UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Institut de Chimie – UMR 7177

THÈSE présentée par :

Blandine COUREL

soutenue le : **07 septembre 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie Analytique

Caractérisation de substances naturelles en contexte archéologique : apport des études moléculaires, isotopiques et de la datation au ^{14}C

THÈSE dirigée par :

Mr ADAM Pierre	Directeur de recherche CNRS, Université de Strasbourg
Mr SCHAEFFER Philippe	Directeur de recherche CNRS, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme LATTUATI-DERIEUX Agnès	Ingénieure de recherche CNRS, Université Pierre et Marie Curie
Mr GROSSI Vincent	Directeur de recherche CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1

« La science est une bénédiction pour qui la saisit et une malédiction pour qui la fuit, mais on ne doit jamais être orgueilleux de son propre savoir puisqu'il n'y a pas de limite dans la science et que personne ne peut arriver à la perfection. Ecouter est la plus belle chose qui existe »

(Ptah-hotep, vers 2400 av. J.-C.)

~ Remerciements ~

J'aurais vivement souhaité ajouter plus d'un « s » au titre de cette page afin de montrer combien je suis profondément reconnaissante envers toutes les personnes qui m'ont aidée durant ces trois années de thèse qui s'achèvent déjà. Toutefois, dans un souci de respecter les règles de la langue française et pour ne pas heurter la sensibilité de Philippe concernant l'orthographe, je ne m'en tiendrai qu'à un seul « s ».

Je souhaiterais donc remercier en premier lieu, et avec une gratitude toute particulière, le Dr **Pierre Adam** et le Dr **Philippe Schaeffer**, mes deux directeurs de thèse, qui m'ont tant apporté durant ces trois années passées au laboratoire. Je ne saurai les remercier suffisamment pour leur disponibilité infaillible, le temps qu'ils m'ont accordé à partager une part de leurs innombrables connaissances, leur patience, leur gentillesse, la confiance qu'ils m'ont accordée tout au long de ce travail et les bons moments de convivialité passés ensemble lors de congrès scientifiques.

Un grand merci également au Dr **Agnès Lattuati-Derieux** et au Dr **Vincent Grossi** qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail et d'assurer le travail de rapporteur.

Mes remerciements s'adressent par ailleurs au Dr **Clément Féliu** qui, en plus de m'avoir lui aussi fait l'honneur de juger mon travail, est à l'origine même d'une partie de ce travail en me mettant à disposition de très nombreux échantillons archéologiques. Je le remercie également pour sa très grande disponibilité lorsqu'il s'agissait de répondre à mes questions. J'en profite également pour remercier l'ensemble des **archéologues de l'Inrap de Strasbourg**, que j'ai eu le plaisir de rencontrer et qui m'ont donné la chance d'accéder à certains de leurs échantillons en provenance de divers sites de fouilles alsaciens. A cet égard, je remercie tout particulièrement Mme **Nathalie Schneider**, Mme **Heidi Cicutta**, Mr **Richard Nilles**, Mr **Yohann Thomas** et Mme **Delphine Minni**.

Dans le même esprit je souhaiterais remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont accepté de répondre à mes multiples requêtes d'échantillons, tant archéologiques que modernes, et qui ont, de ce fait, permis que ces travaux de thèse aboutissent:

- ✓ le Dr **Jacques Connan** grâce auquel j'ai eu la chance d'examiner de plus près les échantillons de Nahal Hemar. Je le remercie vivement pour le temps qu'il a investi, suite à mes demandes, pour la recherche de résines de styrax et de liquidambar.

✓ le Dr **Jeremy Jacob** (Institut des Sciences de la Terre d'Orléans) pour m'avoir fourni les divers échantillons de *Panicum miliaceum*. Je tiens, par ailleurs, à le remercier pour les échanges scientifiques que nous avons pu avoir lors de plusieurs congrès.

✓ Mme **Carole Deflorenne** (INRAP, Villeneuve d'Ascq) et Mme **Emmanuelle Bonnaire** (PAIR, Université de Champagne-Ardenne) pour les échantillons de gruau en provenance de La Haute Borne (Nord, France).

✓ Mr **Joël Motsch** pour l'échantillon de boues de station d'épuration.

✓ le **Dr Arie Nissenbaum** (Weizmann Institute) ainsi que le Pr **Ofer Bar-Yosef** (Université d'Harvard), le Pr **Zohar Amar** et le Pr **Mordechai Kisler** (Université de Bar-Ilan) ainsi que le Pr **Amots Dafni** (Université d'Haifa) pour m'avoir transmis la si précieuse résine de *Styrax officinalis*. Que le Dr Arie Nissenbaum soit également vivement remercié pour les échantillons issus de la fouille de Nahal Hemar.

✓ le Dr **Vincent Girard** (Université de Montpellier) pour la résine de *Styrax officinalis* collectée au Jardin des Plantes de Montpellier.

✓ Mr **Frédéric Tournay** (Jardin Botanique de Strasbourg) pour m'avoir cordialement accueillie au sein du Jardin Botanique de Strasbourg et pour avoir accepté que je prélève quelques échantillons de plantes de *S. officinalis*.

✓ Mme **Elizabeth Dodinet** pour la résine de *Styrax parallelon*.

✓ le Dr **Frédéric Bonté** (LVMH Recherche) et le Pr **Annelise Lobstein** (Université de Strasbourg) pour les gommes résineuses de liquidambar.

✓ Mme **Christine Maulay-Bailly** et Mme **Séverine Amand** (Chimiothèque du MNHN, Paris) pour les baumes historiques de Tolu et du Pérou.

✓ le Dr **Marc Reynders** et Mr **Frank Van Caekenberghe** pour les échantillons prélevés sur les plantes de *Myroxylon* présents au Jardin Botanique de Meise.

Je tiens également à remercier vivement le Dr **Irka Hajdas** (Laboratory of Ion Beam Physics, ETH de Zürich) et le Pr **Stefano Bernasconi** (Geologisches Institut, ETH de Zürich) pour leur fructueuse collaboration sans laquelle les mesures de datation, et en particulier celle de la miliacine, n'auraient pu être menées à bien.

Je remercie toutes les personnes qui ont réalisé des analyses dans le cadre de ce travail : le Dr **Patrick Wehrung** (Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg) pour les analyses de GC-MS, Mme **Estelle Motsch** pour les analyses de GC-MS et de GC-IRMS.

Ma reconnaissance et mes remerciements vont également aux membres de l'équipe du laboratoire Image, Ville, Environnement (Université de Strasbourg), le Pr **Dominique Schwartz**, le Dr **Damien Ertlen**, et le Dr **Lucie Froehlicher**, ainsi que Mme **Martine Trautmann** (Laboratoire d'Analyses des Sols et formations superficielles, Université de Strasbourg) pour leur accueil, le temps qu'ils m'ont accordé et leur enseignement précieux concernant les sols.

Naturellement, je tiens à remercier infiniment **Estelle** pour son amitié et tous les bons moments passés ensemble au labo, devant la machine à café et aux séances de step !

Je souhaite en outre remercier tous les (anciens) membres du laboratoire et les étudiants pour leur gentillesse, leur accueil, leur bonne humeur et les bons moments passés ensemble: **Jean-Michel**, **Gaby**, **Raoul**, **Lucile**, **Gaël**, **Quentin**, **Vanessa**, **Mathilde.**

Enfin, mon dernier remerciement est naturellement adressé à **David** qui m'aura soutenue (et supportée) notamment pendant la période de rédaction de ce manuscrit

SOMMAIRE

Liste des abréviations 5

Liste des figures 7

Liste des tableaux 13

Introduction générale 15

CHAPITRE 1: L'ANALYSE DE SUBSTANCES NATURELLES EN ARCHEOMETRIE MOLECULAIRE 21

1.1. Origine et voies de biosynthèse des lipides de plantes 24

1.1.1. Composés à chaînes linéaires 24

1.1.2. Les terpénoïdes 26

1.1.3. Les phénylpropanoïdes 29

1.2. Diversité et spécificité des lipides au sein des plantes 30

1.2.1. Les résines issues d'angiospermes 32

1.2.2. Les résines issues de gymnospermes 35

1.2.3. Ce que nous apprennent les biomarqueurs… 38

1.3. Apport de l'étude des isotopes du carbone en archéologie 40

1.3.1. Mesure du rapport isotopique ($\delta^{13}C$) 40

1.3.2. Datation au radiocarbone (^{14}C) 45

CHAPITRE 2: L'ANALYSE DE CEREALES EN CONTEXTE ARCHEOLOGIQUE 51

2.1. Introduction 53

2.2. Matériel et méthodes 55

2.2.1. Présentation du corpus d'échantillons et du contexte archéologique 55

2.2.2. Echantillons de référence de millet 59

2.3. Résultats et discussion 59

2.3.1. Etude des lipides des unités stratigraphiques par GC-MS : identification de la couverture végétale 59

2.3.2. Quantification de la miliacine par GC-FID 63

2.3.3. Mesures de datation au ^{14}C par AMS MICADAS 69

2.4. Conclusion **78**

ANNEXE DU CHAPITRE 2 **81**

2.5. Etude complémentaire concernant le contenu lipidique de graines de céréales **83**

2.5.1. Etude de céréales contemporaines 83

2.5.2. Analyse de graines archéologiques 88

CHAPITRE 3: ANALYSE DE SOLS ANTHROPISES : LE CAS DES LATRINES **91**

3.1. Introduction **93**

3.2. Présentation du corpus d'échantillons et du contexte archéologique **94**

3.2.1. Structures de la Place St Thomas (Strasbourg) 95

3.2.2. Structures à Ste Elizabeth (Strasbourg) 95

3.2.3. Structures de la Place du Château (Strasbourg) 96

3.2.4. Structure 4564 à Obernai 97

3.2.5. Station d'épuration contemporaine 97

3.3. Résultats et discussion **97**

3.3.1. Identification de biomarqueurs d'origine fécale 97

3.3.2. Etude de la contribution végétale vs. animale 102

3.3.3. Etude de la composition isotopique en carbone des lipides fécaux 110

3.4. Conclusion **118**

CHAPITRE 4: ETUDE CHIMIOTAXONOMIQUE D'EXSUDATS DE STYRAX, LIQUIDAMBAR ET MYROXYLON ET IMPLICATIONS EN ARCHEOLOGIE **121**

4.1. Introduction **123**

PARTIE I : Etude chimiotaxonomique de baumes de référence issus d'espèces de *Styrax*, *Liquidambar* et *Myroxylon* **127**

4.2. Présentation des échantillons de résines actuelles **129**

4.3. Matériel résineux et parties aériennes issus de *Styracaceae* **131**

4.3.1. *Ce que dit la littérature à propos des Styracaceae* 131

4.3.2. *Ce que nous apprend notre étude moléculaire sur les exsudats de Styracaceae* 136

4.3.3. *Examen moléculaire des parties aériennes de S. officinalis* 150

4.4. Etude des résines de Liquidambar 152
4.4.1. Les Hamamelidaceae 152
4.4.2. Etude moléculaire de résines de Liquidambar utilisées par les parfumeurs 154

4.5. Le cas « litigieux » des baumes de Myroxylon 157
4.5.1. Données de la littérature se rapportant au genre Myroxylon 158
4.5.2. Etude moléculaire de « baumes du Pérou et de Tolu » (baumes historiques) 161
4.5.3. Etude du contenu moléculaire de parties aériennes de Myroxylon (branches et feuilles) 164

Partie II: Etude de l'enduit organique du crâne de Nahal Hemar 167

4.6. De l'usage du « styrax » à travers l'Histoire 169
4.6.1. Propriétés thérapeutiques du « styrax » 169
4.6.2. Le « styrax » pour les fumigations et les parfums 171

4.7. Contexte archéologique et présentation des échantillons étudiés 172
4.7.1. Site archéologique de Nahal Hemar 172
4.7.2. Echantillons sélectionnés pour l'étude en géochimie organique 173

4.8. Evaluation du cortège moléculaire présent dans la résille organique 174
4.8.1. Détection de corps gras au sein des échantillons NH2823 et NH2969 175
4.8.2. Etude chimiotaxonomique de la composante végétale incorporée dans l'enduit 180
4.8.3. Profil des acides aminés 187

4.9. Conclusion 188

ANNEXE DU CHAPITRE 4 191

4.10. Publication dans *Scientific Reports* (Solazzo et *al.*, 2016) 193

CHAPITRE 5: UTILISATION DE BRAI DE BOULEAU COMME ADHESIF POUR LA CONFECTION D'UN BIJOU 233

5.1. Introduction 235

5.2. Présentation des échantillons étudiés 238
5.2.1. Echantillons archéologiques 238
5.2.2. Echantillon de bouleau de référence : écorce et produits de pyrolyse 239

5.3. Résultats et discussion **240**
5.3.1. Etude du contenu lipidique de l'écorce de bouleau 240
5.3.2. Etude moléculaire de produits de chauffe d'écorce de bouleau 242
5.3.3. Identification de la substance naturelle utilisée comme agent collant sur le pendentif d'Eckwersheim 247

5.4. Conclusion **250**

CHAPITRE 6 : CONCLUSION GENERALE **253**

CHAPITRE 7 : PARTIE EXPERIMENTALE **261**

7.1. Traitement géochimique des échantillons **263**
7.1.1. Précautions particulières 263
7.1.2. Extraction, dérivation et fractionnement de la matière organique extractible 263
7.1.3. Isolement et dérivation en vue de mesures isotopiques ($\delta^{13}C$) 264
7.1.4. Traitement des échantillons pour la datation au ^{14}C par AMS 265
7.1.5. Préparation d'échantillons en vue de l'analyse des acides aminés 266
7.1.6. Simulations de dégradation 267

7.2. Instrumentation **267**
7.2.1. Chromatographie gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) 267
7.2.2. GC couplée à la spectrométrie de *masse (GC-MS)* 268
7.2.3. GC couplée à un spectromètre de masse à rapport isotopique (GC-c-IRMS) 269
7.2.4. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse par ionisation chimique à pression atmosphérique (HPLC-APCI-MS) 270
7.2.5. Datation au ^{14}C par spectrométrie de masse par accélérateur (AMS) 270

Références bibliographiques **273**

Appendice - Structures moléculaires **301**

Liste des abréviations

AcOEt	acétate d'éthyle
AGE	Automated Graphitisation Equipment (en datation au ^{14}C)
AIBN	azoisobutyronitrile
APCI[1]	ionisation chimique à pression atmosphérique
BP	Before Present (en datation au ^{14}C)
BuOH	butanol
BSTFA	bis-(*N,O*- triméthylsilyl)-trifluoroacétamide
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
EI	Impact Electronique
FID	Détecteur à Ionisation de Flamme
GC	Chromatographie Gazeuse
GC-MS	Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
HPLC	Chromatographie Liquide à Haute Performance
INRAP	Institut National de Recherche Archéologique Préventive
i-PrOH	isopropanol
m/z	rapport masse sur charge (en MS)
M_W	masse molaire
NIST	National Institute for Science and Technology
PPNB	Néolithique Pré-céramique B
RP-HPLC	Chromatographie Liquide à Haute Performance en phase inverse
SI	Standard Interne
t-BUOOH	hydroperoxide *de tert*-butyle
TFAA	anhydride trifluoroacétique
US	Unité(s) Stratigraphique(s)
V_0	volume mort (en chromatographie liquide)

[1] Les abréviations faisant référence au matériel et techniques analytiques sont volontairement laissées sous leur forme anglophone.

Liste des figures

CHAPITRE 1

FIG. 1.1 **(**A) Coupe transversale d'une feuille présentant les principaux constituants biologiques qui jouent un rôle clé dans la vie et le développement de la plante. (**B**) Coupe transversale d'une cellule végétale 25

FIG. 1.2 Voie de biosynthèse des composés linéaires à chaînes longues (d'après Post-Beittenmiller, 1996, Dewick, 2002, Chikaraishi et *al.*, 2004a) 26

FIG. 1.3 Voie du mévalonate (MVA) à l'origine des sesquiterpènes (C_{15}) et des triterpènes (C_{30}) chez les plantes (d'après Brown, 1998, Rohmer, 1999, Chikaraishi et *al.*, 2004a) 27

FIG. 1.4 Voie de biosynthèse du méthylérythritol phosphate (MEP ou voie non mévalonique) conduisant à la formation des diterpènes (d'après Chikaraishi et *al.*, 2004a) 28

FIG. 1.5 Voie du shikimate utilisée chez les plantes pour la formation de l'acide chorismique à partir duquel sont synthétisés les acides aminés aromatiques, les phénylpropanoïdes, dont les dérivés de l'acide cinnamique et la lignine (d'après Herrmann, 1995, Dewick, 2002) 30

FIG. 1.6 Classification partielle des angiospermes à l'origine des résines terpéniques présentant la diversité des triterpènes biosynthétisés de même que leur spécificité. 34

FIG. 1.7 Structures moléculaires de biomarqueurs caractérisant quelques-unes des résines triterpéniques trouvées en archéologie 35

FIG. 1.8 Structures moléculaires de quelques composés diterpéniques présents dans des résines de gymnospermes 37

FIG. 1.9 Mécanisme d'altération de l'acide abiétique (d'après Simoneit et *al.*, 1986, Otto et Simoneit, 2002, Colombini et *al.*, 2005a) 39

FIG. 1.10 Schéma descriptif du fonctionnement de l'appareil de GC-*c*-IRMS 41

FIG. 1.11 Voies de biosynthèse du glucose par l'assimilation du CO_2 atmosphérique chez les plantes dites en « C3 » et en « C4 ». Le glucose est utilisé ensuite pour la biosynthèse des lipides (d'après Touzeau, 2014) 42

FIG. 1.12 Anatomie des plantes en C3 vs. C4 (Touzeau, 2014) 43

FIG. 1.13 Valeurs de $\delta^{13}C$ (‰) mesurées lors d'analyses isotopiques réalisées sur des plantes en C3 et en C4, considérées dans leur globalité (tissus), ainsi que pour quelques lipides ou familles de lipides issus de ces mêmes plantes (β-sitostérol, *n*-alcanes et *n*-acides) 44

FIG. 1.14 Courbe de calibration IntCal13 utilisée à titre d'exemple pour un échantillon estimé à 2750 ± 30 BP 46

FIG. 1.15 Schéma descriptif de l'appareil AMS MICADAS (ETH de Zürich, Suisse) pour la datation au ^{14}C de petites quantités d'échantillon (d'après Synal et *al.*, 2004, 2007) 48

FIG. 1.16 Système de graphitisation AGE (Wacker et *al.*, 2010a) 49

FIG. 1.17 Système pour l'introduction de l'échantillon dans la source d'ions de l'AMS sous forme de CO_2 gazeux (d'après Ruff et *al.*, 2010a) 50

CHAPITRE 2

FIG. 2.1 Plan du site et localisation des structures étudiées 57

FIG. 2.2 Représentation en coupe des structures étudiées et localisation des prélèvements pour les analyses de géochimie organique. 58

FIG. 2.3 Chromatogrammes en phase gazeuse des extraits lipidiques obtenus pour (**a**) le fossé gaulois 1001.US23, (**b**) le silo protohistorique 1508.US15 et (**c**) le sol environnant le silo 1508. 60

FIG. 2.4 Structures des stérols (S) et des triterpènes (T) identifiés dans les sols issus des structures archéologiques d'Obernai 61

FIG. 2.5 Chromatogrammes en phase gazeuse des extraits lipidiques apolaires obtenus pour les échantillons de référence de (**a**) graines de *P. miliaceum* et (**b**) graines de *S. italica*. 62

FIG. 2.6 Teneur en miliacine (µg pour 100 g de sol) dans les différents échantillons provenant des silos et leur(s) encaissant(s) ainsi que dans le fossé gaulois (Obernai, Alsace). 64

FIG. 2.7 Fragmentogrammes de masse *m/z* 57, 61 et 74 montrant la distribution relative des *n*-alcanes, acides gras et *n*-alcools dans certaines parties de la plante de *P. miliaceum* (feuilles, racines et/ou graines) ainsi que dans l'échantillon de silo 1508.US15. 67

FIG. 2.8 Chromatogrammes en phase gazeuse montrant l'extrait lipidique apolaire de l'échantillon 1330 US2 (**a**) et les fractions enrichies en miliacine obtenues après (**b**) purification sur colonne de silice sèche et (**c**) purification par RP-HPLC 70

FIG. 2.9 Représentation graphique des âges ^{14}C BP calibrés obtenus pour les échantillons de miliacine isolée, les extraits lipidiques, la matière organique totale des sols et l'échantillon de graines en fonction de l'âge des structures, tel que déterminé par céramologie (« datation archéologique ») et lien avec les périodes de l'Histoire 74

FIG. 2.10 Graines de référence contemporaines (Moulin d'Hurtigheim, Alsace, France) 83

FIG. 2.11 Chromatogrammes en phase gazeuse montrant le contenu moléculaire de l'extrait lipidique apolaire obtenu à partir de graines d'épeautre, de blé, de seigle et d'orge (Moulin d'Hurtigheim, Alsace, France). 84

FIG. 2.12 Chromatogramme en phase gazeuse de l'échantillon contemporain de graines d'avoine en provenance du Moulin d'Hurtigheim (Alsace, France). 85

FIG. 2.13 Mécanismes de fragmentation (EI) des dérivés de type 5-*n*-alkylrésorcinols (d'après Budzikiewicz et *al.*, 1967, Ross et *al*, 2004) 85

FIG. 2.14 Spectres de masse (EI, 70 eV) de quelques dérivés d'alkylrésorcinols identifiés dans les échantillons de graines de céréales contemporaines. 86

FIG. 2.15 Graines découvertes en contexte archéologique dont l'extrait lipidique, lorsque cela a été possible, a été analysé par GC-MS 89

FIG. 2.16 Composés polyaromatiques identifiés dans l'échantillon de *Triticum aestivum & durum* en provenance de Strasbourg (STR-1628, INRAP) 90

CHAPITRE 3

FIG. 3.1 Vue d'ensemble des fosses moyenâgeuses (**a**) et fosse circulaire 1121 (**b**) découvertes Place St Thomas 95

FIG. 3.2 Coupe archéologique du site de fouille de Ste Elizabeth au niveau de la fosse 11. 96

FIG. 3.3 Couches « noires » mises au jour lors des fouilles Place du Château à Strasbourg 96

FIG. 3.4 Structure 4564 datée de la période romaine mise au jour à Obernai et localisation des échantillons 4, 8 et 9 prélevés pour les analyses de géochimie organique 97

FIG. 3.5 Fragmentogrammes de masse *m/z* 74, 61 et 57 montrant la distribution typique des *n*-acides, *n*-alcools et *n*-alcanes obtenue pour les échantillons de sols anthropisés étudiés (exemple de l'échantillon SE2) 98

FIG. 3.6 Structures moléculaires des dérivés de stérols identifiés dans les échantillons archéologiques de sols anthropisés et comprenant les Δ^5-stérols, les 5α- et les 5β-stanols 99

FIG. 3.7 Spectres de masse (EI, 70 eV) de l'acétate de coprostanol (**S2**) et de 5α-cholestanol (**S5**) identifiés dans les échantillons archéologiques 99

FIG. 3.8 Mode de formation des stanols et des acides biliaires à partir des Δ^5-stérols au sein de l'environnement (**a**) ou dans le tube digestif (**b**). Schéma modifié d'après les voies réactionnelles décrites dans [1] Grimalt et *al.*, 1990, [2] Gérard, 2014 et [3] Salen et *al.*, 1975 100

FIG. 3.9 Fragmentogrammes de masse *m/z* 215+368+382+396 montrant la distribution des stérols et stanols au sein des échantillons archéologiques (**a**-**d**) et dans le cas d'une station d'épuration contemporaine (**e**). 101

FIG. 3.10 Chromatogrammes en phase gazeuse des extraits lipidiques apolaires issus des sols de comblement des structures (**a**) SE2, (**b**) 3153 et (**c**) 4564. 105

FIG. 3.11 Chromatogrammes en phase gazeuse montrant la distribution des lipides polaires libérés par méthanolyse (CH_3OH/HCl, 1,2N) de la fraction polaire des extraits des échantillons de paléosols (**a**-**c**) et des lipides extraits de la station d'épuration (WTP2) (**d**). 107

FIG. 3.12 Spectres de masse (EI, 70 eV) des acides (**a**) lithocholique (**AB1**), (**b**) désoxycholique (**AB4**), (**c**) chénodésoxycholique (**AB5**) et (**d**) cholique (**AB8**). 109

FIG. 3.13 $\delta^{13}C$ (‰ *vs.* VPDB) des stérols et stanols identifiés au sein des dépôts archéologiques et des échantillons de la station d'épuration. Quelques résultats de la littérature sont donnés à titre de comparaison pour le sitostérol issu de plantes en C3 (-31,4 ‰ à -38,1 ‰ ; Chikaraishi et *al.*, 2004b) et pour le cholestérol extrait d'os d'animaux nourris exclusivement avec des plantes en C3 (-28,0 ‰ à -28,4 ‰ ; Jim et *al.*, 2004) 113

CHAPITRE 4

FIG. 4.1 Structure moléculaire des esters aromatiques caractéristiques des baumes 123

FIG. 4.2 Classification de la famille des *Styracaceae* proposée par Fritsch et *al.* (2001) sur la base de critères morphologiques. 131

FIG. 4.3 Répartition géographique des principales espèces de *Styracaceae* et d'*Hamamelidaceae* (d'après Sales et Hedge, 1996 et Hovaneissian et *al.*, 2006) 132

FIG. 4.4 Planche de dessin (**A**) et photo (**B**) de l'aliboufier, nom commun donné à la plante de *S. officinalis* 133

FIG. 4.5 Spectre de masse du cinnamate de cinnamyle **P20** (EI, 70 eV) 137

FIG. 4.6 Chromatogramme en phase gazeuse de l'extrait lipidique apolaire obtenu à partir du matériel résinique de *S. officinalis* (3020). 138

FIG. 4.7 Chromatogramme en phase gazeuse de l'extrait lipidique apolaire obtenu à partir de l'échantillon d'écorce et de résine prélevé sur un arbre israélien de *S. officinalis* (2982). 138

FIG. 4.8 Chromatogramme en phase gazeuse de l'extrait lipidique apolaire obtenu à partir de la résine de *S. paralleloneurum* (2984). 139

FIG. 4.9 Chromatogramme en phase gazeuse de l'extrait lipidique apolaire obtenu à partir de la résine de *S. tonkinensis* (2986). 139

FIG. 4.10 Spectres de masse du pinorésinol **L1**, de la styraxine **L2**, de l'égonol **B1** et de l'homoégonol **B2** (EI, 70 eV) 143

FIG. 4.11 Fragmentogrammes de masse *m/z* 189 + 201 + 203 montrant le contenu en triterpènes des résines de (**a**) *S. officinalis* 3020, (**b**) *S. officinalis* 2982, (**c**) *S. paralleloneurum* 2984 et (**d**) *S. tonkinensis* 2986. 145

FIG. 4.12 Mécanisme réactionnel de type rétro Diels-Alder à l'origine des fragments *m/z* 203 et 262 typiques des dérivés de l'acide oléanolique (cas de l'acide sumarésinolique dérivé représenté ici, d'après Budzikiewicz et *al.*, 1963) 147

FIG. 4.13 Spectres de masse des dérivés de l'acide oléanolique possédant une fonction oxygénée en C-6 : (**a**) acide 3-oxo-sumarésinolique, (**b**) acide 3β-hydroxy-6-oxo-oléan-12-en-28-oïque et (**c**) acide sumarésinolique (EI, 70 eV) 147

FIG. 4.14 Mécanisme réactionnel de type rétro Diels-Alder à l'origine des fragments *m/z* 201, 260 et 278 typiques des dérivés de l'acide siarésinolique 148

FIG. 4.15 Spectres de masse (**a**) de l'acide 3-oxo-siarésinolique **T16** et (**b**) de l'acide siarésinolique **T14** (EI, 70 eV) 148

FIG. 4.16 Chromatogrammes en phase gazeuse du contenu lipidique apolaire extrait (**a**) de l'écorce, (**b**) des feuilles ainsi que (**c**) des fruits prélevés sur l'arbuste de *S. officinalis* du Jardin Botanique de Strasbourg. 151

FIG. 4.17 Chromatogrammes en phase gazeuse du contenu lipidique apolaire de la gomme (**a**) de *L. orientalis* (gomme du parfumeur ROBERTET) et (**b**) de *L. styraciflua* (ROBERTET). 156

FIG. 4.18 Chromatogrammes partiels en phase gazeuse montrant la distribution des triterpènes au sein de la gomme (**a**) de *L. orientalis* (gomme du parfumeur ROBERTET) et (**b**) de *L. styraciflua* (ROBERTET). 157

FIG. 4.19 *Myroxylon balsamum var. pereirae* (**A**) et *Myroxylon balsamum var. balsamum* (**B**) à partir desquels est obtenu respectivement le baume du Pérou et le baume de Tolu 159

FIG. 4.20 Flacons étiquetés comme correspondant à du « baume du Pérou » et « baume de Tolu » provenant de la collection du Muséum National d'Histoire Naturelle 161

FIG. 4.21 Chromatogrammes en phase gazeuse des résines historiques du (**a**) « baume de Tolu » et (**b**) « baume du Pérou » de la collection botanique du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris. 162

FIG. 4.22 Diterpènes identifiés au sein du « baume du Pérou » du MNHN, indiquant que le matériel est adultéré par une résine issue de gymnospermes (mélèze, vraisemblablement) 163

FIG. 4.23 Chromatogrammes en phase gazeuse des extraits lipidiques obtenus à partir d'échantillons de feuilles et de branches de *Myroxylon balsamum var. balsamum* (respectivement **a** et **b**) et de *Myroxylon balsamum var. pereirae* (respectivement **c** et **d**). 165

FIG. 4.24 Spectres de masse des composés (**a**) **T37** et (**b**) **T39** (EI, 70 eV) 166

FIG. 4.25 **A**. Localisation de la grotte de Nahal Hemar, au Sud du désert de Judée (Israël) et **B.** vue de la grotte, à l'entrée particulièrement exiguë 173

FIG. 4.26 (**A**) Crâne décoré de Nahal Hemar, à l'arrière duquel a été placé un enduit organique sous la forme d'une résille, (**B**) échantillon de la résille (NH2968) prélevé pour l'analyse de géochimie organique 174

FIG. 4.27 Chromatogrammes en phase gazeuse des extraits lipidiques contenant les composés « volatils » originaires des échantillons NH2823 et NH2969 176

FIG. 4.28 Structure générique des triglycérides et fragments $[M\text{-}RCOO]^+$ obtenus en analyse MS (mode APCI, modifié d'après Bastien, 2011) 177

FIG. 4.29 Chromatogramme en phase liquide montrant la distribution des triglycérides contenus dans l'échantillon NH2823. 178

FIG. 4.30 Spectres de masse des triglycérides correspondant aux pics **I** à **VIII** (Figure 4.29) identifiés dans l'échantillon NH2823 (APCI) et suggestions concernant l'association des acides gras impliqués d'après la masse des fragments $[M\text{-}RCOO]^+$ (d'après Holčapek et *al.*, 2003). 179

FIG. 4.31 Chromatogrammes en phase gazeuse des extraits lipidiques obtenus à partir des échantillons (**a**) NH2823, (**b**) NH2969 et (**c**) NH2968 prélevés à l'arrière du crâne de Nahal Hemar. 182

FIG. 4.32 Chromatogrammes en phase gazeuse partiels montrant la distribution des triterpènes présentant les fragments *m/z* 189+203 au sein de (**a**) la résine fraîche de *S. officinalis* collectée à Yodfat, en Israël, (**b)** la même résine fraîche après 13h d'oxydation et (**c**) l'échantillon archéologique NH2968. 184

FIG. 4.33 Spectres de masse des dérivés de l'acide sumarésinolique de type époxylactone **T43**, **T18** et **T19** identifiés dans la résine archéologique NH2968 (EI, 70 eV) 185

FIG. 4.34 Mécanisme d'oxydation conduisant à la formation d'un triterpène de type 11α,12α-époxylactone à partir de l'acide oléanolique (modifié d'après Majumder et Bagchi, 1983) 186

FIG. 4.35 Chromatogramme partiel en phase gazeuse de l'hydrolysat (HCl/CH_3OH) du résidu solide restant après l'extraction aux solvants organiques de l'échantillon NH2968. 188

Fig. 4.36 Eléments constitutifs de l'enduit organique appliqué à la base du crâne de Nahal Hemar (Israël) ainsi que des parties formant la résille mis en évidence par les analyses de GC-MS 190

CHAPITRE 5

FIG. 5.1 Production de brai de bouleau au moyen (**a**) d'une unique chambre de production ou (**b**) selon la méthode du « double-pot » ou distillation *per descensum* (Pietrzak, 2012) 236

FIG. 5.2 Collier (3.1) mis au jour au sein de la tombe 6008 du complexe funéraire d'Eckwersheim et pendentif associé (3.2) dont un fragment a été prélevé en vue d'une analyse en géochimie organique 238

FIG. 5.3 Ecorce de bouleau (**a**) avant et (**b**) après le traitement pyrolytique réalisé au laboratoire 239

FIG. 5.4 Chromatogramme en phase gazeuse obtenu pour l'extrait lipidique de l'écorce d'un bouleau altéré. 240

FIG. 5.5 Spectres de masse des A-*neo*-lupanoïdes identifiés dans l'extrait lipidique d'écorce de bouleau altéré (EI, 70 eV). 241

FIG. 5.6 Formation des A-*neo*-triterpènes par réarrangement de Wagner-Meerwein en conditions acides décrite par Salvador et *al.*, 2009 242

FIG. 5.7 Chromatogrammes en phase gazeuse des extraits lipidiques obtenus suite à un traitement thermique de l'écorce de bouleau : (**a**) cas de l'expérience de pyrolyse réalisée au laboratoire et (**b**) brai de bouleau obtenu selon une méthode ancestrale (méthode du « double-pot ») mise en place dans le cadre de travaux d'archéologie expérimentale (« Museumsdorf Drüppel » de Berlin). 243

FIG. 5.8 Spectres de masse des dérivés d'allobétuline (EI, 70 eV) 245

FIG. 5.9 Mode de fragmentation des dérivés d'allobétuline en spectrométrie de masse (EI ; d'après Schmidt et Huneck, 1979) 245

FIG. 5.10 Réarrangement intramoléculaire au niveau du cycle E à l'origine de la formation des allobétulanes (Green et *al.*, 2007, Salvador et *al*., 2009) 246

FIG. 5.11 Chromatogramme en phase gazeuse montrant la distribution des lipides extraits de l'agent collant prélevé sur le pendentif archéologique (Eckwersheim, Alsace). 248

Fig. 5.12 Voies de transformations naturelles ou anthropiques à l'origine de la formation des biomarqueurs utilisés pour la caractérisation de brai de bouleau et/ou de matériel végétal de bouleau altéré du fait de l'enfouissement en contexte archéologique 251

Liste des tableaux

CHAPITRE 2

TABLEAU 2.1 Corpus d'échantillons soumis aux analyses de géochimie organique et datation des structures archéologiques (céramologie) 56

TABLEAU 2.2 Inventaire des restes de millet (*Panicum miliaceum* et *Setaria italica*) identifiés au sein des structures archéologiques d'Obernai. Les résultats complets de l'étude carpologique peuvent être trouvés dans le rapport de fouille de l'INRAP (Durand, 2016) 65

TABLEAU 2.3 Composition isotopique ($\delta^{13}C$) et déviation standard associée ($\pm \sigma$) mesurées pour les *n*-alcanes, les *n*-alcools, les *n*-acides et la miliacine présents au sein des silos 1330, 1508 et 1781 66

TABLEAU 2.4 Âges mesurés par datation au ^{14}C à l'ETH de Zürich (Laboratory of Ion Beam Physics) pour les échantillons de miliacine isolée, les extraits organiques et les sols bruts décarbonatés 71-72

TABLEAU 2.5 Composition moléculaire des principaux lipides identifiés dans les extraits lipidiques apolaires des échantillons de graines d'épeautre, blé, orge, seigle et avoine (Moulin d'Hurtigheim, Alsace, France) 87

CHAPITRE 3

TABLEAU 3.1 Corpus d'échantillons de sols archéologiques et de boues d'épuration contemporaines étudiés 94

TABLEAU 3.2 Rapports basés sur l'abondance relative des différents dérivés de stérols/stanols déterminés dans le cas de la station d'épuration contemporaine (WTP1 et WTP2) ainsi que pour les paléosols archéologiques 103

TABLEAU 3.3 Composition isotopique du carbone ($\delta^{13}C$, en ‰ vs. VPDB) pour les composés linéaires (*n*-alcanes et *n*-alcools), la miliacine et les stérols présents au sein des échantillons archéologiques de Ste Elizabeth (SE2), Obernai (4564.US9), St Thomas (STh3) et des boues d'épuration modernes 112

TABLEAU 3.4 Comparaison entre les (rares) données de la littérature relatives à la composition isotopique du cholestérol chez les animaux et les humains et celles obtenues dans le cadre de notre étude 117

CHAPITRE 4

TABLEAU 4.1 Echantillons et provenance du matériel végétal étudié 130

TABLEAU 4.2 Inventaire des échantillons archéologiques examinés en provenance de Nahal Hemar 174

TABLEAU 4.3 Quantité de matériel disponible pour l'étude moléculaire et % d'extrait lipidique obtenu après extraction aux solvants organiques (CH_2Cl_2/CH_3OH, 1/1, v/v) 175

TABLEAU 4.4 Critères moléculaires utiles pour la reconnaissance de résines modernes et archéologiques de styrax et storax 189

Introduction générale

L'archéométrie a été développée, après la seconde guerre mondiale, par un ensemble d'archéologues et de scientifiques conscients de ce que la science pouvait apporter de novateur aux problématiques archéologiques. À l'échelle internationale, le premier symposium à réunir à la fois des spécialistes en archéologie et en sciences naturelles eu lieu dans les années 1960 et concernait plus particulièrement la prospection des fouilles au moyen de méthodes géophysiques. En 1976, Maurice Picon (1931-2014), physicien et archéologue de renom et père de l'archéométrie française, fonda avec huit autres compatriotes archéologues et scientifiques le « Groupe des Méthodes Physiques et Chimiques de l'Archéologie » (GMPCA). Ces chercheurs avaient, en effet, constaté que pour

> *« de nombreux archéologues, les recherches de terrain et de laboratoire sur les milieux et les matériels, objets de leur étude, ne se ramenaient plus à une simple description et analyse érudites, mais qu'un certain nombre de progrès dans le sens de la précision et de la rigueur exigeaient l'introduction de moyens nouveaux généralement issus des disciplines dites exactes* […]. ». Il en résultait alors que « *l'évolution (de l'Archéologie) considérée sous son jour le plus général, consacr(ait) en fait l'apparition de ce qu'il est convenu d'appeler la « pluridisciplinarité ». Celle-ci ne (pouvait) être fructueuse que dans le cadre d'une coopération intime et profonde des deux parties engagées dans le dialogue, chacune, en définitive, faisant siens problèmes et techniques de l'autre.* » (Tabbagh, 1994)

Cette rencontre du monde de l'archéologie avec des géologues, sédimentologues, pédologues, botanistes, zoologistes, anthropologues, chimistes, spécialistes des matériaux et spécialistes de la datation (liste non exhaustive), au sein d'équipes pluridisciplinaires, a largement été influencée par les avancées scientifiques et technologiques du XX^{ème} siècle. Par exemple, la microscopie électronique à balayage, développée à partir des années 1960, a permis l'observation à l'échelle microscopique puis nanométrique des objets du patrimoine. Il en va de même pour l'essor des méthodes de datation absolue, parmi lesquelles la datation au ^{14}C dont les principes ont été énoncés par Libby en 1949 (Libby et *al.*, 1949), et qui a rendu possible l'établissement de chronologies plus exactes. La chimie moléculaire, elle aussi, a connu d'importantes mutations grâce aux progrès réalisés dans le domaine de la chromatographie et de la spectrométrie de masse, à partir de la deuxième moitié du XX^{ème}

siècle, permettant de nos jours la séparation et la caractérisation de composés moléculaires variés dans des mélanges complexes. Tous ces outils scientifiques ont profondément transformé le monde de l'archéologie moderne, de sorte qu'aujourd'hui, les collaborations entre archéologues et scientifiques se multiplient.

Parmi les nouvelles disciplines créées à l'interface de l'archéologie et des sciences, l'archéologie moléculaire s'est développée dans l'idée qu'un matériau archéologique, quel qu'en soit l'âge, peut avoir préservé une part de sa signature moléculaire originelle ou transformée. De ce fait, l'identification de marqueurs moléculaires diagnostiques de substances naturelles au sein de la matière organique étudiée permet à la fois de déterminer l'origine biologique d'un matériau archéologique (Agozzino, 1997, Peters et *al*., 2005), mais peut aussi permettre, dans certains cas, d'en connaître un fragment de son histoire : Est-il question d'une ressource native du lieu de sa découverte ou, au contraire, s'agit-il d'une ressource importée, ce qui sous-entend que des échanges commerciaux ont eu lieu ? S'agit-il d'un matériau brut ou est-il le résultat d'une transformation anthropique en lien avec une technique artisanale particulière ? En quoi consiste cette technique ? S'agit-il d'un mélange de divers ingrédients ? ... Ce sont autant de questions auxquelles l'archéologie moléculaire peut apporter des éléments de réponse. Pour faire face à une demande croissante des archéologues, plusieurs aspects méritent tout de même d'être plus particulièrement développés :

(1) La chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) est une technique analytique couramment mise en œuvre pour explorer la composition moléculaire de substances organiques trouvées en contexte archéologique. Elle permet, plus particulièrement, la mise en évidence de composés spécifiques (biomarqueurs) permettant l'identification des produits naturels à partir desquels ces substances archéologiques ont été préparées (Evershed, 2008) ou l'identification des différentes sources végétales qui ont contribué à la matière organique d'un sol archéologique. Cependant, les matériaux organiques archéologiques sont parfois constitués de substances naturelles peu communes et peu connues -voire inconnues-, bien que certaines d'entre elles aient été exploitées dès la Préhistoire. Il est donc, dans ce contexte, nécessaire d'accroître autant que possible, notamment en termes de diversité des espèces étudiées, la connaissance des signatures moléculaires spécifiques liées aux espèces végétales ou animales dont les restes organiques peuvent être rencontrés en contexte archéologique.

(2) A l'origine, un artefact est le fruit d'un savoir technique et artisanal, développé par l'Homme, généralement à partir de ressources naturelles (bois, cires et résines naturelles, bitume, graisses animales et végétales, colorants, …), qu'il façonne selon sa volonté par l'intermédiaire de traitements particuliers (*e.g.*, traitement thermique). Par la suite, ces artefacts, ou toute autre trace relative à une quelconque activité humaine, se retrouvent au niveau de sites archéologiques dans des conditions environnementales et microbiologiques parfois favorables à la préservation (milieu aquatique, conditions anaérobies) ou, au contraire, plus ou moins destructrices. L'ensemble de ces processus d'altération naturels, tout comme les traitements subis lors de la fabrication des artefacts, sont susceptibles de fortement modifier les substances organiques étudiées et leur signature moléculaire spécifique originelle. Il est de ce fait indispensable d'avoir une meilleure connaissance de l'effet de ces processus de dégradation si on cherche, en dépit de leur altération, à déterminer l'origine biologique de substances organiques sur la base d'une étude moléculaire. A cet égard, la résistance particulière de certains composés lipidiques aux processus d'altération représente un atout majeur pour de telles études. Par ailleurs, la reconnaissance en tant que telles, des transformations spécifiquement induites par les traitements subis par les matériaux organiques lors de leur préparation, et la capacité à les distinguer sans ambiguïté de celles liées aux processus d'altération naturels, peut également permettre d'accéder à des informations concernant leur mode de préparation ou la technologie mise en œuvre.

(3) Le besoin se fait également sentir de développer des protocoles analytiques impliquant l'utilisation de très faibles quantités d'échantillon. Au vu de la rareté de certains objets de notre patrimoine culturel et artistique, il est en effet nécessaire que soient élaborées de nouvelles méthodes de travail quasi non-destructives. A titre d'exemple, si le développement d'une instrumentation performante pour la datation au carbone 14 de très petits volumes d'échantillons (AMS MICADAS) représente une avancée majeure (Ruff et *al.*, 2007, 2010a, 2010b), cela nécessite néanmoins que soient mis en place, en amont, des protocoles adaptés d'échantillonnage, de préparation de ces échantillons, de purification et d'isolement des composés d'intérêt, tout en évitant d'introduire des contaminations extérieures.

Afin de répondre au mieux à la demande et aux interrogations des archéologues, ce travail de thèse s'est articulé autour de thématiques variées, impliquant toutes l'utilisation de biomarqueurs lipidiques et de leur signature isotopique pour l'identification de substances

organiques d'origine végétale détectées en contexte archéologique, qu'il s'agisse de matériaux organiques trouvés sur des objets ou de matériel végétal ayant contribué à la matière organique de sols archéologiques. Celles-ci feront l'objet de chapitres distincts.

Nous aborderons, dans un premier temps, quelques notions essentielles relatives aux substances naturelles (Chapitre 1) comme leur composition moléculaire, les voies de biosynthèse utilisées par les plantes et la préservation des lipides de végétaux au sein d'échantillons anciens (notion de biomarqueurs). Nous présenterons également quelques aspects théoriques et pratiques concernant les analyses de la composition isotopique du carbone (GC-*c*-IRMS) et la datation au ^{14}C dans le cas de très petites quantités d'échantillons (AMS MICADAS), ces techniques ayant été mises en œuvre au cours de ce travail.

Puis, à travers l'analyse du contenu lipidique de sols archéologiques et, notamment, la détection de marqueurs moléculaires d'anthropisation, nous chercherons à identifier l'origine et la fonction de sols et de structures archéologiques ainsi qu'à mettre en lumière des pratiques agricoles du passé. Le sol possède, en effet, cette formidable capacité à enregistrer divers signaux moléculaires relatifs à son histoire. Ainsi, par exemple, la présence de la miliacine, un biomarqueur de millet (*Panicum miliaceum*) dans des sols ayant comblé d'anciennes structures de stockage de grains sur un site archéologique, atteste d'une période de culture de cette céréale sur ce site (Chapitre 2), tandis que la détection de stéroïdes d'origine fécale traduit la mise en place d'infrastructures, telles que des latrines, liées à l'établissement de l'homme sur un territoire (Chapitre 3). Ces deux études seront l'occasion d'évaluer le potentiel que représentent les sols archéologiques piégés au sein de structures dites « en creux » et les lipides qui leur sont associés en tant qu'archives. Nous verrons alors comment la datation au ^{14}C de composés individuels permet de replacer le contenu lipidique d'un sol dans une chronologie et de montrer que ces structures « en creux » peuvent archiver des informations concernant une succession de cultures ou une modification d'environnement ayant précédé leur creusement.

Un important volet de cette thèse a été dédié à l'analyse de résines aromatiques, appelées « baumes », caractérisées par la présence de dérivés d'acides cinnamique et benzoïque en contexte archéologique (Chapitre 4). Un premier volet est consacré spécifiquement à une étude chimiotaxonomique ayant pour objectif la détermination de nouveaux critères moléculaires fiables pour la reconnaissance et la différenciation de sucs résineux issus de différentes espèces de *Styrax*, *Liquidambar* et *Myroxylon.* En effet, les

études moléculaires relatives à ces baumes aromatiques rapportées dans la littérature s'avèrent insuffisantes, voire discutables dans certains cas lorsque l'authenticité des échantillons n'est pas avérée. Une deuxième partie, chronologiquement à l'origine de ces travaux chimiotaxonomiques, est consacrée à la caractérisation d'une résille organique ornant un crâne humain mis au jour lors de fouilles archéologiques à Nahal Hemar (sud de la Mer Morte, Israël), dont une résine aromatique de la famille des baumes représente un constituant important.

Enfin, l'étude moléculaire que nous présenterons dans le cinquième chapitre fait suite à la mise en évidence d'une substance, de nature organique, servant d'adhésif pour la confection d'un pendentif mis au jour lors de la fouille d'une sépulture hallstattienne à Eckwersheim (Alsace). En raison de la détection de marqueurs triterpéniques spécifiques en série lupane, cette substance a été identifiée comme étant un brai (goudron) obtenu par traitement thermique d'écorce de bouleau. Cette identification nous a conduit à réaliser une étude moléculaire plus détaillée des modifications induites par le procédé de fabrication du brai sur les structures triterpéniques afin de distinguer clairement les marqueurs triterpéniques directement issus de cette transformation anthropique de ceux liés à une dégradation naturelle post-dépositionnelle des artefacts archéologiques, un processus à prendre systématiquement en considération dans le domaine de l'archéométrie.

Nous clôturons ce document par un récapitulatif de nos résultats (Chapitre 6) et nous discuterons de quelques perspectives qui méritent d'être approfondies dans le cadre de futurs travaux de recherche, en archéométrie notamment.

Note : Les composés moléculaires mentionnés dans ce document (texte, tableaux et figures) sont désignés par les lettres capitales suivantes : **S** (stérols), **T** (triterpènes), **D** (diterpènes), **P** (dérivés de phénols et de phénylpropanoïdes -esters d'acides cinnamique et benzoïque notamment-), **L** (lignanes), **B** (benzofuranes), **F** (flavonoïdes) et **X** (autres composés). Leurs structures sont présentées en appendice.

Chapitre 1 : L'analyse de substances naturelles en archéométrie moléculaire

Le règne végétal, comprenant des centaines de milliers d'espèces et de variétés différentes, représente à lui seul un gigantesque laboratoire de chimie dans lequel des millions de produits naturels peuvent être synthétisés. La complexité de bon nombre de ces constituants est telle qu'il a souvent été difficile pour les chimistes de synthèse de reproduire fidèlement ce que la nature est capable de faire. Quoiqu'ils n'aient pas toujours réussi à synthétiser ces produits, les hommes ont su, très tôt, extraire et tirer parti de la large palette de substances naturelles qu'offrent les plantes auxquelles sont associées différentes propriétés physiques, chimiques et biologiques. Dès la Préhistoire et l'Antiquité, les fibres végétales ont été extraites des plantes pour la confection de papiers et de tissus (Jakes et *al.*, 1994, Franceschi et *al*., 2004), de même qu'un grand nombre de constituants (résines, huiles…) ont servi à la formulation de produits médicinaux (Lev et Amar, 2008), de parfums ou de cosmétiques (Lucas, 1930, Brun, 2000). Enfin, les plantes ont tout naturellement fait partie des premières ressources alimentaires nécessaires à la survie de l'homme. Dans le domaine de l'archéologie, il est, par conséquent, fréquent de retrouver les traces de substances végétales tant à l'échelle macroscopique (fibres, restes carpologiques, par exemple) qu'à l'échelle microscopique avec les lipides de végétaux qui se trouvent être particulièrement bien préservés à travers le temps (Eglinton et *al.*, 1991). L'identification de ces lipides par des analyses moléculaires de biogéochimie organique représente donc un atout majeur pour déterminer l'origine des organismes précurseurs, à condition de savoir reconnaître et interpréter les lipides caractéristiques (« biomarqueurs »).

Nous décrirons, dans une première partie de ce chapitre, les différentes voies de biosynthèse utilisées par les plantes afin d'élaborer une partie de leur important cortège moléculaire lipidique (composés linéaires, terpènes et phénylpropanoïdes). Au sein de cet ensemble très complexe et très diversifié, certains lipides peuvent être particulièrement spécifiques à certaines espèces de plantes et représentent, de ce fait, des outils moléculaires adaptés à la caractérisation de substances naturelles dans le cadre d'études archéologiques comme nous l'illustrerons au travers de quelques exemples. Enfin, nous discuterons de quelques aspects théoriques et pratiques concernant l'analyse de la composition isotopique du carbone (GC-*c*-IRMS) et la datation au radiocarbone de lipides individuels (AMS MICADAS), deux techniques de plus en plus utilisées en archéométrie.

1.1. Origine et voies de biosynthèse des lipides de plantes

Tout commence avec la photosynthèse au cours de laquelle le dioxyde de carbone et l'eau sont incorporés et s'assemblent au sein de l'organisme vivant pour former des sucres tel que rapporté dans l'équation (**1**) – l'équation (**2**) concernant le cas particulier du glucose (Torsell, 1997).

$$nCO_2 + nH_2O \underset{\longleftarrow}{\overset{\overset{Assimilation}{h\nu,\ ATP,\ NADPH}}{\longrightarrow}} (CH_2O)_n + nO_2 \qquad (\mathbf{1})$$

$$6CO_2 + 6H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \qquad (\mathbf{2})$$

Outre le fait que la photosynthèse sert à l'incorporation du carbone organique chez les plantes, cette réaction fournit également l'énergie nécessaire à celles-ci pour leur développement en convertissant l'énergie lumineuse reçue par le soleil en énergie chimique. Que ce soit la photosynthèse, ou sa réaction inverse qu'est la respiration, ces réactions chimiques s'avèrent essentielles à la vie des plantes, d'où leur appellation de métabolismes primaires (Torsell, 1997). Tout métabolisme nécessite de pouvoir stocker, en amont, de l'énergie au sein de l'organisme puis de la transporter vers les cellules cibles, cette énergie se trouvant être fournie sous la forme d'ATP (adénosine triphosphate). La biosynthèse fait également intervenir un agent réducteur, le NADPH/H^+ ou nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, une coenzyme donneuse d'électrons. L'ATP et le NADPH sont, tous deux, impliqués dans la plupart des réactions chimiques décrites ci-dessus. Bien que de multiples enzymes interviennent également au cours des différentes étapes de biosynthèse permettant la carboxylation, l'oxydation, l'hydrogénation, l'hydroxylation ou la condensation de nombreux substrats (Rohmer, 1999, Kunst et Samuels, 2003, Eisenreich et *al.*, 2004), celles-ci ne seront pas détaillées dans la suite de ce chapitre. La rupture du glucose -ou glycolyse- au sein du cytoplasme des cellules végétales conduit ensuite à la formation de deux molécules de pyruvate (**1**, Figure 1.2 ; Torsell 1997) qui serviront de « briques élémentaires » pour les voies de biosynthèse décrites ci-dessous.

1.1.1. Composés à chaînes linéaires

Chacune des feuilles d'une plante est recouverte, sur sa partie externe, d'une couche protectrice, nommée cuticule (Figure 1.1), qui se compose principalement d'un mélange d'hydrocarbures, d'acides gras, d'alcools et d'esters lourds appelé cire épicuticulaire

(Eglinton et Hamilton, 1967, Kolattukudy, 1970). Cette cire épicuticulaire agit comme un puissant imperméabilisant puisque les longues chaînes de type alkyle forment une couche hydrophobe qui empêche la perte d'une quantité trop importante d'eau lors de la respiration et qui limite le transport de l'eau au sein même de la plante. Cette couche cireuse joue également un rôle protecteur car elle prémunit les cellules des plantes et leurs organes contre les agressions externes, telles que le rayonnement ultraviolet du soleil ou les dommages causés par les insectes. Enfin, elle aide l'organisme à résister aux agents infectieux tels que les champignons et les bactéries (Kolattukudy, 1970, Kunst et Samuels, 2003, Koch et Ensikat, 2008).

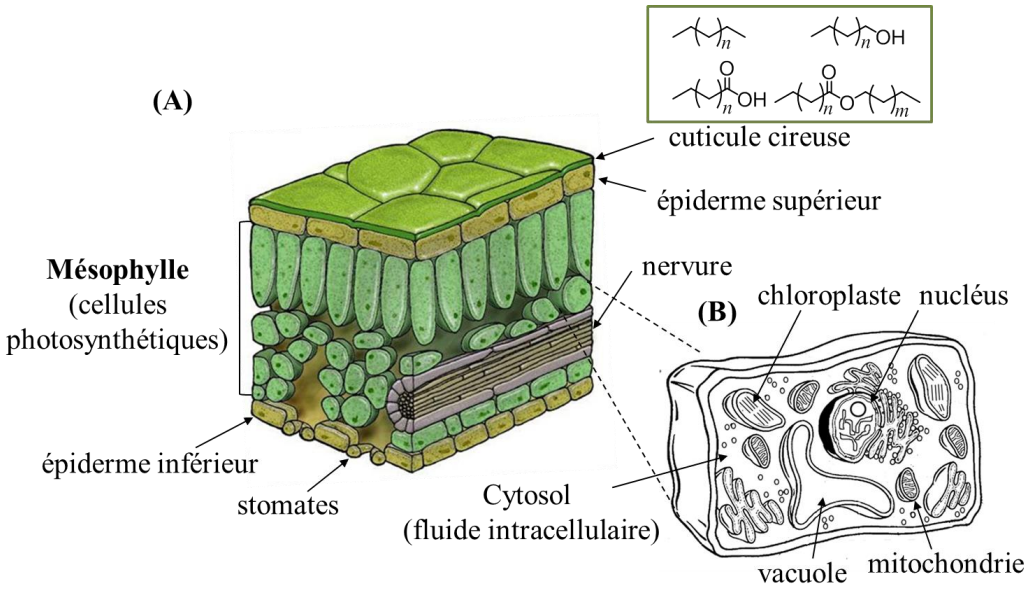


FIG. 1.1 (**A**) Coupe transversale d'une feuille présentant les principaux constituants biologiques qui jouent un rôle clé dans la vie et le développement de la plante. (**B**) Coupe transversale d'une cellule végétale (*Source des images*: (A) slideplayer.fr, slide 1773164; (B) piperpages.wikispaces.com).

La synthèse des composés à chaîne linéaire commence par la formation des acides alcanoïques à partir de l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA, **2**) après plusieurs étapes de condensation, réduction et élongation tel qu'illustré en Figure 1.2 (Eglinton et Hamilton, 1967, Torsell, 1997, Dewick, 2002, Chikaraishi et *al.*, 2004a). Les premières voies réactionnelles consistent en la conversion de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA (**3**) par réaction de carboxylation suivie du transfert des groupements malonyle et acétyle sur une protéine porteuse d'acyle (ACP : « *acyl carrier protein* ») pour former respectivement le malonyl-ACP (**4**) et l'acétyl-ACP. La condensation de ces derniers permet le passage d'une chaîne contenant deux carbones à une chaîne comprenant, cette fois-ci, quatre carbones. S'en suit alors une

succession de réactions de réduction impliquant le NADPH et une insertion, à nouveau, de malonyl-ACP (**4**), générant ainsi un acide comprenant deux carbones additionnels (Post-Beittenmiller, 1996, Dewick, 2002). La réitération des étapes décrites précédemment mène à la synthèse d'acides à chaînes paires pourvues de deux à dix-huit atomes de carbone (Post-Beittenmiller, 1996). C'est ensuite au sein des mitochondries (Figure 1.1) que les *n*-acides à chaînes plus longues, typiquement de C_{20} à C_{32}, sont synthétisés par l'ajout ultérieur de malonyl-CoA (Post-Beittenmiller, 1996, Kachroo et Kachroo, 2009). Etape par étape, la synthèse des acides gras se poursuit par l'adjonction de deux carbones supplémentaires sur le matériel de départ, ce qui explique en partie pourquoi les acides gras d'origine végétale sont majoritairement à chaîne paire (Dewick, 2002). *A posteriori*, une décarboxylation enzymatique ou une réduction conduisent respectivement à l'obtention des *n*-alcanes et des *n*-alcools (Kunst et Samuels, 2003).

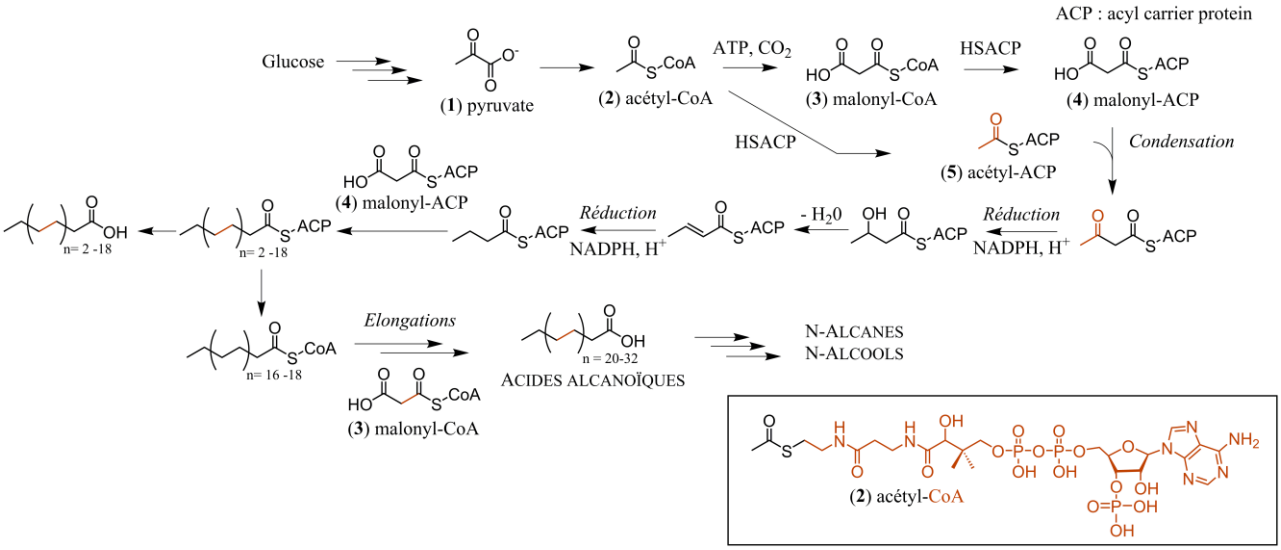


FIG. 1.2 Voie de biosynthèse des composés linéaires à chaînes longues (d'après Post-Beittenmiller, 1996, Dewick, 2002, Chikaraishi et *al.*, 2004a).

1.1.2. Les terpénoïdes

Les terpénoïdes sont largement répandus au sein du monde végétal et constituent notamment une part importante des résines végétales (Langenheim, 2003). C'est d'ailleurs en référence à la térébenthine – une oléorésine extraite de l'arbre *Pistacia terebinthus*, « Terpentin » en allemand – que le chimiste allemand Friedrich Kékulé von Stradonitz, vers 1866, désigna par le terme « terpénoïdes » les composés isolés pour la première fois de cette source végétale (Croteau, 1998). Ces derniers résultent de mécanismes successifs de condensations d'unités isopréniques (comprenant cinq atomes de carbone) tel que cela a été

postulé, entre 1884 et 1887, par Wallach dans la règle de l'isoprène (Torsell, 1997, Croteau, 1998). L'utilisation de l'unité isoprénique comme motif élémentaire servant à la création des terpènes est la raison pour laquelle ces composés naturels sont également désignés par le terme « isoprénoïdes ». Une fois les unités isopréniques assemblées, le nombre d'atomes de carbone impliqués conditionne l'affiliation des terpènes au sein des différentes familles : les monoterpènes (C_{10}), les sesquiterpènes (C_{15}), les diterpènes (C_{20}), les sesterterpènes (C_{25}) ou les triterpènes (C_{30}). Les deux voies de biosynthèse conduisant à la formation de ces composés sont décrites ci-dessous.

La première voie de biosynthèse, clairement établie à partir des années 1950, est la voie du mévalonate (MVA), décrite en Figure 1.3, qui mène à la formation des sesquiterpènes et des triterpènes dans le cytosol des plantes (Eisenreich et *al.*, 2001, Dewick, 2002). Chez les plantes, la décarboxylation du pyruvate (**1**) conduit à la formation de l'acétyl-CoA (**2**) à partir duquel commence la voie du mévalonate qui, en associant trois acétyl-CoA, constitue en premier lieu le mévalonate (**6**). Une fois ce dernier pyrophosphorylé par l'adjonction d'un groupement OPP (groupement pyrophosphate), le mévalonate est alors converti en isopentényl pyrophosphate (IPP, **7**) et en son isomère le diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP, **8**). La condensation de trois IPP donne lieu à la formation du farnésyl-pyrophosphate (**9**), comprenant 15 atomes de carbone, qui est à l'origine de l'ensemble des sesquiterpènes (C_{15}) ainsi que du squalène (**10**) à partir duquel est façonnée une large variété de triterpènes (C_{30}).

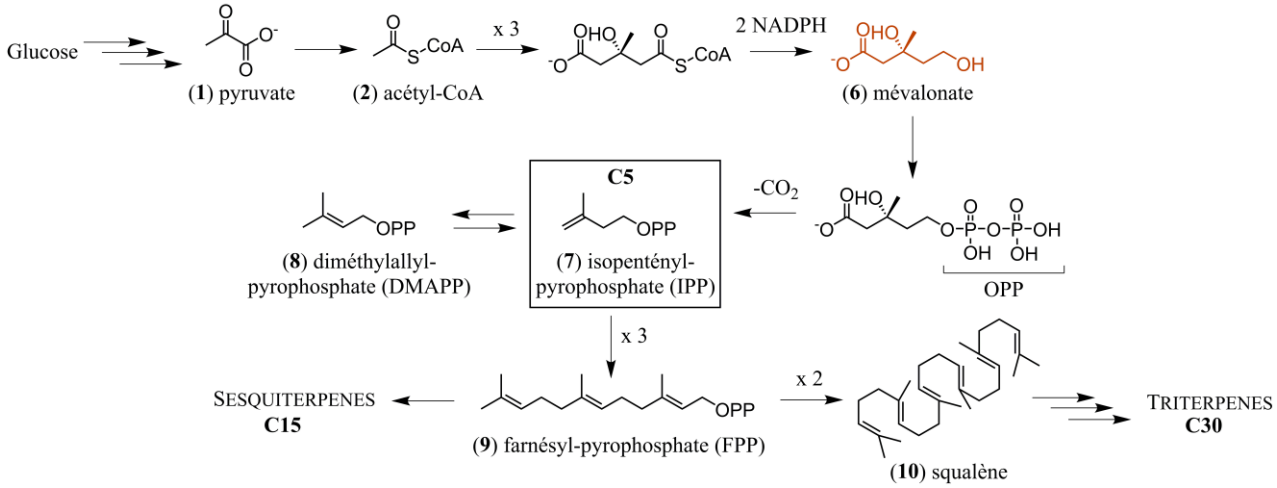


FIG. 1.3 Voie du mévalonate (MVA) à l'origine des sesquiterpènes (C_{15}) et des triterpènes (C_{30}) chez les plantes (d'après Brown, 1998, Rohmer, 1999, Chikaraishi et *al.*, 2004a).

Jusqu'à récemment, la biosynthèse de l'isopentényl-pyrophosphate et, par conséquent, des terpènes, ne se concevait qu'à travers l'unique voie du mévalonate. Toutefois, suite aux expériences de marquage au ^{13}C et ^{2}H opérées par Rohmer, Lichtenthaler et leurs collègues au cours des années 1990 (Lichtenthaler, 1999, Rohmer, 1999), une voie de biosynthèse alternative, se déroulant à l'intérieur des plastides tels que les chloroplastes, a été mise en évidence. Cette voie est désormais reconnue sous l'appellation de voie du MEP (méthylérythritol phosphate) ou, parfois, de voie non mévalonique (Figure 1.4 ; Lichtenthaler, 1999). Le premier intermédiaire de cette voie de biosynthèse est le 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate (DOXP, **13** ; Lichtenthaler, 1999), obtenu par condensation du pyruvate (**1**) avec le D-glycéraldéhyde-3-phosphate (**12**). Par la suite, le composé **14** (méthylérythritol phosphate ou MEP) se forme suite à un réarrangement intramoléculaire accompagné d'une étape de réduction impliquant le NADPH (Chikaraishi et *al.*, 2004a, Eisenreich et *al.*, 2004). Par l'action de diverses enzymes, le MEP est ensuite converti en IPP (**7**) et DMAPP (**8**) puis, lorsque 4 unités d'IPP se condensent entre elles [1], celles-ci forment le géranylgéranyl pyrophosphate (GGPP, **15**) à l'origine des diterpènes (Dewick, 2002).

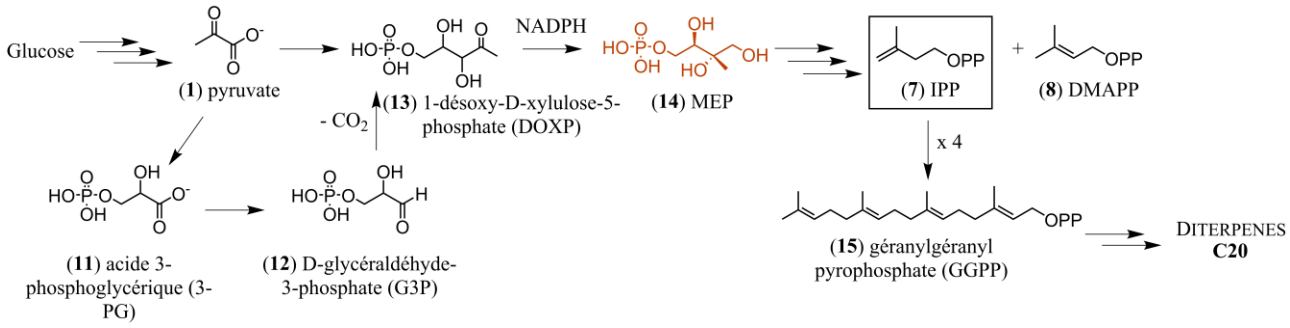


FIG. 1.4 Voie de biosynthèse du méthylérythritol phosphate (MEP ou voie non mévalonique) conduisant à la formation des diterpènes (d'après Chikaraishi et *al.*, 2004a).

Cette description binaire, selon laquelle l'IPP (**7**) et le DMAPP (**8**) ne peuvent être synthétisés que par la voie du MVA dans le cytosol ou via la voie du MEP dans les chloroplastes, constitue une vision simplifiée du processus de biosynthèse. En réalité, la séparation entre ces deux compartiments cellulaires n'est pas totale et des échanges intracellulaires concernant, notamment, l'IPP et le DMAPP peuvent avoir lieu (phénomène de « *crosstalk* » ; Eisenreich et *al.*, 2001, Schuhr et *al.*, 2003).

[1] Par ailleurs, chez les végétaux le couplage du DMAP et de l'IPP, synthétisés par la voie du MEP, peut également conduire à la formation de monoterpènes en C_{10} tandis que le couplage de deux GGPP induit la formation de tétraterpènes en C_{40} (caroténoïdes ; Lichtenthaler, 1999).

1.1.3. Les phénylpropanoïdes

Lorsque les plantes sont sujettes à un facteur externe de stress (attaque d'un agent pathogène, exposition intensive à un rayonnement UV, concentration importante d'ozone dans l'atmosphère, températures faibles, blessures liées à la présence d'animaux, déficience des sols en nutriments), le système végétal est capable de produire des composés de type phénylpropanoïdes qui présentent notamment une activité antimicrobienne ainsi que des propriétés antioxydantes (Dixon et Paiva, 1995, Korkina, 2007). Ces composés sont formés par le biais de la voie du shikimate résumée en Figure 1.5 (Herrmann, 1995, Dewick, 2002). La biosynthèse des dérivés phénylpropanoïdes chez les plantes commence par la création du premier intermédiaire, le 3-désoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate (DAHP, **18**), par couplage du phosphoénol pyruvate (**16**) avec l'érythrose-4-phosphate (**17**), suivie de sa transformation en acide shikimique (**19**) puis en acide chorismique (**20**). A partir de ce dernier sont synthétisés les acides aminés aromatiques, puis, la déamination de la L-phénylalanine (**21**) et de la L-tyrosine (**22**) générera respectivement l'acide cinnamique (**23**) et l'acide *p*-coumarique (**24**) à partir desquels une large variété de dérivés phénylpropanoïdes seront formés, parmi lesquels nous citerons les flavonoïdes, les coumarines, les esters de cinnamate et benzoate, les monolignols (Torsell, 1997, Dewick, 2002). L'acide *p*-coumarique peut, par ailleurs, être le résultat de l'hydroxylation de l'acide cinnamique chez certaines plantes (Russell, 1971).

Chez les végétaux, les monolignols -alcools *p*-coumarylique (**27**), coniférylique (**28**) et sinapylique (**29**)- s'avèrent essentiels puisqu'ils constituent les briques élémentaires qui formeront, par polymérisation, la lignine (Lewis et Yamamoto, 1990), un constituant macromoléculaire du bois qui lui procure solidité, imperméabilité et agit contre la dégradation des cellules de la plante (Pérez et *al.*, 2002). Ces monolignols sont élaborés à partir de leur acide correspondant, l'acide *p*-coumarylique (**24**), l'acide férulique (**25**) et l'acide sinapique (**26**). Nous noterons que ces deux derniers acides (**25** et **26**) sont synthétisés, à partir de l'acide *p*-coumarique (**24**), via une succession de réactions d'oxydation, mettant en jeu le NADPH et O_2, et de méthylation pour lesquelles intervient une coenzyme donneuse de méthyle (SAM pour S-adénosylméthionine, Figure 1.5 ; Dewick, 2002). Si des exceptions existent (Lewis et Yamamoto, 1990), les végétaux se différencient généralement par leur contenu en monolignols. En effet, la lignine des gymnospermes est formée principalement à partir de l'alcool coniférylique tandis que la lignine des dicotylédones (angiospermes de type « feuillus ») se compose des alcools coniférylique et sinapylique et celle des monocotylédones

(plantes herbacées appartenant aux angiospermes, telles les Graminées) de l'ensemble des trois monolignols cités ci-dessus (Lewis et Yamamoto, 1990, Simoneit et *al.*, 1993).

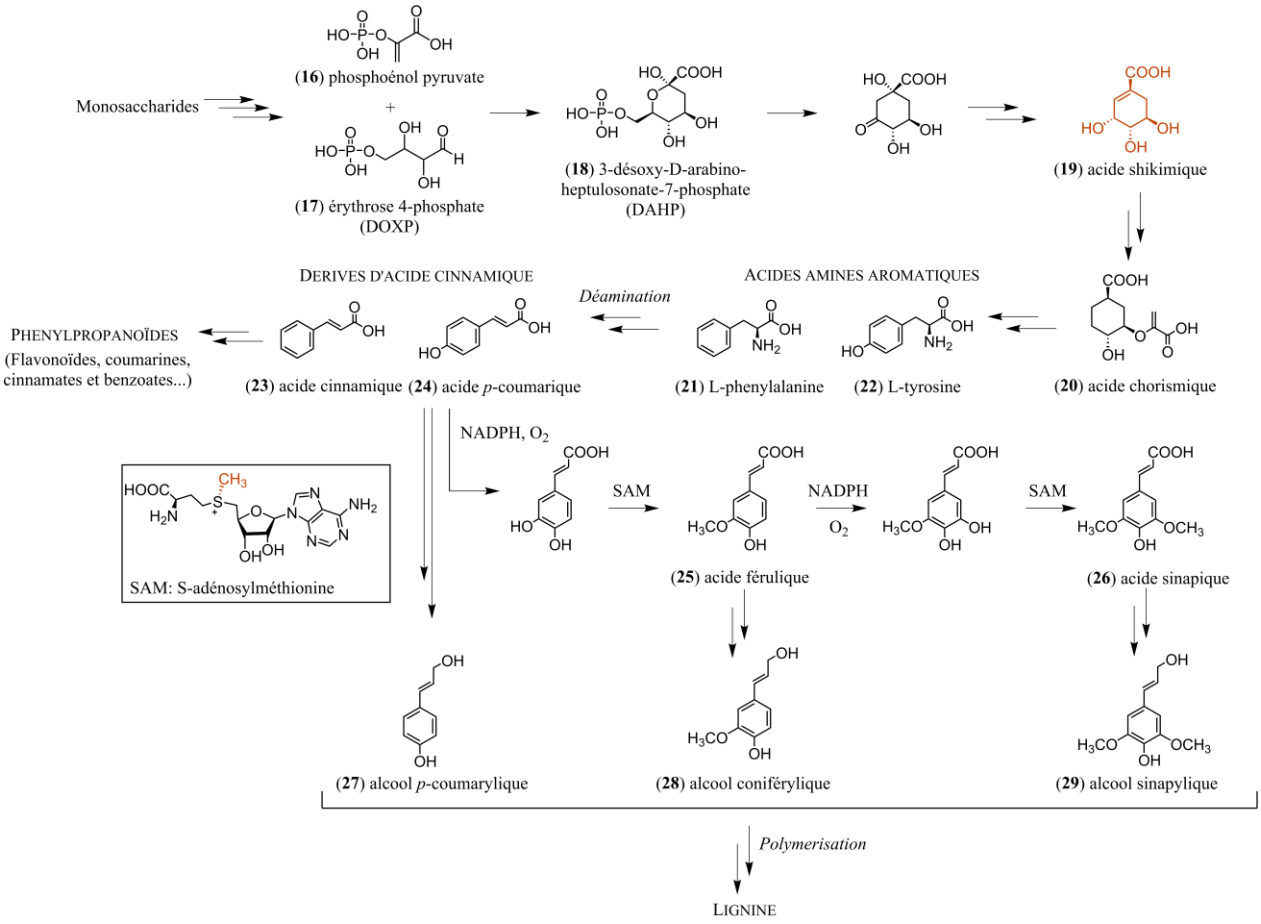


FIG. 1.5 Voie du shikimate utilisée chez les plantes pour la formation de l'acide chorismique à partir duquel sont synthétisés les acides aminés aromatiques, les phénylpropanoïdes, dont les dérivés de l'acide cinnamique et la lignine (d'après Herrmann, 1995, Dewick, 2002).

1.2. Diversité et spécificité des lipides au sein des plantes

Les lipides sont universellement représentés au sein du règne végétal sous des formes très variées telles que les terpènes qui comptent plus de 30 000 dérivés (Langenheim, 2003). Parmi la multitude de produits naturels répertoriés, certains sont omniprésents chez l'ensemble des plantes (par exemple, les composés linéaires constituant la cire épicuticulaire), tandis que d'autres sont spécifiquement synthétisés au sein de famille(s), genre(s), voire espèce(s) de plantes. Par ailleurs, la majorité des lipides, de par leur caractère aliphatique et hydrophobe en particulier, ont la capacité d'être préservés à travers le temps (Eglinton et *al.*, 1991) et il est fréquent qu'au sein de sédiments, de sols ou de restes archéologiques de matériel issu de plantes (les exsudats de végétaux, par exemple) soit conservée l'empreinte

moléculaire issus des organismes producteurs. A cet égard, les milieux désertiques et aquatiques présentent des caractéristiques environnementales particulièrement propices à la préservation des lipides (Evershed et *al.*, 1985, Connan et *al.*, 2000). De par leur spécificité, certains des lipides de végétaux, qui composent cette empreinte moléculaire émanant du passé, constituent d'excellents outils moléculaires, appelés « biomarqueurs », permettant l'identification précise des organismes sources. La pertinence d'un biomarqueur repose sur deux critères fondamentaux : sa spécificité structurale, tout naturellement, mais également son faible potentiel de dégradation. Ce dernier critère est considérablement important dans le cadre d'études en archéométrie puisque la matière organique examinée a souvent subi de sévères réactions de dégradation à travers le temps (Evershed, 2008). Parmi les biomarqueurs présentés dans la littérature, les diterpènes et les triterpènes ont fait l'objet de nombreuses applications dans le domaine de l'archéologie, et ce pour trois raisons principales. La première réside dans le fait que ces composés présentent une volatilité compatible avec l'utilisation de la chromatographie gazeuse (GC), technique couramment utilisée en sciences analytiques. Deuxièmement, leur capacité de résistance nous amène à les retrouver au sein de formations géologiques extrêmement anciennes, telles que des sédiments anciens (ten Haven et *al.*, 1992, Hautevelle et *al.*, 2006), des hydrocarbures fossiles comme le pétrole (Noble et *al.*, 1985, Rullkötter et *al.*, 1994), de même qu'au sein de bois ou de plantes fossilisés (Marynowski et *al.* 2007, Nakamura et *al.*, 2010). Bien qu'ils aient enduré de complexes réactions d'oxydation, de réduction, d'ouverture ou perte de cycle(s), d'aromatisation ou d'isomérisation au cours de la diagénèse, le squelette carboné des di- et triterpènes peut être suffisamment préservé et reconnaissable pour indiquer un apport de végétaux terrestres et en préciser, dans certains cas, les organismes précurseurs. Les ambres, dont la plupart sont datés à partir du Tertiaire avec quelques rares évidences au Carbonifère, au Trias, au Jurassique et au Crétacé (Langenheim, 2003, Roghi et *al.*, 2006, Sargent Bray et Anderson, 2009, Azar et *al.*, 2010) en sont, par exemple, une parfaite illustration. En effet, les analyses en géochimie organique de ces résines végétales fossilisées ont montré la présence de diterpènes et triterpènes, issus pour la plupart de résines de dammar (Dutta et *al.*, 2009, 2014, Mallick et *al.*, 2014) ou de conifères (Otto et *al.*, 2002, Lyons et *al.*, 2009, Dutta et *al.*, 2011) auquels s'ajoutent, parfois, quelques incrustations de feuilles, de bois ou de petits insectes. L'identification de résines ayant quelques millions d'années et dans lesquelles ont été préservés des triterpènes polyfonctionnalisés, inchangés par rapport à leur molécule précurseur (Dutta et *al.*, 2014), prouve la capacité de résistance des terpénoïdes face aux processus diagénétiques. Précisons tout de même que cet état de préservation des lipides

dépend étroitement du contexte environnemental étudié. Ainsi, par exemple, dans les sols, les conditions physico-chimiques (conditions relativement oxydantes) et l'activité microbienne ne favorisent pas la préservation.

Le troisième avantage à considérer les diterpènes et les triterpènes dans le cadre d'études archéologiques est leur importante diversité et spécificité. Un des cas le plus parlant et le plus usité en archéologie moléculaire concerne les résines terpéniques. En effet, le règne végétal se divise en de nombreux groupes et sous-groupes répartis principalement en fonction des caractéristiques morphologiques, anatomiques et génétiques des plantes. Les angiospermes (plantes à fleurs) et les gymnospermes (groupe qui inclut les conifères) représentent deux sous-divisions majeures de la classification des plantes qui se distinguent notamment par l'utilisation de différentes voies de biosynthèse, expliquant, en partie, la production de lipides qui leur sont propres et spécifiques (Bohlmann et *al.*, 1998, Phillips et *al.*, 2006). D'un point de vue chimiotaxonomique, ces deux sources végétales se distinguent très majoritairement par la prédominance respective de triterpènes et de diterpènes[2], une distinction importante fréquemment utilisée pour différencier les résines dites « triterpéniques » de celles dites « diterpéniques » (Langenheim, 2003).

1.2.1. Les résines issues d'angiospermes

La Figure 1.6 illustre tout autant la diversité que la spécificité des terpènes chez les angiospermes et montre quelques exemples de biomarqueurs ayant des applications en archéologie moléculaire. Prenons l'exemple de quatre résines bien distinctes chimiquement : le styrax, l'oliban, la gomme de mastic et la résine de dammar. Les triterpènes de la résine de styrax -un exsudat odorant issu des *Styracaceae*- se composent spécifiquement des dérivés oxygénés en 6β de l'acide oléanolique (composés **30**-**32**, Figure 1.7). Cette spécificité moléculaire nous a alors permis de suggérer le recours à une résine de styrax dans le cadre de rites ancestraux (cf. Chapitre 4). L'oliban, une résine aromatique collectée sur les arbres appartenant au genre *Boswellia* (Langenheim, 2003), se caractérise, quant à elle, par la présence des acides α-boswellique et β-boswellique ainsi que de leurs analogues acétylés

[2] Il convient de préciser à ce propos que cette vision dichotomique selon laquelle les gymnospermes sont capables de ne synthétiser que des diterpènes et les angiospermes que des triterpènes est, en réalité, une vision très simpliste. La complexité du monde végétal fait que certains angiospermes produisent des diterpènes. Ainsi, par exemple, l'exsudat résineux ou « copal » issu des espèces *Hymenaea* et *Copaifera* (famille des Fabacées) contient des acides diterpéniques de la famille des labdanes (Regert et *al.*, 2008, Crowther et *al.*, 2015). En outre, d'autres composés diterpéniques comme le phytol (alcool diterpénique intervenant dans la composition de la chlorophylle) et l'acide gibbérellique (diterpène tétracyclique stimulant la croissance des plantes ; Coulombe et Paquin, 1959) sont ubiquistes au sein du règne végétal.

(composés **33**-**36**, Modugno et *al.*, 2006a). De nombreuses publications rapportent ainsi la présence d'oliban sur des tessons de céramiques (Regert et *al.*, 2008) ou au sein de structures archéologiques tel un cellier en Egypte Nubienne datant du 4ème-5ème siècle de notre ère (Evershed et *al.*, 1997) ou une maison incendiée datée du 2ème siècle après J.-C. au Yémen (Mathe et *al.*, 2007). Le mastic, extrait des pistachiers, était également un matériau couramment employé à la période antique. Celui-ci est aisément reconnaissable de par la présence de triterpènes typiquement associés à cette espèce végétale, parmi lesquels les acides moronique, masticadiénonique et isomasticadiénonique (composés **37**-**39** ; van der Doelen et *al.*, 1998, Modugno et *al.*, 2006a), qui ont permis de mettre en lumière la présence de cette résine au sein d'un encensoir égyptien (Modugno et *al.*, 2006a) ou son utilisation comme produit d'embaumement lors de la momification durant la période Ptolémaïque (Buckley et Evershed, 2001, Charrié-Duhaut et *al.*, 2007). La dernière résine triterpénique largement répandue et fréquemment identifiée en contexte archéologique est la résine de dammar issue des *Dipterocarpaceae* pour laquelle les biomarqueurs spécifiques sont, entre autres, la dammaradiénone, le dammaradiénol et l'acide dammarénolique (composés **40**-**42** ; van der Doelen et *al.*, 1998, Lampert et *al.*, 2003). Cette résine a ainsi pu être identifiée à l'intérieur de jarres asiatiques datant du 15ème et 16ème siècle après J.-C. (Burger et *al.*, 2011), sur des tessons de poteries découverts en Thaïlande (Lampert et *al.*, 2003) ou au sein de vernis appliqués à la surface de peintures à partir du 19ème siècle (van der Doelen et *al.*, 1998, Colombini et *al.*, 2000).

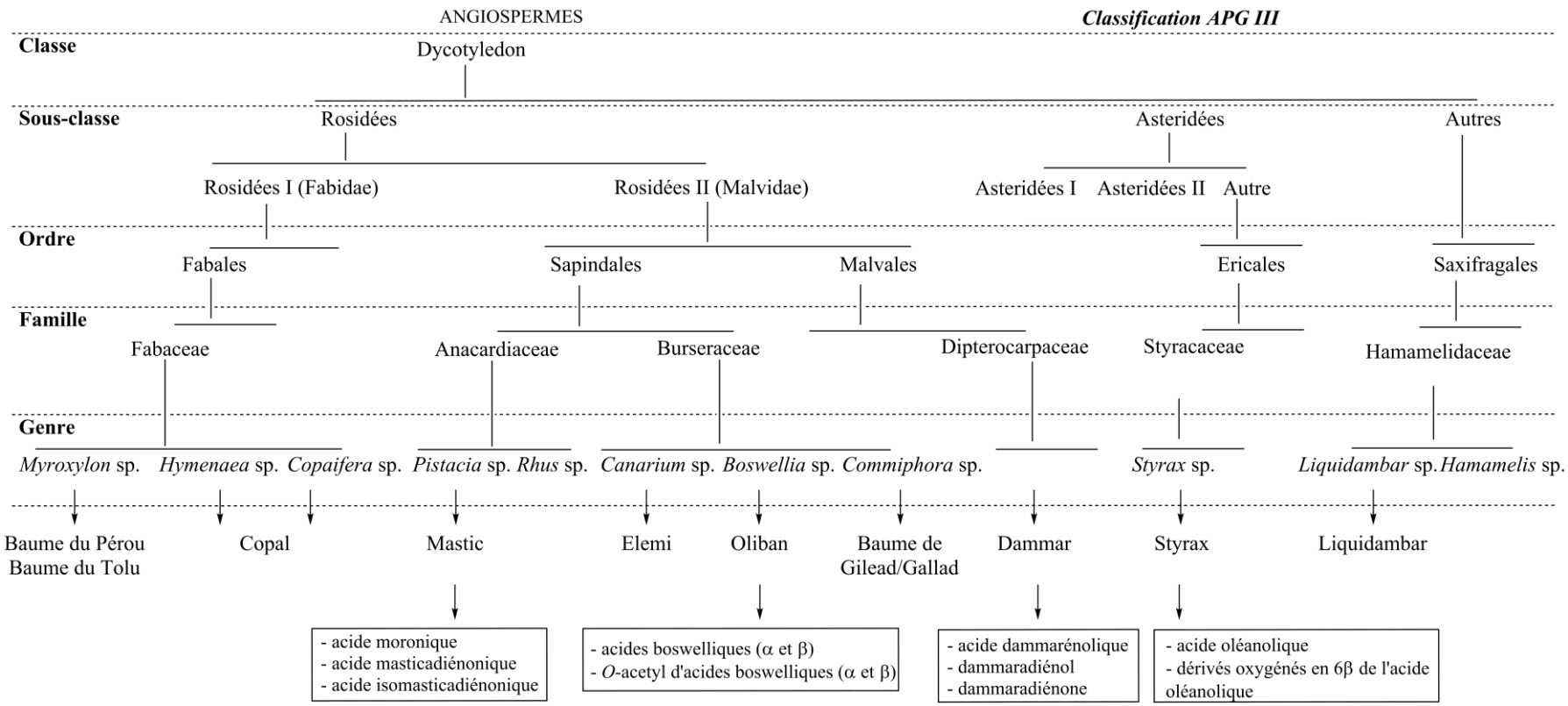


Fig. 1.6 Classification partielle des angiospermes à l'origine des résines terpéniques présentant la diversité des triterpènes biosynthétisés de même que leur spécificité. Les biomarqueurs utilisés en archéométrie moléculaire sont listés dans les rectangles (se rapporter à la Figure 1.7 pour les structures moléculaires).

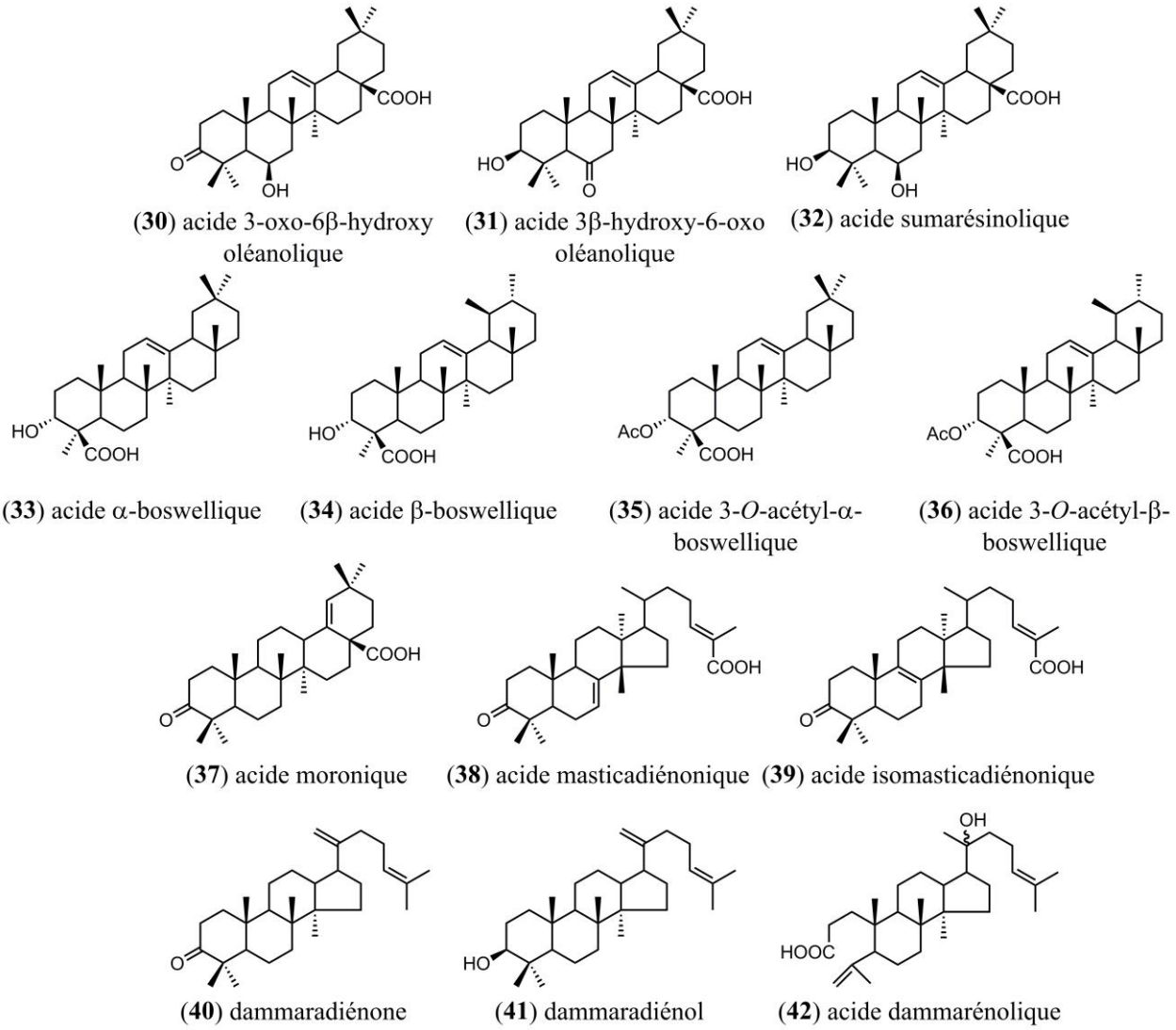


FIG. 1.7 Structures moléculaires de biomarqueurs caractérisant quelques-unes des résines triterpéniques trouvées en archéologie: (**30**-**32**) résine de styrax, (**33**-**36**) oliban, (**37**-**39**) gomme de mastic et (**40**-**42**) résine de dammar.

1.2.2. Les résines issues de gymnospermes

L'approche moléculaire décrite ci-dessus pour les résines triterpéniques est également applicable dans le cas des résines diterpéniques, issues principalement de gymnospermes. Dans le domaine de l'archéologie, trois principales familles de résines ont été décrites dans la littérature de manière abondante, faisant suite à l'utilisation répandue de matériel végétal issu de gymnospermes depuis les temps anciens. Il s'agit des résines de Pinacées, d'Araucariacées et de Cupressacées qui se composent, de manière générale, d'un ensemble de diterpènes présentant des squelettes de type abiétane, pimarane et labdane (structures en Figure 1.8 ; Langenheim, 2003). Toutefois, il a souvent été noté que les résines diterpéniques se

composaient généralement d'un mélange de constituants des trois familles et que la distinction entre les différentes résines ne pouvait se fonder, bien souvent, que sur les abondances relatives des différents composés (Bailly, 2015).

Globalement, les résines de Pinacées sont constituées principalement d'acide abiétique (composé majoritaire, **43**, Figure 1.8) et de ses isomères -les acides lévopimarique (**44**), néoabiétique (**45**) et palustrique (**46**)- en association avec les acides pimarique (**47**), sandaracopimarique (**48**) et isopimarique (**49** ; Colombini et *al.*, 2005a, Steigenberger, 2013) mais se distinguent, en outre, des autres résines de conifère par l'absence de diterpènes tétracycliques (squelette de type kaurane ou beyerane, composés **50** et **51** par exemple) et de dérivés phénoliques de l'abiétane, comme le sugiol (**52**) ou le ferruginol (**53** ; Hautevelle et *al.*, 2006). Steigenberger (2013) a également observé une concentration de l'acide pimarique généralement plus importante que celle de l'acide sandaracopimarique dans les résines issues de différentes espèces de *Pinus* (même s'il existe quelques contre-exemples tels que *P. halepensis* et *P. brutia* qui ne contiennent pas d'acide pimarique ; Joye et Lawrence, 1967, Bailly, 2015) alors que l'inverse est la règle pour les résines de *Picea*, permettant ainsi une distinction au niveau moléculaire de ces deux genres (à l'exception de *P. halepensis* et *P. brutia*, cf. ci-dessus). Le genre *Larix* se caractérise, quant à lui, par la présence de marqueurs spécifiques que sont le larixol (**54**) et l'acétate de larixyle (**55**, Figure 1.8). Enfin, les résines issues de Pinacées du genre *Abies* se démarquent notamment par l'absence d'acide pimarique et par une teneur significative en *cis*-abiénol (**56** ; Steigenberger, 2013, Bailly, 2015). En contexte archéologique, ces résines naturelles ou les matériaux issus de la pyrolyse de bois de Pinacées (poix, goudrons, …) sont très fréquemment identifiés, que ce soit en milieu maritime où ils étaient utilisés pour le calfatage des bateaux (Colombini et *al.*, 2003, Connan et Nissenbaum, 2003, Bailly, 2015), au sein d'anciennes amphores et jarres (Colombini et *al.*, 2005b, Salvini et *al.*, 2008) -dont certaines étaient poissées en particulier lorsqu'il s'agissait de transporter et de stocker du vin (Jerković et *al.*, 2011)-, ou encore dans le milieu artistique où l'emploi de résines de Pinacées au sein de vernis d'œuvres d'art a été établi (Pastorova et *al.*, 1997a, Osete-Cortina et Doménech-Carbó, 2005).

Les résines issues de Cupressacées incluent les résines des genres *Tetraclinis* (résine de sandarac), *Cupressus* (cyprès) et *Juniperus* (genévrier). Ces résines se distinguent par l'importance des dérivés de type labdane dont les acides *cis*- et *trans*- communiques (**57** et **58**, Figure 1.8) qui confèrent une rigidité et viscosité importante à ces résines liées à leur polymérisation (Mills et White, 1977). L'acide sandaracopimarique (**48**) et l'acide 12-

acétoxy-sandaracopimarique (**59**) sont également présents dans ces résines en quantité non négligeable (Osete-Cortina et Doménech-Carbó, 2005, Steigenberger, 2013). Certaines publications font état de l'usage de résines de Cupressacées pour la formulation de vernis de peinture (Mills et White, 1977, Dunkerton et White, 2000) ou pour un usage thérapeutique (Lev et Amar, 2008, Adams et *al.*, 2009).

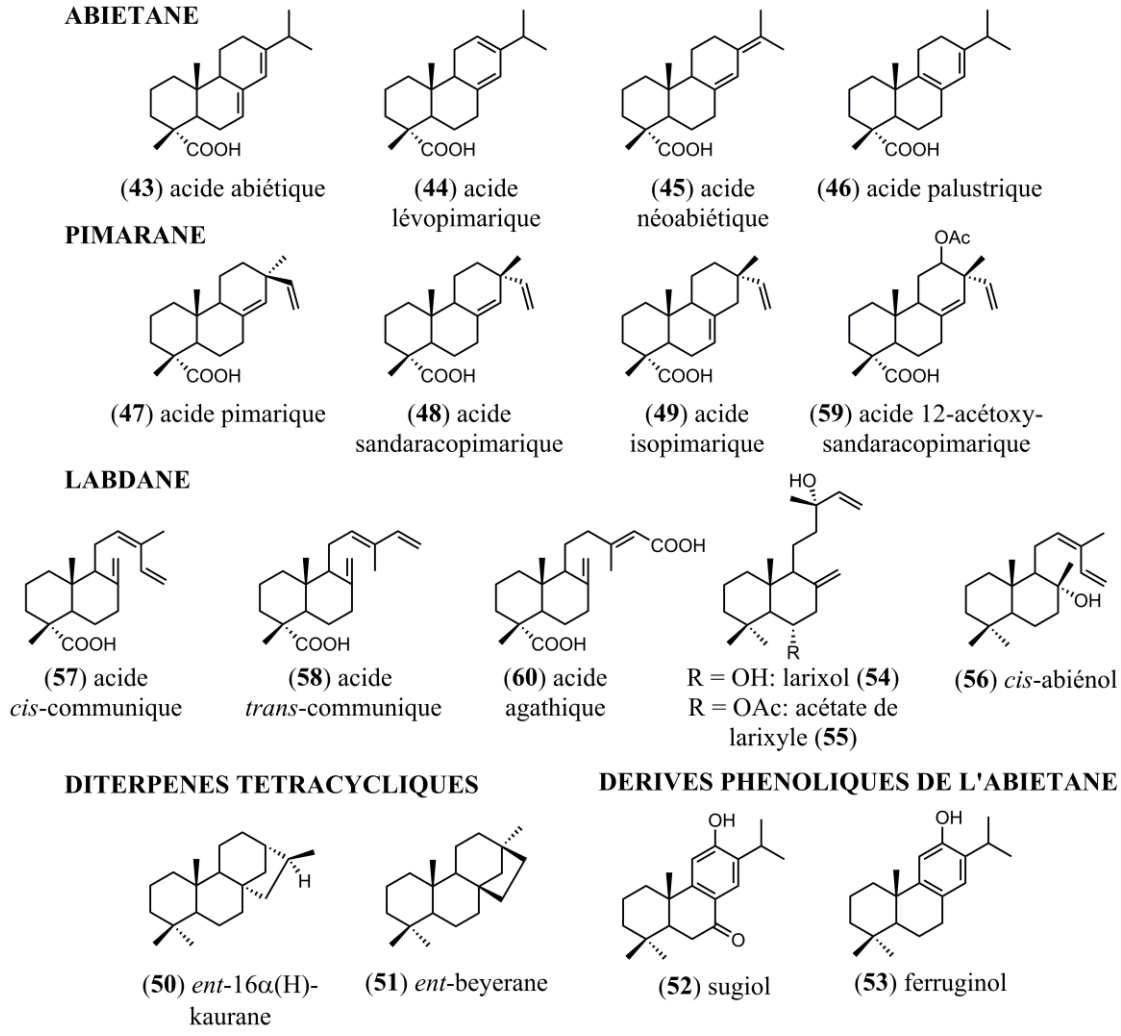


FIG. 1.8 Structures moléculaires de quelques composés diterpéniques présents dans des résines de gymnospermes.

Parmi les résines de la famille des Araucariacées, on compte les résines de copal de Manille ou de kauri. Ces résines se définissent par une quantité importante d'acide agathique (**60**) auquel s'ajoute l'acide sandaracopimarique (**48**) et les dérivés d'acide communique (**57** et **58** ; Mills et White, 1977, Osete-Cortina et Doménech-Carbó, 2005). Ces résines sont parfois trouvées dans les vernis (Langenheim, 2003).

1.2.3. Ce que nous apprennent les biomarqueurs…

L'étude des résines et de matériel végétal en archéométrie donne lieu à une reconstitution des us et coutumes des peuples anciens. Ainsi, lorsque certaines ressources végétales identifiées ne peuvent être natives du lieu de leur découverte, celles-ci ont nécessairement été importées de pays plus ou moins lointains, ce qui permet alors d'établir des routes de commerce et d'échanges (Colombini et *al.*, 2005a, Regert et *al.*, 2008). Outre ce travail d'identification, il est également intéressant de constater que les biomarqueurs, de par leur transformation à partir de leurs molécules précurseurs, contiennent de précieuses informations ayant trait aux techniques artisanales de fabrication mais également aux conditions environnementales du milieu dans lequel un objet archéologique a été enfoui. Dans le cas de matériaux élaborés à partir de bois, comme les goudrons et le brai de bouleau, le recours à une chauffe intense (pyrolyse) engendre la formation de nouveaux composés spécifiques liés à ces processus thermiques. Le brai de bouleau, par exemple, formé par traitement thermique de l'écorce de bouleau, contient des dérivés de type allobétulane (cf. Chapitre 5) dont la présence permet de faire la différence entre brai de bouleau et matériel originel (bois, écorce). De manière analogue, l'identification de constituants diterpéniques aromatiques, tels que le rétène (**61**, Figure 1.9), atteste généralement d'un processus de pyrolyse de matériel issu de Pinacées (bois ou résine ; Evershed et *al.*, 1985, Beck et *al.*, 1997, Egenberg et Glastrup, 1999, Colombini et *al.*, 2005a,b). Lorsque la présence de rétène est accompagnée de celle du déhydroabiétate de méthyle (**62**), on a affaire à une poix impliquant de ce fait une préparation par pyrolyse de bois (Colombini et *al.*, 2005a, Hjulström et *al.*, 2006). Toutefois, l'utilisation du rétène comme marqueur d'altération thermique n'est possible qu'à condition que le milieu environnemental dans lequel le matériel résineux étudié a été préservé est oxygéné (milieu oxique). En effet, il a été montré que le rétène pouvait également être formé par altération diagénétique des acides diterpéniques en milieu aquatique anoxique (Simoneit et *al.*, 1986, Martin et *al.*, 1999). Ainsi, dès lors que l'étude chimiotaxonomique concerne, par exemple, des restes d'enduits poissés ou des contenus d'amphores mis au jour dans le cadre de fouilles d'épaves, en milieu aquatique, les processus diagénétiques à l'origine de la formation du rétène ne doivent pas être négligés (Reunanen et *al.*, 1990). Le rapport 18-norabiétatriène (**63**) / 19-norabiétatriène (**64**) peut alors servir d'indicateur moléculaire pour distinguer un produit de conifère ayant subi un traitement thermique (rapport **63**/**64** ~ 1,5) de celui ayant été transformé diagénétiquement en conditions anaérobies (rapport **63**/**64** nettement en faveur du 18-norabiétatriène ; Bailly, 2015). En outre,

ces composés aromatiques d'origine diagénétique et thermique peuvent être distingués sur la base de leur composition isotopique H/D (Bailly, 2015).

Au contraire d'une altération forcée liée à la préparation des matériaux organiques issus de conifères, la dégradation naturelle des résines de Pinacées, en conditions oxiques, conduit à la formation de composés tels que les acides déhydroabiétique (**65**), 7-oxodéhydroabiétique (**66**), 15-hydroxy-7-oxo-déhydroabiétique (**67**) ou 15-hydroxy-déhydroabiétique (**68**) du fait de réactions d'oxydation et d'une aromatisation peu intense (Pastorova et *al.*, 1997a, Colombini et *al.*, 2005a, Jerković et *al.*, 2011). Précisons tout de même qu'une résine non chauffée peut être dégradée *a posteriori* par des processus anaérobies lors de son enfouissement dans des sédiments anoxiques. Les processus d'aromatisation pouvant aller jusqu'au rétène seront favorisés dans ces conditions par rapport à la formation des produits d'oxydation benzylique **65** à **68** (cf. discussion ci-dessus).

