustré dans la littérature.

Etant donné que le faciès (lower algal chert) dans lequel ces microfossiles ont été trouvés est caractérisé par une forte oxydation (comme le prouve la présence d'oxydes de fer), il est probable que les filaments pyritiques observés soient allochtones. Cette hypothèse est renforcée par le fait que ces filaments ont toujours été trouvés à l'écart des régions présentant une texture stromatolithiques (lamines organiques brunes). Il est donc possible que ces filaments proviennent d'un environnement hydrothermal (source possible de soufre, à moins que ce dernier ne soit le résultat de la réduction bactérienne de sulfates marins), et qu'ils aient été transportés sur une certaine distance, avant d'arriver dans le bassin de dépôt et d'être silicifiés.

Comparaison Draken / Gunflint

Comme il vient d'être expliqué, le fait que la paroi de certains microfossiles de la formation Draken (en particulier les cellules de *Myxococcoides)* soit composée d'un réseau discontinu de particules submicrométriques de matériaux carbonés contraste fortement avec les résultats obtenus pour les deux microfossiles dominants de la formation Gunflint (*Huroniospora spp* et *Gunflintia minuta*), voir tableau 3.

Les cherts de la formation Gunflint sont généralement décrits comme des cherts primaires, déposés sous la forme d'un gel de silice gélatineux, qui a ensuite subi une déshydratation pour donner de l'opale solide, celle-ci cristallisant à son tour pour donner du quartz et de la chalcédoine (Barghoorn et Tyler, 1965; Cloud, 1965; Simonson et Lanier, 1987; Moreau et Sharp, 2004). Ces cherts ne proviennent donc pas du remplacement de carbonates préexistants, comme c'est le cas pour les cherts de la formation Draken (Knoll, 1982; Knoll et al., 1991).

Cette interprétation est fondée sur la richesse en silice des cherts de la formation Gunflint, sur l'absence de carbonates primaires, ainsi que sur le haut niveau de préservation des reliques cellulaires, la diagenèse de carbonates primaires étant pratiquement toujours responsable d'une destruction sévère des microfossiles organiquement préservés (Cloud, 1965). Ces critères font des cherts de la formation Gunflint des roches différentes de la plupart des autres cherts fossilifères d'âge protérozoïque (Knoll et Golubic, 1979, Sommers et al., 2000).

L'origine primaire des cherts de la formation Gunflint a cependant été remise en question par Sommers et al. (2000) suite à des travaux portant sur un échantillon du lower algal chert member (région de Whitefish Falls). L'échantillon recueilli montrait une excellente préservation de textures typiques des carbonates. Les auteurs indiquent que la préservation fidèle de microfossiles n'indique pas toujours que le minéral formant la matrice soit d'origine primaire, et ait précipité à partir d'une solution aqueuse (Sommers et al., 2000). Ils remarquent toutefois que les observations effectuées sur les cherts du lower algal chert member ne s'appliquent peut-être pas aux autres membres de la formation Gunflint,

ou même à d'autres sédiments du lower algal chert member. Il est donc possible que les cherts de la région de Schreiber Beach, qui renferment les microfossiles les mieux préservés de la formation Gunflint, soient constitués de silice primaire, contrairement aux cherts de la région de Whitefish Falls, ou le minéral primaire a pu être un carbonate.

L'importante désorganisation au niveau submicrométrique de la paroi organique des cellules de la formation Draken étudiées ici (majoritairement des *Myxococcoides*) et révélée uniquement par des instruments à haute résolution tel que le microscope à force atomique et le microscope électronique en transmission, est peut-être due à la fossilisation en deux temps (carbonatation suivie d'une silicification) des microfossiles de la formation Draken. D'un autre côté, la présence d'une paroi organique cohérente et solide au niveau des microfossiles de la formation Gunflint (qui sont pourtant plus vieux et plus affectés par le métamorphisme que ceux de la formation Draken), suggère que l'hypothèse initiale concernant les cherts de la formation Gunflint (Barghoorn et Tyler, 1965; Cloud, 1965), à savoir que ces derniers résultent de la déposition primaire de silice, est correcte.

	Formation Draken (Spitsbergen 800 My)	**Formation Gunflint (Canada, 1,9 Ga)**
Matrice	Matrice composée de cristaux de quartz sub-micrométriques	Matrice composée de cristaux de quartz micrométriques
Structure de la paroi	Paroi non individualisée, désorganisée, seulement marquée par endroits par des petites particules de 100 à 200 nm de diamètre (bien révélées par la phase)	Paroi solide, continue, bien individualisée par rapport à la matrice de quartz
Composition de la paroi	Paroi composée principalement de quartz, parfois recouvert de films ultraminces de carbone amorphe présentant une orientation radiale	Paroi composée principalement de carbone amorphe sans évidence de graphitisation
Matière organique	Matière organique mature (μ-Raman), présence de soufre organique hétérocyclique (μ-XRF/XANES et TEM)	Matière organique overmature (μ-Raman), soufre organique en dessous des limites de détection
Fossilisation	Fossilisation par calcification, suivie d'une silicification très précoce (Knoll et al., 1991)	Silicification, sans doute par un gel de silice dense (Cloud, 1965; Sommers et al., 2000).

Tableau 3 : Comparatif entre les microfossiles de la formation Draken et les microfossiles de la formation Gunflint.

Microspectrométrie Raman

Si la microspectrométrie Raman a surtout été utilisée dans cette étude pour étudier la distribution des matériaux carbonés fossiles, et confirmer la présence de carbone dans les parois des microfossiles des formations Draken et Gunflint, cette technique offre en théorie une autre possibilité intéressante. Des études affirment en effet que la microspectrométrie Raman pourrait servir à prouver la nature biologique des matériaux carbonés fossilifères (Kudryavtsev et al., 2001; Schopf et al., 2002; Schopf et al., 2005; Schopf et Kudryavtsev, 2005).

Ainsi, selon Schopf et al. (2005), plusieurs caractéristiques spectrales pourraient être utilisées pour reconnaître un kérogène : présence d'un épaulement (effectivement visible sur nos spectres) sur la partie basse fréquence du pic D (ce pic ayant tendance à devenir plus symétrique avec le niveau de graphitisation), absence du décalage du pic D avec la longueur d'onde du laser excitateur (du bleu à l'infrarouge), et absence de pics de second ordre pour la bande D aux alentours de 2700 cm^{-1}.

La pertinence de ces indicateurs est cependant sujette à caution, aucune étude n'ayant clairement prouvé que ces derniers sont spécifiques aux kérogènes, et qu'ils ne peuvent se retrouver dans des matériaux organiques abiogéniques (chauffage à haute température de composés inorganiques ou organiques, composés provenant de sources hydrothermales, minéraux métamorphiques de nature graphitiques, etc.). Aucun modèle théorique n'a de plus été fourni pour tenter d'expliquer les particularités Raman des kérogènes. D'une manière plus générale, il convient de noter que la véritable origine du pic D dans le cas de matériaux aussi complexes et désordonnés que les kérogènes est toujours sujette à discussion (Castiglioni et al., 2001), et qu'une grande prudence doit être de mise. Pour Pasteuris et Wopenka (2002; 2003), la spectrométrie Raman ne permet pas d'identifier des kérogènes, et permet juste de documenter la présence d'un matériel carboné désordonné d'origine indéterminée.

Un point intéressant concerne la relation potentielle entre le spectre Raman obtenu sur une paroi cellulaire et les observations haute résolution effectuées en microscopie électronique en transmission sur cette même paroi. Les études HR-TEM ont montré que la matière organique pariétale des microfossiles des formations Draken et Gunflint est totalement amorphe à l'échelle nanométrique. Pourtant, un pic G, caractéristique d'un certain ordre, est bel et bien présent dans les spectres Raman. Une explication possible est de considérer que les franges atomiques des régions ordonnées n'apparaissent pas au HR-TEM (car elles se superposent les unes avec les autres), ces dernières ne devenant visibles qu'avec des matériaux très ordonnés (proche du graphite).

La recherche du soufre par microscopie à rayons X

Des analyses qualitatives par microscopie à rayons X du soufre ont déjà été réalisées sur des cellules bactériennes d'Escherichia Coli (Lemelle et al., 2003). Ces dernières ont été imagées comme des bâtonnets de taille micrométrique contenant du phosphore et du soufre, les spectres XANES de cet élément étant caractérisés par un pic bien défini et intense attribué à du soufre lié à des acides aminés (thiol, alkyl-sulfure).

La combinaison des mêmes techniques (l'imagerie de micro-fluorescence et micro-XANES) fut utilisée pour imager avec succès la distribution de microorganismes supposés au niveau des microstructures de la surface minérale de la météorite Tatahouine (Lemelle et al., 2004).

Dans ces deux exemples, le soufre est lié à de la matière organique fraîche ou faiblement dégradée, plutôt qu'à des complexes organiques macromoléculaires réfractaires formés durant des centaines de millions d'années par l'activité diagénétique, comme dans le cas des cellules de *Myxococcoides* de la formation Draken.

Concernant la matière organique fossile, la spectroscopie d'absorption X au seuil du soufre (seuil K, et dans une moindre mesure seuil L) a été employée pour caractériser le soufre (en particulier le rapport entre la maturation et la spéciation du soufre) dans des kérogènes (Sarret et al., 2002; Riboulleau et al., 2000). Les matériaux carbonés étudiés provenaient cependant d'extractions, et étaient très riches en soufre (jusqu'à 17 %, kérogènes de type IIS). D'autres matériaux ont également été étudiés comme les asphaltènes (Sarret et al., 1999), les pétroles, les charbons (Spiro et al., 1984), les huiles de schistes bitumineux (Olivella et al., 2002).

Des analyses en micro-imagerie X ayant conduit à la détection de soufre organique ont également été effectuées sur des structures filamenteuses, supposées d'origine biologique, composées d'oxyde de fer et encapsulées dans une matrice de silice amorphe (Foriel et al., 2004). Ces structures ont été découvertes au niveau d'une cheminée hydrothermale inactive de la dorsale est pacifique. D'après les auteurs, les structures en question ne seraient pas âgées de plus de quelques milliers d'années.

Ces hypothétiques microfossiles peuvent difficilement être comparés aux microfossiles de la formation Draken. Ces derniers sont effectivement organiquement préservés, et ne sont pas remplacés par des oxydes de fer. La phase minérale qui entoure les microfossiles se trouve être de la silice microcristalline, et non pas de la silice amorphe. Enfin, les spectres XANES enregistrés sur les structures décrites par Foriel et al. (2004) montrent que le soufre réduit est présent sous la forme de thiols et d'alkyl-monosulfure, et non pas de thiophènes, la forme principale de soufre réduit dans la matière organique fossile.

La principale différence réside cependant dans les modifications chimiques critiques subies par les phases minérales et organiques des cherts de la

formation Draken, au cours de 800 millions d'années de diagenèse et de métamorphisme, contrairement aux traces de matière organique fraîche préservées dans les structures filamenteuses vieilles de quelques milliers d'années décrites par Foriel et al. (2004). La difficulté de reconnaissance des microfossiles Précambrien est justement due en majeure partie aux processus diagénétiques (Buick, 1990).

De part leur grande jeunesse, et si elles ont effectivement subies un processus de fossilisation qui a conduit a leur encapsulation dans une matrice minérale, les structures filamenteuses décrites par Foriel et al. (2004) n'ont pas été exposées à une activité diagénétique durant des centaines de millions d'années. Elles n'apparaissent donc pas comme pertinentes pour jeter une lumière sur les résultats obtenus au cours de cette étude.

Origine du soufre organique lié aux microfossiles de la formation Draken

La détection de traces de soufre dans la paroi organique de certains microfossiles de la formation Draken pose la question de son origine. D'une manière générale, le soufre présent dans les kérogènes est préférentiellement incorporé durant la diagenèse. Bien que la biomasse contienne entre 0,5 et 1,5 % de soufre (ratio $^{S}/_{C}$ de 0,01 à 0,03), les kérogènes dérivés de la matière organique marine peuvent contenir jusqu'à 10 % de soufre (Summons, 1993). Le soufre en surplus, par rapport à celui provenant directement de la biomasse, provient généralement de l'activité bactérienne sulfato-réductrice (SRB), un processus par lequel la dégradation oxydative de molécules organiques par des bactéries est couplée avec la réduction de sulfates en sulfures, qui réagissent ensuite de manière abiogénique avec la matière organique au cours de la diagénèse (Brassell et al., 1986; Summons, 1993; Shen et al., 2001; Kohnen et al., 1989; Kohnen et al., 1990; Wakeham et al., 1995).

Par rapport aux quantités relativement importantes de soufre détectées dans des kérogènes lors d'études par microspectrométrie X au seuil du soufre (Sarret et al., 2002; Riboulleau et al., 2000), les teneurs en soufre organique détecté dans les parois cellulaires des cellules de *Myxococcoides* de la formation Draken sont très faibles (quelques centaines de ppm). Cette concentration pourrait être proche de la teneur en soufre contenu dans des cellules planctoniques, et il est donc possible de se demander si une partie du soufre détecté dans les microfossiles de la formation Draken ne serait pas autochtone (soufre biogénique initialement contenu dans les biomolécules formant la paroi cellulaire), et non diagénétique.

Quelques indices laissent effectivement penser que les traces de soufres décelés dans les *Myxococcoides* de la formation Draken pourraient effectivement avoir, en partie, une origine biogénique.

Les cellules de *Myxococcoides* ont été interprétées comme étant probablement des cellules planctoniques transportées par les courants dans la zone tidale (Knoll et al., 1991). Bien que les mats microbiens, capables de former des stromatolithes, puissent se développer dans cet environnement, les cellules de *Myxococcoides* analysées ici n'étaient pas associées (du moins au niveau des clasts dans lesquels elles ont été localisées) avec des filaments typiques de ceux que l'on trouve dans des mats microbiens (en particulier des *Siphonophycus*). Ainsi, l'activité sulfato-réductrice qui est parfois associée à la précipitation de carbonates à l'intérieur des mats microbiens (Visscher et al., 2000) ne peut pas être invoquée dans ce cas. De plus, il a été suggéré que l'activité sulfato-réductrice pouvait être rapidement inhibée par une précipitation massive et précoce de silice (Boyce et al., 2001), comme celle impliquée dans la fossilisation des cellules de la formation Draken (Knoll et al., 1991).

Rien ne prouve qu'une activité sulfato-réductrice n'a pas effectivement eu lieu durant la fossilisation des microfossiles de la formation Draken, mais l'hypothèse qu'une partie du soufre pourrait être d'origine biogénique est suffisamment intéressante pour que des études complémentaires soient menées dans le futur, telles que la détermination précise de la signature isotopique du soufre présent dans les parois et les cristaux de pyrite, ou encore la quantification du soufre originellement présent dans la paroi des supposés analogues actuels (*Chlorella*) de *Myxococcoides*.

Implications de la présence de soufre dans les microfossiles de la formation Draken

La présence de soufre dans les parois cellulaires des cellules de *Myxococcoides* de la formation Draken indique que la matière organique est relativement bien préservée, et que cette dernière contient probablement des composés carbonés réfractaires riches en doubles liaisons, site d'attachement préférentiel du soufre durant la diagenèse.

Le soufre peut ponter des molécules organiques par l'intermédiaire de liaisons intermoléculaires (simple, double ou multiples), et former ainsi des réseaux organiques macromoléculaires qui peuvent séquestrer d'éventuels biomarqueurs. De cette manière, il stabilise des composés labiles tels que les lipides, en prolongeant leur durée de vie dans les archives géologiques (Brassell et al., 1986; Whelan et al., 1993; Kohnen et al., 1990). Des microfossiles contenant encore des traces de soufre pourraient contenir des molécules organiques mieux préservées que ceux pauvres ou dépourvus de soufre, et offriraient donc un plus fort potentiel pour la recherche de biomarqueurs. Il est donc possible d'imaginer que l'on puisse sélectionner des microfossiles sur la base de leur teneur en soufre avant d'entamer une recherche de biomarqueurs.

L'incorporation préférentielle de soufre dans les parois organiques de microfossiles pourrait également être utilisée comme indicateur du type de composés présents originellement dans la paroi de la cellule vivante.

Les cellules de *Myxococcoides* étudiées ici par microscopie à rayons X pourrait appartenir à une population de *Myxococcoides chlorelloidea*, étant donné la présence et l'organisation des vésicules internes, qui permettent de différencier cette espèce d'autres espèces de *Myxococcoides* (Knoll et al., 1991). Un analogue actuel possible (figure 57 page 209) pour cette espèce serait une algue verte appartenant à l'ordre des Chlorococcales, *Chlorella* (Knoll et al., 1991).

Les chlorelles possèdent effectivement une morphologie et des figures de division comparables à *Myxococcoides chlorelloidea.* Certaines espèces, comme *Chlorella pyrenoidosa*, possèdent de plus un pyrénoïde (organite cellulaire propre aux chloroplastes, et concentrant les enzymes responsables de la photosynthèse), qui pourrait expliquer la présence du corps organique que l'on trouve parfois à l'intérieur des vésicules fossiles. Celui-ci pourrait cependant simplement être un résidu cytoplasmique, et non un organite cellulaire spécifique (Knoll et al., 1988; Westall et al., 1995). Les cellules de Chlorelles sont également plus petites que celles de *Myxococcoides chlorelloidea*, l'activité diagénétique pouvant cependant provoquer un gonflement des cellules durant la fossilisation.

Certaines espèces de *Chorella* possèdent dans leur paroi des composés plus résistants que les polysaccharides, et qui contiendraient de nombreuses doubles liaisons (Atkinson et al., 1972). Etant donné que ces dernières sont des sites d'attachement préférentiel du soufre durant la diagenèse (Summons, 1993; Shen et al., 2001; Kohnen et al., 1989; Kohnen et al., 1990; Wakeham et al., 1995), la présence de composés réfractaires riches en doubles liaisons pourraient expliquer la présence de soufre réduit dans les parois des *Myxococcoides chlorelloidea* de la formation Draken. L'absence de soufre dans les parois d'autres microfossiles dont les analogues connus ne possèdent pas de composés réfractaires au niveau de leur paroi (d'autres espèces de *Myxococcoides*, mais surtout d'autres genres), permettrait de confirmer cette hypothèse.

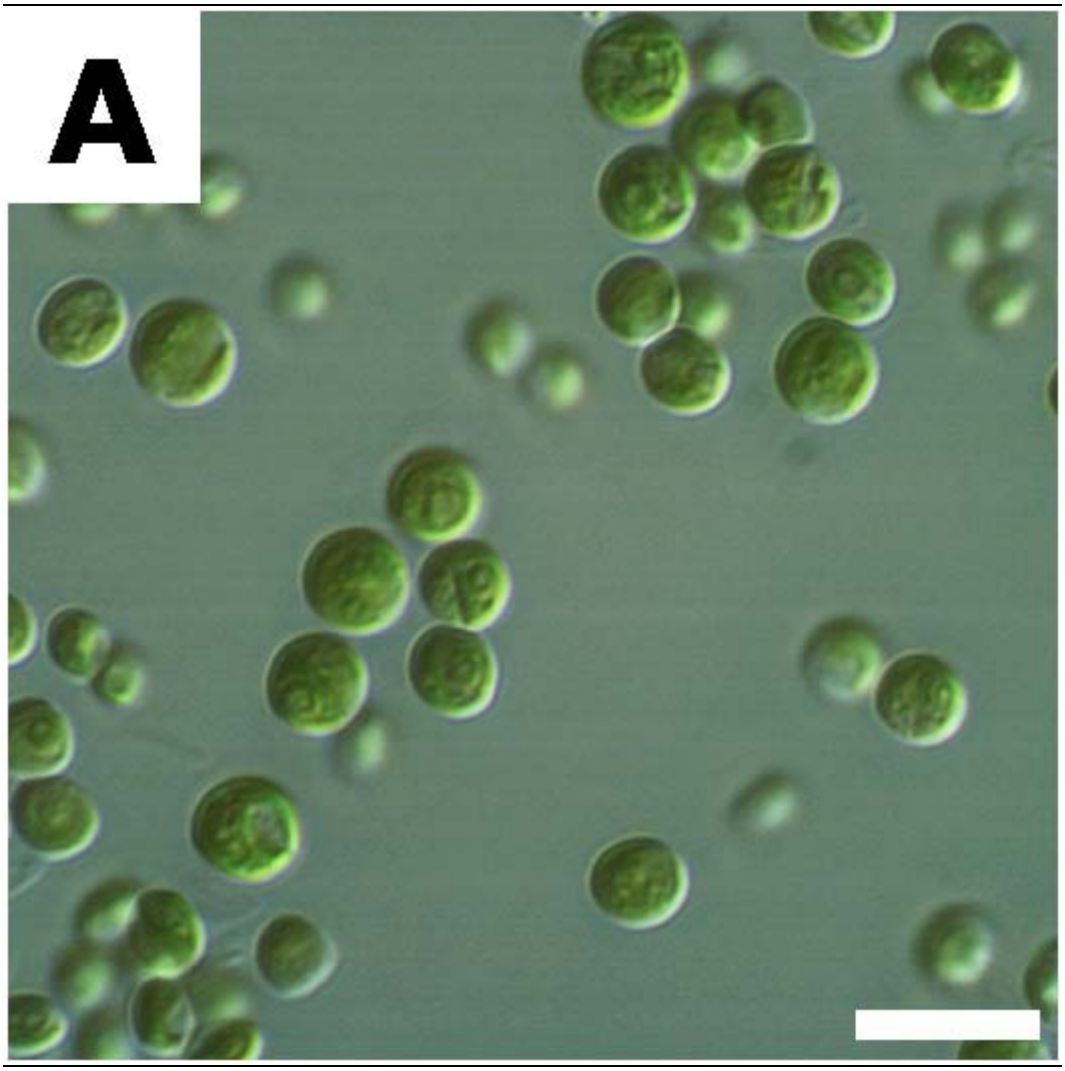


figure 57. *Chlorella vulgaris*. [A] Cellules vivantes de *Chlorella vulgaris* imagées au microscope optique à transmission (grossissement x1000) (photographie non obtenue par l'auteur). Le genre *Chlorella* est considéré comme un analogue actuel plausible pour certaines populations de *Myxococcoides*. Cependant, les cellules sont plus petites (entre 4 à 6 microns) que leur équivalent fossile (diamètre généralement supérieur à 15 microns) (échelle : 10 microns).

