

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG



ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Institut de Chimie – UMR 7177

THÈSE présentée par

Alice FRADET

soutenue le :

19 mars 2025

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline (Spécialité) : Chimie analytique

Caractérisation moléculaire d'ambres géologiques et archéologiques : origines botaniques et géographiques

THÈSE dirigée par : Dr. ADAM Pierre Dr. SCHAEFFER Philippe	Directeur de recherche CNRS, Université de Strasbourg Directeur de recherche CNRS, Université de Strasbourg
RAPPORTEURS : Dr. GROSSI Vincent Dr. NGUYEN TU Thanh Thuy	Directeur de recherche CNRS, Institut Méditerranéen d'Océanologie Maîtresse de conférences, Sorbonne Université
AUTRES MEMBRES DU JURY : Dr. GOMEZ Bernard	Maître de conférences, Université Claude Bernard Lyon 1

Avertissement au lecteur / Warning to the reader

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition des membres de la communauté universitaire. Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Cela implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document. D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction ou représentation illicite encourt une poursuite pénale.

This document is the result of a long process approved by the jury and made available to members of the university community. It is subject to the intellectual property rights of its author. This implies an obligation to quote and reference when using this document. Furthermore, any infringement, plagiarism, unlawful reproduction or representation will be prosecuted.

Code de la Propriété Intellectuelle

Article L122-4 :

Toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause est illicite. Il en est de même pour la traduction, l'adaptation ou la transformation, l'arrangement ou la reproduction par un art ou un procédé quelconque.

Any representation or reproduction in whole or in part without the consent of the author or his successors in title or assigns is unlawful. The same applies to translation, adaptation or transformation, arrangement or reproduction by any art or process whatsoever.

Articles L335-1 à L335-9. : Dispositions pénales / Penal provisions.

Licence attribuée par l'auteur



Remerciements

Ces travaux de thèse n'auraient pas pu être menés à bien sans tout d'abord la bourse octroyée par l'Ecole Normale Supérieure de Lyon et sans l'accueil bienveillant d'un grand nombre de personnes que je remercie infiniment avec ces quelques mots.

Mes sincères remerciements vont tout d'abord à mes deux encadrants de thèse, le Dr Pierre Adam et le Dr Philippe Schaeffer, de l'équipe de Biogéochimie Moléculaire, où j'ai passé trois années en thèse. Je leur suis profondément reconnaissante pour leur bienveillance, leur écoute et leur grande disponibilité. Ils m'ont énormément soutenue tout au long de ces travaux. Merci de m'avoir initiée à la recherche et de m'avoir si bien guidée malgré les défis rencontrés. Un grand merci aussi au Dr Vincent Grossi et au Dr Thanh Thuy Nguyen Tu, les rapporteurs de ces travaux, ainsi qu'au Dr Bernard Gomez, examinateur, qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ces travaux.

Je tiens également à exprimer ma gratitude envers Mme Estelle Motsch, ingénieur de recherches au sein de l'équipe de Biogéochimie Moléculaire, pour sa bonne humeur et ses nombreux conseils (et pour m'avoir pardonnée pour toutes les aiguilles de seringues que j'ai cassées).

Je souhaite également remercier toutes les personnes qui m'ont témoigné leur confiance en me confiant les précieux échantillons que j'ai eu l'opportunité d'étudier lors de ces travaux. :

les archéologues de l'INRAP de Strasbourg, dont tout particulièrement le Dr Matthieu Michler et le Dr Eric Boës, sans qui l'aspect « archéologie » de cette thèse n'aurait pas pu voir le jour.
le Musée Historique de Haguenau, et plus particulièrement le Dr Dimitri Mathiot, Mme Emilie Demongin et Mme Elisabeth Mignon pour nous avoir ouvert les coulisses de ce musée exceptionnel et de nous avoir permis de réaliser des échantillonnages sur leurs précieuses collections.

le musée Unterlinden de Colmar, dont les responsables des collections Mmes Chloé
 Héninger et Aline Specklin qui nous ont accueillis avec beaucoup de bienveillance.

 le Dr Romain Garouste et le Dr André Nél du Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN)
 de Paris pour leur disponibilité et l'ensemble des échantillons d'ambre et de résines qu'ils nous ont confié.

- Le Dr Colette Du Gardin pour l'envoi d'échantillons d'ambres géologiques et archéologiques provenant de sa collection personnelle.

- Jean-Marc Pouillon, qui m'a fait l'honneur de partager une petite partie de son immense collection d'ambre.

- Le Dr Bernard Gomez (Université de Lyon) qui nous a confié une partie de ses collectes d'ambre et de cuticules fossiles de Piolenc, d'Espagne et de Charente-Maritime.

- Jan Pànczak, doctorant, sous la supervision du Prof Pawel Kosakowski et du Dr Pzemyslaw Drzewicz, qui a passé deux semaines dans le laboratoire de Strasbourg, et qui m'a fait l'honneur de me confier une partie de ses échantillons d'ambres géologiques de l'Est de l'Europe.

- le Dr Dany Azar (Université du Liban) qui nous a permis d'étudier une partie des ambres du Liban et de Syrie.

- Mme Barbara Gollain, responsable des collections du musée de Minéralogie de Strasbourg, qui nous a permis d'accéder à l'ensemble des collections d'ambre du musée.

- Les Dr. Christian Neumann et Ludwig Luthardt (Muséum d'Histoire Naturelle de Berlin) qui nous ont envoyé des échantillons provenant directement de la région de Bitterfeld.

- M. Frédéric Tournay (Jardin Botanique de Strasbourg) pour sa disponibilité, pour m'avoir fait découvrir les coulisses du Jardin Botanique et pour m'avoir permis de prélever tout au long de ces trois ans de thèse des résines provenant d'un grand nombre d'espèces.

- M. François Loiret, qui m'a permis d'accéder aux échantillons archéologiques très précieux du Mas d'Azil et de la grotte d'Enlène, avec l'accord de l'association Robert Begouën.

- Mme Violaine Faivre, d'avoir collecté in situ des résines d'Araucariacées provenant de Nouvelle-Calédonie et nous les avoir gentiment transmis jusqu'en Métropole.

- Mme Aude Tsuvaltsidis, doctorante, pour ses conseils et son aide sur l'aspect archéologique de ces travaux.

- Le Dr Didier Néraudeau (Université de Rennes) pour ses conseils et pour nous avoir offert une sélection de nombreux échantillons de Charente-Maritime.

Un immense merci à l'équipe de Biogéochimie Moléculaire, car sans vous, ces travaux n'auraient pas vu le jour et ces années n'auraient certainement pas été aussi enrichissantes ! Merci aux anciens doctorants, en particulier à Mme Kiw Yu Min pour ses précieux conseils. Merci à mes amis de Strasbourg et aux autres doctorants du laboratoire pour vos conseils et nos sorties du vendredi. Merci à mes formidables amies Lisa et Juliette pour leurs recommandations et les belles sorties que nous avons partagées. Merci, mes amis de Lyon, pour vos rires, même à distance. Merci à l'équipe d'asobi de me permettre de décompresser de temps en temps. Et enfin, un grand merci à Bastien pour son soutien inébranlable durant ces trois années, malgré la distance.

Liste des figures, tableaux et abréviations	13
Liste des figures	15
Liste des tableaux	29
Liste des abréviations	31
Conventions	32
Introduction générale	35
Chapitre I - Généralités sur l'ambre et analyse de résines contemporaines	41
I.1. Introduction	43
I.2. Les résines, un exsudat spécifique des plantes supérieures	44
I.2.1. Définition des résines et compositions	44
I.2.2. Production des résines terpéniques	46
I.2.2.1. Classification des terpénoïdes et biosynthèse	46
I.2.2.2. Caractéristiques chimiques des résines	52
I.2.2.3. Exsudation de la résine	52
I.2.2.4. Rôles des résines	53
I.2.3. Familles botaniques actuelles productrices de résines	54
I.2.3.1. Les conifères	54
I.2.3.1.1. Les résines de Pinacées	56
I.2.3.1.2. Les résines de Cupressacées	64
I.2.3.1.3. Les résines de Sciadopityacées	74
I.2.3.1.4. Les résines de Podocarpacées	76
I.2.3.1.5. Les résines d'Araucariacées	76
I.2.3.2. Les Angiospermes	85
I.2.3.2.1. Les résines de Fabacées	86
I.2.3.2.2. Les résines de Burséracées	90
I.2.3.2.3. Les résines d'Anacardiacées	93
I.2.3.2.4. Les résines de Diptérocarpacées	94
I.2.3.2.5. Synthèse sur la chimie des résines d'Angiospermes	97
I.3. L'ambre : définitions et classifications	97
I.3.1. Définition et origines de l'ambre	97
I.3.2. Les gisements d'ambre et de copal dans le monde	100

I.3.3. Principales méthodes utilisées pour l'étude de l'ambre et des résines végétales	102
I.3.3.1. Propriétés physiques de l'ambre et analyse des inclusions	102
I.3.3.1.1. Propriétés physiques et composition élémentaire	102
I.3.3.1.2. Etude des inclusions	103
I.3.3.2. Premières analyses chimiques	104
I.3.3.3. Les analyses par spectroscopie infrarouge	104
I.3.3.4. Les analyses par résonance magnétique nucléaire	105
I.3.3.5. Les analyses par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	107
I.3.3.6. Conclusions sur les méthodes d'analyse des ambres	108
I.3.4. Synthèse sur la chimie des ambres et classification des ambres	108
I.3.5. La formation de l'ambre	109
I.4. La production d'ambre au cours des temps géologiques et les espèces végétales	
	111
I.5. L'ambre et l'Homme : exploitation et utilisations	115
I.6. Conclusion	117
I.7. Molécules citées dans le chapitre	118

Chapitre II - Identification de composés organo-soufrés dans les ambres : mise en évidence d'un processus de diagenèse précoce et implications paléoenvironnementales

II.1. Introduction	127
II.2. Mise en évidence de nouvelles séries de diterpènes soufrés dans les ambres	128
II.2.1. Présentation et description de la série	128
II.2.2. Isolement et caractérisation des composés (9b), (10b) et (11b)	131
II.3. Origine des composés soufrés dans les ambres : signification géochimique et paléoenvironnementale	133
II.3.1. Mode de formation des composés soufrés dans les ambres de Piolenc	133
II.3.2. Origine des autres composés soufrés détectés dans les ambres de Piolenc	139
II.3.3. Etude expérimentale de la formation des composés soufrés dans les ambres	141
II.3.3.1. Sulfuration de la résine de Cedrus atlantica en présence de polysulfures	142
II.3.3.2. Sulfuration de l'acide abiétique en présence de polysulfures	145
II.3.3.3. Sulfuration d'une fraction de résine d'Araucaria columnaris	146
II.3.4. Diterpénoïdes soufrés dans les ambres : Signification géochimique et utilisation comme marqueurs paléoenvironnementaux	150

125

II.4. Distribution des composés organiques soufrés dans les ambres : diversité des	
structures	151
II.4.1. Répartition des composés organo-soufrés dans les ambres	153
II.4.2. Exemples de distributions de composés organo-soufrés dans les ambres : variabilité des teneurs et des structures	154
II.4.2.1. Ambre de la Garnache (Crétacé, Vendée, France)	154
II.4.2.2. Ambre de Bitterfeld (Eocène, Allemagne)	159
II.4.2.3. Ambre de La Buzinie (Crétacé ; Charente-Maritime, France)	160
II.4.2.4. Voies diagénétiques de sulfuration de l'acide agathique	166
II.4.2.5. Ambres de Le Quesnoy (Eocène ; Oise, France)	168
II.5. Conclusion	170
II.6. Molécules citées dans le chapitre	172

Chapitre III – Analyse d'ambres géologiques européens du Crétacé : identification des principales familles botaniques productrices d'ambre	175
III.1. Introduction	177
III.2. Les sites à ambre du Crétacé d'Europe de l'Ouest (France et Espagne)	179
III.2.1. La côte atlantique française, une zone riche en sites contenant de l'ambre d'origines botaniques diverses (ambres de Charente-Maritime et apparentés)	181
III.2.1.1. Les ambres charentais : une complexité moléculaire sous-estimée	181
III.2.1.1.1. Contexte de l'étude	181
III.2.1.1.2. Résultats et Discussion.	191
III.2.1.1.3. Conclusion	206
III.2.1.2. Les ambres du département de la Vienne (Scorbé-Clairvaux) : des ambres de Cheirolepidiacées	209
III.2.1.2.1. Contexte de l'étude	209
III.2.1.2.2. Résultats et Discussion	211
III.2.1.2.3. Conclusion	215
III.2.1.3. Les ambres vendéens (La Garnache) : des ambres associés à un contexte de fossilisation particulier	215
III.2.1.3.1. Contexte de l'étude	215
III.2.1.3.2. Résultats et Discussion	218
III.2.1.3.3. Conclusion	220
III.2.1.4. Les ambres de la Sarthe/Anjou (Le Brouillard)	221
III.2.1.4.1. Contexte de l'étude	221

III.6. Molécules citées dans le chapitre	282
forêts de l'actuelle Europe	278
III.5. Synthèse et perspectives : les grands producteurs d'ambre au Crétacé dans les	
III.4.3. Conclusion	277
III.4.2. Résultats et discussion	276
III.4.1. Contexte de l'étude	275
III. 4. La valchovite, un type d'ambre crétacé d'Europe de l'Est	275
III.3.3. Conclusion et perspectives	274
III.3.2 Résultats et Discussion	269
III.3.1. Contexte de l'étude	266
III.3. Les ambres du Liban	266
	265
III.2.3.2. Resultats et Discussion	259
	250
III.2.3. Les ambres crétacés espagnols : une similarité avec les ambres français	250
	243
III.2.2.4.2. Resultats et discussion	248 249
III.2.2.4.1. Contexte de l'étude	246 249
III.2.2.4. Les ambres du Mont Bugarach (Fourtou et Sougraine, Aude)	246
	245
III.2.2.3.2. Resultats et discussion.	238
III.2.2.3.1. Contexte de l'étude	234
III.2.2.3. Les ambres provençaux (Salignac, La Bouilladisse et Piolenc)	234
III.2.2.2.3. Conclusion	233
III.2.2.2.2. Résultats et Discussion	229
III.2.2.2.1. Contexte de l'étude	228
III.2.2.2. Les ambres d'Ariège (Mas d'Azil, Sainte-Croix et Montbrun)	228
III.2.2.1.3. Conclusion	227
III.2.2.1.2. Résultats et Discussion	226
III.2.2.1.1. Contexte de l'étude	224
III.2.2.1. Les ambres des Landes (Saint-Lon-Les-Mines)	224
III.2.2. Les ambres pyrénéo-provençaux français	224
III.2.1.4.3. Conclusion	224
III.2.1.4.2. Résultats et Discussion	222

Cha iden	pitre IV - Analyse d'ambres géologiques européens du Cénozoïque : tification de différentes sources botaniques	285
IV.1.	Introduction	287
IV.2.	L'ambre baltique ou succinite, la source d'ambre la plus importante en	280
n.	21 Centexte de l'étude	209
IV		209
	IV.2.1.1. Aspect de l'ambre balte et présentation des échantillons	289
	IV. 2.1.2. Age et description des dépôts sédimentaires associés à l'ambre baltique	290
	IV.2.1.3. Origines possibles de l'ambre baltique	293
١V	2.2.2. Résultats et discussion	298
	IV.2.2.1. Caractéristiques moléculaires des échantillons	298
	IV.2.2.2. Variabilité moléculaire et effet de l'altération	303
	IV.2.2.3. Origine botanique de l'ambre baltique	308
	IV.2.2.4. Apports de l'étude de sites géologiques contemporains à ceux de l'ambre baltique	311
١v	2.2.3. Conclusion	316
IV.3	Les ambres saxons (Allemagne), des ambres "frères" de l'ambre baltique	318
IV	.3.1. Les ambres de Bitterfeld, des ambres contemporains à ceux de la Baltique ?	319
	IV.3.1.1. Contexte géologique : sédiments, paléoenvironnement et âge des ambres de Bitterfeld et alentours	319
	IV.3.1.2. Etudes antérieures et origines proposées des ambres de Bitterfeld	320
	IV.3.1.2.1. Variabilité au sein des ambres de Bitterfeld	320
	V.3.1.2.2. La succinite de Bitterfeld	322
	IV.3.1.2.3. La goitschite et la beckerite	324
	IV.3.1.2.4. La stantiénite	324
	IV.3.1.2.5. La glessite	325
	IV.3.1.2.6. La siegburgite	326
	IV.3.1.2.7. La gédanite	327
	IV. 3.1.2.8. La krantzite	327
IV	3.2. Caractérisation moléculaire et origine botanique des ambres de Bitterfeld	327
	IV.3.2.1. Analyse moléculaire de la succinite de Bitterfeld	327
	IV.3.2.2. Analyse moléculaire de la gédanite	329
	IV.3.2.3. Caractérisation moléculaire de la glessite de Bitterfeld	331

IV.3.2.4. Caractérisation moléculaire de la stantiénite de Bitterfeld	335
IV.3.2.5. Caractérisation moléculaire de la kranzite	338
IV.3.3. Conclusion	339
IV.4. La duxite, un ambre appartenant à une catégorie à part	341
IV.4.1. Contexte de l'étude	341
IV.4.1.1. Contexte géologique	341
IV.4.1.2. Études précédentes et origines supposées	342
IV.4.2. Résultats et discussion	344
IV.4.3. Conclusion et perspectives	347
IV.5. L'ambre de l'Oise (France), un ambre d'Angiospermes dépourvu de triterpènes	347
IV.5.1. Contexte de l'étude	348
IV.5.1.1. Contexte géologique	348
IV.5.1.2. Etudes précédentes de l'ambre de l'Oise. Origines botaniques proposées	349
IV.5.2. Résultats et discussion	351
IV.5.3. Conclusion	358
IV.6. Des sources plus localisées : l'ambre des Allinges	359
IV.6.1. Contexte de l'étude	360
IV.6.2. Résultats et discussion	360
IV. 7. Conclusion	362
IV. 8. Molécules citées dans le chapitre	362

Chapitre V - Caractérisation moléculaire d'ambres archéologiques : Détermination de leur origine géographique et mise en évidence de travaux de	
restauration	367
V.1. Introduction	369
V.2. Développement d'une méthode de prélèvement peu invasive d'échantillons archéologiques	373
V.3. Analyses moléculaires d'ambres archéologiques : détermination de leurs origines géographiques et mise en évidence de procédures de restauration	374
V.3.1. Mise en évidence d'ambres baltiques archéologiques	374
V.3.1.1. Echantillons d'ambre du Musée Historique de Haguenau	374
V.3.1.1.1. La forêt de Haguenau durant l'Age du Bronze et l'Age du Fer	374
V.3.1.1.2. Présentation des échantillons archéologiques étudiés	376
V.3.1.1.3. Caractérisation moléculaire des ambres du Musée Historique de Haguenau	377

V.3.1.1.4. Conclusion	384
V.3.1.2. La grotte d'Enlène : un lieu de vie au Magdalénien	384
V.3.1.2.1. Présentation des échantillons étudiés	386
V.3.1.2.2. Caractérisation moléculaire des échantillons de la grotte d'Enlène	386
V.3.1.1.3. Conclusion	388
V.4. Synthèse des résultats obtenus pour les autres échantillons archéologiques	
analysés	389
V.5. Conclusion et perspectives	389
V.6. Molécules citées dans le chapitre	391

Conclusion générale	
Chapitre VI - Partie expérimentale	403
VI.1. Analyses chromatographiques et méthodes spectrométriques	405
VI.1.1. Chromatographie en phase gazeuse équipée d'un détecteur à ionisation de flamme	405
VI.1.2. Chromatographie gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse	405
VI.1.3. Spectrométrie de masse de haute résolution	405
VI.2. Analyses géochimiques des ambres géologiques, des résines et des ambres archéologiques	406
VI.2.1. Précautions particulières	406
VI.2.2. Extraction et préparation des échantillons géologiques et des résines	406
VI.2.3. Extraction et préparation à l'analyse par GC-MS des échantillons archéologiques	407
VI.2.4. Dérivation des échantillons	408
VI.2.4.1. Acétylation des fonctions alcools	408
VI.2.4.2. Méthylation des acides par la N,N-diméthylformamide dimétyle acétal (DMA/DMF)	408
VI.2.5. Fractionnement chromatographique sur colonne de silice	409
VI.2.6. Dégradations chimiques : butanolyse et saponification	410
VI.3. Isolement et identification des composés organiques soufrés (COS) à partir	
d'ambre	410
VI.3.1. Préparation de l'échantillon	410
VI.3.2. Purification de l'extrait méthylé par chromatographie liquide sur colonne de silice	411
VI.3.3. Purification par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) des fractions F15-F18	411
VI.3.4. Résonance magnétique nucléaire (RMN)	411
VI.4. Sulfuration de composés issus de résines actuelles	412
VI.4.1. Préparation des échantillons	412

VI.4.2. Réaction de sulfuration	412
VI.5. Isolement de l'ester méthylique du wollémolide (5b) à partir de la résine de <i>Wollemia nobilis</i>	413
VI.5.1. Extraction et purification chromatographique de la résine	413
VI.5.2. Isolement de l'ester méthylique du wollémolide (5b) à partir de la résine de <i>Wollemia nobilis</i> par chromatographie en couche mince	413
Références bibliographiques	415
Annexes	455

LISTE DES FIGURES, TABLEAUX ET ABRÉVIATIONS



Chapitre 1

Figure I.1. Unités de base des terpénoïdes et des phénols.

Figure I.2. Quelques catégories de terpénoïdes et exemples de structures associées.

Figure I.3. Principales voies de formation des terpénoïdes dans les cellules de plantes et compartiments associés aux différentes transformations (Bohlmann et al., 1998; Dubey et al., 2003; Langenheim, 2003; Rohdich et al., 2001). DMAPP : dimétylalyl-pyrophosphate ; MEP : méthylérythriol-phosphate, MVA : mévalonate, IPP : isopentényl-pyrophosphate, GPP : géranyl-pyrophosphate, GGPP : géranylgéranyl-pyrophosphate, FPP : Farnésyl-pyrophosphate. Figure réalisée sur biorender.com.

Figure I.4. Voie du mévalonate (MVA) à l'origine des sesquiterpènes et des triterpènes chez les plantes (Langenheim, 2003 ; Rohmer, 1999).

Figure I.5. Voie de biosynthèse du méthylérythritol phosphate (MEP ou voie non-mévalonique) conduisant à la formation de mono- et diterpènes (Eisenreich et al., 2004 ; Langenheim, 2003 ; Rohdich et al., 2001 ; Rohmer, 1999)

Figure I.6. Arbre phylogénétique des conifères. Le nombre de genres et d'espèces actuelles associés à ces familles est également indiqué.

Figure I.7. Squelettes hydrocarbonés des principales familles de diterpènes présentes dans les résines de conifères.

Figure I.8. Arbre phylogénétique des Pinacées (d'après Gernandt et al., 2020 et Lin et al., 2010). *Genres dont sont issues les résines de Pinacées étudiées lors de cette thèse.

Figure I.9. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) des fractions apolaires isolées à partir des extraits organiques acétylés et méthylés de résines fraîches de Pinus sylvestris (A), Pinus cembra (B) et Larix decidua (C). En vert sont représentés les diterpènes de la série de l'abiétane, en bleu de la série dérivant de l'(iso)pimarane et en violet les labdanoïdes. Les fractions ont été acétylées et méthylées avant l'analyse.

Figure I.10. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) des fractions apolaires isolées à partir des extraits organiques acétylés et méthylés de résines fraîches de Abies alba (A), Abies cephalonica (B) et Abies concolor (C). En vert sont représentés les diterpènes de la série de l'abiétane, en bleu de la série de l'(iso)pimarane et en violet les labdanoïdes. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques et les fonction alcool ont été acétylés

Figure I.11. Structure de l'isocembrol (22) et du cembrène (23).

Figure I.12. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) des fractions apolaires isolées à partir des extraits organiques acétylés et méthylés de résines fraîches de Cedrus atlantica (A) et de Cedrus brevifolia (B). En vert sont représentés les diterpènes de la série de l'abiétane, en bleu de la série de l'(iso)pimarane et en violet les labdanoïdes. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure I.13. Arbre phylogénétique simplifié des Cupressacées s.I. établi d'après Yang et al. (2012) avec les sousfamilles associées. *Genres auxquels appartiennent les échantillons étudiés au cours de cette thèse.

Figure I.14. Squelettes des sesquiterpènes associés aux Cupressacées

Figure I.15. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) des fractions apolaires isolées à partir des extraits organiques acétylés et méthylés de résines fraîches de Cupressus arizonica (A) et de Cupressus sempervirens (B). En bleu sont représentés les diterpènes de la série de l'(iso)pimarane, en violet les labdanoïdes et en orange les diterpénoïdes phénoliques. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques et les alcools sous forme d'acétates.

Figure I.16. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique acétylé et méthylé d'une résine fraîche de Juniperus communis. En bleu sont représentés les

diterpènes de la série de l'(iso)pimarane, en violet les labdanoïdes et en orange les diterpénoïdes phénoliques. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides carboxyliques sous forme d'esters méthyliques

Figure I.17. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) des fractions apolaires isolées à partir des extraits organiques acétylés et méthylés d'une résine fraîche de (A) Chamaecyparis lawsoniana ; (B) Platycladus orientalis ; (C) Calocedrus decurrens. En vert sont représentés les diterpènes de la série de l'abiétane, en bleu de la série de l'(iso)pimarane, en violet les labdanoïdes et en orange les diterpénoïdes phénoliques. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides carboxyliques sous forme d'esters méthyliques.

Figure I.18. Principaux composés considérés comme biomarqueurs caractéristiques du genre Callitris (Simoneit et al., 2018). La structure du composé (38) est hypothétique.

Figure I.19. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique acétylé et méthylé d'une résine fraîche de Taxodium distichum. En orange sont représentés les diterpénoïdes phénoliques. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides carboxyliques sous forme d'esters méthyliques.

Figure I.20. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique acétylé et méthylé d'une résine fraîche de Sequoia sempervirens. En violet sont représentés les labdanoïdes et en orange les diterpénoïdes phénoliques. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides carboxyliques sous forme d'esters méthyliques.

Figure I.21. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique acétylé et méthylé d'une résine fraîche de Cunninghamia konishii. En violet sont représentés les labdanoïdes, en bleu les diterpènes de la série de l'(iso)pimarane et en vert les diterpènes de la série de l'abiétane. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides carboxyliques sous forme d'esters méthyliques.

Figure I.22. Structure du verticillol (54), un des composés caractéristiques des résines de Sciadopitys (Karlsson et al., 1978).

Figure 1.23. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique acétylé et méthylé de la résine fraîche de Sciadopitys verticillata. En violet sont représentés les labdanoïdes et en vert les diterpènes de la série de l'abiétane. Cercle noir : sucre. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides carboxyliques sous forme d'esters méthyliques.

Figure I.24. Structure de l'acide podocarpique (56) et du totarol (67).

Figure I.25. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique acétylé et méthylé d'une résine fraîche d'Araucaria araucana. En violet sont représentés les labdanes et en bleu les diterpènes de la série de l'(iso)pimarane. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides carboxyliques sous forme d'esters méthyliques.

Figure I.26. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) des fractions apolaires isolées à partir des extraits organiques acétylés et méthylés d'une résine fraîche d'Araucaria columnaris (haut), d'Araucaria heterophylla (milieu) et d'Araucaria cunninghamii (bas). En violet sont représentés les labdanoïdes, en bleu les diterpènes de la série de l'(iso)pimarane et en vert les diterpènes de la série de l'abiétane. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides carboxyliques sous forme d'esters méthyliques

Figure I.27. Structure de l'acide kovalénique (60), un diterpène identifié dans la résine d'Araucaria bidwilli par Caputo et al. (1974).

Figure I.28. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) des fractions apolaires isolées à partir des extraits organiques acétylés et méthylés d'une résine fraîche d'Agathis moorei (A) et d'Agathis lanceolata (B). En violet sont représentés les labdanoïdes, en bleu les diterpènes de la série de l'(iso)pimarane et en vert les diterpènes de la série de l'abiétane. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides carboxyliques sous forme d'esters méthyliques.

Figure I.29. Structures du wollemol (**64**) et du wollemolide (**63**) isolés de cônes de Wollemia nobilis d'après Venditti et al. (2017, 2019) et structure du wollemolide révisée au cours de cette thèse (65) parallèlement aux travaux menés par une autre équipe canadienne (the University of British Colombia) dans le cadre d'un stage de master (Hirla-Schaefer, 2020).

Figure 1.30.Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique acétylé et méthylé d'une résine fraîche de Wollemia nobilis. En violet sont représentés les labdanoïdes, en bleu les diterpènes de la série de l'(iso)pimarane et en vert les diterpènes de la série de l'abiétane. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides carboxyliques sous forme d'esters méthyliques

Figure I.31. Structures de l'acide ozique (69) et de l'acide communique (29), deux représentants des labdanoïdes des séries dites « enantio » et « régulière » présentes, respectivement, dans les résines d'Angiospermes et les résines de conifères.

Figure I.32. Exemples de diterpènes présents dans les résines de Fabacées.

Figure 1.33. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique acétylé et méthylé des résines fraîches de Hymenaea courbaril (A) et Daniella sp. (B). L'espèce exacte à l'origine de la résine de Daniella n'est pas connue. En violet sont représentés les labdanes. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides carboxyliques sous forme d'esters méthyliques.

Figure 1.34. Exemples de composés présents dans les résines des plantes appartenant au genre Myroxylon.

Figure I.35. Principaux squelettes triterpéniques présents dans les résines de Burséracées, Diptérocarpacées et Anacardiacées.

Figure I.36. Chromatogramme en phase gazeuse partiel (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique acétylé et méthylé d'une résine commerciale d'élémi. L'espèce exacte à l'origine de la résine n'est pas connue et il est probable ici que la résine soit issue d'un mélange de résines contemporaines. En violet sont représentés les triterpènes. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides carboxyliques sous forme d'esters méthyliques.

Figure I.37. Exemples de terpènes caractéristiques de la résine de Boswellia (Al-Harrasi et al., 2021 ; Basar et al., 2001, Kosolapov et al., 2024

Figure 1.38. Principaux triterpènes caractéristiques des résines de Burséracées actuelles.

Figure 1.39. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique acétylé et méthylé d'une résine de Pistacia atlantica. En violet sont représentés les triterpènes. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides carboxyliques sous forme d'esters méthyliques.

Figure I.40. Composés caractéristiques des résines du genre Shorea (Burger, 2008 ; Perthuison et al., 2020).

Figure I.41. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, El, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique acétylé et méthylé d'une résine de Dipterocarpus dyeri (A) et une résine de dammar commerciale (B). En violet sont représentés les triterpènes. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides carboxyliques sous forme d'esters méthyliques.

Figure 1.42. Exemples de la variabilité de l'aspect des ambres provenant d'un même site ou de sites différents.

Figure 1.43. Carte du Monde localisant les principaux des sites riches en ambre/copal. Les cercles orange désignent les sites mésozoïques (Trias-Crétacé) et les cercles verts les sites cénozoïques (Paléogène-Quaternaire). Carte crée à partir de Langenheim (2003).

Figure I.44. Schéma des différents types d'environnements possibles à l'origine des bois fossiles et de l'ambre trouvés dans des sédiments déposés dans des embouchures de fleuves.

Figure 1.45. Structures de l'acide ozique (69) et de l'acide (-)-copalique (70).

Figure I.46. Formation de dérivés bicycliques par dégradation thermique de labdanoïdes des séries « régulière » (acide communique (29)) et « enantio » (acide ozique (69)) (d'après Poulin et Helwig, 2014).

Chapitre II

Figure II.1. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un échantillon d'ambre du niveau inférieur des dépôts santoniens de Piolenc (Vaucluse). En rouge : les composés organiques soufrés étudiés dans ce chapitre. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques

Figure II.2. Spectres de masse (GC-MS, IE, 70 eV) de sept composés présents dans la fraction apolaire de l'extrait organique méthylé (DMA-DMF) de l'ambre de Piolenc appartenant à la famille de composés inconnus de masse moléculaire de 350 Da.

Figure II.3 : Structures des composés soufrés (9b), (10b) et (11b) identifiés dans l'ambre de Piolenc ainsi que des acides isopimarique (18) et sandaracopimarique (16)

Figure II.4. Voie de formation diagénétique par réaction avec des espèces réduites du soufre issues de la réduction microbienne de sulfates a) des composés (9a) et (10a) à partir de l'acide sandaracopimarique (16) et/ou isopimarique (18). b) du composé (11a) à partir de l'acide sandaracopimarique (16) (schéma adapté à partir de la Figure 6 dans Lenen et al., 2023).

Figure II.5. Mécanisme de formation du composé (11a) par addition radicalaire de H2S sur l'acide sandaracopimarique (16).

Figure II.6. Exemples de composés organo-soufrés sédimentaires portant le soufre sur des positions substituées **Figure II.7**. Mécanisme proposé pour la formation des composés (9a) et (10a) par réaction de l'acide isopimarique (18) avec des polysulfures (adaptée à partir de la Figure 7 dans Lenen et al., 2023).

Figure II.8. Structures et modes de formation possibles pour les autres composés ayant une masse moléculaire de 350 Da (sous forme d'esters méthyliques) dans l'ambre de Piolenc à partir de : a) l'acide pimarique (17), b) l'acide sandaracopimarique (16) ou l'isopimarique (18) après migration des doubles liaisons, c) l'acide abiétique (19). Les flèches rouges indiquent les positions de sulfuration.

Figure II.9. Composés diterpéniques dont la sulfuration par des polysulfures a été plus spécialement étudiée à l'aide d'expériences en laboratoire.

Figure II.10. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire de l'extrait organique méthylé de la résine de Cedrus atlantica avant sulfuration. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques

Figure II.11. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé de la résine de Cedrus atlantica après sulfuration (NaSH/S8, 60 °C, 24 h). En rouge, les composés soufrés (9a) et (10a). Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques

Figure II.12 – Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé de la résine de Cedrus atlantica après sulfuration (NaSH/S8, 60 °C, 24 h), A) TIC : B) Fragmentogramme de masse m/z = 350 de l'extrait de résine de C. atlantica après sulfuration. C) Spectres de masse des composés (10b) (coélution avec un autre composé) et (13b). En vert, les fragments associés à (9b)/(10b) et, en orange, les fragments associés au composé qui coélue avec celui-ci. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure II.13. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de brut réactionnel obtenu après sulfuration (NaSH/S8, 60 °C, 24 h) d'acide abiétique (19) commercial méthylé (pureté 85%). Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure II.14 – Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de la résine méthylée et acétylée d'Araucaria columnaris (Pin colonnaire). Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'ester méthyliques. L'acide isocupressique (36) été analysé sous forme acétylée. L'acide cupressique (35) porte une fonction alcool tertiaire qui n'a pas été acétylée dans les conditions mises en œuvre.

Figure II.15. Chromatogramme en phase gazeuses (GC-MS, IE, 70 eV) d'une sous-fraction enrichie en acide agathique (27) isolée à partir de l'extrait organique méthylé de la résine d'Araucaria columnaris (Fraction 2) : A) avant sulfuration et B) après sulfuration (NaSH/S8, 60 °C, 24 h). En rouge, les composés organiques soufrés (37a)/(38a). Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques. L'acide isocupressique (36) et l'acide cupressique (35) ont été analysés sous forme acétylée. La fonction alcool tertiaire de l'acide cupressique (35) n'a pas été acétylée dans les conditions mises en œuvre.

Figure II.16. Spectres de masse (GC-MS, IE, 70 eV) des composés (37b) et (38b) obtenus lors de la sulfuration d'une fraction isolée à partir de la résine fraîche d'Araucaria columnaris méthylée

Figure II.17. Sulfuration de l'ester méthylique de l'acide (-)-copalique (40b) avec des polysulfures (Poinsot, 1997) conduisant à obtention d'un composé soufré (39) possédant un cycle soufré de type thiane.

Figure II.18. Voie possible de formation de composés soufrés (37a)/(38a) présents dans l'ambre de la Buzinie par sulfuration de l'acide agathique (27).

Figure II.19 – Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée de l'extrait organique méthylé d'un ambre de La Garnache (Vendée, France). Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure II.20. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre de La Garnache. (A) Courant d'ion total (TIC) et (B) Fragmentogramme de masse m/z 350. Les acides sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure II.21. Résultat du traitement d'un acide carboxylique et d'un alcool avec le DMF-DMA (d'après De Lama Valderrama et al., 2022). Le taux de formylation dépend de l'encombrement stérique au niveau de la fonction alcool. **Figure II.22.** Spectres de masse (GC-MS, IE 70 eV) des composés soufrés principaux présents dans l'ambre de La Garnache (Vendée, France). a) (44), un composé soufré diterpénique décarboxylé ; b) (45), un alcool diterpénique soufré (non dérivé)

Figure II.23. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé de l'ambre de La Garnache (A) Courant d'ion total (TIC) et (B) Fragmentogramme de masse m/z 292. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques

Figure II.24. Résultat du traitement d'un mélange d'acides et d'alcools diterpénoïdes soufrés avec (a) le DMF-DMA ; (b) Ac2O et DMF-DMA successivement.

Figure II.25. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre de Bitterfeld. (A) Courant d'ion total (TIC) et (B) Fragmentogramme de masse m/z 350. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques

Figure II.26. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un échantillon d'ambre de La Buzinie (échantillon A). En rouge les composés organiques soufrés. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure II.27. Spectres de masse (GC-MS, IE, 70 eV) (a), (b), (c), (d) des composés soufrés (54b-58b) vraisemblablement apparentés à l'acide agathique (27) présents dans l'ambre de La Buzinie (échantillon A ; Figure IV.26) ; (e) d'un thiolane ditérpénique synthétique (59) (Poinsot, 1997), (d) du labdanoïde (51b) présent dans l'ambre de la Buzinie et identifié précédemment dans l'ambre d'Archingeay (De Lama-Valderama et al., 2022).

Figure II.28. Structures de composés soufrés synthétiques dérivés de l'acide copalique (40a) et mode de fragmentation principal en spectrométrie de masse (IE) (Poinsot, 1997 ; Poinsot et al., 1997, 1998).

Figure II.29. Voie possible de transformation diagénétique de dérivés soufrés de l'acide agathique (27) dans l'ambre de La Buzinie. *sous la forme d'esters méthyliques

Figure II.30. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique méthylé d'ambre de La Buzinie (échantillon B). En rouge les composés organiques soufrés. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure II.31. Spectres de masse (GC-MS, IE, 70 eV) (a) du composé soufré (37b) détecté dans l'extrait méthylé de l'ambre de La Buzinie (échantillon B) ; (b) du composé soufré (37b) obtenu lors de la sulfuration d'une fraction de résine fraîche méthylée d'A. columnaris riche en acide agathique (27); (c) du composé soufré (61b) détecté dans l'ambre de La Buzinie (échantillon B) ; (d) d'un thiane diterpénique synthétique (62/62') (Poinsot, 1997)

Figure II.32. Sulfuration de l'ester méthylique de l'acide copalique (40b) en présence de polysulfures (Poinsot, 1997 ; Poinsot et al., 1997)

Figure II.33. Voies possibles de formation diagénétique de dérivés soufrés de l'acide agathique (27) détectés dans l'ambre de La Buzinie. En rouge : composés présents dans l'ambre de La Buzinie. En bleu : composés dont la présence est postulée dans l'ambre mais qui n'ont pas été détectés

Figure II.34. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre de Le Quesnoy (Coll. Muséum Naturel de Paris) (A) Courant d'ion total (TIC) et (B) Fragmentogramme de masse m/z 350. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Chapitre III

Figure III.1. Carte de l'ouest de l'Europe avec les différents sites contenant de l'ambre étudiés dans ce chapitre. 1) Puy-Puy, Cadeuil, île d'Aix, La Buzinie, Archingeay et Fouras (Charente-Maritime, Albien-Cénomanien). 2) La Garnache (Vendée, Cénomanien-Turonien). 3) Ecouflant (Maine-et-Loire, Cénomanien) : Du Brouillard, 4) Scorbé-Clairvaux (Vienne, Cénomanien inférieur). 5) Saint-Lon-Les-Mines (Landes, Crétacé inférieur). 6) Mas d'Azil et Sainte-Croix (Ariège, Campanien). 7) Sougraine et Fourtou (Aude, Cénomanien). 8) Piolenc (Vaucluse, Santonien). 9) Salignac-Sistéron (Alpes-de-Haute-Provence, Aptien-Albien). 10) La Bouilladisse (Bouches-du-Rhône, Santonien). 11) Alava et El Soplao (Pays basque espagnol, Albien). 12) Uña (Province de Cuenca, Barrémien13) Province de Teruel (Cénomanien inférieur).

Figure III.2. Carte géologique de la Charente-Maritime avec localisation des différents sites dont des échantillons d'ambre ont été analysés : 1) île d'Aix, 2) Fouras, 3) Puy-Puy, 4) Archingeay-Les-Nouillers, 5) Cadeuil, 6) La Buzinie. 7) île d'Oléron (site non étudié ici), 8) Carrières de Les Renardières (site non étudié ici). Schéma dessiné à partir de Penney (2010).

Figure III.3. Présentation des principaux morphotypes d'ambre décrits par Girard (2008) et Perrichot (2003) présents dans les sites de Charente-Maritime.

Figure III.4. Diversité botanique associée aux restes fossiles des différents groupes/ordres de plantes (en %) obtenue à partir des études palynologiques et paléontologiques (Dejax et Masure, 2005; Gomez et al., 2008; Néraudeau et al., 2008; Peyrot et al., 2019, 2005) au niveau des sites de Cadeuil, Archingeay, Puy-Puy et Fouras ainsi que les âges et les niveaux associés. *Données réduites pour Puy-Puy, peu de mégarestes ayant été identifiés au niveau de ce site. Les données ont été obtenues à partir des comptages et de l'identification des restes fossiles et du pollen effectués dans le cadre de différentes études.

Figure III.5. Diversité des principales familles de Gymnospermes associées aux micro- et mégarestes fossiles identifiés au niveau des différents sites de Charente-Maritime d'après les études de Dejax et Masure, 2005; Gomez et al., 2008; Moreau et al., 2017; Peyrot et al., 2019, 2005. Ces estimations ont été réalisées à partir des études de la littérature sur les études floristiques (restes fossiles et pollen).

Figure III.6. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) des fractions apolaires isolées à partir d'extraits organiques méthylés d'ambres représentatifs de chaque morphotype.

Figure III.7. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre de la catégorie « caramel » (Type 1 d'Archingeay). En violet, les terpènes

de la série des labdanoïdes, en vert les diterpènes de la série de l'acide abiétique, en bleu les diterpènes de la série de l'acide (iso)pimarique, en orange les diterpènes phénoliques. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure III.8. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre de la catégorie « coca» (Type 2 d'Archingeay). En violet, les terpènes de la série des labdanoïdes. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques et les alcools peuvent être sous forme de formiates.

Figure III.9. Mécanisme proposé pour la formation diagénétique du composé (17) par cyclisation/aromatisation, de labdanoïdes apparentés à l'acide communique (7) (adapté d'après De Lama-Valderrama et al., 2022).

Figure III.10. A. Spectre de masse (IE, 70 eV) du composé (27) et propositions de structure pour ce composé. B. Structures et mode de formation possible des hydrocarbures (30) et (30')° et (27)/(27') par décarboxylation de l'acide déhydroabiétique (9) et du composé (17) présents dans l'ambre « coca ».

Figure III.11. Origines possibles et modes de transformation possibles des composés (17), (19) et (19*).

Figure III.12. Squelette des clérodanes

Figure III.13. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre de la catégorie « miel » (Arc 3) d'Archingeay. En violet, les terpènes de la série des labdanoïdes, en vert les diterpènes de la série de l'acide abiétique, en bleu les diterpènes de la série de l'acide pimarique, en marron les diterpènes de la série du phyllocladane, et en noir les composés sesquiterpéniques. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure III.14. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre de Fouras. En vert les diterpènes de la série de l'acide abiétique, en bleu les diterpènes de la série de l'acide (iso)pimarique, et en orange les diterpènes phénoliques. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure III.15. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre de la Buzinie. En violet, les terpènes de la série des labdanoïdes, en vert les diterpènes de la série de l'acide abiétique, en bleu les diterpènes de la série de l'acide (iso)pimarique, et en orange les diterpénoïdes phénoliques. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure III.16. Schéma géologique de la zone de Scorbé-Clairvaux (d'après LeTouzé de Longemer, 1866 et Valentin et al., 2020).

Figure III.17. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un échantillon d'ambre de Scorbé-Clairvaux. En vert les diterpènes de la série de l'acide abiétique, en bleu les diterpènes de la série de l'acide (iso)pimarique, en orange les diterpènes phénoliques. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure III.18. Fragmentogramme de masse m/z = 271 de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique dérivé de cuticules fossiles de Frenelopsis provenant du site de Uña (Espagne). En orange sont représentés les diterpénoïdes phénoliques.

Figure III.19. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre de La Garnache. En vert, les diterpènes de la série de l'acide abiétique, en bleu, les diterpènes de la série de l'acide (iso)pimarique, en orange, les diterpénoïdes phénoliques. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure III.20. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre provenant de la carrière du Brouillard (collection D. Néraudeau). En bleu les diterpènes de la série de l'acide pimarique. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure III.21. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé des échantillons d'ambre provenant de A) Mas d'Azil (Museum d'Histoire Naturelle de Paris), B) Montbrun (coll. F. Loiret), C) Sainte-Croix (coll. F. Loiret).

Figure III.22. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre provenant du Mas d'Azil (collection du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris). En violet sont représentés les labdanoïdes et en bleu les dérivés en série (iso)pimarique. Les cercles noirs représentent des composés organiques soufrés dont la structure n'a pas été déterminée. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure III.23. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un échantillon d'ambre provenant de Montbrun (collection personnelle de F. Loiret). En violet sont représentés les labdanoïdes. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure III.24. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre provenant des niveaux les plus bas de Piolenc (collection personnelle de B. Gomez, Université de Lyon). En bleu sont représentés les composés de la série de l'acide (iso)pimarique, et en vert sont représentés les composés de la série de l'acide abiétique. Les cercles noirs représentent des composés organiques soufrés dont la structure n'a pas été déterminée. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure III.25. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre provenant des niveaux les plus hauts de Piolenc (collection personnelle de B. Gomez, Université de Lyon). En bleu sont représentés les composés de la série de l'acide (iso)pimarique et en vert sont représentés les composés de la série de l'acide abiétique. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure III.26. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre provenant de Salignac-Sisteron (collection de D. Néraudeau, Université de Rennes). En bleu sont représentés les composés de la série de l'acide (iso)pimarique, en violet sont représentés les labdanoïdes. Les cercles violets représentent des labdanoïdes dont la structure n'a pas été élucidée. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques. La structure (69*) avec un astérisque correspond à celle proposée par Menor-Salvan et al. (2016) et à côté, une alternative (69) que nous proposons.

Figure III.27. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre provenant de La Bouilladisse (collection de D. Néraudeau, Université de Rennes). En bleu sont représentés les composés de la série de l'acide (iso)pimarique, en vert les composés de la série de l'acide abiétique et en violet les labdanoïdes. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure III.28. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre provenant de Fourtou (collection Muséum d'Histoire Naturelle de Paris, A. Nel). En bleu sont représentés les composés de la série de l'acide (iso)pimarique, et en violet les labdanoïdes. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure III.29. Carte présentant les principaux bassins crétacés et les localités associées contenant de l'ambre. BCA : Bassin Central des Asturies ; BBC : Bassin Basque-Cantabrique ; BM : Bassin du Maestrat ; SC : Serranía de la Cuenca. 1) Pola de Siero 2) El Caleyu 3) El Soplao 4) Peñacerrada I 5) Peñacerrada II 6)Salinillas de Buradón 7) San Just 8-11) Uña. Carte réalisée à partir de Peñalver et Delclòs, 2010

Figure III.30. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un échantillon d'ambre de Uña (Type moléculaire 1). En bleu sont représentés les composés de la série de l'acide (iso)pimarique, et en violet sont représentés les labdanoïdes. Les cercles violets

représentent des labdanoïdes dont la structure n'a pas été élucidée. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure III.31. Mécanisme proposé pour la formation diagénétique du composé (77) par cyclisation/aromatisation de labdanoïdes apparentés à l'acide communique (7). Ce mécanisme est analogue à celui proposé pour la formation du composé (17) (cf. Figure II9) (adapté d'après De Lama-Valderrama et al., 2022).

Figure III.32. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre de Uña (Type moléculaire 1 bis). En bleu sont représentés les composés de la série de l'acide (iso)pimarique, et en violet sont représentés les labdanoïdes. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques. Les cercles noirs sont des composés soufrés dont la structure est inconnue.

Figure III.33. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) des fractions apolaires isolées à partir des extraits organiques méthylés d'un ambre (A) de Teruel (collection C.du Gardin) et (B) de Alava (bassin de la Peñacerrada, collection de Jan Panczak). En violet sont représentés les labdanoïdes. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure III.34. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre d'El Soplao (Peñacerrada (Collection de Jan Pànczak)). En violet sont représentés les labdanoïdes, en bleu les composés de la série de l'acide (iso)pimarique, en vert les composés de la série de l'acide abiétique et en orange le ferruginol (2). Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques. X : Contaminations

Figure III.35. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un échantillon d'ambre de Meyrouba (Néocomien, Liban). En violet sont représentés les labdanoïdes. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure III.36. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un échantillon d'ambre d'Aintourine (Jurassique supérieur, Liban). En violet sont représentés les labdanoïdes, en bleu les composés de la série de l'acide (iso)pimarique, en vert les composés de la série de l'acide abiétique et en marron les diterpénoïdes tétracycliques. Les cercles noirs correspondent à des diterpènes soufrés. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure III.37. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un échantillon d'ambre de Sfiré (Crétacé inférieur, Liban) En violet sont représentés les labdanoïdes, en bleu les composés de la série de l'acide (iso)pimarique, en vert les composés de la série de l'acide abiétique et en marron les diterpénoïdes tétracycliques. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure III.38. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un échantillon cénomanien de valchovite (République tchèque). En violet sont représentés les labdanoïdes et en bleu les composés de la série de l'acide (iso)pimarique. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques

Chapitre IV

Figure IV.1. Carte représentant la zone entourant la Mer Baltique. En jaune, les zones où se situent les ambres baltiques charriés par la mer. En rouge, les principaux sites dans les terres où les ambres de type « succinites » sont extraits. D'après Weitschat et Wilfried, 2010.

Figure IV.2. Schéma représentant une coupe de la côte proche de Yantarnyi (district de Kaliningrad, Russie). D'après Weitschat et Wichard (2010).

Figure IV.3. Structure de l'acide succinique (ou acide butane-1,4-dioïque) (1)

Figure IV.4. Structure de labdanoïdes appartenant à la série « enantio » (cas de l'acide ozique (5)) et à la série « régulière » (cas de l'acide communique (6)

Figure IV.5. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de fractions apolaires isolées à partir des extraits organiques méthylés de trois échantillons d'ambre provenant des pourtours de la mer Baltique. A) Échantillon provenant d'une plage baltique (musée de Minéralogie de Strasbourg). B) Échantillon provenant de Suède (collection personnelle de J.M. Pouillon). C) Échantillon provenant de la cuvette de Żuławy (collection personnelle de C. Du Gardin). En rouge, la zone contenant les dérivés d'acide succinique, en bleu, la zone contenant les composés dérivant de l'acide (iso)pimarique, et en vert la zone contenant les dérivés de l'acide abiétique

Figure IV.6. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre baltique de Żuławy (Pologne). En bleu, les diterpénoïdes de la série de l'acide (iso)pimarique, en vert les diterpénoïdes de la série de l'acide abiétique, en violet les labdanoïdes et en rouge les dérivés de l'acide succinique. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure IV.7. Mode de formation hypothétique des composés (11) et (23). D'après De Lama Valderama et al. (2022). *Figure IV.8.* Spectre de masse (IE, 70 eV) des composés (17), (18) et (19) présents dans l'ensemble des échantillons d'ambre baltique et structures hypothétiques associées. Les acides sont analysés sous forme d'esters méthyliques. Hypothèses structurales d'après Czechowski et al. (1996) et Mills et al. (1984).

Figure IV.9. Monoterpénols (fenchol (24), isobornéol (25) et bornéol (26)) associés par estérification à l'acide succinique dans l'ambre baltique (Figure IV.4).

Figure IV.10. Chromatogramme (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire d'un ambre de la Baltique (collection J.M. Pouillon) obtenu après butanolyse (BuOH/HCI) de la partie non extractible en utilisant un mélange MeOH/CH2Cl2 (1:1, v/v). En rouge, les esters butyliques dérivant de l'acide succinique (1).

Figure IV.11. Structures hypothétiques des sous-unités constituant la composante macromoléculaire contenue dans l'ambre baltique et effets d'un traitement par butanolyse et par pyrolyse sur celle-ci (Poulin et Helwig, 2014).

Figure IV.12. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'une croûte d'altération de surface d'un échantillon d'ambre baltique (coll. Musée Minéralogique de Strasbourg). En bleu, les diterpénoïdes de la série de l'acide (iso)pimarique, en vert les diterpénoïdes de la série de l'acide abiétique, en violet les labdanoïdes et en rouge les dérivés de l'acide succinique. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure IV.13. Photographie de trois échantillons d'ambre collectés dans la même mine de la cuvette de Żuławy (Pologne), mais qui présentent des différences d'aspect marquées pouvant être associées à des états d'altération plus ou moins importants.

Figure IV.14. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) des fractions apolaires isolées à partir des extraits organiques méthylés d'échantillons d'ambre de la cuvette de Żuławy. A) Échantillon « osseux », B) Échantillon transparent C) Échantillon noir

Figure IV.15. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique méthylé d'un échantillon d'ambre du Groenland (Musée d'Histoire Naturelle de Paris). En bleu les diterpénoïdes de la série de l'acide (iso)pimarique, en vert les diterpénoïdes de la série de l'acide abiétique et en violet les labdanoïdes. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure IV.16. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique méthylé d'un ambre du Groenland (A) TIC et (B) fragmentogramme de masse m/z 115. En rouge, les dérivés de l'acide succinique. Les acides carboxyliques ont été analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure IV.17. (A) Succinate de di-torulosyl (32) identifié dans des conifères du genre Larix (Jiang et al., 2022 ; Xue et al., 2004) ; (B) exemple de diester d'acide succinique (33) détecté après Py-GC-MS d'ambre de la Baltique (classe la).