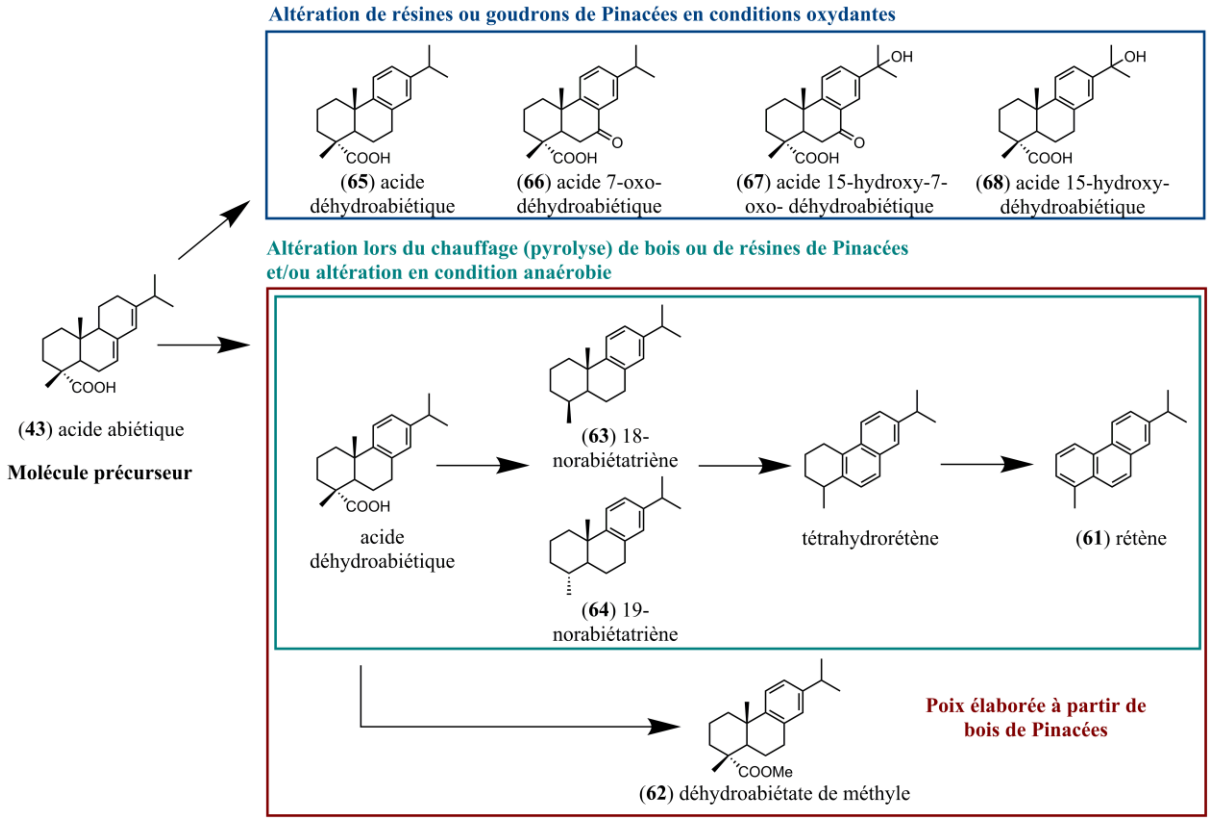


FIG. 1.9 Mécanisme d'altération de l'acide abiétique (d'après Simoneit et *al.*, 1986, Otto et Simoneit, 2002, Colombini et *al.*, 2005a).

1.3. Apport de l'étude des isotopes du carbone en archéologie

Les lipides (dont ceux de végétaux), et plus généralement la matière organique étudiée dans le cadre d'investigations en archéométrie, sont composés principalement de carbone et d'hydrogène et, dans une moindre mesure, d'oxygène. Le carbone, notamment, se définit par son nombre de protons (Z = 6) et son nombre de neutrons variable selon les isotopes (N = 6, 7 et 8 pour le ^{12}C, ^{13}C et ^{14}C respectivement). Sur terre, l'abondance naturelle de ces isotopes du carbone se répartit de la manière suivante : 98,89 % et 1,11 % respectivement pour le ^{12}C et le ^{13}C, les deux isotopes stables du carbone, et 0,0000000001 % pour le ^{14}C (radioactif). Les mesures du rapport des isotopes stables du carbone ($^{13}C/^{12}C$) et de datation au ^{14}C connaissent un intérêt particulier en archéologie moléculaire et ont, d'ailleurs, été utilisées au cours de mes travaux de thèse. C'est la raison pour laquelle le principe de ces deux techniques sera développé ci-dessous.

1.3.1. Mesure du rapport isotopique $\delta^{13}C$

La composition isotopique en carbone est exprimée sous forme d'une valeur de $\delta^{13}C$ (‰) qui donne la déviation du rapport $^{13}C/^{12}C$ de la molécule étudiée par rapport à celle d'un standard international (équation 3 ci-dessous) qui était à l'origine le PDB -pour Pee Dee Belemnite ($^{13}C/^{12}C$ égal à 0,01112372), un carbonate datant du Crétacé- et qui est actuellement remplacé par le VPDB (Vienna Pee Dee Belemnite).

$$\delta^{13}C\ (‰) = \frac{^{13}C/^{12}C_{échantillon} - ^{13}C/^{12}C_{standard}}{^{13}C/^{12}C_{standard}} \times 1000 \qquad \textbf{(3)}$$

L'analyse isotopique peut être réalisée en « *bulk* », c'est-à-dire que l'échantillon est considéré dans sa globalité et que le rapport isotopique est mesuré pour l'intégralité des composés (lipides, protéines, …). Le rapport isotopique mesuré représentera alors une moyenne des $\delta^{13}C$ des différents constituants. Un second type de mesure peut être choisi et concerne l'analyse de composés individuels qui auront été séparés en amont par GC. Il sera alors possible de distinguer des variations isotopiques entre des composés d'une même famille chimique, ou entre différentes familles. Ces analyses sont réalisées au moyen d'un appareil de GC-*c*-IRMS (pour « *coupled Gas Chromatography-combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry* ») représenté schématiquement ci-dessous (Figure 1.10). Une fois séparés par la colonne GC, les analytes sont dirigés vers un four de combustion, chauffé à 1000 °C, qui transforme quantitativement les composés organiques en CO_2 et H_2O, eau qui sera ensuite

éliminée au moyen d'un piège. Chaque analyte est par la suite détecté par le spectromètre de masse de rapport isotopique (IRMS) sous la forme de CO_2 de masse *m/z* 44 ($^{12}C^{16}O^{16}O$), 45 ($^{13}C^{16}O^{16}O$ et $^{12}C^{17}O^{16}O$) et 46 (principalement $^{12}C^{16}O^{18}O$), selon les isotopes impliqués, à partir duquel le rapport $^{13}C/^{12}C$ sera calculé. La masse 46 permet d'évaluer la contribution du ^{12}C qui interfère avec le ^{13}C lors de la mesure de la masse 45 ($^{12}C^{17}O^{16}O$), et cela grâce à la relation de linéarité qui existe entre les abondances en ^{17}O et ^{18}O, intervenant respectivement dans les masses 45 et 46.

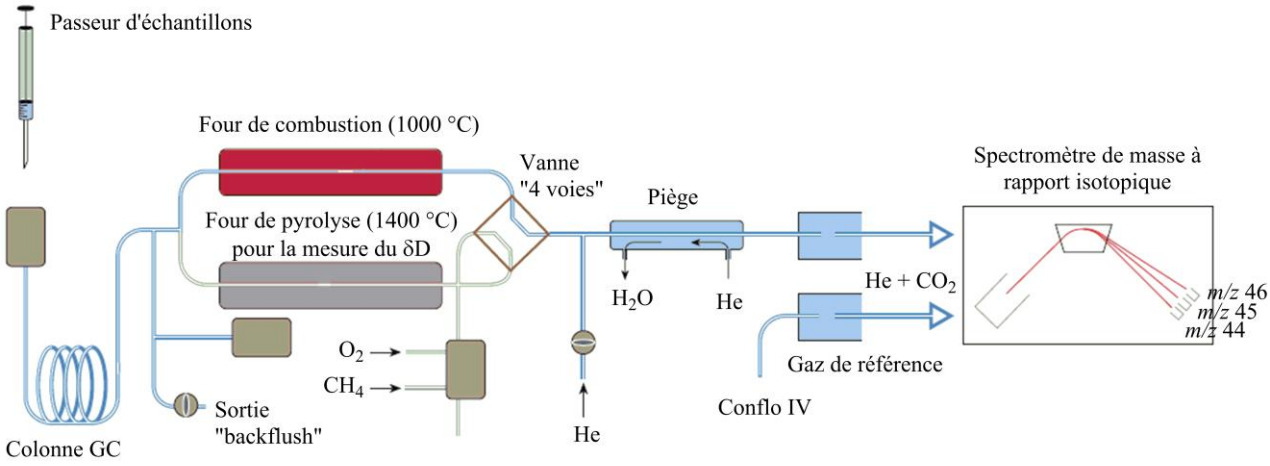


FIG. 1.10 Schéma descriptif du fonctionnement de l'appareil de GC-*c*-IRMS (*Source de l'image*: Thermo Scientific).

En archéométrie, les analyses isotopiques du carbone visent principalement à reconstituer les régimes alimentaires par l'étude des rapports $^{13}C/^{12}C$ du collagène, qui est souvent préservé dans les os fossilisés ou l'émail des dents (Koch et *al.*, 1994), ainsi que de certains lipides apportés par l'alimentation (acides gras, cholestérol, par exemple). Ces études se fondent sur des variations de la composition isotopique au sein des différents organismes vivants induites par plusieurs facteurs dont, notamment, la source de carbone utilisée par l'organisme qui produit ces composés, le mode de fixation du carbone (photosynthèse, hétérotrophie, …), ainsi que le métabolisme mis en jeu (Marshall et *al.*, 2007). De manière générale, les organismes vivants assimilent préférentiellement le ^{12}C par rapport au ^{13}C. Cette préférence entraîne un fractionnement isotopique et conduit donc à des valeurs négatives de $\delta^{13}C$ dans le cas de molécules organiques (appauvrissement relatif en ^{13}C par rapport au standard ; O'Leary, 1988). Toutefois, certains organismes assimilent des proportions relativement plus importantes de ^{13}C du fait de leur métabolisme particulier, ce qui entraîne des différences de composition isotopique caractéristiques qui vont permettre de les

caractériser. Il s'agit notamment des plantes dites en C4 qui peuvent être distinguées des plantes en C3. Ces dernières regroupent les plantes ligneuses et herbacées vivant dans nos régions tempérées alors que les plantes en C4 – parmi lesquelles le maïs, le millet, le sorgho et la canne à sucre – se développent, en particulier, dans les régions subtropicales et tropicales en raison d'un métabolisme spécifiquement adapté aux climats chauds (Brown, 1999). Les composés organiques issus de ces plantes en C3 et C4 présentent des rapports isotopiques bien distincts du fait de différences enzymatiques et physiologiques (Figure 1.11 ; Marshall et *al.*, 2007).

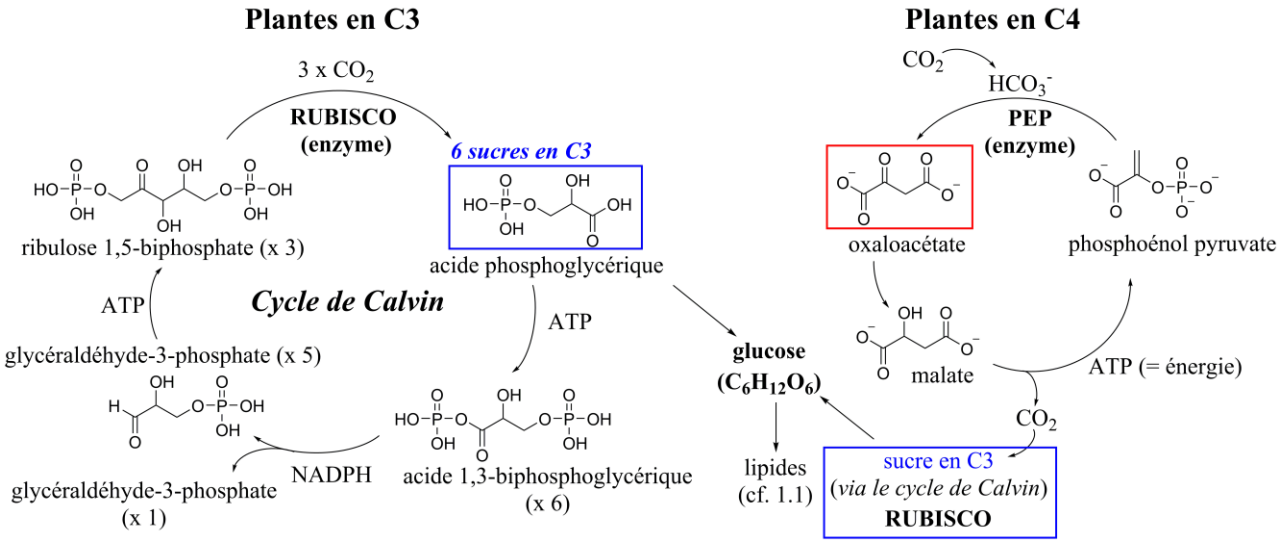


FIG. 1.11 Voies de biosynthèse du glucose par l'assimilation du CO_2 atmosphérique chez les plantes dites en « C3 » et en « C4 ». Le glucose est utilisé ensuite pour la biosynthèse des lipides (d'après Touzeau, 2014).

Dans les chloroplastes des plantes dites « en C3 », localisés au sein des cellules de parenchyme (Figure 1.12), la fixation du CO_2 sur le ribulose 1,5-biphosphate par l'enzyme Rubisco (ou ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase) est la première étape de la photosynthèse qui, à travers un enchaînement de réactions biochimiques (cycle de Calvin), conduit à la formation du produit biosynthétique primaire : l'acide phosphoglycérique à trois atomes de carbone. Cette enzyme de Rubisco favorise nettement l'incorporation du $^{12}CO_2$ par rapport au $^{13}CO_2$ ce qui induit un fractionnement isotopique important ($\Delta\delta \sim 29$ ‰ ; Hayes, 2001, Marshall et *al.*, 2007). En additionnant ce fractionnement isotopique à celui lié au processus de diffusion du CO_2 atmosphérique ($\delta^{13}C$ = -8 ‰) à travers les stomates de la plante ($\Delta\delta \sim 4{,}4$ ‰ ; Touzeau, 2014), les composés organiques issus des plantes en C3 se trouvent fortement appauvris en ^{13}C.

En revanche, dans le cas de la photosynthèse des plantes dites « en C4 », s'ajoute une étape de transport du CO_2 atmosphérique vers les cellules de la gaine périvasculaire où la photosynthèse proprement dite aura lieu. Tout commence dans les cellules du mésophylle (Figure 1.12) dans lesquelles le CO_2 est converti en HCO_3^-. Ce dernier est ensuite fixé par l'enzyme PEP (phosphoénolpyruvate carboxylase) pour donner l'oxaloacétate, un composé contenant quatre atomes de carbone, qui est transformé, par la suite, en malate (Figure 1.11). Ce dernier est alors transporté vers les cellules de la gaine périvasculaire, riches en chloroplastes, puis décarboxylé pour libérer à nouveau du CO_2 qui sera alors utilisé dans la biosynthèse de l'acide phosphoglycérique via le cycle de Calvin (intervention de la Rubisco ; Brugnoli et Farquhar, 2000). Ainsi, le rôle de l'oxaloacétate en C4 consiste exclusivement à transporter le CO_2 vers les cellules capables d'effectuer la photosynthèse. En ce qui concerne le fractionnement isotopique des plantes en C4, celui-ci implique donc à la fois la conversion du CO_2 en HCO_3^- (+9 ‰ ; Touzeau, 2014), la diffusion de ce dernier à travers les stomates (-4 ‰), le fractionnement isotopique propre à l'enzyme PEP (-2 ‰) et enfin celui pouvant être occasionné par la Rubisco. La Rubisco ne disposant, dans les plantes en C4, que du CO_2 apporté par le malate au sein des cellules de la gaine périvasculaire, elle utilise une proportion plus grande du CO_2 disponible, ce qui implique plus de $^{13}CO_2$, que la Rubisco dans les plantes en C3 qui dispose d'un accès moins limité au CO_2 atmosphérique. Il en résulte un fractionnement isotopique moins important lors de la fixation du CO_2 par cette enzyme dans les plantes en C4, bien que le facteur de fractionnement isotopique de la Rubisco des plantes en C4 et celui de la Rubisco des plantes en C3 soient tout à fait similaires[3].

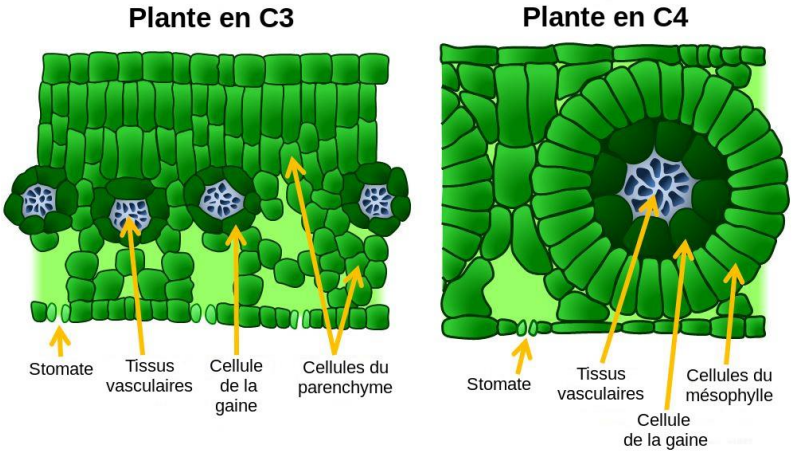


FIG. 1.12 Anatomie des plantes en C3 vs. C4 (Touzeau, 2014).

[3] Notons tout de même que la totalité du CO_2 apporté dans les cellules de la gaine périvasculaire n'est pas assimilé par la Rubisco du fait de la perméabilité de ces cellules qui laissent échapper du CO_2 enrichi en ^{13}C (du fait de l'action de la Rubisco ; Brugnoli et Farquhar, 2000). Si la totalité du CO_2 apporté par le malate était consommée ($^{12}CO_2$ et $^{13}CO_2$), nous n'aurions alors aucun effet isotopique lié à la Rubisco.

Les mesures « *bulk* » de $\delta^{13}C$ de tissus végétaux réalisées à partir de différentes espèces de plantes issues de ces deux familles montrent une différence nette de composition isotopique avec des valeurs de $\delta^{13}C$ comprises entre -20 ‰ et -36 ‰ pour les plantes en C3 et entre -9 ‰ et -20 ‰ pour les plantes en C4 (Figure 1.13 ; van der Merwe et Vogel, 1983, O'Leary, 1988, Koch et *al.*, 1994, Chikaraishi et *al.*, 2004b). Cette différence marquée, observée lors d'analyses isotopiques réalisées sur des tissus de plantes, subsiste -mais de manière moins tranchée- lorsqu'il s'agit d'étudier plus spécifiquement des composés organiques individuels, et en particulier les lipides. Du fait d'un fractionnement isotopique notable lors de la synthèse des lipides (à partir de l'acétyl-CoA ; cf. 1.1), la valeur de $\delta^{13}C$ de ces derniers est systématiquement plus négative (enrichissement relatif en ^{12}C) que celui de l'ensemble de la biomasse de la plante dont ils sont issus (DeNiro et Epstein, 1977). Malgré tout, les valeurs de $\delta^{13}C$ obtenues pour le β-sitostérol, les alcanes linéaires ou les acides gras issus de plantes en C3 restent bien distinctes de celles mesurées pour ces mêmes lipides issus de plantes en C4 (Figure 1.13 ; Ballentine et *al.*, 1998, Chikaraishi et *al.*, 2004b, Bi et *al.*, 2005, Chikaraishi et Naraoka, 2006, Mendez-Millan et *al.*, 2014).

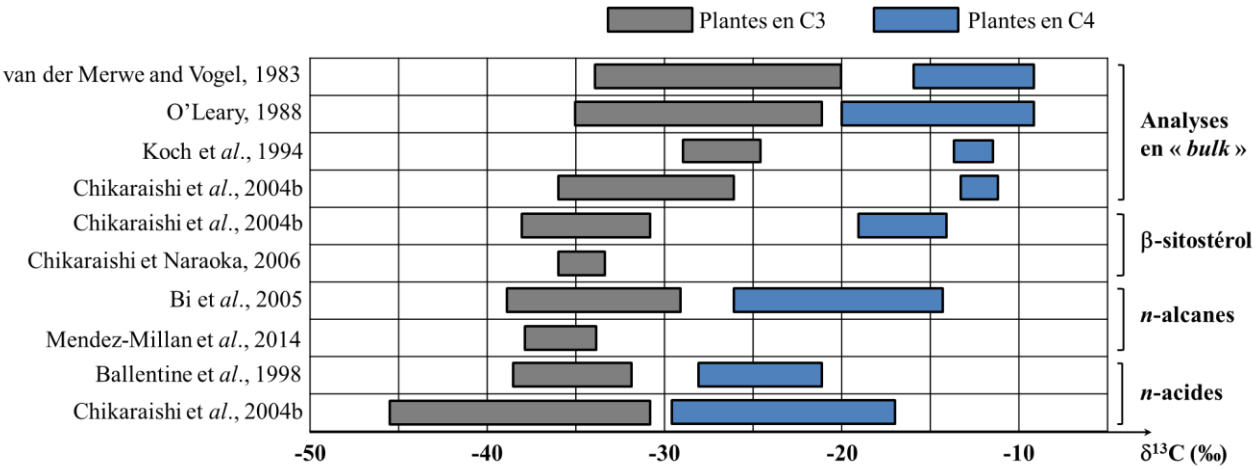


FIG. 1.13 Valeurs de $\delta^{13}C$ (‰) mesurées lors d'analyses isotopiques réalisées sur des plantes en C3 et en C4, considérées dans leur globalité (tissus), ainsi que pour quelques lipides ou familles de lipides issus de ces mêmes plantes (β-sitostérol, *n*-alcanes et *n*-acides).

En remontant dans la chaîne trophique, les animaux qui consomment de la matière végétale apportent à leur organisme certains composés qu'ils ne peuvent synthétiser par eux-mêmes ainsi qu'une source de carbone organique indispensable à la synthèse de nouveaux constituants. La composition isotopique des lipides ou des protéines, notamment, présents dans chaque organisme, sera donc dépendante de la source alimentaire. Des expériences sur

des rats et des cochons ont notamment montré que les valeurs de $\delta^{13}C$ du cholestérol et de certains acides gras ($C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{18:1}$ et $C_{18:2}$) extraits des os étaient représentatives des proportions relatives des aliments provenant de sources végétales en C3 et/ou en C4 dans l'alimentation globale (Stott et *al.*, 1997, Jim et *al.*, 2003, 2004). De telles analyses se sont ensuite développées en archéologie afin, notamment, de reconstituer les régimes alimentaires du passé. Par l'analyse des rapports isotopiques de lipides préservés en milieu sédimentaire, certains chercheurs ont ainsi mis en évidence la consommation de millet en France à partir de l'âge du Bronze (Jacob et *al.*, 2008a) tandis que d'autres, par l'examen du collagène osseux ou de l'émail de dents, ont pu déterminer l'époque où le maïs a été introduit en Amérique du Nord (Vogel et van der Merwe, 1977) et estimer la proportion de plantes en C3 et C4 dans l'alimentation de populations animales ou humaines (Richards et *al.*, 2003, van der Merwe et *al.*, 2003, Touzeau et *al.*, 2014). Il est également ressorti des analyses isotopiques réalisées sur des résidus d'acides gras conservés dans des céramiques que les valeurs de $\delta^{13}C$ de l'acide palmitique ($C_{16:0}$) et de l'acide stéarique ($C_{18:0}$), de même que la différence entre ces deux valeurs, $\Delta^{13}C$ ($= \delta^{13}C_{18:0} - \delta^{13}C_{16:0}$), constituaient des critères pertinents afin de différencier les tissus adipeux (graisse) de ruminants de ceux des non-ruminants (cochons notamment), mais aussi pour identifier la présence de produits laitiers issus de ruminants (Copley et *al.*, 2003, Evershed et *al.*, 2008, Dunne et *al.*, 2012). Enfin, des études ont également montré une différence entre la composition isotopique des acides stéarique et palmitique provenant d'un enfant allaité et de sa mère (entre 1 et 2 ‰), permettant ainsi d'évaluer l'âge de sevrage des jeunes enfants (Richards et *al.*, 2003).

1.3.2. Datation au radiocarbone (^{14}C)

La méthode de datation au carbone 14, telle que Libby l'a mise au point dans les années 1950, repose sur la mesure de comptage de la radioactivité résiduelle au sein de matériel organique, qui peut être reliée à son âge absolu par la loi de décroissance radioactive caractérisée par le temps de demi-vie du radiocarbone, qui est de 5730 ans (Libby et *al.*, 1949, Libby, 1960). En effet, au cours de sa vie, tout être vivant assimile par sa respiration ou son alimentation, et de manière continue, du radiocarbone issu de la réaction entre un neutron cosmique et un atome d'azote atmosphérique (^{14}N). Chaque organisme renferme donc une teneur constante de ^{14}C liée à la proportion de $^{14}CO_2$ dans l'atmosphère. A la mort de l'organisme, ce processus d'assimilation du radiocarbone cesse et la quantité de ^{14}C diminue progressivement suivant la loi de décroissance radioactive du carbone.

Cette technique de datation, qui révolutionna l'archéologie, permet de dater des objets entre 50 000 avant J.-C. et les années 1950 de notre ère, période au cours de laquelle les essais nucléaires ont profondément modifié les teneurs en ^{14}C dans l'atmosphère (Reimer et *al.*, 2004). Cette technique de datation dite « classique » nécessite l'utilisation de calibrations afin de pallier aux variations de la teneur en ^{14}C atmosphérique qui ont eu lieu de manière naturelle dans le passé (Fontugne, 2004) ou qui ont été induites par l'activité anthropique. Ces courbes de calibrations sont réalisées à partir, entre autre, de données dendrochronologiques et sédimentaires (Fontugne, 2004) et l'une des courbes de calibration fréquemment utilisée actuellement est la courbe IntCal13 mise au point par Reimer et *al.* (2013). Du fait de ces variations de concentration en ^{14}C atmosphérique, un âge mesuré en BP (« *Before Present* » où l'an 0 BP se rapporte à l'année 1950 de notre ère) peut donc être associé à plusieurs âges calibrés, exprimés en BC (« *Before Christ* ») ou en BP, avec des probabilités plus ou moins élevées comme cela est illustré en Figure 1.14. Les intervalles de temps obtenus peuvent être plus ou moins larges selon que l'on considère les résultats avec un écart-type de 2σ ou de 1σ. Dans le premier cas, la probabilité que l'âge réel de l'échantillon analysé se trouve dans l'intervalle de temps proposé est élevé (95,4 %) mais cet intervalle est, par conséquent, relativement large, tandis que l'intervalle de temps se trouve diminué dans le second cas avec une probabilité nécessairement plus faible (68,2 %).

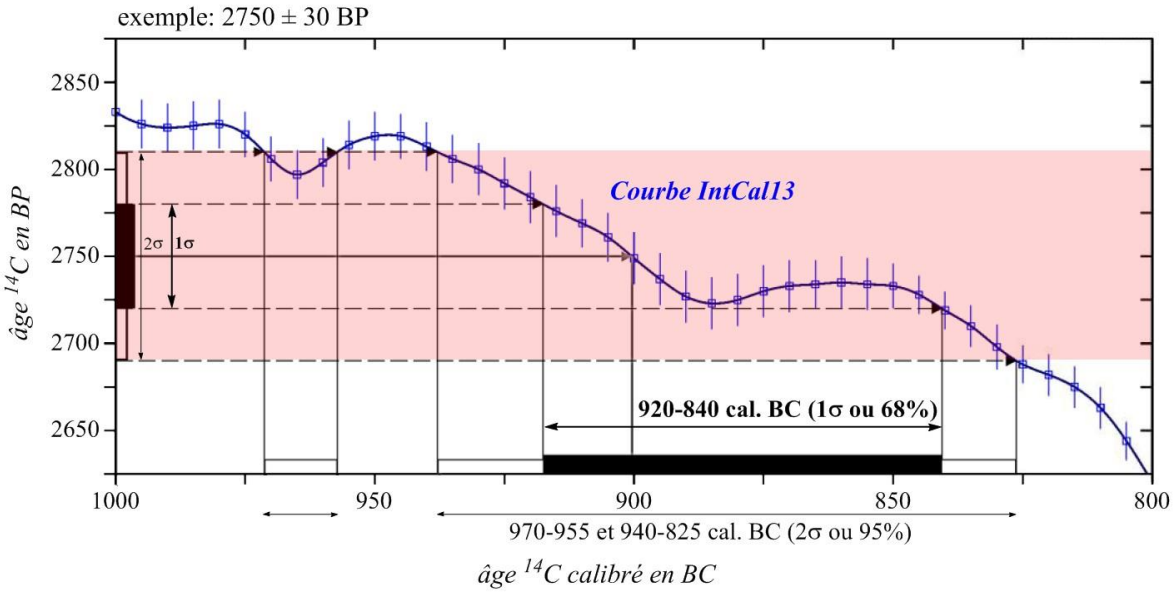


FIG. 1.14 Courbe de calibration IntCal13 utilisée à titre d'exemple pour un échantillon estimé à 2750 ± 30 BP (*source de l'image* : Beta Analytic Radiocarbon Dating Laboratory[4]).

[4] http://www.radiocarbon.com/PDF/Calibration-of-Radiocarbon-Age-Sample.pdf

Une autre limite majeure à cette technique de datation basée sur la mesure de la radioactivité résiduelle vient de la très faible abondance naturelle de l'isotope radioactif du ^{14}C (un atome de ^{14}C pour 1.10^{12} atomes de ^{12}C), ce qui, à l'origine, a impliqué de travailler à partir d'une grande quantité de carbone pour effectuer les mesures (de l'ordre du gramme). Pour remédier à ce problème de quantités d'échantillons, rarement atteignables dans le cas d'objets archéologiques, une technique de datation novatrice a été développée, à partir de la fin des années 1970, associant un accélérateur de particules à un spectromètre de masse (Müller, 1977). Cette performante technique de datation, connue sous le nom d'AMS pour « *Accelerator Mass Spectrometry* », ne mesure plus la décroissance radioactive de l'objet, mais permet de mesurer, de manière directe, la teneur en radiocarbone (^{14}C) avec une bonne précision (Synal et *al.*, 2007). L'un des enjeux actuels de la datation étant de déterminer l'âge d'échantillons toujours plus petits, l'Ecole Polytechnique de Zürich (ETH, Suisse) a développé, à partir de la moitié des années 2000, un système AMS, dénommé MICADAS (« *MIni CArbon DAting System* »), permettant l'introduction de très petites quantités (< 100 µg ; Ruff et *al.*, 2007, 2010a, 2010b) sous forme de graphite ou de CO_2 obtenu grâce à des réacteurs de graphitisation ou d'oxydation adaptés pour de très petits échantillons.

Au regard de la Figure 1.15 qui présente le système AMS MICADAS, développé à l'ETH de Zürich, cet équipement se compose :

(1) d'une source d'ions dans laquelle l'échantillon est bombardé de césium (Cs^+). A la différence des atomes d'azote[5], les atomes de carbone vont alors s'ioniser et former des ions C^- qui constitueront un faisceau d'ions négatifs, permettant ainsi une séparation isobarique (Synal et *al.*, 2004, 2007, Ruff et *al.*, 2007). Par la suite, ces ions négatifs sont accélérés et introduits dans un premier spectromètre de masse (**2**).

(2) d'un spectromètre de masse appliquant un faible champ magnétique, qui permet de sélectionner uniquement les ions de masse *m/z* 14 tels que $^{14}C^-$, $^{13}CH^-$ et $^{12}CH_2^-$. Des cuillères de Faraday permettent ensuite la détection des ions $^{12}C^-$ et $^{13}C^-$ qui se trouvent déviés du faisceau central.

(3) d'un accélérateur de particules dans lequel un gaz, l'hélium (Schulze-König et *al.*, 2011), va entrer en collision avec les ions entrants causant la destruction des ions de type

[5] L'azote, de par sa configuration électronique, est relativement stable (couche externe à moitié remplie) ce qui induit que son affinité électronique soit négative (-7 kJ/mol). Cela signifie qu'il faudrait fournir de l'énergie à l'atome pour lui ajouter un électron ce qui est très défavorable. A l'inverse, l'affinité électronique élevée du carbone (121,9 kJ/mol) conduit à la formation d'ions négatifs stables.

$^{13}CH^-$ et $^{12}CH_2^-$. Cette réaction engendre également la formation d'ions positifs: $^{12}C^+$, $^{13}C^+$ et $^{14}C^+$ qui sont accélérés et introduits dans le second spectromètre de masse (**4**).

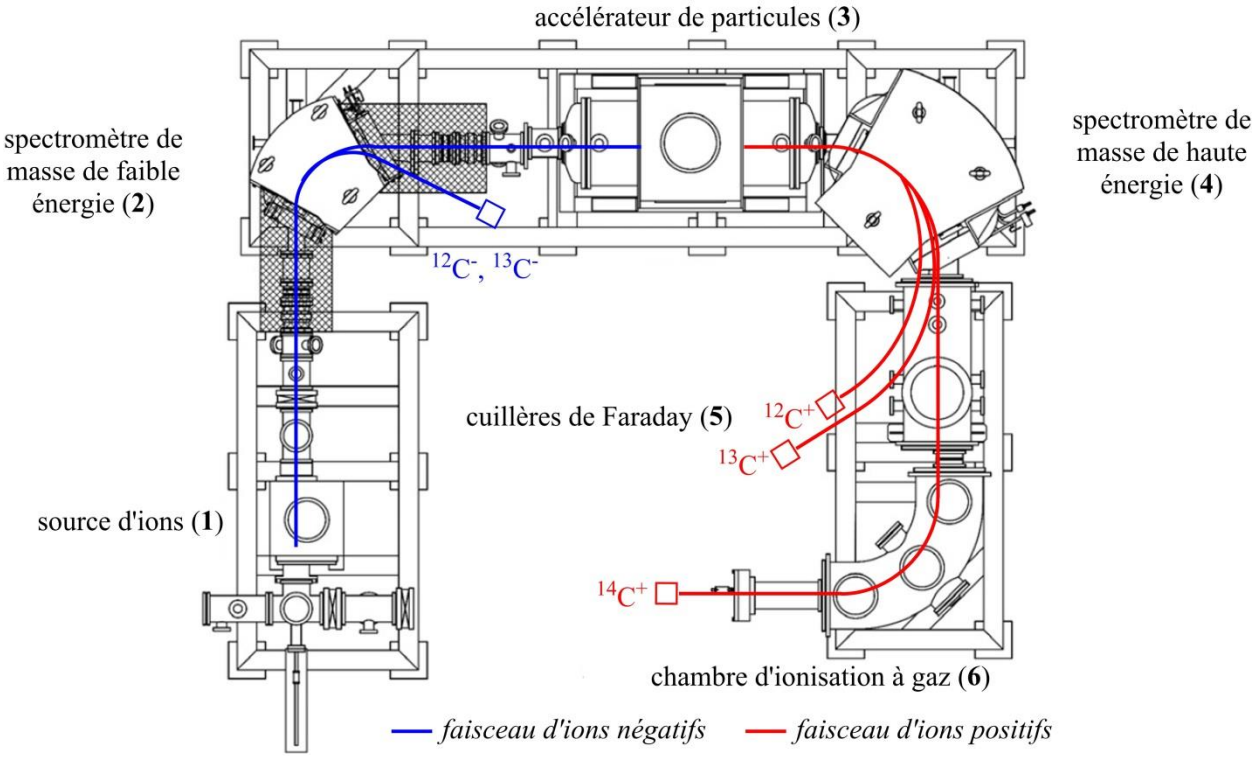


FIG. 1.15 Schéma descriptif de l'appareil AMS MICADAS (ETH de Zürich, Suisse) pour la datation au ^{14}C de petites quantités d'échantillon (d'après Synal et *al.*, 2004, 2007).

(4) d'un spectromètre de masse de haute énergie qui va permettre de diriger les ions positifs selon leur masse vers le détecteur correspondant.

(5) de cuillères de Faraday qui détectent les ions $^{12}C^+$ et $^{13}C^+$ (Synal et *al.*, 2004, 2007).

(6) d'une chambre d'ionisation à gaz (isobutane) permettant la détection des ions $^{14}C^+$ (Synal et *al.*, 2004, 2007).

L'échantillon qui est introduit dans la source d'ions de l'AMS MICADAS peut se trouver sous la forme de graphite ou de CO_2 gazeux selon la quantité de carbone disponible. En effet, si la quantité de matériel à dater contient un équivalent de 0,1-1 mg de carbone, les échantillons sont graphitisés au moyen du système automatisé AGE (Wacker et *al.*, 2010a) présenté en Figure 1.16.

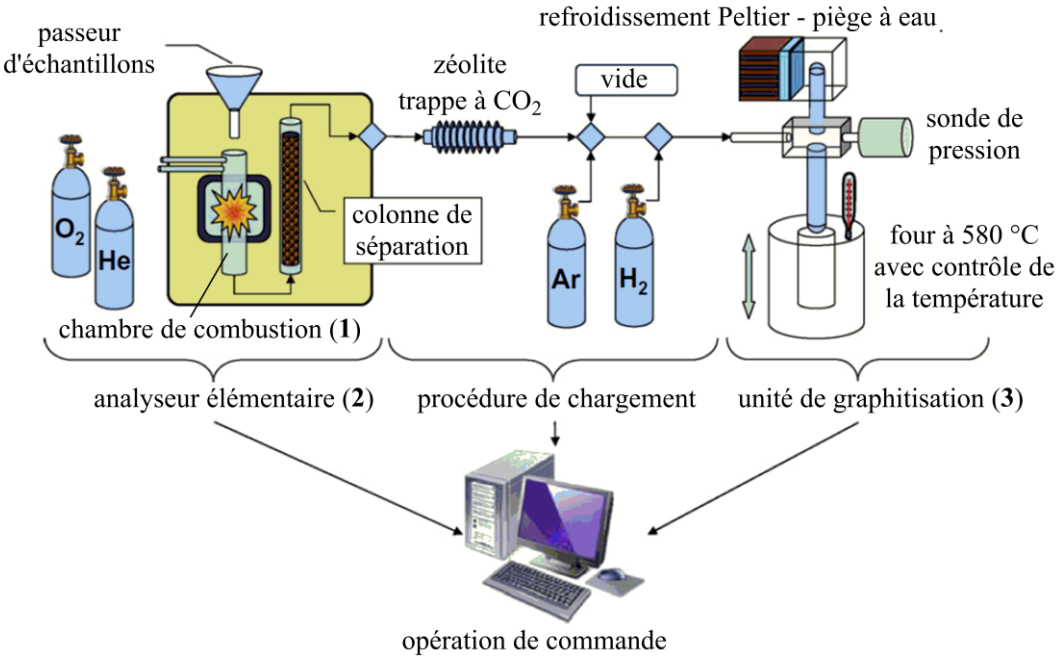


FIG. 1.16 Système de graphitisation AGE (Wacker et *al.*, 2010a).

Dans ce système, les échantillons sont pesés et enveloppés dans une capsule en étain avant d'être placés dans la chambre de combustion (**1**, Figure 1.16) d'un analyseur élémentaire (**2**). Le CO_2 qui résulte de cette combustion est purifié puis adsorbé sur de la zéolithe avant d'être transféré dans une unité de graphitisation (**3**) et plus précisément dans un tube de réaction contenant 3,5 mg de catalyseur (poudre de fer) dans lequel du dihydrogène est ajouté. Le réacteur est ensuite chauffé à 580°C pour une graphitisation optimale. La réaction de graphitisation est terminée au bout de 2 h et le graphite obtenu est ensuite placé sur une cible en aluminium pour l'analyse AMS.

Pour les échantillons contenant moins de 0,1 mg de carbone (analyse de composés individuels par exemple), deux procédures sont utilisées (systèmes 1 et 2 présentés en Figure 1.17). L'échantillon peut être introduit dans un analyseur élémentaire (**1**, système 1) fonctionnant comme pour le système AGE décrit ci-dessus muni d'un système de combustion et d'une colonne pour la séparation des gaz. Les gaz en sortie de colonne (CO_2, H_2O et N_2) sont dirigés vers une vanne à « 6 ports » dans laquelle le CO_2, mélangé avec de l'hélium (gaz vecteur), est acheminé vers un piège composé d'une zéolite d'alumino-silicate cristallin (**2**) tandis que H_2O et N_2 sont évacués dans l'atmosphère (Ruff et *al.*, 2010a). Le CO_2 piégé est ensuite libéré et acheminé vers une seringue (**4**) pour être directement injecté dans la source de l'AMS (**5** ; Ruff et *al.*, 2010a). Il est également possible de brûler les échantillons au sein

de tubes en quartz (système 2, Figure 1.17) qui sont ensuite introduits dans un craqueur d'ampoules (**3**). Le CO_2 libéré est ensuite dirigé vers la seringue pour être injecté dans le spectromètre AMS (Ruff et *al.*, 2007, 2010b). La possibilité d'introduire directement dans la source de l'AMS l'échantillon sous la forme de CO_2 gazeux est véritablement un des atouts majeurs de cet équipement permettant la datation d'échantillons disponibles en très petites quantités (jusqu'à 10 µg).

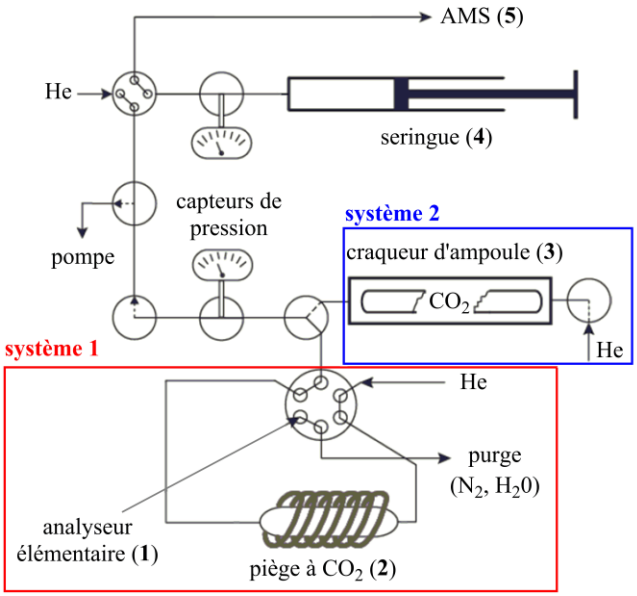


FIG. 1.17 Système pour l'introduction de l'échantillon dans la source d'ions de l'AMS sous forme de CO_2 gazeux (d'après Ruff et *al.*, 2010a).

La datation au ^{14}C a depuis toujours eu de nombreuses applications en archéologie (Jull et Burr, 2014), mais l'amélioration toujours croissante des techniques de datation, donnant accès à l'âge d'échantillons disponibles en quantités toujours plus petites, tout en conservant une bonne précision, offre de nouvelles opportunités pour l'archéologie comme nous le montrerons dans le chapitre suivant.

Chapitre 2 : L'analyse de céréales en contexte archéologique



2.1. Introduction

Au commencement de l'archéométrie, les sciences analytiques furent principalement utilisées pour la caractérisation de résidus organiques provenant de matériel archéologique tels que des amphores, des jarres et d'autres contenants (Condamin et *al.*, 1976, Evershed et *al.*, 1991, Charters et *al.*, 1995, Charrié-Duhaut et *al.*, 2007), des couteaux de silex emmanchés (Boëda et *al.*, 1996) ou des momies (Connan, 1999, Buckley et Evershed, 2001). Pourtant, la matière organique préservée dans les paléosols, et tout particulièrement dans les sols ayant comblé d'anciennes structures mises au jour lors de fouilles archéologiques (tombes, fosses, fentes ...), peut également constituer un objet d'étude intéressant en vue de reconstitutions paléoenvironnementales et archéologiques, mais de telles études ne sont, pour le moment, que peu développées (Ertlen *et al.*, 2013). En effet, ces « structures en creux » peuvent être comblées par les sols de surface environnants, qui restent alors piégés et préservés au sein de ces structures (Gerlach et *al.*, 2006, Kögel-Knaber et *al.*, 2007, Motuzaite-Matuzeviciute et *al.*, 2013, Lauer et *al.*, 2014). Ces sols sont alors susceptibles de contenir des marqueurs moléculaires (biomarqueurs) qui peuvent potentiellement être utilisés comme des « archives pédologiques » afin de remonter, notamment, à la nature de la couverture végétale originelle du sol piégé dans les structures, permettant ainsi de suivre l'évolution du paysage à travers le temps (Ertlen et *al.*, 2010, Trendel et *al.*, 2010, Lavrieux et *al.*, 2012). Cette couverture végétale peut correspondre soit à une végétation naturelle, soit à une végétation d'origine anthropique, notamment dans le cas d'une activité agricole (Jacob et *al.*, 2008a, 2008b, Motuzaite-Matuzeviciute et *al.*, 2013) ou d'activités humaines spécifiques telles que le rouissage du chanvre (Lavrieux et *al.*, 2013).

Toutefois, un sol – et par conséquent son contenu en matière organique – représente un système complexe, particulièrement hétérogène et pouvant être influencé par de nombreux facteurs environnementaux. La signature lipidique d'un sol peut, en réalité, être composée à la fois de lipides anciens et réfractaires qui coexistent avec une matière organique plus récente apportée depuis la surface et introduite dans les horizons plus profonds du sol par bioturbation, par lessivage des sols ou encore par la pénétration de matériel racinaire (Kögel-Knabner, 2002, Schmidt et *al.*, 2011). La contribution des micro-organismes colonisant le sol ne doit également pas être négligée dès lors que ceux-ci utilisent la matière organique des sols comme source de carbone, et qu'ils contribuent de ce fait à l'apport de lipides (Kögel-Knabner, 2002). Le contenu lipidique d'un sol dépend, en outre, du degré de préservation des composés qui est fonction de différents paramètres: climat, activité biologique, pH,

profondeur, granulométrie, nature biochimique du sol (Schmidt et *al.*, 2011) mais aussi de la capacité de résistance propre aux constituants chimiques. Cette complexité du système « sol » nécessite de prendre en considération la dynamique temporelle d'un sol et de replacer, en conséquence, la matière organique issue de ce sol dans son contexte (Schwartz, 2012). Il est possible, en effet, que le sol, ainsi que son contenu lipidique, ayant été piégés au sein d'une structure ou d'une formation en creux puissent ne pas être contemporains de la structure elle-même, ce qui peut témoigner, dans certains cas, de deux occupations distinctes du milieu. A ce jour, seules quelques rares études se sont intéressées à l'âge du contenu lipidique de la matière organique contenu dans les sols (Huang et *al.*, 1996, Rethemeyer et *al.*, 2004, 2005, Mendez-Millan et *al.*, 2014, Courel et *al.*, 2015). Les formidables progrès accomplis dans le domaine de l'instrumentation, permettant actuellement la datation au ^{14}C d'échantillons en quantités toujours plus faibles (Ingalls et Pearson, 2005), sont donc une aubaine pour l'étude moléculaire de sols. En particulier, le spectromètre AMS MICADAS, cf. § 1.3.2) équipé d'un réacteur mini-volume (instrument disponible à l'ETH de Zurich) permet d'évaluer l'âge de lipides individuels disponibles uniquement à l'échelle du microgramme (Ruff et *al.*, 2007, 2010a), ce qui offre de nouvelles opportunités et perspectives pour la détermination du temps moyen de résidence de biomarqueurs lipidiques par datation.

Dans la première partie de ce chapitre, nous présenterons les résultats de l'analyse de paléosols échantillonnés au sein de silos à grains et autres structures en creux mises au jour lors d'un chantier de fouilles archéologiques préventives à Obernai (Alsace, France). Il s'agissait, du côté de la biogéochimie moléculaire, de mettre en évidence des marqueurs moléculaires susceptibles de traduire une activité agricole passée au niveau de ce site, voire de caractériser les espèces céréalières stockées dans les silos. Au cours de ce travail, nous avons cherché à identifier, dans la mesure du possible, de nouveaux marqueurs moléculaires susceptibles de traduire l'existence passée des principales espèces de céréales communément identifiées par carpologie[1] lors de fouilles archéologiques. Ainsi, en annexe de ce chapitre, seront présentés les résultats des analyses moléculaires réalisées à partir de graines contemporaines de blé (*Triticum* sp.), d'orge (*Hordeum vulgare*), de seigle (*Secale cereale*), d'avoine (*Avena* sp.) et d'épeautre (*Triticum spelta*), ainsi qu'à partir d'échantillons archéologiques de graines carbonisées ou agglomérées (gruau).

[1] La carpologie est la science qui étudie les restes végétaux macroscopiques, à l'exception des bois, mis au jour en contexte archéologique (Bouby, 2000). Il s'agit le plus souvent de graines et de noyaux de fruits.

2.2. Matériel et méthodes

Note préliminaire: L'intégralité des données relatives aux protocoles expérimentaux, mis en place et utilisés au cours de ces travaux de thèse, figurent dans le Chapitre 7.

2.2.1. Présentation du corpus d'échantillons et du contexte archéologique

Dans le cadre de l'aménagement d'un Parc d'Activités Economiques Intercommunal à Obernai (Alsace), l'Institut National de Recherche Archéologique Préventive (INRAP) a entrepris, en 2013, des fouilles sur le terrain comme l'exige la loi numéro 2001-44 du 17 janvier 2001 relative à l'archéologie préventive[2]. Le site archéologique a été fouillé sur plus de 7,5 hectares de terrain (Figure 2.1) sous la direction du Dr. Clément Féliu. Les archéologues ont ainsi mis au jour de nombreuses structures et une quantité importante de matériel attestant d'une occupation humaine du site de manière quasi-continue depuis le Néolithique jusqu'au début du Moyen-âge (Féliu, 2016).

Dans le cadre de notre travail de thèse, différents sols issus du remplissage de structures creusées profondément dans le loess (entre 1 et 2,20 mètres de profondeur) ont été examinés afin de mettre en évidence, dans la mesure du possible, des marqueurs moléculaires pouvant témoigner d'une occupation ou d'une activité anthropique. Les analyses se sont concentrées tout particulièrement sur l'étude de structures protohistoriques (Tableau 2.1), parmi lesquelles des silos utilisés pour le stockage de céréales et témoignant d'une activité agricole locale. Ces silos sont, pour la plupart, datés de l'âge du Bronze final (950-800 av. J.-C.) et de La Tène ancienne[3] (LTB : 400-260 av. J.-C.), auxquels s'ajoutent deux structures datant de La Tène finale (LTD : 150-30 av. J.-C.), à savoir un fossé constituant l'enclos d'une ferme (st. 1001) et un silo -st. 1521- (Figures 2.1 et 2.2). En plus de ces structures protohistoriques, un silo du Néolithique (st. 1817) ainsi qu'une structure de fonction initialement indéterminée (st. 4564), mais qui s'avèrera par la suite correspondre à des latrines de la période antique, ont également été échantillonnés. Cette dernière structure a fait l'objet d'une étude séparée dont les résultats seront décrits dans le Chapitre 3.

[2] Loi parue dans le Journal Officiel de la République Française le 18 janvier 2001, pages 928-931.
[3] Le site archéologique de « La Tène » se situe sur le territoire de la commune neuchâteloise, en Suisse. Lors de sa découverte, de très nombreuses céramiques et objets présentant une typographie bien particulière et reconnaissable ont permis la mise en place d'un référentiel dont se servent actuellement les archéologues pour définir le second âge du Fer.

Ces structures archéologiques, à l'origine creusées dans le sol, ont été comblées, après leur abandon, par les sols de surface environnants et/ou par l'effondrement des parois de la structure suite à des phénomènes d'érosion. Ce comblement se fait par étapes successives qui peuvent être distinguées lors de la fouille. En effet, la coupe archéologique d'une structure excavée révèle des différences visibles de coloration des sols apportés lors des différentes phases de remplissage, ce qui permet alors de délimiter des unités stratigraphiques (Figure 2.2). Dans le cadre de notre étude, des échantillons de sols ont été prélevés dans ces différentes unités stratigraphiques (« US ») au sein des silos. Afin de différencier les lipides propres à la structure -ou à son remplissage- de ceux issus du sol environnant dans lequel les structures ont été creusées à l'origine, des échantillons dans l'entourage direct des structures étudiées (appelés « encaissants ») ont également été prélevés.

TABLEAU 2.1

Corpus d'échantillons soumis aux analyses de géochimie organique et datation des structures archéologiques (céramologie). US: unités stratigraphiques identifiées à l'intérieur des structures, E.: encaissant, *i.e.*, échantillon de sol prélevé à la périphérie de la structure.

Structure	Datation	Période historique	Niveaux de prélèvement
Silos			
1330	400-260 av. J.-C.	La Tène B	US2, US6, US10, E.
1508	400-260 av. J.-C.	La Tène B	US15, US19, E.
1513	400-260 av. J.-C.	La Tène B	US2/3/4, US9, E.
1521	150-30 av. J.-C.	La Tène D	US2, US3, US8, E. base, E. gauche
1763	950-800 av. J.-C.	Bronze Final IIIb	US2, US10, E.
1781	400-260 av. J.-C.	La Tène B	US6, US10, E
1817	4600-4300 av. J.-C.	Néolithique moyen	US3, US8, US9, E. haut, E. gauche
Fossé gaulois			
1001	150-30 av. J.-C	La Tène D	US23, E.
Latrines			
4564	fin II^{ème} – milieu III^{ème} siècle ap. J.-C.	Gaule Romaine	US4, US8, US9, E.



FIG. 2.1 Plan du site et localisation des structures étudiées (*source* : Clément Féliu, INRAP).

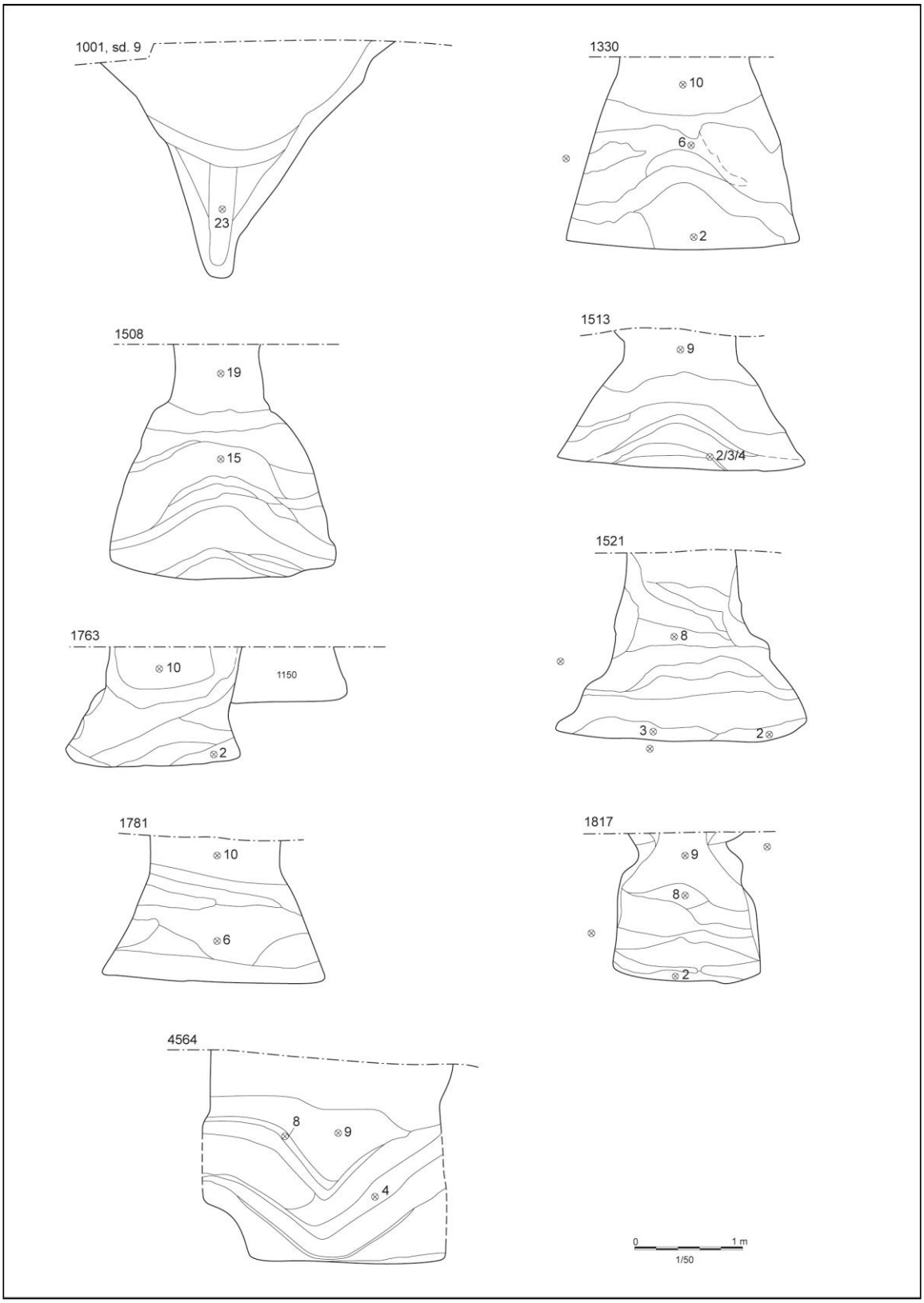


FIG. 2.2 Représentation en coupe des structures étudiées et localisation des prélèvements pour les analyses de géochimie organique. Les numéros font référence aux unités stratigraphiques (« US ») des silos étudiés dans lesquelles les prélèvements ont été effectués (*source* : Clément Féliu et Pierre Girard, INRAP).

2.2.2. Echantillons de référence de millet

Dans le cadre de cette étude, des échantillons des deux principales espèces de millet ont été analysés:

- Des échantillons de *Panicum miliaceum* (millet commun) ont été gracieusement fournis par le Dr. Jérémy Jacob (Institut des Sciences de la Terre d'Orléans). Il s'agit de différentes parties de la plante (tiges, épis, feuilles, graines, racines) obtenues à partir de millet cultivé à Orléans dans le cadre d'une étude approfondie sur le millet dont les résultats sont en partie rapportés par Bossard et *al.* (2013).
- Un échantillon commercial de millet destiné à la consommation a été analysé (millet décortiqué vendu par Priméal). Bien que non précisé sur l'emballage, il s'agit très certainement de l'espèce *Setaria italica* (ou millet des oiseaux) d'après les analyses moléculaires que nous avons effectuées.

2.3. Résultats et discussion

2.3.1. Etude des lipides des unités stratigraphiques par GC-MS : identification de la couverture végétale

Les analyses moléculaires des extraits organiques issus des échantillons de sols provenant des unités stratigraphiques des différents silos ont montré des profils lipidiques comparables entre eux et compatibles avec ceux généralement observés dans le cas de sols de prairie. En effet, les nombreux composés de type *n*-alkyles (*n*-alcanes, *n*-acides, *n*-alcools), qui constituent la composante principale de la fraction lipidique, présentent des distributions systématiquement dominées par les *n*-alcools à chaînes paires entre C_{22} et C_{32}, parmi lesquels l'alcool en C_{26} prédomine. Moins abondants, les *n*-acides à chaînes paires entre C_{20}-C_{32} sont généralement dominés par les homologues en C_{24}-C_{30}. Enfin, les alcanes linéaires, qui se caractérisent par des chaînes carbonées impaires comprises entre C_{27} et C_{33} sont invariablement dominés par les composés en C_{29} et C_{31} (Figure 2.3). Ces distributions traduisent un apport significatif de végétaux, et plus spécifiquement de Graminées (van Bergen et *al.*, 1997, Trendel *et al.*, 2010). À ces composés linéaires sont associés un assemblage de stérols en C_{29} (Figure 2.3 et 2.4), typiquement d'origine végétale (phytostérols), et un ensemble de triterpènes – parmi lesquels la glutinone (**T4**, Figure 2.4), le taraxérol (**T5**), le germanicol (**T7**), le lupéol (**T8**), l'α-amyrine (**T9**), la friedeline (**T10**), l'acétate de bauerényle (**T11**) et la bétuline (**T12**) – issus d'angiospermes (voir par exemple, Schnell *et al.*,

2014). Il est toutefois surprenant de constater que les distributions relatives des composés en série *n*-alkyles et de certains stérols et triterpènes semblent, à première vue, comparables à la fois dans les silos et dans les sols environnants.

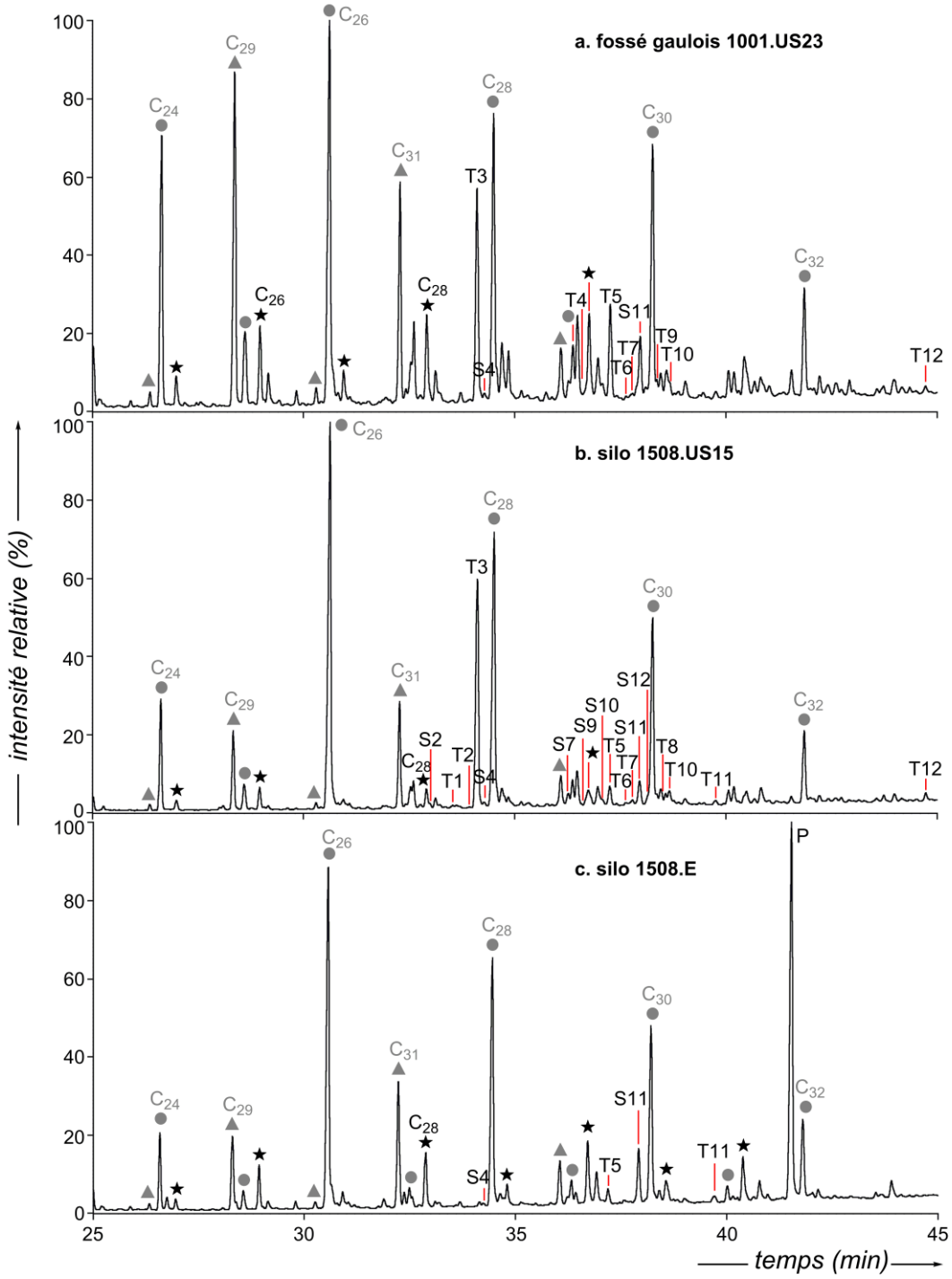


FIG. 2.3 Chromatogrammes en phase gazeuse des extraits lipidiques obtenus pour (**a**) le fossé gaulois 1001.US23, (**b**) le silo protohistorique 1508.US15 et (**c**) le sol environnant le silo 1508. (★) Acides gras, (●) *n*-alcools, (▲) *n*-alcanes, (S) stérols, (T) triterpènes et (P) pollution. Les alcools sont analysés sous la forme d'acétates et les acides sous la forme d'esters méthyliques.

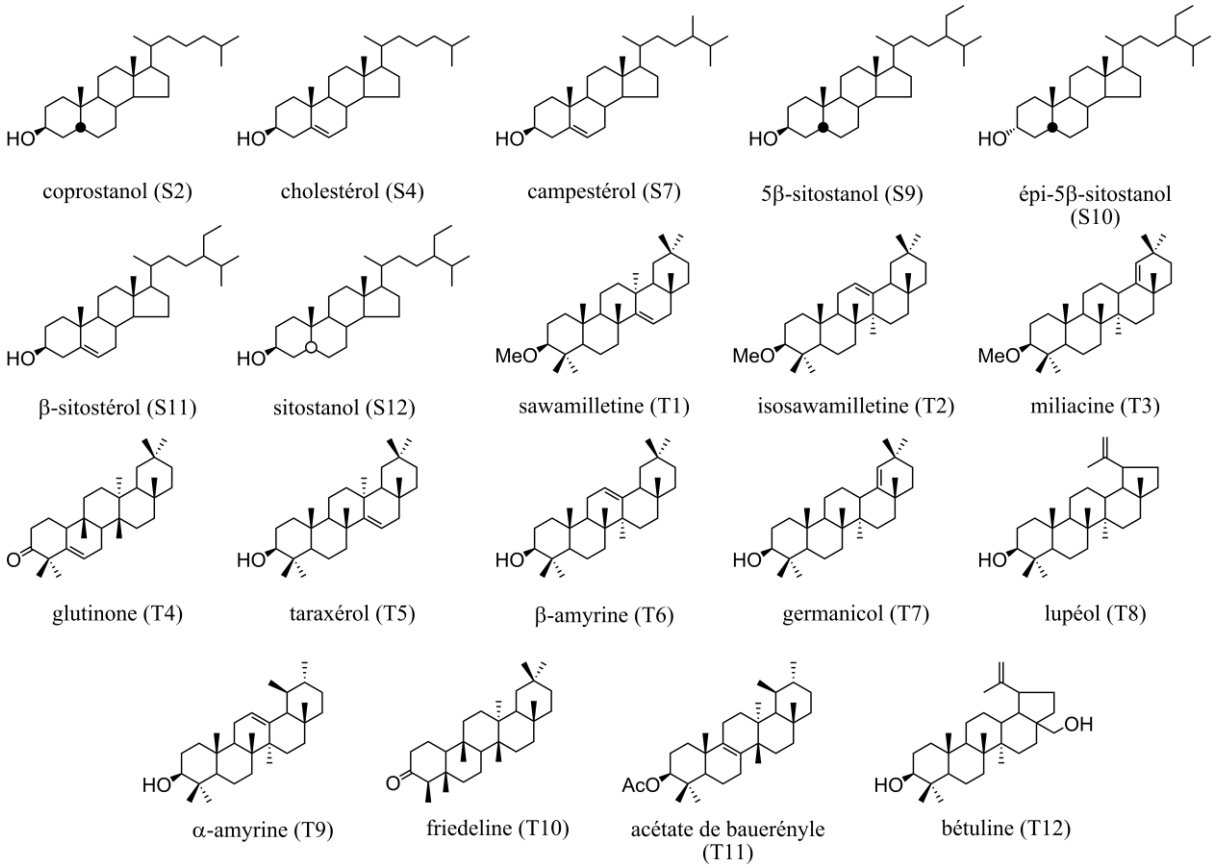


FIG. 2.4 Structures des stérols (S) et des triterpènes (T) identifiés dans les sols issus des structures archéologiques d'Obernai.

Néanmoins, parmi les triterpènes de végétaux mis en évidence, la présence de la miliacine (**T3**, Figures 2.3 et 2.4) en quantité notable mérite d'être soulignée. Il s'agit d'un triterpène pentacyclique présentant, de manière peu fréquente, une fonction méthoxy (OCH_3) naturelle sur le carbone 3. Cette particularité, généralement restreinte aux Graminées (ou Poacées ; Ohmoto *et al.*, 1970, Jacob *et al.*, 2005), confère à ces composés une bonne résistance à la (bio)dégradation lors de l'enfouissement, composés auxquels sont attribués, par ailleurs, des propriétés antibactériennes et antifongiques (Jacob *et al.*, 2005). Cette bonne résistance de la molécule conduit à l'identifier au sein de paléosols étudiés en contexte archéologique (Motuzaite-Matuzeviciute et *al.*, 2013). Ce triterpène est associé très spécifiquement, comme l'ont montré les travaux de Jacob *et al.* (2008b), à l'espèce botanique *Panicum miliaceum*, plus communément désignée sous l'appellation de millet commun. Il est, par conséquent, tout particulièrement intéressant de la retrouver préservée au sein de la quasi-totalité des sols de comblement des silos étudiés (à l'exception du silo 1817, daté du Néolithique moyen) au contraire des encaissants. Sa présence suggère, en effet, l'existence de millet sur le site d'Obernai, celui-ci ayant pu être stocké dans les silos au cours de leur

utilisation, à moins que la miliacine ne provienne des sols environnants ayant comblé les silos après leur abandon (voir ci-après).

La miliacine est présente dans les différents compartiments de la plante de millet commun (glumes, tiges, feuilles,…), mais est particulièrement abondante dans les graines de cette céréale (Figure 2.5.a ; Bossard *et al.*, 2013). A l'inverse, ce composé n'est pas présent parmi les lipides de l'espèce *Setaria italica* (millet des oiseaux, Figure 2.5.b ; Bossard et *al.*, 2013), ce qui permet une véritable différentiation entre les deux principales espèces de millet.

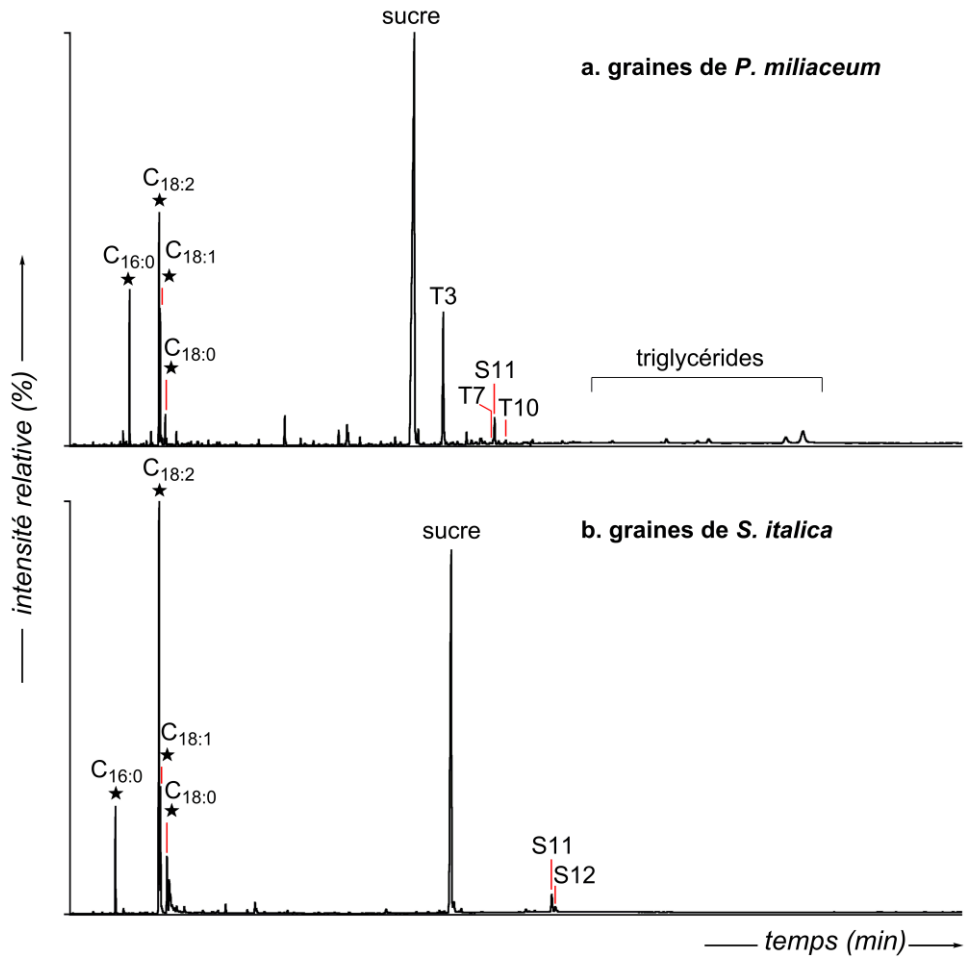


FIG. 2.5 Chromatogrammes en phase gazeuse des extraits lipidiques apolaires obtenus pour les échantillons de référence de (**a**) graines de *P. miliaceum* et (**b**) graines de *S. italica*. Les acides gras (★) sont analysés sous la forme d'esters méthyliques tandis que les stéroïdes (S11, S12) et le triterpène T7 sont analysés sous forme d'acétates.

Des analyses en isotopie du carbone viennent par ailleurs confirmer le lien qui existe entre la miliacine et la céréale de millet. En effet, la valeur de $\delta^{13}C$ représentative de la composition isotopique du carbone mesurée pour la miliacine isolée est de -21,6 ‰ (valeurs

identiques dans le cas des silos 1781 et 1508), ce qui est analogue aux valeurs décrites dans la littérature pour la miliacine purifiée à partir de millet de référence ou extraite de sédiments (-21,5 à -23,5 ‰ ; Jacob *et al.*, 2008a). Ces valeurs, qui se situent autour de -20 ‰, correspondent à un appauvrissement en ^{13}C moins marqué par rapport à celles généralement mesurées dans le cas de la plupart des lipides de végétaux présents sous nos latitudes. En effet, ces derniers utilisent une voie de fixation du carbone en C3 qui conduit à la biosynthèse de lipides avec des signatures isotopiques du carbone entre -30 ‰ et -40 ‰ (cf. § 1.3.1). Dans le cas de la miliacine, la valeur mesurée se distingue parfaitement des valeurs caractéristiques observées dans le cas de plantes en C3, et traduit donc une origine végétale typique d'une plante utilisant un métabolisme (anabolisme) en C4 (O'Leary, 1988, Hobbie et Werner, 2004), ce qui est bien le cas du millet commun (Jacob *et al.*, 2008a).

Dans le cas des échantillons des sols de comblement des silos étudiés, la miliacine constitue le triterpène majeur du contenu lipidique, représentant par exemple près de 92 % de l'ensemble des triterpènes de l'extrait lipidique de l'échantillon 1330.US2 (échantillon représentatif du corpus des extraits organiques). Accompagnant la miliacine dans nos échantillons, un certain nombre d'autres composés triterpéniques ont été identifiés, dont la sawamilletine (**T1**) -autre triterpène pentacyclique de type méthyléther -, à laquelle s'ajoute le taraxérol (**T5**), le germanicol (**T7**), le lupéol (**T8**) et la friedeline (**T10**). La plupart de ces composés ont été identifiés, lors de précédentes études, dans *P. miliaceum* (Bossard *et al.*, 2013), mais aussi au sein de paléosols ayant servi à la culture de millet (Motuzaite-Matuzeviciute *et al.*, 2013).

2.3.2. Quantification de la miliacine par GC-FID

Des analyses semi-quantitatives de la miliacine ont été effectuées afin de déterminer si ce composé est bien lié aux silos et, si oui, de déterminer si la miliacine provient de résidus de millet initialement stocké dans les silos ou si, au contraire, la miliacine est liée aux sols qui ont comblé les silos après que ceux-ci aient été abandonnés. Il ressort de ces travaux que de fortes teneurs en miliacine au sein des différents niveaux de prélèvement dans les silos sont observées, alors que ce composé est absent ou présent à l'état de traces dans les sols environnant les silos (les «encaissants») (Figure 2.6). Cette observation suggère que la miliacine est étroitement associée aux silos et ne provient pas du sol dans lequel a été creusée la structure. Quant aux teneurs en miliacine mesurées à l'intérieur même des structures, celles-ci sont variables d'un silo à l'autre -entre 1 µg et 35 µg pour 100 g de sol-. Par ailleurs,

au sein d'un silo donné, d'importantes variations verticales de concentration sont également observées entre les différents niveaux de prélèvement, et nous pouvons ainsi observer des concentrations maximales dans les échantillons prélevés au fond du silo (structures 1763, 1513 et 1508 ; Figure 2.6), en position intermédiaire (structures 1330 et 1781), ou encore en position sommitale (structure 1521).

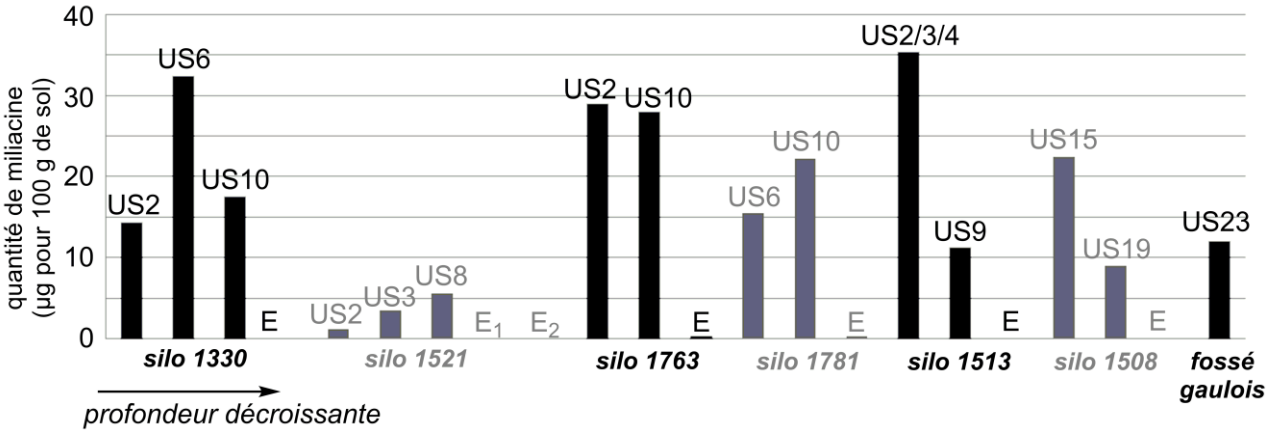


FIG. 2.6 Teneur en miliacine (µg pour 100 g de sol) dans les différents échantillons provenant des silos et leur(s) encaissant(s) ainsi que dans le fossé gaulois (Obernai, Alsace). « US » : unités stratigraphiques ; « E » : encaissant(s).

Dans l'hypothèse où la présence de miliacine dans les silos témoignerait d'un stockage de cette céréale, une concentration maximale en miliacine serait attendue à la base du silo (présence de graines résiduelles après vidage du silo). Nos observations indiquent que tel n'est pas le cas, ce qui suggère que la miliacine semble plutôt liée aux sols ayant comblé les silos une fois ceux-ci vidés, ces sols de comblement correspondant sans doute à des sols sur lesquels aurait été cultivé du millet. D'autre part, l'identification de la miliacine au sein du fossé gaulois (st. 1001, 12 µg pour 100 g de sol), structure n'ayant pas été utilisée pour le stockage des récoltes et n'ayant du reste aucune fonction agricole, suppose une distinction entre l'usage des structures et leur contenu lipidique. Ainsi donc, les silos, tout comme le fossé, auraient servi de «pièges archéologiques» ayant scellé l'empreinte moléculaire du sol environnant apporté par érosion, qui aurait, de ce fait, conservé la marque de cette ancienne activité agricole.

Par ailleurs, l'étude carpologique a permis de mettre en évidence une grande variété de macrorestes, dont certains correspondent à des glumelles/caryopses de *P. miliaceum* au sein des silos 1513, 1763 et 1781 (Tableau 2.2 ; pour l'étude complète, voir Durand, 2016). Aucune corrélation n'a pu être établie entre le nombre de carporestes identifiés et la teneur en

miliacine au sein des silos et certains sols de comblement, contenant de la miliacine, ne présentent aucune trace de macrorestes de millet commun (silos 1330, 1508, 1521). Ce résultat n'est pas forcément étonnant dans la mesure où l'on considère désormais que la miliacine est issue d'une culture de surface et non nécessairement des récoltes de millet stockées dans le silo. En contexte archéologique, la faible persistance des glumelles de millet au cours de leur carbonisation (celles-ci se conservant bien mieux en conditions humides ; Wiethold, 2009) peut également expliquer en partie l'absence de restes carpologiques dans certaines des structures et montre, par conséquent, l'intérêt des analyses moléculaires en géochimie organique réalisées en complément des études carpologiques. Le grand nombre de caryopses de millet dans la couche 10 du silo 1763 -172 macrorestes contre un maximum de 10 graines répertoriées dans les autres structures (Tableau 2.2)- pourrait suggérer que la miliacine, dans cette unité structurale, est issue d'une contribution significative de restes de millet d'origine domestique, attestant d'une consommation de cette céréale, et non principalement de sols sur lesquels le millet a été cultivé et qui ont comblé le silo. En aucun cas n'est exclue la possibilité que tous ces silos aient pu servir au stockage du millet, mais les travaux présentés ici ne permettent pas de le démontrer.

TABLEAU 2.2

Inventaire des restes de millet (*Panicum miliaceum* et *Setaria italica*) identifiés au sein des structures archéologiques d'Obernai. Les résultats complets de l'étude carpologique peuvent être trouvés dans le rapport de fouille de l'INRAP (Durand, 2016).

Structure	**1508**	**1513**		**1521**	**1763**			**1781**		**4564**
Unité stratigraphique	US15	US2/3/4	US9	US8	US2	US10	US5/7	US6	US10	US8
Panicum miliaceum										
carbonisé		3	3		8	172	6			
minéralisé								2		10
Setaria italica										
carbonisé	2		1	1	2		4	3	3	
***Panicum*/*Setaria* sp.**										
carbonisé	1		1		3			5		
***Panicum*/*Setaria* sp.**										
fragments	3									

Des mesures du rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ de quelques lipides gras (*n*-alcanes, *n*-acides et *n*-alcools) ont été réalisées avec l'intention de pouvoir estimer la part de ces lipides pouvant provenir du millet dans les échantillons de sol étudiés. En effet, l'analyse moléculaire des différents compartiments de cette plante montre la présence de ces mêmes classes de composés (voir ci-après et Figure 2.7).

Dans un premier temps, des mesures isotopiques ont été réalisées pour les *n*-alcanes préservés au sein des sols de comblement des silos 1330, 1781 et 1508 et les résultats montrent des valeurs de $\delta^{13}C$ comprises entre -31,5 ‰ et -35,5 ‰ (Tableau 2.3). En adéquation avec de précédentes observations, nous notons un appauvrissement graduel en ^{13}C dès lors que la longueur de la chaîne carbonée augmente (Bi et *al.*, 2005). Dans un second temps, les *n*-alcools et les *n*-acides, préservés au sein du silo 1508, ont également fait l'objet de mesures isotopiques, dévoilant des valeurs de $\delta^{13}C$ relativement analogues, comprises entre -31,4 ‰ et -36,2 ‰ dans le cas des *n*-alcools et entre -32,6 ‰ et -34,9 ‰ pour les *n*-acides. Ces valeurs, inférieures à -30 ‰, sont conformes aux valeurs de $\delta^{13}C$ des lipides de plantes utilisant un métabolisme en C3 (Chikaraishi et *al.*, 2004a, 2004b, Bi et *al.*, 2005, Chikaraishi et Naraoka, 2006, Mendez-Millan et *al.*, 2014), ce qui atteste d'un apport quasi exclusif de lipides de plantes de ce type.

TABLEAU 2.3

Composition isotopique ($\delta^{13}C$) et déviation standard associée ($\pm \sigma$) mesurées pour les *n*-alcanes, les *n*-alcools, les *n*-acides et la miliacine présents au sein des silos 1330, 1508 et 1781.

$\delta^{13}C$ ($\pm \sigma$)	***n*-alcanes**					**triterpène**
	n-C_{25}	*n-C_{27}*	*n-C_{29}*	*n-C_{31}*	*n-C_{33}*	*miliacine (**T3**)*
1330.US2	- 31,8 ‰ (± 0,7)	- 31,5 ‰ (± 0,6)	- 33,5 ‰ (± 0,5)	- 34,7 ‰ (± 0,2)	- 35,5 ‰ (± 0,3)	-
1781.US6	-	-	-	-	-	- 21,6 ‰ (± 0,2)
1508.US15	- 32,1 ‰ (± 0,5)	- 31,9 ‰ (± 0,2)	- 34,0 ‰ (± 0,3)	- 34,5 ‰ (± 0,2)	- 33,0 ‰ (± 0,1)	- 21,6 ‰ (± 0,1)
	***n*-alcools**					
	n-C_{22}	*n-C_{24}*	*n-C_{26}*	*n-C_{28}*	*n-C_{30}*	*n-C_{32}*
	- 33,8 ‰ (± 0,4)	- 33,9 ‰ (± 0,1)	- 36,2 ‰ (± 0,1)	- 36,1 ‰ (± 0,1)	- 34,9 ‰ (± 0,2)	- 31,4 ‰ (± 0,2)
	***n*-acides**					
	n-C_{20}	*n-C_{22}*	*n-C_{24}*	*n-C_{26}*	*n-C_{28}*	*n-C_{30}*	*n-C_{32}*
	- 32,6 ‰ (± 0,4)	- 33,8 ‰ (± 0,2)	- 32,8 ‰ (± 0,2)	- 33,7 ‰ (± 0,4)	- 34,6 ‰ (± 0,2)	- 34,9 ‰ (± 1,2)	- 34,9 ‰ (± 0,7)

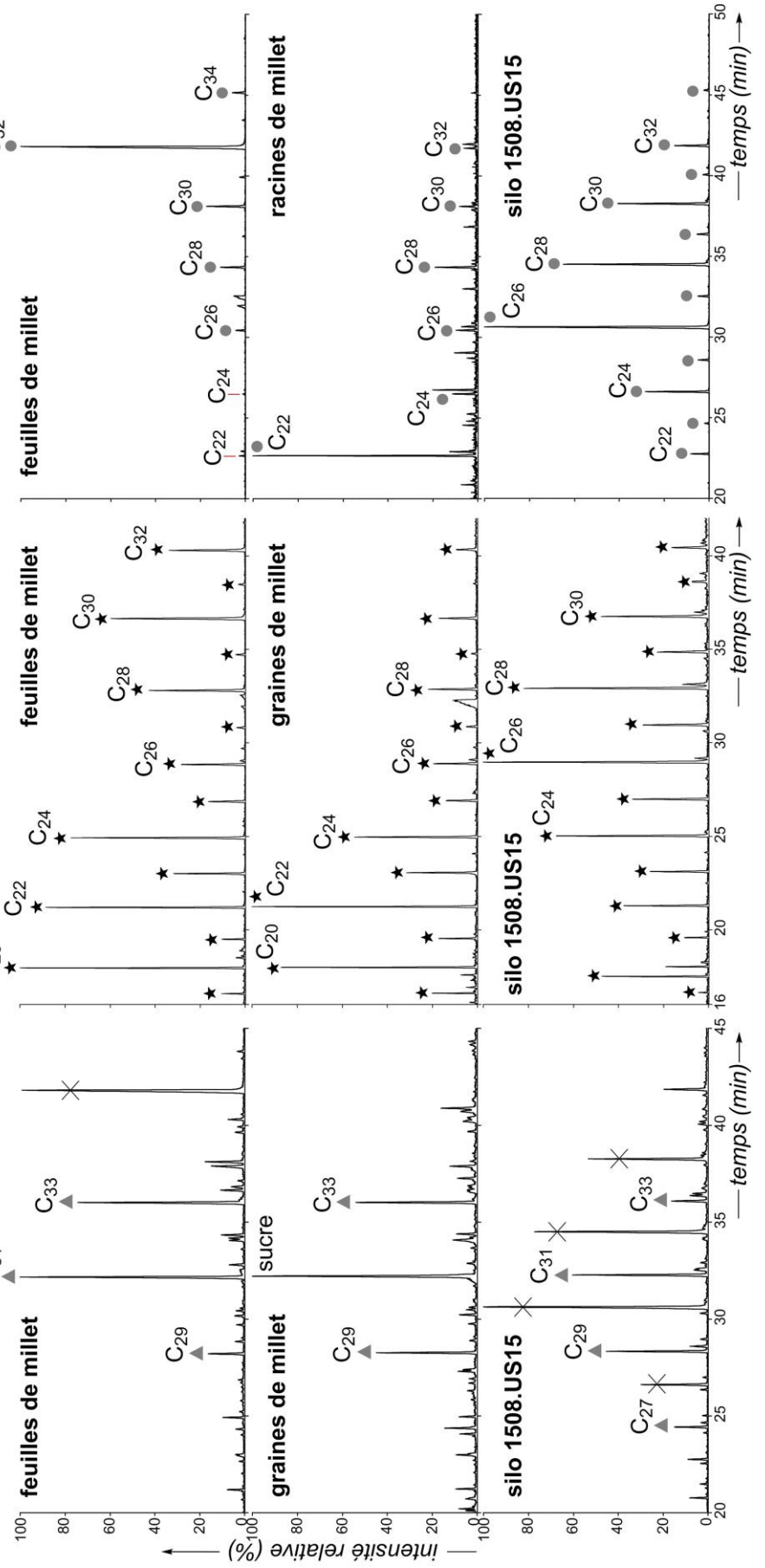


FIG. 2.7 Fragmentogrammes de masse *m/z* 57, 61 et 74 montrant la distribution relative des *n*-alcanes, acides gras et *n*-alcools dans certaines parties de la plante de *P. miliaceum* (feuilles, racines et/ou graines) ainsi que dans l'échantillon de silo 1508.US15. Les alcools sont analysés sous la forme d'acétates et les acides sous la forme d'esters méthyliques.

Il semblerait donc que les lipides de millet n'aient que faiblement contribué à la signature lipidique, ce qui n'est que peu surprenant au regard de la faible concentration des composés de type *n*-alkyle observée dans les différents compartiments de la plante de millet examinés (Figure 2.7). En effet, les analyses moléculaires des différents éléments de *P. miliaceum* (tiges, épis, racines, feuilles et graines) ont révélé la présence de *n*-alcanes, à l'état de trace, présentant une distribution principalement centrée sur les homologues impairs de C_{27} à C_{33}. Le constat est similaire dans le cas des *n*-alcools où seules les feuilles semblent en contenir une quantité plus conséquente, avec une distribution atypique centrée sur un unique homologue, celui en C_{32} (Figure 2.7) tel que rapporté par Tulloch (1982). En outre, il est intéressant de constater qu'alors que les valeurs de $\delta^{13}C$ des *n*-alcools du silo 1508 sont de plus en plus négatives (*i.e.*, appauvries en ^{13}C) avec l'accroissement de la longueur de la chaîne alkyle, le rapport $\delta^{13}C$ de l'alcool en C_{32} est, en comparaison de ses homologues inférieurs, fortement enrichi en ^{13}C (-31,4 ‰ pour l'alcool en C_{32} contre -34,9 ‰ pour l'alcool en C_{30} par exemple ; Tableau 2.3). Compte tenu de ce résultat, nous avons estimé, d'après l'équation ci-dessous, que la part de l'alcool en C_{32} issu d'une plante en C4 (le millet, dans ce cas) est d'environ 1/3.

$$\frac{\delta_{mesuré}\text{-}\delta_{C4}}{\delta_{C3}\text{-}\delta_{C4}} = \frac{C_3}{C_3+C_4} \times 100 \qquad \textbf{(4)}$$

- avec δ_{C3} ou δ_{C4} : rapports isotopiques dans le cas de sources lipidiques purement en C3 (-36 ‰) ou en C4 (-24 ‰).
- avec C3 ou C4 : pourcentage de source en C3 ou C4.

Enfin, les *n*-acides à chaînes paires, présents en faibles concentrations dans les différents compartiments du millet, se distribuent entre le dérivé en C_{20} et celui en C_{32} avec une prédominance de l'acide en C_{22} (Figure 2.7). Toutefois, aucune contribution liée aux *n*-acides provenant du millet n'a pu être identifiée via les analyses isotopiques, ce qui pourrait s'expliquer par la faible abondance de cette famille dans la plante.

Finalement, le croisement des données relatives à la quantification de la miliacine et aux mesures des rapports $^{13}C/^{12}C$ concernant les composés linéaires tend à démontrer la faible contribution actuelle du contenu lipidique issu du millet dans les sols étudiés. Deux raisons peuvent expliquer ce phénomène : la prédominance des plantes en C3 (principalement des Graminées), contemporaines au millet, ou, plus vraisemblablement, un phénomène de « turn-

over » de la matière organique, compte tenu d'un changement de végétation. En effet, le remplacement d'une culture de millet, éventuellement plus ancienne que les silos, par un couvert végétal comprenant des plantes en C3 a pu occasionner le renouvellement progressif des lipides issus du millet (sauf pour la miliacine, particulièrement résistante) par ceux du couvert végétal de type C3 mis en place ultérieurement. Ce point sera rediscuté et approfondi à la lumière des résultats de datation au ^{14}C présentés ci-après.

2.3.3. Mesures de datation au ^{14}C par AMS MICADAS

Les mesures de datation au ^{14}C par AMS MICADAS ont concerné des échantillons de sols après décarbonatation, des extraits organiques bruts, de même que des échantillons de miliacine après isolement. Le préalable pour dater la miliacine a, en effet, consisté à mettre au point une succession d'étapes de séparation et de purification par chromatographie afin d'isoler la miliacine des autres composés lipidiques. Pour ces travaux d'isolement de la miliacine, nous avons eu recours à différentes techniques chromatographiques: la chromatographie sur colonne de silice, la chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC) et la chromatographie sur couche mince (CCM) comme cela est décrit en partie expérimentale (cf. § 7.1.4). Ce protocole fortement chronophage n'a pu être réalisé sur l'ensemble des structures archéologiques contenant de la miliacine. C'est la raison pour laquelle notre choix s'est porté sur trois structures associées à trois périodes historiques distinctes. Ainsi, la miliacine issue de l'US2 du silo 1763 (âge du Bronze final), des trois unités stratigraphiques du silo 1330 (US2, 6 et 10, second âge du Fer), et de l'US8 des latrines (st. 4564, période romaine) a été isolée en vue d'une datation. Grâce au protocole mis en place, il nous a été possible d'extraire des échantillons de miliacine (de l'ordre de 15 µg à 300 µg avec une pureté de 80 % à 90 %, déterminé par GC-FID ; Figure 2.8.c). Il convient de noter que la sawamilletine (composé **T1**, Figure 2.8) qui n'a pu être intégralement éliminée lors de ces étapes de purification et qui est éluée quelques secondes avant la miliacine (**T3**) en GC est un triterpène également associé à la culture de millet, ce qui, par conséquent, n'entraînera pas d'erreur dans la datation, dans la mesure où ce composé est très certainement contemporain de la miliacine.

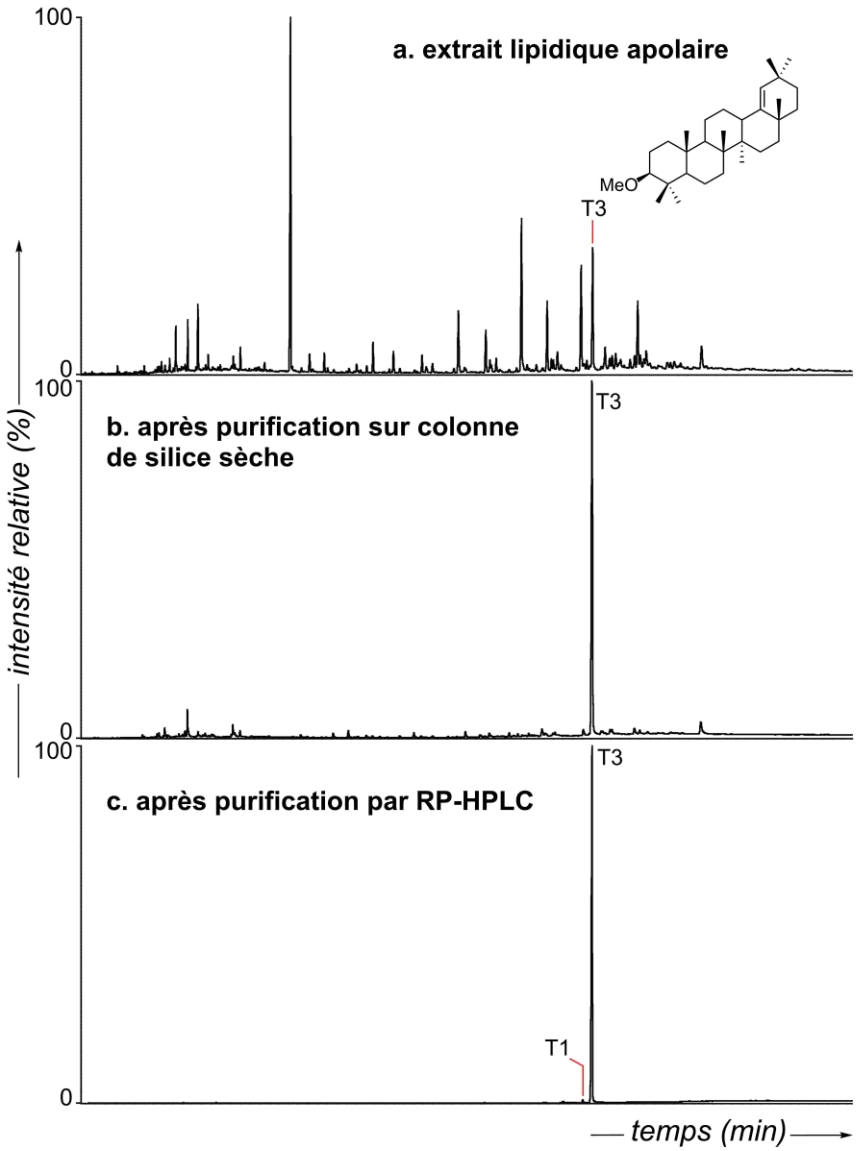


FIG. 2.8 Chromatogrammes en phase gazeuse montrant l'extrait lipidique apolaire de l'échantillon 1330 US2 (**a**) et les fractions enrichies en miliacine obtenues après (**b**) purification sur colonne de silice sèche et (**c**) purification par RP-HPLC.

TABLEAU 2.4

Âges mesurés par datation au ^{14}C à l'ETH de Zürich (Laboratory of Ion Beam Physics) pour les échantillons de miliacine isolée, les extraits organiques et les sols bruts décarbonatés.

	Miliacine					
	Âge BP[a] (céramologie)	N° échantillon (ETH)	Quantité de miliacine	Âge ^{14}C BP (± 1σ)	Âge ^{14}C BP calibré (68 %)	Âge ^{14}C BP calibré (95 %)
1330.US2	2350-2210	ETH-59645	40 µg	3151 (± 66)	3451-3331 (55,4 %) 3292-3256 (12,8 %)	3510-3209 (92,8 %) 3557-3532 (2,1 %) 3192-3184 (0,5 %)
1330.US6	2350-2210	ETH-59646	27 µg	2999 (± 87)	3267-3066 (56,7 %) 3336-3290 (11,5 %)	3388-2946 (95,4 %)
1330.US10	2350-2210	ETH-59647	38 µg	3175 (± 255)	3700-3060 (68,2 %)	3994-2776 (94,7 %) 4074-4041 (0,7 %)
1763.US2	2900-2750	ETH-63065	15 µg	2967 (± 127)	3257-2965 (61,3 %) 3331-3292 (6,9 %)	3411-2844 (93,5 %) 3446-3424 (1,0 %) 2822-2802 (0,8 %)
4564.US8	env. 1750	ETH-65602	300 µg	1906 (± 50)	1924-1741 (68,2 %)	1969-1714 (95,4 %)

[a]BP: « *Before Present* » *i.e.*, avant l'année 1950 prise pour référence (0 BP), puisqu'à partir de cette année-là, les essais nucléaires ont profondément modifié les concentrations atmosphériques en ^{14}C.

TABLEAU 2.4 (suite)

	Extraits lipidiques					
	Âge BP[a] (céramologie)	N° échantillon (ETH)	Quantité d'extrait	Âge ^{14}C BP (± 1σ)	Âge ^{14}C BP calibré (68 %)	Âge ^{14}C BP calibré (95 %)
1330.US2	2350-2210	-	-	-	-	-
1330.US6	2350-2210	ETH-59648	1,3 mg	2806 (± 28)	2946-2872 (68,2 %)	2994-2846 (95,4 %)
1330.E	-	ETH-63066	0,8 mg	122 (± 27)	117-65 (31,5 %) 265-243 (12,3 %) 142-124 (9,4 %) 37-23 (8,0 %) 231-218 (7,0 %)	149-53 (47,8 %) 271-186 (32,7 %) 48-10 (14,9 %)
4564.US8	env. 1750	ETH-63064	1,5 mg	1784 (± 25)	1735-1690 (37,9%) 1670-1625 (30,3 %)	1812-1686 (61, 0 %) 1676-1620 (34,4 %)

	Sols bruts					
	Âge BP[a] (céramologie)	N° échantillon (ETH)	Quantité de sol	Âge ^{14}C BP (± 1σ)	Âge ^{14}C BP calibré (68 %)	Âge ^{14}C BP calibré (95 %)
1330.US6	2350-2210	ETH-65607	230 mg[b]	3042 (± 28)	3257-3210 (37,6 %) 3331-3293 (27,0 %) 3192-3185 (3,6 %)	3346-3168 (95,4 %)
1330.E	-	ETH-65606	140 mg[c]	7597 (± 54)	8442-8362 (68,2 %)	8539-8328 (95,4 %)
1763.US2	2900-2750	ETH-66449	200 mg[b]	3022 (± 23)	3316-3171 (68,2 %)	3336-3145 (95,4 %)
4564.US8	env. 1750	ETH-65605	145 mg[c]	2072 (± 27)	2064-1996 (56,7 %) 2104-2086 (11,5 %)	2125-1986 (91,8 %) 1962-1951 (1,9 %) 1981-1970 (1,7 %)

[a]BP: « *Before Present* » *i.e.*, avant l'année 1950 prise pour référence (0 BP), puisqu'à partir de cette année-là, les essais nucléaires atmosphériques ont profondément modifié les concentrations atmosphériques en ^{14}C.

[b]mesures effectuées sur des échantillons de sols après extraction des lipides aux solvants (CH_2Cl_2/CH_3OH, 1/1, v/v) suivie d'une décarbonatation.

[c]mesures réalisées sur des échantillons de sols bruts après décarbonatation.

Les données relatives aux mesures de datation sont reportées dans le Tableau 2.4 pour la miliacine, les extraits organiques bruts et les échantillons de sols pour lesquels les âges sont exprimés en BP (« *Before Present* », le présent étant l'année de référence 1950 ; Reimer *et al.*, 2004). L'âge ^{14}C doit ensuite être calibré selon la courbe de calibration choisie (IntCal13 ; Reimer *et al.*, 2013) permettant de tenir compte des variations atmosphériques en ^{14}C au cours du temps (cf. § 1.3.2). L'âge calibré en BP peut être, si nécessaire, transposé en âge BC/AD (avant/après J.-C.), plus communément utilisé par la communauté archéologique, en tenant compte de l'année de référence, autrement dit de l'année 1950.

Que ce soit dans le cas du silo 1330 ou des latrines 4564, les extraits lipidiques des sols de comblement sont près de 300 ans plus récents que la matière organique totale des sols (Figure 2.9). Cette différence d'âge témoigne de l'existence, dans la partie non extractible de la matière organique, d'une partie plus ancienne, composée de matériel réfractaire. Par ailleurs, la datation au ^{14}C indique que la matière organique du sol ayant comblé le silo 1330 (3346 – 3168 BP) ainsi que son contenu lipidique extractible (2994 – 2846 BP) sont plus anciens que la structure elle-même (2350 – 2210 BP évalué d'après la typologie de la céramique). Par conséquent, le silo semble avoir été rempli par du matériel plus ancien ou un mélange de matériel contemporain et plus ancien, renforçant ainsi l'idée que le contenu lipidique analysé à partir des sols ayant comblé les silos n'est pas nécessairement en relation directe avec l'usage qui en a été fait. A l'inverse, les résultats de datation obtenus dans le cas des latrines (structure 4564, ~ 1750 BP) suggèrent que son remplissage s'est produit principalement à partir de matériel relativement contemporain à la structure elle-même (1812 – 1686 BP pour l'extrait lipidique et 2125 – 1986 BP pour le sol), très certainement en lien avec l'apport de matière fécale au sein de cette structure (cf. Chapitre 3).

En ce qui concerne les mesures de datation des encaissants, seule la matière organique d'un échantillon (1330.E) et son extrait lipidique correspondant ont été mesurés. Il ressort de ces mesures que la matière organique totale est relativement ancienne (~ 8400 BP), bien plus en tout cas que celle des sols de comblement du silo que cet encaissant contient (env. 3200-3300 BP). En revanche, de manière tout à fait surprenante, l'extrait lipidique de l'encaissant montre un âge plutôt récent (entre 23 et 265 BP), ce qui pourrait s'expliquer par une contamination de notre extrait avec du matériel moderne. Il convient de noter que les extraits lipidiques issus des encaissants sont généralement très faibles et qu'une contamination est donc envisageable. Nous avons donc pris le parti de ne pas prendre en compte cette valeur, considérée comme « aberrante ».

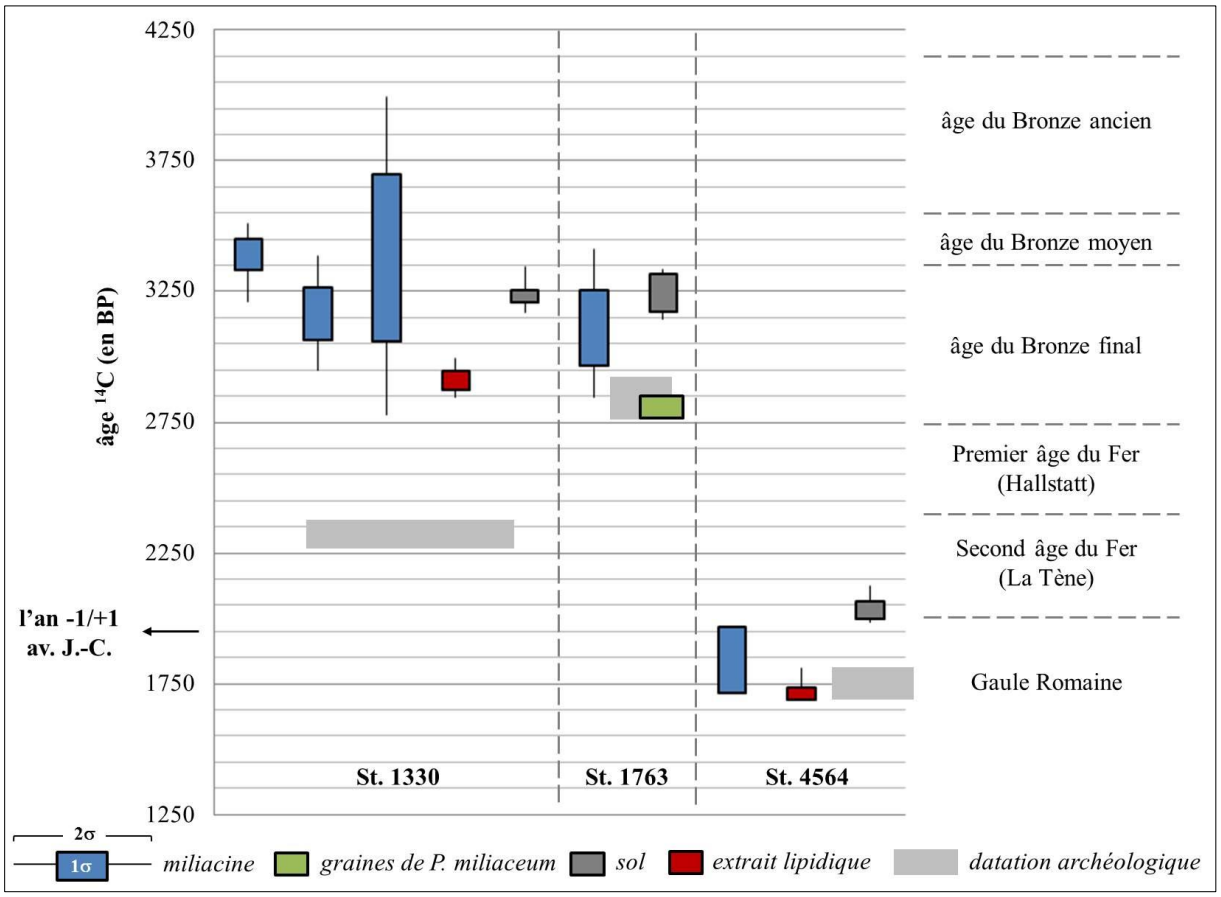


FIG. 2.9 Représentation graphique des âges ^{14}C BP calibrés obtenus pour les échantillons de miliacine isolée (en bleu), les extraits lipidiques (en rouge), la matière organique totale des sols (en gris) et l'échantillon de graines (en vert) en fonction de l'âge des structures, tel que déterminé par céramologie (« datation archéologique ») et lien avec les périodes de l'Histoire (à droite).