D'un point de vue taxonomique, il est important de garder en mémoire le fait que le genre *Myxococcoides* a été à l'origine créé pour désigner plusieurs populations très spécifiques de cellules sphériques fossiles trouvées dans la formation Bitter Springs. De nombreux auteurs ont ensuite étendu les limites du genre pour inclure un grand nombre d'unicellulaires de forme sphérique. Ce terme est désormais utilisé pour désigner des vésicules de taille diverse (de 3 microns à 35 microns), solitaire ou formant des agrégats denses, sans enveloppes externes bien définies, les cellules coloniales pouvant toutefois être emprisonnées par une couche de mucilage externe. Il est tout à fait possible que ce genre comprenne à la fois des cellules photo-autotrophes procaryotes et eucaryotes. Dans la plupart des cas, la morphologie est tellement simple que très peu de conclusions taxonomiques peuvent être tirées. Les cellules sont généralement sphériques, mais la sphéricité peut être perdues suite

à une compression (éventuellement due à la présence d'une cellule adjacente).

Avantages de la microscopie à rayons X pour l'étude du soufre

Au vu des résultats obtenus et décrits ci-dessus, il s'avère que la micro-imagerie de fluorescence X et la microspectrométrie au seuil d'absorption du soufre (seuil K) sont d'excellentes techniques pour compléter les études menées en microscopie à force atomique.

Par rapport à d'autres techniques permettant de détecter et de cartographier le soufre à l'échelle micrométrique, comme la microsonde électronique (voir Boyce et al., 2001), la microscopie à rayons X offre une sensibilité supérieure d'un à deux ordre de grandeur. La profondeur d'échappement des photons provenant du soufre dans des matrices de silice ou de calcite est également supérieure à celle de la microsonde électronique, ce qui facilite l'étude de microstructures présentes sous la surface d'une lame mince. Un avantage majeur de la microscopie à rayons X est bien entendu la combinaison avec la microspectrométrie au seuil d'absorption du soufre (S-XANES) qui permet de réaliser des études de spéciation. De plus, la métallisation nécessaire des échantillons pour des études à la microsonde électronique empêche toute étude supplémentaire de la surface par microscopie à force atomique.

Par rapport à la microspectrométrie au seuil d'absorption du carbone (C-XANES), utilisée avec succès pour étudier les matériaux carbonés de cellules végétales fossiles (Boyce et al., 2002; Boyce et al., 2003), le S-XANES ne requiert pas de sectionner l'échantillon en lame ultramince d'une épaisseur inférieure à 800 nm pour l'imagerie, et d'une épaisseur inférieure à 400 nm pour la spectrométrie (Cody et al., 1996). Dans la pratique, pour l'étude de cellules fossiles, des sections ultra-minces de 100 à 200 nanomètres d'épaisseur doivent être préparées par ultra-microtomie puis déminéralisées (Boyce et al., 2003). En comparaison, des mesures S-XANES peuvent être réalisées directement à la surface polie d'une lame mince de roches.

La microspectrométrie d'absorption au seuil L du soufre, non testée dans le cadre de cette thèse, semble plus efficace pour étudier et discriminer les formes réduites du soufre (Sarret et al. 1999), et pourrait donc également être appliquée à l'étude de microfossiles précambriens.

En étant spécifique d'un élément donné, non destructive, sensible à l'état d'oxydation et capable d'analyser des microfossiles individuels de taille micrométrique sans traitement particulier des échantillons (comme la métallisation qui empêcherait toute étude supplémentaire de la surface par microscopie à force atomique), la micro-imagerie X et le micro-XANES apparaissent comme des techniques de choix pour cartographier *in-situ* et déterminer la spéciation du soufre dans des microfossiles précambriens. Cependant, comme dans le cas de la microspectrométrie Raman, la

résolution spatiale est trop faible pour pouvoir permettre de corréler pixel par pixel les cartes élémentaires avec les images AFM.

Expérimentations futures

Plusieurs études complémentaires pourraient être réalisées dans le futur pour approfondir les résultats obtenus durant le cadre de cette thèse sur le soufre organique préservé dans la paroi des cellules de *Myxococcoides* de la formation Draken.

Ainsi, l'hypothèse de l'origine biogénique du soufre détecté dans les parois des microfossiles de la formation Draken pourrait être grandement renforcée par des études conduites sur de la matière organique autre que celle située au niveau des parois cellulaires (comme des particules organiques dispersées dans la matrice minérale, et qui ne sont peut-être pas d'origine biogénique). S'il s'avère que ces particules ne contiennent pas de soufre, il est possible que cet élément puisse être utilisé comme indicateur de biogénicité dans certains cas, et que des analyses par microscopie à rayons X puisse permettre d'apporter quelques informations quand à l'interprétation de microstructures carbonées archéennes controversées (Schopf 1993; Brasier et al., 2002; Schopf et al., 2002; Brasier et al., 2004; Westall, 2005), beaucoup plus vieilles que les microfossiles néoprotérozoïque à l'origine biologique indéniable étudiés ici.

Une autre perspective intéressante sera d'analyser le soufre présent dans d'autres microfossiles de la formation Draken, comme les cellules filamenteuses du genre *Siphonophycus* (Knoll et al., 1991). Ces filaments sont considérés comme étant des gaines d'anciennes cyanobactéries. De part leur composition polysaccharidique, ces enveloppes sont sans doute différente, d'un point de vue chimique, de la paroi des cellules de *Myxococcoides*. Il est possible que cette différence, en particulier la quantité relative de doubles liaisons, puisse s'exprimer en terme de différence de concentrations en soufre. Des études axées sur la quantification précise du soufre dans de nombreux taxas de la formation Draken (Knoll, 1982; Knoll et al., 1991), et utilisant la procédure décrite ici, pourraient donc révéler d'intéressantes informations concernant la taxonomie et l'histoire taphonomique de cet assemblage fossilifère.

Le rapport soufre/carbone mériterait aussi d'être précisément déterminé, étant donné son rôle potentiel d'indicateur du degré de préservation de la matière organique. La détermination de ce rapport nécessiterait l'utilisation d'une technique permettant de déterminer la concentration du carbone avec une précision similaire à celle offerte par la microscopie X pour le soufre.

CHAPITRE V

PERSPECTIVES

«L'expérience est une lanterne que l'on porte sur le dos, car elle n'éclaire que le chemin parcouru.»

Confusius

Au vu des limitations de l'instrument que nous avons listé dans le chapitre précédent, et qui ne peuvent être passées sous silence, il apparaît clairement que le microscope à force atomique ne peut être utilisé pour caractériser des microfossiles précambriens qu'en combinaison avec d'autres techniques, tel que la microscopie optique (identification et localisation des microfossiles quand ils sont visibles par cette technique, contexte pétrographique), la microscopie électronique (identification et localisation de certains microfossiles archéens submicrométriques, détection d'artefacts, cartographie élémentaire), la microspectrométrie Raman (minéralogie, distribution des kérogènes), ou encore la microscopie à rayons X (cartographie élémentaire, spéciation d'éléments).

Cependant, par rapport à toutes ces techniques, le microscope à force atomique possède une capacité unique, celle de pouvoir réaliser un contact mécanique direct entre une pointe extrêmement fine et la surface d'un échantillon. Cette dernière ouvre des possibilités très intéressantes, au nombre desquelles se trouvent la nanodissection, et surtout la microscopie à force chimique, qui sera décrit ci-dessous.

Même si ces modes d'utilisation n'ont pas été mis en œuvre dans le cadre de cette thèse, ils méritent d'être mentionnés et détaillés ne serait-ce que d'un point de vue théorique, étant donné que par leur intermédiaire, le microscope à force atomique pourrait devenir un instrument clé dans la boîte à outils du micro-paléontologiste et de l'exobiologiste (Avci et al., 2004).

Microscopie à force chimique

Introduction

La microscopie à force chimique est un mode de fonctionnement du microscope à force atomique, dans lequel la pointe est fonctionnalisée avec une fonction chimique ou mieux, une sonde moléculaire tel qu'un anticorps ou un aptamère. La pointe est amenée au contact avec l'échantillon, de manière à permettre une interaction potentielle entre la fonction chimique ou la sonde moléculaire portée par la pointe d'une part, et la fonction ou la molécule cible située à la surface de l'échantillon.

A l'heure actuelle, comme expliqué en introduction, la recherche d'une signature moléculaire semble être la voie la plus prometteuse à suivre pour prouver la biogénicité d'une structure donnée, si tant est qu'une certaine quantité de biomarqueurs ait pu être préservé durant la fossilisation, et qu'une contamination (durant l'échantillonnage, le transport, les mesures, ou par des fluides récents) puisse être écartée.

Les analyses permettant de détecter des biomarqueurs moléculaires ne peuvent actuellement être réalisées que sur roche totale, étant donné la très faible teneur en carbone des cherts protérozoïques ou archéens. Cette technique possède le désavantage de prendre en compte non seulement la fraction autochtone (c'est-à-dire la fraction de matière organique liée aux microfossiles), mais également la fraction allochtone et la fraction remaniée. Les observations des microfossiles de la formation Draken ont démontré que la paroi cellulaire peut contenir des quantités très faibles de matières organiques, qui deviendront négligeables devant celles des fractions allochtone ou remaniée.

L'idéal serait de rechercher les biomarqueurs de manière *in-situ*, au sein même d'un microfossile, à l'image des mesures isotopiques effectuées par sonde ionique (House et al., 2000). Aucune technique actuelle ne semble cependant être en mesure de réaliser ce type d'analyse, exceptée la microscopie à force chimique.

Dans ce domaine, les anticorps représentent des sondes moléculaires idéales, ces derniers étant capables de détecter des quantités infimes (du nanogramme au picogramme) d'antigènes (Avci et al., 2004), dans des milieux hétérogènes et complexes (comme par exemple l'environnement cellulaire), et ce de manière très spécifique. Les aptamères constituent une alternative également intéressante. Ces oligonucléotides, constitués d'une séquence variable et de deux séquences constantes, sont aussi capables de reconnaître spécifiquement une molécule cible, tout en offrant quelques avantages sur les anticorps. La production d'un aptamère est effectivement plus simple que celle d'un anticorps, et les mesures pourraient éventuellement être faites dans une atmosphère saturée en vapeur d'eau, donc dans un milieu moins contraignant que ceux nécessaires à l'activité des anticorps (Maurel, communication

personnelle). Les aptamères pourraient donc se révéler de très bons compléments des anticorps.

De son côté, le microscope à force atomique possède la capacité de positionner très finement, avec une précision nanométrique, les anticorps en question au-dessus d'une cible potentielle. En couplant la grande spécificité et sensibilité des anticorps avec la haute résolution spatiale de la microscopie à force atomique, le microscope à force atomique pourrait permettre d'identifier, au sein de la paroi organique d'une structure supposée être un microfossile, des géomolécules dérivées de biomolécules (hopanes, stéranes, isoprénoïdes), fournissant ainsi des arguments réellement convaincants sur la biogénicité des structures étudiées.

Il est important de noter que la microscopie à force chimique est la seule technique capable de caractériser les forces d'interactions sur une surface donnée, dans un environnement naturel et avec une résolution nanométrique. Cette capacité est absente chez d'autres techniques couramment utilisées pour détecter des interactions antigènes-anticorps, tel que ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), l'immunofluorescence optique, l'immunolocalisation par des particules d'or colloïdal ou encore l'immunoblotting (Avci et al., 2004).

Les objectifs à accomplir dans ce domaine sont les suivants : la première étape consiste à produire des anticorps dirigés contre un biomarqueur potentiellement présent dans la paroi d'une structure fossile supposée être d'origine biologique. Une fois l'anticorps obtenu, il faudra alors le fixer à l'extrémité d'une pointe, puis caractériser la force d'interaction entre cette pointe fonctionnalisée et la surface de l'échantillon, par le biais de modes comme l'imagerie de force latérale ou l'imagerie force volume, qui ont été testés dans le cadre de cette thèse.

Considérations théoriques sur la microscopie à force chimique

Production d'anticorps

Si l'on excepte la sélection d'un biomarqueur, traité d'un point de vue pratique ci-dessous, la production d'un anticorps dirigé contre un biomarqueur donné est la première étape - et l'une des plus importantes - , pour avancer dans le domaine de la microscopie à force chimique.

L'objectif est de produire un anticorps possédant une bonne affinité et une excellente spécificité pour un biomarqueur moléculaire, que celui-ci soit libre ou lié. Il semble intéressant de s'orienter vers la production d'anticorps monoclonaux. Ces derniers sont souvent très sensibles et très spécifiques, et peuvent être produits en grandes quantités, et ce avec des caractéristiques constantes. Cependant, comme indiqué plus loin, l'équipe d'immunologiste avec laquelle nous avons collaboré s'est orientée vers la production d'anticorps polyclonaux, plus faciles à produire que les anticorps monoclonaux.

Les biomarqueurs moléculaires potentiellement intéressants en micropaléontologie précambrienne (Brocks et al., 1999; Summons et al., 1999) combinent deux inconvénients majeurs : ce sont effectivement des molécules petites et hydrophobes. Pour stimuler la réaction immunogène, elles devront donc être couplées à une molécule présentatrice, et le couplage devra avoir lieu en milieu semi-organique. Celui-ci devra être choisi avec soin, de manière à favoriser au mieux les interactions entre les deux partenaires (molécule cible et transporteur), et d'éviter que l'une des deux molécules n'aient tendance à précipiter durant le couplage, ce qui diminuerait le rendement des réactions de ligation.

Une fois le couplage de la molécule réalisé, la production des anticorps monoclonaux peut débuter. Depuis sa mise au point par Köhler et Milstein en 1975, cette technique de production d'anticorps est utilisée de manière intensive dans différents domaines. Relativement longue (six mois environ), elle comprend plusieurs étapes :

- L'immunisation : Il s'agit d'injecter l'antigène dans un animal (rats, souris, lapins, en général 3 ou 4) pour déclencher une réaction immunitaire productrice d'anticorps. L'immunisation nécessite plusieurs injections plus ou moins espacées, une maturation de la réponse immune se produisant au cours du temps. Une méthode ELISA spécifique doit être parallèlement développée pour contrôler l'efficacité de l'immunisation. Pour les tests ELISA, l'antigène est lié à une molécule transporteuse totalement différente de celle utilisée pour l'immunisation, de manière à éliminer des anticorps qui seraient spécifiques non pas de l'antigène, mais de sa molécule présentatrice, ou de la liaison chimique reliant la molécule transporteuse et l'antigène
- La fusion. Après sélection du meilleur animal par des tests ELISA, les cellules spléniques sont fusionnées avec des cellules cancéreuses (myélome) capables de se reproduire à l'infini. Les hybridomes obtenus possèdent ainsi à la fois la capacité de produire des anticorps, et celle de proliférer en permanence (à condition bien sûr de leur apporter un milieu de culture convenable). Les cellules fusionnées sont placées dans des microplaques, et les puits au sein desquels une seule cellule s'est développée sont identifiés.
- Criblage: Les clones capables de produire des anticorps dirigés contre l'antigène sont sélectionnés par des tests ELISA. Les cellules positives sont ensuite criblées une seconde fois pour rechercher les hybridomes producteurs des anticorps ayant la plus grande spécificité.
- Phase d'extension : Le meilleur hybridome est placé dans des conditions propices à sa réplication : culture cellulaire, ou plus souvent inoculation dans des souris histocompatibles pour produire un liquide d'ascite qui sera très riche en anticorps (jusqu'à 10 mg/ml).

- Purification des anticorps : Les anticorps produits doivent ensuite être purifiés, le plus souvent par chromatographie d'exclusion puis par chromatographie d'affinité sur protéines A ou G.
- Détermination des caractéristiques de l'anticorps : Une fois la molécule purifiée, ses propriétés doivent être déterminées : isotype (type d'immunoglobuline), constante d'affinité et spécificité pour la molécule cible (essai sur des molécules de structure proche mais néanmoins différente). La spécificité est ici très importante : certains anticorps ne reconnaîtront effectivement que la molécule liée, ce qui ne permettra pas de détecter la molécule cible sous sa forme libre dans l'échantillon. Il est donc important de déterminer la spécificité à la fois sur la molécule cible libre et la molécule cible liée.

Etude de cas : la production d'anticorps anti-stérane

Des travaux très intéressants pour la problématique de production d'anticorps dirigés contre des biomarqueurs organiques ont été réalisés entre 1989 et 1992 au Centre de Biophysique Moléculaire dans le cadre d'une thèse effectuée par Karine Chevrie-Binant (et soutenue en 1992). L'objectif de cette thèse était de réaliser des anticorps dirigés contre un biomarqueur (stérane). Les pistes suivies lors de ces travaux peuvent se révéler très intéressantes pour orienter des recherches futures.

Pour produire des anticorps anti-stérane, Chevrie-Binant s'est d'abord penchée sur deux techniques classiques, à savoir le couplage de l'antigène sur des protéines transporteuses (albumine bovine SAB ou hémocyanine de patelle KLH) en utilisant différentes liaisons chimiques : activation de l'extrémité carboxylique de l'acide cholanique sous forme d'esters actifs de type succinimidyle, paranitrophényle ou benzotriazolyle (liaison avec les groupements $-NH_2$ des protéines), et introduction d'une fonction phényl-isothiocyanate (liaison avec les groupements $-NH_2$) ou phényl-diazonium (liaison avec les groupements phénol et imidazole).

L'efficacité du couplage a été déterminée en liant l'antigène à un acide aminé non protéique (norvaline) pouvant être dosé par analyse d'acides aminés. Les couplages ont été réalisés dans des milieux semi-organiques qui ne favorisent la solubilité ni des antigènes, ni des protéines transporteuses. Des tests ont également été réalisés avec des peptides multi-antigènes (MAP), qui sont des immunogènes synthétiques solubles en milieu organique.

Seul le couplage de l'antigène (ici des stéranes sous la forme d'acide cholanique) sur de l'albumine par une liaison isothiocyanate a permis de stimuler la synthèse d'anticorps. Ce résultat s'explique par un taux de substitution assez élevé (25 résidus par molécule transporteuse pour un rendement de 51 %). A défaut, il est possible d'utiliser la liaison phényl-diazonium (23 résidus par molécule transporteuse pour un rendement de 44 %). En ce qui concerne le couplage par liaison ester, les partenaires précipitent et l'ester est hydrolysé avant d'avoir pu réagir avec les

fonctions amine. Dans le cas de l'utilisation de KLH, les anticorps sont surtout dirigés contre les épitopes très nombreux de la protéine. Enfin on notera que la réaction a été plus importante avec les souris de la lignée BP que des souris Balb/C.

Le protocole opératoire du couplage par la fonction phényl-isothiocyanate est donné en détail dans la thèse (pages 72 à 73). Dans une première étape l'antigène est couplé par le BOP (hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdiméthylamino phosphonium) à la para-nitrophényléthylamine, puis le dérivé para-nitrophényl obtenu est réduit par hydrogénisation catalytique (palladium/charbon actif) en para-aminophényl qui est alors traité par le thiophosgène. L'antigène ainsi activé est alors présenté à l'albumine dans un milieu semi-organique (DMF/H2O 80/20 v/v + DIEA)

Un polymère synthétique de L-Lysine (7 à 15 résidus) modifié par l'introduction de bras glycylglycyl (pour augmenter l'accessibilité aux anticorps) et de groupement gluconoyles (pour augmenter l'hydroinsolubilité) a été utilisé comme molécule présentatrice d'antigène pour les tests ELISA. Ce polymère présentait l'avantage de pouvoir être facilement chargé en antigène (stérane) en milieu totalement organique. Le protocole utilisé pour produire ce polymère est détaillé dans la thèse (page 44 à 48).