Figure IV.18. Photographies des différents échantillons étudiés dans Chapitre IV. Les échantillons de stantiénite, de glessite et de krantzite proviennent des collections du Musée National de Varsovie (Pologne), la gédanite provient de la collection personnelle de C. du Gardin et la succinite des collections du Muséum d'Histoire Naturelle de Berlin.

Figure IV.19. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique méthylé d'un ambre de Bitterfeld de type succinite provenant du Musée d'Histoire Naturelle de Berlin. En bleu diterpénoïdes de la série de l'acide (iso)pimarique, en vert diterpénoïdes de la série de l'acide abiétique, en violet les labdanoïdes et en rouge les dérivés de l'acide succinique. Les cercles noirs correspondent à des diterpènes soufrés. Les acides sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure IV.20. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique méthylé d'une gédanite de la collection personnelle de C. du Gardin. En bleu, diterpénoïdes de la série de l'acide (iso)pimarique, en vert, diterpénoïdes de la série de l'acide abiétique, et en violet, les labdanoïdes. Les acides carboxyliques sont analysés sous la forme d'esters méthyliques.

Figure IV.21. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) partiel (zone des triterpènes) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique acétylé et méthylé d'un variant noir de la glessite de Bitterfeld. En violet, les triterpènes. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques et les alcools sous forme d'acétates.

Figure IV.22. Structure de l'acide \Box -boswellique (51), la breine (52), du maniladiol (53), du dipterocarpol (54) et des composés supposés en dériver (55) et (56). Ces derniers n'ont été détectés que dans l'échantillon de glessite brune.

Figure IV.23. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) partiel (zone des triterpènes) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique acétylé et méthylé d'un variant brun de la glessite de Bitterfeld. En violet, les triterpènes. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques et les alcools sous forme d'acétates.

Figure IV.24. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique méthylé d'une stantiénite de Bitterfeld (Collection de J.Pànczak) (A) Courant d'ion total ; (B) Fragmentogramme de masse m/z 71.

Figure IV.25. Fragmentogrammes de masse (GC-MS, IE, 70 eV) (a) m/z 217 et (b) m/z 191 de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique acétylé et méthylé d'une stantiénite de Bitterfeld.

Figure IV.26. Fragmentogrammes de masse (GC-MS, 70 eV, IE) (a) m/z 204 et (b) m/z 218 de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique acétylé et méthylé d'une stantiénite de Bitterfeld (GC-MS, IE, 70 eV).

Figure IV.27. Chromatogramme en phase gazeuse partiel (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique acétylé et méthylé d'une kranzite. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques et les alcools sous forme d'acétates.

Figure IV.28. A) Echantillon de duxite étudié B) Localisation des bassins du massif de Bohème et des bassins associés avec la position des mines principales contenant de la duxite (modifié d'après Havelcová et al., 2018). La flèche indique le site de prélèvement de l'échantillon étudié.

Figure IV.29. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique méthylé d'un échantillon de Duxite (Bílina, République tchèque, collection J. Pànczak, Université de Cracovie). En noir, les sesquiterpènes, en vert, les diterpénoïdes de la série de l'abiétane, en bleu, les diterpénoïdes de la série du (iso)pimarane. Les acides carboxyliques ont été analysés sous la forme d'esters méthyliques.

Figure IV.30. A) Carte géologique de la zone de l'Oise (France) avec en vert, les sites principaux où de l'ambre a été trouvé (d'après Nel et al., 2004). B) Les échantillons étudiés dans cette partie proviennent des sites suivants :

Le Quesnoy (Collection du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris), Moru (Collection de C. du Gardin) et Gisors (collection de A. Nel, Muséum d'Histoire naturelle de Paris).

Figure IV.31. Structure de la quesnoïne (113) d'après Jossang et al. (2008)

Figure IV.32. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique méthylé d'un ambre de l'Oise (collection du Muséum National d'Histoire Naturelle, ambre provenant des alentours de Paris). Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques. En violet, les composés liés aux labdanoïdes.

Figure IV.33. Rappel des structures de l'acide communique (6) et de l'acide ozique (5).

Figure IV.34 : Effets de la pyrolyse sur la composante macromoléculaire des ambres présentant des sous-unités labdanoïdes (d'après Anderson (1995) et Bray et Anderson (2009).

Figure IV.35. Mode de formation de la quesnoïne (113) à partir de l'acide isoozique (114) (d'après Jossang et al., 2008)

Figure IV.36. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique méthylé d'un ambre du site de Le Quesnoy (Oise ; collection Musée National d'Histoire Naturelle). Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques. En noir sont représentés les produits d'altération thermique de labdanoïdes et en violet les labdanoïdes. Les cercles rouges représentent des sulfoxides diterpéniques (cf. Chapitre II)

Figure IV.37. Chromatogramme en phase gazeuse partiel (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique méthylé d'un ambre provenant de République dominicaine (Collection du Muséum National d'Histoire Naturelle). Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques. En violet sont représentés les labdanoïdes. Les composés (125) et (126) ont été identifiés d'après Wang et al. (2017).

Figure IV.38. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique méthylé d'un ambre provenant du Chiapas (Collection de M.M. Solórzano-Kraemer, Senckenberg Research Institute, Allemagne) En violet sont représentés les labdanoïdes. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure IV.39. Chromatogramme en phase gazeuse partiel (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique méthylé d'un copal de Madagascar (Collection du Muséum National d'Histoire Naturelle). En violet sont représentés les labdanoïdes. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques. **Figure IV.40**. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique méthylé d'un ambre provenant d'Allinges (Collection personnelle de J.M. Pouillon). En bleu sont représentés les diterpénoïdes de la série du (iso)pimarane et en vert les diterpénoïdes de la série de l'abiétane. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Chapitre V

Figure V.1. Protocole non invasif de prélèvement mis au point pour l'analyse moléculaire (GC-MS) d'échantillons archéologiques en ambre.

Figure V.2. Représentation d'une section de tumulus

Figure V.3. Photographies de certains objets en ambre provenant du Musée Historique de Haguenau sur lesquels des prélèvements ont été réalisés en vue de leur analyse moléculaire.

Figure V.4. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) des fractions apolaires isolées à partir des extraits organiques méthylés de 4 échantillons d'ambre du Musée Historique de Haguenau datant de l'Age du Bronze. Sur la figure sont représentées les zones d'élution des principales familles moléculaires mises en évidence dans ces ambres.

Figure V.5. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) des fractions apolaires isolées à partir de extraits organiques méthylés de 3 échantillons d'ambre du Musée Historique de Haguenau datant de l'Age du Fer.

Sur la figure sont représentées les zones d'élution des principales familles moléculaires mises en évidence dans ces ambres.

Figure V.6. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé de l'échantillon N617-A (Age du Bronze, Musée Historique de Haguenau). En bleu les composés de la série du pimarane, en vert les composés de la série de l'abiétane, en violet les labdanoïdes et en rouge les dérivés de l'acide succinique. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques

Figure V.7. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, 70 eV, IE) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé de l'échantillon N171a (Age du Fer, Musée Historique de Haguenau). En bleu les composés de la série du pimarane, en vert les composés de la série de l'abiétane, en violet les labdanoïdes et en rouge les dérivés de l'acide succinique. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Figure V.8. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé de l'échantillon N90c (Age du Fer, Musée Historique de Haguenau) présentant un vernis de restauration. En bleu les composés de la série du pimarane, en vert les composés de la série de l'abiétane, en violet les triterpénoïdes et en rouge les dérivés de l'acide succinique. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques. X : contaminations.

Figure V.9. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé de l'échantillon ESF 4060 (ambre trouvé dans la salle du fond de la grotte d'Enlène lors des premières fouilles) (A) Courant d'ion total ; (B) Fragmentogramme de masse m/z 155. En violet sont représentés les labdanoïdes. Les carrés noirs correspondent à des composés inconnus présents également dans l'ambre du Mas d'Azil, mais non détectés dans les ambres de Montbrun/Sainte Croix. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Chapitre VI

Figure VI.1. Mécanisme d'acétylation des fonctions alcools à l'aide d'anhydride acétique en présence de pyridine. *Figure VI.2*. Mécanisme de méthylation des fonctions acides carboxyliques à l'aide de la DMA/DMF.

Figure VI.3. Structure de l'ester méthylique du wollémolide (5b) et numérotation des atomes de carbone.

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau I.1. Exsudats végétaux et principales caractéristiques chimiques.

 Tableau I.2.
 Comparaison moléculaire des principaux genres de pinacées produisant de la résine. [1] Bol'shakova

 et al., 1987 ; [2] Steigenberger, 2013 ; [3] Martin et al., 2002 ; [4] Radulgin et al., 1991 ; [5] Mills, 1973.

 Tableau I.3. Principales caractéristiques chimiques des différentes sous-familles de Cupressacées.

Tableau I.4. Principales familles de diterpénoïdes identifiées sans les genres Araucaria (section Araucaria), Araucaria (section Eutacta) et Wollemia.

Tableau I.5. Principales caractéristiques chimiques des résines des Angiospermes actuelles.

Tableau I.6. : Dénomination des substances issues de résines végétales en fonction de leur âge.

Tableau I.7. Classification des ambres selon les unités structurales constituant leur composante macromoléculaire (Anderson et Crelling, 1995 ; Anderson et Botto, 1993 ; Bray et Anderson, 2008 ; Rust et al., 2010 ; Poulin et Hellwig, 2012 ; Wolfe et al., 2009).

Tableau I.8. Principaux sites ambrifères dans le Monde, âge des sites et origines botaniques des ambres associées.

Chapitre II

Tableau II.1. Liste des ambres pour lesquels des composés organiques soufrés ont été détectés.

Chapitre III

Tableau III.1. Liste des ambres pour lesquels des composés organiques soufrés ont été détectés.

Figure III.2. Carte géologique de la Charente-Maritime avec localisation des différents sites dont des échantillons d'ambre ont été analysés : 1) île d'Aix, 2) Fouras, 3) Puy-Puy, 4) Archingeay-Les-Nouillers, 5) Cadeuil, 6) La Buzinie. 7) île d'Oléron (site non étudié ici), 8) Carrières de Les Renardières (site non étudié ici). Schéma dessiné à partir de Penney (2010).

Figure III.3. Présentation des principaux morphotypes d'ambre décrits par Girard (2008) et Perrichot (2003) présents dans les sites de Charente-Maritime.

Chapitre IV

Tableau IV.1. Comparaison entre compositions moléculaires de l'ambre baltique et de résines actuelles provenant des familles de Gymnospermes proposées comme étant potentiellement à l'origine de l'ambre baltique. Ces comparaisons ont été effectuées à partir de résines fraîches collectées en Nouvelle-Calédonie et au Jardin Botanique de Strasbourg.

Tableau IV.2. Présentation des différents types d'ambre de la région de Bitterfeld, principales spécificités moléculaires, origines botaniques proposées dans la littérature et provenance des échantillons étudiés dans ce Chapitre.

Chapitre V

Tableau V.1. Synthèse des échantillons archéologiques en ambre analysés et origines géographiques de l'ambre identifiées.

Chapitre VI

Tableau VI.1. Déplacements chimiques 1H (500 MHz) et 13C (125 MHz) de l'ester méthylique du wollémolide (5b) dans CDCl3

Liste des abréviations

AcOEt	Acétate d'éthyle
AEC	Avant l'Ere Commune
AP	Avant le présent
CCM	Chromatographie sur couche mince
COS	Composé organique soufré
COSY	COrrelation SpectroscopY
Da	Dalton
DCM	DiChloroMéthane
DMAPP	DiMétylalyl-PyroPhosphate
FPP	Farnésyl PyroPhosphate
FT-IR	Fourier Transform InfraRed spectroscopy
GC-FID	Gas Chromatography-Flame Ionization Dectector
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry
GPP	Géranyl PyroPhosphate
GGPP	GéranylGéranyl PyroPhosphate
HMBC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
IE	Impact Electronique
IPP	Isopentényl PyroPhosphate
m/z	Rapport masse/charge
MeOH	Méthanol
MEP	Méthyl Erythritol Phosphate
MVA	Acide mévalonique
NIST	National Institute of Standards and Technology
NOESY	Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
Py-GC-MS	Pyrolysis-Gas-Chromatography-Mass Spectrometry
PTV	Programme Temperature Vaporization
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
S.S	sensu stricto, au sens strict
s./	sensu lato, au sens large
T°C	Température (en Celsius)
TIC	Total Ion Current
Vm	Volume mor

5



Conventions

Numérotation des principaux squelettes terpéniques cités dans le texte

Oléanane

. 23

24





INTRODUCTION GÉNÉRALE


En français, le mot ambre vient de l'arabe « sanbar », qui désigne à la fois l'ambre jaune issu de résines végétales et l'ambre gris, une substance sécrétée par l'intestin des cachalots et largement utilisée en cosmétique depuis l'Antiquité. L'ambre (d'origine végétale) joue un rôle clé dans l'économie contemporaine, se classant comme le deuxième type de « pierre précieuse » importée aux Etats-Unis, juste après le diamant. Son utilisation dans l'artisanat et la bijouterie remonte à des millénaires, avec des objets en ambre façonnés dès l'Aurignacien, soit environ 40 000 ans avant notre ère. A partir de l'Age du Bronze (3000 - 800 AEC), l'utilisation de l'ambre est largement répandue parmi les peuples européens et est associée à de nombreux cultes. Par exemple, de l'ambre a été trouvé dans des tombeaux égyptiens de la Sixième Dynastie, associé à la représentation du dieu du soleil Râ (env. 3000 AEC). Cette omniprésence en Europe à cette époque est étonnante, étant donné que l'exploitation de l'ambre était limitée à certaines zones, dont principalement le pourtour de la mer Baltique. Cette diffusion s'explique ainsi par l'établissement de routes commerciales reliant les régions productrices (zone baltique) et des zones peuplées plus éloignées, telles que celles situées autour du bassin méditerranéen. Ainsi, dès le début de l'Age du Bronze, l'ambre devient un des premiers objets de luxe commercialisé. Cependant, en l'absence de traces écrites, la datation et le suivi de l'évolution de ces routes commerciales sont extrêmement complexes. Les premières mentions des "routes de l'ambre" datent de l'Antiquité, soit des milliers d'années après leur émergence théorique (Pline l'Ancien, 79 EC). En dehors de la zone baltique, il existe toutefois en Europe certains sites géologiques d'importance mineure montrant des traces d'exploitation de l'ambre par l'Homme (Liban, Sicile), ces ambres présentant un aspect très similaire à celui des ambres de la Baltique. Il est donc difficile d'envisager qu'une distinction entre les différentes sources d'ambre puisse être uniquement basée sur leur aspect morphologique. Ainsi, les premières méthodes proposées pour connaître l'origine géographique des ambres archéologiques ont été liées à l'analyse de leur composante organique.

Dès l'Antiquité, l'ambre a été reconnu comme une "résine ancienne", en raison de sa forte ressemblance morphologique avec les résines contemporaines. Par ailleurs, la présence d'insectes et autres inclusions dans les ambres a laissé penser qu'à l'origine, l'ambre devait posséder une viscosité proche de celle des résines pour pouvoir contenir de telles inclusions. Plus tard, des études paléontologiques et chimiques ont confirmé son origine végétale.

En tant que résine fossilisée, l'ambre conserve des constituants moléculaires présents à l'origine dans la résine, et dans la très grande majorité des cas, il s'agit de terpénoïdes qui sont des molécules organiques spécifiques issues du métabolisme secondaire des plantes.

Qualifié d'archétype du fossile, l'ambre est en effet un fossile en soi, mais aussi un milieu de fossilisation très particulier. En effet, l'ambre permet, outre la conservation de certains biomarqueurs issus de la résine dont il est issu, la conservation de certains tissus mous ou peu fossilisables en temps normal. Par exemple, un lézard entièrement conservé ainsi qu'une aile d'oiseau ont été trouvés dans de l'ambre crétacé de Birmanie.

Les premières études chimiques de grande envergure de l'ambre se basent sur des analyses par spectroscopie infrarouge (IR, FTIR), ce qui a permis d'analyser et de répertorier des échantillons provenant de centaines de sites, révélant une grande hétérogénéité chimique entre les ambres et suggérant une diversité de producteurs. Il a ainsi été proposé d'utiliser ce référentiel pour l'étude d'ambres archéologiques. De ce fait, et comme les analyses IR sont non destructives, celles-ci ont été largement adoptées pour l'étude de l'ambre. Cependant, ce type d'analyses présente ses limites, notamment du fait que les spectres enregistrés sont fortement tributaires de certains facteurs ayant affecté les ambres, comme le niveau d'altération ou de maturation de chaque échantillon considéré, rendant de ce fait difficile, voire impossible, d'établir une distinction entre les ambres issus de différentes familles botaniques, et d'identifier ces dernières.

En revanche, l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) - parfois utilisée avec une étape préalable de pyrolyse (py-GC-MS) - permet d'identifier les principaux constituants moléculaires de l'ambre. Ainsi, il est possible d'établir une empreinte moléculaire spécifique pour chaque échantillon d'ambre, celle-ci permettant à la fois d'établir des comparaisons avec des résines contemporaines, de remonter aux origines botaniques des ambres - ou, tout au moins, de s'en approcher -, ou encore de déterminer le niveau de maturité atteint par les ambres. Cependant, dans le cas de l'analyse d'échantillons précieux, comme des échantillons d'ambre archéologiques, cette méthode d'analyse exige la destruction de matériau, ce qui peut constituer une limitation à son application.

Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans le cadre de ces problématiques, et pour lesquelles il s'agit, d'une part, d'étudier au niveau moléculaire des ambres provenant de sites géologiques bien identifiés au travers de l'Europe, ceci afin d'en déterminer l'origine botanique et d'établir un référentiel à partir de l'empreinte moléculaire de ces échantillons. Cela a été réalisé grâce à des collaborations avec des paléobotanistes et des paléo-entomologues, qui ont fourni un grand nombre d'échantillons d'ambre issus de nombreux sites. Dans ce même contexte, un certain nombre de résines contemporaines issues de conifères et d'Angiospermes ont été étudiées en suivant la même approche, afin de tenter d'établir des corrélations entre ambres et genres ou espèces botaniques. Un second grand volet de nos travaux a consisté à analyser des échantillons d'ambre archéologiques, et d'établir des comparaisons entre les distributions moléculaires de ces ambres avec celles provenant du référentiel moléculaire établi à partir des ambres « géologiques » étudiés dans un premier temps. Nous avons été amenés, pour cette partie liée aux ambres archéologiques, à développer une méthode d'analyse peu invasive pour préserver l'intégrité des échantillons. Cette méthode, appliquée à un grand nombre d'objets archéologiques en ambre, a conduit à identifier l'origine géographique des échantillons analysés, mais aussi à mettre en évidence un certain nombre d'ingrédients utilisés dans le cadre de la restauration d'objets issus de collections muséales.

Ce manuscrit est découpé en six chapitres de la manière suivante :

Le premier chapitre de la thèse aborde la problématique des résines et de l'ambre en tant qu'objets d'étude, en abordant leur définition, leur chimie et leur mode de transformation. Il met en lumière les caractéristiques chimiques des résines modernes à partir de données de la littérature et de l'analyse moléculaire de résines contemporaines provenant de divers sites, dont le jardin botanique de Strasbourg et celui de Paris.

Le deuxième chapitre est focalisé sur l'identification d'une nouvelle série de composés soufrés repérés dans certains échantillons d'ambre, et dont l'origine et la signification en termes de paléoenvironnements sont discutées.

Le troisième chapitre est consacré à l'analyse moléculaire d'échantillons d'ambre du Mésozoïque, en particulier du Crétacé, provenant de nombreux sites européens.

En effet, le Crétacé a constitué une période clé pour la production de résines végétales dans le contexte de l'évolution et de la radiation des grands groupes botaniques tels qu'on les connait actuellement.

Dans le quatrième chapitre sont examinés les ambres européens du Cénozoïque, en se concentrant sur les ambres provenant des principaux sites d'exploitation actuels, notamment ceux des pourtours de la mer Baltique et de la région de Bitterfeld (Allemagne).

Enfin, dans le cinquième chapitre est abordée l'étude d'échantillons d'ambre trouvés en contexte archéologique, en se focalisant notamment sur deux collections très spécifiques : celle du Musée Historique de Haguenau, qui comprend de nombreux échantillons de l'Age du Bronze et du Fer, et celle d'échantillons issus de la collection personnelle de R. Begouën. Ces

échantillons, d'une source très rare, proviennent de la grotte d'Enlène, en Ariège, qui a été habitée durant le Magdalénien (14 000 à 12 000 ans AP) et où certains objets en ambre façonnés ont été mis au jour.

Un dernier chapitre sera dédié à la description des protocoles expérimentaux mis en œuvre lors des différentes analyses effectuées au cours de cette thèse.

Enfin, une brève conclusion sera ensuite proposée, tout en mettant en perspective les futurs travaux qui pourraient être développés à la suite de cette thèse.

<u>CHAPITRE I</u>: GÉNÉRALITÉS SUR L'AMBRE ET L'ANALYSE DE RÉSINES CONTEMPORAINES



I.1. Introduction

L'une des premières descriptions de l'ambre a été réalisée par Pline l'Ancien durant le premier siècle de notre ère. Celui-ci observe que l'ambre présente en son sein insectes et autres inclusions, à l'instar des résines actuelles. Il suppose donc que l'ambre observé est en réalité une résine ancienne durcie par le soleil. En effet, la filiation entre les ambres et les résines est relativement évidente étant donné les caractéristiques morphologiques partagées (couleur, présence d'inclusions). Cependant, la résine est très répandue, alors que l'ambre n'est trouvé que dans de rares gisements ou dans certaines zones restreintes, faisant ainsi de l'ambre un matériau unique et précieux rattaché à la catégorie des fossiles. La transformation de la résine en ambre nécessite des conditions particulières. Cette transformation semble relativement longue puisque les ambres les plus jeunes sont datés de plusieurs millions d'années (Langenheim, 2003). Un fossile étant défini, selon le Larousse (2024) comme correspondant à un « *Débris ou empreinte de plante ou d'animal, ensevelis dans les couches rocheuses antérieures à la période géologique actuelle, et qui s'y sont conservés* », l'ambre peut donc être considéré comme une résine végétale fossile.

Ainsi, pour comprendre la formation et la chimie des ambres, il est important de connaître et d'étudier la chimie des résines actuelles, en appliquant le principe de l'actualisme.

La première partie de ce chapitre est donc consacrée à l'étude de résines actuelles. Plus particulièrement, ce chapitre abordera la chimie des résines, la biosynthèse de leurs constituants ainsi que les principaux végétaux producteurs de résines. Les principales caractéristiques moléculaires des résines actuelles seront présentées sur la base d'une étude bibliographique et de l'analyse chimique de résines fraîches provenant de différentes sources, dont, entre autres, le jardin botanique de Strasbourg et le Musée National d'Histoire Naturelle de Paris.

La seconde partie de ce chapitre sera consacrée à l'ambre, sa définition, sa chimie ainsi que les processus conduisant à sa formation à partir de la résine. A partir de l'étude de la littérature portant sur les sites où de l'ambre est trouvé, la production de l'ambre au cours des temps géologiques sera discutée. Enfin, une troisième partie abordera rapidement la place de l'ambre en tant que matériau en contexte économique et religieux.

I.2. Les résines, un exsudat spécifique des plantes supérieures

I.2.1. Définition des résines et compositions

Initialement, le nom « résine » désignait toutes les substances hydrophobes sécrétées par les plantes, ou « exsudats ». Cette définition, relativement vague et imprécise, ne permet pas la distinction entre le mot « résine » et « exsudat », qui sont d'ailleurs souvent utilisés indifféremment (Burger, 2008). En effet, le mot « exsudat », défini selon le Larousse comme « un liquide suintant naturellement ou accidentellement d'un végétal » désigne, outre la résine, un grand nombre de matériaux visqueux de compositions extrêmement diverses, comme les gommes à base de polysaccharides ou les caoutchoucs. Les premières études portant sur la chimie des résines et de leurs modalités d'excrétion ont été réalisées au début du XX^{ème} siècle (Tschirch, 1906), mettant ainsi en évidence une grande variabilité chimique parmi les exsudats des plantes. Ce n'est cependant qu'à partir du milieu du XX^{ème} siècle que s'effectuent les plus importantes avancées sur la chimie des résines, avec notamment l'essor des techniques analytiques (§I.3.3). (Langenheim, 2003 ; Seyfullah et al., 2018 ; Vávra, 2009). Ces études ont ainsi mis en évidence la différence de composition entre les résines et les autres exsudats, et ont conduit à une meilleure compréhension des voies métaboliques mises en jeu dans la biosynthèse de leurs constituants (e.g. Goodwin, 1973, Langenheim, 2003 ; Niitsu et al., 2022; Tholl, 2015).

Ces études ont notamment montré que les résines sont majoritairement composées de terpénoïdes et/ou de composés phénoliques, contrairement aux gommes et mucilages qui sont constitués de polysaccharides, ou les latex (caoutchouc) qui sont constitués d'eau et de polyisoprénoïdes polymérisés (Burger, 2008 ; Langenheim, 2003 ; **Tableau I.1**).

Nom de l'exsudat	Composition	Références		
Résines terpéniques	Terpénoïdes libres et polymérisés	Anderson (1995), Langenheim (2003), Seyfullah et al. (2018)		
Résines phénoliques	Terpénoïdes dont phénoliques	Langenheim (2003)		
Gommes	Polysaccharides	Langenheim (2003)		
Mucilages	Polysaccharides	Langenheim (2003)		
Latex	Polyterpénoïdes, protéines, hydrates de carbone, composés phénoliques	Burger (2008), Langenheim (2003)		

Tableau I.1. Exsudats végétaux et principa	ales caractéristiques chimiques.
--	----------------------------------

Les terpénoïdes sont une classe de composés organiques basés sur des unités terpéniques largement répandus dans les organismes vivants (**Figure I.1**). A ce jour, plus de 35000 composés terpéniques ont été décrits (Langenheim, 2003). Très largement diversifiés, ceux-ci sont séparés en deux catégories. Les terpénoïdes essentiels à la vie cellulaire comme les stéroïdes présents dans les membranes, et les terpénoïdes dits « secondaires » qui sont issus du métabolisme secondaire (i.e. un ensemble des processus dont la finalité n'est pas la création d'énergie). Cette dernière catégorie est la plus diversifiée et sera la catégorie la plus développée dans ce chapitre.

Les composés phénoliques sont, quant à eux, constitués d'un cycle aromatique et d'une fonction phénolique (**Figure I.1**).



Unité terpénique Unité phénolique

Figure I.1. Unités de base des terpénoïdes et des phénols.

Les différents exsudats pouvant parfois se ressembler morphologiquement (coulées visqueuses), le moyen le plus efficace pour différencier les résines des autres exsudats est d'analyser leurs constituants, et donc les voies de biosynthèse mises en œuvre.

C'est pour cela qu'actuellement, la définition la plus consensuelle des résines a été donnée par Langenheim (2003) qui les définit comme des « mélanges lipophiles de composés volatils et non-volatils secondaires de type terpénoïdes et phénols qui sont usuellement sécrétés dans des structures spécialisées [...] avec un rôle dans les

interactions écologiques ». Ici, la notion de « composés secondaires » fait référence au fait que ceux-ci, qui constituent les résines, proviennent du métabolisme secondaire de la plante (Langenheim, 2003).

Il existe deux grandes catégories de résines identifiées en fonction de leurs constituants prédominants. Les résines terpéniques, les plus communes dans le règne végétal, sont constituées essentiellement de composés terpéniques, tandis que les résines phénoliques, beaucoup plus rares dans le monde végétal, sont composées d'un mélange de terpènes et de composés phénoliques (Langenheim, 2003). Les résines phénoliques sont notamment produites par les espèces du genre *Xanthorrhoea* (Xanthorrhoeaceae, Australie). Celles-ci restent vraiment anecdotiques dans le monde végétal, et la plupart des résines sont donc essentiellement des résines terpéniques (Langenheim, 2003).

Dans certains cas, la résine est produite et sécrétée dans des structures spécialisées, et est produite par une plante saine (Langenheim, 2003 ; Weitschat et Wichard, 2003). Ce type de résine est appelé résine préformée ou constitutive. En revanche, le plus souvent, la production de résine est d'origine pathologique et est causée par un stress chez la plante. La résine, dans ce cas, est un moyen de défense face à une blessure ou une attaque de pathogènes (Hovaneissian et al., 2006; Langenheim, 2003). L'exsudation de résine est donc dans ce cas induite ou traumatique (Langenheim, 2003). Selon les espèces, la composition des résines induites et constitutives varie et dépend des conditions climatiques et des stress potentiels (Chiavari et al., 1995a, 1995b). La résine traumatique a plusieurs rôles, dont celui d'agent de cicatrisation (Lampert, 2002a ; Langenheim, 2003). Il existe de nombreux rôles associés aux résines, allant de la protection cicatricielle à l'excrétion de composés toxiques (§I.2.2.4.).

I.2.2. Production des résines terpéniques

I.2.2.1. Classification des terpénoïdes et biosynthèse

Les résines terpéniques sont donc constituées principalement de terpénoïdes qui sont une catégorie de lipides organiques portant des groupes fonctionnels. Les terpènes, quant à eux, correspondent à une catégorie apparentée d'hydrocarbures ne portant pas de groupe(s) fonctionnel(s). Les terpènes et terpénoïdes sont tous construits à partir d'unités isopréniques (**Figure I.1**) (Langenheim, 2003 ; Runeckles et Mabry, 2013, Tholl, 2015). Le nom provient de la térébenthine, une oléorésine de *Pistacia terebinthus* nommée « Terpentin » en allemand. Le chimiste Friedrich Kékulé von Stradonitz a isolé les composés de cette résine en 1866 et les a désignés par le terme « terpénoïdes » (Bohlmann et al., 1998 ; Croteau et Johnson, 1985).

Ces composés sont très diversifiés du point de vue fonctionnel et structural (Langenheim, 2003). Les terpénoïdes jouent un rôle, par exemple, dans la fluidité membranaire, le transport d'électrons ou encore la régulation et le développement cellulaire (Lange et al., 1998 ; McCaskill et Croteau, 1998). Il faut distinguer les terpénoïdes au rôle physiologique essentiel (*i.e.* métabolites primaires), comme par exemple les stéroïdes, qui sont des constituants des membranes cellulaires des organismes, des terpénoïdes dits non essentiels (i.e. métabolites secondaires) intervenant, par exemple, dans la défense des plantes face à une agression (Burger, 2008 ; Langenheim, 2003). Cette seconde catégorie de composés, dont les fonctions ne sont pas directement impliquées dans le fonctionnement énergétique de l'organisme, est la plus diversifiée puisque près de 30 000 terpènes en font partie sur les 35 000 décrits.

Parmi les terpénoïdes et terpènes, on distingue plusieurs sous-classes dépendant du nombre d'unités isopréniques assemblées pour construire les squelettes, dont les principales sont les monoterpènes (C₁₀), les sesquiterpènes (C₁₅), les diterpènes (C₂₀), les triterpènes (C₃₀) et les tétraterpènes (C₄₀) (**Figure I.2**).

Il existe deux voies de biosynthèse conduisant à leur formation (**Figure I.3**). Les précurseurs des terpénoïdes sont le isopentényl-pyrophosphate (IPP) et le diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP) (Eisenreich et al., 2004 ; Langenheim, 2003 ; Rohdich et al., 2001). Ils sont formés lors de la biosynthèse soit à partir du mévalonate (MVA) (voie du MVA), ou alors à partir du méthylérythriol phosphate (MEP) (voie du MEP ; **Figure I.3**).



TERPENOIDES

Figure I.2. Quelques catégories de terpénoïdes et exemples de structures associées.

La première voie de biosynthèse est celle du mévalonate (MVA) identifiée vers la moitié du XX^{ème} siècle (Dewick, 2002 ; Lange et al., 1998 ; Langenheim, 2003 ; Tholl, 2015). Cette voie est à l'origine de la formation des sesquiterpènes (C₁₅) et des triterpènes (C₃₀) dans le cytosol (i.e. le liquide intracellulaire) de nombreux organismes vivants, dont les plantes. La décarboxylation du pyruvate conduit à la formation de l'acétyl-CoA. Ensuite, l'association de trois acétyl-CoA conduit au mévalonate qui est converti, après adjonction d'un groupement pyrophosphate (OPP), en IPP et en DMAPP, son isomère.

La condensation de trois IPP donne le farnésyl-pyrophosphate (FPP), comprenant 15 atomes de carbone. Celui-ci est à l'origine des sesquiterpènes (C₁₅) et du squalène à partir duquel sont formés les triterpènes par dimérisation de 2 unités en C₁₅ (C₃₀) (**Figure I.4**).



Figure I.3. Principales voies de formation des terpénoïdes dans les cellules de plantes et compartiments associés aux différentes transformations (Bohlmann et al., 1998; Dubey et al., 2003; Langenheim, 2003; Rohdich et al., 2001). DMAPP : dimétylalyl-pyrophosphate ; MEP : méthylérythriol-phosphate, MVA : mévalonate, IPP : isopentényl-pyrophosphate, GPP : géranyl-pyrophosphate, GGPP : géranylgéranyl-pyrophosphate, FPP : Farnésyl-pyrophosphate. Figure réalisée sur biorender.com.

Jusqu'à la fin du XX^{ème} siècle, la voie du MVA était la seule voie connue de synthèse des terpénoïdes. Cependant, Rohmer et al. (1999) ont mis en évidence une voie de biosynthèse alternative chez les bactéries à l'aide d'expériences de marquage au ¹³C et ²H. Cette voie de biosynthèse des isoprénoïdes est également utilisée par les plantes, mais est exclusivement opérante dans les chloroplastes (**Figure I.3**), alors que la voie du mévalonate est suivie dans le cytosol. Cette voie comprend la formation d'un intermédiaire clé, le méthylérythritol phosphate (MEP) dont cette voie de biosynthèse tire le nom (**Figure I.5**).



Figure I.4. Voie du mévalonate (MVA) à l'origine des sesquiterpènes et des triterpènes chez les plantes (Langenheim, 2003 ; Rohmer, 1999).

Celle-ci peut aussi être appelée voie non-mévalonique, ou encore la voie DOXP (1désoxy-D-xylulose-5-phosphate), ce composé étant le premier intermédiaire de cette voie (Langenheim, 2003) formé par la condensation du pyruvate avec le Dglycéraldéhyde-3-phosphate (**Figure 1.5**) qui est ensuite réarrangé et réduit pour conduire au MEP (Eisenreich et al., 2004 ; Langenheim, 2003). Ensuite, l'action en séquence de nombreuses enzymes transforme le MEP en IPP ou en DMAPP. La condensation de 4 unités isopréniques permet la formation du géranylgéranyl pyrophosphate (GGPP) qui sera réarrangé par la suite en diterpènes (C₂₀) (Dewick, 2002 ; Eisenreich et al., 2004).



Figure I.5. Voie de biosynthèse du méthylérythritol phosphate (MEP ou voie nonmévalonique) conduisant à la formation de mono- et diterpènes (Eisenreich et al., 2004 ; Langenheim, 2003 ; Rohdich et al., 2001 ; Rohmer, 1999)

Les voies de biosynthèse impliquent de nombreuses enzymes et sont donc codées par des gènes multiples. De plus, la séparation en différents compartiments des étapes des voies de biosynthèse permet une régulation plus fine.

La présentation de ces voies constitue une vision simplifiée des processus réels et il existe de nombreuses variations dans le Vivant. De plus, il est probable que ces voies interagissent plus que ce qui a été expliqué ci-dessus. En effet, la séparation entre les plastides et le cytosol est loin d'être étanche, et il existe des échanges entre les différents compartiments, permettant ainsi la création de composés complexes (Eisenreich et al., 2004).

La grande diversité des terpènes est donc due principalement aux dernières étapes des voies de biosynthèse faisant intervenir certaines enzymes nommées les terpènes synthétases. Celles-ci sont très diversifiées et catalysent la formation de composés très spécifiques (Langenheim, 2003).

I.2.2.2. Caractéristiques chimiques des résines

Les études moléculaires réalisées sur les résines (Langenheim, 2003 ; Steigenberger, 2013) ont montré que celles-ci présentaient des polymères de tailles importante constitué de la répétition d'une sous-unité mono ou diterpénique (e.g. labdanoïdes) et de composés terpéniques libres. Dès la sécrétion de la résine, la part de cette composante macromoléculaire dans la résine est amplifiée par des réactions de polymérisation induites, notamment, par l'action des rayons solaires ou des réactions d'oxydation conduisant à la formation d'espèces radicalaires réactives (Langenheim, 2003 ; **Figure I.6**).

La composante non-macromoléculaire de la résine est constituée d'une fraction volatile principalement composée de monoterpènes et de sesquiterpènes. Celle-ci représente entre 20 et 50% de cette composante et a été largement étudiée. Ses constituants sont à l'origine de l'odeur de la résine et sont impliqués dans la communication de la plante avec son environnement (Boone et al., 2011 ; Caroll et al., 2011 ; Croteau et Johnson, 1985 ; Wang et al., 1997). C'est cependant la partie la moins volatile de la composante non-macromoléculaire des résines qui généralement concentre les composés spécifiques d'intérêt chimiotaxonomique de la plante (Langenheim, 2003 ; Seyfullah et al., 2018).

I.2.2.3. Exsudation de la résine

Les résines végétales sont produites par des cellules spécialisées présentes dans l'épithélium : les cellules parenchymateuses. Ces cellules sont ubiquistes dans les différents organes de la plante (racines, feuilles, etc... ; Langenheim, 2003).

Ces cellules se dissocient et forment des lacunes en poches ou canaux dont le nombre, l'aspect et la taille dépendent des espèces. Les lacunes en canaux restent actives plus longtemps et produisent donc plus de résine que les lacunes en poches. Ces deux types de lacunes sont trouvés dans les structures végétatives de la plante (racines, tiges, tronc), mais aussi dans les structures reproductrices (fleurs, fruits). Seule la famille des Fabacées présente les deux types sécrétoires (Langenheim, 2003).

Ces lacunes constituent l'appareil sécréteur où sont stockés l'ensemble des produits de sécrétion. Lors d'une blessure, le suintement est « passif » puisqu'il est dû à la

rupture de ces lacunes. La quantité de résine lors d'un traumatisme est donc proportionnelle à la taille de la blessure (Hovaneissian et al., 2006 ; Lampert, 2002 ; Langenheim, 2003).

La biosynthèse de la résine est compartimentée (§I.2.2.1) et fait intervenir les plastides, le cytoplasme et le réticulum endoplasmique lisse (REL) des cellules sécrétrices. Le REL possède la capacité de fusionner avec les autres organites cellulaires et est donc responsable du transport cellulaire des composants des résines. Il forme des petites vésicules circulant vers la membrane plasmique qui déchargent leur contenu à l'extérieur de la cellule (Langenheim, 2003).

L'exportation de la résine des cellules productrices vers les zones de stockage peut s'effectuer via les espaces intercellulaires (Carde et al., 1980 ; Langenheim, 2003). Chez *Pinus* par exemple, des vésicules circulent dans ces espaces pour transporter la résine produite (Bernard-Dagan, 1988 ; Bernard-Dagan et al., 1982).

Dans la plupart des cas, cependant, la résine est transportée via des canaux résinifères. Il est à noter cependant que de nombreuses espèces productrices de résine ne présentent pas de canaux résinifères, impliquant que l'unique mode de transport de la résine chez ces espèces se fait via les espaces intercellulaires. La résine peut ensuite être stockée dans des cystes ou des poches résinifères (Langenheim, 2003).

I.2.2.4. Rôle des résines

Les résines peuvent être physiologiques (i.e. produites par une plante saine) et sont alors appelées « préformées » ou « constitutives », mais elles peuvent également être pathologiques (i.e. production consécutive à un stress biotique ou abiotique). La résine est donc dite « induite » (Chiavari et al., 1995b ; Langenheim, 2003).

Les premières hypothèses concernant le rôle des résines voulaient qu'elles soient des substances de stockage intercellulaire de composés toxiques pour la plante qui participeraient donc à l'excrétion (Langenheim, 2003). La fonction de défense ne serait donc pas première selon cette hypothèse et serait en conséquence secondaire (Langenheim, 2003 ; Seyfullah et al., 2018).

Certaines études ont aussi montré que les résines pouvaient agir en tant qu'agents cicatrisants en cas de blessure (Langenheim, 2003 ; Seyfullah et al., 2018). Il a également été observé que les résines protégeaient les jeunes feuilles et tiges de la

dessication, des radiations UV ainsi que des variations environnementales fortes (Langenheim, 2003).

I.2.3. Familles botaniques actuelles productrices de résines

Actuellement, toutes les familles de plantes ne produisent pas de résine. Les résines sont principalement fabriquées par les conifères, également connus sous le nom de « résineux », ainsi que par certaines familles d'Angiospermes, notamment les Burséracées, Diptérocarpacées, Anacardiacées et Fabacées (Langenheim, 2003).

Comme cela a été abordé précédemment, les résines se composent d'une partie macromoléculaire peu spécifique et de terpénoïdes de faible poids moléculaire, qui, eux, sont d'un grand intérêt chimiotaxonomique. Dans cette partie, nous allons donc nous concentrer uniquement sur ces derniers pour mettre en lumière les principales caractéristiques moléculaires des grandes familles productrices de résines contemporaines.

I.2.3.1. Les conifères

Parmi les Gymnospermes, les conifères sont les principaux producteurs de résine. Il existe actuellement 7 familles de conifères (**Figure I.6**). Les familles les plus diversifiées sont les Pinacées avec plus de 250 espèces, les Podocarpacées avec 156 espèces, les Cupressacées avec 140 espèces et les Araucariacées avec 41 espèces. Ce sont des plantes vasculaires dont les graines sont portées par des écailles regroupées en cônes, spécifiques au clade des coniférophytes (ou pinophytes). Actuellement, ce sont uniquement des plantes ligneuses et ce sont majoritairement des arbres. La répartition des conifères est géographiquement ubiquiste et ceux-ci peuvent être prédominants dans certains environnements (Langenheim, 2003).



Figure I.6. Arbre phylogénétique des conifères. Le nombre de genres et d'espèces actuelles associés à ces familles est également indiqué.

Les premiers fossiles de Gymnospermes apparaissent vers la fin du Carbonifère (-300 à -310 Ma) (Hernandez-Castillo, 2001 ; Plotnick et al., 2009). Les premiers cônes typiques du clade des conifères apparaissent il y a 225 millions d'années, marquant ainsi l'apparition de cette famille.

C'est durant le Mésozoïque, cependant, que la plupart des familles de conifères voient le jour et une grande partie des environnements sont dominés par ceux-ci durant cette période. Leur diversité diminue vers la fin du Mésozoïque, durant le Crétacé, qui voit apparaître les Angiospermes, qui deviendront les espèces végétales dominantes dans de nombreux environnements (Langenheim, 2003 ; Neale et Wheeler, 2019 ; Taylor, 2009).

Les résines de conifères sont caractérisées par une fraction volatile importante (20 à 50% des composés libres) constituée de monoterpènes (C₁₀) et sesquiterpènes (C₁₅) (Langenheim, 2003). Outre une fraction volatile importante, les résines de conifères contiennent principalement des diterpènes (C₂₀). Plus particulièrement, les résines de conifères se caractérisent par la présence de plusieurs familles de diterpènes dont les proportions relatives varient en fonction des familles botaniques (**Figure I.7**).



Figure I.7. Squelettes hydrocarbonés des principales familles de diterpènes présentes dans les résines de conifères.

I.2.3.1.1. Les résines de Pinacées

Les Pinacées représentent près d'un tiers des espèces de conifères. Celles-ci, avec les Araucariacées, sont les producteurs actuels de résine les plus prolifiques Cette famille est particulièrement bien représentée dans l'hémisphère Nord. La seule espèce présente actuellement au sud de l'équateur est le pin de Sumatra (*Pinus markusii*). Les Pinacées sont réparties en quatre sous-familles : *Abietinoideae, Pinoideae, Piceoideae* et *Laricoideae* (Langenheim, 2003 ; Gernandt et al., 2020 ; Lin et al., 2010). Les genres appartenant à chaque sous-famille sont présentés dans la **figure I.8**.

Les résines de Pinacées sont caractérisées par une texture peu visqueuse, dite « douce » (Langenheim, 2003). Certaines études ont conduit à proposer que cette viscosité serait due à une faible importance de la composante macromoléculaire (Langenheim, 2003 ; Mills et White, 1994). Cependant, il est à noter que cela n'a jamais été formellement démontré et cette hypothèse résulte sans doute simplement du fait que les résines de Pinacées sont usuellement peu visqueuses et facilement solubles dans de nombreux solvants organiques.

Dans la fraction volatile, les isomères du pinène sont présents dans l'ensemble des résines de cette famille, même si ces composés ne sont pas spécifiques à ce taxon (e.g. Cannac et al., 2009 ; loannou et al., 2014 ; Mirov et al., 1961 ; Silori et al., 2019). En dehors de cette fraction volatile, la composante non macromoléculaire est dominée par les diterpènes ayant un squelette de type abiétique et (iso)pimarique (**Figure I.10**). La plupart des composés présents sont sous la forme d'acides diterpéniques (Bailly, 2015 ; Croteau et Johnson, 1985 ; Otto et al., 2007 ; Steigenberger, 2013).



Figure I.8. Arbre phylogénétique des Pinacées (d'après Gernandt et al., 2020 et Lin et al., 2010). *Genres dont sont issues les résines de Pinacées étudiées lors de cette thèse.

En dehors de cette fraction volatile, la composante non macromoléculaire est dominée par les diterpènes ayant un squelette de type abiétique et (iso)pimarique (**Figure I.9**). La plupart des composés présents sont sous la forme d'acides diterpéniques (Bailly, 2015 ; Croteau et Johnson, 1985 ; Otto et al., 2007 ; Steigenberger, 2013). Plus particulièrement, les fractions non macromoléculaires des résines de Pinacées sont dominées par des acides diterpéniques apparentés à l'acide abiétique (**6**) et à l'acide (iso)pimarique (**1**)/(**3**). C'est l'absence des autres familles de diterpènes qui est caractéristiques des résines de Pinacées. Par exemple, il n'existe à notre connaissance dans la littérature aucun exemple de résine de Pinacées comprenant des composés diterpéniques à quatre cycles (e.g. de la série du kaurane (**55**)) ou de diterpénoïdes phénoliques.

Les acides résiniques (i.e. acides diterpéniques) les plus fréquemment trouvés dans les résines de Pinacées sont : l'acide abiétique (6), déhydroabiétique (5), néoabiétique (7) (squelettes de type abiétane), l'acide pimarique (1), sandaracopimarique (2) et isopimarique (3) (squelettes de type (iso)pimarane) (Bailly, 2015 ; Mills et White, 1999 ; Scalarone et al., 2002). Même si ces composés sont très souvent trouvés parmi les résines de ce groupe, leurs proportions varient beaucoup selon les genres et les espèces.

En effet, les distributions moléculaires des résines de *Pinus sylvestris* (**Figure I.9.A.**) et *Pinus cembra* (**Figure I.9.B**) sont dominées par les dérivés de l'acide abiétique (6) et pimarique (1). Cependant, la résine du *Pinus cembra* comprend également un labdanoïde, l'acide lambertianique (11) qu'on ne trouve pas dans les autres résines. De manière générale, les labdanoïdes sont plutôt rares parmi les résines appartenant à ce genre, mais ne sont pas absents. En effet, les résines des genres *Pinus* et *Picea* peuvent contenir des labdanoïdes fonctionnalisés en faibles quantités (Mills et White, 1977 ; Raldugin et al., 1976 ; Song et al., 1995 ; Sturm, 1982).

Les résines du genre *Larix* sont assez particulières parmi ce groupe, car celles-ci sont relativement riches en labdanoïdes et plus particulièrement en larixol (**14**) et en acétate de larixol (**15**)/(**15**') qui sont caractéristiques des résines du genre (Mills, 1973 ; Osete-Cortina et al., 2004 ; Tanaka et al., 1997).

Dans le cas de notre étude de la résine de *L. decidua*, l'extrait a été acétylé avant analyse par GC-MS, et on ne peut pas savoir de ce fait quelle est la part de larixol (14) et d'acétate naturel de larixol (15/15') dans cette résine. Si une partie du larixol (14) n'a pas été acétylée lors de l'étape de dérivation de l'extrait lipidique, cela est sans doute dû à l'encombrement stérique au niveau de la fonction alcool en position 6 sur le squelette labdanoïde. Quoi qu'il en soit, le larixol (14) et l'acétate de larixol (15/(15') sont des composés importants de la résine de *Larix decidua* (Figure I.9).

Les résines du genre *Picea* sont caractérisées par la présence du *cis*-abiénol (**17**) et de l'oxyde de manoyl (**16**) (Raldugin et al., 1991). Les résines de ce genre sont également caractérisées par la présence d'acide pimarique (**1**) et d'acide sandaracopimarique (**2**) en quantités équivalentes (Bailly, 2015 ; Martin et al., 2002 ; Radulgin et al., 1991).

Dans le cas de nos analyses, les résines du genre *Abies* présentent, quant à elles, une prédominance des composés dérivant de l'acide abiétique (6) et déhydroabiétique (5). Par exemple, les résines d'*Abies alba, Abies cephalonica* et *Abies concolor* sont toutes trois largement dominées par les composés de cette série (**Figure I.10**). Le *cis*-abiénol (17) est caractéristique des résines de ce genre (Steigenberger, 2013), mais n'a cependant été détecté que dans la résine de *Abies alba*. Cette résine comprend également l'oxyde de manoyle (16) en faibles quantités. Il est à noter que les résines du genre *Abies* ne contiennent pas d'acide pimarique (1), contrairement à beaucoup de résines associées à d'autres genres de cette famille. L'abiétol (20) et le déhydroabiétol (21) ont pu être détectés en proportions appréciables dans les résines de *Abies cephalonic* et *Abies concolor*.



Figure I.9. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) des fractions apolaires isolées à partir des extraits organiques acétylés et méthylés de résines fraîches de Pinus sylvestris (A), Pinus cembra (B) et Larix decidua (C). En vert sont représentés les diterpènes de la série de l'abiétane, en bleu de la série dérivant de l'(iso)pimarane et en violet les labdanoïdes. Les fractions ont été acétylées et méthylées avant l'analyse.



Figure I.10. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) des fractions apolaires isolées à partir des extraits organiques acétylés et méthylés de résines fraîches de Abies alba (A), Abies cephalonica (B) et Abies concolor (C). En vert sont représentés les diterpènes de la série de l'abiétane, en bleu de la série de l'(iso)pimarane et en violet les labdanoïdes. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques et les fonction alcool ont été acétylés.

Les résines du genre *Pseudotsuga* présentent quant à elles une composition proche de celle des résines du genre *Pinus*. Il est à noter par ailleurs que certaines de ces résines se distinguent des autres résines de conifères par la présence d'esters méthyliques de diterpènes natifs, que notre traitement d'échantillons (méthylation des acides avant analyse par GC-MS) ne permet pas de distinguer des acides diterpéniques (Erdtman et al., 1968 ; Norin, 1972). Des études montrent également la présence d'isocembrol (**22**) et de cembrène (**23**) en faibles quantités (**Figure I.11** ; Mills et White, 1977).



Figure I.11. Structure de l'isocembrol (22) et du cembrène (23).

Les résines du genre *Cedrus* (**Figure I.12**) sont caractérisées par des proportions importantes d'acide isopimarique (**3**) et l'absence d'acide pimarique (**1**), à l'instar des résines du genre *Abies*. Cependant, contrairement aux espèces du genre *Abies*, les résines du genre *Cedrus* présentent des proportions beaucoup plus faibles d'acide abiétique (**6**) et de ses dérivés (**Figure I.12**). Les résines du genre *Cedrus* contiennent très peu de labdanoïdes (Bailly, 2015 ; Langenheim, 2003 ; Steigenberger, 2013). Par exemple, les labdanoïdes sont absents des fractions non macromoléculaires des résines de *Cedrus atlantica*. En revanche, il est à noter que la résine de *Cedrus brevifolia* contient des proportions non négligeables d'oxyde de manoyle (**16**) mais, contrairement aux résines d'*Abies*, l'abiénol (**17**) n'a pas été détecté.



Figure I.12. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) des fractions apolaires isolées à partir des extraits organiques acétylés et méthylés de résines fraîches de Cedrus atlantica (**A**) et de Cedrus brevifolia (**B**). En vert sont représentés les diterpènes de la série de l'abiétane, en bleu de la série de l'(iso)pimarane et en violet les labdanoïdes. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Pour conclure, les résines de Pinacées sont largement dominées par des diterpènes dérivant de l'acide abiétique (6) et sandaracopimarique (2) (Tableau I.2). Les labdanoïdes peuvent y être présents, mais en très faibles quantités dans la composante non macromoléculaire. Dans ce cas, leurs structures sont souvent relativement spécifiques de ce genre. A notre connaissance, aucun diterpénoïde phénolique n'a été détecté dans les résines de cette famille.

Tableau I.2. Comparaison moléculaire des principaux genres de Pinacées produisant de la
résine. [1] Bol'shakova et al., 1987 ; [2] Steigenberger, 2013 ; [3] Martin et al., 2002 ; [4]
Radulgin et al., 1991 ; [5] Mills, 1973. Les numéros en gras correspondent aux structures
moléculaires présentées en fin de chapitre (§ I.7).

	Pinus	Picea	Cedrus	Larix	Abies
Pimaranes	(1) > (2)	(2) > (1)	(2) > (1)	(1) absent	(1) absent
Abiétanes	(132) souvent présent	(132) peut être présent (<i>P. abies</i>) [1]	(132) présent abiétanes = pimaranes		abiétanes > pimaranes
Labdanes	(11) présent (<i>P. cembra</i>)	(16) présent [1] (17) présent [2,3,4]	(16) présent	(14) et (13) importants [1,5]	(17) et (16) présents

I.2.3.1.2. Les résines de Cupressacées

Les Cupressacées représentent la plus grande famille actuelle de conifères, puisqu'elle contient plus de 40 genres et 140 espèces. En phylogénie classique, cette famille ne comprenait que les Cupressacées *sensu stricto* (**Figure I.13**), mais, suite à l'évaluation génétique des conifères, l'appellation « Cupressacées » désigne maintenant les anciennes Cupressacées ainsi que les Taxacées et Céphalotaxacées (Cupressus *sensu lato*). Les Cupressacées *s.l.* sont constituées actuellement de 7 sous-familles (**Figure I.13**), dont la plus importante est celle des *Cupressoideae*.