Dans le cas des silos protohistoriques étudiés (silos 1763 et 1330), la miliacine est manifestement plus ancienne que les structures archéologiques à partir desquelles elle a été extraite. En effet, les échantillons de miliacine issus de ces sols de comblement sont tous datés de l'âge du Bronze (Figure 2.9), entre 3994 BP et 2776 BP (soit 2044 – 826 av. J.-C.) si l'on considère les extrema, alors que les silos 1763 et 1330 étaient probablement en fonction respectivement entre 2900 – 2750 BP (fin de l'âge du Bronze) et 2350 – 2210 BP (second âge du Fer) tel que cela a été déterminé par céramologie. Ces résultats corroborent l'hypothèse émise sur la base de la quantification de la miliacine dans les silos selon laquelle les silos auraient servi de «pièges archéologiques» en conservant la marque d'une culture de millet, remontant à au moins 3000 ans, comme le souligne la présence de miliacine préservée dans ces sols. Dans le cas du silo 1330, l'écart observé entre l'âge de la structure et celui de la miliacine, -ce dernier ayant été mesuré à trois profondeurs de comblement (US2, US6 et

US10), et fournissant un âge sensiblement identique- est, à ce titre, particulièrement important et représente plus de 600 ans. Cette similitude d'âge pour les trois échantillons de miliacine suggère que la structure a vraisemblablement -et assez logiquement- été comblée rapidement par un même sol environnant. En revanche, la miliacine extraite du silo 1763 (3257 – 2965 BP, soit entre 1307 et 1015 av. J.-C.) est, cette fois-ci, contemporaine ou immédiatement antérieure à la structure datée de la fin de l'âge du Bronze (2900 – 2750 BP), période au cours de laquelle cette céréale a été manifestement stockée et/ou consommée, comme le démontre la présence, à la base de la structure, de restes de grains de millet carbonisées âgées d'environ 2800 ans (mesure de datation des grains, mis au jour dans l'US2 du silo 1763, réalisée par le laboratoire de radiocarbone de Poznań, échantillon Poz-80225 : 2851 – 2786 BP (68 %), soit 901 – 836 av. J.-C. ; Clément Féliu, résultats non publiés). En conclusion, contrairement à ce que l'on pourrait penser à première vue, les résultats de quantification de la miliacine issue des silos rejoignent les données de datation, et montrent sans ambiguïté que la miliacine ne traduit pas l'existence de stockage de millet dans les silos -même si cela ne peut être exclu-, mais plutôt celle d'une culture de millet antérieure aux silos, et dont l'empreinte moléculaire a été enregistrée dans les sols ayant comblé les silos après leur abandon. La présence de résidus carbonisés de millet contemporains au silo 1763 indique que la culture de cette céréale s'est au moins poursuivie jusqu'au creusement de ce silo.

A la lumière de ces résultats de datation au radiocarbone, reconsidérons à présent les données isotopiques ($^{13}C/^{12}C$) se rapportant à la miliacine ainsi qu'aux différentes familles de composés linéaires, préservés au sein des échantillons du silo 1330. Comme nous avons pu le constater précédemment, il existe un écart de plusieurs siècles entre l'âge de la miliacine mesuré par datation au ^{14}C et l'âge de la structure 1330. Ce résultat implique que le sol qui s'est trouvé piégé au sein de la structure, une fois cette dernière ayant été abandonnée (*i.e.*, au cours du Second âge du Fer), a eu le temps de connaître différentes phases de végétation. A la suite de la culture de millet (plante en C4), un couvert végétal constitué de plantes herbacées, exclusivement de type C3, a pu se développer et être utilisé, par exemple, comme pâturage ou culture céréalière (blé, par exemple). La durée pendant laquelle ces végétations en C4 puis en C3 ont successivement été en place ne peut être précisée dans la mesure où l'âge déterminé pour la miliacine correspond à un âge moyenné résultant de la combinaison de contributions plus anciennes et de contributions plus récentes pour lesquelles il est difficile d'en connaître les limites de début et, surtout, de fin (la culture du millet a perduré au moins jusqu'à l'âge du Bronze final). Cette transformation du paysage végétal a ainsi conduit progressivement au

remplacement de la signature moléculaire issue du millet par celle provenant des plantes en C3 ayant remplacé le millet. Pour chaque structure moléculaire considérée, la vitesse de ce remplacement dépend, d'une part, de l'importance de la contribution provenant du millet par comparaison avec celle apportée par les plantes en C3 et, d'autre part, de la stabilité de la structure considérée. Ainsi, par exemple, la signature isotopique spécifique de la miliacine, qui possède une structure particulièrement stable grâce à sa fonction méthoxy en C-3 (Jacob et *al*., 2005), et qu'aucune plante européenne en C3 semble biosynthétiser [4] (Bossart et *al.*, 2013), n'a pas pu être modifiée (*i.e.*, « diluée » par un apport de cette même molécule, mais issue d'une plante en C3). En revanche, dans le cas des composés linéaires, la dégradation continue de ces derniers, au cours du temps, et l'apport permanent de nouveaux composés linéaires dans le sol, issus cette fois de plantes en C3 ayant succédé au millet, ont conjointement entraîné la dilution progressive de la signature moléculaire et isotopique des composés linéaires originellement issus de plantes en C4. Une telle situation est tout à fait comparable à celle décrite par Mendez-Millan et *al.* (2014) qui ont étudié l'évolution des signatures isotopiques de lipides dans un sol au cours d'une chronoséquence de trente ans, au cours de laquelle la savane (dominée par des plantes en C4) a été remplacée par une plantation d'Eucalyptus (C3). L'empreinte moléculaire et isotopique de méthyléthers triterpéniques, spécifiques des plantes de la savane, n'a été que peu altérée, alors que les rapports de $\delta^{13}C$ d'une partie des lipides linéaires ont, au cours de cette phase de transition, évolué vers des valeurs de $\delta^{13}C$ plus négatives, ce qui représente un « shift » caractéristique du passage d'une végétation en C4 à une végétation en C3. Inversement, lors du passage d'une culture en C3 (blé, par exemple) vers une culture en C4 (maïs), les rapports $^{13}C/^{12}C$ des constituants du sol tendent vers des valeurs moins appauvries en ^{13}C (Lichtfouse et *al*., 1995). De nombreuses études ont mis à profit ces variations isotopiques au sein des sols afin de mettre en évidence un changement de couvert végétal et d'étudier le « turn-over » de la matière organique causé par ce changement (*e.g.*, Cerri et *al*., 1985, Balesdent et *al*., 1988, Mariotti et Peterschmitt, 1994, Pessenda et *al*., 1998).

[4] Les plantes productrices de miliacine, connues dans l'état actuel des recherches, ont été répertoriées par Bossard et *al.* (2013) : *Eragrostis ferruginea*, *Miscanthus floridulus*, *Panicum dichotomiflorum*, *Paspalum dilatatum*, *Microstegium vimineum*, *Syntherisma sanguinalis*, *Glyceria acutiflora* et différentes espèces de *Chionochloa*. Ces plantes étant soit de type C4 (Waller et Lewis, 1979, Sage et Monson, 1999, Andres, 1992), soit natives de zones géographiques localisées hors de l'Europe (par exemple, les plantes du genre *Chionochloa* sont originaires d'Asie du Sud-Est et plus spécialement de Nouvelle-Zélande), il semble exclu que de telles plantes aient pu se développer sur le sol d'Obernai au cours de la Protohistoire.

A la différence des silos protohistoriques, le sol de comblement du silo 1817, daté du Néolithique moyen (6550 – 6250 BP soit 4600 – 4300 av. J.-C.), se caractérise par l'absence de miliacine. Ce résultat suggère donc que la culture du millet n'était pas encore introduite dans la région à cette période.

Enfin, la structure 4564 (1969 – 1714 BP, *i.e.*, de 19 av. J.-C. à 236 ap. J.-C. ; Tableau 2.4), qui, comme nous le verrons dans le chapitre suivant, correspond à des latrines de la période Gallo-Romaine d'après datation archéologique, contient des sols de comblement particulièrement riches en miliacine (cf. § 3.3.2, Figure 3.10). La datation de cette dernière (Tableau 2.4) fournissant un âge contemporain à celui de la structure, il semble, de ce fait, vraisemblable que la population gallo-romaine au niveau du site d'Obernai ait consommé du millet. La miliacine, ingérée via l'alimentation mais visiblement difficilement assimilée et digérée, aurait alors été excrétée sans être dégradée, et se serait accumulée dans les latrines, parmi les déchets d'origine fécale (cf. Chapitre 3).

Les différentes mesures de datation au ^{14}C mettent donc en évidence une culture de millet à la période de l'âge du Bronze et à la période romaine tout au moins, ce qui paraît tout à fait envisageable au vu des données historiques et archéologiques retraçant l'histoire de cette céréale. En Alsace, où le développement des pratiques agricoles remonte à environ 4500 av. J.-C. (Ruas et Marinval, 1991), peu de rapports archéologiques font état de restes carpologiques de millet au cours de la Protohistoire, avec quelques rares attestations de sa culture et de sa consommation au cours de l'âge du Fer (Wiethold, 2000, Bataille, 2014, Goude et *al.*, 2015). Rares sont également les mentions de restes de millet commun en Alsace mis au jour sur des sites archéologiques de la période romaine (Vandorpe et Jacomet, 2011). Nos observations relatives au site archéologique d'Obernai viennent donc compléter ces données historiques se rapportant à la culture de millet tant à l'échelle régionale que nationale.

Lorsque nous nous intéressons de plus près à l'histoire de cette céréale, un peu tombée en désuétude de nos jours, il apparaît que celle-ci est originaire de Chine où ses premiers foyers de domestication remontent au VIII^{ème} millénaire av. J.-C. (Laporte, 2001, Fuller, 2007, Lu *et al.*, 2009). Notons à ce propos qu'en Chine, les graines de millet étaient, par exemple, mises à fermenter avec d'autres céréales locales afin de produire de la bière (Wang et *al.*, 2016). Par la suite, la culture de millet s'est progressivement diffusée en Asie et au Proche-Orient avant d'atteindre l'Europe Centrale à la fin du Néolithique (Hunt *et al.*, 2008). Alors qu'en France, le blé et l'orge sont cultivés dès le Néolithique (Ruas et Marinval, 1991, Martin

et al., 2007), il faut attendre la Protohistoire pour voir apparaître une diversification des espèces céréalières et les premières attestations, par carpologie, de la culture de *P. miliaceum* dès l'âge du Bronze ancien (vers 1700 av. J.-C. ; Marinval, 1992, 1995). Il convient de préciser que des caryopses de millet, associés à de la céramique du Néolithique ancien (vers 3500 av. J.-C.) ont été identifiés en France, mais que cette découverte singulière, sans aucun équivalent pour cette époque en France, est toutefois sujette à discussion (Marinval, 1995). Les âges du Bronze et du Fer sont donc associés à une période d'intensification de la culture de millet en France. Les graines de millet étaient alors stockées avec leurs enveloppes protectrices (les glumelles) pour une meilleure conservation au sein de silos enterrés, dont ceux mis au jour à Obernai sont le parfait exemple, ou dans des vases (Marinval, 1995). Puisque ces graines, en l'état, étaient indigestes et donc impropres à la consommation, il était ensuite nécessaire d'en ôter les glumelles (Lundström-Baudais et *al.*, 2002) pour ensuite les cuisiner sous forme de bouillies ou de galettes (Marinval, 1995). Par la suite, lors de la conquête de la Gaulle, les romains apportèrent avec eux de nouvelles espèces végétales, principalement d'origine méditerranéenne, qui sont à l'origine d'une diversification importante des denrées alimentaires consommées (Cabanis et *al.*, 2015). A partir de cette période, le millet est alors progressivement remplacé par d'autres céréales (apparition du seigle, par exemple). La culture de millet est finalement totalement abandonnée au début du Moyen-âge (Jacob *et al.*, 2008b).

2.4. Conclusion

Le site archéologique d'Obernai (Alsace, France) a offert aux archéologues l'opportunité d'étudier les pratiques agricoles locales grâce à la découverte d'un ensemble important de silos protohistoriques utilisés pour le stockage de céréales. L'analyse des lipides préservés et extraits de certains sols de comblement, issus de structures archéologiques choisies pour l'étude, a permis de mettre en évidence l'omniprésence de la miliacine qui témoigne d'une culture de millet commun sur le site. La datation au ^{14}C de la miliacine isolée, accompagnée de la datation de sols et d'extraits organiques associés, indique que cette culture était établie au cours de l'âge du Bronze ainsi qu'au cours de la période Gallo-Romaine. Il s'agit là de l'unique attestation de millet en Alsace pour la période de l'âge du Bronze, ce qui offre de nouvelles perspectives pour la reconstitution des pratiques agricoles et des régimes alimentaires dans l'Est de la France. L'Alsace, de par son positionnement géographique, constituait probablement une zone d'échange, au carrefour des cultures, qui a

donc pu jouer un rôle central dans la diffusion du millet et plus largement dans la diffusion et la transmission de pratiques traditionnelles agricoles en provenance d'Europe de l'Est.

Au sein des silos, aucune variété de céréales autres que le millet n'a pu être identifiée par GC-MS sur la base de critères moléculaires. Dans la mesure où l'analyse de graines d'autres types de céréales (blé, orge, seigle) récoltées en contexte archéologique n'a pas permis de mettre en évidence des marqueurs moléculaires spécifiques et stables (voir annexe), il est possible que nos analyses lipidiques ont tendance à surévaluer l'importance du millet, la miliacine possédant un très fort potentiel de préservation à l'inverse de dérivés de type alkylrésorcinols présents dans les autres céréales étudiées (voir en annexe). Nous pourrions envisager, à l'avenir, d'analyser d'autres éléments de céréales (tiges, feuilles, …) à la recherche de nouveaux critères chimiotaxonomiques permettant de mettre en évidence des sols cultivés avec ces céréales. Au stade actuel de nos travaux, nos résultats dévoilent une des limites majeures de l'archéologie moléculaire en ce qui concerne la reconnaissance de céréales et les reconstitutions « alimentaires » en archéométrie, à savoir le potentiel de préservation de marqueurs lipidiques chimiotaxonomiques.

Annexe du chapitre 2



2.5. Etude complémentaire concernant le contenu lipidique de graines de céréales

L'étude moléculaire des silos d'Obernai, présentée précédemment, a conduit à l'identification de la miliacine, un composé répondant aux critères de robustesse et de spécificité des biomarqueurs chimiotaxonomiques puisque celui-ci est étroitement associé à la céréale de millet commun comme l'ont montré les travaux entrepris par le Dr. Jérémy Jacob et ses collègues (Jacob et *al.*, 2005, 2008b, Bossard et *al.*, 2013). Nous nous sommes alors demandé dans quelle mesure il serait possible de caractériser au moyen de lipides chimiotaxonomiques d'autres espèces de céréales, notamment en contexte archéologique. C'est ainsi que nous avons entrepris l'analyse du contenu lipidique de diverses céréales modernes et archéologiques avant de procéder à l'étude de restes alimentaires anciens de nature inconnue.

2.5.1. Etude de céréales contemporaines

Le contenu lipidique de plusieurs espèces céréalières, communément cultivées et donc fréquemment rencontrées lors d'études carpologiques, a été examiné. Il s'agit de grains d'épeautre (*Triticum spelta*), de blé (*Triticum* sp.), de seigle (*Secale cereale*), d'orge (*Hordeum vulgare*) et d'avoine (*Avena* sp.) que nous nous sommes procurés au "Moulin d'Hurtigheim" (Bas-Rhin, Alsace ; Figure 2.10).

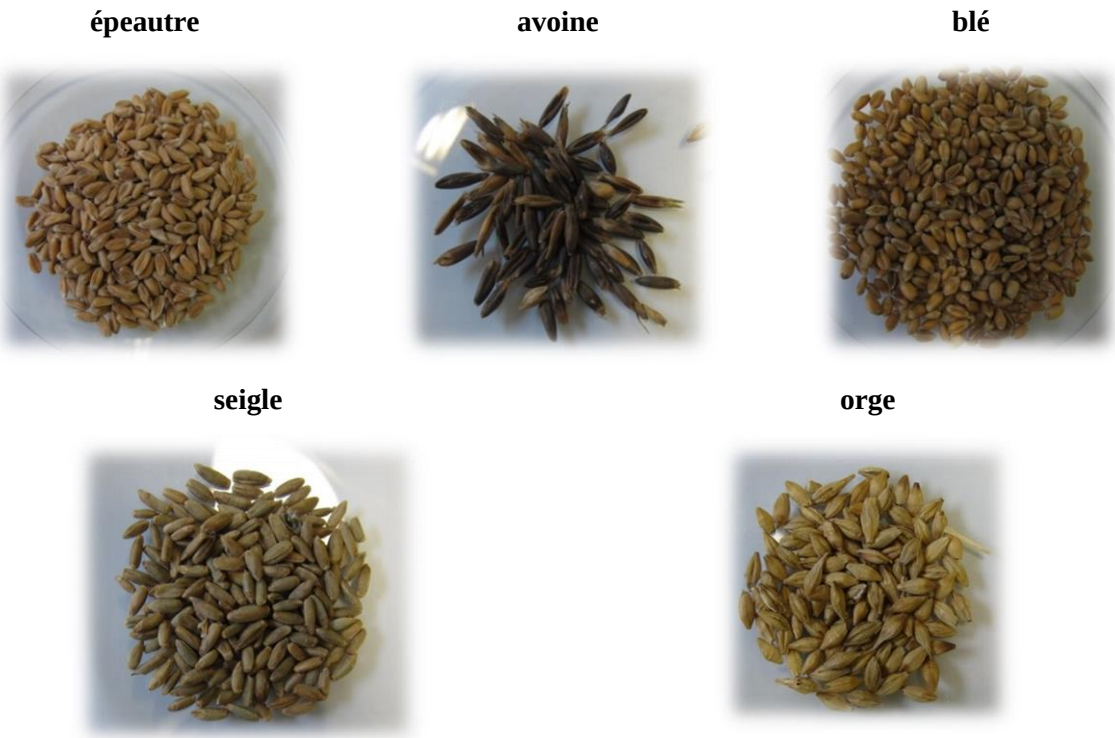


FIG. 2.10 Graines de référence contemporaines (Moulin d'Hurtigheim, Alsace, France).

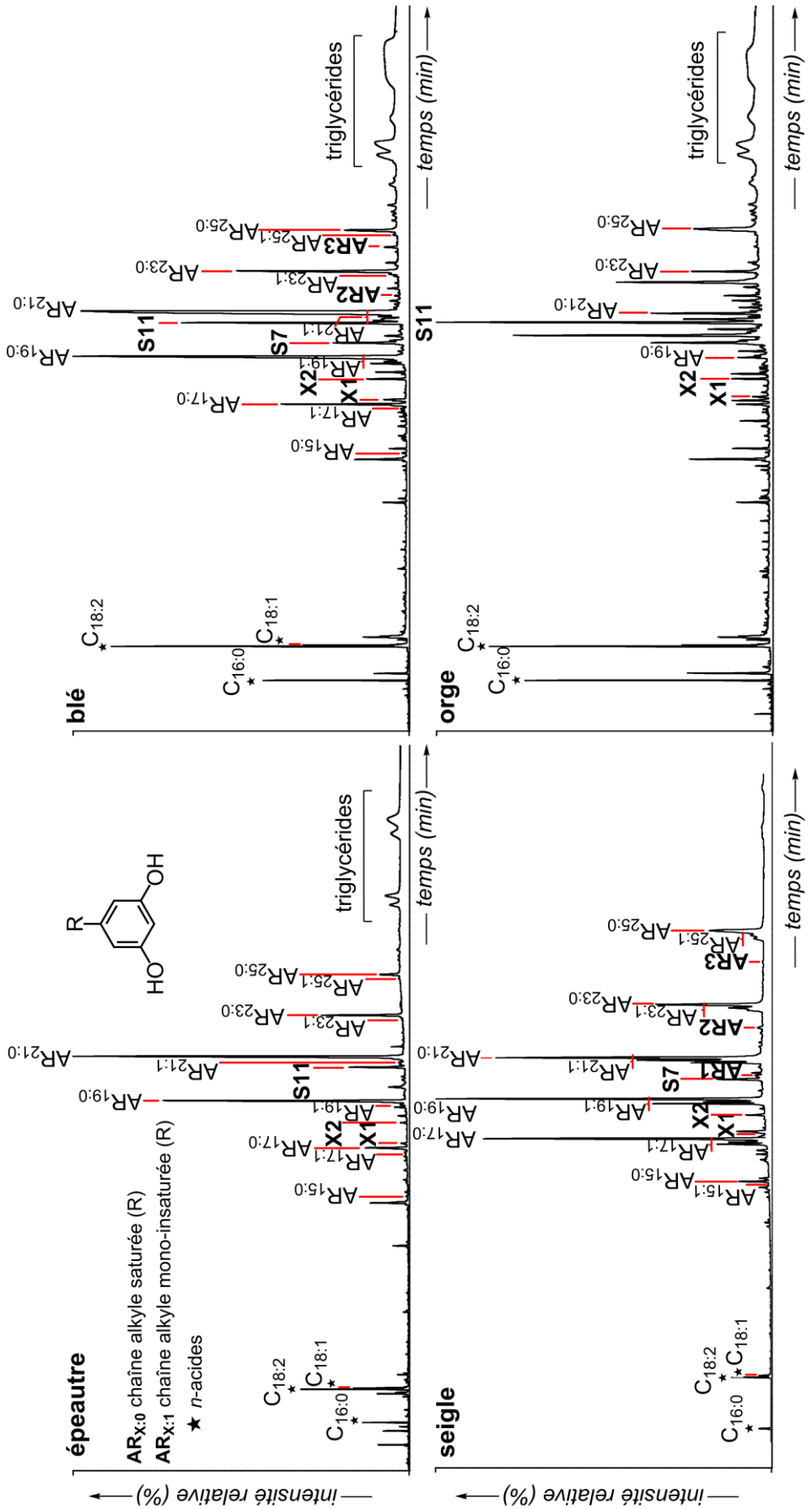


FIG. 2.11 Chromatogrammes en phase gazeuse montrant le contenu moléculaire de l'extrait lipidique apolaire obtenu à partir de graines d'épeautre, de blé, de seigle et d'orge (Moulin d'Hurtigheim, Alsace, France). **ARx** : alkylrésorcinols avec « x » : nombre de carbone de la chaîne alkyle. Les alcools (phénols et stérols) sont analysés sous la forme d'acétates et les acides sous la forme d'esters méthyliques.

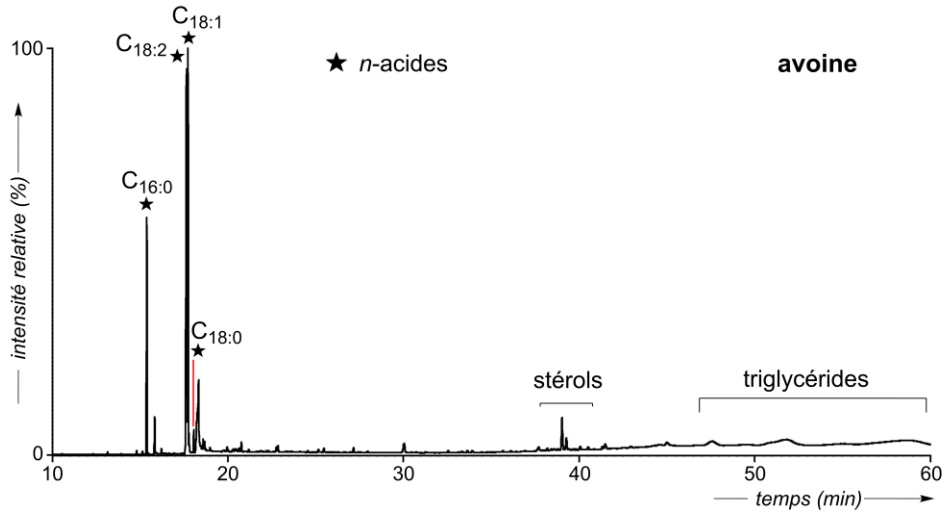


FIG. 2.12 Chromatogramme en phase gazeuse de l'échantillon contemporain de graines d'avoine en provenance du Moulin d'Hurtigheim (Alsace, France). Les stérols sont analysés sous la forme d'acétates et les acides sous la forme sous la forme d'esters méthyliques.

A première vue, les extraits lipidiques des graines d'épeautre, de blé, d'orge et de seigle présentent une grande similitude au niveau des profils chromatographiques des extraits lipidiques (Figure 2.11). En effet, conformément aux données de la littérature, toutes ces graines contiennent un nombre important de dérivés d'alkylrésorcinols (AR), ce qui n'est pas le cas des graines d'avoine (Figure 2.12 ; Hengtrakul et *al.*, 1991, Seitz, 1992, Ross et *al.*, 2001, 2003). Les alkylrésorcinols se composent d'une molécule de résorcinol (dérivé phénolique possédant deux fonctions hydroxyles en positions *méta*) à laquelle est rattachée une longue chaîne *n*-alkyle saturée ou insaturée. La fragmentation en spectrométrie de masse (EI) de tels composés peut conduire soit à une rupture en β du cycle aromatique (rupture benzylique), soit à un réarrangement de Mc Lafferty (Figure 2.13 ; Budzikiewicz et *al.*, 1967, Ross et *al.*, 2004). Or, du fait de la présence de groupements oxygénés sur les positions *méta* du cycle aromatique, le réarrangement de Mc Lafferty se trouve favorisé (Budzikiewicz et *al.*, 1967) et conduit à la formation de l'ion positif de rapport *m/z* 124.

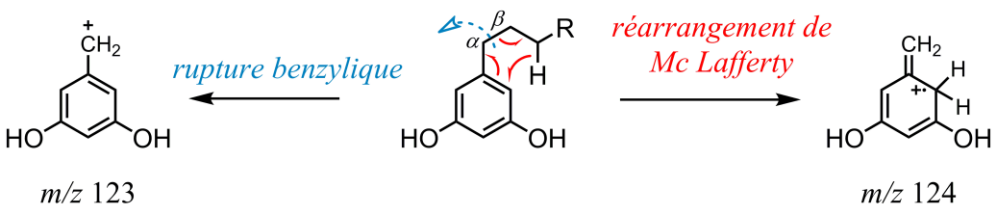


FIG. 2.13 Mécanismes de fragmentation (EI) des dérivés de type 5-*n*-alkylrésorcinols (d'après Budzikiewicz et *al.*, 1967, Ross et *al*, 2004).

Apparaissant comme le pic de base de cette famille de composés, le fragment *m/z* 124 a permis de reconnaître divers dérivés d'alkylrésorcinols parmi les échantillons de céréales étudiés (Tableau 2.5). Quelques spectres de masse d'alkylrésorcinols sont présentés en Figure 2.14. Seuls les dérivés d'alkylrésorcinols possédant de longues chaînes alkyles à nombre impair de carbone ont été identifiés, parmi lesquels les homologues de type 5-*n*-alkylrésorcinols en C_{15}-C_{23} dominent amplement le profil moléculaire (**$AR_{X:0}$**, Figure 2.11). En quantités plus modestes ont été caractérisés des dérivés présentant des chaînes alkyles mono-insaturées (**$AR_{X:1}$**), relativement abondants dans le seigle. De plus, des dérivés d'alkylrésorcinols possédant une β-cétone sur la chaîne alkyle (**AR1**-**AR3**) ont été identifiés sur la base du spectre de masse du 5-(2-oxononadécanyl)-résorcinol proposé par Seitz (1992). Outre la présence des fragments *m/z* 124 et *m/z* 123, liés respectivement au réarrangement de Mc Lafferty et à la rupture benzylique, le spectre MS de ces homologues d'alkylrésorcinols oxygénés se caractérise par un fragment particulièrement intense correspondant à la contrepartie de l'ion *m/z* 123 (*m/z* 267, 295 et 323 pour **AR1**, **AR2** et **AR3** respectivement).

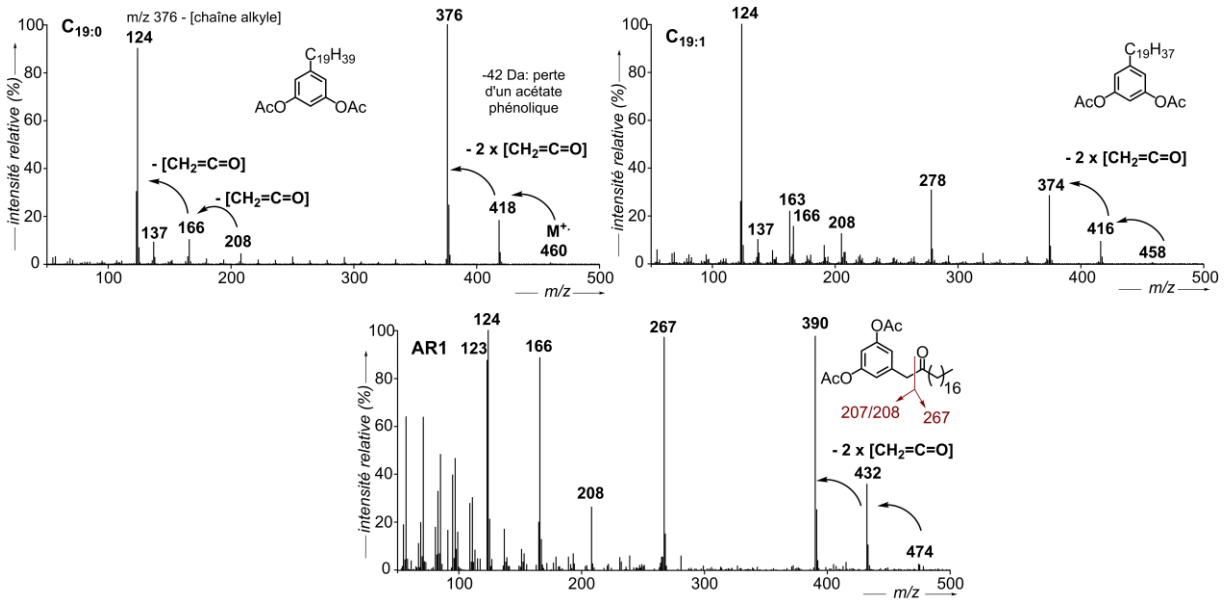


FIG. 2.14 Spectres de masse (EI, 70 eV) de quelques dérivés d'alkylrésorcinols identifiés dans les échantillons de graines de céréales contemporaines. Les composés sont analysés sous la forme d'acétates.

TABLEAU 2.5

Composition moléculaire des principaux lipides identifiés dans les extraits lipidiques apolaires des échantillons de graines d'épeautre, blé, orge, seigle et avoine (Moulin d'Hurtigheim, Alsace, France)

Céréales	***n*-alcanes**	***n*-alcools**	***n*-acides**		**Dérivés d'alkylrésorcinols (à chaîne impaire)**		
			saturés	Mono-insaturés	R : chaîne sans insaturation	R_1 : chaîne avec une insaturation	R_1 : chaîne sans insaturation et avec C=O
épeautre	traces	-	C_{16}* C_{18} C_{22}-C_{26}	$C_{18:2}$* $C_{18:1}$	C_{15}-C_{25} avec C_{19}* et C_{21}*	C_{17}-C_{25}	-[a]
blé	C_{25}-C_{31} avec C_{29}*	C_{22}-C_{30} avec C_{26}*	C_{16}* C_{18} C_{20}-C_{30}	$C_{18:2}$* $C_{18:1}$	C_{15}-C_{27} avec C_{19}* et C_{21}*	C_{17}-C_{25}	✓ [b]
orge	C_{25}-C_{31} avec C_{29}*	C_{22}-C_{32} avec C_{26}*	C_{16}* C_{18}	$C_{18:2}$* $C_{18:1}$	C_{19}-C_{27} avec C_{21}*	C_{19}-C_{25}	-
seigle	C_{25}-C_{33}	C_{26}* traces	C_{16} C_{18}	$C_{18:2}$* $C_{18:1}$	C_{15}-C_{25} avec C_{17}-C_{21}*	C_{17}-C_{25}	✓
avoine	traces	traces	C_{16} * C_{18}	$C_{18:2}$ $C_{18:1}$*	-	-	-

*****composé majeur de la famille moléculaire considérée.

[a]Composé non détecté

[b]Composé détecté

Les dérivés d'alkylrésorcinols s'avèrent être non spécifiques des céréales (Graminées) puisque leur présence a été mise en évidence au sein de nombreuses autres familles de plantes (Anacardiacées, Fabacées …), mais également parmi certains champignons, algues et même bactéries (Kozubek et Tyman, 1999). Par conséquent, les alkylrésorcinols ne peuvent être utilisés comme biomarqueurs chimiotaxonomiques pour ce type de céréales. Par ailleurs, certains articles font état de la dégradation des dérivés d'alkylrésorcinols lors de préparations culinaires impliquant des processus de fermentation et de cuisson (Winata et Lorenz, 1997), tandis que d'autres articles rapportent un phénomène de complexation entre les alkylrésorcinols et d'autres lipides (Ross et *al.*, 2003). Quoi qu'il en soit, ces observations réduisent considérablement les chances de détecter ces composés tels quels en contexte archéologique. Or, hormis les dérivés d'alkylrésorcinols, les graines analysées se sont révélées être pauvres en lipides, excepté en acides gras. La distribution de ceux-ci se caractérise par la forte prédominance des homologues non-spécifiques $C_{16:0}$, $C_{18:2}$, $C_{18:1}$, $C_{18:0}$, tout spécialement dans les graines d'avoine (Figure 2.12). Nous avons, par ailleurs, observé la présence de stérols (campestérol et β-sitostérol notamment), universellement présents chez les plantes, de tocophérols (α et β) et de triglycérides (Figures 2.11 et 2.12). Au final, ces analyses de graines contemporaines n'ont pas abouti à l'identification de nouveaux biomarqueurs spécifiques, ce qui semble grandement compromettre l'identification de ce type de graines de céréales en contexte archéologique au moyen d'outils moléculaires. Néanmoins, dans le cas de l'étude de sols agricoles, il pourrait s'avérer plus judicieux d'examiner le contenu lipidique des racines et des parties aériennes des céréales susceptibles d'entrer en contact avec le sol et dans lesquelles nous pourrions éventuellement identifier des biomarqueurs triterpéniques spécifiques et suffisamment résistants (idéalement des dérivés possédant une fonction $-OCH_3$, par exemple) pour une application en archéologie.

2.5.2. Analyses de graines archéologiques

Bien qu'aucun biomarqueur approprié pour la caractérisation d'espèces de céréales n'ait pu être identifié à partir de graines contemporaines, nous souhaitions tout de même évaluer la capacité des alkylrésorcinols à être préservées en contexte archéologique et, plus largement, à apprécier ce que pouvait être la signature moléculaire de restes carpologiques. Pour cela, des graines de blé, d'orge et de seigle, trouvées en contexte archéologique (fouilles sur différents sites de Strasbourg, France ; Figure 2.15) et suffisamment reconnaissables pour permettre leur identification par les spécialistes carpologues de l'INRAP, ont complété notre

étude moléculaire. De plus, une galette de céréales (ou gruau), de nature inconnue et trouvée sur le site archéologique de La Haute Borne (Nord, France), a été analysée.

blé (STR-1628, Strasbourg, INRAP)



blé (US-1358, Strasbourg, INRAP)



orge (US-1358, Strasbourg, INRAP)



seigle (US-1358, Strasbourg, INRAP)



Galette de nature inconnue (F50083-US55002, La Haute Borne)



FIG. 2.15 Graines découvertes en contexte archéologique dont l'extrait lipidique, lorsque cela a été possible, a été analysé par GC-MS.

Dans les échantillons de céréales de Strasbourg (Figure 2.16), quelques triterpènes à haut degré d'aromatisation ont été identifiés en faibles quantités. Il s'agit de composés résultant de l'aromatisation ou de la perte du cycle A de triterpènes pentacycliques présentant un squelette de type oléanane ou ursane. De tels composés, fortement aromatiques, sont associés à la dégradation microbienne, en condition anaérobie, de précurseurs triterpéniques piégés notamment au sein de dépôts sédimentaires (Laflamme et Hites, 1979, Trendel et *al.*, 1989, Freeman et *al.*, 1994). Etant donné l'absence de composés triterpéniques dans les graines de références (cf. § 2.4.1), leur détection au sein des échantillons de graines archéologiques étudiées, mises au jour à Strasbourg, laisse envisager un apport exogène de lipides issus de la dégradation de la matière organique de végétaux dans la fosse environnante. Ce type de milieu aquatique et anoxique est connu pour être favorable à la conservation de macrorestes archéobotaniques (Bouby, 2000) et pour favoriser des réactions d'aromatisation dans le cas de triterpènes de végétaux (Schnell et *al.*, 2014 et références citées). Le reste des

extraits lipidiques se compose de stérols et de triterpènes de végétaux n'étant pas suffisamment spécifiques pour en préciser une quelconque origine botanique. De manière surprenante également, l'un des composés majeurs de l'échantillon de blé STR-1628 est le coprostanol, un marqueur de matière fécale (cf. Chapitre 3), qui peut caractériser l'environnement (latrines, sans doute) dans lequel a été retrouvé cet ensemble de graines.

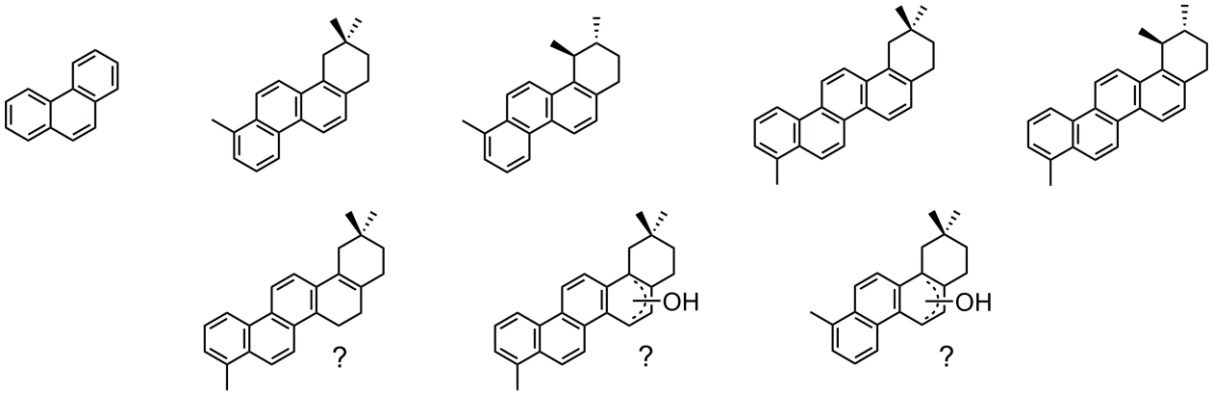
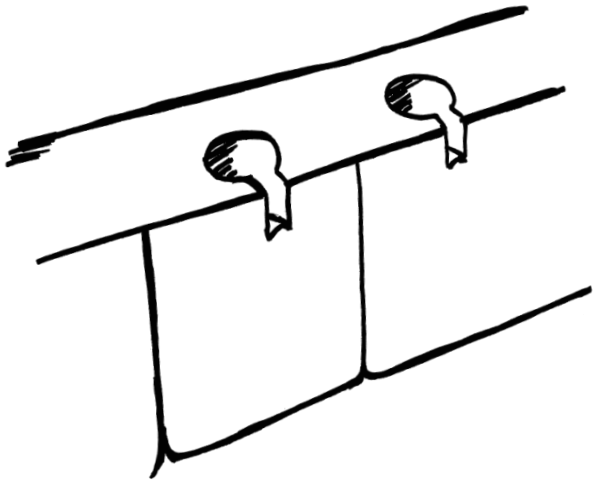


FIG. 2.16 Composés polyaromatiques identifiés dans l'échantillon de *Triticum aestivum & durum* en provenance de Strasbourg (STR-1628, INRAP).

Dans l'échantillon de gruau, la déception a été d'autant plus grande puisque, abstraction faite des nombreux composés liés à une contamination extérieure, aucun lipide endogène à l'échantillon n'a pu être extrait, probablement du fait de la trop forte altération (carbonisation) de ces graines. En l'absence de marqueurs chimiotaxonomiques « fiables » (résistants à l'altération, notamment), nous avons donc décidé de ne pas poursuivre cette étude et il semble difficile de reconnaître la nature de restes anciens de ce type de céréales par le biais d'analyses chimiques de graines préservées. Les études carpologiques restent alors à ce stade la meilleure façon de procéder, tout au moins lorsque les restes sont suffisamment identifiables.

Chapitre 3 : Analyse de sols anthropisés : le cas des latrines



3.1. Introduction

Au-delà de l'étude de vestiges archéologiques encore en place et du mobilier qui leur sont associés, les archéologues portent aujourd'hui un intérêt croissant aux marqueurs anthropiques piégés dans les sols et, notamment, ceux mis au jour en contexte urbain. Le rassemblement des populations dans les villes, l'aménagement du territoire et le développement d'activités économiques, politiques et sociales sont autant de phénomènes qui ont profondément marqué et modifié l'environnement. Cette interaction de l'homme avec son milieu se traduit notamment par une érosion artificielle des sols et une accumulation de matériaux issus de l'activité humaine (charbons, matière organique, débris, …). A cet égard, l'un des axes de recherche en plein essor actuellement concerne l'étude géoarchéologique des « terres noires » identifiées en milieu urbain (Cammas et *al.*, 2011). Il s'agit de dépôts organo-minéraux, peu stratifiés, se caractérisant par une couleur particulièrement sombre du sol en raison de son important contenu organique[1] (Macphail et *al.*, 2002, Fondrillon, 2007, Devos et *al.*, 2011). Malheureusement, ces « terres noires » ne sont que rarement fouillées et leur potentiel en tant qu'archives du sol n'est que peu exploité à des fins archéologiques. En effet, ces dépôts, datés pour la plupart du Moyen-âge, sont généralement rapidement décapés afin d'atteindre au plus vite les couches d'occupation inférieures (généralement du Haut-Empire ; Fondrillon, 2007). Suite à la prise de conscience, dans les années 1990, en France, de l'importance de ces sols dans lesquels l'empreinte d'une activité anthropique a pu être préservée, les quelques études géoarchéologiques récentes ont permis d'associer à ces « terres noires » différentes fonctions : fosses-dépotoirs, latrines-dépotoirs, puits, zones d'habitation ou d'activité artisanale, axes de circulation, espaces extérieurs urbains tels des cours et des jardins (Macphail et *al.*, 2002, Fondrillon, 2007 et références citées, Cammas et *al.*, 2011, Devos et *al.*, 2011).

L'étude des « terres noires » et, plus généralement, des sols anthropisés requiert une approche interdisciplinaire pouvant associer des études (géo)archéologiques, pédologiques, géomorphologiques, sédimentologiques, géotechniques, biogéochimiques, pouvant être mises en œuvre selon les moyens disponibles. Le sol est ainsi observé, dans un premier temps, à l'échelle macroscopique à travers l'étude de sa granulométrie, ses critères morphologiques ou l'examen de ses éléments exogènes grossiers comme les fragments de céramiques, les restes

[1] Si cette couleur noire est généralement associée à une teneur élevée en matière organique, il est important de préciser que certains sols contenant un grand nombre de charbons, mais peu de matière organique lipidique, peuvent également présenter une couleur similaire (Macphail, 1983).

anthracologiques et carpologiques (Devos et *al.*, 2011). Dans un second temps, l'investigation, à l'échelle microscopique, des constituants du sol vient compléter les données (études micromorphologiques, caractérisations moléculaires). A ce titre, l'étude de la matière organique des sols constitue un précieux objet d'étude archéométrique, cette matière étant susceptible de renfermer des marqueurs chimiotaxonomiques d'une activité humaine, comme l'agriculture par exemple (cf. Chapitre 2). Dans le cadre de ce chapitre, nous présenterons l'étude moléculaire de sols ayant comblé des structures archéologiques, de fonctions, à l'origine, inconnues. Les analyses en GC-MS ont mis en avant l'importance des 5β-stanols et des acides biliaires dans l'ensemble des échantillons examinés, démontrant ainsi une pollution fécale au sein de ces sols (*e.g.*, Leeming et *al.*, 1996, Bull et *al.*, 1999a, 2002, 2003, Derrien et *al.*, 2011, Baeten et *al.*, 2012, Sistiaga et *al.*, 2014a). Ces observations suggèrent, par conséquent, un phénomène d'anthropisation du sol lié à l'utilisation de latrines.

3.2. Présentation du corpus d'échantillons et du contexte archéologique

Onze structures archéologiques (Tableau 3.1), réparties sur quatre sites alsaciens dont trois situés à Strasbourg et un à Obernai (Bas-Rhin, France), ont été choisies pour cette étude.

TABLEAU 3.1

Corpus d'échantillons de sols archéologiques et de boues d'épuration contemporaines étudiés.

Nom	N° de prélèvement INRAP	Localisation	Datation
STh1	5972-PXX-1172-001 (fosse 1106)	Place Saint Thomas, Strasbourg	X^{ème} siècle ap. J.-C.
STh2	5972-PXX-1240-001		II^{ème} siècle av. J.-C. – I^{er} siècle ap. J.-C.
STh3	5972-PXX-1238-001 (fosse 1237)		X^{ème} siècle ap. J.-C.
STh4	5972-PXX-1120-001 (fosse 1121)		X^{ème} siècle ap. J.-C.
SE2	PR6 1090 (Structure 011)	Sainte Elizabeth, Strasbourg	Haut-Empire romain (50-II^{ème} siècle ap. J.-C.)
SE3	1086 (base)		
SE4	1064 (haut)		
3153	5892-PXX-3153 (US3153)	Place du Château, Strasbourg	XII^{ème} – XV^{ème} siècle ap. J.-C.
3009	5892-PXX-3009 (US3009)		
4564	US4, US8 et US9 (structure 4564)	Obernai	fin II^{ème} – milieu III^{ème} siècle ap. J.-C.
WTP1	-	Truchtersheim	actuel
WTP2	-		actuel

3.2.1. Structures de la Place St Thomas (Strasbourg)

Hormis l'échantillon STh2 issu de la plus ancienne couche du site datée au ^{14}C entre 196 avant J.-C. et l'an 45 de notre ère (fin de l'âge du Fer et début de l'occupation romaine), il s'agit de sols de comblement de fosses circulaires datées du Moyen-âge (X^{ème} siècle ap. J.-C.).



FIG. 3.1 Vue d'ensemble des fosses moyenâgeuses (**a**) et fosse circulaire 1121 (**b**) découvertes Place St Thomas (Strasbourg ; *photos* : Heidi Cicutta, INRAP).

L'objectif principal des analyses en géochimie organique était d'apporter une réponse quant à la fonction primaire de ces fosses et/ou de savoir si leurs parois avaient été renforcées par des tonneaux en bois, ce qui constituait l'hypothèse de départ des archéologues au vu de leur forme parfaitement circulaire.

3.2.2. Structures à Ste Elizabeth (Strasbourg)

Les sols analysés en provenance du site de Ste Elizabeth (Strasbourg) sont issus du remplissage de la fosse 11 (premier colmatage de la fosse pour l'échantillon SE2 et sommet du comblement pour l'échantillon SE3) et des alluvions situés au-dessus (échantillon SE4), comme cela est illustré en Figure 3.2. Ces sols de colmatage et ces alluvions forment une couche datée du Haut-Empire Romain (50-II^{ème} siècle ap. J.-C.). Aucune fonction n'a été attribuée à la structure 11 par les archéologues, d'où le recours aux analyses de géochimie organique.

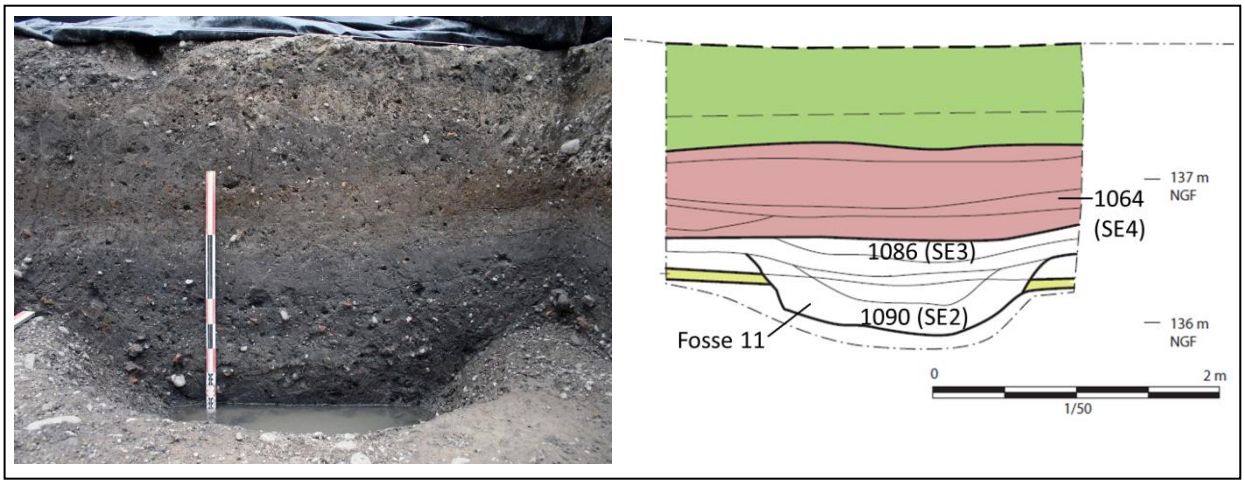


FIG. 3.2 Coupe archéologique du site de fouille de Ste Elizabeth au niveau de la fosse 11. NGF: « niveau général de la France » (*photo et dessin* : Richard Nilles, INRAP).

3.2.3. Structures de la Place du Château (Strasbourg)

Les sols analysés en provenance du site de la Place du Château (Strasbourg) ont été prélevés au sein de couches noires mises au jour à l'emplacement de l'ancien chantier de construction de la cathédrale actuelle érigée au cours du XII^{ème}-XV^{ème} siècle de notre ère (Figure 3.3). La coloration sombre visible au niveau de certaines couches archéologiques peut, dans certains cas, témoigner de la nature d'un sol riche en matière organique, ce qui a notamment suscité notre intérêt dans le cadre d'études de géochimie organique. L'une des hypothèses émises par les archéologues concernait la possibilité de stabulation de bétail à cet emplacement.



FIG. 3.3 Couches « noires » mises au jour lors des fouilles Place du Château à Strasbourg (*photos* : Nathalie Schneider, INRAP).

3.2.4. Structure 4564 à Obernai

Parmi les très nombreuses structures archéologiques que les fouilles de l'INRAP ont révélées à Obernai (cf. Chapitre 2), la structure 4564 utilisée au cours de l'occupation de la Gaule par les Romains (fin II^{ème} – milieu III^{ème} siècle ap. J.-C.) présente une stratigraphie particulière avec une superposition de niveaux bien visibles (Figure 3.4). Certaines couches présentent la particularité de posséder une couleur sombre marquée alternant avec des niveaux de couleur jaunâtre/verdâtre (couleurs plus particulièrement marquées lorsque le sol est détrempé). Deux hypothèses avaient été formulées par les archéologues quant à la fonction passée de cette structure: il pouvait s'agir soit d'un lieu ayant servi au travail (rouissage) du chanvre, soit d'anciennes latrines.

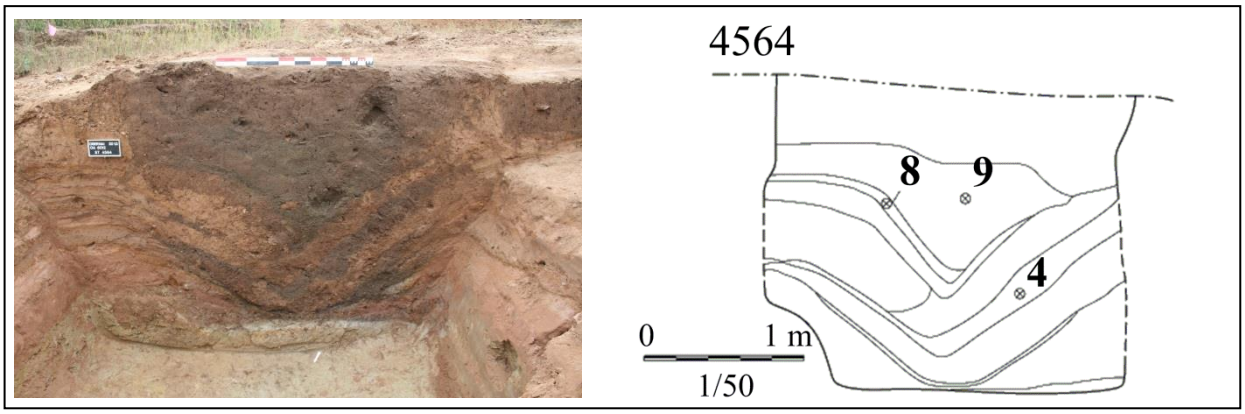


FIG. 3.4 Structure 4564 datée de la période romaine mise au jour à Obernai et localisation des échantillons 4, 8 et 9 prélevés pour les analyses de géochimie organique (*photo et dessin* : Clément Féliu, INRAP).

3.2.5. Station d'épuration contemporaine

Afin de procéder à une analyse comparative, un échantillon de boues d'une station d'épuration contemporaine localisée à Truchtersheim, en Alsace, a été prélevé à partir duquel deux prélèvements ont été effectués (WTP1 et WTP2 pour « *water treatment plan* »).

3.3. Résultats et discussion

3.3.1. Identification de biomarqueurs d'origine fécale

L'examen du contenu lipidique des échantillons de sols archéologiques par GC-MS a donné lieu à l'identification de divers composés linéaires tels que les *n*-acides, *n*-alcools et *n*-alcanes auxquels s'ajoutent de nombreux dérivés de stérols. Pour l'ensemble des extraits lipidiques, quelle que soit leur provenance, la signature moléculaire propre aux dérivés de

type *n*-alkyles est typiquement dominée par l'alcool en C_{26}, par les alcanes en C_{29} et C_{31} et par une série d'acides en $C_{24,26,28}$ (Figure 3.5), ce qui suggère une contribution significative de végétaux dans la matière organique du sol (van Bergen et *al.*, 1997, Trendel et *al.*, 2010).

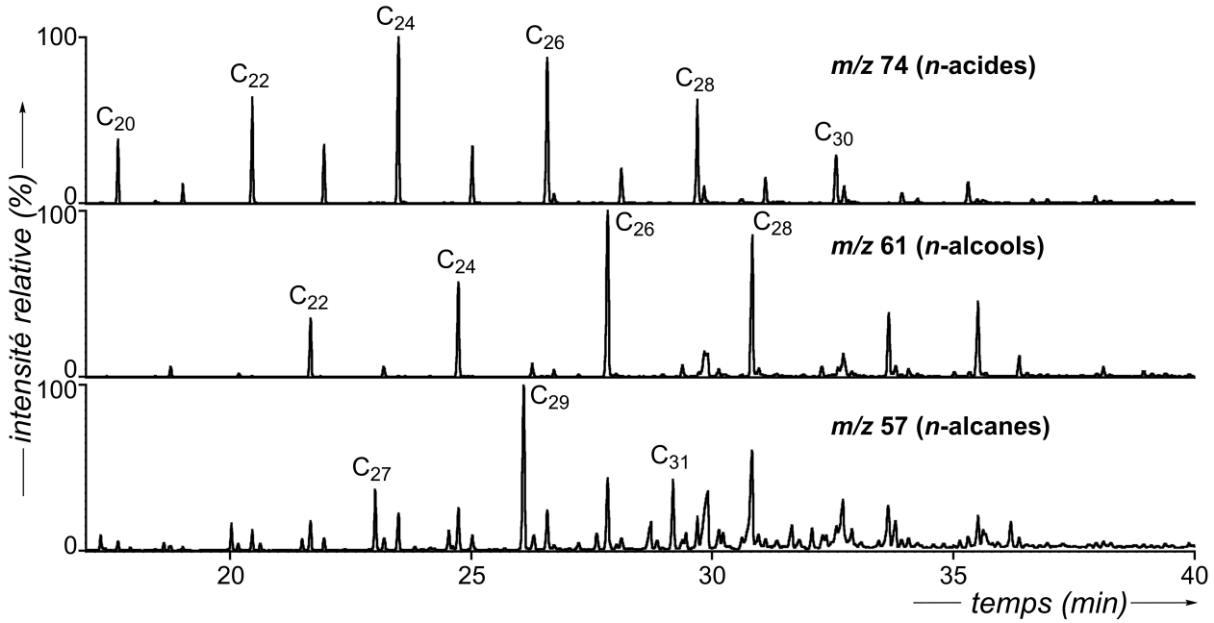


FIG. 3.5 Fragmentogrammes de masse *m/z* 74, 61 et 57 montrant la distribution typique des *n*-acides, *n*-alcools et *n*-alcanes obtenue pour les échantillons de sols anthropisés étudiés (exemple de l'échantillon SE2).

Les stérols et stanols détectés au sein des échantillons archéologiques appartiennent à la classe des stérols en C_{27} et C_{29} pour les composés majoritaires et en C_{28} pour les minoritaires. Les stéroïdes en C_{27} et C_{29}, tout particulièrement, se répartissent selon trois catégories : les Δ^5-stérols comprenant le cholestérol (**S4**, Figure 3.6) et le sitostérol (**S11**), les stanols présentant une stéréochimie 5α(H) (5α-stanols), tels que le 5α-cholestanol (**S5**) et le 5α-sitostanol (**S12**), et, enfin, ceux pour lesquels la stéréochimie de l'hydrogène en C-5 est de type 5β (5β-stanols), ce qui inclut le coprostanol (**S2**) et l'épicoprostanol (**S3**) ainsi que le 5β-sitostanol (**S9**) et l'épi-5β-sitostanol (**S10**). L'identification des stanols s'est faite en fonction de leur temps de rétention relatif en GC (Carrillo Hernández, 2004, Schaeffer et *al.*, 2013) et au regard de leurs spectres de masse caractéristiques présentant notamment le fragment spécifique à *m/z* 215, ce dernier étant lié à la fois à la perte de la fonction alcool acétylée en C-3 et à la rupture au niveau du cycle D (Figure 3.7). Quant aux Δ^5-stérols, la perte de l'acétate en C-3 donne lieu aux fragments de base à *m/z* 368, 382 et 396 respectivement pour les dérivés en C_{27}, C_{28} et C_{29}.

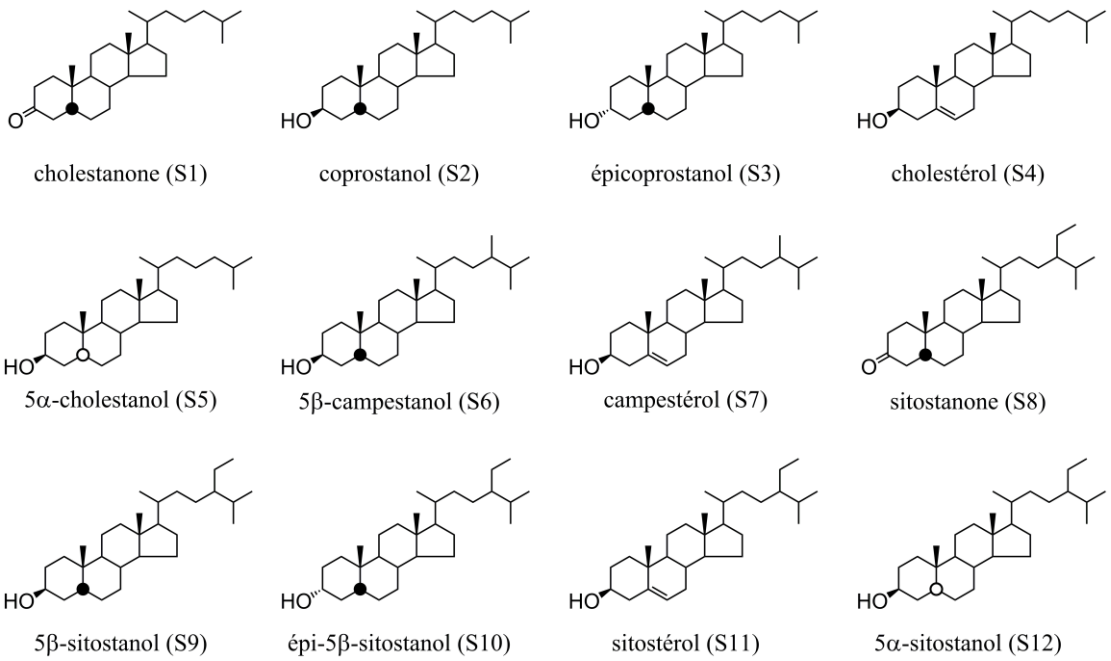


FIG. 3.6 Structures moléculaires des dérivés de stérols identifiés dans les échantillons archéologiques de sols anthropisés et comprenant les Δ^5-stérols, les 5α- et les 5β-stanols (les spectres de masse du coprostanol **S2** et du cholestanol **S5** sont présentés en Figure 3.7).

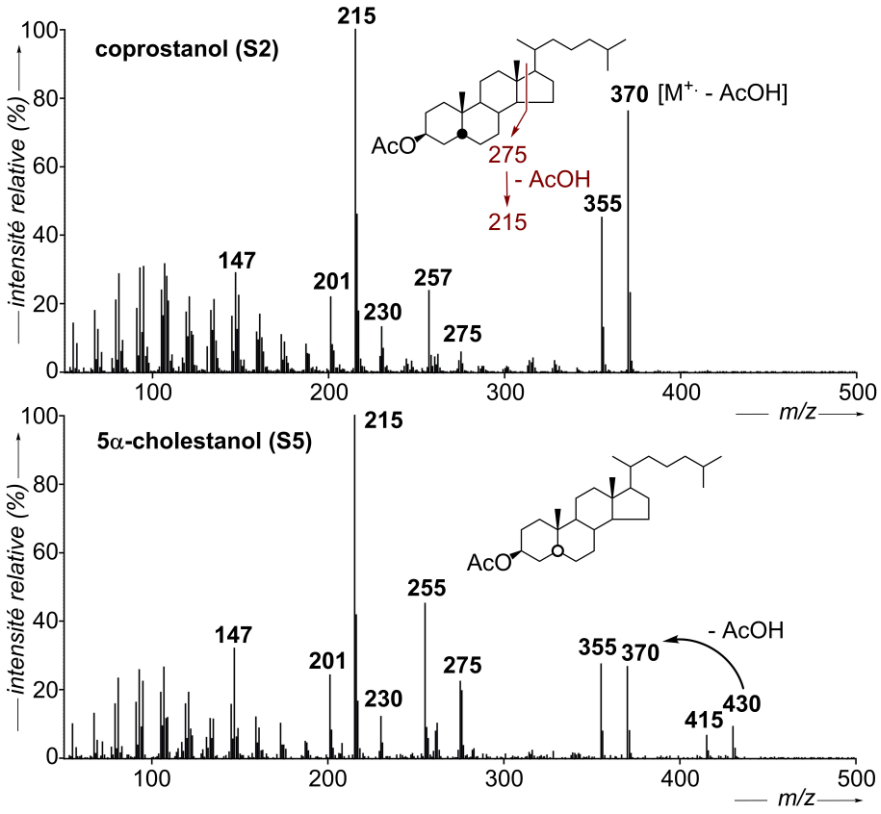


FIG. 3.7 Spectres de masse (EI, 70 eV) de l'acétate de coprostanol (**S2**) et de 5α-cholestanol (**S5**) identifiés dans les échantillons archéologiques.

Lorsqu'ils ne sont pas d'origine biosynthétique, les 5α-stanols **S5** et **S12** sont le résultat de la dégradation en conditions anaérobies du cholestérol (**S4**) et du sitostérol (**S11**) par les micro-organismes colonisant les sols et les sédiments (Figure 3.8.a ; Gaskell et Eglinton, 1975). En revanche, les 5β-stanols (**S2**, **S3**, **S6**, **S9** et **S10**) sont formés par hydrogénation des Δ^5-stérols *via* un processus microbiologique impliquant les bactéries entériques présentes à l'intérieur du tube digestif des animaux et des humains (Fig. 3.8.b ; Martin et *al.*, 1973, Gérard, 2014). Par conséquent, la présence de 5β-stanols au sein de paléosols est habituellement associée à un dépôt de matière fécale (Bull et *al.*, 1999a, Baeten et *al.*, 2012, Sistiaga et *al.*, 2014a, 2014b) ou à l'épandage de fumier (Bull et *al.*, 1999b, 2001). L'ensemble des échantillons analysés contiennent ces stérols fécaux, mais seuls les échantillons présentant une grande proportion de 5β-stanols ont fait l'objet d'une analyse plus approfondie. Il s'agit des structures STh3, SE2, SE3, SE4, 3009, 3153 et 4564 pour lesquelles la contribution en quantité très élevée de dérivés de coprostanol implique un apport important de matière fécale.

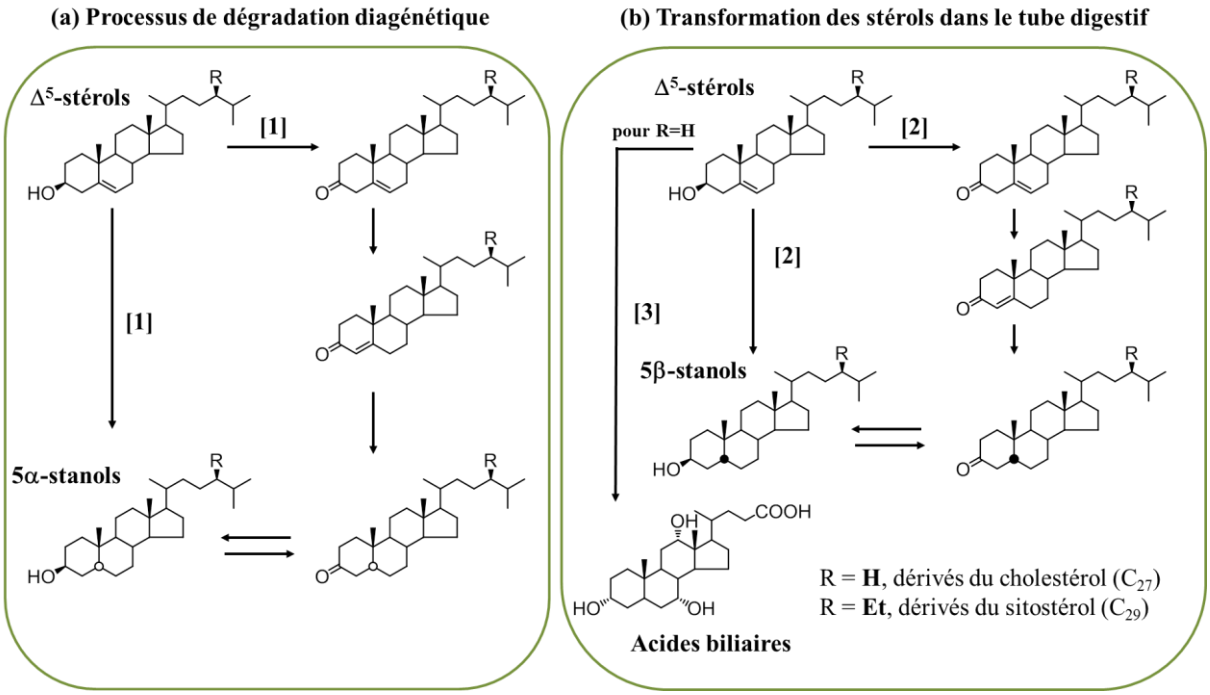


FIG. 3.8 Mode de formation des stanols et des acides biliaires à partir des Δ^5-stérols au sein de l'environnement (**a**) ou dans le tube digestif (**b**). Schéma modifié d'après les voies réactionnelles décrites dans [1] Grimalt et *al.*, 1990, [2] Gérard, 2014 et [3] Salen et *al.*, 1975.

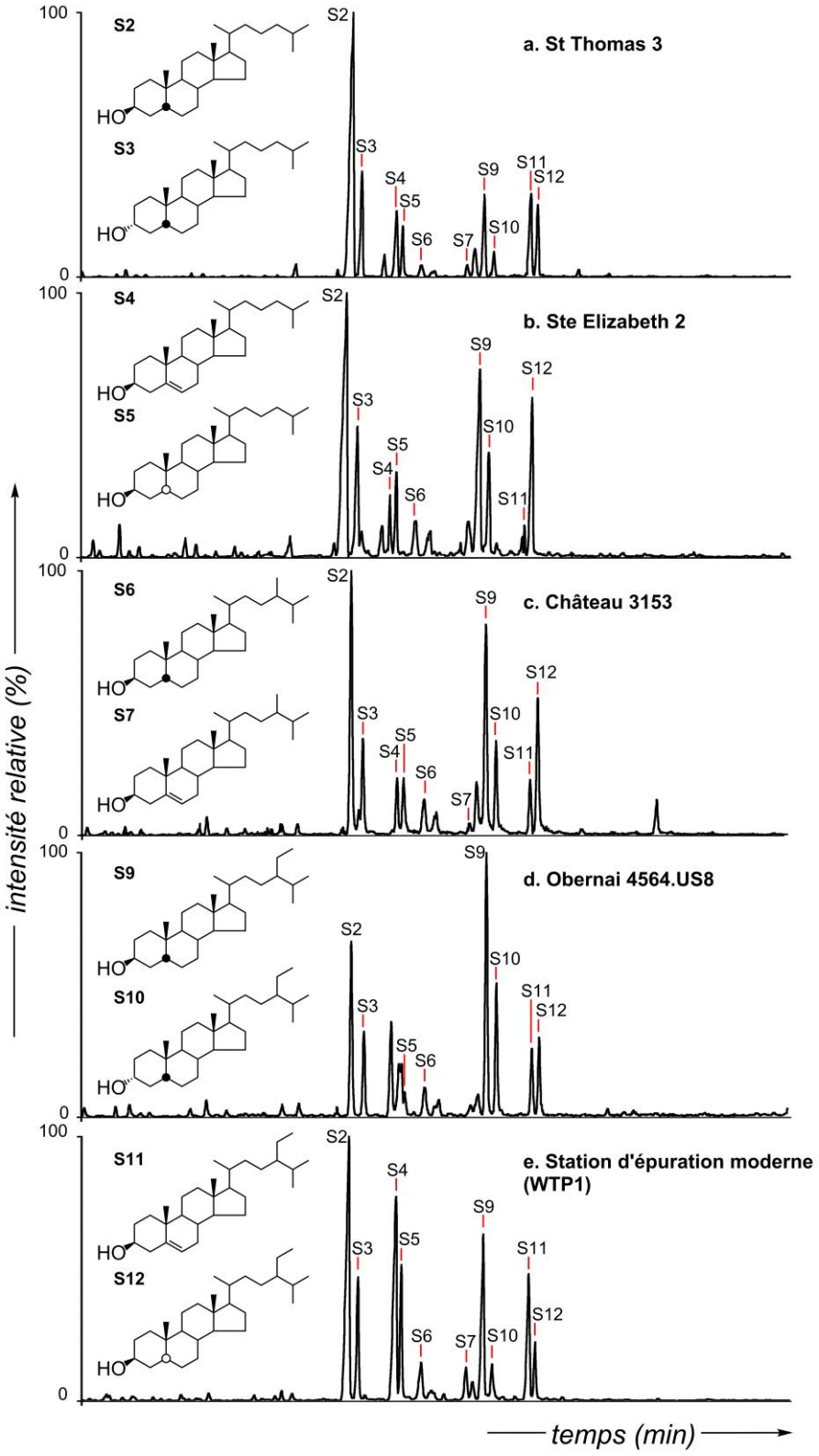


FIG. 3.9 Fragmentogrammes de masse *m/z* 215+368+382+396 montrant la distribution des stérols et stanols au sein des échantillons archéologiques (**a-d**) et dans le cas d'une station d'épuration contemporaine (**e**). Les stérols sont analysés sous la forme d'acétates.

La présence d'une pollution fécale au sein de ces structures archéologiques s'est vue confirmée par la mesure du rapport [coprostanol + épicoprostanol]/[coprostanol + épicoprostanol + 5α-cholestanol], désigné par le rapport A dans la suite de ce chapitre. Ce rapport, formulé à l'origine par Grimalt et *al.* (1990) et adapté par la suite pour une application en archéologie moléculaire (Bull et *al.*, 1999b), a été déterminé pour chacun des échantillons en tenant compte de l'aire des pics en GC-MS à partir du courant d'ion caractéristique des stanols (*m/z* 215). A l'exception de l'échantillon 3009, les valeurs obtenues sont toutes égales ou supérieures à 0,7, ce qui correspond à la valeur au-dessus de laquelle une contribution d'origine fécale est avérée (Tableau 3.2). Par ailleurs, la profonde similitude entre le contenu en stérols et stanols des boues d'une station d'épuration contemporaine et celui de nos échantillons archéologiques (Figure 3.9) semble également confirmer ce point.

3.3.2. Etude de la contribution végétale vs. animale

Au-delà de la simple mise en évidence de restes fécaux au sein d'une structure ou d'un sol archéologique, de nombreuses études ont établi des critères moléculaires quantitatifs afin de tenter de caractériser le type d'alimentation en fonction de la distribution des stéroïdes d'origine fécale (Bull et *al.*, 2002). Parmi ces critères, l'abondance relative des dérivés de stérols permet tout particulièrement de différencier un régime herbivore des régimes carnivore et/ou omnivore. En effet, la distribution des stérols et stanols fécaux chez les ruminants, qui consomment exclusivement des plantes riches en phytostérols (stérols en C_{29}, principalement), est largement dominée par la présence des 5β-stanols en C_{29}. A l'inverse, les restes fécaux provenant d'omnivores et de carnivores contiennent des teneurs plus élevées en homologues en C_{27} que sont le coprostanol et l'épicoprostanol (Leeming et *al.*, 1996, Bull et *al.*, 2002, Derrien et *al.*, 2011). Ainsi, le rapport [coprostanol+épicoprostanol]/[5β-sitostanol+épi-5β-sitostanol] (rapport B), reflète l'importance de la contribution des stérols d'origine animale par rapport à ceux d'origine végétale en relation avec la nature de l'alimentation. Il convient de garder à l'esprit que tous les stanols en C_{27} ne sont pas nécessairement issus directement de l'alimentation puisque qu'une part du cholestérol dégradé par les microorganismes entériques provient également du cholestérol formé *de novo*, notamment au sein du foie (cholestérol biliaire ; Wilson et Rudel, 1994).

En ce qui concerne les échantillons de sols archéologiques, ce rapport est variable, avec des valeurs comprises entre 0,7 et 6,0 (Rapport B, Tableau 3.2). Parmi ces résultats, nous noterons qu'une valeur particulièrement élevée (C_{27}/C_{29} = 5,1) a été obtenue dans le cas de la

structure STh3 et, dans une moindre mesure, pour les structures 3153 et SE2 (respectivement 2,2 et 1,7), ce qui est tout à fait comparable aux valeurs obtenues dans le cas des boues issues de la station d'épuration contemporaine (2,2 et 6,0). La différence importante des rapports entre les deux échantillons issus d'une même station peut s'expliquer par la très forte hétérogénéité des prélèvements de boues d'épuration.

TABLEAU 3.2

Rapports basés sur l'abondance relative des différents dérivés de stérols/stanols déterminés dans le cas de la station d'épuration contemporaine (WTP1 et WTP2) ainsi que pour les paléosols archéologiques (rapports déterminés à partir des aires des pics en GC-MS à partir du courant d'ion *m/z* 215).

	WTP1	**WTP2**	**SE2**	**SE3**	**SE4**	**STh3**	**3153**	**3009**	**4564.US8**	**4564.US9**
Rapport A[a]	0,8	0,9	0,9	0,7	0,7	0,9	1,0	0,6	0,9	0,8
Rapport B[b]	2,2	6,0	1,7	0,7	0,7	5,1	2,2	1,2	0,7	0,7
Rapport C[c]	2,0	5,9	1,8	0,7	0,6	5,3	2,0	1,2	0,7	0,6

[a] Rapport A: [coprostanol+épicoprostanol]/[coprostanol +épicoprostanol + 5α-cholestanol]; pollution fécale attestée lorsque > 0,7 (Bull et *al.*, 1999b); [b] Rapport B: [coprostanol+épicoprostanol]/ [5β sitostanol+épi-5β-sitostanol]; >1: origine humaine ou porcine; <1: ruminants (Bull et *al.*, 2002); [c] Rapport C: coprostanol/5β-stigmastanol; > 1,5 : caractérise une pollution d'origine humaine ou porcine (Evershed et Bethell, 1996).

La forte teneur en stéroïdes en C_{27} dans les échantillons STh3, 3153 et SE2 qui se traduit ici par un rapport [coprostanol]/[5β-sitostanol] supérieur à 1,5 (rapport C, Tableau 3.2), montre donc que ces structures, mises au jour dans un contexte urbain, sont à mettre en relation avec un apport de matière fécale provenant d'omnivores. Cet apport peut être lié soit à l'occupation humaine du site, soit à la présence d'animaux comme les porcs (Evershed et Bethell, 1996). A l'inverse, la structure 4564, découverte à Obernai, se caractérise par une plus large proportion de phytostérols. Cela se traduit notamment par un rapport B inférieur à 1 et un rapport C inférieur à 1,5 (Tableau 3.2). De telles valeurs sont habituellement observées dans le cas d'un apport essentiellement d'origine végétale, comme tel peut être le cas avec les ruminants. Au vu de ces résultats, trois hypothèses peuvent être proposées afin d'expliquer ces fortes teneurs en phytostérol et phytostanols :

(1) De la matière fécale issue de ruminants a été entreposée au sein de la structure afin de constituer un fumier en vue de son épandage ultérieur sur un sol pour le fertiliser.

(2) Le rejet de matière fécale d'origine humaine dans le sol s'est accompagné de l'incorporation de bactéries entériques qui continuent d'être fonctionnelles dans les

conditions anoxiques et, de ce fait, à agir au sein des latrines en dégradant notamment le sitostérol issu du couvert végétal du sol.

(3) Ces fortes teneurs en stéroïdes en C_{29} traduisent, au sein de l'alimentation des populations gallo-romaines d'Obernai, un apport conséquent de ressources végétales comprenant des céréales et/ou des légumes. Des proportions relativement similaires entre les homologues en C_{27} et en C_{29} ont d'ailleurs été observées chez des chimpanzés (Sistiaga et *al.*, 2015), un animal omnivore à dominante herbivore, frugivore et granivore.

L'importance des stéroïdes en C_{29} dans l'extrait lipidique de la structure 4564 peut, en outre, être le résultat de la combinaison de plusieurs des hypothèses citées ci-dessus. La consommation de ressources végétales se manifeste également à travers la prédominance de la miliacine (**T3**), biomarqueur triterpénique spécifique du millet commun (cf. Chapitre 2 ; Jacob et *al.*, 2008b, Bossard et *al.*, 2013), au sein de l'extrait lipidique de l'échantillon 4564 et, dans une moindre mesure, dans l'échantillon SE2 (Figure 3.10). Ainsi, la miliacine représente pour ces échantillons, respectivement, 25 % et 14 % de l'ensemble des lipides apolaires analysés en GC-MS, une telle proportion laissant envisager *a priori* une consommation notable de millet en ce qui concerne le site de Ste Elizabeth (Moyen Age) et celui d'Obernai (période Gallo-romaine). Par ailleurs, dans le cas du site d'Obernai, la datation au ^{14}C de la miliacine (cf. § 2.3.3) indique que celle-ci est bien contemporaine à la structure archéologique. La présence d'une fonction méthoxy en C-3 a été évoquée pour rendre compte de la résistance particulière de la miliacine face aux processus diagénétiques, par rapport aux autres triterpènes fonctionnalisés en C-3 (Jacob et *al.*, 2005). Cette fonction méthoxy pourrait peut-être également expliquer que ce triterpène n'ait pas été totalement dégradé par le microbiote intestinal lors de la phase de digestion. Ainsi donc, la résistance de cette molécule face aux processus diagénétiques et aux transformations microbiennes lors de la digestion pourrait être à l'origine des quantités importantes de miliacine dans certains des paléosols examinés. Contrairement à la miliacine, d'autres lipides de céréales ou d'espèces de plantes ayant été consommées ont pu être totalement dégradés ou ne possèdent pas une spécificité suffisante permettant de détailler d'avantage les régimes alimentaires dans le cadre d'études moléculaires archéologiques.

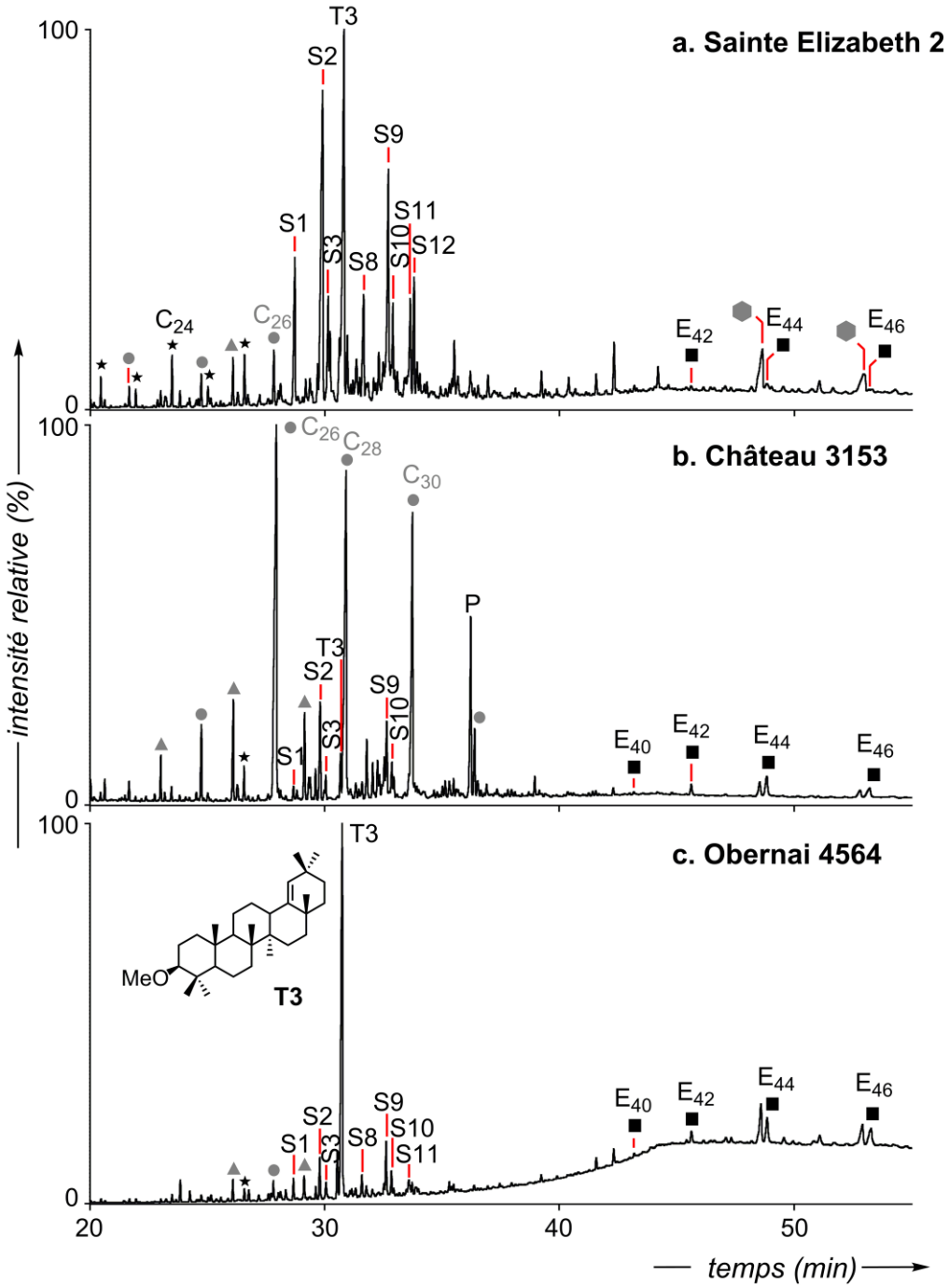


FIG. 3.10 Chromatogrammes en phase gazeuse des extraits lipidiques apolaires issus des sols de comblement des structures (**a**) SE2, (**b**) 3153 et (**c**) 4564. (★) acides gras, (●) *n*-alcools, (▲) *n*-alcanes, (S) stérols, (T) triterpènes, (■) esters lourds et (⬢) glycosides de stérol. Les alcools sont analysés sous la forme d'acétates et les acides sous la forme d'esters méthyliques. Les structures moléculaires des stérols sont présentées en Figure 3.6 ; **T3** : miliacine.

A la différence des échantillons dont la composition lipidique est largement dominée par les dérivés de stérols, les échantillons 3009 et 3153 (et, dans une moindre mesure, les échantillons STh1, STh2, STh4) présentent une proportion élevée d'alcools linéaires (Figure 3.10.b). La distribution de ces *n*-alcools se caractérise par la prédominance de l'alcool en C_{26} qui, dans le cas de sols, est souvent interprétée comme indiquant une contribution végétale provenant de graminées (van Bergen et *al.*, 1997, Trendel et *al.*, 2010). Dans le contexte des échantillons 3009 et 3153, une quantité importante et plutôt inhabituelle des homologues en *n*-C_{28} et *n*-C_{30} a été notée (Fig. 3.10.b), et il a été envisagé que cette contribution particulière puisse correspondre à un apport de paille, d'autant plus que les études archéologiques suggèrent que les structures étudiées pourraient correspondre à une aire dédiée à la stabulation. Il pourrait s'agir, notamment, de paille de seigle (prédominance de l'alcool en C_{26} ; Ji et Jetter, 2008) et de paille de blé dans laquelle l'alcool en C_{28} est présent en quantité substantielle (del Rio et *al.*, 2013). L'identification d'esters lourds en C_{40}-C_{46} avec une prédominance de l'ester en C_{44} (dont la partie acyle correspond à l'acide en C_{18} au vu du fragment de base *m/z* 285 en MS) est également compatible avec une contribution de paille de blé (del Rio et *al.*, 2013). Néanmoins, nombreux sont les céréales, fruits ou autres espèces végétales qui contiennent des esters lourds à longues chaînes alkyles dont certains présentent une distribution similaire dominée par le stéarate en C_{44} (Tulloch et Hoffman, 1973, Tulloch, 1975, Ji et Jetter, 2008). L'ensemble de nos observations relatives aux structures 3153 et 3009, mises au jour Place du Château, s'accorde donc avec l'idée qu'il ait pu y avoir un sol aménagé avec de la paille pour les animaux, comme cela est le cas dans un espace dédié à la stabulation de bétail.

En plus de l'analyse « classique » des constituants lipidiques de la fraction apolaire des extraits de nos échantillons, nous avons également procédé à l'étude des composés libérés par traitement acide (méthanolyse, CH_3OH/HCl, 1,2 N) de la fraction polaire. Ce traitement, qui a été réalisé sur les échantillons STh2, STh3, SE2, 3153 et 4564, a induit la libération de nombreux acides biliaires en C_{24} (Figure 3.11), dont ceux dits « primaires », qui sont produits par oxydation du cholestérol dans le foie et ceux dits « secondaires » qui dérivent des acides primaires (Salen et *al.*, 1975, Gérard, 2014). Parmi ceux-ci figurent l'acide lithocholique (**AB1**) et l'acide désoxycholique (**AB3, AB3***), deux acides secondaires, ainsi que l'acide chénodésoxycholique (**AB5**) et l'acide cholique (**AB8**), deux acides primaires, dont les spectres de masses sont représentés en Figure 3.12. L'analyse des spectres de masse de standards commerciaux de référence a permis de confirmer leur identification, et nous avons également procédé à une co-injection par GC-MS de l'acide hyodésoxycholique (**AB9**).

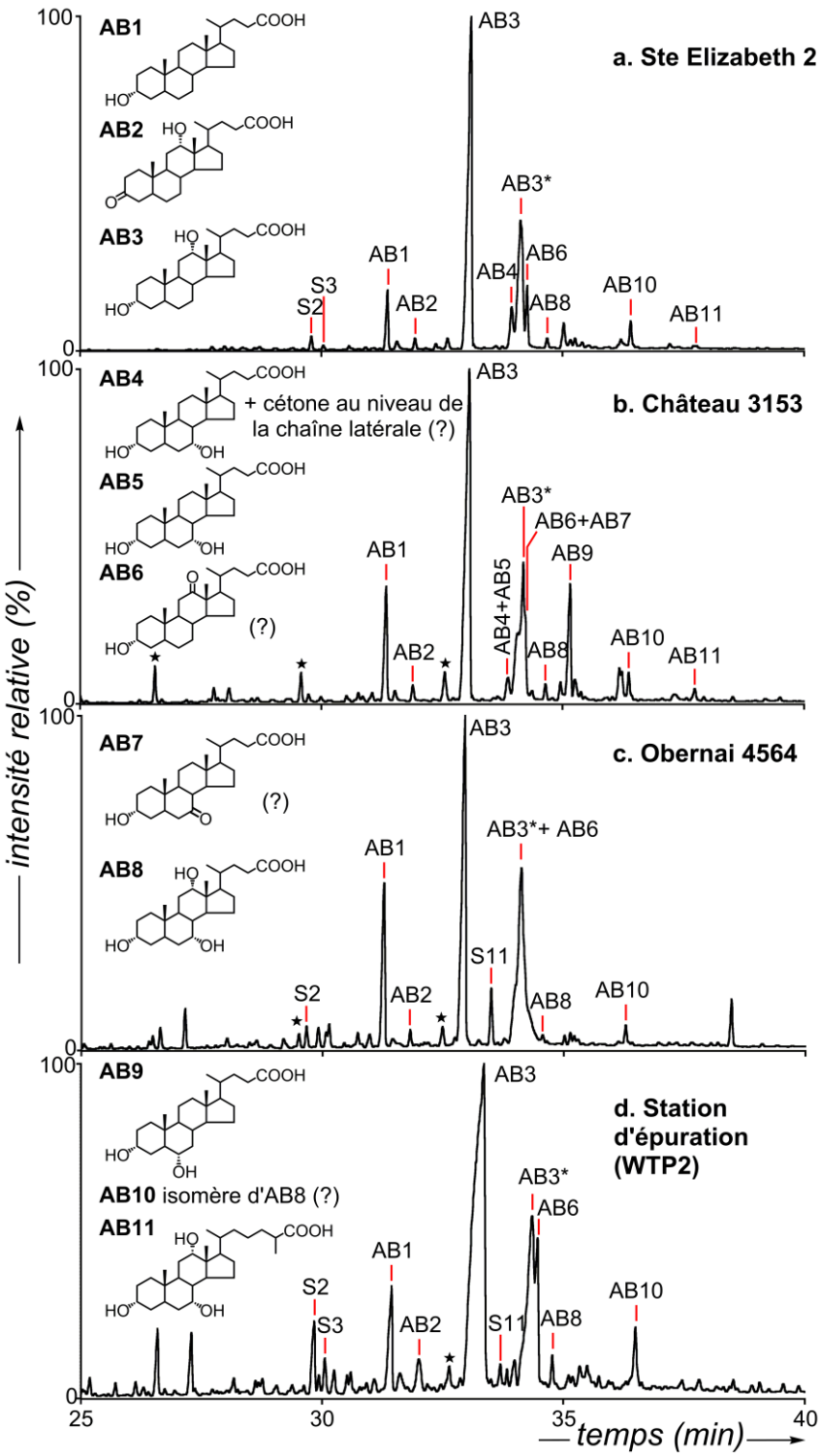


FIG. 3.11 Chromatogrammes en phase gazeuse montrant la distribution des lipides polaires libérés par méthanolyse (CH_3OH/HCl, 1,2N) de la fraction polaire des extraits des échantillons de paléosols (**a-c**) et des lipides extraits de la station d'épuration (WTP2) (**d**). Pour les stérols et stanols (S) et les acides biliaires (AB) présents, les fonctions alcools ont été analysées sous la forme d'acétates et les fonctions acides sous la forme d'esters méthyliques. Les structures moléculaires des stérols sont présentées en Figure 3.6. **AB3***: acide désoxycholique (**AB3**) incomplètement acétylé en position C-12, probablement du fait de l'encombrement stérique.

Dans chacun de nos échantillons, l'acide désoxycholique **AB3** est largement majoritaire, suivi de l'acide lithocholique **AB1** (Figure 3.11). Des études précédemment menées concernant les distributions relatives d'acides biliaires chez divers organismes vivants ont notamment montré que l'acide désoxycholique **AB3** constituait l'acide majoritaire des excréments chez les bovidés et, dans une moindre mesure, chez les équidés (Tyagi et *al.*, 2008). D'autre part, ce même acide se retrouve en quantité très importante dans les selles humaines (Lin et *al.*, 1978, Batta et *al.*, 1999, Tadano et *al.*, 2006) puisque les micro-organismes présents dans l'intestin transforment les deux principaux acides primaires synthétisés par l'homme, que sont l'acide cholique **AB8** et l'acide chénodésoxycholique **AB5**, en acides lithocholique **AB1** et désoxycholique **AB3** (Bull et *al.*, 2002, Gérard, 2014). Les distributions en acides biliaires observées au sein des hydrolysats archéologiques sont relativement analogues à celle observée dans l'échantillon WPT2 de la station d'épuration contemporaine dans lequel les acides biliaires se trouvent à l'état libre, sans hydrolyse préalable. Par conséquent, une source humaine semble privilégiée en accord avec l'empreinte fécale de type omnivore observée dans les échantillons à partir de la distribution des 5β-stanols.

Parmi l'ensemble des hydrolysats analysés, l'échantillon 3153 se distingue des autres dans la mesure où l'acide hyodésoxycholique (**AB9**) y a été identifié en quantité notable (Figure 3.11.b). Il s'agit d'un acide biliaire exclusivement produit par les suidés (Tyagi et *al.*, 2008), ce qui serait parfaitement en accord avec la possibilité que le lieu étudié corresponde à un lieu de stabulation (voir ci-dessus).

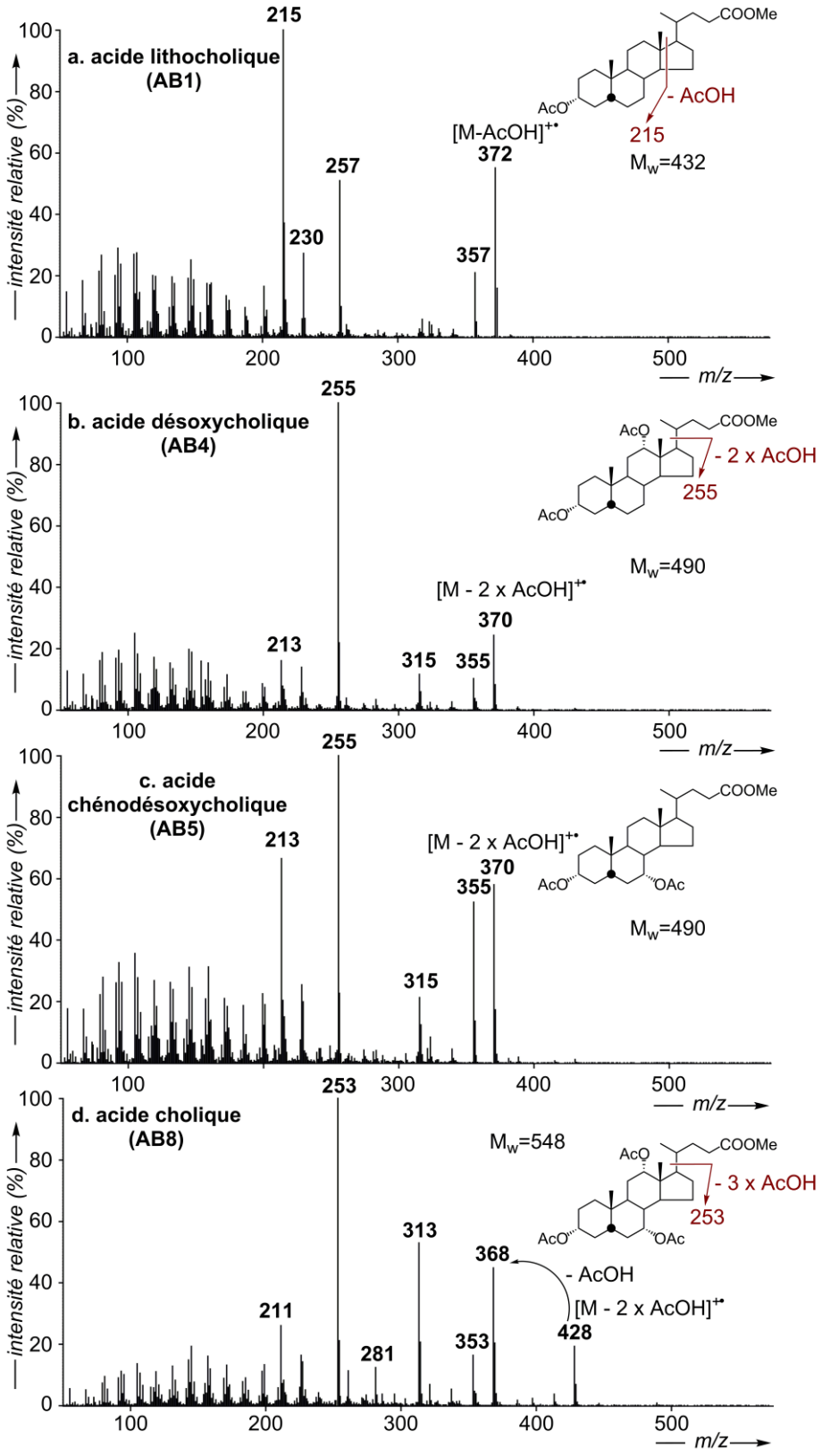


FIG. 3.12 Spectres de masse (EI, 70 eV) des acides (**a**) lithocholique (**AB1**), (**b**) désoxycholique (**AB4**), (**c**) chénodésoxycholique (**AB5**) et (**d**) cholique (**AB8**). Les fonctions alcools ont été analysées sous la forme d'acétates et les fonctions acides sous la forme d'esters méthyliques.

3.3.3. Etude de la composition isotopique en carbone des lipides fécaux

Puisque le millet commun semble avoir une place importante dans l'alimentation des populations ayant occupé le site d'Obernai et, de manière moins marquée, celui de Ste Elizabeth à Strasbourg, des analyses en isotopie du carbone ont été réalisées afin de tester si cette source alimentaire peut être détectée via la composition isotopique des lipides. En effet, le millet, en tant que plante en C4, utilise un métabolisme biosynthétique particulier qui induit un appauvrissement moindre de ses lipides en isotope lourd (^{13}C) par rapport aux lipides synthétisés par les plantes en C3 (O'Leary, 1988, Hobbie et Werner, 2004 ; voir aussi chapitre 1, § 1.3.1). Ceci se traduit, par exemple, par une valeur de $\delta^{13}C$ de -21,5 ‰ mesurée pour la miliacine dans les deux cas étudiés (échantillons SE2 et 4564, Tableau 3.3), alors que les lipides de plantes en C3 ont des valeurs se situant entre -29 ‰ et -36 ‰ pour les composés linéaires (cf. chapitre 2 et Tableau 3.3) et inférieures à -30 ‰ dans le cas des triterpènes pentacycliques (Jacob et *al.*, 2011, Gastaldo, 2014 : entre -29,9 ‰ et -35 ‰).

Nos recherches se sont donc concentrées sur la composition isotopique des *n*-alcanes, des *n*-alcools, de la miliacine ainsi que des stérols et des stanols en C_{27} et C_{29}. Notons qu'en raison de la nécessité de dériver les composés possédant une fonction alcool (BSTFA ; cf. chapitre 7, § 7.1.3), un calcul a dû être opéré afin de corriger la valeur de $\delta^{13}C$ obtenue, en tenant compte de la composition isotopique des atomes de carbone ajoutés par dérivation (Rieley, 1994). Les lipides pour lesquels les valeurs de $\delta^{13}C$ ont été mesurées sont originaires des structures SE2 et 4564 dont l'empreinte moléculaire est supposée avoir été amplement influencée par une alimentation variée, comprenant à la fois du millet (plante en C4) et des plantes en C3 afin d'évaluer, dans le cas de ces autres lipides, quelle est la part relative liée à la contribution issue de plantes en C4 et en C3. En parallèle, une étude analogue a été réalisée dans le cas de la structure STh3, pour laquelle l'absence totale de miliacine semble indiquer une alimentation sans apport de plantes en C4. En effet, au Haut Moyen Âge, hormis le millet, la contribution de plantes en C4 (maïs, sorgho, ...) peut être considérée comme inexistante. A titre de comparaison comme référentiel d'une alimentation mixte comprenant plantes en C3 et en C4, nous avons également étudié les échantillons de la station d'épuration contemporaine, l'alimentation « moderne » comprenant une part notable de plantes en C4 (maïs, essentiellement) ingéré soit directement dans l'alimentation humaine, soit via l'ingestion de viande provenant d'animaux alimentés avec du maïs.

Originaire de la cire épicuticulaire des plantes, les *n*-alcanes et les *n*-alcools possèdent une composition isotopique reflétant le métabolisme de leur plante d'origine (C3 *versus* C4). Dans le cas présent, les *n*-alcanes présentent des valeurs de $\delta^{13}C$ comprises entre -29,4 ‰ et -36,2 ‰ (Tableau 3.3), avec un appauvrissement progressif en ^{13}C lorsque le nombre de carbone du composé augmente comme cela a été observé lors de précédentes études (Simpson et *al.*, 1998, Mendez-Millan et *al.*, 2014). Des valeurs comparables, fortement appauvries en ^{13}C, ont été obtenues pour les *n*-alcanes contenus dans la cire épicuticulaire des plantes de type C3 (Collister et *al.*, 1994, Lockheart et *al.*, 1997, Bi et *al.*, 2005, Mendez-Millan et *al.*, 2014) ou dans le cas de sols se caractérisant par une couverture végétale composée de plantes en C3 (Chikaraishi et Naraoka, 2006), ce qui montre que les *n*-alcanes contenus dans nos échantillons sont principalement issus de plantes de ce type. Malheureusement, seuls les *n*-alcools extraits des échantillons SE2 et 4564, tous deux caractérisés par un apport de plantes en C4 (millet), ont pu faire l'objet de mesures en isotopie du carbone, les trop faibles concentrations d'alcools linéaires dans les échantillons STh3 et WTP2 ne permettant pas d'accéder à ce type d'analyse. La composition isotopique en carbone des *n*-alcools identifiés au sein des échantillons SE2 et 4564 montre une valeur maximale de -32,8 ‰ et une valeur minimale de -35,5 ‰ (Tableau 3.3), ces valeurs étant comparables à celles mesurées pour des alcools linéaires lors de l'étude d'un système sol-plantes de type C3 (Chikaraishi et Naraoka, 2006). Comme pour les *n*-alcanes, un appauvrissement graduel en ^{13}C avec la longueur de chaîne a été observé dans cette étude. Pourtant, avec une valeur de $\delta^{13}C$ de -32,8 ‰, l'alcool en C_{32} contenu dans les anciennes latrines d'Obernai affiche la valeur la plus enrichie en ^{13}C de la série des *n*-alcools. Il se trouve que l'alcool en C_{32} est, de manière peu commune, l'homologue prédominant dans les feuilles de millet (cf. § 2.3.2), bien que ces dernières ne fassent guère partie de l'alimentation des occupants gallo-romains d'Obernai. Ce résultat suggère donc une contribution végétale d'origine non fécale qui pourrait être liée à un sol de culture ayant piégé et préservé le contenu lipidique de feuilles de millet s'étant répandues sur le sol. Ainsi, il n'est pas impossible qu'une part des stéroïdes en C_{29} détectés au sein de la structure 4564 provienne de la signature lipidique du sol comme cela a pu être évoqué précédemment (cf. § 3.3.2).

TABLEAU 3.3

Composition isotopique du carbone ($\delta^{13}C$, en ‰ vs. VPDB) pour les composés linéaires (*n*-alcanes et *n*-alcools), la miliacine et les stérols présents au sein des échantillons archéologiques de Ste Elizabeth (SE2), Obernai (4564.US9), St Thomas (STh3) et des boues d'épuration modernes.