Même si le couplage de l'antigène avec l'albumine par l'intermédiaire d'une liaison phényl-isothiocyanate ou phényl-diazonium a permis d'obtenir des anticorps stéraniques, Chevrie-Binant s'est orienté vers la technique du complexe immun pour produire les anticorps voulus.

Les complexes immuns sont connus pour augmenter dans certains cas de façon drastique la réponse immunitaire. Cette technique consiste à coupler l'antigène à une molécule X, puis à développer des anticorps anti-X. On injecte alors le complexe antigène-X-anticorps.

Dans le cas des biomarqueurs, la molécule X idéale doit être à la fois soluble dans les milieux aqueux et organiques, et présenter de nombreux groupements fonctionnels pour faciliter le couplage, ainsi que les interactions avec les protéines (anticorps). Elle doit également présenter des caractéristiques spectrales permettant un suivi aisé tout au long des différentes opérations. Sa taille ne doit pas être trop importante par rapport à l'antigène (pour ne pas masquer ce dernier), et les liaisons établies avec le site actif de l'anticorps doivent être suffisamment solides pour empêcher un relargage du conjugué antigène-X après l'injection dans l'animal. Chevrie-Binant a choisi le bleu de basilène E3-G, une molécule dont les propriétés lui ont valu le nom de «pseudo ligand universel».

Malgré sa complexité (un deuxième anticorps de très haute affinité dirigé contre un ligand doit effectivement être produit), la technique du complexe immun a offert plusieurs avantages pour la production d'anticorps stéraniques et devrait donc sérieusement être envisagée pour

la production d'anticorps dirigés contre des géomolécules d'intérêt en micropaléontologie précambrienne :

- Une réaction au moins aussi bonne que le complexe antigène-SAB.
- Une réponse immunitaire plus homogène chez les souris injectées.
- Une mémoire immunologique plus rapide (réaction maximale après 50 jours au lieu de 70 à 80 jours).
- Un taux plus important d'hybridomes sécréteurs après la fusion (14 %), explicable par la stimulation des lymphocytes B.
- Un masquage des épitopes du ligand X et une orientation de la réponse immune vers les épitopes mineurs, faiblement immunogènes, de l'antigène.

La technique du complexe immun avec le bleu de basilène a permis à Chevrie-Binant d'obtenir des anticorps anti-stéranes (Ig1) avec une affinité acceptable et une très bonne spécificité pour la molécule cible, qu'elle soit libre ou liée.

Si le complexe immun n'a pas donné de différences notables au niveau de la quantité d'anticorps produits, il a néanmoins augmenté la réponse immune. En conséquence, si le temps ainsi que les ressources sont limitées, il est préférable d'utiliser la technique classique de couplage antigène-protéine. Une immunisation pourra être tentée en couplant le biomarqueur avec de l'albumine bovine en milieu semi-organique par l'intermédiaire de liaisons isothiocyanate. La technique du complexe immun pourra quant à elle être utilisée avec avantage sur le plus long terme.

Les analyses immunogéochimiques effectuées par Chevrie-Binant ont montré que les anticorps monoclonaux produits n'ont aucun mal à se lier à des biomarqueurs appartenant à la fraction libre. Si aucun résultat probant n'a pu être obtenu pour des questions de temps sur les kérogènes, il est tout à fait possible que des anticorps très spécifiques puissent reconnaître de très faibles quantités de biomarqueurs dans un milieu aussi complexe et hétérogène que les kérogènes. Cependant, les problèmes d'encombrement stériques ne doivent pas être négligés. Il est effectivement probable que le site de reconnaissance de la molécule à rechercher puisse être masqué par les macromolécules organiques environnantes. Si la molécule biomarqueur est aliphatique, le risque existe que cette dernière se replie sur elle-même, empêchant alors l'anticorps de la reconnaître. Ce problème potentiel n'existe cependant pas pour d'autres biomarqueurs potentiels dotés d'un squelette carboné plus rigide, comme les hopanes ou les stéranes. Enfin, il n'est pas non plus certain que la molécule à rechercher soit présente en quantité suffisamment importante dans la paroi cellulaire pour pouvoir être détectée.

Mesures par microscopie à force chimique

Une fois les anticorps obtenus, ces derniers peuvent être utilisés pour fonctionnaliser des pointes, qui permettront alors de rechercher, à l'intérieur de la composante organique d'un microfossile donné et à une échelle sub-micrométrique, la présence du biomarqueur ciblé par l'anticorps.

L'anticorps doit être fixé à une pointe d'AFM standard par l'intermédiaire d'un linker (comme le polyéthylène glycol, PEG). La présence de cette molécule intermédiaire assurera une certaine flexibilité à l'ensemble, l'anticorps possédant ainsi un certain degré de liberté qui lui permettra de se fixer plus aisément avec les biomarqueurs éventuellement présents à la surface de la lame mince polie.

Le greffage d'une partie seulement de l'anticorps (région FAB) est une possibilité à explorer. Ce greffage partiel pourrait permettre d'utiliser des liaisons S-H pour la liaison entre l'anticorps et le linker, et de mieux contrôler l'orientation de la molécule lors du greffage (lors du greffage classique, il est effectivement tout à fait possible que certaines molécules s'accrochent «tête bêche» aux molécules linkers par une région proche du site actif). Le greffage de la partie FAB permettrait également d'accrocher plus d'anticorps et limiterait les problèmes d'encombrement stérique au niveau de la pointe fonctionnalisée.

Différents modes de fonctionnement du microscope à force atomique permettront de caractériser les interactions entre l'anticorps situé à l'extrémité de la pointe et les molécules cibles éventuellement présentes à la surface de l'échantillon, et ce à l'échelle nanométrique : imagerie de force latérale (Frisbie et al., 1994), spectrométrie de force, imagerie force volume (Avci et al., 2004), ou l'imagerie de phase (Raab et al, 1999).

Dans un premier temps, il faudra déterminer le plus approprié sur la base de plusieurs critères (acquisition simultanée d'images topographiques et d'images de force, facilitée de mise en œuvre, stabilité de la mesure, etc.).

- Le mode le plus simple à mettre en œuvre est vraisemblablement l'imagerie de force latérale (LFM), qui correspond à une détermination des forces de friction par mesure des déplacements horizontaux du spot laser sur la photodiode à quatre cadrans de l'AFM.
- La spectrométrie de force proprement dite, ou une courbe force-distance est établie pour un point donné, un transect ou une matrice de points (force volume) semble très appropriée. La détermination fine de la constante de raideur des leviers permettra de mesurer quantitativement les forces, à l'inverse de l'imagerie de force latérale qui ne permet qu'une mesure qualitative.
- Enfin, selon certains travaux (Raab et al, 1999), les interactions pourraient être mesurées en mode tapping, après l'établissement de

relations entre l'adhésion de la surface et le décalage de phase. Cette approche est très intéressante, étant donné que le mode tapping permet de réduire à un minimum les forces mises en œuvre durant la mesure.

Les anticorps étant des molécules biologiques, les analyses devront être effectuées en milieu liquide. Si les mesures en milieu liquide ne présentent en général pas de difficultés particulières, la localisation d'un microfossile donné demande cependant plus d'expertise que lors d'une analyse à l'air libre.

Comme décrit ci-dessus, pour repérer un microfossile sur une lame mince, une carte des défauts de la surface obtenue par microscopie optique en lumière réfléchie est établie. Ces défauts, qui constituent autant de points de repères, sont retrouvés par l'intermédiaire de la petite caméra optique en lumière réfléchie qui équipe le microscope à force atomique (D3100). Cependant, cette caméra a d'abord été conçue pour fonctionner à l'air. La présence d'une couche d'eau dans le trajet optique rend les images très floues, et il peut être particulièrement délicat de retrouver la zone à analyser. Des balayages plus importants (plus de 50 microns de côté) seront alors nécessaires pour retrouver un microfossile donné. Comme une pointe sur laquelle a été fixé un ensemble de protéines n'est pas une sonde idéale pour obtenir des images nettes et précises de l'échantillon, l'interprétation des images demandera une certaine expérience.

Le travail en milieu liquide a cependant un avantage. Comme il a été démontré plus haut, le mode contact, nécessaire à l'imagerie de force latérale et l'imagerie force volume, ne peut être utilisé sur des surfaces attaquées à l'acide fluorhydrique. Effectivement, les forces qui s'exercent sur la surface en mode contact sont trop importantes, et provoquent en quelques minutes la contamination de la pointe ou une destruction partielle de la surface rocheuse. C'est pourquoi, pour l'étude de surfaces corrodées, le mode tapping, ou les forces d'interactions sont moindres, est toujours préféré au mode contact. Néanmoins, l'imagerie en milieu liquide permet de diminuer dramatiquement (d'un facteur 100 dans de l'eau pure, et d'un facteur 10000 en présence de petites quantités d'éthanol) les forces qui s'exercent entre la pointe et la surface d'un échantillon. Les forces de capillarité, qui sont en majeure partie responsable des phénomènes d'adhésion de la pointe lors d'un travail à l'air (à moins de travailler sous vide, toute surface est effectivement recouverte d'une couche mono moléculaire d'eau), sont par exemple automatiquement éliminées. Ainsi, si les mesures en imagerie de force latérale et en image force volume seront surtout effectuées sur des lames minces non traitées à l'acide, il n'est pas impossible que l'imagerie en milieu liquide rende aussi possible des mesures sur une surface corrodée.

Plusieurs séries de tests seront réalisées sur des surfaces idéales, avant de tenter une cartographie d'un biomarqueur choisi sur des lames minces de roches. Des essais préliminaires avec l'anticorps anti-biomarqueur pourront par exemple être effectués sur une surface de graphite HOPG sur

laquelle aura été absorbée des quantités connues de biomarqueur (des dilutions pourront être utilisées pour tenter d'estimer la limite inférieure de sensibilité de la technique), ou une section polie d'une roche de référence très riche en biomarqueurs (schistes noirs par exemple). Ces essais permettront d'une part de vérifier l'existence d'une interaction entre l'anticorps et le biomarqueur et d'autre part, de mesurer sa valeur en piconewtons (dans le cas où les courbes de force permettent effectivement de discriminer individuellement les ruptures de liaisons). Le biomarqueur pourra aussi être mélangé à des milieux complexes de nature connue, qui simuleront les kérogènes.

Concernant les mesures proprement dites sur des échantillons de lames minces de roches, plusieurs témoins devront être réalisés pour vérifier l'origine des forces mesurées, des interactions non spécifiques pouvant effectivement venir fausser les résultats :

- Imagerie avec une pointe fonctionnalisée sur laquelle un anticorps similaire à l'anticorps produit, mais ne possédant aucune affinité pour le biomarqueur, aura été fixé. Ces mesures permettront de quantifier l'importance des interactions non spécifiques, et de déterminer l'influence de la topographie de l'échantillon sur l'adhésion.
- Saturation du biomarqueur présent à la surface de l'échantillon par des anticorps, puis imagerie après lavage. Le biomarqueur ayant été masqué, aucune adhésion ne devra plus être observée avec les pointes fonctionnalisées. De manière à vérifier que la dénaturation de l'anticorps fixé sur la pointe n'est pas à l'origine de l'absence d'adhésion, la capacité de reconnaissance de la pointe sera vérifiée juste après avec une surface de graphite chargée en biomarqueur.

D'autres techniques pourront également être utilisées pour vérifier les résultats obtenus par microscopie à force chimique sur des lames minces de roches.

Une cartographie globale du biomarqueur pourra ainsi être réalisée par immunofluorescence grâce à des anticorps anti-biomarqueur couplés à des fluorophores. Même si la résolution, limitée par la diffraction, sera beaucoup plus faible que celle offerte par la cartographie à force chimique, cette étape pourrait donner une première idée de la distribution et de la concentration du biomarqueur en question. Des observations d'immunofluorescence sur des lames minces de la formation Gunflint effectuées au Centre de Biophysique Moléculaire ont montré que ces cherts ne présentent pas d'auto fluorescence dans les longueurs d'onde qui seront utilisées pour exciter les fluorochromes (FTIC). Ce résultat est encourageant, étant donné qu'une autofluorescence aurait pu perturber les mesures de fluorescence optique.

Un autre concept serait de faire développer une surface de test, pour permettre de vérifier sans la moindre ambiguïté la capacité de cartographie des anticorps produits, sur des échelles micrométriques.

Grâce à des techniques issues de la microélectronique et des nanotechnologies, il devrait théoriquement être possible de lithographier, sur une surface de 1cm^2 de côté, des motifs géométriques d'une taille variable (entre 50 et 5 microns). Ces motifs seront ensuite fonctionnalisés par des groupements fonctionnels (par exemple amines ou hydroxyles), qui serviront à accrocher le biomarqueur sélectionné. Le reste de la surface sera occupé par des groupements hydrophobes (-CH_3) qui simuleront les composés carbonés de la paroi des microfossiles précambriens.

Cette surface pourra être utilisée avec les trois microscopes (optique, électronique à balayage et à force atomique), ce qui lui conférerait la valeur de surface de référence. Dans l'avenir, il serait envisageable de faire graver des motifs de dimensions submicrométriques, compatibles avec les possibilités de résolution spatiale du microscope à force atomique.

Résultats préliminaires

Même si la microscopie à force chimique n'a pu être abordée dans le cadre de cette thèse, quelques avancées préliminaires ont néanmoins été effectuées, et sont décrites ci-dessous.

Sur les deux assemblages fossilifères étudiés dans cette thèse, les microfossiles de la formation Gunflint semblent être les plus adaptés à une cartographie à force chimique. Les microorganismes préservés dans les cherts de cette formation possèdent en effet une paroi riche en kérogènes, ce qui n'est absolument pas le cas des microfossiles de la formation Draken, qui ont perdu la majorité de leur matière organique pariétale.

Sélection d'un biomarqueur

Un échantillon de chert noir de la formation Gunflint d'une trentaine de grammes a été envoyé au Planetary and Space Sciences Research Institute (PSSRI) de l'Open University, qui a réalisé les analyses de la matière organique. La fraction libre (bitume) a été extraite sur 34 grammes de roches par Soxhlet puis analysée par GCMS et GCIRMS après séparation en fraction aliphatique et aromatique. De grandes quantités de n-alcanes (n14-n28) ont été détectées par GCMS dans la fraction aliphatique, tout comme du phytane et du pristane. La détection de phytane et de pristane confirme les travaux de Oró et al. (1965). Cependant, la distribution des n-alcanes semble pointer une source immature récente. Quelques espèces aromatiques avec une signature mature ont bien été identifiées dans la fraction aromatique, mais en très faible quantité.

Seule la fraction aliphatique a pu être analysée par GCIRMS. Le $\delta^{13}C$ pour les n-alcanes varie entre -27 et -30 ‰, une valeur biogénique mais qui, couplé à l'immaturité des n-alcanes, pourrait également indiquer une source récente. 2g du résidu de l'extraction ont été attaqués à l'acide (HCL/HF). Cette digestion a permis d'obtenir un résidu de 5,38 mg, dont 5 mg ont été pyrolisés puis analysés par GC-MS. Aucun composant ne fut détecté. Une combustion par étape sera prochainement effectuée sur les 0,38 grammes restant pour déterminer le $\delta^{13}C$. D'une manière générale, les analyses sont rendues particulièrement difficiles et délicates par la très faible quantité de carbone présent dans les échantillons de Gunflint (TOC ≈ 1,5 mg C/g).

Au vu des résultats obtenus sur Gunflint, le phytane a été sélectionné comme biomarqueur cible pour la production d'anticorps, et ce pour plusieurs raisons, l'une des plus importantes étant sa qualité de biomarqueur.

Appartenant à la famille des isoprénoïdes, le phytane est constitué de l'enchaînement de sous-unités comptant 5 atomes de carbone (unité isoprène). Sa synthèse dans des conditions abiotiques est, selon l'état de

nos connaissances, hautement improbable. Le phytane provient généralement de la chaîne latérale (phytyl) de la chlorophylle (Oró et al., 1965). De plus, s'ils sont caractéristiques d'organismes photosynthétiques, les isoprénoïdes sont également présents dans la paroi des archées, et le phytane pourrait donc potentiellement être utilisé pour identifier des organismes du domaine des archées.

En 1965, Oro et al. mirent en évidence du pristane et du phytane dans les cherts de Gunflint. Dans ces travaux, la fraction volatile fut extrait grâce à un mélange 3:1 de benzène et de méthanol, après que les échantillons aient été soit déminéralisés à l'acide fluorhydrique, soit pulvérisés. Les analyses montrèrent la présence de n-alcanes possédant 16 à 32 atomes de carbone. La distribution des hydrocarbures est bimodale, ces derniers étant distribués en deux grands groupes, l'un avec un maximum autour de C18 et C19, l'autre avec un maximum situé à C22. Aucune prédominance des alcanes impairs ne fut notée par rapport aux alcanes pairs. Pour exclure la présence d'une contamination, un large fragment de chert fut lavé avec un mélange 3:1 de benzène et de méthanol. D'après les analyses, les auteurs ont estimé que la part des hydrocarbures détectés lors des analyses et provenant d'une contamination était inférieure à 1 %. Pour Cloud et Hagen (1965), le pristane et le phytane détecté proviennent de la chaîne latérale de la chlorophylle, un résultat qui semble confirmer l'appartenance supposée de la plupart des microfossiles de la formation Gunflint au groupe des cyanobactéries. Cette hypothèse est renforcée par le fait que le rapport $^{12}C/^{13}C$ de la matière organique de la formation Gunflint a été estimé à –33.1 ‰ , proche de celle d'un fractionnement par la photosynthèse (Barghoorn et Tyler, 1965).

Les analyses effectuées par l'Open University confirment la présence de phytane en quantité non négligeable, ce qui augmente les probabilités de le détecter avec des anticorps. Même si ces derniers possèdent un seuil de sensibilité très bas, il est toujours avantageux, dans le cadre d'un premier test, de savoir que la molécule à rechercher est présente dans des quantités non négligeables.

Quelques indicateurs (distribution des n-alcanes et le $\delta^{13}C$) suggère que le phytane pourrait cependant provenir d'une source récente (contamination). Cette hypothèse ne diminue pas l'intérêt de la recherche de phytane par microscopie à force chimique, bien au contraire. Comme nous l'avons indiqué, cette molécule étant un produit de dégradation de la chaîne latérale de la chlorophylle, sa présence dans la formation Gunflint a été interprétée comme une preuve de l'existence de bactéries de type cyanobactéries (Oró et al., 1965). Si le phytane résulte d'une contamination, l'appartenance des microfossiles de Gunflint au groupe des cyanobactéries pourrait être remise en question. Dans le cas contraire, son éventuelle présence, dans la paroi organique des microfossiles de la formation Gunflint, confirmera leur biogénicité et fournira des indices convaincants sur leur taxonomie.

Enfin, le phytane est relativement facile à obtenir sous une forme fonctionnalisée (nécessaire pour accrocher le phytane à une molécule transporteuse), que ce soit sous forme de phytol (3,7,11,15 tetramethyl 2 hexadecen 1 ol) ou d'acide phytanique (acide 3,7,11,15 tetramethyl hexadecanoique). Le phytol a l'inconvénient de posséder une double liaison qui pourrait intervenir dans le processus de reconnaissance, et on lui préférera donc l'acide phytanique, dont la chaîne aliphatique est identique à celle du phytane.

Production d'anticorps polyclonaux

Malgré les avantages offerts par les anticorps monoclonaux (sensibilité, spécificité, production en grandes quantités, caractéristiques constantes), l'équipe d'immunologistes (Odile Trambouze-Vandenabeele du laboratoire d'Organisation Moléculaire: Evolution et Matériaux Fluorés de l'Université Montpellier II, en collaboration avec Michel Geffard de l'INSERM de Bordeaux) avec laquelle nous nous sommes associés pour défricher le domaine de la microscopie à force chimique a préféré s'orienter vers des anticorps polyclonaux, plus facile à produire. L'objectif était d'acquérir une première expertise pour la production d'anticorps dirigés contre des molécules hydrophobes et de petites tailles tels que les biomarqueurs.

Tests préliminaires avec l'acide isovalérique

Dans un premier temps, l'équipe de Michel Geffard a effectué des tests de greffage de manière à tester le potentiel de la BSA comme molécule transporteuse. Un composé possédant une structure relativement proche de l'acide phytanique, l'acide isovalérique de formule $(CH_3)_2$-CH-CH_2-COOH, a été couplé sur de la sérum albumine bovine (BSA) délipidée (la BSA contenant en effet toujours des traces de lipides, il s'avère nécessaire d'éliminer ces derniers avant de tenter une immunisation avec des molécules de nature lipidique).