La fraction volatile des résines de Cupressacées est très souvent associée aux dérivés du cuparane (27) et du cédrane (28) (Figure I.14), et sont considérés comme des biomarqueurs typiques de ce taxon (Langenheim, 2003 ; Otto et Wilde, 2001). Toutefois, ils ne sont pas exclusivement rattachés à cette famille car ils peuvent aussi se trouver dans des résines de Pinacées, et même dans certains groupes hors conifères, comme les Lamiacées (Angiospermes) (Otto et Wilde, 2001).



Figure I.13. Arbre phylogénétique simplifié des Cupressacées s.l. établi d'après Yang et al. (2012) avec les sous-familles associées. *Genres auxquels appartiennent les échantillons étudiés au cours de cette thèse.



Figure I.14. Squelettes des sesquiterpènes associés aux Cupressacées

Les Cupressacées *s.s.* sont des résines contenant une grande quantité de labdanoïdes comme l'acide communique (**29**) (Steigenberger, 2013). Associés à ces labdanoïdes, les résines de Cupressacées sont également caractérisées par la présence de diterpénoïdes phénoliques.

Les résines de Cupressoidées

Les Cupressoidées représentent la sous-famille des Cupressacées la plus importante actuellement (**Figure I.14**). Les résines de ces sous-familles sont relativement diversifiées et sont majoritairement dominées par les labdanoïdes et les dérivés de l'acide pimarique/sandaracopimarique (**1/2**) (Cox et al., 2007 ; Otto et Wilde, 2001). Par exemple, la résine de *Cupressus arizonica* (**Figure I.15**) est caractérisée par la prédominance de l'acide communique (**29**). L'acide sandaracopimarique (**2**) est aussi présent en faibles quantités. Les diterpénoïdes phénoliques comme le ferruginol (**32**) et le sempervirol (**33**) ont également été détectés, mais ne sont pas les composés les plus abondants. Il est à noter qu'au sein du genre *Cupressus*, les proportions de diterpénoïdes phénoliques semblent être très variables, puisque la résine de *Cupressus sempervirens* présente, outre des labdanoïdes, de fortes proportions de diterpènes phénoliques et, plus particulièrement, de sempervirol (**33**) (**Figure I.15**), qui d'ailleurs a été isolé et identifié à partir de cette résine (Mangoni et Caputo, 1967). Il est à noter que les dérivés de l'acide abiétique (**6**) n'ont pas été détectés dans les résines de *Cupressus*.

Les résines de *Juniperus* sont caractérisées quant à elles par une prédominance des labddanoïdes et une contribution de dérivés de l'acide (iso)pimarique (**1/3**) et sandaracopimarique (**2**) (Adams et al., 1980 ; Cox et al., 2007 ; Otto et Wilde, 2001). Des dérivés de l'acide abiétique (**6**) ont aussi pu être détectés dans certaines espèces du genre, mais ceux-ci ne sont pas dominants (Adams et al., 1980 ; Otto et Wilde, 2001). Ainsi, la résine de *Juniperus communis* présente, à côté des labdanoïdes (acide communique (**29**), acide isocupressique (**31**), acide imbricatolique (**30**), et une faible contribution de l'acide sandaracopimarique (**2**) (**Figure I.16**).

A cet égard, l'acide imbricatolique (**30**), l'acide cupressique (**34**), le torulosol (**35**) et l'oxyde de manoyle (**16**) ont été mis en évidence dans la résine de *Juniperus turbinata* (Venditti et al., 2018) et ces composés ont aussi été observés dans les résines de *Juniperus rigida* et *Juniperus phoenicea* (Abdel-Kader et Alqasoumi., 2008 ; Woo et al., 2011).



Figure I.15. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) des fractions apolaires isolées à partir des extraits organiques acétylés et méthylés de résines fraîches de Cupressus arizonica (A) et de Cupressus sempervirens (B). En bleu sont représentés les diterpènes de la série de l'(iso)pimarane, en violet les labdanoïdes et en orange les diterpénoïdes phénoliques. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques et les alcools sous forme d'acétates.



Figure I.16. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique acétylé et méthylé d'une résine fraîche de Juniperus communis. En bleu sont représentés les diterpènes de la série de l'(iso)pimarane, en violet les labdanoïdes et en orange les diterpénoïdes phénoliques. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides carboxyliques sous forme d'esters méthyliques

Les résines de certaines autres espèces rattachées à d'autres genres de Cupressacées, comme *Platycladus orientalis* et *Chamaecyparis lawsoniana* (**Figure I.17 B** et **A**), présentent des distributions moléculaires caractérisées par une contribution significative des dérivés de l'acide sandaracopimarique (2). Plus particulièrement, la résine de *Platycladus orientalis* est presqu'exclusivement constituée de dérivés de cette famille ainsi que de diterpénoïdes phénoliques. Dans le cas de la résine de *Chamaecyparis lawsoniona*, les composés prédominants restent les labdanoïdes, comme l'acide isocupressique (**31**) (**Figure I.17.A**).



Figure I.17. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) des fractions apolaires isolées à partir des extraits organiques acétylés et méthylés d'une résine fraîche de (A) Chamaecyparis lawsoniana ; (B) Platycladus orientalis ; (C) Calocedrus decurrens. En vert sont représentés les diterpènes de la série de l'abiétane, en bleu de la série de l'(iso)pimarane, en violet les labdanoïdes et en orange les diterpénoïdes phénoliques. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides carboxyliques sous forme d'esters méthyliques.

Pour conclure, les résines de Cupressoideae sont constituées majoritairement de labdanoïdes comme l'acide communique (29) et ses dérivés, ainsi que des dérivés de l'acide sandaracopimarique (2). L'ensemble des résines de Cupressoideae étudiées dans le cadre de cette thèse présentent des diterpénoïdes phénoliques qui sont caractéristiques des Cupressacées. Les proportions de ces composés varient cependant beaucoup entre les différentes résines.

Ainsi, les diterpénoïdes phénoliques peuvent compter parmi les composés majeurs, comme dans la résine de *Cupressus sempervirens*, ou n'être présents que sous forme de traces comme dans la résine de *Calocedrus decurrens*. Les dérivés de l'acide abiétique (**6**) sont généralement absents et n'ont été détectés que dans la résine de *Calocedrus decurrens*

Les résines de Callitroidées

Les résines de cette sous-famille sont composées principalement de diterpénoïdes appartenant à la série de l'acide pimarique (1)/acide sandaracopimarique (2) comme l'acide 4-*epi*-pimarique (38) (Figure I.18) (Simoneit et al., 2018). Il est à noter que la structure de l'acide 4-*epi*-pimarique (38) a été proposée uniquement sur la base de l'étude de son spectre de masse par Simoneit et al. (2018). Ainsi, les résines du genre *Callitris* présentent majoritairement des composés de cette famille. Associés à ces composés ont également été observés des labdanoïdes tels que l'acide communique (29), l'acide lambertianique (11) et l'acide callitrisique (39), qui est un épimère de l'acide déhydroabiétique (5) (Simoneit et al., 2018), ainsi que des diterpénoïdes phénoliques : le ferruginol (32) et l'hinokiol (40). L'acide callitrisique (39) a été uniquement reporté dans les résines des Callitroideae (Simoneit et al., 2018). Celui-ci peut être donc considéré comme un biomarqueur robuste de cette famille.



Figure I.18. Principaux composés considérés comme biomarqueurs caractéristiques du genre Callitris (Simoneit et al., 2018). La structure du composé (**38**) est hypothétique.

Les résines de Taxodioidées

Les Taxodioidées produisent des résines constituées principalement de diterpénoïdes phénoliques (Cox et al., 2007 ; Langenheim, 2003 ; Otto et Wilde, 2001 ; Otto et al., 2002), comme cela est illustré dans le cas de la résine de *Taxodium distichum* (**Figure I.19**). Les structures proposées sur la **Figure I.20** sont basées sur l'interprétation des spectres de masse et la comparaison avec des distributions de composés diterpéniques mis en évidence dans des résines de Taxodiacées (Simoneit et al., 2019). Ils comprennent, notamment, le ferruginol (**32**), le 11-hydroxy-ferruginol (**44**), la royleanone (**42**), la taxoquinone (**45**), les 11-hydroxysugiol (**46**) ainsi que des analogues insaturés de ces composés (e.g., (**41**), (**43**), (**47**) ; Simoneit et al., 2019) (**Figure I.19**).



Figure I.19. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique acétylé et méthylé d'une résine fraîche de Taxodium distichum. En orange sont représentés les diterpénoïdes phénoliques. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides carboxyliques sous forme d'esters méthyliques.

Les résines de Séquoioidées

Les résines de Séquoioidées sont riches en diterpénoïdes phénoliques à l'instar des résines de Taxodioidées (**Figure I.20**) (Simoneit et al., 2019). Cependant, au contraire de ces dernières, la résine de *Sequoia sp.* présente des proportions significatives de labdanoïdes tels que l'acide communique (**29**) et l'acide isocupressique (**31**). De façon

plus générale, les résines de *Sequoia* semblent être dominées par les labdanoïdes et les composés phénoliques (Simoneit et al., 2019).



Figure I.20. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique acétylé et méthylé d'une résine fraîche de Sequoia sempervirens. En violet sont représentés les labdanoïdes et en orange les diterpénoïdes phénoliques. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides carboxyliques sous forme d'esters méthyliques.

Les résines de Cunninghamioidées

Les distributions moléculaires des résines de ce groupe sont dominées par les labdanoïdes, à l'instar de beaucoup de résines de Cupressacées, notamment du genre *Cupressus, Sequoia* et *Callitris* (Cox et al., 2007 ; Simoneit et al., 2018, 2019). Ainsi, la résine de *Cunninghamia konishii* est riche en acide communique (**29**) et en un composé (**34**) que nous avons identifié comme étant l'acide cupressique sur la base de son spectre de masse (**Figure I.21**).

Celle-ci contient aussi de très faibles quantités de déhydroabiétol (**21**). De la même façon, cette résine contient peu de dérivés de l'acide sandaracopimarique (**2**) et ne contient pas d'acide pimarique (**1**).


Figure I.21. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique acétylé et méthylé d'une résine fraîche de Cunninghamia konishii. En violet sont représentés les labdanoïdes, en bleu les diterpènes de la série de l'(iso)pimarane et en vert les diterpènes de la série de l'abiétane. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides carboxyliques sous forme d'asters méthyliques.

Pour conclure, les résines de Cupressacées sont relativement diverses en fonction des différentes sous-familles (**Tableau I.3**), bien que la plupart des résines étudiées contiennent des diterpénoïdes phénoliques.

	Abiétanes	Pimaranes	Labadanes	Diterpénoïdes phénoliques
Cupressoidées	Absents à l'exception de <i>C. decurrens</i>	Très présents, surtout acide pimarique (1) et sandaracopimarique (2). Acide isopimarique (3) souvent absent	Très présents, surtout acide communique (29) + agathique (58) et dérivés	Présents de façon variable
Callitroidées	Faibles quantités sauf acide callitrisique (38)	Très présents	Peu présents	Très présents
Taxodioidées	Absents	Absents	Rares	Très présents
Sequoioidées	Absents	Absents	Très présents, surtout acide communique (29) et dérivés	Très présents
Cunninghamioidées	Peu présents	Présents	Dominants	Peu présents

Tableau I.3. Principales caractéristiques chimiques des différentes sous-familles de
Cupressacées. Les numéros en gras correspondent aux structures moléculaires présentées
en fin de chapitre (§ I.7).

I.2.3.1.3. Les résines de Sciadopityacées

Les Sciadopityacées sont constituées actuellement d'une unique espèce, *Sciadopitys verticillata* (appelée « pin parasol du Japon »). Cette famille a été mise à part des Cupressacées du fait d'une divergence génétique relativement importante (Yang et al., 2012). Cependant, les résines de *Sciadopitys* présentent des caractéristiques communes avec celles des Cupressacées. Par exemple, des dérivés du cédrane (28) ont été détectés dans la résine (Otto et Wilde, 2001). En outre, la fraction des composés volatils comprend, en plus des composés de la famille du cédrane (28), un composé spécifique à la résine de *Sciadopitys verticillata*, le verticillol (54) identifié par Karlsson et al. (1978) (Figure I.22).



Figure I.22. Structure du verticillol (54), un des composés caractéristiques des résines de Sciadopitys (Karlsson et al., 1978).

L'analyse de la résine de *Sciadopitys verticillata* que nous avons réalisée (**Figure I.23**) montre la large prédominance des labdanoïdes. Outre l'acide communique (**29**) et l'acide lambertianique (**11**), nous avons également mis en évidence la présence de composés (**49**) à (**53**), appartenant à la famille de la sciadine (**49**) (Bastard et al., 1984 ; Hasegawa et Hirose, 1985 ; Sumimoto, 1963) (**Figure I.23**). Ces composés avaient, par ailleurs, été identifiés dans différentes compartiments de *Sciadopitys verticillata*, comme les feuilles ou le bois, mais pas dans la résine. Nos attributions structurales reposent, d'une part, sur la comparaison avec des spectres de masse en mode IE disponibles dans la littérature (Hasegawa et Hirose, 1985). C'est le cas, plus particulièrement, pour les composés (**51**) et (**53**) dont les spectres de masse que nous avons obtenus sont tout à fait similaires aux spectres de masse publiés par Hasegawa et Hirose (1985). Pour les autres composés, pour lesquels nous n'avons pu trouver dans la littérature de description du mode de fragmentation en spectrométrie de masse en IE, l'attribution structurale repose sur la présence d'ions moléculaires compatibles avec les masses moléculaires de composés identifiés dans un compartiment de

Sciadopitys verticillata et rapportés dans la littérature (Bastard et al., 1984 ; Hasegawa et Hirose, 1985 ; Kaneko et al., 1963a et b ; Sumimoto, 1963). Elle s'appuie également sur la présence, dans les spectres de masse, de fragments de masse typiques qui permettent d'associer les composés mis en évidence dans la résine de *Sciadopitys verticillata* aux dérivés de l'acide lambertianique (**11**) identifiés, par ailleurs, dans *Sciadopitys verticillata*. C'est le cas, notamment, d'un fragment à m/z 95 intense qui est caractéristique d'une sous-unité structurale comportant un cycle furanique avec une cétone en position benzylique que l'on attend dans les spectres de masse des composés (**50**) et (**53**) et qui est également observé dans les spectres de masse bien décrits des composés (**51**) et (**53**) (Hasegawa et Hirose, 1985). A cet égard, c'est l'absence de ce fragment au profit d'un fragment à m/z 94 qui a permis de distinguer les composés (**49**) et (**50**) qui possèdent des masses moléculaires identiques à 328 Da.

Par ailleurs, des diterpènes tétracycliques dérivés du kaurane (55) ont été identifiés par Ambrose et al. (2022).





Pour conclure, dans la mesure où il n'existe qu'une seule espèce actuelle de Sciadopityacées, il est difficile d'établir des généralités concernant leurs résines et d'en tirer des conclusions sur les résines fossiles provenant potentiellement de cette famille. Cependant, la résine de *Sciadopitys verticillata* est caractérisée par la prédominance de labdanoïdes, et plus particulièrement d'acide lambertianique (**11**), et des dérivés de la sciadine (**49**), qui peuvent être considérés comme très spécifiques de cette espèce parmi les résines de conifères.

I.2.3.1.4. Les résines de Podocarpacées

Les Podocarpacées représentent actuellement une famille importante comptant plus de 200 espèces et 19 genres. Le genre qui montre la plus grande diversité est le genre *Podocarpus* qui englobe presque la moitié des espèces de la famille. Les représentants de cette famille ne produisent pas énormément de résine, sa production étant limitée à des réactions face à des agressions extérieures (Langenheim, 2003). Les résines de Podocarpacées semblent présenter une composante non macromoléculaire dominée par les dérivés de l'acide abiétique (**5**) et des composés phénoliques comme le totarol (**67**) (Cox et al., 2007 ; Otto et Wilde, 2001). Des labdanoïdes sont présents, mais en faibles proportions (Cox et al., 2007). L'une des spécificités des résines de cette famille est la présence de l'acide podocarpique (**56**) (**Figure I.24**) (Cox et al., 2007).



Acide podocarpique (56) Totarol (67)

Figure I.24. Structure de l'acide podocarpique (56) et du totarol (67).

I.2.3.1.5. Les résines d'Araucariacées

Les Araucariacées correspondent à une famille actuellement peu diversifiée, avec seulement trois genres pour une dizaine d'espèces. Les trois genres actuels sont *Agathis, Araucaria* et *Wollemia*, ce dernier genre étant monospécifique. Toutes les espèces sont uniquement présentes dans l'hémisphère sud et certaines d'entre elles

produisent de la résine en très grandes quantités, jusqu'à plusieurs kilogrammes par jour (Langenheim, 2003).

Les résines d'Araucariacées présentent une grande variété de diterpènes qui comprend des diterpènes des séries de l'(iso)pimarane (72)/(73) et de l'abiétane (71), des labdanoïdes, mais aussi, dans certains cas, des diterpènes tétracycliques des séries du phylocladane (68) et du kaurane (55) (Cox et al., 2007 ; Chiavari et al., 2008 ; Langenheim, 2003 ; Van den Berg, 2002 ; Scalarone et al., 2002).

Les plantes du genre *Araucaria* sont associées aux zones tropicales d'Australie et de l'Amérique du Sud. Elles produisent d'importantes quantités de résine et leur composition peut être variable. Au sein de ce taxon, on distingue deux sections en fonction de leur répartition géographique, la section Araucaria et la section Eutacta. Cette séparation est aussi justifiée par la phylogénie des différentes espèces du genre (Stull et al., 2021).

La section Araucaria est constituée des espèces présentes en Amérique du Sud et en Australie orientale, tandis que la section Eutacta comprend les espèces de Nouvelle-Calédonie, de l'île de Norfolk et de Nouvelle-Guinée.

Les résines étudiées de la section Araucaria présentent une distribution moléculaire dominée par les labdanoïdes comme l'acide imbricatolique (**30**), l'acide isocupressique (**31**) et leurs dérivés (Cox et al., 2007 ; Otto et Wilde, 2001). Associés à ces composés, on peut détecter également l'acide pimarique (**1**) et sandaracopimarique (**2**) (Cox et al., 2007). Par exemple, l'extrait organique de la résine d'*Araucaria araucana* (section Araucaria) comprend un labdanoïde, l'acide imbricatolique ((**30**) ; **Figure I.25**), comme composé largement prédominant (Schmeda-Hirschmann et al., 2005) et est accompagné de l'acide dihydroagathique (**57**), de l'acide pimarique (**1**) et de l'acide sandaracopimarique (**2**) (**Figure I.25**).

La résine d'*Araucaria bidwilli*, quant à elle, s'est avérée contenir de nombreux composés, dont les composés majeurs, que nous n'avons pas pu identifier dans le cadre de nos travaux, hormis l'acide agathique (**58**) et un dérivé apparenté à l'acide (+)-copalique (**59**). C'est pourquoi le chromatogramme en phase gazeuse de la fraction apolaire de l'extrait dérivé de cette résine ne sera pas présenté dans ce chapitre.



Figure I.25. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique acétylé et méthylé d'une résine fraîche d'Araucaria araucana. En violet sont représentés les labdanes et en bleu les diterpènes de la série de l'(iso)pimarane. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides carboxyliques sous forme d'esters méthyliques.

Les espèces appartenant à la seconde section (Eutacta) présentent des résines chimiquement très différentes. En effet, par exemple, la résine d'*Araucaria columnaris* contient de l'acide abiétique (6) comme composé prédominant (Figure I.26.A) alors qu'il est absent des résines de la section Araucaria. De même, les composés prédominants de la résine d'*Araucaria heterophylla* sont l'acide abiétique (6) et l'acide communique (29) (Figure I.26.B). L'acide pimarique (1) et l'acide sandaracopimarique (2) sont également présents en quantités variables dans les résines d'Araucariacées de la section Eutacta. Cette prédominance des diterpènes de la série de l'abiétane s'observe aussi pour la résine d'*Araucaria cunninghamii,* qui est largement dominée par les diterpènes de la série de l'abiétane (Figure I.26.C).

Pour conclure, les résines du genre *Araucaria* présentent deux grands types moléculaires. Le premier type (Section Araucaria) est caractérisé par des distributions moléculaires largement dominées par les labdanoïdes et qui ne présentent pas de dérivés de l'acide abiétique (6) tandis que le second type moléculaire (Section Eutacta) présente ces deux séries de composés qui sont largement prédominantes.

Aucun diterpène de la série du clérodane (e.g., (**60**) ; **Figure I.26**) n'a été identifié parmi les espèces étudiées, alors que ceux-ci avaient été mis en évidence en faibles quantités dans la résine de *A. bidwilli* (Caputo et al., 1974 ; Cox et al., 2007). Il est à noter, cependant, que les diterpènes de la série du clérodane (**Figure I.27**) sont relativement peu étudiés. Il est donc possible que ces composés soient présents dans les résines étudiées ici, mais n'aient pas été reconnus comme tels.



Figure I.26. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) des fractions apolaires isolées à partir des extraits organiques acétylés et méthylés d'une résine fraîche d'Araucaria columnaris (A), d'Araucaria heterophylla (B) et d'Araucaria cunninghamii (C). En violet sont représentés les labdanoïdes, en bleu les diterpènes de la série de l'(iso)pimarane et en vert les diterpènes de la série de l'abiétane. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides carboxyliques sous forme d'esters méthyliques



Figure I.27. Structure de l'acide kovalénique (*60*), un diterpène identifié dans la résine d'Araucaria bidwilli par Caputo et al. (1974).

Le genre Agathis comprend actuellement une vingtaine d'espèces natives de la région pacifique. Les résines associées à ce genre semblent être caractérisées par une abondance des composés dérivant de l'acide abiétique (6) et des labdanoïdes comme l'acide agathique (58) qui sont importants dans les résines des trois espèces étudiées (Agathis robusta, Agathis moorei, Agathis lanceolata) (Figure 1.28). De façon générale, il semble que les résines du genre Agathis présentent moins de dérivés de l'acide pimarique (1) que les résines du genre Araucaria (Cox et al., 2007). Parmi les résines étudiées, par exemple, Agathis lanceolata ne présente pas de dérivés de l'acide pimarique (1) (Figure I.28.B). La résine d'Agathis moorei présente quant à elle uniquement de l'acide sandaracopimarique (2), mais en très faibles quantités (Figure I.28.A). Le chromatogramme d'Agathis robusta n'est pas présenté ici car la résine étudiée présentait une altération relativement importante rendant difficile l'identification des composés. Il apparait cependant que cette résine est dominée par l'acide sandaracopimarique (2), contrairement aux deux autres espèces étudiées dans le cadre de cette thèse. Associés à ce composé, l'acide abiétique (6), déhydroabiétique (5), l'acide communique (29) et l'acide agathique (58) ont été identifiés en quantités importantes.

Pour conclure, il apparaît que les résines du genre *Agathis* peuvent se différencier des résines d'*Araucaria* par une quantité plus importante de composés dérivant de l'acide abiétique (6) et une quantité plus faible d'acide sandaracopimarique (2) ou (iso)pimarique (1)/(3) (Cox et al., 2007 ; Otto et Wilde, 2001).



Figure I.28. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) des fractions apolaires isolées à partir des extraits organiques acétylés et méthylés d'une résine fraîche d'Agathis moorei (**A**) et d'Agathis lanceolata (**B**). En violet sont représentés les labdanoïdes, en bleu les diterpènes de la série de l'(iso)pimarane et en vert les diterpènes de la série de l'abiétane. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides carboxyliques sous forme d'esters méthyliques.

Le genre *Wollemia*, uniquement représenté actuellement par l'espèce *Wollemia nobilis*, est considérée comme un taxon Lazare (c.-à-d., un taxon considéré uniquement connu comme fossile jusqu'à sa redécouverte en tant qu'organisme(s) vivant(s)) (Jones et al., 1995). En effet, jusqu'au milieu des années 1980, ce genre était supposé éteint jusqu'à la découverte de l'espèce *Wollemia nobilis* en Australie (Jones, 1995).

La résine de cette espèce est assez spécifique et présente des composés comme le wollemolide (structure (63) initialement proposée, avant révision pour devenir (65) ; voir ci-après) qui a été isolé et décrit pour la première fois par Venditti et al. (2019) (Figure I.29). Associé à ce composé a été mis en évidence un autre nouveau composé, le wollemol (64) aussi uniquement décrit dans cette résine.



Figure I.29. Structures du wollemol (64) et du wollemolide (63) isolés de cônes de Wollemia nobilis d'après Venditti et al. (2017, 2019) et structure du wollemolide révisée au cours de cette thèse (65) parallèlement aux travaux menés par une autre équipe canadienne (the University of British Colombia) dans le cadre d'un stage de master (Hirla-Schaefer, 2020).

Dans le cadre de nos travaux, l'analyse de la fraction apolaire de la résine après dérivation a montré la présence d'un composé majeur dont le spectre de masse était inconnu. Nous avons donc entrepris d'isoler ce composé afin d'en effectuer l'étude structurale par des études de RMN (cf. Matériel et Méthodes). Il en est ressorti que les spectres de RMN étaient très proches, voire identiques, de ceux publiés par Venditti et al. (2019). Toutefois, nos interprétations structurales nous ont conduit à proposer une structure différente de celle reportée par Venditti et al. (2019) qui avaient isolé ce même composé à partir des cones de *Wollemia nobilis* (et non de la résine) (structures (65) et (63), respectivement). Ultérieurement, une recherche bibliographique poussée nous a mené à un mémoire de master de l'université de Colombie Britannique (Hirkala-Schaefer, 2020), où l'identification structurale de ce même composé (65) est rapportée, confirmant de ce fait notre attribution structurale (Figure 1.29 et 1.30). Ainsi, la résine de *Wollemia nobilis* est dominée par le wollemolide (65) et son dérivé de type alcool (66), l'acide sandaracopimarique (2) et l'acide abiétique (6), ainsi que

l'acide agathique (58) (Figure I.30).

Le wollemolide (65) ayant été uniquement identifié dans différents compartiments de cette espèce (dont la résine) à ce jour, nous pouvons considérer que ce composé représente un biomarqueur robuste pour cette espèce. En l'absence d'autres espèces appartennant au genre Wollemia, il est toutefois difficile de généraliser le caractère chimiotaxonomique de cette famille de composés à l'ensemble des ex-membres de ce genre.



Figure I.30. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique acétylé et méthylé d'une résine fraîche de Wollemia nobilis. En violet sont représentés les labdanoïdes, en bleu les diterpènes de la série de l'(iso)pimarane et en vert les diterpènes de la série de l'abiétane. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides carboxyliques sous forme d'esters méthyliques.

Pour conclure, les résines d'Araucariacées présentent toutes une prédominance des labdanoïdes ainsi que la présence de l'acide sandaracopimarique (2). Les dérivés de l'acide abiétique (6) peuvent être prédominants dans certaines résines, et notamment dans celles issues du genre *Agathis*, mais ils ne sont pas systématiquement présents. On peut noter, en outre, l'absence de diterpénoïdes phénoliques dans toutes les résines d'Araucariacées analysées (**Tableau I.4**).

Nous n'avons pu mettre en évidence aucun diterpène tétracyclique (e.g. série du kaurane (**55**)), bien que ceux-ci aient déjà été détectés dans les extraits de feuilles et dans certaines résines de cette famille (Kumar et al., 2022 ; Lu et al., 2013).

	Abiétanes	Pimaranes	Labdanes	Diterpénoïdes phénoliques
<i>Araucaria</i> (Section Araucaria)	Absents	Présents surtout acide pimarique (1) et sandaracopimarique (2)	Prédominants	Absents
<i>Araucaria</i> (Section Eutacta)	Présents voire prédominants	Présents surtout acide pimarique (1) et sandaracopimarique (2)	Co-prédominants	Absents
Agathis	Présents voire prédominants	Présents surtout acide sandaracopimarique (2)	Surtout acide agathique (58)	Absents
Wollemia	Présents surtout acide abiétique (6)	Présents surtout acide sandaracopimarique (2)	Surtout wollemolide (65)	Absents

Tableau I.4. Principales familles de diterpénoïdes identifiées dans les genres Araucaria (section Araucaria), Araucaria (section Eutacta) et Wollemia.

I.2.3.2. Les Angiospermes

Les Angiospermes, aussi appelées « plantes à fleurs », sont des plantes vasculaires qui font partie des spermatophytes, à l'instar des conifères. Actuellement, les Angiospermes sont le clade de plantes le plus diversifié en termes de familles et d'espèces. Les Angiospermes sont apparues durant la fin du Mésozoïque et ont divergé des Gymnospermes par l'apparition de fleurs en tant que structures reproductrices (Langenheim, 2003). Le plus ancien fossile d'Angiospermes est Montsechia vidalii, daté du Crétacé inférieur (Barrémien, -130 Ma ; Gomez et al., 2015, 2020), bien que des études moléculaires et polléniques placent l'apparition des Angiospermes légèrement avant cette période (Moore et al., 2007). Malgré cette apparition relativement tardive dans le registre fossile, les Angiospermes se sont rapidement diversifiées durant le Crétacé et sont même devenues dominantes dans la plupart des écosystèmes. A contrario des conifères actuels, les Angiospermes ne sont pas toutes ligneuses ou arbustives. Une très grande majorité de ce groupe ne produit donc pas de résine sensu stricto. Il est à noter cependant qu'il existe une grande diversité d'exsudats dans ce groupe, dont la chimie ne sera pas présentée dans cette partie (latex, gommes, mucilages).

Parmi les Angiospermes actuelles, les plantes produisant le plus de résine appartiennent au clade des Rosidées et se placent dans les familles des Fabacées (anciennement légumineuses, Fabales), des Burseracées (Sapindales), des Anacardiacées (Sapindales) et des Diptérocarpacées (Malvidées). Nous nous intéresserons donc principalement à ces groupes, ceux-ci regroupant les producteurs de résine les plus importants (Burger, 2008 ; Langenheim, 2003 ; Steigenberger, 2013).

I.2.3.2.1. Les résines de Fabacées

Les Fabacées appartiennent à l'ordre des Fabales dans la classe des Rosidées. Anciennement nommées « légumineuses », ce groupe comprend des arbres et arbustes produisant de grandes quantités de résine. C'est l'une des plus importantes familles de plantes à fleurs et la troisième famille en termes de diversité après les Orchidées et les Astéracées. Cette famille compte actuellement 765 genres et plus de 19 000 espèces.

De nos jours, les genres produisant de la résine dans cette famille sont : *Hymenaea, Guibourtia, Tessmannia, Copaifera* et *Daniella* (Langenheim, 2003 ; Steigenberger, 2013). Dans le langage courant, on désigne souvent par « copal » les résines plus ou moins anciennes provenant de Fabacées. Le genre *Myroxylon* produit aussi de la résine en grandes quantités et est à l'origine du baume du Pérou et de Tolu (Steigenberger, 2013 ; Courel et al., 2019), mais dans la littérature, les résines de ce genre sont placées à part des autres résines de Fabacées à cause de leur constitution moléculaire unique (Steigenberger, 2013).

En dehors de ce genre, les résines issues d'arbres de cette famille sont constituées principalement de labdanoïdes de la série de l'acide ozique (69) (série dite « enantio ») présentant des configurations différentes au niveau de la jonction des cycles A/B et au départ de la chaîne latérale (en C-9) de celles observées dans le cas des labdanoïdes de la série dite « régulière », comme l'acide communique (29), trouvés chez les conifères (Figure I.31) (Bray et Anderson, 2009 ; Cox et al., 2007 ; Mills et White, 1994 ; Poulin et Helwig, 2014).



Figure I.31. Structures de l'acide ozique (69) et de l'acide communique (29), deux représentants des labdanoïdes des séries dites « enantio » et « régulière » présentes, respectivement, dans les résines d'Angiospermes et les résines de conifères.

De plus, il a été montré que ces labdanoïdes participent aux processus de polymérisation affectant les résines une fois qu'elles ont été exsudées (Cunningham et al., 1983 ; Langenheim, 2003).

Par exemple, la composante non macromoléculaire de la résine d'*Hymenaea courbaril*, une espèce vivant en Amérique du Sud, est constituée en très grande partie de labdanoïdes de cette série. Cette résine est très riche en acide ozique (**69**) et en acide (-)-copalique (**70**), qui sont tous deux communs dans les résines issues de ce genre (Steigenberger, 2013) (**Figure I.32** et **Figure I.33**). L'absence des autres squelettes diterpéniques (des séries de l'abiétane (**71**), de l'(iso)pimarane (**72**)/(**73**) et du kaurane (**55**)) est une différence notable avec les résines de conifères. Il est à noter que de très faibles quantités de diterpènes de la série du clérodane (**74**) ont été détectées dans certaines espèces d'*Hymenaea*, comme l'acide kovalénique (**60**) (**Figure I.32**; Cunningham et al.,1973 ; Doménech-Carbó et al., 2009 ; Steigenberger, 2013). Les résines du genre *Daniella* cependant contiennent aussi ces composés, mais comprennent également de l'acide daniellique (**75**) (**Figure I.33**), qui semble caractéristique de ce genre lorsqu'il est présent en proportions significatives (**Figure I.32**).

Le genre *Copaifera* produit de grandes quantités de résine se caractérisant par sa très grande fluidité. Celle-ci présente, outre les labdanoïdes en série « enantio » décrits précédemment, une grande quantité de sesquiterpènes (Arruda et al., 2019; Steigenberger, 2013; Van der Werf et al., 2000). Les résines du genre *Copaifera* présentent principalement des diterpènes comme l'acide agathique (**58**) et l'acide polyalthique (**76**) qui sont des labdanoïdes, ainsi que de l'acide hardwikiique (**77**) qui appartient à la série du clérodane (**74**) (Arruda et al., 2019). Il est à noter que l'acide agathique (**58**) est majoritairement trouvé dans les résines de conifères et sa présence dans le cas d'Angiospermes est donc une caractéristique unique du genre *Copaifera*.



Figure I.32. Exemples de diterpènes présents dans les résines de Fabacées.

Le genre *Myroxylon*, placé à part des autres résines de la famille des Fabacées dans la littérature, produit une résine dont la fraction volatile est très importante et qui est dominée par des phénylpropanoïdes (**Figure I.34**) produisant une odeur caractéristique (Steigenberger, 2013 ; Courel et al., 2019).



Figure I.33. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique acétylé et méthylé des résines fraîches de Hymenaea courbaril (A) et Daniella sp. (B). L'espèce exacte à l'origine de la résine de Daniella n'est pas connue. En violet sont représentés les labdanes. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides carboxyliques sous forme d'esters méthyliques.



Figure I.34. Exemples de composés présents dans les résines des plantes appartenant au genre Myroxylon.

1.2.3.2.2. Les résines de Burséracées

Les Burséracées appartiennent à l'ordre des Sapindales, à l'instar des Anacardiacées. Il existe dans cette famille près de 600 espèces productrices de résine réparties en 17 genres (De la Cruz-Cañizares et al., 2005 ; Weeks et al., 2005). Actuellement, les résines de Burséracées sont, notamment, très utilisées pour la fabrication de vernis (élémi ; De la Cruz-Cañizares et al., 2005), d'encens (oliban, élémi) ou pour leurs propriétés aromatiques ou médicinales (myrrhe, élémi) (e.g., Soyocak et al., 2022). Il est à noter que l'appellation « copal » dans la littérature peut aussi désigner certaines résines de cette famille et, notamment, les résines du genre *Protium* provenant d'Amérique latine, à l'instar d'*Hymenaea courbaril* (Langenheim, 2003 ; Steigenberger, 2013).

Actuellement, les genres de la famille des Burséracées les plus utilisés pour la production de résine sont les genres *Canarium, Boswellia, Protium, Commiphora* et *Bursera*. La composition moléculaire des extraits lipidiques des résines de Burséracées est caractérisée par la prédominance de triterpènes basés sur des squelettes pentacycliques de type lupane (**83**), ursane (**84**) et oléanane (**85**), mais comprend également des triterpènes tétracycliques en série dammarane (**86**) et euphane (**87**) (**Figure I.35**).



Figure I.35. Principaux squelettes triterpéniques présents dans les résines de Burséracées, Diptérocarpacées et Anacardiacées.

Le genre botanique *Canarium* est actuellement la source principale des résines de type élémi du fait de sa production importante de résine (Cotterrel et al., 1970 ; Cartoni et al., 2004). Ce genre est caractérisé par l'abondance de triterpènes appartenant aux β - (88) et α -amyrines (89) (Cartoni et al., 2004 ; Langenheim, 2003 ; Steigenberger, 2013) dans leur résine. A cet égard, les amyrines (88 et 89) sont les composés principaux dans la distribution moléculaire de la résine élémi analysée (Figure I.36). Associés aux amyrines (88) et (89), on trouve également l'acide α -élémolique (90) et un isomère correspondant sans doute à son épimère en C-3 (90'), ainsi que des dérivés d'amyrines que nous avons identifiés, sur la base de l'interprétation de leurs spectres de masse, comme étant le maniladiol (91) et la bréine (92) (ainsi que leurs isomères 3-*epi* (91') et (92') ; Figure I.36). Ces composés ont tous été identifiés dans des résines d'arbres du genre *Canarium* (Billet et al., 1971 ; Cotterrell et al., 1970 ; Kikuchi et al., 2012). L' α -élémol (93), un sesquiterpène, est aussi régulièrement détecté dans les résines du genre *Canarium* (De la Cruz-Cañizares et al., 2005).



Figure 1.36. Chromatogramme en phase gazeuse partiel (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique acétylé et méthylé d'une résine commerciale d'élémi. L'espèce exacte à l'origine de la résine n'est pas connue et il est probable ici que la résine soit issue d'un mélange de résines contemporaines. En violet sont représentés les triterpènes. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides carboxyliques sous forme d'esters méthyliques.

Les résines du genre *Protium* contiennent également les β - (88) et α -amyrines (89) en tant que composés principaux, généralement dans un rapport d'environ 1/2 (Stacey et al., 2006). L'acide α -élémolique (90) et son isomère (90'), le bréine (92), le maniladiol (91) et leurs versions oxydées peuvent également être trouvés en faibles quantités dans les résines du genre *Protium* (Sciani et al., 2012). Le genre *Boswellia* est souvent associé à l'oliban (encens). Ce genre est caractérisé par la présence d'acides α - et β -boswelliques (94/94') et (95/95') (Figure I.37 ; Al-Harrasi et al., 2021 ; Aksamija, 2012 ; Fattorusso et al., 1983 ; Paul et al., 2011 ; Kosolapov et al., 2024). Une des particularités des résines du genre *Boswellia* est la présence de diterpènes macrocycliques comme le cembrène A (96) ou le verticilla-4(20),7,11-triène (97) (Figure I.37) (Aksamija, 2013 ; Basar et al., 2001).



Figure I.37. Exemples de terpènes caractéristiques de la résine de Boswellia (Al-Harrasi et al., 2021 ; Basar et al., 2001, Kosolapov et al., 2024

Le genre *Commiphora* est très diversifié puisqu'il contient près de 200 espèces actuellement réparties entre l'Afrique, l'Asie et l'Arabie (Shen et al., 2012; Langenheim, 2003). Les principaux constituants de ces résines sont volatils puisque celles-ci sont dominées par les sesquiterpènes. Les résines de certaines espèces de *Commiphora* sont appelées myrrhe (Langenheim, 2003).

Le genre *Bursera* est la source des « copals » mexicains et autres résines cérémoniales d'Amérique centrale (Blancas et al., 2021 ; Gigliarelli et al., 2015, Lucero-Gómez et al., 2014). Les résines d'arbres de ce genre sont caractérisées par une abondance de lupéol (**98**), d'α-amyrine (**89**) et de 3-épi-lupéol (**98**') (Blancas et al., 2021 ; De la Cruz-Cañizares et al., 2005 ; Gigliarelli et al., 2015 ; Lucero-Gómez et al., 2014, Stacey et al., 2005 ; **Figure I.38**).



Figure I.38. Principaux triterpènes caractéristiques des résines de Burséracées actuelles.

I.2.3.2.3. Les résines d'Anacardiacées

Les Anacardiacées sont aussi très diversifiées puisqu'elles comprennent plusieurs centaines d'espèces réparties dans les régions tempérées et tropicales (Langenheim, 2003). Les résines de cette famille sont aussi constituées presque exclusivement de triterpènes avec des squelettes de type oléanane (85), euphane (87) et dammarane (86) (Figure 1.35; Langenheim, 2003; Mills et White, 1977). Actuellement, le genre le plus utilisé pour la production de résine est le genre *Pistacia* et sa résine donne du « mastic » qui est très utilisé pour des usages médicinaux, cosmétiques ou alimentaires depuis des millénaires (e.g. Clark et al., 2013; Geizci, 2019). Les constituants principaux de la résine de Pistacia atlantica sont l'acide oléanonique (99), l'acide moronique (100), l'acide masticadiénonique (101) l'acide et isomaticadiénonique (102) (Figure I.39) qui sont très communs dans les résines issues de cette famille et de ce genre (Bruni et Guglielmi, 2014, Caputo et al., 1978).

A notre connaissance, aucun triterpène ayant un squelette hydrocarboné de type ursane (**84**) n'a été mis en évidence dans les résines d'Anacardiacées (Langenheim, 2003 ; Steigenberger, 2013).



Figure I.39. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique acétylé et méthylé d'une résine de Pistacia atlantica. En violet sont représentés les triterpènes. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides carboxyliques sous forme d'esters méthyliques.

I.2.3.2.4. Les résines de Diptérocarpacées

Les Diptérocarpacées comprennent près de 500 espèces végétales produisant de la résine de façon plus ou moins importante (Appanah et Turnbull, 1998 ; Burger, 2008). Les résines obtenues à partir de cette famille sont appelées dammars. Les genres les plus utilisés pour la production de résine sont : *Hopea* (102 espèces), *Shorea* (194 espèces) et *Dipterocarpus* (69 espèces) et appartiennent aux Diptérocarpoidées, une des sous-familles majeures du groupe (Appanah et Turnbull, 1998 ; Burger, 2008). Les arbres de ces genres sont à feuilles persistantes, et sont natifs de régions au climat tropical (Appanah et Turnbull, 1998 ; Langenheim, 2003, Ourisson et al., 1965).

La chimie des résines de Diptérocarpacées est relativement peu diversifiée, ces résines contenant souvent les mêmes composés, mais dans des proportions relatives différentes (Lampert, 2002). Les dammars sont constitués de sesquiterpènes et de triterpènes (van der Doelen et al., 1998,).

L'absence de monoterpènes est caractéristique de cette famille (e.g. Bisset et al., 1966, 1967, 1971 ; Diaz et al., 1966).

Les triterpènes dominants dans les résines de dammar présentent des squelettes typiques du dammarane (**86**), mais aussi de l'oléanane (**85**) et de l'ursane (**84**) (**Figure I.41**). L'association de ces trois types de squelettes est caractéristique de cette famille (Burger, 2008). Plus rarement, des composés présentant les squelettes du lupane (**83**) et du hopane (**107**) ont été détectés (Burger, 2008).

Par exemple, la résine de *Dipterocarpus dyeri* comprend le diptérocarpol (**111**), la dammaradiénone (**109**) et la 20,24-époxy-25-hydroxy-dammaran-3-one (**110**) (**Figure I.40**) qui sont typiques des résines de dammar (Burger, 2008 ; Van de Doelen et al., 1998a, b). Associés à ces composés, on trouve également l'acide moronique (**100**), le lupéol (**98**) et la lupénone (**108**). Une partie de ces composés est commune avec la résine de dammar commerciale (**Figure I.41**) qui est le plus souvent un mélange des résines de plusieurs genres.

Le genre *Shorea* est, quant à lui, caractérisé par la présence de l'acide shoréique (**119**) et de ses dérivés dans les résines (**Figure I.40**).

Pour conclure, l'association de triterpènes des séries du dammarane (86), de l'oléanane (85) et de l'ursane (84) est caractéristique des résines des Diptérocarpacées.



Figure I.40. Composés caractéristiques des résines du genre Shorea (Burger, 2008 ; Perthuison et al., 2020).



Figure I.41. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, EI, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique acétylé et méthylé d'une résine de Dipterocarpus dyeri (A) et une résine de dammar commerciale (B). En violet sont représentés les triterpènes. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides carboxyliques sous forme d'esters méthyliques.

I.2.3.2.5. Synthèse sur la chimie des résines d'Angiospermes

Il existe actuellement de nombreuses familles d'Angiospermes produisant de la résine. Utilisées dans l'art et l'artisanat, ces résines sont très recherchées pour leurs différentes propriétés (viscosité, couleur, odeur) qui diffèrent selon leur chimie. Dans le **tableau I.5.** sont présentées les principales caractéristiques chimiques des résines d'Angiospermes actuelles.

Tableau I.5. Principales caractéristiques chimiques des résines des Angiospermes actuelles. Les chiffres en gras correspondent aux structures moléculaires présentées en fin de chapitre

(§ I.7).				
	Diterpènes	Triterpènes	Autres	
Fabacées	<i>Ent</i> -labdanes comme l'acide ozique (69), l'acide (-)-copalique (70) et l'acide daniéllique (75)	Absents sauf chez le genre Myroxylon	Phénylpropanoïdes (80), (81), (82) chez le genre <i>Myroxylon</i>	
Burséracées	Présents dans la fraction volatile (cembrène (96), dérivés du verticillol (97)	Triterpènes présentant les squelettes de l'oléanane (85), de l'ursane (84) et du lupane (83). Amyrines dominantes		
Anacardiacées	Absents	Triterpènes présentant les squelettes de l'oléanane (85), du dammarane (86) et du lupane (83). Absence de la série de l'ursane (84)		
Diptérocarpacées	Absents	Triterpènes présentant les squelettes du dammarane (86)*, de l'oléanane (85), de l'ursane (84) et du lupane (83)		

*Triterpènes prédominants dans la plupart des résines

I.3. L'ambre : définition et classification

Cette section est dédiée à la définition de l'ambre, à ses origines botaniques et géographiques, et aux méthodes qui peuvent être mises en œuvre pour son étude.

I.3.1. Définitions et origines de l'ambre

Les premières définitions de l'ambre remontent à l'antiquité avec Pline dans *Naturalis Historia* (environ 77 après J-C) qui décrit l'ambre comme un produit de plantes et compare celui-ci à un exsudat de conifères ou à une gomme.

Il décrit l'ambre baltique et note de nombreuses ressemblances physiques avec les résines de Pinacées, notamment dans le fait qu'il trouve de nombreuses inclusions d'insectes dans l'ambre balte comme dans les résines actuelles.

Cependant, malgré l'hypothèse émise durant l'Antiquité d'une probable filiation avec les résines, les ambres ont été considérés d'un point de vue principalement minéralogique jusqu'au milieu du XX^{ème} siècle (Langenheim, 1969). De nombreuses descriptions d'ambre ont été réalisées et des noms divers ont été donnés à différents types d'ambre présentant des aspects ou des propriétés spécifiques comme la glessite, la succinite, la résinite, la goitschite, etc... (e.g. Aweng, 1894 ; Bergemann, 1859 ; Lacroix, 1910). Plus d'une centaine de types d'ambre ont ainsi été décrits sous forme minéralogique en n'indiquant que les propriétés physiques et chimiques de premier ordre, chaque type d'ambre possédant des propriétés différentes à l'instar des minéraux.

Ces dénominations se basent donc principalement sur les propriétés physiques des ambres et leurs morphotypes. L'ambre est ainsi reconnu comme un minéral dont la couleur varie de jaune à brun/noir avec quelques exceptions blanches, bleues ou vertes, dont l'opacité est variable (**Figure I.42**). Il est surtout caractérisé par la présence d'inclusions (animaux, bulles, plantes). Son « point de fusion » varie entre 170 °C (l'ambre devient mou) et 300 °C (l'ambre est détruit), sa densité est comprise entre 1,05 et 1,10 et sa dureté est très faible puisqu'elle est inférieure à 3 sur l'échelle de Mohs (Lacroix, 1910 ; Langenheim, 1969, 2003). Cependant, comme le montre la **Figure I.42**, les ambres possèdent une grande variabilité en termes de morphotypes, ce qui amène un questionnement sur une définition de l'ambre principalement basée sur des critères morphologiques. Par exemple, les ambres de la baltique peuvent être translucides comme opaques (Grimaldi, 1996). De même, la couleur peut varier énormément parmi les ambres d'un même site et certains ambres peuvent présenter des motifs particuliers comme les ambres de Saint-Lon-Les-Mines ou Puy-Puy qui présentent des stratifications (**Figure I.42**).

Il est donc impossible de donner une définition universelle de l'ambre en se basant uniquement sur des critères liés à l'aspect physique.



Figure I.42. Exemples de la variabilité de l'aspect des ambres provenant d'un même site ou de sites différents.

Il faudra attendre le milieu du XX^{ème} siècle pour voir apparaître des définitions de l'ambre se basant sur des critères organiques/chimiques. L'étude des inclusions dans l'ambre a permis de mettre en évidence le caractère initialement semi-liquide de l'ambre et a conduit à la comparaison avec les résines actuelles (Grimaldi, 2009, 1996 ; Langenheim, 2003). De plus, la découverte d'ambre directement dans les canaux résiniques de bois fossiles a permis de mettre en évidence que l'ambre est bien une résine fossilisée (Gomez et al., 2018 ; Grimaldi, 1996 ; Langenheim, 2003).

L'apport des techniques analytiques (cf. Partie I.3.3) dans l'étude de l'ambre a également permis de mettre en évidence la ressemblance en termes de composition entre les ambres et les résines actuelles, notamment en ce qui concerne la présence de terpénoïdes libres et d'une matrice macromoléculaire constituée de sous-unités terpéniques polymérisées.

Ces études ont ainsi permis de proposer une nouvelle définition de l'ambre basée sur son origine. Il s'agit d'une résine fossile de plantes « supérieures » composée principalement de terpénoïdes (Anderson, 1995 ; Anderson et Crelling, 1995 ; Langenheim, 1969, 2003). Les résines sont transformées en ambre sous l'action de différents processus d'altération diagenétique après leur enfouissement en milieu sédimentaire (§I.3.5) (Anderson et Crelling, 1995 ; Langenheim, 1969). Anderson (1995) propose en guise de définition que l'ambre est « *un matériau organique solide, discret, dérivant de résines de plantes supérieures et trouvé dans des charbons et autres sédiments sous la forme de particules macro- et microscopiques »*.

Cependant, cette définition possède des limitations. En effet, il est difficile de déterminer la limite entre la résine et l'ambre puisque celle-ci dépend du « taux de fossilisation » qui est difficile à quantifier. Ainsi, selon Anderson (1995) et Vávra (2009), la limite entre résine, résine fossile, copal et ambre, qui sont tous des matériaux issus de résines, mais qui ont subi des transformations diagénétiques à des niveaux divers, n'est pas parfaitement tranchée. Le consensus est que ces catégories sont déterminées uniquement en tenant compte de l'âge de ces substances, même si cette limite reste artificielle (**Tableau I.6**). L'ensemble de ces catégories (résine, copal, ambre) peut se trouver dans la littérature sous l'appellation de « résinite » qui désigne toutes les substances géologiques issues d'une résine (Anderson, 1995).

 Tableau I.6. : Dénomination des substances issues de résines végétales en fonction de leur

 âco

	aye.		
Âge Dénomination			
< 250 ans	Résine moderne		
250 – 5 000 ans	Résine ancienne		
5 000 – 40 000 ans	Résine subfossile		
40 000 ans à 2 Ma	Copal		
Supérieur à 2 Ma	Ambre		

Il est à noter que le copal désigne principalement les résines fossiles provenant d'Angiospermes de la famille des Fabacées.

I.3.2. Les gisements d'ambre et de copal dans le monde

Les résines fossiles sont réparties dans le temps et l'espace de façon très restreinte. En effet, outre le problème lié aux espèces productrices elles-mêmes, qui ne sont pas forcément abondantes, la fossilisation de la résine nécessite des conditions et, probablement, une composition particulière (Delclòs et al., 2023 ; Langenheim, 2003). Les ambres sont le plus souvent associés à des sédiments riches en fossiles et en matière organique. Il est difficile de dater l'ambre de façon absolue (absence dans la structure d'éléments radioactifs), mais celui-ci est très souvent lié à des fossiles dont il est possible d'estimer l'âge en utilisant la biostratigraphie (Langenheim, 2003).

L'âge des sites où on trouve de l'ambre s'étend de 320 millions d'années à 2 millions d'années (du Carbonifère au Pléistocène), couvrant donc une large plage de temps (Bray et Anderson, 2009 ; Delclòs et al., 2023 ; Langenheim, 2003). Plusieurs

centaines de sites contenant de l'ambre ont été recensés dans le Monde, mais la plupart du temps, l'ambre n'y est présent qu'en très faibles quantités (Krumbiegel et Krumbiegel, 1994). Il existe en réalité moins d'une cinquantaine de sites contenant assez d'ambre pour être exploité (Langenheim, 2003). Ceux-ci sont présentés dans la **figure I.43**. L'étude de l'âge des sites où de l'ambre peut être trouvé met en évidence qu'il existe des périodes plus propices à la production d'ambre que d'autres (Delclòs et al., 2023). Les périodes géologiques au cours desquelles on trouve le plus de sites contenant de l'ambre sont le Crétacé (145-66 Ma) qui marque la première période d'augmentation de la production d'ambre durant les temps géologiques) et l'Eocène (56-34 Ma ; Delclòs et al., 2023 ; Langenheim, 2003).



Figure I.43. Carte du Monde localisant les principaux des sites riches en ambre/copal. Les cercles orange désignent les sites mésozoïques (Trias-Crétacé) et les cercles verts les sites cénozoïques (Paléogène-Quaternaire). Carte créée à partir de Langenheim (2003).

L'ambre est le plus souvent trouvé dans des sédiments sableux ou calcaires formés dans des estuaires (Langenheim, 2003 ; Seyfullah et al., 2018). En effet, il est considéré que la faible densité de l'ambre permet qu'il soit transporté facilement *via* un réseau fluviatile et soit déposé ensuite dans des deltas ou estuaires (Grimaldi, 1996

; Langenheim, 2003 ; Poinar, 1992 ; Seyfullah et al., 2018). Ces environnements étant propices à une sédimentation rapide et à une anoxie/dysoxie favorisant la préservation de la matière organique, ils sont idéaux pour permettre la fossilisation de la résine (**Figure I.44**). Il est généralement considéré que l'ambre et le bois fossilisé sédimentent rarement à l'endroit où la résine et le bois sont produits. Les environnements où se développent les arbres producteurs de résine peuvent donc être divers et vont de la forêt continentale traversée par un cours d'eau à des mangroves, des marécages des plaines d'inondation et des forêts littorales (**Figure I.44**).