		Ste Elizabeth (SE2)	Obernai (ST4564.US9)	St Thomas (STh3)	Station d'épuration (WTP2)
***n*-alcanes**	*n*-C_{23}	-29,4 (± 0,3)	n.d.	n.d.	-
	n-C_{25}	-31,4 (± 0,3)	-31,9 (± 0,8)	n.d.	-
	n-C_{27}	-31,0 (± 0,1)	-32,0 (± 0,2)	-31,8 (± 0,4)	-
	n-C_{29}	-33,2 (± 0,1)	-33,1 (± 0,3)	-33,6 (± 0,1)	-
	n-C_{31}	-36,2 (± 0,4)	-34,3 (± 0,3)	-34,7 (± 0,2)	-
	n-C_{33}	-33,3 (± 0,6)	-34,1 (± 0,3)	-34,4 (± 0,1)	-
***n*-alcools**	*n*-C_{22}	-35,2 (± 0,6)	-33,3 (± 0,4)	n.d.	n.d.
	n-C_{24}	-34,3 (± 0,4)	-33,9 (±0,4)	n.d.	n.d.
	n-C_{26}	-35,5 (± 0,3)	-35,1 (± 0,2)	n.d.	-35,7 (± 0,4)
	n-C_{28}	-34,9 (± 0,5)	-35,1 (± 0,3)	n.d.	n.d.
	n-C_{30}	n.d.	-34,3 (± 0,3)	n.d.	n.d.
	n-C_{32}	n.d.	-32,8 (± 0,1)	n.d.	n.d.
triterpènes	*Miliacine*	-21,5 (± 0,4)	-21,5 (± 0,6)	-	-
stérols	*Coprostanol* ***(S2)***	-23,2 (± 0,3)	-23,3 (± 0,5)	-24,2 (± 0,4)	-24,4 (± 0,3)
	Epicoprostanol ***(S3)***	-23,4 (± 0,4)	-23,6 (± 0,4)	-23,6 (± 0,6)	-24,5 (± 0,4)
	Cholestérol ***(S4)***	-28,2 (± 1,0)	-27,1 (± 1,5)	-26,8 (± 0,7)	-25,3 (± 1,2)
	5α-cholestanol ***(S5)***	-29,9 (± 0,5)	-29,8 (± 1,5)	-27,8 (± 1,1)	-29,9 (± 1,7)
	5β-sitostanol ***(S9)***	-33,6 (± 0,3)	-32,8 (± 0,7)	-33,2 (± 0,2)	-33,0 (± 0,2)
	épi-5β-sitostanol ***(S10)***	-37,4 (± 1,0)	-32,2 (± 0,6)	-33,7 (± 0,7)	-33,3 (± 0,4)
	sitostérol ***(S11)***	-32,2 (± 0,7)*	-29,8 (± 0,1)	-31,6 (± 1,2)	-32,4 (± 0,2)
	5α-sitostanol ***(S12)***	-33,6 (± 1,3)	-32,8 (± 0,5)	-34,4 (± 0,4)	-36,0 (± 2,0)

n.d.: non déterminé (sous la limite de détection)

*co-élution avec la 5β-stigmastanone (**S8**)

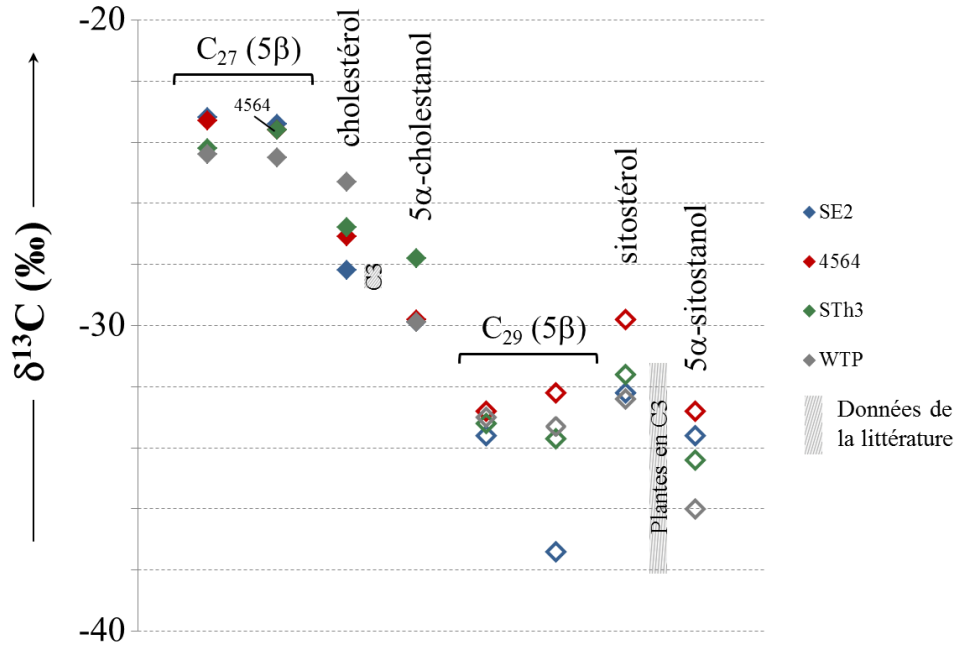


FIG. 3.13 $\delta^{13}C$ (‰ *vs.* VPDB) des stérols et stanols identifiés au sein des dépôts archéologiques et des échantillons de la station d'épuration. Les stérols en C_{27} sont représentés par les losanges pleins (♦) et les stérols en C_{29} par les losanges vides (◊). Quelques résultats de la littérature sont donnés à titre de comparaison pour le sitostérol issu de plantes en C3 (-31,4 ‰ à -38,1 ‰ ; Chikaraishi et *al.*, 2004b) et pour le cholestérol extrait d'os d'animaux nourris exclusivement avec des plantes en C3 (-28,0 ‰ à -28,4 ‰ ; Jim et *al.*, 2004).

En ce qui concerne les stérols en C_{27} et C_{29}, les analyses de GC-*c*-IRMS ont révélé un appauvrissement moins marqué en ^{13}C pour ces derniers par rapport aux composés de type *n*-alkyles (Tableau 3.3). La nature différente des intermédiaires réactionnels conduisant à la formation, dans un cas, des isoprénoïdes dont les stérols, et dans l'autre, des composés linéaires, est à l'origine, en partie, de cette différence de composition isotopique. En effet, bien que ces deux familles de composés soient synthétisées à partir de l'acétyl-CoA (cf. § 1.1), l'isopentényl pyrophosphate, ou IPP, précurseur des stéroïdes, contient, par rapport aux composés à chaîne linéaire, proportionnellement moins d'atomes de carbone issus du groupe carbonyle de l'acétyl-CoA (perte d'un carbone issu du carbonyle lors de l'étape de décarboxylation conduisant, à partir du mévalonate, au squelette isoprénique), appauvri en ^{13}C par rapport au méthyle (DeNiro et Epstein, 1977), d'où un enrichissement relatif en ^{13}C pour les stérols (Chikaraishi et *al.*, 2004a). De surcroît, chacune des différentes étapes biosynthétiques utilisées pour la formation des composés linéaires et des composés

isoprénoïdes peuvent hypothétiquement conduire à un fractionnement isotopique plus ou moins significatif.

Nous avons également constaté que les stérols en C_{27} étaient nettement enrichis en ^{13}C par rapport à leurs homologues en C_{29} (Figure 3.13). En effet, alors que les phytostérols présentent une composition isotopique variable entre -30 ‰ et -40 ‰, les valeurs de $\delta^{13}C$ des stérols en C_{27} ne sont jamais inférieures à -30 ‰. Afin de comprendre la raison de cet enrichissement en ^{13}C, nous avons, dans un premier temps, considéré les diverses sources possibles de Δ^5-stérols au sein d'un sol marqué par un apport de matière fécale.

Concernant le **sitostérol** (**S11**), chaque individu qui se nourrit de plantes en assimile dans son organisme et en rejette dans ses excréments. Toutefois, dès lors que les échantillons analysés proviennent d'un site archéologique comprenant à la fois une contribution de matière fécale et celle de plantes s'étant développées sur ce site au cours du temps, la composition isotopique du sitostérol peut être en partie influencée par une contribution de sitostérol provenant directement des plantes. A cet égard, nous pouvons noter que la composition isotopique de stérols présents dans un sol où pousse de manière prédominante une plante donnée reflète effectivement la composition isotopique des stérols de la plante (Chikaraishi et Naraoka, 2006). Une telle contribution est sans doute négligeable dans le cas de latrines archéologiques en contexte urbain bien que ne puisse être exclue une contribution issue, par exemple, de déchets végétaux. Par ailleurs, dans le cas d'aires ayant servi à la stabulation de bétail, des phytostérols peuvent également tirer leur origine de la paille. Les valeurs de $\delta^{13}C$ mesurées pour le sitostérol, se distribuant, dans notre cas, entre -29,8 ‰ et -32,4 ‰, reflètent donc à la fois la contribution provenant des plantes consommées et celles d'autres contributions végétales (plantes qui se sont développées sur le sol étudié, paille, déchets végétaux) qui se sont ajoutées aux matières fécales. Les valeurs de $\delta^{13}C$ que nous avons déterminées pour le sitostérol sont tout à fait comparables à celles mesurées dans le cas de sitostérol originaire de plantes en C3 (Figure 3.13 ; Chikaraishi et *al.*, 2004b). Quoiqu'il en soit, aucune influence liée à la présence de millet (plante en C4) n'a pu être identifiée au niveau des valeurs isotopiques déterminées pour le sitostérol, même s'il est intéressant de constater que le rapport $^{13}C/^{12}C$ le plus élevé correspond au sol échantillonné dans la structure 4564 (Figure 3.13) où l'on observe une importante contribution de miliacine (Figure 3.10).

En comparant les valeurs de $\delta^{13}C$ observées dans le cas du sitostérol avec celles spécifiques aux stanols en C_{29}, nous constatons que ces derniers sont appauvris en ^{13}C (-

32,2 ‰ à -37,4 ‰). Cette diminution du rapport $^{13}C/^{12}C$ peut s'expliquer, en partie, par un fractionnement isotopique survenant lors des réactions d'hydrogénation des stérols en stanols, qu'il s'agisse de réactions de réduction microbiennes (Wakeham, 1989) ou de réactions de réduction biosynthétiques chez les plantes par exemple. En effet, les réactions chimiques ou biochimiques conduisent généralement à un enrichissement relatif en ^{12}C des produits de transformation par rapport au substrat dont ils dérivent et, de ce fait, à un enrichissement relatif en ^{13}C du substrat résiduel (Schmidt et Gleixner, 1998).

Concernant le **5α-sitostanol** (**S12**), ce dernier constitue un produit naturel présent dans de nombreuses plantes. Ainsi, dans le cas des échantillons étudiés, le 5α-sitostanol peut provenir aussi bien des plantes consommées que de déchets végétaux divers et/ou de paille (contexte urbain), et de plantes poussant sur le sol (contexte non urbain). Le 5α-sitostanol dans l'environnement peut également résulter de la réduction ultérieure (diagénétique) du sitostérol en milieu sédimentaire anoxique. En effet, dans le cas des latrines ou de sols de zones de stabulation ou de préparation de fumier, nous pouvons envisager la possibilité que la réduction des stérols en 5α-stanols puisse se produire lors du « compostage » en conditions relativement anoxiques de matières fécales (Bull et *al.*, 2001), même s'il n'est pas question ici de sédiments anoxiques mais de sols. Etant donné que le 5α-sitostanol présent dans les échantillons étudiés correspond probablement à un mélange de produits biosynthétiques et de produits de réduction microbienne du sitostérol, nous pouvons nous attendre à un très léger appauvrissement en ^{13}C de ce 5α-sitostanol. Le **5β-sitostanol** (**S9**) et l'**épi-5β-sitostanol** (**S10**) sont, quant à eux, issus exclusivement de la réduction par les bactéries entériques du sitostérol provenant de l'alimentation. Comme il s'agit de produits de réduction du sitostérol, il n'est pas surprenant de constater un léger appauvrissement en ^{13}C des 5β(H)-sitostanols par rapport au sitostérol (Figure 3.13).

Selon le même raisonnement que précédemment dans le cas du sitostérol, nous nous sommes intéressés aux différentes origines du **cholestérol** (**S4**) dans les structures archéologiques étudiées et aux facteurs qui influent sur sa composition isotopique en carbone. Ces origines sont principalement au nombre de trois:

- (1) le cholestérol directement apporté par la consommation de nourriture d'origine animale (œufs, lait, viande).
- (2) le cholestérol biliaire excrété vers l'intestin (Wilson et Rudel, 1994). Cette excrétion explique que l'on trouve à la fois du cholestérol et des 5β-cholestanols en

proportions importantes dans les matières fécales d'animaux très majoritairement végétariens (*e.g.*, le gorille ; Sistiaga et *al.*, 2015). Si ce cholestérol comprend, chez un omnivore, une part issue de l'alimentation et qui a été absorbée par l'organisme, la synthèse *de novo* à partir de l'acétyl-CoA y contribue à hauteur de 80 % (cholestérol endogène ; Jim et *al.*, 2003).

- (3) le cholestérol produit par les organismes eucaryotes (animaux principalement) qui résident *in situ* au niveau des sols et qui, par conséquent, viennent « contaminer » le pool des stérols de la matière fécale.

Dans les échantillons de sols archéologiques étudiés (Ste Elisabeth, Obernai et St Thomas), le cholestérol, avec des valeurs de $\delta^{13}C$ comprises entre -26,8 ‰ et -28,2 ‰ (Tableau 3.3), est manifestement plus enrichi en ^{13}C que le sitostérol. Ces valeurs semblent coïncider avec celles mesurées pour du cholestérol osseux chez des rats ou des cochons nourris avec des plantes en C3 (≈ -28‰, Tableau 3.4 ; Stott et *al.*, 1997, Jim et *al.*, 2004). Des valeurs de $\delta^{13}C$ plus élevées que celles mesurées pour du sitostérol provenant de plantes en C3 (*i.e.*, < -30 ‰ ; Chikaraishi et *al.*, 2004b) peuvent s'expliquer par le fait que le cholestérol présent dans un animal est, en bonne partie, synthétisé *de novo* (Jim et *al.*, 2004), notamment à partir de carbohydrates d'origine végétale, apportés par l'alimentation, qui sont enrichis en ^{13}C par rapport aux lipides. Les valeurs mesurées dans le cas des échantillons archéologiques seraient donc compatibles avec celles attendues pour du cholestérol issu de la composante d'origine animale du régime alimentaire provenant d'animaux nourris avec des végétaux en C3. Elles seraient également compatibles avec celles attendues pour du cholestérol endogène, si la part végétale du régime alimentaire est principalement de type C3. Une alimentation comprenant une composante importante issue de plantes en C4 semblerait donc exclue sur la base de la composition isotopique du cholestérol, qu'il s'agisse de consommation directe de plantes en C4 ou de produits provenant d'animaux nourris avec des plantes en C4. Par ailleurs, nous ne pouvons exclure sur la base des valeurs de $\delta^{13}C$ une contribution, certes limitée, de cholestérol exogène provenant d'animaux (vers, insectes) qui se seraient développés au niveau des structures archéologiques.

Dans le cas de la station d'épuration, une valeur pour le cholestérol de -25,3 ‰, donc légèrement enrichie en ^{13}C par rapport aux valeurs mesurées dans le cas des échantillons archéologiques, pourrait s'expliquer par une contribution importante à l'heure actuelle de plantes en C4 (maïs, notamment), à la fois dans l'alimentation des animaux et des humains. A

cet égard, nous pouvons noter que cette valeur est très proche de celles mesurées par Becchi et *al.* (1994) pour du cholestérol dans des urines de sportifs (-24,5 ‰ à -25,3 ‰, Tableau 3.4).

TABLEAU 3.4

Comparaison entre les (rares) données de la littérature relatives à la composition isotopique du cholestérol chez les animaux et les humains et celles obtenues dans le cadre de notre étude.

Cholestérol	**Homme**	**Rat**	**Cochon**	**En contexte sol**
dans les urines [1]	-24,5 à -25,3 ‰			
osseux (alimentation en C3 [2])		-28,0 à -28,4 ‰	env. -28 ‰	
osseux (alimentation en C4 [3])		-15,7 à -16,4 ‰	env. -15 ‰	
dans le cadre de cette étude				-25,3 à -28,2 ‰

[1] Becchi et *al.*, 1994, [2] et [3] Stott et *al.*, 1997, Jim et *al.*, 2004

Alors que nous avons constaté un appauvrissement en ^{13}C des 5β(H)-sitostanols par rapport au sitostérol, le **coprostanol** et l'**épicoprostanol** présentent de manière très surprenante des valeurs de $\delta^{13}C$ systématiquement moins appauvries en ^{13}C que le cholestérol dont ils dérivent, que ce soit dans le cas des échantillons archéologiques et de la station d'épuration (Tableau 3.3). Ainsi, les 5β-stanols en C_{27}, à la différence de ceux en C_{29}, sont donc enrichis en ^{13}C par rapport à leur précurseur, si l'on considère que la valeur de $\delta^{13}C$ du cholestérol -ce dernier correspondant à un mélange de cholestérol issu de l'alimentation et de cholestérol endogène- est proche de -28‰, comme cela a été discuté dans le paragraphe précédent. Il semblerait que cet enrichissement corresponde à un phénomène observé systématiquement dans les échantillons archéologiques analysés et dans l'échantillon de station d'épuration (Figure 3.13) mais que nous ne pouvons pas expliquer pour l'instant.

Pour l'interprétation de nos données, une des difficultés majeures réside dans le fait que nous ne pouvons confronter nos résultats avec ceux de la littérature puisqu'aucune donnée n'existe, à notre connaissance, concernant la détermination de la composition isotopique du carbone des 5β-stanols. Ainsi, alors que nous pensions pouvoir recueillir quelques informations concernant les régimes alimentaires sur la base des rapports isotopiques des 5β-stanols, il s'avère que les résultats obtenus nous permettent de ne tirer aucune conclusion à ce sujet.

3.4. Conclusion

L'objectif principal de cette étude, qui consistait à caractériser la fonction des structures archéologiques, a été atteint. En effet, les études par GC-MS du contenu lipidique des sols ayant comblé les structures archéologiques ont révélé la présence notamment de 5β-stanols et d'acides biliaires, ces derniers étant libérés par méthanolyse. Ces résultats suggèrent un apport conséquent de matière fécale au sein de ces structures. Ainsi,

- A **Obernai**, la structure 4564, datée de l'époque romaine, a été utilisée en tant que latrines au cours de la période romaine par des populations consommant une part importante de ressources végétales, parmi lesquelles le millet commun.

- **Place du Château**, à Strasbourg, la matière organique contenue dans les sols se caractérise par une contribution notable de matière fécale ainsi que de matière végétale. L'abondance inhabituelle du *n*-alcool en C_{28} laisse penser que de la paille a pu recouvrir le sol et la présence de l'acide hyodésoxycholique spécifique à une source porcine semble confirmer l'hypothèse initiale des archéologues, à savoir que cet emplacement, situé sur le chantier de la cathédrale de Strasbourg, a servi à la stabulation d'animaux (de cochons en l'occurrence).

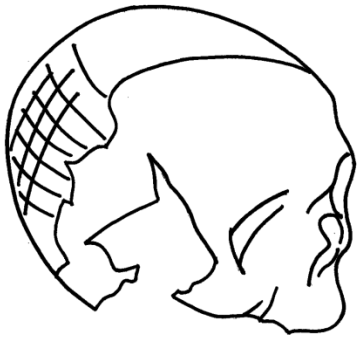
- La fosse 11, mise au jour sur le site archéologique de **Ste Elizabeth** (Strasbourg), correspond à une zone de rejets fécaux d'origine humaine.

- L'analyse des sols ayant comblé les structures circulaires Place **St Thomas** n'a pas donné lieu à l'identification de marqueurs moléculaires de bois (chêne par exemple) ayant pu attester de la présence de tonneaux (cf. l'hypothèse des archéologues présentée en 3.2.1). Néanmoins, nous pouvons affirmer que la fosse 1237 se caractérise par une pollution fécale importante d'origine anthropique indiquant la présence de latrines.

Les résultats des analyses isotopiques n'ont pas pu être interprétés de manière complète. Ainsi, par exemple, nous n'avons pu expliquer la signature isotopique particulièrement enrichie en ^{13}C observée pour les 5β-cholestanols. D'autre part, nous n'avons pas pu, sur la base de la composition isotopique du carbone des lipides identifiés dans les latrines (composés linéaires et stéroïdes fécaux), mettre en évidence une contribution de végétaux en C4 (le millet) à l'alimentation de populations ayant utilisé ces latrines. Ces

observations préliminaires demandent à être approfondies par de nouvelles mesures des rapports $^{13}C/^{12}C$ du cholestérol et de ses dérivés afin de comprendre les raisons du fort enrichissement en ^{13}C observé dans les échantillons étudiés.

Chapitre 4 : Etude chimiotaxonomique d'exsudats de *Styrax*, *Liquidambar* et *Myroxylon* et implications en archéologie



4.1. Introduction

Qu'est-ce qu'un baume ? Intéressons-nous, tout d'abord, à ce que dit le dictionnaire à ce propos :

> *« Sécrétion végétale complexe, odorante, riche en esters benzoïques et cinnamiques, produite par de nombreuses espèces végétales, souvent d'usage pharmaceutique »* (Larousse©).

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous tiendrons à cette définition, mais il faut savoir que certains auteurs incluent, parmi les baumes, des résines terpéniques sans composante de type phénylpropanoïde, que sont le baume du Canada, la résine élémi, la myrrhe et l'oliban (Langenheim, 2003). Les baumes, qui sont constitués de nombreux dérivés de l'acide benzoïque et/ou de l'acide cinnamique (Figure 4.1) -des composés volatils qui confèrent à ces substances une odeur plaisante, agréable et qui leur est propre-, sont alors qualifiés de « vrais » baumes (Custódio et Veiga-Junior, 2012). Cette appellation désigne principalement le matériel visqueux exsudé des espèces végétales de *Styracaceae*, d'*Hamamelidaceae* et de *Myroxylon* (Langenheim, 2003, Hovaneissian et *al.*, 2006), dont nous rapportons le contenu lipidique en première partie de ce chapitre.

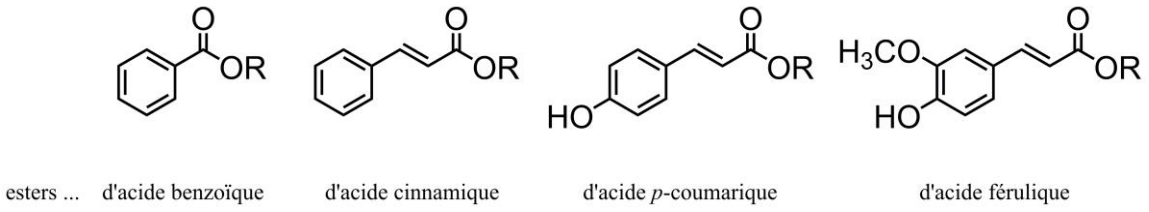


FIG. 4.1 Structure moléculaire des esters aromatiques caractéristiques des baumes.

Cette étude, qui vise à caractériser chimiquement certains de ces baumes, fait suite à l'identification de nombreux esters benzoïques et cinnamiques au sein d'un enduit organique appliqué à l'arrière d'un crâne humain mis au jour à Nahal Hemar, un site archéologique localisé en Israël (voir § 4.7 et annexe du chapitre 4). La présence de ces esters aromatiques nous a alors conduit à considérer la possibilité de l'utilisation d'une résine de type « styrax »[1] (résines de *Styracaceae* ou d'*Hamamelidaceae*) dont nous cherchions à préciser la source botanique sur la base de critères moléculaires. Les résultats sont présentés en deuxième partie de ce chapitre. Or, lors de l'examen approfondi des données existantes de la littérature sur le

[1]Lorsque nous parlerons du « styrax » en terme générique, sans distinction aucune entre les résines issues des espèces *Styrax* et de *Liquidambar*, nous utiliserons les guillemets.

sujet, il est apparu que l'essentiel des études moléculaires concernant les résines de « styrax », revues par Pauletti et *al.* (2006) et Custódio et Veiga-Junior (2012), font principalement état de la présence de composés volatils et de faible poids moléculaire, parmi lesquels les esters formés à partir des acides benzoïque, cinnamique, *p*-coumarique et férulique (Figure 4.1) dans le cas des résines de *Styrax benzoin* (Schroeder, 1968, Popravko et *al.*, 1984, Pastorova et *al.*, 1997b, Modugno et *al.*, 2006b), *S. paralleloneurum* (Pastorova et *al.*, 1997b, Hovaneissian et *al.*, 2008), *S. tonkinensis* (Hovaneissian et *al.*, 2008), *Liquidambar styraciflua* (Fernandez et *al.*, 2005) et *L. orientalis* (Hafizoğlu et *al.*, 1996, Pastorova et *al.*, 1998, Fernandez et *al.*, 2005, Hovaneissian et *al.*, 2008). En revanche, bien que le potentiel chimiotaxonomique de bon nombre de triterpènes ne soit plus à démontrer (cf. § 1.2, Peters et *al.*, 2005), la composition triterpénique des résines de « styrax » n'a été que rarement discutée en ces termes et, de manière quasi exclusive, n'a concerné que les exsudats de *S. tonkinensis* (Wang et *al.*, 2006a, Hovaneissian et *al.*, 2008), *S. japonica* (Kwon et *al.*, 2008) et *L. orientalis* (Huneck, 1963).

Cette mauvaise connaissance des résines de « styrax » est à l'origine, notamment, de multiples confusions, tant botaniques que linguistiques et chimiques, entre les différentes essences. Selon la disponibilité et les coûts sur le marché de ces résines, celles-ci ont pu être remplacées, en parfumerie notamment, par des résines aromatiques aux caractéristiques odorantes très similaires. Langenheim (2003) précise, à ce propos, que puisqu'il fut un temps où il n'était plus possible de se procurer de la résine de styrax en provenance d'Asie, celle-ci fut alors remplacée par la résine de *L. orientalis*, accentuant d'autant plus l'amalgame qui existe entre les résines de styrax et de storax. En effet, alors qu'il est normalement d'usage de désigner par le terme « styrax » les résines extraites d'arbres appartenant au genre *Styrax* et par « storax » les résines issues des plantes du genre *Liquidambar*, cette distinction linguistique n'a pas toujours été respectée et le terme de « styrax » a pu être affecté, dans certains cas, à l'une ou l'autre des résines. Compte tenu de la rareté de certaines de ces résines, il a également été nécessaire, dès les temps anciens, de trouver des substituts à celles-ci, ce qui a naturellement favorisé l'élaboration de produits d'imitation, plus ou moins aboutis, comme en témoigne Pline l'Ancien à travers ses écrits datés du I^{er} siècle de notre ère.

> *« De quelque pays qu'il provienne, on préfère celui qui est roux, tenace et onctueux ; celui qui est furfuracé et couvert d'une moisissure blanche est plus mauvais. On le falsifie avec de la résine de cèdre ou de la gomme; d'autres fois, avec du miel ou des amandes amères; tout cela se reconnaît au goût. Le meilleur se vend 8 deniers. Il vient aussi en Pamphylie, mais il est plus âcre et moins juteux. »* (Pline l'Ancien, *Histoire naturelle*, livre XII)

Cette adultération des résines de « styrax » perdure encore de nos jours puisqu'il est très fréquent de trouver des produits vendus sur le marché sous le nom de « benzoin » ou de « styrax », mais qui sont en réalité des mélanges altérés comprenant, entre autre, de la colophane ou du dammar (Langenheim, 2003).

Dans le but de clarifier ces différents aspects, il apparaît donc que des recherches plus approfondies sont requises afin d'établir de nouveaux critères (chimio)taxonomiques en vue d'une authentification certaine des résines de styrax et de storax, notamment pour des applications en archéologie, mais aussi, plus largement, pour la reconnaissance future de résines dites de « styrax » dans le cadre de la répression des fraudes. C'est ainsi que nous nous sommes intéressés au contenu lipidique de différentes résines de styrax et de storax (ou liquidambar) parmi lesquelles la résine de *S. officinalis* dont nous présentons, dans ce manuscrit, la première étude moléculaire. Afin d'être le plus exhaustif possible, nous nous sommes également intéressés aux baumes de Tolu et du Pérou qui contiennent des esters benzoïques et cinnamiques afin de voir, notamment, s'ils peuvent être distingués des résines de styrax et de storax sur une base moléculaire. Enfin, ce travail de caractérisation moléculaire de baumes sera immédiatement mis en application à travers l'étude de la résille organique placée à l'arrière d'un crâne décoré mis au jour sur le site archéologique de Nahal Hemar (Israël) afin de valider le caractère chimiotaxonomique de certains composés identifiés.

Partie I : Etude chimiotaxonomique de baumes de référence issus d'espèces de *Styrax*, *Liquidambar* et *Myroxylon*

4.2. Présentation des échantillons de résines actuelles

Comme l'ont confirmé nos analyses préliminaires opérées sur de multiples résines commerciales (« Storax de Turquie », « Baume de Tolu »…), nombreux sont les produits vendus dans le commerce qui se trouvent être adultérés. Dans un souci de pertinence, nous avons donc cherché à nous procurer, dans la mesure du possible, des résines certifiées (*S. officinalis* notamment), mais cela n'a pas toujours été possible au vu de la rareté de certains produits (particulièrement de *Myroxylon*). Nous avons eu, malgré tout, l'opportunité d'examiner divers échantillons issus des 3 genres de végétaux: *Styrax* sp., *Liquidambar* sp. et *Myroxylon* sp. grâce à la généreuse contribution de plusieurs intervenants (Tableau 4.1).

Concernant l'arbuste de *Styrax officinalis*, dont la résine est extrêmement rare, nous avons eu la possibilité de collecter personnellement des échantillons de feuilles, d'écorce et de fruits d'un arbuste du Jardin Botanique de Strasbourg. En revanche, ce dernier se développant sous un climat peu propice à la production de résine, il n'a donc pas été possible d'en prélever. Cherchant alors à acquérir la substance résineuse de spécimens natifs du pourtour méditerranéen, nous avons finalement pu obtenir un exsudat fraîchement collecté sur un arbre localisé à Yodfat, au Nord de l'Israël (résine 2984) ainsi qu'une résine collectée au Jardin des plantes de Montpellier (résine 3020). Afin de compléter cette collection de résines de styrax, un échantillon de résine de *S. paralleloneurum* (résine 2984) et de résine de *S. tonkinensis* (résine 2986) nous ont été gracieusement offerts par Mme Elisabeth Dodinet[1].

Les résines de liquidambar sont, quant à elles, couramment utilisées en parfumerie et nous avons pu ainsi nous procurer des résines de *L. orientalis* et *L. styraciflua* de la société ROBERTET par l'intermédiaire de parfumeurs.

Enfin, pour étudier la composition chimique des résines de *Myroxylon*, nous n'avons pas été en mesure d'obtenir des résines contemporaines certifiées. Nous avons cependant pu recevoir, de la part du Jardin Botanique de Meise (en Belgique), des échantillons de feuilles et de branches pour les deux variétés les plus connues : *M. balsamum var. balsamum* et *M. balsamum var. pereirae*. Quant aux résines, le Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN, Paris) a également mis à notre disposition trois résines historiques de sa collection.

[1] Laboratoire Archéologie TRACES –UMR 5608 de l'Université de Toulouse II.

TABLEAU 4.1

Echantillons et provenance du matériel végétal étudié.

Espèce végétale	N° échantillon	Eléments de la plante	Provenance
Styracaceae (famille), Styrax sp. (genre)			
S. officinalis	2982	résine (+ écorce)	Yodfat, Israël[1]
	3020	résine	Jardin des plantes de Montpellier[2]
		fruits	Jardin botanique de Strasbourg[3]
		feuilles	
		écorce	
S. parallelon	2984	résine	Sumatra (Indonésie) [4]
S. tonkinensis	2986	résine	Résine achetée en Syrie[4]
Hamamelidaceae (famille), Liquidambar sp. (genre)			
L. orientalis	-	gomme	Gomme de Turquie, Société ROBERTET [5]
L. styraciflua	-	résine	Société ROBERTET[5]
Fabaceae (famille), Myroxylon sp. (genre)			
M. balsamum var. balsamum	MNHN-Tolu-14	résine (historique)	Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), Paris[6]
	MNHN-Tolu	résine (historique)	MNHN, Paris[6]
	19373049-F	feuilles	Jardin botanique de Meise (Belgique) – *source* : Jardin colonial Laeken, Bruxelles (Belgique)[7]
	19373049-B	branches	
M. balsamum var. pereirae	MNHN-Pérou	résine (historique)	MNHN, Paris[6]
	19546864-F	feuilles	Jardin botanique de Meise (Belgique) – *source* : Institut National pour l'Etude Agronomique du Congo Belge, République Démocratique du Congo[7]
	19546864-B	branches	

[1]Résine fournie par le Dr. Arie Nissenbaum du *Weizmann Institute of Science*, Rehovot, Israël et transmise par le Dr. Jacques Connan.
[2]Résine prélevée par le Dr. Vincent Girard, UMR 5059, Université de Montpellier et transmise par le Dr. Jacques Connan.
[3]Eléments de *S. officinalis* offerts par Mr. Frédéric Tournay (Jardin Botanique de Strasbourg).
[4]Résines reçues de la part de Mme Elizabeth Dodinet (laboratoire Archéologie TRACES –UMR 5608 de l'Université de Toulouse II.) par l'intermédiaire du Dr. Jacques Connan.
[5]Résines obtenues par l'intermédiaire du Pr. Annelise Lobstein (Faculté de Pharmacie, Strasbourg) et du Dr. Frédéric Bonté (LVMH Recherche).
[6]Résines historiques mises à disposition par Mme Christine Maulay-Bailly et Mme Séverine Amand (Chimiothèque du MNHN, Paris).
[7]Don du Jardin Botanique de Meise par l'intermédiaire du Dr. Marc Reynders et Mr. Frank Van Caekenberghe.

4.3. Matériel résineux et parties aériennes issus de *Styracaceae*

4.3.1. Ce que dit la littérature à propos des Styracaceae

Bien que la classification et l'organisation phylogénétique des *Styracaceae* puissent être variables selon les sources documentaires étudiées, nous considérerons que cette famille de végétaux compte 11 genres sous-divisés en près de 160 espèces, dont le genre *Styrax* comptant 130 espèces (Figure 4.2 ; Fritsch et *al.*, 2001, Pauletti et *al.*, 2006).

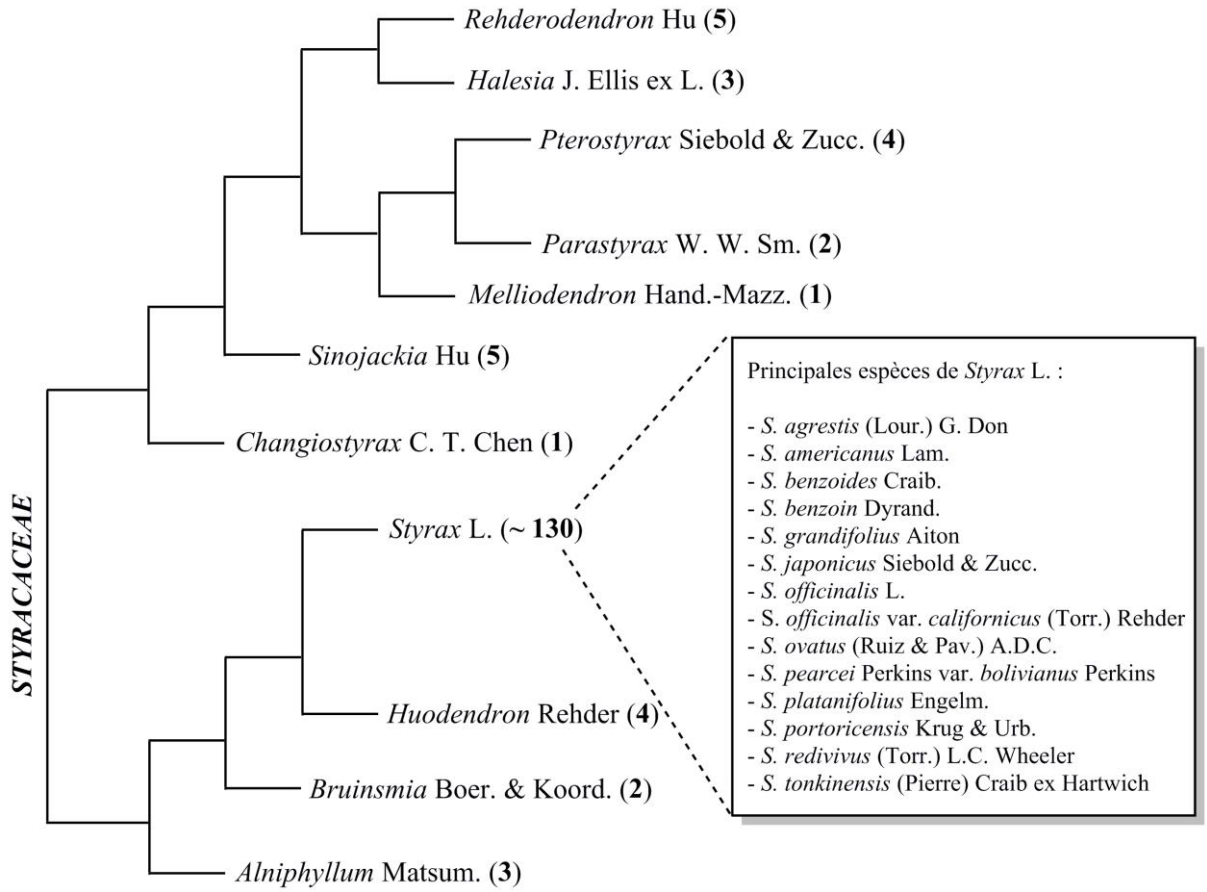


FIG. 4.2 Classification de la famille des *Styracaceae* proposée par Fritsch et *al.* (2001) sur la base de critères morphologiques. Entre parenthèse : nombre d'espèces répertoriées pour chaque genre.

Seules les plantes du genre *Styrax* produisent la résine du même nom qui est récoltée par gemmage, autrement dit, une fois que le tronc de l'arbre a été incisé au moyen d'un outil tranchant (Pauletti et *al.*, 2006). Ces plantes, qui se développent sous des climats tempérés et chauds, voire tropicaux (Figure 4.3), se retrouvent aussi bien sur le pourtour du bassin méditerranéen (*S. officinalis)* que sur le continent américain (*S. californicus*, *S. ovatus* et *S. pearcei* notamment) ou sur le continent asiatique -parmi lesquelles *S. tonkinensis* (Laos,

Thaïlande, Vietnam), *S. paralleloneurum* et *S. benzoin* (Malaisie, îles de Sumatra, Java et Bornéo, Fritsch et *al*., 2001, Hovaneissian et *al.*, 2006).

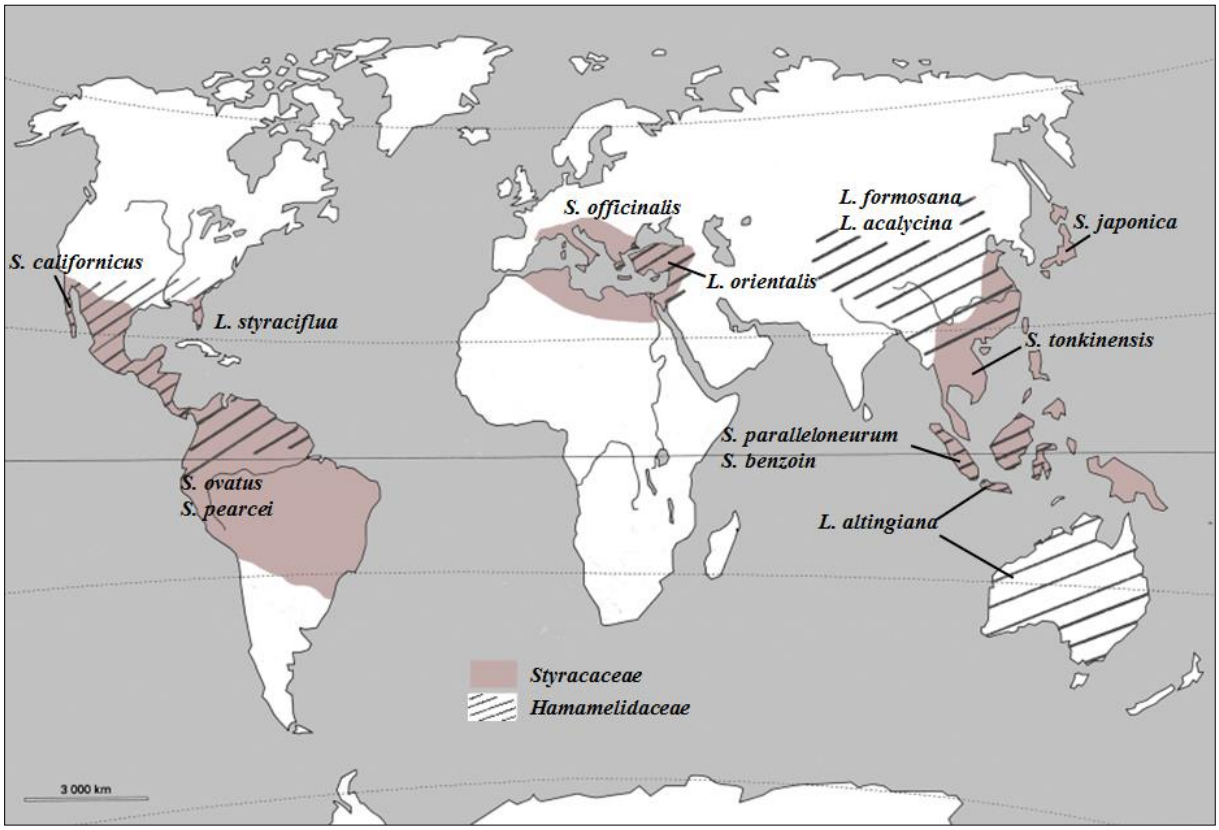


FIG. 4.3 Répartition géographique des principales espèces de *Styracaceae* et d'*Hamamelidaceae* (d'après Sales et Hedge, 1996 et Hovaneissian et *al*., 2006).

Les résines, produites essentiellement par les espèces asiatiques, figurent parmi les principales résines de styrax vendues actuellement dans le commerce, pour des utilisations en parfumerie, cosmétique ou à des fins médicales. Elles se retrouvent alors sous différentes appellations dont celle de « benjoin » ou « benzoin », termes que l'on retrouve dans « benjoin de Siam » ou « benjoin du Laos » qui servent à désigner la résine issue de *S. tonkinensis* et dans « benjoin de Sumatra » qui se réfère aux résines de *S. benzoin* et *S. paralleloneurum* (Hovaneissian et *al.*, 2006).

En revanche, la résine de *S. officinalis* est une substance très rare, certains botanistes allant même jusqu'à douter de son existence (Langenheim, 2003). Cette idée tient au fait que l'aliboufier (Figure 4.4), nom commun donné à l'arbuste de *S. officinalis*, ne produit généralement pas de résine ni spontanément, ni en réponse à une blessure naturelle ou volontairement occasionnée sur l'arbre. Néanmoins, il semblerait que la production de résine

soit possible sous certaines conditions climatiques et environnementales particulières liées, de ce fait, à la localisation géographique de la plante. Dès l'Antiquité, ce phénomène avait été observé, obligeant alors les grecs à importer cette gomme-résine tant désirée de Phénicie (Amigues, 2007). L'aliboufier originaire du Proche-Orient (Liban, Palestine, Israël) et du pourtour méditerranéen (Chypres, Rhodes, Crète, Grèce, Italie, Sud de la France) est, en effet, plutôt adapté aux climats chauds et, bien qu'il puisse se développer sous des climats plus froids -comme l'atteste, par exemple, sa présence au Jardin Botanique de Strasbourg- l'arbre ne produit pas de résine dans ces conditions peu favorables. Par ailleurs, même lorsque les conditions favorables sont rassemblées, la sécrétion de résine prend du temps et il faut s'armer de patience avant de pouvoir récolter suffisamment de résine en vue d'une quelconque exploitation, comme nous avons pu le constater suite à nos demandes de résines en Israël et dans le Sud de la France (Montpellier). Dès lors que l'arbuste produit ce matériel résineux si précieux, celui-ci présente une consistance initialement visqueuse, puis durcit avec le temps, conduisant à l'obtention d'un styrax solide qui ne doit pas être confondu avec le storax liquide issu de *L. orientalis* (voir ci-dessous ; Hovaneissian et *al.*, 2006, Amigues, 2007).

A.



B.



FIG. 4.4 Planche de dessin (**A**) et photo (**B**) de l'aliboufier, nom commun donné à la plante de *S. officinalis* (*source des images* : A. www.plantillustrations.org, extrait de Vietz, 1804 ; B. Wikipédia).

D'un point de vue moléculaire, nous distinguerons le matériel résinique des autres compartiments de la plante (feuilles, fruits, bois….) puisque ces derniers peuvent être très différents de la résine, certains ayant observé, à ce propos, l'absence totale d'odeur aromatique dans les parties aériennes de la plante (Amigues, 2007). De plus, alors que nous

avons recensé de nombreuses études faisant état de la composition chimique des résines de *S. benzoin*, *S. tonkinensis* et *S. paralleloneurum* (revues par Pauletti et *al.*, 2006), aucune étude, à notre connaissance, ne mentionne la composition chimique de la résine de *S. officinalis*. Pour ce cas particulier, nous développerons donc ce qui, dans la littérature, est rapporté au sujet de la composition chimique des différents organes de la plante.

Les résines de styrax sont principalement constituées d'acides cinnamique et benzoïque et de leurs esters respectifs, dont les teneurs peuvent être variables selon la qualité de la résine. En effet, Pastorova et ses collaborateurs (1997b) ont observé une quantité plus élevée d'acides benzoïque (**P1**, cf. appendice) et cinnamique (**P2**) à l'état libre lorsqu'il s'agissait de résines de médiocre qualité et ont donc suggéré que la présence de leurs esters respectifs constituait un gage de qualité pour la résine. De plus, selon la méthode analytique mise en œuvre pour l'extraction du matériel organique de la résine ou pour la détection moléculaire de ses constituants chimiques, des différences significatives entre celles-ci peuvent également être constatées (analyses adaptées aux composés volatils *vs*. aux composés moins volatils). Du fait de cette variabilité notable, nous avons pris le parti de ne pas nous attarder, dans la description des résines présentée ci-dessous, sur les pourcentages relatifs des différents composés moléculaires donnés dans la littérature.

- ***S. tonkinensis* (ou benzoin/benjoin de Siam)**

Cette résine contient majoritairement des dérivés formés à partir de l'acide benzoïque (**P1**), à la différence du benzoin de Sumatra (voir ci-dessous ; Langenheim, 2003). La résine de *S. tonkinensis* compte parmi ses constituants l'acide benzoïque sous sa forme libre, le benzaldéhyde (**P3**), le coniféraldéhyde (**P4**), la vanilline (**P5**) -ou l'isovanilline (**P6**) selon Hovaneissian et *al.* (2008)-, l'acide vanillique (**P7**), l'alcool coniférylique (désigné également par le terme de lubanol, **P8**), le benzoate de benzyle (**P9**), le benzoate de *p*-coumaryle (**P10**) et le benzoate de coniféryle (**P11** ; Fernandez et *al.*, 2003, Wang et *al.*, 2006b, Hovaneissian et *al.*, 2008, Burger et *al.*, 2016). Ce dernier est, de par son abondance, considéré comme le marqueur chimiotaxonomique de l'espèce (Hovaneissian et *al.*, 2008). D'autres travaux, relatifs à la résine de *S. tonkinensis*, ont conduit à l'isolement et à la caractérisation par RMN de composés aromatiques parmi lesquels le benzoate de *trans*-(tétrahydro-2-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-5-oxofuran-3-yl)-méthyle (**P12**), le benzoate de 3-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-2-oxopropyle (**P13**) et le 4-((*E*)-3-éthoxyprop-1-ényl)-2-méthoxyphénol (**P14**), caractérisés par Wang et *al.* (2006b), auxquels s'ajoutent des dérivés d'alcool

coniférylique présentant un ou deux groupements de type benzoate (composés **P15** à **P18** ; Burger et *al.*, 2016). La résine de *S. tonkinensis* se caractérise également par la présence de triterpénoïdes (produits minoritaires) que sont l'acide oléanolique (**T13**), l'acide siarésinolique (**T14**), l'acide sumarésinolique (**T15**), les acides 3-oxo-siarésinolique (**T16**) et 3-oxo-sumarésinolique (**T17**), le 6β-hydroxy-3-oxo-11α,12α-époxyoléan-28,13β-olide (**T18**), le 3β,6β-dihydroxy-11α,12α-époxyoléan-28,13β-olide (**T19**), l'acide 3β,6β-dihydroxy-11-oxo-oléan-12-en-28-oïque (**T20**) et le 3β-hydroxy-12-oxo-13Hα-oléan-28,19β-olide (**T21** ; Wang et *al.*, 2006a). Certains articles mentionnent, en outre, la présence du benzoate de cinnamyle (**P19**) et du cinnamate de cinnamyle (**P20**). Cependant, à la lecture des articles cités pour référence dont, notamment, les travaux de Schroeder (1968), nous n'avons pu confirmer ces propos. Il convient de noter, par ailleurs, que Schroeder (1968) associe le terme « benzoin de Siam » à l'espèce *Styrax benzoin*, ce qui constitue la source d'une des nombreuses erreurs de terminologie parues dans la littérature.

- ***S. benzoin* et *S. paralleloneurum* (ou benzoins/benjoins de Sumatra).**

Les teneurs relatives des différents constituants mises à part, le cortège moléculaire des résines issues de ces deux espèces botaniques est relativement similaire. Ces résines possèdent principalement des dérivés de l'acide cinnamique, à l'inverse du benzoin du Siam (voir ci-dessus ; Langenheim, 2003), parmi lesquels nous pouvons nommer l'acide cinnamique lui-même (**P2**), le cinnamate de cinnamyle (ou styracine, **P20**), le cinnamate de benzyle (**P21**), le cinnamate de *p*-coumaryle (**P22**) et le cinnamate de coniféryle (**P23** ; Pastorova et *al.*, 1997b, Fernandez et *al.*, 2003, Hovaneissian et *al.*, 2008). De nombreux dérivés de l'acide benzoïque sont également présents au sein de ces deux résines : l'acide benzoïque (**P1**), le benzoate de *p*-coumaryle (**P10**) et le benzoate de coniféryle (**P11** ; Popravko et *al.*, 1984, Pastorova et *al.*, 1997b). La vanilline (**P5**), le styrène (**P24**) et le pinorésinol (**L1**) sont, de même, des composés que l'on trouve à la fois dans la résine de *S. benzoin* et dans la résine de *S. paralleloneurum* (Popravko et *al.*, 1984, Pastorova et *al.*, 1997b, Hovaneissian et *al.*, 2008). A la différence de la résine de *S. paralleloneurum*, certains auteurs rapportent, de plus, la présence du benzoate de benzyle (**P9**), du benzoate de cinnamyle (**P19**), du cinnamaldéhyde (**P25**) et du benzaldéhyde (**P3**) au sein de la résine de *S. benzoin* (Popravko et *al.*, 1984, Fernandez et *al.*, 2003). Du coté des triterpènes, il semblerait que les acides siarésinolique (**T14**) et sumarésinolique (**T15**) soient également présents (Pauletti et *al.*, 2006, Custódio et Veiga-Junior, 2012). Malgré cette forte ressemblance entre les résines, un

critère moléculaire a pu être établi afin de les différencier. Cette distinction se fonde sur l'abondance relative des dérivés de cinnamates, et en particulier du cinnamate de *p*-coumaryle (**P22**), qui représentent, dans le cas de la résine de *S. paralleloneurum*, des constituants majeurs de la résine (Pastorova et *al.*, 1997b).

- ***S. officinalis*.**

Avant l'étude présente, à défaut de pouvoir acquérir de la résine de *S. officinalis*, les travaux publiés sur *S. officinalis* se sont concentrées uniquement sur l'analyse des parties aériennes de la plante (feuilles, tiges, fleurs) et ont révélé la présence, entre autres, de lignanes dont la styraxine (**L2**, Ulubelen et *al.*, 1978), de benzofuranes tels que l'égonol (**B1**) et l'homoégonol (**B2** ; Akgul et Anil, 2003), de saponines de triterpènes (Yayla et *al*., 2002), de flavonoïdes et d'acides phénoliques (Proestos et *al.*, 2006), d'acides gras linéaires (Vardar et Oflas, 1973) ou encore de molécules de faible poids moléculaire et hautement volatiles (mono- et sesquiterpènes, composés aromatiques ; Tayoub et *al.*, 2006a, 2006b).

D'autres espèces de *Styracaceae* ont fait l'objet de quelques études comme *S. japonica* pour l'écorce (Kwon et *al.*, 2008) ou *S. camporum* pour les feuilles (Pauletti et *al.*, 2002), dans lesquels quelques triterpènes appartenant aux famille de l'oléanane et/ou de l'ursane, comme l'acide oléanolique (**T13**) et l'érythrodiol (**T22**) (parfois sous leur forme d'acétate naturel en C-3) et l'acide maslinique (**T23**), ont été isolés, en quantité suffisante pour qu'en soit déterminée la structure par RMN. Enfin, des lignanes, comme l'égonol (**B1**) et l'homoégonol (**B2**), ont été identifiés au sein des parties aériennes de *S. ferrugineus*, *S. camporum* et *S. pohlii* (Pauletti et *al.*, 2000, Moraes et *al.*, 2012).

4.3.2. Ce que nous apprend notre étude moléculaire sur les exsudats de Styracaceae

a. <u>Les dérivés phénylpropanoïdes</u>

Les résines exsudées de *Styracaceae* se caractérisent, tout particulièrement, par l'omniprésence et l'abondance des dérivés d'acides cinnamique et benzoïque, qui sont, entre autres, responsables de la plaisante odeur aromatique libérée naturellement par les résines ou suite à leur combustion par fumigation. La détection de ces cinnamates et benzoates par MS s'appuie principalement sur l'identification du fragment de base résultant de la rupture de la liaison ester (Figure 4.5), à savoir le fragment *m/z* 105 ou 131, selon que l'on est en présence d'un dérivé d'acide benzoïque ou d'un dérivé d'acide cinnamique. Ces fragments mis à part, très peu d'informations structurales, comme la masse moléculaire ($M^{+\cdot}$ en EI) ou la nature de

la contrepartie, sont fournies par l'intermédiaire de fragments additionnels, hormis quelques exceptions comme le cinnamate de cinnamyle (**P20**), ce qui rend particulièrement difficile l'élucidation de la contrepartie, de type alcool, liée par le groupement ester.

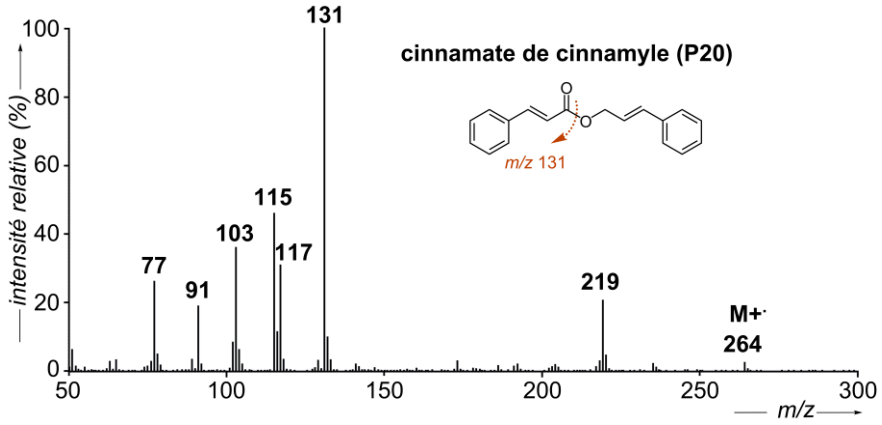


FIG. 4.5 Spectre de masse du cinnamate de cinnamyle **P20** (EI, 70 eV).

Dans le but d'élucider un certain nombre de structures chimiques, nous avons par la suite procédé à des analyses de MS en utilisant les modes CI ou FI. Cependant, l'analyse en mode CI (isobutane ou ammoniac) ou FI n'a pas nécessairement entraîné l'ionisation des composés ciblés, ce qui aurait pu permettre d'obtenir des informations quant aux masses moléculaires respectives de ces derniers. C'est la raison pour laquelle la structure moléculaire de nombreux composés n'a pu être établie. Néanmoins, un certain nombre de dérivés d'acides cinnamique et benzoïque de faible poids moléculaire (masse moléculaire inférieure à 400 Da) ont pu être identifiés au sein des résines de *Styracaceae*, par comparaison avec les données MS de la littérature (Modugno et *al.*, 2006b, Hovaneissian et *al.*, 2008), et dont les structures moléculaires sont représentées en appendice.

L'analyse par GC-MS de la fraction apolaire des deux résines de *S. officinalis* (2982 et 3020) ainsi que des résines de *S. paralleloneurum* (2984) et de *S. tonkinensis* (2986) nous a permis de constater de multiples différences significatives parmi les distributions en esters d'acides cinnamique et benzoïque. Nous avons ainsi recensé une majorité de dérivés d'acide cinnamique dans les exsudats de *S. officinalis* (Figures 4.6 et 4.7) ainsi qu'au sein de la résine de *S. paralleloneurum* (Figure 4.8), alors qu'à l'inverse, les dérivés de l'acide benzoïque prédominent dans la résine de *S. tonkinensis* (Figure 4.9).

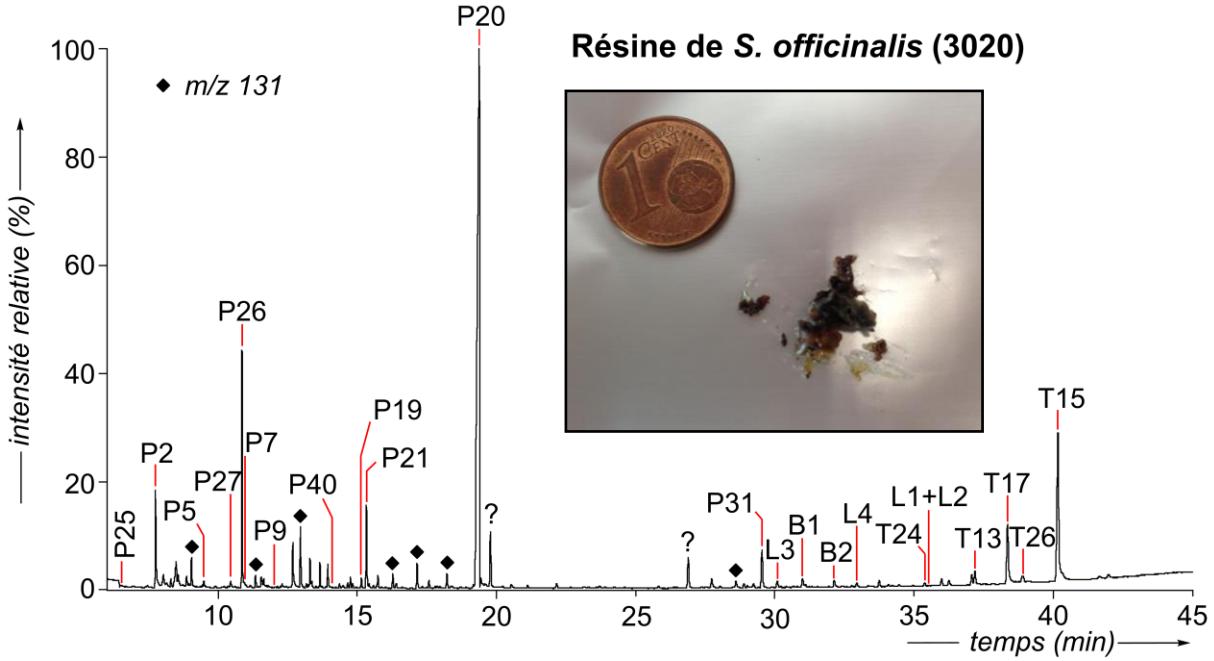


FIG. 4.6 Chromatogramme en phase gazeuse de l'extrait lipidique apolaire obtenu à partir du matériel résinique de *S. officinalis* (3020). Les composés comportant des fonctions acides et alcools sont analysés respectivement sous forme d'esters méthyliques et d'acétates. Les structures moléculaires sont représentées en appendice. Les cinnamates, caractérisés par un fragment de base à *m/z* 131 et dont la structure moléculaire n'a pu être déterminée, sont désignés par des losanges pleins (programme de température B).

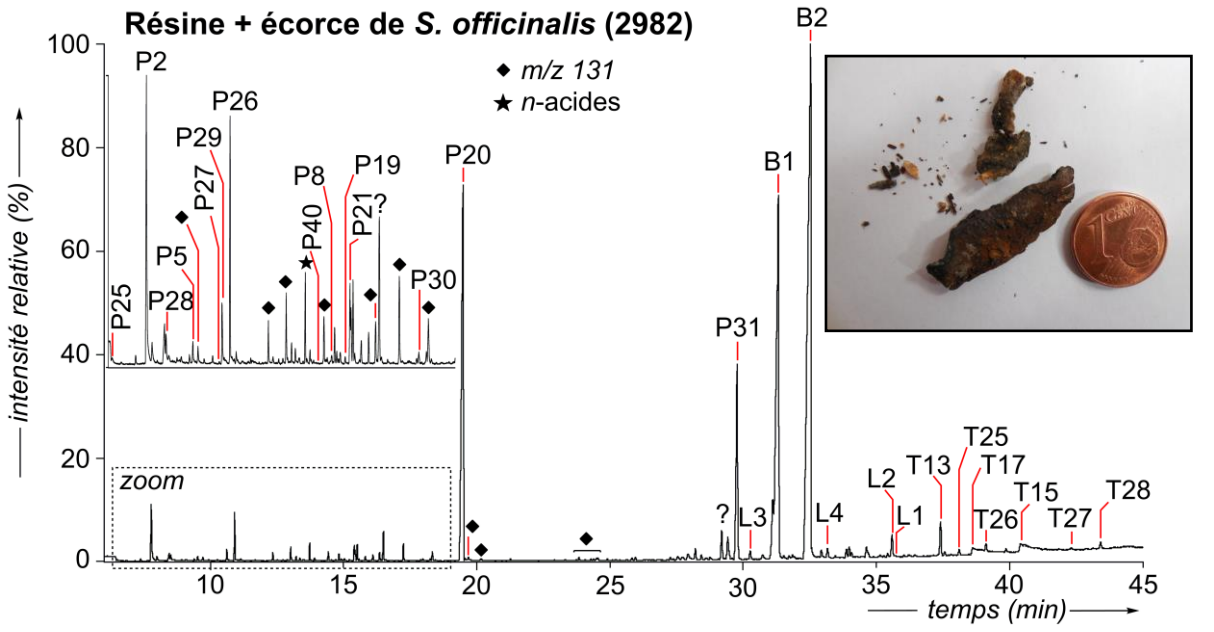


FIG. 4.7 Chromatogramme en phase gazeuse de l'extrait lipidique apolaire obtenu à partir de l'échantillon d'écorce et de résine prélevé sur un arbre israélien de *S. officinalis* (2982). Les composés comportant des fonctions acides et alcools sont analysés respectivement sous forme d'esters méthyliques et d'acétates. Les structures moléculaires sont représentées en appendice. Les cinnamates, caractérisés par un fragment de base à *m/z* 131 et dont la structure moléculaire n'a pu être déterminée sont désignés par des losanges pleins (programme de température B).

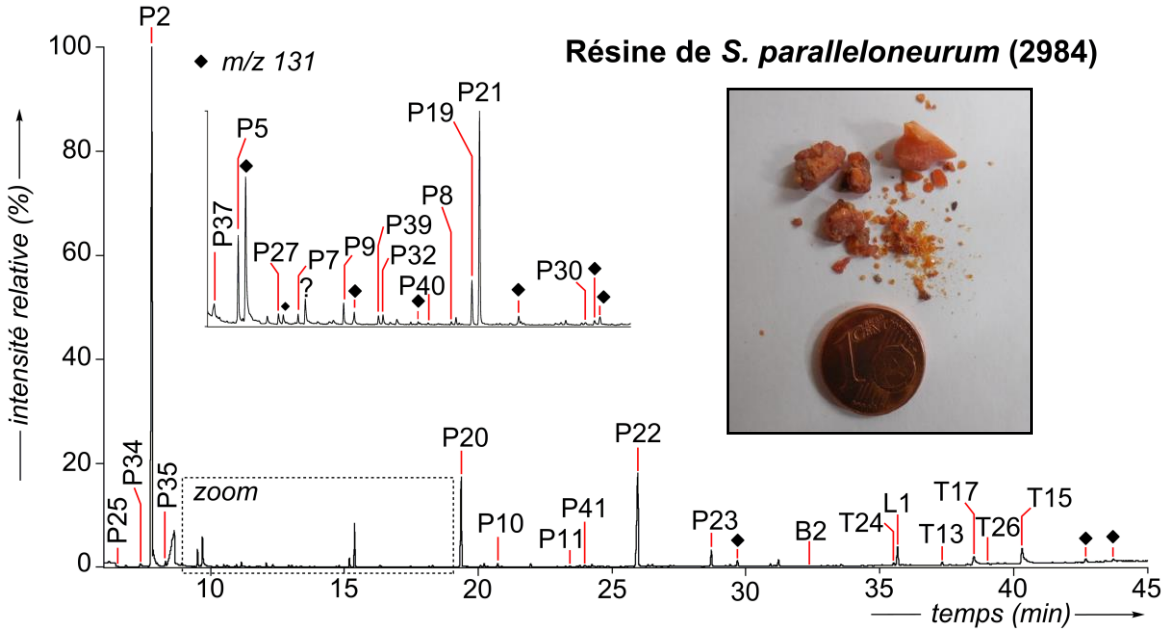


FIG. 4.8 Chromatogramme en phase gazeuse de l'extrait lipidique apolaire obtenu à partir de la résine de *S. paralleloneurum* (2984). Les composés comportant des fonctions acides et alcools sont analysés respectivement sous forme d'esters méthyliques et d'acétates. Les structures moléculaires sont représentées en appendice. Les cinnamates, caractérisés par un fragment de base à *m/z* 131 et dont la structure moléculaire n'a pu être déterminée, sont désignés par des losanges pleins (programme de température B).

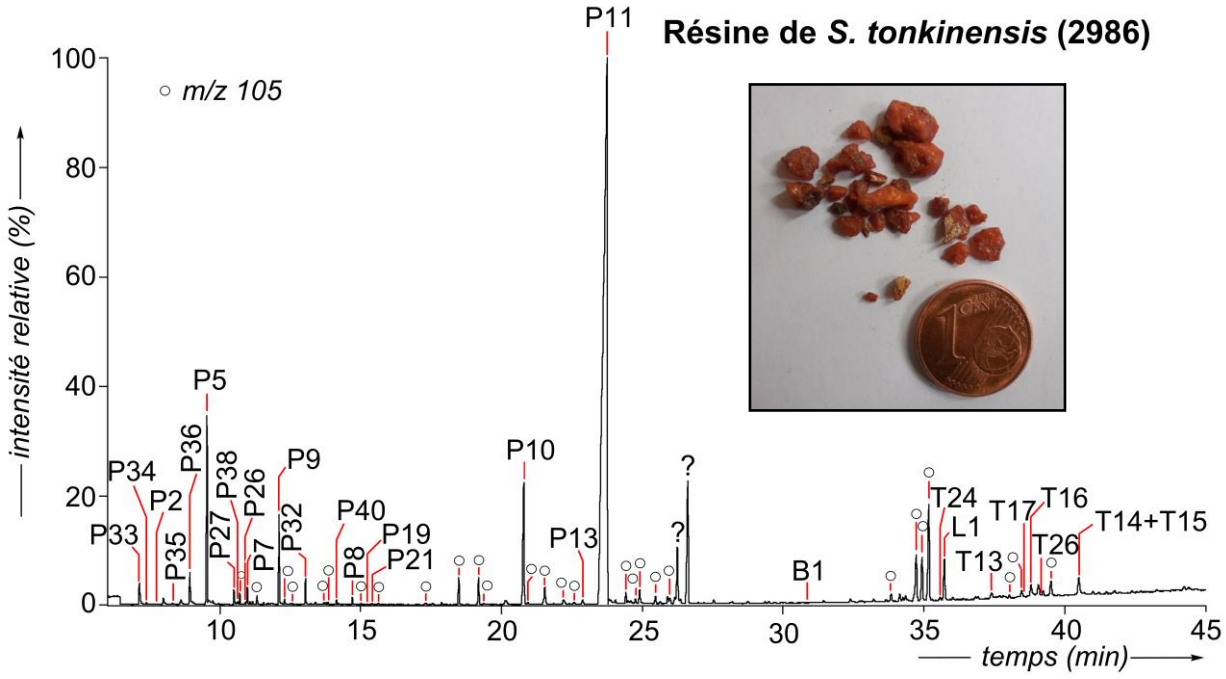


FIG. 4.9 Chromatogramme en phase gazeuse de l'extrait lipidique apolaire obtenu à partir de la résine de *S. tonkinensis* (2986). Les composés comportant des fonctions acides et alcools sont analysés respectivement sous forme d'esters méthyliques et d'acétates. Les structures moléculaires sont représentées en appendice. Les benzoates, caractérisés par un fragment de base à *m/z* 105 et dont la structure moléculaire n'a pu être déterminée sont désignés par des cercles vides (programme de température B).

Quant à la résine fraîche de *S. officinalis* (Figure 4.6) prélevée sur l'aliboufier du Jardin des plantes de Montpellier (résine 3020), celle-ci se caractérise par la prédominance du cinnamate de cinnamyle (**P20**). Ce dernier s'accompagne, de plus, de la présence du méthoxyeugénol (**P26**), de l'acide cinnamique (**P2**) et du cinnamate de benzyle (**P21**), par ordre d'importance décroissante. Enfin, parmi les composés mineurs, si ce n'est à l'état de trace, nous avons relevé la présence du cinnamaldéhyde (**P25**), de la vanilline (**P5**), de l'eugénol (**P27**), de l'acide vanillique (**P7**), du benzoate de benzyle (**P9**) et du benzoate de cinnamyle (**P19**). Au regard de ces premiers résultats, nous pouvons en conclure que la composante « phénylpropanoïde » de l'extrait est manifestement dominée par la présence des esters de cinnamate (*m/z* 131).

L'empreinte moléculaire des cinnamates de la résine de *S. officinalis* collectée en Israël (résine 2982, Figure 4.7) est relativement analogue à celle décrite dans le cas de la résine 3020, à l'exception de quelques constituants supplémentaires, parmi lesquels l'alcool cinnamique (**P28**), le cinnamate de propyle (**P29**) et, à l'état de trace, le cinnamate de 3-phénylpropanyle (**P30**). La présence de ce dernier au sein de la résine de *S. officinalis* 2982, ainsi que dans la résine de *S. paralleloneurum* 2984 (voir ci-après), deux espèces appartenant au genre des *Styracaceae*, semble aller à l'encontre de l'idée suggérant que le cinnamate de 3-phénylpropanyle soit spécifique aux *Hamamelidaceae* (Pastorova et *al.*, 1998). Néanmoins, le caractère chimiotaxonomique du cinnamate de 3-phénylpropanyle ne semble pas totalement remis en cause, puisque ce dernier ne figure qu'à l'état de trace parmi les composés présents dans les résines fraîches de *Styracaceae* que nous avons étudiées.

La structure du composé **P31** -ce dernier étant particulièrement abondant au sein de la résine 2982, et, dans une moindre mesure, dans la résine 3020- n'a pu être clairement établie. Néanmoins, la présence d'un fragment de base *m/z* 167 suggère qu'il s'agit d'un dérivé possédant une fonction 4-hydroxy-3,5-diméthoxybenzène. Ce composé **P31** semble absent de l'écorce ou de toutes les parties aériennes de la plante examinées (cf. § 4.3.3). De ce fait, nous suggérons que ce dérivé puisse être spécifique à la résine et non issu d'une contribution de l'écorce, bien que des fragments de l'écorce aient été incorporés à la résine lors de sa collecte.

Quant à la résine de *S. paralleloneurum* (Figure 4.8), la distribution lipidique observée est largement dominée par l'acide cinnamique (**P2**), en accord avec les précédentes études (Langenheim, 2003, Hovaneissian et *al.*, 2008), qui est accompagné du cinnamate de *p*-coumaryle (**P22**), du cinnamate de cinnamyle (**P20**), du cinnamate de benzyle (**P21**) et du

cinnamate de coniféryle (**P23)** par ordre d'intensité relative décroissante observée en GC-FID. Si la faible quantité d'esters de cinnamate par comparaison avec l'acide cinnamique sous sa forme libre peut être associée à une faible qualité de la résine (Pastorova et *al.*, 1997b), cette singularité pourrait aussi constituer, plus généralement, une caractéristique intrinsèque de la résine.

Enfin, concernant la résine de *S. tonkinensis* (Figure 4.9), l'importance du benzoate de coniféryle (**P11**) prévaut sur l'ensemble de la signature moléculaire, qui comprend par ailleurs de la vanilline (**P5**), du benzoate de benzyle (**P9**), du benzoate de *p*-coumaryle (**P10**) et de l'acide *p*-coumarique (**P32**). Contrairement aux trois résines de styrax précédentes, la distribution moléculaire des phénylpropanoïdes se compose principalement des esters de benzoate (*m/z* 105), ce qui constitue un critère moléculaire permettant de distinguer tout particulièrement cet exsudat.

En résumé, pour chacune des résines étudiées, l'analyse par GC-MS de la fraction apolaire a montré la prédominance spécifique d'un ester d'acide cinnamique ou benzoïque en particulier, à savoir, le cinnamate de cinnamyle (**P20**) pour la résine de *S. officinalis*, l'acide cinnamique (**P2**) dans le cas de l'exsudat de *S. paralleloneurum* et, enfin, le benzoate de coniféryle (**P11**) pour la résine de *S. tonkinensis*.

Lors d'études relatives à la caractérisation de résines fraîches, vendues dans le commerce notamment, la prépondérance de l'un ou l'autre de ces composés peut, par conséquent, constituer un critère chimiotaxonomique d'identification pour chacune des espèces, tout en gardant à l'esprit que des variations peuvent être observées selon la qualité de la résine[2] (Pastorova et *al.*, 1997b) et le protocole analytique mis en œuvre. En revanche, l'utilisation de telles distributions moléculaires dans le but de caractériser des résines anciennes, mises au jour en contexte archéologique notamment, n'est pas forcément pertinente. En effet, l'altération du matériau archéologique peut fortement modifier les abondances relatives de certains dérivés d'esters d'acides cinnamique et benzoïque, qu'il s'agisse d'un vieillissement naturel de la résine lié aux conditions environnementales du milieu, ou d'une modification de nature anthropique en vue de son usage (traitement

[2] Pastorova et *al.* (1997b) distinguent différentes qualités de résines en provenance de l'île de Sumatra (*S. paralleloneurum* Perk et *S. benzoin* Dyrand). En effet, les résines dites de première et de deuxième qualité (dénommées « Mata Rasar » et « Mata Halus ») correspondent à des exsudats de pureté élevée, prélevés à l'arrière de l'écorce. Pour les qualités du troisième rang et inférieures, la résine est ôtée de la surface de l'écorce, et s'est donc trouvée, un certain temps, au contact de l'air et de la lumière, ce qui l'a nécessairement altérée. En outre, plus la qualité diminue, plus l'importance des résidus d'écorces au sein de la résine augmente.

thermique par exemple). Dans ce contexte précis, il nous faut donc rechercher d'autres lipides qui soient à la fois spécifiques et résistants face aux processus d'altération pour chacune des espèces étudiées.

b. Les lignanes et néo-lignanes

L'analyse des deux résines de *S. officinalis* a révélé la présence de néo-lignanes de la famille des benzofuranes que sont l'égonol (**B1**) et l'homoégonol (**B2**). En spectrométrie de masse (EI), ces derniers forment deux fragments caractéristiques d'intensité élevée : l'ion moléculaire $M^{+\cdot}$ (*m/z* 368 et 384 pour l'égonol **B1** et l'homoégonol **B2** sous forme acétylée ; Figure 4.10) accompagné du fragment résultant de la rupture benzylique en β du cycle aromatique (*m/z* 282 et 298). L'importance des composés **B1** et **B2** est tout à fait remarquable, dans le cas de la résine 2982, dans la mesure où l'analyse en GC-FID de la composante lipidique a, en effet, permis d'estimer l'abondance relative de l'égonol et de l'homoégonol à près de 19 % et 29 % de la fraction apolaire. Cette richesse en néo-lignanes observée dans le cas de l'échantillon 2982 provient certainement du fait que lors du prélèvement de la résine, des fragments d'écorce, de taille non négligeable (cf. photo en Figure 4.7), ont été inévitablement inclus à l'échantillon compte tenu de la difficulté à recueillir cette résine produite en très faible quantité par l'aliboufier. Cette « contamination » de l'échantillon, moindre dans le cas de l'échantillon 3020, a donc introduit les composés **B1** et **B2**, dont la présence au sein de l'écorce de *S. officinalis* s'est vue confirmée, de manière indépendante, par l'analyse de l'échantillon d'écorce prélevé au Jardin Botanique de Strasbourg (cf. § 4.3.3). Outre leur présence au sein de la résine de *S. officinalis*, ces composés ont également été détectés au sein des résines de styrax 2984 et 2986. Plus largement, il semblerait que l'égonol **B1** et l'homoégonol **B2** soient présents au sein de toutes les espèces du genre *Styrax* (Pauletti et *al.*, 2006 et références citées, Moraes et *al.*, 2012, de Oliveira et *al.*, 2015a) faisant de ces derniers d'excellents biomarqueurs moléculaires de ce genre botanique, d'autant qu'aucune publication ne mentionne, à notre connaissance, la présence de ces derniers dans d'autres genres ou espèces botaniques.

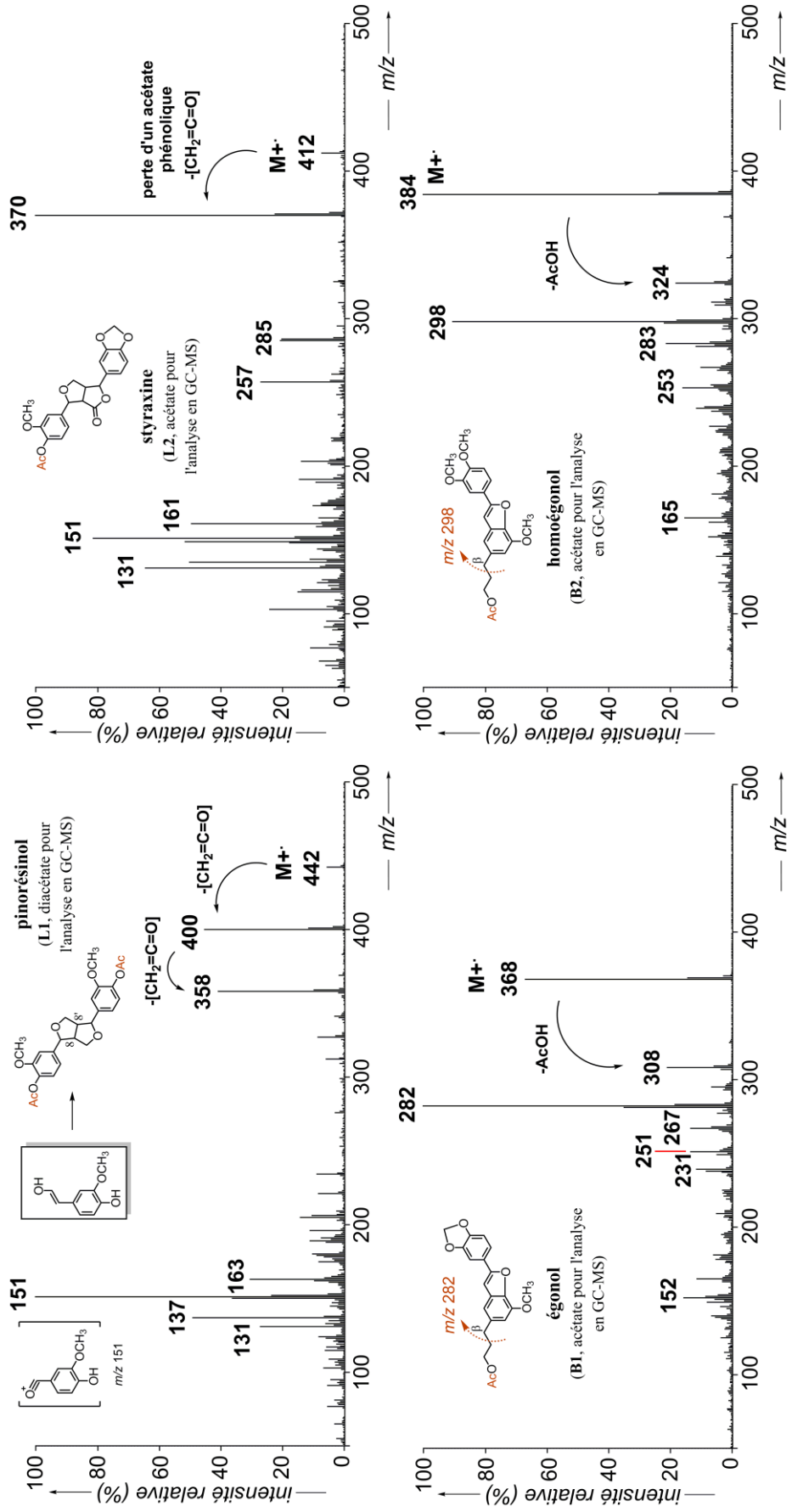


FIG. 4.10 Spectres de masse du pinorésinol **L1**, de la styraxine **L2**, de l'égonol **B1** et de l'homoégonol **B2**. Les fonctions alcools sont analysées en GC-MS sous forme d'acétates (EI, 70 eV).

Il est intéressant de noter, par ailleurs, que l'égonol et l'homoégonol ont montré des propriétés biologiques intéressantes qui expliquent en partie l'usage de *Styracaceae* dans le domaine de la médecine. A cet égard, Pauletti et *al.* (2000) ont démontré l'activité antimicrobienne et antifongique de ces composés au moyen de tests biologiques et il semblerait qu'ils agissent également contre les cellules tumorales (de Oliveira et *al.*, 2015a). Cependant, si l'égonol et l'homoégonol sont omniprésents au sein des parties aériennes de *Styracaceae* (feuilles, tiges, fruits ; Pauletti et *al.*, 2006 et références citées), ces derniers semblent être absents, d'après la littérature, des résines de *Styracaceae*, à moins que celles-ci ne contiennent d'autres éléments de la plante comme nous l'avons observé dans le cas de l'échantillon 2982.

Les dérivés de lignanes ont également fait l'objet de notre attention. Il s'agit de composés phénoliques élaborés à partir de deux unités de type monolignols (alcool *p*-coumarylique ou *p*-coniférylique dans le cas des espèces de *Styrax*), reliées au niveau des carbones C-8 et C-8' (Figure 4.10). La fragmentation en MS de tels composés se caractérise notamment par la perte des acétates phénoliques (élimination du groupement cétène, d'où la perte de 42 Da ; Nakata et Tatematsu, 1971) et par la rupture au niveau du système 3,7-dioxabicyclo (3,3,0) octane, ce qui nous a permis de proposer que les composés **L1** et **L2**, présentant tous deux un fragment *m/z* 151, puissent être respectivement le pinorésinol et la styraxine (Ulubelen et *al.*, 1978). Les quatre résines de styrax étudiées contiennent toutes du pinorésinol (**L1**), un lignane ubiquiste au sein du règne végétal (Milder et *al.*, 2005, Durazzo et *al*., 2013). A l'inverse, seules les résines issues de *S. officinalis* renferment de la styraxine (**L2**), de la sésamine (**L3**) et du pipéritol (**L4**). De manière semblable à l'égonol et à l'homoégonol, la styraxine a pu être apportée par l'écorce de *S. officinalis*, expliquant sa présence au sein de l'échantillon 2982. A la différence des composés **L3** et **L4**, nous n'avons pas connaissance de travaux ayant détecté la styraxine dans d'autres espèces de *Styracaceae* ou au sein de plantes de genres différents, et ce, depuis le premier travail de caractérisation de la styraxine au sein des parties aériennes de la plante de *S. officinalis* réalisé par Ulubelen et *al.* (1978). Par conséquent, la détection au sein d'un échantillon de la styraxine, marqueur de *Styracaceae*, en révèle la source précise.

c. Les triterpènes

Alors que l'essentiel des articles scientifiques qui traitent de la signature moléculaire des résines issues de *Styracaceae* se concentrent sur la caractérisation de dérivés de cinnamates et de benzoates, de lignanes et de néo-lignanes, rares sont les mentions de constituants triterpéniques qui se rapportent aux résines de styrax (Wang et *al.*, 2006a, Hovaneissian et *al.*, 2008). Nos analyses en GC-MS ont révélé la présence de triterpènes présentant un squelette de type oléanane (et ursane dans une moindre mesure) en très faibles quantités. Hormis l'identification des acides oléanonique (**T24**, Figure 4.11), oléanolique (**T13**) et ursolique (**T25**), des composés omniprésents chez les angiospermes, d'autres triterpènes aux spectres de masse plus inhabituels ont attiré notre attention. Ceux-ci ont pu être classés selon deux groupes : le premier comprenant les triterpénoïdes se distinguant par leur fragment de base à *m/z* 203 et le second incluant ceux qui se caractérisent par le fragment *m/z* 201.

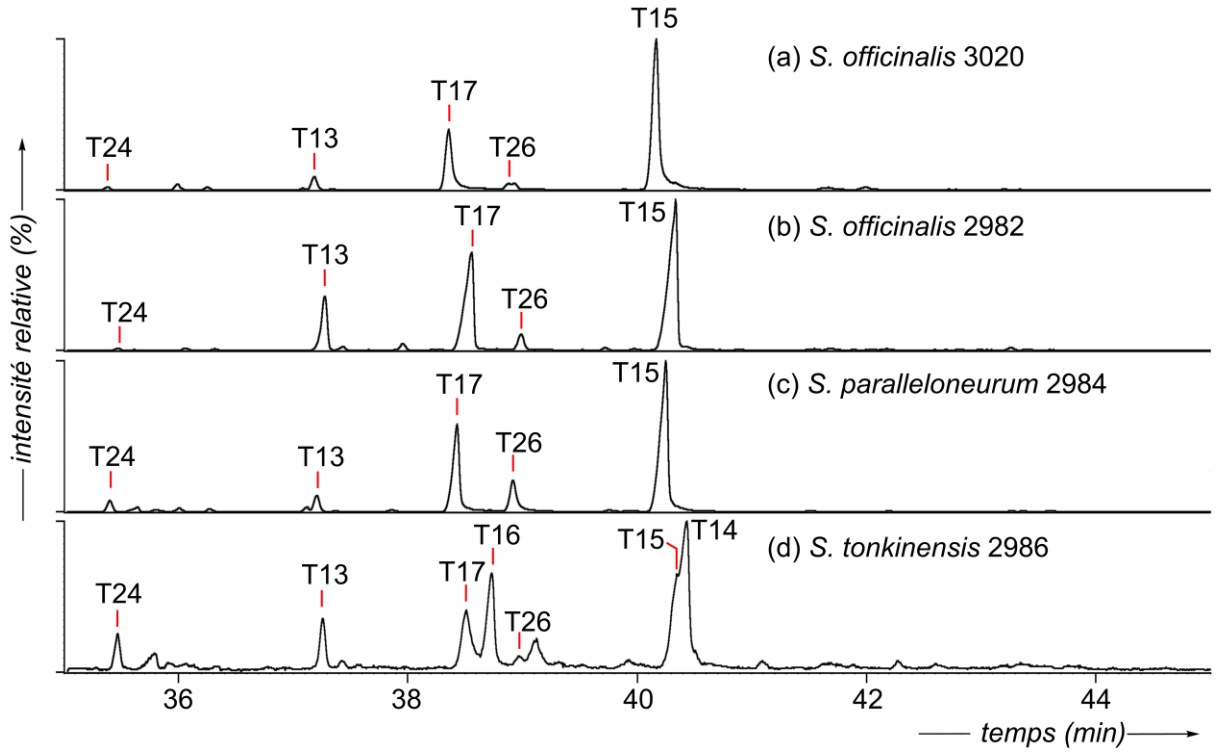


FIG. 4.11 Fragmentogrammes de masse *m/z* 189 + 201 + 203 montrant le contenu en triterpènes des résines de (**a**) *S. officinalis* 3020, (**b**) *S. officinalis* 2982, (**c**) *S. paralleloneurum* 2984 et (**d**) *S. tonkinensis* 2986. Les structures des triterpènes sont représentées en appendice.

Le fragment *m/z* 262 est classiquement associé à la réaction de rétro Diels-Alder (fragment *a*, Figure 4.12) observée dès lors que le triterpène présente une double liaison dans le cycle C en position C-12 ainsi qu'un groupement carbométhoxy en position C-17 (Budzikiewicz et *al.*, 1963). La perte du groupement $COOCH_3$ forme, par la suite, le fragment *m/z* 203 (fragment *a'*). L'information structurale apportée par ces deux fragments ne concerne, toutefois, que le motif moléculaire du système cyclique C/D/E. A défaut de fragments spécifiques au système cyclique A/B, seul l'ion moléculaire nous a permis, bien souvent, de proposer une structure complète pour ces triterpènes. Alors que l'analyse MS en mode EI, effectuée sur un appareil pourvu d'un analyseur de type quadripôle, favorisait principalement la génération des ions *a* et *a'* aux dépens de l'ion $M^{+\cdot}$, deux analyses, l'une en mode EI et l'autre en mode FI, réalisées sur un appareil équipé d'un analyseur à temps de vol (TOF, cf. partie expérimentale), nous ont permis d'établir de manière formelle les masses moléculaires des composés **T17**, **T26** et **T15**, à savoir respectivement *m/z* 484, 526 et 528[3]. La présence d'un groupement hydroxyle au niveau des cycles A/B, non acétylé malgré l'étape de dérivation, se manifeste par les fragments *m/z* 466 (composé **T17**) et *m/z* 450 (composé **T15**) qui résultent de la perte de 18 Da ($-H_2O$) par rapport à l'ion moléculaire ($M^{+\cdot}$) et l'ion [$M^{+\cdot}$-AcOH]. L'encombrement stérique empêchant l'acétylation indique que la stéréochimie du groupement hydroxyle est de type 6β (position axiale ; Djerassi et *al.*, 1955). En définitive, les composés **T17**, **T26** et **T15** ont été identifiés comme étant respectivement l'acide 6β-hydroxy-3-oxo-oléan-12-en-28-oïque (ou acide 3-oxo-sumarésinolique), l'acide 3β-hydroxy-6-oxo-oléan-12-en-28-oïque et l'acide 3β,6β-dihydroxy-oléan-12-en-28-oïque, ce dernier étant plus fréquemment désigné par le nom générique d'acide sumarésinolique. Leur spectre de masse, en conformité avec ceux de la littérature (Wahlberg et Enzell, 1971), est représenté en Figure 4.13.

[3]Il convient de préciser que chronologiquement, le travail d'analyse des triterpènes en GC-MS (TOF) a été réalisé sur les échantillons archéologiques de l'enduit organique de Nahal Hemar (cf. deuxième partie de ce chapitre) et non sur les résines de référence, dont l'étude s'est déroulée ultérieurement. L'identification des triterpènes dans les échantillons de résines de référence s'est donc faite par comparaison avec les données de GC (temps de rétention) et MS (spectres de masse) obtenues à partir des échantillons archéologiques.

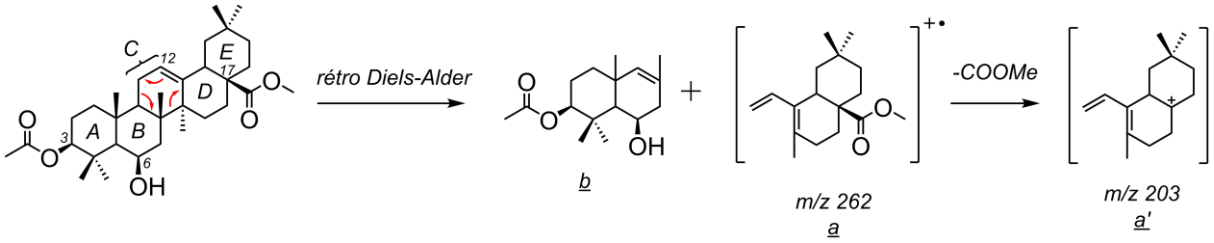


FIG. 4.12 Mécanisme réactionnel de type rétro Diels-Alder à l'origine des fragments *m/z* 203 et 262 typiques des dérivés de l'acide oléanolique (cas de l'acide sumarésinolique dérivé représenté ici, d'après Budzikiewicz et *al.*, 1963).

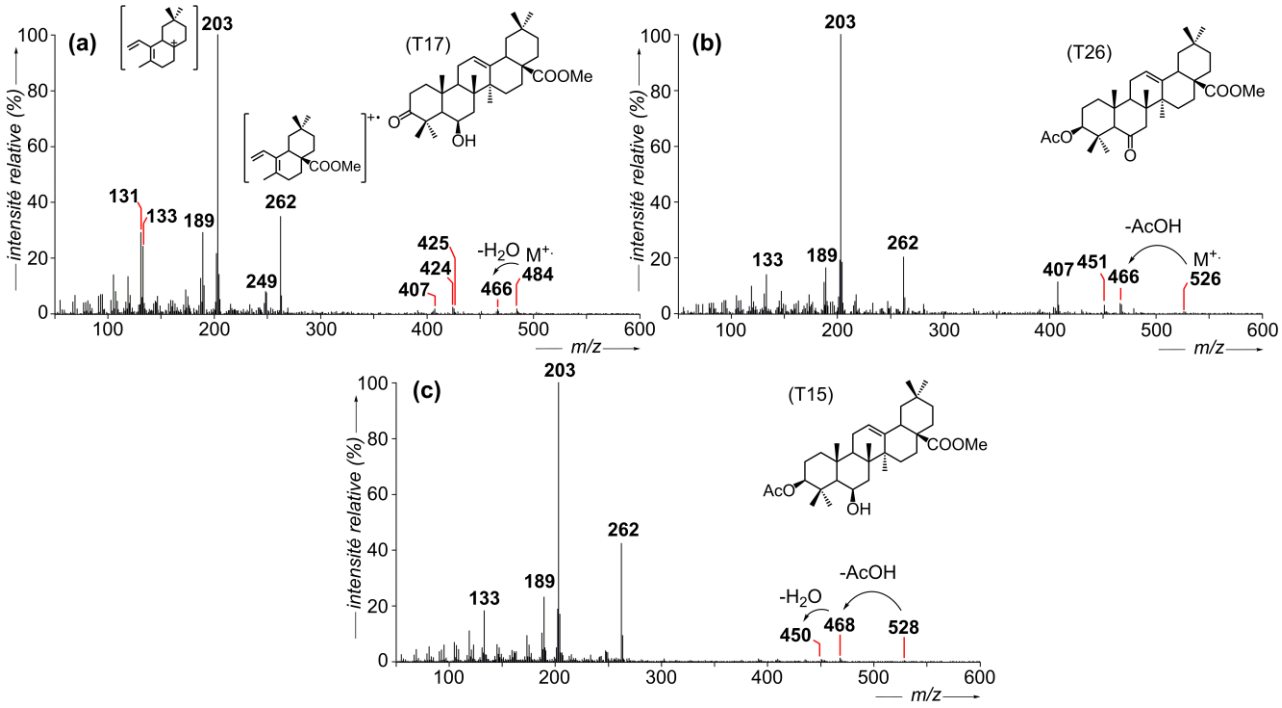


FIG. 4.13 Spectres de masse des dérivés de l'acide oléanolique possédant une fonction oxygénée en C-6 : (**a**) acide 3-oxo-sumarésinolique, (**b**) acide 3β-hydroxy-6-oxo-oléan-12-en-28-oïque et (**c**) acide sumarésinolique. Les fonctions acides sont analysées sous forme d'esters méthyliques et les fonctions alcools sous forme d'acétates, lorsqu'elles sont acétylables (EI, 70 eV).

Deux triterpènes possédant le squelette de l'oléanane, mais présentant cette fois-ci des fragments *m/z* 201 et 278 ont également pu être caractérisés. En effet, le fragment *m/z* 278 (espèce *c*, Figure 4.14) est la conséquence de la réaction de rétro Diels-Alder qui a lieu dans le cycle C des Δ^{12}-oléanènes dans le cas où le système C/D/E présente un groupement hydroxyle supplémentaire par rapport au motif C/D/E des triterpènes décrits précédemment (16 Da de plus en comparaison du fragment à *m/z* 262). Il se trouve que ce groupement hydroxyle est également placé sur une position non acétylable (19α ; Schnell et *al.*, 2014), ce qui explique

la perte d'une molécule d'H_2O conduisant à l'ion *c'* à *m/z* 260 (Figure 4.14). Enfin, la perte du groupement carbométhoxy conduit immanquablement au fragment de base à *m/z* 201 (ion *c''*). Au vu des masses moléculaires déterminées par CI ($[M+H]^+$ = 485 et 529), nous en avons déduit la présence respective de l'acide 19α-hydroxy-3-oxo-oléan-12-en-28-oïque (ou acide 3-oxo-siarésinolique, **T16**) et de l'acide 3β,19α-dihydroxy-oléan-12-en-28-oïque (ou acide siarésinolique, **T14**). Les données MS décrites dans la littérature relatives à ces derniers (Jakupovic et *al.*, 1988), semblables aux nôtres (Figure 4.15), viennent confirmer ce travail d'identification.

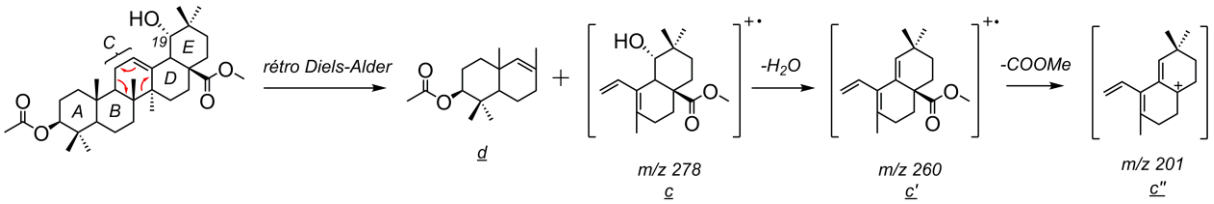


FIG. 4.14 Mécanisme réactionnel de type rétro Diels-Alder à l'origine des fragments *m/z* 201, 260 et 278 typiques des dérivés de l'acide siarésinolique (**T14**).

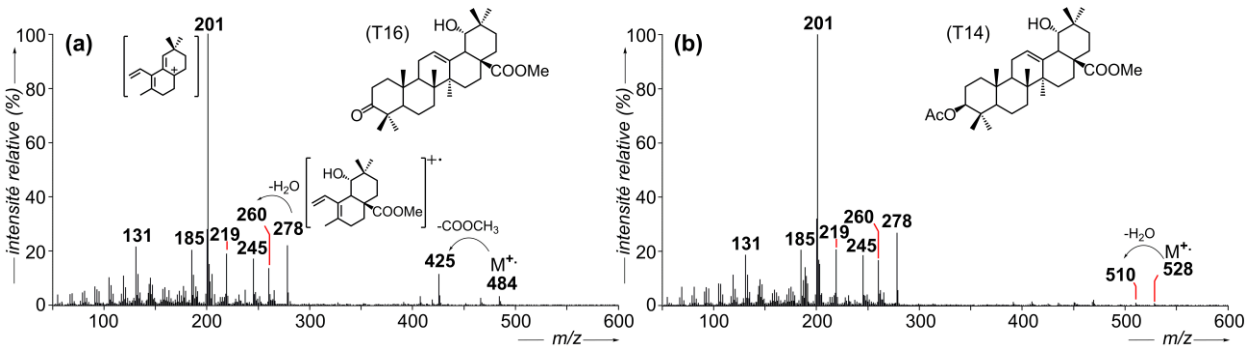


FIG. 4.15 Spectres de masse (**a**) de l'acide 3-oxo-siarésinolique **T16** et (**b**) de l'acide siarésinolique **T14**. Les fonctions acides sont analysées sous forme d'esters méthyliques et les fonctions alcools sous forme d'acétate lorsqu'elles sont acétylables (EI, 70 eV).

L'analyse par GC-MS de chacune des résines de *S. officinalis*, *S. paralleloneurum* et *S. tonkinensis* a donc révélé la présence de dérivés de l'acide oléanolique possédant une fonction oxygénée (alcool ou cétone) en position C-6 (**T17**, **T26** et **T15**, Figure 4.11). Ce résultat s'avère être cohérent avec l'étude de Wang et *al.* (2006a) qui ont identifié les composés **T15** et **T17** au sein d'une des résines asiatiques de styrax, à savoir *S. tonkinensis*. En revanche, il s'agit de la première attestation, à notre connaissance, de l'acide sumarésinolique **T15** et de ses dérivés dans le cas des résines de *S. paralleloneurum* et *S. officinalis*. En plus de contenir

ces composés, la résine de *S. tonkinensis* se distingue par la présence des dérivés de l'acide oléanolique portant une fonction alcool en C-19 (**T16** et **T14**, Figure 4.11), tel que cela est mentionné dans la littérature (Wang et *al.*, 2006a), ce qui pourrait, selon nous, constituer un critère moléculaire supplémentaire pour la caractérisation de cette résine.

L'acide siarésinolique (**T14**) et l'acide sumarésinolique (**T15**) ne sont pas nécessairement spécifiques au genre *Styrax* puisque ce derniers ont été identifiés dans de nombreux genres de plantes différents, que ce soit sous forme libre ou sous forme de saponines (*e.g.*, Ouyang et *al.*, 1997, Cunha et *al.*, 2003, Garcez et *al.*, 2003, Rauter et *al.*, 2007, Estrada et *al.*, 2012, de Oliveira et *al.*, 2015b). Toutefois, considérant les données de la littérature, rares sont les plantes à contenir à la fois ces triterpénoïdes et leurs dérivés ainsi que les esters d'acides cinnamique et benzoïque. Nous noterons, à ce propos, que l'acide 3-oxo-sumarésinolique (**T17**) a été mentionné dans le cadre d'études concernant les cônes de *L. styraciflua* (Fukuda et *al.*, 2005, 2006) et que, de même, les composés **T15** et **T17** ont été répertoriés dans un baume de Tolu commercial (Wahlberg et *al.*, 1971, Wahlberg et Enzell, 1971). Avant de se prononcer au sujet de ces composés triterpéniques pouvant être des biomarqueurs chimiotaxonomiques spécifiquement liés aux résines de *Styrax*, il apparaît donc nécessaire que soient engagées des recherches complémentaires concernant les triterpènes présents au sein des résines de *Liquidambar* et de *Myroxylon* puisque ces dernières renferment, elles aussi, une large variété d'esters de type cinnamate et benzoate.

Enfin, les composés **T27** et **T28**, détectés en fin d'analyse de la résine 2982 et dont les structures n'ont pas été clairement établies, semblent fortement analogues au motif triterpénique décrit par Yayla et *al.* (2002) lors de leur étude sur les saponines contenues dans les fruits de *S. officinalis*. Il est par ailleurs intéressant de noter que l'hydrolyse de la fraction polaire de la résine 2982, obtenue après fractionnement de l'extrait lipidique (cf. § 7.1.2.d), a permis de libérer, en quantité importante, ces mêmes triterpènes polyfonctionnalisés au niveau des cycles D et E, correspondant vraisemblablement à la partie aglycone des saponines, le composé **T27** constituant alors le composé largement majoritaire de l'hydrolysat.

4.3.3. Examen moléculaire des parties aériennes de S. officinalis

A la différence des deux résines de *S. officinalis* 2982 et 3020, les composés phénoliques semblent être totalement absents des parties aériennes de la plante qui ont été prélevées au Jardin Botanique de Strasbourg. En effet, les profils chromatographiques correspondant aux extraits lipidiques de l'écorce, des feuilles et des fruits de *S. officinalis* (Figure 4.16), largement dominés par de nombreux sucres, montrent en outre la présence d'acides gras, de *n*-alcanes et de phytostérols, tous en faible quantité et ubiquistes dans les extraits de plantes.

Les fruits contiennent une forte teneur en benzofuranes parmi lesquels nous avons détecté l'égonol (**B1**), l'homoégonol (**B2**), le butanoate d'égonol (**B3**), le méthylbutanoate d'égonol (**B4**), le méthylbutanoate d'homoégonol (**B5**), un dérivé d'égonol de structure non déterminée (**B6**) et le benzoate d'égonol (**B7**). Seuls les composés **B1** et **B2** se retrouvent également au sein de l'écorce, comme cela a été observé lors de précédentes études (Akgul et Anil, 2003, Pauletti et *al.*, 2006). L'analyse de l'écorce a également révélé la présence de la styraxine (**L2**). Comme cela a été discuté précédemment, l'égonol et l'homoégonol peuvent être considérés comme des marqueurs chimiotaxonomiques du genre *Styrax*, et la styraxine comme un biomarqueur spécifique de l'espèce *S. officinalis*, ce qui en fait de véritables outils moléculaires dans le cadre de caractérisation moléculaire de matériel végétal.

A l'exception des acides oléanolique (**T13**) et ursolique (**T25**), aucun autre triterpène constitutif des résines 2982 et 3020 de *S. officinalis* n'a pu être identifié. Ce résultat nous permet de proposer que les dérivés de l'acide oléanolique oxygénés en C-6 ou C-19 puissent être une signature moléculaire spécifique des résines. En revanche, nous y avons reconnu la bétuline (**T12**), l'érythrodiol (**T22**), l'aldéhyde oléanolique (**T29**) et l'acide bétulinique (**T30**), des triterpènes fréquemment identifiés chez les angiospermes.

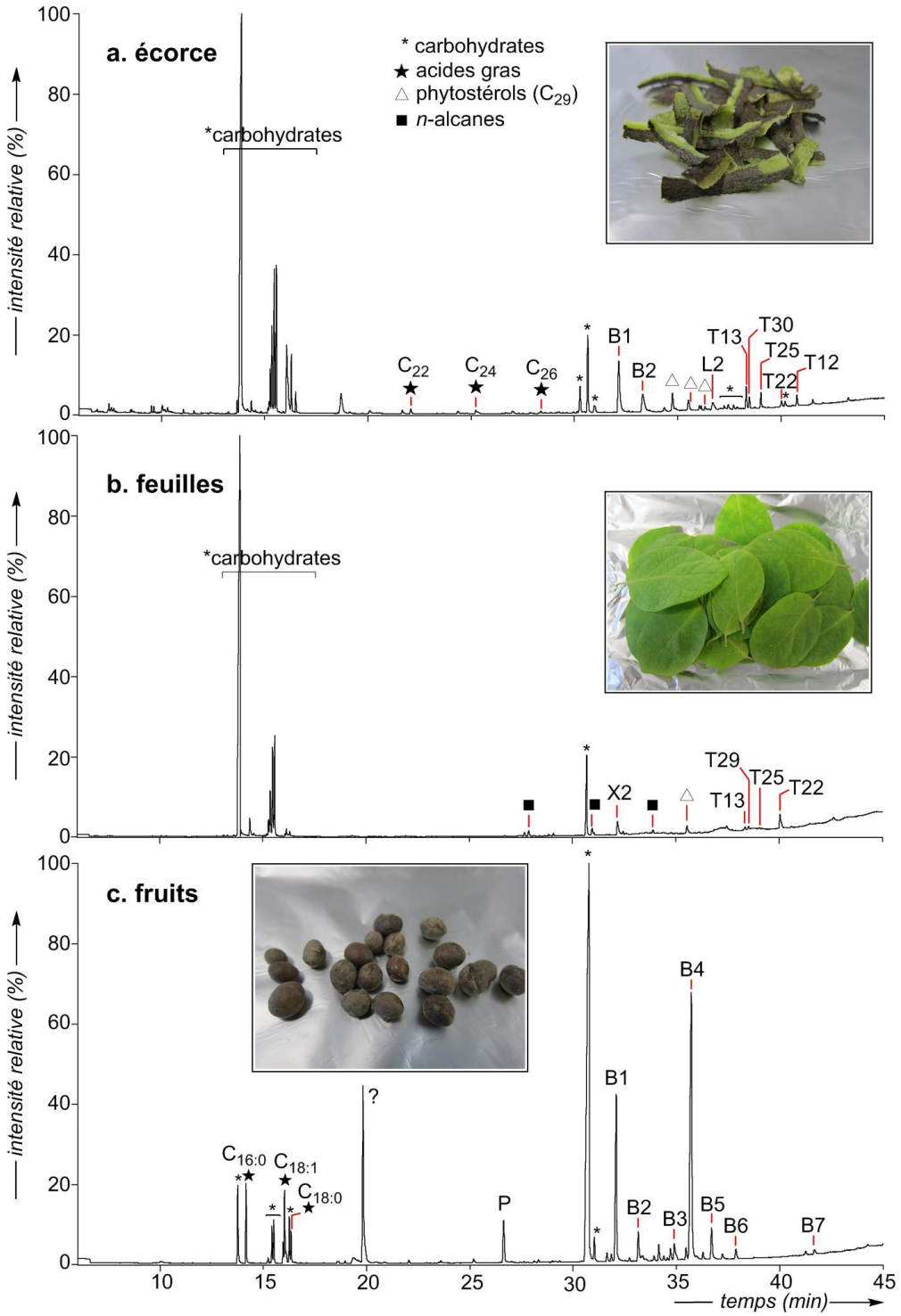


FIG. 4.16 Chromatogrammes en phase gazeuse du contenu lipidique apolaire extrait (**a**) de l'écorce, (**b**) des feuilles ainsi que (**c**) des fruits prélevés sur l'arbuste de *S. officinalis* du Jardin Botanique de Strasbourg. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides sous forme d'esters méthyliques (programme de température B ; **X2** : α-tocophérol, cf. appendice ; P : pollution).

4.4. Etude des résines de *Liquidambar*

4.4.1. Les Hamamelidaceae

La famille des *Hamamelidaceae* est organisée en 30 genres, dont le genre *Liquidambar*, et comprend plus de 100 espèces (Zhou et *al.*, 2001) qui se répartissent principalement entre la côte sud-ouest de la Turquie, en Anatolie (*L. orientalis*), aux Etats-Unis et en Amérique centrale (*L. styraciflua*) et en Asie avec l'espèce *L. altingiana* présente en Indonésie, en Chine et en Australie (Figure 4.3 ; Langenheim, 2003, Hovaneissian et *al.*, 2006).