La méthode de couplage a consisté en une activation de la fonction acide de la molécule avec de l'éthylchloroformiate dans le méthanol en présence de triethylamine. Après 10 minutes l'acide activé est mis au contact de la BSA (apparition d'un précipité laiteux) en solution dans l'eau. L'excès d'acide n'ayant pas réagit est éliminé par dialyse.

Les couplages ont été effectués trois fois et se sont avérés répétables. L'immunogénicité des immunoconjugués (c'est à dire la capacité du complexe moléculaire BSA-acide isovalérique à faire réagir le système immunitaire des souris ou rats) a été vérifiée. Après seulement deux injections espacées de 15 jours, des anticorps spécifiques ont été obtenus.

Le couplage choisi par l'équipe de Michel Geffard présente l'intérêt de greffer l'acide choisi directement sur la protéine transporteuse, sans devoir utiliser de molécule intercalaire entre la protéine et l'acide. Cette façon de procéder devrait permettre de diminuer considérablement le risque de voir l'acide phytanique se replier sur lui même, et devrait donc augmenter les chances d'obtenir un anticorps spécifique. L'acide phytanique est effectivement une molécule assez longue, et son

repliement dans l'espace est susceptible de poser des problèmes pour l'obtention d'anticorps.

L'équipe de Michel Geffard a démontré dans le passé que la spécificité des anticorps anti-acides gras dépendait de la longueur de leur chaîne carbonée. Ainsi, pour les composés ayant moins de douze atomes de carbone, les anticorps sont spécifiques, alors qu'au-delà les anticorps ne distinguent plus les acides gras entre eux (une molécule en C16 n'est par exemple pas différenciée d'une molécule en C20 ou C22), ce qui pose problème. L'acide phytanique possède une chaîne aliphatique de 15 atomes de carbone. Cependant, la présence de quatre branchements sur les carbones 3, 7, 11 et 15 devrait contraindre son repliement dans l'espace, et l'hypothèse a été faite que ce dernier se comporte comme un acide gras d'environ douze atomes de carbone. Celle-ci, et le fait que les anticorps obtenus contre l'acide isovalérique aient permis après seulement deux immunisations d'obtenir des anticorps spécifiques en abondance (la forte immunogénicité du composé étant vraisemblablement liée aux CH_3, des groupements encombrants connus pour être fortement immunogènes), laissaient penser que des anticorps pouvaient être obtenus contre l'acide phytanique.

Essais avec l'acide phytanique

Des anticorps dirigés contre l'acide phytanique ont été obtenus sur des lapins, et ce dès la seconde injection. L'affinité des anticorps anti-phytane a été estimée à ~10^{-7} M, ce qui est une valeur satisfaisante (1,2.10^{-7}M et 7,0.10^{-7}M respectivement pour les compétitions du 24-01-06 et du 03-03-06). Ces valeurs d'affinité n'ont pas pu être améliorées avec les immunisations suivantes (jusqu'à cinq immunisations supplémentaires effectuées). La spécificité a fini par décroître après un grand nombre d'immunisations, une réaction classique dans ce genre d'expériences.

Les essais de compétition (tableau 4) ont montré que les acides gras linéaires mono acide (comme l'acide palmitique, myristique, oléique) ne sont pas reconnus par les anticorps anti-acide phytanique, alors que les acides valproïque et azélaïque sont reconnus respectivement avec des réactivités croisées de 1/5 et 1/29. L'acide valproïque est un acide ramifié comme l'acide phytanique, alors que l'acide azélaïque est un diacide linéaire. Il semblerait donc que les anticorps reconnaissent une «conformation de repliement» de l'acide phytanique, conformation mimée par l'acide valproïque ramifié, et par la contrainte d'un double greffage à la protéine probable pour l'acide azélaïque.

Point intéressant, le farnésyl, qui est un lipide ramifié méthylé avec des doubles liaisons, présente une réactivité croisée plus faible que l'acide valproïque et azélaïque, alors que sa structure est très proche de celle de l'acide phytanique. Le taux de réactivité croisé du farnésyl est clairement inférieur à ce qu'il était possible d'attendre compte tenu de sa similitude de structure. L'une des explications possibles est que les doubles liaisons

de cette molécule jouent un rôle dans le processus de reconnaissance, ou dans le repliement de la molécule sur elle-même.

Des tests de compétition supplémentaires vont devoir être effectués afin de comprendre l'importance du repliement de la molécule dans le processus de reconnaissance. Ces tests seront réalisés avec des acides gras méthylés plus courts que l'acide phytanique, ainsi qu'avec leurs homologues linéaires. La spécificité de l'anticorps vis à vis d'un acide gras linéaire de longueur égale à celle de l'acide azélaïque, mais ne possédant qu'une fonction acide, sera également déterminée pour confirmer l'effet «di-greffage» sur la contrainte spatiale et donc la reconnaissance.

Même si ces travaux sont préliminaires et demandent a être poursuivis, ils montrent que des anticorps polyclonaux peuvent tout à fait être produits contre le phytane, et ouvrent la voie à la production d'anticorps monoclonaux dirigés contre ce biomarqueur intéressant.

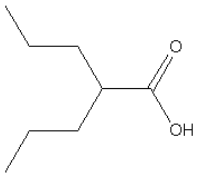
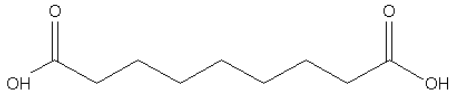
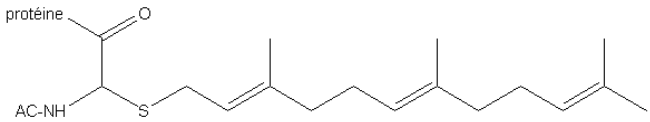
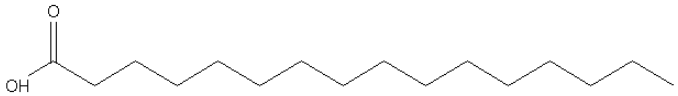
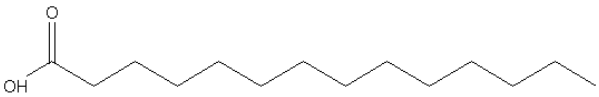
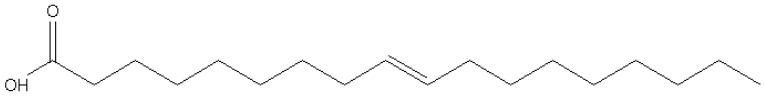
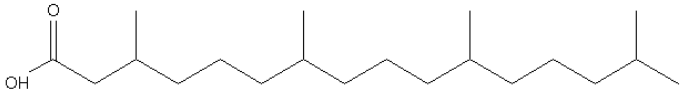
Compétiteur	Réactivité croisée	Structure du composé
Acide valproïque	1/5	
Acide azélaïque	1/29	
Farnésyl-cysteine	1/731	
Acide palmitique	> 1/10 000	
Acide myristique	> 1/10 000	
Acide oléique	> 1/10 000	
Acide phytanique		

Tableau 4: Rapport de réactivité croisée (couplage BSA-acide phytanique) et structure des compétiteurs.

Applications potentielles de la microscopie à force chimique pour l'étude des microfossiles de la formation Gunflint

La microscopie à force chimique a le potentiel de résoudre d'importantes questions dans le domaine de la micropaléontologie précambrienne. Le cas des microfossiles de la formation Gunflint sera utilisé comme exemple. Effectivement, malgré 50 ans d'étude, l'affinité de microfossiles tels que *Gunflintia minuta*, *Huroniospora, Eoastrion* ou *Eosphaera* demeure problématique.

Gunflintia minuta

L'affinité taxonomique de *Gunflintia minuta* demeure sujette à question. L'hypothèse la plus communément répandue dans la communauté scientifique est de considérer que l'assemblage fossilifère de Gunflint est dominé par des procaryotes reliés aux cyanobactéries actuelles, et vraisemblablement capables de produire de l'oxygène par photosynthèse.

Les filaments de *Gunflintia minuta* ressemblent effectivement à des gaines de cyanobactéries filamenteuses, une interprétation qui a été proposée très tôt (Barghoorn et Tyler, 1965), et qui semblait supportée par la découverte de phytane et de pristane (Oró et al., 1965) dans les cherts de la formation Gunflint. Cependant, plusieurs observations remettent en cause cette interprétation.

Premièrement, comme expliqué plus haut, il est possible que le pristane et le phytane détectés dans les cherts de la formation Gunflint proviennent d'une contamination (par les eaux du lac Supérieur ?), les affleurements se trouvant effectivement sur les berges de cette étendue d'eau.

Second point, même si les filaments de *Gunflintia minuta* sont souvent associés aux cherts présentant une texture stromatolithique, à l'échelle de la lame mince, nous n'avons jamais trouvé la moindre preuve (texture, orientation préférentielle des filaments) attestant que *Gunflintia minuta* était un constructeur primaire («mat builder») de stromatolithes. Ces observations sont en profond désaccord avec celles d'Awramik et Semikhatov (1978), ou de Walter et Awramik (1979). Dans des cherts de Gunflint présentant une microtexture stromatolithique, ces auteurs notent que les limites de couches sombres sont définies par des accumulations denses de *Gunflintia minuta* orientés parallèlement aux lamines, et que les cellules ovoïdes d'*Huroniospora* peuvent se retrouver dans les lamines claires, mais surtout au niveau des espaces interstitiels existant entre les colonnes stromatolithiques. De plus, les parois des colonnes seraient formées par des masses denses de filaments orientés parallèlement au bord des colonnes. Les filaments libres de *Gunflintia minuta* seraient absents dans les régions non-stromatolithiques entre les colonnes, ou dans les faciès chert-carbonates.

Les travaux d'Awramik et Semikhatov (1979) ont cependant été vigoureusement remis en question par Strother et Tobin (1987).

Contrairement aux observations d'Awramik et Semikhatov (1979), ces auteurs notent une absence d'alignement de l'assemblage *Gunflintia*/*Huroniospora* au niveau des lamines organiques ou entre les lamines. Contrairement à des stromatolithes, les cherts de Gunflint ne montrent pas de séquences stratifiées de microorganismes d'affinités diverses (cellules photosynthétiques, puis hétérotrophes, etc.). Au contraire, le même assemblage se répète en permanence le long d'un profil vertical (Strother et Tobin, 1987).

La structure de la communauté microbienne préservée dans les cherts de la formation Gunflint semble donc bien différente de celles caractérisant les stromatolithes précambriens plus récents, les stromatolithes actuels et les mats microbiens. Sur la base de ces observations, Strother et Tobin (1987) ont suggéré que les microfossiles préservés au niveau des faciès stromatolithiques des cherts de Gunflint ne représentaient peut-être pas des restes cellulaires d'une communauté photosynthétique constructrice de tapis microbiens, mais d'une communauté secondaire de filaments et de bactéries sphériques hétérotrophes, qui occupaient et dégradaient les lamines stromatolithiques construites auparavant par des cyanobactéries et/ou des processus abiogéniques.

L'observation de structures cellulaires caractéristiques de cyanobactéries, tels que des akinètes et des hétérocystes, est aussi sujette à caution. Les akinètes sont des cellules assez volumineuses possédant une paroi épaisse (ce qui leur confèrent une certaine résistance à la dessiccation), et situées en position sub-terminale. Lorsque les conditions du milieu redeviennent favorables, elles peuvent donner naissance à un nouveau filament, et constituent donc des formes de résistance. Plus petits, situés en position terminale et possédant une paroi très épaisse (qui augmente donc les chances de préservation dans les archives fossiles), les hétérocystes sont des cellules spécialisées, capable de fixer de l'azote grâce à une nitrogénase. Cette enzyme ne pouvant fonctionner en présence d'oxygène, les hétérocystes lui fournissent un environnement anaérobie compatible avec son activité. En 1968, Licari et Cloud ont décrit l'existence de cellules claires, larges et subsphériques de 2,5 à 3 microns de diamètre sur certains filaments de *Gunflintia minuta*, interprétées comme étant des akinètes et des hétérocystes (voir figure 41A page 156). Selon ces deux auteurs, ces structures renforçaient l'idée de l'appartenance de ces microfossiles au groupe des cyanobactéries. Cette hypothèse a été réfutée par Knoll et al. (1988), et la présence de cellules intercalaires comme des hétérocystes ou des akinètes sur certains filaments semble plutôt être une conséquence d'une altération diagénétique accrue, que la présence de véritables structures biologiques.

Si, d'un point de vue morphologique, les filaments de *Gunflintia minuta* ressemblent à des enveloppes de cyanobactéries, ils peuvent aussi être comparés à d'autres types de microorganismes. Ainsi, Barghoorn et Tyler (1965) font référence à des bactéries ferrugineuses : *Crenothrix* est par exemple cité comme analogue moderne du microfossile *Entosphaeroides*

amplus, et *Gallionella* comme représentant moderne de certains filaments de *Gunflintia minuta* possédant une structure spirale (également cité par Cloud en 1965, voir figure 16B page 68). En 1965, Cloud notait également la similarité des microfossiles filamenteux avec des bactéries utilisant le fer tel que *Leptothrix* et *Sphaerotilus*. Plusieurs microfossiles de la formation Gunflint pourraient donc être en réalité affilés à deux groupes de bactéries, les bactéries bourgeonnantes et les bactéries engainées.

Comme leur nom l'indique, les bactéries bourgeonnantes se reproduisent par bourgeonnement. La plupart sont aquatiques, et vivent attachées à des surfaces. D'autres vivent en suspension. *Gallionella* et *Metallogenium*, des espèces chemolithotrophes aérobies, font partie des bactéries bourgeonnantes.

Les bactéries engainées forment un groupe de microorganismes qui vivent couramment dans les eaux stagnantes, la plupart des espèces vivant attachées à des surfaces submergées. Comme leur nom l'indique, les bactéries engainées sont caractérisées par le fait que les cellules, qui s'assemblent en filaments, sont enfermées dans une gaine. Il est à noter que la gaine de certaines bactéries, comme *Leptothrix* ou *Crenothrix*, est souvent imprégnée ou incrustée d'oxydes de fer ou de manganèse, ce qui doit grandement favoriser leur fossilisation. *Leptothrix* et *Sphaerotilus* représentent les deux principaux genres de bactéries engainées.

Leptothrix est une bactérie engainée filamenteuse qui vit dans différents types d'environnement aquatiques riches en ions métalliques, mais généralement non pollués (Takeda et al., 1998). Elle se développe à une température optimale de 10 à 35°C, et à un pH de 6,5 à 7,5. Comme pour *Sphaerotilus*, les centrales de traitement des eaux usées représentent un environnement de choix pour *Leptothrix*, qui peut parfois complètement boucher les canalisations par son activité. Elle peut, contrairement aux autres bactéries engainées comme *Sphaerotilus*, oxyder à la fois le fer II et le manganèse II (Nelson et al., 1999), et ce bien qu'elle ne semble pas tirer de l'énergie de ces réactions. La gaine peut être incolore, ou colorée en jaune ou en brun foncé, selon que les produits des réactions oxydantes la recouvrent.

Sphaerotilus est une bactérie filamenteuse qui, comme la précédente, vit préférentiellement dans les eaux courantes, mais aussi les stations de traitements des eaux usées et les égouts. Elle affectionne les milieux pollués, à l'inverse de *Leptothrix* (Takeda et al., 1998). Elle se développe sous des pressions partielles en oxygène faible, et est capable d'utiliser différents composés organiques, comme les polysaccharides, les sucres, les polyalcools et les acides organiques.

De nombreuses bactéries engainées ou bourgeonnantes peuvent tirer leur énergie de l'oxydation de métaux comme le fer ou le manganèse. La relation très étroite que les cherts de la formation Gunflint entretiennent avec des horizons très riches en fer (minerais de fer rubanés), et l'ubiquité de ces dépôts au protérozoïque montrent que l'environnement de

prédilection de bactéries engainées ou bourgeonnantes existait au moment de la précipitation des cherts de la formation Gunflint. Il est tout à fait plausible que des microorganismes affiliés à ces deux groupes aient été non seulement présents, mais également fossilisés dans les cherts de la formation Gunflint.

Les bactéries ferreuses ne sont pas connues dans les environnements marins (sans doute à cause de la faible teneur en fer des océans actuels), mais les niveaux de salinité qu'elles sont capables de tolérer laissent penser qu'elles pourraient s'être développées il y a deux milliards d'années dans un environnement marin (Cloud, 1965).

Etant donné que seule l'enveloppe cellulaire semble avoir été préservée dans le cas des filaments *Gunflintia minuta*, il semble pertinent de s'intéresser à la composition chimique des enveloppes extracellulaires des bactéries engainantes de type *Leptothrix* et *Sphaerotilus*. Cette dernière a pu être étudiée grâce à une technique impliquant la lyse des corps cellulaires par un mélange de lysozyme, de protéases, d'EDTA 7 et de détergents comme le sodium dodecyl sulfate (SDS) ou le N-lauroylsarcosine (Emerson et Ghiorse, 1993; Romano et Peloquin, 1963).

La composition de l'enveloppe de *Sphaerotilus natans* est dominée par des sucres (54,1 %), suivi par des protéines et des lipides (1 à 3 %) (Takeda et al., 1998). Contrairement à *Leptothrix*, le polysaccharide est formé de sucres neutres (glucose) et de galactosamines dans un rapport 1:4 (Takeda et al., 1998), sans acides uroniques. Les deux acides aminés les plus abondants sont la glycine et la cystéine. Les lipides, détectés par certains auteurs, seraient en fait du à l'accumulation de poly 3 hydroxy butyrate (PHB), qui peut constituer jusqu'à 30 % de la biomasse, et qui est caractéristique de la souche. Lorsqu'elle est cultivée dans des conditions inhibant la synthèse de ce composé, *Sphaerotilus natans* ne renferme que des traces de lipides. Etant donné que l'enveloppe, observée au microscope optique, ne semble pas affecté par l'extraction à l'aide de solvants, Takeda et al. (1998) estime qu'elle ne renferme pas de molécules lipidiques. Lorsqu'elle est hydratée, l'enveloppe renferme 99 % de son poids en eau. L'enveloppe de *Sphaerotilus* est insensible aux agents réducteurs capables de rompre les ponts disulfures, contrairement à *Leptothrix*. Ces derniers ne joueraient donc pas de rôle dans le maintien structural de l'enveloppe (Takeda et al., 1998).

De son côté, et comme les enveloppes de nombreuses cyanobactéries, l'enveloppe de *Leptothrix* est formée par une matrice fibrillaire constituée d'un hétéropolysaccharide anionique (24 à 35 %) et de protéines (25 %) riches en cystéine, l'ensemble pouvant être connecté par des ponts disulfures, avec une petite quantité de lipides, moins de 8 % (Emerson et Ghiorse, 1993). Le polysaccharide est composé d'un mélange 1:1 d'acides uroniques et de N-acétyl galactosamine. Que ce soit chez *Leptothrix* ou *Sphaerotilus*, l'acide muramique, présent de manière universelle dans la paroi bactérienne, n'a pas été détecté dans les enveloppes (Romano et Peloquin, 1963).

Le rôle exact joué par l'enveloppe extracellulaire est toujours débattu, mais elle semble offrir plusieurs bénéfices à la cellule qui en possède : protection physique contre des prédateurs comme des protozoaires (Emerson et Ghiorse, 1993) ou des bactériophages (Takeda et al., 1998), adhésion à une surface solide et positionnement avantageux dans le flux de nutriment (Takeda et al., 1998), accumulation de nutriments (Emerson et Ghiorse, 1993), rétention d'eau pour se protéger de la dessiccation (Takeda et al., 1998).

L'étude fine de l'enveloppe de cyanobactéries filamenteuses et de bactéries engainées pourraient permettre d'identifier des molécules potentiellement préservées durant la fossilisation, et qu'il serait possible de rechercher par microscopie à force atomique, de manière à affiner nos connaissances sur la taxonomie des filaments de *Gunflintia minuta*.

Huroniospora

En ce qui concerne l'affinité d'*Huroniospora*, la situation est confuse, peut-être encore plus que celle des filaments de *Gunflintia minuta*. Les principales hypothèses sont résumées ci-dessous. *Huroniospora* pourrait être :

- des algues «bleues-vertes» de type *Chroococcus* (Cloud, 1965).
- des endospores produites par les espèces filamenteuses (cyanobactéries ou bactéries ferriques), comme par exemple des hétérocystes qui se seraient détachés des filaments. L'ouverture terminale visible sur certains spécimens d'*Huroniospora* marquerait alors la jonction de la spore avec le corps parent. Cependant, aucune croissance de filament n'a été observée à partir d'une cellule d'*Huroniospora*. De plus, le diamètre d'*Huroniospora* est souvent bien supérieur au diamètre des filaments les plus représentés (Cloud, 1965).
- des cellules végétatives en division (Licari et Cloud, 1968).
- des spores au sens large, comme des spores détachées du «manche de parapluie» du microfossile *Kakabekia umbellata* (Tyler et Barghoorn, 1965), ou des spores périphériques du genre *Eosphaera*. L'ouverture terminale visible sur certains spécimens d'*Huroniospora* marquerait alors la jonction de la spore avec le corps parent. Cette hypothèse ne semble cependant pas valable, étant donné la rareté des organismes producteurs par rapport au grand nombre de cellules d'*Huroniospora*.
- des dinoflagellés, donc des cellules eucaryotes (Tyler et Barghoorn, 1965).
- des spores de champignons (Tyler et Barghoorn, 1965; Darby, 1974). Cette hypothèse est considérée comme peu raisonnable, en l'absence d'hyphes connectées aux coccoides. Les spécimens étudiés par Darby appartenaient de plus au genre *Galaxiopsis*.