Figure I.44. Schéma des différents types d'environnements possibles à l'origine des bois fossiles et de l'ambre trouvés dans des sédiments déposés dans des embouchures de fleuves.

I.3.3. Principales méthodes utilisées pour l'étude de l'ambre et des résines végétales

I.3.3.1. Propriétés physiques de l'ambre et analyse des inclusions

I.3.3.1.1. Propriétés physiques et composition élémentaire

Les premières analyses physico-chimiques d'ambre ont consisté tout d'abord en l'étude des inclusions et des propriétés physiques de l'ambre (température de fusion,

couleur, opacité...) (Langenheim, 2003). Dès l'Antiquité, des insectes et des débris de plantes ont été observés dans l'ambre (Langenheim, 2003). Par la suite, les principales études sur les ambres ont porté sur leurs propriétés physiques (e.g. Lacroix, 1910). Des études sur la composition élémentaire de l'ambre ont ainsi permis de mettre en évidence que les ambres contiennent en moyenne de 73 à 79% de carbone, 9 à 11 % d'hydrogène et 10 à 20% d'oxygène (bilan massique). Cependant, ces études ne permettent pas réellement de différencier les ambres entre eux et la plupart de ces différences peuvent s'expliquer par des différences du niveau d'altération et d'oxydation.

I.3.3.1.2. Etude des inclusions

Les inclusions dans l'ambre ont été largement étudiées par les entomologues durant le XIX^{ème} siècle et ces études se sont poursuivies durant les deux siècles suivants (e.g. Penney et Green, 2010; Poinar, 1992 ; Weitschat et Wilfried, 2002). En effet, l'ambre permet la conservation des tissus mous et autres tissus rarement conservés lors de la fossilisation dans des roches sédimentaires.

Ces études ont ainsi permis de mieux connaitre les environnements dans lesquels s'étaient développés les arbres producteurs des résines à l'origine des ambres ainsi que d'étudier l'évolution d'autres organismes présents dans ces environnements. Par exemple, l'étude des inclusions a permis de mieux comprendre la divergence du groupe des fourmis à partir des autres groupes d'insectes (Langenheim et al., 1973 ; Nel et al., 2004). Ces études ont aussi permis de dater l'ambre selon les principes de la biostratigraphie et ont amené à distinguer les ambres en fonction de leur âge (Langenheim, 2003, 1969 ; Weitschat et Wilfried, 2002).

De la même façon, l'étude des inclusions a grandement été utilisée pour déterminer l'origine botanique des ambres. Par exemple, les premières hypothèses concernant le producteur à l'origine de l'ambre baltique (Chapitre IV, §VI.2) se basent sur l'analyse de restes de bois et de pollen piégés dans l'ambre (Conwentz, 1890 ; Schubert, 1961). Ces études mettent en œuvre des techniques de microscopie (microscope optique, à fluorescence, électronique ; Penney et Green, 2010 ; Poinar, 1992 ; Poinar Jr., 2010 ; Weitschat et Wilfried, 2002). Par exemple, Grimaldi et al. (1994) ont utilisé la microscopie électronique à balayage afin d'étudier en 3D des tissus mous présents dans les ambres dominicains. Ces auteurs ont notamment pu étudier ainsi des cellules épidermiques et colonnaires d'une Fabacée (*Hymenaea sp.*) présentes dans l'ambre.

Ces méthodes microscopiques ont aussi permis de mettre en évidence l'existence d'une symbiose ayant existé entre un champignon et un platypodiné (Coléoptère). Même si l'étude des inclusions permet d'avoir une idée de la biocénose présente dans un environnement donné, le piégeage des organismes dans l'ambre est un processus sélectif. En effet, les plus petits organismes sont plus souvent trouvés, et il s'agit d'organismes vivant principalement sur le bois ou dans la litière de la forêt (Breton, 2007; Weitschat et Wilfried, 2002). Ainsi, l'étude des inclusions permet d'obtenir quelques informations concernant l'environnement dans lequel se développait les producteurs de la résine à l'origine de l'ambre, mais ne permet pas de connaitre celui-

I.3.3.2. Premières analyses chimiques

ci de manière complète.

L'une des premières études sur la structure chimique de l'ambre a été réalisée par Agricola (1846) qui a réalisé une distillation sèche de l'ambre, isolant ce qu'il a appelé *flores succini* ou la fleur de l'ambre (Agricola, 1846 ; Langenheim, 2003). Plus tard, cette molécule a été nommée acide succinique (**124**). Viollier et Reutter (1916) ont réalisé des titrages afin de différencier les ambres contenant de l'acide succinique (**124**) des autres. Cependant, comme cela a été discuté précédemment, la présence de nombreux acides diterpéniques dans les ambres ont probablement faussé ce type de titration.

I.3.3.3. Les analyses par spectroscopie infrarouge

Les analyses morphologiques et des inclusions dans les ambres ne permettant pas réellement de distinguer les ambres selon leurs sources botaniques, des techniques analytiques basées sur les analyses spectrales ont été mises en place durant le XX^{ème} siècle. La spectroscopie infrarouge a été plus particulièrement utilisée pour l'étude de l'ambre (e.g. Beck, 1986). Cette spectroscopie est, en effet, sélective, peu invasive et relativement rapide en termes de mise en œuvre. Des études de grande envergure impliquant cette méthode (Anderson, 1995 ; Beck et al., 1965 ; Beck, 1985a, 1986) ont permis de confirmer la nature organique de l'ambre puisque l'ensemble des ambres étudiés a montré une dominance des liaisons C-C et C-O, typiques de matériaux organiques.

Beck (1965) a proposé que la spectroscopie infrarouge pourrait être utilisée pour distinguer les ambres selon leur origine géographique, les ambres de différentes origines qu'il a analysés présentant des spectres différents. Il a également préconisé l'utilisation de cette méthode pour l'analyse des ambres archéologiques, cette méthode étant peu invasive (Beck et al., 1965 ; Beck, 1986, 1985 a,b). Cependant, il a mis en évidence que cette méthode était sensible à l'altération et pouvait difficilement être utilisée sur des ambres recouverts de vernis (Beck, 1985a). Enfin, il a été noté que cette méthode n'a pas permis de se prononcer sur l'origine de certains ambres archéologiques (du Gardin, 1986).

Cette méthode a aussi été utilisée dans le cadre d'études en paléobotanique puisque de nombreux travaux sont basés sur la comparaison des spectres d'absorption infrarouge d'ambres et de résines actuelles pour proposer des origines botaniques possibles pour les ambres (e.g. Beck, 1986, 1985a ; Langenheim, 1969 ; Nohra et al., 2015). Cependant, comme cela a été souligné précédemment, la méthode est sensible à l'état d'altération des échantillons. Il est donc difficile de comparer par spectroscopie infrarouge une résine fraîche peu altérée à un ambre ayant subi diverses transformations diagénétiques. D'autre part, la spectroscopie infrarouge étant une méthode d'analyse globale, elle ne permet pas d'identifier les constituants de l'ambre et ne peut donc que difficilement être utilisée pour déterminer l'origine botanique d'un ambre.

I.3.3.4. Les analyses par résonance magnétique nucléaire (RMN)

La RMN du carbone et du proton est, comme la spectroscopie infrarouge, une méthode non destructive qui permet soit l'analyse directe d'échantillons entiers, soit l'identification de la structure moléculaire d'un composé préalablement isolé.

Ainsi, la RMN (¹³C ; RMN du solide) a par exemple été utilisée pour l'analyse globale d'ambres dominicains par Lambert et al. (1985). Ces auteurs ont ainsi pu mettre en évidence certaines transformations subies par l'ambre au cours de l'enfouissement comme la disparition progressive des groupements *exo*-méthylènes fréquents sur les composés de type labdanoïdes apparentés à l'acide ozique (**69**) ou à l'acide (-)-copalique (**70**) (**Figure I.45**) qui sont des constituants importants des résines de Fabacées (*Hymenaea* sp.) supposées être à l'origine des ambres dominicains.



Figure I.45. Structures de l'acide ozique (69) et de l'acide (-)-copalique (70).

Lambert et Poinar (2002) ont également comparé les spectres RMN (¹³C ; RMN du solide) obtenus pour des résines contemporaines et des ambres de différentes origines et ont pu subdiviser les ambres en différents groupes sur cette base. Comme dans le cas de la spectroscopie infrarouge, cette méthode ne se prête que difficilement, dans son approche globale, à la détermination de l'origine botanique des ambres en raison de sa sensibilité aux processus d'altération ayant affecté les ambres.

Cependant, la RMN peut également être utilisée pour déterminer la structure moléculaire de composés, éventuellement d'intérêt chimiotaxonomique, préalablement isolés à partir d'ambre.

Ainsi, les structures d'un certain nombre de terpénoïdes issus d'ambre ont pu être déterminées au cours des dernières années en mettant en œuvre une combinaison d'expériences de RMN comprenant, notamment, des expériences de corrélations homo- (¹H-¹H) et hétéronucléaires (¹H-¹³C) (e.g. Atolani et Olatunji, 2014 ; Clifford et al., 1997 ; De Lama et al., 2022 ; Jossang et al., 2008 ; Kimura et al., 2012 ; Lenen et al., 2023 ; Menor-Salván et al., 2010). Cette méthode est relativement coûteuse en temps car elle nécessite généralement la mise en œuvre de plusieurs méthodes analytiques en séquence pour isoler par chromatographie des composés suffisamment purs pour pouvoir en déterminer la structure à l'aide de la RMN.

I.3.3.5. Les analyses par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

Une alternative aux méthodes d'analyses globales est l'analyse moléculaire par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) de la partie des ambres soluble dans des solvants organiques. Dans ce cas, les lipides constitutifs de l'ambre sont tout d'abord séparés par chromatographie gazeuse et sont ensuite analysés individuellement par spectrométrie de masse. Cette approche donne ainsi accès aux spectres de masse de biomarqueurs individuels ayant un potentiel chimiotaxonomique, permettant ainsi de relier l'ambre à la source végétale de la résine dont il est issu. La distribution de ces composés constitue en quelque sorte une « empreinte digitale » qui est spécifique à chaque ambre et qui peut être interprétée en termes d'origine botanique et géographique et donne des informations sur les transformations diagénétiques et les processus d'altération subis par l'ambre et la résine qui en est à l'origine depuis son enfouissement en milieu sédimentaire. L'identification par spectrométrie de masse des différents constituants de l'ambre repose sur la comparaison avec des spectres de masse de bases de bases de données ou à des spectres de masse publiés dans la littérature.

Cependant, les ambres peuvent comprendre de nombreux composés dont les spectres de masse n'ont pas été répertoriés et pour lesquels des hypothèses structurales peuvent être formulées, mais qui demandent néanmoins confirmation, par exemple en utilisant la RMN après l'isolement de composés individuels.

Cette approche basée sur l'analyse par GC-MS des constituants de l'ambre a été mise en œuvre dans de nombreuses études (e.g. Czechowski et al., 1996 ; Grantham et Douglas, 1980 ; Menor-Salvan et al., 2010 ; Simoneit et al., 2021 ; Yamamoto et al., 2006). Toutefois, elle ne permet pas d'obtenir des informations concernant la partie macromoléculaire généralement majeure de l'ambre. Pour pallier ce problème, une approche possible consiste à faire précéder l'analyse de GC-MS d'une étape de pyrolyse (py-GC-MS) en présence ou non d'un agent méthylant ou silylant (TMAH ou HMDS). Ces techniques permettent, en amont, de casser des liaisons covalentes liant entre elles les sous-unités structurales constituant la composante macromoléculaire de l'ambre et d'en libérer les unités constitutives pour les analyser par GC-MS. (e.g. Sorg et Krebs, 1986 ; Anderson et Winans, 1991 ; Anderson, 1995 ; Colombini et al., 2013 ; Nohra et al., 2015 ; Poulin et Helwig, 2014).

Dans la mesure où cette approche repose sur un processus pyrolytique impliquant des réactions de craquage thermique, celui-ci peut conduire à une altération des sousunités structurales de l'ambre, et donc à une perte d'information (Anderson et Winans, 1991).

I.3.3.6. Conclusions sur les méthodes d'analyse des ambres

Il existe un ensemble de techniques analytiques permettant d'avoir accès à plusieurs aspects de la chimie des ambres et des résines. Cependant, ces techniques sont complémentaires, et aucune de ces méthodes ne permet à elle seule d'obtenir une vue d'ensemble de la constitution chimique d'un ambre.

I.3.4. Synthèse sur la chimie des ambres et classification des ambres

Les différentes études réalisées sur l'ambre ont donc montré qu'à l'instar des résines, les ambres sont constitués d'une composante de bas poids moléculaire comprenant des terpénoïdes libres et d'une composante macromoléculaire constituées de sousunités structurales terpénoïdes (Anderson et Crelling, 1995 ; Beck, 1986 ; Langenheim, 2003, 1969). L'étude des ambres par py-GC-MS a permis de proposer une première classification des ambres à partir de la composition de leur composante macromoléculaire (Anderson et al., 1992 ; Anderson, 1994, 1995) (**Tableau I.7**).

Cette classification est cependant peu satisfaisante car une grande partie des ambres sont regroupés dans la première classe et donc celle-ci ne permet pas une discrimination fine des ambres.

Une classification plus récente repose donc sur l'origine botanique des ambres et est basée sur l'identification de biomarqueurs spécifiques en utilisant la spectrométrie de masse (Dutta et al., 2011, 2014 ; Otto et Wilde, 2001). La mise en œuvre de cette approche moléculaire a permis de mettre en évidence une grande variété de producteurs de résines à l'origine de l'ambre et qui sera présentée dans la partie I.4.
Tableau I.7. Classification des ambres selon les unités structurales constituant leur composante macromoléculaire (Anderson et Crelling, 1995 ; Anderson et Botto, 1993 ; Bray et Anderson, 2008 ; Poulin et Hellwig, 2012 ; Wolfe et al., 2009). Les chiffres en gras correspondent aux structures moléculaires présentées en fin de chapitre (§ I.7).

Classe d'ambre	Sous-classe	Caractéristiques chimiques	Exemples		
- Classe I -	Classe I (généralités)	Structure basée sur la réticulation de diterpènes de la série du labdane.(125) Représente une large gamme de résines diterpéniques. Divisé en quatre sous-groupes, chacun étant défini par une stéréochimie propre des labdanoïdes et la présence ou non d'acide succinique (124).	le 5) 5) 5 5 5 5 6 6 6 6 7 6 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7		
	Classe la	Structure basée sur la réticulation de labdanoïdes avec une stéréochimie dite « régulière » (1S, 4aR, 5S, 8aR) comme l'acide communique (29), le communol (126) et le biformène (12) et comprend de l'acide succinique (124) (Figure 1.31).	Ambres de la mer Baltique, gédanite de Bitterfeld		
	Classe lb	Structure basée sur la réticulation des mêmes labdanoïdes que les ambres de la classe la mais sans contenir d'acide succinique (124).	Ambres de Birmanie et de Nouvelle-Zélande		
	Classe Ic	Structure basée sur la réticulation de labdanoïdes ayant une configuration énantiomérique au niveau de la jonction entre les cycles A et B (1S, 4aS, 5R, 8aS) comme l'acide ozique (69), l'ozol (127) et les <i>enantio</i> -biformène (78). Ne contient pas d'acide succinique (124). (Figure 1.31)	Ambres dominicains, mexicains, africains (Zanzibar, Kenya), américains (Illinois)		
	Classe Id	Structure similaire à celle des ambres de la classe lc mais contenant de l'acide succinique (124).	Ambres du Canada et du Groenland		
Classe II		Structure basée sur la polymérisation de sesquiterpènes bicycliques comme le cadinène (128). Contient des triterpènes.	Ambres indiens		
Classe III		Structure basée sur la polymérisation de styrène (129).	Siegburgite (Bitterfeld)		
Classe IV		Classe avec une polymérisation faible basée sur des sesquiterpènes comme le cédrane (28).	Ambres californiens (Pliocène)		
Classe V		Classe non-polymérisée basée sur des diterpènes.	Ambre d'Highgate Hill, Settlingite (Angleterre)		

I.3.5. La formation de l'ambre

Comme cela a été discuté précédemment (partie I.2), l'exposition de la résine aux conditions atmosphériques induit des processus de polymérisation affectant les terpénoïdes de la résine et conduit à la formation de structures oligo- ou polymériques contribuant au développement d'une composante macromoléculaire (Langenheim, 2003, Pastorova, 1997).

En parallèle de ces processus de polymérisation, les composés les plus légers sont perdus par évaporation (e.g. Lyon et al., 2001 ; Ragazzi et Schmidt, 2011 ; Seyfullah et al., 2019). Cependant, la totalité des composés volatils n'est pas perdue lors de la diagenèse et une partie de ces composés peut toujours être détectée dans les ambres (Dutta et al., 2017 ; McCoy et al., 2017).

Les facteurs qui contrôlent les processus de polymérisation ne sont pas encore exactement connus actuellement. Ainsi, des études réalisées sur la duxite, un ambre d'Europe centrale, ont montré une très faible importance de la composante macromoléculaire (Havelcová et al., 2018 ; Krumbiegel, 2002) sans pouvoir réellement expliquer le faible taux de polymérisation observé.

De la même façon, les processus intervenant dans l'altération diagénétique des résines et la formation de l'ambre ne sont pas tous connus ou compris, mais en tout cas, l'augmentation de la température avec l'enfouissement joue un rôle important.

Ainsi, l'altération thermique à laquelle sont soumis les résines et les ambres lors de leur enfouissement peut conduire à la formation de produits de dégradation qui ont perdu une fonctionnalité ou une partie du squelette hydrocarboné par rapport aux terpénoïdes biologiques dont ils sont issus. Par exemple, il n'est pas rare d'observer dans les ambres des composés bicycliques (**130**) et (**131**) qui sont supposés provenir de la dégradation de labdanoïdes par perte de la chaîne latérale (Bray et Anderson, 2009 ; Poulin et Helwig, 2014 ; **Figure I.46**). De tels composés ont également été observés lors de l'analyse d'ambres par py-GC-MS (e.g. Anderson, 1995).

Outre les réactions de coupure de liaisons covalentes, il a été proposé que certains labdanoïdes peuvent également subir des réactions de cyclisation durant la diagenèse (Simoneit et al., 2018 ; De Lama Valderrama et al., 2023).

Pour conclure, la fossilisation et la maturation des résines est un processus très complexe et implique de nombreuses étapes dont les effets ne sont pas tous connus ou compris.



Figure I.46. Formation de dérivés bicycliques par dégradation thermique de labdanoïdes des séries « régulière » (acide communique (**29**)) et « enantio » (acide ozique (**69**)) (d'après Poulin et Helwig, 2014).

Ceux-ci peuvent parfois avoir plusieurs molécules précurseurs, comme dans le cas des composés bicycliques (**130**) et (**131**) présentés sur la **figure I.46** qui peuvent être formés par altération de labdanoïdes précurseurs différents puisque ceux-ci partagent une sous-unité structurale commune constituée par les cycles A et B, que ce soit dans la série dite « régulière », ou dans la série « enantio ».

I.4. La production d'ambre au cours des temps géologiques et les espèces végétales productrices associées

Les ambres les plus anciens décrits datent du Carbonifère (Bray et Anderson, 2009), soit il y a 320 millions d'années. Ces ambres sont de la Classe I et présentent des labdanoïdes de la série de l'acide ozique (**69**) comme composés majoritaires. Il a été proposé que ces premiers ambres proviendraient de Cordaitales (Gymnospermes arborescents) ou de fougères à « graines » (ovules). En effet, durant le Carbonifère, les plantes dominantes dans les forêts faisaient partie de ces deux groupes. De plus, des « sacs secréteurs » ont été trouvés dans le bois fossilisé des genres *Cordaites* et *Mesoxylon* (Langenheim, 2003). Des études plus approfondies des substances présentes dans les sacs secréteurs de *Mesoxylon* ont mis en évidence que celles-ci comprenaient principalement des phénols et des composés volatils comme des dérivés du benzène (Mastalerz et al., 2022 ; Langenheim, 2003 ; van Bergen et al., 1995).

Il semble donc exister une certaine variabilité au sein des ambres du Carbonifère puisque certains ambres présentent une prédominance de labdanoïdes tandis que d'autres contiennent plutôt des composés phénoliques et des composés de plus bas poids moléculaire (Langenheim, 2003).

Il existe, cependant, peu de sites datés de cette époque où on peut trouver de l'ambre (Langenheim, 2003). Il faut, en effet, attendre la fin du Jurassique et le Crétacé pour voir se multiplier non seulement le nombre de sites contenant de l'ambre, mais aussi des sites nettement plus riches en ambre quantitativement (Delclòs et al., 2023; Langenheim, 2003). Ces périodes sont également celles où sont apparus des systèmes sécréteurs plus complexes dans les bois et où les conifères se sont diversifiés et multipliés (Langenheim, 2003). Cette diversification et cette augmentation de la production d'ambre s'explique aussi par le grand changement climatique qui a eu lieu durant le Crétacé. En effet, actuellement, la production de résine est grandement liée aux conditions climatiques et il semble que les climats tropicaux sont plus propices à une production importante de résine (Seyfullah et al., 2018). Il est donc raisonnable d'envisager que l'augmentation de température durant le Crétacé ait conduit à une augmentation globale de la production de résine et donc d'ambre in fine. Le référencement des sites contenant de l'ambre par Delclòs et al. (2023) a permis de mettre en évidence que la majorité des sites connus actuellement sont datés du Crétacé. Les différentes études physico-chimiques (IR, GC-MS, RMN) sur les ambres crétacés ont montré la diversité des ambres durant cette période (Tableau I.8). La filiation des ambres avec les différents producteurs de résine est cependant difficile, du fait de la méconnaissance des conditions de maturation des résines fossiles et des biomarqueurs associés aux différentes taxons d'arbres producteurs de résine. Cependant, les études paléontologiques ont permis de mettre en évidence les principales familles à l'origine des ambres crétacés (Tableau I.8).

Ils sont tous supposés être issus des conifères qui étaient prédominants durant cette période (Langenheim, 2003). Plus précisément, il est supposé que les familles principales à l'origine de ces ambres soient les actuelles Pinacées, Cupressacées, Araucariacées et Podocarpacées, mais aussi les familles éteintes que sont les Cheirolépidiacées et les Miroviacées (Delclòs, et al., 2023 ; Langenheim, 2003).

Dès la fin du Crétacé, la production d'ambre diminue pour ré-augmenter durant l'optimum climatique de l'Eocène. Cette période a coïncidé avec la formation des plus importantes zones d'ambre exploitées par l'Homme que sont la région baltique et la région de Bitterfeld (Allemagne). Les ambres de ces zones sont, d'après la littérature, associés principalement à des conifères (Pinacées ou Araucariacées), même si l'origine botanique exacte est matière à débat (Langenheim, 2003 ; Mills et White, 1973 ; Chapitre IV). Le Cénozoïque marque aussi l'apparition des ambres d'Angiospermes comprenant les ambres contenant des labdanoïdes de la série « enantio » typiques des Fabacées (e.g. Morayma et al., 2007 ; Langenheim, 2003 ; Poinar, 1992 a, b, 2001 ; Chapitre IV) et ceux contenant des triterpènes (e.g. Tang et al., 2024 ; Yamamoto et al., 2006 ; Chapitre IV).

Pour conclure, il existe un grand nombre d'espèces végétales productrices de résine à l'origine de l'ambre tout au long des temps géologiques, à partir du Carbonifère (**Tableau I.8**). Cependant, malgré l'apparition de la production de résine durant le Carbonifère, ce n'est que durant le Crétacé que cette production est devenue conséquente. Cette période a d'ailleurs été nommée « Cretaceous Resinous Interval » (Delclòs et al., 2023). Il est possible d'expliquer ces variations de production par des périodes climatiques plus propices au développement de certaines espèces végétales résineuses (Delclòs et al., 2023), mais aussi par un contexte paléogéographique favorable au développement de forêts lié à la dérive des continents qui a également, à certaines périodes, conduit à la formation de nombreux espaces d'accommodation permettant un taux de sédimentation rapide dans des environnements comme les deltas et les mangroves. Il a aussi été proposé que la production de résine ait été augmentée par l'existence d'incendies réguliers favorisés par des épisodes de sécheresse (Delclòs et al., 2023).

Un pic de production d'ambre a, par la suite, de nouveau été observé durant l'Eocène, qui est aussi caractérisé par une augmentation globale et massive de la température globale sur Terre puisque, durant cette période, nommée « Paleocene-Eocene Thermal Maximum » (PETM), les températures les plus importantes jamais connues auraient été enregistrées (Kennett et al., 1991 ; Zachos et al., 2008).

Tableau I.8. Principaux sites ambrifères	s dans le Monde,	âge des sites e	et origines botaniques
des a	ambres associée	S.	

Sites associés aux ambres	Age	Origines botaniques	Références	
Illinois	Carbonifère	Fougères à graines ou Cordaitales (Gymnospermes)	Bray et Anderson, 2009	
Redagno et Pietralba (Italie)	Permien supérieur	Gymnospermes – Famille proche des conifères actuels	Maffi et Maffi, 1992	
Alpes italiennes (Dolomites)	Trias supérieur (Carnien)	Cheirolépidiacées	Roghi et al., 2006, Schmidt et al., 2006 ;	
Lunz (Autriche)	Trias supérieur (Carnien)	Cupressacées ou Pinacées	Fischer et al., 2017	
Liban	Jurassique – Crétacé	Araucariacées ou Cheirolépidiacées	Nohra et al., 2014, Azar et al., 2010	
lle de Wight (Angleterre)	Crétacé inférieur (Barrémien)	Pinacées ou Cheirolépidiacées	Bray et Anderson 2008	
Alpes (France)	Crétacé (Aptien- Albien)	Araucariacées ou Cheirolépidiacées	Nohra et al., 2015 ; Saint- Martin et al., 2021	
Provence (France)	Crétacé (Albien - Santonien)	Cupressacées, Araucariacées et Cheirolépidiacées	Nohra et al., 2015 ; Saint- Martin et al., 2021	
Charente-Maritime (France)	Crétacé (Albien- Cénomanien)	Cupressacées ou Cheirolépidiacées	De Lama et al., 2022 ; Nohra et al., 2015	
Pyrénées (France)	Crétacé supérieur (Cénomanien)	Araucariacées ou Cheirolépidiacées	Girard et al., 2013 ; Nohra et al., 2015	
Anjou (France)	Crétacé supérieur (Cénomanien)	Araucariacées ou Cheirolépidiacées	Nohra et al., 2015	
Bassin basque- cantabrique (Espagne)	Crétacé (Albien – Maastrichtien)	Cheirolépidiacées, Cupressacées et Araucariacées	Menor-Salván et al., 2010, 2016 ; Najarro et al., 2010	
Krizany (République Tchèque)	Crétacé (Cénomanien)	Araucariacées (valchovite*)	Havelcová et al., 2014, 2016	
Kuji (Japon)	Crétacé supérieur (Santonien)	Araucariacées	Kawamura et al., 2018 ; Kimura et al., 2012	
Oise (France)	Eocène	Fabacées	Nohra et al., 2015 ; Jossang et al., 2008	
Geisetal (Allemagne)	Eocène moyen à supérieur	Burséracées, Diptérocarpacées ou Altingiacées	Kosmowska-Ceranowicz et Krumbiegel, 1990 ; Simoneit et al., 2018	
Mer Baltique	Eocène moyen à supérieur	Pinacées (succinite*) ou Araucariacées	Mills et al., 1984 ; Czechowski et al., 1996	
Bitterfeld (Allemagne)	Oligocène-Eocène	Pinacées (succinite*) et Cupressacées et Altingiacées (siegburgite*) et Burséracées (glessite*)	Drzewicz et al., 2016 ; Pastorova et al., 1998 ; Yamamoto et al, 2006 ;	
Sumatra (Indonésie)	Miocène	Diptérocarpacées	Wang et al., 2018	
République Tchèque	Miocène	Cupressacées (duxite*)	Havelcová et al., 2018	
Sicile (Italie)	Miocène	Fabacées (simetite*)	Van der Werf et al., 2016	

*Type d'ambre considéré

I.5. L'ambre et l'Homme : exploitation et utilisations

L'ambre a toujours joué un rôle socio-économique fort. Les premiers objets façonnés en ambre datent du Paléolithique, plus précisément de l'Aurignacien (43 000 à 31 000 AP). Les objets datant de cette époque proviennent d'Isturitz (Pays-Basque, France ; White et Normand, 2015) et comprennent des perles de bijoux ainsi qu'une statuette de cheval (White et Normand, 2015). Cela montre que dès cette période, l'ambre a été utilisé à des fins ornementales et probablement religieuses, bien que cela était relativement rare.

Assez rapidement, le nombre d'objets en ambre s'est multiplié et, durant le Néolithique (9000 à 3000 AP), l'utilisation de l'ambre semble assez largement répandue (Langenheim, 2003). Outre la fabrication de bijoux, l'ambre est lié, dans le cas de certaines populations, à des pratiques religieuses. Par exemple, les populations nordiques utilisaient l'ambre comme objet lié au culte du soleil, et de nombreux objets en ambre façonnés sous la forme de disques solaires ont été trouvés (Langenheim, 2003). Ce lien avec le soleil sera repris par de nombreux cultes puisqu'on retrouve de l'ambre dans des cultes égyptiens du dieu Râ (Dieu du soleil) et des cultes de Phaéthon (Fils d'Hélios, dieu grec du Soleil) (Ovide, I^{er} siècle av JC).

A partir de l'âge du Bronze (2700 à 800 BCE), plusieurs centaines de sites archéologiques présentent des objets en ambre (Causey, 2011, 2020 ; Du Gardin, 1986 ; Langenheim, 2003). Cette période marque en effet un tournant dans l'exploitation de l'ambre par l'Homme étant donné la complexification du façonnage des bijoux et différents objets en ambre (Causey, 2011 ; Du Gardin, 1986 ; Langenheim, 2003). Outre l'amélioration des techniques de façonnage, l'âge du Bronze marque l'apparition d'un commerce de plus grande ampleur puisque de l'ambre est trouvé en Egypte (3200 AP) dans des tombeaux de la Sixième Dynastie. L'Egypte ne possédant pas de gisements locaux d'ambre (Langenheim, 2003), il a été supposé que durant cette période, des voies commerciales permettant des échanges entre les peuples nordiques et méditerranéens ont été mises en place. La présence de céramiques façonnées de façon typiquement méditerranéenne dans la région baltique conforte ainsi l'hypothèse d'échanges durables entre les peuples.

Ainsi, l'ambre est devenu l'un des premiers matériaux de « luxe » (i.e. d'utilisation non nécessaire) a avoir été commercialisé (Causey, 2011 ; Langenheim, 2003). Durant cette période, même si les peuples à l'origine du commerce de l'ambre étaient

scandinaves et baltiques, le façonnage des ambres ne s'effectuait pas sur place. En effet, une majorité des objets façonnés à partir d'ambre ont été découverts dans des sites comme Ugarit (Proche-Orient, Syrie), Tell Atchana (Turquie) (Causey, 2011, 2020; Cline, 2012; Frondel, 1968; Yener, 2004) et dans les grandes villes mycéniennes (Beck et al., 1974).

Dès la fin de l'âge du Bronze, les voies commerciales étaient bien établies et l'ambre distribué aux quatre coins de l'Europe puisque l'on trouve de l'ambre balte en Grèce et en Crète, les gisements potentiels d'ambre local étant inexistants. De plus, des perles d'ambre trouvées sur l'épave d'Uluburun datant de l'âge du Bronze ont été découvertes, ce qui témoigne d'un transport maritime de l'ambre durant cette période (Pulak, 2012).

L'âge du Fer (1200 à 100 BCE) est caractérisé par une nouvelle complexification du façonnage des objets en ambre grâce à l'apparition de nouveaux outils en fer (Causey, 2011, 2020 ; Langenheim, 2003). Certaines régions deviennent même spécialisées dans le travail de l'ambre, comme Picenum (côte est de l'Italie, sur les bords de l'Adriatique) qui prospère grâce à la production d'objets façonnés en ambre (Causey, 2011 ; Ridgway, 2016). L'ambre durant cette période est très prisé, particulièrement dans la région du Levant où il est associé à une grande richesse (Causey, 2011). Parallèlement, c'est à partir de cette période que de « faux » ambres provenant de résines actuelles d'arbres du Levant sont aussi commercialisés, devenant ainsi probablement l'un des premiers matériaux victime de falsification (Causey, 2011 ; Odriozola et al., 2019).

Par la suite, les produits issus de l'ambre deviennent moins présents en bijouterie, ceux-ci étant considérés comme démodés à l'époque classique. L'Italie centrale poursuit sa production d'ambre avec les Etrusques (figurines et bijoux), avec cependant un nombre d'objets diminuant (Causey, 2011).

L'époque romaine est marquée par une nouvelle augmentation du façonnage de l'ambre. En effet, la conquête des terrains germaniques rend l'ambre beaucoup plus accessible et relance la production d'objets en ambre (Causey, 2011, 2020). La cité d'Aquilée en Italie devient notamment un centre de production majeur entre le l^{er} et III^{ème} siècle de notre ère, ce qui contribue largement à la richesse de cette région. Celle-ci, en bordure de la mer Adriatique et à l'embouchure du fleuve Natissa, est le

port final des routes de l'ambre provenant de la mer Baltique, des régions danubiennes et rhénanes (Langenheim, 2003). Dans *Histoire Naturelle*, Pline l'Ancien évoque le commerce de l'ambre en tant que commerce de luxe, celui-ci pouvant atteindre des prix très élevés : « [L'ambre] tellement apprécié est-il comme objet de luxe, qu'une minuscule effigie humaine faite d'ambre, se serait vendue à un prix plus élevé que des hommes vivants, corpulants et vigoureux » (Livre 27 :12.2, Pline l'Ancien).

Durant le Moyen-Age (V^{ème} – XV^{ème} siècle), l'ambre a été remplacé progressivement par des matériaux plus rares et plus précieux comme les diamants ou l'or et a perdu un peu de son poids commercial. Cependant, de l'ambre est toujours trouvé dans de nombreuses sépultures des classes moyennes à basses (Langenheim, 2003). Un nouvel essor dans l'exploitation de l'ambre s'est produit au XV^{ème} siècle, lorsque l'empire prussien a mis en place une guilde d'artisans bijoutiers qui ont re-développé le savoir-faire lié à la manipulation de l'ambre en bijouterie, mais aussi pour fabriquer des objets religieux. Ainsi, de nombreux crucifix, gobelets cérémoniels et plateaux en ambre ont été façonnés durant cette période. Par la suite, une grande partie de l'exploitation de l'ambre a eu lieu principalement en Europe du Nord, autour de la mer Baltique (Langenheim, 2003). De nos jours, l'ambre reste très utilisé en bijouterie et artisanat. C'est la deuxième gemme importée aux Etats-Unis derrière les diamants (Langenheim, 2003).

I.6. Conclusion

L'ambre est donc une résine fossile ayant hérité d'une partie du cortège moléculaire de la résine dont il est issu. Ce cortège moléculaire est hautement spécifique et dépends donc de la source dont il est issu, expliquant ainsi l'importante diversité des ambres détectée par les diverses études moléculaires effectuées ces dernières décennies. L'étude moléculaire des ambres permet donc d'appréhender une partie de la biodiversité de l'époque de sa production. Malgré les nombreuses recherches sur le sujet, certains ambres, comme l'ambre baltique, manquent encore de consensus concernant leur origine botanique. En effet, bien que l'ambre conserve une partie des composés de la résine d'origine, il subit plusieurs transformations diagénétiques qui modifient également son profil moléculaire. Il est donc essentiel de comprendre ces transformations pour retracer l'origine botanique. Nos recherches nous ont ainsi amenés à mettre en évidence des composés soufrés uniquement visibles dans les ambres permettant ainsi de comprendre une de ces transformations diagenétiques possibles.

I.7. Molécules citées dans le chapitre



18

16 Oxyde de manoyle





20 Abiétol

19



46/46'

Sciadine



Acide (-)-copalique



91' : épimère 3α-OH 92' : épimère 3α-OH

- Bréïne α -élémol
- Acide
- Acide β-boswellique

95' : épimère 3β-OH

 α -boswellique 94' : épimère 3β-OH







Dérivés bicycliques +1 à 2 double(s) liaison(s)

HO₂C⁻ 132 Acide Iévopimarique

<u>CHAPITRE II</u> : IDENTIFICATION DE COMPOSÉS ORGANO-SOUFRÉS DANS LES AMBRES : MISE EN ÉVIDENCE D'UN PROCESSUS DE DIAGENÈSE PRÉCOCE ET IMPLICATIONS PALÉOENVIRONNEMENTALES



II.1. Introduction

L'ambre est constitué d'un assemblage moléculaire dominé par des composés terpéniques et d'une composante macromoléculaire de terpènes polymérisés héritée de la résine dont il est issu (Chapitre I, partie I.3). L'étude moléculaire de ces composés par GC-MS et/ou Py-GC-MS, notamment, peut donc fournir des informations sur l'origine botanique de l'ambre (Chapitre I, partie I.3.3.). Cependant, l'assemblage moléculaire qui constitue les ambres peut être altéré de façon significative par diverses transformations durant l'enfouissement et la diagenèse. Comme les lipides biologiques dont les biomarqueurs moléculaires dans les ambres sont issus n'ont pas toujours été préservés sans altération dans l'ambre, la corrélation entre le signal moléculaire fossile observé et une source botanique spécifique est souvent difficile à établir. Dans ce contexte, l'identification précise de biomarqueurs moléculaires dans les ambres peut permettre une meilleure compréhension de leur origine et mode de formation et conduit ainsi à une détermination plus précise des sources botaniques. Les transformations subies par les biomarqueurs dans les ambres peuvent également fournir des informations utiles sur les conditions paléo-environnementales ayant prévalu dans les écosystèmes où poussaient les arbres producteurs de résine, ainsi que sur les processus d'altération de la matière organique associés à ces milieux.

Dans ce contexte, l'analyse moléculaire par GC-MS de l'ambre de Piolenc (Santonien, France ; coll. Dr B. Gomez) a conduit à la mise en évidence d'une nouvelle série de composés possédant une masse moléculaire de 350 Da. Dans le cadre d'un stage de master 1 (Lenen, 2022), l'isolement et l'identification par RMN de deux membres de cette série de composés (**9a**) et (**11a**) a révélé la présence de composés soufrés dérivant de l'acide isopimarique (**18**) (Lenen et al., 2023).

La présence de composés organiques soufrés a ensuite été étudiée par GC-MS dans un grand nombre d'échantillons d'ambre d'âges et d'origines botaniques/géographiques variés afin de mieux connaitre la répartition de ces composés dans les ambres et d'évaluer l'importance des processus de sulfuration affectant les ambres. Il s'est également agi d'étudier la variabilité structurale des composés organiques soufrés rencontrés dans les ambres. Des voies de formation possibles de ces composés soufrés ont ensuite été étudiées à l'aide, notamment, d'expériences de sulfuration en laboratoire mettant en jeu des résines de conifères fraîches ou des sous-fractions obtenues à partir de ces résines et des espèces réduites du soufre similaires à celles présentes dans les environnements naturels anaérobies et issues de la réduction microbienne des sulfates.

II.2. Mise en évidence de nouvelles séries de diterpènes soufrés dans les ambres

II.2.1. Présentation et description de la série

Les dépôts datant du Santonien inférieur de Piolenc (Vaucluse, France) sont caractérisés par un ensemble de lits de sable et de lignite (Saint-Martin et al., 2013). Deux niveaux gris sombre ligniteux se sont révélés contenir des cuticules d'origine végétale ainsi que de l'ambre. L'analyse moléculaire par GC-MS (**Figure II.1**) d'une fraction apolaire obtenue à partir de l'extrait organique méthylé de l'ambre du niveau le plus ancien a montré la présence d'une série de composés qui n'avaient pas été décrits précédemment et qui présentent une masse moléculaire de 350 Da (**Figure II.2**).



Figure II.1. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un échantillon d'ambre du niveau inférieur des dépôts santoniens de Piolenc (Vaucluse). En rouge : les composés organiques soufrés étudiés dans ce chapitre. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Outre ces nouveaux composés, cette fraction contient des dérivés terpéniques plus communs et caractéristiques d'un ambre de Cupressacées (Chapitre III, § III.2.2.3). La **Figure II.2** présente les spectres de masse des composés (**9b**) à (**15b**). Les spectres de masse des composés (**9b**) et (**10b**) sont très similaires avec des fragments majeurs à m/z 168, 229, 289 et un ion moléculaire à m/z 350. Les composés (**13b**) et (**15b**) présentent des spectres de masse possédant des caractéristiques communes avec des ions importants à m/z 229, 289, 335 et 350 [M+]⁻. Sur cette base, on pourrait proposer que ces différents composés soient apparentés. Les composés (**12b**) et (**14b**) présentent toutefois un mode de fragmentation assez distinct de celui des autres composés. En effet, le spectre de masse du composé (**12b**) comporte des fragments principaux à m/z 121, 193, 229, 291, 318 et un ion moléculaire à m/z 350. Les fragments à m/z 193, 291 et 318 sont absents dans les autres spectres de masse (**Figure IV.2**). Le composé (**14b**), quant à lui, est le seul avec une masse moléculaire de 348 Da. Cependant, son spectre de masse présente des fragments à m/z 167 et 289 que l'on retrouve dans les spectres de masse d'autres composés de la série.

L'étude de la fragmentation en spectrométrie de masse peut donner quelques indices sur la famille moléculaire à laquelle appartiennent ces composés (Enzell et al., 1972). Ainsi, les fragments à *m*/*z* 121 et *m*/*z* 181 que l'on retrouve dans l'ensemble des spectres de masse des composés de la série à l'exception de (**14b**) sont des fragments fréquemment rencontrés dans des spectres de masse de composés diterpéniques (Azemard et al., 2016 ; Chang et Thomas, 1971). Ceux-ci sont associés, notamment, à des diterpènes tricycliques sans double liaison sur le cycle B comme l'acide sandaracopimarique (**16**), l'acide pimarique (**17**) et l'acide déhydroabiétique (**7**) (**Figure II.1**).

Si l'on suppose que les composés qui présentent un ion moléculaire [M⁺][•] à *m/z* 350 sont des dérivés de composés diterpéniques comme le suggèrent le mode de fragmentation en spectrométrie de masse et l'abondance, par ailleurs, des composés diterpéniques dans l'ambre de Piolenc, on pourrait considérer que la masse moléculaire de 350 Da correspond formellement à la masse moléculaire de l'ester méthylique d'un acide diterpénique (316 Da) à laquelle l'équivalent d'une masse de 34 Da a été ajoutée. Cette masse pourrait correspondre à H₂O₂ ou H₂S. Il est cependant difficile d'aller plus loin concernant la structure de ces composés sur la seule base des spectres de masse obtenus par GC-MS. Il a donc été décidé d'isoler certains membres

de cette famille afin de déterminer leurs structures à l'aide de la spectrométrie de masse de haute résolution (HR-MS) et d'études complètes de RMN comprenant des expériences 1D (¹H, ¹³C, DEPT) et des expériences de corrélation homonucléaire (COSY, NOESY) et hétéronucléaire (HMBC, HSQC).



Figure II.2. Spectres de masse (GC-MS, IE, 70 eV) de sept composés présents dans la fraction apolaire de l'extrait organique méthylé (DMA-DMF) de l'ambre de Piolenc appartenant à la famille de composés inconnus de masse moléculaire de 350 Da.

II.2.2. Isolement et caractérisation des composés (9b), (10b) et (11b)

Trois membres de cette famille de composés (9b), (10b) et (11b) ont été isolés à partir de l'ambre de Piolenc (cf. Chapitre VI Matériel et Méthodes) dans le cadre d'un stage de master 1 (Lenen, 2022). Afin d'isoler ces composés, l'extrait organique méthylé obtenu à partir de l'ambre de Piolenc a tout d'abord été fractionné sur colonne de silice (cf. Chapitre VI. Matériel et Méthodes). Afin de tester la présence des composés d'intérêt dans les différentes fractions obtenues lors du fractionnement, celles-ci ont été analysées par GC-MS. Quatre fractions se sont avérées être particulièrement enrichies en trois composés d'intérêt (9b), (10b) et (11b) disponibles en quantités suffisantes pour envisager la purification complète en vue d'une étude structurale par RMN. Un fractionnement supplémentaire par HPLC sur colonne de silice a été réalisé (Chapitre VI. Matériel et Méthodes) et a permis d'isoler le composé (9b) (1,4 mg) et (11b) (0,5 mg) avec des puretés respectives de 94% et 91%. Les évaluations de pureté ont été réalisées par GC-FID. Le composé (10b) a également été isolé, mais en quantités insuffisantes (< 0,2 mg) pour permettre une caractérisation complète par RMN. L'ion [M+H]⁺ obtenu pour le composé (9b) par HR-MS (électrospray (ESI), mode d'ionisation positif) à m/z 351,2351 correspond à la formule moléculaire C₂₁H₃₅O₂S (calc. : m/z 351,2352) qui comprend donc un atome de soufre. De même, l'ion [M+H]+ obtenu par HR-MS dans le cas du composé (11b) à m/z 351,2354 correspond à la même formule moléculaire C₂₁H₃₅O₂S. L'étude par RMN proprement dite des composés (9b) et (11b) a été réalisée par L. Lenen dans le cadre de son stage de M1 (Lenen, 2022). Le détail de l'étude structurale par RMN est présenté dans Lenen et al. (2023) dont je suis coautrice et qui est attaché en annexe de cette thèse. L'étude par RMN des structures de (9b) et (11b) a clairement montré que ces composés correspondent à des acides diterpénoïdes sulfurés qui, compte tenu de leur squelette hydrocarboné, sont apparentés à l'acide isopimarique (18) ou à l'acide sandaracopimarique (16). Les structures des composés (9b), (10b) et (11b) (sous la forme d'esters méthyliques) ainsi que celles des acides isopimarique (18) et sandaracopimarique (16) sont présentées sur la Figure II.3.



Figure II.3 : Structures des composés soufrés (**9b**), (**10b**) et (**11b**) identifiés dans l'ambre de Piolenc ainsi que des acides isopimarique (**18**) et sandaracopimarique (**16**).

Le composé (**10b**) (**Figure II.3**) correspond, quant à lui, très vraisemblablement à un épimère en C-14 du composé (**9b**) étant donné les fortes similitudes entre leurs spectres de masse (**Figure II.2**). Seuls les temps de rétention en chromatographie en phase gazeuse et les intensités relatives des principaux fragments dans les spectres de masse sont différents.

Il résulte de ces identifications que les autres composés de masse 350 Da détectés dans l'ambre de Piolenc (cf. Figures II.2 et II3) sont sans doute également des composés soufrés issus d'acides diterpéniques. Certains d'entre eux pourraient, par exemple, être apparentés aux diterpénoïdes de la série de l'acide isopimarique (18) comme les composés (9b), (10b) et (11b), mais avec l'atome de soufre localisé sur d'autres positions. D'autres composés pourraient être apparentés aux acides diterpéniques des séries (iso)pimarique (17a)/(18a), abiétique (19) et communique (20). Quant au composé ayant une masse moléculaire de 348 Da (14b) (Figure II.2), il s'agit sans doute d'un analogue diterpénique possédant une double liaison ou un cycle supplémentaire.

II.3. Origine des composés soufrés dans les ambres : signification géochimique et paléoenvironnementale

II.3.1. Mode de formation des composés soufrés dans les ambres de Piolenc

Les structures des composés (9b), (10b) et (11b) montrent clairement une filiation de ces composés aux diterpènes des séries de l'acide isopimarique (18) et de l'acide sandaracopimarique (16). Il s'agit là, à notre connaissance, de la première identification de sulfures dans de l'ambre. Dans la mesure où nous avons pu mettre en évidence la présence des composés organiques soufrés (COS) dans des ambres datant de différentes périodes géologiques et issus de sources botaniques distinctes (Tableau II.1), nous pouvons proposer que ces composés aient été formés par des processus de sulfuration diagénétique affectant des diterpénoïdes biologiques issus des résines.

Si des composés soufrés n'ont jamais été décrits dans les ambres et résines, cependant, de nombreuses structures organo-soufrées ont été identifiées dans les pétroles et sédiments. Celles-ci comprennent des composés de bas poids moléculaire (e.g. de Leeuw et Sinninghe Damsté, 1990; Sinninghe Damsté et De Leeuw, 1990; Behrens et al., 1997; Poinsot et al., 1998; Schaeffer et al., 2006), mais également des structures macromoléculaires où le soufre joue le rôle d'agent de réticulation (e.g. Sinninghe-Damsté et al., 1988 ; Kohnen et al., 1991 ; Adam et al., 1991a, 1993 ; Schaeffer et al., 1995 ; Adam et al., 2000 ; Kok et al., 2000). Une grande variété de structures a ainsi été mise en évidence et des composés soufrés sédimentaires apparentés aux principales familles de lipides biologiques à l'origine de biomarqueurs moléculaires fossiles ont ainsi été identifiés. Ils comprennent des composés linéaires (Schmid et al., 1987), des stéroïdes (Behrens et al., 1997), des triterpènes et hopanoïdes (Valisolalao et al., 1984 ; Adam et al., 1991b ; Schaeffer et al., 2006), des caroténoïdes (Schaeffer et al., 1995), des dérivés de la chlorophylle (Schaeffer et al., 1993), ainsi que des composés sesterterpéniques et diterpéniques (Brassel et al., 1986 ; Sinninghe Damsté et al., 1989; Poinsot et al., 1997, 1998). Parmi ces derniers, cependant, aucun composé soufré apparenté aux acides résiniques n'a été identifié à ce jour.

Site étudié	Pays	Age de l'ambre	COS issus de l'acide isopimarique (18) ou sandaracopimari que (16)	COS issus de labdanoïdes	Autres COS (origines non définies)
Piolenc	France	Santonien (Crétacé)	(9a), (10a), (11a)	—	(12a), (13a), (14a), (15a)
La Buzinie	France	Cénomanien- Albien (Crétacé)	(9a), (10a), (11a)	(37a/38a), (54a/55a), (56a), (57), (58a)	(14a)
Le Mas d'Azil	France	Maastrichtien (Crétacé)	_	(57), (56a), (54a/155a) dominants	_
Montbrun/Sainte- Croix	France	Maastrichtien (Crétacé)	—	(57), (56a), (54/55), (61a) dominants + COS sans fonction acide en C-4	_
Saint-Lon-Les- Mines	France	Crétacé		(57), (56a), (54a / 55a), (61) dominants	
Fourtou/Sougraine	France	Cénomanien (Crétacé)	(9a/10a)	(56a), (57)	Oui
La Garnache	France	Cénomanien (Crétacé)	(10a), (44), (45)	_	Oui dominants dans l'échantillon
Oise	France	Eocène		Oui (structures non élucidées)	Oui
Teruel	Espagne	Cénomanien- Albien (Crétacé)		(56a), (57)	
Alava	Espagne	Cénomanien- Albien (Crétacé)		(56a), (57)	_
Uña	Espagne	Barrémien (Crétacé)		_	Oui
Valchovite	République tchèque	Crétacé inférieur	—	(56a), (57)	_
Succinite Bitterfeld	Allemagne	Eocène	(9a/10a) en très faibles quantités		_
Chiapas	Mexique	Miocène	—	(56a), (57) en très faibles quantités	—

Tableau II.1. Liste des ambres pour lesquels des composés organiques soufrés ont été détectés. Les chiffres en gras correspondent aux structures moléculaires présentées en fin de chapitre (§ II.6).

Le mode de formation des COS sédimentaires a fait l'objet de nombreux travaux au cours des dernières décennies. Il est apparu que ces composés ont sans doute été formés par des processus diagénétiques abiotiques à un stade précoce de l'enfouissement, ou même dans la colonne d'eau, et mettant en jeu des lipides biologiques fonctionnalisés et des espèces inorganiques de soufre formées par

réduction microbienne des sulfates en milieu anaérobie (e.g. Sinninghe-Damsté et De Leeuw, 1990 ; Adam et al., 1991a ; Schaeffer et al., 1995 ; Adam et al., 2000 ; Kok et al., 2000 ; Werne et al., 2000 ; Filley et al., 2002 ; Amrani, 2014). Les carbonyles et les doubles liaisons se sont révélés être des fonctions particulièrement susceptibles d'être sulfurées (e.g. Adam et al., 1991a ; De Graaf et al., 1992 ; 1995 ; Schouten et al., 1997 ; Behrens et al., 1997 ; Poinsot et al., 1997 ; Schneckenburger et al., 1998 ; Amrani et al., 2004).

Dans ce contexte, l'hypothèse la plus probable pour la formation des composés (9a), (10a) et (11a) serait alors la sulfuration diagénétique d'acide isopimarique (18) ou sandaracopimarique (16) par des espèces inorganiques du soufre comme H₂S ou les polysulfures formés par réduction microbienne des sulfates. En effet, les acides isopimarique (18) et sandaracopimarique (16) comportent deux doubles liaisons non activées permettant l'addition de soufre sur les positions C-8, C-14, C-15 et C-17 (Figure II.4). Cependant, il est à noter que les composés (9a)/(10a) et (11a) présentent des sites de sulfuration distincts. En effet, dans le cas des composés (9a)/(10a), le soufre s'est additionné sur les positions les plus substituées (C-8/C-14), tandis que dans le cas du composé (11a), il est lié aux positions les moins substituées (C-15/C-17). Il est dans ce cas évident que la sélectivité des deux types de sulfuration est contrastée et qu'il est sans doute nécessaire d'envisager deux mécanismes différents pour rendre compte de la formation de ces composés. Il faut, d'autre part, que ces réactions puissent se produire dans des conditions similaires, expliquant l'apparition concomitante de ces deux types de composés.



Figure II.4. Voie de formation diagénétique par réaction avec des espèces réduites du soufre issues de la réduction microbienne de sulfates a) des composés (**9a**) et (**10a**) à partir de l'acide sandaracopimarique (**16**) et/ou isopimarique (**18**). b) du composé (**11a**) à partir de l'acide sandaracopimarique (**16**) (schéma adapté à partir de la Figure 6 dans Lenen et al.,

2023).