La résine de liquidambar est une sécrétion pathologique de la plante, tout comme dans le cas des résines de styrax. Suite à une blessure, l'arbre produit un liquide épais et visqueux tel du miel, de couleur orangée et aux odeurs de vanille (Amigues, 2007). Cette résine, à la différence des résines de styrax, ne deviendra jamais solide, comme le suggère le nom même de la résine « liquidambar » qui provient de l'association du mot latin « *liquidus* » (= liquide) et du mot arabe « *ambar* » qui signifie « ambre ». Par conséquent, ce suc résineux n'est pas utilisé dans le cadre de fumigations mais l'est, en revanche, pour son parfum ou ses propriétés thérapeutiques puisqu'il sert notamment à la cicatrisation des plaies et au traitement des infections respiratoires (Amigues, 2007).

Les travaux de recherche visant à connaître la composition moléculaire de ces gommes-résines se sont principalement intéressés aux espèces *L. orientalis* et *L. styraciflua*. Concernant la première, rencontrée dans le commerce sous l'appellation de « gomme -ou storax- de Turquie », les analyses ont mis en évidence la présence de sesquiterpènes (α-pinène et β-caryophyllène notamment ; Acar et Anil, 1991, Fernandez et *al.*, 2005) et de dérivés aromatiques, parmi lesquels sont répertoriés le cinnamate de cinnamyle (**P20**, cf. annexe) et le cinnamate de 3-phénylpropanyle (**P30**), en tant que produits majeurs, et l'acide benzoïque (**P1**), l'acide cinnamique (**P2**), le benzoate de benzyle (**P9**), le cinnamate de benzyle (**P21**), le cinnamaldéhyde (**P25**), l'alcool cinnamique (**P28**) et le 3-phénylpropanol (**P42**) en tant que produits mineurs (Acar et Anil, 1991, Hafizoğlu et *al.*, 1996, Pastorova et *al.*, 1998, Hovaneissian et *al.*, 2008). Enfin, la composition triterpénique de cette résine se limite à la présence des acides oléanonique (**T24**) et 3-épi-oléanolique (**T31**), la stéréochimie 3-α(OH) de ce dernier étant pour le moins peu commune dans la nature (Huneck, 1963, Pastorova et *al.*, 1998).

La chimie des lipides du matériel végétal issu de *L. styraciflua* n'a pas fait l'objet d'études très exhaustives. Dans le cadre de travaux de recherche visant à identifier et caractériser de nouveaux composés présentant une activité cytotoxique envers diverses cellules cancéreuses notamment, la distribution en triterpènes des cônes de *L. styraciflua* a été étudiée, conduisant à l'identification de triterpènes, en quantités mineures (<3 % de l'extrait organique total), en série lupane et oléanane, parmi lesquels l'acide 6β-hydroxy-3-oxo-oléan-12-en-28-oïque (**T17** ; Sakai et *al.*, 2004, Fukuda et *al.*, 2006, Sun et *al*., 2008) que nous avons identifié précédemment au sein des résines de styrax. Par ailleurs, Fernandez et *al.* (2005) y décrivent la distribution moléculaire en composés de faible poids moléculaire et volatils (*e.g*., styrène, α-pinène, β-caryophyllène), qui, selon le protocole analytique employé peuvent ne pas être détectés (perte en cas d'évaporation).

Il est toutefois important de préciser que ces résines de liquidambar, dont certaines sont disponibles dans le commerce, se trouvent être fréquemment adultérées par ajout d'autres substances moins rares et moins coûteuses, telles que de la résine de dammar ou du mastic, comme en témoigne la présence de certains biomarqueurs triterpéniques spécifiques de ces substances végétales issues de *Dipterocarpaceae* (Hovaneissian et *al.*, 2008) et du genre *Pistacia* (Modugno et *al*., 2006b). Ce phénomène tient au fait que les résines de liquidambar sont extrêmement rares. En effet, alors que dans les années 1970, la région turque de l'Anatolie produisait près de 70 tonnes de gomme par an, dont la plupart était exportée en Europe et en Russie (Igolen, 1972), ce chiffre diminua drastiquement pour n'atteindre qu'une tonne au début des années 2000 du fait de la diminution des forêts de *L. orientalis* imputable à la surexploitation par l'homme (Öztürk et *al.*, 2008). Cette réduction importante de la production de résine a contraint les autorités turques à ajouter cette résine à la liste des produits prohibés à l'exportation (décret relatif au régime d'exportation de la Turquie du 22 décembre 1995 ; Amigues, 2007). Par conséquent, nous pouvons nous interroger sur l'authenticité des résines de *L. orientalis* actuellement mises en vente, notamment via des sites internet. A ce titre, nous avons analysé plusieurs échantillons commerciaux vendus sous l'appellation « Storax de Turquie » (pour désigner une « résine de *L. orientalis* » ou, à tort, une « résine de *S. officinalis* ») et les résultats de nos analyses ont montré la présence, dans un cas, de sesquiterpènes (α-cédrène, thujopsène α-himachalène, cuparène et cédrol, en proportions curieusement similaires à celle observée dans le cadre d'une étude de Cèdre du Texas réalisée au laboratoire ; résultats non publiés) et, dans d'autres, de triterpènes

spécifiques à la résine de dammar (acide dammarénolique, par exemple, cf. § 1.2.1) ou de diterpènes caractéristiques de résines de conifère (acides abiétique et pimarique et leurs dérivés, cf. § 1.2.2), indiquant sans ambiguïté que nous sommes là en présence de matériel non authentique, adultéré au moyen de substances végétales plus ordinaires et donc moins onéreuses.

4.4.2. Etude moléculaire des résines de Liquidambar utilisées par les parfumeurs

A l'opposé des résines de styrax décrites précédemment, la diversité moléculaire observée dans le cas des deux résines de liquidambar étudiées est relativement limitée. Les profils chromatographiques correspondants aux fractions apolaires des gommes de *L. orientalis* (ou gomme de Turquie) et *L. styraciflua* (ou gomme du Honduras, Figure 4.17) montrent de très fortes similitudes et se distinguent des résines de styrax par la prédominance du cinnamate de 3-phénylpropanyle (**P30**) et du cinnamate de cinnamyle (**P20**). Ainsi, bien que le composé **P30** soit présent à l'état de traces au sein de résines de styrax (cf. § 4.3.2), la distribution moléculaire en faveur des phénylpropanoïdes **P20** et **P30** reste incontestablement associée aux résines de liquidambar en ce qui concerne des résines fraîchement collectées.

Parmi les composés minoritaires, nous avons, par ailleurs, noté l'existence de l'acide cinnamique (**P2**), du cinnamate de benzyle (**P21**), du cinnamate de *p*-coumaryle (**P22**), de l'alcool cinnamique (**P28**) et du 3-phénylpropanol (**P42**). Quelques composés additionnels ont été identifiés exclusivement dans la résine du liquidambar d'Amérique Centrale: il s'agit de l'alcool *p*-coumarylique (**P39**), du benzoate de cinnamyle (**P19**) et d'un composé pour lequel nous proposons qu'il s'agisse du cinnamate de 3-(4-hydroxyphényl)-propyle (**P41**) au vu de son spectre de masse. Finalement, à quelques exceptions près -le benzoate de benzyle (**P9**) que nous n'avons pu identifier au sein de nos résines de liquidambar par exemple-, la distribution des cinnamates et benzoates que nous venons de décrire vient confirmer les précédentes études réalisées sur les liquidambars (Acar et Anil, 1991, Hafizoğlu et *al.*, 1996, Pastorova et *al.*, 1998, Hovaneissian et *al.*, 2008).

En concentrant les extraits lipidiques issus des résines de storax, il nous a été possible d'étudier les distributions en triterpènes qui s'avèrent être relativement analogues (Figure 4.18). Nous noterons, à cet égard, la présence de dérivés d'acides oléanolique et ursolique, reconnaissables à leurs fragments majeurs caractéristiques *m/z* 203 et 262, parmi lesquels

nous citerons, pour la version oléanane, l'acide oléanonique (**T24**), l'acide 3-épi-oléanolique (**T31**), l'acide oléanolique (**T13**) et l'acide maslinique (**T23**) et, pour les dérivés de type ursane, l'acide ursonique (**T32**) accompagné de l'acide 3-épi-ursolique (**T33**). Parmi ces derniers, l'acide oléanonique constitue de loin l'entité triterpénique majoritaire des deux gommes. Fait remarquable au sein de ces deux résines de *Liquidambar*, nous y avons noté la présence de l'acide 3-oxo-sumarésinolique (**T17**)**,** comme l'avaient fait avant nous plusieurs chercheurs lors de l'étude moléculaire des cônes de *L. styraciflua* (Sakai et *al.*, 2004, Fukuda et *al.*, 2006, Sun et *al.*, 2008). Il s'agit d'un des trois dérivés de l'acide oléanolique, avec ses homologues **T15** et **T26,** présentant une fonction oxygénée en position C-6 et identifié au sein des résines de styrax étudiées (cf. § 4.3.2) dont nous cherchons justement à évaluer le potentiel chimiotaxonomique.

Les analyses en GC-MS montrent également la présence de composés de la série de l'oléanane présentant une fonction aldéhyde en C-28 (fragment *m/z* 232 au lieu de *m/z* 262) tel qu'observé dans le cas de l'aldéhyde oléanonique (**T29**) et de l'aldéhyde oléanolique (**T34**). Enfin, des dérivés de lupane, se caractérisant par leur fragment de base à *m/z* 189, ont été identifiés parmi lesquels le lupéol (**T8**) et l'acide 6β-hydroxy-3-oxo-lup-20(29)-en-28-oïque (**T35**), ce dernier triterpène ayant été précédemment identifié dans les cônes de *L. styraciflua* (Sakai et *al.*, 2004, Fukuda et *al.*, 2006).

De cette description concernant la composition en triterpénoïdes des gommes de *L. orientalis* et *L. styraciflua*, il nous faut donc en retenir (1) l'absence de la série complète des composés dérivant de l'acide oléanolique possédant une fonction oxygénée en position C-6, seul le composé **T17** ayant été détecté, (2) la prédominance de l'acide oléanonique **T24** et (3) la présence, certes en quantité très modeste, des acides oléanolique et ursolique présentant une stéréochimie atypique en C-3 (*i.e.*, 3α-OH). En résumé, en comparant le profil des triterpènes avec celui observé dans le cadre de l'étude moléculaire des résines de styrax (cf. § 4.3.2), nous pouvons affirmer que les distributions en triterpènes sont clairement distinctes, permettant ainsi de proposer des critères moléculaires d'ordre chimiotaxonomique en vue de la caractérisation d'exsudats provenant de l'une ou de l'autre source végétale.

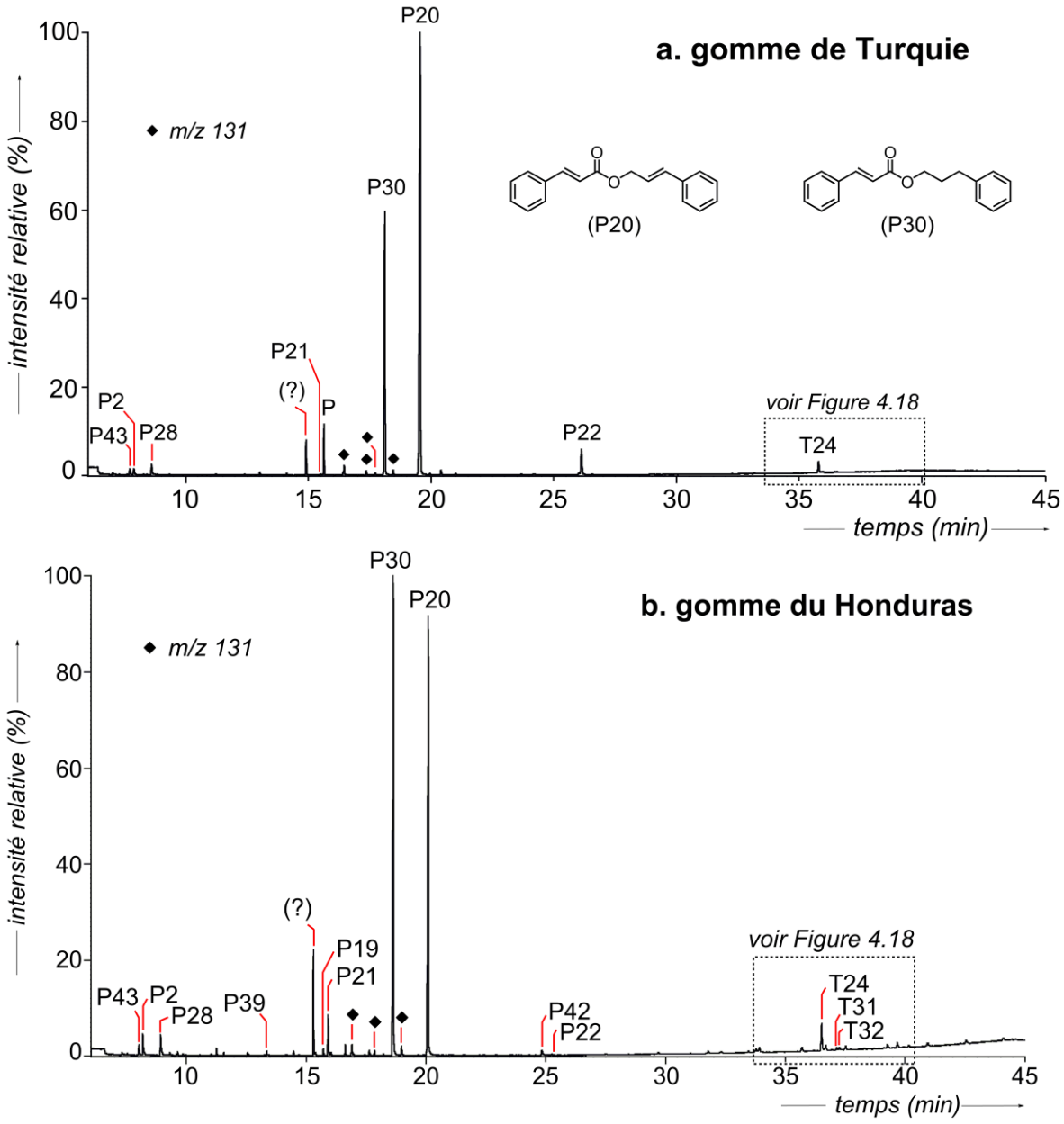


FIG. 4.17 Chromatogrammes en phase gazeuse du contenu lipidique apolaire de la gomme (**a**) de *L. orientalis* (gomme du parfumeur ROBERTET) et (**b**) de *L. styraciflua* (ROBERTET). Les cinnamates (pic de base à *m/z* 131) dont la structure moléculaire n'a pu être déterminée sont désignés par des losanges pleins (programme de température C). Les composés comportant des fonctions acides et alcools sont analysés respectivement sous forme d'esters méthyliques et d'acétates. (?) : Produit de dégradation de **P20** formé lors de l'injection en GC-MS (injecteur PTV).

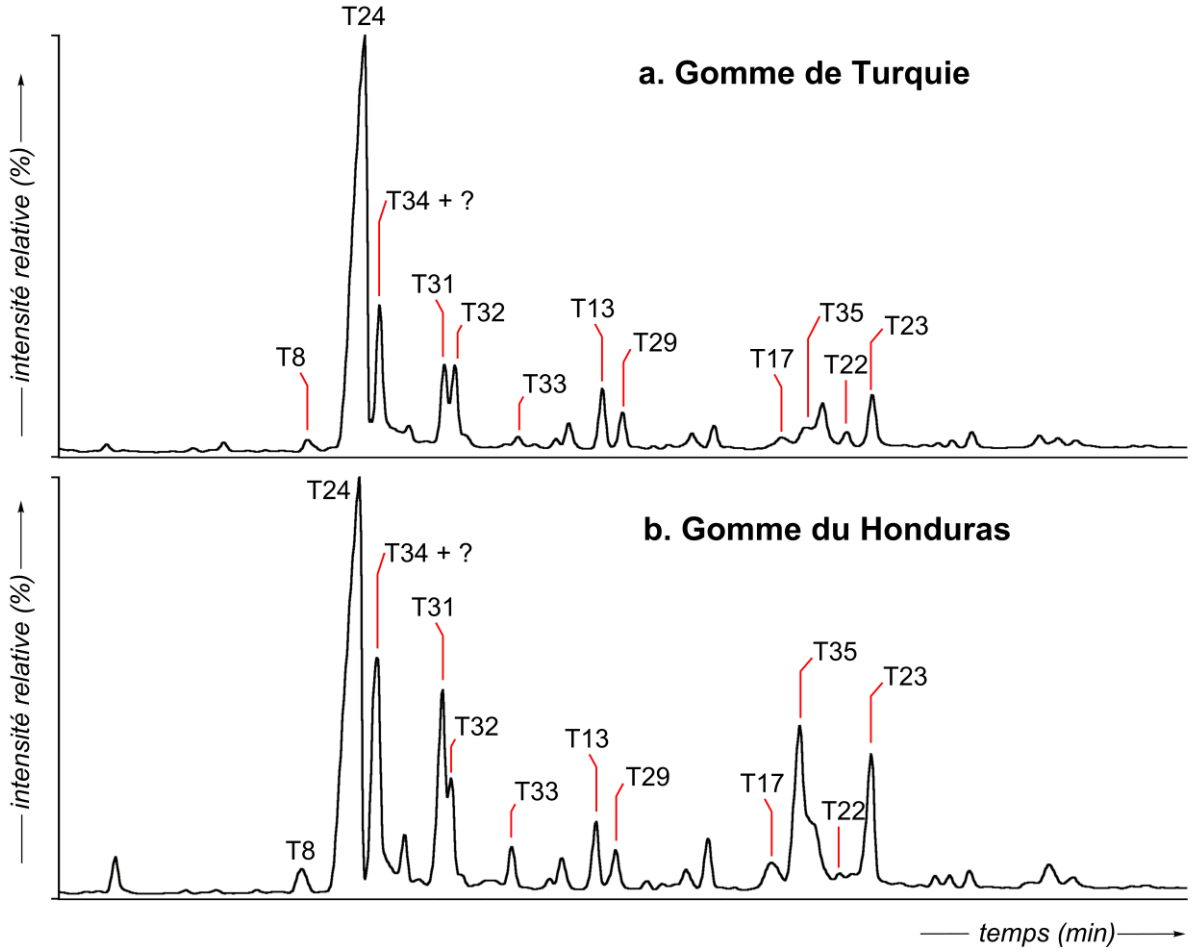


FIG. 4.18 Chromatogrammes partiels en phase gazeuse montrant la distribution des triterpènes au sein de la gomme (**a**) de *L. orientalis* (gomme du parfumeur ROBERTET) et (**b**) de *L. styraciflua* (ROBERTET). Les composés comportant des fonctions acides et alcools sont analysés respectivement sous forme d'esters méthyliques et d'acétates.

4.5. Le cas « litigieux » des baumes de *Myroxylon*

Si la présence simultanée de dérivés de l'acide oléanolique possédant une fonction oxygénée en C-6 (composés **T15**, **T17** et **T26**) et des esters d'acides cinnamique et benzoïque semble être une particularité intrinsèque aux résines de styrax, les travaux publiés par Walhberg et Enzell (1971) et Wahlberg et *al.* (1971) au sujet d'un baume de Tolu commercial nous ont fortement interpellés dans la mesure où ces auteurs font part à la fois de la présence d'une série de cinnamates et benzoates et des composés triterpéniques **T15**, **T17** et **T26**. Seulement, comme ces auteurs le mentionnent, l'origine du baume étudié est sujette à caution et la présence concomitante de triterpènes présentant un squelette de type dammarane (cf. § 1.2.1) suggère, en outre, l'adjonction de matériel résinique issu de *Dipterocarpaceae* au

baume commercial prétendument « de Tolu ». Nous avons alors décidé de réexaminer la composition en triterpènes du genre *Myroxylon*. Pour cela, nous avons tenté d'obtenir des échantillons de baumes certifiés, ce qui, au final n'a pas été possible du fait de la rareté de ces produits. Par ailleurs, comme nous mettions considérablement en doute l'authenticité de l'ensemble des baumes de ce genre disponibles commercialement, nous avons préféré baser notre étude moléculaire concernant le genre *Myroxylon* d'après, d'une part, l'analyse d'extraits lipidiques de feuilles et de branches issues des deux principales variétés (*M. balsamum var. pereirae* et *M. balsamum var. balsamum*) obtenues *via* le jardin botanique de Meise (Belgique ; Tableau 4.1) et de résines historiques du Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris), d'autre part.

4.5.1. Données de la littérature se rapportant au genre Myroxylon

Au même titre que les résines de styrax et de liquidambar, le baume de Tolu et celui du Pérou sont intégrés dans la catégorie des « vrais » baumes (Custódio et Veiga-Junior, 2012). Ces baumes correspondent à la sécrétion pathologique produite par les arbres appartenant au genre *Myroxylon*, de la famille des *Fabaceae* (ou *Leguminosae*), dont l'origine du nom est grecque (« μύρον » : parfum liquide, essence parfumée, huile, « ξύλον » : bois, dictionnaire d'A. Bailly, 1901). Si le baume de Tolu peut être associé à l'espèce *Myroxylon balsamum* et le baume du Pérou à l'espèce *Myroxylon pereirae*, la ressemblance morphologique est telle que de nombreux botanistes les associent à la même espèce (*Myroxylon balsamum*) qu'ils subdivisent ensuite en deux variétés, *Myroxylon balsamum var. balsamum* et *Myroxylon balsamum var. pereirae* (Figure 4.19), réputées, en revanche, produire deux résines bien distinctes (Langenheim, 2003). Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous avons opté pour cette dernière classification qui est, par ailleurs, en usage au Jardin Botanique de Meise dont proviennent les échantillons de feuilles et branches utilisés pour notre étude moléculaire.

A.



B.



FIG. 4.19 *Myroxylon balsamum var. pereirae* (**A**) et *Myroxylon balsamum var. balsamum* (**B**) à partir desquels est obtenu respectivement le baume du Pérou et le baume de Tolu (*source* : **A**. Langenheim, 2003, **B**. Sartori et *al.*, 2015).

La variété *Myroxylon balsamum var. balsamum*, endémique de l'Amérique du Sud (Brésil, Argentine, Colombie, Venezuela ; Langenheim, 2003, Custódio et Veiga-Junior, 2012), produit une sécrétion relativement liquide en réponse à une incision faite dans l'écorce et le phloème[5] (Coppen, 1995). Cet exsudat, aux senteurs rappelant notamment la jacinthe (Langenheim, 2003), est encore utilisé de nos jours par certains peuples autochtones de Colombie pour soigner les plaies et arrêter les saignements (Langenheim, 2003). Le baume de Tolu est également utilisé pour le traitement des bronchites, laryngites, diarrhées, leucorrhées, comme arôme alimentaire ou encore comme agent parfumant dans les produits cosmétiques et d'hygiène (Custódio et Veiga-Junior, 2012).

Quant à la variété *Myroxylon balsamum var. pereirae*, à partir de laquelle est obtenue le baume du Pérou, elle est originaire d'Amérique centrale et plus précisément du sud du Mexique, du Guatemala et de la République du Salvador (Custódio et Veiga-Junior, 2012). La technique employée par les Indiens pour la récolte de la résine consiste à battre le bois de l'arbre pour en décrocher l'écorce. La surface du tronc, ainsi mise à découvert, est alors recouverte de tissus dont le rôle est d'absorber l'exsudat qui en sort. L'écorce peut également être brûlée afin de la ramollir pour, ensuite, la retirer et stimuler ainsi la production de résine

[5]Le phloème est le tissu conducteur de la sève élaborée situé entre l'écorce et le cambium.

(Anderson, 1955, Coppen, 1995). De manière semblable au baume de Tolu, ce baume du Pérou est utilisé dans les traitements de l'asthme, de la cataracte, des rhumatismes et pour soigner les plaies externes (Custódio et Veiga-Junior, 2012).

Les baumes du Pérou et de Tolu ont fait l'objet de très peu d'analyses moléculaires dans la littérature. Ces baumes sont malgré tout connus et utilisés pour leur contenu en esters d'acide cinnamique et d'acide benzoïque. Seo et *al.* (2012) rapportent, à cet égard, la présence du benzoate de benzyle (composé majeur, **P9**), de l'acide benzoïque (**P1**), de l'acide cinnamique (**P2**), du cinnamate de benzyle (**P21**) et de l'alcool benzylique (**P43**) au sein du baume du Pérou. Ils y identifient également la vanilline (**P5**) et le (*E*)-nérolidol (**X3**, cf. appendice). Quant au baume de Tolu, une étude par GC-MS, réalisée à partir d'un baume commercial -non certifié- a montré que ce dernier se composait, pour l'essentiel, d'acides benzoïque et cinnamique libres, de benzoate de benzyle et de cinnamate de benzyle (Harkiss et Linley, 1979). D'autres auteurs se sont intéressés, plus particulièrement, aux multiples flavonoïdes que contient le bois de *M. balsamum* et *M. pereirae* (de Oliveira et *al.*, 1978, Maranduba et *al.*, 1979) ou aux triterpènes de la résine (Wahlberg et Enzell, 1971, Wahlberg et *al.*, 1971). Cependant, comme nous l'avons mentionné en introduction, l'identification de composés présentant le squelette de dammaranes -ces composés étant étroitement associés aux résines issues de *Dipterocarpaceae* (Burger, 2008)-, indique que la résine commerciale sur laquelle cette dernière étude est fondée a été manifestement adultérée par de la résine de dammar, nous amenant donc à reconsidérer la validité des résultats publiés en terme de chimiotaxonomie. Cette adultération des baumes de Tolu et du Pérou, au même titre que celle des résines de styrax et de liquidambar, est un procédé courant pouvant s'opérer au moyen de matériels résiniques variés tels que de la résine de *Pinus* ou des éléments de *Copaifera* (Langenheim, 2003).

4.5.2. Etude moléculaire de « baumes du Pérou et de Tolu » (baumes historiques)

L'étude moléculaire de baumes historiques conservés au Muséum National d'Histoire Naturelle -MNHN- de Paris a concerné un baume dit « du Pérou » et deux baumes dont les étiquettes mentionnent le nom « Baume de Tolu » (Figure 4.20).



FIG. 4.20 Flacons étiquetés comme correspondant à du « baume du Pérou » (à gauche) et « baume de Tolu » (au milieu et à droite) provenant de la collection du Muséum National d'Histoire Naturelle.

L'analyse par GC-MS de la fraction apolaire obtenue à partir du « baume de Tolu » a montré la présence d'esters d'acide cinnamique et benzoïque, parmi lesquels l'acide cinnamique (**P2**, Figure 4.21), le benzoate de benzyle (**P9**), le cinnamate de benzyle (**P21**). Nous notons, par ailleurs, l'absence totale de triterpènes connus et, en particulier, de triterpènes oxygénés en C-6. Cependant, quand bien même les deux échantillons de baume de Tolu ne seraient pas adultérés, le manque de données moléculaires relatives à la composition chimique de la résine de *M. balsamum var. balsamum* ne nous permet pas véritablement, à ce stade, d'en confirmer l'authenticité. Les données moléculaires présentées ici-même constituent donc une première étude qu'il conviendrait d'approfondir.

Quant au « baume du Pérou », outre les dérivés d'acides cinnamique et benzoïque précédemment identifiés au sein du « baume de Tolu » (composés **P2**, **P9** et **P21**), l'empreinte lipidique contient également du cinnamate de cinnamyle (**P20**), l'ensemble de ces observations se révélant être en conformité avec la description faite pour le baume du Pérou par Langenheim (2003). Le « baume du Pérou » se définit également par la présence, non négligeable, du cinnamate de 3-phénylpropanyle (**P30**), composé que l'on retrouve

abondamment dans les résines de *Liquidambar*. Si la présence de ce composé dans le « baume du Pérou » du MNHN évoque les résines de *Liquidambar* précédemment étudiées, l'importance de l'acide oléanonique (**T24**) accompagné de l'acide 3-épi-oléanolique (**T30**) au sein de ce même extrait conforte la possibilité d'une telle origine, nous conduisant donc à mettre en doute la nature de ce baume comme étant du baume du Pérou.

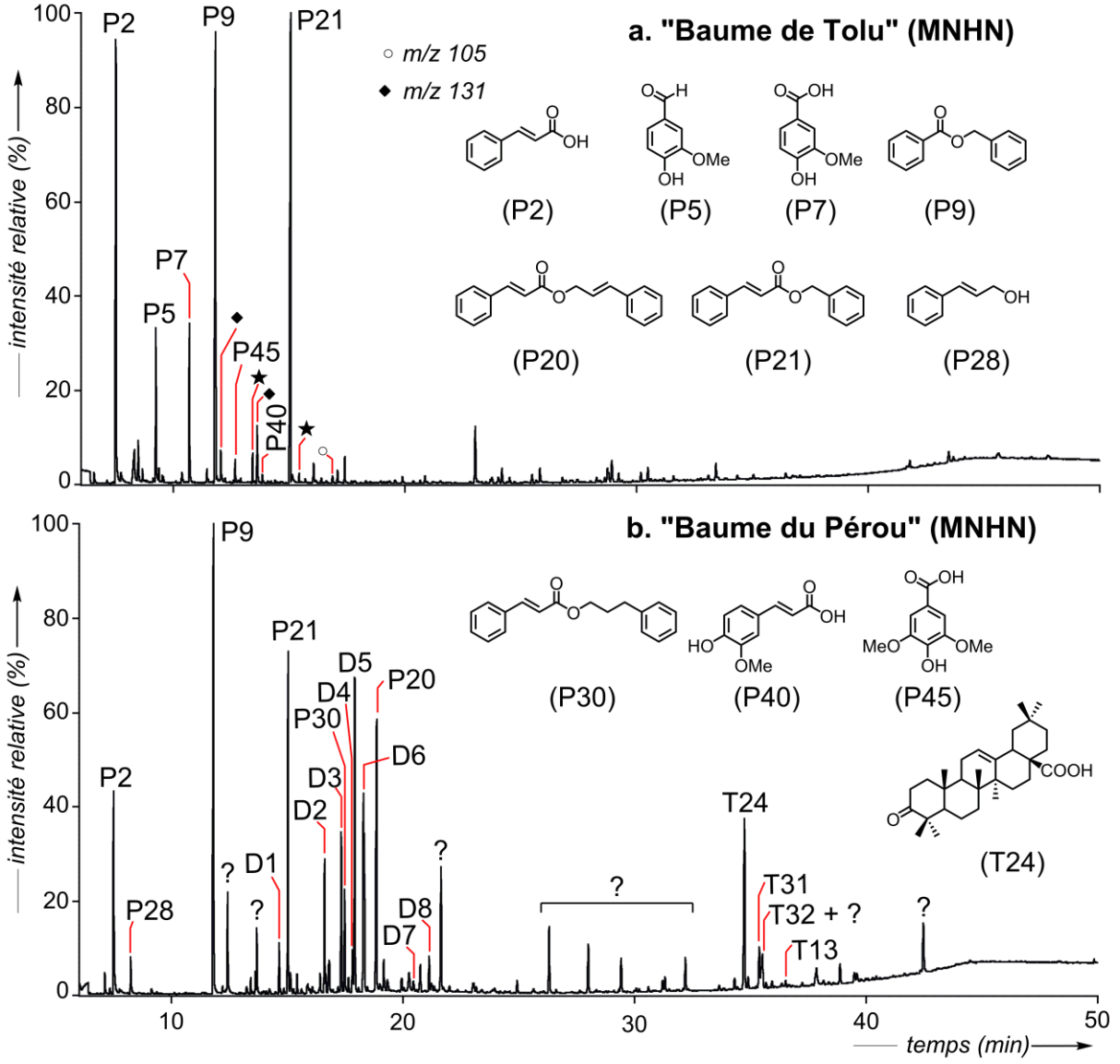


FIG. 4.21 Chromatogrammes en phase gazeuse des résines historiques du (**a**) « baume de Tolu » et (**b**) « baume du Pérou » de la collection botanique du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris. DX: Diterpènes, dont les structures identifiées dans le « baume du Pérou » sont représentées en Figure 4.22. Les composés présentant des fonctions acides et alcools sont analysés respectivement sous forme d'esters méthyliques et d'acétates.

De manière plutôt inattendue, nous y avons également relevé la présence de nombreux diterpènes en quantités notables (composés **D1** à **D8**, Figure 4.22). Or, la plante *M. balsamum var. pereirae*, sécrétrice du baume du Pérou, appartient au groupe phylogénétique des angiospermes dont les résines se caractérisent globalement par leur contenu en triterpènes, à l'inverse des résines de gymnospermes constituées de diterpènes (cf. § 1.2). L'identification de tels composés indique donc clairement que ce « baume du Pérou » a été adultéré par ajout d'une résine diterpénique. Nous pouvons même aller jusqu'à proposer que celle-ci est issue de mélèze du fait de la détection de quelques diterpènes caractéristiques du genre *Larix*, c'est-à-dire le 13-épi-manool (**D1**) et, plus spécifiquement, l'acétate de larixyle (**D6**), présent en tant que tel dans la résine de mélèze mais qui, dans la fraction analysée, peut être issu, en partie, de l'acétylation du larixol (**D6'**) également présent dans cette résine (Mills, 1973, van den Berg et *al.*, 2000, Findeisen et *al.*, 2007). En résumé, l'échantillon de « baume du Pérou » provenant du MNHN semble, en réalité, avoir été créé de toute pièce en mélangeant une résine de *Liquidambar* à un exsudat de mélèze, ce dernier étant également connu sous l'appellation de « térébenthine de Venise ». Il n'est toutefois pas impossible que du matériel résinique véritablement issu de *M. balsamum var. pereirae* ait également été ajouté puisque la distribution en esters d'acides cinnamique et benzoïque, différente tout de même de celle issue des liquidambars, fait apparaître la possibilité d'une troisième composante végétale. Toutefois, nous ne pouvons, à ce stade de l'analyse, en apporter l'évidence.

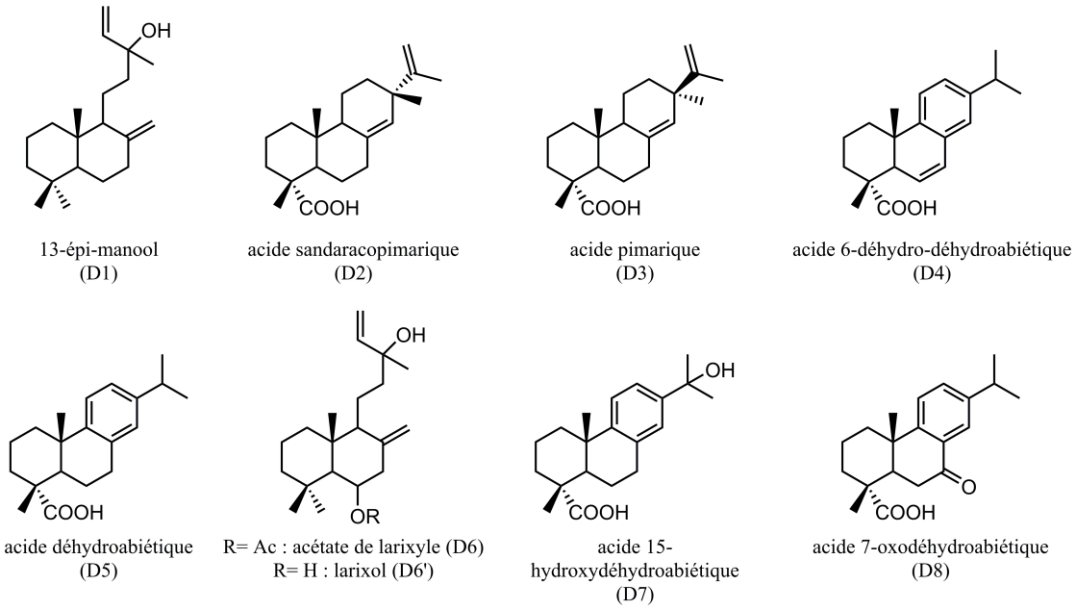


FIG. 4.22 Diterpènes identifiés au sein du « baume du Pérou » du MNHN, indiquant que le matériel est adultéré par une résine issue de gymnospermes (mélèze, vraisemblablement).

Ces résultats, bien que préliminaires, conduisent à mettre en lumière les nombreuses ambiguïtés qui existent autour de la composition chimique des baumes de *Myroxylon* et démontrent ainsi la nécessité de poursuivre ce travail chimiotaxonomique afin d'établir des critères moléculaires fiables pour leur identification. La difficulté pour mener à bien cette recherche restant l'obtention de résines certifiées, ce travail pourra se poursuivre à la seule condition que ce critère essentiel puisse être atteint.

4.5.3. Etude du contenu moléculaire de parties aériennes de Myroxylon (branches et feuilles)

Faute de pouvoir acquérir de la résine fraîchement collectée sur un arbre du genre *Myroxylon,* le Jardin Botanique de Meise (Belgique) nous a gracieusement fait don d'échantillons de feuilles et de branches prélevés sur *M. balsamum var. balsamum* et *M. balsamum var. pereirae*. L'analyse par GC-MS des fractions lipidiques des extraits a conduit à l'obtention de profils chromatographiques relativement similaires entre les branches et entre les feuilles des deux variétés. Les distributions moléculaires observées sont riches en constituants organiques et il n'a pas toujours été aisé de proposer des structures moléculaires, d'autant plus que la littérature est extrêmement peu documentée à ce propos.

L'extrait lipidique provenant des branches des deux variétés botaniques se caractérisent par la présence, en tant que composés majeurs, de sucres (Figure 4.23) et, dans une moindre mesure, de sesquiterpènes, du (*E*)-nérolidol (**X3**, cf. appendice), d'isoflavonoïdes (composés **F1** à **F4**) et de β-sitostérol (**S11**) et stigmastérol (**S13** ; phytostéroïdes), en accord avec des précédentes analyses réalisées au sujet du matériel végétal issu de *Myroxylon* (de Oliveira et *al.*, 1978, Simas et *al.*, 2004, Seo et *al.*, 2012). Quant à la signature en triterpènes, nous avons pu mettre en évidence la présence de β-amyrine (**T6**) et de lupéol (**T8**), composés extrêmement courants parmi les triterpènes d'angiospermes (Phillips et *al.*, 2006), ainsi que de la 11-oxo-β-amyrine (**T36**).

Si ces mêmes composés **T6**, **T8** et **T36** se trouvent également au sein des extraits de feuilles de *Myroxylon*, ces dernières se distinguent, par ailleurs, par une série de triterpènes plus inhabituels parmi lesquels nous avons identifié le composé **T37** et son produit de dégradation (**T38**). En ce qui concerne le composé **T37**, il s'agit d'un dérivé de la β-amyrine

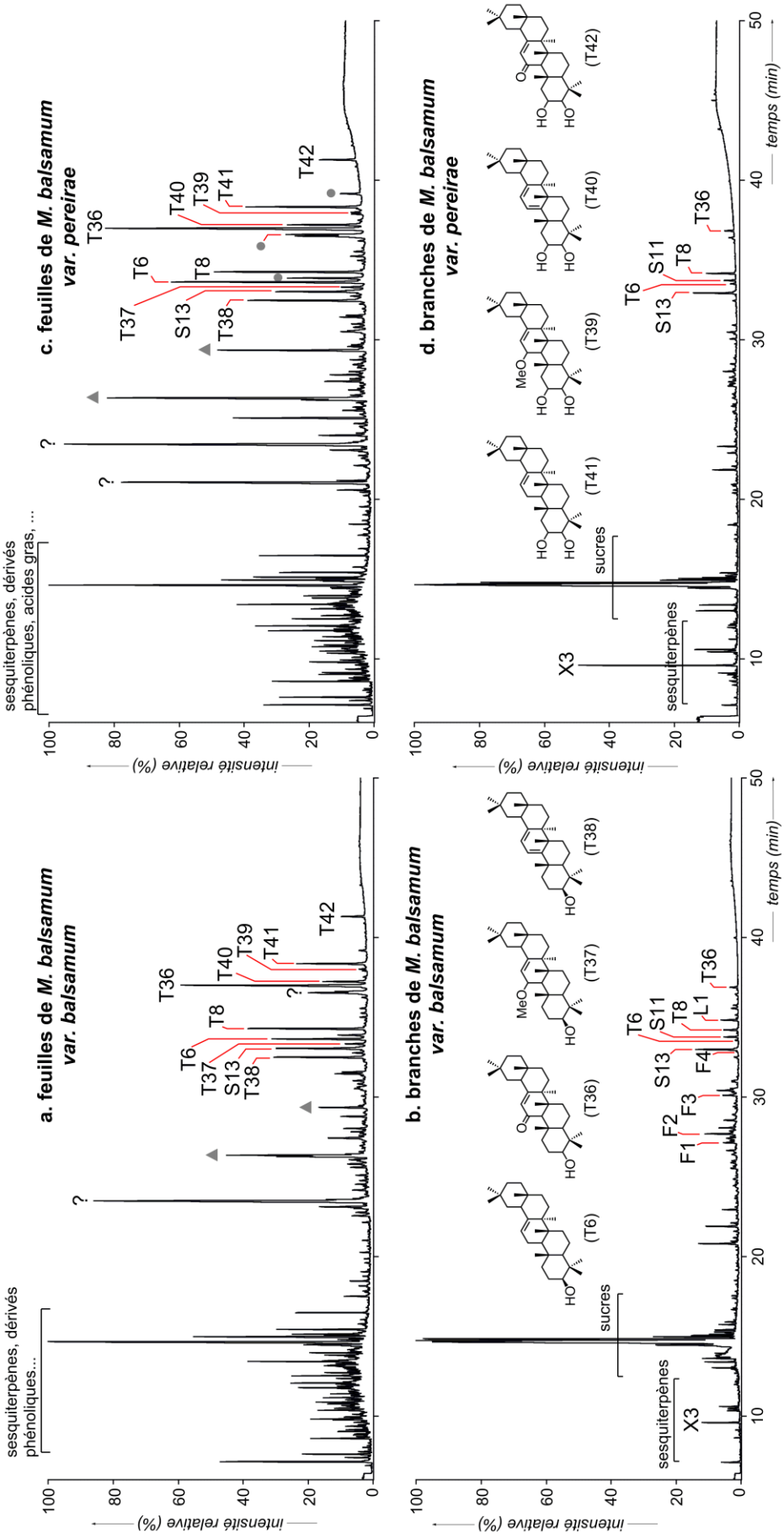


FIG. 4.23 Chromatogrammes en phase gazeuse des extraits lipidiques obtenus à partir d'échantillons de feuilles et de branches de *Myroxylon balsamum var. balsamum* (respectivement **a** et **b**) et de *Myroxylon balsamum var. pereirae* (respectivement **c** et **d**). Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides sous forme d'esters méthyliques (programme de température B).

possédant un groupement méthoxy en C-11 que nous avons pu identifier sur la base des données de MS présentées par Mathias et *al.* (2000 ; Figure 4.24) qui ont été, au demeurant, établies dans le cadre d'une étude moléculaire s'intéressant aux triterpènes des feuilles de *M. balsamum*. D'autre part, une série de triterpènes relativement analogues, mais possédant un groupe hydroxy supplémentaire en C-2 (**T39** à **T42**), a pu être identifiée d'après l'homologie existante entre les spectres de masse de cette série de composés et le spectre de masse du composé **T37** fourni par Mathias et *al*. (2000 ; Figure 4.24). Hormis ces triterpènes atypiques, nous avons constaté, avant tout, l'absence des dérivés de l'acide oléanolique possédant une fonction oxygénée en C-6 (**T15**, **T17** et **T26**). Conscient du fait que la chimie des résines puisse être différente de celle des parties aériennes de la plante sécrétrice, comme l'ont démontré nos analyses de résines et d'éléments végétaux de *S. officinalis*, nous ne pouvons, en l'état de notre étude, certifier que ces triterpènes oxygénés en C-6 ne puissent être présents au sein de résines de *Myroxylon*. Toutefois, aucune recherche actuelle ne fait état de la présence de dérivés d'acides sumarésinolique et siarésinolique au sein de *Myroxylon*, les travaux de Wahlberg et *al.* (1971) mis à part, mais que l'on peut *a priori* exclure dans la mesure où il s'agit sans doute de matériel résinique adultéré comme le suggère la présence de triterpènes spécifiques aux résines de *Dipterocarpaceae*. Il serait donc important de poursuivre cette étude en y incluant l'analyse de résines fraîchement collectées et certifiées par des experts botanistes dès que cela pourra être possible.

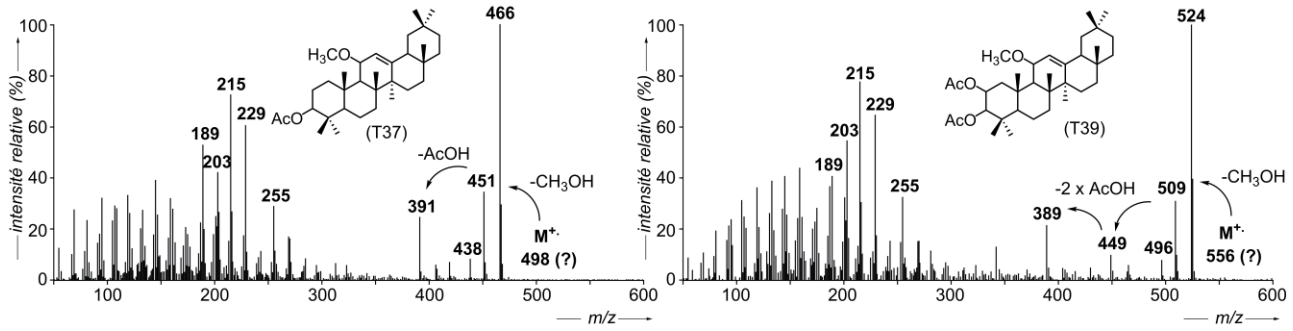


FIG. 4.24 Spectres de masse des composés (**a**) **T37** et (**b**) **T39**. Les fonctions alcools sont analysées sous forme d'acétates (EI, 70 eV).

Partie II: Etude de l'enduit organique du crâne de Nahal Hemar

4.6. De l'usage du « styrax » à travers l'Histoire

L'utilisation de résines aromatiques telles que les résines de styrax ou de storax (liquidambar) est connue par l'intermédiaire de nombreuses sources historiques, et pourtant rares sont les évidences archéologiques ou chimiques qui nous permettent d'en certifier l'usage (Modugno et *al.*, 2006b). C'est d'ailleurs ce qui fait la singularité du crâne de Nahal Hemar, dont l'étude scientifique est présentée dans cette deuxième partie de chapitre, puisqu'il s'agirait d'une des premières attestations chimiques de l'usage de styrax, mais également de la plus ancienne. Attardons-nous tout de même un instant sur les quelques évidences archéologiques qui témoignent de l'usage du styrax, tout particulièrement au cours de l'Antiquité.

4.6.1. Propriétés thérapeutiques du « styrax »

Des tablettes cunéiformes, dont certaines datées du VII^{ème} siècle av. J.-C., mais qui sont en réalité des copies de textes plus anciens, comportent des textes médicaux expliquant de quelle manière les médecins Akkadiens traitaient le rhume et la constipation au moyen de la gomme de styrax (Fossey, 1945).

> *« Si un homme souffre d'un rhume, tu pileras de la gomme-résine de styrax dans de la bière fine, du miel et de l'huile raffinée. »*
>
> *« Tu tritureras de la gomme résine de styrax dans de l'huile raffinée ; tu tireras sa langue ; il boira et vomira. »* (Fossey, 1945)

Les égyptiens avaient également connaissance de la résine de styrax (ou storax) qu'ils nommaient « *nénib*[6] », comme l'attestent quelques représentations où figure la résine parmi les onguents représentés sur les scènes d'offrandes (laboratoire du temple d'Edfou ; Chermette et Goyon, 1996), tout comme l'analyse chimique d'un échantillon de résine datée de la XII^{ème}-XIII^{ème} Dynastie (soit le II^{ème} millénaire av. J.-C. environ, Goyon et *al.*, 1999) et un fragment de bois mis au jour dans la tombe de Toutânkhamon (assimilé au genre *Liquidambar* ; Serpico et White, 2000, Modugno et *al*., 2006b). Les embaumeurs égyptiens avaient donc probablement recours à cette résine lorsqu'ils préparaient des corps pour la vie

[6]Sur les parois du laboratoire d'Edfou (période tardive ; Chermette et Goyon, 1996), le terme « *nénib* » se trouve inscrit de la manière suivante :



dans l'Au-delà afin, notamment, d'éviter leur putréfaction. Des analyses chimiques de substances d'embaumement ont effectivement suggéré l'utilisation de styrax (ou storax) sur des momies égyptiennes non datées (Lucas, 1930), et il semblerait que les Carthaginois firent de même avec leurs morts (Reutter, 1918). L'utilisation de styrax (ou storax) dans le cadre de rituels d'embaumement peut s'expliquer par les propriétés antiseptiques et antifongiques des esters cinnamiques et benzoïques qui sont des constituants majeurs de ces résines. Plus tard, en Amérique du Sud, les Incas mirent à profit ces mêmes propriétés en utilisant pour la momification les baumes du Pérou et de Tolu connus, eux aussi, pour leur forte concentration en esters aromatiques (Reutter, 1915, 1918). Toutefois, nous regrettons de ne pas avoir accès aux résultats détaillés de ces différents travaux analytiques, cités ci-dessus, afin de confirmer ces résultats.

A la lecture des écrits grecs et romains qui nous sont parvenus, il apparaît que quelques auteurs mentionnent la résine de « styrax », parmi lesquels l'historien grec Hérodote (V^{ème} siècle av. J.-C.) et le naturaliste romain Pline l'Ancien (I^{er} siècle ap. J.-C.) dont voici les propos :

> *« Ils [les Arabes] recueillent l'encens en faisant brûler du styrax, une gomme dont les Phéniciens font le commerce avec la Grèce, car les arbres qui donnent l'encens sont gardés par des serpents ailés, petits et de couleurs diverses (ceux-là même qui envahissent l'Egypte), massés nombreux autour de chaque arbre ; rien ne peut les en écarter, sinon la fumée du styrax. »* (Hérodote, *L'Enquête*, livre III, 107)

> *« La portion de la Syrie limitrophe de la Judée, et située au-dessus de la Phénicie, produit le styrax (styrax officinale, L.) autour de Gabala, de Marathus et de Casius, montagne de la Séleucie. L'arbre porte le même nom ; il ressemble au cognassier. Il donne un suc âpre, mais laissant un goût agréable. A l'intérieur il est semblable à un roseau, et rempli de jus. Vers le lever de la Canicule, des vermisseaux ailés y volent et le rongent, vermoulure qui en salit le sue. Après le styrax de Syrie on vante celui de Pisidie, de Sidon, de Chypre, de Cilicie; celui de Crète n'est pas estimé. Celui du mont Aman en Syrie est employé par les médecins, et encore plus par les parfumeurs. »* (Pline l'Ancien, *Histoire naturelle*, livre XII)

Cet usage thérapeutique apparaît également dans les prescriptions du médecin grec Hippocrate, à partir du V^{ème} siècle av. J.-C., et notamment dans son traité de gynécologie intitulé « Traité des maladies de femmes » dont en voici quelques extraits :

> *« Quand les règles ne se déclarent point, on pile du styrax et du pouliot [7]; on y mêle de la graisse d'oie pour en former un pessaire. […]. Autre pessaire pour purger la matrice, dans le cas où les règles ne se montrent point. Pilez du styrax et de l'origan, incorporez avec de la graisse d'oie, et formez un pessaire. […].Quand il survient des douleurs promptes avec des défaillances […] on emploie, de la même manière, du styrax trempé dans un baume. »* (Hippocrate, *Œuvres d'Hippocrate*, volume II)

Enfin, la résine de styrax était utilisée par les civilisations antiques pour ses propriétés antiseptiques, désinfectantes, expectorantes, antibactériennes et antifongiques (Pauletti et *al.*, 2006, Hovaneissian et *al.*, 2008). Le « styrax » servait notamment à traiter les infections chroniques des voies respiratoires comme l'asthme ou la bronchite (Hovaneissian et *al.*, 2008). Les Amérindiens, quant à eux, mâchaient de la résine de *L. styraciflua* afin de se nettoyer et soigner les dents (Langenheim, 2003).

4.6.2. Le « styrax » pour les fumigations et les parfums

De par la présence de nombreux constituants volatils au sein du matériel résinique de type « styrax », la combustion de ce dernier libère un parfum agréable, que certains qualifient de vanillé (Amigues, 2007). Cette propriété odoriférante de la résine a conduit à ce qu'elle soit employée pour les fumigations, liturgiques par exemple, ou la formulation de parfums. Dans la région du Moyen-Orient, il n'était pas possible, selon Amigues (2007), d'utiliser la résine de liquidambar (*L. orientalis*) pour les fumigations du fait de sa consistance particulièrement liquide, et seule la résine solide de styrax (*S. officinalis*) pouvait être, par conséquent, utilisée. L'emploi de résine de styrax comme encens[8] ou pour la formulation d'onguents est attestée en Egypte ancienne par l'intermédiaire de textes gravés sur les parois de temples (Chermette et Goyon, 1996) et grâce à l'analyse par GC-MS du contenu d'un encensoir (Modugno et *al.*, 2006b). Selon Aristote, les fumigations de styrax servaient à repousser les animaux indésirables tels que les insectes (Amigues, 2007). Le benjoin était également, en Chine, associé à des pratiques rituelles afin de repousser les démons et d'établir des connections avec le monde des esprits bienveillants (Andaya, 2002).

Les Européens s'intéressèrent également à ces résines et un commerce s'établit avec l'Indonésie notamment, à partir du XV^{ème} siècle ap. J.-C., comme le démontre la découverte

[7] Le « pouliot », désigné par le terme scientifique *Mentha pulegium*, est une espèce de menthe sauvage de la famille des Lamiacées.
[8] Nous considérons ici le terme « encens » dans son sens général et non comme celui se rapportant à la gomme résinique obtenue à partir des plantes du genre *Boswellia*.

de jarres contenant des résines de styrax dans des épaves datées du XV^{ème}-XVII^{ème} siècle ap. J.C. et mises au jour dans l'Océan Pacifique (Gianno et *al.*, 1990). Aujourd'hui encore, les créateurs de parfums s'approvisionnent en résines de styrax, gommes de liquidambar, baume de Tolu et du Pérou pour leur odeur balsamique (pouvant être associé aux senteurs de chocolat, caramel, vanille, miel, …). Les résines de « styrax » font notamment parties des essences qui composent les parfums aux propriétés olfactives de type oriental tels que « Opium » (Yves Saint Laurent), « Bois des îles » (Chanel) ou « Shalimar » (Guerlain), ce dernier contenant également du baume du Pérou ou, tout du moins, un produit équivalent.

4.7. Contexte archéologique et présentation des échantillons étudiés

4.7.1. Site archéologique de Nahal Hemar

Le site archéologique de Nahal Hemar (« la vallée du bitume » en hébreu) se situe dans le désert de Judée, à 17 km à l'Ouest de la Mer Morte et à 210 mètres en dessous du niveau de la mer (Figure 4.25 ; Bar-Yosef et Alon, 1988). Au cours des années 1950-1960, des bédouins, à la recherche des rouleaux de la Mer Morte, y mirent au jour une grotte, de taille exiguë (environ 4 m × 8 m) et encombrée par d'imposants blocs rocheux. Ce n'est qu'en 1983 que des archéologues, sous la direction d'Ofer Bar-Yosef et de David Alon, redécouvrirent cette grotte et entreprirent de fouiller les 4 couches stratigraphiques du site.

Ce sont les strates 3 (3A et 3B) et 4 qui ont fourni les plus belles découvertes du site, parmi lesquelles un reste de foyer, des cordages, un important matériel lithique (têtes de flèche, lames), des objets élaborés à partir de matériel osseux (de bovins principalement), des récipients enduits d'asphalte, des fragments de filets et de tissus auxquels s'ajoutent un casque, une faucille, du fil de lin, des perles faites de coquillages, des figurines anthropomorphes en os, un masque en calcaire, des pièces de vanneries (nattes, paniers) et, enfin, six crânes humains (Bar-Yosef et Alon, 1988). Nombreux sont les objets, préservés au sein de la cave, qui furent associés à la pratique d'un culte. Au regard des mesures de datation, opérées sur des fragments de charbon et d'artefacts, ainsi que de la typologie du matériel archéologique, les strates 2 à 4 furent attribuées à la période du Néolithique Précéramique B (souvent abrégée « PPNB », 8500-7000 av. J.-C.).

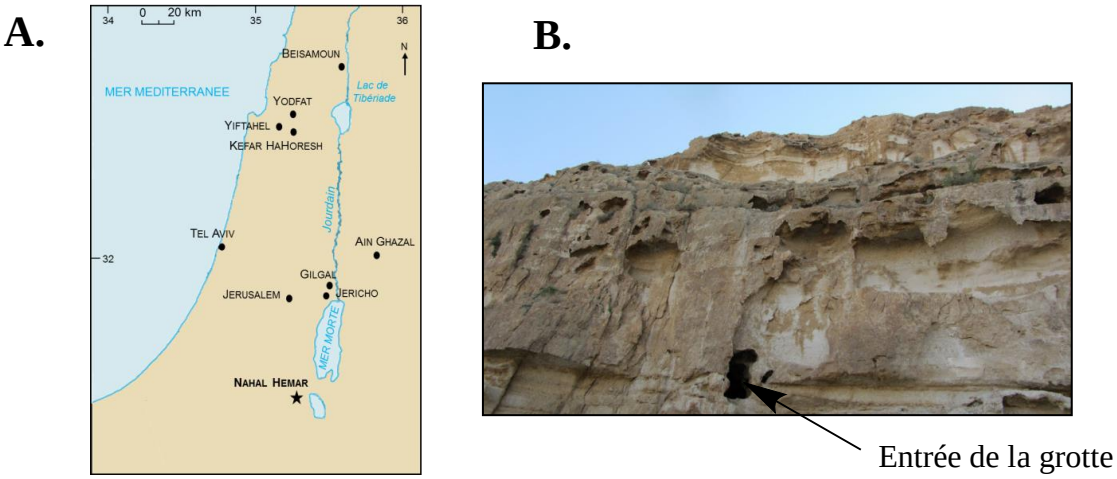


FIG. 4.25 A. Localisation de la grotte de Nahal Hemar, au Sud du désert de Judée (Israël) et **B.** vue de la grotte, à l'entrée particulièrement exiguë (*sources* : A. Carte modifiée d'après celle du World Factbook[9], B. Photo de Arie Geva, Picassa Web).

4.7.2. Echantillons sélectionnés pour l'étude de géochimie organique

Dans le cadre d'un réexamen approfondi de certains des objets mis au jour à Nahal Hemar, deux échantillons ont pu être prélevés sur le panier #448, de même que trois échantillons à la surface du crâne #515 (Tableau 4.2). Il s'agit, pour ces derniers, d'échantillons détachés d'une résille en damier ornant les crânes (NH2823 et NH2969) et de la couche à la base de la résille, en contact avec le crâne (NH2968, Figure 4.26). L'étude a également concerné un résidu de collagène (#672), sans lien direct apparent avec le panier et le crâne, puisque un écart temporel de plus de mille ans sépare ces échantillons du fragment de collagène. Toutefois, cet échantillon exclusivement composé de collagène constituait un échantillon de référence archéologique pour l'étude protéomique engagée sur les fragments de crâne et de panier par deux autres équipes de chercheurs associées à ces travaux d'identification. Seuls les résultats relatifs à l'analyse des échantillons provenant de l'enduit organique du crâne font l'objet, dans la suite de ce document, d'une description approfondie. L'étude des deux échantillons de panier NH2825 et NH2826 ainsi que du résidu NH2824 est rapportée et commentée dans la publication jointe en annexe (Solazzo et *al*., 2016 ; cf. § 4.10).

[9]The World Factbook, Washington, DC, Central Intelligence Agency, 2016.

TABLEAU 4.2

Inventaire des échantillons archéologiques examinés en provenance de Nahal Hemar.

Objet archéologique[a]	N° échantillon	description	datation[b]
« résidu organique » #672	NH2824	Echantillon de collagène	7300-7050 cal. BC
Panier #448	NH2825	Fragment noir présentant des résidus de végétaux à la surface	-
	NH2826	Fragment marron avec une empreinte végétale	
Crâne #515	NH2823	Résille en damier	8920-8430 cal. BC
	NH2968	Couche de base à l'aspect fibreux	
	NH2969	Résille en damier	

[a]numérotation issue de Connan et *al.* (1995).
[b]mesures de datation au ^{14}C transmises par le Weizmann Institute (Israël).



FIG. 4.26 (**A**) Crâne décoré de Nahal Hemar, à l'arrière duquel a été placé un enduit organique sous la forme d'une résille, (**B**) échantillon de la résille (NH2968) prélevé pour l'analyse de géochimie organique (*photos du crâne* : Clara Amit, Israel Antiquities Authority, *photo de l'échantillon* : Caroline Solazzo).

4.8. Evaluation du cortège moléculaire présent dans la résille organique

Dans le but d'altérer le moins possible le crâne de Nahal Hemar #515, témoin archéologique unique et par conséquent de grande valeur, les nouveaux prélèvements réalisés en vue d'un réexamen moléculaire ont conduit à l'obtention d'échantillons dont la masse n'excédait pas 83 mg (Tableau 4.3). Si la quantité restreinte de matériel archéologique disponible pour les analyses chimiques peut parfois constituer un frein important pour des études moléculaires, la nature fortement lipidique de l'enduit étudié (> 67 % d'extrait organique) a représenté, ici, un avantage considérable. A l'inverse, les échantillons de panier, dont les résultats sont présentés dans la publication en partie 4.10, ont montré une très faible proportion de matériel extractible aux solvants organiques (< 10 %).

TABLEAU 4.3

Quantité de matériel disponible pour l'étude moléculaire et % d'extrait lipidique obtenu après extraction aux solvants organiques (CH_2Cl_2/CH_3OH, 1/1, v/v).

	N° échantillon	Quantité de matériel prélevé (mg)	% d'extrait lipidique
collagène	NH2824	483	< 1
panier	NH2825	22	3
	NH2826	54	9
crâne	NH2823	83	> 90
	NH2968	22	67
	NH2969	52	> 70

L'investigation par GC-MS de la résille organique a mis en lumière la complexité du matériau apposé à la surface du crâne. Afin de ne manquer aucun composé moléculaire, même les plus volatils, nous avons choisi de mettre en place, pour chacun des échantillons, un protocole analytique comprenant (1) une première étape d'extraction au dichlorométhane et sollicitant le moins d'étapes d'évaporation afin de détecter au mieux les composés les plus volatils, (2) une seconde étape d'extraction avec un mélange CH_2Cl_2/CH_3OH (1:1, v/v) et un protocole « classique » de purification et, enfin, (3) une hydrolyse du résidu non extractible (cf. partie expérimentale en chapitre 7). Chaque phase de l'étude a alors conduit à la détection de composés de nature bien différente que sont (1) des corps gras (triglycérides), (2) des lipides de végétaux et (3) des acides aminés.

4.8.1. Détection de corps gras au sein des échantillons NH2823 et NH2969

Dans les échantillons NH2823 et NH2969, l'analyse par GC-MS de la fraction contenant les molécules les plus « volatiles » a montré la présence du cadalène (**X4**, cf. appendice), des acides palmitique ($C_{16:0}$) et stéarique ($C_{18:0}$), de quelques *n*-alcanes et, de manière plus exceptionnelle, d'esters lourds et de triglycérides (Figure 4.27). Si peu d'informations structurales en rapport avec les triglycérides sont obtenues par GC-MS, les fragments abondants à *m/z* 257 et 285 observés dans le cas des esters lourds suggèrent une construction moléculaire basée sur les esters de l'acide palmitique et de l'acide stéarique. Cette distribution des esters (E_{30} à E_{44}) centrée sur l'homologue en E_{34} est plutôt inhabituelle et ne correspond pas aux cires classiquement observées en archéologie (Regert et *al.*, 2005). La présence de ces homologues peut donc provenir d'une source végétale non identifiée ou de réactions de condensation entre les composés chimiques originaires des échantillons archéologiques dans lesquels ces acides en $C_{16:0}$ et $C_{18:0}$ se retrouvent à l'état libre en quantité

très élevée. Par ailleurs, il est remarquable de noter que contrairement à ces échantillons de résille, l'échantillon NH2968, qui a été prélevé à la base de l'enduit, ne contient aucun des composés décrits ci-dessus.

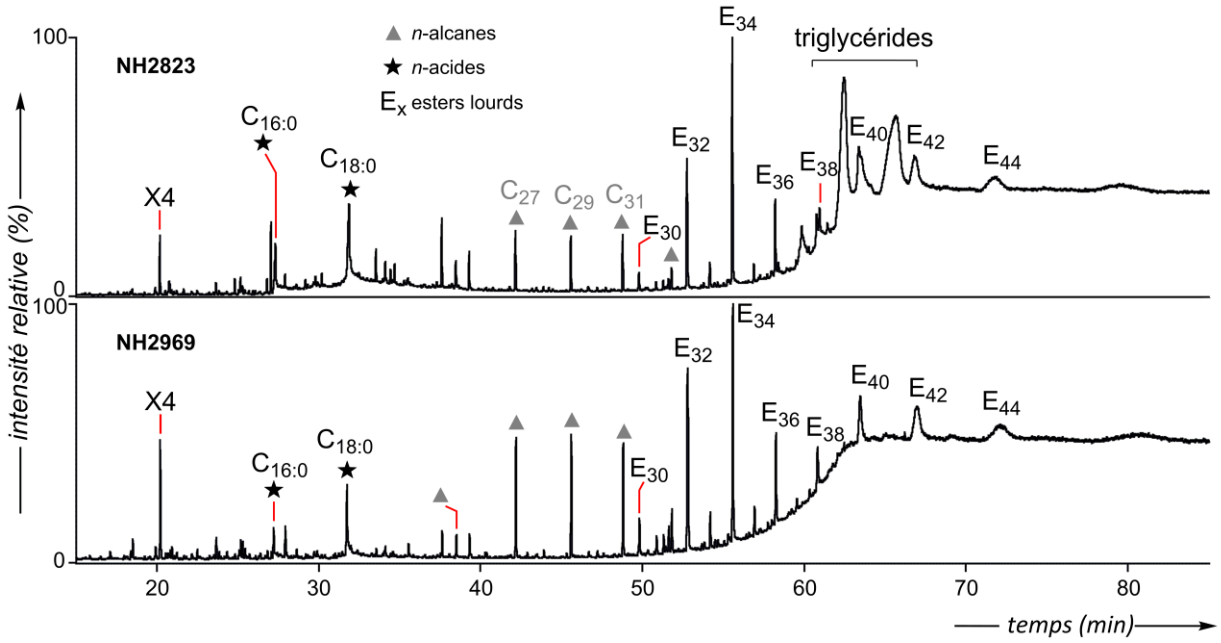


FIG. 4.27 Chromatogrammes en phase gazeuse des extraits lipidiques contenant les composés « volatils » originaires des échantillons NH2823 et NH2969 (programme de température D). Les acides sont analysés sous la forme d'esters méthyliques.

Dans l'échantillon NH2823, la présence de triglycérides (ou triacylglycérols, TAG), principaux constituants des huiles et graisses tant animales que végétales (Laakso, 2002, Bastien, 2011), mérite d'être soulignée au regard de leur abondance au sein de l'échantillon. Si l'analyse par GC-MS n'est sans doute pas la méthode la plus adaptée aux TAG en raison notamment de leur faible volatilité -à moins d'utiliser des conditions et une colonne capillaire adaptées aux analyses à hautes températures-, l'analyse par LC-MS, en mode APCI [10] (ionisation chimique à pression atmosphérique) et en phase inverse, permet de séparer les différents homologues de TAG selon leur longueur de chaîne totale et leur nombre d'insaturations, puis d'en déterminer la structure moléculaire partielle, en spécifiant la nature des acides gras liés au glycérol (Laakso, 2002, Buchgraber et *al.*, 2004). En mode APCI, les triglycérides se fragmentent principalement pour former les ions $[M+H]^+$ et $[M\text{-}RCOO]^+$ (Fauconnot et *al.*, 2004), ce dernier fragment étant le résultat de la perte d'un des acides gras estérifiés sur l'une des trois positions du glycérol (*sn*-1, *sn*-2 ou *sn*-3, Figure 4.28). Par

[10] Il est à noter que l'analyse des TAG peut également se faire en LC-MS en utilisant les modes ESI (électrospray) et APPI (photoionisation à pression atmosphérique ; Gómez-Ariza et *al.*, 2006, Saliu et *al.*, 2014)

ailleurs, d'autres informations structurales sont fournies par l'intensité de certains de ces fragments. En effet, l'intensité de l'ion $[M+H]^+$ augmente dès lors que les chaînes d'acides gras contiennent des insaturations alors que la détection de cet ion, dans le cas d'un TAG formé exclusivement à partir d'acides gras saturés, est souvent délicate (Byrdwell et Emken, 1995). D'autre part, compte tenu de la difficulté plus importante à arracher le groupement acyle positionné en *sn*-2, l'intensité des ions $[M-RCOO]^+$ correspondant à la perte des chaînes *sn*-1 et *sn*-3 (espèces a et c, Figure 4.28) sera plus intense que celle de l'ion $[M-RCOO]^+$ résultant de la perte de la chaîne *sn*-2 (espèce b ; Mottram et *al*., 1997, Laakso, 2002).

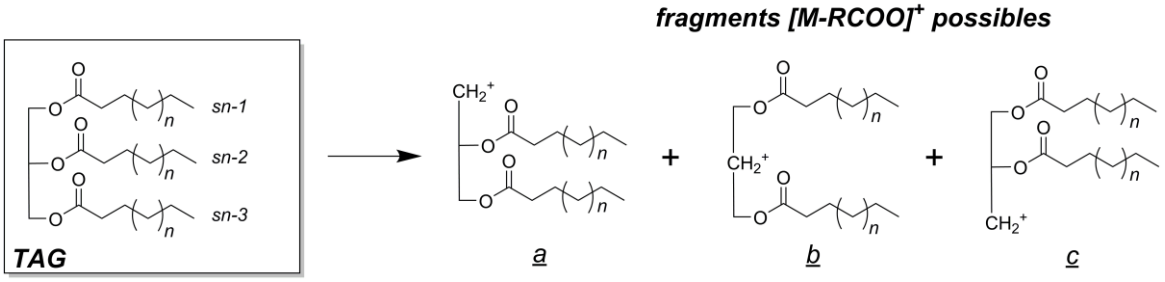


FIG. 4.28 Structure générique des triglycérides et fragments $[M-RCOO]^+$ obtenus en analyse MS (mode APCI, modifié d'après Bastien, 2011).

La figure 4.29 montre le profil chromatographique des triglycérides de l'échantillon NH2823 obtenu lors de l'analyse par HPLC-MS et la figure 4.30 présente les spectres de masse obtenus en mode APCI pour chacun des pics chromatographiques. Les différents fragments, notamment de type $[M-RCOO]^+$, ont fait apparaître l'existence de nombreuses co-élutions de TAG, rendant le travail de caractérisation délicat. Néanmoins, il semblerait que ces triglycérides soient principalement constitués de chaînes hydrocarbonées saturées, parmi lesquelles les acides myristique ($C_{14:0}$), palmitique ($C_{16:0}$) et stéarique ($C_{18:0}$) sont majoritaires comme l'indique l'abondance relative des fragments $[M-RCOO]^+$ et la quasi absence d'ions $[M+H]^+$ (Figure 4.30). En effet, comme l'ont montré Byrdwell et Emken (1995), en mode APCI, les spectres de masse des TAG insaturés présentent des ions $[M+H]^+$ bien visibles, ce qui n'est pas le cas des dérivés saturés, dont les spectres de masse sont largement dominés par les fragments du type $[M-RCOO]^+$. Il nous est toutefois possible de proposer qu'un certain nombre de ces triglycérides sont constitués d'une combinaison d'acides en C_{16}, C_{18} et C_{20}, saturés pour l'essentiel, mais avec éventuellement une composante mineure d'acides monoinsaturés (cf. ions $[M+H]^+$ visibles dans les spectres de masse de la Figure 4.30). Il est également important de noter que la distribution des TAG observée dans cet échantillon, très ancien, ne reflète pas nécessairement la distribution originelle et que l'altération du matériau,

avec le temps, a pu conduire à l'oxydation des chaînes insaturées, et donc à l'élimination progressive et sélective des dérivés insaturés. Ainsi, il est donc épineux de proposer une origine, qu'elle soit animale ou végétale, concernant la source biologique des TAG identifiés dans l'échantillon NH2823, et leur présence parmi les constituants de la résille du crâne ne peut seulement être interprétée qu'en terme de contribution d'une substance grasse en tant qu'ingrédient possible dans la confection de cette résille. Il convient toutefois de demeurer prudent quant à la présence de ces TAG, dans la mesure où les échantillons de résille NH2823 et NH2969 sont, d'un point de vue moléculaire, semblables en tous points (cf. Figure 4.27 et discussion sur les dérivés cinnamiques et benzoïques ci-après), à l'exception de la présence exclusive de TAG dans le prélèvement NH2823. Ceci nous amène alors à envisager la possibilité d'une éventuelle contamination, soit lors de l'échantillonnage, soit lors de la manipulation ou du traitement de l'échantillon, celui-ci étant disponible en très petites quantités et donc susceptible d'être facilement contaminé. Malheureusement, en l'absence de données telle qu'une datation au ^{14}C des TAG, nous ne pouvons trancher entre la possibilité d'une origine syngénétique ou d'une contamination plus récente.

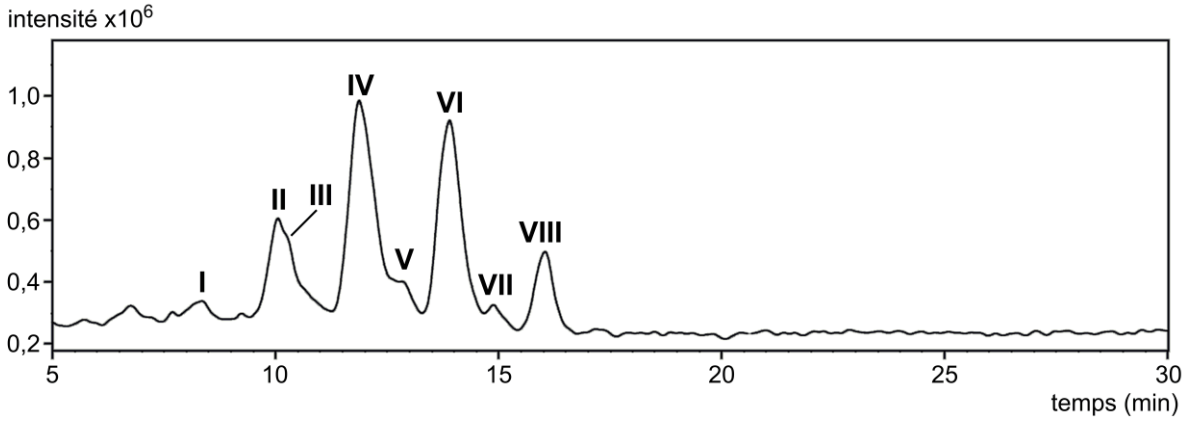


FIG. 4.29 Chromatogramme en phase liquide montrant la distribution des triglycérides contenus dans l'échantillon NH2823. Chaque pic est constitué d'un mélange de TAG coéluant.

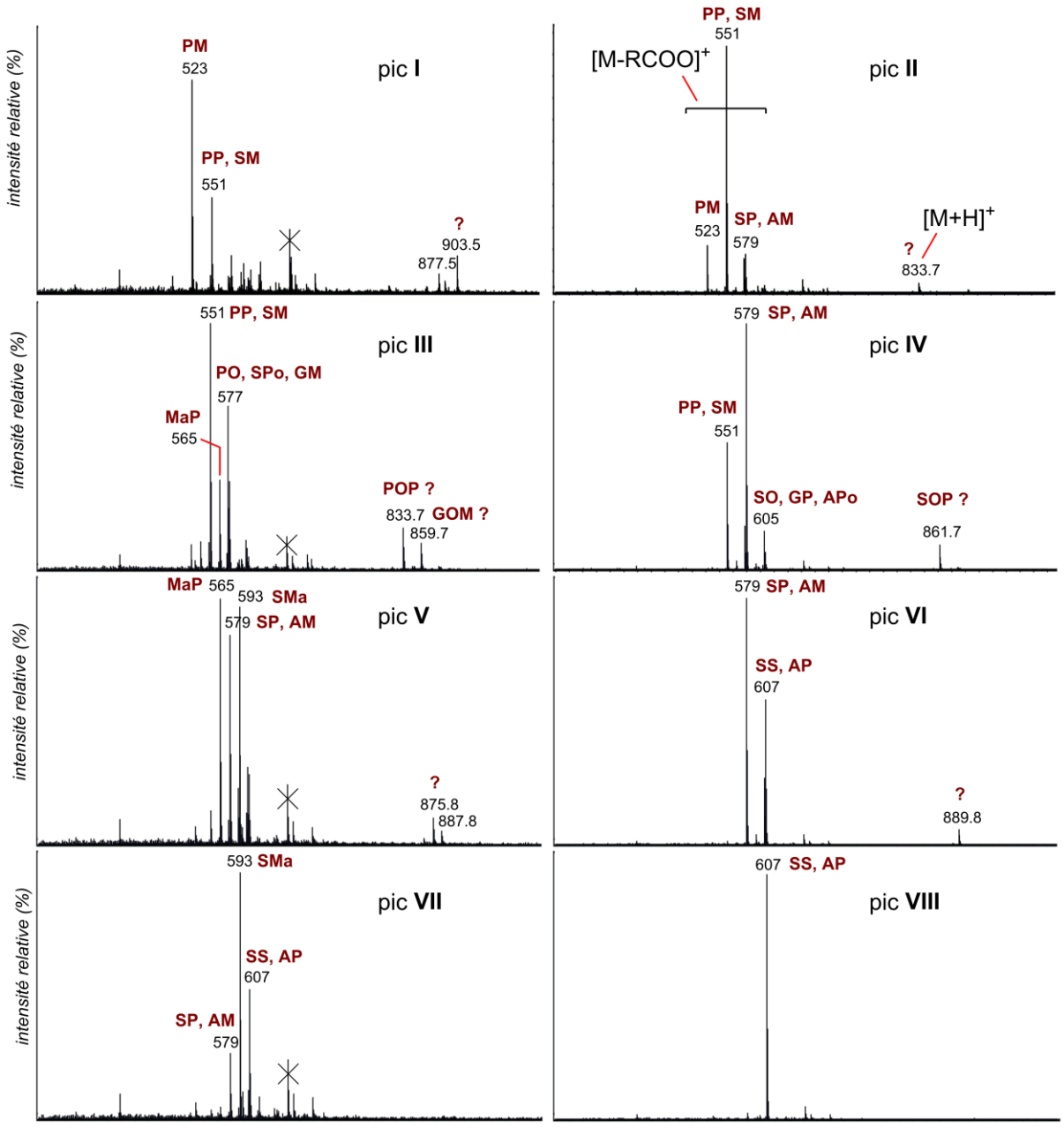


FIG. 4.30 Spectres de masse des triglycérides correspondant aux pics **I** à **VIII** (Figure 4.29) identifiés dans l'échantillon NH2823 (APCI) et suggestions concernant l'association des acides gras impliqués d'après la masse des fragments $[M\text{-}RCOO]^+$ (d'après Holčapek et *al.*, 2003). M : acide myristique ($C_{14:0}$), P : acide palmitique ($C_{16:0}$), Po : acide palmitoléique ($C_{16:1}$), Ma : acide margarique ($C_{17:0}$), S : acide stéarique ($C_{18:0}$), O : acide oléique ($C_{18:1}$), G : acide gadoléique ($C_{20:1}$), A : acide arachidique ($C_{20:0}$).

4.8.2. Etude chimiotaxonomique de la composante végétale incorporée dans l'enduit

Comme nous l'avons évoqué précédemment lors de l'analyse des corps gras, une différence majeure est apparue entre l'échantillon NH2968 (base du crâne) et les échantillons NH2823 et NH2969 (résille), ces deux derniers étant fort semblables d'un point de vue moléculaire (Figure 4.31). L'analyse par GC-MS de l'extrait lipidique des échantillons NH2823 et NH2969 a ainsi révélé la prédominance des acides gras en $C_{16:0}$ et $C_{18:0}$ accompagnés de quelques composés phénoliques de faible poids moléculaire, en début de chromatogramme, et de dérivés de l'acide cinnamique et de l'acide benzoïque. La caractérisation structurale de ces composés est rendue difficile par l'absence d'ions moléculaires et de fragmentation, hormis celle, très intense, qui donne les fragments *m/z* 105 (dérivés benzoïques) et 131 (dérivés cinnamiques), permettant de distinguer ces deux séries de composés (cf. § 4.3.2). Sans information concernant la partie alcool impliquée dans la structure, de nombreux esters des acides cinnamique et benzoïque n'ont pu voir leur structure caractérisée.

Si les esters formés à partir des acides cinnamique et benzoïque sont peu abondants au sein des échantillons prélevés au niveau de la résille, l'échantillon NH2968 révèle un contenu particulièrement riche en ces dérivés (Figure 4.31). Quoique la majorité des structures n'aient pu être identifiées, il nous a été possible de mettre en évidence, tout de même, l'acide cinnamique (**P2**), le cinnamate de benzyle (**P21**) et le cinnamate de cinnamyle (**P20**). Ce résultat majeur, en adéquation avec de précédentes analyses de pyrolyse-GC-MS (Solazzo et *al*., 2014), nous a conduit à proposer qu'un baume aux caractéristiques aromatiques ait pu intervenir dans la formulation de l'enduit situé à l'arrière du crâne de Nahal Hemar. N'écartant à l'origine aucune source botanique, nous avons, dans un premier temps, tenu compte de la distribution géographique des espèces productrices de baumes (espèces *Styrax*, *Liquidambar* et *Myroxylon*). Evidemment, la possibilité que les populations préhistoriques, demeurant à Nahal Hemar il y a plus de 10 000 ans, aient pu s'approvisionner en baume de Tolu ou en baume du Pérou (*Myroxylon* sp.), dont la production se trouve exclusivement localisée sur le continent américain (cf. § 4.5.1), a été totalement écartée. En tenant compte, ensuite, de la répartition géographique des différentes espèces de *Styrax* et de *Liquidambar* (Figure 4.3), les sources botaniques retenues ont été la résine de *S. officinalis* et celle de *L. orientalis*, toutes deux originaires du bassin méditerranéen. Bien qu'actuellement, les plantations de *L. orientalis*, en vue d'une production de résine, se concentrent essentiellement dans le sud de la Turquie et, dans une moindre mesure, sur les îles de Chypre et de Rhodes

(Igolen, 1972, Amigues, 2007, Öztürk et *al.*, 2008), il nous est paru délicat de tenir compte de la répartition géographique actuelle pour l'extrapoler à la période du Néolithique Précéramique B.

Cependant, la prédominance du cinnamate de cinnamyle (**P20**) et/ou du cinnamate de 3-phénylpropanyle (**P30**), composés majeurs dans les résines de référence (Figures 4.6 et 4.17) n'a pas été observée dans le cas de l'échantillon NH2968. Puisque la distribution des esters d'acides cinnamique et benzoïque diverge fortement du contenu moléculaire des résines de référence étudiées au préalable, nous n'avons pu déterminer la source botanique de la résine archéologique utilisée pour la confection du revêtement du crâne sur la base de ce critère moléculaire. L'altération de la résine végétale étudiée ne faisant aucun doute étant donné son l'âge, il est plus que probable que la distribution originelle des esters de l'acide cinnamique et de l'acide benzoïque ait été altérée par vieillissement, conduisant à la formation de nombreux produits additionnels d'altération et, en contrepartie, à la disparition de certains composés de la résine initiale. En effet, des réactions d'hydrolyse et/ou de condensation, ces dernières faisant interagir les multiples composés aromatiques entre eux ou avec d'autres constituants du mélange, ont très certainement induit la formation de nouveaux constituants, parmi lesquels des esters de cinnamate et benzoate, entraînant de ce fait une complexification importante du mélange. L'altération partielle des esters d'acides cinnamique et benzoïque a entraîné une modification notable des abondances relatives initiales de ces composés, ce qui ne permet pas de différencier les deux sources botaniques envisagées et, donc, d'identifier précisément la composante végétale de l'enduit organique.

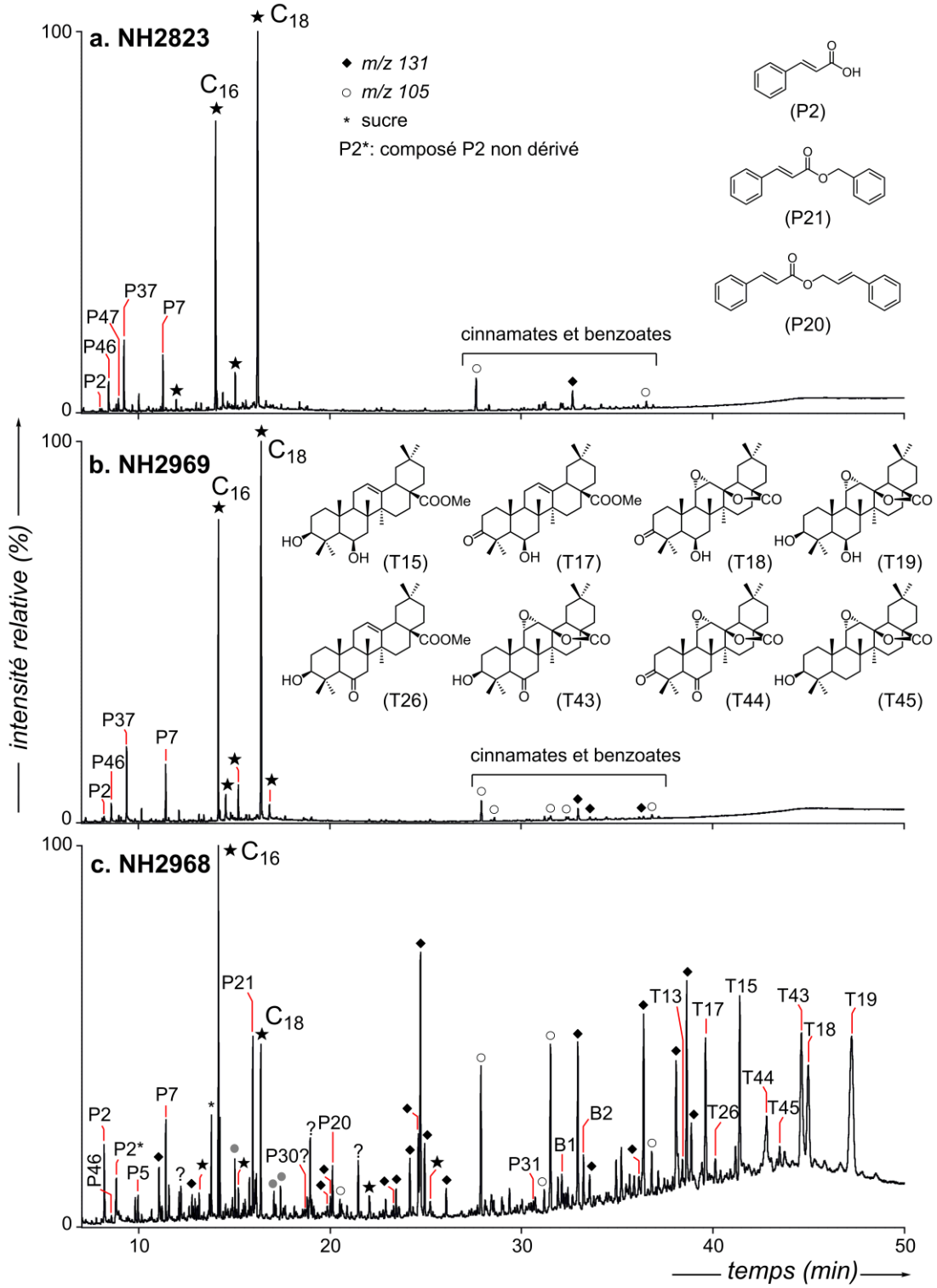


FIG. 4.31 Chromatogrammes en phase gazeuse des extraits lipidiques obtenus à partir des échantillons (**a**) NH2823, (**b**) NH2969 et (**c**) NH2968 prélevés à l'arrière du crâne de Nahal Hemar. La présence d'esters de cinnamate (*m/z* 131) et de benzoate (*m/z* 105) est respectivement signalée au moyen de losanges pleins et de cercles vides. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides sous forme d'esters méthyliques (programme de température C).

Suite à ce constat, le potentiel chimiotaxonomique des triterpénoïdes au sein de l'échantillon NH2968 (base de la résille) a été exploré -ce type de composés étant absent des deux autres échantillons NH2823 et NH2969-. Cet échantillon contient, en effet, des dérivés rares de l'acide oléanolique présentant une fonction oxygénée (alcool ou cétone) en position C-6 (Figure 4.32). Comme décrit précédemment dans le cas des résines de référence (cf. § 4.3.2.c), l'identification structurale de ces triterpènes a été effectuée sur la base de l'interprétation des spectres de masse (MS) obtenus en ionisation de champ (FI), impact électronique (EI) et ionisation chimique (CI) ainsi que par comparaison avec les données de la littérature. Nous avons ainsi pu mettre en évidence, parmi les triterpènes de l'échantillon NH2968, l'acide oléanolique (**T13**), l'acide 6β-hydroxy-3-oxo-oléan-12-en-28-oïque (**T17**), l'acide 3β-hydroxy-6-oxo-oléan-12-en-28-oïque (**T26**) ainsi que l'acide sumarésinolique (**T15**). Lors de l'étude préliminaire concernant les résines de référence, nous avions observé ces mêmes composés, avec une distribution fortement similaire (Figure 4.32), au sein de l'échantillon de référence de *S. officinalis*, tandis que la résine de *L. orientalis* se caractérise par la présence de l'acide oléanonique (**T24**). De ce fait, nous pouvons en conclure que la contribution d'une résine de *L. orientalis* peut être exclue, et qu'un enduit à base de résine de *S. officinalis* a très certainement été appliqué à la surface du crâne, possiblement dans le but de le parfumer. Cette hypothèse est corroborée par l'identification de l'égonol et l'homoégonol (**B1** et **B2**) caractéristiques des *Styracaceae* (cf. § 4.3.2). La présence de ces benzofuranes, importants constituants de l'écorce de *S. officinalis* (cf. § 4.3.3), suggère que les hommes responsables de la collecte de la résine à Nahal Hemar ont prélevé des fragments d'écorce avec la résine.

L'identification d'une résine de *S. officinalis* comme ingrédient de l'enduit organique appliqué à l'arrière du crâne de Nahal Hemar, il y plus de 9000 ans, correspond à la plus ancienne attestation, à notre connaissance, de l'utilisation d'une résine aux propriétés odoriférantes dans le cadre de pratiques rituelles. Le recours à une telle résine démontre la capacité de nos ancêtres à exploiter les ressources naturelles dont ils disposaient dans un périmètre géographique plus ou moins large et témoigne également de leur grande technicité pour prélever et modeler, à leur convenance, ce matériel résinique.

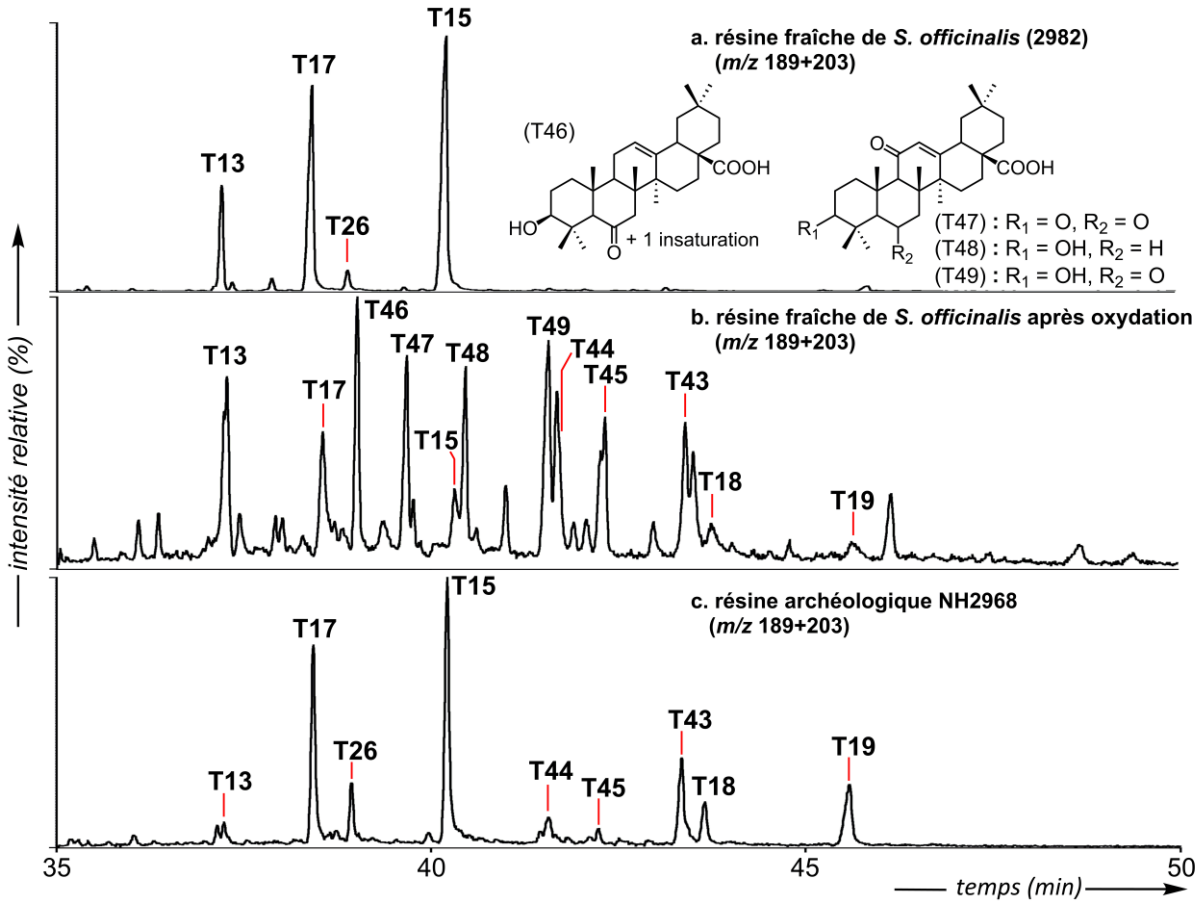


FIG. 4.32 Chromatogrammes en phase gazeuse partiels montrant la distribution des triterpènes présentant les fragments *m/z* 189+203 au sein de (**a**) la résine fraîche de *S. officinalis* collectée à Yodfat, en Israël, (**b**) la même résine fraîche après 13h d'oxydation et (**c**) l'échantillon archéologique NH2968. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides sous forme d'esters méthyliques.

A côté de ces triterpènes possédant une fonction oxygénée en C-6 (**T15**, **T17**, **T26**) dans ce même échantillon (NH2968), des composés partageant les mêmes fragments de base à *m/z* 189+204, typiques de motifs triterpéniques, ont été détectés en fin de chromatogramme (Figures 4.31 et 4.32). L'examen en MS et l'étude comparative des données publiées (Wang et *al.*, 2006a) ont permis d'établir qu'il s'agit de structures de type époxylactone (Figure 4.33). Les fragments à *m/z* 291, 249 et 293 (pour les composés **T43**, **T18** et **T19**, respectivement) ont été interprétés comme des fragments issus du réarrangement moléculaire observé dans le cas des 11α,12α-époxy-γ-lactones de la série de l'oléanane tel que proposé par Kamiya et *al.* (1997). Ce motif de type époxylactone se retrouve également dans le cas des composés **T44** et **T45**, identifiés par analogie, comme étant respectivement le 3,6-oxo-11α,12α-époxyoléan-28-13β-olide et le 3β-hydroxy-11α,12α-époxyoléan-28-13β-olide. Compte tenu de l'absence de ces molécules dans la résine fraîche de *S. officinalis*, nous avons envisagé qu'il puisse s'agir

de triterpènes provenant d'une seconde substance d'origine végétale au sein de l'enduit organique, ou, plus vraisemblablement en raison de leur identification -à l'état de traces- dans une résine de *S. tonkinensis* (Wang et *al.*, 2006a), de produits de dégradation dérivant des triterpènes naturels de la résine de styrax.

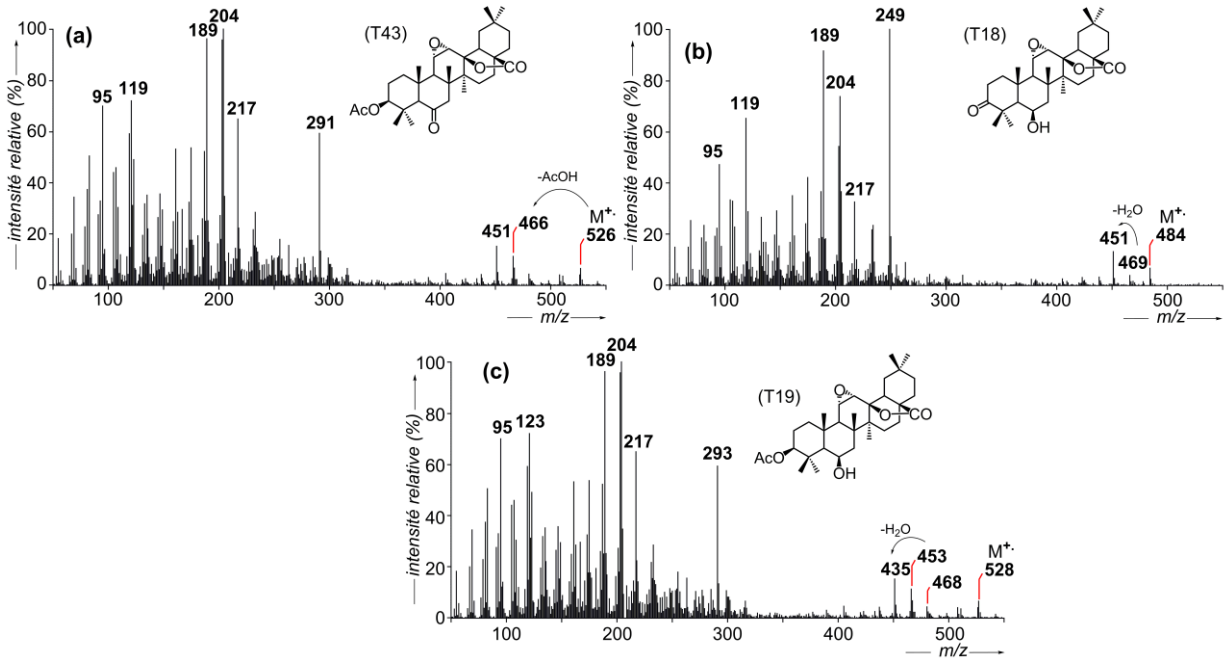


FIG. 4.33 Spectres de masse des dérivés de l'acide sumarésinolique de type époxylactone **T43**, **T18** et **T19** identifiés dans la résine archéologique NH2968 (EI, 70 eV).

Afin de vérifier cette dernière hypothèse, nous avons mis en œuvre une réaction d'autoxydation en conditions radicalaires (AIBN, *t*-BuOOH, air, 50 °C, 13h, cf. § 7.1.6) à partir d'une aliquote de la résine fraîche de *S. officinalis* 2982 dans le but de simuler artificiellement le vieillissement de la résine de *S. officinalis*. Cette expérience d'oxydation a donné lieu à la formation, entre autres, des triterpènes **T46** à **T49**, les trois derniers possédant un système conjugué constitué d'une cétone en position C-11 et d'une double liaison en position C-12 (Figure 4.32), comme le suggère les fragments *m/z* 217, 257, 276 et 317, caractéristiques des dérivés de l'acide 11-oxo-oléanolique (Wyrzykiewicz et *al.*, 1989). De surcroît, notre expérience d'autoxydation a induit la formation de triterpènes présentant une fonction 11α,12α-époxy-γ-lactone (**T18**, **T19** et **T43** à **T45**), ceux-là même qui sont présents au sein de la résine archéologique. Il est fort probable que les mécanismes réactionnels intervenant dans la formation de ces 11α,12α-époxylactones à partir des dérivés d'acide sumarésinolique soient analogues au réarrangement moléculaire décrit précédemment lors d'expériences de photo-oxydation (hν et O_2 ; Kitagawa et *al.*, 1968) ou d'oxydation en

conditions radicalaires (Majumder et Bagchi, 1983), à partir de triterpènes de la série de l'oléanane et de l'ursane. Ce mécanisme d'oxydation implique notamment la formation d'un hydroperoxyde allylique en position C-11 suivi d'un réarrangement intramoléculaire via un mécanisme concerté (Figure 4.34).

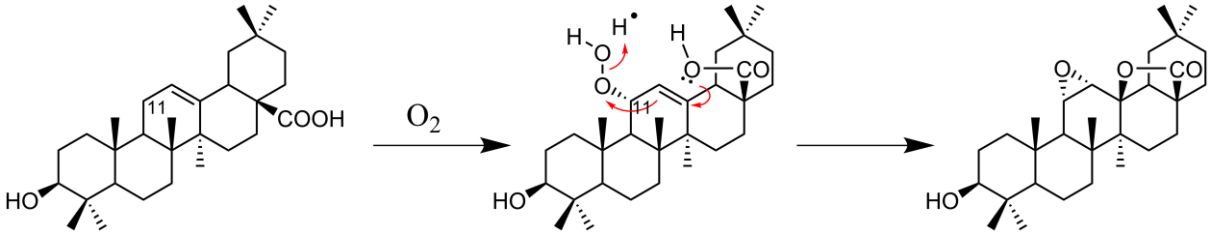


FIG. 4.34 Mécanisme d'oxydation conduisant à la formation d'un triterpène de type 11α,12α-époxylactone à partir de l'acide oléanolique (modifié d'après Majumder et Bagchi, 1983).

La présence des composés **T18**, **T19** et **T43** à **T45** dans l'enduit archéologique serait donc liée à un processus d'altération dû au vieillissement de l'échantillon archéologique et nous proposons, à ce titre, que les dérivés triterpéniques de type 11α,12α-époxylactone oxygénés en C-6 puissent constituer d'importants marqueurs chimiotaxonomiques de résines de *S. officinalis* dans le cadre d'études archéologiques. Fait remarquable qui mérite d'être discuté, nous avons constaté l'absence des produits d'oxydation constitués d'un groupement de type 11,12-énone au niveau du cycle C (composés **T47** à **T49**), au sein de la résine archéologique, et dont nous avons observé la formation lors de l'expérience d'autoxydation. Une de nos hypothèses repose sur le fait que les conditions régnant au niveau de l'enduit du crâne (pH, espèces oxydantes, …) aient pu favoriser la formation des composés **T18**, **T19** et **T43** à **T45** au sein de l'échantillon archéologique. On ne peut toutefois exclure que des triterpènes portant un groupement de type 11,12-énone aient été initialement formés et oxydés par la suite, un processus que notre expérience de relative courte durée n'a été en mesure de reproduire.

Pour des applications archéologiques futures, il pourrait également être intéressant d'étudier le comportement de certains composés, triterpéniques notamment, lors d'une cuisson modérée de la résine, un procédé qui aurait pu être mis en place dans le but de rendre le matériau plus malléable et ainsi d'en faciliter l'application sur le crâne ou l'incorporation à d'autres substances dans le cadre de la constitution d'un mélange.

Remarque : Puisque nos résultats démontrent l'incorporation d'une résine de *S. officinalis* au sein de l'enduit organique, nous avons cherché à savoir si les aglycones (**T27** et

T28) des saponines de triterpènes décrits par Yayla et *al.* (2002) et identifiés dans nos résines de référence 2982 et 3020, pouvaient être également présents dans l'enduit du crâne. Leur détection aurait, en effet, constitué un argument supplémentaire en faveur de l'utilisation d'un exsudat de *S. officinalis*. Ces aglycones n'ayant pu être mis en évidence dans l'extrait lipidique apolaire, nous avons alors procédé à l'hydrolyse de la fraction polaire de l'extrait lipidique de NH2968, mais cette dégradation chimique n'a pas, pour autant, libéré de tels composés.

4.8.3. Profil des acides aminés

L'un des objectifs de l'étude était également de caractériser, au moyen de techniques protéomiques notamment, un des constituants du revêtement retrouvé sur le crâne de Nahal Hemar qui avait été identifié comme étant du collagène lors de précédentes analyses (Connan et *al.*, 1995) afin de confirmer cette identification et de déterminer son origine biologique. Nous nous sommes alors demandé de quelle manière les analyses par GC-MS, couramment employées en géochimie organique, pouvaient permettre l'identification d'une substance protéinique comme le collagène. Nous avons alors procédé à la méthanolyse de la composante non extractible aux solvants organiques, ce qui a conduit à la libération de nombreux acides aminés. Leur analyse par GC-MS a ainsi permis d'identifier certains constituants majeurs du collagène, tels que la glycine, la proline et l'hydroxyproline (Figure 4.35 ; Plavan et *al.*, 2013). Ce résultat peut donc suggérer que de la résine de *S. officinalis* ait pu être mélangée à du collagène afin de faciliter notamment l'adhésion de la résille sur le crâne. L'intégralité des résultats se rapportant à l'étude des acides aminés est présenté en annexe de ce chapitre (Solazzo et *al.*, 2016).

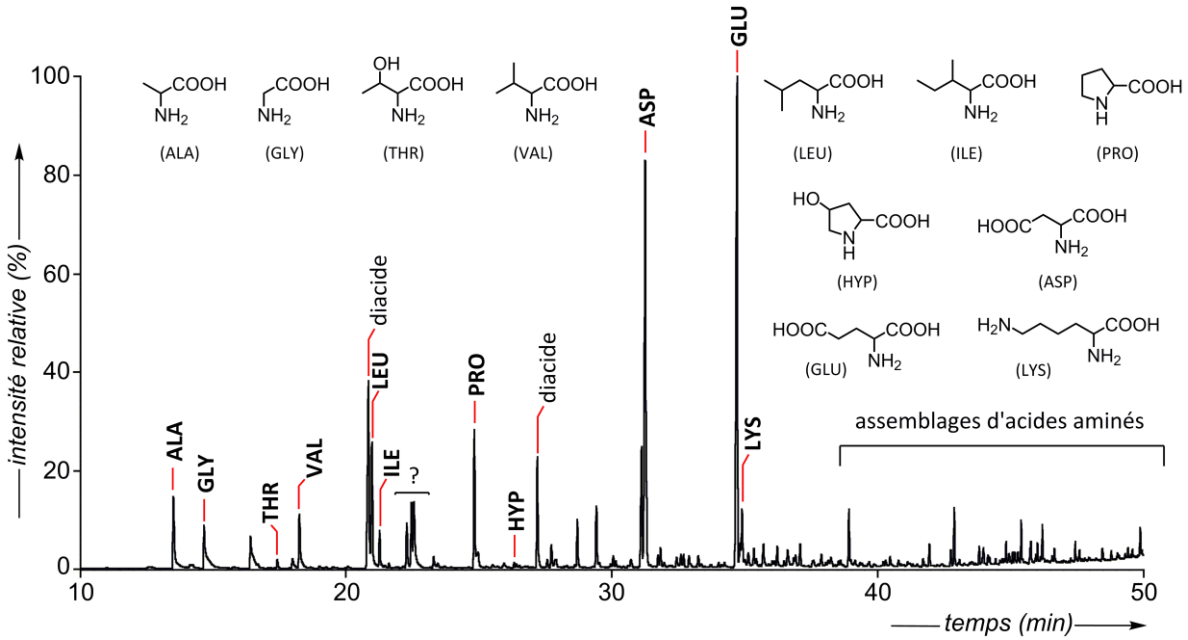


FIG. 4.35 Chromatogramme partiel en phase gazeuse de l'hydrolysat (HCl/CH_3OH) du résidu solide restant après l'extraction aux solvants organiques de l'échantillon NH2968. Les fonctions acides sont analysées sous forme d'esters butyliques et les fonctions alcools et amines sous forme de trifluoroacétates (programme de température E).