- des algues rouges (Tappan, 1976).
- pour Awramik et Semikhatov (1978), le fait qu'*Huroniospora* soit presque exclusivement associé aux lamines stromatolithiques et aux filaments de *Gunflintia minuta* en fait un constructeur principal appartenant au groupe des cyanobactéries.

L'hypothèse la plus conservatrice est de considérer qu'il s'agit de cellules procaryotes. Comme d'autres microfossiles précambriens, certaines cellules d'*Huroniospora* présentent parfois une petite tache sombre qui pourrait être prise pour un noyau (Darby, 1974; Tappan, 1976). Cependant, ces structures internes évoquant une organisation cellulaire eucaryote sont vraisemblablement le résultat d'une coalescence du cytoplasme en petits globules, et ne peuvent donc pas être utilisées comme critères diagnostics (Knoll et al., 1978; Westall et al., 1995). Strother et Tobin (1987) estiment qu'il pourrait également s'agir d'une cellule végétative enveloppée par une paroi protectrice, ou une endospore formée à l'intérieur d'une cellule mère.

Licari et Cloud (1968) notent que certaines cellules d'*Huroniospora* semblent avoir été fossilisées en pleine division, mais Strother et Tobin (1987) considèrent que les cellules d'*Huroniospora* accolées sont le résultat d'une juxtaposition fortuite, et non d'une division cellulaire.

Darby (1974) et Tappan (1976) ont également observé des divisions évoquant une reproduction par bourgeonnement, absente chez les cyanobactéries mais commune chez les champignons et les algues supérieures. Ce type de structure peut cependant s'expliquer par la rupture et l'expansion des gaines durant la dégradation post-mortem. Cette hypothèse est de plus contredite par la distribution des cellules d'*Huroniospora*, qui s'observent uniquement au niveau des lamines stromatolithiques. Ces cellules faisaient donc partie intégrante de la communauté microbienne, même si des doutes sérieux subsistent quant à leur participation à la construction des stromatolithes. Ce genre d'environnement n'est pas compatible avec la présence de cellules eucaryotes.

Knoll et al. (1988) notent que dans les roches de la formation Duck Creek, *Huroniospora* constitue au maximum 20 % de l'assemblage fossilifère. Quand les coccoides sont en quantité plus importantes, il semble que cela soit en partie du à une dégradation diagénétique préférentielle des filaments associés. Il semble donc que les cellules ellipsoïdales d'*Huroniospora* soient plus résistantes que les filaments. Strother et Tobin (1987) estiment justement que les cellules d'*Huroniospora* représentent des spores ou des formes enkystées plutôt que des cellules végétatives. Ces dernières ne constitueraient donc pas une évidence directe de la nature primaire et photosynthétique des microorganismes fossilisés dans les cherts de la formation Gunflint.

Strother et Tobin (1987) ont aussi noté que les cellules d'*Huroniospora* sont presque toujours des individus solitaires. Elles sont rarement

attachées les unes aux autres et ne forment jamais de groupes qui pourraient être interprétés comme des colonies. Bien que certains spécimens très rares d'*Huroniospora* aient été trouvés en doublet durant notre étude, l'appariement des cellules est certainement due à une juxtaposition fortuite et ne peut être interprétée comme le résultat d'une division cellulaire.

Des mesures isotopiques *in-situ* ont été effectuées sur 15 microfossiles de la formation Gunflint exposés à la surface de sections polies de 15 microns d'épaisseur par microsonde ionique (House et al., 2000). Des valeurs de ^{13}C comprises entre -32 % et – 45% ont été mesurées. Sept spécimens bien préservés d'*Huroniospora* possèdent des valeurs groupées autour de -36% (une valeur plus proche d'un fractionnement par des bactéries méthanogènes que des bactéries photosynthétiques), et deux microfossiles du même genre montrent de surcroît un très fort fractionnement isotopique (-42% et – 45%).

Pour House et al., les valeurs moyennes sont compatibles avec une fixation du carbone via le cycle de Calvin ou la voie acetyl-CoA, tout en excluant d'autres cycles comme le cycle du 3-hydroxypropionate ou le cycle de l'acide tricarboxylique (House et al., 2000). Les mesures effectuées semblent donc confirmer l'affinité des deux principaux microfossiles de Gunflint avec le groupe des cyanobactéries, validant ainsi les assignations effectuées sur des critères purement morphologiques. Cependant, les deux valeurs extrêmes trouvées pour deux cellules d'*Huroniospora*, et qui ne semblent pas être dues à une altération diagénétique, remettent en question le caractère général, global, de cette conclusion.

En mesurant le rapport axial d'une population de cellules d'*Huroniospora*, Strother et Tobin (1987) estiment que cette dernière est probablement constituée de deux espèces différentes. Est-il possible que les valeurs de fractionnement du carbone supérieures à 40 % soient caractéristiques de l'un de ces deux espèces ? Ces valeurs reflètent-elles simplement l'assimilation de carbone déjà fractionné, et provenant par exemple de la dégradation microbienne de matériaux organiques ?

Eoastrion

La nature de ce microorganisme demeure inconnue, mais plusieurs auteurs ont noté sa ressemblance avec une bactérie terrestre capable d'oxyder le fer et le manganèse, *Metallogenium* (Klaveness, 1999).

Une autre hypothèse est de considérer qu'*Eoastrion* est apparenté à *Kakabekia umbellata*. La forme en étoile d'*Eoastrion* rappelle effectivement superficiellement celle en forme d'ombrelle de *Kakabekia umbellata*. Cependant, d'après Barghoorn et Tyler (1965), ce microfossile semble surtout restreint à la région de Kakabeka Falls, alors qu'*Eoastrion* est bien représenté tout au long de l'affleurement de Gunflint (des spécimens de *Kakabekia umbellata* ont cependant été identifiés dans les cherts d'autres secteurs, comme le confirme d'ailleurs les observations

effectuées dans le cadre de cette étude). De plus, aucune membrane ou film organique ne relie les filaments d'*Eoastrion*, alors qu'une telle structure existe entre les «baleines» de *Kakabekia umbellata*. Il semble donc peu probable qu'un lien autre qu'une analogie morphologique existe entre les deux microfossiles.

Eosphaera

L'incertitude qui règne quant à l'appartenance taxinomique des microorganismes pétrifiés dans les cherts de la formation Gunflint est particulièrement évidente dans le cas d'*Eosphaera*. Les micropaléontologues ne peuvent que spéculer sur sa structure et son mode de vie.

Kazmierczak (1976) et Tappan (1976) ont tous les deux proposé qu'*Eosphaera* soit une espèce eucaryote. Pour Kazmierczak, *Eosphaera* ressemble à une algue du Dévonien (*Eovolvox*), qui présente de nombreux points communs avec les Volvocales actuelles. Pour Cloud (1976) et Awramik et Barghoorn (1977), la ressemblance est cependant superficielle : les différences de taille entre *Eosphaera* et *Eovolvox* sont importantes, et aucune cénobe fille n'a été décrit chez *Eosphaera*.

Tappan (1976) compare quant à lui *Eosphaera* à des algues rouges de l'ordre des Porphyridiales. Bien que généralement de petites tailles par rapport à *Eosphaera*, ces algues peuvent atteindre une taille similaire à celle de son analogue fossile. L'environnement dans lequel *Eosphaera* a vécu semble également compatible avec le milieu marin de prédilection des Porphyridiales. Enfin, les cellules du genre *Porphyridium* présentent une structure complexe très proche de celle d'*Eosphaera*, avec des cellules reproductrices situées en périphérie et confinées près de la cellule mère par une fine enveloppe protectrice. Cependant, d'autres types de morphologie, rencontrées chez les Porphyridiales, n'ont jamais été observées dans les roches de la formation Gunflint. En conséquence, la position taxinomique d'*Eosphaera*, comme celles d'autres représentants de l'assemblage de Gunflint, demeure incertaine.

Pour Awramik et Barghoorn (1977), les microfossiles de Gunflint sont tous procaryotiques. Cependant, Knoll et al. (1978) notent qu'aucun microfossile de la formation Gunflint ne peut-être assigné avec certitude à une espèce procaryote ou eucaryote. Ces différents exemples montrent que l'étude des microfossiles de la formation Gunflint par des techniques avancées comme la microscopie à force chimique est une nécessité.

Le couplage AFM/Raman

La microspectrométrie Raman est l'exemple type des techniques de caractérisation chimique qui permettent de compléter efficacement des mesures AFM, de part ses nombreux avantages (technique non-destructive, mesure *in-situ*, résolution micrométrique). A ce titre, le couplage AFM/Raman présente d'intéressantes perspectives pour la micropaléontologie précambrienne. Plusieurs constructeurs (comme Nanonics ou WITec) proposent effectivement des microscopes à force atomique couplés à un micro spectromètre Raman.

Plusieurs techniques sont utilisées pour réaliser ce couplage. La première (WITec) consiste en un microscope similaire à un microscope optique, chaque objectif offrant une fonction différente (Raman confocal, SNOM, AFM). La tourelle devant subir une rotation pour permettre de changer de fonction, la précision du repositionnement peut être sujet à question, ce qui diminue l'intérêt d'un tel dispositif.

Une technique plus intéressante (Nanonics) consiste à recueillir le spectre Raman avec un microspectromètre standard, simultanément au balayage de l'échantillon par la pointe de l'AFM. La résolution Raman est limitée par la résolution du microscope optique, mais est parfaitement corrélée avec la position de la pointe AFM. L'inconvénient majeur de ce système est bien entendu la résolution du Raman, qui reste micrométrique (car limitée par la diffraction du laser d'excitation), alors que la résolution des images AFM peut facilement atteindre quelques nanomètres par pixel. La nature chimique de structures possédant des dimensions nanométriques, comme les particules pariétales submicrométriques apparaissant après attaque acide douce au niveau de la paroi des microfossiles de la formation Draken, ou les globules situés au niveau des parois organiques des microfossiles de la formation Gunflint, ne pourraient donc pas être déterminées.

Pour augmenter la résolution spatiale du Raman, plusieurs techniques sont cependant possibles. L'acquisition peut ainsi être réalisée par une sonde SNOM. Le signal récupéré étant généralement faible, des temps d'acquisition très longs deviennent malheureusement nécessaires.

Une seconde technique consiste à imager l'échantillon sur un prisme de verre. Le faisceau laser pénètre dans le prisme par un des côtés à angle droit, subit une réflexion interne au sommet du prisme, et ressort par l'autre côté. La réflexion au sommet du prisme donne naissance à une onde évanescente. Si un échantillon est placé dans cette région, l'onde évanescente l'illumine, mais aucun signal Raman ne peut être obtenu. Un signal Raman peut cependant être acquis si une pointe AFM, terminée par une nanoparticule d'argent ou d'or, est amenée au contact de la surface, grâce à la diffusion de la lumière évanescente par la nanoparticule. Cette technique devrait permettre en théorie de récupérer un signal Raman d'une région correspondant en gros au diamètre de la nanoparticule métallique.

Une autre technique consiste à recueillir un spectre Raman avec un microspectromètre standard, la pointe de l'AFM étant alors rétractée. Dans un deuxième temps, une pointe AFM terminée par une nanoparticule est amenée au contact de la surface, et un second spectre Raman est obtenu. Comme la nanoparticule située à l'extrémité de la pointe bloque une partie de la lumière, la région située juste en dessous ne contribue théoriquement pas au signal Raman. En soustrayant le second spectre du premier, il serait théoriquement possible d'obtenir le spectre Raman de la région située sous la pointe.

Il ne fait aucun doute que les développements instrumentaux, tels que ceux envisagés ci-dessus, permettront d'améliorer considérablement les capacités des microscopes à force atomique, qui deviendront des instruments ubiquistes, capables d'effectuer un grand nombre de mesures sur de très petits objets. Dans le domaine de la micropaléontologie précambrienne, le couplage AFM/Raman est certainement l'un des concepts les plus prometteurs.

Applications spatiales de la microscopie à force atomique

En raison de l'intérêt récent porté au microscope à force atomique dans le domaine de la micropaléontologie précambrienne (Kempe et al., 2002; Kempe et al., 2005), il semble pertinent d'évaluer son utilisation potentielle pour la recherche de traces de vie fossiles dans des roches extraterrestres.

Si la microscopie à force atomique est une technique relativement jeune, elle commence malgré tout à être utilisée dans le domaine spatial. Deux microscopes à force atomique font effectivement partie de la charge utile de deux missions d'exploration, l'une à destination d'une comète, l'autre de la planète Mars.

Le premier microscope à force atomique équipe la sonde Rosetta, lancée par l'Agence Spatiale Européenne (ESA) le 2 mars 2004 à bord d'un lanceur Ariane 5, et qui devrait intercepter la comète 67P/Churyumov-Gerasimenko (Romstedt et al., 2000) en août 2014. Après une période pendant laquelle une cartographie de l'astre par l'orbiteur sera réalisée, suivra une phase d'observation rapprochée avec notamment l'envoi d'un atterrisseur à la surface de la comète. Baptisé MIDAS (Micro-Imaging Dust Analysis System), ce microscope à force atomique a pour objectif de caractériser la taille, la forme et la distribution des grains de poussière cométaires. Des particules de poussières interplanétaires ont été utilisées sur Terre pour tester cet instrument.

Le second microscope à force atomique, FaMars, devrait être lancé en 2007 avec la mission américaine Phoenix. Phoenix sera la première mission «Scout», une nouvelle classe de sondes martiennes peu coûteuses et complémentaires des missions majeures qui composent le programme d'exploration de Mars. Phoenix devra réaliser une étude *in-situ* des composés volatils martiens (en particulier l'eau) et des molécules organiques au niveau des hautes latitudes de l'hémisphère nord, là ou la sonde Mars Odyssey a découvert en 2002 de vastes concentrations de glace dans le sous-sol (Feldman et al., 2002; Mitrofanov et al., 2002; Boynton et al., 2002).

Comme avec MIDAS, l'objectif de FaMars sera de caractériser les particules microscopiques de poussière en suspension dans l'atmosphère, ou présente à la surface du sol martien. FaMars fait partie d'une expérimentation de microscopie liée au package scientifique MECA (Gautsch, 2002). Ces performances ont été déterminées sur Terre en utilisant des cristaux de quartz micrométriques.

Les contraintes qui pèsent sur un microscope à force atomique spatialisable sont nombreuses. L'appareil doit occuper un volume réduit, être léger et posséder une sensibilité suffisante (ce qui nécessite une plateforme stable, une situation délicate à atteindre avec un atterrisseur ou un rover). Il doit consommer peu de puissance électrique et fonctionner à bas voltage (des voltages supérieurs à 50 V pourraient

effectivement ioniser le dioxyde de carbone qui compose l'essentiel de l'atmosphère martienne et créer des décharges électriques au niveau des circuits électroniques, voir Gautsch, 2002). Il doit également être résistant aux vibrations et aux chocs (tout particulièrement en ce qui concerne les leviers, qui sont des structures très fragiles), et enfin il doit être capable de supporter les températures et pressions régnants à la surface de Mars (les basses températures augmentant le temps de balayage, voir Gautsch, 2002). Bien entendu, au vu des risques de bris ou de contamination des pointes, un système doit permettre l'échange des pointes.

Tous ces critères ont été plus ou moins remplis dans le cas des microscopes à force atomique MIDAS et FaMars, et aucun obstacle technique ne semble empêcher la spatialisation d'AFM. Cependant, comme nous l'avons vu, MIDAS et FaMars sont des microscopes tournés vers la caractérisation de la taille, de la forme, du volume, de la texture et de la distribution de particules de poussière, quelles soient cométaires ou martiennes. L'échantillonnage fait intervenir une surface collante (par exemple recouverte de silicone), qui agit comme un piège sur la surface collectrice, et limite (voire empêche) le déplacement des particules de poussière durant les mesures (surtout en mode contact). La surface collectrice peut alors être examinée directement, ou après un examen préliminaire au microscope optique, très utile pour sélectionner des zones compatibles avec des mesures AFM. L'idéal est effectivement de trouver des régions qui contiennent quelques particules, sans que ces dernières soient trop nombreuses (ce qui augmenterait la rugosité et rendrait les mesures plus délicates).

En comparaison, l'analyse de microfossiles préservés dans une roche extraterrestre (par exemple martienne) avec un microscope à force atomique apparaît bien plus compliquée. Comme expliqué plus haut, le microscope à force atomique ne peut être utilisé comme technique de détection, et pour des applications micropaléontologiques, il doit impérativement s'appuyer sur d'autres instruments comme le microscope optique ou le microscope électronique à balayage. De plus, étant donné que le microscope à force atomique ne peut fonctionner que sur des surfaces très plates, il faudra donc impérativement inclure un dispositif de polissage.

Ainsi, pour qu'une roche martienne puisse être analysée par microscopie à force atomique, cette dernière devra avoir été collectée (par un bras robotique ou une foreuse), découpée (si ses dimensions sont trop importantes), amincie (de manière à produire une lame mince qui puisse être observée en lumière transmise, et pas uniquement en lumière réfléchie) et enfin polie. Celle-ci devra ensuite être examinée par microscopie optique, la totalité de la surface (quelques cm^2) devant être couverte à différents grossissements.

Si une structure intéressante est découverte, la pointe de l'AFM devra être placée exactement (à quelques microns près) à sa verticale, ce qui amène au problème de la relocalisation. Etant donné que le temps consacré aux

investigations sera limité, il semble irréaliste de devoir passer des heures à balayer la surface de l'échantillon pour retrouver une structure donnée. Le microscope à force atomique devra donc être couplé de manière étroite avec un autre microscope, comme le microscope optique par exemple, l'objectif étant qu'un objet situé au centre du champ de vision du microscope optique puisse être immédiatement visualisé au microscope à force atomique. Comparée à l'étude de particules de poussière, la seule application spatiale actuelle de la microscopie à force atomique, l'analyse *in-situ* de structures potentiellement biogéniques avec un AFM comporte de nombreuses contraintes techniques, et semble donc difficilement réalisable.

De plus, la détérioration significative de la qualité des images due à la convolution de la pointe (par émoussement ou contamination), et la prédominance des formes rondes dans les images AFM, risquent de compliquer encore plus les mesures. C'est particulièrement vrai dans le champ de l'exobiologie : comme exposé en introduction, des structures minérales totalement abiogéniques peuvent sévèrement compliquer la recherche de traces de vie fossiles, sans qu'il soit nécessaire de devoir en plus prendre en compte des artefacts résultants de l'instrumentation.

Une vérification, par un instrument indépendant, de la nature réelle des structures observées, sera nécessaire. Or, sur Terre, l'instrument idéal pour ce type de vérification n'est autre que le microscope électronique à balayage, une technique qui n'a jamais été spatialisée. La forme de la pointe peut bien sur être reconstruite en utilisant différentes techniques (érosion, blind reconstruction). Cependant, dans un domaine aussi sensible que l'exo-micropaléontologie, ce type de méthode n'offrira pas les garanties nécessaires pour que les images produites puissent être tenues pour réelles.

Si l'on ajoute à ces observations le fait que l'étude de microfossiles à l'aide d'un microscope à force atomique demande une interaction directe et intense (démontrée durant cette thèse) entre l'instrument et l'opérateur, il semble que le potentiel exobiologique d'un microscope à force atomique embarqué sur une mission robotique planétaire soit fortement compromis.

Cependant, étant donné les potentialités futures de cette technique (capacité de nanodissection, cartographie moléculaire par microscopie à force chimique), cet instrument pourrait jouer un rôle clé dans la caractérisation de structures préservées dans des roches extraterrestres ramenées par des missions de retour d'échantillons.

CONCLUSION

Dans son ensemble, cette thèse a permis de confirmer l'importance, actuelle et future, de la microscopie à force atomique pour l'étude de microfossiles précambriens préservés dans des cherts, exposés à la surface de lames minces pétrographiques polies, et corrodés par de l'acide fluorydrique.

En étant capable d'imager des microfossiles préservés dans les cherts des formations Draken (800 millions d'années) et Gunflint (1,9 milliards d'années), ces travaux ont montré que le microscope à force atomique était tout à fait apte à imager des microfossiles de quelques microns d'envergure, les seuls travaux réalisés jusqu'à présent dans ce domaine concernant des acritarches de grandes tailles (50 microns de diamètre, cf Kempe et al., 2003; Kempe et al., 2005).