La formation du composé (**11a**), où le soufre est localisé sur les positions les moins substituées (C-15 et C-17; **Figure II.4.**) des doubles liaisons de l'acide sandaracopimarique (**16a**), le précurseur postulé, peut s'expliquer par un mécanisme d'addition radicalaire de H₂S comme présenté sur la **Figure II.5**.



Figure II.5. Mécanisme de formation du composé (**11a**) par addition radicalaire de H₂S sur l'acide sandaracopimarique (**16**).

L'addition des radicaux HS[•] se produit, en effet, selon un mécanisme de réaction en chaîne, sur les positions les moins substituées des doubles liaisons (sélectivité de type anti-Markovnikov ; e.g. Stacey et Harris, 1963 ; Adam et al., 1998 ; Dénès et al., 2014).

La mise en place d'un tel mécanisme demande néanmoins que les conditions permettent la génération des premiers radicaux. Ceux-ci pourraient être formés par irradiation lumineuse (Adam et al., 1998), un processus sans doute peu probable dans le cas de résines déposées en milieu sédimentaire anaérobie, ou alors par des processus redox (oxydation). Ces processus pourraient affecter directement H₂S/HS⁻ ou alors être tout d'abord à l'origine de radicaux non soufrés qui pourront alors, un fois formés, abstraire de l'hydrogène sur H₂S pour conduire aux radicaux HS⁻ (Dénès et al., 2014).

Un tel mécanisme ne pourrait cependant pas rendre compte de la formation des composés (9a) et (10a) où le soufre est localisé sur les positions les plus substituées des doubles liaisons des précurseurs potentiels tels que l'acide isopimarique (18) et l'acide sandaracopimarique (16). Une telle situation est très fréquente dans le cas des composés organo-soufrés sédimentaires et a été reportée dans le cas de nombreuses familles moléculaires comme, notamment, les stéroïdes (Behrens et al., 1997 ; (21) ; Figure II.6), les hopanoïdes (Schaeffer et al., 2006 ; (22) ; Figure II.6), les labdanoïdes et autres composés polypréniques réguliers (Poinsot et al., 1997, 1998 ; (23) et (24) ; Figure IV.6) ou encore des triterpènes bi- ou tricycliques dérivés du squalène (Werne et al., 2000 ; Gug et al., 2009 ; Adam et al., 2009 ; (25) et (26) ; Figure II.6).



Figure II.6. Exemples de composés organo-soufrés sédimentaires portant le soufre sur des positions substituées

Un mécanisme possible d'incorporation de soufre sur les positions les plus substituées pourrait être une addition de H₂S catalysée par les acides qui se produit normalement avec une sélectivité de type Markovnikov. Cependant, elle nécessite généralement des conditions très acides et des températures élevées, peu probables dans un environnement sédimentaire (van Zijll Langhout et Waterman, 1954 ; De Graaf et al., 1995).

Il a été montré, par ailleurs, que des doubles liaisons isolées pouvaient être sulfurées au niveau de la position la plus substituée par les polysulfures en milieu alcalin pour conduire à des thiols et des polysulfures organiques dans des conditions de températures plus compatibles avec celles régnant dans un environnement sédimentaire récent que celles nécessaires pour l'addition acido-catalysée de H₂S (de Graaf et al., 1995; Poinsot, 1997; Schneckenburger, 1997). Dans le cas de diènes, cette réaction conduit à des sulfures cycliques (De Graaf et al., 1992 ; Poinsot et al., 1997 ; Adam et al., 2009 ; Gug et al., 2009). Il a été montré que dans ces conditions, le mécanisme d'addition du soufre sur les doubles liaisons est concerté (Poinsot, 1997 ; Schneckenburger, 1997 ; Poinsot et al., 1997 ; Adam et al., 2009 ; Gug et al., 2009). Le mécanisme possible de la formation des composés (9a) et (10a) par sulfuration de l'acide isopimarique (18) par les polysulfures est explicité dans la Figure II.7. Ce processus conduit sans doute d'abord à la sulfuration de la double liaison en C-14, stériquement plus accessible, suivie par la cyclisation en C-8. L'addition de l'atome de soufre et de l'atome d'hydrogène a lieu de façon concertée du même côté de la double liaison et conduit en principe à la formation du cycle le plus petit (Schneckenburger, 1997; Poinsot, 1997; Poinsot et al., 1997).



Figure II.7. Mécanisme proposé pour la formation des composés (*9a*) et (*10a*) par réaction de l'acide isopimarique (*18*) avec des polysulfures (adaptée à partir de la Figure 7 dans Lenen et al., 2023).

II.3.2. Origine des autres composés soufrés détectés dans les ambres de Piolenc

Une grande partie des composés ayant une masse moléculaire de 350 Da dans l'ambre de Piolenc n'a pas pu être isolée et caractérisée par RMN. Cependant, étant donné leur masse moléculaire et leur mode de fragmentation en spectrométrie de masse, similaire à ceux des composés identifiés par HR-MS et RMN, il est extrêmement probable qu'ils correspondent aussi à des diterpènes ayant subi une sulfuration, à l'instar des composés (9a), (10a) et (11a). A priori, tous les diterpènes possédant deux doubles liaisons non activées relativement proches peuvent subir le même type de réaction de sulfuration que celles décrites ci-dessus, pour rendre compte de la formation de (9a), (10a) et (11a). On pourrait proposer par exemple que les composés que nous n'avons pas pu identifier formellement correspondent des isomères des molécules (9a) et (11a) dont la formation pourrait s'expliquer par la sulfuration de l'acide pimarique (17) (Figure II.8.a), ou encore par sulfuration de composés diterpéniques résultant de la migration de doubles liaisons au niveau de l'acide isopimarique (18) et de l'acide sandaracopimarique (16) (Figure II.8.b).

Une sulfuration de l'acide abiétique (**19**) pourrait également être envisagée après migration des doubles liaisons (**Figure II.8.c**). Enfin, il n'est pas exclu qu'une partie des composés soufrés détectés dans les ambres aient été formés par sulfuration de diterpènes bicycliques appartenant à la série du labdane, comme l'acide communique (**20**).



Figure II.8. Structures et modes de formation possibles pour les autres composés ayant une masse moléculaire de 350 Da (sous forme d'esters méthyliques) dans l'ambre de Piolenc à partir de l'acide : a) pimarique (17), b) sandaracopimarique (16) isopimarique (18) après migration des doubles liaisons, c) abiétique (19). Les flèches rouges indiquent les positions de sulfuration.

II.3.3. Etude expérimentale de la formation des composés soufrés dans les ambres

Afin de vérifier les hypothèses sur l'origine et la formation des diterpénoïdes soufrés dans l'ambre, des expériences de sulfuration ont été réalisées dans le cadre d'un stage de master 1 (Magnin, 2023). Ces expériences mettent en jeu des résines de conifère fraîches méthylées ou des constituants de résines méthylés et des polysulfures dans des conditions compatibles avec celles régnant en milieu sédimentaire anoxique.

Trois substrats ont été mis en œuvre lors de ces expériences de sulfuration. Ils comprennent des acides diterpéniques représentant trois grandes familles de diterpènes : la famille de l'acide (iso)pimarique (18), celle de l'acide abiétique (19) et celle de l'acide agathique (27) (Figure II.9). Le premier substrat utilisé est une résine de cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica*) qui a été préalablement méthylée. Cette résine est caractérisée une contribution significative des acides isopimarique (18) et sandaracopimarique (16a) (Figure II.9), les précurseurs postulés pour les composés soufrés (9a), (10a) et (11a) identifiés dans l'ambre de Piolenc. Le second substrat utilisé est de l'acide abiétique (19) commercial (Figure II.9). Le troisième substrat mis en œuvre est une sous-fraction isolée d'une résine de pin colonnaire (*Araucaria columnaris*) riche en acide agathique (27) (Figure II.9). Des composés pouvant correspondre à des sulfures issus de la sulfuration de l'acide agathique (27) ou de labdanoïdes apparentés ont, en effet, été détectés par GC-MS dans de l'ambre en provenance de La Buzinie (Charente, France, Chapitre III, §III.2.1.1.).



Figure II.9. Composés diterpéniques dont la sulfuration par des polysulfures a été plus spécialement étudiée à l'aide d'expériences en laboratoire.

Les expériences réalisées ont mis en jeu les substrats décrits ci-dessus préalablement méthylés ainsi que des polysulfures formés par un mélange de NaSH et de soufre élémentaire dans un rapport molaire S²⁻/S⁰ de 2/1 (Cf. Chapitre VI. Matériel et Méthode

VI.6). Les conditions expérimentales conduisent à la formation de thianes ou de thiolanes à partir substrats diéniques (cf. Schneckenburger, 1997; Poinsot et al., 1997; Gug et al., 2009; Adam et al., 2009). Ces conditions se sont avérées reproduire la formation de COS sédimentaires (cf. De Graaf et al., 1995; Poinsot et al., 1997; Adam et al., 2009). Elles favorisent dans des conditions douces de température la sulfuration des positions des doubles liaisons les plus substituées et la formation des cycles les plus petits.

II.3.3.1. Sulfuration de la résine de Cedrus atlantica en présence de polysulfures

La résine de *C. atlantica* (Pinacée) a été sélectionnée à cause de sa haute teneur en acide sandaracopimarique (16) et acide isopimarique (18), les précurseurs postulés des composés (9a), (10a) et (11a) (Figure II.10). La composition de cette résine est relativement simple et comprend une dizaine d'acides diterpéniques présentés sur la Figure II.10.



Figure II.10. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire de l'extrait organique méthylé de la résine de Cedrus atlantica avant sulfuration. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

L'expérience de sulfuration a mis en jeu l'extrait lipidique obtenu à partir de la résine fraîche de *C. atlantica* préalablement méthylée ainsi que des polysulfures (cf. Poinsot et al., 1997 ; Gug et al., 2009 ; Adam et al., 2009) Dans le cas de la résine de *C. atlantica* riche en acide isopimarique (**18**), la formation possible des composés (**9a**) et

(10a) identifiés dans l'ambre de Piolenc avait été anticipée (cf. Figure II.7). Après l'expérience de sulfuration, on peut noter l'apparition de nouveaux composés (Figure II.11). Parmi ceux-ci, on peut compter, notamment, des dérivés oxydés de l'acide abiétique (29-34) (Figure II.11) dont l'origine n'est pas tout à fait élucidée. Ils correspondent, au moins en partie, à des composés déjà présents dans la résine fraîche dont l'abondance relative aurait augmentée lors de l'expérience de sulfuration par consommation des composés insaturés non-aromatiques dans des réactions de sulfuration intra- ou intermoléculaire. Enfin, on observe la formation des composés (9a) et (10a) identifiés dans l'ambre de Piolenc (Figure II.11 et II.12), alors qu'en parallèle, l'abondance relative de l'acide sandaracopimarique (16) et de l'acide isopimarique (18) diminue après la sulfuration, notamment, par rapport à celle de l'acide déhydroabiétique (7) moins susceptible d'être sulfuré.



Figure II.11. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé de la résine de Cedrus atlantica après sulfuration (NaSH/S₈, 60 °C, 24 h). En rouge, les composés soufrés (**9a**) et (**10a**). Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Il paraît donc évident ici que l'acide sandaracopimarique (16) et de l'acide isopimarique (18) sont effectivement les composés précurseurs des composés (9a) et (10a) identifiés dans l'ambre de Piolenc. Ce résultat plaide, de plus, en faveur d'un mécanisme de sulfuration mettant en jeu les polysulfures pour expliquer la formation de (9a) et (10a). Il est à noter cependant que l'incorporation intermoléculaire du soufre

entre deux composés diterpéniques est également possible dans les conditions mises en œuvre et pourrait conduire à la formation de dimères de diterpènes couplés par des ponts mono- ou polysulfures. Une telle réaction pourrait expliquer, au moins partiellement, la diminution relative de certains composés comme l'acide abiétique (19) qui, compte tenu de la proximité des doubles liaisons, ne devrait pas permettre facilement une incorporation intramoléculaire du soufre. Le composé (11a) identifié dans l'ambre de Piolenc n'a en revanche pas été mis en évidence parmi les produits issus de l'expérience de sulfuration de la résine de C. atlantica bien que les précurseurs potentiels de ce composé soient présents. Il semble donc que les mécanismes de sulfuration à l'origine de ce composé ne soient pas opérant dans les conditions expérimentales mises en œuvre. Il avait été envisagé en effet que, contrairement aux mécanismes de formation des composés (9a) et (10a), la formation de ce composé soit due à des réactions d'addition radicalaire du soufre (cf. Figure **II.5**). Se pose alors la question des conditions régnant au niveau des résines lors de la diagenèse et des espèces inorganiques du soufre effectivement présentes permettant à la fois la formation des composés (9a/10a) et du composé (11a).

Enfin, un examen détaillé du fragmentogramme de masse *m/z* 350 (**Figure II.12**) a montré la présence d'un autre composé soufré de structure inconnue dans les produits de sulfuration de la résine de *C. atlantica* et dont le mode de fragmentation en spectrométrie de masse s'apparente, sans être totalement identique, à celui du composé (**13a**) détecté dans l'ambre de Piolenc (cf. **Figure II.2**).


Figure II.12. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé de la résine de Cedrus atlantica après sulfuration (NaSH/S₈, 60 °C, 24 h), A) TIC : B) Fragmentogramme de masse m/z = 350 de l'extrait de résine de C. atlantica après sulfuration. C) Spectres de masse des composés (10b) (coélution avec un autre composé) et (13b). En vert, les fragments associés à (9b)/(10b) et, en orange, les fragments associés au composé qui coélue avec celui-ci. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

II.3.3.2. Sulfuration de l'acide abiétique en présence de polysulfures

Le second substrat utilisé est l'ester méthylique d'acide abiétique (**19**) commercial dont la pureté n'est que de 85 % obtenu par méthylation à l'aide de DMA-DMF. Outre l'acide abiétique (**19**), le substrat utilisé contient, en effet, également de l'acide déhydroabiétique (**7**), un analogue oxydé en position benzylique (**33**) ainsi que de l'acide isopimarique (**18**) comme impuretés principales. La **Figure II.13** présente le chromatogramme obtenu après sulfuration d'acide abiétique (**19**) commercial méthylé. Aucun composé formé par sulfuration de l'acide abiétique (**19**) n'a pu être mis en évidence après l'expérience de sulfuration (**Figure II.13**). L'acide abiétique (**19**) n'est donc apparemment pas un bon candidat pour la sulfuration dans les conditions mises en œuvre.

Cela pourrait s'expliquer par un encombrement stérique important et/ou par le fait que la formation d'un cycle soufré est difficile à cause de la position trop proche des doubles liaisons. Néanmoins, on ne peut exclure que le soufre puisse réagir de manière intermoléculaire comme cela a été évoqué précédemment et conduire à la formation de dimères ou d'oligomères liés par des ponts mono- ou polysulfures (e.g. De Graaf et al., 1992, 1995).



Figure II.13. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de brut réactionnel obtenu après sulfuration (NaSH/S₈, 60 °C, 24 h) d'acide abiétique (**19**) commercial méthylé (pureté 85%). Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Ces composés ayant une masse moléculaire élevée, il est possible qu'ils sortent de la fenêtre analytique de la GC-MS. Une analyse par spectrométrie de masse en mode d'introduction directe a été effectuée afin de vérifier si la sulfuration avait pu conduire à la formation de dimères ou oligomères d'acide abiétique (**19**) soufré. Il s'est avéré que de tels composés n'ont pas été détectés à la suite de l'expérience de sulfuration.

II.3.3.3. Sulfuration d'une fraction de résine d'Araucaria columnaris

La résine d'*Araucaria columnaris* est une résine riche en acide agathique (27) (Figure II.14) et contient principalement des diterpènes de la série des labdanoïdes. Les acides pimarique (17), sandaracopimarique (16) et abiétique (19) sont aussi présents (Figure II.14). L'acide agathique (27) étant potentiellement un bon candidat pour la sulfuration, un fractionnement fin sur colonne de silice a été effectué en partant d'une fraction apolaire isolée de l'extrait organique méthylé et acétylé de la résine d'*A. columnaris* afin d'isoler une sous-fraction enrichie en ce composé. L'analyse par GC-MS des huit fractions obtenues par chromatographie a montré que l'acide agathique (27) est réparti entre les fractions F1, F2 et F3. Cependant, il est plus concentré dans

la fraction F2 (**Figure II.15.A**) qui contient également de l'acide cupressique (**35**) et de l'acide isocupressique (**36**). C'est pourquoi l'expérience de sulfuration mettant en jeu des polysulfures selon le même protocole que celui mis en œuvre pour l'extrait de *C. atlantica* et l'acide abiétique (**19**) (cf. Chapitre VI Matériel et Méthodes.) a été réalisée avec la fraction F2 (**Figure II.15A**).



Figure II.14. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de la résine méthylée et acétylée d'Araucaria columnaris (Pin colonnaire). Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'ester méthyliques. L'acide isocupressique (36) été analysé sous forme acétylée. L'acide cupressique (35) porte une fonction alcool tertiaire qui n'a pas été acétylée dans les conditions mises en œuvre.

Après sulfuration, la proportion d'acide agathique (27) (Figure II.15B) diminue relativement aux autres diterpènes comme l'acide cupressique (35) (Figure II.15). Deux nouveaux composés, (37a) et (38a), de masse moléculaire de 396 Da (Figure II.16), ont été observés, cette masse correspondant à une augmentation de 34 Da par rapport à la masse moléculaire de l'acide agathique (27) (362 Da sous la forme d'ester méthylique). Ces deux composés pourraient donc formellement correspondre à des composés résultant de l'addition de H_2S sur l'acide agathique (27). Nous proposons donc que ces composés aient les structures présentées sur les Figures II.15 et II.16 et posséderaient un cycle de type thiolane avec un atome de soufre lié en C-8 et C-13. Les structures proposées se basent sur la sélectivité observée lors des réactions de sulfuration mettant en jeu les polysulfures. En effet, lors de la sulfuration de diènes non conjugués, cette sélectivité conduit à la sulfuration des positions les plus encombrées et à la formation des cycles les plus petits possibles (Schneckenburger, 1997; Poinsot, 1997; Poinsot et al., 1997; Figure II.7). La formation de ces deux

composés peut s'expliquer par une isomérie au niveau du centre asymétrique en C-13 portant un groupement méthyle et un groupement éthyle.

L'hypothèse de structure proposée est confortée par l'interprétation du mode de fragmentation en spectrométrie de masse de ces deux composés. En effet, les spectres de masse présentés en **Figure II.16** présentent un mode de fragmentation similaire pour ces deux composés avec des ions principaux à *m*/*z* 163, 174, 213, 223, 337 et 396 ([M⁺]⁺). Les fragments à *m*/*z* 163, 174 et 213 sont également des fragments importants observés dans le spectre de masse du composé (**39**) (**Figure II.17**) qui avait été obtenu par sulfuration de l'ester méthylique de l'acide (-)-copalique (**40b**) (Poinsot, 1997 ; Poinsot et al., 1997) et qui ne diffère de l'acide agathique (**27**) méthylé que par la stéréochimie absolue (série dite « enantio ») et par l'absence du groupement carbométhoxy sur le cycle A. La sulfuration du (-)-copalate de méthyle (**40b**) avait été réalisée dans des conditions analogues à celles mises en œuvre dans le cas de l'expérience réalisée sur une sous-fraction de la résine de *A. columnaris* (Schneckenburger, 1997 ; Poinsot, 1997).



Figure II.15. Chromatogramme en phase gazeuses (GC-MS, IE, 70 eV) d'une sous-fraction enrichie en acide agathique (27) isolée à partir de l'extrait organique méthylé de la résine d'Araucaria columnaris (Fraction 2) : A) avant sulfuration et B) après sulfuration (NaSH/S₈,

60 °C, 24 h). En rouge, les composés organiques soufrés (**37a**)/(**38a**). Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques. L'acide isocupressique (**36**) et l'acide cupressique (**35**) ont été analysés sous forme acétylée. La fonction alcool tertiaire de l'acide cupressique (**35**) n'a pas été acétylée dans les conditions mises en œuvre.



Figure II.16. Spectres de masse (GC-MS, IE, 70 eV) des composés (**37b**) et (**38b**) obtenus lors de la sulfuration d'une fraction isolée à partir de la résine fraîche d'Araucaria columnaris méthylée.

Les structures (**37b**) et (**38b**) proposées correspondent donc à des analogues carbométhoxylés sur le cycle A du composé obtenu lors des expériences de sulfuration reportées par Poinsot (1997) (**Figure II.17**).



Figure II.17. Sulfuration de l'ester méthylique de l'acide (-)-copalique (**40b**) avec des polysulfures (Poinsot, 1997) conduisant à obtention d'un composé soufré (**39**) possédant un cycle soufré de type thiane.

Les composés soufrés (**37b**)/(**38b**) formés lors de l'expérience de sulfuration de la fraction méthylée issus de la résine d'*A. columnaris* présentent des spectres de masse identiques à ceux de esters méthyliques de deux composés présents, quoiqu'en faibles quantités, dans l'ambre de La Buzinie (Charente, France) (Chapitre III, III.2.1.1.2, Figure III.30, III.31). Ce résultat montre que l'acide agathique (**27**) peut, comme l'acide isopimarique (**18**) et l'acide sandaracopimarique (**16**), subir des processus de sulfuration lors de la formation de l'ambre à partir de résine (**Figure III.18**).

Comme dans le cas de la formation des composés (**9a**) et (**10a**) à partir d'acides diterpéniques apparentés à l'acide isopimarique (**18**), la sulfuration a lieu sur les positions les plus substituées de doubles liaisons, suggérant un rôle possible des polysulfures dans ce processus. On peut noter que dans le cas de l'acide agathique (**27**), l'incorporation du soufre en position C-13 est sans doute facilitée du fait que la double liaison est conjuguée à une fonction acide et est donc susceptible de subir une addition de Michael.



Figure II.18. Voie possible de formation de composés soufrés (**37a**)/(**38a**) présents dans l'ambre de la Buzinie par sulfuration de l'acide agathique (**27**).

II.3.4. Diterpénoïdes soufrés dans les ambres : signification géochimique et utilisation comme marqueurs paléoenvironnementaux

Les diterpénoïdes soufrés identifiés dans les ambres ont probablement été formés après le dépôt de la résine dans des sédiments anoxiques. En effet, comme la formation de composés organo-soufrés en milieu sédimentaire nécessite la présence d'espèces réduites du soufre formées par réduction bactérienne des sulfates, il est probable que les conditions prévalant dans les sédiments au moment du dépôt des résines étaient anaérobies et favorables au développement des bactéries sulfato-réductrices. Cette anoxie favorise, en effet, la préservation de la matière organique ainsi que la formation d'espèces soufrées réduites réactives telles que le sulfure d'hydrogène (H₂S) et les polysulfures qui découlent de l'activité respiratoire des bactéries sulfato-réductrices qui utilisent le sulfate (SO4²⁻) comme accepteur d'électrons. Ces conditions peuvent être notamment rencontrées dans les sédiments déposés dans des environnements tels que les marais/marécages ou les mangroves.

En outre, il est peu plausible que la sulfuration des composés de l'ambre se produise après la transformation de la résine en ambre, car l'ambre est un matériau solide sans doute relativement peu perméable aux échanges avec le milieu. La sulfuration se produit donc probablement lors des premières étapes de l'enfouissement de la résine dans le sédiment, avant la transformation de la résine en ambre, à un stade où la résine est encore suffisamment fluide pour permettre l'interaction avec les espèces inorganiques du soufre formées dans les sédiments. A cet égard, la diffusion d'espèces inorganiques du soufre dans les ambres à un moment ou un autre de leur formation dans le sous-sol avait déjà été mise en évidence précédemment, par exemple par la détection d'arthropodes pyritisés inclus dans de l'ambre mexicain du Chiapas (Serrano-Sanchez et al., 2015) ou l'identification de soufre dans les ambres à des teneurs bien supérieures à celles mesurées dans des résines fraîches (Ragazzi et al., 2003 ; Riquelme et al., 2014). La transformation progressive en ambre aurait alors lieu après sulfuration lors de l'enfouissement à un stade ultérieur de la diagenèse. Ces composés pourraient donc être utilisés comme indicateurs de processus de réduction des sulfates dans des environnements de dépôt anciens et marqueurs de milieux comme les marais ou mangroves dans lesquels les végétaux (arbres résinifères) se développaient.

II.4. Distribution des composés organiques soufrés dans les ambres : diversité des structures

La présence de composés organo-soufrés dans les ambres n'avait, à notre connaissance, jamais été signalée avant nos travaux. Cependant, un certain nombre d'études mentionnent la présence de soufre dans les ambres, mais sans nécessairement discuter de manière précise la nature et l'origine des espèces soufrées présentes (e.g. Stout et al., 2000 ; Ragazzi et al., 2003 ; Roghi et al., 2006 ; Riquelme et al., 2014 ; Serrano-Sanchez et al., 2015 ; Stach et al., 2020 ; Vazquez-Bautista et al., 2021). Ainsi, la teneur en soufre des ambres a été étudiée et s'est avérée être relativement variable.

Des valeurs pouvant aller de 0,02 % pour de l'ambre dominicaine à jusqu'à 1,74 % pour de l'ambre du Trias ont été rapportées (Ragazzi et al., 2003). Comme la teneur en soufre des résines fraiches est généralement inférieure à celle des ambres, Riquelme et al. (2014) ont envisagé que le soufre dans les ambres a été acquis à partir des sols et sédiments dans lesquels les ambres ont été enfouis durant la diagenèse. Si Stach et al. (2020) n'ont pas exclu que le soufre détecté par spectroscopie Raman

dans les ambres puisse être issu de la biomasse des insectes ou des plantes inclus dans ces ambres, ils ont également proposé que le soufre puisse plus vraisemblablement provenir des sédiments environnants où se produit la réduction microbienne des sulfates. Ces auteurs ont même proposé que les sulfures ainsi formés puissent réagir avec la matière organique pour former des composés de bas poids moléculaire ou réagir de manière intermoléculaire pour former des agrégats macromoléculaires. Vazquez-Bautista et al. (2021) ont également mis en évidence du soufre dans des ambres du Chiapas (Mexique) et ont envisagé sur la base d'études par spectrométrie photoélectronique X (XPS) que le soufre se trouverait dans la matrice polymérique des ambres, impliqué dans des liaisons C-S ou S-S. Enfin, comme nous l'avions mentionné précédemment, Serrano-Sanchez et al. (2015) ont rapporté la présence d'arthropodes pyritisés inclus dans de l'ambre du Chiapas, ce qui indique a priori qu'à la fois des espèces réduites du soufre et du fer ont pu diffuser dans l'ambre pour permettre la pyritisation de ces organismes. Dans aucune des études consacrées au soufre dans les ambres, l'incorporation de soufre sur la matière organique, parfois évoquée, n'a clairement été démontrée. On peut noter cependant que certains auteurs ont mentionné la présence de composés inconnus de masse moléculaire à 350 Da (sous forme d'esters méthyliques) dans des échantillons d'ambre, identiques à celle des composés soufrés diterpéniques identifiés dans l'ambre de Piolenc, (Stout et al., 2000 ; Fischer et al., 2017). Il est donc possible que la présence de composés organo-soufrés dans les ambres soit plus répandue que ne le laisse supposer la littérature. Nous avons ainsi entrepris de rechercher systématiquement ces composés dans les ambres d'échantillons d'origine géologique auxquels nous avons pu avoir accès au cours de cette thèse. Nous nous sommes également intéressés à la variabilité des structures organo-soufrées rencontrées.

II.4.1. Répartition des composés organo-soufrés dans les ambres

Le tableau II.1 résume les résultats obtenus lors de nos travaux de thèse concernant la présence de COS dans des ambres d'origines diverses, ainsi que ceux issus des travaux effectués par Jan Panczak (Université de Cracovie) dans la cadre d'une collaboration avec notre équipe. Ces résultats ont également été complétés par les rares mentions de ces composés dans la littérature -bien qu'ils n'aient pas été reconnus comme tels- (Stout et al., 2000 ; Fischer et al., 2017). Les composés soufrés que nous avons pris en compte lors de cette recherche sont des composés ayant une masse de 350 Da (après dérivation) qui comprend les trois acides diterpéniques soufrés identifiés dans l'ambre de Piolenc, mais également des composés soufrés sans doute liés aux familles principales d'acides résiniques apparentés. ((iso)pimarique (17)/(18), abiétique (19) et communique (20); cf. Figure II.3). Ont également été pris en compte des composés que nous avons identifiés comme étant des COS issus de la série labdanoïde sur la base de l'interprétation de leur fragmentation en spectrométrie de masse. En effet, cette fragmentation s'apparente à celle de composés labdanoïdes soufrés précédemment identifiés dans les sédiments (Poinsot, 1997; Poinsot et al., 1997; Poinsot et al., 1998). Enfin, des composés qui, sur la base de l'interprétation des spectres de masse, semblent correspondre à des produits d'altération diagénétique des familles de COS évoquées ci-dessus ont également été considérés.

La recherche de COS dans des ambres de différents sites a permis de montrer que ces composés sont relativement répandus dans les ambres (**Tableau II.1**). Des COS ont été détectés aussi bien dans des ambres issus d'Angiospermes (e.g. Oise, France ou Chiapas, Mexique) que dans les ambres issus de résines de conifères (e.g. La Garnache et La Buzinie, France ; Bitterfeld, Allemagne) et dans des ambres datant de différentes périodes géologiques (Crétacé à Eocène). La proportion relative des COS relativement aux biomarqueurs non soufrés est cependant très variable selon les ambres analysés. Ainsi, ils sont des constituants majeurs dans l'ambre de La Garnache (France) alors qu'ils apparaissent en quantités relatives plus modestes dans l'ambre de Bitterfeld (Allemagne). Ces composés sont présents à l'état de traces ou absents dans les ambres d'Archingeay (France) et de la région baltique.

II.4.2. Exemples de distributions de composés organo-soufrés dans les ambres : variabilité des teneurs et des structures

Quelques exemples de distributions de COS dans des ambres sont présentés de manière plus détaillée ci-dessous, pour illustrer la variabilité des teneurs en COS, mais également la grande variabilité structurale de ces composés qui peuvent dériver des acides résiniques tricycliques (séries pimarique (**17**), isopimarique (**18**) et abiétique (**19**)) ou de labdanoïdes. Ces composés peuvent également avoir été altérés par différents processus diagénétiques.

II.4.2.1. Ambre de la Garnache (Cénomanien, Vendée, France)

La fraction apolaire obtenue à partir d'un ambre de La Garnache (Vendée, France) et datant du Cénomanien (cf. Chapitre III, §III.2.1.3) est caractérisée par une contribution significative de diterpènes appartenant aux séries de l'acide abiétique (**19**) et des acides (iso)pimariques (**17**)/(**18**) par rapport aux labdanoïdes, mais également par une prédominance exceptionnelle des COS par rapport aux composés non soufrés (**Figure II.19**). Parmi les différents ambres analysés, il s'agit clairement de l'ambre le plus riche en COS.

Parmi les composés soufrés présents dans l'ambre de la Garnache figure une série de composés caractérisés par une masse moléculaire à 350 Da identique à celle des composés soufrés détectés dans l'ambre de Piolenc. Certains des composés importants détectés dans l'ambre de La Garnache correspondent d'ailleurs à des composés présents dans l'ambre de Piolenc, tels que (**11a**) et (**13a**) (**Figure II.20**) dont la structure n'a pas été élucidée pour l'instant.



Figure II.19 Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée de l'extrait organique méthylé d'un ambre de La Garnache (Vendée, France). Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.



Figure II.20. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre de La Garnache. (A)
Courant d'ion total (TIC) et (B) Fragmentogramme de masse m/z 350. Les acides sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Cependant, il convient de noter que si les composés ayant une masse moléculaire de 350 Da peuvent être des acides diterpéniques soufrés sous la forme d'esters

méthyliques, il n'est pas impossible qu'une partie d'entre eux correspondent à des alcools diterpéniques soufrés sous la forme de formiates et dont la masse moléculaire est identique. En effet, il avait été montré précédemment que le réactif de méthylation que nous avons utilisé, le DMF-DMA, était capable de formyler des alcools (Figure II. 21) et, d'autre part, que les diterpènes dans les ambres peuvent également porter une fonction alcool plutôt qu'une fonction carboxylique au niveau du cycle A (De Lama-Valderrama et al., 2022).



Figure II.21. Résultat du traitement d'un acide carboxylique et d'un alcool avec le DMF-DMA (d'après De Lama Valderrama et al., 2022). Le taux de formylation dépend de l'encombrement stérique au niveau de la fonction alcool.

D'autres types de composés, que nous avons également identifiés comme étant des composés soufrés, bien que présentant une masse moléculaire différente de 350 Da, ont été détectés dans l'ambre de La Garnache. Ces composés possèdent des fragments en spectrométrie de masse similaires à ceux des composés identifiés dans l'ambre de Piolenc, mais avec une masse moléculaire de 292 Da, (par exemple (44) ; **Figure II.22**, composé A, **Figure II.23**). Cette masse pourrait correspondre à celle d'acides diterpéniques soufrés dont le groupement acide carboxylique aurait été perdu par décarboxylation (350 – 58 = 292 : perte d'un groupement carbométhoxy par rapport à un ester méthylique d'acide diterpénique soufré).

Une telle décarboxylation est un processus diagénétique auquel sont couramment soumis les acides résiniques en milieu sédimentaire sous l'effet de processus thermiques lors de l'enfouissement, mais également dans des environnements récents (Tavendale et al. 1997a,b; Martin et al., 1999; Schaeffer et al., 2019). Il s'agit alors, dans le cas des sédiments récents, d'un processus induit par des microorganismes (e.g. Tavendale et al., 1997a,b; Martin et al., 1999). Dans le cas d'écoulements de résines à l'origine de l'ambre, l'accès des microorganismes aux diterpénoïdes acides est sans doute difficile et le processus de décarboxylation des acides diterpéniques à un stade précoce de l'enfouissement est très probablement limité. Il est donc plus vraisemblable que cette décarboxylation ait lieu plus tardivement, lors de l'altération diagénétique d'acides diterpéniques soufrés conformés.



Figure II.22. Spectres de masse (GC-MS, IE 70 eV) des composés soufrés principaux présents dans l'ambre de La Garnache (Vendée, France). a) (44), un composé soufré diterpénique décarboxylé ; b) (45), un alcool diterpénique soufré (non dérivé).



Figure II.23. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé de l'ambre de La Garnache (**A**) Courant d'ion total (TIC) et (**B**) Fragmentogramme de masse m/z 292. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Certains composés, comme le composé (45) de la Figure II.22, présentent une masse moléculaire de 322 Da qui pourrait correspondre à celle d'alcools diterpéniques soufrés (non dérivés). Afin de conforter cette hypothèse, nous avons analysé un nouvel échantillon d'ambre de La Garnache en réalisant, successivement, une étape d'acétylation (Ac₂O, pyridine, 60 °C, 2 h), puis une étape de méthylation des acides carboxyliques à l'aide de DMF-DMA. Il en résulte une disparition de tous les composés ayant une masse moléculaire à 322 Da au profit de nouveaux composés ayant une masse moléculaire de 364 Da pouvant correspondre à des alcools diterpéniques soufrés, mais cette fois sous forme acétylée. Ce résultat conforte ainsi l'hypothèse selon laquelle les composés de masse moléculaire de 322 Da sont effectivement des alcools diterpéniques soufrés sous forme non dérivée. On peut remarquer également, comme cela a été évoqué précédemment, que le réactif utilisé pour la méthylation des acides carboxyliques (DMF-DMA) est susceptible de formyler une partie des alcools (De Lama-Valderrama et al., 2022) et conduire à des diterpénols soufrés formylés ayant une masse moléculaire de 350 Da identique à celle des esters méthyliques d'acides diterpéniques soufrés (cf. Figure II.21). Cependant, cette formylation n'est généralement pas quantitative. Ainsi donc, une partie des composés ayant une masse moléculaire de 350 Da pourrait correspondre à des alcools diterpéniques soufrés (sous forme de formyles) comme ceux détectés dans l'ambre de la Garnache.

A cet égard, une proportion importante des composés ayant une masse moléculaire de 350 Da a disparu lorsque nous avons utilisé un protocole de dérivation mettant un œuvre successivement une étape d'acétylation puis de méthylation des acides (**Figure II.24**), indiquant que, dans cet échantillon, les alcools diterpéniques soufrés sont prédominants par rapport aux acides diterpéniques soufrés. Une observation similaire a été faite dans le cas des composés diterpéniques non soufrés (i.e., prédominance des alcools diterpéniques *vs.* les acides correspondants).



Figure II.24. Résultat du traitement d'un mélange d'acides et d'alcools diterpénoïdes soufrés avec (**a**) le DMF-DMA ; (**b**) Ac₂O et DMF-DMA successivement.

II.4.2.2. Ambre de Bitterfeld (Eocène, Allemagne)

Les COS (**9a**), (**10a**) et (**11a**) identifiés dans l'ambre de Piolenc sont également présents dans l'ambre de Bitterfeld (Eocène, Allemagne, Chapitre IV, §IV.3.) et comptent parmi les COS les plus importants (**Figure II.25**). Cependant, contrairement à l'ambre cénomanien de la Garnache, ils n'ont été détectés qu'en quantités très faibles. L'origine des COS de l'ambre de Bitterfeld est donc assez similaire à celle des COS de l'ambre de Piolenc. Une partie de ceux-ci aurait été dont formée par sulfuration de diterpènes de la série de l'acide isopimarique (**18**). Cela est cohérent avec l'abondance de cette série dans l'ambre de Bitterfeld (Chapitre III, §IV.3).



Figure II.25. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre de Bitterfeld. (**A**) Courant

d'ion total (TIC) et (**B**) Fragmentogramme de masse m/z 350. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

II.4.2.3. Ambre de La Buzinie (Crétacé ; Charente-Maritime, France)

Outre les COS provenant de la sulfuration de diterpènes de la série de l'acide isopimarique (**18**), des COS provenant de la sulfuration de composés appartenant à d'autres séries de diterpènes ont été mis en évidence dans certains échantillons. Par exemple, dans l'ambre de La Buzinie (Charente-Maritime, France; Crétacé), des composés provenant de la sulfuration de labdanoïdes ont pu être mis en lumière, en accord avec le fait que l'ambre de La Buzinie est majoritairement composée de labdanoïdes (**46-52**) (**Figure II.26**). Le chromatogramme en phase gazeuse de la fraction apolaire isolée à partir d'un échantillon d'ambre de La Buzinie (échantillon A) est présenté sur la **Figure II.26**.



Figure II.26. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un échantillon d'ambre de La Buzinie (échantillon A). En rouge les composés organiques soufrés. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Ainsi, en plus des composés soufrés détectés dans l'ambre de Piolenc (9a), (10a), (11a) et (14a) (cf. Figure II.3), l'échantillon A d'ambre de La Buzinie (Figure II.26) contient les composés (54a)/(55a) ayant une masse moléculaire de 396 Da (sous la forme d'esters méthyliques (54b)/(55b)), masse qui pourrait correspondre à celle d'un acide diterpénique soufré qui porterait une deuxième fonction acide carboxylique méthylée et une insaturation (cycle ou double liaison) de moins que les composés soufrés (9b) et (10b) dérivés de diterpènes de la série de l'acide isopimarique (18) (Figure II.27).



Figure II.27. Spectres de masse (GC-MS, IE, 70 eV) (a), (b), (c), (d) des composés soufrés (54b-58b) vraisemblablement apparentés à l'acide agathique (27) présents dans l'ambre de La Buzinie (échantillon A ; Figure IV.26) ; (e) d'un thiolane ditérpénique synthétique (59) (Poinsot, 1997), (d) du labdanoïde (51b) présent dans l'ambre de la Buzinie et identifié précédemment dans l'ambre d'Archingeay (De Lama-Valderama et al., 2022).

On peut alors proposer que ces composés correspondent à une paire d'isomères de sulfures diterpéniques issus de la sulfuration de l'acide agathique (27) et comportant un cycle thiacyclopentanique en « spiro » comme indiqué sur la Figure II.27a. Cette hypothèse repose sur l'analogie du mode de fragmentation en spectrométrie de masse de ces composés avec celui des composés (60)/(60') (Figure II.28) obtenus par sulfuration de l'ester méthylique d'un isomère de l'acide copalique (63) et des composés (59)/(59') résultant de la réduction d'une des fonctions carbométhoxy des composés (60)/(60') (Figure II.28) (Schneckenburger et al., 1997; Poinsot, 1997; Poinsot et al., 1997). Ces composés présentent, en effet, des masses moléculaires décalées de 44 Da et 88 (2 x 44) Da correspondant à la différence liée à la présence d'une ou deux fonctions carbométhoxy par rapport à celle d'un ou deux groupements méthyle, respectivement. Par ailleurs, les spectres de masse des composés (60)/(60') présentent, comme les composés (54b)/(55b) (ambre de La Buzinie), un fragment majeur à *m*/z 213 (Poinsot, 1997) interprété comme résultant d'une fragmentation dans le cycle B et correspondant à la partie droite de la structure (Figure II.28). Le même type de fragmentation est observé dans le cas des composés (59)/(59') avec, cette fois, un fragment majeur à m/z 169 (=213-44) correspondant à la partie droite de la molécule (Figures II.27 et II.28).



Figure II.28. Structures de composés soufrés synthétiques dérivés de l'acide copalique (*40a*) et mode de fragmentation principal en spectrométrie de masse (*IE*) (Poinsot, 1997; Poinsot et al., 1997, 1998).

L'ambre de la Buzinie contient également les composés (**56a**) et (**57**) avec des masses moléculaires de 338 Da (ester méthylique **56b**) et 280 Da, respectivement. Leurs structures ont pu être proposées sur la base de l'interprétation de leurs spectres de masse (**Figure II.27b,c**). La prédominance du fragment à m/z 155 dans les deux spectres de masse correspondant à la partie droite de ces composés est tout à fait analogue à celle du fragment à m/z 169 dans les spectres de masse des composés **59/59**' (**Figure II.27e**). Ces composés ont été interprétés comme étant des produits de décarboxylation diagénétique des composés (**54a**)/(**55a**) (**Figure II.29**).



Figure II.29. Voie possible de transformation diagénétique de dérivés soufrés de l'acide agathique (27) dans l'ambre de La Buzinie. *sous la forme d'esters méthyliques.

Enfin, le composé (**58a**), dont le spectre de masse de l'ester méthylique correspondant (**58b**) est présenté sur la **Figure II.27d**, pourrait correspondre à un thiol qui dériverait du composé (**57a**) par ouverture du cycle soufré. Le mode de fragmentation en spectrométrie de masse du composé (**58b**) présente, en effet, de grandes analogies avec celui du composé (**51b**) (**Figure II.27e**), également présent dans l'extrait méthylé de l'ambre de La Buzinie. Ce composé avait précédemment été isolé à partir de l'ambre d'Archingeay (Charente Maritime, France) et sa structure déterminée par RMN (De Lama-Valderrama et al., 2022). Les deux composés présentent, en effet, une fragmentation en spectrométrie de masse liée à l'élimination de H₂O dans le cas du composé (**51b**) et de H₂S dans le cas du composé (**58b**) pour conduire à un ion *m/z* 304. Cet ion est sans doute de même nature dans les deux cas et à l'origine de la plupart des autres fragments observés dans les spectres de masses.

L'analyse d'un autre échantillon d'ambre de La Buzinie (échantillon B ; **Figure II.30**) montre une distribution de composés diterpéniques similaire à celle observée dans le cas de l'échantillon A (**Figure II.26**) avec une prédominance des labdanoïdes. On observe, néanmoins, quelques différences en ce qui concerne les proportions relatives entre les différents composés.

Si la plupart des composés soufrés détectés dans l'échantillon A ((9a), (10a), (11a), (54a-57)) sont également présents dans l'échantillon B, cet échantillon contient

également des structures nouvelles que nous avons identifiées comme étant des composés organiques soufrés.

C'est le cas, notamment, des composés qui apparaissent à l'état de traces dans l'échantillon B et dont les spectres de masse (**Figure II.31a**) sont tout à fait similaires à ceux des composés (**37b**) et (**38b**) (**Figure II.16** et **Figure II.31b**) formés lors de l'expérience de sulfuration mettant en jeu une fraction isolée de la résine fraiche méthylée de *A. columnaris* et les polysulfures (cf. II.3.3.3). Ces deux composés sont sans doute des épimères au niveau du centre asymétrique portant un groupement méthyle et un groupement éthyle sur le cycle soufré.



Figure II.30. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique méthylé d'ambre de La Buzinie (échantillon B). En rouge les composés organiques soufrés. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Comme cela a été discuté dans la partie consacrée aux expériences de laboratoire mettant en jeu une fraction méthylée de résine de *A. columnaris* et les polysulfures (cf II.3.3.3), l'hypothèse structurale proposée pour les composés (**37b**)/(**38b**) repose sur leur mode de fragmentation en spectrométrie de masse, qui est caractérisé par la présence des fragments à m/z 163, 174 et 213.



Figure II.31. Spectres de masse (GC-MS, IE, 70 eV) (a) du composé soufré (37b) détecté dans l'extrait méthylé de l'ambre de La Buzinie (échantillon B) ; (b) du composé soufré (37b) obtenu lors de la sulfuration d'une fraction de résine fraîche méthylée d'A. columnaris riche en acide agathique (27); (c) du composé soufré (61b) détecté dans l'ambre de La Buzinie (échantillon B) ; (d) d'un thiane diterpénique synthétique (62/62') (Poinsot, 1997).

Ces fragments sont, en effet, également importants dans le spectre de masse d'un composé qui avait été obtenu par sulfuration de l'ester méthylique de l'acide copalique (**40b**) (Poinsot, 1997 ; Poinsot et al., 1997, cf. **Figure II.17**) qui ne diffère de l'acide agathique méthylé (**27b**) que par la stéréochimie absolue et par l'absence du groupement carbométhoxy sur le cycle A.

Par ailleurs, les spectres de masse des composés (**37b**)/(**38b**) présentent également des analogies avec celui de diterpénoïdes soufrés synthétiques (**62/62**') apparentés à l'acide copalique (**40a**) (Poinsot, 1997 ; Poinsot et al., 1997) présenté sur la **Figure II.31d**. On peut remarquer, notamment, la présence du fragment à *m*/*z* 163 également présent dans les spectres de masse des composés (**37b**)/(**38b**) (**Figure II.31a,b**) et qui semble caractéristique des diterpénoïdes soufrés labdanoïdes portant un cycle thiacyclohexanique.

Le fragment à *m*/*z* 169 est l'analogue du fragment *m*/*z* 213 observé dans les spectres des composés (**37b**)/(**38b**) avec un décalage de 44 Da correspondant à la différence liée à la présence d'une fonction carbométhoxy par rapport à celle d'un groupement méthyle.

Le composé (61a) (Figure II.30) a, quant à lui, été identifié comme étant un produit de décarboxylation des composés (37a)/(38a). En effet, le spectre de masse du composé (61b) possède en commun avec celui des composés (37b)/(38b) les fragments à m/z 163 et m/z 223 (Figure II.31c). D'autre part, le fragment à m/z 155 est tout à fait analogue au fragment à m/z 169 dans le spectre du diterpénoïde soufré sur la Figure II.31d. Enfin, la masse moléculaire à 338 Da correspond à la perte d'un groupement carbométhoxy par rapport à la masse moléculaire des composés (37b)/(38b) (396 Da).

II.4.2.4. Voies diagénétiques de sulfuration de l'acide agathique

Les différents dérivés labdanoïdes (37a), (38a), (54a-58a) et (61a) mis en évidence dans les échantillons d'ambre de La Buzinie peuvent tous être issus de la sulfuration de l'acide agathique (27). Ils portent tous le soufre sur des positions quaternaires indiquant qu'ils sont vraisemblablement issus de processus de sulfuration mettant en jeu les polysulfures qui favorisent la sullfuration des positions les plus substituées (Figure II.7). Ces composés, à l'exception du composé (58a) qui est un thiol, peuvent être divisés en deux familles : celle possédant un cycle thiacyclopentanique de type « spiro » (54a-57) et celle ayant un cycle thiacyclohexanique (37a), (38a), (61a). Cette différence de localisation de l'atome de soufre peut être liée à la position des doubles liaisons sur les précurseurs diterpéniques apparentés à l'acide agathique (27) ayant subi la sulfuration. En effet, des expériences de sulfuration réalisées par Poinsot et al. (1997) mettant en jeu les polysulfures et, successivement, l'ester méthylique de l'acide copalique (40b) et un isomère de l'ester méthylique de l'acide copalique (63) formés par isomérisation de la double liaison du groupement méthylène « exo » à l'intérieur du cycle B ont, en effet, conduit à la formation de composés soufrés possédant, respectivement, un cycle thiacyclohexanique ou un cycle thiacyclopentanique cyclisé en mode « spiro » (Figure II.32).

La formation de ces composés est en effet liée à la sélectivité particulière de la réaction de sulfuration de diènes non conjugués par les polysulfures qui favorise la formation de sulfures cycliques avec le cycle le plus petit et où l'atome de soufre est localisé sur les positions les plus substituées (Schneckenburger, 1997 ; Poinsot, 1997 ; Poinsot et al., 1997).



Figure II.32. Sulfuration de l'ester méthylique de l'acide copalique (*40b*) en présence de polysulfures (Poinsot, 1997 ; Poinsot et al., 1997).

Il en résulte que la sulfuration de l'acide agathique (27) et d'un isomère de l'acide agathique résultant de la migration de la double liaison du groupement méthylène « exo » (52) pourrait expliquer la formation des deux familles de composés géologiques observés dans l'ambre de La Buzinie. Ainsi, la **Figure II.33** présente une voie possible de formation diagénétique de deux principales familles de dérivés soufrés de l'acide agathique (27) détectées dans l'ambre de La Buzinie. L'étape initiale de sulfuration par des polysulfures se produisant soit sur l'acide agathique (27) (conduisant aux dérivés avec un thiacyclohexane (37a), (38a), (61a)), soit sur un isomère résultant de la migration de la double liaison du méthylène « exo » (conduisant aux dérivés avec un thiacyclopentane (54a-57) peut ensuite être suivie par des réactions de décarboxylation. Le thiol (58a) peut, quant à lui, s'expliquer par un processus comprenant la sulfuration d'un isomère de l'acide agathique (27) suivi par une réaction de décarboxylation. Il est également possible que le composé (58a)



Figure II.33. Voies possibles de formation diagénétique de dérivés soufrés de l'acide agathique (27) détectés dans l'ambre de La Buzinie. En rouge : composés présents dans l'ambre de La Buzinie. En bleu : composés dont la présence est postulée dans l'ambre mais qui n'ont pas été détectés.

II.4.2.5. Ambre de Le Quesnoy (Eocène ; Oise, France)

Les exemples présentés précédemment proviennent tous d'ambres de conifères. Cependant, des COS ont aussi été trouvés dans des ambres provenant d'Angiospermes. Par exemple, une grande majorité des échantillons provenant de Le Quesnoy dans l'Oise (France, Eocène, Chapitre IV) contiennent des COS (**Figure II.34**). Une fabacée, *Aulacoxylon sparnacense*, est à l'origine de cet ambre (de Franceschi and de Plöeg, 2003; Nel et al., 1999), ce qui est confirmé par la présence de diterpènes typiques des Angiospermes de cette famille (**Chapitre I,** §I.2.3.2.1), comme l'acide daniellique (**64**) (**Figure II.34**). Associés à ces composés, on trouve des COS dont le mode de fragmentation en spectrométrie de masse est très similaire à celui des COS présentés précédemment. Ainsi, par exemple, le spectre de masse du composé principal (**65**) (**Figure II.34**), qui a une masse moléculaire de 350 Da (sous la forme d'ester méthylique), indiquant qu'il s'agit sans doute d'un acide diterpénique soufré, présente des fragments principaux à *m/z* 229 et 289.

Ceux-ci sont aussi prédominants dans les spectres de masse des composés (**13b**) et (**15b**) (**Figure II.2**) de l'ambre de Piolenc. S'il s'agit bien d'un diterpénoïde soufré, il fait vraisemblablement partie de la série de diterpènes dite « enantio » par rapport aux diterpènes de la série « régulière » trouvés dans les résines de conifères comme l'acide daniellique (**64**) présenté sur la **Figure II.34** ou la quesnoïne (**66**), un alcool diterpénique identifié dans un ambre de l'Oise par Jossang et al. (2008).





Des constituants éluant en fin de chromatogramme (**Figure II.29**) présentent une masse moléculaire de 366 Da. La différence de 16 Da par rapport à la masse moléculaire des sulfures d'acides diterpéniques (sous forme d'esters méthyliques) pourrait correspondre à un atome d'oxygène supplémentaire suggérant que ces composés correspondent à des sulfoxydes formés par oxydation de sulfures.

Des COS similaires ont aussi été trouvés dans l'ambre du Chiapas (Mexique; Miocène, **Chapitre IV, §IV.5.2**) dont l'origine botanique est similaire à celle de l'ambre de l'Oise (Fabacées) (McCoy et al., 2017). Des analyses élémentaires (PIXE/RBS) confirment la présence de soufre dans cet ambre (Riquelme et al., 2014). Cependant, la proportion relative des COS dans l'ambre du Chiapas reste relativement faible par rapport à celle dans l'ambre de l'Oise.

II.5. Conclusion

L'identification et l'étude de composés inconnus de l'ambre de Piolenc ont conduit à la découverte d'une nouvelle série de composés diterpéniques et à révéler pour la première fois la présence de composés organo-soufrés dans les ambres.

La recherche systématique de COS dans les ambres dont nous avons pu disposer pour les études réalisées au cours de cette thèse a montré que ceux-ci sont présents, en quantités variables, mais pas systématiquement, dans une grande variété d'ambres indépendamment de leur origine botanique ou de leur âge. En effet, ces composés ont été détectés aussi bien dans des ambres du Crétacé (ambres de la Buzinie, de La Garnache, d'Archingeay, de Piolenc, de Montbrun, du Mas d'Azil, de Teruel, ou encore valchovite...) que dans des ambres de l'Éocène/Miocène (ambres de l'Oise et de Chiapas). De la même façon, la présence des COS dans l'ambre n'est pas liée à l'origine botanique de celui-ci puisque ces composés peuvent être associés aussi bien à des ambres de conifères qu'à des ambres d'Angiospermes. La variabilité des COS dans les ambres concerne aussi leur structure et leurs précurseurs biologiques. En effet, si les sulfures isolés et identifiés par RMN à partir de l'ambre de Piolenc résultent de la sulfuration de l'acide isopimarique (18) ou de ses dérivés, l'interprétation des spectres de masse a permis de mettre en évidence d'autres COS, notamment dans le cas de l'ambre de La Buzinie, qui seraient issus de la sulfuration de labdanoïdes. Cependant, une grande partie des structures des COS présents dans les ambres reste non déterminée à ce jour.