4.9. Conclusion

L'étude par GC-MS de résines de référence de styrax, exsudées de différentes espèces de *Styracaceae*, a mis en lumière la composition lipidique de ces dernières. Fait remarquable, il s'agit de la première étude du genre en ce qui concerne la résine de *S. officinalis* grâce à l'obtention de résines fraîchement collectées et certifiées. En intégrant au projet de recherche des résines de *Liquidambar* et du matériel végétal de *Myroxylon*, cette étude comparative nous a permis de mettre en évidence divers critères moléculaires chimiotaxonomiques utiles pour la reconnaissance de telles essences végétales, ce travail d'authentification pouvant s'avérer particulièrement utile pour différencier les nombreux produits falsifiés du commerce des résines authentiques de styrax et de storax. Le tableau 4.4 résume ainsi les caractéristiques moléculaires de ces dernières, qu'il s'agisse des distributions en esters d'acides cinnamique et benzoïque ou de la présence spécifique de triterpènes ou autres composés (benzofuranes, lignanes). Parmi ces biomarqueurs, nous noterons la présence de quelques dérivés rares de l'acide oléanolique au sein des résines de styrax (acides sumarésinolique et/ou siarésinolique accompagnés de leurs dérivés) et au sein des liquidambars ou storax (l'acide 3-épi-oléanolique).

TABLEAU 4.4

Critères moléculaires utiles pour la reconnaissance de résines modernes et archéologiques de styrax et storax.

Biomarqueurs	Prédominance des cinnamates et benzoates	Triterpènes	Autres composés
Résines de styrax			
S. officinalis	cinnamate de cinnamyle **P20**	acide sumarésinolique **T15** et ses dérivés	Egonol **B1** et homoégonol **B2** (si contribution d'écorce) et styraxine **L2**
S. paralleloneurum	acide cinnamique **P2**		
S. tonkinensis	benzoate de coniféryle **P11**	acides sumarésinolique et siarésinolique **T14** et ses dérivés	
Résines de liquidambar (ou storax)			
L. orientalis	cinnamate de 3-phénylpropanyle et cinnamate de cinnamyle **P30** et **P20**	acide oléanonique **T24** (majeur) et 3-épi-oléanolique **T31** (mineur)	-
L. styraciflua			-

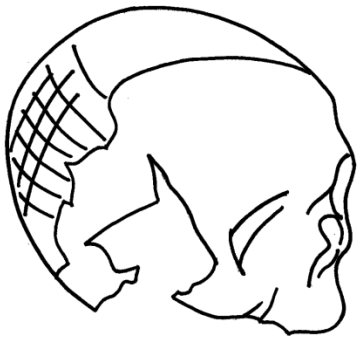
S'il paraît pertinent d'utiliser ces biomarqueurs dans le cadre de travaux d'authentification de résines fraîches (contrôles des produits commerciaux notamment), le potentiel chimiotaxonomique de tels marqueurs moléculaires, en contexte archéologique, mérite d'être vérifié. Ainsi donc, l'étude de l'enduit organique placé à l'arrière du crâne de Nahal Hemar (Israël, période du PPNB) a montré que la distribution relative des dérivés d'esters d'acide cinnamique et d'acide benzoïque pouvait être fortement affectée par le vieillissement des échantillons, se traduisant notamment par la formation par réaction de condensation de nombreux esters non identifiés. En revanche, le profil triterpénique, préservé au sein de l'échantillon archéologique, comparable en de nombreux points au profil observé dans le cas des résines fraîches de *S. officinalis*, a donné lieu à une identification certaine de la source botanique de la résine grâce notamment aux dérivés atypiques de l'acide oléanolique possédant une fonction oxygénée (alcool ou cétone) en position C-6. Cette composante végétale s'est vue, par ailleurs, confirmée par la présence de benzofuranes spécifiques aux résines de styrax (égonol et homoégonol). Cette application en contexte archéologique a ainsi révélé la robustesse de ces triterpènes et de ces benzofuranes, faisant de ces deux dernières familles d'excellents biomarqueurs de *Styracaceae* en contexte archéologique.

L'enduit organique appliqué à la surface du crâne de Nahal Hemar se divise donc en deux parties : une base comprenant de la résine de *S. officinalis* directement appliquée au contact du crâne et une résille composée d'un mélange de styrax et de matière grasse comme en témoigne la présence d'esters lourds mais aussi de triglycérides (Figure 4.36) -même si la question d'une contamination se pose dans ce dernier cas-. Si le crâne de Nahal Hemar est déjà un cas archéologique unique de crânes modelés (objets rituels caractéristiques des premières sociétés du Moyen Orient à la période du PPNB) compte tenu de l'absence d'un enduit recouvrant le visage fait de chaux ou d'argile (Garfinkel, 1994, Verhoeven, 2002, Fletcher et *al.*, 2008), son originalité réside également dans l'incorporation d'une résine de *S. officinalis*. L'usage d'un tel matériau témoigne de la capacité de nos lointains ancêtres à observer et exploiter les ressources naturelles de leur environnement. Un tel motif décoratif atteste également de la créativité de ces hommes nous précédant de près de 10 000 ans.



Fig. 4.36 Eléments constitutifs de l'enduit organique appliqué à la base du crâne de Nahal Hemar (Israël) ainsi que des parties formant la résille mis en évidence par les analyses de GC-MS (*source de l'image* : Clara Amit, Israel Antiquities Authority).

Annexe du chapitre 4



4.10. Publication dans *Scientific Report*s (Solazzo et *al.*, 2016)

Les résultats des analyses en géochimie organique et en protéomique, réalisées sur différents objets archéologiques de Nahal Hemar sélectionnés, font l'objet d'un article scientifique qui a été publié en août 2016 dans le journal *Scientific Report*. Une copie de cet article est présentée ci-dessous.

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Identification of the earliest collagen- and plant-based coatings from Neolithic artefacts (Nahal Hemar cave, Israel)

Received: 27 January 2016
Accepted: 13 July 2016
Published: 09 August 2016

Caroline Solazzo[1], Blandine Courel[2], Jacques Connan[3], Bart E. van Dongen[4], Holly Barden[4], Kirsty Penkman[5], Sheila Taylor[5], Beatrice Demarchi[5], Pierre Adam[2], Philippe Schaeffer[2], Arie Nissenbaum[6], Ofer Bar-Yosef[7] & Michael Buckley[8]

Mortuary practices in human evolution record cognitive, social changes and technological innovations. The Neolithic Revolution in the Levant was a watershed in this domain that has long fascinated the archaeological community. Plaster modelled skulls are well known at Jericho and several other Neolithic sites, and in Nahal Hemar cave (Israel, ca. 8200 −7300 cal. BC) excavations yielded six unique human skulls covered with a black organic coating applied in a net pattern evoking a headdress. This small cave was used as storage for paraphernalia in the semi-arid area of the Judean desert and the dry conditions preserved other artefacts such as baskets coated with a similar dark substance. While previous analysis had revealed the presence of amino acids consistent with a collagen signature, in the present report, specific biomarkers were characterised using combined proteomic and lipid approaches. Basket samples yielded collagen and blood proteins of bovine origin (*Bos* genus) and a large sequence coverage of a plant protein charybdin (*Charybdis* genus). The skull residue samples were dominated by benzoate and cinnamate derivatives and triterpenes consistent with a styrax-type resin (*Styrax officinalis*), thus providing the earliest known evidence of an odoriferous plant resin used in combination with an animal product.

Mortuary practices and substances employed in rituals are considered as recording the diversity of social and technological evolution of past societies. Rich archaeological evidence from the Late Pleistocene and most of the Holocene lack the written documents reporting the underlying symbolism and its place in the ideology of the users of these techniques. Historical cases include artefacts such as vases containing myrrh[1], ceramics with birch bark tar[2], incense burners with frankincense[3], and mummies with remains of embalming organic materials like coniferous or *Pistacia* resins[4,5]. Although the treatment of the dead began during the Paleolithic period, the transition from foraging to farming, generally known as the Neolithic Revolution in the Levant, resulted in new social arrangements, a suite of technological inventions, and an unexpected diversity in mortuary practices and creations of human figures. The best known are the plaster modelled skulls and human statues[6–10], cultural features of the Pre-Pottery Neolithic B (PPNB) period in the Near East (ca. 8600 to 6200 BC). The skulls were found in Jericho, Ain Ghazal, Kefar HaHoresh, Yiftahel, Beisamoun and Tel Ramad and considered to have been involved in ritual practices and ancestors' cult. The plaster statues found only in Jericho and Ain Ghazal, that possibly stood in the village's shrine, were recovered from special dumping pits after they went out of use[9,10].

[1]Museum Conservation Institute, Smithsonian Institution, Suitland, MD 20746, USA. [2]Laboratoire de Biogéochimie Moléculaire, Institut de Chimie de Strasbourg, UMR 7177, Université de Strasbourg, 67200 Strasbourg, France. [3]23 rue Saint-Exupéry, 64000 Pau, France. [4]School of Earth, Atmospheric and Environmental Sciences, Williamson Research Centre for Molecular Environmental Science, University of Manchester, Manchester, M13 9PL, United Kingdom. [5]BioArCh, Department of Chemistry, University of York, York, YO10 5DD, United Kingdom. [6]Department of Earth and Planetary Sciences, Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel. [7]Department of Anthropology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA. [8]Faculty of Life Sciences, Manchester Institute of Biotechnology, University of Manchester, Manchester, M1 7DN, United Kingdom. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.S. (email: solazzo.c@gmail.com) or M.B. (email: m.buckley@manchester.ac.uk)

Layer	Material	Lab Number	^{14}C BP	Cal BC
1	cloth	OxA-1013	660 ± 200	1296 ± 168 A.D.
3A	charcoal	RT- 650	8100 ± 100	7061 ± 185
3A	charcoal	Pta-3650	8270 ± 80	7312 ± 122
3A	charcoal	BM-2298	8250 ± 70	7312 ± 122
3B	Knots of net	OxA-1014	8600 ± 120	7708 ± 146
3B	Twined napkin	OxA-1015	8500 ± 220	7975 ± 266
4	Linen yarn.1	Pta-3625	8850 ± 90	7986 ± 174
4	Linen yarn.2	BM-2299	9120 ± 300	8335 ± 422
4	Knotted fabric	OxA-1016	8810 ± 120	7940 ± 203

Table 1. Dates from Nahal Hemar obtained after the excavations in 1983 (calibrated by Calpal on line 2007, http://www.calpal-online.de).

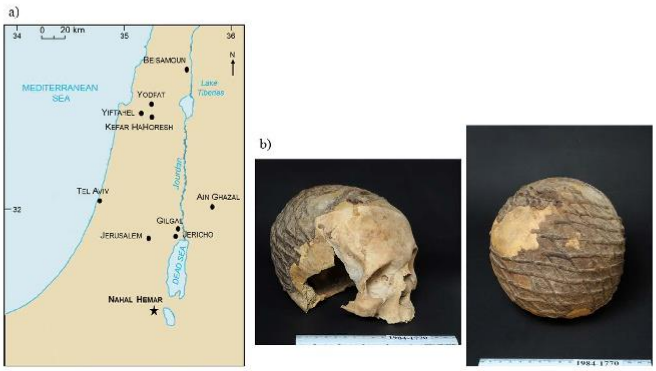


Figure 1. (**a**) Location of the Nahal Hemar cave, 17 kms west of the Dead Sea and of other Israeli PPNB sites mentioned in the article (map modified from https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/is.html, The World Factbook, Washington, DC: Central Intelligence Agency, 2016), (**b**) Human skull #515 with a net pattern decoration from which sub-samples NH2968 and NH2969 have been collected (accession number IAA No. 1984–1770, Photo Clara Amit, Courtesy of the Israel Antiquities Authority).

Here we report, in the context of examining the new Neolithic treatments of the dead, a unique set of six decorated skulls found in Nahal Hemar cave in the Judean Desert (Fig. 1a)[11–13]. The cave is a small, dark chamber probably used for storage of paraphernalia for planned ceremonies. The skulls were found in the lower layer (layer 4), where pieces of twined linen including a head gear and a napkin, baskets, painted wooden beads, a sickle, bone tools and a special type of flint blades, were found in 1982–3 and radiocarbon dated to 8210–7300 cal. BC (Table 1)[11] placing them in the Middle Pre-Pottery Neolithic B period (see SI). The skulls coating was directly dated to 8920–8430 cal. BC (Table 2). Contrary to the skulls modelled with lime plaster[8], those discovered in Nahal Hemar cave were treated differently. The cranial vault was covered with a thin layer of a brown-black substance and subsequently adorned with a similar material applied in a net pattern (Fig. 1b). In addition to these skulls, other well-preserved organic finds include fragments of baskets that were also coated with a black substance, as well as loose lumps of coating-like residue.

The origin of the people responsible for the Nahal Hemar artefacts is still unknown. Most of the finds including a stone mask, and especially the plant remains, were brought from the hilly region characterised by the Mediterranean vegetation belt. Similar stone masks were found in the general area south of Jerusalem[14]. Evidence from the carnelian bead indicates that the lapidary technique employed in piercing the rock was common in the northern Levant[15]. The proposal that the finds may have been made by a local desert tribe who favoured the cave for burial of cultic objects was suggested when the black substance lining of the skulls and baskets was first believed to correspond to bitumen, a locally accessible material[16] well-known for its water-resistant properties[17]. Examples of bitumen use have been found in the earlier PPNA age Gilgal I site in the Jordan Valley, dated to ca. 9,200 BC[18,19]. However, pyrolysis and amino acid analysis (by Mary Ann Gawinowicz, Columbia University, 1994) on a basket sample (#448, Table 2) and a flake (#672) of the loose coating-like material revealed a protein origin characterised by a collagen signature[18,20], which led to the suggestion of an early use of collagen as binding material (referred in the early studies as "glue") albeit with a tenuous link between the artefact types. The preparation and use of collagen-based material so early in prehistory was remarkable given that, in the area, the processing of

Artefacts[a]	Archaeological reference[a] and description	Sub-sample numbers[b]	Position	Period[c]	Composition
Organic Flake #672	"Resin": yellow lump, resin-like aspect	NH2824	Layer 3	7300–7050 cal. BC	Collagen
Basket #448	1208–210 B: Black lump with vegetal debris on surface	NH2825	Layer 4	—	Collagen, squill
	1208–210 C: Brown lump with vegetal imprint	NH2826			Collagen
Skull #515	Skull: Black lump of the basis	NH2968	Layer 4	8920–8430 cal. BC	Collagen, styrax
	Skull: Black lump of the net pattern	NH2969			Collagen, styrax

Table 2. Sample information and main results. [a]Accession numbers as given in Connan *et al.*[18]. [b]Laboratory references. [c]Radiocarbon dates obtained at the Weizmann Institute.

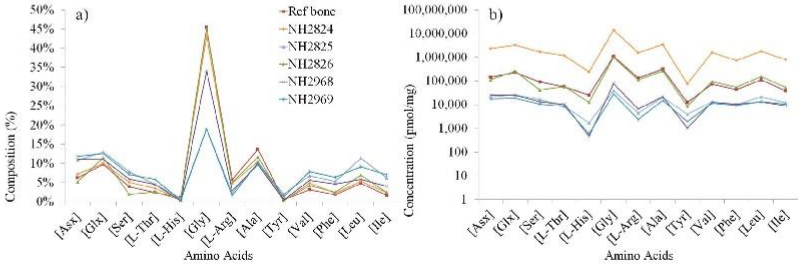


Figure 2. (**a**) Amino acid composition and (**b**) concentrations of the amino acids in the Nahal Hemar samples and in a reference bone sample (protein composition dominated by collagen). Note: the presence of amino acids in NH2969, not directly in contact with the skull, rules out the possibility of a contamination from skin and bones from the skull.

collagen into glue only appears much later during the 3rd millennium BC in Egypt where it was used on furniture items and as a painting binder[21]. Without further analysis or other Neolithic examples of glue production, the nature of the collagen was speculative. Modern analytical techniques have advanced greatly over the past two decades, particularly with respect to their applications to archaeological residue analysis. The exceptional nature of the Nahal Hemar archaeological site warranted a re-examination of these organic coating substances (Table 2) using some of these modern techniques, particularly protein analysis using proteomic methodologies and lipid analysis by gas chromatography mass spectrometry (GC/MS) and pyrolysis GC/MS (py-GC/MS) to identify the source of the collagen and detect potential additional components.

Results

Revisiting the collagen signatures. The RP-HPLC distribution of the amino acids obtained after hydrolysis of the basket and skull coating residues (Fig. 2, Table S1) was characterised by a high relative proportion of glycine (Fig. 2a) typically observed in collagen-dominated tissues such as bone[22]. Proline and hydroxyproline were not detected using this RP-HPLC method (as they are secondary amino acids and therefore not derivatised), but they were identified through GC/MS analyses (partial gas chromatograms shown in Figs S1–3). Amino acid concentrations in the basket subsample NH2825 and the skull coating subsamples were low. The basket subsample NH2826 had a concentration in amino acids typical of bone collagen (see bone reference Fig. 2b), but was still 15 times lower than NH2824, taken from a fragment with resin-like aspect found in a superior layer, previously identified as collagen in Connan *et al.*[18]. This sample served as a reference to assess the potential of collagen preservation in the cave and likely comes from gelatinised bone or skin (see Discussion). In addition, the Py-GC/MS data for this reference sample, shown in SI (Table S2 and Fig. S4A), revealed products of proline- and hydroxyproline-containing structural moieties from collagen proteins comprising pyrroline, pyrrole, diketopyrrole, and the 2,5-diketopiperazine derivatives (cyclic compounds of two amino acids) of Pro-Ala, Pro-Gly, Pro-Lys, and Pro-Pro. The predominance of these compounds supports a mostly pure collagen origin, and presence of peptides.

Of the four residue samples analysed these compounds were found only in basket sample NH2826 (Fig. S4C), but in lower relative quantities if compared to NH2824. A decrease in the relative quantity of these dimerization products has been associated with a disruption of the polymer chains or collagen degradation[23]. In the other basket sample NH2825, multiple pyridine and pyrrole derivatives (Table S2, Fig. S4B) were identified (in collagen these mainly correspond to pyrolysis products of Pro, Hyp and Ala)[23] but not the diketopyrrole and diketopiperazine derivatives.

Taxonomic sources of animal proteins. The more informative proteomic analyses identified the expected collagen type I (alpha-1 and -2) protein in both NH2826 and the reference flake NH2824 (Table 2) with

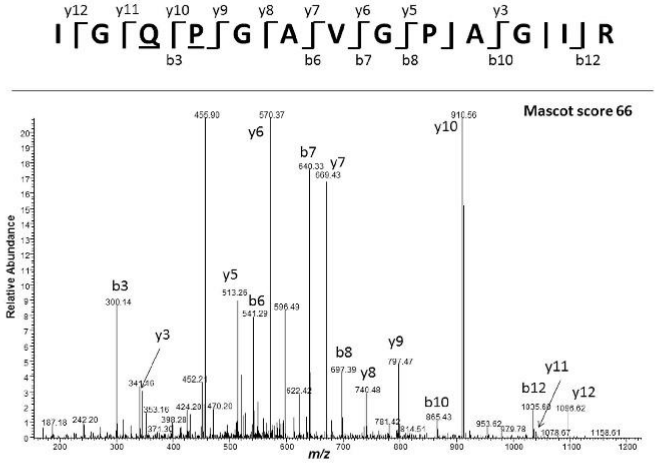


Figure 3. Tandem MS spectrum of IGQPGAVGPAGIR, M = 1208.651, with deamidation in Q_3 and hydroxylation in P_4 to Hyp from collagen alpha-2(I) chain CO1A2_BOVIN, identified by Mascot, from the basket sample NH2826.

respectively 25% and 61% percentage coverage for collagen α1(I) and 33% and 48% for collagen α2(I) (Tables S3 and S4) in agreement with the less well-preserved collagen observed in this basket sample compared to the flake. Both samples could be confidently identified as bovine (i.e., *Bos* given the geographical context), due to the presence of the species biomarker IGQPGAVGPAGIR from collagen α2(I)[24]. In NH2824, the peptide was identified at M = 1191.672 (M = 1207.667 with the proline residue P_4 modified to hydroxyproline) and at M = 1192.656 (Fig. S5) and 1208.651 with additional deamidation of the glutamine Q_3. In NH2826, the peptide was identified in its deamidated form only (Fig. 3).

In NH2824, the presence of blood was affirmed by the identification of bovine haemoglobins alpha and beta (44% and 47% percentage coverage respectively) and other major plasma proteins such as fibrinogen proteins (Table 3).

In addition to collagen, several other extracellular matrix (ECM) proteins, all belonging to the family of small leucine-rich repeat proteoglycans (SLRPs) and playing a role in the growth and organisation of collagen fibrils, were found. However the different types of SLRP proteins identified in NH2824 and NH2826 might be indicative of a different origin for the collagen, with the distribution in NH2826 more consistent with bone SLRPs. In NH2826, the SLRPs were characterised by fibromodulin (10% coverage) and biglycan (20% coverage) associated with collagen fibrillogenesis and by the aggrecan core protein (4% coverage) found in cartilage, while in NH2824 decorin, lumican and mimecan were found (Table 3, S3): decorin (26%) has a role in matrix assembly through interaction with type 1 collagen[25], lumican (21%) is another collagen-binding protein participating in collagen fibril assembly[26] mainly expressed in cornea, dermis and tendon[27], and mimecan (17%) is known to influence collagen fibril diameter and interfibrillar spacing[28].

Taxonomic sources of plant biomolecules. In the other basket (NH2825) and skull (NH2968 and NH2969) samples where the amino acid concentration was low, no collagen peptides were identified (Tables S4 and S5). In the basket sample NH2825 plant triterpenoids and sterols as well as plant pyrolysis products (furanones, guaiacol, cresol) were identified instead (Table S2, Fig. S4B) and the presence of a plant protein was confirmed with the identification of charybdin (percentage coverage of 55%, Table S4), a 29-kDa type 1 ribosome-inactivating protein (RIP) that was characterised and named in Touloupakis *et al.*[29] in the bulb of the white variety of *Charybdis maritima*. Two peptides were found to be unique to charybdin using Blast against all entries (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/): LTGQTYTDFIK (Fig. S6) and SLIVVSQMFCEATR (Fig. S7). Charybdis (or Drimia), known by its common name as sea squill (or sea onion), is native of the Mediterranean coastal regions and is represented by several species[30] (see SI for the taxonomy of Charybdis/Drimia), of which charybdin has to date only been sequenced from *C. maritima*. It is therefore possible that the charybdin protein identified in the basket originates from a *Charybdis* species not yet sequenced.

In contrast to the lipid extract from the collagenous sample NH2824, which is extremely low (0.5%, Table S6), the lipid extracts of the skull coating samples (NH2968 and NH2969) represent a significant part of the investigated materials (>67%, Table S6), suggesting that the latter comprise additional predominant solvent-soluble constituent(s). GC/MS analyses of these total lipid extracts (Fig. 4 and S8) revealed a botanical origin of this component, which is in agreement with py-GC/MS results (Fig. S4D,E). Indeed, besides the presence of phenolic compounds (phenols, guaiacols and syringols), which are typical of lignin[31], both samples contained a number

	Collagen	#	Blood	#	SLRPs	#	Charybdin	#	Others	#
Flake NH2824	α-1(I), α-2(I), α-1(VI), α-2(VI), α-3(VI)	138	Hemoglobin, Fibrinogen, Complement C3[a]	26	Decorin, Lumican, Mimecan	9	—	—	—	—
Basket NH2825	—	—	—	—	—	—	Ribosome-inactivating protein	6	—	—
Basket NH2826	α-1(I), α-2(I), α-3(VI)	29	[a]	—	Fibromodulin, Biglycan, Aggrecan core protein	7	—	—	Thrombospondin-1, Keratin cytoskeletal 1	7

Table 3. Proteomic results in sample NH2824 and basket samples NH2825/26: proteins matched with total number (#) of non-redundant peptides with score > 40; SLRP stands for Small-Leucine-Rich Proteins. [a]Serum albumin identified (although the identification of serum albumin may be genuine, it is ignored here as it is likely to be a column carry-over contaminant due to its generic use in proteomic laboratories as a standard, confirmed with it being present in our blank analyses). Details in SI.

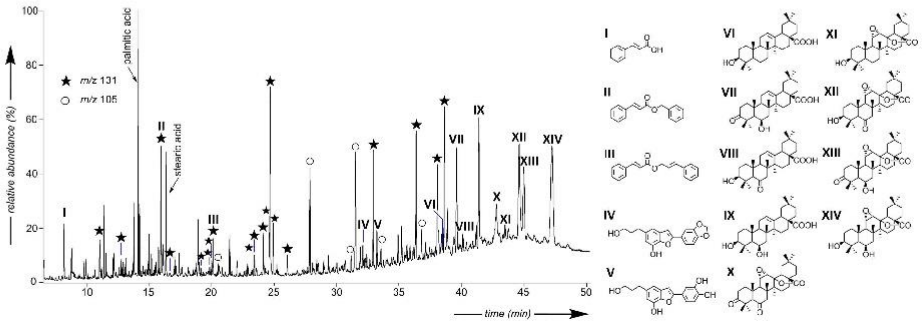


Figure 4. Gas chromatogram of the total lipid extract from the Neolithic skull (NH2968) found in the Nahal Hemar cave. Cinnamic (*m/z* 131) and benzoic (*m/z* 105) ester derivatives are identified respectively by filled stars and open circles. Alcohols are detected as acetates and acids as methyl esters.

of aromatic ester derivatives of cinnamic and benzoic acids, suggesting the contribution of a balsam, and more precisely, of a styrax-type resin. In the Mediterranean region this resin is exclusively produced in response to an incision of two types of trees: *Styrax officinalis* (*Styracaceae* family) and *L. orientalis* (*Hamamelidaceae* family). Both were known and utilised in antiquity, for example as an incense, medicinal or cosmetic product[32]. While their modern distribution (South of Europe and the Middle East[33] for the former, and the South of Turkey, Cyprus and Rhodes[34] for the latter) would favour *S. officinalis* as the source of the archaeological resin, both were considered as a potential match. GC/MS investigation of fresh *S. officinalis* (Fig. S9) and *L. orientalis* resins revealed the predominance of cinnamyl cinnamate (III, Fig. 4) in the former and cinnamyl cinnamate associated to 3-phenylpropanyl cinnamate in the latter. However, discrimination between these two botanical sources in the archaeological coating was not possible based on the distributions of cinnamate and benzoate derivatives, especially since the distribution of these derivatives may have been altered upon ageing. This would be in agreement with the detection of numerous cinnamate and benzoate derivatives (presence of characteristic fragments at *m/z* 105 or 131) specifically occurring among the lipids from the archaeological samples. However, these compounds could not be firmly identified based on their mass spectra and it is proposed that they correspond to alteration or condensation products of cinnamates and benzoates. Subsequently the chemotaxonomic potential of the triterpenes from the skull sub-samples NH2968 and NH2969 was investigated[35]. *L. orientalis* could be easily excluded as a source since the archaeological samples do not contain oleanonic acid, the predominant triterpene of *L. orientalis* according to our analysis of the fresh resin sample and the literature[36]. On the other hand, in addition to oleanolic acid (VI, Fig. 4) - a triterpene commonly found in plants[37] -, a series of unusual triterpenoids was identified based on their mass spectra in electron impact, supplemented by field-ionization for molecular weight determination. This compound series occurs in substantial relative amounts in sample NH2968 as well as in a fresh resin sample collected from a *S. officinalis* tree grown in Israel (Fig. 5). They correspond to 6β-hydroxy- or 6-keto- derivatives of oleanolic acid (VII-IX, Fig. 4, mass spectra in Fig. S10) previously reported to occur as minor components of the Asian styrax species *Styrax tonkinensis*[38]. The close similarity of the triterpenic composition of *S. officinalis* resin and the skull sample NH2968, supplemented by the presence, in the latter, of lignan compounds (IV and V, Fig. 4) typically found in the bark of *S. officinalis*[39], lead us to identify the resinic constituent of the skull sample as an exudate from *S. officinalis*. Finally, the late eluting compounds in the archaeological sample (X–XIV, Fig. 4), absent from the fresh resin sample (Fig. 5), were identified as epoxylactone triterpenoids structurally related to triterpenoids (VI-IX, mass spectra in Fig. S11)[38] and representing their alteration products (similar compounds have notably been observed after oxidative experiments on oleanolic and ursolic acids using

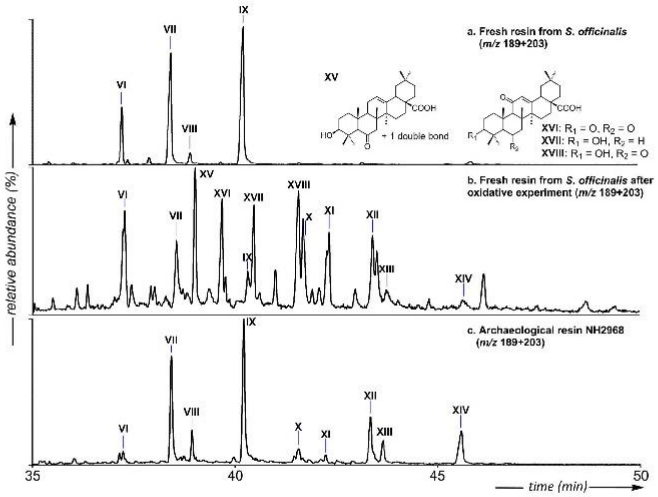


Figure 5. Partial GC/MS chromatogram showing the distribution of triterpenoids presenting fragment(s) at *m/z* 189 + 203 in (**a**) the fresh resin of *S. officinalis* collected at Yodfat (Israel), (**b**) the fresh resin after 13 hours of oxidative treatment, (**c**) the archaeological skull sample NH2968. Alcohols are detected as acetates and acids as methyl esters. Compound numbers **VI–XIV** refer to the structures reported on Fig. 4.

irradiation or chemical reactants)[40,41]. This was confirmed by means of a laboratory experiment using fresh resin of *S. officinalis* under radical oxidative conditions, compounds VI to IX being affected by autoxidation processes and leading to compounds X-XIV (Fig. 5).

Discussion

Preservation. The cave (about 8 × 4 m) is located on the eastern, drier slope of a cliff on the right bank of the Nahal Hemar and has a narrow entrance (about 1.0 × 0.7 m), guaranteeing relatively stable environmental conditions[12] (a mean annual temperature of 20 °C and an average precipitation of 100 mm)[42]. The organic compounds found on the archaeological artefacts have benefitted from undergoing relatively limited degradation in the cave context as compared to open-air sites in the region, known for poor biomolecular preservation[43]. The identification of small proteins such as SLRPs is indeed quite remarkable, as these proteins have not been reported in studies of animal binders[44,45], or in the recent characterisation of collagen adhesives from archaeological sites with good organic preservation: in Switzerland (Neolithic waterlogged site in Zurich)[46], and in China (Bronze Age Xiaohe Cemetery, Taklamakan Desert)[47]. They were however identified in 43 and 700 ka old animal bones found in permafrost[48,49]. The exceptional preservation of the proteins from the collagen flake in particular (with high coverages of the collagen proteins) gives a proxy for the potential for preservation of the organics directly related to artefacts recovered from within the cave. However, as the flake itself has been radiocarbon dated as at least a thousand years younger than the layer in which the artefacts were found, it gives little clue as to the manufacture of the collagen coating. It is plausible that the gelatinous flake might simply be a natural product of diagenesis of skin and/or bone (a rare phenomenon but observed in cave sites elsewhere in the Mediterranean)[50], rather than remnants left by the PPNB visitors of the cave producing the coating substance for their artefacts. Indeed, the original archaeological report of the cave mentions that "a sticky non-greasy, water-soluble substance was found to exude from many of the mammal bones. This could be concentrated urine, or some kind of dung extract. The material also had a pungent odour"[51].

The presence of collagen, while attested in all samples by their amino acid composition (especially Gly, Pro, Hyp), was confirmed by proteomics only in the samples that presented a high concentration of amino acids. Interestingly, in the cases where the amino acid concentration was low, it was shown that the collagen was mixed with a plant product. It is possible that the addition of these plant-based products, particularly the resin, might have hampered collagen extraction (resulting in low collagen concentration as detected by mass spectrometric analysis) or alternatively contributed to the breakdown of the collagen (as indicated by the absence of diketopyrrole and diketopiperazine derivatives), perhaps as a result of processing the material. In addition, the recovered organic matter would have undergone some degradation upon ageing, as indicated by the presence of oxidized derivatives of triterpenoids. Such alteration processes could explain the presence of numerous unidentified cinnamate and benzoate derivatives (base peak fragments at *m/z* 131 and 105) in the archaeological sample (Fig. 4), which may be formed by coupling reactions between benzoic and cinnamic acids and other constituents of the organic substance.

Archaeological significance. The baskets in Nahal Hemar were made in the close twining technique with twisted strands of plants (reeds, rushes or grasses)[52] and were coated on the inner and outer surfaces, most likely for lining/waterproofing the baskets. But as only fragments remain, such as in basket #448, it is not known which sub-sample corresponds to the inner or the outer surface. Despite this, both sub-samples show very different results, with one (NH2826) yielding matches to bovine collagen and little else, whereas another (NH2825) yielded remarkably high amounts of a sea squill protein. This is the earliest find of a protein of botanical origin identified in archaeological organic residues (cereal proteins have been identified in a 2500-year old bread from China)[53]; the identification of this sea squill protein may have been facilitated by the natural abundance of charybdin, the main protein constituent in the large bulb of this particular plant[29] (see SI). The distribution of amino acids in charybdin (Fig. S12) is characterised by a low percentage of glycine, indicating that about twice as much charybdin is necessary to bring the concentration of glycine to its 19% value in NH2825 (compared to 45% in NH2826). Such a difference either indicates that the plant was intentionally mixed with the collagen in NH2825 (which would also be in agreement with the presence of plant triterpenoids and phytosteroids in the lipid extract, as well as plant pyrolysis products) or that a substantial amount of contamination was introduced during the use of the artefact (such as leaching during storage and/or transport of the sea squill plant in the basket). Sea squill (also called medicinal squill) has been known since antiquity and its bulb used for its pharmaceutical properties such as diuretic and cardiotonic[29]. Considering its importance, it is possible that the plant was used as early as the Neolithic and took part in the ritual practices carried out within the cave.

Likewise, the choice of collagen as raw material for the coating, considering the presence of natural asphalts between the cave (now inaccessible from ground level) and the valley, as well as the widespread use of bitumen during the Neolithic period, is intriguing. At the time of the cave occupation, the wadi bottom was completely filled with sediments (as confirmed by the discovery of hyena remains in the superficial archaeological layers)[54] which allowed access to the cave but is likely to have covered the oil seep so it is plausible that people might not have been aware of its presence[16]. Another possibility is that the objects were imported to the cave, perhaps over long distances, by people who did not use bitumen[54]. Without other evidence of similar manufacturing, it is however difficult to determine if this represents an established practice or a single event. In the basket at least, the collagen was unambiguously identified as bovine. Placed in the Neolithic context, this finding is significant considering the importance that cattle had in this period, whether for ritual (wild cattle burial)[55] or for secondary products[56]. The cattle bones found in Nahal Hemar are large and either from aurochs or from a large domestic cattle[51]: as no cut marks were found, they might have been placed there for ritual purposes as well.

The application of the styrax resin on the skulls is more comprehensible in the cultural context. This fragrant resin could have been used to perfume these ritual objects, considered by some archaeologists as artefacts for an ancestor cult, and by others as the seat of the life-force honoured by people to ensure fecundity and well-being[10]. The first mention of styrax resin in ancient texts is dated from the 5th c. BC in the travel writings of Herodotus[57], about 7500 years after the occupation of the Nahal Hemar cave. Scientific evidence of the use of styrax in an archaeological context is extremely rare in the literature and the oldest evidence[1], to the best of our knowledge, corresponds to a resin (analytical results not detailed in the paper) collected in Egyptian vestiges from the XIIth and XIIIth dynasty. This conclusion was made by comparison with a commercial resin, but based on the present work, it appears that all the resins commercially available under the label "*Styrax officinalis*" that we have investigated turned out to be mixtures of substances of other origins. This can be explained by the difficulty of obtaining resin from *S. officinalis*, which is only produced under specific conditions (suitable climate, in response to an intentional incision or injury of the bark) and with an extremely low yield[32]. Concerning our own sampling of fresh resin, it took a long period of time to collect sufficient amounts (a few milligrams) of resin for analytical purposes, and pure resin could not be obtained (resin was mixed with bark). It seems likely that Neolithic people produced the resin in the same manner as we did, which explains the presence of lignans IV and V (Fig. 4)- typical constituents of the bark from *S. officinalis*[39]- both in the archaeological and in the fresh resin samples. In any case, the identification of *S. officinalis* resin within the ingredients of the decorative organic coating of the skull corresponds to the earliest evidence of the use of an odoriferous resin in a cultural context.

Conclusions

The new analytical evidence obtained in this study has highlighted the diversity of materials comprising the exceptionally well-preserved organic coatings from artefacts of the Nahal Hemar cave, more than 10,000 years old. The complexity and originality of these coatings, in particular the addition of an odoriferous resin only on the skulls (possibly due to its rarity and efforts required to obtain sufficient quantity), is unique and the earliest known evidence of the use of these animal and plant products in the Near East. It represents a rare insight into the capacity of Neolithic people who already domesticated various cereals, chickpeas, broad bean, as well as goat, sheep, cattle and pigs that allowed for stable and flourishing economy that drove the social systems into initial hierarchies. Domestic building constructed from stone and mudbricks saw also the investments in carving tall, incised T-shaped limestone pillars for the construction of the ceremonial center of Göbekli Tepe. In this dynamic Levantine society technological inventions were made for domestic purposes such as digging wells and for scheduled rituals. Flax, already used for making strings, was domesticated, and employed in making textiles by twining. In the Neolithic villages extensive use of lime plaster was practiced for the domestic and holy buildings as well as shaping human statues, and modelling skulls and in the rare case described above, with collagen. The presence of artisans is attested in the lapidary technique for beads' production and carving of stone masks. Several of the earliest Neolithic inventions demonstrating the experimental efforts needed to

optimise resources for practical (strengthening baskets) and cultural purposes (decorated skulls) were uncovered in the dry Nahal Hemar cave in the Judean desert, Israel.

Methods

All archaeological samples are sub-samples from the materials analysed in the original 1995 study[18], originally obtained from the Israel Museum. Fresh resins of *L. orientalis* and *S. officinalis* were used for comparative GC/MS analyses: the first was obtained from ROBERTET Company and the second, not commercially available, was collected directly on a tree certified as *S. officinalis* and located at Yodfat in Israel (32°50′13.25″ N, 35°16′17.19″E).

Pyrolysis gas-chromatography mass spectrometry (py-GC/MS) analysis. All samples were analysed by normal flash pyrolysis GC/MS. The samples were pyrolysed using a CDS (Chemical Data Systems) 5200 series pyroprobe pyrolysis unit by heating at 600 °C for 20 s to fragment macromolecular components. These fragments were then analysed using an Agilent 7890A gas chromatograph fitted with a HP-5 fused column (J&W Scientific; 5% diphenyl-dimethylpolysiloxane; 30 m, 0.32 mm i.d., 0.25 μm film thickness) coupled to an Agilent 5975C MSD single quadrupole mass spectrometer operated in electron ionization (EI) mode (scanning a range of *m/z* 50–650 at 1 scan s^{-1} with a 1 minute solvent delay; ionization energy 70 eV). The pyrolysis transfer line and injector port temperatures were set at 350 °C, the heated interface at 280 °C, the EI source at 230 °C and the MS quadrupole at 150 °C. Helium was used as the carrier gas and the samples were introduced in split mode in a ratio of 5:1. The oven was programmed from 40 °C (held for 5 minutes) to 250 °C at 4 °C min^{-1}, then to 320 °C at 20 °C min^{-1}, were it was kept for 5 min. Compounds were identified by comparison with spectra from the literature.

Gas-chromatography mass spectrometry (GC/MS). The lipid material from the archaeological samples (20–500 mg) was extracted by sonication using a mixture of dichloromethane (DCM)/methanol (MeOH) (1:1, v/v) by adaptation of an established protocol[58]. After filtration through celite, the solvents were removed under reduced pressure to obtain the total lipid extract (TLE). An aliquot of the TLE, dissolved in DCM, was acetylated using 1 mL of acetic anhydride and 20 μL of N-methylimidazole (catalyst) at ambient temperature for 20 min. After addition of MeOH followed by removal of the residual reactants and solvent under reduced pressure, the acetylated extract was esterified with diazomethane in diethyl ether (1 mL) at ambient temperature for 30 min. The excess of diazomethane was removed under a nitrogen flux and the derivatized TLE was then fractionated on a silica gel column into an apolar fraction (elution with DCM/ethyl acetate (EtOAc), 8:2 v/v) analysed by GC/MS and GC/HRMS, and a more polar fraction (elution with DCM/MeOH (1:1 v/v) not further investigated. Sample material remaining after lipid extraction (the "residue") was subjected to acid methanolysis with CH_3OH/HCl (6N, 110 °C, 7 to 9 h). After liquid-liquid extraction, the aqueous phase was recovered and the released amino acids were derivatized first using BuOH/HCl (3N, 12 mL, 100 °C, 1 h) and secondly, after evaporation under reduced pressure, with trifluoroacetic anhydride (3 mL, ambient temperature, 3 h). The residual reactants were removed by evaporation to dryness under N_2. Before GC/MS injection, separation of the constituents was performed on a silica gel column following the protocol described in literature[58]. To perform the oxidation experiment on a fresh sample of *S. officinalis* resin, acetonitrile (ACN, 5 mL), *tert*-butyl-hydroperoxide (5,5 M in decane, 500 μL) and azobisisobutyronitrile (15 mg) were added in this order to about 10 mg of TLE of the resin and the reaction was operated at 50 °C for 13 h under an air atmosphere. Following liquid-liquid extraction, the organic phase was collected and treated as described previously prior to GC/MS analysis. GC/MS analyses were performed on a Thermo Scientific GC Trace Ultra gas chromatograph equipped with a programmed temperature vaporizing injector and a HP5 MS column (30 m, 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness) connected to a triple quadripole Thermo Scientific TSQ Quantum mass spectrometer using helium as carrier gas and the following temperature program: 70 °C (held for 1 min) to 200 °C at 10 °C min^{-1}, then to 320 °C at 4 °C min^{-1} followed by an isothermal period of 40 min. The transfer line temperature was set at 320 °C. MS spectra were collected in electron impact (ionization voltage of 70 eV) or in chemical ionisation mode (isobutane as gas reactant gas) and registered in full-scan mode (scan from 50 to 800 *m/z*).

GC/MS analyses in the field ionization mode (FI) were carried out on a Agilent Technologies 7890A gas chromatograph coupled to a JEOL Accu TOF GCV JMS-T100GCV mass spectrometer using a scan from 35 to 800 *m/z*. The instrument was equipped with a split/splitless injector used in a splitless mode and a DB5UI column (20 m, 0.18 mm i.d., 0.18 μm film thickness) using helium as carrier gas and the following temperature program: 70 °C (held for 1 min) to 200 °C at 10 °C min^{-1}, then to 320 °C at 4 °C min^{-1} followed by an isothermal period of 10 min.

Amino acid analysis. In total 28 amino acid analyses were undertaken on:

1 subsample of NH2824 (NEaar 7742; NH2824O-3), analysed in triplicate.

2 subsamples of basket sample 448-1208-210 NH2825 (NEaar 9127–9128; NH2825.1–2), each analysed singly or in duplicate.

3 subsamples of basket sample 448-1208-210 NH2826 (NEaar 9997–9999; NH2826.1–3), each analysed at least in duplicate.

3 subsamples of NH2968 (NEaar 10000–2; NH2968.1–3), each analysed singly or in duplicate.

3 subsamples of NH2969 (NEaar 10003–5; NH2969.1–3), each analysed in duplicate.

Samples were prepared using modified procedures of Penkman and Penkman *et al.*[59,60]. NH2824 was bleached before analysis, involving treatment with 12% NaOCl for 15 seconds, the bleach removed by rinsing with water and methanol, and then dried overnight in the fume hood. All samples were treated with 7 M HCl under

N_2 at 110 °C for 24 h (H*), referred to as the 'total hydrolysable' amino acid' fraction (THAA), to release the peptide-bound amino acids, thus yielding the 'total' amino acid concentration. Samples were then dried by centrifugal evaporator and rehydrated for reversed phase high pressure liquid chromatography (RP-HPLC) analysis with 0.01 mM L-homo-arginine as an internal standard. The primary amino acid compositions of the samples were analysed in duplicate by an Agilent 1100 HPLC using fluorescence detection following a modified method of Kaufman and Manley[61]. During preparative hydrolysis both asparagine and glutamine undergo rapid irreversible deamidation to aspartic acid and glutamic acid respectively[62]. It is therefore not possible to distinguish between the acidic amino acids and their derivatives and they are reported together as Asx and Glx.

Proteomic analysis. The sample was resuspended in 200 µL 50 mM ammonium bicarbonate, heated for 3 hours at 65 °C and digested with 1 µL of 1 µg µL^{-1} trypsin. The solution was then acidified to 0.1% trifluoroacetic acid (TFA), sample clean-up using a C_{18} pipette tip was carried out into 50% acetonitrile (ACN) and the solution of eluted peptides concentrated by evaporation and resuspension in 10 µL 0.1% TFA. 1 µL of sample was then analysed by LC-MS/MS (Waters nanoAcquity UPLC coupled to a Thermo Scientific LTQ Velos Dual Pressure Linear Ion Trap mass spectrometer) on which the peptides were concentrated on a pre-column (20 mm x 180 µm) then separated on a 1.7 µM Waters nanoAcquity BEH (Ethylene Bridged Hybrid) C_{18} analytical column (75 mm × 250µm i.d.), using a gradient from 99% buffer A (0.1% formic acid (FA) in H_2O)/1% buffer B (0.1% FA in ACN) to 25% B in 45 min at 200 nL min^{-1}. Peptides were selected for fragmentation automatically by data dependent analysis. Proteomics data files were searched using Mascot v2.2.06 (Matrix Science) against the publicly available UniProt (Universal Protein Resource) database (www.uniprot.org). Standard searches were carried out using two missed cleavages, error tolerances of 0.5 *m/z* units (MS and MS/MS) and variable oxidation of methionine and hydroxylation of proline and lysine and deamidation of asparagines and glutamine modifications. Raw files have been made available on PeptideAtlas (http://www.peptideatlas.org/PASS/PASS00915).

References

1. Goyon, J.-C., Archier, P., Coen, S. & Vieillescazes, C. Contribution de la chimie analytique à l'étude de vestiges de la XII^{e} ou XIII^{e} dynastie égyptienne. *SAK* **27,** 107–121 (1999).
2. Lucquin, A., March, R. J. & Cassen, S. Analysis of adhering organic residues of two "coupes-à-socles" from the Neolithic funerary site "La Hougue Bie" in Jersey: evidences of birch bark tar utilisation. *J. Archaeol. Sci.* **34,** 704–710 (2007).
3. Mathe, C., Connan, J., Archier, P., Mouton, M. & Vieillescazes, C. Analysis of frankincense in archaeological samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Ann. Chim.* **97,** 433–445 (2007).
4. Buckley, S. A. & Evershed, R. P. Organic chemistry of embalming agents in Pharaonic and Graeco-Roman mummies. *Nature* **413,** 837–841 (2001).
5. Charrié-Duhaut, A. *et al.* The canopic jars of Rameses II: real use revealed by molecular study of organic residues. *J. Archaeol. Sci.* **34,** 957–967 (2007).
6. Fletcher, A., Pearson, J. & Ambers, J. The manipulation of social and physical identity in the Pre-Pottery Neolithic. *Camb. Archaeol. J.* **18,** 309–325 (2008).
7. Garfinkel, Y. Ritual burial of cultic objects: the earliest evidence. *Camb. Archaeol. J.* **4,** 159–188 (1994).
8. Goren, Y., Goring-Morris, A. N. & Segal, I. The technology of skull modelling in the pre-pottery neolithic B (PPNB): regional variability, the relation of technology and iconography and their archaeological implications. *J. Archaeol. Sci.* **28,** 671–690 (2001).
9. Rose, J. C., Schmandt-Besserat, D. & Rollefson, G. O. A decorated skull from MPPNB 'Ain Ghazal. *Paléorient* **24,** 99–104 (1998).
10. Verhoeven, M. Ritual and ideology in the pre-pottery Neolithic B of the Levant and Southeast Anatolia. *Camb. Archaeol. J.* **12,** 233–258 (2002).
11. Arensburg, B. & Hershkovitz, I. Neolithic Human remains. *Atiqot* **18,** 50–58 (1988).
12. Bar-Yosef, O. & Alon, D. Nahal Hemar cave. The excavations. *Atiqot* **18,** 1–30 (1988).
13. Yakar, R. & Hershkovitz, I. The modelled skulls. *Atiqot* **18,** 59–63 (1988).
14. Hershman, D. *Face to Face: The Oldest Masks in the World*. (The Israel Museum, Jerusalem, 2014).
15. Groman-Yaroslavski, I. & Bar-Yosef Mayer, D. E. Lapidary technology revealed by functional analysis of carnelian beads from the early Neolithic site of Nahal Hemar Cave, southern Levant. *J. Archaeol. Sci.* **58,** 77–88 (2015).
16. Connan, J. La colle au collagène, innovation du néolithique. *La Recherche* **284,** 33 (1996).
17. Connan, J. In *Le bitume dans l'Antiquité* (ed Errance) 272 (Actes Sud, 2012).
18. Connan, J., Nissenbaum, A. & Dessort, D. *Geochemical study of Neolithic "bitumen"-coated objects of the Nahal Hemar cave in the Dead Sea area in Organic Geochemistry: Developments and Applications to Energy, Climate, Environment and Human History* (eds Grimalt, J.O. & Dorronsoro, C.) 699–701 (AIGOA, 1995).
19. Tamar, N. & Gilgal, I. A Pre-Pottery Neolithic site, Israel. The 1985–1987 seasons. *Paléorient* **15,** 11–18 (1989).
20. Nissenbaum, A. Eight-thousand-year-old collagen from an Israeli cave. *Archaeologia Umadaèi Hateva* **5,** 5–10 (1997).
21. Newman, R. & Serpico, M. *Adhesives and binders*. (Cambridge University Press, 2000).
22. Buckley, M. *et al.* Comparing the survival of osteocalcin and mtDNA in archaeological bone from four European sites. *J. Archaeol. Sci.* **35,** 1756–1764 (2008).
23. Kaal, J., López-Costas, O. & Martínez Cortizas, A. Diagenetic effects on pyrolysis fingerprints of extracted collagen in archaeological human bones from NW Spain, as determined by pyrolysis-GC-MS. *J. Archaeol. Sci.* **65,** 1–10 (2016).
24. Buckley, M., Collins, M., Thomas-Oates, J. & Wilson, J. C. Species identification by analysis of bone collagen using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **23,** 3843–3854 (2009).
25. Waddington, R. J., Roberts, H. C., Sugars, R. V. & Schönherr, E. Differential roles for small Leucine-rich Proteoglycans in bone formation. *Eur. Cell Mater.* **6,** 12–21 (2003).
26. Nikitovic, D., Katonis, P., Tsatsakis, A., Karamanos, N. K. & Tzanakakis, G. N. Lumican, a small leucine-rich proteoglycan. *Iubmb Life* **60,** 818–823 (2008).
27. Lamoureux, F., Baud'huin, M., Duplomb, L., Heymann, D. & Rédini, F. Proteoglycans: key partners in bone cell biology. *BioEssays* **29,** 758–771 (2007).
28. Tasheva, E. S. *et al.* Mimecan/osteoglycin-deficient mice have collagen fibril abnormalities. *Mol. Vis.* **8,** 407–415 (2002).
29. Touloupakis, E. *et al.* Isolation, characterization, sequencing and crystal structure of charybdin, a type 1 ribosome-inactivating protein from *Charybdis maritima* agg. *Febs J.* **273,** 2684–2692 (2006).
30. Pfosser, M. F. & Speta, F. From *Scylla* to *Charybdis* - is our voyage safer now? *Plant Syst. Evol.* **246,** 245–263 (2004).

31. Branca, C., Giudicianni, P. & Di Blasi, C. GC/MS Characterization of liquids generated from low-temperature pyrolysis of wood. *Ind. Eng. Chem. Res.* **42,** 3190–3202 (2003).
32. Amigues, S. Le styrax et ses usages antiques. *Journal des savants*, 261–318 (2007).
33. Fritsch, P. Isozyme analysis of intercontinental disjuncts within styrax (Styracaceae): implications for the Madrean-Tethyan hypothesis. *Am. J. Bot.* **83,** 342–355 (1996).
34. Öztürk, M., Çelik, A., Güvensen, A. & Hamzaoğlu, E. Ecology of tertiary relict endemic *Liquidambar orientalis* Mill. forests. *For. Ecol. Manage.* **256,** 510–518 (2008).
35. Provan, G. J. & Waterman, P. G. Major triterpenes from the resins of *Commiphora incisa* and *C. kua* and their potential chemotaxonomic significance. *Phytochemistry* **27,** 3841–3843 (1988).
36. Pastorova, I., Weeding, T. & Boon, J. J. 3-Phenylpropanylcinnamate, a copolymer unit in Siegburgite fossil resin: a proposed marker for the Hammamelidaceae. *Org. Geochem.* **29,** 1381–1393 (1998).
37. Jäger, S., Trojan, H., Kopp, T., Laszczyk, M. & Scheffler, A. Pentacyclic triterpene distribution in various plants-rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules* **14,** 2016 (2009).
38. Wang, F., Hua, H., Pei, Y., Chen, D. & Jing, Y. Triterpenoids from the resin of *Styrax tonkinensis* and their antiproliferative and differentiation effects in human leukemia HL-60 cells. *J. Nat. Prod.* **69,** 807–810 (2006).
39. Pauletti, P. M., Teles, H. L., Silva, D. H. S., Araújo, Â. R. & Bolzani, V. S. The Styracaceae. *Rev. Bras. Farmacogn.* **16,** 576–590 (2006).
40. Kitagawa, I., Kitazawa, K. & Yosioka, I. Photooxidation of oleanolic acid: formation of 11α, 12α-epoxy- and 12α-hydroxy-oleanolic lactones. *Tetrahedron Lett.* **9,** 509–512 (1968).
41. Majumder, P. L. & Bagchi, A. Oxidative transformations of triterpenoids of the ursane and oleanane skeleta with hydrogen peroxide. Introduction of 11,12-double bond and 13(28)oxide moiety in the ursane system. *Tetrahedron* **39,** 649–655 (1983).
42. Kislev, M. E. Desiccated plant remains: an interim report. *Atiqot* **18,** 76–81 (1988).
43. Kahila Bar-Gal, G., Ducos, P. & Kolska Horwitz, L. The application of ancient DNA analysis to identify neolithic caprinae: a case study from the site of Hatoula, Israel. Int. J. *Osteoarchaeol.* **13,** 120–131 (2003).
44. Dallongeville, S. *et al.* Identification of animal glue species in artworks using proteomics: application to a 18th century gilt sample. *Anal. Chem.* **83,** 9431–9437 (2011).
45. Leo, G. *et al.* Proteomic strategies for the identification of proteinaceous binders in paintings. *Anal. Bioanal. Chem.* **395,** 2269–2280 (2009).
46. Bleicher, N., Kelstrup, C., Olsen, J. V. & Cappellini, E. Molecular evidence of use of hide glue in 4th millennium BC Europe. *J. Archaeol. Sci.* **63,** 65–71 (2015).
47. Rao, H. *et al.* Proteomic identification of adhesive on a bone sculpture-inlaid wooden artifact from the Xiaohe Cemetery, Xinjiang, China. *J. Archaeol. Sci.* **53,** 148–155 (2015).
48. Cappellini, E. *et al.* Proteomic analysis of a Pleistocene mammoth femur reveals more than one hundred ancient bone proteins. *J. Proteome Res.* **11,** 917–926 (2012).
49. Orlando, L. *et al.* Recalibrating Equus evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse. *Nature* **499,** 74–78 (2013).
50. Freeman, L. G. & Echegaray, J. G. Aurignacian structural features and burials at Cueva Morin (Santander, Spain). *Nature* **226,** 722–726 (1970).
51. Davis, S. J. M. The larger mammal remains. *Atiqot* **18,** 68–71 (1988).
52. Schick, T. Cordage, basketry and fabrics. *Atiqot* **18,** 31–43 (1988).
53. Shevchenko, A. *et al.* Proteomics identifies the composition and manufacturing recipe of the 2500-year old sourdough bread from Subeixi cemetery in China. *J. Proteomics* **105,** 363–371 (2014).
54. Bar-Yosef, O. *A cave in the desert: Nahal Hemar 9000-year old-finds*. Vol. 258 (The Israel Museum, 1985).
55. Goring-Morris, N. & Horwitz, L. K. Funerals and feasts during the Pre-Pottery Neolithic B of the Near East. *Antiquity* **81,** 902–919 (2007).
56. Evershed, R. P. *et al.* Earliest date for milk use in the Near East and southeastern Europe linked to cattle herding. *Nature* **455,** 528–531 (2008).
57. Hérodote. *L'Enquête. Livre I à IV, translation Barguet A.* (Gallimard collection folio classique, 1985).
58. Schnell, G. *et al.* Contrasting diagenetic pathways of higher plant triterpenoids in buried wood as a function of tree species. *Org. Geochem.* **66,** 107–124 (2014).
59. Penkman, K. E. H. *Amino acid geochronology: a closed system approach to test and refine the UK model*. Unpublished PhD thesis, University of Newcastle (2005).
60. Penkman, K. E. H., Kaufman, D. S., Maddy, D. & Collins, M. J. Closed-system behaviour of the intra-crystalline fraction of amino acids in mollusc shells. *Quat. Geochronol.* **3,** 2–25 (2008).
61. Kaufman, D. S. & Manley, W. F. A new procedure for determining dl amino acid ratios in fossils using reverse phase liquid chromatography. *Quat. Sci. Rev.* **17,** 987–1000 (1998).
62. Hill, R. L. Hydrolysis of proteins. *Advances in Protein Chemistry* **20,** 37–107 (1965).

Acknowledgements

We thank Prof. Z. Ammar, Prof. M. Kislev (Bar Ilan University) and Prof. A. Dafni (Haifa University) for kindly providing the resin of *S. officinalis*, A. Lobstein (Strasbourg University) and Dr. Frédéric Bonté (LVMH Research) for the resin of *L. orientalis*, P. Wehrung and E. Motsch (Strasbourg University) for the mass spectrometry analyses. The proteomics and py-GC/MS work was supported by a Royal Society University Research Fellowship (University of Manchester), and by a Burch Fellowship in Theoretical Medicine and Affiliated Sciences (Smithsonian Institution). The amino acid analyses were supported by the Leverhulme Trust.

Author Contributions

J.C. and A.N. provided samples and original documentation, and reviewed the manuscript. B.C. conducted GC and GC/MS analysis. B.E.v.D. and H.B. conducted py-GC/MS analysis. K.P., S.T. and B.D. conducted amino acid analysis. M.B. conducted proteomics analysis. C.S., B.C., P.A., P.S., K.P., B.E.v.D. and M.B. analysed data. C.S., B.C., P.A., P.S., B.E.v.D., K.P., O.B.-Y. and M.B. wrote the paper.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at http://www.nature.com/srep

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Solazzo, C. *et al.* Identification of the earliest collagen- and plant-based coatings from Neolithic artefacts (Nahal Hemar cave, Israel). *Sci. Rep.* **6**, 31053; doi: 10.1038/srep31053 (2016).

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

© The Author(s) 2016

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Identification of the earliest collagen- and plant-based coatings from Neolithic artefacts (Nahal Hemar cave, Israel)

Caroline Solazzo[1], Blandine Courel[2], Jacques Connan[3], Bart E. van Dongen[4], Holly Barden[4], Kirsty Penkman[5], Sheila Taylor[5], Beatrice Demarchi[5], Pierre Adam[2], Philippe Schaeffer[2], Arie Nissenbaum[6], Ofer Bar-Yosef[7], Mike Buckley[8]

[1] Museum Conservation Institute, Smithsonian Institution, Suitland, MD 20746

[2] Laboratoire de Biogéochimie Moléculaire, Institut de Chimie de Strasbourg, UMR 7177, Université de Strasbourg, 67200 Strasbourg, France

[3] 23 rue Saint-Exupéry, 64000 Pau, France

[4] School of Earth, Atmospheric and Environmental Sciences, Williamson Research Centre for Molecular Environmental Science, University of Manchester, Manchester, M13 9PL, United Kingdom

[5] BioArCh, Department of Chemistry, University of York, York, YO10 5DD, United Kingdom

[6] Department of Earth and Planetary Sciences, Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel

[7] Department of Anthropology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA

[8] Faculty of Life Sciences, Manchester Institute of Biotechnology, University of Manchester, Manchester, M1 7DN, United Kingdom

Corresponding authors:

Solazzo Caroline, solazzo.c@gmail.com,
Museum Conservation Institute, Smithsonian Institution, Suitland, MD 20746

Buckley, Mike, m.buckley@manchester.ac.uk
Manchester Institute of Biotechnology, The University of Manchester, Manchester, M1 7DN, United Kingdom

The Nahal Hemar cave

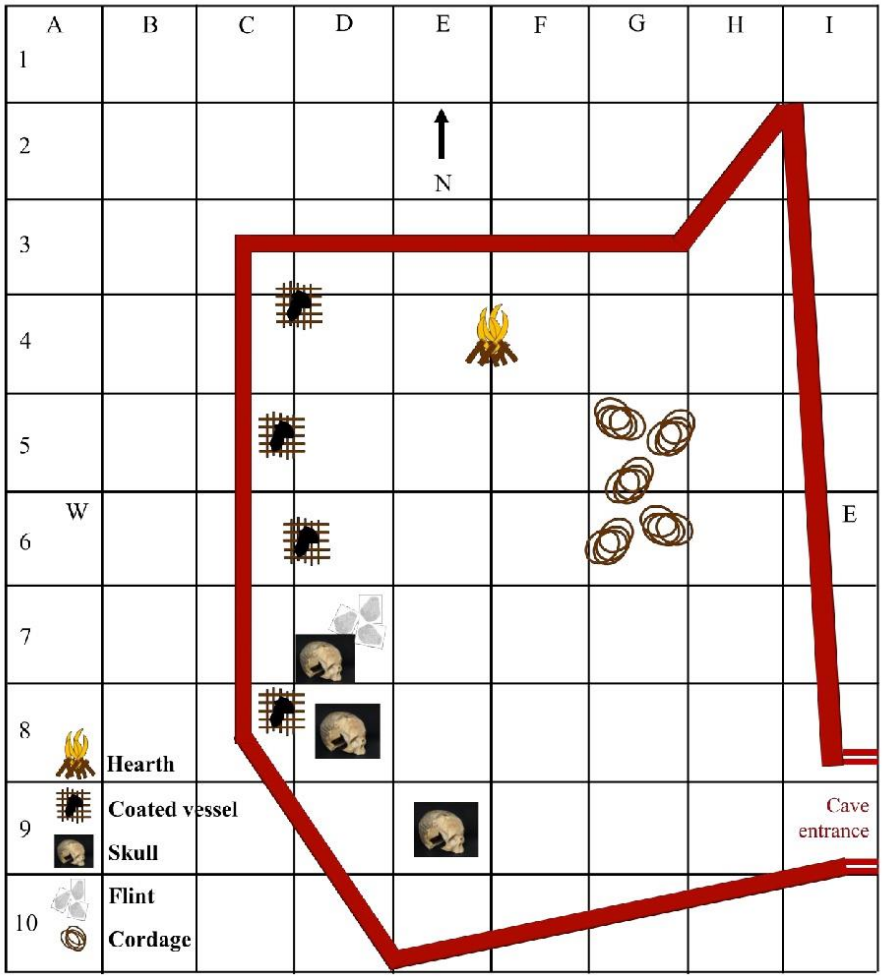
The cave was first discovered in the 1950s and 60s by Bedouins who were searching for Dead Sea scrolls; they dug along the entrance of the cave but found nothing[1]. Later the cave was rediscovered and excavated by archaeologists in 1983[2]. A test excavation in March along the Western wall, opposite the entrance, revealed the modelled skulls and other bone and stone artefacts. This was followed by a systematic excavation in June by Ofer Bar-Yosef and David Alon which established the stratigraphy along the Northern wall. The cave is small (about 4 x 8 m), and was covered with large boulders that had fallen from the ceiling. Neolithic finds were located under the boulders, so that these rocks must have fallen after the Neolithic occupation of the cave. Between the first survey and the excavation of the cave, the central part had been plundered but original deposits were found under the boulders. The stratigraphy were described as follow in Bar-Yosef, 1985[1] and 1988[2]:

Stratum 1: about half a meter thick; contained Early Bronze I and Byzantine-Early Arabic sherds, as well as "coprolites, broken twigs, and gravel formed by the disintegration of a rock layer in the cave wall".

Stratum 2: 0.35-0.45 m thick; contains few Neolithic finds, gravel and coprolites. "The gravel was due to the crumbling of the rock caused by the use of the cave as a sheep-pen"

Stratum 3 (3A and 3B): 0.60 m thick; rich in Neolithic finds (such as threads, flint tools, animal bones), including the remains of a hearth (layer 3A, near the North wall) from which charcoal were used for radiocarbon dating (Table 1A).

Stratum 4: depth varies as it covered the uneven cave floor and material between the stone boulders; it contained stalagmites, white sand and coprolites. The layer produced the important artefacts such as the skulls, a sickle and the head gear. All deposits were sieved, and objects from the dumps were found to complete some of the excavated artefacts.



Outline of the cave, showing the approximate positions of finds and the skulls near the Western wall (one square represents 1 m^2).

3

Amino acid distribution obtained by RP-HPLC

Collagen is the major protein identified in archaeological bones and skin. It is a fibrous protein found in skin, sinews, and bone and consists of a coil of three chains (two identical chains α1 and one α2), forming a triple helix where each chain is made of repetitive glycine-Xaa-Yaa motifs where Xaa and Yaa can be almost any other amino acid but is mostly proline or hydroxyproline and Yaa respectively. As such, glycine accounts for approximately one third of the amino acid content, giving it a distinctive amino acid composition signature.

Table S1: Distribution of amino acids (with standard deviation in brackets) in the archaeological samples, compared to a bone reference; n refers to the number of analyses and the average total concentration in amino acids is indicated in µmol/mg

Sample	Flake #672	Basket #448	Basket #448	Skull #515	Skull #515	Reference bone
Sub-sample	NH2824	NH2825	NH2826	NH2968	NH2969	
% Asx	7.15 (0.33)	10.80 (0.38)	5.18 (0.22)	11.12 (0.98)	11.80 (0.37)	6.24
% Glx	9.97 (0.38)	12.95 (0.73)	11.49 (0.69)	10.99 (0.56)	12.53 (0.60)	9.74
% Ser	5.14 (0.24)	7.86 (1.64)	1.87 (0.13)	5.91 (1.58)	7.12 (0.65)	3.88
% Thr	3.52 (0.30)	4.55 (2.81)	2.55 (0.08)	4.52 (0.55)	5.83 (0.13)	2.42
% His	0.72 (0.04)	0.88 (0.06)	0.57 (0.05)	0.20 (0.45)	0.38 (0.59)	1.08
% **Gly**	**43.25 (1.12)**	**18.95 (2.68)**	**45.32 (1.85)**	**34.09 (2.14)**	**18.96 (1.09)**	**45.43**
% Arg	4.74 (0.08)	2.30 (0.16)	5.00 (0.30)	2.86 (0.41)	1.61 (0.80)	5.74
% Ala	10.45 (0.17)	10.15 (0.77)	11.70 (0.21)	9.67 (0.86)	10.17 (0.38)	13.63
% Tyr	0.24 (0.07)	2.01 (0.11)	0.40 (0.12)	0.49 (0.45)	1.30 (0.65)	0.52
% Val	4.87 (0.17)	6.77 (0.86)	4.18 (0.20)	5.60 (0.09)	7.80 (0.36)	3.09
% Phe	2.22 (0.26)	5.27 (1.11)	2.43 (0.08)	4.63 (1.57)	6.39 (0.48)	1.83
% Leu	5.33 (0.82)	11.32 (1.32)	6.94 (0.25)	5.82 (2.09)	9.08 (0.40)	4.75
% Ile	2.39 (0.44)	6.19 (0.63)	2.37 (0.10)	4.09 (0.22)	7.03 (0.32)	1.64
n	3	4	8	5	6	1
Conc. µmol/mg	27.34	0.15	1.82	0.18	0.11	2.33

NH2824: Amino acid profile obtained by gas chromatography

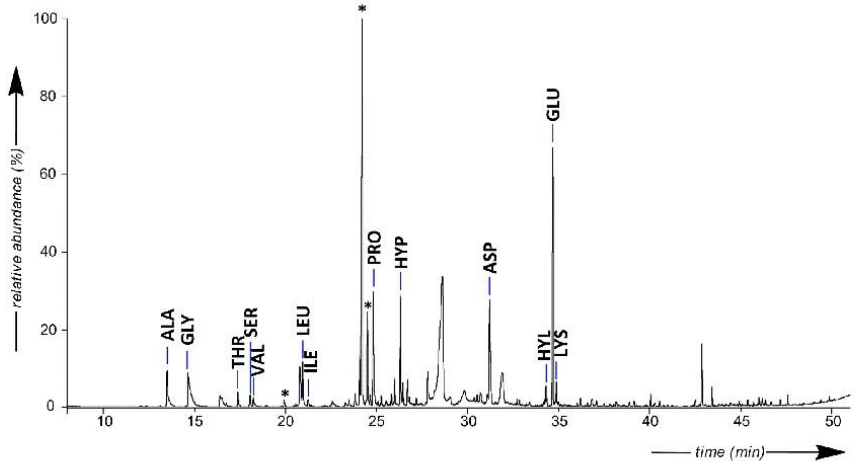


Figure S1: Partial gas chromatogram of the hydrolysed residue (HCl/CH_3OH, 6N, 7h) remaining after solvent extraction of the organic material **NH2824**. (ALA) alanine, (GLY) glycine, (THR) threonine, (SER) serine, (VAL) valine, (LEU) leucine, (ILE) isoleucine, (PRO) proline, (HYP) hydroxyproline, (ASP) aspartic acid, (HYL) 5-hydroxylysine, (GLU) glutamic acid, (LYS) lysine. Acids are identified as their butyl ester derivatives and alcohol and amine functions are characterised as their TFAA derivatives. Amino acids have been identified based on their mass spectra in electron impact and chemical ionization and by comparison with the NIST database. * = Carbohydrates.

NH2825: Amino acid profile obtained by gas chromatography

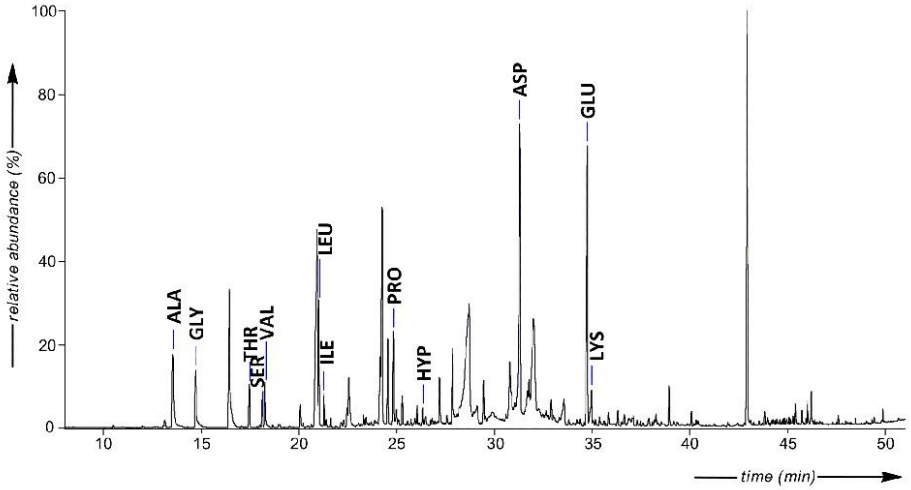


Figure S2: Partial gas chromatogram of the hydrolysed residue remaining after solvent extraction (HCl/CH_3OH, 6N, 9 h) of the basket sample **NH2825**. (ALA) alanine, (GLY) glycine, (THR) threonine, (SER) serine, (VAL) valine, (LEU) leucine, (ILE) isoleucine, (PRO) proline, (HYP) hydroxyproline, (ASP) aspartic acid, (GLU) glutamic acid, (LYS) lysine. Acids are identified as their butyl ester derivatives and alcohol and amine functions are characterised as their TFAA derivatives. Amino acids have been identified based on their mass spectra in electron impact and chemical ionization and by comparison with the NIST database.

NH2968: Amino acid profile obtained by gas chromatography

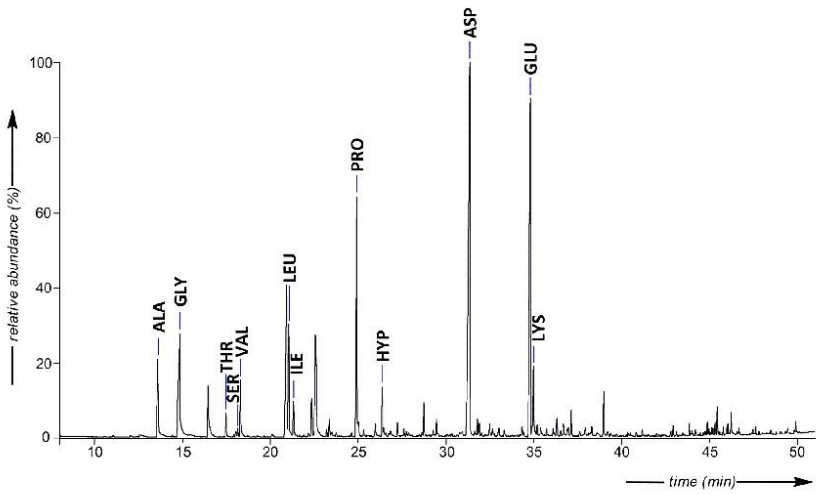


Figure S3: Partial gas chromatogram of the hydrolysed residue (HCl/CH_3OH, 6N, 9h) remaining after solvent extraction of the skull sample **NH2968**. (ALA) alanine, (GLY) glycine, (THR) threonine, (SER) serine, (VAL) valine, (LEU) leucine, (ILE) isoleucine, (PRO) proline, (HYP) hydroxyproline, (ASP) aspartic acid, (GLU) glutamic acid, (LYS) lysine. Acids are identified as their butyl ester derivatives and alcohol and amine functions are characterised as their TFAA derivatives. Amino acids have been identified based on their mass spectra in electron impact and chemical ionization and by comparison with the NIST database.

Identification of pyrolysis products obtained by py-GC/MS

Table S2: Main pyrolysis moieties identified with their possible biological origin as characterised in [3-9]

Peak	Characteristic ions (m/z)	Compound name	Origin
1	53, 66, 68(M)	2-Pentyne	
2	53, 81, 82(M)	2-Methylfuran	
3	77, 78(M)	Benzene	
4	68, 69(M)	Pyrroline	Pro
5	51, 53, 81, 95, 96(M)	2, 5-dimethylfuran	
6	53, 80, 81(M)	1-methyl-pyrrole	Pro, Hyp
7	50, 51, 52, 79(M)	Pyridine	
8	91, 92(M)	Toluene	Phe
9	95, 110(M)	2-ethyl-5-methylfuran	
10	53, 67, 80, 95(M)	1-ethyl-pyrrole	Hyp
11	66, 92, 93(M)	2-methyl-pyridine	
12	53, 80, 81(M)	2-methyl-Pyrrole	Pro, Hyp
13	91, 106(M)	Ethylbenzene	Phe
14	86, 94, 95(M)	2,5-dimethyl-1H-pyrrole	
15	66, 92, 93(M), 94	3-methyl-pyridine	
16	51, 78, 103, 104(M)	Styrene	Phe
17	96, 67, 53	2-methyl-cyclopentenone	
18	79, 106, 107(M)	2-ethyl-pyridine	
19	81, 108(M)	2,5-dimethyl-pyrazine	
20	54, 55, 84(M)	2(5H)-Furanone	
21	80, 94, 95(M)	2,4-dimethyl-pyrrole	
22	79, 106, 107(M)	2,5-dimethyl-pyridine	
23	91, 115, 117, 118(M)	2-propenyl-benzene	
24	91, 120(M)	Propylbenzene	
25	50, 51, 52, 57, 71, 79, 99, 104, 105(M)	2-ethenyl-pyridine	
26	50, 80, 95(M)	2-ethyl-pyrrole	Hyp
27	65, 79, 92, 106, 107(M)	3-ethyl-pyridine	
28	51, 77, 105, 106(M)	Benzaldehyde	Balsam
29	50, 51, 53, 81, 109, 110(M)	5-methyl-2-Furaldehyde	
30	76, 103(M)	Benzonitrile	
31	94, 121, 122(M)	2-ethyl-6-methyl-Pyrazine	
32	66, 94(M)	Phenol	Tyr, Lignin
33	94, 109(M)	2-ethyl-4-methyl-pyrrole	
34	91, 94, 115, 117, 118(M)	beta-Methylstyrene	
35	93, 120, 121(M)	2-ethyl-6-methyl-Pyridine	
36		methylpyrrole-2-carboxylate	
37	67, 94(M)	2-aminopyridine	
38	80, 81, 137(M)	1-pentyl-pyrrole	
39	89, 90, 116, 117(M)	Benzyl nitrile	
40	51, 77, 105, 120(M)	Acetophenone	
41	53, 81, 109, 124(M)	4-methoxyphenol	
42	51, 77, 79, 107, 108(M)	4-methylphenol=p-cresol	Lignin
43	81, 109, 124(M)	2-methoxyphenol=guaiacol	Lignin
44	66, 94, 109(M)	3-acetyl-1-pyrroline	
45	117, 118, 119(M)	Indoline	
46	56, 113(M)	1-methyl-2,5-pyrrolidinedione	

47	56, 107, 108(M)	Ethylpyrazine		
48	89, 90, 116, 117(M)	Benzyl nitrile		
49	54, 69, 97(M)	Pyrrole-2,5-dione=maleimide	Asn	
50	84, 99(M)	5-methyl-2-pyrrolidinone		
51	65, 93, 121, 136(M)	Hydroxyacetophenone		
52	77, 107, 121, 122(M)	2,4-dimethylphenol	Tyr	
53	77, 107, 121, 122(M)	2,5-dimethyl-phenol	Tyr	
54	70, 85, 113(M)	1-acetylpyrrolidine		
55	77, 95, 107, 122, 123, 138(M)	2-methoxy-4-methyl-Phenol=creosol	Lignin	
56	107, 122(M)	2,3-dimethyl-phenol	Tyr	
57	78, 106, 134(M)	2-Coumaranone		
58	51, 77, 105, 122(M)	Benzoic acid	Balsam	
59	91, 104, 164(M)	Methyl hydrocinnamate	Balsam	
60	137, 152(M)	4-ethyl-guaiacol	Lignin	
61	51, 52, 78, 79, 122(M)	Picolinamide		
62	89, 90, 117(M)	Indole	Trp	
63	77, 107, 135, 150(M)	4-vinylguaiacol	Lignin	
64	93, 96, 111, 139, 154(M)	2,6-dimethoxy-phenol=Syringol	Lignin	
65	77, 103, 131, 161, 162(M)	Methyl cinnamate	Balsam	
66	51, 78, 128, 129, 155, 156(M)	Bipyridine		
67	81, 151, 152(M)	Vanillin	Lignin, Balsam	
68	50, 154, 155(M)	3-phenyl-pyridine		
69	77, 91, 103, 149, 164(M)	Isoeugenol	Lignin	
70	51, 77, 91, 103, 147, 148(M)	Cinnamic acid/Trans Cinnamic acid	Balsam	
71	53, 80, 107, 108, 136(M)	3-propyl-phenol		
72	168, 183, 198(M)	1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-naphtalene		
73	93, 130, 186(M)	Diketodipyrrole	Hyp	
74	77, 91, 179, 194(M)	Methoxyeugenol	Lignin	
75	70, 97, 125, 168(M)	2,5-diketopiperazine derivative	Pro-Ala	
76	55, 57, 60, 73, 129, 143, 185, 228(M)	Tetradecanoic acid		
77	70, 83, 111, 154(M)	Pyrrolidinopiperazine derivative	Pro-Gly, Pro-Lys	
78	70, 194(M)	2,5-diketopiperazine derivative	Pro-Pro	
79	55, 57, 60, 73, 129, 213, 256(M)	Hexadecanoic acid		
80	55, 57, 60, 73, 129, 227, 171, 185, 270(M)	Heptadecanoic acid		
81	77, 91, 103, 131, 192, 193, 238(M)	Benzyl cinnamate	Balsam	
82	55, 57, 60, 73, 129, 185, 241, 284(M)	Octadecanoic acid		
83	103, 115, 117, 131, 219, 264(M)	Cinnamyl cinnamate	Balsam	

Profiles obtained by pyrolysis gas chromatography

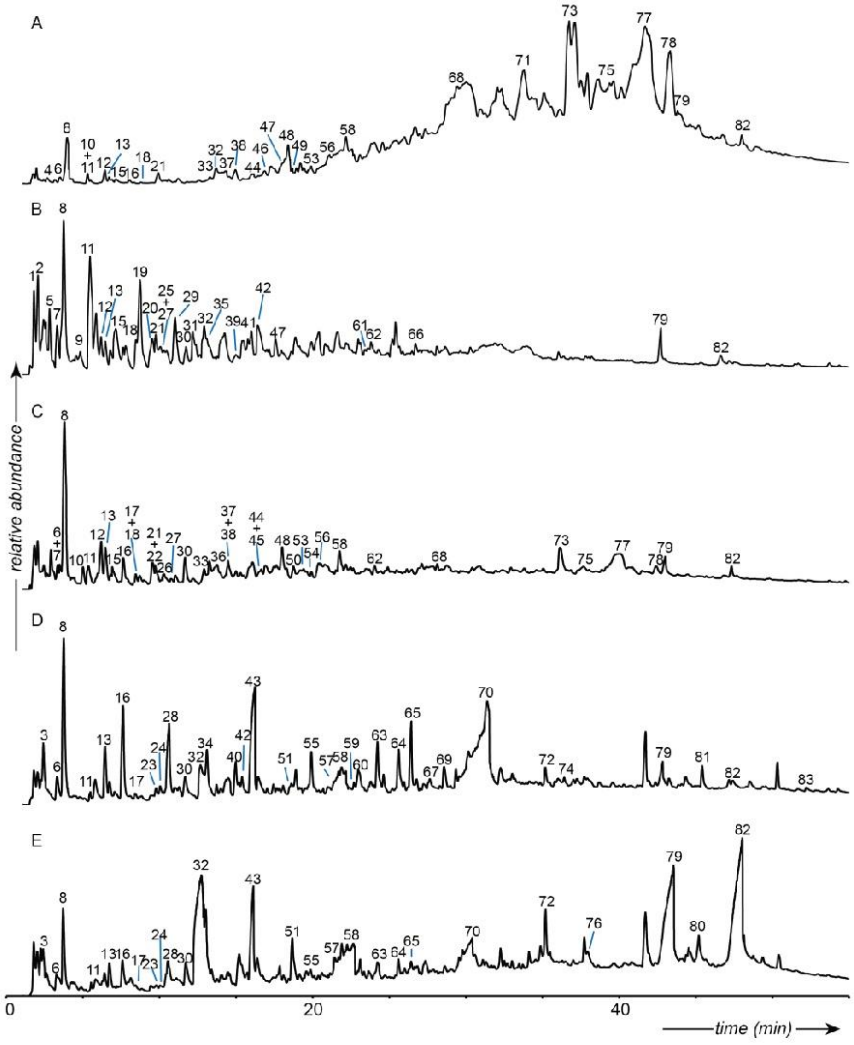


Figure S4: Py-GC/MS total ion current chromatograms of A) NH2824, B) NH2825, C) NH2826, D) NH2868 and E) NH2869. Compound numbers refer to those reported in Table S2.

Identification of proteins by nanoLC-MS/MS

Table S3: Proteomic results on the flake **NH2824**: Protein name, accession number, species, #peptides (#peptides > mascot score 40), percentage coverages, ion score (ion score > mascot score 40) and role of the protein. Proteins were selected if at least three peptides were matched with a score >40.

Protein	Acc. No.	Species	# pep. (>40)	Cov (%)	Ion Score (>40)	Function and location
Collagen alpha-1(I)	CO1A1_BOVIN	*Bos taurus*	540(139)	61	3271(2942)	Structural role Connective tissues
Collagen alpha-2(I)	CO1A2_BOVIN	*Bos taurus*	325(84)	48	2667(2317)	Structural role Connective tissues
Serum albumin	ALBU_BOVIN	*Bos taurus*	47(15)	24	605(520)	Maintain oncotic pressure and transport protein Plasma
Hemoglobin subunit beta	HBB_BOVIN	*Bos taurus*	23(7)	47	210(206)	Oxygen-carrier Blood
Hemoglobin subunit alpha-I/II	HBA_BISBO HBA_BOVIN	*Bison bonasus*	15(4)	44	156(130)	Oxygen-carrier Blood
Collagen alpha-2(VI) chain	CO6A2_HUMAN	*Homo sapiens*	14(5)	12	140(141)	
Decorin	PGS2_BOVIN	*Bos taurus*	23(4)	26	137(121)	Small leucine-rich proteoglycan, involved in collagen fibrinogenesis
Collagen alpha-3(VI) chain	CO6A3_HUMAN	*Homo sapiens*	25(5)	8	119(103)	
Lumican	LUM_BOVIN	*Bos taurus*	18(5)	21	110(107)	Small leucine-rich proteoglycan, involved in collagen fibrinogenesis
Mimecan	MIME_BOVIN	*Bos taurus*	17(3)	17	105(97)	Small leucine-

						rich proteoglycan, involved in collagen fibrinogenesis.
Collagen alpha-1(VI) chain	CO6A1_HUMAN	*Homo sapiens*	11(4)	7	103(89)	
Complement C3	CO3_BOVIN	*Bos taurus*	12(3)	6	90(90)	Protein of the immune system
Fibrinogen gamma-B chain	FIBG_BOVIN	*Bos taurus*	7(3)	12	87(84)	Glycoprotein involved in blood clotting Plasma
Fibrinogen beta chain	FIBB_BOVIN	*Bos taurus*	12(3)	14	85(78)	Glycoprotein involved in blood clotting Plasma
Fibrinogen alpha chain	FIBA_BOVIN	*Bos taurus*	9(4)	9	78(78)	Glycoprotein involved in blood clotting Plasma

Table S4: Proteomic results on the basket samples **NH2825** and **NH2826**: Protein name, accession number, species, #peptides (#peptides > mascot score 40), percentage coverages, ion score (ion score > mascot score 40) and role of the protein. Proteins were selected if at least three peptides were matched with a score >40.

Protein	Acc. No.	Species	# pep. (>40)	Cov. (%)	Ion Score (>40)	Function and location
NH2825						
Ribosome-inactivating protein charybdin	RIP_DRIMA	*Drimia maritima*	84(11)	55	335(269)	Protein synthesis inhibitor
NH2826						
Collagen alpha-2(I)	CO1A2_BOVIN	*Bos taurus*	116(20)	33	599(544)	Structural role Connective tissues
Collagen alpha-1(I)	CO1A1_BOVIN	*Bos taurus*	165(15)	25	403(337)	Structural role Connective tissues
Serum albumin	ALBU_BOVIN	*Bos taurus*	26(10)	17	314(283)	Maintain oncotic pressure and transport protein Plasma
Collagen alpha-3(VI) chain	CO6A3_HUMAN	*Homo sapiens*	24(4)	5	138(101)	
Fibromodulin	FMOD_BOVIN	*Bos taurus*	26(4)	10	119(112)	Small leucine-rich proteoglycan, involved in collagen fibrinogenesis
Biglycan	PGS1_BOVIN	*Bos taurus*	13(4)	20	115(105)	Small leucine-rich proteoglycan, involved in collagen fibrinogenesis
Keratin, type II cytoskeletal 1	K2C1_HUMAN	*Homo sapiens*	13(4)	18	112(95)	Structural, skin

Aggrecan core protein	PGCA_BOVIN	*Bos taurus*	23(3)	4	94(92)	Small leucine-rich proteoglycan, major component of articular cartilage
Thrombospondin-1	TSP1_BOVIN	*Bos taurus*	5(3)	3	68(63)	Glycoprotein

NH2824: tandem MS spectrum, bovine collagen

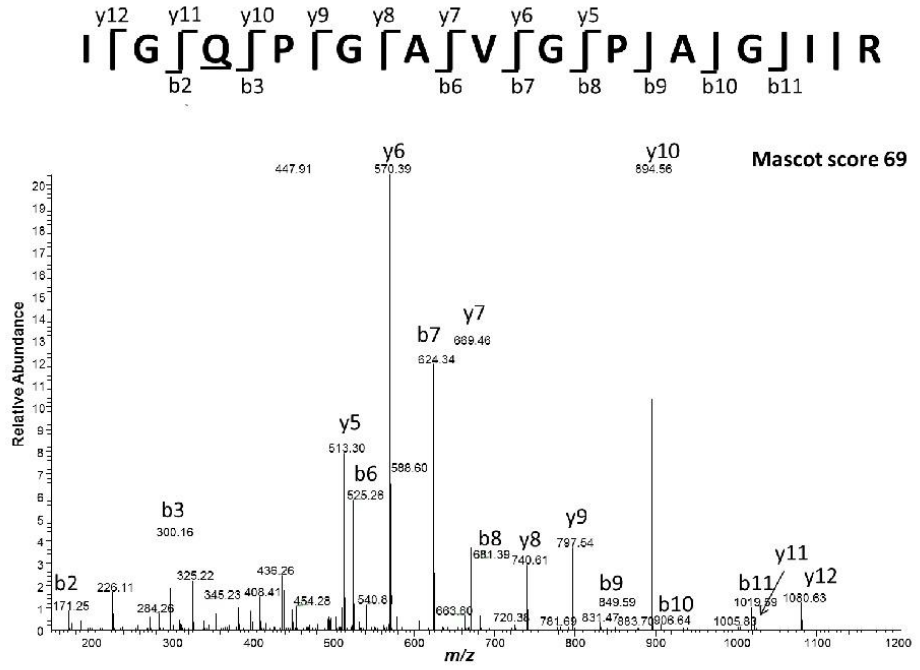


Figure S5: Tandem MS spectrum of IGQPGAVGPAGIR, M=1192.656, with deamidation in Q_3 from collagen alpha-2(I) chain CO1A2_BOVIN, identified by Mascot, in the flake sample NH2824.

NH2825: tandem MS spectra, charybdin

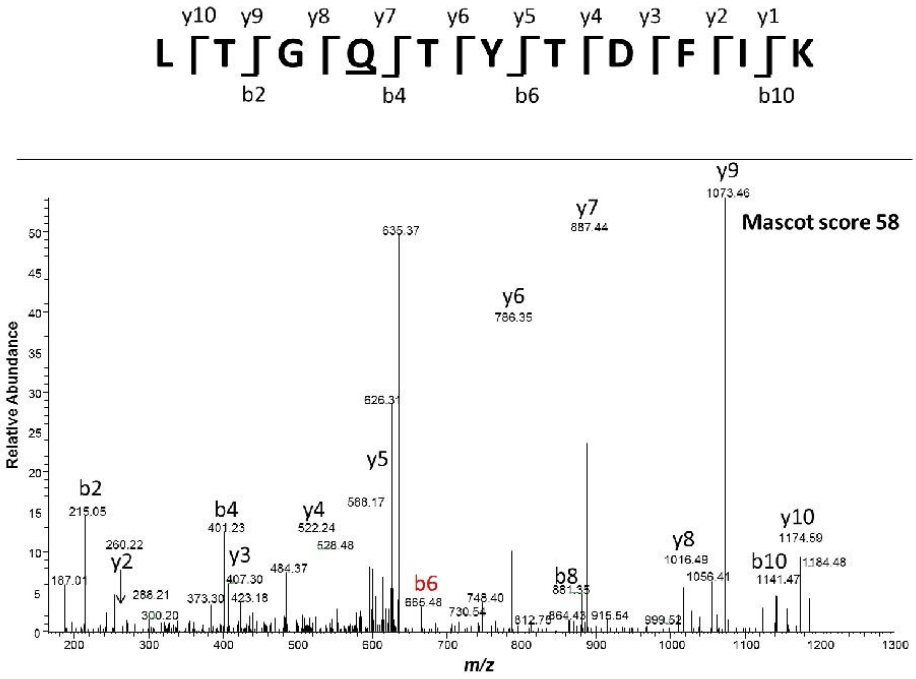


Figure S6: Tandem MS spectrum of LTGQTYTDFIK, M=1286.639, with deamidation in Q_4 from ribosome-inactivating protein charybdin RIP_DRIMA, identified by Mascot (in red are fragments manually identified), in basket sample NH2825.

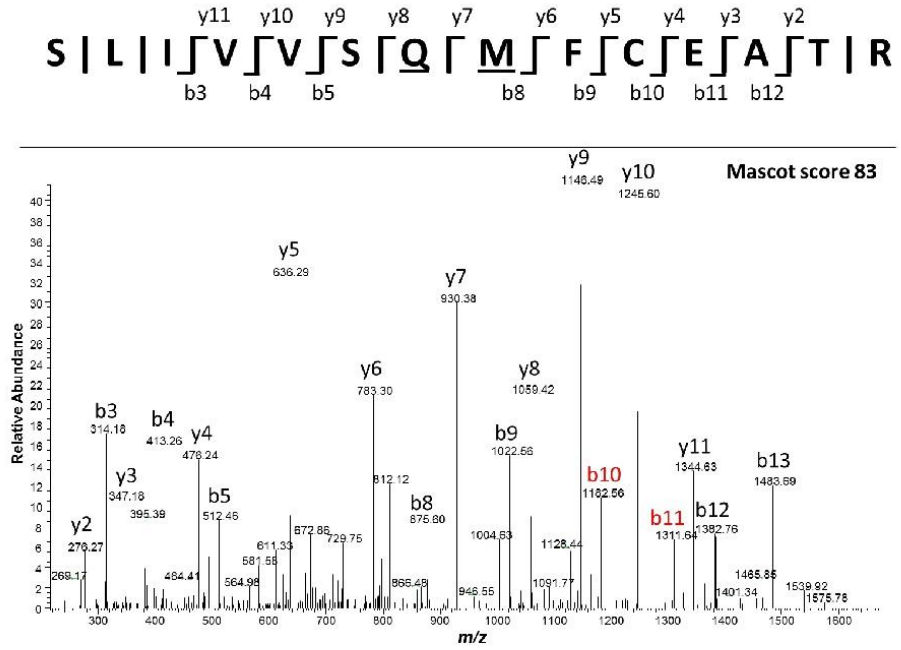


Figure S7: Tandem MS spectrum of SLIVVSQMFCEATR, M=1656.788, with deamidation in Q_7 and oxidation in M_8 from ribosome-inactivating protein charybdin RIP_DRIMA, identified by Mascot (in red are fragments manually identified), in basket sample NH2825.

Table S5: Proteomic results on the skull samples **NH2968** and **NH2969**: Protein name, accession number, species, #peptides (#peptides > mascot score 40), percentage coverages, ion score (ion score > mascot score 40) and role of the protein

Protein	Acc. No.	Species	# pep. (>40)	Cov. (%)	Ion Score (>40)	Function and location
NH2968 Skull (background)						
Keratin, type II cytoskeletal 1	K2C1_HUMAN	*Homo sapiens*	36(9)	39	450(351)	Structural, skin
Keratin, type I cytoskeletal 16	K1C16_HUMAN	*Homo sapiens*	32(9)	49	358(336)	Structural, skin
Keratin, type I cytoskeletal 9	K1C9_HUMAN	*Homo sapiens*	24(5)	32	223(157)	Structural, skin
Lactotransferrin	TRFL_HUMAN	*Homo sapiens*	18(3)	29	166(120)	Glycoprotein
Serum albumin	ALBU_HUMAN	*Homo sapiens*	24(3)	31	106(85)	Maintain oncotic pressure and transport protein Plasma
NH2969 Skull (net pattern)						
Keratin, type II cytoskeletal 1	K2C1_HUMAN multiple	*Homo sapiens*	21(9)	34	241(233)	Structural, skin

Most proteins identified are from Human and most likely contamination. The cytoskeletal keratins identified are common laboratory contamination from dead skin resulting from handling. An indication that the proteins are likely false positives is the complete absence of Asn and Gln deamidation (a modification commonly identified in ancient proteins) in the proteins identified in the skull while deamidation is consistently found in the proteins identified in the basket.

% of lipid extract

Table S6: Sample amounts and % of lipid extract obtained after solvent extraction (CH_2Cl_2/CH_3OH, 1/1, v/v).

Sub-sample number	Sample amounts for lipid analysis (mg)	Lipid extract (%)
NH2824	483	< 1
NH2825	22	3
NH2826	54	9
NH2968	22	67
NH2969	52	>70

Total lipid extracts analysed by GC/MS

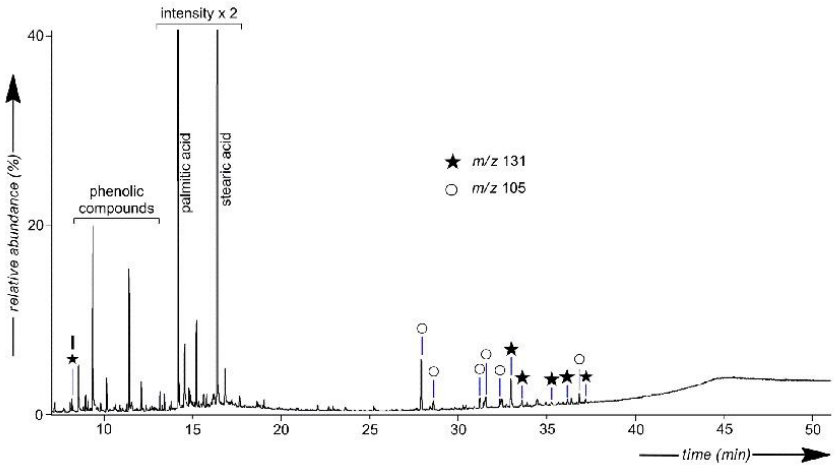


Figure S8: Gas chromatogram of the total lipid extract from the Neolithic skull (NH2969) found in the Nahal Hemar cave. (I) cinnamic acid. Cinnamic (*m/z* 131) and benzoic (*m/z* 105) ester derivatives are identified by filled stars and open circles, respectively. Alcohols are detected as acetate derivatives and acids as methyl esters.

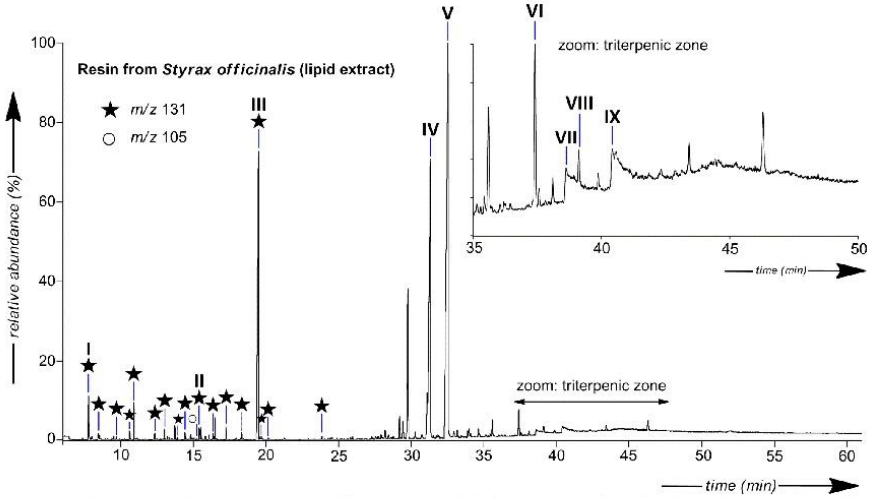


Figure S9: Gas chromatogram of the total lipid extract of a fresh resin sample of *Styrax officinalis* (*Styracaceae*). Cinnamic (*m/z* 131) and benzoic (*m/z* 105) ester derivatives are identified respectively by filled stars and open circles. Alcohols are detected as acetate derivatives and acids as methyl esters. Numbers refer to the compound structures reported on Fig. 5.

Identification of the triterpenoids occurring in samples NH2968, NH2969 and in the resin of *S. officinalis*

The structural identification of the triterpenoids as C-6 oxygenated derivatives of oleanolic acid in samples NH2968 and NH2969 and in the fresh and oxidized resin of *S. officinalis* is mainly based on mass spectral investigations using GC-MS (electron impact (EI), chemical ionization (CI) and field ionization (FI) modes) as well as on comparison with published mass spectra of triterpenoids from *Styrax sp*[10] or other plant species[11] and of amyrin-related epoxylactones[12].

*Identification of compounds **VII** to **IX***

The EI mass spectra of compounds **VII** - **IX** (Fig. S10) display a characteristic fragment at *m/z* 262 corresponding to the Retro-Diels Alder fragmentation of olean-12-ene derivatives bearing a carbomethoxy group at C-17[13] and a fragment at *m/z* 203 resulting from the loss of the carbomethoxy function. GC-MS analysis with FI mode allowed the molecular weight of compounds **VII**, **VIII** and **IX** to be unambiguously determined ($M^{+\cdot}$ 484, 526 and 528, respectively). The occurrence of a non-acetylated hydroxyl group on the *A*/*B* ring moiety of compounds **VII** and **IX** is evidenced by the presence of a fragment at *m/z* 466 and 450, respectively, resulting from the loss of 18 Da ($-H_2O$) in the mass spectra (Fig. S10). In this respect, the high steric hindrance around the 6β-hydroxyl group prevented it from being acetylated. Lastly, comparison of the mass spectra of **VII**, **VIII** and **IX** (Fig. S10) with spectra published in the literature[2] firmly supports identification of these compounds as methyl 3-oxo-6β-hydroxy-olean-12-en-28-oate, methyl 3β-acetoxy-6-oxo-olean-12-en-28-oate, and methyl 3β-acetoxy-6-hydroxy-olean-12-en-28-oate, respectively.

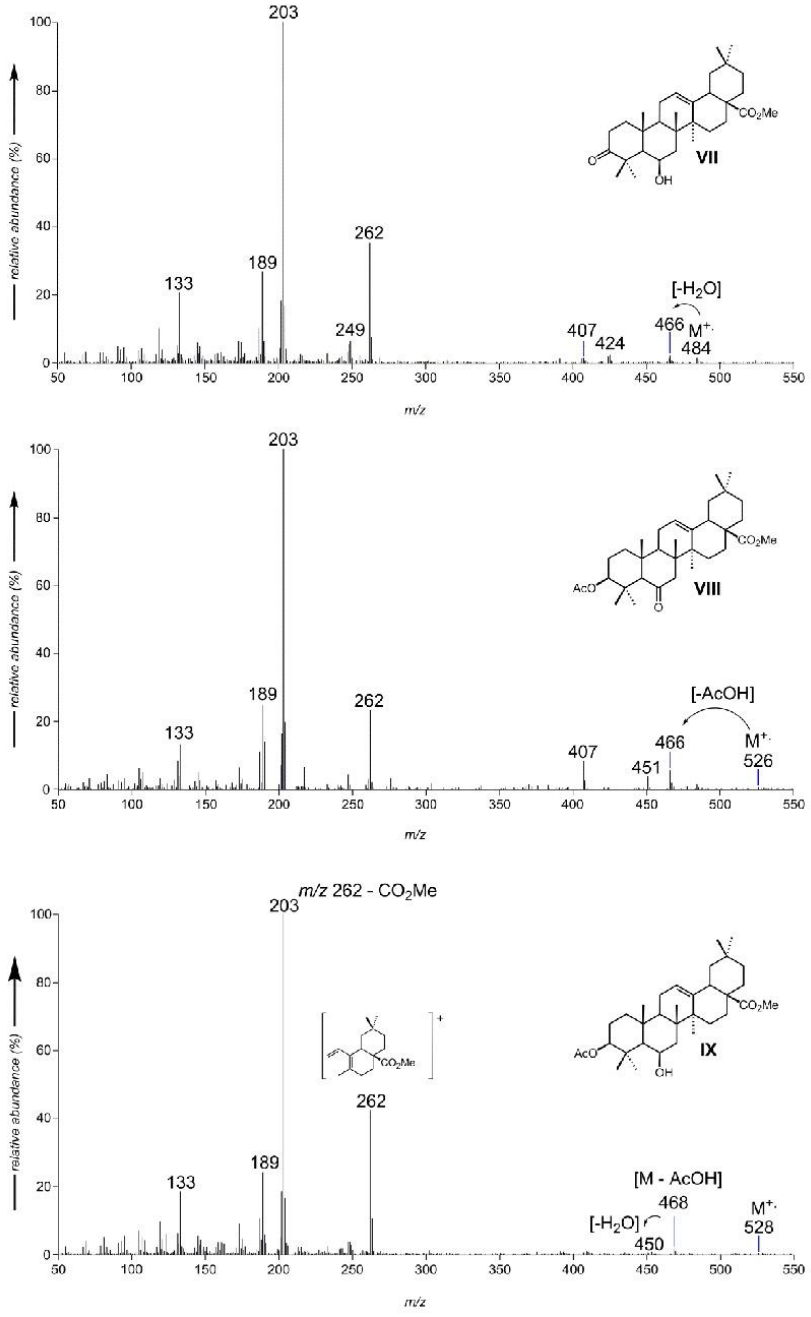


Fig S10: Mass spectra of compounds **VII** - **IX** (EI, 70 eV)

*Identification of compounds **XII** to **XIV***

Compounds **XII**, **XIII** and **XIV** were identified as the epoxylactone analogues of the triterpenoids **VII, VIII** and **IX**. Indeed, compounds **XII** to **XIV**, found both in the archaeological sample NH2968 and in the resin of *S. officinalis* after the laboratory oxidation experiment, display mass spectra with a fragmentation pattern very similar to that described in the literature for amyrin-derived epoxylactones[10,12,14]. The mass spectra of **XII** - **XIV** share common main fragments at *m/z* 189, 204 and 217 as well as fragments at *m/z* 291, 249 and 293, respectively, for **XII**, **XIII** and **XIV** which are interpreted as characteristic rearrangements fragments of amyrin-related 11α-12α-epoxylactones by analogy with the fragmentation pattern proposed by Kamiya et *al.*[14]. Furthermore, unambiguous determination of the molecular weight by mass spectrometry in FI mode ($M^{+\cdot}$ 526, 484 and 528, respectively) and the similarity of the EI mass spectra of compounds **XII** - **XIV** with those published in the literature[10] further support the identification of compounds **XII** - **XIV** as the epoxylactone analogues of the C-6 oxygenated oleanolic acid derivatives occurring in fresh resin of *S. officinalis*.