La difficulté à retrouver, à la surface d'une lame mince de roche corrodée par l'acide fluorhydrique, la section d'un microfossile de dimension micrométrique ne doit cependant pas être sous-estimée. Seule la mise au point d'une procédure de relocalisation précise a permis de franchir cet obstacle. La procédure mise en place dans le cadre de cette thèse a permis de localiser rapidement et de manière non ambiguë n'importe quel microfossile, et ce avec la gamme complète des microscopes employés durant cette étude (optique, électronique, à force atomique).

L'un des points clés de cette procédure concerne l'observation des échantillons géologiques avant attaque acide, les procédures décrites dans la littérature faisant l'impasse sur cette étape. L'étude des surfaces avant corrosion a montré que la paroi de chaque microfossile, que ce soit ceux de la formation Draken ou Gunflint, est marquée par une série de cicatrices d'arrachements, liées à la désagrégation de la matière organique durant le polissage de la surface de la lame mince. Ces cicatrices, de quelques dizaines ou centaines de nanomètres d'épaisseur, peuvent servir de guide topographique pour localiser le microfossile, surtout si le processus d'attaque acide est ajusté de manière à conserver les plus importantes.

L'imagerie avant attaque acide a également permis l'emploi de modes basés sur le mode contact, non utilisable sur une surface attaquée, à cause des problèmes de contamination des pointes. L'imagerie de force latérale a ainsi montré sa capacité à distinguer un matériau mou constituant la paroi d'un microfossile (des filaments de *Gunflintia minuta* épigénisés en pyrite) par rapport à la matrice minérale environnante. L'imagerie force volume a de son côté permis de réaliser des cartes d'adhésion, confirmant les propriétés adhésives des kérogènes constituant les parois des microfossiles de la formation Gunflint.

Après attaque acide, des différences importantes sont apparues entre les microfossiles de la formation Gunflint et ceux de la formation Draken. La plupart des microfossiles de l'assemblage fossilifère de Gunflint (dominé par deux entités, les coccoides *Huroniospora* et les filaments *Gunflintia minuta*) dévoilent, après une attaque acide conventionnelle (10 à 20 minutes à 5%), une paroi solide, continue, bien individualisée par rapport à la matrice de quartz. Au voisinage des microfossiles, les cristaux de quartz sont de dimensions micrométriques, ce qui facilite l'étude de surface par microscopie à force atomique, la rugosité étant effectivement limitée.

La situation est différente pour les microfossiles de la formation Draken, la grande majorité de ceux étudiés durant cette thèse étant des cellules de *Myxococcoides*. Après une attaque acide similaire à celle utilisée pour les lames minces de la formation Gunflint, aucune structure particulière n'apparaît dans la région correspondant à la paroi. L'attaque acide modifie de manière intense la surface de la roche, ce qui complique énormément les investigations. Un protocole d'attaque beaucoup moins agressif (30 à 40 minutes à 1 %) a cependant fournit de bons résultats. Après une attaque douce, les microfossiles de la formation Draken dévoilent la présence de petites particules d'une taille de 100 à 200 nm au niveau des régions correspondantes aux parois cellulaires. L'intensité de la corrosion pouvant être très inégale à l'échelle du micron, il est parfois délicat de reconnaître, sur la surface corrodée, l'empreinte de la paroi. Cette dernière apparaît cependant de manière particulièrement nette sur les images de phase, qui se sont révélées très utiles pour localiser les microfossiles de la formation Draken après attaque acide. Sans pouvoir déterminer la nature des particules submicrométriques constituant les parois cellulaires, l'imagerie de phase montre malgré tout qu'il s'agit d'un matériau possédant des propriétés mécaniques différentes de la matrice de quartz environnante.

La combinaison de la microscope optique, de la microscopie à force atomique et de la microscopie électronique en transmission (après obtention de coupes ultra-fines par la technique FIB) a fourni des informations tridimensionnelles sur la structure et la composition de microfossiles individuels, à l'échelle micrométrique et nanométrique. Ces investigations ont en particulier montré que des cellules qui apparaissent bien préservées au vu des standards de la microscopie optique, comme les *Myxococcoides* de la formation Draken, ne possèdent pas en réalité une paroi solide, dense et interrompue. La matière organique se présente effectivement sous la forme de films ultraminces de carbone amorphe, recouvrant des cristaux submicrométriques de quartz, qui composent la majorité du microfossile. Sur les deux microfossiles de la formation Draken étudiés par la technique du FIB, ces films présentent une orientation radiale, vraisemblablement due au remplissage de la cellule par de la calcite fibreuse, avant la silicification. La désorganisation importante de la paroi organique des *Myxococcoides* de la formation Draken est probablement liée à une fossilisation en deux temps.

Au vu des travaux réalisés, il s'avère que la distribution de la matière organique, ainsi que sa faible quantité par rapport au quartz, ne peut pas être détectée par microscopie optique ou par microspectrométrie Raman. Etant très sensible à des traces de kérogènes, ces techniques photoniques peuvent conduire à une surestimation du niveau réel de préservation de la matière organique d'un microfossile pétrifié dans un chert. Un microfossile présentant une excellente préservation selon des standards optiques peut donc être en réalité majoritairement composé de quartz. La faible quantité de matière organique peut rendre des analyses *in-situ* et sur roches totales problématiques, ce qui rend la détermination de la préservation des matériaux carbonés à l'échelle submicrométrique obligatoire, avant toutes analyses complémentaires.

Au vu des analyses effectuées durant cette thèse, il ressort clairement que la microscopie à force atomique possède des avantages marquants par rapport à d'autres techniques de microscopie. Ainsi, le traitement des échantillons est minimal, et les analyses peuvent être effectuées sur une simple lame mince pétrographique polie, l'attaque acide n'étant pas obligatoire. La résolution spatiale est bien supérieure à celle d'un microscope optique, et atteint facilement celle d'un microscope électronique à balayage, sans qu'il soit besoin de métalliser la surface et de travailler sous vide. De plus, contrairement à ces deux microscopes, le microscope à force atomique est capable de produire de véritables images 3D d'un objet donné, et de mesurer certains paramètres physiques, le tout sans destruction de l'échantillon.

Cependant, plusieurs inconvénients sont également liés à la technique. Ainsi, l'un des problèmes les plus importants rencontrés durant l'imagerie de surfaces corrodées à l'acide est le phénomène de contamination des pointes. De manière à minimiser celui-ci, l'idéal est d'utiliser des pointes fibres à haut ratio d'aspect, possédant un faible rayon de courbure, et fabriquées dans un matériau autre que le silicium, tel que des fibres de carbone haute densité ou des nanotubes de carbone. L'existence d'artefacts liés au phénomène de contamination des pointes a aussi fait ressortir l'importance de la microscopie électronique à balayage comme technique de vérification des images AFM obtenues.

L'utilisation pratiquement obligatoire de la microscopie électronique à balayage, ainsi que la nécessité d'identifier les microfossiles au microscope optique avant de pouvoir se livrer à des investigations par microscopie à force atomique, font que cet instrument doit être regardé comme une technique complémentaire dans le domaine de la micropaléontologie précambrienne. De plus, le microscope à force atomique est aveugle d'un point de vue chimique, et des analyses complémentaires doivent donc être réalisées sur les microfossiles pour connaître leur chimie.

Plusieurs techniques furent utilisées dans le cadre de cette thèse. La présence de carbone dans les parois cellulaires, indiquée par la coloration brune ou noire des parois cellulaires au microscope optique, fut confirmée

par microanalyse EDX, ainsi que par micro spectrométrie Raman. La nature amorphe du matériau constituant les parois des microfossiles de la formation Gunflint et Draken, suspectée par les images AFM haute résolution, fut confirmée par l'observation au microscope électronique en transmission de coupes ultraminces réalisées au travers des parois organiques par la technique FIB. Enfin, des travaux de microscopie X effectués à European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) ont permis de mettre en évidence des traces de soufre organique hétérocyclique dans les parois de quelques spécimens de *Myxococcoides* de la formation Draken, cet élément étant par contre absent au niveau des parois des microfossiles de la formation Gunflint.

Si ces différentes techniques complémentent efficacement la microscopie à force atomique et montrent clairement les avantages d'études *in-situ* intégrées, il faut noter qu'elles possèdent des résolutions spatiales inférieures à celle de la microscopie à force atomique, d'où des problèmes de corrélation entre les différents jeux de données. Dans ce domaine, l'avenir est sans doute la microscopie à force chimique.

En accrochant à l'extrémité des pointes des sondes moléculaires, il est effectivement possible de doter le microscope à force atomique de capacité de reconnaissance moléculaire. L'une des familles de sondes moléculaires les plus prometteuses est sans conteste les anticorps. Ces derniers sont effectivement caractérisés par une très grande sensibilité et spécificité. De son côté, le microscope à force atomique offre la capacité de déplacer un anticorps au-dessus de n'importe quel point d'une surface donnée, et de mesurer la force des interactions de ce dernier avec l'échantillon, dans un environnement naturel et avec une résolution spatiale nanométrique. Aucune autre technique utilisée couramment en immunologie n'offre ces avantages.

Dans le domaine de la micropaléontologie, l'avenir du microscope à force atomique se jouera certainement sur ses capacités de reconnaissance chimique. En permettant de cartographier la présence de molécules biomarqueurs (hopanes, stéranes, isoprénoides) dans la paroi organique de microfossiles précambriens, cet instrument pourrait fournir des preuves non absolues, mais néanmoins très convaincantes, de leur origine biologique. Les capacités de nanoindentation du microscope à force atomique laisse penser qu'il pourrait aussi être utilisé pour disséquer à l'échelle nanométrique la paroi organique de microfossiles précambriens.

L'apport de la microscopie à force atomique dans le domaine de la micropaléontologie précambrienne bénéficiera également des avancées réalisées avec la technique elle-même. Parmi les avancées notables qui viendront enrichir le champ de la microscopie à force atomique dans les prochaines années, on peut citer une réduction drastique de la durée de balayage, permettant d'imager la surface pratiquement en temps réel, l'acquisition d'une haute densité d'information, permettant de zoomer sur une région intéressante sans balayage supplémentaire, la disponibilité de pointes à la géométrie parfaitement connue (nanotubes de carbone) et

offrant une excellente résolution latérale, ou encore le couplage avec d'autres instruments (AFM/Raman).

Le microscope à force atomique pourrait également jouer un rôle dans la recherche de traces de vie fossile dans le système solaire. Cependant, bien que des microscopes à force atomique aient déjà été spatialisés, il semble peu probable que cet instrument puisse être utilisé pour réaliser des investigations exobiologiques *in-situ*. Le couplage indispensable avec un autre microscope (par exemple optique), la nécessité de travailler sur des surfaces polies, les nombreux artefacts de mesure, ainsi que les interactions presque constantes entre l'opérateur et l'instrument durant les analyses, font que la recherche de microfossiles par des sondes robotiques utilisant un microscope à force atomique n'est pas une option. Cependant, l'utilisation future de modes tels que la cartographie par force chimique pourrait fournir des informations essentielles permettant de distinguer des microfossiles réels d'artefacts mimétiques organiques ou minéraux, avec une résolution au moins submicrométrique. Le microscope à force atomique pourrait alors devenir un instrument important pour l'étude de roches potentiellement fossilifères, ramenées sur Terre par des missions de retour d'échantillons.

ANNEXES

N°	Code	Formation	Hauteur (contact)	Imagerie LFM	Force volume	Etching	Hauteur (tapping)	Phase	Imagerie liquide	Raman	XRF XANES	FIB/TEM
1	#adi-af	Draken	X									
2	#adi-bb	Draken	X		X		X	X			X	
3	#alpha	Draken	X			60 min 5%	X	X				
4	#alpha-bis	Draken	X								X	
5	#big	Draken	X		X	40 min 1%	X	X				
6	#char	Draken	X		X	40 min 1%	X	X				
7	#char2	Draken	X		X	40 min 1%	X	X				
8	#div	Draken	X		X							
9	#dual	Draken	X		X	40 min 1%	X	X				
10	#glo	Draken	X		X	40 min 1%	X	X				
11	#grp	Draken	X		X	40 min 1%	X	X				
12	#har	Draken	X		X	40 min 1%	X	X				
13	#oig	Draken	X		X	40 min 1%	X	X				
14	#ppo	Draken	X		X	40 min 1%	X	X				
15	#poi	Draken	X		X	40 min 1%	X	X				
16	#r1	Draken	X		X	40 min 1%	X	X		X		X
17	#tr3	Draken	X		X	40 min 1%	X	X				X
18	#tu	Draken	X		X							
19	#col_A	Draken	X		X	40 min 1%	X					
20	#col_Bmg	Draken	X		X	40 min 1%	X	X			X	
21	#col_C	Draken	X		X	40 min 1%	X	X				
22	#col_D	Draken	X		X	40 min 1%	X	X				
23	#col_E	Draken	X		X	40 min 1%	X				X	
24	#col_F	Draken	X		X	30 min 1%	X					
25	#col_G	Draken	X		X	30 min 1%	X	X				
26	#col_Gb	Draken	X		X	30 min 1%	X					
27	#col_H	Draken	X		X	20 min 1%	X					
28	#hum-aa	Draken	X		X	30 min 1%	X					
29	#hum-bc	Draken	X			30 min 1%	X					
30	#hum-cr	Draken				30 min 1%	X					
31	#hum-pom	Draken				30 min 1%	X					
32	#hum-pyr	Draken	X			30 min 1%	X	X				
33	#hum-rob	Draken	X			30 min 1%	X					
34	#hum-tw	Draken				30 min 1%	X	X				
35	#ori-3	Draken	X		X			X				
36	#ori-4	Draken	X		X	48 % 30’	X					

Tableau 5 : Liste des microfossiles de la formation Draken sélectionnés pour une étude par microscopie à force atomique. Les autres techniques utilisées sont également indiquées.

N°	Code	Formation	Hauteur (contact)	Imagerie LFM	Force volume	Etching	Hauteur (tapping)	Phase	Imagerie liquide	Raman	XRF XANES	FIB/TEM
1	#01-4	Gunflint	X	X	X	20 min 5%	X	X	X			X
2	#01-5	Gunflint	X		X	10 min 5%	X	X				
3	#01-6	Gunflint	X		X							
4	#01-9	Gunflint	X			5 min 5 %	X					
5	#01-10	Gunflint	X		X	20 min 5 %	X					
6	#01-11	Gunflint	X		X	20 min 5 %	X	X				
7	#eag-br	Gunflint	X									
8	#eag-ch	Gunflint	X		X	10 min 5 %	X					
9	#eag-dav	Gunflint	X		X	10 min 5 %	X	X				
10	#eag-gas	Gunflint	X		X	10 min 5 %	X					
11	#eag-he	Gunflint	X	X	X	10 min 5 %	X	X				
12	#jer	Gunflint	X		X	10 min 5 %	X					
13	#monika	Gunflint	X		X	10 min 5 %	X					
14	#egg	Gunflint	X		X	10 min 5 %	X					
15	#sing	Gunflint	X		X	10 min 5 %	X					
16	#tube	Gunflint	X		X	10 min 5 %	X	X				
17	#worm	Gunflint	X		X	10 min 5 %	X					
18	#en-akba	Gunflint	X			20 min 5 %	X	X				
19	#en-aver	Gunflint	X			20 min 5 %	X	X				
20	#en-bat	Gunflint	X	X	X	20 min 5 %	X	X				
21	#en-fes2	Gunflint	X			20 min 5 %	X	X				
22	#en-fr	Gunflint	X	X	X	20 min 5 %	X	X				
23	#en-nb	Gunflint	X	X	X	20 min 5 %	X	X				
24	#en-wu	Gunflint	X			20 min 5 %	X	X				
25	#arg-ano	Gunflint	X	X	X		X	X	X			
26	#dl	Gunflint	X	X	X		X	X		X		
27	#arg-hallu	Gunflint	X	X	X		X	X	X			
28	#pika	Gunflint	X	X	X		X	X	X			
29	#pycross	Gunflint	X	X	X		X	X	X		X	
30	#wiwa	Gunflint	X	X	X		X	X	X			

Tableau 6 : Liste des microfossiles de la formation Gunflint sélectionnés pour une étude par microscopie à force atomique. Les autres techniques utilisées sont également indiquées.

BIBLIOGRAPHIE

Arouri K., Greenwood P.F., Walter M.R., (1999) A possible chlorophycean affinity of some Neoproterozoic acritarchs. *Organic Geochemistry* **30**, 1323 -1337.

Arouri K., Greenwood P.F., Walter M.R., (2000) Biological affinities of Neoproterozoic acritarchs from Australia: microscopic and chemical characterization. *Organic Geochemistry* **31**, 75-89.

Atkinson Jr A.W., Gunning B.E.S., John P.C.L., (1972) Sporopollenin in the cell wall of Chlorella and other algae: Ultrastructure, chemistry, and incorporation of 14C-acetate, studied in synchronous cultures. *Planta* **107**, 1-32.

Avci R., Schweitzer M., Boyd R.D., Wittmeyer J., Steele A., Toporski J., Beech I., Arce F.T., Spangler B., Cole B., McKay D.S.D.S., (2004) Comparison of Antibody-Antigen Interactions on Collagen Measured by Conventional Immunological Techniques and Atomic Force Microscopy. *Langmuir* **20**, 11053-11063.

Awramik S.M., Barghoorn E.S., (1977) The Gunflint microbiota. *Precambrian Research* **5**, 121-142.

Awramik S.M., Semikhatov M.A., (1979) The relationship between morphology, microstructure, and microbiota in three vertically intergrading stromatolites from the Gunflint Iron Formation. *Canadian Journal of Earth Sciences* **16**, 484-495.

Awramik S.M., Schopf J.W., Walter M.R., (1983) Filamentous fossil bacteria from the Archaean of Western Australia. Precambrian Research. *Precambrian Research* **20**, 357-374.

Awramik S.M., Schopf J.W., Walter M.R., (1988) Carbonaceous filaments from North Pole, Western Australia: Are they fossil bacteria in Archean Stromatolites? A discussion. *Precambrian Research* **39**, 303-309.

Bada J.L., Glavin D.P., McDonald G.D., Becker L., (1998) A search for endogenous amino acids in Martian meteorite ALH84001. *Science* **279**, 362-365.

Barghoorn E.S., Tyler S.A., (1965) Microorganisms from the Gunflint Chert. *Science* **147**, 563-577.

Beny-Bassez C., Rouzaud J.N., (1985) Characterization of carbonaceous materials by correlated electron and optical microscopy and Raman microspectroscopy. *Scanning Electron Microscopy* **1**, 119-132.

Beyssac O., Goffé B., Petitet J.P., Froigneux E., Moreau M., Rouzaud J.N., (2003) On the characterization of disordered and heterogeneous carbonaceous materials using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta A* **59**, 2267-2276.

Binning G., Quate C.F., Gerber Ch., (1986) Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters* **56**, 930.

Borg L.E., Connelly J.N., Nyquist L.E., Shih C.Y., Wiesmann H.V., Reese Y., (1999) The age of the carbonates in the Martian meteorite ALH84001. *Science* **286**, 90-94.

Bowring S.A., Williams I.S., (1999) Priscoan (4.00–4.03 Ga) orthogneisses from northwestern Canada. *Contributions to Mineralogy and Petrology* **134**, 3-16.

Boyce C.K., Hazen R.M., Knoll A.H., (2001) Nondestructive, in situ, cellular-scale mapping of elemental abundances including organic carbon in permineralized fossils. *PNAS* **98**, 5970–5974.

Boyce C. K., Cody G. D., Feser M., Jacobsen C., Knoll A.H., Wirick S., (2002) Organic chemical differentiation within fossil plant cell walls detected with X-ray spectromicroscopy. *Geology* **30**, 1039-1042.

Boyce C. K., Cody G. D., Fogel M.L., Hazen R. M., Alexander C. M. O'D, Knoll A.H., (2003) Chemical Evidence for cell wall lignification and the evolution of tracheids in Early Devonian Plants. *International Journal of Plant Science* **164**, 691-702.

Boynton W.V., Feldman W.C., Squyres S.W., Prettyman T.H., Brückner J., Evans L.G., Reedy R.C., Starr R., Arnold J.R., Drake J.R., Englert P.A.J.P.A.J., Metzger A.E.A.E., Mitrofanov I., Trombka, C. d'Uston, H. Wänke, O. Gasnault, D.K. Hamara, D.M. Janes, R.L. Marcialis, S. Maurice, I. Mikheeva, G.J. Taylor, R. Tokar, and C. Shinohara J.I.(2002) Distribution of Hydrogen in the Near Surface of Mars: Evidence for Subsurface Ice Deposits. *Science* **297**, 81-85.

Brack A., Raulin F., (1991) L'évolution chimique et les origines de la vie. *Masson* 181p.