Par ailleurs, une voie diagénétique de formation de ces composés a pu être envisagée. Elle est sans doute analogue à celle proposée pour expliquer la formation des composés organo-soufrés dans les roches sédimentaires et met en jeu des lipides fonctionnalisés d'origines biologiques diverses et des espèces réduites du soufre (H₂S ou polysulfures) issues de la réduction des sulfates par action bactérienne en milieu sédimentaire anaérobie. Cette proposition s'appuie, notamment, sur des expériences de laboratoire mettant en jeu des fractions ou composés issus de résines et des espèces réduites du soufre dans des conditions compatibles avec celles régnant en milieu sédimentaire. Ces expériences ont permis de montrer, plus particulièrement, la formation des thianes (9a)/(10a) apparentés à l'acide isopimarique (18) identifiés dans l'ambre de Piolenc par réaction entre la résine méthylée de *C. atlantica* et des polysulfures ainsi que celle de thianes (9a)/(10a) dérivés de l'acide agathique (27) présents dans l'ambre de La Buzinie et formés par sulfuration d'une fraction méthylé enrichie en ester méthylique d'acide agathique (27),obtenue à partir de la résine fraîche de *A. columnaris*.

Ainsi, on peut envisager, pour expliquer la présence de composés soufrés dans les ambres, que de la résine soit entrée en contact avec des espèces réduites du soufre dans des environnements sédimentaires anaérobies, comme des marécages ou des mangroves et que ces espèces soufrées ont diffusé dans la résine et réagi avec les constituants organiques de la résine. Il est vraisemblable que la sulfuration ait eu lieu avant l'étape de fossilisation conduisant à la formation de l'ambre, matériel solide impropre à la diffusion des espèces soufrées dans le matériau afin de permettre aux processus de sulfuration d'opérer.

Pour conclure, la présence des COS dans l'ambre est un excellent indicateur de milieu de diagenèse précoce et indique un début de fossilisation dans des paléoenvironnements de dépôt anaérobies, riches en sulfates et favorables au développement des bactéries sulfato-réductrices telles que les mangroves ou marais/marécages, notamment. La présence de composés organiques soufrés dans l'ambre communique donc des informations sur les environnements/écosystèmes dans lesquels vivaient les arbres producteurs de résine dont dérivent les ambres.



II.6. Molécules citées dans le chapitre

isocupressique

cupressique



CHAPITRE III – ANALYSE D'AMBRES GÉOLOGIQUES EUROPÉENS DU CRÉTACÉ : IDENTIFICATION DES PRINCIPALES FAMILLES BOTANIQUES PRODUCTRICES D'AMBRE



III.1. Introduction

Les ambres les plus anciens sont datés de la fin du Carbonifère (310 Ma) et on estime que les plus récents sont datés de la fin du Pléistocène (40 000 ans) (Delclòs et al., 2023; Langenheim, 2003; Seyfullah et al., 2018). L'étude des résines fossiles permet ainsi de retracer leur production au cours des périodes géologiques et l'évolution des arbres producteurs associés. Cependant, les périodes géologiques où de l'ambre a été formé de manière conséquente ainsi que les sites où on peut en trouver ne sont pas distribués de manière homogène (Delclòs et al., 2023). En effet, tous les arbres ne produisant pas une résine susceptible de se fossiliser, il existe au cours des temps géologiques des périodes où la production de résines est faible et des zones géographiques où l'on ne trouve que peu ou pas d'ambre. Ainsi, il n'existe que quelques sites dans le monde où on peut trouver de l'ambre datant d'avant le Crétacé et les quantités mises au jour sont faibles (Delclòs et al., 2023). Le Crétacé, quant à lui, marque un « âge d'or » de l'ambre et de nombreux sites où on trouve de l'ambre datant de cette période ont été découverts. D'autre part, on observe une augmentation significative de la quantité d'ambre produite durant cette période (Delclòs et al., 2023; Krumbiegel et Krumbiegel, 1994; Langenheim, 2003). En France, par exemple, plus de la moitié des sites fossilifères contenant de l'ambre sont datés du Crétacé (Lacroix, 1910; Nohra et al., 2015; Saint Martin et al., 2021). Cette abondance relativement soudaine durant cette période soulève de nombreuses questions parmi les paléobotanistes sur les essences végétales produisant cet ambre. D'autre part, le Crétacé est également considéré comme un « âge d'or » pour l'évolution des plantes, car même si la plupart des familles de Gymnospermes sont apparues avant cette période, elles se sont largement diversifiées durant ce laps de temps (Coiffard et al., 2006; Gomez et al., 2004; Peyrot et al., 2019). L'apparition des premières Angiospermes, aussi appelées plantes à fleurs, est, quant à elle, datée du Crétacé inférieur (Coiffard et al., 2006; Doyle, 1978; Endress, 2011). Ces diversifications et cette abondance s'expliquent par un changement climatique majeur durant la période du Crétacé qui aurait été favorable au développement des différentes essences susceptibles de produire de la résine en abondance (Langenheim, 2003).

Ce chapitre s'intéresse donc à l'étude moléculaire des ambres datant du Crétacé en Europe avec comme objectif l'identification de leurs sources botaniques. Une première partie de ce chapitre aborde l'étude moléculaire des ambres du Crétacé inférieur de l'Europe de l'Ouest, connus depuis le début du XIX^{ème} siècle (Fleuriau de Bellevue, 1817; Lacroix, 1910). Les sites contenant de l'ambre décrits dans cette partie sont principalement concentrés dans l'ouest de la France (Charente-Maritime, Vendée et Vienne) ainsi que dans le nord de l'Espagne (région basque cantabrique) et dans la zone pyrénéo-provençale (Landes, Aude, Ariège, Bouches-du-Rhône, Vaucluse, Alpes-de-Haute-Provence). L'ensemble de ces sites sont quasiment contemporains et datés du Crétacé supérieur (Menor-Salván et al., 2010; Néraudeau et al., 2002; Nohra et al., 2015; Perrichot et al, 2010). Etant proches géographiquement et temporellement, il a été proposé que l'ensemble de ces ambres était issu de résines provenant d'essences végétales proches (voire identiques) croissant dans des environnements similaires (Lambert et al., 2008; Nohra et al., 2015; Pańczak et al., 2024, 2023; Perrichot et al, 2010). Les principales hypothèses placent l'origine des ambres français et espagnols crétacés parmi les Cupressacées et/ou les Cheirolepidiacées), les Cheirolepidiacées formant une famille éteinte de conifères sans équivalents actuels (Alvin, 1982; Daviero et al., 2001; Gomez et al., 2002; Zhou, 1995). Il est donc difficile, sur une base moléculaire, d'affilier certains ambres à des résines de Cheirolepidiacées sans avoir de résines de référence actuelles. Cette partie est donc dédiée à l'analyse des ambres crétacés français et espagnols afin d'estimer la diversité des producteurs d'ambre durant cette période et d'affilier, lorsque cela est possible, les différents ambres à une potentielle origine botanique. Grâce à nos collaborations avec des paléontologues et des entomologistes ainsi qu'à une étude de la littérature, les analyses moléculaires des différents ambres ont pu être mises en relation avec la flore fossile environnant les ambres. Cette mise en perspective a ainsi permis de dégager les principales caractéristiques moléculaires des ambres de Cheirolepidiacées. La deuxième partie de ce chapitre est dédiée aux ambres d'Europe de l'Est, et plus particulièrement à la valchovite, un type d'ambre trouvé uniquement en République tchèque et en Autriche.

Ce type d'ambre, mis en évidence pour la première fois autour de la ville de Valchov (Moravie, République tchèque), rassemble un ensemble d'ambres sur la base de critères purement physiques. Les premières études placent l'origine botanique de la valchovite parmi les Araucariacées (e.g. Havelcová et al., 2014). L'analyse moléculaire

de la valchovite ainsi que sa filiation botanique déduite de cette analyse seront discutées dans cette partie.

La troisième partie de ce chapitre concerne les ambres des plus anciens sites du Crétacé d'Eurasie : il s'agit des dépôts du Moyen Orient situés dans la ceinture levantine (Israël, Liban, Syrie, Jordanie) et datés du Crétacé inférieur et de la fin du Trias. Nos travaux ont porté principalement sur l'analyse moléculaire par GC-MS d'ambres provenant de sites du Liban et d'un site de Syrie (collection de D. Azar, Université du Liban). L'ensemble des ambres de ces sites sont considérés comme provenant d'une même source botanique appartenant aux Araucariacées, et plus particulièrement du genre *Agathis* (Azar, 2012; Maksoud et Azar, 2020; Azar et al., 2010). L'origine botanique de l'ensemble des ambres crétacés du Moyen-Orient est discutée sur la base de nos analyses par GC-MS de ces ambres libanais et syriens.

Une dernière partie est consacrée à une réflexion sur les principaux producteurs d'ambres en Europe durant le Crétacé. Il est discuté dans cette partie de l'extension géographique des principaux producteurs ainsi que des caractéristiques chimiques de leur résine. Cette partie synthétise l'ensemble des données obtenues dans ce chapitre et l'intègre dans une perspective évolutive et paléogéographique.

III.2. Les sites à ambre du Crétacé d'Europe de l'Ouest (France et Espagne)

Des prospections minières du XIX^{ème} siècle ont permis de mettre en évidence en France de nombreux sites datés du Crétacé inférieur contenant du lignite associé à des morceaux d'ambre de diverses tailles (Coquand, 1856; Lacroix, 1910). Ultérieurement, en Espagne, de nombreux sites de la même période géologique contenant de l'ambre ont été mis au jour (Alonso et al., 2000; Peñalver et al., 2010; Peñalver et Delclòs, 2010). Par leur rapprochement géographique et temporel, l'ensemble de ces sites sont extrêmement intéressants d'un point de vue paléontologique. En effet, l'étude des ambres et des fossiles associés à ces sites a permis d'avoir une meilleure image des végétaux et animaux présents en Europe durant cette période du Crétacé. Ces études ont notamment permis la révision de la phylogénie de certains groupes fossiles. Par exemple, l'étude des insectes fossilisés

dans les ambres de ces sites a mis en lumière la divergence du sous-ordre des Apocrites (sous-ordre qui comprend notamment les fourmis) avec les autres hyménoptères, et cela dès le Crétacé (Nel et al., 2004; Perrichot et al., 2008), permettant ainsi une meilleure compréhension de l'histoire évolutive des insectes. Pour améliorer la compréhension écologique et évolutive des espèces végétales présentes durant le Crétacé, de nombreuses hypothèses concernant les producteurs des résine à l'origine de ces ambres franco-espagnols ont été proposées, la plupart suggérant que l'ensemble des ambres de cette période ait été produit principalement par un producteur unique, à l'instar des ambres baltiques (Langenheim, 2003; Weitschat et Wichard, 2010). La nature du/des producteurs supposés est cependant loin de faire un consensus et différentes études proposent les Cupressacées et/ou les Cheirolepidiacées comme grands producteurs de résine au Crétacé en Europe (p. ex. Menor-Salván et al., 2010; Nohra et al., 2015; Otto et al., 2002).

Afin d'appréhender la variabilité moléculaire des ambres de cette région, une partie de nos travaux a été consacrée à l'étude moléculaire par GC-MS d'ambres provenant d'un grand nombre de sites crétacés franco-espagnols allant de la Provence jusqu'au Bassin Cantabrique (**Figure III.1**). L'ensemble de ces analyses nous a permis de discuter des principales caractéristiques moléculaires des résines fossiles et d'en dégager les principales sources botaniques d'ambre en Europe durant cette période du Crétacé.

Comme cela a été mentionné précédemment, on recense dans l'Ouest européen de nombreux affleurements crétacés contenant de l'ambre (Girard et al., 2013a; Lacroix, 1910; Nel et al., 2004; Néraudeau et al., 2002; Péquart et Péquart, 1960; Peyrot et al., 2019). Ces affleurements sont datés entre l'Aptien (c.-à-d. avant dernier étage du Crétacé inférieur, 121-113 Ma) et le Maastrichtien (c.-à-d. dernier étage du crétacé supérieur, 72-66 Ma).


Figure III.1. Carte de l'ouest de l'Europe avec les différents sites contenant de l'ambre étudiés dans ce chapitre. 1) Puy-Puy, Cadeuil, île d'Aix, La Buzinie, Archingeay et Fouras (Charente-Maritime, Albien sup.-Cénomanien inf.). 2) La Garnache (Vendée, Cénomanien sup.). 3) Ecouflant (Maine-et-Loire, Cénomanien inf.) : Du Brouillard, 4) Scorbé-Clairvaux (Vienne, Cénomanien inférieur). 5) Saint-Lon-Les-Mines (Landes, Crétacé inférieur). 6) Mas d'Azil et Sainte-Croix (Ariège, Campanien sup.-Maastrichtien ?). 7) Sougraine et Fourtou (Aude, Cénomanien). 8) Piolenc (Vaucluse, Santonien inf.). 9) Salignac-Sistéron (Alpes-de-Haute-Provence, Aptien-Albien). 10) La Bouilladisse (Bouches-du-Rhône, Santonien). 11) Alava et El Soplao (Pays basque espagnol, Aptien-Albien). 12) Uña (Province de Cuenca, Barrémien13) Province de Teruel (Albien inf.-moyen).

III.2.1. La côte atlantique française, une zone riche en sites contenant de l'ambre d'origines botaniques diverses (ambres de Charente-Maritime et apparentés)

III.2.1.1. Les ambres charentais : une complexité moléculaire sous-estimée

III.2.1.1.1. Contexte de l'étude

Contexte géologique

La Charente-Maritime est une zone riche en sites contenant de l'ambre (**Figure 2.2**). Cette zone se situe en bordure du bassin Aquitain et est dominée par des roches sédimentaires crétacées s'échelonnant entre l'Albien (100-113 Ma) et le Campanien (83-72 Ma) et par des roches sédimentaires jurassiques au nord de la Charente (Néraudeau, 2008; Néraudeau et al., 2005, 2002; Perrichot et al, 2010). Les dépôts crétacés, d'une épaisseur de 50 m environ, sont constitués de grandes séries argilo-sableuses associées à un environnement fluviatile ou paralique. Localement, des lentilles d'argiles lignitiques et de lignite contenant des fossiles de plantes et des ambres peuvent être visibles (Coquand, 1856; Koeniguer, 1981; Moreau et al., 2017; Néraudeau, 2008; Perrichot et al., 2008).



Figure III.2. Carte géologique de la Charente-Maritime avec localisation des différents sites dont des échantillons d'ambre ont été analysés : 1) île d'Aix, 2) Fouras, 3) Puy-Puy, 4)
Archingeay-Les-Nouillers, 5) Cadeuil, 6) La Buzinie. 7) île d'Oléron (site non étudié ici), 8)
Carrières de Les Renardières (site non étudié ici). Schéma dessiné à partir de Perrichot et al. (2010).

Les différents sites étudiés correspondent à des affleurements comprenant différents niveaux d'une même formation qui peut être divisée en deux séries principales nommées A et B (Moreau, 1976; Néraudeau et al., 2009, 2005;Peyrot et al., 2019, 2005).

L'unité A est constituée de deux sous-unités. La première (A1) est caractérisée par la présence de sables localement riches en lignite associés à des accumulations d'ambre et de mégafossiles. Cette sous-unité comprend des strates datées de l'Albien supérieur (Dejax et Masure, 2005) et du Cénomanien inférieur (Néraudeau, 2008; Néraudeau et al., 2003). Celle-ci est visible uniquement dans les strates inférieures d'Archingeay (4, **Figure III.2**) et de Cadeuil (5, **Figure III.2**) (Néraudeau, 2008; Néraudeau et al., 2005).

La seconde sous-unité (A2) est plus homogène et est constituée de sables fins altérnant avec des niveaux d'argiles contenant des mégafossiles (Gomez et al., 2008; Néraudeau et al., 2005). Cette sous-unité a été datée du Cénomanien grâce à la présence d'ostracodes qui sont de bons fossiles stratigraphiques (Damotte et al., 1981) et par des analyses palynologiques (Moreau, 1976; Peyrot et al., 2005). Celleci affleure principalement au niveau de l'île d'Aix (1, **Figure III.2**), des strates inférieures d'Archingeay (4, **Figure II.2**), de Cadeuil (5, **Figure III.2**), de Puy-Puy (3, **Figure III.2**) et des niveaux inférieurs de l'affleurement de La Buzinie (6, **Figure III.2**) (Néraudeau, 2008; Néraudeau et al., 2002). Les ambres contenus dans cette sous-unité se situent dans les bancs inférieurs plus riches en argiles. Les mégafossiles se situent plutôt quant à eux dans les niveaux supérieurs de cette sous-unité (Néraudeau, 2008). La série A, dominée par les sables, est plutôt associée à un milieu fluviatile (Néraudeau et al., 2005; Peyrot et al., 2019).

La seconde série, nommée B, est associée majoritairement à des niveaux sableux entrecoupés d'argiles et de niveaux de glauconite. Cette série est datée du Cénomanien grâce à la présence des foraminifères benthiques *Orbitolina plana* et *O. conica* (Moreau, 1996). Ces niveaux sableux sont interprétés comme étant des dépôts de milieux paraliques et/ou d' estuaires (Néraudeau et al., 2009). Dans les niveaux les plus bas de la série, de l'ambre et des vertébrés peuvent être trouvés (Néraudeau et al., 2005, 2003). Ces niveaux affleurent dans les localités de La Buzinie (6, **Figure III.2**), de Fouras (2, **Figure III.2**) et de l'île d'Aix (1, **Figure III.2**). Parmi les niveaux moyens de la série, on observe des niveaux riches en coquilles d'huîtres et des

niveaux de marnes et de calcaires riches en coquilles et en échinodermes (Néraudeau et Moreau, 1989). Les niveaux les plus hauts sont composés de dépôts marins relativement profonds (B3). Caractérisée par des alternances de calcaires et de marnes, une partie de ces niveaux affleure dans la localité de La Buzinie (6, **Figure III.2**). De faibles quantités d'ambre sous forme de nodules altérés peuvent être trouvées dans ces niveaux (Edgecombe et al., 2009; Néraudeau et al., 2009).

La plupart des ambres prélevés proviennent de la série A, et plus particulièrement de la sous-unité A1 présente à Cadeuil et Archingeay. La grande majorité des ambres charentais a été récoltée à Cadeuil et Archingeay (Néraudeau et al., 2009; Peyrot et al., 2019). Cependant, des études ont montré que les niveaux A2 de la série contiendraient sans doute également une quantité importante d'ambre (Néraudeau et al., 2009; Perrichot et al., 2010).

L'ambre charentais a été collecté dans le cadre d'une mission de terrain dirigée par D. Néraudeau (Université de Rennes) et son équipe (1999). Une centaine de kilogrammes d'ambre a été récoltée. Presque 80 % de l'ambre collecté provient du site d'Archingeay contre 15% pour le site de Cadeuil, 4% pour le site de La Buzinie, et moins de 1% pour les autres sites (Fouras, île d'Aix, Puy-Puy, île d'Oléron, les Renardières). Jusqu'à cinq morphotypes d'ambre (classification selon des critères physiques) ont été décrits selon les différentes sites (Girard, 2008; Moreau et al., 2017; Néraudeau et al., 2003; Perrichot, 2003). Le morphotype le plus fréquent dans les différents sites correspond à un ambre opaque de couleur sable/caramel. Celui-ci représente plus de 77% des ambres d'Archingeay et quasi 100% des ambres à La Buzinie (**Type 1 - Caramel**). Le second morphotype d'ambre (10% des ambres étudiés) est de couleur rouge et peut être entouré d'une couche externe blanc-gris (Type 2 – Rouge). Ce type est associé principalement au gisement d'Archingeay-Les-Nouillers et est plus rare dans les autres gisements (5% Cadeuil, 2% Fouras, <0.1% dans les autres gisements). Le type morphologique le plus fossilifère est de couleur jaune miel (Type 3 - Miel). Celui-ci a été uniquement trouvé à Archingeay-Les-Nouillers et Cadeuil. Le dernier morphotype décrit est défini par une couleur jaune translucide peu commune puisqu'il représente environ 1% des ambres et a été trouvé principalement à Cadeuil (4% du matériel) et Fouras-Bois Vert (2%).

Ultérieurement, certains morphotypes décrits ont été séparés en plusieurs morphotypes (D. Néraudeau, communication personnelle). Les ambres rouges (Type
2) ont ainsi été subdivisés en trois morphotypes : les ambres rouges, les ambres coca et les ambres liège, ces derniers étant plus sombres que les premiers (Figure III.3).



Abondance

Figure III.3. Présentation des principaux morphotypes d'ambre décrits par Girard (2008) et Perrichot (2003) présents dans les sites de Charente-Maritime.

Paléoenvironnement

L'ensemble des études paléontologiques, sédimentologiques et taxonomiques ont permis d'obtenir quelques caractéristiques concernant le paléoenvironnement de dépôt des niveaux riches en ambre en Charente-Maritime durant le Crétacé. Les principales hypothèses avancent qu'il s'agit d'un environnement présentant un ensemble d'îles à proximité du continent et comprenant un grand nombre d'estuaires et de deltas fluviatiles sous un climat tempéré/tropical (Dejax et Masure, 2005; Néraudeau et al., 2009; Peyrot et al., 2005). Le climat devait être relativement sec, avec des périodes de mousson annuelle, expliquant la répartition hétérogène des dépôts de lignite et des fossiles (Néraudeau et Moreau, 1989; Perrichot et al, 2010; Peyrot et al., 2019). La flore, essentiellement littorale, était caractérisée par une abondance de monilophytes et de Gymnospermes adaptés à des conditions hypersalines et au stress hydrique (Dejax et Masure, 2005; Néraudeau et al., 2005; Peyrot et al., 2019, 2005). Les Angiospermes présentes étaient fortement diversifiées et associées à des environnements fluviatiles et saumâtres (Coiffard et al., 2009, 2006).

On observe une grande diversité parmi les Gymnospermes et les différents sites semblent être dominés par les Cheirolepidiacées et les Cupressacées (**Figure III.4**) (Dejax et Masure, 2005; Moreau et al., 2017).



Figure III.4. Diversité botanique associée aux restes fossiles des différents groupes/ordres de plantes (en %) obtenue à partir des études palynologiques et paléontologiques (Dejax et Masure, 2005; Gomez et al., 2008; Néraudeau et al., 2008; Peyrot et al., 2019, 2005) au niveau des sites de Cadeuil, Archingeay, Puy-Puy et Fouras ainsi que les âges et les niveaux associés. *Données réduites pour Puy-Puy, peu de mégarestes ayant été identifiés au niveau de ce site. Les données ont été obtenues à partir des comptages et de l'identification des restes fossiles et du pollen effectués dans le cadre de différentes études.

Des restes fossiles des principales familles de conifères existant encore actuellement comprenant les Cupressacées, les Pinacées et les Podocarpacées ont été mis en évidence au niveau des différents sites de Charente Maritime (Dejax et Masure, 2005; Gomez et al., 2008; Peyrot et al., 2019). De plus, des restes fossiles d'une famille éteinte de conifères, les Cheirolepidiacées (cf. Chapitre I, I.4), ont également été trouvés (Gomez et al., 2008, 2002; Peyrot et al., 2019). Cette famille est majoritaire au

niveau du site de La Buzinie (**Figure III.5**). Dans le cas du site de Fouras, les Cheirolepidiacées et les Cupressacées sont dominantes (**Figure III.5**).

À Cadeuil et Archingeay, ce sont les fossiles de Cupressacées qui sont présents en écrasante majorité. Les **figures III.4** et **III.5** ne sont représentatives que de la biodiversité présente au niveau des différents sites et non pas de l'abondance au sein des différents taxons. En effet, ces figures ont été construites en ne prenant en compte que le nombre de taxons et non pas l'abondance des espèces au sein de ceux-ci. En effet, par exemple à Archingeay, une grande partie de la biodiversité est expliquée par les Cupressacées. Cependant, lorsque l'on regarde l'abondance des espèces au sein de ce site, il apparaît que celui-ci était dominé par deux espèces : *Frenelopsis alata*, de la famille des Cheirolepidiacées et un conifère du genre *Glenrosa Watson* (Gomez et al., 2008). Ces fossiles se trouvent aussi, dans des proportions variables, au niveau des autres sites étudiés (Gomez et al., 2004; Moreau et al., 2017; Néraudeau et al., 2020 a,b).



Figure III.5. Diversité des principales familles de Gymnospermes associées aux micro- et mégarestes fossiles identifiés au niveau des différents sites de Charente-Maritime d'après les études de Dejax et Masure, 2005; Gomez et al., 2008; Moreau et al., 2017; Peyrot et al., 2019, 2005. Ces estimations ont été réalisées à partir des études de la littérature sur les études floristiques (restes fossiles et pollen).

Études précédentes et origines botaniques supposées

Les premières hypothèses concernant l'origine botanique des ambres charentais sont basées sur des études paléontologiques. Ainsi, Crié (1890) a décrit dans les lignites de l'île d'Aix un grand nombre d'échantillons de bois fossile pouvant être affiliés à Araucarioxylon et *Cedroxylon* proches des genres modernes Araucaria (Araucariacées) et Abies (Pinacées). Cet auteur en a donc conclu que les nodules d'ambre associés à ce site proviennent de la résine d'un des conifères dont le bois fossile a été décrit. Koeniguer (1977, 1981, 1992), lors de ses études paléobotaniques de la région, a également noté l'abondance de bois fossile d'Araucarioxylon associé à la famille des Araucariacées qu'il considère à l'origine de l'ambre charentais. Plus tard, Néraudeau et al. (2002) ont établi le lectotype d'Agathoxylon gardoniense, décrit pour la première fois par Crié (1890). Ces auteurs ont proposé que cette espèce, étant donné son abondance dans les niveaux à lignite et ambre, soit la source de l'ambre charentais. Perrichot (2004, 2003) a réalisé une analyse complémentaire de l'ensemble des strates comprenant du lignite de la Charente-Maritime et a décrit un grand nombre de fossiles de bois et d'ambre associé. Notamment, il a constaté que certains bois fossilisés contiennent de l'ambre directement incrusté dans le bois, ainsi que la présence de morceaux de bois inclus dans l'ambre. Dans la plupart des cas où cela a été observé, les bois étaient affiliés au genre Agathoxylon appartenant aux Araucariacées. (Perrichot, 2003). Cependant, cet auteur a noté que de l'ambre a aussi été trouvé en contact direct avec du bois fossile des genres Brachyoxylon et Podocarpoxylon, qui sont affiliés aux conifères de la famille éteinte des Cheirolepidiacées. L'hypothèse selon laquelle il y aurait plusieurs sources botaniques faisant partie de la famille des Araucariacées et des Cheirolepidiacées pour les ambres charentais a donc été proposée. Ces études ont ainsi permis de mettre en évidence qu'au moins deux espèces botaniques distinctes seraient à l'origine des ambres charentais. Cependant, il est à noter qu'il est possible que les espèces à l'origine de certains ambres ne soient pas représentées dans le registre fossile, notamment si le bois n'a pas été bien préservé au cours du temps. A l'inverse, l'association bois fossile/ambre n'est pas forcément une indication de filiation directe entre une espèce botanique productrice et la résine, dans la mesure où cette association pourrait être fortuite si l'ambre n'est pas clairement localisé dans les canaux résinifères du bois.

Toutefois, les hypothèses émises sur la base des études paléontologiques réalisées semblent être confortées par des études spectroscopiques d'ambre et de résines contemporaines basées sur la spectroscopie infrarouge et la résonance magnétique nucléaire. En effet, la comparaison des spectres des ambres charentais avec ceux de résines actuelles d'Araucariacées et notamment du genre Agathis montre de nombreuses similitudes (Lambert et al., 2008, 1996; Lambert and Poinar, 2002). Certaines analyses en spectroscopie infrarouge rapprochent cependant les ambres charentais des résines actuelles de Cupressacées (Nohra et al., 2015), ce qui n'est pas le cas des analyses paléontologiques. Une telle approche est cependant discutable. En effet, comme cela a été discuté dans le chapitre I (cf I.3.3.3), les spectres issus des analyses par spectroscopie infrarouge sont extrêmement sensibles à la composition chimique des échantillons, celle-ci étant directement liée au degré d'altération et au niveau de diagenèse subi par les échantillons analysés (Beck, 1986). Il est donc difficile de relier un ambre altéré par des processus diagénétiques à une résine fraîche. Ces analyses spectrales permettent néanmoins de mettre en évidence qu'il existe au moins deux types chimiques distincts parmi les ambres charentais, mais il est difficile de déterminer de façon robuste l'origine botanique de ces types d'ambre à partir de ces analyses.

De ce fait, Nohra et al. (2015) proposent une identification de l'origine botanique sur la base d'une étude par thermochemolyse-GC-MS. Cette méthode a ainsi révélé la présence dans les ambres d'Archingeay de labdanoïdes dont la configuration est dite « régulière », à l'instar des labdanoïdes de conifères (cf Chapitre I, I.2.3.1). L'absence d'acide succinique associé à ces labdanoïdes implique l'appartenance des ambres charentais à la classe lb (Anderson, 1995; Nohra et al., 2015). Les analyses par thermochemolyse ont par ailleurs mis en évidence que les ambres charentais sont dominés par des diterpènes, étayant ainsi l'hypothèse d'une origine parmi les conifères (Nohra et al., 2015). Nohra et al. (2015) ont aussi noté la présence de composés interprétés comme étant des dérivés de l'acide callitrisique (1), un composé typique des Cupressacées, dans les ambres d'Archingeay-Les-Nouillers. D'un autre côté, comme aucun diterpène phénolique n'avait été observé au cours de ces analyses, ces auteurs ont rejeté la possibilité d'une telle origine.

Il en a été conclu que l'origine botanique de l'ambre d'Archingeay serait proche des Araucariacées, et plus particulièrement du genre *Agathis*, ce qui rejoint les hypothèses formulées précédemment sur la base des analyses spectrales (Lambert et al., 2008, 1996; Nohra et al., 2015). La thermochemolyse-GC-MS rend cependant l'identification des biomarqueurs difficile car une partie des composés est dégradée par pyrolyse. Il est donc possible que l'absence de composés phénoliques soit dû à la méthode d'analyse employée, d'autant plus qu'il n'est pas spécifié dans cette étude quel est le type morphologique qui a été étudié. Il est donc aussi possible que les différences observées soient dues à des types moléculaires différents.

Une analyse ultérieure par GC-MS d'un échantillon d'ambre d'Archingeay (De Lama Valderrama et al., 2022) a mis en évidence la présence d'un diterpène phénolique, le ferruginol (2), dans un ambre caramel d'Archingeay. Cette analyse a également conduit à l'identification de nouveaux diterpènes formés par cyclisation de l'acide cupressique (3) et/ou du torulosol(4), deux labdanoïdes plutôt associés aux Cupressacées.

Dans ce contexte, et malgré l'absence de marqueurs moléculaires univoques caractéristiques de Cupressacées, comme l'acide callitrisique (1) ou le cuparène (5), la détection de ferruginol (1) est en faveur de l'hypothèse selon laquelle cet ambre serait issu de Cupressacées plutôt que d'Araucariacées, car ce composé est fréquent et abondant dans les Cupressacées alors qu'il n'a été rapporté que dans une seule espèce d'Araucariacées (Otto et Wilde, 2001 ; Cox et al., 2007). De Lama Valderrama et al. (2022) n'excluent cependant pas la possibilité d'une origine à partir de Cheirolepidiacées, espèces végétales qui sont abondantes parmi les fossiles du site d'Archingeay et dont il n'existe pas d'équivalents actuels. Pour conclure, l'ensemble des études paléontologiques, spectrales et moléculaires semblent pointer vers une origine de type Cupressacées ou Araucariacées pour les ambres charentais, tout au moins pour les échantillons analysés. Cependant, il n'est pas possible d'éliminer complètement la possibilité d'une origine de type Cheirolepidiacées.

Présentation des échantillons

Un ensemble d'échantillons d'ambre fourni par D. Néraudeau a été analysé lors de cette étude. Des représentants de chaque type morphologique : coca, miel, liège, caramel et rouge ont été collectés à Archingeay-Les-Nouillers (**Figure III.3**). Les ambres citron proviennent essentiellement du site de Cadeuil. Les ambres des autres sites étudiés (Puy-Puy, La Buzinie, île d'Aix, Fouras) ont été analysés moins extensivement, et seulement quelques échantillons ont été analysés, sans tenir compte de leur type morphologique.

III.2.1.1.2. Résultats et Discussion

Caractérisation moléculaire des ambres d'Archingeay-Les-Nouillers, de Puy-Puy, de <u>l'île d'Aix et de Cadeuil</u>

Remarque préliminaire : la caractérisation moléculaire des échantillons morphotypes du site d'Archingeay a été effectuée dans le cadre du stage de master 1 de L. Alez-Martin (2022) et a fait l'objet d'un poster présenté au congrès FROG (French Researchers in Organic Geochemistry) en 2022 (Alez-Martin et al., 2022).

Pour chaque morphotype, les extraits lipidiques dérivés de plusieurs échantillons ont été analysés par GC-MS. À la suite de cela, il est évident qu'au sein de chaque catégorie, il existe une certaine homogénéité moléculaire. Cependant, il a aussi été mis en évidence que ces morphotypes ne reflètent pas complètement un type moléculaire. En effet, les analyses moléculaires ont conduit à regrouper ces morphotypes deux par deux en raison de leurs similarités (**Figure III.6**), menant à la création de trois types moléculaires. Le premier type moléculaire, majoritaire dans l'ensemble des sites étudiés, est nommé **Arc 1** et rassemble les morphotypes « rouge » et « caramel ». Le second type, nommé **Arc 2**, rassemble les morphotypes « coca » et « liège », tandis que le dernier, **Arc 3**, minoritaire, rassemble les morphotypes « miel » et « citron ». Les trois types possèdent des distributions moléculaires dominées par des diterpènes, indiquant une origine botanique issue de conifères (Langenheim, 2003).



Figure III.6. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) des fractions apolaires isolées à partir d'extraits organiques méthylés d'ambres représentatifs de chaque morphotype.

La Figure III.7 montre le chromatogramme en phase gazeuse de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un échantillon d'ambre du premier type moléculaire Arc 1. Ce premier type moléculaire est dominé par les labdanoïdes (Figure III.7) et présente une quantité relative de diterpènes de la série de l'abiétane (70) (Figure III.7) et du (iso)pimarane (71)/(72) (Figure III.7) beaucoup plus faible. Les composés principaux sont les composés (13) et (21) qui ont été isolés et identifiés par De Lama Valderrama et al. (2022) à partir d'un échantillon d'ambre d'Archingeay. Ceux-ci sont probablement issus de la cyclisation de l'acide cupressique (3) et/ou du torulosol (4) qui sont tous deux des composés fréquents dans la famille des Cupressacées et des Araucariacées (Cox et al., 2007; De Lama Valderrama et al., 2022). L'abondance des labdanoïdes est une caractéristique moléculaire actuelle des familles des Cupressacées et des Araucariacées (Langenheim, 2003; Otto et al., 2001). Ainsi par exemple, la résine de *Cupressus arizonica* (Chapitre I, Figure I.15) est composée majoritairement de labdanoïdes dérivant de l'acide agathique (6) et communique (7). De la même façon, la résine d'Araucaria columnaris est dominée par des labdanoïdes comme l'acide agathique (6) (Chapitre I, Figure I.26).

Cependant, il est à noter que dans la résine des Araucariacées actuelles, les dérivés de l'acide abiétique (**8**) sont dominants (Langenheim, 2003; Lu et al., 2013; Otto and Wilde, 2001, Chapitre I, I.2.3.1.5.), ce qui n'est pas le cas ici. En effet, dans l'ambre de type **Arc 1**, on ne détecte que l'acide déhydroabiétique (**9**) parmi cette série et celui-ci est présent en très faibles quantités. Cette absence ou présence en faibles quantités des dérivés de l'acide abiétique est une caractéristique des résines de Cupressacées actuelles (Cox et al., 2007).

De plus, associé à ces labdanoïdes, un diterpène phénolique, le ferruginol (2) a été détecté en petites quantités. Les diterpènes phénoliques sont des biomarqueurs fréquents dans les résines de Cupressacées et de Podocarpacées, et sont en revanche absents dans les résines d'Araucariacées (Cox et al., 2007; Langenheim, 2003).

Finalement, il apparait que les ambres du type moléculaire **Arc 1** analysés ici présentent la même distribution moléculaire que l'échantillon analysé par De Lama Valderrama et al. (2022). L'origine botanique de cette catégorie est donc probablement similaire, voire identique, et correspondrait à un type d'ambre provenant de Cupressacées.

Ce type d'ambre (**Arc 1**) est aussi trouvée majoritairement (ou exclusivement) dans les échantillons analysés de l'île d'Aix, de Puy-Puy et de Cadeuil.

Le type moléculaire **Arc 1** est donc majoritaire en Charente-Maritime et est présent dans l'ensemble des sites étudiés, à l'exception de La Buzinie et de Fouras, dont les distributions moléculaires des ambres seront présentées ci-après.

Le producteur principal de résine dans les forêts cénomaniennes en Charente-Maritime serait donc affilié aux Cupressacées, et il pourrait s'agir par exemple du genre *Glenrosa* dont les reste fossiles sont relativement abondants sur les différents sites (Gomez, communication personnelle ; Gomez et al., 2004; Perrichot, 2003).



Figure III.7. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre de la catégorie « caramel » (Type 1 d'Archingeay). En violet, les terpènes de la série des labdanoïdes, en vert les diterpènes de la série de l'acide abiétique, en bleu les diterpènes de la série de l'acide (iso)pimarique, en orange les diterpènes phénoliques. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Ambre de type Arc 2

La Figure III.8 présente le chromatogramme en phase gazeuse de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un échantillon d'ambre « coca », que nous avons rattaché au type moléculaire Arc 2. Ce type moléculaire est dominé par les labdanoïdes, et plus particulièrement par les dérivés issus de l'acide communique (7). Les composés (10), (11), (25), (26) (Figure III.8) détectés dans des ambres espagnols par Menor-Salván et al. (2016) ont aussi été mis en évidence dans les extraits des ambres du type moléculaire Arc 2. De plus, les labdanoïdes cyclisés (13) et (21) (Figure II.8) identifiés par De Lama Valderrama et al. (2022) sont également présents en proportions relatives plus faibles que dans le cas de l'ambre de type Arc 1. L'un des composés majeurs est le kujigamberol (28) identifié initialement par Kimura et al. (2012) dans l'ambre de Kuji.



Figure III.8. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre de la catégorie «coca» (Type 2 d'Archingeay). En violet, les terpènes de la série des labdanoïdes. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques et les alcools peuvent être sous forme de formiates.

Il est à noter que ce composé apparait principalement sous forme d'alcool et non d'un dérivé de type formiate, bien que le traitement par le DMA-DMF utilisé pour la méthylation des acides carboxyliques soit susceptible de formyler les alcools - mais souvent de manière partielle - (De Lama Valderrama et al., 2022). Cela est peut-être dû à l'encombrement stérique particulier au niveau de la fonction alcool du kujigamberol localisée sur une position néopentylique.

La structure du composé (**17**) (**Figure III.8**), pourrait laisser penser qu'il est issu de la transformation diagénétique d'un diterpénoïde tricyclique de la série de l'abiétane (acide callitrisique (**1**)), compte tenu de la stéréochimie en C-4. Il pourrait alors être l'un des rares constituants (avec les composés (**27/27'**), voir ci-dessous) présents dans les ambres du type moléculaire **Arc 2** qui, potentiellement, ne serait pas un dérivé de labdanoïdes.

Il est possible, cependant, que ce composé soit en fait issu de la transformation d'un labdanoïde selon un processus comprenant une réaction de cyclisation et une réaction d'aromatisation comme cela a été proposé par De Lama Valderrama et al. (2022) (**Figure III.9**).



Figure III.9. Mécanisme proposé pour la formation diagénétique du composé (**17**) par cyclisation/aromatisation, de labdanoïdes apparentés à l'acide communique (**7**) (adapté d'après De Lama-Valderrama et al., 2022).

Le composé marqué (27/27') sur la Figure III.8 avait déjà été mis en évidence par Menor-Salvan et al. (2016). Il présente un spectre de masse (Figure III.10A) caractérisé par un ion moléculaire $[M^{+\circ}]$ à *m*/z 228 et des fragments majeurs à *m*/z 131 et *m*/z 213. Menor-Salvan et al. (2016) avaient proposé que ce composé correspondrait à un analogue insaturé de l'ambérène (11) (Figure III.10A). Nous proposons, en alternative, une structure tricyclique monoaromatique (Figure III.10A) en raison de l'analogie du spectre de masse du composé (27) avec celui des hydrocarbures (30) et (30') issus de la décarboxylation de l'acide déhydroabiétique (9) (Figure III.10B). On observe, en effet, pour le composé (27) un décalage de 28 Da par rapport à l'ion moléculaire (*m*/z 256) et les fragments principaux (*m*/z 159 et *m*/z 241) des composés (30) et (30') (e.g. Bailly, 2016). Dans le cas de l'échantillon d'ambre « coca » du type moléculaire Arc 2, ce composé (27) pourrait être issu de la décarboxylation du composé (17) et, de ce fait, être également apparenté aux labdanoïdes bien que possédant a priori un squelette d'acide résinique tricyclique (Figure III.10B). Comme les hydrocarbures (30) et (30') issus de la décarboxylation d'30 et (30') issus de la décarboxylation d'30 et (30') issus de la décarboxylation d'30 et (30') et m/z 241) des composés (30) et (30') (e.g. Bailly, 2016). Dans le cas de l'échantillon d'ambre « coca » du type moléculaire Arc 2, ce composé (27) pourrait être issu de la décarboxylation du composé (17) et, de ce fait, être également apparenté aux labdanoïdes bien que possédant a priori un squelette d'acide résinique tricyclique (Figure III.10B). Comme les hydrocarbures (30) et (30') issus de la décarboxylation

de l'acide déhydroabiétique (9), le composé (27) doit avoir un isomère correspondant à un épimère en C-4 (27') (Figure III.10) avec un spectre de masse vraisemblablement identique.



Figure III.10. A. Spectre de masse (IE, 70 eV) du composé (27) et propositions de structure pour ce composé. B. Structures et mode de formation possible des hydrocarbures (30) et (30')° et (27)/(27') par décarboxylation de l'acide déhydroabiétique (9) et du composé (17) présents dans l'ambre « coca ».

Il apparait donc que tous les composés mis en évidence dans l'ambre « coca », y compris les composés (17) et (27)/(27'), peuvent être considérés comme étant susceptibles de dériver de labdanoïdes. Nous n'avons pas pu mettre en évidence des composés pouvant être affiliés de manière non ambigüe aux acides résiniques tricycliques. Parmi les résines issues de végétaux contemporains, il est extrêmement rare d'en trouver qui soient constituées uniquement de labdanoïdes (Langenheim, 2003, Chapitre I, I.4). Les seuls exemples sont les résines de Fabacées issues d'Angiospermes. Au stade actuel de nos travaux, nous ne pouvons exclure a priori que l'ambre « coca » soit issu d'une résine d'Angiospermes, dans la mesure où nous n'avons pas pu mettre en évidence de biomarqueurs issus exclusivement de conifères.

Cependant, les labdanoïdes biosynthétisés par les Angiospermes et ceux issus de Gymnospermes diffèrent par leurs stéréochimies, laissant ainsi une possibilité de distinguer ces deux origines botaniques sur une base moléculaire. En effet, comme cela a été discuté dans le chapitre I, il existe deux séries de labdanoïdes, la première dérivant de l'acide communique (7) (type dit « régulier ») typique des conifères et la seconde dérivant de l'acide ozique (31) (type dit « enantio ») typique des Angiospermes (Figure III.11) (e.g. Anderson et al., 1995; Bray and Anderson, 2009, Chapitre I, I.2.3.2.1).

Ici, la présence du composé (17) nous donne une indication concernant le type de labdanoïdes présents dans l'ambre « coca » puisqu'elle indique que celui-ci provient d'un labdanoïde dit « régulier ». En effet, il a été proposé que les composés (17) et (19), fréquents dans les ambres, proviendraient de la cyclisation/aromatisation de labdanoïdes ou de l'aromatisation de dérivés de l'acide (iso)pimarique (e.g. De Lama Valderrama et al., 2022; Simoneit et al., 2018). Les modes de formation de ces sont présentés sur la **Figure III.11.** Si composés un processus de cyclisation/aromatisation peut affecter un labdanoïde tel que l'acide communique (7) de la série « régulière » pour conduire au composé (17) (Figures III.8 et III.9), un tel processus pourrait également affecter un composé comme l'acide ozique (31) qui correspond à la version « enantio » de l'acide communique (7) (Figure III.10). Ainsi, si l'acide ozique (31) avait subi ce processus de cyclisation/aromatisation, nous aurions dû détecter le composé (19*) (Figure III.11). Dans la mesure où les colonnes de GC qui nous avons utilisées ne permettent pas de séparer les énantiomères, le composé (19*), qui n'est autre que l'énantiomère du composé (19) (Figure III.11), aurait un temps de rétention (et un spectre de masse) identique à celui du composé (19) et différent de celui du composé (17). Ce composé n'ayant pas été détecté, il est raisonnable de proposer que les labdanoïdes présents dans l'ambre « coca » font bien partie de la série « régulière » et que la résine à l'origine du type moléculaire Arc 2 provient bien de conifères. Il est cependant difficile d'aller plus loin quant à l'identification de sources botaniques possibles dans la mesure où nous ne connaissons pas de résines de conifères actuelles exclusivement constituées de labdanoïdes.



Figure III.11. Origines possibles et modes de transformation possibles des composés (17), (19) et (19*).

Ce type de distribution a été déjà décrit parmi les ambres espagnols (Menor-Salván et al., 2016). Ces auteurs ont proposé comme origine une Araucariacée ou une Cupressacée car ce sont les familles dont les résines sont caractérisées par les proportions les plus importantes de labdanoïdes (Otto et al., 2002, 2001; Simoneit et al., 1986, Chapitre I, I.2.3). Ces auteurs ont également proposé que, dans le cas d'une résine d'Araucariacées, les diterpénoïdes de la série du clérodane (**34**) (**Figure lil.12**) éventuellement présents auraient été transformés en labdanoïdes lors de la diagenèse, expliquant leur écrasante prédominance dans l'échantillon. Cependant, l'absence de composés diterpéniques tricycliques dans l'échantillon n'a pas été expliquée. Il est à noter de plus que ces composés sont relativement peu connus. Il est donc possible que ces composés existent dans les ambres, mais que ceux-ci n'aient pas été reconnus.

Il avait aussi été proposé que les ambres espagnols soient principalement issus de Cheirolepidiacées, celles-ci étant relativement proche phylogénétiquement des Cupressacées et Araucariacées (Menor-Salvan et al., 2010 ; 2016).



Figure III.12. Squelette des clérodanes.

Cependant, nos travaux portant sur l'étude moléculaire d'ambre de plusieurs sites associés à la présence de fossiles de Cheirolepidiacées ont mis en évidence la présence significative de composés dérivant de l'acide déhydroabiétique (**9**) dans les fossiles (Fradet et al., 2023). D'autres études basées sur l'analyse de fossiles de Cheirolepidiacées avaient aussi conclu que ces fossiles produisaient majoritairement des dérivés de l'acide déhydroabiétique (**9**) (Bray et Anderson, 2008; Nguyen Tu et al., 2000). Dans le cas présent, ces composés sont absents, infirmant donc l'hypothèse d'une telle origine botanique.

Ambre de type Arc 3

La Figure III.13 présente le chromatogramme en phase gazeuse de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre de la catégorie « miel » affilié au type moléculaire **Arc 3**, le plus rare puisqu'il n'a été mis en évidence uniquement à Cadeuil et Archingeay. La distribution moléculaire comprend des diterpènes dérivant de l'acide abiétique, de l'acide (iso)pimarique, et des diterpènes tétracycliques possiblement apparentés au phyllocladane (36) ou au kaurane (37). Associés à ces diterpènes, on détecte également des labanoïdes. Par exemple, un des composé (13) identifié par De Lama Valderrama et al. (2022) dans un ambre du type moléculaire **Arc 1** est aussi présent. Des dérivés de l'acide agathique (6), dont la double liaison du méthylène *exo* aurait migré selon un processus connu pour se produire lors de la diagenèse dans le cas des ambres (Clifford et Hatcher, 1995), apparaissent aussi en fin de chromatogramme (composés (23/24), Figure III.13).

Parmi les composés apparentés à l'acide abiétique (**8**) se trouve l'acide callitrisique (**1**) initialement identifié dans le genre *Callitris* de la famille des Cupressacées (Carman et Deeth, 1971; Simoneit et al., 2018; Welch et Kim, 1976).

Cependant, il est à noter que l'acide callitrisique (1) n'est pas uniquement associé aux Cupressacées, mais peut être présent dans les résines de certaines Araucariacées (Anderson, 2006). La présence de l'ensemble des familles diterpéniques en quantités relatives comparables est une caractéristique des résines d'Araucariacées (Langenheim, 2003 ; Lu et al., 2013, Otto et Wilde, 2001). Par exemple, la résine d'*Araucaria columnaris* (Chapitre I, **Figure I.26**) contient des diterpènes des trois familles. De plus, on a pu proposer pour un des composés détectés (**Figure III.13**), une structure tétracyclique (**35**) qui pourrait être apparentée aux diterpènes de la série du phyllocladane/kaurane (**36/37**) (sur la base de l'interprétation de son spectre de masse. En effet, celui-ci est très similaire au spectre de masse d'un dérivé oxygéné du phyllocladane tel que trouvé dans la base de spectres de masse NIST. Les diterpènes tétracycliques de la série du phyllocladane/kaurane (**36/37**) sont caractéristiques des Araucariacées (Abdel-Sattar et al, 2009; García et al., 2007; Lu et al., 2013).

A l'instar des labdanoïdes, les diterpènes de la série du phyllocladane (**36**) et du kaurane (**37**) existent en séries dites « régulière » et « enantio » qui se distinguent au niveau de la configuration de leurs centres asymétriques. Ici, l'ensemble des diterpènes est assez typique des conifères, et il est donc raisonnable de proposer que les configurations des centres asymétriques des diterpènes tétracycliques mis en évidence dans l'ambre « miel » correspondent à ceux de diterpènes de la série dite « régulière » typique des conifères. L'hypothèse la plus vraisemblable est donc que les ambres de type **Arc 3** soient issus de résines d'Araucariacées.



Figure III.13. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre de la catégorie « miel » (*Arc 3*) d'Archingeay. En violet, les terpènes de la série des labdanoïdes, en vert les diterpènes de la série de l'acide abiétique, en bleu les diterpènes de la série de l'acide pimarique, en marron les diterpènes de la série du phyllocladane, et en noir les composés sesquiterpéniques. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Caractérisation moléculaire de l'ambre de Fouras et origine(s) botanique(s)

L'analyse par GC-MS d'échantillons d'ambre de Fouras (**Figure III.14**) a conduit à l'identification d'un nouveau type moléculaire présentant des caractéristiques spécifiques. En effet, ce type d'ambre présente une prédominance des composés dérivant de l'acide pimarique (**32**) (**Figure III.14**).

Cette prédominance est une caractéristique compatible avec une résine de Pinacées (Chapitre I, § I.2.3.1.1), ce qui est également compatible avec la présence de l'acide déhydroabiétique (**9**), bien que détecté en faibles quantités. En revanche, la présence de ferruginol (**2**) semble rendre cette hypothèse caduque. En effet, comme nous l'avons vu dans le chapitre I (§I.2.3), les diterpènes phénoliques sont plutôt présents chez les Cupressacées et prédominants chez les Podocarpacées (Cox et al., 2007). Dans le cas de l'ambre de Fouras, la faible quantité de diterpènes phénoliques rend toutefois l'hypothèse d'une origine de type Podocarpacées peu probable.

L'hypothèse la plus vraisemblable serait donc que l'on ait affaire ici à une résine de Cupressacées. Il apparait, en effet, que l'ambre de Fouras contient également des labdanoïdes, comme cela est le cas avec les résines de Cupressacées. Ainsi, on peut noter ici la présence du composé (17) qui est supposé être issu de la cyclisation d'un labdanoïde (cf. Figure II.11), de même que celle des composés (41) et (42) (Figure II.14), qui sont eux aussi principalement issus de la transformation diagénétique de labdanoïdes (Bray and Anderson, 2008; Clifford et Hatcher, 1995). Cependant, les labdanoïdes sont souvent les diterpénoïdes prédominants dans les résines de Cupressacées actuelles (Otto et Wilde, 2001 ; Simoneit et al., 2018), ce qui ne transparait pas dans la distribution moléculaire de l'ambre de Fouras. D'autre part, les résines de Cupressacées sont souvent dépourvues de dérivés de l'acide abiétique (8) (Cox et al., 2007 ; Otto et Wilde, 2001, Simoneit et al., 2018).

Ainsi, par exemple, les composés principaux de la résine de *Cupressus sempervirens* sont le sempervirol (**45**), un diterpénoïde phénolique, des dérivés de l'acide communique (**7**) et agathique (**6**), ainsi que l'acide sandaracopimarique (**33**). Aucun composé dérivant de l'acide abiétique (**8**) n'est présent dans la résine de *Cupressus sempervirens* (Chapitre I, **Figure I.15**). De même, la résine de *Chamaecyparis lawsoniana* (Chapitre I, **Figure I.17**) ne contient aucun dérivé de l'acide abiétique (**8**), la distribution des diterpènes étant dominée par les dérivés de l'acide agathique (**6**) et communique (**7**) ainsi que par le totarol (**46**). Cependant, il faut noter que l'acide déhydroabiétique (**9**) a été mis en évidence en faibles quantités dans les résines de certaines espèces de Cupressacées du genre *Callitris* (Simoneit et al., 2018).