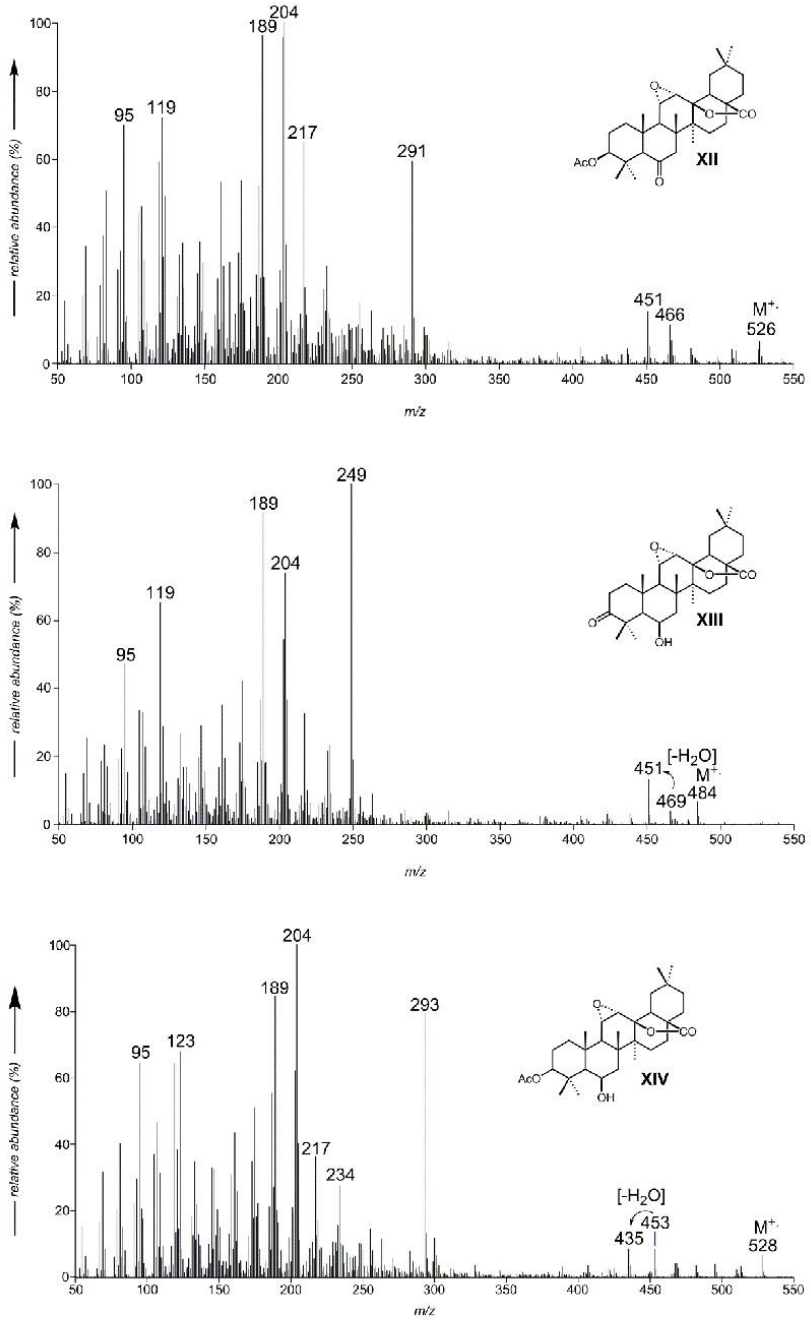


Fig S11: Mass spectra of compounds **XII** - **XIV** (EI, 70 eV).

Taxonomy of *Charybdis maritima* (*Drimia maritima*)

The World Checklist of Selected Plant Families (http://apps.kew.org/wcsp/qsearch.do) indicates the first mention of the sea squill under the name "*Scilla maritima*" in 1753, then later as "*Urginea maritima* (L.) Baker, J. Linn. Soc., Bot. 13: 221 (1873)", "*Drimia maritima* (L.) Stearn, Ann. Mus. Goulandris 4: 204 (1978)", and finally "*Charybdis maritima* (L.) Speta, Phyton (Horn) 38: 60 (1998)". There are 12 species under the genus Charybdis which are commonly accepted under their synonyms in the Drimia genus, under which the World Checklist of Selected Plant Families gives 181 records (at time of publication). The number of species recorded in NCBI under the genus Drimia is of 66.

Drimia belongs to the Urgineoideae subfamily of the Hyacinthaceae family (hyacinth family) which contains three other subfamilies (Hyacinthoideae, Ornithogaloideae and Oziroeoideae). According to Pfosser and Speta (2004)[15], the sea onion, well known since Antiquity for its medicinal properties and by the Romans as Scilla, was first wrongly attributed to the Scilla genus in the Hyacinthoideae subfamily. The genus Urginea (Urgineoideae subfamily) was created in the 1830s and was followed by the inclusion by Baker of the sea onion in 1873. The genera *Bowiea* and *Drimia* were then added and *Charybdis* created later, in which these authors (Pfosser and Speta (2004)[15]) have classified the Mediterranean squills.

Charybdin

Charybdin was characterised and named by Touloupakis et al. (2006)[16] as a novel 29 kDa type I ribosome-inactivating protein (RIP) found in bulbs of *C. maritima*. There are seven other ribosome-inactivating proteins characterized in the Hyacinthaceae family; of them the closest species has less than 50% percentage coverage in common with charybdin.

RIPs inhibit protein synthesis by enzymatically damaging ribosomes; there are of two types, type I has a single peptide chain, type II contains two. By cleaving a certain site in rRNA, they stop protein synthesis, thus inhibiting ribosome activity[17]. Some RIPs such as ricin are potent toxins. In *C. maritima*, Touloupakis et al.[16] mention that with 150-200 mg per 100 g, the "bulbs contain extremely high quantities of the charybdin protein. The initial extract contained mainly charybdin and very small amounts of other proteins, which were only observed when the gel was overloaded." Charybdin was the only protein characterised in this study. At the time of writing, there are 265 entries available in NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) for the Urgineoideae sub-family, 174 entries for the genus Drimia/Charybdis and 11 for *D. maritima* (mostly chloroplast proteins).

In addition to characterising charybdin, the study highlights a substitution at position 79 in the active site of RIPs where tyrosine is replaced in charybdin by valine. The authors argue that this substitution might be responsible for its low inhibitory activity compared with other RIPs, and that the protein (as the main protein constituent in the bulb) might have a different function such as storage. The peptide which bears Val79, DDLVLR, was successfully identified with a score of 49, as well as IHRDDLVLR with a score of 42. While the first peptide is highly conserved in plants and bacteria (but not identified in RIPs), the second one is found only in a handful of bacterial species.

Amino acid distribution in charybdin and collagen

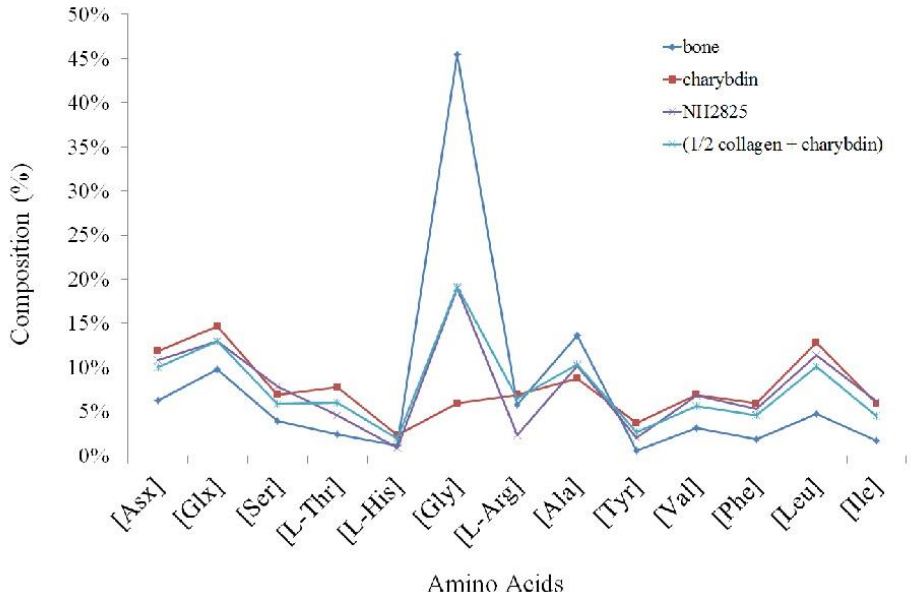


Figure S12: The theoretical distribution in amino acids (relative distribution of the amino acids identified by RP-HPLC) in the charybdin protein from *Charybdys maritima* (RIP_DRIMA) is plotted against the amino acid analysis distribution obtained in the bone reference and sample NH2825. In the hypothesis that charybdin is the sole plant protein constituent in the organic residue of NH2825, it would require twice as much charybdin as collagen to bring the concentration in glycine from its level in bone collagen to the one detected in NH2825.

References

1 Bar-Yosef, O. *A cave in the desert: Nahal Hemar 9000-year old-finds*. Vol. 258 (The Israel Museum, 1985).

2 Bar-Yosef, O. & Alon, D. Nahal Hemar cave. The excavations. *'Atiqot* **18**, 1-30 (1988).

3 Stankiewicz, B. A., Hutchins, J. C., Thomson, R., Briggs, D. E. G. & Evershed, R. P. Assessment of bog-body tissue preservation by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **11**, 1884-1890 (1997).

4 Chiavari, G. & Galletti, G. C. Pyrolysis—gas chromatography/mass spectrometry of amino acids. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **24**, 123-137 (1992).

5 Stankiewicz, A. B. *et al.* Recognition of Chitin and Proteins in Invertebrate Cuticles Using Analytical Pyrolysis/Gas Chromatography and Pyrolysis/Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **10**, 1747-1757 (1996).

6 Branca, C., Giudicianni, P. & Di Blasi, C. GC/MS Characterization of Liquids Generated from Low-Temperature Pyrolysis of Wood. *Ind. Eng. Chem. Res.* **42**, 3190-3202 (2003).

7 Custódio, D. L. & Veiga-Junior, V. F. True and common balsams. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **22**, 1372-1383 (2012).

8 Modugno, F., Ribechini, E. & Colombini, M. P. Aromatic resin characterisation by gas chromatography–mass spectrometry: Raw and archaeological materials. *J Chromatogr A* **1134**, 298-304 (2006).

9 Hovaneissian, M., Archier, P., Mathe, C. & Vieillescazes, C. Contribution de la chimie analytique à l'étude des exsudats végétaux styrax, storax et benjoin. *C R Chim* **9**, 1192-1202 (2006).

10 Wang, F., Hua, H., Pei, Y., Chen, D. & Jing, Y. Triterpenoids from the resin of *Styrax tonkinensis* and their antiproliferative and differentiation effects in human leukemia HL-60 cells. *J. Nat. Prod.* **69**, 807-810 (2006).

11 Wahlberg, I. & Enzell, C. 3-oxo-6β-hydroxyolean-12-en-28-oic acid, a new triterpenoid from commercial tolu balsam. *Acta Chemica Scandinavica* **25**, 70-76 (1971).

12 Majumder, P. L. & Bagchi, A. Oxidative transformations of triterpenoids of the ursane and oleanane skeleta with hydrogen peroxide. introduction of 11,12-double bond and 13(28)oxide moiety in the ursane system. *Tetrahedron* **39**, 649-655 (1983).

13 Budzikiewicz, H., Wilson, J. M. & Djerassi, C. Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. XXXII.1 Pentacyclic Triterpenes. *Journal of the American Chemical Society* **85**, 3688-3699 (1963).

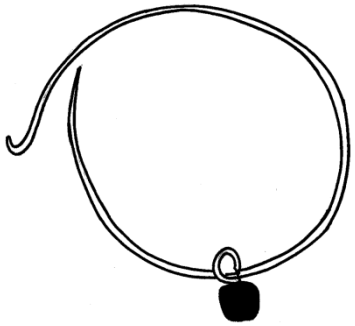
14 Kamiya, K., Yoshioka, K., Saiki, Y., Ikuta, A. & Satake, T. Triterpenoids and flavonoids from *Paeonia lactiflora*. *Phytochemistry* **44**, 141-144 (1997).

15 Pfosser, M. F. & Speta, F. From *Scylla* to *Charybdis* - is our voyage safer now? *Plant Syst. Evol.* **246**, 245-263 (2004).

16 Touloupakis, E. *et al.* Isolation, characterization, sequencing and crystal structure of charybdin, a type 1 ribosome-inactivating protein from Charybdis maritima agg. *FEBS J.* **273**, 2684-2692 (2006).

17 Stirpe, F. in *Molecular Neurosurgery With Targeted Toxins* (eds Ronald G. Wiley & Douglas A. Lappi) 9-29 (Humana Press, 2005).

Chapitre 5 : Utilisation de brai de bouleau comme adhésif pour la confection d'un bijou



5.1. Introduction

Comme nous venons de le démontrer à travers l'exemple de Nahal Hemar (cf. Chapitre 4), les substances naturelles ont été, dès la Préhistoire, exploitées pour de multiples usages (parfums, produits d'hygiène, offrandes, remèdes…). Les sucs résineux, issus de l'activité de gemmage, n'ont pas été les seuls matériaux d'origine végétale à avoir été utilisés et nous pouvons citer parmi ces derniers des substances denses, visqueuses et collantes appelées «goudron », « poix[1] » ou « brai » obtenues par pyrolyse de bois de conifères (pin, sapin, …) ou de feuillus (bouleau surtout, mais aussi hêtre, chêne, aulne, frêne[2], … ; Hayek et *al.*, 1990, Connan et *al.*, 2000, Bailly, 2015). Dans le cadre de ce chapitre, nous nous intéresserons plus spécifiquement à l'utilisation du brai de bouleau[3], une substance obtenue par pyrolyse de copeaux d'écorce de bouleau (ordre : *Fagales*, famille : *Betulaceae*, genre : *Betula*). Le brai de bouleau est considéré comme l'un des plus anciens matériaux manufacturés au cours de l'histoire humaine, fruit d'un savoir qui remonte au Paléolithique (Koller et *al.*, 2001, Grünberg, 2002, Modugno et *al.*, 2006a). Pour cette période, les archéologues ne disposent que de peu d'informations relatives à la production de ce brai, mais suggèrent la mise en œuvre de températures peu élevées, comprises entre 340 °C et 400 °C [4] pour le produire (Koller et *al.*, 2001, Grünberg, 2002). Attesté ensuite pour la période du Mésolithique (Aveling et Heron, 1998), le brai de bouleau constitue un matériau omniprésent parmi les découvertes archéologiques datées du Néolithique en Europe (*e.g.*, Binder et *al.*, 1990, Regert et *al.*, 1998, Bosquet et *al.*, 2001, Urem-Kotsou et *al.*, 2002, Lucquin et *al.*, 2007).

Bien que, de nos jours, les procédés mis en œuvre par nos ancêtres, à partir du Néolithique, pour la production du brai restent encore mal connus sur bien des aspects, les découvertes archéologiques et les expériences de simulation de production de brai à partir

[1] Dans certains cas, le terme de « poix » peut également désigner le produit issu de la cuisson de la gemme de l'arbre (Garnier, 2007).

[2] Les expériences de production de brai réalisées par Hayek et *al.* (1990) attestent qu'il est possible d'obtenir du brai à partir d'une diversité importante de feuillus. Toutefois, à notre connaissance, aucune évidence archéologique ne fait état de brai autre que de bouleau. Cette préférence évidente pour le bouleau pourrait-elle être attribuée à de meilleurs rendements, à une qualité supérieure de l'adhésif produit, à une facilité de collecte de l'écorce, à un nombre important de forêts de bouleau, … ? Aucune étude ne permet actuellement d'en connaitre la raison exacte.

[3] L'usage fait que les termes « poix » ou « goudron » s'appliquent le plus souvent aux produits de cuisson de bois de conifères tandis que l'appellation « brai » est majoritairement associée au produit de pyrolyse de l'écorce de bouleau.

[4] Une étude d'archéologie expérimentale, cherchant à reproduire la production de brai de bouleau, a montré que ce matériau ne pouvait se former qu'en chauffant l'écorce à des températures supérieures à 340 °C (Koller et *al.*, 2001).

d'écorce de bouleau indiquent une technique pouvant associer, au sein de récipients en céramique, une cuisson à très haute température (pyrolyse) et un système de séparation des composés volatils du brai proprement dit (résidu noir, visqueux, aux propriétés adhésives). Une des techniques couramment employée pour la production de brai de bouleau consistait à placer un récipient en céramique percé par le fond sur un autre pot destiné, quant à lui, à récolter le brai s'écoulant lors de la cuisson (Figure 5.1.b ; Pietrzak, 2012). Ce dispositif était fermé, placé dans une fosse avant d'être scellé avec de l'argile afin d'en assurer l'étanchéité et ainsi créer des conditions parfaitement anoxiques. Un foyer en surface permettait de cuire la céramique supérieure remplie de copeaux d'écorce de bois et l'on estime qu'un chauffage à des températures entre 500 et 700 °C, au niveau de ce foyer, permettait de maintenir une température interne de près de 400 °C (Neubauer-Saurer, 1997, Bosquet et *al.*, 2001, Regert et *al.*, 2003, Pietrzak, 2012).

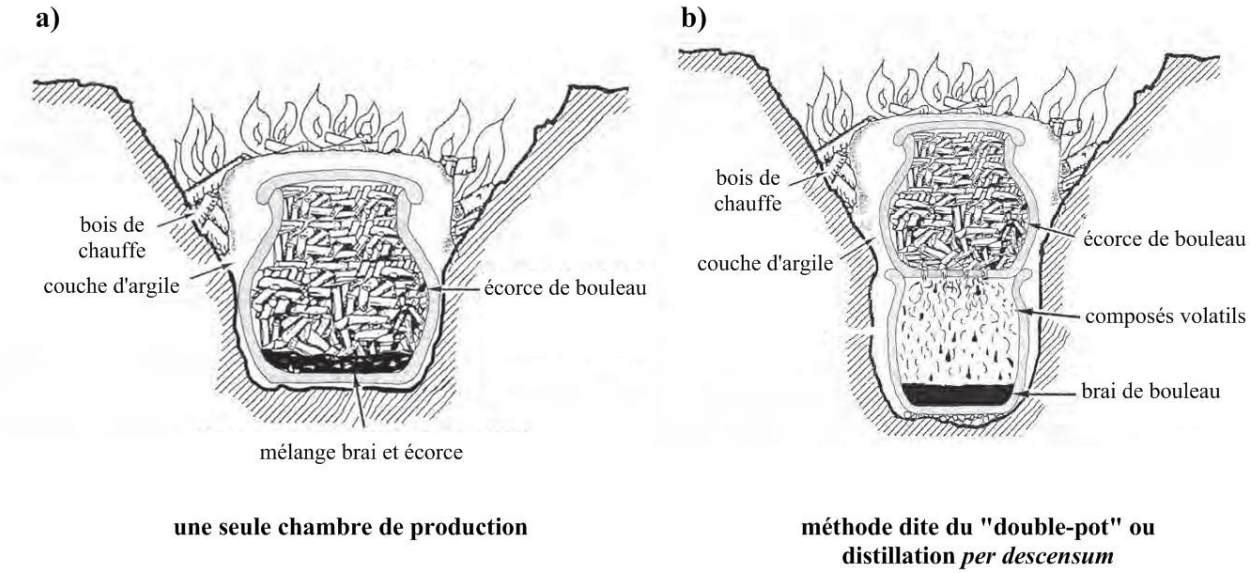


FIG. 5.1 Production de brai de bouleau au moyen (**a**) d'une unique chambre de production ou (**b**) selon la méthode du « double-pot » ou distillation *per descensum* (Pietrzak, 2012).

Cette technique, appelée distillation *per descensum* ou méthode du « double-pot », est attestée en Europe à partir de l'âge du Fer (Regert et Vacher, 2001, Thomas et Claude, 2011, Pietrzak, 2012, Figure 5.1.b), notamment à travers la mise au jour d'un bol en céramique percé par le fond, tel un entonnoir, lors de la fouille du site archéologique du Grand Aunay daté de l'âge du Fer (Sarthe, France ; Regert et Vacher, 2001, Regert et *al.*, 2003). Précisons toutefois qu'un dispositif avec une seule chambre de production pouvait également être utilisé (Figure 5.1.a ; Pietrzak, 2012 et références citées) et que le matériau ainsi obtenu pouvait

contenir à la fois du brai et des résidus de matériel végétal non transformé. Si le brai de bouleau était généralement utilisé à l'état brut, quelques rares évidences archéologiques et chimiques attestent de l'utilisation de brai de bouleau ayant été mélangé à d'autres substances organiques telles que de la cire d'abeille (Regert et *al.*, 2003, van Gijn et Boon, 2006, Rageot et *al.*, 2015), de la résine de pin (Rageot et *al.*, 2015) ou de la matière grasse (Dudd et Evershed, 1999).

Le brai de bouleau, ainsi préparé, était exploité notamment pour ses propriétés adhésives et hydrophobes. En effet, l'essentiel des découvertes archéologiques faisant état de ce matériau témoignent de son utilisation pour l'emmanchement d'outils lithiques ou osseux (Regert et *al.*, 1998, Urem-Kotsou et *al.*, 2002), pour la réparation de poteries ébréchées ainsi que pour assurer l'étanchéité des céramiques (Binder et *al*., 1990, Charters et *al*., 1993, Connan et *al.*, 2000, Bosquet et *al.*, 2001, Urem-Kotsou et *al.*, 2002, Rageot et *al.*, 2015), comme élément décoratif de poteries (Vogt, 1949, Trąbska et *al.*, 2011, Rageot et *al.*, 2015) mais aussi, de manière plus étonnante, en tant que produit à mâcher comme le révèlent les empreintes de dents préservées à la surface de quelques fragments de brai (Aveling et Heron, 1999, van Gijn et Boon, 2006). Il est également suggéré que le brai de bouleau ait pu être utilisé pour traiter la surface des poteries, afin de réduire la porosité de la céramique et lui conférer ainsi une plus grande résistance lors de sa chauffe (récipients utilisés pour la cuisson des aliments ; Regert et *al.*, 2003).

Dans le cadre de nos travaux, nous avons été contactés par des archéologues explorant un site archéologique situé à Eckwersheim (Alsace, France). En effet, ils avaient mis au jour un collier, parmi le mobilier et les objets funéraires d'une tombe hallstattienne (premier âge du Fer). La présence d'une substance noire, vraisemblablement organique, sur celui-ci (cf. § 5.2.1.) nous a conduit à nous y intéresser afin d'en déterminer la composition moléculaire et d'identifier sa possible fonction dans la confection du pendentif. L'analyse moléculaire ayant révélé la présence de nombreux dérivés triterpéniques de la famille du lupane, des biomarqueurs moléculaires abondants dans le bois et l'écorce de bouleau (Hayek et *al.*, 1989, Krasutsky, 2006, Schnell et *al.*, 2014), ce travail de recherche a été complété par l'analyse d'écorce de bouleau en état de décomposition et de brais de bouleau de référence afin de différencier les marqueurs moléculaires liés au traitement thermique de ceux naturellement présents et/ou liés au vieillissement et à l'altération naturelle du matériau.

5.2. Présentation des échantillons étudiés

5.2.1. Echantillons archéologiques

Dans le cadre des travaux d'infrastructures liés à l'aménagement de la ligne à grande vitesse (LGV) Est-Européenne, l'INRAP est intervenu au niveau de différents secteurs placés le long du tracé afin de répertorier les vestiges archéologiques et de les étudier. Ainsi, les fouilles archéologiques, menées par le Dr. Clément Féliu et le Dr. Yohann Thomas à Eckwersheim (Bas-Rhin, Alsace), ont permis la découverte de deux tertres funéraires datés, d'après le mobilier, de l'Hallstatt [5] (premier âge du Fer ; Thomas et Féliu, 2012). Parmi les sépultures mises au jour, la tombe 6008 a fourni de nombreux objets dont un collier (Figure 5.2), daté entre 625 et 550 av. J.-C. (phase Ha D1), comprenant un pendentif constitué de deux petites coques de bronze ajustées au moyen d'une substance noire, organique sans doute, d'origine inconnue. Cette substance (échantillon PRL BG 6008-02) a fait l'objet d'une analyse en biogéochimie organique afin d'en étudier sa composition, son origine et sa fonction.

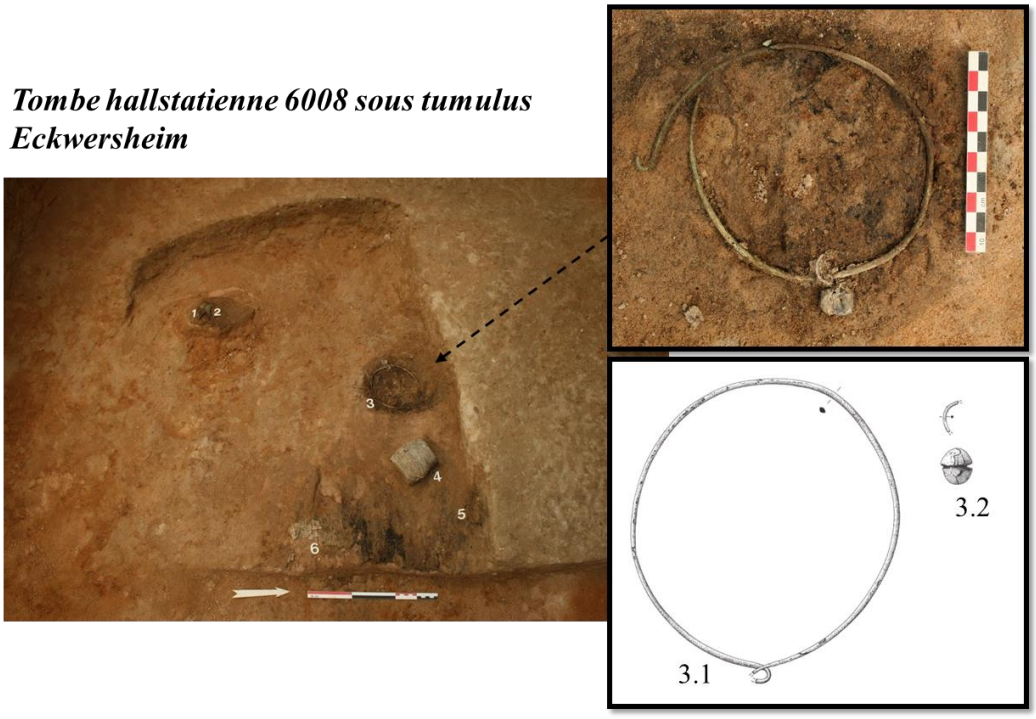


FIG. 5.2 Collier (3.1) mis au jour au sein de la tombe 6008 du complexe funéraire d'Eckwersheim et pendentif associé (3.2) dont un fragment a été prélevé en vue d'une analyse en géochimie organique (*source de l'image* : INRAP).

[5] La période de l'Hallstatt ou premier âge du Fer doit son nom à la ville autrichienne du même nom, connue pour avoir abrité une importante nécropole de cette période. Cette dernière est sous-divisée en 4 phases, désignées par les lettres A (1200-1000 av. J.-C.), B (1000-800 av. J.-C.), C (800-650 av. J.-C.) et D (650-475 av. J.-C.).

5.2.2. Echantillons de bouleau de référence : écorce et produits de pyrolyse

Afin de distinguer les marqueurs moléculaires issus du vieillissement naturel de l'écorce de bouleau de ceux formés lors du traitement thermique de cette même écorce, trois échantillons de référence ont été intégrés à l'étude. Le premier est constitué de fragments d'écorce de bouleau prélevés sur un bois en état de décomposition (Figure 5.3.a) et le second du produit obtenu par pyrolyse de cette même écorce au laboratoire (Figure 5.3.b). Le choix d'un matériau de départ altéré (bois en décomposition), et non frais, a été motivé par la présence, dans l'échantillon archéologique (cf. § 5.3.3.), de dérivés particuliers du lupane, dont il s'agissait de préciser l'origine (diagénétique *vs*. pyrolytique), comme nous le verrons plus loin. Les copeaux d'écorce de bouleau ont été pyrolysés sous atmosphère inerte (N_2) à haute température pendant 10 minutes dans un montage constitué d'un ballon et d'un réfrigérant (cf. § 7.1.6.b pour le protocole détaillé). L'extrait organique obtenu à partir du résidu carbonisé présent dans le ballon (Fig. 5.3.b) ainsi qu'une substance s'étant condensée sur le réfrigérant, contenant les composés les plus volatils, ont été analysés séparément (désignés respectivement par les termes de « pyrolyse 1 » et « pyrolyse 2 »). Toutefois, l'analyse de ce dernier n'ayant pas montré de différences significatives au niveau de la distribution des triterpènes, sa composition moléculaire ne sera pas décrite par la suite. Notons tout de même que, de manière prévisible, la proportion en dérivés phénoliques volatils (non détaillés ci-après) issus de la dégradation de la lignine y est bien plus élevée.

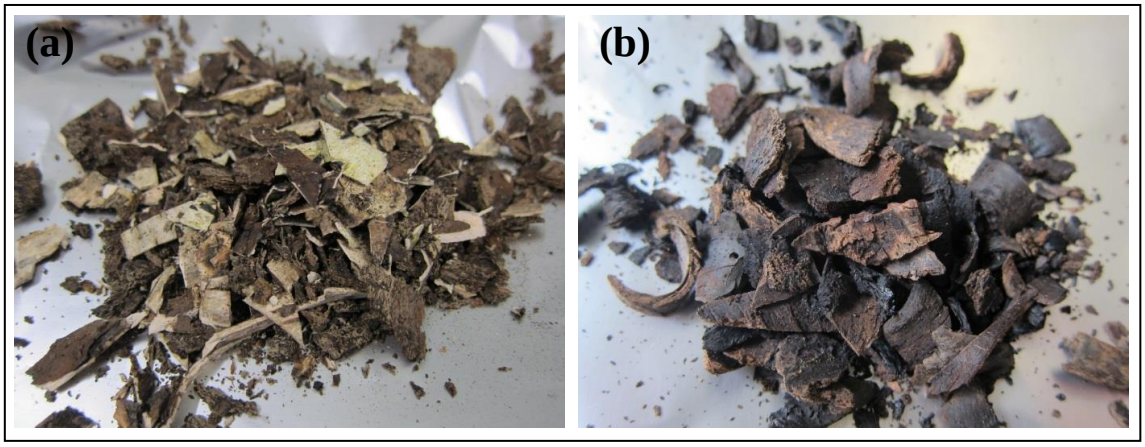


FIG. 5.3 Ecorce de bouleau (**a**) avant et (**b**) après le traitement pyrolytique réalisé au laboratoire.

Quant au troisième échantillon de référence, il s'agit d'un échantillon de brai de bouleau produit par l'équipe d'archéologie expérimentale du Museumsdorf Düppel de Berlin (numéro de référence 162/5 20 18 00) et gracieusement fourni par le Dr. Andreas Kurzweil. Ce brai a été obtenu après chauffe de bois de *Betula pendula* selon la méthode du « double-pot ».

5.3. Résultats et discussion

5.3.1. Etude du contenu lipidique de l'écorce de bouleau

Sans grande surprise, la matière organique extraite de l'écorce provenant d'un bouleau en décomposition renferme principalement une série de triterpènes appartenant à la famille des lupanoïdes (Figure 5.4), reconnaissables, notamment, au fragment caractéristique à *m/z* 189 dans leur spectre de masse (Budzikiewicz et *al.*, 1963). La distribution de ces triterpènes est prédominée par la bétuline (**T12**, estimée à > 60% des lipides analysés), provoquant de ce fait la saturation du pic chromatographique[6] en GC-MS. Accompagnant la bétuline, nous avons pu noter la présence du lupéol (**T8**), de l'acide bétulinique (**T30**), de la lupénone (**T50**), du bétulonal (**T51**) et de la bétulone (**T52**). Ce résultat s'accorde parfaitement avec les études publiées précédemment faisant état du contenu moléculaire de l'écorce de bouleau (Hayek et *al.*, 1990, Krasutsky, 2006, Jäger et *al.*, 2009, Schnell et *al.*, 2014). Si la bétuline est connue pour être largement répandue chez les angiospermes (Hayek et *al.*, 1989), l'abondance tout à fait remarquable de ce composé au sein des extraits de *Betula* (dont il tire son nom) fait de celui-ci un biomarqueur moléculaire adapté pour la caractérisation de matériel végétal originaire de bouleau (Hayek et *al.*, 1989, Krasutsky, 2006).

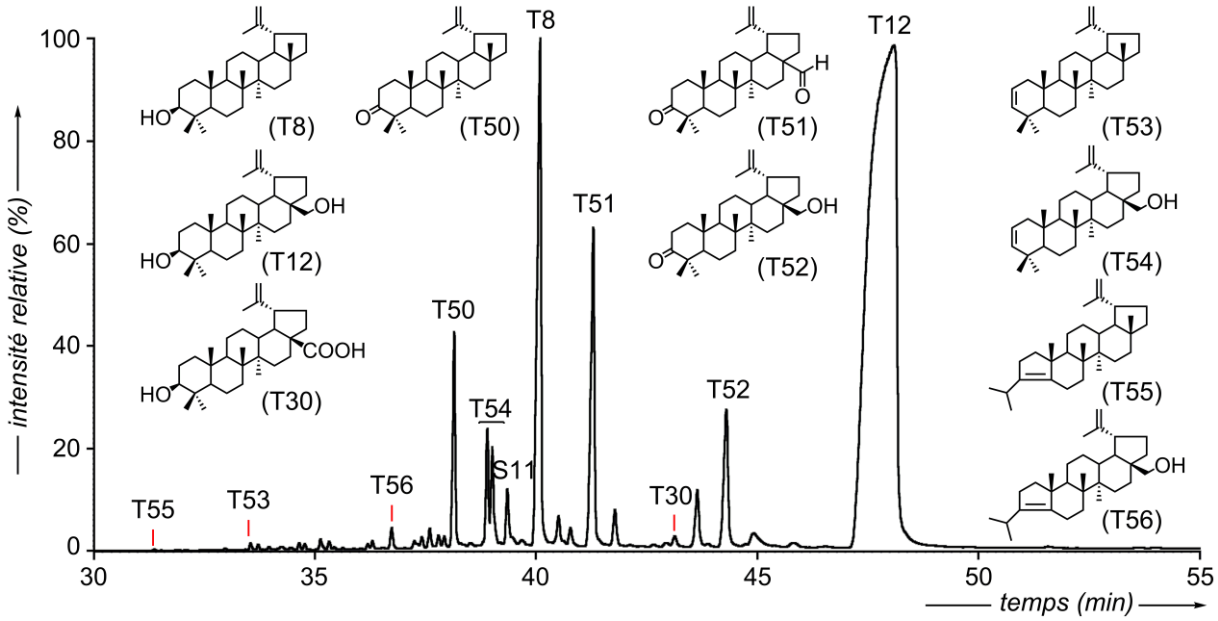


FIG. 5.4 Chromatogramme en phase gazeuse obtenu pour l'extrait lipidique de l'écorce d'un bouleau altéré. Les alcools sont analysés sous la forme d'acétates et les acides sous la forme d'esters méthyliques (programme de température F).

[6] Malgré une saturation notable du pic chromatographique correspondant à la bétuline, nous avons volontairement injecté l'échantillon en GC-MS dans les proportions présentées en Figure 5.4, et cela afin de permettre une bonne détection des triterpènes élués avant la bétuline et présents à de plus faibles concentrations.

Outre la détection de lipides naturellement présents au sein de l'écorce de bouleau, des produits liés à l'altération de ces derniers ont été mis en évidence. Il s'agit notamment de produits présentant une insaturation en position C-2(3) (**T53** et **T54**) formés par déshydratation du lupéol et de la bétuline (Bosquet et *al.*, 2001, Modugno et *al.*, 2006a). Dans le cas présent, nous avons pu établir que leur présence, dans cette fraction lipidique, est un artéfact lié à leur formation dans l'injecteur PTV de l'appareil de GC-MS, et qu'ils ne correspondent donc pas à des produits formés naturellement lors des processus d'altération de l'écorce.

D'autres marqueurs triterpéniques de l'altération de l'écorce de bouleau finissent de compléter cette distribution moléculaire. Il s'agit des composés **T55** et **T56** que nous avons identifiés comme étant des dérivés de lupane résultant de la contraction du cycle A. Les structures moléculaires de ces composés **T55** et **T56** ont été proposées sur la base de leur spectre de masse respectif (Figure 5.5), ainsi que par comparaison avec les spectres de masse de triterpènes de la série de l'oléanane présentant une contraction du cycle A similaire (Elgamal et *al.*, 1969) et, tout spécialement, avec le spectre de masse du composé **T57** (dérivé d'allobétulane, cf. ci-dessous, Figures 5.8) décrit dans la littérature (Li et *al.*, 1998, Salvador et *al.*, 2009). La perte de 43 Da par rapport à l'ion moléculaire $M^{+\cdot}$ (respectivement 408 et 466 pour **T55** et **T56**) correspond à la perte du groupement *iso*-propyle sur le cycle A, typique de ces dérivés, qui conduit ainsi à la formation des fragments de base à *m/z* 365 et 423 (Elgamal et *al.*, 1969). D'autres fragments caractéristiques de ces composés ont été rapportés dans la littérature parmi lesquels, notamment, l'ion résultant de la rupture des liaisons C-6/C-7 et C9/C-10 (Elgamal et *al.*, 1969) qui mène, en définitive, à la formation des ions en *m/z* 229 et 227 observés respectivement dans les spectres des composés **T55** et **T56** (Figure 5.5).

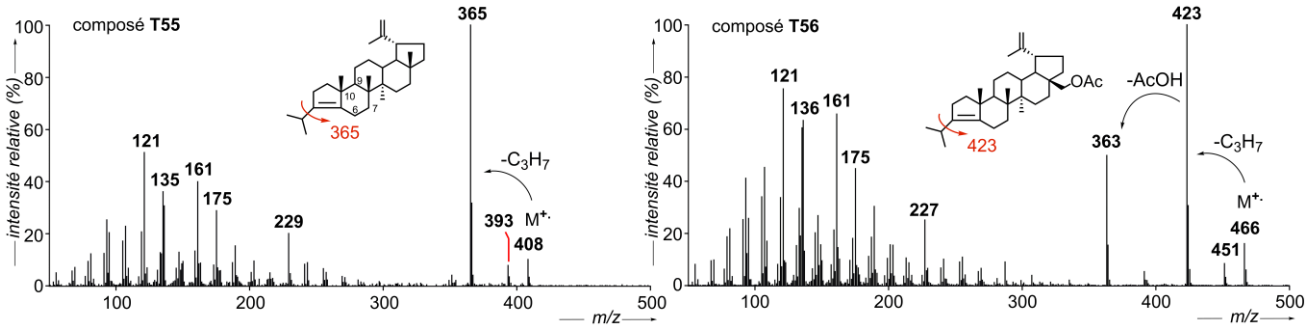


FIG. 5.5 Spectres de masse des A-*neo*-lupanoïdes identifiés dans l'extrait lipidique d'écorce de bouleau altéré (EI, 70 eV). La fonction alcool (composé **T56**) est analysée sous forme d'acétate.

En conditions acides, ces dérivés de la famille des A-*neo*-triterpènes se forment par la perte de l'alcool en C-3(β) accompagnée d'un réarrangement intramoléculaire de type Wagner-Meerwein (migration 1,2 d'un groupement alkyle sur le carbocation adjacent, Figure 5.6 ; Salvador et *al.*, 2009). Une telle modification intramoléculaire peut se produire lors de la diagénèse de la matière organique de végétaux dans les sédiments (ten Haven et *al.*, 1992). Concernant l'échantillon d'écorce de bouleau étudié, la formation des A-*neo*-lupanoïdes identifiés est vraisemblablement la conséquence du vieillissement de l'écorce et de sa décomposition. Ce processus a d'ailleurs pu être favorisé par des conditions acides induites par la libération de nombreux dérivés phénoliques au sein du bois en état de décomposition lors de la dégradation de la lignine (processus de dépolymérisation ; Colombini et *al*., 2009).

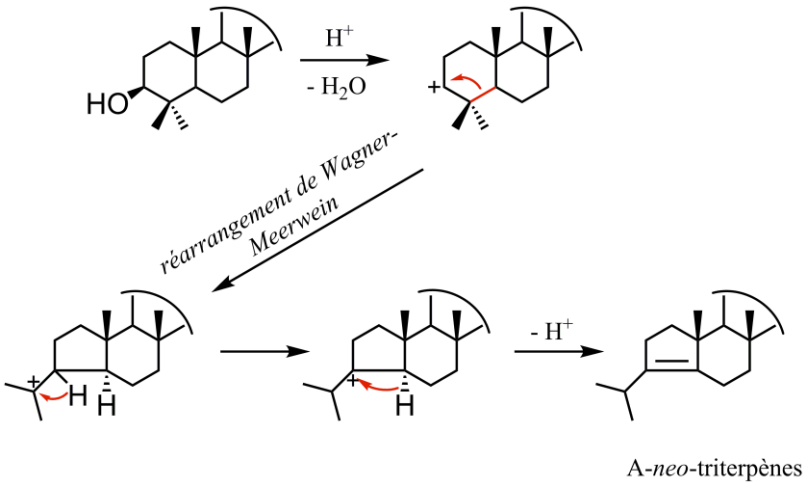


FIG. 5.6 Formation des A-*neo*-triterpènes par réarrangement de Wagner-Meerwein en conditions acides décrite par Salvador et *al.*, 2009.

5.3.2. Etude moléculaire de produits de chauffe d'écorce de bouleau

Le résidu obtenu après chauffe à haute température de l'écorce de bouleau (« pyrolyse 1 ») est principalement constitué de quatre classes de composés (Figure 5.7):

- ✓ de nombreux phénols de faible poids moléculaire (en début de chromatogramme, non présentés) résultant de la dégradation de la lignine (Faix et *al.*, 1990).
- ✓ des triterpènes natifs de l'écorce de bouleau (cf. ci-dessus) que sont le lupéol (**T8**), la bétuline (**T12**), l'acide bétulinique (**T30**), la lupénone (**T50**), le bétulonal (**T51**) et la bétulone (**T52**). Ce résultat montre que le processus de chauffe n'a conduit qu'à une dégradation partielle des triterpènes biologiques (le lupéol et la bétuline, par exemple).

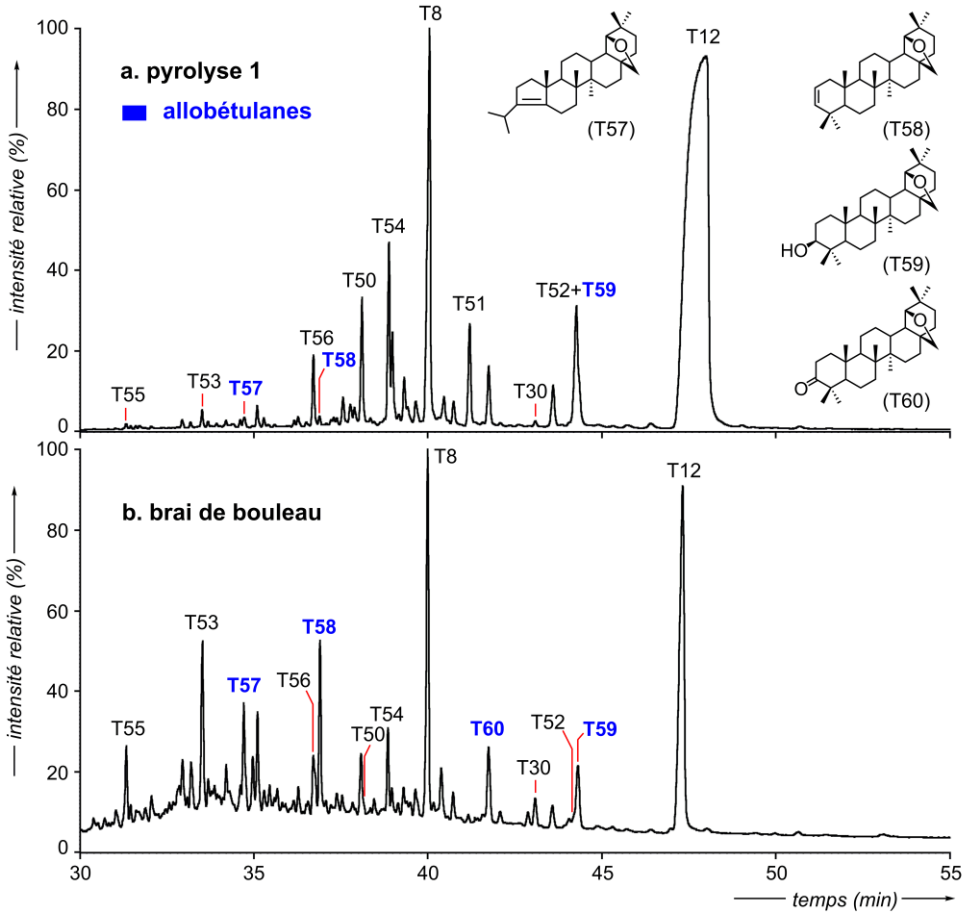


FIG. 5.7 Chromatogrammes en phase gazeuse des extraits lipidiques obtenus suite à un traitement thermique de l'écorce de bouleau : (**a**) cas de l'expérience de pyrolyse réalisée au laboratoire et (**b**) brai de bouleau obtenu selon une méthode ancestrale (méthode du « double-pot ») mise en place dans le cadre de travaux d'archéologie expérimentale (« Museumsdorf Drüppel » de Berlin). Les alcools sont analysés sous la forme d'acétates et les acides sous la forme d'esters méthyliques.

✓ des triterpènes issus de la transformation du lupéol et de la bétuline par déshydratation (**T53** et **T54**). Contrairement à l'analyse précédente d'écorce de bouleau altérée, le composé **T54** ne correspond pas un artéfact lié à sa formation dans l'injecteur PTV lors de l'analyse par GC-MS puisque sa détection par GC-FID (injecteur « *on-column* » en mode « *track-oven* ») atteste de sa présence intrinsèque dans l'échantillon. Quant au composé **T53**, bien que sa présence en faible quantité ne nous permette pas de le détecter clairement sur le chromatogramme obtenu en GC-FID, cela ne signifie pas pour autant qu'il n'ait pas été formé par déshydratation du lupéol lors de l'expérience de pyrolyse. La présence de Δ^2-lupanoïdes dans l'extrait du résidu d'écorce carbonisé s'explique donc par une réaction de déshydratation s'opérant lors du processus de chauffe à haute température, comme cela avait été observé lors d'une expérience de pyrolyse effectuée à 600 °C (Regert et *al.*, 2006).

- ✓ des A-*neo*-lupanoïdes produits par réarrangement intramoléculaire du cycle A (**T55** et **T56**). Présents à l'origine dans l'écorce de bouleau ayant servi pour l'expérience de pyrolyse (Figure 5.4), il est difficile de préciser l'effet du chauffage sur de tels composés au vu de nos données. En effet, si nous remarquons une légère augmentation de l'intensité relative du composé **T56** après pyrolyse, pouvant ainsi présumer d'un effet lié au traitement thermique, il pourrait également s'agir d'une augmentation apparente liée à la diminution de l'intensité relative des marqueurs naturels d'écorce de bouleau.

- ✓ de nouveaux triterpènes dérivant de la bétuline appelés « allobétulanes » (**T57** à **T59**), identifiés par comparaison avec les données MS de la littérature (Figures 5.8 et 5.9 ; Schmidt et Huneck, 1979, Lavoie, 2001). Il s'agit de dérivés de la bétuline formés par un réarrangement intramoléculaire au niveau du cycle E en milieu acide (Figure 5.10 ; Green et *al.*, 2007, Salvador et *al*., 2009). Comme ils n'ont pu être détectés dans l'écorce naturellement altérée qui nous a servi de substrat pour l'expérience de pyrolyse, la présence des allobétulanes au sein des produits de chauffe confirme leur formation, de manière exclusive, par altération thermique du matériel végétal de bouleau (Heron et *al.*, 1999, Rageot, 2015). Cependant, il nous semble important de préciser, ici, que les allobétulanes n'ont pas toujours été considérés comme des marqueurs de transformation anthropique. En effet, Hayek et *al.* (1990) mentionnent la présence de l'allobétulone (**T60**) dans de l'écorce de bouleau. De même, la détection de l'allobétul-2-ène (**T58**) a été, dans certains cas, associée à l'altération naturelle du brai en milieu naturel, sédimentaire notamment, en lien avec l'enfouissement d'objets archéologiques (Regert et *al.*, 1998, Bosquet et *al.*, 2001, Regert, 2004). A ce propos, il convient, toutefois, de clarifier la structure moléculaire de ce que l'on nomme « allobétul-2-ène », à savoir une structure issue d'un réarrangement intramoléculaire au niveau du cycle E (composé **T58** représenté en Figure 5.7), contrairement à certains articles où ce nom désigne le produit d'élimination de l'alcool en en C-3 de la bétuline (Binder et *al*., 1990, Regert et Rolando, 1996). Quoi qu'il en soit, l'hypothèse selon laquelle l'allobétul-2-ène constitue un marqueur de dégradation naturelle repose sur le fait que les co-auteurs de ces travaux n'ont pas été en mesure d'identifier ces dérivés d'allobétulane lors d'expériences de dégradation de la bétuline et du lupéol réalisées en laboratoire et mettant en jeu le mélange $POCl_3$-pyridine (Regert et *al.*, 1998, Regert, 2004). Les conditions basiques prévalant dans ces expériences, en effet, ne favorisent pas la formation des dérivés de type allobétulane et, d'ailleurs, conduisent uniquement à la formation de Δ^2-triterpènes (Trendel, 1985, Dehaen et *al.*,

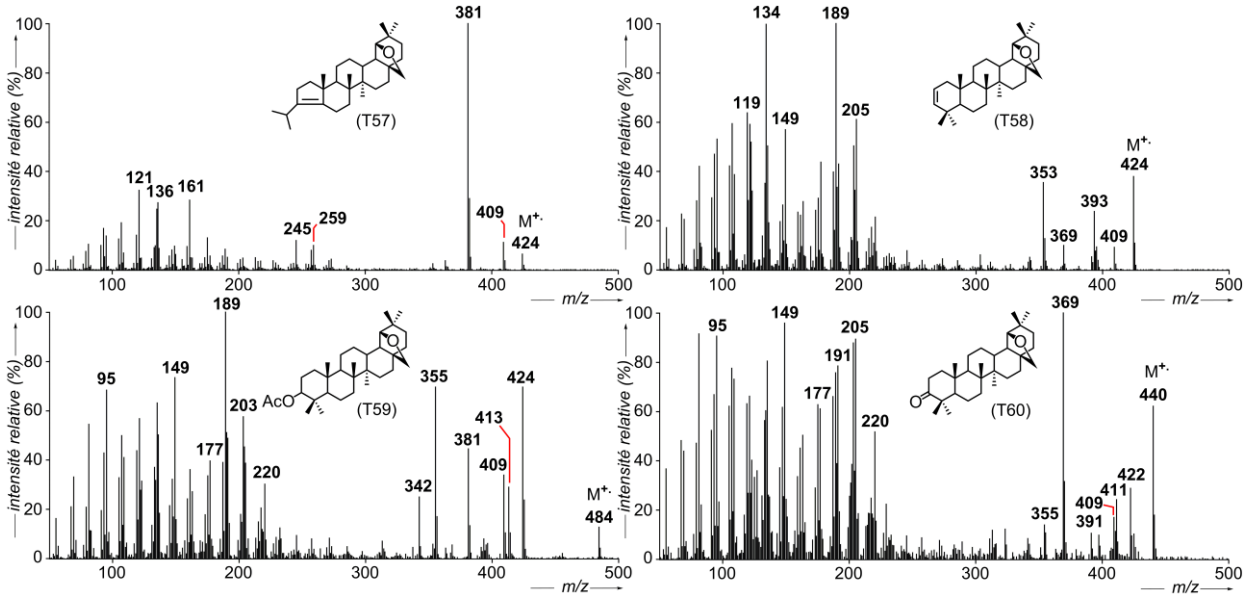


FIG. 5.8 Spectres de masse des dérivés d'allobétuline (EI, 70 eV).

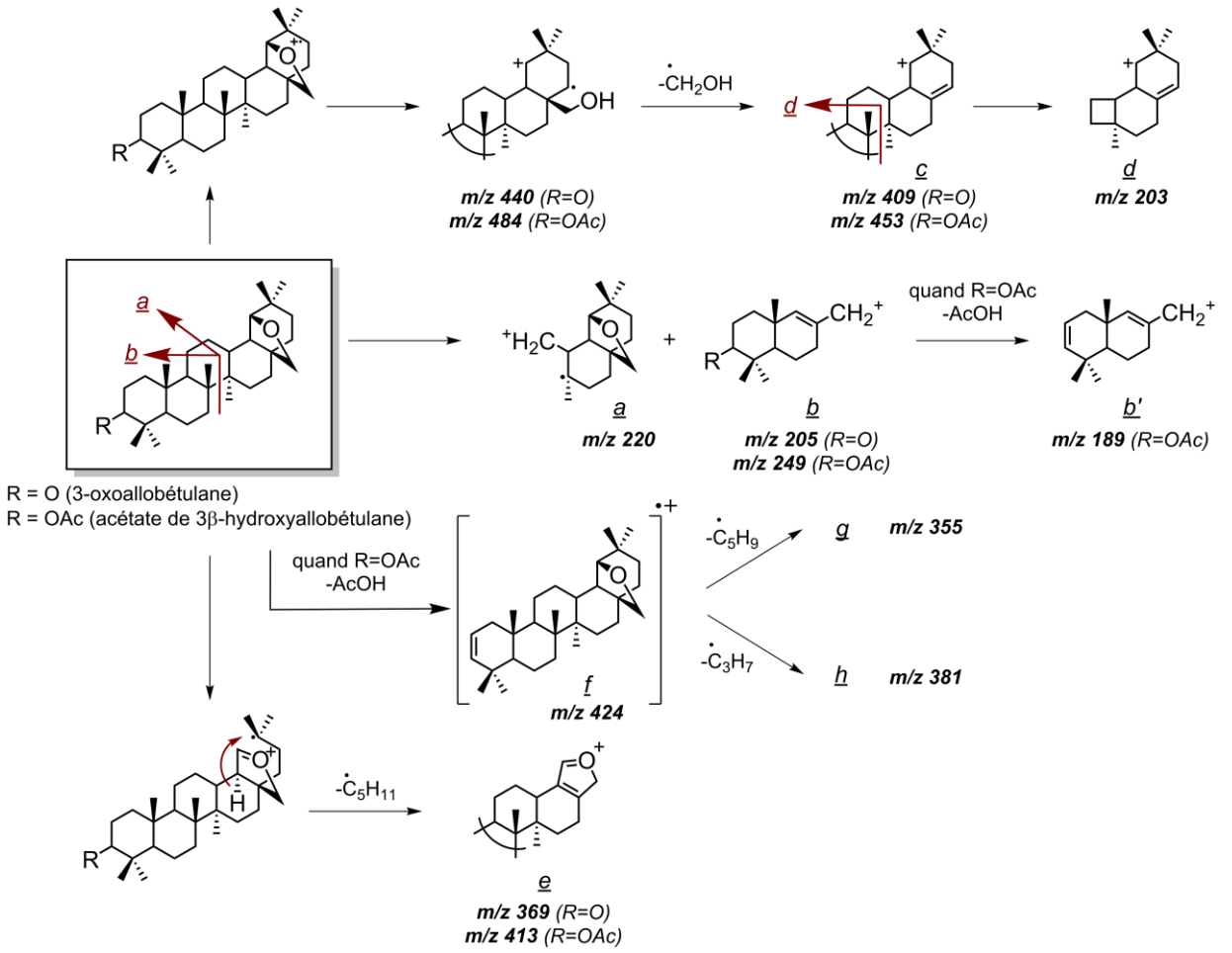


FIG. 5.9 Mode de fragmentation des dérivés d'allobétuline en spectrométrie de masse (EI ; d'après Schmidt et Huneck, 1979).

2011) tels que les produits de déshydratation du lupéol et de la bétuline (**T53** et **T54**). Cependant, de telles expériences ne peuvent être considérées comme des expériences de simulation réalistes dans la mesure où les conditions expérimentales mises en œuvre sont très différentes des conditions prévalant lors de la préparation du brai de bouleau. Dans notre cas, la production de ces composés lors de la pyrolyse est clairement établie, nous conduisant ainsi à considérer ces dérivés comme les marqueurs moléculaires d'un traitement thermique et donc de production de brai de bouleau.

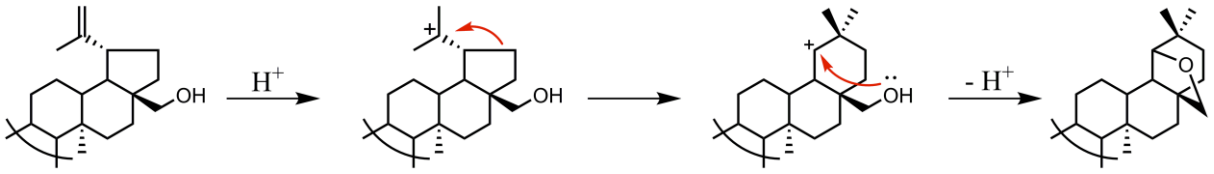


FIG. 5.10 Réarrangement intramoléculaire au niveau du cycle E à l'origine de la formation des allobétulanes (Green et *al.*, 2007, Salvador et *al.*, 2009).

La Figure 5.7.b montre, par ailleurs, le profil lipidique observé pour l'échantillon de brai de bouleau 162/5 20 18 00 obtenu dans le cadre de travaux d'archéologie expérimentale selon le procédé de distillation *per descensum* (ou méthode du « double-pot »). Le contenu moléculaire de ce brai présente des différences significatives par rapport à celui du résidu obtenu au laboratoire par pyrolyse d'écorce de bouleau, qui s'expliquent, à l'évidence, par une différence de méthode employée pour la production de ce brai. Si la bétuline s'avère d'ordinaire nettement plus abondante que les autres lupanoïdes dans l'écorce de bouleau, la pyrolyse en milieu totalement clos et anoxique ainsi que sur une durée de temps relativement longue a entrainé une dégradation de la bétuline nettement plus importante que dans le cas de notre courte expérience de pyrolyse (10 min sous atmosphère de N_2). Plus généralement, le brai de bouleau élaboré par distillation *per descensum* se caractérise par une proportion moindre des triterpènes natifs de l'écorce de bouleau par rapport à leurs produits de transformation. Nous observons ainsi une augmentation des lupanoïdes insaturés en C-2(3) formés par déshydratation de l'alcool en C-3 et une teneur nettement supérieure en dérivés de type allobétulane (composés **T57** à **T60**) dans le brai de bouleau 162/5 20 18 00. Par ailleurs, si les proportions de lupénone (**T50**) et de bétulone (**T52**) peuvent augmenter du fait de l'oxydation du lupéol et de la bétuline lors de la chauffe (Bosquet et *al.*, 2001), nous constatons que ces produits ne sont présents qu'à l'état de trace au sein du brai de bouleau 162/5 20 18 00. Enfin, concernant la détection des A-*neo*-lupanoïdes au sein du brai expérimental 162/5 20 18 00, leur origine n'est pas formellement établie. En effet, sans

l'analyse de l'écorce de bouleau utilisée pour la production de ce brai, qui a pu contenir ces produits d'altération, tout comme dans le cas de notre propre échantillon d'écorce, il semble délicat de conclure quant à la formation de ces A-*neo*-lupanoïdes par pyrolyse de l'écorce de bouleau.

De l'ensemble de ces observations, nous pouvons en déduire que la cuisson à haute température de copeaux d'écorce de bouleau conduit immanquablement à la transformation d'une partie des triterpènes biosynthétisés par cette espèce végétale (lupéol, bétuline, acide bétulinique…). Ce traitement thermique est notamment à l'origine de la présence de l'allobétuline et de ses dérivés dans l'échantillon de brai de bouleau. Ces composés sont formés par réarrangement intramoléculaire acido-catalysé au niveau du cycle E de la bétuline et de ses analogues. D'autres transformations ont également été observées, parmi lesquelles une élimination de la fonction alcool en C-3 conduisant aux triterpènes présentant une insaturation en C-2. Par conséquent, les dérivés de type allobétulanes et les Δ^2-lupanoïdes peuvent être considérés comme des marqueurs d'une transformation anthropique formés lors de la production de brai (Modugno et *al.*, 2006a). En revanche, la formation des lupanoïdes présentant une fonction cétone en C-3 ou une contraction du cycle A en réponse à un traitement thermique n'a pu être clairement établie dans notre cas.

5.3.3. Identification de la substance naturelle utilisée comme agent collant sur le pendentif d'Eckwersheim

L'étude moléculaire par GC-MS de l'échantillon archéologique d'Eckwersheim a révélé la présence de deux familles de terpènes particulièrement intéressantes et révélatrices de ce qu'a pu être cette substance intercalée entre les deux coques de bronze formant le pendentif (Figure 5.11). La première famille à laquelle nous allons nous intéresser est constituée des composés diterpéniques que sont l'acide di-déhydroabiétique (**D4**), l'acide déhydroabiétique (**D5**), l'acide 7-oxodéhydroabiétique (**D8**) ainsi que les alcools tertiaires en C-15 apparentés (composés **D9** et **D10**), tous dérivant de la même molécule précurseur : l'acide abiétique (**D11**, cf. appendice). Ce dernier est connu pour être un composé naturel ubiquiste des résines de conifères (Otto et Wilde, 2001) et particulièrement abondant dans les résines de Pinacées (Otto et *al.*, 2007). La présence de ces diterpènes indique donc une contribution issue de conifères dans la substance collante du pendentif qui peut correspondre à de la résine ou à de la poix, un goudron végétal préparé par pyrolyse de bois de conifère (*e.g.*, Evershed et *al.*, 1985, Connan et Nissenbaum, 2003, Bailly, 2015).

Cependant, l'absence, au sein de notre échantillon archéologique, de composés aromatiques diterpéniques, tel que le rétène (**D12**, cf. appendice), qui sont généralement formés en abondance par défonctionnalisation et aromatisation des acides résiniques (*e.g.*, Evershed et *al.*, 1985, Connan et Nissenbaum, 2003) lors de la préparation de la poix, conduit à exclure la possibilité que de la poix ait servi à la confection du bijou. En revanche, la présence de dérivés monoaromatiques de l'acide abiétique, dont certains possèdent une fonction cétone en C-7 (**D8**, **D10**) laisse entrevoir l'usage d'une résine brute dont les composés ont été altérés, et en particulier oxydés, lors d'un processus naturel de vieillissement du matériau (Regert et Rolando, 2002, Colombini et *al.*, 2005a, Bailly, 2015).

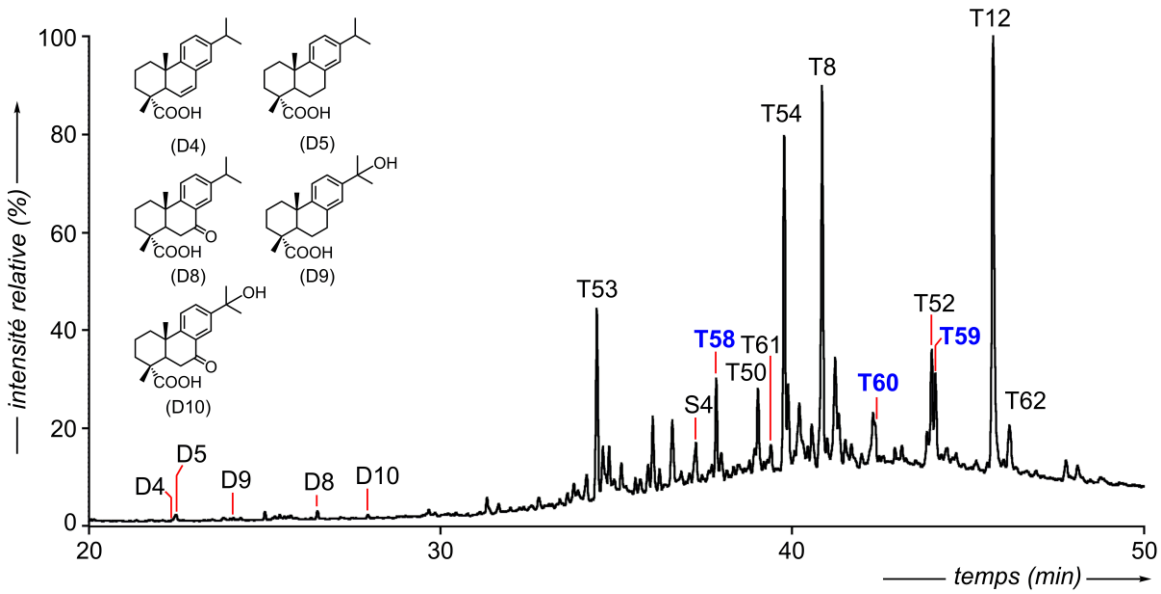


FIG. 5.11 Chromatogramme en phase gazeuse montrant la distribution des lipides extraits de l'agent collant prélevé sur le pendentif archéologique (Eckwersheim, Alsace). Les alcools sont analysés sous la forme d'acétates et les acides sous la forme d'esters méthyliques.

En plus de l'identification de dérivés diterpéniques spécifiques aux résines issues de conifères, l'utilisation d'une composante végétale originaire, cette fois-ci, d'angiospermes, se manifeste à travers la présence de nombreux triterpènes. Plus précisément, il s'agit de composés triterpéniques appartenant à la famille des lupanoïdes (*m/z* 189 en MS) parmi lesquels le lupéol (**T8**), la bétuline (**T12**), la lupénone (**T50**), la bétulone (**T52**), la lupanone (**T61**, cf. appendice), et, enfin, le lupane-3,28-diol (**T62**, cf. appendice), des composés naturellement présents au sein de l'écorce de bouleau (Krasutsky, 2006, Schnell et *al.*, 2014). L'identification de cet ensemble moléculaire nous permet donc de déterminer précisément l'origine du matériau originel, à savoir de l'écorce de bouleau dont on peut émettre

l'hypothèse qu'il puisse s'agir d'écorce de *Betula pendula* (bouleau verruqueux) ou de *Betula pubescens* (bouleau pubescent), ces dernières étant les deux espèces les plus répandues en Europe (Beck et *al.*, 2016).

Le profil chromatographique révèle, par ailleurs, la présence de marqueurs de transformation anthropique du matériau végétal originel, qui se forment lors de la fabrication du brai de bouleau et, en particulier, les dérivés d'allobétulane (composés **T58** à **T60**), dont les proportions relatives avoisinent celles observées au sein du brai de bouleau 162/5 20 18 00. L'importance des dérivés formés par déshydratation du lupéol et de la bétuline (respectivement **T53** et **T54**) au sein de l'extrait organique de l'échantillon archéologique témoigne, avec les dérivés d'allobétulane, d'une transformation de l'écorce de bouleau par pyrolyse visant à obtenir du brai. Par comparaison avec les nombreuses études ayant rapporté l'identification de ces différents marqueurs de brai de bouleau (Bosquet et *al.*, 2001, Connan et *al.*, 2000, Rageot, 2015, Rageot et *al.*, 2015) et en conformité avec l'étude de brai présentée ci-dessus, nous pouvons donc sans ambiguïté affirmer que l'extrait lipidique de l'échantillon PRL BG 6008-02 d'Eckwersheim se compose majoritairement de brai de bouleau. La ressemblance de l'empreinte moléculaire de l'échantillon archéologique avec celle du brai de référence 162/5 20 18 00 peut, par ailleurs, suggérer que des procédés de production relativement similaires ont pu être utilisés dans les deux cas, à savoir la méthode de distillation *per descensum*, connue en France au moins à partir de l'âge du Fer. Ce matériau devait vraisemblablement servir de liant entre les deux coques de bronzes afin de les fixer et, ainsi, constituer le pendentif du bijou.

Hormis quelques rares évidences de brai de bouleau se trouvant être mélangé à d'autres substances (Dudd et Evershed, 1999, Regert et *al.*, 2003, van Gijn et Boon, 2006, Rageot et *al.*, 2015), celui-ci a généralement été employé sous sa forme brute. Si le « noyau » de pendentif d'Eckwersheim est constitué majoritairement de brai de bouleau, son examen moléculaire a également révélé la présence d'une résine fraîche (*i.e.*, non chauffée) de conifère altérée naturellement par oxydation. Toutefois, la très faible concentration des dérivés d'acide abiétique par rapport aux triterpènes suggère que la présence de cette résine est liée à une « contamination » de l'échantillon. Cette contamination aurait pu être introduite, par exemple, lors de la réutilisation d'un récipient ayant contenu de la résine lors de la préparation du brai de bouleau, voire par contact avec du matériel issu de conifères.

5.4. Conclusion

En résumé, l'étude moléculaire du pendentif d'Eckwersheim (Alsace, France), daté de la période de l'Hallstatt, a permis l'identification de la substance végétale utilisée pour confectionner le bijou et, plus précisément, pour permettre la fixation des deux coques en bronze qui le constituent. En effet, la présence de nombreux dérivés triterpéniques appartenant à la famille du lupane a suggéré l'emploi de matériel végétal issu d'écorce de bouleau. La présence en quantité notable de dérivés d'allobétuline et de Δ^2-triterpènes dans l'échantillon archéologique nous permet de postuler que l'adhésif utilisé lors de la confection du pendentif est du brai de bouleau ayant pu être préparé par la méthode du « double-pot ». En effet, la comparaison des signatures moléculaires de fragments d'écorce de bouleau altéré, du produit résultant de la pyrolyse de cette même écorce et d'un brai de bouleau réalisé selon la méthode du « double-plot », nous a permis de distinguer, parmi les triterpènes détectés, ceux naturellement présents dans l'écorce de bouleau (le lupéol et la bétuline étant quantitativement majoritaires), de ceux issus d'une altération naturelle ou forcée (Figure 5.12). A la lumière des résultats obtenus, nous en avons déduit qu'aussi bien les dérivés d'allobétuline que les Δ^2-triterpènes constituaient des biomarqueurs de chauffe pertinents.

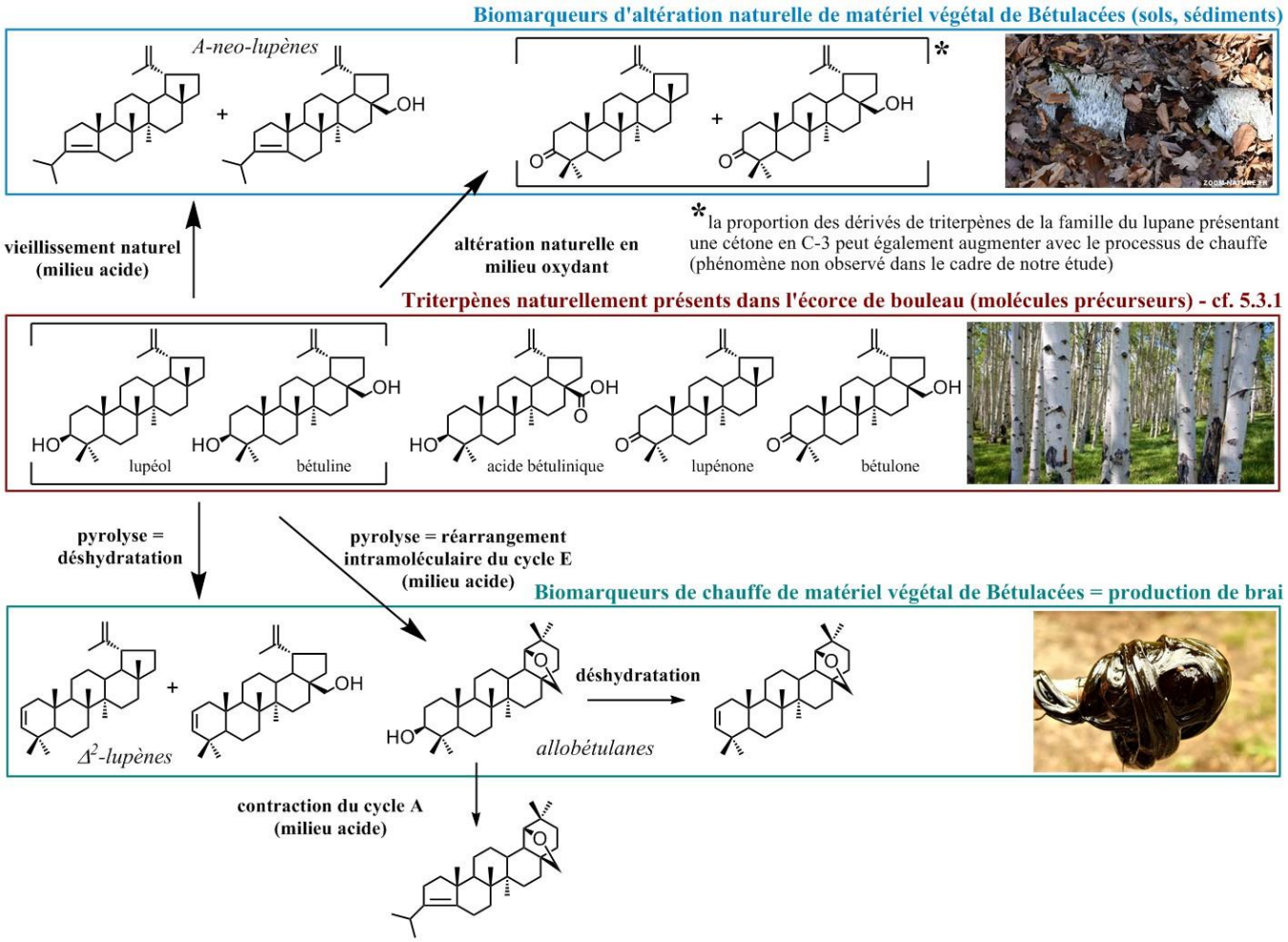


Fig. 5.12 Voies de transformations naturelles ou anthropiques du lupéol et de la bétuline à l'origine de la formation des biomarqueurs utilisés pour la caractérisation de brai de bouleau et/ou de matériel végétal de bouleau altéré du fait de l'enfouissement en contexte archéologique (*source des images* : www.zoom-nature.fr, alk-abello.com et www.youtube.com/watch?v=S0wKbpt613U).

Chapitre 6 : Conclusion générale

Dans le cadre de cette thèse, nous souhaitions apporter, au moyen d'outils moléculaires, isotopiques et par datation au ^{14}C, des réponses à certaines problématiques d'ordre archéologique. Ce travail de thèse s'est articulé autour de deux thématiques majeures : (1) l'étude de marqueurs moléculaires préservés au sein de sols archéologiques, généralement en lien avec une occupation humaine, et (2) l'étude de substances végétales impliquées en tant qu'ingrédients dans la confection d'objets anciens. Nous souhaiterions donc conclure ce travail en attirant l'attention du lecteur sur les possibilités qu'offrent de telles études et les perspectives que ces travaux ouvrent.

- ***Etude de paléosols et apport des mesures de $\delta^{13}C$ et de datation au ^{14}C***

En premier lieu, nos travaux ont permis de mettre en avant l'intérêt d'étudier la matière organique des sols archéologiques et tout spécialement ceux qui se trouvent piégés au sein de structures dites « en creux » (silos, puits, fentes, fossés, …). Cette matière organique est en effet susceptible de contenir des marqueurs moléculaires lipidiques issus de végétaux et/ou associés à une activité humaine passée. Une telle approche moléculaire à partir de sols peut donner lieu à l'identification de la couverture végétale originelle d'un sol ou de l'utilisation de celui-ci à travers les âges, ce qui représente un précieux atout dans le cadre de reconstitutions archéologiques et paléoenvironnementales. Nos travaux relatifs aux sols piégés dans des structures archéologiques (site d'Obernai) et aux sols anthropisés strasbourgeois viennent à ce titre illustrer cela (cf. chapitres 2 et 3). Dans les sols archéologiques d'Obernai, l'identification de la miliacine, un triterpène pentacyclique de type méthyl éther, spécifique de la céréale de millet (*Panicum miliaceum*) et dont le rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ ($\delta^{13}C$: -21,6 ‰) est typique des lipides de plantes en C4, a permis de mettre en évidence l'existence d'une culture de millet à Obernai. Exception faite de la miliacine, les valeurs de $\delta^{13}C$ des lipides linéaires (*n*-alcanes, *n*-acides et *n*-alcools) isolés de ces mêmes sols révèlent une empreinte isotopique caractéristique de plantes en C3 (entre -31,4 ‰ et -36,2 ‰), suggérant par conséquent qu'une végétation composée de plantes en C3 (pâturages, culture de blé ou autres céréales en C3, …) a vraisemblablement succédé à la culture de millet en C4 en effaçant/remplaçant l'intégralité de la signature lipidique issue des lipides non spécifiques du millet et communs à la plupart des végétaux (lipides linéaires, phytostérols, triterpènes non spécifiques du millet).

Par ailleurs, l'analyse par GC-MS du contenu lipidique de sols anthropisés (couches de sols de couleur particulièrement sombre pouvant indiquer une contribution significative de

matière organique), dont la plupart mis au jour en contexte urbain, a, quant à elle, révélé une quantité importante de 5β-stanols (tout particulièrement de coprostanol et d'épicoprostanol) ainsi que d'acides biliaires dans les échantillons, ce qui laisse supposer un apport conséquent de matière fécale, principalement d'origine humaine. Au vu de ces résultats, nous en avons conclu que les structures ont été utilisées comme latrines. Enfin, dans un des échantillons prélevé Place du Château à Strasbourg, l'abondance des *n*-alcools et, plus spécifiquement, la présence en quantité substantielle de l'homologue en C_{28} a suggéré la contribution de paille de blé. Si l'on ajoute à cela la présence de l'acide hyodésoxycholique -un acide biliaire exclusivement synthétisé par les suidés-, nous pouvons proposer que l'emplacement étudié a été utilisé pour la stabulation d'animaux (cochons). Dans les trois cas cités ci-dessus, l'étude de la matière organique du sol a clairement pu nous indiquer l'usage qui en avait été fait, apportant ainsi de nouveaux éléments (et/ou des éléments complémentaires) aux archéologues qui n'auraient pu en avoir connaissance par le biais d'autres types d'études basées sur l'analyse de macrorestes.

L'étude des sols archéologiques ayant comblé les silos protohistoriques d'Obernai a toutefois souligné la possibilité d'un décalage temporel non négligeable entre l'âge d'une structure et celui de son contenu. En effet, alors que les silos sont datés, pour la plupart, de l'âge du Fer (d'après le matériel archéologique et notamment la typologie des céramiques), il apparaît que la matière organique des sols de comblement est systématiquement plus vieille, en raison, sans doute, d'un mélange de matériel organique récent et plus ancien dont on mesure, en réalité, la moyenne. Ainsi, il est judicieux, lors de l'étude de sols, de replacer l'empreinte moléculaire de ce dernier et notamment de ses constituants lipidiques dans un contexte historique au moyen de mesures de datation. A cet égard, la datation au radiocarbone de composés individuels, préalablement isolés, offre aujourd'hui de nouvelles possibilités pour comprendre la dynamique de la matière organique dans ces sols et de légitimer l'utilisation de certains biomarqueurs en tant qu'archives environnementales et archéologiques. Dans le cadre de l'étude du contenu lipidique des sols de comblement des silos à grains, la datation de la miliacine obtenue après isolement a permis de faire remonter la culture du millet à l'âge du Bronze, période antérieure à celle pendant laquelle les silos ont été utilisés pour le stockage des récoltes. Ces différentes mesures de datation, qu'elles aient été effectuées sur la miliacine, les extraits lipidiques ou la matière organique totale du sol, ont démontré que les structures en « creux » ont la capacité de piéger des paléosols et constituent, à ce titre, des « archives pédologiques » qui méritent d'être considérées au même titre que l'ensemble des

macrorestes archéologiques (charbons, céramiques, matériel osseux, …) mis au jour lors de fouilles de structures anciennes.

- ***Identification de substances végétales issues d'objets archéologiques***

La caractérisation de substances végétales provenant d'objets archéologiques constitue un enjeu de premier plan en archéométrie moléculaire. Lorsqu'ils répondent aux critères de spécificité des biomarqueurs, les lipides « fossiles », que l'on peut identifier via les analyses de GC-MS, représentent de précieux outils moléculaires pour la caractérisation de substances naturelles. Toutefois, l'examen moléculaire d'échantillons de matériel végétal de référence constitue un préalable essentiel afin que soient proposés de nouveaux critères chimiotaxonomiques pertinents pour leur caractérisation. A ce titre, notre étude relative aux résines de référence issues de *Styrax* et de *Liquidambar*, auxquelles s'ajoutent les baumes de Tolu et du Pérou du genre *Myroxylon* (cf. chapitre 4), représente une avancée majeure dans l'étude des baumes aromatiques, avec notamment la première étude moléculaire concernant la résine de *S. officinalis*. Les analyses par GC-MS ont révélé des différences de compositions lipidiques significatives entre ces espèces, de sorte qu'il semble possible d'authentifier une résine fraîche au regard de sa distribution en esters d'acides cinnamique et benzoïque. Cependant, ces composés aromatiques s'avèrent particulièrement sensibles aux processus d'altération (réactions de condensation, d'hydrolyse, …) et ne peuvent donc pas constituer des outils moléculaires de choix dans le cadre d'études archéométriques.

Du fait de l'altération post-dépositionnelle des matériaux archéologiques inhérente aux conditions physico-chimiques du milieu dans lequel l'objet ancien s'est trouvé être en présence, les études biogéochimiques se concentrent principalement sur les lipides qui présentent un potentiel de préservation élevé. Parmi les lipides de végétaux résistant aux processus diagénétiques, nous pouvons compter notamment sur les triterpènes. Qu'il s'agisse du crâne funéraire de Nahal Hemar daté du PPNB (soit environ 8500-7000 av. J.-C. ; cf. chapitre 4) ou du pendentif d'Eckwersheim daté de l'âge du Fer (Hallstatt, 625-550 av. J.-C. ; cf. chapitre 5), les extraits lipidiques obtenus à partir de ces échantillons archéologiques se sont tous deux illustrés par leur important contenu en triterpènes.

Fréquemment observés en contexte archéologique, certains triterpénoïdes de végétaux présentent en outre une spécificité structurale importante, ce qui permet de les associer aisément à leur organisme producteur. Ainsi, lors de l'étude des baumes aromatiques (cf. chapitre 4), les sucs résineux issus du genre *Styrax* se sont distingués par l'existence de

triterpènes pentacycliques atypiques possédant une fonction oxygénée en C-6. Ces dérivés étant absents à la fois dans les gommes de liquidambars et les baumes de Tolu et du Pérou, nous en avons conclu qu'il s'agissait de biomarqueurs spécifiques aux résines de styrax, lorsque ces derniers s'accompagnent de dérivés aromatiques (esters d'acide cinnamique et benzoïque). A la lumière de ces nouvelles données moléculaires, l'enduit organique ornant le crâne de Nahal Hemar a donc été observé sous un nouvel angle. L'identification de triterpènes oxygénés en C-6 au sein de l'enduit, dans des proportions remarquablement similaires à celles observées dans le cas des deux résines fraîches de *S. officinalis*, a abouti à une identification certaine de la composante végétale de la résine organique, probablement utilisée dans le but de parfumer le crâne. En ce qui concerne l'étude moléculaire de la substance organique trouvée sur le pendentif d'Eckwersheim (Alsace), l'analyse par GC-MS a permis d'établir la présence de dérivés du lupane tels que la lupénone, la lupanone, le lupéol, la bétulone et la bétuline (cf. chapitre 5). Ces composés existent naturellement en tant que triterpènes majeurs dans l'écorce de bouleau (*Betulaceae*), indiquant de ce fait l'utilisation d'une telle source végétale dans le matériau intervenant dans la confection du pendentif.

S'il est possible d'observer, en contexte archéologique, des triterpènes « natifs » -c'est-à-dire tels qu'ils ont été biosynthétisés par les plantes, sans transformation-, à l'image de ces dérivés d'acide sumarésinolique des résines de styrax ou de ces lupanoïdes natifs de l'écorce de bouleau, l'identification de triterpènes dont la structure a été modifiée peut également être révélatrice de l'histoire du matériau. Ainsi, la nature des transformations subies par les triterpènes peut fournir des informations concernant, le mode de fabrication de ce matériau, son utilisation par l'homme ou encore les processus de dégradation post-dépositionnels qu'il a subi. Des expériences de simulation (autoxydation, traitement thermique, …) réalisées en laboratoire peuvent permettre alors d'évaluer le comportement des triterpènes vis-à-vis de processus d'altération, naturels ou anthropiques, susceptibles de profondément modifier l'ensemble de la signature moléculaire spécifique originelle d'une substance végétale. Ainsi, par exemple, l'autoxydation de résine fraîche de *S. officinalis* a conduit à l'obtention des mêmes produits de dégradation (époxylactones) que ceux identifiés dans l'enduit du crâne de Nahal Hemar et vraisemblablement formés au cours du vieillissement naturel de l'objet archéologique. A l'inverse d'une expérience cherchant à reproduire un processus naturel, une expérience de pyrolyse d'écorce de bouleau a permis de mettre en évidence un certain nombre de dérivés du lupane formés par processus thermiques, et de distinguer ceux-ci de ceux résultant de l'altération naturelle du matériau. La détection de ces mêmes dérivés de pyrolyse

dans l'échantillon archéologique nous a permis d'en conclure quant à l'utilisation de brai de bouleau, sans doute utilisé comme agent collant lors de la confection du pendentif.

Ainsi, comme nous l'avons illustré au travers de ces quelques exemples développés au cours de cette thèse, il ressort que certains outils de la biogéochimie moléculaire comme, par exemple, l'analyse par GC-MS des lipides, la détermination de la composition isotopique du carbone ($\delta^{13}C$) et la datation au ^{14}C de composés individuels, sont devenus quasi incontournables dans le cadre d'études archéologiques. Il conviendra, pour des travaux futurs, d'établir des protocoles analytiques rigoureux et fiables permettant d'accéder de manière plus « routinière » à certaines de ces données (datation, notamment), d'élargir les référentiels moléculaires se rapportant aux substances naturelles d'origine végétale et de mettre au point des expériences de laboratoire simulant de manière réaliste les processus susceptibles d'altérer la matière organique au cours du temps, à des échelles de temps allant du siècle au millénaire.

Chapitre 7 :

Partie expérimentale

7.1. Traitement géochimique des échantillons

7.1.1. Précautions particulières

Les analyses réalisées dans le cadre de cette thèse concernent, pour la plupart, des matériaux archéologiques très anciens et rares, précieux et disponibles en très faibles quantités. Afin d'éviter toute contamination, par les plastifiants notamment, de nombreuses précautions ont été prises:

- ✓ Tous les solvants utilisés sont redistillés puis conservés dans des bouteilles en verre, soigneusement lavées et fermées au moyen d'une feuille en aluminium.
- ✓ L'ensemble de la verrerie est lavée à l'eau, séchée à l'acétone et, enfin, lavée au CH_2Cl_2 redistillé.
- ✓ Tout le matériel (pipettes, coton, sable, silice, célite) est, de même, nettoyé au CH_2Cl_2 dans un soxhlet. Concernant la silice, celle-ci est ensuite séchée puis activée dans une étuve à 120 °C.
- ✓ Chaque échantillon traité est conservé au congélateur à -20 °C.

7.1.2. Extraction, dérivation et fractionnement de la matière organique extractible

a) Extraction

La matière organique lipidique dans les échantillons est extraite au moyen d'un mélange de CH_2Cl_2/CH_3OH (1:1, v/v), à l'aide d'un bain à ultra-sons, suivi d'une filtration sur célite et de l'élimination des solvants sous pression réduite. Une aliquote de l'extrait lipidique est ensuite soumise successivement à deux étapes de dérivation (cf. § 7.1.2.b). Dans le cadre de l'étude quantitative de la miliacine (cf. Chapitre 2), une quantité connue d'ester de propyle de l'acide stéarique, utilisé comme standard interne (SI), est ajoutée à cette aliquote avant les étapes de dérivation.

b) Acétylation et méthylation

Dans un premier temps, les alcools sont acétylés en introduisant dans l'aliquote, préalablement solubilisée dans du CH_2Cl_2, environ 1 mL d'anhydride acétique (réactif) et 20 µL de N-méthylimidazole (catalyseur) et en laissant réagir le mélange à température ambiante pendant 20 minutes. Après adjonction de CH_3OH dans le but d'éliminer les anhydrides mixtes pouvant s'être formés au cours de l'acétylation, l'excès de réactif est éliminé sous pression réduite. Dans un second temps, l'ajout d'une solution éthérée de diazométhane à l'échantillon

dissout dans du CH_2Cl_2 permet la méthylation des fonctions acides (température ambiante). Au bout de 30 minutes, l'ensemble est placé sous un flux d'azote pour éliminer l'excès de diazométhane, puis le solvant résiduel est éliminé sous pression réduite.

c) Fractionnement global

L'extrait dérivé est fractionné sur colonne de silice sèche, permettant l'obtention d'une fraction apolaire (élution au moyen d'un mélange de CH_2Cl_2/AcOEt, 8:2, trois volumes morts V_0) et d'une fraction plus polaire (CH_2Cl_2/CH_3OH, 1:1, deux V_0). La fraction apolaire dérivée est analysée par GC-FID puis par GC-MS selon les conditions décrites ci-dessous (cf. § 7.2.1. et 7.2.2). Dans le cadre d'études quantitatives (cf. Chapitre 2), pour s'affranchir des problèmes de facteurs de réponse inhérents à la nature des différents composés organiques lors d'analyses de GC-MS, il est préférable de travailler à partir du signal obtenu en GC-FID qui est proportionnel à la quantité de carbone.

d) Méthanolyse de la fraction lipidique polaire

Les composés polaires collectés lors du fractionnement global sur colonne de silice (§ 7.1.2.c) sont transférés dans un tube muni d'un bouchon étanche possédant un joint en téflon, puis le solvant est évaporé sous flux d'azote. Un mélange HCl/CH_3OH (1,2 N) est ajouté et l'ensemble est placé dans un four chauffé à 110 °C pendant 4 heures. Après retour à température ambiante, le solvant et l'acide sont évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif et les lipides sont acétylés avant d'être analysés par GC-FID et GC-MS (cf. § 7.2.1. et 7.2.2).

7.1.3. Isolement et dérivation en vue de mesures isotopiques ($\delta^{13}C$)

a) Fractionnement

L'objectif de ce fractionnement étant la séparation fine d'extraits lipidiques pour effectuer des analyses de GC-*c*-IRMS, celui-ci est réalisé sur une colonne de silice à partir d'un extrait organique non dérivé. Les alcanes linéaires sont élués en premier avec un mélange de cyclohexane/CH_2Cl_2 (9:1, v/v; 1,5 V_0), puis sont obtenus la miliacine (CH_2Cl_2; $2V_0$) et les alcools linaires et les stérols (CH_2Cl_2/AcOEt, 9:1, v/v; $2V_0$). Enfin, les composés les plus polaires, comprenant notamment les acides carboxyliques, sont récupérés au moyen d'un mélange CH_2Cl_2/CH_3OH (1:1, v/v; $2V_0$).

b) Dérivation des fonctions alcools et acides pour analyse par GC-*c*-IRMS

Les fonctions alcools sont dérivées par ajout de 40 µL de pyridine et 140 µL de BSTFA ou Bis-(*N*,*O*- triméthylsilyl)-trifluoroacétamide (70 °C). Au bout de 2 h, l'excès de réactif est éliminé par évaporation sous un flux d'azote.

Les fonctions acides carboxyliques sont méthylées à l'aide de BF_3 dans le méthanol (2 h, 60 °C). Le brut réactionnel est alors transféré dans une ampoule à décanter dans laquelle sont ajoutés de l'eau distillée et du CH_2Cl_2. La phase organique, qui contient les esters méthyliques, est récupérée puis purifiée par filtration au CH_2Cl_2 sur une colonne de silice.

La composition isotopique en carbone des groupements trimethylsilyles (TMS) du BSTFA ($\delta^{13}C$ = -20,76 ‰) et du CH_3OH ($\delta^{13}C$ = -48,5 ‰), utilisés comme agents de dérivation, est connue, ce qui permet de corriger les valeurs de $\delta^{13}C$ des composés dérivés en utilisant la formule décrite par Rieley (1994).

$$\delta^{13}C_{composé} = \frac{n_{c\,(composé\,dérivé)} \times \delta^{13}C_{composé\,dérivé} - n_{c\,(TMS/CH_3OH)} \times \delta^{13}C_{TMS/CH_3OH}}{n_{c\,(composé)}} \quad \textbf{(5)}$$

avec n_c : nombre de carbone

7.1.4. Traitement des échantillons pour datation au ^{14}C par AMS

a) Isolement de la miliacine

Dans un premier temps, une aliquote de l'extrait organique brut (*i.e.*, non dérivé) est fractionnée sur une colonne de silice sèche permettant l'élution successive de fractions avec un mélange cyclohexane/CH_2Cl_2 (8:2), CH_2Cl_2 et enfin CH_2Cl_2/CH_3OH (1:1), la seconde fraction se trouvant fortement enrichie en miliacine. Celle-ci est ensuite purifiée par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC) à l'aide d'un système constitué d'une pompe Waters 590 HPLC (phase mobile: CH_2Cl_2/CH_3OH, 2:8, v/v, débit: 1mL/min) connectée à une colonne Agilent ZORBAX SB-C18 (25 cm × 4,6 mm de diamètre interne, 5 µm, Agilent) en association avec un réfractomètre différentiel R401 (Waters Associates) et une table traçante pour l'enregistrement du signal. Après collecte du composé désiré, lorsque cela est nécessaire, une dernière étape de purification peut être réalisée au moyen de la chromatographie sur couche mince (SiO_2, 0,5 mm d'épaisseur) avec un mélange de cyclohexane/acétone (98:2) pour éluant. Le fractionnement est effectué en utilisant un échantillon de miliacine de référence afin que soit délimitée la zone de R_f

correspondante (évaluée entre 0,76 et 0,83). La pureté de la miliacine ainsi obtenue est vérifiée par GC-FID et GC-MS.

b) Décarbonatation et préparation des échantillons de sols

Afin de procéder à la datation des échantillons de sols, ces derniers sont décarbonatés à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique (1,2 N) à température ambiante pendant 15 minutes. Après centrifugation, le surnageant est éliminé et le résidu solide est rincé à l'eau distillée. Cette procédure est répétée autant de fois que nécessaire jusqu'à obtenir un pH neutre. Enfin, les échantillons de sols décarbonatés sont séchés dans un four à 45 °C (environ 2h) avant d'être introduits dans une capsule en étain (entre 100 et 300 mg d'échantillon de sol).

7.1.5. Préparation d'échantillons en vue de l'analyse des acides aminés

a) Méthanolyse du résidu solide non extractible

Dans le cas des échantillons prélevés sur les objets archéologiques de Nahal Hemar (cf. Chapitre 4), le résidu solide, correspondant à la part non extractible par les solvants organiques, a subi une dégradation chimique en vue d'identifier, dans la mesure du possible, les acides aminés présents. Pour cela, le résidu est préalablement introduit dans un tube en pyrex. Après ajout d'une solution méthanolique d'acide chlorhydrique (HCl/CH_3OH, 6 N), le tube fermé avec un bouchon muni d'un joint en téflon est placé dans un four maintenu à une température de 110 °C (7 - 9 h).

b) Traitement après méthanolyse et dérivation

Après transfert de la phase méthanolique issue de l'hydrolyse du résidu dans une ampoule à décanter, puis adjonction d'AcOEt et d'eau distillée, une extraction liquide-liquide permet de séparer la phase aqueuse, susceptible de contenir les acides aminés, de la phase organique (AcOEt) dans laquelle sont présents les lipides libérés par l'hydrolyse. Ces derniers sont dérivés selon le protocole décrit en 7.1.2. En revanche, pour estérifier les acides aminés, la fraction obtenue après élimination de l'eau sous pression réduite est traitée avec 12 mL d'un mélange de BuOH/HCl (3N, 100 °C, 1h) pour former des esters de butyle. Après évaporation du BuOH, les fonctions amines et alcools sont trifluoroacétylées au moyen de 3 mL d'anhydride trifluoroacétique (TFAA), à température ambiante pendant 3 h (protocole adapté de Richardin et *al.*, 1991). Les réactifs résiduels sont ensuite évaporés à sec, sous flux

d'azote, avant que l'échantillon ne soit fractionné sur colonne de silice (cf. § 7.1.2.c) puis injecté en GC-FID et GC-MS (cf. § 7.2.1. et 7.2.2.).

7.1.6. Simulations de dégradation

a) Autoxydation (mécanisme radicalaire)

Afin d'identifier, au sein de l'enduit organique archéologique de Nahal Hemar (cf. Chapitre 4), les composés moléculaires résultant du vieillissement de l'échantillon, la résine de *S. officinalis* 2982 a été soumise à une réaction d'autoxydation. Une fois l'échantillon brut (environ 10 mg) solubilisé dans de l'acétonitrile, 500 µL de *t*-BuOOH (amplificateur réactionnel, 5,5 M dans le décane) et environ 5 mg d'AIBN (initiateur radicalaire) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est chauffé à 50 °C pendant 13 h sous agitation magnétique en présence d'air. Dans le but de stopper la réaction, 1 mL de CH_3OH est ajouté (15 min). Après élimination du solvant, les lipides sont extraits au moyen d'AcOEt. Une nouvelle étape d'évaporation à l'évaporateur rotatif permet l'élimination du solvant et l'échantillon est ensuite dérivé, fractionné puis analysé par GC-FID et GC-MS (cf. § 7.2.1 et 7.2.2.).

b) Traitement thermique

Dans le cadre de l'étude de brai de bouleau (cf. Chapitre 5), nous avons réalisé une expérience de pyrolyse à partir de copeaux d'écorce de bouleau. Pour cette expérience, l'écorce de bouleau est introduite dans un ballon muni d'un réfrigérant et l'ensemble est placé sous atmosphère inerte (N_2). Le montage est chauffé à haute température au moyen d'un décapeur thermique pendant près de 10 minutes, jusqu'à ce que l'on observe la formation de brai de bouleau. Celui-ci est extrait au moyen d'un mélange de CH_2Cl_2/CH_3OH (1:1, v/v) et constitue l'échantillon dit de « pyrolyse 1 ». Certains composés (les plus volatils, notamment) se sont condensés sur le réfrigérant et sont collectés par rinçage avec un mélange de CH_2Cl_2/CH_3OH (1:1, v/v), formant l'échantillon dit de « pyrolyse 2 ». Ces deux échantillons sont ensuite traités selon le protocole décrit en § 7.1.2.

7.2. Instrumentation

7.2.1. Chromatographie en phase gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme (GC-FID)

Les analyses semi-quantitatives sont effectuées au moyen d'un appareil de chromatographie en phase gazeuse HEWLETT-PACKARD HP 6890 series, équipé d'un

injecteur « on-column » utilisé en mode « track-oven », d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et d'une colonne capillaire de type HP5 (30 m × 0,32 mm × 0,25 µm). Le débit du gaz vecteur (H_2) est de 2,5 mL/min (débit constant) et la température du détecteur est de 310 °C.

Le choix du programme de température dépend de celui utilisé en GC-MS (cf. § 7.2.2). Toutefois, dans le cas de l'analyse de la miliacine(cf. Chapitre 2), le programme de température, optimisé pour observer la meilleure séparation pour la miliacine (cf. Chapitre 2), consiste en une rapide montée en température de 70 °C à 300 °C à 10 °C/min suivie d'une période d'isotherme à 300 °C pendant 40 minutes. Cette rapide montée en température conduit à une bonne séparation entre la miliacine et l'acétate de l'alcool linéaire en C_{28}, qui, dans les conditions « classiques » (montée à 4 °C/min), sont co-élués. La quantité de miliacine dans l'extrait organique ainsi que la quantité rapportée par gramme de sol sont déterminées par comparaison avec le standard interne (cf. Chapitre 2 et § 7.1.2.a).

7.2.2. GC couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

L'essentiel des analyses par GC-MS ont été réalisées en impact électronique (EI, 70 eV, balayage en masse de 50 à 700 en *m/z*) avec un spectromètre de masse TSQ Quantum (THERMO Scientific) couplé à un chromatographe en phase gazeuse TRACE GC ULTRA (THERMO Scientific) équipé d'un passeur automatique d'échantillons Tri Plus (THERMO Scientific), d'un injecteur PTV en mode « simili on-column » et d'une colonne HP-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,1 µm). Le programme de température utilisé est choisi parmi l'un des programmes suivant :

Programme A : un gradient de 70 °C à 200 °C à 10 °C/min puis de 200 °C à 320 °C à 3 °C/min et enfin une période d'isotherme à 320 °C de 40 minutes.

Programme B : un gradient de 70 °C à 200 °C à 10 °C/min puis de 200 °C à 320 °C à 4 °C/min et enfin une période d'isotherme à 320 °C de 40 minutes.

Programme C : un gradient de 70 °C à 200 °C à 10 °C/min puis de 200 °C à 320 °C à 4 °C/min et enfin une période d'isotherme à 320 °C de 60 minutes.

Programme D : un gradient de 40 °C à 100 °C à 10 °C/min puis de 100 °C à 320 °C à 4 °C/min et enfin une période d'isotherme à 320 °C de 40 minutes

Programme E (acides aminés) : une isotherme à 70 °C pendant 10 minutes suivi d'un gradient de 70 °C à 200 °C à 4 °C/min puis de 200 °C à 300 °C à 10 °C/min et enfin une période d'isotherme à 300 °C de 40 minutes.

Programme F : un gradient de 70 °C à 200 °C à 10 °C/min puis de 200 °C à 300 °C à 4 °C/min et enfin une période d'isotherme à 300 °C de 40 minutes.

Le gaz vecteur employé est l'hélium avec un débit constant de 1,1 mL/min. La ligne de transfert est chauffée à 310 °C. Les données sont analysées avec le logiciel Xcalibur et les spectres de masse obtenus sont comparés avec les données de la banque de données NIST et celles de la littérature.

En ce qui concerne les analyses en ionisation chimique (CI), le gaz utilisé est l'isobutane ou l'ammoniac à un débit de 1,3 mL/min.

Dans le cadre de l'analyse de la résine organique archéologique de Nahal Hemar (cf. Chapitre 4), certaines analyses de GC-MS ont été réalisées avec un instrument équipé d'un analyseur à temps de vol (TOF). Les échantillons sont introduits dans un chromatographe en phase gazeuse Agilent Technologies 7890A, couplé à un spectromètre de masse JEOL Accu TOF GCV JMS-T100GCV, opérant soit en impact électronique (70 eV), soit en ionisation de champ (FI) et utilisant un balayage en masse de 35 à 800 *m/z*. L'instrument est, par ailleurs, équipé d'un injecteur « split/splitless », fonctionnant, dans notre cas, en mode « splitless », et d'une colonne DB5UI (20 m × 0,18 mm × 0,18 µm) avec de l'helium comme gaz vecteur. Le programme de température utilisé est le suivant : un gradient de 70 °C à 200 °C à 10 °C/min puis de 200 °C à 320 °C à 4°C/min pour finir avec une isotherme de 10 minutes à 320 °C (**programme G**).

7.2.3. GC couplée à un spectromètre de masse à rapport isotopique (GC-c-IRMS)

Les mesures de rapports isotopiques du carbone s'opèrent par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse de rapport isotopique (GC-*c*-IRMS) au moyen d'un chromatographe GC Trace GC Ultra (Thermo Scientific) équipé d'un injecteur « on-column » et couplé à un spectromètre de masse Delta V Plus (Thermo Scientific) avec, à l'interface des deux appareils, un système GC Isolink constitué d'un four de combustion (à 1000 °C) et d'un système de dilution ConFlo IV. Les injections sont effectuées à l'aide d'un passeur automatique Tri Plus (ThermoScientific). Les composés lipidiques sont séparés au moyen d'une colonne Agilent HP 5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) selon un programme de

température correspondant à un gradient linéaire de 80 °C à 310 °C à 4 °C/min suivi d'un palier d'isotherme à 310 °C de 40 minutes. Chaque analyse est encadrée par plusieurs injections (5 avant et 3 après) d'un gaz de CO_2 de référence qui permettent de vérifier la stabilité des mesures (Sessions, 2006). Les données obtenues lors de chaque analyse sont traitées avec le logiciel Isodat 3.0. Chaque analyse est réitérée trois fois, à partir desquelles une déviation standard (σ) est calculée. En amont et en aval des trois injections, les valeurs de $\delta^{13}C$ des *n*-alcanes d'un mélange d'hydrocarbures certifié de type A5 (*n*-C_{16} à *n*-C_{30}, Arndt Schimmelmann, Biogeochemical Laboratories, Indiana University, USA) sont mesurées et utilisées pour établir une droite de calibration qui est utilisée pour corriger les valeurs mesurées dans le cas des échantillons analysés. Par ailleurs, l'ajout de carbone lors des réactions de dérivation nécessite que soient corrigées les valeurs de $\delta^{13}C$ obtenues sur la base de la formule décrite par Rieley (1994, cf. § 7.1.3, équation 5).

7.2.4. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse par ionisation chimique à pression atmosphérique (HPLC-APCI-MS)

L'analyse des triglycérides (cf. Chapitre 4) a été réalisée sur un appareil HPLC Agilent série 1100 équipé d'un système de pompes binaires et couplé à un spectromètre de masse Esquire 3000^+ (Bruker) muni d'une source APCI. Les triglycérides sont séparés au moyen d'une colonne en phase inverse Agilent ZORBAX SB-C18 (15 cm × 2,1 mm, 5µm) en éluant suivant un gradient linéaire binaire isopropanol (*i*-PrOH)-CH_3OH allant de 30% à 60 % d'*i*-PrOH en 25 minutes suivi d'un palier isocratique à 60 % en *i*-PrOH pendant 10 minutes avant de revenir en 5 min à 20 % d'*i*-PrOH (débit de 0,2 mL/min).

En ce qui concerne l'ionisation en APCI et la détection, les conditions du spectromètre sont les suivantes : pression du nébuliseur 50 psi, température de vaporisation 350 °C, débit du gaz 5 L/min (N_2), température du gaz 300 °C, tension du capillaire -2kV, corona 4 µa, gamme de masse *m/z* 200-1400.

7.2.5. Datation au ^{14}C par spectrométrie de masse par accélérateur (AMS)

La datation au ^{14}C de très faibles quantités de matériel (extraits organiques de sol, molécules individuelles) requiert un équipement très performant et spécifique dont dispose une équipe de l'ETH de Zürich (Laboratory of Ion Beam Physics). Il s'agit d'un spectromètre de masse par accélérateur spécialement conçu pour l'analyse de très faibles quantités d'échantillon (AMS MICADAS), de l'ordre du milligramme au microgramme (cf. § 1.3.2 ;

Ruff *et al.*, 2010a, 2010b). Les échantillons, contenant suffisamment de quantité de carbone, ainsi que des échantillons d'acide phtalique (pour les blancs) sont graphitisés au moyen du système automatisé AGE (cf. § 1.3.2 ; Wacker et *al.*, 2010a). Les échantillons qui contiennent moins de 0,1 mg de carbone sont brûlés puis transférés dans de petit tubes pour être analysés par une source d'ions (Ruff et *al.*, 2007, 2010a). De l'acide oxalique II (standard, Christl et *al.*, 2013) est préparé et mesuré avec ces échantillons. Les rapports isotopiques du carbone $^{14}C/^{12}C$ et $^{13}C/^{12}C$ sont déterminés par le système de datation MICADAS mis au point à l'ETH (cf. § 1.3.2 ; Synal et *al.*, 2007, Wacker et *al.*, 2010b). Après correction des mesures en tenant compte du blanc et du fractionnement isotopique ($\delta^{13}C$ mesuré sur le graphite ou le CO_2), les âges ^{14}C sont calculés suivant la convention de Stuiver et Polach (1977). Les âges calibrés sont déterminés en utilisant la courbe de calibration atmosphérique IntCal13 décrite par Reimer et *al.* (2013).