Brack A., Leclercq B., (2003) La vie est-elle universelle ? : Des premiers êtres vivants à l'exploration spatiale. *EDP Sciences* 206p.

Brack A., (2004) Et la matière devint vivante. *Le Pommier* 63p.

Bradley J.P., Harvey R.P., McSween H.Y., (1997) No 'nanofossils' in Martian meteorite. *Nature* **390**, 454.

Bradley J.P., McSween H.Y., Harvey R.P., (1998) Epitaxial growth of nanophase magnetite in Martian meteorite Allan Hills 84001: Implications for biogenic mineralization. *Meteoritics and Planetary Science* **33**, 765-773.

Brasier M.D., Green O.R., Jephcoat A.P., Kleppe A.K., Van Kranendonk M.J., Lindsay J.F., Steele A., Grassineau N.V., (2002) Questioning the evidence for Earth's oldest fossils. *Nature* **416**, 76-81.

Brasier M.D., Green O.R., Lindsay J.F., Steele A., (2004a) Earth's oldest (approximately 3.5 Ga) fossils and the 'Early Eden hypothesis': questioning the evidence. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **34**, 257-269.

Brasier M.D., Green O.R., McLoughlin N., (2004b) Characterization and critical testing of potential microfossils from the early Earth: the Apex 'microfossil debate' and its lessons for Mars sample return. *International Journal of Astrobiology* **3**, 139-150.

Brassell S.C., Lewis C.A., de Leeuw J.W., de Lange F., Sinninghe Damste J., (1986) Isoprenoid thiophenes: Novel products of sediment diagenesis?. *Nature* **320**, 160-162.

Brocks J.J., Logan G.A., Buick R., Summons R.E., (1999) Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes. *Science* **285**, 1025-1026.

Brocks J.J., Summons R.E., Buick R., Logan G.A., (2003) Origin and significance of aromatic hydrocarbons in giant iron ore deposits of the late Archean Hamersley Basin in Western Australia. *Organic Geochemistry* **34**, 1161-1175.

Broderick T.M., (1920) Economic geology and stratigraphy of the Gunflint iron district, Minnesota. *Economic Geology* **15**, 422-452.

Buick R., (1984) Cabonaceous filaments from North Pole, Western Australia: Are they fossil bacteria in Archaean stromatolites?. *Precambrian Research* **24**, 157-172.

Buick R., (1988) Carbonaceous filaments from North Pole, western Australia : are they fossil bacteria in archean stromatolites? A reply. *Precambrian Research* **39**, 311-317.

Buick R., (1990) Microfossil recognition in Archean rocks: An appraisal of spheroids and filaments from a 3500 M.Y. old chert-barite unit at North Pole, Western Australia. *Palaios* **5**, 441-459.

Burnham N.A., Chen X., Hodges C.S., Matei G.A., Thoreson E.J., Roberts C.J., Davies M.C., Tendler S.J.B., (2003) Comparison of calibration methods for atomic-force microscopy cantilevers. *Nanotechnology* **14**, 1-7.

Castiglioni C., Mapelli C., Negri F., Zerbi G., (2001) Origin of the D line in the Raman spectrum of graphite: A study based on Raman frequencies and intensities of polycyclic aromatic hydrocarbon molecules. *Journal of Chemical Physics* **114**, 963-974.

Cayeux L., (1911) Existence des restes organiques dans les roches ferrugineuses associées aux minerais de fer huroniens des Etats-Unis. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* **153**, 910-912.

Chevrie-Binant K., (1992) Analyse immunochimique de stéranes, application à la géochimie organique. *PhD Thesis*.

Cleveland J.P., Manne S., Bocek D., Hansma P.K., (1993) A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy. *Review of Scientific Instruments* **64**, 403-405.

Cloud P.E., (1965) Significance of the Gunflint (Precambrian) microflora. *Science* **148**, 27-35.

Cloud P.E., Hagen H., (1965) Electron microscopy of the Gunflint microflora: preliminary results. *PNAS* **54**, 1-8.

Cody G. D., Botto R. E., Ade H., Wirick S., (1996) The Application of Soft X-ray Microscopy to The In-Situ Analysis of Sporinite in Coal. *International Journal of Coal Geology* **32**, 69-86.

Dalton R., (2002) Squaring up over ancient life. *Nature* **417**, 782-784.

Darby D.G., (1974) Reproductive Modes of Huroniospora microreticulata from Cherts of the Precambrian Gunflint Iron-Formation. *Geological Society of America Bulletin* **85**, 1595-1596.

Dauphas N., van Zuilen M.A., Wadhwa M., Davis A.M., Marty B., Janney P.E., (2004) Clues from Fe isotope variations on the origin of early Archean BIFs from Greenland. *Science* **306**, 2077-2080.

Delsemme A., (1994) Les origines cosmiques de la vie. *Flammarion* 382p.

Durand B., Monin J.C., (1980) Elemental analysis of kerogens (C,H,O,N,S,Fe). *In : Durand, B. (Ed.), Kerogen, Insoluble Organic Matter from Sedimentary Rocks, Editions Technip, Paris*, 113-142.

Emerson D., Ghiorse W.C., (1993) Ultrastructure and chemical composition of the sheath of Leptothrix discophora SP-6. *Journal of Bacteriology* **175**, 7808-7818.

Fairchild I.J., Knoll A.H., Swett K., (1991) Coastal lithofacies and biofacies associated with syndepositional dolomitization and silicification (Draken Formation, Upper Riphean, Svalbard). *Precambrian Research* **53**, 165-197.

Fedo C.M., Whitehouse M.J., (2002) Metasomatic origin of quartz-pyroxene rock, Akilia, Greenland, and implications for Earth's earliest life. *Science* **296**, 1448-1452.

Feldman W.C., Boynton W.V., Tokar R.L., Prettyman T.H., Gasnault O., Squyres S.W., Elphic R.C., Lawrence D.J., Lawson S.L., Maurice S.L., McKinney G.W.G.W., Moore K.R.K.R., Reedy R.C., (2002) Global Distribution of Neutrons from Mars: Results from Mars Odyssey. *Science* **297**, 75-78.

Ferris F.G., Fyfe W.S., Beveridge T.J., (1988) Metallic ion binding by Bacillus Subtilis : Implications for the fossilization of microorganisms. *Geology* **16**, 149-152.

Folsome C.E., Allen R.D., Ichinose N.K., (1975) Organic Microstructures as Products of Miller-Urey Electrical Discharges. *Precambrian Research* **2**, 263-275.

Foriel J., Philippot P., Susini J., Dumas P., Somogyi A., Salome M., Khodja H., Menez B., Fouquet Y., Moreira Y., Lopez-Garcia P.P., (2004) High-resolution imaging of sulfur oxidation states, trace elements, and organic molecules distribution in individual microfossils and contempo rary microbial filaments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **68**, 1561-1569.

Fox S.W., Harada K., Kendrick J., (1959) Production of spherules from synthetic proteinoid and hot water. *Science* **129**, 1221-1223.

Fralick P., Davis D.W., Kissin S.A., (2002) The age of the Gunflint Formation, Ontario, Canada: single zircon U–Pb age determinations from reworked volcanic ash. *Canadian Journal of Earth Sciences* **39**, 1085-1091.

Francis S., Margulis L., Barghoorn E.S., (1978) On the experimental silicification of microorganisms II. On the time of appearance of eukaryotic organisms in the fossil record. *Precambrian Research* **6**, 65-100.

Friedmann E.I., Wierzchos J., Ascaso C., Winklhofer M., (2001) Chains of magnetite crystals in the meteorite ALH84001: evidence of biological origin. *PNAS* **98**, 2176-2181.

Frisbie C.D., Rozsnyai L.F., Noy A., Wrighton M.S., Lieber C.M., (1994) Functional group imaging by chemical force microscopy. *Science* **265**, 2071-2074.

Furnes H., Banerjee N.R., Muehlenbachs K., Staudigel H., de Wit M., (2004) Early life recorded in archean pillow lavas. *Science* **304**, 578-581.

Garcia-Ruiz J.M., Carnerup A., Christy A.G., Welham N.J., Hyde S.T., (2002) Morphology : an ambiguous indicator of biogenicity. *Astrobiology* **2**, 353-369.

Garcia-Ruiz J.M., Hyde S.T., Carnerup A.M., Christy A.G., Van Kranendonk M.J., Welham N.J., (2003) Self-assembled silica-carbonate structures and detection of ancient microfossils. *Science* **302**, 1194-1197.

Gargaud M., Despois D., Parisot J.P., (2001) L'environnement de la Terre primitive. *Presses universitaires de Bordeaux* 577p.

Gargaud M., Despois D., Parisot J.P., (2003) Les traces du vivant. *Presses universitaires de Bordeaux* 514p.

Gargaud M., Claeys P., Martin H., (2005) Des atomes aux planètes habitables. *Presses universitaires de Bordeaux* 606p.

Gautsch S., (2002) Development of An Atomic Force Microscope and Measurement Concepts for Characterizing Martian Dust and Soil Particles. *PhD Thesis*.

Gibson C.T., Watson G.S., Myhra S., (1996) Determination of the spring constants of probes for force microscopy/ spectroscopy. *Nanotechnology* **7**, 259-262.

Gill J.E., (1924) Gunflint iron-bearing formation, Ontario. *in Summary Report : Geological Survey of Canada, Part C,* 28-88.

Gleason J.D., Kring D.A., Hill D.H., Boynton W.V., (1997) Petrography and bulk chemistry of Martian orthopyroxenite ALH 84001: Implications for the origin of secondary carbonates. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **61**, 3503-3512.

Golden D.C., Ming D.W., Morris R.V., Brearley A.J., Lauer H.V., Treiman A.H., Zolensky M.E., Schwandt C.S., Lofgren G.E., McKay G.E., (2004) Evidence for exclusively inorganic formation of magnetite in Martian meteorite ALH84001. *American Mineralogist* **89**, 681-695.

Goodwin A.M., (1956) Facies relations in the Gunflint Iron Formation. *Economic Geology* **51**, 565-595.

Goodwin A.M., (1960) Gunflint Iron Formation of the Whitefish Lake Area: Ontario. *Department of Mines* **69**, 41-63.

Grotzinger J.P., Bowring S.A., Saylor B.Z., Kaufman A.J., (1995) Biostratigraphic and geochronologic constraints on early animal evolution. *Science* **270**, 598-604.

Harland W.B., Armstrong R.L., Cox A.V., Craig L.E., Smith A.G., Smith D.G., (1990) A geologic time scale, 1989 edition. *Cambridge University Press* 263p.

Harvey R.P., McSween H.Y., (1996) A possible high-temperature origin for the carbonates in Martian meteorite. *Nature* **382**, 49-51.

Heidmann J., (1992) Intelligences extra-terrestres. *Editions Odile Jacob* 239p.

Hofmann H.J., (1969) Stromatolites from the Proterozoic Animikie and Sibley Groups. *Geological Survey of Canada* **68-69**, 77p.

Hofmann H.J., (1971) Precambrian fossils, pseudofossils, and problematica in Canada. *Geological Survey of Canada* **189**, 146p.

Hofmann H.J., (2004) Archean microfossils and abiomorphs. *Astrobiology* **4**, 135-136.

Holm N.G., Charlou J.L., (2001) Initial Indicators of Abiotic Formation of Hydrocarbons in the Rainbow Ultramafic Hydrothermal System, Mid-Atlantic Ridge. *Earth and Planetary Science Letters* **191**, 1-8.

Horita J., Berndt M.E., (1999) Abiogenic methane formation and isotopic fractionation under hydrothermal conditions. *Science* **285**, 1055-1057.

House C.H., Schopf J.W., McKeegan K.D., Coath C.D., Harrison T.M., Stetter K.O., (2000) Carbon isotopic composition of individual Precambrian microfossils. *Geology* **28**, 707-710.

Hurley P.M., Fairbairn H.W., Pinson W.H., Howler J., (1962) Unmetamorphosed minerals in the Gunflint Formation used to test the age of the Animikie. *Journal of Geology* **70**, 489-492.

Javaux E., Knoll A.H., Walter M.R., (2004) TEM evidence for eukaryotic diversity in mid-Proterozoic oceans. *Geobiology* **2**, 121-132.

Jull A. J. T., Courtney C., Jeffrey D.A., Beck J.W., (1998) Isotopic evidence for a terrestrial source of organic compounds found in martian meteorites Allan Hills 84001 and Elephant Moraine 79001. *Science* **279**, 366-369.

Kazmierczak J., (1979) The eukaryotic nature of Eosphaera-like ferriferous structures from the Precambrian Gunflint Iron Formation, Canada: A comparative study. *Precambrian Research* **9**, 1-22.

Kempe A., Schopf J.W., Altermann W., Kudryavtsev A.B., Heckl W.M., (2002) Atomic force microscopy of Precambrian microscopic fossils. *PNAS* **99**, 9117-9120.

Kempe A., Wirth R., Altermann W., Stark R. W., Schopf J.W., Heckl W. M., (2005) Focussed ion beam preparation and in situ nanoscopic study of Precambrian acritarchs. *Precambrian Research* **140**, 36-54.

Klaveness D., (1999) Metallogenium - a microbial enigma. *In : Seckbach, J. (Ed.), Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments, Kluwer academic Publishers*, 539-548.

Knoll A.H., Barghoorn E.S., (1976) A gunflint-type microbiota from the Duck Creek dolomite, western Australia. *Origins of Life* **7**, 417-423.

Knoll A.H., Barghoorn E.S., Awramik S.M., (1978) New microorganisms from the Aphebian Gunflint iron formation, Ontario. *Journal of Paleontology* **52**, 976-992.

Knoll A.H., Golubic S., (1979) Anatomy and taphonomy of a Precambrian algal stromatolite. *Precambrian Research* **10**, 115-151.

Knoll A.H., (1982) Microfossils from the late Precambrian Draken Conglomerate, Ny Friesland, Svalbard. *Journal of Paleontology* **56**, 755-790.

Knoll A.H., Strother P.K., Rossi S., (1988) Distribution and diagenesis of microfossils from the lower Proterozoic Duck Creek Dolomite, Western Australia. *Precambrian Research* **38**, 257-279.

Knoll A.H., Swett K., Mark J., (1991) Paleobiology of a Neoproterozoic tidal flat/lagoonal complex: the Draken Conglomerate Formation, Spitsbergen. *Journal of Paleontology* **65**, 531-570.

Knoll A.H., Fairchild I.J., Swett K., (1993) Calcified microbes in Neoproterozoic carbonates: implications for our understanding of the Proterozoic/Cambrian transition. *Palaios* **8**, 512-525.

Knoll A.H., (2003) Life on a Young Planet: The First Three Billion Years of Evolution on Earth. *Princeton University Press* 304p.

Kohler G., Milstein C., (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-497.

Kohnen M.E., Sinninghe Damste J., ten Haven H.L., de Leeuw J.W., (1989) Early incorporation of polysulphides in sedimentary organic matter. *Nature* **341**, 640-641.

Kohnen M.E.L., Sinninghe Damsté J.S., Kock-van Dalen A.C., ten Haven H.L., Rullkötter J., and de Leeuw J.W., (1990) Origin and diagenetic transformations of C25 and C30 highly branched isoprenoid sulphur compounds: further evidence for the transformation of organically bound sulphur during early diagenesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **54**, 3053-3063.

Kudryavtsev A.B., Schopf J.W., Agresti D.G., Wdowiak T.J., (2001) In situ laser-Raman imagery of Precambrian microscopic fossils. *PNAS* **98**, 823–826.

Lemelle L., Simionovici A., Susini J., Oger P., Chukalina M., Rau C., Golosio B., Gillet P., (2003) X-ray imaging techniques and exobiology. *Journal de Physique* **IV 104**, 377-380.

Lemelle L., Salome M., Fialin M., Simionovici A., Gillet P., (2004) In situ identification and X-ray imaging of microorganisms distribution on the Tatahouine meteorite. *Spectrochimica Acta* **59**, 1703-1710.

Lepland A., van Zuilen M.A., Arrhenius G., Whitehouse M.J., Fedo C.M., (2005) Questioning the evidence for Earth's earliest life - Akilia revisited. *Geology* **33**, 77-79.

Licari G.R., Cloud P.E., (1968) Reproductive structures and taxonomic affinities of some nannofossils from the gunflint iron formation. *PNAS* **59**, 1053–1060.

Marshall C.P., Javaux E.J., Knoll A.H., Walter M.R., (2005) Combined micro-Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and micro-Raman spectroscopy of Proterozoic acritarchs: A new approach to Palaeobiology. *Precambrian Research* **138**, 208-224.

Maurel M.C., (1997) La naissance de la vie, de l'évolution prébiotique à l'évolution chimique. *Diderot* 135p.

McKay D.S., Gibson E.K., Thomas-Keprta K.L., Vali H., Romanek C.S., Clemett S.J., Chillier X.D.F., Maechling C.R., Zare R.N., (1996a) Search for past life on Mars: possible relic biogenic activity in Martian meteorite ALH84001. *Science* **273**, 924-930.

McKay D.S., Thomas-Keprta K.L., Romanek C.S., Gibson E.K., Vali H., (1996b) Evaluating the evidence for past life on Mars: Responce. *Science* **274**, 2123-2124.

McKay D.S., Gibson E.K., Thomas-Keprta K.L., Vali H., (1997) Reply to Bradley et al. (1997). *Nature* **390**, 455.

Mitrofanov I., Anfimov D., Kozyrev A., Litvak M., Sanin A., Tret'yakov V., Krylov A., Shvetsov V., Boynton W., Shinohara W., Hamara D.D., Saunders R.S.R.S., (2002) Maps of Subsurface Hydrogen from the High Energy Neutron Detector, Mars Odyssey. *Science* **297**, 78-81.

Miyano T., (1987) Diagenetic to low-grade metamorphic conditions of Precambrian iron-formations. *In: Appel, P.W.U. and LaBerge, G.L. (Eds.), Precambrian Iron-Formations. Theophrastus Publications, Athens,* 155-186.

Mojzsis S.J., Arrhenius G., McKeegan K.D., Harrison T.M., Nutman A.P., Friend C.R., (1996) Evidence for life on Earth before 3,800 million years ago. *Nature* **384**, 55-59.

Moreau J.W., Sharp T.G., (2004) A Transmission Electron Microscopy Study of Silica and Kerogen Biosignatures in ~1.9 Ga Gunflint Microfosssils. *Astrobiology* **4**, 196-210.

Myers J.S., Crowley J.L., (2000) Vestiges of life in the oldest Greenland rocks? A review of early Archean geology in the Godthabsfjord region, and reappraisal of field evidence for > 3850 Ma life on Akilia. *Precambrian Research* **103**, 101-124.

Nelson Y.M., Lion L.W., Ghiorse W.C., Shuler M.L., (1999) Production of biogenic Mn oxides by Leptothrix discophora SS-1 in a chemically defined growth medium and evaluation of their Pb absorption characteristics. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 175-180.

Oberlin A., Boulmier J.L., Villey M., (1980) Electron microscopic study of kerogen microtexture. Selected criteria for determining the evolution path and evolution stage of kerogen. *In : Durand, B. (Ed.), Kerogen, Insoluble Organic Matter from Sedimentary Rocks, Editions Technip, Paris*, 191-241.

Olivella M.A., Palacios J.M., Vairavamurthy A., del Río J.C., de las Heras F.X.C., (2002) A study of sulfur functionalities in fossil fuels using destructive- (ASTM and Py-GC/MS) and non-destructive- (SEM-EDX, XANES and XPS) techniques. *Fuel* **81**, 405-411.

Orberger B., Rouchon V., Westall F., de Vries S.T., Pinti D.L., Wagner C., Wirth R., Hashizume K., (2006) Microfacies and origin of some Archean cherts (Pilbara, Australia). *Geological Society of America* **405**, 133-156.

Oró J., Nooner D.W., Zlatkis A., (1965) Hydrocarbons of biological origin in sediments about two billion years old. *Science* **148**, 77-79.

Pasteris J.D., (1989) In situ analysis in geological thin-sections by laser Raman microprobe spectroscopy: A cautionary note. *Applied Spectroscopy* **43**, 567-569.

Pasteris J.D., Wopenka B., (2002) Images of the Earth's earliest fossils?. *Nature* **420**, 476-477.

Pasteris J.D., Wopenka B., (2003) Necessary, but Not Sufficient: Raman Identification of Disordered Carbon as a Signature of Ancient Life. *Astrobiology* **3**, 727-738.

Pickering I.J., Prince R.C., Divers T., George G.N., (1998) Sulfur K-edge X-ray absorption spectroscopy for determining the chemical speciation of sulfur in biological systems. *FEBS Letters* **441**, 11-14.

Prietzel J., Thieme J., Neuhäusler U., Susini J., Kögel-Knabner I., (2003) Speciation of sulphur in soils and soil particles by X-ray spectromicroscopy. *European Journal of Soil Science* **54**, 423-433.