Ce type moléculaire présente donc des caractéristiques moléculaires correspondant partiellement à la fois à une résine de Cupressacées, d'Araucariacées et de Pinacées. La constitution moléculaire de l'ambre de Fouras ne peut donc être liée simplement à celle de la résine d'une famille actuelle de conifères et présente, au contraire, des caractéristiques hybrides entre plusieurs familles botaniques. Nous proposons donc ici que la résine ayant conduit à ce type moléculaire d'ambre puisse être celle d'une Cheirolepidiacée, une famille de conifères éteinte actuellement, mais dont les restes fossiles sont abondants sur le site de Fouras. Cette hypothèse est partiellement renforcée par l'étude d'ambre de sites de la même période où on trouve en abondance des cuticules fossiles de Cheirolepidiacées (*Frenelopsis*), comme les sites de Scorbé-Clairvaux et Piolenc (cf. III.2.1.2. et III.2.2.3). Cependant, l'empreinte moléculaire de l'ambre de Fouras est assez différente de celles observées pour les ambres de Scorbé-Clairvaux et Piolenc (cf. III.2.1.2. et III.2.1.2. et III.2.2.3). A ce stade, on ne peut donc pas exclure que l'ambre de Fouras soit issu d'une résine de Cupressacée.



Figure III.14. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre de Fouras. En vert les diterpènes de la série de l'acide abiétique, en bleu les diterpènes de la série de l'acide (iso)pimarique, et en orange les diterpènes phénoliques. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Caractérisation moléculaire de l'ambre de La Buzinie et origines botaniques.

Les différents échantillons d'ambres analysés provenant de La Buzinie présentent des caractéristiques moléculaires similaires. Ces distributions (**Figure III.15**) montrent des extraits dominés par les labdanoïdes tels que des dérivés de l'acide agathique ((**23/24**),(**17**); **Figure III.15**), le kujigambérol ((**28**), **Figure III.15**) – sous la forme de formiate suite à la réaction du DMF-DMA sur la fonction alcool du kujigambérol (**28**) – et un éther cyclisé de labdanoïdes (**13**) (**Figure III.15**) identifié par De Lama Valderrama et al. (2022).

Associés à ces composés, les composés (17) et (19) ont également été détectés en proportions significatives, tout comme le ferruginol (2), un diterpénoïde phénolique. Enfin, une quantité importante de composés soufrés (47-54) a également été mise en évidence (Figure III.15). La structure et l'origine de ces composés est discutée en détail dans le chapitre II (§II.2 et §II.3). Une partie de ces composés (47-49)) provient de la sulfuration des acides sandaracopimarique (33) et/ou isopimarique (55) (Lenen et al., 2023; Chapitre II, §II.2), ce qui indique que ces acides étaient présents originellement dans la résine à l'origine de cet ambre. Une autre partie des diterpènoïdes soufrés peut, quant à elle, être rattachée à des labdanoïdes (e.g. (50-54)). La présence d'acides diterpéniques tricycliques de la série (iso)pimarique, bien que discrète, a donc été clairement mise en évidence par la présence des composés soufrés (47), (48) et (49), du composé (19) qui est supposé être formé par aromatisation/déalkylation de l'acide pimarique (32) ou de l'acide isopimarique (55) (cf. Figure III.12), et d'un acide tricyclique monoinsaturé en série (iso)pimarique (43) présent en faibles quantités (Figure III.15) et dont la structure est proposée sur la base de la spectrométrie masse (Bibliothèque de spectres NIST).



Figure III.15. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre de la Buzinie. En violet, les terpènes de la série des labdanoïdes, en vert les diterpènes de la série de l'acide abiétique, en bleu les diterpènes de la série de l'acide (iso)pimarique, et en orange les diterpénoïdes phénoliques. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques. Compte tenu des résultats de l'analyse moléculaire de l'ambre de Buzinie, la résine à l'origine de cet ambre devait contenir une grande quantité relative de labdanoïdes dérivant de l'acide communique (7) et agathique (6), ainsi que, dans une moindre proportion, des acide résiniques tricycliques en série (iso)pimarique (55), notamment, dont la présence a été révélée sous la forme de composés diterpéniques soufrés (Figure III.15)

Il apparait ainsi que les échantillons provenant de La Buzinie présentent des caractéristiques similaires à celles du type moléculaire **Arc 1** de Charente-Maritime: une abondance de labdanoïdes, la présence de diterpénoïdes phénoliques (essentiellement du ferruginol (2)) et la présence de quelques dérivés en série (iso)pimarique. Il est donc fort probable que l'ambre de la Buzinie proviennent de la même source botanique que les ambres du type **Arc 1** identifiés à Archingeay. Toutefois, la résine à l'origine des ambres de Buzinie aurait subi une transformation précoce diagenétique spécifique ayant conduit à la formation de composés soufrés. Comme cela sera discuté dans le chapitre II (§I.3), les composés soufrés se forment dans des environnements anoxiques, comme des marais et des marécages, où l'action des bactéries sulfato-réductrices conduit à la formation d'espèces réduites du soufre tels que H₂S et les polysulfures susceptibles de réagir avec la matière organique.

Les différences de composition observées entre les ambres d'Archingeay et de La Buzinie proviendraient ainsi d'une différence d'environnement de dépôt et non pas d'une différence au niveau de la source botanique. L'ambre de La Buzinie proviendrait donc aussi d'une Cupressacée, probablement *Glenrosa* étant donné la présence de nombreux fossiles de cette espèce botanique sur ces deux sites.

III.2.1.1.3. Conclusion

Les ambres de Charente-Maritime présentent une diversité chimique non soupçonnée puisqu'au moins quatre sources botaniques distinctes ont été identifiées alors qu'initialement uniquement deux sources avaient été proposées (Néraudeau et al., 2020b; Nohra et al., 2015).

Si l'étude morphologique des ambres a mené à l'identification de 6 morphotypes, il s'est avéré d'après nos études moléculaires que la diversité était largement surestimée puisque sur les 6 morphotypes proposés dans la littérature, il n'existait en réalité que

3 types chimiques. De plus, il a été mis en évidence qu'au sein de certains morphotypes pouvaient co-exister plusieurs types moléculaires. Ainsi, par exemple, l'ambre caramel d'Archingeay (type 1) et l'ambre de Fouras sont morphologiquement identiques alors que ceux-ci sont très différents d'un point de vue des distributions moléculaires, et proviennent de ce fait de deux familles différentes de conifères. Les études morphologiques des ambres sont donc utiles pour mettre en évidence une variabilité potentielle. En revanche, en l'absence d'analyses moléculaires, il est impossible sur la base de ces critères morphologiques d'être certain que cette variabilité (ou absence de variabilité) puisse être directement corrélée à des origines botaniques distinctes (ou identiques).

Les ambres charentais sont donc dominés par le type moléculaire **Arc 1** (De Lama Valderrama et al., 2022) caractérisé par la prédominance des labdanoïdes, la présence de dérivés de l'acide pimarique/sandaracopimarique ainsi que celle de diterpénoïdes phénoliques (ferruginol (**2**), essentiellement). Ces caractéristiques sont typiques de résines de Cupressacées (Cox et al., 2007 ; Otto et Wilde, 2001 ; Simoneit et al., 2018). Cependant, une certaine variabilité chimique a été observée parmi les ambres de ce type moléculaire. En effet, les ambres de la localité de La Buzinie présentent des diterpènes issus de la sulfuration de l'acide communique (**7**), de l'acide agathique (**6**) et de l'acide sandaracopimarique/isopimarique (**33**)/(**55**). Cette variabilité s'explique donc non pas par des sources botaniques différentes, mais par des milieux de dépôt différents, celui où ont été identifiés les composés organo-soufrés impliquant l'existence de conditions anoxiques et la présence de bactéries sulfato-réducrtices (cf. Chapitre II).

Le type **Arc 2** est caractérisé par la présence exclusive de diterpénoïdes appartenant à la série des labdanoïdes « réguliers ». Les autres acides résiniques tricycliques n'ont pas été détectés. Ce type de composition est très rare dans les résines actuelles, et la plupart des résines de conifères présentent des diterpènes d'autres séries, en plus de ceux pouvant être rattachés aux labdanoïdes.

Il est possible que ce type d'ambre provienne d'une résine d'Araucariacées qui est naturellement riche en labdanoïdes, comme la résine d'*Araucaria araucana* (Chapitre I, **Figure I.25**). En effet, la résine des Araucariacées est riche en labdanoïdes libres, mais aussi en labdanoïdess liés au sein de la composante macromoléculaire de la

résine (Langenheim, 2003, Otto et Wilde, 2001). Il peut de ce fait être envisagé que la contribution des labdanoïdes « libres » dans ce type d'ambre ait été progressivement augmentée par maturation et relargage à partir de la composante macromoléculaire (processus de cracking et/ou d'hydrolyse), ce qui aurait pu masquer la contribution (peut-être minime à l'origine dans la résine) de diterpénoïdes appartenant à d'autres familles. Il pourrait être intéressant d'effectuer des études de maturation artificielle de résines d'*Araucaria* en laboratoire afin de voir s'il est possible d'observer, après chauffage notamment, l'augmentation progressive de la proportion relative des labdanoïdes par rapport aux diterpènes des autres séries.

Le dernier type moléculaire identifié à Archingeay, nommé **Arc 3**, est extrêmement rare et est caractérisé par une contribution comparable de composés apparentés aux séries de l'acide pimarique/sandaracopimarique (**33**)/(**55**), de l'acide abiétique (**8**), et des labdanoïdes. La présence de ces trois familles en quantités similaires est plutôt une caractéristique de résines d'Araucariacées (Chapitre I. I.2.3.1.5). L'ensemble des sites de Charente-Maritime étudiés présentent donc des assemblages d'ambres presque similaires.

L'ambre de Fouras présente, quant à lui, un type moléculaire qui n'a pas été identifié ailleurs. Ce type moléculaire est particulier puisque la résine à l'origine de cet ambre présente à la fois des caractéristiques de résines de Cupressacées, de Pinacées et d'Araucariacées. En effet, la plupart des caractéristiques moléculaires sont typiques de résines de Cupressacées (i.e. présence de diterpénoïdes phénoliques et de labdanoïdes et prédominance de dérivés de l'acide sandaracopimarique/pimarique (**33**)/(**32**). En revanche, ce type d'ambre présente une faible quantité de labdanoïdes, ce qui est rare parmi les résines de Cupressacées. Nous pourrions donc proposer un conifère de la famille des Cheirolepidiacées comme origine botanique possible de la résine qui a conduit à l'ambre de Fouras, ce qui rejoint les hypothèses émises par Nohra et al. (2015).

Cependant, les Cupressacées ne peuvent pas être exclues comme origine botanique, les caractéristiques moléculaires de cet ambre étant compatibles avec les distributions moléculaires de quelques rares résines actuelles de Cupressacées (du genre *Callitris*). Pour conclure, d'après nos travaux portant sur l'analyse d'ambres issus de plusieurs sites du Sud de la France, il devait exister durant le Crétacé un nombre plus important de producteurs de résine que supposés (e.g. Nohra et al., 2015). Il semblerait par ailleurs que la majorité des ambres soit issue de résines produites par une/des Cupressacée(s) et non majoritairement par une/des Cheirolepidiacée(s), comme cela avait été proposé précédemment (Moreau et al., 2017b; Néraudeau et al., 2008; Néraudeau et Moreau, 1989; Perrichot, 2003). Les Cheirolepidiacées sont néanmoins présentes parmi les producteurs de résine ayant conduit à de l'ambre, et peuvent même être les producteurs principaux d'ambre pour certains des sites étudiés, comme celui de Fouras.

III.2.1.2. Les ambres du département de la Vienne (Scorbé-Clairvaux) : des ambres de Cheirolepidiacées

III.2.1.2.1. Contexte de l'étude

Contexte géologique et fossiles associés

Des dépôts d'ambre situés dans la Vienne ont été évoqués pour la première fois par LeTouzé de Longuemar (1866) qui a découvert des petits éclats d'ambre dans les sables à glauconite du Cénomanien situés à proximité de Chincé et Parigny (hameaux de la commune de Jaunay-Clan). Plus tard, Lacroix (1910), dans son inventaire des principaux sites contenant de l'ambre en France, a décrit de l'ambre dans des niveaux de lignite proches de Marigny-Brizay. Lors de l'élaboration des cartes géologiques de la région, Cariou et Joubert (1989) ont suggéré que de l'ambre pourrait être trouvé dans plusieurs niveaux de lignites et niveaux sableux. Les travaux le long des lignes de TGV ont permis de mettre en évidence une partie de ces niveaux contenant effectivement de l'ambre, dont une partie a été collectée ainsi que des fossiles associés (Polette et al., 2019; Valentin et al., 2020, 2014).

Actuellement, deux sites sont connus pour fournir des quantités non négligeables d'ambre et de fossiles : Scorbé-Clairvaux et Châtellerault-La Désirée (Valentin et al., 2020) (**Figure III.16**).

Les niveaux les plus bas contenant de l'ambre sont datés du Cénomanien et sont constitués de lits d'argiles ligniteuses contenant de nombreux méga- et microrestes fossiles. Deux niveaux distincts contenant de l'ambre sont identifiés à Scorbé-Clairvaux. Le premier se trouve dans des niveaux de sables quartziques possédant une matrice calcaire qui sont localement nommés « Grison ». Plus particulièrement, les ambres sont présents dans des lentilles d'argiles noires à la base de la série allant de la base du Cénomanien au Turonien. Ce premier lit fossilifère contient également de nombreux fossiles et est plus particulièrement riche en fossiles de *Frenelopsis,* une Cheirolepidiacée (Schenk, 1869).

Le second niveau contenant de l'ambre est beaucoup plus riche en termes d'ambre et de fossiles et est situé au sein de calcaires marneux associés à un milieu marin. La présence de l'ammonite *Manteliceras lymense* (Spath, 1926) dans ces niveaux permet de les dater du Cénomanien inférieur. La partie supérieure de la série est constituée de grès comprenant des stratifications croisées et de nombreux éléments bioclastiques, indiquant le passage à un milieu marin plus profond.

Les ambres de Scorbé-Clairvaux et de La Désirée ont donc été déposés dans un bassin paralique alimenté par des apports continentaux et marins (Guelorget et Perthuisot, 1992).



Figure III.16. Schéma géologique de la zone de Scorbé-Clairvaux (d'après LeTouzé de Longemer, 1866 et Valentin et al., 2020).

Études précédentes et origines botaniques

Peu d'études ont été réalisées sur les ambres de Scorbé-Clairvaux et Châtellerault-La Désirée, les premiers travaux datant de 2020 (Valentin et al., 2020). Dans cette étude, ces auteurs ont mis en évidence une ressemblance morphologique entre les ambres

de La Désirée et d'autres ambres du Cénomanien, comme les ambres de la Mayenne (Néraudeau et al., 2020) ou de la Sarthe (Breton, 2007; Girard et al., 2013). Ils en ont conclu que ces ambres doivent avoir une origine botanique commune, d'autant plus qu'un même assemblage floristique fossile a été relevé au niveau de ces affleurements.

Une origine à partir de Cheirolepidiacées a ainsi été proposée. Cette hypothèse se base sur l'observation d'un grand nombre de restes fossiles de *Frenelopsis*, qui sont dominants dans les niveaux d'ambre (Valentin et al., 2020). A cet égard, il est à noter que de l'ambre a été observé directement au niveau de conduits résiniques de fossiles de bois de *Frenelopsis* sur les sites de El Soplao (Espagne) et Scorbé-Clairvaux (Gomez et al., 2018 ; Gomez et al., non publié), confortant le fait que cette espèce était bien résinifère.

Présentation des échantillons

Ces travaux se basent sur l'analyse d'échantillons provenant de Scorbé-Clairvaux (collections personnelles de B. Gomez, Université de Lyon). En l'absence d'échantillons accessibles provenant de La Désirée, aucune comparaison n'a été possible entre ces deux sites.

III.2.1.2.2. Résultats et Discussion

Les ambres de Scorbé-Clairvaux analysés présentent tous un cortège moléculaire très similaire dominé par les diterpènes dérivant de la série de l'acide sandaracopimarique/pimarique (33/32) et de l'acide abiétique (8) (Figure III.17), indiguant ainsi une origine à partir de conifères (Langenheim, 2003; Otto et al., 2002). Plus particulièrement, les composés majoritaires sont des hydrocarbures dérivant de l'acide déhydroabiétique (9). La prédominance des composés de cette série est typique des résines de Pinacées et d'Araucariacées (Cox et al., 2007; Otto et Wilde, 2001; Steigenberger, 2013). Par exemple, les résines du genre Abies sont dominées par l'acide abiétique (8) et déhydroabiétique (9) (Chapitre I, Figure 1.10). Cependant, on détecte également dans cet ambre un diterpénoïde phénolique, le sempervirol (45), alors que ces derniers sont plutôt typiques des résines de Cupressacées et de Podocarpacées et sont absents chez les Pinacées et les Araucariacées (Cox et al., 2007; Chapitre I, I.2.3.1.1 et I.2.3.1.5). La présence de diterpénoïdes phénoliques exclut donc a priori les Pinacées et Araucariacées comme espèces végétales productrices de la résine à l'origine de l'ambre de Scorbé-Clairvaux. De plus, les résines de Podocarpacées sont généralement dominées par les diterpénoïdes phénoliques (Cox et al., 2007), ce qui n'est pas le cas ici. Par exemple, la résine d'arbres du genre *Taxodium* est dominée par plusieurs composés phénoliques comme le ferruginol (**2**) et ses dérivés (Chapitre I, **Figure 1.19**, Cox et al., 2007). Cela semble donc exclure une source de type Podocarpacées pour ces ambres.

Pour ces mêmes raisons, il est peu probable que ces ambres proviennent d'une résine de Cupressacées, car celles-ci sont usuellement caractérisées par une faible prépondérance des diterpènes dérivant de la série de l'acide abiétique (**8**) (Otto et al., 2001; Simoneit et al., 2019, 2016; Chapitre I, I.2.3.1.2.), qui sont prédominants dans nos échantillons d'ambre.



Figure III.17. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un échantillon d'ambre de Scorbé-Clairvaux. En vert les diterpènes de la série de l'acide abiétique, en bleu les diterpènes de la série de l'acide (iso)pimarique, en orange les diterpènes phénoliques. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Les ambres de Scorbé-Clairvaux présentent donc des caractéristiques moléculaires à la fois de Cupressacées par la présence de diterpénoïdes phénoliques et de

Pinacées/Araucariacées par l'abondance de diterpènes de la série dérivant de l'acide abiétique (8).

Il est possible que ces ambres dérivent de résines de Cheirolepidiacées, et plus particulièrement appartenant au genre *Frenelopsis* dont des restes fossiles ont été mis au jour en abondance sur le site de Scorbé-Clairvaux.

De plus, comme cela a été mentionné précédemment, les arbres du genre *Frenelopsis* sont susceptibles de produire de la résine, comme l'indique la présence d'ambre localisé dans du bois fossile de *Frenelopsis* (Gomez et al., 2018; Néraudeau et al., 2017). Nous ne connaissons toutefois pas les caractéristiques moléculaires des résines de Cheirolépidiacées puisqu'il s'agit d'une famille éteinte, et que l'ambre localisé sur les fossiles de bois de *Frenelopsis* est précieux et présent en de trop faibles quantités pour en permettre des prélèvements pour analyse moléculaire. Il n'est pas exclu qu'une telle résine puisse présenter des caractéristiques moléculaires différentes de celles des résines des familles de conifères actuelles et compatibles avec celles observées dans le cas des ambres de Scorbé-Clairvaux.

Pour tenter de conforter cette hypothèse, les extraits lipidiques de cuticules fossiles de *Frenelopsis* provenant de sites d'âge crétacé (La Buzinie, Charente-Maritime ; Piolenc, Vaucluse ; Uña, Espagne) et fournies par B. Gomez (Université de Lyon) ont été analysés par GC-MS (**Figure III.18**). Ainsi, cette analyse a permis de mettre en évidence la présence de diterpénoïdes phénoliques (ferruginol (2), totarol (46) et sempervirol (45)) dans les extraits provenant de Piolenc et de Una,confirmant les résultats d'une étude effectuée précédemment par Nguyen Tu et al. (2000). En effet, ces auteurs avaient détecté du ferruginol (2) dans des cuticules de *Frenelopsis* provenant de République tchèque. Une étude similaire a été conduite sur les cuticules de *Frenelopsis* d'El Soplao (Espagne), conduisant aussi à l'identification de ferruginol (2) dans ce matériel fossile (Menor-Salván et al., 2009). Cela confirme donc que *Frenelopsis* était une espèce végétale capable de synthétiser des diterpènes phénoliques.

Cependant, il est à noter que notre analyse des cuticules fossiles de *Frenelopsis* a montré que seuls le sempervirol (**46**) et le totarol (**45**) ont été détectés, alors que les études antérieures avaient mis en évidence uniquement le ferruginol (**2**) (Nguyen Tu et al., 2000) dans ces cuticules. Il est donc possible que les Cheirolepidiacées soient

capables de synthétiser une variété de diterpénoïdes phénoliques. Il est aussi envisageable que des processus diagénétiques dans les sédiments soient capables d'induire des réactions de réarrangement parmi les diterpénoïdes phénoliques, à l'instar de ce qui avait été mis en évidence par Le Métayer et al. (2008).



Figure III.18. Fragmentogramme de masse m/z = 271 de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique dérivé de cuticules fossiles de Frenelopsis provenant du site de Uña (Espagne). En orange sont représentés les diterpénoïdes phénoliques.

Les ambres de Scorbé-Clairvaux présentent donc une distribution moléculaire « chimérique » possédant des caractéristiques moléculaires de résines de Pinacées et d'Araucariacées, avec une abondance marquée de l'acide abiétique (8) et de ses dérivés, mais aussi des caractéristiques de résines de Cupressacées et de Podocarpacées, avec la présence de diterpénoïdes phénoliques. Cet assemblage moléculaire pourrait s'expliquer par l'affiliation de ce type d'ambre avec les Cheirolepidiacées. Étant une famille éteinte sans équivalent actuel, la composition chimique de leur(s) résine(s) n'est pas connue, mais il est à noter que morphologiquement, les Cheirolepidiacées présentent à la fois des caractéristiques d'Araucariacées, de Cupressacées et de Pinacées. Leur appartenance phylogénique est complexe, et cette famille éteinte se rapprocherait aussi bien des Cupressacées que des Araucariacées (Daviero et al., 2001; Gomez et al., 2002; Mendes et al., 2010).

III.2.1.2.3. Conclusion

Les ambres de Scorbé-Clairvaux sont très homogènes d'un point de vue composition moléculaire, et présentent un cortège moléculaire commun aux Cupressacées et aux Pinacées/Araucariacées. L'écrasante prédominance de *Frenelopsis* (une Cheirolepidiacée) dans la flore fossile associée à ce gisement d'ambre semble pointer vers ce type d'origine botanique pour l'ambre. Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi les ambres de Scorbé-Clairvaux présentent les caractéristiques moléculaires de plusieurs familles de conifères actuelles. Les Cheirolepidiacées étant une famille à part, proche des Cupressacées et des Araucariacées, il est donc possible que leur résine partage des caractéristiques moléculaires communes avec les résines de ces deux familles.

III.2.1.3. Les ambres vendéens (La Garnache) : des ambres associés à un contexte de fossilisation particulier

III.2.1.3.1. Contexte de l'étude

Contexte géologique

Les ambres vendéens sont connus depuis les premières descriptions géologiques de l'Ouest français (Cavoleau, 1844; Rivière, 1842, 1840). Cependant, ces ambres sont seulement évoqués et pas vraiment décrits. Ce n'est qu'en 2002 qu'ils ont été décrits suite à la découverte d'un ensemble de pièces d'ambre près du village de La Garnache (Vendée) lors de la construction de la route départementale D32 entre La Garnache et Challans (Néraudeau et al., 2017).

Deux zones d'affleurement contenant de l'ambre sont proches de La Garnache et ont été nommés « La Garnache 1 » et « La Garnache 2 ».

« La Garnache 1 » est un affleurement constitué d'argiles grises et de lentilles de lignite contenant des morceaux d'ambre millimétriques à centimétriques ainsi que du bois fossile (Anfray, 2004).

Entre 2005 et 2014, de nouvelles fouilles ont permis l'étude plus en détail de cet affleurement et ont conduit à la mise à nu d'un second affleurement « La Garnache 2 » une centaine de mètres plus loin (Néraudeau et al., 2017).

Les niveaux des deux séries appartiennent au bassin de Challans dont la ville homonyme est située à une dizaine de kilomètres de La Garnache. Les unités du bassin de Challans ont été estimées être d'âge crétacé (Rivière, 1842, 1840). Des niveaux similaires à ceux de La Garnache, nommés « Argiles à Lignites et sperkise » par Rivière (1942), y ont été décrits. Ces niveaux sont datés du Cénomanien supérieur (Viaud, 1981). Par-dessus ces niveaux, des argiles noires du Turonien sont visibles au sud de Challand et à La Robinière, qui sont très proches géographiquement de La Garnache (Ters et Viaud, 1983). L'ensemble des datations de ces niveaux a été réalisé à partir d'analyses palynologiques (Azéma et al., 1972 ; Durand et al., 1963; Durand et Ters, 1958) et paléontologiques (Azéma et al., 1981; Azéma et Viaud, 1979).

Les niveaux contenant de l'ambre à La Garnache se corrèlent difficilement parmi les niveaux de la série de Challans. En effet, le matériel a été récolté majoritairement durant les années 2002 et 2003 et reste limité. Il est donc difficile de réaliser une datation biostratigraphique sur le matériel obtenu (Néraudeau et al., 2017). Le seul moyen d'estimer l'âge des sédiments de la Garnache est donc par corrélation horizontale, ce qui donnerait un âge autour du Cénomanien (Rivière 1842, 1840). Des cartes plus récentes donneraient cependant plutôt un âge Turonien ou Santonien (93 Ma à 84 Ma) aux sédiments de La Garnache (Ters et Viaud, 1983).

Une faille sépare les sites de La Garnache 1 et 2. Il est donc peu probable que les sites soient donc contemporains. De plus, il apparaît que les sédiments des deux sites ne soient pas constitués des mêmes espèces, confirmant ainsi cette hypothèse (Néraudeau et al., 2017). Il est donc supposé que les sédiments de La Garnache 2 soient plus anciens que ceux de La Garnache 1 et soient estimés être datés du Cénomanien inférieur (100,5 à 93,9 Ma). A ce jour, aucun ambre provenant de La Garnache 2 n'a été décrit.

Paléoenvironnement

Les analyses palynologiques des sédiments de la Garnache 1 montrent un assemblage relativement peu riche, avec environ 70 palynomorphes identifiés
(Néraudeau et al., 2017), contenant en majorité des pollen de *Classopollis*, un genre de pollen qui est usuellement associé aux Cheirolepidiacées. Cependant, d'autres types de pollen associés à d'autres familles de conifères ont aussi été mis en évidence, ainsi que des pollens d'Angiospermes. Il est à noter, cependant, que peu de spores ont été identifiées, laissant penser que les monilophytes étaient peu présents dans l'environnement. L'étude des micro-inclusions dans l'ambre de La Garnache 1 montre cependant une grande diversité d'arthropodes et de micro-organismes tels que les algues et les champignons (Néraudeau et al., 2017).

Dans les niveaux de lignite de La Garnache 1, plusieurs espèces de bois fossile ont été décrites (Néraudeau et al., 2017). Le premier morphotype de bois, contenant des canaux résinifères, présente des caractéristiques proches des bois de Pinacées et montre des affinités avec les genres Pinuxylon Gothan, Pinoxylon Knowlton ou Pinites Lindley et Hutton (Néraudeau et al., 2017). Le second morphotype correspond à un bois homoxylé sans canaux résiniques s.s. mais avec des canaux traumatiques. L'ensemble des caractéristiques de ce bois laisse supposer une filiation avec le genre Taxodioxylon Hartig (Néraudeau et al., 2017). Le troisième morphotype, majoritaire dans les sédiments, a une origine incertaine. Celui-ci possède des canaux résiniques parfois remplis de matériel résinique (ambre) et présente des oculipores typiques des Cupressacées. Cependant, le bois étudié semble aussi présenter des caractéristiques de Podocarpacées au niveau de son parenchyme axial (Néraudeau et al., 2017). Enfin, l'aspect des rayons du bois est très similaire à ceux des bois d'Angiospermes homoxylés. Ce morphotype présente donc une structure avec des caractéristiques trouvées chez certains conifères (Cupressacées/Podocarpacées) et chez des Angiospermes (Néraudeau et al., 2017).

Études précédentes et origines associées

Au niveau du site de La Garnache 1, plus de 5000 morceaux d'ambre ont été récoltés, leur taille moyenne étant de 5 mm environ. La couleur des échantillons est relativement homogène, et tend vers le jaune orangé.

Les analyses du bois et des fossiles associés laissent penser que les ambres vendéens proviendraient d'une source botanique de type Pinacées ou Taxodiacées (Cupressacées *s.l.*), même s'il ne peut pas être exclu que le troisième morphotype de bois d'origine incertaine soit en partie à l'origine de l'ambre (Néraudeau et al., 2017).

Des analyses chimiques ont été réalisées sur quelques échantillons par Nohra et al. (2015). Les analyses en spectroscopie infrarouge laissent penser à une origine de Cupressacées et/ou d'Araucariacées et ces résultats semblent confirmés par des analyses en résonance magnétique (Nohra et al., 2015). Finalement, les résultats en thermochemolyse-GC-MS (Nohra et al., 2015) montrent que les ambres vendéens appartiennent à la classe lb (Anderson et al., 1992), indiquant qu'il sont issus de conifères. De plus, l'analyse a révélé la présence de diterpènes de la série de l'abiétane (**70**). Suite à cette étude, les Cupressacées ont été proposées comme source botanique possible malgré l'absence de biomarqueurs robustes de Cupressacées comme peuvent l'être le cuparène (**5**) ou le cédrane (**60**) (Nohra et al., 2015).

Présentation des échantillons

Les échantillons analysés proviennent des collections de D. Néraudeau (Université de Rennes) et sont issus de la première campagne de collecte au niveau du site de La Garnache 1.

III.2.1.3.2. Résultats et Discussion

Les ambres provenant de La Garnache présentent une distribution moléculaire qui comprend quelques diterpénoïdes de la série de l'acide abiétique (8) (Figure III.19), mais qui est dominée par les diterpènes de la série de l'acide (iso)pimarique (32)/(55) (Figure III.19), qui comprend également des composés soufrés dont l'identification est présentée dans le Chapitre II. Ces composés soufrés sont, en effet, les composés majeurs de l'ambre de La Garnache (Figure II.19). Parmi ces composés, on observe, notamment le composé (49) provenant de la sulfuration de l'acide isopimarique (55) et/ou sandaracopimarique (33) (Lenen et al., 2023).



Figure III.19. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre de La Garnache. En vert, les diterpènes de la série de l'acide abiétique, en bleu, les diterpènes de la série de l'acide (iso)pimarique, en orange, les diterpénoïdes phénoliques. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Cependant, il est à noter qu'une grande partie des composés soufrés présents dans les sédiments de La Garnache n'ont pas pu être complètement identifiés sur la seule base de la spectrométrie de masse, rendant ainsi difficile l'affiliation botanique de cet ambre. Il est possible, en effet, que certaines familles de diterpénoïdes ne soient présentes dans l'ambre de La Garnache que sous forme de composés dont la structure n'a pas été élucidée. Ces diterpénoïdes n'ont, de ce fait, pas été pris en compte pour la détermination de l'origine botanique de cet ambre.

La présence de ferruginol (2) semble toutefois pointer vers une origine botanique telle que les Cupressacées ou les Podocarpacées (Cox et al., 2007; Simoneit et al., 2018). La faible quantité de diterpénoïdes phénoliques laisse plutôt penser à une origine de type Cupressacées car ces composés sont généralement prédominants dans les résines de Podocarpacées (Cox et al., 2007; Chapitre I, I.2.3.1.4). De plus, l'abondance des composés dérivant de l'acide (iso)pimarique (32)/(55) appuie cette hypothèse (Cox et al., 2007, Otto et Wilde, 2001).

Par exemple, la résine de *C. lawsoniana* est dominée par les dérivés de l'acide (iso)pimarique (**32**)/(**55**) et comprend aussi du ferruginol (**2**) en quantités non négligeables (Chapitre I, Otto et Wilde, 2001, **Figure I. 17**), à l'instar de l'échantillon d'ambre de La Garnache.

Cependant, on pourrait proposer, étant donné la quantité non négligeable (mais pas pré-pondérente) d'acide déhydroabiétique (9) et de ses dérivés présents dans l'ambre de La Garnache, que cet ambre puisse provenir d'une résine de Cheirolepidiacées. En effet, comme cela a été discuté précédemment (§ III.2.1), les ambres de Cheirolepidiacées sont supposées partager des caractéristiques moléculaires avec les résines de Cupressacées actuelles (e.g. présence de phénols diterpéniques), mais doivent également présenter une contribution significative de dérivés de l'acide abiétique (8)/déhydroabiétique (9). Une telle hypothèse serait d'ailleurs cohérente avec l'abondance des pollens de Cheirolepidiacées sur le site de La Garnache (Néraudeau et al., 2017). La contribution de dérivés d'acide déhydroabiétique (9) reste toutefois relativement discrète par rapport aux exemples d'ambres provenant de sites où dominent les restes fossiles de Cheirolépidiacées comme l'ambre de Scorbé-Clairvaux (§III.1.2). D'autre part, la présence d'acide callitrisique (1) en petites quantités irait plutôt dans le sens d'une origine de Cupressacées, comme cela a été proposé pour l'ambre de Piolenc (Lenen et al., 2023), et ceci bien que des marqueurs caractéristiques de Cupressacées comme le cédrène (59) ou le cuparène (5) n'aient pas été détectés.

III.2.1.3.3. Conclusion

Les ambres de La Garnache présentent une homogénéité moléculaire indiquant une origine botanique commune pour l'ensemble des échantillons analysés. La présence de ferruginol (2) et l'abondance des diterpènes de la série de l'acide pimarique (32)/isopimarique (55) semblent indiquer comme source une Cupressacée ou, dans une moindre mesure, une Cheirolepidiacée. Cette conclusion rejoint celles d'études précédentes (Néraudeau et al., 2017; Nohra et al., 2015).

De plus, l'identification de composés soufrés (Chapitre II) met en évidence que l'ambre de La Garnache a été fossilisé dans un contexte anoxique, probablement dans un environnement de type marécage ou mangrove.

III.2.1.4. Les ambres de la Sarthe/Anjou (Le Brouillard)

III.2.1.4.1. Contexte de l'étude

Contexte géologique et paléoenvironnemental

Les ambres d'Anjou, malgré une découverte dès le début du XX^{ème} siècle, n'ont été que relativement peu étudiés. Les premières descriptions des ambres d'Anjou ont été réalisées par Couffon et Dollfus (1928). Ces auteurs ont décrit un ensemble d'affleurements où de l'ambre a été collecté et ont constitué une première collection conservée au musée d'Angers. Actuellement, seule la carrière située sur la commune d'Ecouflant (carrière du Brouillard) est encore accessible. Celle-ci est située à 8 km au nord d'Angers. L'affleurement est constitué d'une alternance épaisse de niveaux sableux et de niveaux de lignite. Ces niveaux sont classés dans la formation des Argiles du Baugeois (Couffon et Dollfus, 1928). La série est divisée en 3 unités et 24 niveaux sédimentaires (Duplessis, 2006; Néraudeau et al., 2013). La base de la série (unité A) concentre des faciès silicoclastiques sans glauconite, ni fossiles marins, contenant des niveaux à sables et à argiles noires. Cette unité contient des ambres et des cuticules fossiles et est constituée de 11 niveaux. L'unité B, au milieu de la série, est composée de silts glauconieux sans microfossiles, ambres et cuticules. L'unité C, en haut de la série, est constituée de marnes avec des niveaux plus calcaires contenant des microfossiles marins.

Associés aux ambres, des cuticules et bois fossiles ont également été trouvés. Les plantes principales associées sont *Ginkgoxylon gruetti*, une Ginkgoale (Pons et Vozenin-Serra, 1992). Des bois fossiles de conifères appartenant aux Araucariacées, aux Cheirolepidiacées (*Frenelopsis alata, Brachyphyllum* sp.) et aux Cupressacées ont aussi été identifiés (Azemard, 1979; Berthelin et Pons, 1999; Pons, 1979; Pons et al., 1980).

Les lignites ambrifères ont été datés du Cénomanien inférieur en raison de leur contact avec des couches jurassiques (Couffon, 1936, 1934). L'ensemble des couches

marquent une transgression marine, l'unité A contenant l'ambre étant plutôt continentale tandis que les séries B et C sont plutôt à dominante marine avec l'apparition progressive de fossiles marins.

Études précédentes et origines botaniques

Néraudeau et al. (2013), lors de leur synthèse sur l'ensemble des fossiles du site, ont proposé comme origine botanique une Cheirolepidiacée (*Frenelopsis alata*) ou une Ginkgoale (*Nehvizdya andegavense*) en se basant sur le fait que ce sont les plantes majoritaires identifiées sur ce site. Nohra et al. (2015) ont analysé un échantillon de l'ambre d'Anjou et il a été mis en évidence que les ambres d'Anjou présentent des similarités moléculaires avec les ambres cénomaniens alpins, pyrénéens et charentais. Plus particulièrement, les ambres d'Anjou présentent des similitudes moléculaires avec les ambres charentais, à l'exception de l'absence de terpénoïdes phénoliques dans les échantillons d'Anjou. Malgré cette absence, Nohra et al. (2015) ont émis l'hypothèse d'une origine botanique parmi les Cupressacées. Ils n'ont cependant pas exclu l'hypothèse d'une source botanique parmi les Araucariacées et les Cheirolepidiacées, les fossiles de ces familles étant dominants dans les niveaux où de l'ambre a été trouvé.

III.2.1.4.2. Résultats et Discussion

Les ambres provenant de la carrière du Brouillard présentent une distribution moléculaire dominée par les diterpènes tricycliques appartenant à la série dérivant de l'acide pimarique/isopimarique (e.g. (18), (43), (55) ; Figure III.20), indiquant ainsi une origine botanique parmi les conifères. Des sesquiterpènes sont présents en grandes quantités dans l'échantillon dont le chromatogramme en phase gazeuse est présenté en Figure III.20.

La prédominance de la série des diterpènes dérivant de l'acide (iso)pimarique (**32**)/(**55**) (**Figure III.20**) est une caractéristique moléculaire typique des conifères, et plus particulièrement des Pinacées et des Cupressacées (Cox et al., 2007; Langenheim, 2003). Cependant, il est à noter que chez les Pinacées et les Cupressacées, cette prédominance s'accompagne souvent d'une co-dominance des composés de la série

de l'acide abiétique (8) (Chapitre I §I.2.3, Cox et al., 2007; Otto et al., 2007; Simoneit et al., 2019, 2018).



Figure III.20. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre provenant de la carrière du Brouillard (collection D. Néraudeau). En bleu les diterpènes de la série de l'acide pimarique. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Cependant, dans l'échantillon décrit ici, aucun composé de cette série n'a été identifié, ce qui semble écarter une origine parmi les Pinacées, les résines de Pinacées étant souvent dominées par les diterpénoïdes de la série de l'acide abiétique (8). Par exemple, la résine d'*Abies alba* (Chapitre I, **Figure I.10**) est dominée par l'acide déhydroabiétique (9) et les dérivés appartenant à cette même série.

L'échantillon présente donc des caractéristiques moléculaires très particulières, réduites à un nombre limité de familles moléculaires, rendant difficile la détermination de l'origine botanique puisque celui-ci est dominé par des diterpénoïdes de la série de l'acide (iso)pimarique et par des labdanoïdes, mais ne présente aucun composé d'une autre série diterpénique.

Cependant, la présence du cédrane (**60**) (Grantham et Douglas, 1980) semble plutôt pointer vers une origine de Cupressacées. En effet, ce composé peut être considéré comme un biomarqueur typique de cette famille (Grantham et Douglas, 1980 ; Philp,

1985; Otto et Wilde, 2001). Cette hypothèse est cohérente avec les données paléontologiques et les études précédentes qui avaient conduit à conclure qu'une origine parmi les Cupressacées était vraisemblable. En effet, certaines résines de Cupressacées sont largement dominées par les composés de la série de l'acide (iso)pimarique. Par exemple, la résine de *Chamaecyparis lawsoniana* est largement dominée par les dérivés des acides sandaracopimarique (**33**), pimarique (**32**) et isopimarique (**55**) (Chapitre I, **Figure 1.17**). Il est possible que la résine à l'origine de l'ambre de la carrière du Brouillard ait été constituée majoritairement des composés de cette série ainsi que d'un labdanoïde, à l'instar de la résine de *C. lawsoniana*. Cependant, il est à noter que la majorité des résines de Cupressacées présentent des diterpénoïdes phénoliques, absents dans cet échantillon.

II.2.1.4.3. Conclusion

Les ambres provenant de la carrière du Brouillard présentent une distribution moléculaire homogène largement dominée par les dérivés de l'acide pimarique/sandaracopimarique/isopimarique. Cette prédominance est visible surtout dans les résines de Cupressacées. La présence de cédrane (**60**) vient encore conforter cette hypothèse, malgré l'absence de diterpénoïdes phénoliques. Nos conclusions concordent donc avec celles des études précédentes concernant l'ambre de ce site (Duplessis, 2006; Néraudeau et al., 2013 ; Nohra et al., 2015).

III.2.2. Les ambres pyrénéo-provençaux français

III.2.2.1. Les ambres des Landes (Saint-Lon-Les-Mines)

III.2.2.1.1. Contexte de l'étude

Contexte géologique et paléontologique

Le gisement de Saint-Lon-Les-Mines est connu depuis l'Aurignacien (-40000 ans) puisque des parures en ambre et jais ont été mises au jour à Isturitz (Pays basque français) (White et Normand, 2015). Ce site est donc considéré comme l'une des plus anciennes mines d'Europe exploitées par l'Homme pour son lignite et son charbon. Les premières traces écrites datent du XVIII^{ème} siècle et proviennent du savant Borda

d'Oro qui a visité la zone en 1771. Il a décrit ainsi que « la mine de charbon était dans un état remarquable. Le charbon brûlait du feu que lui avaient communiqué les pyrites allumées par le contact de l'eau répandue dans l'atmosphère » (Casse, 2014). Ainsi, dès le XVIII^{ème} siècle, la mine est décrite comme contenant une grande quantité de charbon et de lignite associé à de la pyrite (FeS₂). La pyrite est recherchée d'un point de vue industriel, car celle-ci peut être décomposée en sulfate de fer, oxyde de fer et sulfate de calcium. Cette décomposition cependant est spontanée et exothermique. Celle-ci libère de grandes quantités de chaleur (jusqu'à 500 °C) pouvant enflammer le lignite l'entourant. C'est cette particularité qui a rendu l'exploitation de la mine difficile, le lignite pouvant prendre feu lors de l'exploitation. À partir de 1838, l'exploitation de la mine a été épisodique jusqu'en 1916, où l'exploitation reprendra pour soutenir les besoins dus aux différentes guerres. En 1945, la mine a pris feu suite à des actes de résistance, signant ainsi l'arrêt progressif de son exploitation (Casse, 2014).

La mine de lignite se place au sein de marnes et argiles du Crétacé inférieur (Albien) (Burger et Cuvillier, 1946; Delbos, 1854; Dupouy-Camet, 1947). La zone de Saint-Lon-Les-Mines est caractérisée par un anticlinal culminant dont les strates supérieures datent du Cénomanien terminal (c.-à-d. étage postérieur à l'Albien). La base de la série contenant du lignite est constituée de calcaires contemporains à la transgression marine s'étendant sur toute la partie méridionale du territoire. Ces calcaires sont associés à des fossiles d'algues, de polypiers et de spicules d'éponge caractérisant un environnement de type marin peu profond (notice de la carte géologique de Saint-Vincent-de-Tyrosse par Kieken et al. ,1975).

La partie supérieure de la série, datée de l'Albien supérieur, correspond à des faciès marins plus profonds dont certains secteurs sont soumis à des émersions épisodiques où se déposent les argiles et les bancs de lignite. Le caractère sporadique des émersions explique la conservation du lignite et l'anoxie des sédiments attestée par la présence de pyrite. Les sédiments entourant ces dépôts de lignite ont tout d'abord été datés du Crétacé inférieur (Delbos, 1854), mais la présence du gastéropode *Glauconia cureti* et du mollusque *Exogyra flabellata* dans les déblais miniers a placé ceux-ci dans l'Albien (notice de la carte géologique de Saint-Vincent-de-Tyrosse par Kieken et al.,1975).

Le paléoenvironnement durant l'Albien devait donc être une immense lagune plus ou moins profonde, selon les zones, et possédant des zones marécageuses, où se déposaient les différents débris végétaux et la résine dans des conditions anoxiques.

Le climat devait être tropical (Burger et Cuvillier, 1946 ; Casse, 2014 ; Kieken et al., 1975).

Études précédentes et origines botaniques

A notre connaissance, la seule étude géochimique effectuée sur les ambres de Saint-Lon-Les-Mines a été réalisée par White et Normand (2015) afin de déterminer si l'ambre trouvé dans les grottes d'Isturitz provenait de Saint-Lon-Les-Mines. L'étude par GC-MS et spectroscopie infra-rouge (Rosa, 2007, Rapport non publié) a montré l'absence de succinates dans les ambres de la grotte d'Isturitz, ce qui a donc permis de conclure que l'ambre archéologique ne provenait pas de la Baltique mais présentait une importante ressemblance avec les ambres trouvés dans le gisement de Saint-Lon-Les-Mines. Cependant, Rosa (2007) a noté dans son rapport qu'outre une ressemblance avec l'ambre de Saint-Lon-Les-Mines, les ambres archéologiques présentaient également des ressemblances avec des ambres crétacés espagnols de la Peñacerrada. Elle en a conclu que l'origine botanique de l'ambre de Saint-Lon-Les-Mines devait être similaire à ce type d'ambre espagnol et a proposé le genre *Araucaria* en tant que possible source botanique.

Présentation des échantillons

Les échantillons de Saint-Lon-Les-Mines, dont l'analyse est présentée dans cette partie, proviennent de deux sources. Une partie des échantillons provient du musée de Minéralogie de Strasbourg et ont été fournis sous la forme de grains d'ambre dans une matrice de lignite. Une autre partie des échantillons provient de la collection personnelle d'ambre de C. Normand (Université Paul Sabatier de Toulouse) qui a fourni des échantillons d'ambre sans matrice.

III.2.2.1.2. Résultats et Discussion

L'ensemble des échantillons analysés présente des distributions moléculaires similaires, indiquant une origine botanique commune. Ces distributions sont uniquement constituées de labdanoïdes (Figure III.21). Les composés principaux sont l'ambérène (11) (Figure III.21) et ses dérivés (10), (25), (26) et (62). Le kujigamberol (28) et des dérivés de l'acide communique (14), (15) et (16) sont aussi présents en quantités significatives.

Les structures des composés principaux dérivant de l'ambérène (11) ont été proposées par Menor-Salván et al. (2016) à partir d'un des types d'ambre espagnol de la Peñacerrada (présenté dans le paragraphe III.3). La présence du composé (17), alors que le composé (19) est absent, indique que l'ensemble des labdanoïdes présents appartient à la série « régulière » associée à une origine à partir de conifères et non d'Angiospermes, comme cela a été discuté en détail précédemment (III.2.1.1), Ce type de distribution moléculaire dominée très largement par les labdanoïdes ressemble fortement à celle des ambres **Arc 2** décrit dans le paragraphe dédié aux ambres d'Archingeay (section III.2.1.1 et **Figure II.8**). L'hypothèse la plus raisonnable serait donc que l'origine botanique de ces deux types d'ambre soit très proche, voire identique, et pointe vers une source de type Araucariacée.

III.2.2.1.3. Conclusion

Les différents échantillons d'ambre de Saint-Lon-Les-Mines présentent des distributions moléculaires similaires. Celles-ci sont dominées par les labdanoïdes, à l'instar des ambres du type moléculaire **Arc 2** d'Archingeay. L'arbre producteur de la résine à l'origine de ce type d'ambre serait une Araucariacée, dont la résine était particulièrement dominée par des diterpénoïdes appartenant aux labdanoïdes. L'écart d'âge entre les ambres d'Archingeay et les ambres de Saint-Lon-Les-Mines est relativement faible puisque les premiers ont été datés du Cénomanien inférieur tandis que les autres sont datés de l'Albien supérieur. Cet écart correspond à quelques centaines de milliers d'années. Les arbres producteurs des résines à l'origine de cet ambre appartiennent donc vraisemblablement à une famille identique, voire à un genre identique, mais il n'est pas sûr que l'espèce soit la même.

Cependant, il est à noter que tous les ambres de Saint-Lon-Les-Mines que nous avons analysés appartiennent à ce type moléculaire, contrairement aux ambres d'Archingeay qui présentent des types moléculaires plus diversifiés. Il est donc possible que la source botanique à l'origine de l'ambre de Saint-Lon-Les-Mines était un producteur de résine dominant dans ce qui correspond actuellement aux Landes, alors qu'en Charente-Maritime, ce producteur devait être minoritaire. Il est aussi possible que l'arbre producteur était prédominant durant l'Albien et que celui-ci ait été remplacé durant le Cénomanien par une/des Cupressacée(s) produisant de la résine. Il est aussi possible qu'une différence de climat entre les deux périodes ait entraîné un changement floristique.

III.2.2.2. Les ambres d'Ariège (Mas d'Azil, Sainte-Croix et Montbrun)

III.2.2.2.1. Contexte de l'étude

Lors de fouilles visant à identifier les gisements paléontologiques régionaux dans le cadre de l'activité de la Société paléontologique de Plantaurel, G. Breton et ses collègues ont identifié des ambres dans des affleurements proches de la grotte du Mas d'Azil (Ariège), connue pour avoir abrité différentes populations durant l'époque magdalénienne (cf. Chapitre V) (Breton et al., 2013). Ultérieurement, F. Loiret a également mis en évidence de l'ambre à Sainte-Croix, un site localisé à quelques kilomètres de ce premier site de découverte d'ambre proche du Mas d'Azil (F. Loiret, communication personnelle).

Contexte géologique

Les sites du Mas d'Azil et de Sainte-Croix sont situés dans les chaînons sous-Pyrénéens du Plantaurel et des Petites Pyrénées. La formation associée au Mas d'Azil est nommée « formation terrigène des Grès de Labarre » et est constituée d'un ensemble de dépôts deltaïques avec une forte influence du milieu continental. Ce système, qui a été mis en place lors du Campanien, a progradé vers l'ouest lors de l'émersion des régions orientales (Breton et al., 2013). La série est divisée en 10 niveaux de grès et/ou d'argiles noires. Au sein de cette série, la datation est difficile du fait de l'absence de fossiles marqueurs chronologiques comme des biostratigraphiques ou de la glauconite. Les données utilisées pour la datation sont basées sur les assemblages palynologiques et floristiques (Breton et al., 2013; Legroux, 1979). Ces études ont mis en évidence que les débris de végétaux et les microrestes représentaient plus de 15% du résidu organique des argiles du Mas d'Azil. L'association palynologique laisse penser que ces dépôts proviennent du Crétacé supérieur, et plus précisément du Campanien supérieur.

Les échantillons d'ambre et les restes de végétaux fossiles sont concentrées dans ces strates argileuses et plus particulièrement dans le niveau 6 constitué d'argiles

sableuses noires (Breton et al., 2013). La taille des ambres reste modérée et le plus gros morceau récolté par Breton et al. (2013) fait une taille de 17 mm.

Études précédentes et origine botanique proposée

Les sites du Mas d'Azil et de Sainte-Croix n'ayant été découverts que relativement tardivement, il n'existe que peu d'études sur l'origine de l'ambre. Breton et al. (2013), lors de l'étude des micro-inclusions dans les ambres du Mas d'Azil, ont identifié du bois fossile du genre *Cupressinoxylon* Göppert associé à ces ambres. Ce genre botanique est affilié aux Cupressacées *s.l.* (c.-à-d. incluant les Taxodiacées).

Il a été proposé, étant donné la proximité de l'ambre avec ce bois fossile, qu'une Cupressacées soit à l'origine de l'ambre du Mas d'Azil, dans la mesure où l'analyse morphologique des ambres a démontré que ceux-ci n'avaient été que très peu transportés (fossilisation *in situ*; Breton et al., 2013).

Présentation des échantillons

L'analyse d'ambres provenant de trois sites est présenté dans cette partie. Un premier lot provenant du Mas d'Azil a été fourni par le Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris. Un second lot fourni par F. Loiret comprend un ensemble d'ambre provenant des sites de Montbrun et de Sainte-Croix.

III.2.2.2.2. Résultats et Discussion

L'analyse de l'ensemble des échantillons a permis de mettre en évidence une hétérogénéité de composition selon l'origine géographique des ambres. En effet, comme l'illustre la **Figure III.21**, les ambres du Mas d'Azil présentent une distribution moléculaire distincte de celles des ambres de Montbrun ou de Sainte-Croix. Les distributions moléculaires des ambres de Sainte-Croix et Montbrun présentent quant à elles des analogies (**Figure III.21**).



Figure III.21. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé des échantillons d'ambre provenant de A) Mas d'Azil (Museum National d'Histoire Naturelle de Paris), B) Montbrun (coll. F. Loiret), C) Sainte-Croix (coll. F. Loiret).

Caractérisation moléculaire des ambres du Mas d'Azil

L'ambre du Mas d'Azil présente une distribution moléculaire dominée par les labdanoïdes (**Figure III.22**). Plus particulièrement, cette distribution est dominée par l'ambérène (**11**) et ses dérivés identifiés pour la première fois dans des ambres espagnols (Menor-Salván et al., 2016). Associés à ceux-ci, des composés organiques soufrés décrits dans le **Chapitre IV**, et provenant principalement de la sulfuration de labdanoïdes, sont visibles en tant que composés majoritaires (cercles noirs et (**50**)/(**50**') - un isomère de (**50**)-, (**51**)). Les composés (**11**), (**25**), (**26**) et (**27**)/(**27**') (**Figure III.22**) sont communs avec ceux présents dans les extraits d'ambre issu de Saint-Lon-Les-Mines et d'Archingeay **Arc 2**.

Il est aussi à noter que les ambres provenant du Mas d'Azil, contrairement aux ambres de Saint-Lon-Les-Mines, contiennent de grandes quantités des composés soufrés provenant de labdanoïdes (cf. **Chapitre II**).