Références bibliographiques

ACAR I., ANIL H., **1991**. Investigation of chemical composition of natural *Liquidambar orientalis* Mill balsam by gas chromatography-mass spectrometer combined system. *Doga: Turk Kimya Dergisi* 15, 34-38.

ADAMS M., BERSET C., KESSLER M., HAMBURGER M., **2009**. Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders – a survey of European herbals from the 16th and 17th century. *Journal of Ethnopharmacology* 121, 343-359.

AGOZZINO P., **1997**. Some mass spectrometry contributions in the study of cultural heritage. *In*: Caprioli R.M., Malorni A., Sindona G. (Eds.). *Selected Topics and Mass Spectrometry in the Biomolecular Sciences*, Kluwer Academic Publishers, 575-579.

AKGUL Y.Y., ANIL H., **2003**. Benzofurans and another constituent from seeds of *Styrax officinalis*. *Phytochemistry* 63, 939-943.

AMIGUES S., **2007**. Le styrax et ses usages antiques. *Journal des Savants* 2, 261-318.

ANDAYA L., **2002**. The trans-Sumatra trade and the ethnicization of the Batak. *Bijdragen tot de Taal-, Land- en Volkenkunde* 158, 367-409.

ANDERSON A.B., **1955**. Recovery and utilization of tree extractives. *Economic Botany* 9, 108-140.

ANDRES I.M., **1992**. A revised list of the European C4 plants. *Photosynthetica* 26, 323-331.

AVELING E.M., HERON C., **1998**. Identification of birch bark tar at the Mesolithic site of Star Carr. *Ancient Biomolecules* 2, 69-80.

AVELING E.M., HERON C., **1999**. Chewing tar in the early Holocene: an archaeological and ethnographic evaluation. *Antiquity* 73, 579-584.

AZAR D., GÈZE R., EL-SAMRANI A., MAALOULY J., NEL A., **2010**. Jurassic amber in Lebanon. *Acta Geologica Sinica* 84, 977-983.

BAETEN J., MARINOVA E., DE LAET V., DEGRYSE P., DE VOS D., WAELKENS M., **2012**. Faecal biomarker and archaeobotanical analyses of sediments from a public latrine shed new light on ruralisation in Sagalassos, Turkey. *Journal of Archaeological Science* 39, 1143-1159.

BAILLY, A. **1901**. Abrégé du dictionnaire GREC FRANÇAIS. Librairie Hachette.

BAILLY L., **2015**. Caractérisation moléculaire et isotopique de goudrons et résines archéologiques dérivés de conifères en contexte maritime. Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, France.

BALESDENT J., WAGNER G.H., MARIOTTI A., **1988**. Soil organic matter turnover in long-term field experiments as revealed by carbon-13 natural abundance. *Soil Science Society of America Journal* 52, 118-124.

BALLENTINE D.C., MACKO S.A., TUREKIAN V.C., **1998**. Variability of stable carbon isotopic compositions in individual fatty acids from combustion of C4 and C3 plants: implications for biomass burning. *Chemical Geology* 152, 151-161.

BAR-YOSEF O., ALON D., **1988**. Nahal Hemar Cave. The excavations. *Atiqot* 18, 1-30.

BASTIEN C., **2011**. Etude chimique des substances contenues dans une collection exceptionnelle de poteries provenant de Deir-El-Medineh (Egypte) : une population et ses produits. Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, France.

BATAILLE G., **2014**. Eckbolsheim, Bas-Rhin. Parc d'activité – Les fouilles archéologiques préalables à la construction des parkings et zones annexes du Zénith. Rapport d'opération, Volume 2, INRAP Grand Est Sud.

BATTA A.K., SALEN G., RAPOLE K.R., BATTA M., BATTA P., ALBERTS D., EARNEST D., **1999**. Highly simplified method for gas-liquid chromatographic quantitation of bile acids and sterols in human stool. *Journal of Lipid Research* 40, 1148-1154.

BECCHI M., AGUILERA R., FARIZON Y., FLAMENT M.-M., CASABIANCA H., JAMES P., **1994**. Gas chromatography/combustion/isotope-ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids to detect misuse of testosterone in sport. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 8, 304-308.

BECK C.W., STOUT E.C., JÄNNE P.A., **1997**. The pyrotechnology of pine tar and pitch inferred from quantitative analyses by gas chromatography-mass spectrometry and carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometry. *In*: Brzeziński W., Piotrowski W. (Eds), *Proceedings of the First International Symposium on Wood Tar and Pitch*. State Archaeological Museum in Warsaw, 181-192.

BECK P., CAUDULLO G., DE RIGO D., TINNER W., **2016**. *Betula pendula*, *Betula pubescens* and other birches in Europe: distribution, habitat, usage and threats. *In*: San-Miguel-Ayanz J., de Rigo D., Caudullo G., Durrant H., Mauri A. (Eds.). *European Atlas of Forest Tree Species*, Luxembourg, 70-73.

BI X., SHENG G., LIU X., LI C., FU J., **2005**. Molecular and carbon and hydrogen isotopic composition of *n*-alkanes in plant leaf waxes. *Organic Geochemistry* 36, 1405-1417.

BINDER D, BOURGEOIS G., BENOIST F., VITRY C., **1990**. Identification de brai de bouleau (*Betula*) dans le Néolithique de Giribaldi (Nice, France) par la spectrométrie de masse. *Revue d'Archéométrie* 14, 37-42.

BOËDA E., CONNAN J., DESSORT D., MUHESEN S., MERCIER N., VALLADAS H., TISNÉRAT N., **1996**. Bitumen as a hafting material on Middle Palaeolithic artefacts. *Nature* 380, 336-338.

BOHLMANN J., MEYER-GAUEN G., CROTEAU R., **1998**. Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95, 4126-4133.

BOSQUET D., REGERT M., DUBOIS N., JADIN I., **2001**. Identification de brai de bouleau sur quatre vases du site rubané de Fexhe-le-Haut-Clocher « Podrî I'Cortri ». Premiers résultats. *Notae Praehistoricae* 21, 119-127.

BOSSARD N., JACOB J., LE MILBEAU C., SAUZE J., TERWILLIGER V., POISSONNIER B., VERGÈS E., **2013**. Distribution of miliacin (olean-18-en-3β-ol methyl ether) and related compounds in broomcorn millet (*Panicum miliaceum*) and other reputed sources: Implications for the use of sedimentary miliacin as a tracer of millet. *Organic Geochemistry* 63, 48-55.

BOUBY L., **2000**. Restituer les pratiques agraires par la carpologie archéologique. *Etudes Rurales* 153-154, 177-194.

BROWN G.D., **1998**. The biosynthesis of steroids and triterpenoids. *Natural Product Reports* 15, 653-696.

BROWN R.H., **1999**. Agronomic implications of C4 photosynthesis. *C4 Plant Biology*, 473-507.

BRUGNOLI E., FARQUHAR G.D., **2000**. Photosynthetic fractionation of carbon isotopes. *Advances in Photosynthesis and Respiration* 9, 399-434.

BRUN J.-P., **2000**. The production of perfumes in Antiquity: the case of Delos and Paestum. *American Journal of Archaeology* 104, 277-308.

BUCHGRABER M., ULBERTH F., EMONS H., ANKLAM E., **2004**. Triacylglycerol profiling by using chromatographic techniques. *European Journal of Lipid Science and Technology* 106, 621-648.

BUCKLEY S.A., EVERSHED R.P., **2001**. Organic chemistry of embalming agents in Pharaonic and Graeco-Roman mummies. *Nature* 413, 837-841.

BUDZIKIEWICZ H., WILSON J.M., DJERASSI C., **1963**. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII.1. Pentacyclic triterpenes. *Journal of the American Chemical Society* 85, 3688-3699.

BUDZIKIEWICZ H., DJERASSI C., WILLIAMS D.H., **1967**. Mass spectrometry of organic compounds. Holden-Day, San Francisco.

BULL I.D., SIMPSON I.A., DOCKRILL S.J., EVERSHED R.P., **1999a**. Organic geochemical evidence for the origin of ancient anthropogenic soil deposits at Tofts Ness, Sanday, Orkney. *Organic Geochemistry* 30, 535-556.

BULL I.D., SIMPSON I.A., VAN BERGEN P.F., EVERSHED R.P., **1999b**. Muck 'n' molecules: organic geochemical methods for detecting ancient manuring. *Antiquity* 73, 86-96.

BULL I.D., BETANCOURT P.P., EVERSHED R.P., **2001**. An organic geochemical investigation of the practice of manuring at a Minoan site on Pseira Island, Crete. *Geoarchaeology* 16, 223-242.

BULL I.D., LOCKHEART J., ELHMMALI M.M., ROBERTS D.J., EVERSHED R.P., **2002**. The origin of faeces by means of biomarker detection. *Environment International* 27, 647-654.

BULL I.D., ELHMMALI M.M., ROBERTS D.J., EVERSHED R.P., **2003**. The application of steroidal biomarkers to track the abandonment of a Roman wastewater course at the agora (Athens, Greece). *Archaeometry* 45, 149-161.

BURGER P., **2008**. Caractérisation moléculaire de résines végétales archéologiques et actuelles : étude de résines de *Dipterocarpaceae*. Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, France.

BURGER P., CHARRIE-DUHAUT A., CONNAN J., ALBRECHT P., **2011**. Taxonomic characterisation of fresh *Dipterocarpaceae* resins by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS): providing clues for identification of unknown archaeological resins. *Archaeological and Anthropological Sciences* 3, 185-200.

BURGER P., CASALE A., KERDUDO A., MICHEL T., LAVILLE R., CHAGNAUD F., FERNANDEZ X., **2016**. New insights in the chemical composition of benzoin balsams. *Food Chemistry* 210, 613-622.

BYRDWELL W.C., EMKEN E.A., **1995**. Analysis of triglycerides using atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Lipids* 30, 173-175.

CABANIS M., DEBERGE Y., BOUBY L., HAJNALOVÀ M., MARINVAL P., MENNESSIER-JOUANNET C., VERMEULEN C., VERNET G., **2015**. Changes in crop cultivation during the last five centuries before the Roman conquest: archaeobotanical investigation in the Clermont-Ferrand basin, Massif Central, France. *Archaeological and Anthropological Sciences*, 1-16.

CAMMAS C., BORDERIE Q., DESACHY B., AUGRY S., **2011**. L'approche géoarchéologique de l'urbain. Développement du concept, méthodologie et applications aux opérations archéologiques. *Archéopages* 31, 80-93.

CARRILLO HERNANDEZ T., **2004**. Caractérisation moléculaire et isotopique de biomarqueurs de milieux de dépôt anciens très immatures (Jurassique Supérieur de la plate-forme russe). Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, France.

CERRI C., FELLER C., BALESDENT J., VICTORIA R., PLENECASSAGNE A., **1985**. Application du traçage isotopique naturel en ^{13}C, à l'étude de la dynamique de la matière organique dans les sols. *Comptes-rendus des séances de l'Académie des Sciences, Série 2, Mécanique-physique, chimie, sciences de l'univers, sciences de la terre* 300, 423-428.

CHARRIE-DUHAUT A., CONNAN J., ROUQUETTE N., ADAM P., BARBOTIN C., DE ROZIERES M.-F., TCHAPLA A., ALBRECHT P., **2007**. The canopic jars of Rameses II: real use revealed by molecular study of organic residues. *Journal of Archaeological Science* 34, 957-967.

CHARTERS S., EVERSHED R.P., GOAD L.J., HERON C., BLINKHORN P.W., **1993**. Identification of an adhesive used to repair a Roman jar. *Archaeometry* 35, 91-101.

CHARTERS S., EVERSHED R.P., BLINKHORN P.W., DENHAM V., **1995**. Evidence for the mixing of fats and waxes in archaeological ceramics. *Archaeometry* 37, 113-127.

CHERMETTE M., GOYON J.-C., **1996**. Le catalogue raisonné des producteurs de styrax et d'oliban d'Edfou et d'Athribis de Haute Egypte. *Studien zur Altagyptischen Kultur*, 47-82.

CHIKARAISHI Y., NARAOKA H., POULSON S.R., **2004a**. Carbon and hydrogen isotopic fractionation during lipid biosynthesis in a higher plant (*Cryptomeria japonica*). *Phytochemistry* 65, 323-330.

CHIKARAISHI Y., NARAOKA H., POULSON S.R., **2004b**. Hydrogen and carbon isotopic fractionations of lipid biosynthesis among terrestrial (C3, C4 and CAM) and aquatic plants. *Phytochemistry* 65, 1369-1381.

CHIKARAISHI Y., NARAOKA H., **2006**. Carbon and hydrogen isotope variation of plant biomarkers in a plant-soil system. *Chemical Geology* 231, 190-202.

CHRISTL M., VOCKENHUBER C., KUBIK P.W., WACKER L., LACHNER J., ALFIMOV V., SYNAL H.-A., **2013**. The ETH Zurich AMS facilities: performance parameters and reference materials. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 294, 29-38.

COLLISTER J.W., RIELEY G., STERN B., EGLINTON G., FRY B., **1994**. Compound-specific $\delta^{13}C$ analyses of leaf lipids from plants with differing carbon dioxide metabolisms. *Organic Geochemistry* 21, 619-627.

COLOMBINI M.P., MODUGNO F., GIANNARELLI S., FUOCO R., MATTEINI M., **2000**. GC-MS characterization of paint varnishes. *Microchemical Journal* 67, 385-396.

COLOMBINI M.P., GIACHI G., MODUGNO F., **2003**. The characterization of paints and waterproofing materials from the shipwrecks found at the archaeological site of the Etruscan and Roman harbor of Pisa (Italy). *Archaeometry* 45, 659-674.

COLOMBINI M.P., MODUGNO F., RIBECHINI E., **2005a**. Direct exposure electron ionization mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry techniques to study organic coatings on archaeological amphorae. *Journal of Mass Spectrometry* 40, 675-687.

COLOMBINI M.P., GIACHI G., MODUGNO F., RIBECHINI E., **2005b**. Characterisation of organic residues in pottery vessels of the Roman age from Antinoe (Egypt). *Microchemical Journal* 79, 83-90.

COLOMBINI M.P., LUCEJKO J.J., MODUGNO F., ORLANDI M., TOLPPA E.-L., ZOIA L., **2009**. A multi-analytical study of degradation of lignin in archaeological waterlogged wood. *Talanta* 80, 61-70.

CONDAMIN J., FORMENTI F., METAIS M.O., MICHEL M., BLOND P., **1976**. The application of gas chromatography to the tracing of oil in ancient amphorae. *Archaeometry* 18, 195-201.

CONNAN J., NISSENBAUM A., DESSORT D., **1995**. Geochemical study of Neolithic "bitumen"-coated objects of the Nahal Hemar cave in the Dead Sea area. *In*: Grimalt J.O., Dorronsoro C. (Eds.), Organic Geochemistry: Developments and Applications to Energy, Climate, Environment and Human History. AIGOA, 699-701.

CONNAN J., **1999**. Use and trade of bitumen in antiquity and prehistory: molecular archaeology reveals secrets of past civilizations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 354, 33-50.

CONNAN J., ADAM P., DESSORT D., ALBRECHT P., **2000**. Apport de la chimie moléculaire à la connaissance des enduits utilisés pour le traitement des bois et le calfatage des bateaux romains de la Saône. *In* : Bonnamour L. (Ed.), *Archéologie des fleuves et des rivières*, Edition Errance, 40-47.

CONNAN J., NISSENBAUM A., **2003**. Conifer tar on the keel and hull planking of the Ma'agan Mikhael Ship (Israel, 5th century BC): identification and comparison with natural products and artefacts employed in boat construction. *Journal of Archaeological Science* 30, 709-719.

COPLEY M.S., BERSTAN R., DUDD S.N., DOCHERTY G., MUKHERJEE A.J., STRAKER V., PAYNE S., EVERSHED R.P., **2003**. Direct chemical evidence for widespread dairying in prehistoric Britain. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100, 1524-1529.

COPPEN J.J.W., **1995**. Non-wood forest products 6. Gums, resins and latexes of plant origin. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 91-95.

COULOMBE L.-J., PAQUIN R., **1959**. Effets de l'acide gibbérellique sur le métabolisme des plantes. *Canadian Journal of Botany* 37, 897-901.

COUREL B., SCHAEFFER P., ADAM P., ERTLEN D., SCHWARTZ D., BERNASCONI S.M., HAJDAS I., **2015**. Analyse, isolement et datation au ^{14}C de lipides dans les sols. *In*: Poulenard J., Rossi M. (Eds.), Sols et Matières Organiques : mémoires et héritages. Actes du colloque Sols en héritage, les 12èmes Journées d'Etude des Sols, 30 juin - 14 juillet 2014, Université de Savoie, Le Bourget-du Lac. *Collection EDYTEM*, 18, 57-68.

CROTEAU R., **1998**. The discovery of terpenes. *Discoveries in Plant Biology* 1, 329-343.

CROWTHER A., VEALL M.-A., BOIVIN N., HORTON M., KOTARBA-MORLEY A., FULLER D.Q., FENN T., HAJI O., MATHESON C.D., **2015**. Use of Zanzibar copal (*Hymenaea verrucosa* Gaertn.) as incense at Unguja Ukuu, Tanzania in the 7-8th century CE: chemical insights into trade and Indian Ocean interactions. *Journal of Archaeological Science* 53, 374-390.

CUNHA W.R., MARTINS C., DA SILVA FERREIRA D., CROTTI A.E.M., LOPES N.P., ALBUQUERQUE S., **2003**. *In vitro* trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia* species. *Planta Medica* 69, 470-472.

CUSTÓDIO D.L., VEIGA-JUNIOR V.F., **2012**. True and common balsams. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22, 1372-1383.

DEHAEN W., MASHENTSEVA A.A., SEITEMBETOV T.S., **2011**. Allobetulin and its derivatives: synthesis and biological activity. *Molecules* 16, 2443-2466.

DEL RÍO J.C., PRINSEN P., GUTIÉRREZ A., **2013**. A comprehensive characterization of lipids in wheat straw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 1904-1913.

DENIRO M.J., EPSTEIN S., **1977**. Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. *Science* 197, 261-263.

DE OLIVEIRA A.B., IRACEMA M., MADRUGA L.M., GOTTLIEB O.R, **1978**. Isoflavonoids from *Myroxylon balsamum*. *Phytochemistry* 17, 593-595.

DE OLIVEIRA P.F., DAMASCENO J.L., BERTANHA C.S., ARAÚJO A.R.B., PAULETTI P.M., TAVARES D.C., **2015a**. Study of the cytotoxic activity of *Styrax camporum* extract and its chemical markers, egonol and homoegonol. *Cytotechnology*, 1-6.

DE OLIVEIRA A.M., DE ARAUJO A.F., LEMOS R.P.L., CONSERVA L.M., DE SOUZA FERRO J.N., BARRETO E., **2015b**. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of the siaresinolic acid, a triterpene isolated from the leaves of *Sabicea grisea* Cham. & Schltdl. var. *grisea*. *Journal of Natural Medicines* 69, 232-240.

DERRIEN M., JARDÉ E., GRUAU G., PIERSON-WICKMANN A.-C., **2011**. Extreme variability of steroid profiles in cow feces and pig slurries at the regional scale: implications for the use of steroids to specify fecal pollution sources in waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 7294-7302.

DEVOS Y., VRYDAGHS L., DEGRAEVE A., MODRIE S., **2011**. Unravelling urban stratigraphy. The study of Brussels' (Belgium) dark earth. An archaeopedological perspective. *Medieval and Modern Matters* 2, 51-76.

DEWICK P.M., **2002**. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. John Wiley & Sons (Eds.), 2nd edition, Chichester.

DIXON R.A., PAIVA N.L., **1995**. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* 7, 1085-1097.

DJERASSI C., THOMAS G.H., JEGER O., **1955**. Über die Stereochemie der Sumaresinolsäure und deren Überführung in Oleanolsäure. *Helvetica Chimica Acta* 38, 1304-1307.

DUDD S.N., EVERSHED R.P., **1999**. Unusual triterpenoid fatty acyl ester components of archaeological birch bark tars. *Tetrahedron Letters* 40, 359-362.

DUNKERTON J., WHITE R., **2000**. The discovery and identification of an original varnish on a panel by Carlo Crivelli. *National Gallery Technical Bulletin* 21, 70-76.

DUNNE J., EVERSHED R.P., SALQUE M., CRAMP L., BRUNI S., RYAN K., BIAGETTI S., DI LERNIA S., **2012**. First dairying in green Saharan Africa in the fifth millennium BC. *Nature* 486, 390-394.

DURAND F., **2016**. Aperçu des productions agricoles et leurs évolutions entre le Bronze final et l'Antiquité. *In* : Obernai (Bas-Rhin), Parc d'activités économiques intercommunal – 6000 ans d'histoire au pied du Mont Saint-Odile. Rapport d'opération, Volume 5, INRAP Grand Est Sud.

DURAZZO A., TURFANI V., AZZINI E., MAIANI G., CARCEA M., **2013**. Phenols, lignans and antioxidant properties of legume and sweet chestnut flours. *Food Chemistry* 140, 666-671.

DUTTA S., MALLICK M., BERTRAM N., GREENWOOD P.F., MATHEWS R.P., **2009**. Terpenoid composition and class of Tertiary resins from India. *International Journal of Coal Geology* 80, 44-50.

DUTTA S., MALLICK M., KUMAR K., MANN U., GREENWOOD P.F., **2011**. Terpenoid composition and botanical affinity of Cretaceous resins from India and Myanmar. *International Journal of Coal Geology* 85, 49-55.

DUTTA S., SAXENA R., SINGH H., **2014**. Exceptional preservation of angiosperm markers in Miocene and Eocene ambers. *Geology* 42, 155-158.

EGENBERG I.M., GLASTRUP J., **1999**. Composition of kiln-produced tar. *In*: Bridgland J., Brown J. (Eds.). *Preprints of triennial meeting (12th), Lyon, 29 August-3 September 1999*, 862-867.

EGLINTON G., HAMILTON R.J., **1967**. Leaf epicuticular waxes. *Science* 156, 1322-1335.

EGLINTON G., LOGAN G.A., AMBLER R.P., BOON J.J., PERIZONIUS W.R.K., **1991**. Molecular preservation [and discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 333, 315-328.

EISENREICH W., ROHDICH F., BACHER A., **2001**. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science* 6, 78-84.

EISENREICH W., BACHER A., ARIGONI D., ROHDICH F., **2004**. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61, 1401-1426.

ELGAMAL M.H.A., FAYEZ M.B.E., KEMP T.R., **1969**. The mass spectra of some triterpenoid dehydration products. *Organic Mass Spectrometry* 2, 175-194.

ERTLEN D., SCHWARTZ D., TRAUTMANN M., WEBSTER R., BRUNET D., **2010**. Discriminating between organic matter in soil from grass and forest by near-infrared spectroscopy. *European Journal of Soil Science* 61, 207-216.

ERTLEN D., FÉLIU C., MICHLER M., SCHNEIDER-SCHWIEN N., SCHNEIKERT F., THOMAS Y., BRAGUIER S., MINNI D., VEBER C., **2013**. Les structures de type "fente" dans le Kochersberg (Alsace): un programme de recherche en cours de développement. *Revue Archéologique de l'Est*, Supplément 33, 213-227.

ESTRADA O., CONDE D., MENDEZ J., CARDOZO A., **2012**. Chemical constituents from *Chrysobalanus venezuelanus*. *Biochemical Systematics and Ecology* 45, 66-68.

EVERSHED R.P., JERMAN K., EGLINTON G., **1985**. Pine wood origin for pitch from the *Mary Rose*. *Nature* 314, 528-530.

EVERSHED R.P., HERON C., GOAD L.J., **1991**. Epicuticular wax components preserved in potsherds as chemical indicators of leafy vegetables in ancient diets. *Antiquity* 65, 540-544.

EVERSHED R.P., BETHELL P.H., **1996**. Application of multimolecular biomarker techniques to the identification of fecal material in archaeological soils and sediments. *ACS Symposium Series* 625, 157-172.

EVERSHED R.P., VAN BERGEN P.F., PEAKMAN T.M., LEIGH-FIRBANK E.C., HORTON M.C., EDWARDS D., BIDDLE M., KJØLBYE-BIDDLE B., ROWLEY-CONWY P.A., **1997**. Archaeological frankincense. *Nature* 390, 667-668.

EVERSHED R.P., **2008**. Organic residue analysis in archaeology: the archaeological biomarker revolution. *Archaeometry* 50, 895-924.

EVERSHED R.P., PAYNE S., SHERRATT A.G., COPLEY M.S., COOLIDGE J., UREM-KOTSU D., KOTSAKIS K., ÖZDOĞAN M., ÖZDOĞAN A.E., NIEUWENHUYSE O., AKKERMANS P.M.M.G., BAILEY D., ANDEESCU R.-R., CAMPBELL S., FARID S., HODDER I., YALMAN N., ÖZBAŞARAN M., BICAKCI E., GARFINKEL Y., LEVY T., BURTON M.M., **2008**. Earliest date for milk use in the Near East and southeastern Europe linked to cattle herding. *Nature* 455, 528-531.

FAIX O., MEIER D., FORTMANN I., **1990**. Thermal degradation products of wood. *Holz als Roh- und Werkstoff* 48, 351-354.

FAUCONNOT L., HAU J., AESCHLIMANN J.-M., FAY L.-B., DIONISI F., **2004**. Quantitative analysis of triacylglycerol regioisomers in fats and oils using reversed-phase high-performance liquid chromatography and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18, 218-224.

FELIU C., **2016**. Obernai (Bas-Rhin), Parc d'activités économiques intercommunal – 6000 ans d'histoire au pied du Mont Saint-Odile. Rapport d'opération, INRAP Grand Est Sud.

FERNANDEZ X., LIZZANI-CUVELIER L., LOISEAU A.-M., PERICHET C., DELBECQUE C., **2003**. Volatile constituents of benzoin gums: Siam and Sumatra. Part 1. *Flavour and Fragrance Journal* 18, 328-333.

FERNANDEZ X., LIZZANI-CUVELIER L., LOISEAU A.-M., PERICHET C., DELBECQUE C., ARNAUDO J.-F., **2005**. Chemical composition of the essential oils from Turkish and Honduras styrax. *Flavour and Fragrance Journal* 20, 70-73.

FINDEISEN A., KOLIVOSKA V., KAML I., BAATZ W., KENNDLER E., **2007**. Analysis of diterpenoic compounds in natural resins applied as binders in museum objects by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 1157, 454-461.

FLETCHER A., PEARSON J., AMBERS J., **2008**. The manipulation of social and physical identity in the Pre-Pottery Neolithic. Radiographic evidence for cranial modification at Jericho and its implications for the plastering of skulls. *Cambridge Archaeological Journal* 18, 309-325.

FONDRILLON M., **2007**. La formation du sol urbain: étude archéologique des terres noires à Tours (4e-12e siècle). Thèse de doctorat, Université de Tours, France.

FONTUGNE M., **2004**. Les derniers progrès du calibrage des âges radiocarbones permettent-ils une révision des chronologies entre 25 et 50 000 ans BP? *Quaternaire* 15, 245-252.

FOSSEY C., **1945**. L'infusion par la bouche dans la médecine akkadienne. *Revue d'Assyriologie et d'Archéologie Orientale* 40, 109-112.

FRANCESCHI E., LUCIANO G., CAROSI F., CORNARA L., MONTANARI C., **2004**. Thermal and microscope analysis as a tool in the characterisation of ancient papyri. *Thermochimica* 418, 39-45.

FREEMAN K.H., BOREHAM C.J., SUMMONS R.E., HAYES J.M., **1994**. The effect of aromatization on the isotopic compositions of hydrocarbons during early diagenesis. *Organic Geochemistry* 21, 1037-1049.

FRITSCH P.W., MORTON C.M., CHEN T., **2001**. Phylogeny and biogeography of the Styracaceae. *International Journal of Plant Sciences* 162, S95-S116.

FUKUDA Y., SAKAI K., MATSUNAGA S., TOKUDA H., TANAKA R., **2005**. Cancer chemopreventive activity of lupane- and oleanane-type triterpenoids from the cones of *Liquidambar styraciflua*. *Chemistry & Biodiversity* 2, 421-428.

FUKUDA Y., YAMADA T., WADA S.-I., SAKAI K., MATSUNAGA S., TANAKA R., **2006**. Lupane and oleanane triterpenoids from the cones of *Liquidambar styraciflua*. *Journal of Natural Products* 69, 142-144.

FULLER D.Q., **2007**. Contrasting patterns in crop domestication and domestication rates: recent archaeobotanical insights from the Old World. *Annals of Botany* 100, 903-924.

GARCEZ F.R., GARCEZ W.S., MIGUEL D.L.S., SEREA A.A.T, PRADO F.C., **2003**. Chemical constituents from *Terminalia glabrescens*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 14, 461-465.

GARFINKEL Y., **1994**. Ritual burial of cultic objects: the earliest evidence. *Cambridge Archaeological Journal* 4, 159-188.

GARNIER N., **2007**. Analyse de résidus organiques conservés dans des amphores : un état de la question. *In* : Bonifay M., Tréglia J.-C. (Eds.). *LRCW 2. Late roman coarse wares, cooking wares and amphorae in the Mediterranean*. BAR International Series 1662, 39-49.

GASKELL S.J., EGLINTON G., **1975**. Rapid hydrogenation of sterols in a contemporary lacustrine sediment. *Nature* 254, 209-211.

GASTALDO C., **2014**. Biosynthèse des unités isopréniques chez les végétaux. Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, France.

GÉRARD P., **2014**. Metabolism of cholesterol and bile acids by the gut microbiota. *Pathogens* 3, 14-24.

GERLACH R., BAUMEWERD-SCHMIDT H., VAN DEN BORG K., ECKMEIER E., SCHMIDT M.W.I., **2006**. Prehistoric alteration of soil in the Lower Rhine Basin, Northwest Germany – archaeological, ^{14}C and geochemical evidence. Geoderma 136, 38-50.

GIANNO R., ERHARDT D., ENDT P.W., **1990**. Archaeological resins from shipwrecks off the coasts of Sarpan and Thailand. *MASCA Research Papers in Science and Archaeology* 7, 59-67.

GÓMEZ-ARIZA J.L., ARIAS-BORREGO A., GARCÍA-BARRERA T., BELTRAN R., **2006**. Comparative study of electrospray and photospray ionization sources coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometer for oil authentication. *Talanta* 70, 859-869.

GOUDE G., BALASESCU A., RÉVEILLAS H., THOMAS Y., LEFRANC P., **2015**. Diet variability and stable isotope analyses: looking for variables within the Late Neolithic and Iron Age human groups from Gougenheim site and surrounding areas (Alsace, France). *International Journal of Osteoarchaeology* 25, 988-996.

GOYON J.-C., ARCHIER P., COEN S., VIEILLESCAZES C., **1999**. Contribution de la chimie analytique à l'étude de vestiges de la XIIe ou XIIIe dynastie égyptienne. *Studien zur altägyptischen Kultur* 27, 107-121.

GREEN B., BENTLEY M.D., CHUNG B.Y., LYNCH N.G., JENSEN B.L., **2007**. Isolation of betulin and rearrangement to allobetulin. A biomimetic natural product synthesis. *Journal of Chemical Education* 84, 1985-1987.

GRIMALT J.O., FERNÁNDEZ P., BAYONA J.M., ALBAIGÉS J., **1990**. Assessment of fecal sterols and ketones as indicators of urban sewage inputs to coastal waters. *Environmental Science & Technology* 24, 357-363.

GRÜNBERG J.M., **2002**. Middle Palaeolithic birch-bark pitch. *Antiquity* 76, 15-16.

HAFIZOGLU H., REUNANEN M., ISTEK A., **1996**. Chemical constituents of balsam from *Liquidambar orientalis*. *Holzforschung* 50, 116-117.

HARKISS K.J., LINLEY P.A., **1979**. A comparative study of the acid and ester content of Tolu balsam. *Planta Medica* 35, 61-65.

HAUTEVELLE Y., MICHELS R., MALARTRE F., TROUILLER A., **2006**. Vascular plant biomarkers as proxies for palaeoflora and palaeoclimatic changes at the Dogger/Malm transition of the Paris Basin (France). *Organic Geochemistry* 37, 610-625.

HAYEK E.W.H., JORDIS U., MOCHE W., SAUTER F., **1989**. A bicentennial of betulin. *Phytochemistry* 28, 2229-2242.

HAYEK E.W.H., KRENMAYR P., LOHNINGER H., JORDIS U., MOCHE W., SAUTER F., **1990**. Identification of archaeological and recent wood tar pitches using gas chromatography/mass spectrometry and pattern recognition. *Analytical Chemistry* 62, 2038-2043.

HAYES J.M., **2001**. Fractionation of carbon and hydrogen isotopes in biosynthetic processes. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 43, 225-277.

HENGTRAKUL P., LORENZ K., MATHIAS M., **1991**. Alkylresorcinol homologs in cereal grains. *Journal of Food Composition and Analysis* 4, 52-57.

HERODOTUS. *L'Enquête*, Livres I à IV. *In:* Traduction d'Andrée Barguet (1964), Gallimard.

HERON C., AVELING E.M., CHALLINOR C., DERHAM B., STACEY R.J., STERN B., **1999**. Chromatography in archaeology. *Chromatography and Separation Technology* 5, 4-8.

HERRMANN K.M., **1995**. The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The Plant Cell* 7, 907-919.

HIPPOCRATES. *Traité de la nature de la femme*. *In*: Encyclopédie des Sciences Médicales, Œuvres d'Hippocrate, vol. II. Traduction de Jean-Baptiste Gardeil (1837), au bureau de l'Encyclopédie, Paris.

HJULSTRÖM B., ISAKSSON S., HENNIUS A., **2006**. Organic geochemical for pine tar production in middle Eastern Sweden during the Roman Iron Age. *Journal of Archaeological Science* 33, 283-294.

HOBBIE E.A., WERNER R.A., **2004**. Intramolecular, compound-specific, and bulk carbon isotope patterns in C_3 and C_4 plants: a review and synthesis. *New Phytologist* 161, 371-385.

HOLČAPEK M., JANDERA P., ZDERADIČKA P., HRUBÁ L., **2003**. Characterization of triacylglycerol and diacylglycerol composition of plant oils using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1010, 195-215.

HOVANEISSIAN M., ARCHIER P., MATHE C., VIEILLESCAZES C., **2006**. Contribution de la chimie analytique à l'étude des exsudats végétaux styrax, storax et benjoin. *Comptes Rendus Chimie* 9, 1192-1202.

HOVANEISSIAN M., ARCHIER P., MATHE C., CULIOLI G., VIEILLESCAZES C., **2008**. Analytical investigation of styrax and benzoin balsams by HPLC-PAD-fluorimetry and GC-MS. *Phytochemical Analysis* 19, 301-310.

HUANG Y., BOL R., HARKNESS D.D., INESON P., EGLINTON G., **1996**. Post-glacial variations in distributions, ^{13}C and ^{14}C contents of aliphatic hydrocarbons and bulk organic matter in three types of British acid upland soils. *Organic Geochemistry* 24, 273-287.

HUNECK S., **1963**. Triterpene –IV. Die Triterpensäuren des Balsams von *Liquidambar Orientalis* Miller. *Tetrahedron* 19, 479-482.

HUNT H.V., VANDER LINDEN M., LIU X., MOTUZAITE-MATUZEVICIUTE G., COLLEDGE S., JONES M.K., **2008**. Millets across Eurasia: chronology and context of early records of the genera *Panicum* and *Setaria* from archaeological sites in the Old World. *Vegetation History and Archaeobotany* 17, 5-18.

IGOLEN G., **1972**. Le styrax d'Anatolie. *Rivista Italiana Essenze-Profumi-Piante Officinali* 54, 554-558.

INGALLS A.E., PEARSON A., **2005**. Ten years of compound-specific radiocarbon analysis. *Oceanography* 18, 18-31.

JACOB J., DISNAR J.-R., BOUSSAFIR M., ALBUQUERQUE A.L.S., SIFEDDINE A., TURCQ B., **2005**. Pentacyclic triterpene methyl ethers in recent lacustrine sediments (Lagoa do Caçó, Brazil). *Organic Geochemistry* 36, 449-461.

JACOB J., DISNAR J.-R., BARDOUX G., **2008a**. Carbon isotope evidence for sedimentary miliacin as a tracer of *Panicum miliaceum* (broomcorn millet) in the sediments of Lake le Bourget (French Alps). *Organic Geochemistry* 39, 1077-1080.

JACOB J., DISNAR J.-R., ARNAUD F., CHAPRON E., DEBRET M., LALLIER-VERGÈS E., DESMET M., REVEL-ROLLAND M., **2008b**. Millet cultivation history in the French Alps as evidenced by a sedimentary molecule. *Journal of Archaeological Science* 35, 814-820.

JACOB J., LE MILBEAU C., BOSSARD N., DISNAR J.-R., BILLAUD Y., **2011**. Combined $\delta^{13}C$ - δD analysis of pentacyclic triterpenes and their derivatives. *The 25th International Meeting on Organic Geochemistry*, September 2011, Interlaken, Suisse. Abstract book, p. 273.

JÄGER S., TROJAN H., KOPP T., LASZCZYK M.N., SCHEFFLER A., **2009**. Pentacyclic triterpene distribution in various plants – rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules* 14, 2016-2031.

JAKES K.A., SIBLEY L.R., YERKES R., **1994**. A comparative collection for the study of fibres used on prehistoric textiles from Eastern North America. *Journal of Archaeological Science* 21, 641-650.

JAKUPOVIC J., ZDERO C., PAREDES L., BOHLMANN F., **1988**. Sesquiterpene glycosides and other constituents from *Osteospermum* species. *Phytochemistry* 27, 2881-2886.

JERKOVIĆ I., MARIJANOVIĆ Z., GUGIĆ M., ROJE M., **2011**. Chemical profile of the organic residue from ancient amphora found in the Adriatic Sea determined by direct GC and GC-MS analysis. *Molecules* 16, 7936-7948.

JI X., JETTER R., **2008**. Very long chain alkylresorcinols accumulate in the intracuticular wax of rye (*Secale cereal*e L.) leaves near the tissue surface. *Phytochemistry* 69, 1197-1207.

JIM S., AMBROSE S.H., EVERSHED R.P., **2003**. Natural abundance stable carbon isotope evidence for the routing and *de novo* synthesis of bone FA and cholesterol. *Lipids* 38, 179-186.

JIM S., AMBROSE S.H., EVERSHED R.P., **2004**. Stable carbon isotopic evidence for differences in the dietary origin of bone cholesterol, collagen and apatite: implications for their use in palaeodietary reconstruction. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68, 61-72.

JOYE N.M., LAWRENCE R.V., **1967**. Resin acid composition of pine oleoresins. *Journal of Chemical and Engineering Data* 12, 279-282.

JULL A.J.T., BURR G.S., **2014**. Radiocarbon: archaeological applications. *In*: Holland H., Turekian K. (Eds.). *Treatise on Geochemistry*, 2nd edition, 14, 45-53.

KACHROO A., KACHROO P., **2009**. Fatty acid-derived signals in plant defense. *Annual Review of Phytopathology* 47, 153-176.

KAMIYA K., YOSHIOKA K., SAIKI Y., IKUTA A., SATAKE T., **1997**. Triterpenoids and flavonoids from *Paeonia lactiflora*. *Phytochemistry* 44, 141-144.

KITAGAWA I., KITAZAWA K., YOSIOKA I., **1968**. Photooxidation of oleanolic acid: formation of 11α,12α-epoxy- and 12α-hydroxy-oleanolic lactones. *Tetrahedron Letters* 4, 509-512.

KOCH P.L., FOGEL M.L., TUROSS N., **1994**. Tracing the diets of fossil animals using stable isotopes. Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science, 1st Edition, Blackwell Scientific Publications, 63-92.

KOCH K., ENSIKAT H.-J., **2008**. The hydrophobic coatings of plant surfaces: epicuticular wax crystals and their morphologies, crystallinity and molecular self-assembly. *Micron* 39, 759-772.

KÖGER-KNABNER I., **2002**. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biology & Biochemistry* 34, 139-162.

KÖGER-KNABNER I., SCHMID E.-M., KNICKER H., SKJEMSTAD J., BÄUMLER R., **2007**. Origin and composition of organic matter in pits from the Neolithic settlement at Murr, Bavaria. *Atti dela Società Toscana de Scienze Naturali di Pisa*, Serie A, 112, 45-54.

KOLATTUKUDY P.E., **1970**. Plant waxes. *Lipids* 5, 259-275.

KOLLER J., BAUMER U., MANIA D., **2001**. High-tech in the Middle Palaeolithic: Neandertal-manufactured pitch identified. *European Journal of Archaeology* 4, 385-397.

KORKINA L.G., **2007**. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. *Cellular and Molecular Biology* 53, 15-25.

KOZUBEK A., TYMAN J.H.P., **1999**. Resorcinolic lipids, the natural non-isoprenoid phenolic amphiphiles and their biological activity. *Chemical Reviews* 99, 1-26.

KRASUTSKY P.A., **2006**. Birch bark research and development. *Natural Product Reports* 23, 919-942.

KUNST L., SAMUELS A.L., **2003**. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in Lipid Research* 42, 51-80.

KWON J.-H., CHANG M.-J., SEO H.-W., LEE J.-H., MIN B.-S., NA M., KIM J.C., WOO M.H., CHOI J.S., LEE H.K., BAE K., **2008**, Triterpenoids and a sterol from the stem-bark of *Styrax japonica* and their protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activities. *Phytotherapy Research* 22, 1303-1306.

LAAKSO P., **2002**. Mass spectrometry of triacylglycerols. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104, 43-49.

LAFLAMME R.E., HITES R.A., **1979**. Tetra- and pentacyclic, naturally-occurring, aromatic hydrocarbons in recent sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 43, 1687-1681.

LAMPERT C.D., GLOVER I.C., HEDGES R.E.M., HERON C.P., HIGHAM T.G.G., STERN B., SHOOCONGDEJ R., THOMPSON G.B., **2003**. Dating resin coating on pottery: the Spirit Cave early ceramic dates revised. *Antiquity* 77, 126-133.

LANGENHEIM J.H., **2003**. Plant resins: chemistry, evolution, ecology and ethnobotany. Timber Press, Portland, Cambridge, 622 p.

LAPORTE L., **2001**. Guilaine, (J.), Dir. – Premiers paysans du monde, naissance des agricultures,. Séminaire du Collège de France. *Revue Archéologique de l'Ouest* 18, 240-242.

LAROUSSE©, accessible sur le site www.larousse.fr.

LAUER F., PROST K., GERLACH R., PÄTZOLD S., WOLF M., URMERSBACH S., LEHNDORFF E., ECKMEIER E., AMELUNG W., **2014**. Organic fertilization and sufficient nutrient status in Prehistoric agriculture ? – Indications from multi-proxy analyses of archaeological topsoil relicts. *PLOS ONE* 9, e106244.

LAVOIE S., **2001**. Contribution à la synthèse de dérivés de l'acide bétulinique à partir du bétulinol extrait de l'écorce de bouleau blanc (*Betula papyrifera*). Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Chicoutimi.

LAVRIEUX M., BREHERET J.-G., DISNAR J.-R., JACOB J., LE MILBEAU C., ZOCATELLI R., **2012**. Preservation of an ancient grassland biomarker signature in a forest soil from the French Massif Central. *Organic Geochemistry* 51, 1-10.

LAVRIEUX M., JACOB J., DISNAR J.-R., BRÉHERET J.G., LE MILBEAU C., **2013**. Sedimentary cannabinol tracks the history of hemp retting. *Geology* 41, 751-754.

LEEMING R., BALL A., ASHBOLT N., NICHOLS P., **1996**. Using faecal sterols from humans and animals to distinguish faecal pollution in receiving waters. *Water Research* 30, 2893-2900.

LEV E., AMAR Z., **2008**. "Fossils" of practical medical knowledge from medieval Cairo. *Journal of Ethnopharmacology* 119, 24-40.

LEWIS N.G., YAMAMOTO E., **1990**. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41, 455-496.

LI T.-S., WANG J.-X., ZHENG X.-J., **1998**. Simple synthesis of allobetulin, 28-oxyallobetulin and related biomarkers from betulin and betulinic acid catalysed by solid acids. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 3957-3965.

LIBBY W.F., ANDERSON E.C., ARNOLD J.R. **1949**. Age determination by radiocarbon content: world-wide assay of natural radiocarbon. *Science* 109, 227-228.

LIBBY W.F., **1960**. Radiocarbon dating. *Nobel Lecture*, 593-610.

LICHTENTHALER H.K., **1999**. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology* 50, 47-65.

LICHTFOUSE E., DOU S., HOUOT S., BARRIUSO E., **1995**. Isotope evidence for soil organic carbon pools with distinct turnover rate -II. Humic substances. *Organic Geochemistry* 23, 845-847.

LIN D.S., CONNOR W.E., NAPTON L.K., HEIZER R.F., **1978**. The steroids of 2000-year-old human coprolites. *Journal of Lipid Research* 19, 215-221.

LOCKHEART M.J., VAN BERGEN P.F., EVERSHED R.P., **1997**. Variations in the stable carbon isotope compositions of individual lipids from the leaves of modern angiosperms: implications for the study of higher land plant-derived sedimentary organic matter. *Organic Geochemistry* 26, 137-153.

LU H., ZHANG J., LIU K.-B., WU N., LI Y., ZHOU K., YE M., ZHANG T., ZHANG H., YANG X., SHEN L., XU D., LI Q., **2009**. Earliest domestication of common millet (*Panicum miliaceum*) in East Asia extended to 10,000 years ago. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106, 7367-7372.

LUCAS A., **1930**, Cosmetics, perfumes and incense in Ancient Egypt. *Journal of Egyptian Archaeology* 16, 41-53.

LUCQUIN A., MARCH R.J., CASSEN S., **2007**. Analysis of adhering organic residues of two « coupes-à-socles » from the Neolithic funerary site « La Hougue Bie » in Jersey: evidences of birch bark tar utilisation. *Journal of Archaeological Science* 34, 704-710.

LUNDSTRÖM-BAUDAIS K., RACHOUD-SCHNEIDER A.-M., BAUDAIS D., POISSONNIER B., **2002**. Le broyage dans la chaîne de transformation du millet (*Panicum miliaceum*): outils, gestes et écofacts. *In* : H. Procopion, R. Treuil (éds), *Moudre et Broyer: I. Méthodes. Comité des Travaux Historiques et Scientifiques*, Paris, 181-209.

LYONS P.C., MASTALERZ M., OREM W.H., **2009**. Organic geochemistry of resins from modern *Agathis australis* and Eocene resins from New Zealand: diagenetic and taxonomic implications. *International Journal of Coal Geology* 80, 51-62.

MACPHAIL R.I., **1983**. The micromorphology of dark earth from Gloucester, London and Norwich: an analysis of urban anthropogenic deposits from the Late Roman to early Medieval periods in England. *Soil Micromorphology, International Working Meeting on Soil Micromorphology* 6, 245-252.

MACPHAIL R.I., GALINIÉ H., VERHAEGHE F., **2002**. A future for dark earth? *Antiquity* 77, 349-358.

MAJUMDER P.L., BAGCHI A., **1983**. Oxidative transformations of triterpenoids of the ursane and oleanane skeleta with hydrogen peroxide. Introduction of 11,12-double bound and 13(28)oxide moiety in the ursane system. *Tetrahedron* 39, 649-655.

MALLICK M., DUTTA S., GREENWOOD P.F., **2014**. Molecular characterization of fossil and extant dammar resin extracts: insight into diagenetic fate of sesqui- and triterpenoids. *International Journal of Coal Geology* 121, 129-136.

MARANDUBA A., DE OLIVEIRA A.B., DE OLIVEIRA G.G., DE REIS J.E., GOTTLIEB O.R., **1979**. Isoflavonoids from *Myroxylon peruiferum*. *Phytochemistry* 18, 815-817.

MARINVAL P., **1992**. Archaeobotanical data on millets (*Panicum miliaceum* and *Setaria italica*) in France. *Review of Palaeobotany and Palynology* 73, 259-270.

MARINVAL P., **1995**. Données carpologiques françaises sur les Millets (*Panicum miliaceum* L. et *Setaria italica* (L.) Beauv.) de la Protohistoire au Moyen Age. *In*: Millet : Actes du Congrès d'Aizenay, 18-19 août 1990, Peter Lang, Frankfurt, 31-61.

MARIOTTI A., PETERSCHMITT E., **1994**. Forest savanna ecotone dynamics in India as revealed by carbon isotope ratios of soil organic matter. *Oecologia* 97, 475-480.

MARSHALL J.D., BROOKS J.R., LAJTHA K., **2007**. Sources of variation in the stable isotopic composition of plants. Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science, 2nd Edition, Blackwell Scientific Publications, 22-60.

MARTIN W.J., RAVI SUBBIAH M.T., KOTTKE B.A., BIRK C.C., NAYLOR M.C., **1973**. Nature of fecal sterols and intestinal bacterial flora. *Lipids* 8, 208-215.

MARTIN V.J.J., YU Z., MOHN W.W., **1999**. Recent advances in understanding resin acid biodegradation: microbial diversity and metabolism. *Archives of Microbiology* 172, 131-138.

MARTIN L., THIÉBAULT S., REY P.-J., **2007**. Production et consommation végétale durant la Préhistoire récente: études archéobotaniques de quelques sites des Alpes occidentales. *In*: Boëtsch G. & Hubert A. (Eds.), *Alimentation et Montagne, Actes de la 6ème Université européenne d'été « Anthropologie des populations alpines »*, Gap: éditions des Hautes-Alpes, 11-24.

MARYNOWSKI L., OTTO A., ZATON M., PHILIPPE M., SIMONEIT B.R.T., **2007**. Biomolecules preserved in *ca.* 168 million year old fossil conifer wood. *Naturwissenschaften* 94, 228-236.

MATHE C., CONNAN J., ARCHIER P., MOUTON M., VIEILLESCAZES C., **2007**. Analysis of frankincense in archaeological samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Annali di Chimica* 97, 433-445.

MATHIAS L., VIEIRA I.J.C., BRAZ-FILHO R., FILHO E.R., **2000**. A new pentacyclic triterpene isolated from *Myroxylon balsamum* (syn. *Myroxylon peruiferum*). *Journal of the Brazilian Chemical Society* 11, 195-198.

MENDEZ-MILLAN M., NGUYEN TU T.T., BALESDENT J., DERENNE S., DERRIEN D. EGASSE C., THONGO M'BOU A., ZELLER B., HATTÉ C., **2014**. Compound-specific ^{13}C and ^{14}C measurements improve the understanding of soil organic matter dynamics. *Biogeochemistry* 118, 205-223.

MILDER I.E., ARTS I.C., VAN DE PUTTE B., VENEMA D.P., HOLLMAN P.C.H., **2005**, Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. *British Journal of Nutrition* 93, 393-402.

MILLS J.S., **1973**. Diterpenes of *Larix* oleoresins. *Phytochemistry* 12, 2407-2412.

MILLS J.S., WHITE R., **1977**. Natural resins of art and archaeology. Their sources, chemistry, and identification. *Studies in Conservation* 22, 12-31.

MODUGNO F., RIBECHINI E., COLOMBINI M.P., **2006a**. Chemical study of triterpenoid resinous materials in archaeological findings by means of direct exposure electron ionisation mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20, 1787-1800.

MODUGNO F., RIBECHINI E., COLOMBINI M.P., **2006b**. Aromatic resin characterization by gas chromatography-mass spectrometry: raw and archaeological materials. *Journal of Chromatography A* 1134, 298-304.

MORAES A.C.G., BERTANHA C.S., GIMENEZ V.M.M., GROPPO M., SILVA M.L.A., CUNHA W.R., JANUÁRIO A.H., PAULETTI P., **2012**. Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for quantification of egonol and homoegonol in *Styrax* species. *Biomedical Chromatography* 26, 869-874.

MOTTRAM H.R., WOODBURY S.E., EVERSHED R.P., **1997**. Identification of triacylglycerol positional isomers present in vegetable oils by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 11, 1240-1252.

MOTUZAITE-MATUZEVICIUTE G., JACOB J., TELIZHENKO S., JONES M.K., **2013**. Miliacin in palaeosols from an Early Iron Age in Ukraine reveal *in situ* cultivation of broomcorn millet. *Archaeological and Anthropological Sciences*, 1-8.

MÜLLER R.A., **1977**. Radioisotope dating with a cyclotron. *Science* 196, 489-494.

NAKAMURA H., SAWADA K., TAKAHASHI M., **2010**. Aliphatic and aromatic terpenoid biomarkers in Cretaceous and Paleogene angiosperm fossils from Japan. *Organic Geochemistry* 41, 975-980.

NAKATA H., TATEMATSU A., **1971**. A mechanism of mass spectral ketene elimination from phenyl acetates. *Organic Mass Spectrometry* 5, 1343-1344.

NEUBAUER-SAURER D., **1997**. Birkenpechproduktion im Neolithikum (ein mögliches Verfahren). *In*: Brzeziński W., Piotrowski W. (Eds.), *Proceedings of the First International Symposium on Wood Tar and Pitch*. State Archaeological Museum in Warsaw, 41-44.

NOBLE R.A., ALEXANDER R., KAGI R.I., KNOX J., **1985**. Tetracyclic diterpenoid hydrocarbons in some Australian coals, sediments and crude oils. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 49, 2141-2147.

OHMOTO T., IKUSE M., NATORI S., **1970**. Triterpenoids of the Gramineae. *Phytochemistry* 9, 2137-2148.

O'LEARY M.H., **1988**. Carbon isotopes in photosynthesis. *BioScience* 38, 328-336.

OSETE-CORTINA L., DOMÉNECH-CARBÓ M.T., **2005**. Analytical characterization of diterpenoid resins present in pictorial varnishes using pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry with on line trimethylsilylation. *Journal of Chromatography A* 1065, 265-278.

OTTO A., WILDE V., **2001**. Sesqui-, di-, and triterpenoids as chemosystematic markers in extant conifers – a review. *The Botanical Review* 67, 141-238.

OTTO A., SIMONEIT B.R.T., **2002**. Biomarkers of Holocene buried conifer logs from Bella Coola and North Vancouver, British Columbia, Canada. *Organic Geochemistry* 33, 1241-1251.

OTTO A., SIMONEIT B.R.T., WILDE V., KUNZMANN L., PÜTTMANN W., **2002**. Terpenoid composition of three fossil resins from Cretaceous and Tertiary conifers. *Review of Palaeobotany and Palynology* 120, 203-215.

OTTO A., SIMONEIT B.R.T., WILDE V., **2007**. Terpenoids as chemosystematic markers in selected fossil and extant species of pine (*Pinus*, Pinaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 154, 129-140.

OUYANG M.-A., WANG H.-Q., LIU Y.-Q., YANG C.-R., **1997**. Triterpenoid saponins from the leaves of *Ilex latifolia*. *Phytochemistry* 45, 1501-1505.

ÖZTÜRK M., ÇELIK A., GÜVENSEN A., HAMZAOĞLU E., **2008**. Ecology of Tertiary relict endemic *Liquidambar orientalis* Mill. forests. *Forest Ecology and Management* 256, 510-518.

PASTOROVA I., VAN DER BERG K.J., BOON J.J., VERHOEVEN J.W., **1997a**. Analysis of oxidized diterpenoid acids using thermally assisted methylation with TMAH. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 43, 41-57.

PASTOROVA I., DE KOSTER C.G., BOON J.J., **1997b**. Analytical study of free and ester bound benzoic and cinnamic acids of gum benzoin resins by GC-MS and HPLC-frit FAB-MS. *Phytochemical Analysis* 8, 63-73.

PASTOROVA I., WEEDING T., BOON J.J., **1998**. 3-phenylpropanylcinnamate, a copolymer unit in Siegburgite fossil resin: a proposed marker for the *Hammamelidaceae*. *Organic Geochemistry* 29, 1381-1393.

PAULETTI P.M., ARAÚJO A.R., YOUNG M.C.M., GIESBRECHT A.M., DA SILVA BOLZANI V., **2000**. *Nor*-lignans from the leaves of *Styrax ferrugineus* (Styracaceae) with antibacterial and antifungal activity. *Phytochemistry* 55, 597-601.

PAULETTI P.M., ARAÚJO A.R., DA SILVA BOLZANI V., **2002**. Triterpenos de *Styrax camporum* (Styracaceae). *Química Nova* 25, 349-352.

PAULETTI P.M., TELES H.L., SILVA D.H.S., ARAUJO A.R., BOLZANI V.S., **2006**. The *Styracaceae*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 16, 576-590.

PEREZ J., MUÑOZ-DORADO J., DE LA RUBIA T., MARTINEZ J., **2002**. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology* 5, 53-63.

PESSENDA L.C.R., GOMES B.M., ARAVENA R., RIBEIRO A.S., BOULET R., GOUVEIA S.E.M., **1998**. The carbon isotope record in soils along a forest-cerrado ecosystem transect: implications for vegetation changes in the Rondonia state, southwestern Brazilian Amazon region. *The Holocene* 8, 599-603.

PETERS K.E., WALTERS C.C., MOLDOWAN J.M., **2005**. *The Biomarker Guide, Volume 1: Biomarkers and isotopes in the environment and human history*. Second Edition, Cambridge University Press, Cambridge, 471p.

PHILLIPS D.R., RASBERY J.M., BARTEL B., MATSUDA S.P.T., **2006**. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Current Opinion in Plant Biology* 9, 305-314.

PIETRZAK S., **2012**. Wood tar in the Dnieper and Elbe communities: VI-II millennium BC. *Baltic-Pontic studies* 17.

PLAVAN V., MIU L., GAVRILYUK N., **2013**. Evaluation of the amino acid composition, structure and properties of archaeological leather. *Procedia Chemistry* 8, 279-283.

PLINIUS SECUNDUS G. (ou PLINE L'ANCIEN), *Histoire Naturelle*, livre XII. *In* : Dubochet (1848-1850), Paris, Emile Littré.

POPRAVKO S.A., SOKOLOV I.V., TORGOV I.V., **1984**. Derivatives of unsaturated aromatic alcohols in propolis and styrax benzoin. *Chemistry of Natural Compounds* 20, 140-147.

POST-BEITTENMILLER D., **1996**. Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 405-430.

PROESTOS C., BOZIARIS I.S., NYCHAS G.-J.E., KOMAITIS M., **2006**. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry* 95, 664-671.

RAGEOT M., **2015**. Les substances naturelles en Méditerranée Nord-Occidentale (VI^{e}-I^{e} millénaire BCE) : chimie et archéologie des matériaux exploités pour leurs propriétés adhésives et hydrophobes. Thèse de doctorat, Université de Nice Sophia-Antipolis, France.

RAGEOT M., PÊCHE-QUILICHINI K., PY, V., FILIPPI J.-J., FERNANDEZ X., REGERT M., **2015**. Exploitation of beehive products, plant exudates and tars in Corsica during the early Iron age. *Archaeometry* 58, 315-332.

RAUTER A.P., BRANCO I., LOPES R.G., JUSTINO J., SILVA F.V.M., NORONHA J.P., CABRITA E.J., BROUARD I., BERMEJO J., **2007**. A new lupene triterpenetriol and anticholinesterase activity of *Salvia sclareoides*. *Fitoterapia* 78, 474-481.

REGERT M., ROLANDO C., **1996**. Archéologie des résidus organiques. De la chimie analytique à l'archéologie: un état de la question. *Techne* 3, 118-128.

REGERT M., DELACORTE J.-M., MENU M., PETREQUIN P., ROLANDO C., **1998**. Identification of Neolithic hafting adhesives from two lake dwellings at Chalain (Jura, France). *Ancient Biomolecules* 2, 81-96.

REGERT M., VACHER S., **2001**. Des adhésifs organiques sur un site de La Tène au Grand Aunay (Sarthe). *Archéopages* 4, 20-29.

REGERT M., ROLANDO C., **2002**. Identification of archaeological adhesives using direct inlet electron ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 74, 965-975.

REGERT M., VACHER S., MOULHERAT C., DECAVALLAS O., **2003**. Adhesive production and pottery function during the Iron Age at the site of Grand Aunay (Sarthe, France). *Archaeometry* 45, 101-120.

REGERT M., **2004**. Investigating the history of prehistoric glues by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 27, 244-254.

REGERT M., LANGLOIS J., COLINART S., **2005**. Characterisation of wax works of art by gas chromatographic procedures. *Journal of Chromatography A* 1091, 124-136.

REGERT M., ALEXANDRE V., THOMAS N., LATTUATI-DERIEUX A., **2006**. Molecular characterisation of birch bark tar by headspace solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry: a new way for identifying archaeological glues. *Journal of Chromatography A* 1101, 245-253.

REGERT M., DEVIÈSE T., LE HÔ A.-S., ROUGEULLE A., **2008**. Reconstructing ancient Yemeni commercial routes during the Middle Ages using structural characterization of terpenoid resins. *Archaeometry* 50, 668-695.

REIMER P.J., BROWN T.A., REIMER R.W., **2004**. Discussion: reporting and calibration of post-bomb ^{14}C data. *Radiocarbon* 46, 1299-1304.

REIMER P.J., BARD E., BAYLISS A., BECK J.W., BLACKWELL P.G., RAMSEY C.B., BUCK C.E., CHENG H., EDWARDS R.L., FRIEDRICH M., GROOTES P.M., GUILDERSON T.P., HAFLIDASON H., HAJDAS I., HATTÉ C., HEATON T.J., HOFFMANN D.L., HOGG A.G., HUGHEN K.A., KAISER K.F., KROMER B., MANNING S.W., NIU M., REIMER R.W., RICHARDS D.A., SCOTT E.M., SOUTHON J.R., STAFF R.A., TURNEY C.S.M., VAN DER PLICHT J., **2013**. IntCal13 and Marine13 radiocarbon age calibration curves 0-50,000 years cal BP. *Radiocarbon* 55, 1869-1887.

RETHEMEYER J., KRAMER C., GLEIXNER G., WIESENBERG G.L.B., SCHWARK L., ANDERSEN N., NADEAU M.-J., GROOTES P.M., **2004**. Complexity of soil organic matter: AMS ^{14}C analysis of soil lipid fractions and individual compounds. *Radiocarbon* 46, 465-473.

RETHEMEYER J., KRAMER C., GLEIXNER G., JOHN B., YAMASHITA T., FLESSA H., ANDERSEN N., NADEAU M.-J., GROOTES P.M., **2005**. Transformation of organic matter in agricultural soils: radiocarbon concentration versus soil depth. *Geoderma* 128, 94-105.

REUNANEN M., EKMAN R., HEINONEN M., **1990**. Long-term alteration of pine tar in a marine environment. *Holzforschung* 44, 277-278.

REUTTER L., **1915**. Archéologies, analyses de deux masses ayant servi aux Incas à embaumer leurs morts. *Bulletins et Mémoires de la Société d'Anthropologie de Paris*, VI Série, 6, 288-293.

REUTTER L., **1918**. De l'embaumement chez les anciens. *Bulletin de la Société dHistoire de la Pharmacie* 19, 353-355.

RICHARDIN P., BONNASSIES S., CHAHINE C., **1991**. Detection of trace quantities of 4-hydroxyproline using mass spectrometry in archaeological leathers. *Das Leder* 42, 201-204.

RICHARDS M.P., PEARSON J.A., MOLLESON T.I., RUSSELL N., MARTIN L., **2003**. Stable isotope evidence of diet at Neolithic Çatalhöyük, Turkey. *Journal of Archaeological Science* 30, 67-76.

RIELEY G., **1994**. Derivatization of organic compounds prior to gas chromatographic-combustion-isotope ratio mass spectrometric analysis: identification of isotope fractionation processes. *Analyst* 119, 915-919.

ROHMER M., **1999**. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Natural Product Reports* 16, 565-574.

ROGHI G., RAGAZZI E., GIANOLLA P., **2006**. Triassic amber of the Southern Alps (Italy). *Palaios* 21, 143-154.

ROSS A.B., KAMAL-ELDIN A., JUNG C., SHEPHERD M.J., ÅMAN P., **2001**. Gas chromatographic analysis of alkylresorcinols in rye (*Secale cereale* L) grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 1405-1411.

ROSS A.B., SHEPHERD M.J., SCHÜPPHAUS M., SINCLAIR V., ALFARO B., KAMAL-ELDIN A., ÅMAN P., **2003**. Alkylresorcinols in cereal and cereal products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 4111-4118.

ROSS A.B., ÅMAN P., ANDERSSON R., KAMAL-ELDIN A., **2004**. Chromatographic analysis of alkylresorcinols and their metabolites. *Journal of Chromatography A* 1054, 157-164.

RUAS M.-P., MARINVAL P., **1991**. Alimentation végétale et agriculture d'après les semences archéologiques (de 9000 av. J.-C. au XV^{e} siècle). *In* : Pour une archéologie agraire, sous la direction de Jean Guilaine, Armand Colin, 409-439.

RUFF M., WACKER L., GÄGGELER H.W., SUTER M., SYNAL H.-A., SZIDAT S., **2007**. A gas ion source for radiocarbon measurements at 200 kV. *Radiocarbon* 49, 307-314.

RUFF M., FAHRNI S., GÄGGELER H.W., HAJDAS I., SUTER M., SYNAL H.-A., SZIDAT S., WACKER L., **2010a**. On-line radiocarbon measurements of small samples using elemental analyzer and Micadas gas ion source. *Radiocarbon* 52, 1645-1656.

RUFF M., SZIDAT S., GÄGGELER H.W., SUTER M., SYNAL H.-A., WACKER L., **2010b**. Gaseous radiocarbon measurements of small samples. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 268, 790-794.

RULLKÖTTER J., PEAKMAN T.M., TEN HAVEN H.L., **1994**. Early diagenesis of terrigenous triterpenoids and its implications for petroleum geochemistry. *Organic Geochemistry* 21, 215-233.

RUSSELL D.W., **1971**. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. *The Journal of Biological Chemistry* 246, 3870-3878.

SAGE R.F., MONSON R.K., **1999**. C4 plant biology. *Academic Press*, California, USA.

SAKAI K., FUKUDA Y., MATSUNAGA S., TANAKA R., YAMORI T., **2004**. New cytotoxic oleanane-type triterpenoids from the cones of *Liquidambar styraciflua*. *Journal of Natural Products* 67, 1088-1093.

SALEN G., SHEFER S., SETOGUCHI T., MOSBACH E.H., **1975**. Bile alcohol metabolism in man. *The Journal of Clinical Investigation* 56, 226-231.

SALES F., HEDGE I.C., **1996**. Biogeographical aspects of selected SW Asiatic woody taxa. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien* 98B Supplement, 149-161.

SALIU F., DEGANO I., COLOMBINI M.P., **2014**. Identification of triacylglycerols in archaeological organic residues by core-shell reversed phase liquid chromatography coupled to electrospray ionization-quadrupole-time of flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1346, 78-87.

SALVADOR J.A.R., PINTO R.M.A., SANTOS R.C., LE ROUX C., BEJA A.M., PAIXÃO J.A., **2009**. Bismuth triflate-catalyzed Wagner-Meerwein rearrangement in terpenes. Application to the synthesis of the 18α-oleanane core and A-*neo*-18α-oleanene compounds from lupane. *Organic & Biomolecular Chemistry* 7, 508-517.

SALVINI L., PECCI A., GIORGI G., **2008**. Cooking activities during the Middle Ages: organic residues in ceramic vessels from the Sant' Antimo Church (Piombino-Central Italy). *Journal of Mass Spectrometry* 43, 108-115.

SARGENT BRAY P., ANDERSON K.B., **2009**. Identification of carboniferous (320 Million years old) class Ic amber. *Science* 326, 132-134.

SARTORI A.L.B., LEWIS G.P., DE FREITAS MANSANO V., DE AZEVEDO TOZZI A.M.G., **2015**. A revision of the genus *Myroxylon* (Leguminosae: Papilionoideae). *Kew Bulletin* 70, 48.

SCHAEFFER P., MOTSCH E., ADAM P., **2013**. Formation of a 5α(H)-stigmastan-3α-ol from phytosterols during anaerobic degradation of buried wood and possible implications for environmental studies. *26th International Meeting on Organic Geochemistry*. Abstract book, vol. 1, 298-299.

SCHMIDT J., HUNECK S., **1979**. Mass spectroscopy of natural products. V-Mass spectroscopic studies of ring A substituted allobetulane derivatives. *Organic Mass Spectrometry* 14, 646-655.

SCHMIDT H.-L., GLEIXNER G., **1998**. Carbon isotope effects on key reactions in plant metabolism and ^{13}C-patterns in natural compounds. *In*: Griffiths H. (Ed.). *Stable Isotopes:Integration of Biological, Ecological and Geochemical Processes*. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, 13-25.

SCHMIDT M.W.I., TORN M.S., ABIVEN S., DITTMAR T., GUGGENBERGER G., JANSSENS I.A., KLEBER M., KÖGEL-KNABNER I., LEHMANN J., MANNING D.A.C., NANNIPIERI P., RASSE D.P., WEINER S., TRUMBORE S.E., **2011**. Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. *Nature* 478, 49-56.

SCHNELL, G., SCHAEFFER P., TARDIVON H., MOTSCH E., CONNAN J., ERTLEN D., SCHWARTZ D., SCHNEIDER N., ADAM P., **2014**. Contrasting diagenetic pathways of higher plant triterpenoids in buried wood as a function of tree species. *Organic Geochemistry* 66, 107-124.

SCHROEDER H.A., **1968**. The *p*-hydroxycinnamyl compounds of Siam benzoin gum. *Phytochemistry* 7, 57-61.

SCHUHR C.A., RADYKEWICZ T., SAGNER S., LATZEL C., ZENK M.H., ARIGONI D., BACHER A., ROHDICH F., EISENREICH W., **2003**. Quantitative assessment of crosstalk between the two isoprenoid biosynthesis pathways in plants by NMR spectroscopy. *Phytochemistry Reviews* 2, 3-16.

SCHULZE-KÖNIG T., SEILER M., SUTER M., WACKER L., SYNAL H.-A., **2011**. The dissociation of ^{13}CH and $^{12}CH_2$ molecules in He and N_2 at beam energies of 80-250 keV and possible implications for radiocarbon mass spectrometry. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 269, 34-39.

SCHWARTZ D., **2012**. Les temps du sol : interprétations temporelles de l'archivage pédologique dans les approches paléoenvironnementalistes et géoarchéologiques. *Etude et Gestion des Sols* 19, 51-65.

SEITZ L.M., **1992**. Identification of 5-(2-oxoalkyl)resorcinols and 5-(2-oxoalkenyl)resorcinols in wheat and rye grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 1541-1546.

SEO S.-M., PARK H.-M., PARK, I.-K., **2012**. Larvicidal activity of ajowan (*Trachyspermum ammi*) and Peru balsam (*Myroxylon pereira*) oils and blends of their constituents against mosquito, *Aedes aegypti*, acute toxicity on water flea, *Daphnia magna*, and aqueous residue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 5909-5914.

SERPICO M., WHITE R., **2000**. Resins, amber and bitumen. *In*: Nicholson P.T., Shaw I. (Eds.), *Ancient Egyptian Materials and Technology*. Cambridge University Press, 430-474.

SESSIONS A.L., **2006**. Isotope-ratio detection for gas chromatography. *Journal of Separation Science* 29, 1946-1961.

SIMAS N.K., LIMA E.C., CONCEIÇÃO S.R., KUSTER R.M., DE OLIVEIRA FILHO A.M., LAGE C.L.S., **2004**. Productos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóodes. *Química Nova* 27, 46-49.

SIMONEIT B.R.T., GRIMALT J.O., WANG T.G., COX R.E., HATCHER P.G., NISSENBAUM A., **1986**. Cyclic terpenoids of contemporary resinous plant detritus and of fossil woods, ambers and coals. *In:* Leuthauser D., Rullkötter, J. (Eds.), *Advances in Organic Geochemistry 1985: Part II. Molecular and General Organic Geochemistry*. *Organic Geochemistry* 10, 877-889.

SIMONEIT B.R.T., ROGGE W.F., MAZUREK M.A., STANDLEY L.J., HILDEMANN L.M., CASS G.R., **1993**. Lignin pyrolysis products, lignans, and resin acids as specific tracers of plant classes in emissions from biomass combustion. *Environmental Science & Technology* 27, 2533-2541.

SIMPSON I.A., DOCKRILL S.J., BULL I.A., EVERSHED R.P., **1998**. Early anthropogenic soil formation at Tofts Ness, Sanday, Orkney. *Journal of Archaeological Science* 25, 729-746.

SISTIAGA A., MALLOL C., GALVÁN B., SUMMONS R.E., **2014a**. The Neanderthal meal: a new perspective using faecal biomarkers. *PLOS ONE* 9, e101045.

SISTIAGA A., BERNA F., LAURSEN R., GOLDBERG P., **2014b**. Steroidal biomarker analysis of a 14,000 years old putative human coprolite from Paisley Cave, Oregon. *Journal of Archaeological Science* 41, 813-817.

SISTIAGA A., WRANGHAM R., ROTHMAN J.M., SUMMONS R.E., **2015**. New insights into the evolution of the human diet from faecal biomarker analysis in wild chimpanzee and gorilla faeces. *PLOS ONE* 10, e0128931.

SOLAZZO C., BUCKLEY M., CONNAN J., BARDEN H., VAN DONGEN B., PENKMAN K., NISSENBAUM A., **2014**. Biomolecular composition of cultural artefacts from the Nahal Hemar cave and earliest use of bovine "glue". *6th International Symposium on Biomolecular Archaeology, Basel, 27-29 August 2014*.

STEIGENBERGER G., **2013**. The Vigani Cabinet – Analysis of historical resinous materials by gas chromatography-mass spectrometry and infrared spectroscopy. Thèse de doctorat, Université de Dresden, Allemagne.

STOTT A.W., DAVIES E., EVERSHED R.P., **1997**. Monitoring the routing of dietary and biosynthesis lipids through compound – specific stable isotope ($\delta^{13}C$) measurements at natural abundance. *Naturwissenschaften* 84, 82-86.

STUIVER M., POLACH H.A., **1977**. Discussion: reporting of ^{14}C data. *Radiocarbon* 19, 355-363.

SUN H., FANG W.-S., HU C., **2008**. An efficient semi-synthesis and structure revision of a cytotoxic triterpenoid 25-acetoxy-3α-hydroxyolean-12-en-28-oic acid from *Liquidambar styraciflua*. *Journal of Asian Natural Products Research* 10, 297-305.

SYNAL H.-A., DÖBELI M., JACOB S., STOCKER M., SUTER M., **2004**. Radiocarbon AMS towards its low-energy limits. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 223-224, 339-345.

SYNAL H.-A., STOCKER M., SUTER M., **2007**. MICADAS: a new compact radiocarbon AMS system. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 259, 7-13.

TABBAGH A., **1994**. Notes pour servir à l'histoire du GMPCA. *Histoire & Mesure* 9, 404-408.

TADANO T., KANOH M., MATSUMOTO M., **2006**. Studies of serum and feces bile acids determination by gas chromatography-mass spectrometry. *Rinsho Byori* 54, 103-110.

TAYOUB G., SCHWOB I., BESSIÈRE J.-M., MASOTTI V., RABIER J., RUZZIER M., VIANO J., **2006a**. Composition of volatile oils of Styrax (*Styrax officinalis* L.) leaves at different phenological stages. *Biochemical Systematics and Ecology* 34, 705-709.

TAYOUB G., SCHWOB I., BESSIÈRE J.-M., RABIER J., MASOTTI V., MÉVY J.-P., RUZZIER M., GIRARD G., VIANO J., **2006b**. Essential oil composition of leaf, flower and stem of Styrax (*Styrax officinalis* L.) from south-eastern France. *Flavour and Fragrance Journal* 21, 809-812.

TEN HAVEN H.L., PEAKMAN T.M., RULLKÖTTER J., **1992**. Early diagenetic transformation of higher-plant triterpenoids in deep-sea sediments from Baffin Bay. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 56, 2001-2024.

THOMAS N., CLAUDE C., **2011**. Les vases à fond percé: pratique de la distillation *per descensum* au bas Moyen âge en Île-de-France. *Revue Archéologique d'Île-de-France* 4, 267-288.

THOMAS Y., FÉLIU C., **2012**. La nécropole de tumulus de la « Forêt de Brumath (Sud) » : nouveaux ensembles funéraires hallstattiens (Fouille LGV Est, Eckwersheim, Bas-Rhin). *Bulletin de l'Association Française pour l'Etude de l'Âge du Fer* 30, 55-59.

TORSELL K.B.G., **1997**. *Natural product chemistry: a mechanistic, biosynthetic and ecological approach*. Swedish Pharmaceutical Press, Second Edition, 480 p.

TOUZEAU A., **2014**. Fractionnement isotopique du carbone chez les plantes vasculaires. *Planet-Terre*. http://planet-terre.ens-lyon.fr/article/fractionnement-isotopique-carbone-C3-C4.xml.

TOUZEAU A., AMIOT R., BLICHERT-TOFT J., FLANDROIS J.-P., FOUREL F., GROSSI V., MARTINEAU F., RICHARDIN P., LECUYER C., **2014**. Diet of ancient Egyptians inferred from stable isotope systematics. *Journal of Archaeological Science* 46, 114-124.

TRĄBSKA J., WESEŁUCHA-BIRCZYŃSKA A., ZIĘBA-PALUS J., RUNGE M.T., **2011**. Black painted pottery, Kildehuse II, Odense County, Denmark. *Spectrochimica Acta Part* A 79, 824-830.

TRENDEL J.M., **1985**. Dégradation de triterpènes dans les sédiments. Aspects photochimiques et microbiologiques. Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur de Strasbourg I, France.

TRENDEL J.M., LOHMANN F., KINTZINGER J.P., ALBRECHT P., **1989**. Identification of *des*-A-triterpenoid hydrocarbons occurring in surface sediments. *Tetrahedron* 45, 4457-4470.

TRENDEL J.M., SCHAEFFER P., ADAM P., ERTLEN D., SCHWARTZ D., **2010**. Molecular charaterisation of soil surface horizons with different vegetation in the Vosges Massif (France). *Organic Geochemistry* 41, 1036-1039.

TULLOCH A.P., HOFFMAN L.L., **1973**. Leaf wax of oats. *Lipids* 8, 617-622.

TULLOCH A.P., **1975**. Chromatographic analysis of natural waxes. *Journal of Chromatographic Science* 13, 403-407.

TULLOCH A.P., **1982**. Epicuticular waxes of *Panicum miliaceum*, *Panicum texanum* and *Setaria italica*. *Phytochemistry* 21, 2251-2255.

TYAGI P., EDWARDS D.R., COYNE M.S., **2008**. Use of sterol and bile acid biomarkers to identify domesticated animal sources of faecal pollution. *Water Air Soil Pollution* 187, 263-274.

ULUBELEN A., SAIKI Y., LOTTER H., CHARI V.M., WAGNER H., **1978**. Chemical components of *Styrax officinalis* L. IV. The structure of a new lignan styraxin. *Planta Medica* 34, 403-407.

UREM-KOTSOU D., STERN B., HERON C., KOTSAKIS K., **2002**. Birch-bark tar at Neolithic Makriyalos, Greece. *Antiquity* 76, 962-967.

VAN BERGEN P.F., BULL I.D., POULTON P.R., EVERSHED R.P., **1997**. Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted classical experiments – I. Total lipid extracts, solvent insoluble residues and humic acids from Broadbalk Wilderness. *Organic Geochemistry* 26, 117-135.

VAN DEN BERG, K.J., BOON J.J., PASTOROVA I., SPETTER L.F.M., **2000**. Mass spectrometric methodology for the analysis of highly oxidized diterpenoid acids in Old Master paintings. *Journal of Mass Spectrometry* 35, 512-533.

VAN DER DOELEN G.A., VAN DEN BERG K.J., BOON J.J., **1998**. Comparative chromatographic and mass-spectrometric studies of triterpenoid varnishes: fresh material and aged samples from paintings. *Studies in Conservation* 43, 249-264.

VAN DER MERWE N.J., VOGEL J.C., **1983**. Recent carbon isotope research and its implications for African archaeology. *African Archaeological Review* 1, 33-56.

VAN DER MERWE N.J., THACKERAY F., LEE-THORP J.A., LUYT, J., **2003**. The carbon isotope ecology and diet of *Australopithecus africanus* at Sterkfontein, South Africa. *Journal of Human Evolution* 44, 581-597.

VANDORPE P., JACOMET S., **2011**. Plant economy and environment. *In*: Plant macro remains from the 1st and 2nd Cent. A.D. in Roman Oedenburg/Biesheim-Kunheim (F). Methodological aspects and insights into local nutrition, agricultural practices, import and the natural environment. Manuscrit d'habilitation, Université de Bâle, Suisse.

VAN GIJN A.L., BOON J.J., **2006**. Birch bark tar. *In* : Louwe Kooijmans L.P., Jongste P.F.B. (Eds.), *Schipluiden. A Neolithic settlement on the Dutch North sea coast c. 3500 cal. BC*, Leiden (Analecta Praehistorica Leidensia, 37/38), p. 261-266.

VARDAR Y., OFLAS S., **1973**. Preliminary studies on the styrax oil. *Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles* 22, 145-148.

VERHOEVEN M., **2002**. Ritual and ideology in the Pre-Pottery Neolithic B of the Levant and Southeast Anatolia. *Cambridge Archaeological Journal* 12, 233-258.

VIETZ F.B., **1804**. *Icones plantarum medico-oeconomico-technologicarum*, vol. 2.

VOGEL J.C., VAN DER MERWE N.J., **1977**. Evidence for early maize cultivation in New York State. *American Antiquity* 42, 238-242.

VOGT E., **1949**. The birch as a source of raw material during the Stone Age. *Proceedings of the Prehistoric Society* 15, 50-51.

WACKER L., NĚMEC M., BOURQUIN J., **2010a**. A revolutionary graphitisation system: fully automated, compact and simple. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 268, 931-934.

WACKER L., BONANI G., FRIEDRICH M., HAJDAS I., NĚMEC M., RUFF M., SUTER M., SYNAL H.-A., VOCKENHUBER C., **2010b**. MICADAS: routine and high-precision radiocarbon dating. *Radiocarbon* 52, 252-262.

WAHLBERG I., ENZELL C.R., **1971**. 3-oxo-6β-hydroxyolean-12-en-28-oic acid, a new triterpenoid from commercial Tolu balsam. *Acta Chemica Scandinavica* 25, 70-76.

WAHLBERG I., HJELTE M.-B., KARLSSON K., ENZELL C.R., **1971**. Constituents of commercial Tolu balsam. *Acta Chemica Scandinavica* 25, 3285-3295.

WAKEHAM S.G., **1989**. Reduction of stenols to stanols in particulate matter at oxic-anoxic boundaries in sea water. *Nature* 342, 787-790.

WALLER S.S., LEWIS J.K., **1979**. Occurrence of C_3 and C_4 photosynthetic pathways in North American grasses. *Journal of Range Management* 32, 12-28.

WANG F., HUA H., PEI Y., CHEN D., JING Y., **2006a**. Triterpenoids from the resin of *Styrax tonkinensis* and their antiproliferative and differenciation effects in human leukemia HL-60 cells. *Journal of Natural Products* 69, 807-810.

WANG F., HUA H., BIAN X., PEI Y., JING Y., **2006b**. Two new aromatic compounds from the resin of *Styrax tonkinensis* (Pier.) Craib. *Journal of Asian Natural Products Research* 8, 137-141.

WANG J., LIU L., BALL T., YU L., LI Y., XING F., **2016**. Revealing a 5,000-y-old beer recipe in China. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 113, 6444-6448.

WIETHOLD J., **2000**. Macro-restes végétaux et carbonisés du premier âge du Fer provenant de fouille sauvetage de chantier 'les résidences du vignoble' à Hattstatt-'Ziegelscheuer' (Haut-Rhin). Rapport d'étude. *In* : Dumont A., Treffort J.-M. (Eds.), Hattstatt « Ziegelsheuer » « Les résidences du vignoble », 68 – Haut-Rhin, Puits à eau protohistoriques (Bronze Ancien et Hattstatt C), Afan Grand-Est, Strasbourg, SRA Alsace.

WIETHOLD J., **2009**. Restes végétaux gorgés d'eau provenant d'un niveau organique de l'état 2. *In* : Barral, P., Richard, H. (Eds.), Fouilles de la fontaine Saint-Pierre au Mont Beuvray (1988-1992, 1996). Aménagements d'une source sur l'oppidum de Bibracte. Glux-en-Glenne: Centre archéologique européen du Mont Beuvray. *Collection Bibracte* 17, 135-149.

WILSON M.D., RUDEL L.L., **1994**. Review of cholesterol absorption with emphasis on dietary and biliary cholesterol. *Journal of Lipid Research* 35, 943-955.

WINATA A., LORENZ K., **1997**. Effects of fermentation and baking of whole wheat and whole rye sourdough breads on cereal alkylresorcinols. *Cereal Chemistry* 74, 284-287.

WYRZYKIEWICZ E., WRZECIONO U., ZAPRUTKO L., **1989**. Triterpenoids. Part IV. Mass spectrometry of pentacyclic triterpenoids: 18β- and 18α-11-oxooleanolic acid derivatives. *Organic Mass Spectrometry* 24, 105-108.

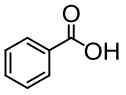
YAYLA Y., ALANKUŞ-ÇALIŞKAN Ö., ANIL H., BATES R.B., STESSMAN C.C., KANE V.V., **2002**. Saponins from *Styrax officinalis*. *Fitoterapia* 73, 320-326.

ZHOU Z.-K., CREPET W.L., NIXON K.C., **2001**. The earliest fossil evidence of the *Hamamelidaceae*: Late Cretaceous (Turonian) inflorescences and fruits of *Altingioodeae*. *American Journal of Botany* 88, 753-766.

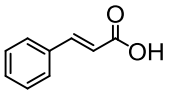
Annexe 1

Structures moléculaires

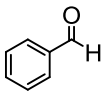
DERIVES DE PHENOLS ET PHENYLPROPANOÏDES



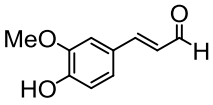
P1



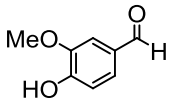
P2



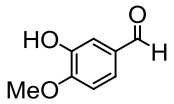
P3



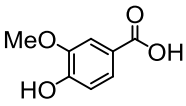
P4



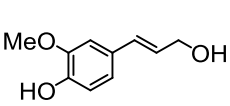
P5



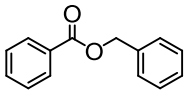
P6



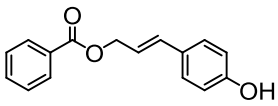
P7



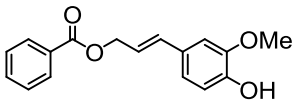
P8



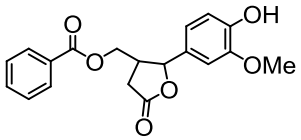
P9



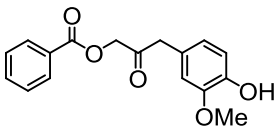
P10



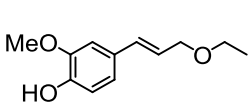
P11



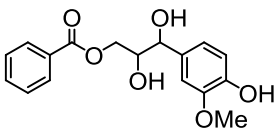
P12



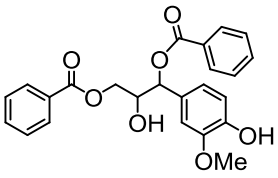
P13



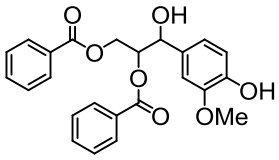
P14



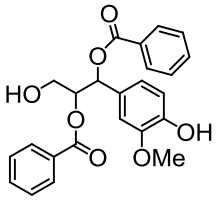
P15



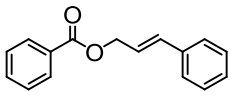
P16



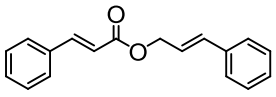
P17



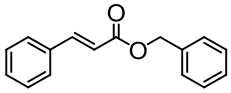
P18



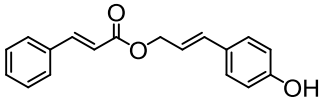
P19



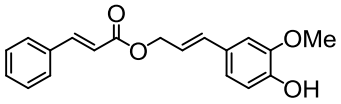
P20



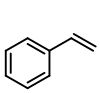
P21



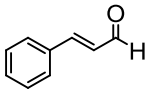
P22



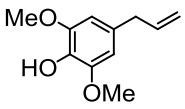
P23



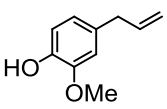
P24



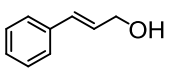
P25



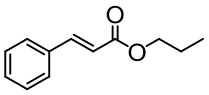
P26



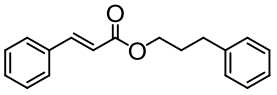
P27



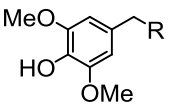
P28



P29

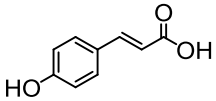


P30

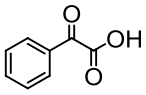


?

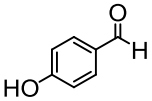
P31



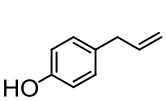
P32



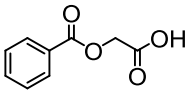
P33



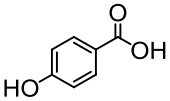
P34



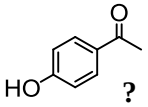
P35



P36

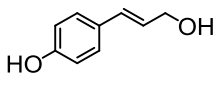


P37

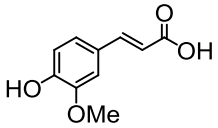


?

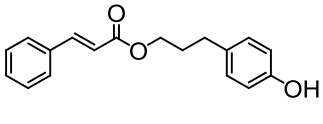
P38



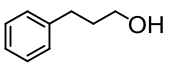
P39



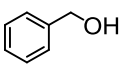
P40



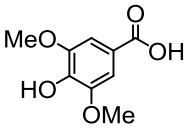
P41



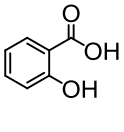
P42



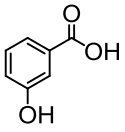
P43



P44

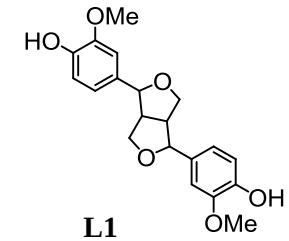


P45

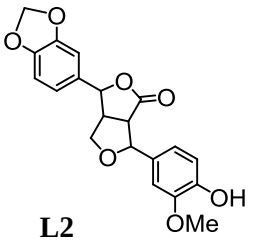


P46

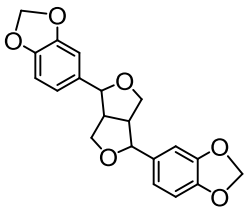
LIGNANES, NEOLIGNANES (BENZOFURANES) ET FLAVONOÏDES



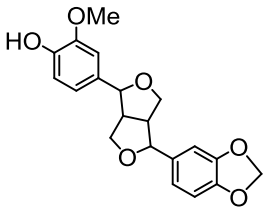
L1



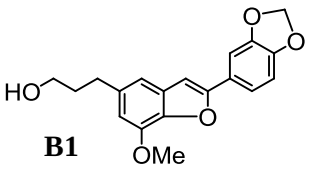
L2



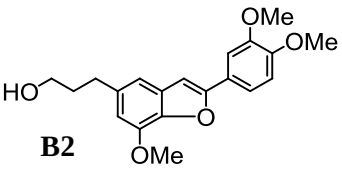
L3



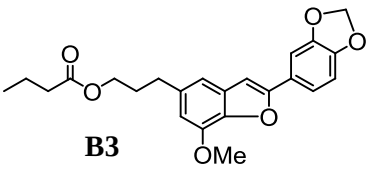
L4



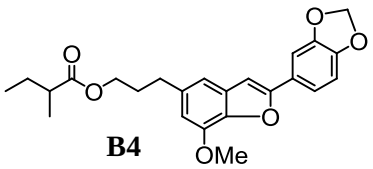
B1



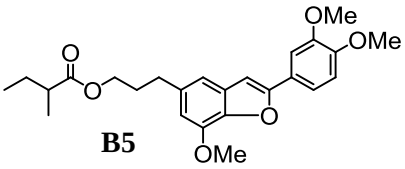
B2



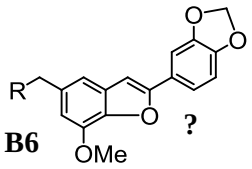
B3



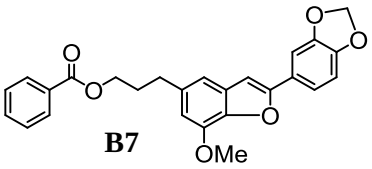
B4



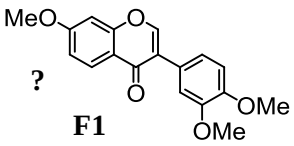
B5



B6 **?**

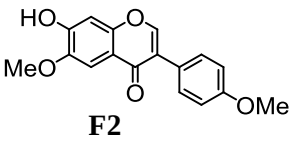


B7

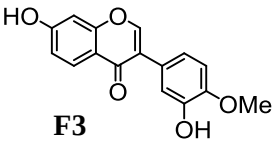


?

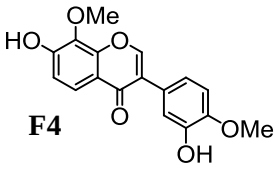
F1



F2

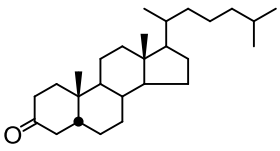


F3

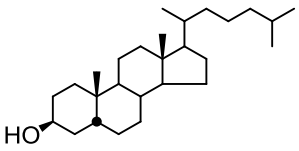


F4

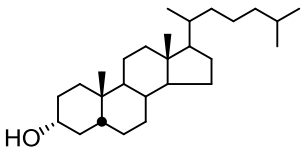
STEROLS



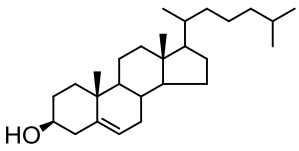
S1



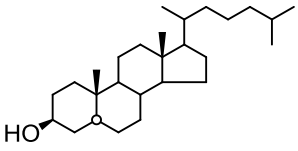
S2



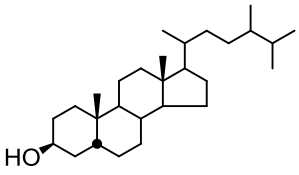
S3



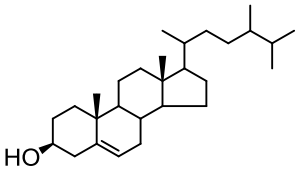
S4



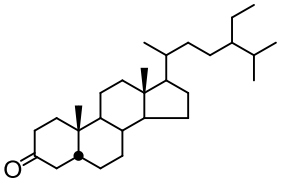
S5



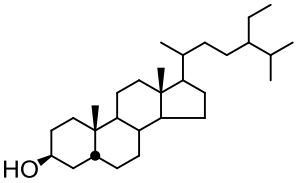
S6



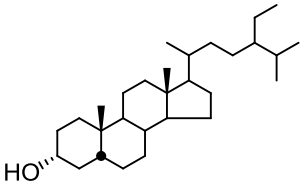
S7



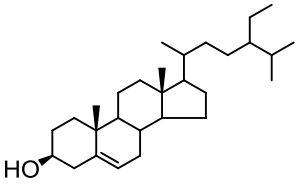
S8



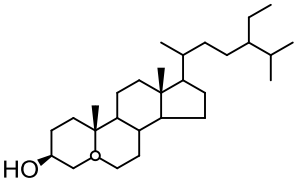
S9



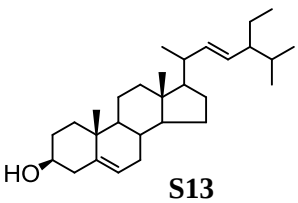
S10



S11

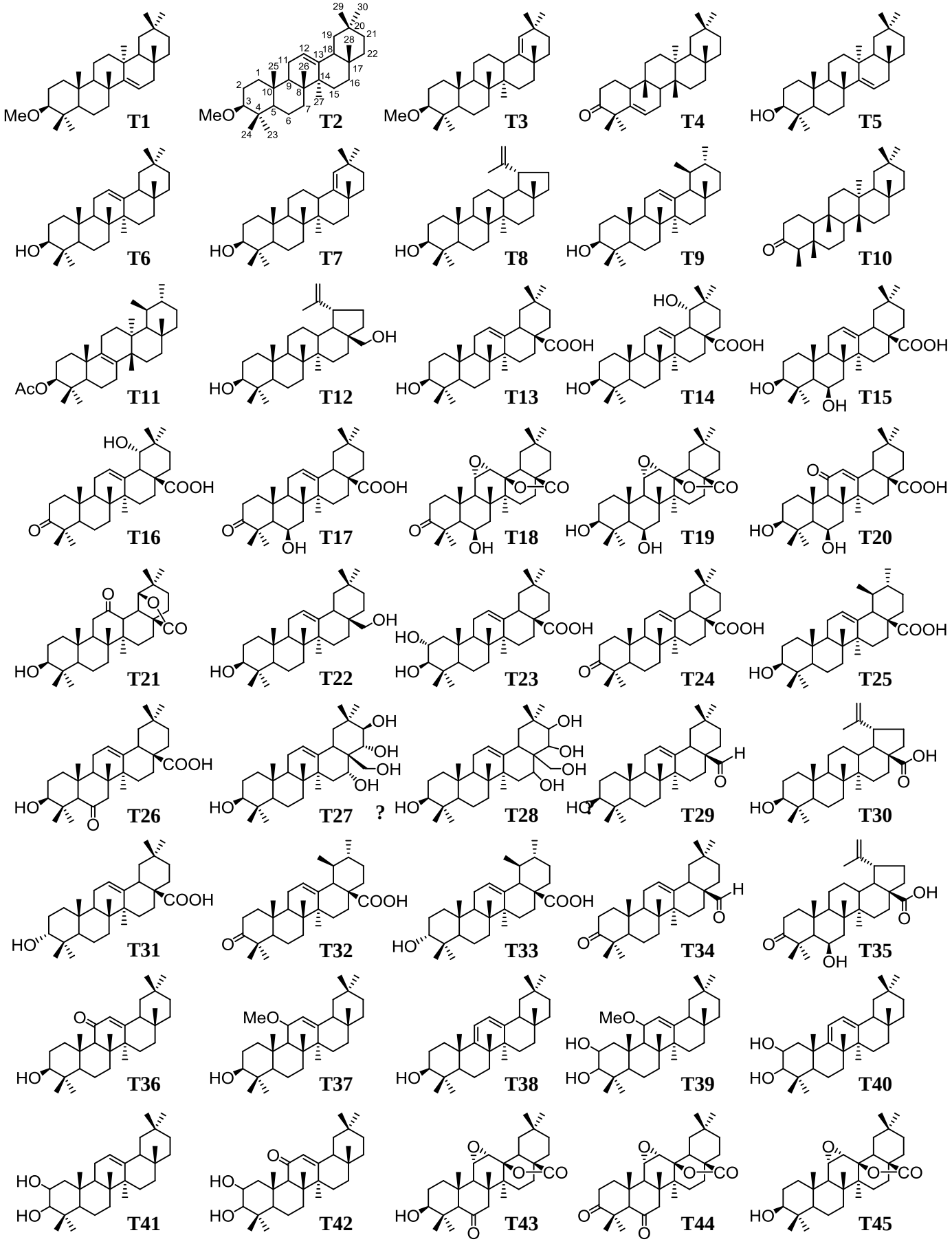


S12

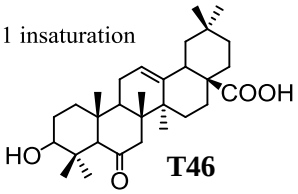


S13

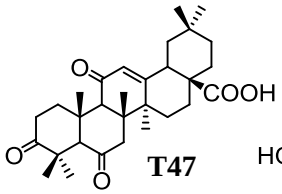
TRITERPENES



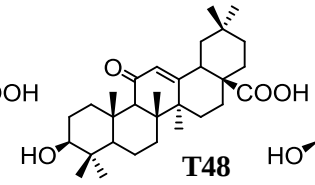
+ 1 insaturation



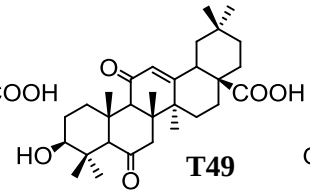
T46



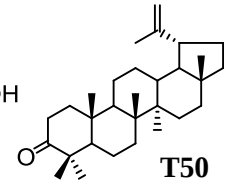
T47



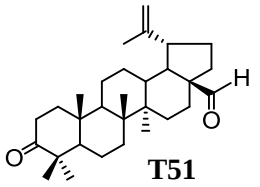
T48



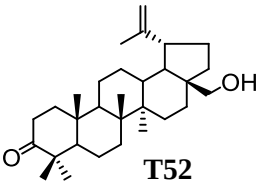
T49



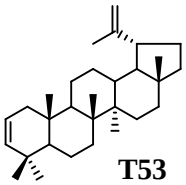
T50



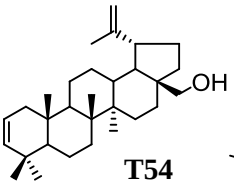
T51



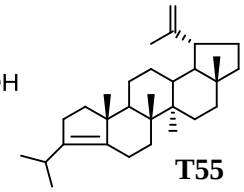
T52



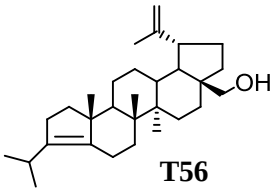
T53



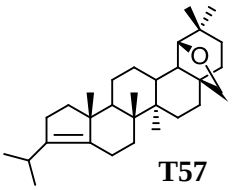
T54



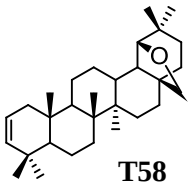
T55



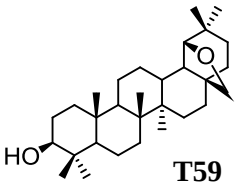
T56



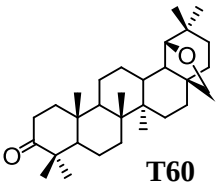
T57



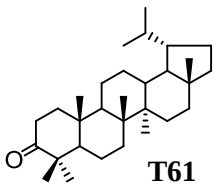
T58



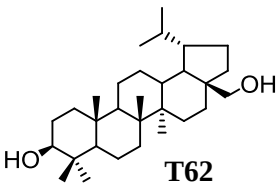
T59



T60

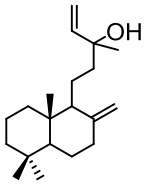


T61

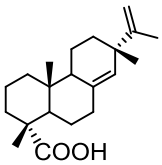


T62

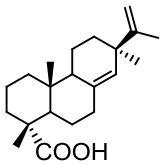
DITERPENES



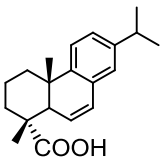
D1



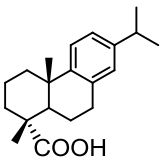
D2



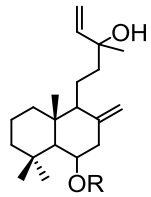
D3



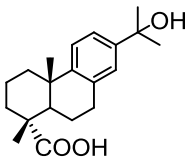
D4



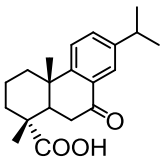
D5



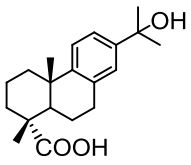
D6 (R=$COCH_3$)
D6' (R=H)



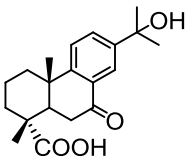
D7



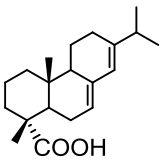
D8



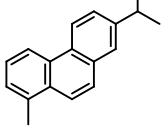
D9



D10

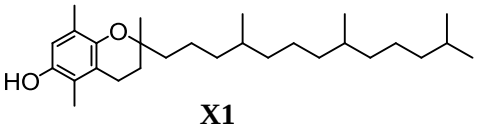


D11

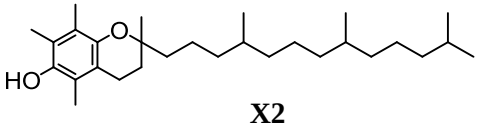


D12

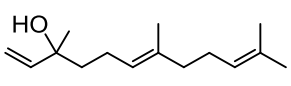
AUTRES



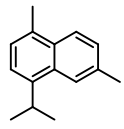
X1



X2



X3



X4

Blandine COUREL

Caractérisation de substances naturelles en contexte archéologique : apport des études moléculaires, isotopiques et de la datation au ^{14}C

Ces travaux d'archéométrie concernent l'étude moléculaire par GC-MS de marqueurs lipidiques (biomarqueurs) préservés au sein de sols archéologiques et de substances végétales impliquées en tant qu'ingrédients dans la confection d'artefacts. Des analyses complémentaires en isotopie du carbone de composés individuels et des mesures de datation au ^{14}C (AMS MICADAS) de la matière organique totale des sols, d'extraits lipidiques et d'un composé individuel (miliacine) ont également été effectuées. Cette approche a permis:

- de montrer l'existence de la culture de millet dès l'âge du Bronze en Alsace, les sols associés à cette culture et leur contenu organique ayant été piégés et préservés dans des silos à grains enterrés datés de l'âge du Fer.
- d'identifier la nature de structures archéologiques comme étant d'anciennes latrines et une aire de stabulation de bétail *via* l'identification de stéroïdes fécaux.
- d'établir des critères chimiotaxonomiques fiables basés sur l'analyse des lipides pour l'authentification de résines de styrax et de liquidambars.
- d'identifier la nature d'une résine issue de *Styrax officinalis* ayant été incorporée dans l'enduit organique ornant un crâne décoré (IX^{ème} millénaire av. J.-C., site de Nahal Hemar, Israël).
- de mettre en évidence l'emploi de brai de bouleau comme agent collant lors de la confection d'un bijou daté du Premier âge du Fer.

Mots clés : archéométrie, biomarqueurs lipidiques, GC-MS, datation au ^{14}C, triterpènes, millet, résines végétales, styrax, liquidambars.

In this archaeometric study, lipid biomarkers from archaeological soils and organic substances originating from plants found on artefacts were investigated by GC-MS. In addition, the stable carbon isotopic composition of individual lipids and the ^{14}C age (AMS MICADAS) of soil organic matter, lipid extracts and one isolated compound (miliacin) were determined. Such an archaeometric approach allowed:

- the existence of a millet cultivation during the Bronze Age in Alsace to be unveiled for the first time based on preserved molecular remains of this cereal in agricultural soils trapped within grain silos dated from the Iron Age.
- the function of uncharacterized archaeological structures to be identified as ancient latrines and a stall area based on the identification of faecal steroidal markers.
- reliable chemotaxonomic criteria for the authentication of styrax resins and liquidambar gums to be established using specific organic markers (triterpenoids, notably).
- the vegetal component of an organic coating decorating a skull from the 9th millennium BC (Nahal Hemar site, Israel) to be identified as a resin from *Styrax officinalis.*
- the use of birch bark tar as adhesive for the making of a jewellery dated from the Iron Age to be discovered.

Key words: archaeometry, lipid biomarkers, GC-MS, ^{14}C dating, triterpenoids, millet, plant resins, styrax, liquidambars.