Quirico E., Rouzaud J.N., Bonal L., Montagnac G., (2005) Maturation grade of coals as revealed by Raman spectroscopy : progress and problems. *Spectrochimica Acta Part A* **65**, 2368-2377.

Raab A., Han W., Badt D., Smith-Gill S.J., Lindsay S.M., Schindler H., Hinterdorfer P., (1999) Antibody recognition imaging by force microscopy. *Nature Biotechnology* **17**, 902-905.

Radmacher M., Fritz M., Hansma H.G., Hansma P.K., (1994) Direct Observation of Enzyme Activity with the Atomic Force Microscopy. *Science* **265**, 1577-1579.

Randazzo A.F., Markun C.D., (1980) Sedimentary structures in the Gunflint iron formation, Schreiber Beach, Ontario. *Precambrian Research* **12**, 287-310.

Raulin F., (1994) La vie dans le Cosmos. *Flammarion* 125p.

Raulin F., Raulin-Cerceau F., Schneider J., (1997) La bioastronomie. *Presses universitaires de France* 127p.

Raulin-Cerceau F., Léna P., Schneider J., (2002) Sur les traces du vivant, de la Terre aux Etoiles. *Le Pommier* 305p.

Reeves H., de Rosnay J., Coppens Y., Simonnet D., (1996) La plus belle histoire du Monde, les secrets de nos origines. *Editions du Seuil* 165p.

Riboulleau A., Derenne S., Sarret G., Largeau C., Baudin F., Connan J., (2000) Pyrolytic and spectroscopic study of a sulphur-rich kerogen from the ''Kashpir oil shales'' (Upper Jurassic, Russian platform). *Organic Geochemistry* **31**, 1641-1661.

Robert F., Selo M., Hillion F., Skrzypczak A., (2005) NanoSIMS images of precambrian fossil cells [abstract 1314]. *In : 36rd Lunar and Planetary Science Conference, LPI Contribution No. 1314, Lunar and Planetary Institute, Houston.*

Roberts S., Tricker P.M., Marshall J.E.A., (1995) Raman spectroscopy of chitinozoans as a maturation indicator. *Organic Geochemistry* **23**, 223-228.

Romano A.H., Peloquin J.P., (1963) Composition of the sheath of Sphaerotilus natans. *Journal of Bacteriology* **86**, 252–258.

Romstedt J., Riedler W., Torkar K., Arends H., Gavira J., Fehringer F., Ruedenauer M., Kassing R., Jäckel A., (2000) The Midas Instrument on the Rosetta Mission. *In : 31rd Lunar and Planetary Science Conference, LPI Contribution No. 1742, Lunar and Planetary Institute, Houston.*

Rosing M.T., (1999) 13C-Depleted carbon microparticles in >3700-Ma sea-floor sedimentary rocks from west greenland. *Science* **283**, 674-676.

Rouzaud J.N., Oberlin A., (1983) Carbon films structure and microtexture (optical and electron microscopy, Raman spectroscopy). *Thin Solid Films* **105**, 75–96.

Sader J.E., Larson I., Mulvaney P., White L.R., (1995) Method for the calibration of atomic force microscope cantilevers. *Review of Scientific Instruments* **66**, 3789-3798.

Sader J.E., (1998) Frequency response of cantilever beams immersed in viscous fluids with applications to the atomic force microscope. *Journal of Applied Physics* **84**, 64-76.

Sader J.E., Chon J.W.M., Mulvaney P., (1999) Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers. *Review of Scientific Instruments* **70**, 3967-3969.

Sarret G., Connan J., Kasrai M., Bancroft G.M., Charrié-Duhaut A., Lemoine S., Adam P., Albrecht P., Eybert-Bérard L., (1999) Chemical forms of sulfur in geological and archeological asphaltenes from Middle East, France, and Spain determined by sulfur K- and L-edge x-ray absorption near-edge structure spectroscopy. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **63**, 3767-3779.

Sarret G., Mongenot T., Connan J., Derenne S., Kasrai M., Bancroft G.M., Largeau C., (2002) Sulfur speciation in kerogens of the Orbagnoux deposit (Upper kimmeridgian, Jura) by XANES spectroscopy and pyrolysis. *Organic Geochemistry* **33**, 877-895.

Schelble R.T., Westall F., Allen C.C., (2004) 1.8 Ga iron-mineralized microbiota from the Gunflint Iron Formation, Ontario, Canada: implications For Mars. *Advances in Space Research* **33**, 1268-1273.

Schidlowski M., (1988) A 3,800-million-year isotopic record of life from carbon in sedimentary rocks. *Nature* **333**, 313-318.

Schieber J., Arnott H.J., (2003) Nannobacteria as a by-product of enzyme-driven tissue decay. *Geology* **31**, 717–720.

Schoenberg R., Kamber B.S., Collerson K.D., Moorbath S., (2002) Tungsten isotope evidence from approximately 3.8-Gyr metamorphosed sediments for early meteorite bombardment of the Earth. *Nature* **418**, 403-405.

Schopf J.W., Walter M.R., (1983) Archean microfossils: New evidence of ancient microbes. *In : Earth's Earliest Biosphere : its Origin and Evolution, Schopf, J.W. (Ed.), Princeton University Press, New Jersey, 214-239.*

Schopf J.W., Packer B.M., (1987) Early Archean (3.3-billion to 3.5-billion-year-old) microfossils from Warrawoona Group, Australia. *Science* **237**, 70-73.

Schopf, J.W., (1992) Paleobiology of the Archean. *In : Schopf, J.W. and Klein, C., (Eds.), The Proterozoic Biosphere, Cambridge University Press, New York*, 25-39.

Schopf J.W., (1993) Microfossils of the Early Archean Apex chert: new evidence of the antiquity of life. *Nature* **260**, 640-646.

Schopf J.W., (1999) Cradle of Life: The Discovery of Earth's Earliest Fossils. *Princeton University Press*, 336p.

Schopf J.W., Kudryavtsev A.B., Agresti D.G., Wdowiak T.J., Czaja A.D., (2002) Laser–Raman imagery of Earth's earliest fossils. *Nature* **416**, 73-76.

Schopf J.W., (2004) Earth's earliest biosphere: Status of the hunt. *In : Erikson, P.G., Altermann, W., Nelson, D.R., Mueller, W.U. and Cateneanu O. (Eds.), Developments in Precambrian Geology 12 : The Precambrian Earth:Tempos and Events, Elsevier, Amsterdam*, 516-539.

Schopf J.W., Kudryavtsev A.B., Agresti D.G., Czaja A.D., Wdowiak T.J., (2005) Raman Imagery: A New Approach to Assess the Geochemical Maturity and Biogenicity of Permineralized Precambrian Fossils. *Astrobiology* **5**, 333-371.

Schopf J.W., Kudryavtsev A.B., (2005) Three-dimensional Raman imagery of precambrian microscopic organisms. *Geobiology* **3**, 1-12.

Score R., MacPherson G., (1985) Macroscopic and thin section description of ALH84001. *In Antarctic Meteorite Newsletter 8 (2), 5. JSC Curator's Office, Houston.*

Score R., Mittlefehldt D.W., (1993) Macroscopic and thin section description of ALH84001. *In Antarctic Meteorite Newsletter 16 (3), 3. JSC Curator's Office, Houston.*

Score R., (1997) The thrill of the search: Finding ALH84001. *The Planetary Report XVII*, 5-7.

Shapiro R., (1994) L'origine de la vie. *Flammarion* 426p.

Shen Y., Buick R., Canfield D.E., (2001) Isotopic evidence for microbial sulphate reduction in the early Archaean era. *Nature* **410**, 77-81.

Simonson B.M., Lanier W.P., (1987) Early silica cementation and microfossil preservation in cavities in iron formation stromatolites, early Proterozoic of Canada. *In: Appel, P.W.U. and LaBerge, G.L. (Eds.), Precambrian Iron-Formations. Theophrastus Publications, Athens,* 187-213.

Sommers M.G., Awramik S.M., Woo K.S., (2000) Evidence for initial calcite-aragonite composition of Lower Algal Chert Member ooids and stromatolites, Paleoproterozoic Gunflint Formation, Ontario, Canada. *Canadian Journal of Earth Sciences* **37**, 1229-1243.

Spiro C.L., Wong J., Lytle F.W., Greegor R.B., Maylotte D.H., Lamson S.H., (1984) X-ray Absorption Spectroscopic Investigation of Sulfur Sites in Coal: Organic Sulfur Identification. *Science* **226**, 48-50.

Stark M., Moller C., Muller D.J., Guckenberger R., (2001) From images to interactions: high-resolution phase imaging in tapping-mode atomic force microscopy. *Biophysical Journal* **80**, 3009-3018.

Steele A., Goddard D.T., Beech I.B., Tapper R.C., Stapleton D., Smith J.R., (1998) Atomic force microscopy imaging of fragments from the Martian meteorite ALH84001. *Journal of Microscopy* **189**, 2-7.

Strauss H., Marais D.J.D., Hayes J.M., Summons R.E., (1992) The Carbon-Isotopic Record. *In : Schopf, J.W. and Klein, C., (Eds.), The Proterozoic Biosphere, Cambridge University Press, New York*, 117-127.

Strother P.K., Tobin K., (1987) Observations on the genus Huroniospora Barghoorn: Implications for paleoecology of the Gunflint Chert. *Precambrian Research* **36**, 323-333.

Summons R.E., (1993) A review of Fundamental Aspect of Organic Matter Formation, Preservation, and Composition. *In : Engle, M.A. and Macko, S.A., (Eds.), Organic Geochemistry Principles and Applications, Plenum Press, New York and London*, 3-21.

Summons R.E., Jahnke L.L., Hope J.M., Logan G.A., (1999) 2-Methylhopanoids as biomarkers for cyanobacterial oxygenic photosynthesis. *Nature* **400**, 554-557.

Susini J., Salome M., Fayard B., Ortega R., Kaulich B., (2002) The scanning X-ray microprobe at the ESRF by X-ray microscopy beamline. *Surf. Rev. Lett.* **9**, 203- 211.

Takeda M., Nakano F., Nagase T., Iohara K., Koizumi J., (1998) Isolation and chemical composition of the sheath of Sphaerotilus natans. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **62**, 1138-1143.

Tappan H., (1976) Possible eucaryotic algae (Bangiophycidae) among early Proterozoic microfossils. *Geological Society of America Bulletin* **87**, 633–639.

Taylor A.P., Barry J.C., (2003) Magnetosomal matrix: ultrafine structure may template biomineralization of magnetosomes. *Journal of Microscopy* **213**, 180-197.

Thomas-Keprta K.L., Bazylinski D.A., Kirschvink J.L., Clemett S.J., McKay D.S., Wentworth S.J., Vali H., Gibson Jr E.K., Romanek C.S., (2000) Elongated prismatic magnetite crystals in ALH84001 carbonate globules: potential Martian magnetofossils. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **64**, 4049-4081.

Thomas-Keprta K.L., Clemett S.J., Bazylinski D.A., Kirschvink J.L., McKay D.S., Wentworth S.J., Vali H., Gibson Jr E.K., McKay M.F., Romanek M.F., (2001) Truncated hexa-octahedral magnetite crystals in ALH84001: presumptive biosignatures. *PNAS* **98**, 2164-2169.

Thomas-Keprta K.L., Clemett S.J., Bazylinski D.A., Kirschvink J.L., McKay D.S., Wentworth S.J., Vali H., Gibson Jr E.K., Romanek C.S., (2002) Magnetofossils from ancient Mars: a robust biosignature in the martian meteorite ALH84001. *Applied Environmental Microbiology* **68**, 3663-3672.

Tissot B.P., Welte D.H., (1984) Petroleum formation and occurrence. *Springer-Verlag*, 699p.

Toporski J.K.W., Steele A., Stapleton D., Goddard D.T., (1999) Contamination of Nakhla by terrestrial microorganisms. *In : 30rd Lunar and Planetary Science Conference, LPI Contribution No. 1526, Lunar and Planetary Institute, Houston.*

Tortonese M., Kirk M., (1997) Characterization of application specific probes for SPMs. *SPIE* **3009**, 53-60.

Treiman A.H., (1998) The history of Allan Hills revised: Multiple shock events. *Meteoritics and Planetary Science* **33**, 753-764.

Treiman A.H., (2003) Submicron magnetite grains and carbon compounds in Martian meteorite ALH84001: inorganic, abiotic formation by shock and thermal metamorphism. *Astrobiology* **3**, 369-392.

Tyler S.A., Barghoorn E.S., (1954) Occurrence of structurally preserved plants in pre-cambrian rocks of the Canada shield. *Science* **119**, 606-608.

Ueno Y., Isozaki Y., Yurimoto H., Maruyama S., (2001) Carbon isoto-pic signatures of individual Archean microfossils (?) from Western Australia. *International Geology Review* **40**, 196–212.

Valley J.W., Eiler J.M., Graham C.M., Gibson E.K., Romanek C.S., Stolper E.M., (1997) Low-temperature carbonate concretions in the Martian meteorite ALH84001: Evidence from stable isotopes and mineralogy. *Science* **275**, 1633-1637.

van Zuilen M.A., Lepland A., Arrhenius G., (2002) Reassessing the evidence for the earliest traces of life. *Nature* **418**, 627-630.

van Zuilen M.A., Lepland A., Teranes J.L., Finarelli J., Wahlen M., Arrhenius A., (2003) Graphite and carbonates in the 3.8 Ga old Isua Supracrustal Belt, southern West Greenland. *Precambrian Research* **123**, 331-348.

Vandenbroucke M., (2003) Kerogen: from types to models of chemical structure. *Oil & Gas Science and Technology* **58**, 243-269.

Visscher P.T., Reid R.P., Bebout B.M., (2000) Microscale observations of sulfate reduction: Correlation of microbial activity with lithified micritic laminae in modern marine stromatolites. *Geology* **28**, 919-922.

Wakeham S.G., Sinninghe Damste J.S., Kohnen M.E.L., de Leeuw J.W., (1995) Organic sulfur compounds formed during early diagenesis in Black sea sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **59**, 521-533.

Walter M.R., Awramik S.M., (1979) Frutexites from stromatolites of the Gunflint Iron Formation of Canada, and its biological affinities. *Precambrian Research* **9**, 23-33.

Wang A., Dhamelincourt P., Dubessy J., Guerard D., Landais P., Lelaurain M., (1989) Characterization of graphite alteration in an uranium deposit by micro-Raman spectroscopy, X-ray diffraction, transmission electron microscopy and scanning electron microscopy. *Carbon* **27**, 209-218.

Westall F., Boni L., Guerzoni M.E., (1995) The experimental silicification of microorganisms. *Palaeontology* **38**, 495-528.

Westall F., (1997) Influence of cell wall composition on the fossilisation of bacteria and the implications for the search for early life forms. *In : Cosmovici, C., Bowyer, S. and Werthimer, D. (Eds.), Astronomical and Biochemical Origins and the Search for Life in the Universe, Editori compositrici, Bolgna,* 491-504.

Westall F., (1999) The nature of fossil bacteria: A guide to the search for extraterrestrial life. *Journal of Geophysical Research* **104**, 16437-13451.

Westall F., Folk R.L., (2003) Exogenous carbonaceous microstructures in Early Archaean cherts and BIFs from the Isua greenstone belt: Implications for the search for life in ancient rocks. *Precambrian Research* **126**, 313-330.

Westall F., (2005) Life on the Early Earth: A Sedimentary View. *Science* **308**, 366-367.

Westall F., Southam G., (2006) Early life on Earth. *In Benn, K. et al. (Eds.) Archean Geodynamic Processes, AGU Monograph 164, 283-304*, 283-304.

Westall F., de Ronde C.E.J., Southam G., Grassineau N., Colas M., Cockell C., Lammer H., (2006a) Implications of a 3.472-3.333 Ga-old subaerial microbial mat from the Barberton greenstone belt, South Africa for the UV environmental conditions on the early Earth. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. Series B (in press).*

Westall F., de Vries S.T., Nijman W., Rouchon V., Orberger B., Pearson V., Watson J., Verchovsky A., Wright I., Rouzaud I., Marchesini D.D., Anne S.S., (2006b) The 3.466 Ga Kitty's Gap Chert, an Early Archaean microbial ecosystem. *In : Reimold, W.U. and Gibson, R. (eds.), Processes on the Early Earth, Geol. Soc. Amer. Sp.* 405, 105-131.

Whelan J.K., Thompson-Rizer C.L., (1993) Chemical methods for assessing kerogen and protokerogen types and maturity. *In : Engle, M.A. and Macko, S.A., (Eds.), Organic Geochemistry Principles and Applications, Plenum Press, New York and London*, 289-353.

Wing M.R., Bada J.L., (1991) The origin of the polycyclic aromatic hydrocarbons in meteorites. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* **21**, 375-383.

Winter B.L., Knauth L.P., (1992) Stable isotope geochemistry of cherts and carbonates from the 2.0 Ga gunflint iron formation: implications for the depositional setting, and the effects of diagenesis and metamorphism. *Precambrian Research* **59**, 283-313.

Wirth R., (2004) Focused Ion Beam (FIB): A novel technology for advanced application of micro- and nanoanalysis in geosciences and applied mineralogy. *European Journal of Mineralogy* **16**, 863-876.

MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE DE MICROFOSSILES PRECAMBRIENS

Résumé : Deux assemblages fossilifères, Draken (800 Ma) et Gunflint (1900 Ma), ont été étudiés par microscopie à force atomique (AFM), ce qui a permis de déterminer les potentialités et les limites de cette technique pour l'étude de microfossiles précambriens.

Une méthodologie innovante a permis la sélection et la relocalisation précise des microfossiles, quelque soit leur taille et le microscope utilisé. L'attaque acide a été optimisée de manière à exposer au mieux les parois organiques cellulaires, tout en maintenant une rugosité compatible avec les limites de fonctionnement de l'AFM.

Des mesures topographiques avant attaque acide ont permis de découvrir que la paroi de chaque microfossile est invariablement marquée par une série de cicatrices d'arrachements, créées par le polissage. L'imagerie de force latérale a montré sa capacité à distinguer des filaments épigénisés en pyrite, tandis que l'imagerie force volume a de son côté permis de réaliser des cartes d'adhésion. Après attaque acide, des différences importantes sont apparues entre les microfossiles de Gunflint et ceux de Draken. Les premiers dévoilent une paroi solide, bien individualisée, alors que les seconds possèdent une paroi discontinue, formée d'un réseau lâche de films et de particules submicrométriques, qui apparaît surtout en imagerie de phase.

Les résultats obtenus par AFM ont été confirmés et complétés par une batterie d'autres techniques : microscopie électronique à balayage et en transmission, microanalyse EDX, micro spectrométrie Raman et microscopie X synchrotron. Les avantages de la microscopie à force chimique, et le potentiel de l'AFM pour la recherche de traces de vie fossiles extraterrestres sont également discutés.

Mots clés : micropaléontologie précambrienne, microfossiles, Gunflint, Draken, microscopie à force atomique, imagerie de force latérale, imagerie force volume, imagerie de phase, microscopie X synchrotron, XANES, focused ion beam (FIB), microscopie à force chimique.

ATOMIC FORCE MICROSCOPY OF PRECAMBRIAN MICROFOSSIL

Abstract : Two fossiliferous assemblages, Draken (800 Ma) et Gunflint (1900 Ma), were studied by atomic force microscopy, which has permitted the determination of advantages and disadvantages of this technique for the study of Precambrian microfossils.

A new methodology has permitted the selection and precise relocalisation of microfossiles of any size with each type of microscope used. The etching step was optimized in order to better expose the organic wall, and to produce a surface rugosity compatible with the functional limitation of the AFM.

Topographical measurements before etching showed that the wall of almost all microfossils is invariably marked by a series of mechanical defaults created during the polishing. Lateral force imaging demonstrated its capability to distinguish filaments replaced by pyrite, while force volume imaging permitted the acquisition of adhesion maps. After etching, important differences between Gunflint and Draken microfossils were observed. Gunflint microfossils are characterized by a strong, coherent organic wall, whereas those of the Draken formation have a discontinuous wall composed of a loose network of submicrometer particules, especially well visible in phase imaging.

The results obtained by AFM were confirmed and complemented by other techniques: scanning and transmission electron microscopy, EDX microanalysis, Raman microspectrometry and X-ray synchrotron microscopy. The advantages of chemical force microscopy and the potential of AFM in the search of past traces of life in extraterrestrial rocks is also discussed.

Keywords : Precambrian micropaleontology, microfossils, Gunflint, Draken, atomic force microscopy, lateral force imaging, force volume imaging, phase imaging, X-ray synchrotron microscopy, XANES, focused ion beam (FIB), chemical force microscopy.

Discipline – spécialité doctorale : Exobiologie – Micropaléontologie précambrienne

Intitulé et adresse du laboratoire : Centre de Biophysique Moléculaire, rue Charles Sadron, 45071 Orléans cedex 02, France