Figure III.22. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre provenant du Mas d'Azil (collection du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris). En violet sont représentés les labdanoïdes et en bleu les dérivés en série (iso)pimarique. Les cercles noirs représentent des composés organiques soufrés dont la structure n'a pas été déterminée. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Ici, la résine dont est issu cet ambre devait donc être dominée par des labdanoïdes. Ce type de distribution moléculaire est compatible avec celui de résines de Cupressacées et d'Araucariacées. Par exemple, la distribution des diterpènes de la résine de *Cupressus arizonica* (Cupressacée) est dominée par l'acide communique (7) et l'acide isopimarique (55) (Chapitre I ; Figure I.15). A l'instar de l'échantillon présenté en figure III.22, la résine de *Cupressus arizonica* ne contient pas de composés dérivant de l'acide abiétique (8). Cependant, il est à noter que l'ensemble des résines de Cupressacées étudiées présentent très souvent des diterpènes phénoliques alors que ceux-ci sont absents des extraits d'ambre du Mas d'Azil. En l'absence de ces composés ou de biomarqueurs typiques des Cupressacées, il est difficile de conclure que cette famille botanique est à l'origine de l'ambre du Mas d'Azil. De plus, comme cela a été discuté auparavant, l'abondance des labdanoïdes est aussi une caractéristique chimique des résines d'Araucariacées. L'hypothèse la plus vraisemblable serait donc que l'ambre du Mas d'Azil soit issu d'une résine d'Araucariacées.

Caractérisation moléculaire des ambres de Montbrun et de Sainte-Croix

Les ambres provenant de Montbrun et de Sainte-Croix présentent des distributions moléculaires très similaires dominées par les labdanoïdes dérivant de l'ambérène (11) dont le 4-méthylambérène (64) qui est le composé majeur dans cet ambre (Figure II.23). Associés à ces composés, des labdanoïdes soufrés ((50/50'), (51), (53), (54), (65), (66), (67) ; Chapitre II, II.4) ont également été détectés. Une partie de ces composés avaient déjà été mis en évidence dans les ambres du Mas d'Azil (Figure II.22).



Figure II.23. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un échantillon d'ambre provenant de Montbrun (collection personnelle de F. Loiret). En violet sont représentés les labdanoïdes. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Cependant, les composés (65), (66), (67) et (68) ([M⁺°] à *m*/z 302 ; structure inconnue) ne sont pas présents dans l'ambre du Mas d'Azil et sont propres aux ambres de Montbrun et de Sainte-Croix (Figure III.23). Les ambres de Montbrun et de Sainte-Croix présentent aussi une prédominance du 4-méthylambérène (64), qui n'est présent qu'en traces au Mas d'Azil. Il semblerait donc que les résines à l'origine des ambres de Montbrun et de Sainte-Croix présentent des labdanoïdes ne portant pas de fonction

acide en C-4 sur le cycle A contrairement aux labdanoïdes plus classiques. Cette caractéristique semble propre à ces ambres.

La résine à l'origine de ces ambres présente donc une prédominance des composés de type labdanoïdes dérivant de l'acide communique (**7**) et de labdanoïdes ne présentant pas d'acide carboxylique sur le cycle A.

Il est cependant possible que la résine à l'origine de ces ambres soit relativement proche de celle à l'origine des ambres du Mas d'Azil et de Saint-Ion-Les-Mines, et devait appartenir aux Araucariacées.

En effet, comme cela a été discuté auparavant, la prédominance des composés dérivant des labdanoïdes est communément observée dans les résines de cette famille (Cox et al., 2007; Langenheim, 2003, chapitre I, I.2.3.1.5). Cependant, l'absence des autres familles de diterpènes est relativement rare parmi les résines de cette famille.

III.2.2.2.3. Conclusion

Les ambres du Mas d'Azil, de Montbrun et de Sainte-Croix présentent tous des distributions moléculaires dominées par des labdanoïdes. L'absence de biomarqueurs caractéristiques des Cupressacées tels que les diterpénoïdes phénoliques, le cédrane (60) et le cuparène (5) semble exclure cette famille de producteurs potentiels. L'abondance des labdanoïdes étant une caractéristique des Araucariacées, nous proposons que les producteurs des résines à l'origine de ces ambres fassent partie cette famille de conifères. Il est à noter cependant que les ambres du Mas d'Azil et de Montbrun/Sainte-Croix se distinguent clairement entre eux au niveau moléculaire. Les ambres de Montbrun/Sainte-Croix présentent en effet des labdanoïdes ne portant pas de fonction acide en C-4 sur leur cycle A mais un groupe méthyle, composés qui sont absents des ambres du Mas d'Azil. L'ensemble de ces ambres contient des composés soufrés, indiquant des conditions de fossilisation similaires (i.e. conditions anoxiques, dans des milieux de type marécage ou mangrove). Les différences moléculaires ne semblent donc pas liées à des différences de fossilisation. L'hypothèse la plus raisonnable serait donc qu'il existe au moins deux sources botaniques distinctes faisant partie de la famille des Araucariacées pour les ambres de ces sites.

III.2.2.3. Les ambres provençaux (Salignac, La Bouilladisse et Piolenc)

Les premières mentions d'ambre en Provence datent du milieu du XVIII^{ème} siècle (p. ex. Lavoisier, 1765). Lacroix (1910), lors de son inventaire des ambres français, évoque plusieurs sites en Provence contenant de l'ambre. Souvent mentionnés dans les travaux liés à l'étude des inclusions insectifères (p. ex. Nel et al., 2004 ; Perrichot et al., 2007), les ambres de Provence sont des objets d'intérêt scientifique.

Dans leur synthèse sur les ambres provençaux, Saint Martin et al. (2021) ont inventorié les différents sites provençaux crétacés et ont distingué les ambres du Vaucluse (Piolenc, Bédoin et Rustrel), les ambres de la Drome, les ambres des Alpes de Haute Provence (Salignac, Montagne de Lure et Bilieux), les ambres des Bouches du Rhône (Venelles, Carry-Le-Rouet, Martigues, etc.) et ceux du Var (Mazaugues, Plan d'Aups). On se basera dans cette partie sur ces distinctions géographiques. Une partie seulement des sites évoqués par Saint Martin et al. (2021) : Piolenc (Vaucluse), Salignac (Alpes-de-Haute-Provence), La Bouilladisse (Bouches-du-Rhône) sera étudiée ici.

III.2.2.3.1. Contexte de l'étude

Contexte géologique

Piolenc

La première évocation des sables lignifères de Piolenc contenant de l'ambre a été réalisée par Gras (1862) lors de sa description du Massif d'Uchaux où est localisé ce gisement. Le faciès étant similaire à celui des lignites du Plan d'Aups, cet auteur en a conclu que les sables de Piolenc et les lignites du Plan d'Aups avaient un âge similaire, estimé correspondre au Crétacé. Un âge santonien a été proposé grâce aux analyses palynologiques (Médus, 1970a, b) et est compatible avec la présence d'une espèce particulière de rudiste (Mennessier, 1950, 1949).

Les principaux affleurements sont localisés dans les quartiers « Saint-Louis » de la ville de Piolenc. Ceux-ci constituent une formation de 9 unités parmi lesquelles il y a deux niveaux d'argiles sableux contenant des compressions végétales, des cuticules préservées et des ambres (Gomez et al., 2003). Ces 9 niveaux correspondent à des alternances de grès laminés et d'argiles sableuses contenant du lignite. Cette

succession peut s'expliquer par des variations du niveau marin dans un contexte côtier. Les sables les plus blancs contenant des obliques tangentielles visibles en haut de série correspondent à des barres sableuses subtidales. Des traces de racines sont visibles au milieu de la série, indiquant une phase d'émersion et donc un environnement plutôt supratidal.

En dessous de ces niveaux se trouvent des sables orangés avec des rides de courant indiquant un environnement intertidal. Pour finir, on trouve en bas de la série des argiles lignifères propres aux marécages côtiers (Gomez et al., 2003 ; Malartre, 1994). L'ensemble de cette série a été déposé sur les bordures de la mer Alpine, durant la phase régressive de la fin du Santonien (Gomez et al., 2003).

L'analyse paléobotanique effectuée par Gomez et al. (2003) a démontré que les macrorestes des niveaux inférieurs de Piolenc étaient dominés par des restes d'Angiospermes. Aucun macroreste de ptéridophytes ou de chlamydospermes n'a été identifié (Gomez et al., 2003), contrairement aux résultats palynologiques qui suggèrent la présence de ce type de végétaux dans le milieu (Médus, 1970a). Le niveau lignifère en haut de la série contient aussi des restes d'Angiospermes et de Gymnospermes. Les mégarestes de Gymnospermes identifiés dans les niveaux supérieurs comprennent presque uniquement des restes rattachés au genre *Frenelopsis*, une Cheirolepidiacée (Gomez, communication personnelle).

Sisteron (Salignac-Sisteron)

Lacroix (1910) a reporté dans son inventaire des sites contenant de l'ambre un affleurement contenant du lignite et de l'ambre dans la zone de Salignac-Sisteron. Les premières descriptions des faciès de cette zone ont été réalisées par Bréhéret (1995). Les niveaux les plus bas de la série, datés du Clansayésien (un sous étage de l'Aptien), sont composés de marnes bleues contenant des petits nodules d'ambre orange. Ces niveaux affleurent au nord de Sisteron, près de la localité de Les Coignets. Les autres niveaux de la série contenant de l'ambre sont localisés à Les Coulets. Ceux-ci sont situés environ 100 m au-dessus des marnes noires contenant une accumulation d'ammonites *Leymeriella tardefurcata* datées de l'Albien (Joly, 2008 ; Kennedy et al., 2017) et 30 m en dessous des grès calcaires contenant l'ammonite *Idiohamites* typique des faciès cénomaniens (Saint Martin et al., 2021). Bréhéret

(1995) a noté que l'ambre présent dans les différents niveaux se présente sous la forme de nodules pluricentimétriques, mais que contrairement à ce qu'on observe au niveau de nombreux sites, ils ne sont pas accompagnés de débris fossiles.

Des morceaux d'ambre de plus faibles tailles ont aussi été collectés dans les niveaux calcaires au sein de la série présentant des bioturbations et contenant des bélemnites (Bréhéret, 1995). L'environnement de dépôt de ces niveaux serait donc de type marin pélagique. L'ambre présent dans ces sédiments aurait donc été transporté et il est de ce fait difficile de reconstruire le paléoenvironnement dans le lequel évoluaient les espèces végétales à l'origine de l'ambre.

Selon Onoratini et al. (2009), de l'ambre aurait aussi été trouvé dans la zone de Salignac-Sisteron dans les niveaux datés du cénomanien inférieur et constitués d'une alternance de marnes bleues et de calcaires gréseux.

La Bouilladisse

Les hauts de Belcodène, au nord de la ville de La Bouilladisse, sont connus depuis la fin du XIX^{ème} siècle comme une zone où l'on trouve des séries sédimentaires ambrifères (Collot, 1890 ; Philip, 1974). La série affleurante est composée principalement de marnes et de calcaire, indiguant une sédimentation en milieu marin. Le bas de la série est constitué de calcaires à rudistes surmontés par des calcaires noduleux. Au milieu de la série affleurent des marnes bleues contenant des fossiles marins. Au-dessus se trouvent les niveaux ambrifères constitués d'une alternance de sables et/ou de marnes à lignites. Le haut de la série est dominé par des marnes sableuses de couleur jaune, puis à nouveaux par des calcaires à rudistes (Saint Martin et al., 2021, 2013). Collot (1890) a décrit dans l'ouest du massif de Belcodène, audessus d'un des niveaux marneux ligniteux, la présence de fossiles stratigraphiques (rudistes et bivalves) indiquant que la série date du Crétacé supérieur et plus particulièrement de la subdivision sénonienne. Philip (1974) précisera plus tard cet âge par l'analyse de polypiers indiquant un âge santonien (env. -86 à -84 Ma). Les ambres étant contenus dans les sédiments décrits par Collot (1890) et Philip (1974), ceux-ci sont donc aussi estimés dater du Santonien.

Études précédentes et origines botaniques supposées

Les premières études visant à caractériser les origines botaniques des ambres de Provence ont été réalisées dans un cadre archéologique visant à distinguer ceux-ci des ambres baltiques (Beck et Liu, 1976 ; Onoratini et al., 2009).

Ces études analytiques étaient principalement basées sur la technique de la spectroscopie infrarouge. Onoratini et al. (2009) ont ainsi mis en évidence que malgré une distance géographique et un âge proche, les ambres de Provence présentaient des spectres infrarouges distincts. Plus tard, Nohra et al. (2015), en complétant ces travaux de caractérisation par des études de résonance magnétique et de thermochemolyse-GC-MS, ont distingué les ambres de Salignac-Sisteron des autres ambres de France. Plus particulièrement, une distinction a été faite entre les ambres de Salignac-Sisteron, les ambres de Piolenc et les ambres de Belcodène. Cette distinction a été confortée par des analyses de thermogravimétrie (Ragazzi et al., 2003) qui ont permis de rapprocher les ambres de Piolenc et de Belcodène et de les distinguer des ambres de Salignac-Sisteron.

Selon Onoratini et al. (2009), il est possible que les différences entre les ambres santoniens soient principalement dues à l'influence des environnements de dépôts plutôt qu'à la source botanique des résines à l'origine de ces ambres. En effet, comme cela a été expliqué dans le chapitre I (§I.3.3.4), les analyses en spectroscopie infrarouge sont extrêmement sensibles aux processus d'altération ayant affecté les résines/ambres et donc également aux conditions régnant dans les environnements de dépôts dans un environnement plutôt continental tandis que les ambres de Salignac-Sisteron et de Belcodène sont plutôt associés à des sédiments marins. Onoratini et al. (2009) n'ont pas exclu que les environnements aient influencé de manière prépondérante les spectres infrarouges et donc que l'ensemble des ambres de Provence puissent, en fait, avoir une origine botanique commune.

Pour Nohra et al. (2015), les ambres santoniens (Piolenc) seraient issus de conifères étant donné l'abondance de diterpènes dans les analyses en thermochemolyse-GC-MS. Ils ont proposé, comme origine, une résine de Cupressacées à partir de l'analyse des spectres IR et des analyses de GC-MS (Nohra et al., 2015).

III.2.2.3.2. Résultats et Discussion

Caractérisation moléculaire des ambres de Piolenc

L'ensemble des ambres de Piolenc présente des distributions moléculaires dominées par les composés diterpéniques, indiquant une origine botanique parmi les conifères. Cependant, il est possible de distinguer les ambres de Piolenc selon le niveau à partir duquel ils ont été collectés.

En effet, les extraits lipidiques de l'ambre provenant des niveaux les plus anciens (c.à-d. les niveaux les plus bas de la série) sont dominés principalement par des diterpènes de la série de l'acide pimarique (**32**)/sandaracopimarique (**33**) (Figure **III.24**) comme le composé (**19**) issu de l'aromatisation de diterpénoïdes de cette série (De Lama Valderrama et al., 2022 ; Simoneit et al., 2018), ou le composé (**43**) issu de la réduction de diterpénoïdes de cette même série. Associés à ces composés ont également été détectés de l'acide déhydroabiétique (**9**) et de l'acide callitrisique (**1**) en faibles quantités. Des composés organiques soufrés ont également été mis en évidence (Composés (**47-49**) et cercles noirs ; Figure III.24) (Chapitre II; Lenen et al., 2023). En particulier, les composés (**47**), (**48**) et (**49**) ont pu être isolés à partir de l'ambre de Piolenc et identifiés par RMN (Lenen et al., 2023). Ces composés proviendraient, comme cela a été discuté dans le chapitre II, de la sulfuration de diterpénoïdes de la série de l'acide isopimarique (**55**).

Il n'y a pas dans l'échantillon d'acides carboxyliques en série labdanoïde. Cependant, la présence du composé (**41**) laisse penser que la résine initiale en contenait une quantité significative. En effet, celui-ci est issu de la dégradation thermique de labdanoïdes (Bray et Anderson, 2008 ; Poulin et Helwig, 2014). Cette hypothèse est confirmée par la présence du composé (**17**), qui est sans doute issu de la cyclisation d'un labdanoïde comme l'acide communique (**7**) (De Lama Valderrama et al., 2022; voir également **Figure II.9**).

La résine à l'origine de cet ambre devait donc contenir un diterpène tel que l'acide pimarique (**32**) et/ou sandaracopimarique (**33**) et/ou isopimarique (**55**) ainsi qu'un/des labdanoïde(s), de l'acide callitrisique (**1**) et de l'acide abiétique (**8**) /déhydroabiétique (**9**).

La présence de ces composés est typique des résines de Cupressacées (Cox et al., 2007 ; Langenheim, 2003 ; Otto et al., 2007, 2001 ; Simoneit et al., 2019 ; Chapitre I, §I.2.3.1). Notamment, la présence de l'acide callitrisique (**1**) semble indiquer plutôt une origine parmi les Cupressacées puisque celui-ci est essentiellement trouvé parmi les résines de cette famille (Anderson, 2006).

La présence du cuparène (5) semble aussi confirmer l'hypothèse d'une origine parmi cette famille, celui-ci étant un biomarqueur robuste lié à cette famille (Grantham et Douglas, 1980 ; Otto et Wilde, 2001).





Les ambres provenant des niveaux les plus récents de Piolenc (c.-à-d. les niveaux les plus hauts de la série) présentent une distribution moléculaire assez différente. En effet, la distribution moléculaire des extraits de ces ambres est dominée par les diterpènes de la série de l'acide déhydroabiétique (9) et isopimarique (55), qui sont les deux composés majeurs des extraits. Associés à ceux-ci, les composés (17) et (19) ont également été détectés (Figure III.25).

Les labdanoïdes n'ont pas pu être mis en évidence dans ces échantillons. Cependant, la présence du composé (**17**), supposé avoir été formé par cyclisation/aromatisation de labdanoïdes (De Lama Valderrama et al., 2022; cf. aussi **Figure II.9**) pourrait indiquer qu'initialement, ces ambres contenaient une faible proportion de cette famille de diterpènes. La présence de diterpènes dérivant de l'acide abiétique (**8**) et isopimarique (**55**) est une caractéristique des Pinacées et des Cupressacées actuelles (Chapitre I, I.2.3.1; Cox et al., 2007 ; Otto et al., 2007 ; Simoneit et al., 2019). En effet, par exemple, la résine de *Abies alba*, une Pinacée, présente une co-prédominance des diterpènes dérivant de l'acide abiétique (**5**) et isopimarique (**55**) (Chapitre I, **Figure I.10**) et une très faible contribution de labdanoïdes, à l'instar de l'ambre étudié.

Il est à noter cependant, comme cela a été discuté dans le chapitre I, que les résines de Cupressacées présentent des proportions non négligeables de labdanoïdes et sont assez rarement dominées par les diterpènes dérivant de l'acide abiétique (8) (Otto et al., 2001 ; Simoneit et al., 2019, 2018). Par exemple, la résine de *Cuninghamia konishii*, est dominée par des labdanoïdes et des diterpènes dérivant de l'acide isopimarique (55) et ne présente que très peu de diterpènes apparentés à l'acide abiétique (8) (Chapitre I, Figure I.21). Il est donc en réalité difficile d'affilier, surtout en l'absence de diterpénoïdes phénoliques ou de biomarqueurs spécifiques comme le cédrène (59) ou le cuparène (5), l'ambre de ces niveaux à une Cupressacée.

Il est à noter cependant que les ambres de Piolenc comprennent de l'acide callitrisique (1), qui est généralement associé aux Cupressacées puisque la présence de ce composé, dans les résines de conifères modernes tout au moins, est limitée aux Cupressacées (Anderson, 2006 ; Simoneit et al., 2019, 2016).

Si l'on se réfère aux analyses paléontologiques, les restes fossiles de Cheirolepidiacées sont très largement prédominants dans les niveaux hauts de l'affleurement de Piolenc où se trouvent ces ambres, le genre *Frenelopsis* représentant plus de 90% de la flore associée (communication personnelle B. Gomez, Université de Lyon). Il est donc possible aussi de proposer une origine parmi les Cheirolepidiacées pour les ambres des niveaux les plus récents de Piolenc. En effet, comme cela a été discuté dans le paragraphe sur les ambres de Scorbé-Clairvaux, il apparaît que les ambres de Cheirolepidiacées sont aussi dominés par les terpènes

des séries de l'acide abiétique (5) et de l'acide (iso)pimarique (32)/(55), à l'instar des échantillons des niveaux les plus hauts de Piolenc. Cependant, contrairement aux ambres de Scorbé-Clairvaux, aucun diterpénoïde phénolique n'a été détecté ici, rendant ainsi plus difficile l'affiliation avec les Cheirolepidiacées. Il est néanmoins envisageable qu'il existait des variations parmi la composition moléculaire des résines de Cheirolepidiacées et que celles-ci contenaient des quantités extrêmement variables de diterpénoïdes phénoliques, à l'instar des résines de Cupressacées actuelles.

distribution moléculaire dominée par des diterpènes des séries de l'acide abiétique (8) et de l'acide (iso)pimarique (32)/(55) généralement observée dans les résines de Pinacées, mais qui n'est pas totalement incompatible avec une résine de Cupressacées. D'autre part, de l'acide callitrisique (1), généralement associé aux Cupressacées, a également été détecté. Il est donc possible, même en l'absence d'autres marqueurs spécifiques, que cet ambre soit issu de Cupressacées.

Cependant, on ne peut exclure qu'en réalité, l'origine des ambres de ces niveaux de Piolenc soit à chercher parmi les Cheirolepidiacées puisque les résines de Cheirolepidiacées partagent également des caractéristiques moléculaires communes avec les résines de Pinacées. L'absence de diterpénoïdes phénoliques (alors que ceux-ci sont observés, notamment, dans les ambres de Scorbé-Clairvaux pour lesquels une origine de Cheirolépidiacées a également été envisagée), laisse cependant une certaine incertitude concernant cette hypothèse.

La présence du composé (**58**), un des produits d'oxydation de l'acide déhydroabiétique (**9**) (Steigenberger, 2013), montre que cet échantillon a subi des processus d'altération oxydative auxquels les diterpénoïdes phénoliques sont susceptibles d'être particulièrement sensibles (Steigenberger, 2013) et qui expliquerait peut-être pourquoi ces composés n'ont pas pu être mis en évidence dans les ambres provenant des niveaux les plus hauts de Piolenc.



Figure III.25. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre provenant des niveaux les plus hauts de Piolenc (collection personnelle de B. Gomez, Université de Lyon). En bleu sont représentés les composés de la série de l'acide (iso)pimarique et en vert sont représentés les composés de la série de l'acide abiétique. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Caractérisation moléculaire de l'ambre de Salignac

Les échantillons d'ambre de Salignac sont très proches chimiquement entre eux et présentent tous une distribution moléculaire dominée par les labdanoïdes (**Figure III.26**) similaire à celle décrite par Menor-Salván et al. (2016) dans le cas d'ambres espagnols. Associé à ces composés, seuls quelques composés (**43**, **19**), qui pourraient faire partie de la série de l'acide (iso)pimarique (**32**)/(**55**), a été mis en évidence (**Figure III.26**). Le composé (**19**), qui peut être interprété comme étant un produit issu de l'aromatisation de diterpènes de la série (iso)pimarique (**32**)/(**55**), est également présent en faibles quantités dans l'échantillon (De Lama Valderrama et al., 2022; Simoneit et al., 2018; **Figure II.9**).

Cette distribution moléculaire est également très proche de celles des ambres du Mas d'Azil décrites plus haut (**Figure II.23**), même si ces dernières comprennent des composés soufrés qui n'ont pas été mis en évidence dans les ambres de Salignac. En effet, nous observons dans les ambres du Mas d'Azil la prédominance marquée des labdanoïdes. L'origine botanique de ces ambres est donc probablement proche et apparentée aux Araucariacées. Il est cependant difficile d'imaginer une même source

(c.-à-d. une même espèce) pour ces ambres, sachant que près de 30 millions d'années les séparent, les ambres du Mas d'Azil étant datés du Maastrichtien (77 à 66 Ma) et ceux de Salignac du Cénomanien (100-93,9 Ma).



Figure III.26. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre provenant de Salignac-Sisteron (collection de D. Néraudeau, Université de Rennes). En bleu sont représentés les composés de la série de l'acide (iso)pimarique, en violet sont représentés les labdanoïdes. Les cercles violets représentent des labdanoïdes dont la structure n'a pas été élucidée. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques. La structure (69*) avec un astérisque correspond à celle proposée par Menor-Salvan et al. (2016) et à côté, une alternative (69) que nous proposons.

Caractérisation moléculaire de l'ambre de La Bouilladisse

L'ambre de la Bouilladisse présente une signature moléculaire caractéristique de conifères (Otto et Wilde, 2001).

Les principales familles de diterpènes généralement trouvées dans les résines de conifères y sont représentées. Les diterpènes dérivant de l'acide déhydroabiétique (9) et ses dérivés sont prédominants dans l'échantillon représenté en **Figure III.27**. L'acide callitrisique (1), mis en évidence dans les résines de Cupressacées du genre *Callitris* (Simoneit et al., 2018), est présent en quantités non négligeables. De même, le cuparène (5) est un biomarqueur de la famille des Cupressacées (Grantham et

Douglas, 1980; Otto et Wilde, 2001). Enfin, la présence des trois familles de l'abiétane (**70**), de l'(iso)pimarane (**71**)/(**72**) et du labdane (**73**) dans l'échantillon est cohérente avec l'hypothèse d'une origine parmi les Cupressacées.



Figure III.27. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre provenant de La Bouilladisse (collection de D. Néraudeau, Université de Rennes). En bleu sont représentés les composés de la série de l'acide (iso)pimarique, en vert les composés de la série de l'acide abiétique et en violet les labdanoïdes. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

En effet, la résine de *Calocedrus decurrens* (une Cupressacée), par exemple, contient de l'acide déhydroabiétique (9), de l'acide communique (7) ainsi que de l'acide sandaracopimarique (33) en tant que composés majoritaires (Chapitre I, Figure I.17). Cependant, même si la résine de *Calocedrus decurrens* présente des analogies avec l'ambre de La Bouilladisse, cette résine comprend également du ferruginol (2), un diterpénoïde phénolique qui n'a pas été détecté dans les ambres de La Bouilladisse. Il n'est pas impossible que les résines à l'origine des ambres de La Bouilladisse aient contenu de faibles quantités de diterpénoïdes phénoliques, comme les résines actuelles de calocèdres, mais que ces composés aient été altérés/détruits assez rapidement lors de la diagenèse.

Les échantillons provenant de La Bouilladisse présentent de nombreux composés en commun avec les ambres provenant des niveaux inférieurs de Piolenc. La principale différence chimique visible entre les échantillons de La Bouilladisse et de Piolenc (niveaux inférieurs) est liée à la présence de composés organiques soufrés dans les ambres de Piolenc. Or, comme cela a été discuté dans le chapitre II, ces composés sont des produits de transformation diagénétiques de diterpènes associés à des milieux de dépôt particuliers. Les résines à l'origine des ambres de Piolenc (niveaux inférieurs) devaient donc, avant sulfuration, être relativement proches chimiquement des résines qui ont conduit aux ambres de La Bouilladisse, et donc avoir des origines botaniques proches, d'autant que dans les deux cas, les ambres ont été trouvés dans des sédiments datés du Santonien.

III.2.2.3.3. Conclusion

Les ambres de Provence présentent une grande variabilité moléculaire et au moins trois sources botaniques distinctes ont été identifiées lors de leur étude. Nos résultats sont en accord avec les études précédentes qui proposent pour les ambres santoniens de Provence une origine botanique parmi les Cupressacées (Nohra et al., 2015; Onoratini et al., 2009). Cependant, il est à noter que les ambres santoniens de Piolenc ne sont pas homogènes puisque les niveaux du haut de l'affleurement sont dominés par des ambres provenant sans doute d'une Pinacée/Cupressacée/Cheirolepidiacée (il est difficile de conclure avec certitude pour cet ambre), tandis que les niveaux inférieurs contiennent des ambres provenant fort vraisemblablement d'une Cupressacée.

En revanche, des ressemblances existent entre les ambres santoniens de La Bouilladisse et les ambres santoniens des niveaux bas de Piolenc. Comme l'avait soulignée une étude précédente (Onoratini et al., 2009), il est possible que les plantes à l'origine des ambres de ces sites soient proches, mais que les différences environnementales soient à l'origine des différences observées au niveau moléculaire (milieu anaérobie et présence de sulfates favorables au développement de bactéries sulfato-réductrices).

Pour finir, notre étude moléculaire a permis de mettre en évidence la ressemblance entre les ambres de Salignac-Sisteron et les ambres du Mas d'Azil, indiquant des sources botaniques similaires, appartenant très vraisemblablement aux Araucariacées. Cependant, il est probable que le genre et l'espèce aient été différents, connaissant la différence d'âge entre les ambres de Salignac-Sisteron et du Mas d'Azil datés, respectivement, du Cénomanien (100-94 Ma) et du Maastrichtien (77 à 66 Ma).

III.2.2.4. Les ambres du Mont Bugarach (Fourtou et Sougraine, Aude)

III.2.2.4.1. Contexte de l'étude

Contexte géologique et paléoenvironnemental

Les premières évocations d'ambre dans l'Aude ont été reportées dans « Mémoires sur l'ambre jaune » décrivant une partie des sites où de l'ambre a été trouvé en France (Cassini, 1723). Cet auteur a décrit un ensemble de gisements d'ambre près du mont Bugarach, dans l'Aude, dont les sites de Fourtou et Sougraine. Par la suite, les études sédimentologiques et paléontologiques ont montré que l'ambre peut être trouvé principalement dans les sédiments datant du Crétacé moyen/supérieur des Corbières (Bilotte, 1985). Les sédiments associés à l'ambre sont typiques de bassins ouverts continentaux et alternent entre une composante terrigène et carbonatée. Les analyses paléontologiques placent ces sédiments au sein du Crétacé et, plus particulièrement, entre le Cénomanien et le Turonien (Bilotte, 1985, 1973 ; Sénesse, 1937). La présence de foraminifères tel que *O. concava* ou *O. conica* indique un environnement plutôt saumâtre (Bilotte, 1985; Girard et al., 2013a).

La série sédimentaire visible à Fourtou est composée de plusieurs unités. Les plus bas niveaux sont constitués de marnes grises entrecoupées de bancs de sable et d'un peu de lignite.

Sur ces niveaux se trouvent des bancs de sable contenant des foraminifères (*O. concava, O. conica*) entrecoupés d'un banc de lignite. Au-dessus, se trouvent des marnes noires fossilifères contenant les ambres dont l'étude est présentée dans cette partie. Ensuite, les niveaux deviennent plus calcaires suite à un épisode de transgression marine, et les fossiles trouvés dans ces bancs sont à nouveau principalement marins (Girard et al., 2013a). Les bancs contenant l'ambre étant encadrés par des bancs de sable contenant des foraminifères typiques du Cénomanien, ceux-ci sont donc naturellement datés du milieu du Cénomanien (Girard et al., 2013a).

Le bois fossile associé à l'ambre de Fourtou se trouve sous forme de lignite et est donc relativement mature. L'analyse de la xyloflore semble indiquer que celle-ci est assez homogène avec une prédominance du conifère *Agathoxylon* Hartig et plus particulièrement de l'espèce *Agathoxylon gardoniense* (Crié) (Girard et al., 2013a) qui est souvent trouvée dans le Cénomanien français (Crié, 1890; Gomez et al., 2004; Néraudeau et al., 2002). Associées au bois, des cuticules bien préservées sont également identifiables. Deux taxons fossiles ont été identifiés, le premier, *Frenelopsis alata* (E. Knobloch), faisant partie des Cheirolepidiacées et le second, *Glenrosa sp,* étant une Cupressacée (Girard et al., 2013a). Ces taxons fossiles ont été trouvés dans de nombreux affleurements cénomaniens (Gomez et al., 2004 ; Néraudeau et al., 2002).

Études précédentes et origines botaniques proposées

L'analyse par thermogravimétrie différentielle réalisée par Ragazzi et al. (2009) n'a pas permis de discriminer les ambres de Fourtou des autres ambres du Cénomanien présents dans le sud-ouest de la France. Ces auteurs mettent cependant en évidence que les ambres de Fourtou présentent une concentration très forte en soufre, contrairement à la majorité des autres ambres crétacés étudiés. Ils expliquent cela par la diffusion de soufre dans les ambres dans le milieu sédimentaire. Cependant, aucune hypothèse sur l'origine botanique des ambres de Fourtou n'a pu être formulée dans cette étude, les analyses thermiques n'étant pas adaptées pour fournir ce type d'informations.

Girard et al. (2013a) ont proposé, sur la base d'analyses paléontologiques et taxonomiques, une origine parmi les Araucariacées et/ou les Cheirolepidiacées, et ont suggéré, sur cette base, que les origines de ces ambres seraient communes avec les ambres charentais et espagnols.

Les analyses par spectroscopie infrarouge ont montré que les ambres de Fourtou ne sont pas distinguables des autres ambres crétacés français par cette méthode (Nohra et al., 2015). Sur la base des spectres infrarouges (et avec les limitations inhérentes à cette méthode d'analyse), Nohra et al. (2015) proposent comme origine botanique une Cupressacée ou une Araucariacée. Des analyses complémentaires par thermochemolyse-GC-MS ont montré que les ambres de Fourtou appartiennent à la classe lb (Nohra et al., 2015) comprenant les ambres riches en labdanoïdes dits

« réguliers » et dépourvus d'acide succinique. Ces analyses ont aussi permis de mettre en évidence que les ambres de Fourtou, dominés par les labdanoïdes, sont très proches chimiquement des ambres pyrénéens, suggérant une origine botanique commune. Les Cheirolepidiacées ont alors été proposées comme origine (Nohra et al., 2015).

III.2.2.4.2. Résultats et discussion

Les ambres de Fourtou et Sougraine analysés ici présentent des distributions moléculaires analogues dominées par les labdanoïdes (Figure III.28). Une partie des composés décrits dans les ambres espagnols par Menor-Salván et al. (2016) sont également présents dans ces échantillons ((11), (25), (26) ; Figure III.28). Les composés (19) et (43) issus de la transformation de diterpènes de la série (iso)pimarique typique des conifères ont également été détectés. Les composés principaux sont des diterpénoïdes soufrés (50)/(50'), (51)/(51'), décrits en détail dans le chapitre II. Comme cela a été discuté dans ce chapitre, ceux-ci peuvent être issus de la sulfuration de labdanoïdes tels que le composé (14) ou de la sulfuration de diterpénoïdes tricyclique comme le composé (47)/(48) qui proviendrait de la sulfuration de l'acide isopimarique (55).

Il s'avère ici que les échantillons de Fourtou et Sougraine sont extrêmement proches des échantillons du Mas d'Azil et de Salignac-Sisteron puisque ceux-ci sont aussi dominés par les labdanoïdes et contiennent quelques représentants de diterpènes dérivant de l'acide isopimarique (e.g. composé (**19**) provenant de l'aromatisation de diterpènes de la série pimarique)

La différence principale entre les sites semble résider principalement dans la proportion de composés soufrés et pourrait donc s'interpréter comme étant liée à des milieux de dépôt différents, et non à des sources botaniques distinctes. Les ambres de Fourtou/Sougraine semblent être ceux contenant le plus de composés organosoufrés parmi les ambres des trois sites dont il est question dans cette section. Ceci est cohérent avec les résultats des analyses qui avaient mis en évidence de forts taux de soufre dans ces ambres (Ragazzi et al., 2009).

Les ambres de Salignac-Sistéron et de Fourtou/Sougraine sont tous datés du Cénomanien inférieur et sont donc proches dans le temps et l'espace. Il est de ce fait

possible qu'ils proviennent de résines issues d'essences phylogénétiquement proches. Cependant, comme cela a été discuté précédemment, les composés présents dans les ambres étant majoritairement des produits de transformation diagénétique, il est difficile d'en être sûr puisque des lipides précurseurs différents peuvent conduire aux même produits diagénétiques. De plus, la ressemblance avec les ambres du Mas d'Azil ne peut pas s'expliquer par une origine botanique commune étant donné l'écart d'âge important entre les ambres des deux sites. Cependant, il est raisonnable de proposer une origine parmi les Araucariacées pour l'ensemble de ces ambres.



Figure III.28. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre provenant de Fourtou (collection Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris, A. Nel). En bleu sont représentés les composés de la série de l'acide (iso)pimarique, et en violet les labdanoïdes. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

III.2.2.4.3. Conclusion

Les ambres de Fourtou/Sougraine sembleraient issus de résines déposées dans des environnements de dépôt probablement légèrement différents de ceux à l'origine des ambres du Mas d'Azil ou de Salignac-Sisteron, expliquant ainsi le taux de sulfuration particulièrement élevé observé pour les ambres de Fourtou/Sougraine, alors que les composés soufrés n'ont été détectés qu'en proportions moindres dans les ambres du Mas d'Azil et sont quasiment absents dans les ambres de Salignac-Sisteron. Ainsi, les ambres de Fourtou/Sougraine et, dans une moindre mesure, du Mas d'Azil, résines déposées des proviennent de dans environnements anoxiques particulièrement favorables au développement des bactéries sulfato-réductrices qui ont conduit à la formation d'espèces inorganiques réduites du soufre comme H₂S ou les polysulfures susceptibles de réagir avec la matière organique des résines (cf. Chapitre II). Cela explique peut-être pourquoi les ambres de ces trois sites ont présenté des différences lors des études précédentes (Nohra et al., 2015), différences qui n'ont pas nécessairement pu être interprétées en termes d'origine botanique. En effet, les techniques utilisées (FT-IR, RMN, notamment) sont très sensibles aux processus d'altération diagénétiques subis par les ambres.

Cependant, malgré des environnements de dépôt différents, il apparaît que l'ensemble de ces ambres sont très proches puisque les distributions moléculaires sont toutes caractérisées par la prédominance des labdanoïdes et la présence en proportions moindres de biomarqueurs issus de diterpènes de la série de l'acide (iso)pimarique. Cela pourrait s'expliquer par des origines botaniques relativement proches pour ces différentes résines. En revanche, il est sans doute exclu que l'ensemble de ces ambres proviennent de la résine d'une essence végétale unique, l'écart d'âge étant trop important. Il est probable que la diagenèse ait « gommé » une partie des différences au niveau moléculaire existant entre ces résines.

III.2.3. Les ambres crétacés espagnols : une similarité avec les ambres français

III.2.3.1. Contexte de l'étude

Contexte géologique

Les ambres espagnols ont été mentionnés pour la première fois au début du XVIII^{ème} siècle par Casal (1762) dans son manuscrit sur l'histoire naturelle et médicale de la principauté des Asturies. Suite à cela, une dizaine de sites géologiques, la plupart concentrés dans le nord de l'Espagne, ont été décrits (Delclòs et al., 2007 ; Peñalver et al., 2022 ; Peñalver et Delclòs, 2010). La majorité des sites présentant de l'ambre

en Espagne sont datés du Crétacé et, plus particulièrement, du Crétacé inférieur (Penney, 2010). Sept sites crétacés contenant de l'ambre ont été décrits par Delclòs et al. (2007), et, plus tard, quelques sites ont été ajoutés.

Ceux-ci sont répartis au sein de quatre bassins sédimentaires : le bassin basque cantabrique (Peñacerrada I et II, Salinillas de Buradón et El Soplao), la dépression centrale des Asturies (El Caleyu, Pola de Siero), le bassin de Maestrat (La Hoya, Uña, San Just, Arroyo de la Pascueta) et l'ensemble de bassins ibériques du sud-ouest (Serranía de Cuenca : Uña, Buenache et Las Hoyas) (**Figure III.29**).



Figure III.29. Carte présentant les principaux bassins crétacés et les localités associées contenant de l'ambre. BCA : Bassin Central des Asturies ; BBC : Bassin Basque-Cantabrique ; BM : Bassin du Maestrat ; SC : Serranía de la Cuenca. 1) Pola de Siero 2) El Caleyu 3) El Soplao 4) Peñacerrada I 5) Peñacerrada II 6) Salinillas de Buradón 7) San Just 8-11) Uña. Carte réalisée à partir de Peñalver et Delclòs, 2010.

Bassin basque cantabrique

Le bassin basque cantabrique a été mis en place lors l'étirement de la croûte terrestre par le mouvement des plaques ibériques et européennes durant le Crétacé, lors de l'ouverture de l'océan Atlantique et du golfe de Gascogne (Rat, 1988 ; Soto et al., 2007). Les affleurements visibles à Peñacerrada I et II présentent une partie de la formation de Eschua (anciennement Nograro), représentée uniquement dans la partie la plus à l'est du bassin. À l'Ouest, la formation la plus représentée est la formation de Eschua.

Les affleurements sont proches des villes de Moraza (*Peñacerrada I*) et Montoria (*Peñacerrada II*). La formation est découpée en trois unités (Barrón et al., 2015 ; Martínez-Torres et al., 2011 ; Martínez-Torres et Alonso-Ramírez, 2003). C'est la seconde unité de la formation d'Eschua qui est présente dans les sites de la Peñacerrada par un ensemble de niveaux indiquant un environnement deltaïque en phase de régression puis de transgression dans les niveaux les plus hauts. Cette unité est constituée d'épais niveaux de grès entrecoupés par des niveaux silteux riches en charbon. Selon Martínez-Torres et al. (2003 ; 2011), c'est la présence d'un diapir de matériel gypseux du Keuper (Trias) qui a empêché l'accumulation trop importante de sédiments, réduisant ainsi les effets d'altération diagénétique liés à l'enfouissement et conduisant à une meilleure préservation de la matière organique (c.-à-d. fossiles, ambre avec microinclusions). L'affleurement contenant le plus d'ambre est celui situé à Peñacerrada I (à l'est) et à El Soplao (à l'ouest). Actuellement, seul le site d'El Soplao est encore accessible.

Le site d'El Soplao comprend des grès silteux riches en matière organique appartenant à la formation de Las Peñosas, indiquant un environnement côtier avec une forte influence fluviatile. Des événements de crues importantes (saisons des pluies) sont visibles dans les sédiments, expliquant l'apport important de matériel organique continental et conduisant à l'accumulation de bois fossiles et d'ambre. La nature de cet environnement est confirmée par la présence de mollusques typiques d'eaux saumâtres. Certaines pièces d'ambre comprennent des restes fossiles de serpules et de bryozoaires, indiquant un environnement littoral, et plus précisément une mangrove côtière (Najarro et al., 2010). Les niveaux à ambre sont datés de l'Albien inférieur (112-110 Ma) (Najarro et al., 2010, Peñalver et Delclòs, 2010).

Le bois et les cuticules fossiles associés à l'ambre dans la localité d'El Soplao sont principalement issus de conifères appartenant aux genres *Frenelopsis* (Cheirolepidiaceae), *Mirovia (*Miroviaceae) et, plus rarement, aux genres *Nehvizdya* (Gingkoaceae) (Menor-Salván et al., 2010 ; Najarro et al., 2010).
Les études palynologiques montrent qu'une majeure partie des pollens est affiliée aux Araucariacées, et plus particulièrement à l'espèce *Araucariacites australis* (Alonso et al., 2000a ; Barrón et al., 2015 ; Barrón López et al., 2001). Selon ces études, les forêts cénomaniennes espagnoles devaient être dominées par les Araucariacées et les Cupressacées. Cependant, il semblerait que les zones les plus côtières étaient tout de même dominées par les Cheirolepidiacées qui sont des espèces xéromorphes relativement bien adaptées aux eaux salées et/ou saumâtres du littoral (Alonso et al., 2000a ; Barrón López et al., 2001).

Bassin de Maestrat

Ce bassin est caractérisé par un système de rift avec de nombreuses failles listriques ayant joué durant la période allant de l'Oxfordien (Jurassique) à l'Albien (Crétacé) (Salas et al., 2001). La sédimentation était dominée par des calcaires, des grès et des marnes, indiquant des environnements marins peu profonds ou d'eau douce (delta) (Delclòs et al., 2007). La formation associée à ces dépôts est la formation d'Eschua, visible également dans l'est du bassin basque cantabrique. Les sédiments, datés de l'Albien supérieur à moyen, présentent un faciès typique de deltas sous influence des marées. Au sein de ces sédiments, des niveaux de charbon et de lignite sont visibles (Peñalver et Delclòs, 2010 ; Querol et al., 1992). De l'ambre et des fossiles peuvent également être trouvés dans ces niveaux.

Ces niveaux affleurent dans les localités de San Just, La Hoya et Arroyo de la Pascueta, San Just étant le site le plus productif en ambre.

La dépression centrale des Asturies

Les premières descriptions d'ambre en Espagne ont porté sur des ambres provenant de la dépression centrale des Asturies (Casal, 1762). L'ambre asturien a été découvert dans les formations d'Ullaga (Albien supérieur), du Corao (Cénomanien inférieur), d'El Caleyu (Cénomanien inférieur), de La Manjoya (milieu du Cénomanien), ainsi que dans la formation de Las Tercias (Cénomanien supérieur - Turonien supérieur) (González-Fernández et al., 2004). Les affleurements de la formation d'Ullaga sont les plus fossilifères et apparaissent à proximité des localités d'El Caleyu et de Pola de Siero.

Cette formation est constituée de calcaires et de grès marneux contenant de nombreux fossiles d'huîtres, d'ostracodes, de foraminifères et de plantes (Arbizu et al., 1999).

La province de la Cuenca

Les gisements fossilifères de Las Hoyas et Uña sont situés dans le sud-ouest de la chaîne ibérique en Espagne, dans la province de la Cuenca. Les niveaux contenant des fossiles de plantes et de l'ambre font partie de la formation de La Huérguina. Ce bassin est en réalité constitué d'un ensemble de grabens et hemi-grabens typique des bassins intracontinentaux en divergence. Cet ensemble de bassins s'est ouvert au cours du Jurassique et du Crétacé sur la mer Téthysienne. La sédimentation s'est principalement produite dans des environnements peu profonds, qui sont caractéristiques de la formation (Vilas et al., 1983). La subsidence de ces bassins est liée à l'ouverture de la croûte atlantique centrale et/ou à la tectonique inversée de la plaque ibérique pendant la formation de la chaîne alpine, créant une zone d'extension et donc de nombreuses failles qui fracturent les bassins, multipliant ainsi le nombre d'environnements de dépôt (Salas et al., 2001). La somme de ces deux épisodes de rifting et d'inversion pourrait expliquer la structure de graben nord-ouest/sud-est des sous-bassins (Peñalver et Delclòs, 2010).

Le résultat de ce contrôle structural est le dépôt de faciès lacustres ouverts permettant, par exemple, les minces dépôts de calcaires riches en matière organique déposés en conditions anoxiques observés à Las Hoyas situé au sud du bassin. Plus au Nord, à Uña, les dépôts sont cependant largement dominés par des sédiments silicoclastiques indiquant un environnement typique de cônes alluviaux distaux.

Las Hoyas est un bassin de type semi-graben (Diéguez et Meléndez, 2000 ; Fregenal-Martinez et Melendez, 1994 ; Martínez et Meléndez, 2000). Deux unités lithostratigraphiques, les formations de Tragacete et de La Huérguina, ont été définies pour expliquer les changements de faciès observés. La formation de Tragacete se développe à la base des bassins et se caractérise par une dominance d'argilites et de marnes, entrecoupées de lits carbonatés et silicoclastiques. Des lentilles de charbon et de bauxite sont également présentes, ce qui confirme l'origine continentale des bassins (Peñalver et Delclòs, 2010). La formation de La Huérguina est très développée au sommet des séquences et se compose principalement d'une variété de calcaires fins avec des marnes fines et des grès calcaires contenant localement du lignite. Les sédiments de la formation de La Huérguina présente à Las Hoyas ont vraisemblablement été déposés dans un contexte lacustre en raison de la présence de calcaires riches en matière organique et finement laminés déposés en conditions anoxiques. La zone autour d'Uña a enregistré une sédimentation complexe comprenant des phases de sédimentation en milieu lacustre et des phases de sédimentation en éventail deltaïque (Fregenal-Martínez et Meléndez, 1993 ; Martínez et Meléndez, 2000).

À Las Hoyas, les principaux dépôts sont des grès calcaires minces et des grès alluviaux. La série qui y est associée est plutôt interprétée comme la transition entre un environnement alluvial et lacustre.

À Uña, le niveau contenant de l'ambre est nommé Uña 3 et correspond à des dépôts silicoclastiques typiques de lobes fluviatiles et de l'effondrement de berges. La strate Uña 3 est un équivalent latéral des niveaux visibles à Las Hoyas. Cependant, il est à noter que très peu d'ambre a été trouvé à Las Hoyas (Fradet, 2021).

Les environnements de dépôt dans lesquels se sont déposés les sédiments de Uña et de Las Hoyas étaient séparés par un isthme temporaire qui a permis d'enregistrer des sédiments d'un environnement lacustre très peu profond. Leur datation est basée sur des corrélations stratigraphiques à l'échelle régionale et sur les assemblages fossiles de charophytes, les identifiant comme étant du Barrémien supérieur (Crétacé inférieur). Cette datation a également été confortée par l'étude palynologique et, en particulier, par les grains de pollen d'Angiospermes précoces présents à Uña (Buscalioni et Fregenal-Martinez, 2010 ; Delgado Buscalioni et al., 2016).

Les principaux fossiles de végétaux présents à Uña proviennent de conifères : *Frenelopsis* Schenk (Cheirolepidiaceae), *Glenrosa* Watson et Fischer (Cupressaceae) et de ginkgoales : *Nehvizdya* Hluštík (Fradet, 2021 ; Gomez et al., 2001). Le site de Las Hoyas présente principalement une espèce appartenant aux Angiospermes : *Montsechia vidalii*. Les premières analyses spectrales des ambres espagnols ont été effectuées par Beck (1986). Celui-ci a remarqué que les ambres espagnols présentaient des spectres FT-IR très proches de ceux des ambres siciliens. Par la suite, il a été supposé que les ambres espagnols analysés étaient dominés par les labdanoïdes à l'instar des ambres siciliens (Beck, 1986 ; Lambert et al., 1985 ; Lambert et Frye, 1982), et une origine commune est proposée. Cependant, les analyses par spectroscopie infrarouge (Beck, 1986) et par résonance magnétique nucléaire ne permettent pas d'identifier de façon précise les constituants de l'ambre (Lambert et al., 1985 ; Lambert et Frye, 1982) et ne permettent donc pas, de ce fait, d'en identifier la source botanique de manière fiable.

C'est pourquoi d'autres équipes ont complété ces analyses de spectroscopie infrarouge des ambres espagnols par des études impliquant la GC-MS afin d'identifier les principaux biomarqueurs présents (Alonso et al., 2000b ; Álvarez-Parra et al., 2021 ; Delclòs et al., 2007 ; Menor-Salván et al., 2016, 2010). Les premières études chimiques ont été réalisées sur les ambres provenant d'Alava (Alonso et al., 2000). Ces auteurs ont noté la présence dans certains ambres de dérivés du kaurane (**37**), des composés abondants chez les coniférales. Cependant, ces composés étant particulièrement abondants chez le genre actuel *Agathis*, ils ont conclu à une origine parmi les Araucariacées (Alonso et al., 2000). Ils ont également noté que dans les échantillons étudiés, peu d'acides résiniques communs aux Araucariacées étaient présents. Il a été proposé que l'absence des acides résiniques typiques des Araucariacées puisse être liée à la maturité relativement élevée des échantillons.

Une autre analyse moléculaire des ambres d'El Soplao, un site localisé dans le bassin basque cantabrique, a également été réalisée (Menor-Salván et al., 2016, 2010, 2009). Cette analyse a mis en évidence la présence de biomarqueurs communs entre les cuticules de *Frenelopsis* et l'ambre d'El Soplao (Menor-Salván et al., 2009) ce qui a conduit à conclure que les cuticules et l'ambre avaient une même origine. Les biomarqueurs identifiés dans les ambres et les cuticules associées comprennent le ferruginol (**2**) et des hydrocarbures dérivant de diterpènes tricycliques.

Or, ces composés sont aussi présents chez les Cupressacées et ne sont donc pas des biomarqueurs spécifiques des Cheirolepidiacées (Langenheim, 2003 ; Otto et Wilde, 2001 ; Simoneit et al., 2019).

Une deuxième étude plus extensive d'ambre de ce même site a permis de mettre en évidence l'existence de plusieurs types moléculaires (Menor-Salván et al., 2016, 2010 ; Najarro et al., 2010). Le premier type est caractérisé par la présence significative de diterpénoïdes phénoliques (ferruginol (2), totarol (46) et hinokiol (75)) et de composés diterpéniques dérivant de l'acide pimarique (32) et/ou isopimarique (55) (Menor-Salván et al., 2010). Ces auteurs en ont conclu que ce type moléculaire est proche des résines actuelles de Cupressacées et ont proposé une origine parmi cette famille botanique. De plus, ils ont noté la présence de l'acide callistrisique (1), qui est un composé relativement commun chez les Cupressacées (Anderson, 2006 ; Anderson et al., 1992 ; Simoneit et al., 2019, 2018). Il est donc possible que ce type d'ambre soit issu d'une résine de Cheirolepidiacées du fait que les résines produites par des arbres de cette famille présentent vraisemblablement également des diterpénoïdes phénoliques, des dérivés de l'acide abiétique (8) et pimarique/isopimarique (32)/(55) (Menor-Salván et al., 2010, 2009). Ce type moléculaire d'ambre est trouvé au niveau des sites d'El Soplao, Oreña et El Caleyu (Menor-Salván et al., 2016).

Le second type moléculaire est caractérisé par l'absence de diterpénoïdes phénoliques et la prédominance des dérivés de l'acide pimarique (**32**) et abiétique (**8**) (Menor-Salván et al., 2010). Ce type moléculaire a été identifié parmi les ambres des sites de La Hoyas et Cuchía. Une comparaison avec des ambres brésiliens crétacés provenant des bassins de l'Amazone et d'Araripe (Brésil) a permis de mettre en évidence une similarité entre les ambres espagnols du second type moléculaire et ces ambres brésiliens (Menor-Salván et al., 2016).

Un autre type moléculaire, caractérisé par la présence quasi-exclusive de biomarqueurs rattachés aux labdanoïdes, a été découvert ultérieurement (Menor-Salván et al., 2016). Ces biomarqueurs proviendraient, d'après Menor-Salván et al. (2016), de l'altération d'acides labdanoïdes ainsi que de diterpènes de la série du clérodane (**34**) qui sont présents dans des résines d'Araucariacées (Cox et al., 2007). En effet, ces auteurs ont proposé, notamment, que les diterpènes de la série du clérodane (**34**) pourraient être des précurseurs possibles de l'ambérène (**11**). Même si actuellement, il n'existe pas de résines contenant uniquement des labdanoïdes, Menor-Salván et al. (2016) ont proposé que ce type moléculaire d'ambre proviendrait d'une résine d'Araucariacées, dans la mesure où les résines contemporaines d'Araucariacées contiennent majoritairement des labdanoïdes.

L'absence de composés diterpéniques tricycliques comme l'acide sandaracopimarique (**33**), qui sont souvent présents dans les résines d'Araucariacées (Chapitre I, §I.2.3.1.5 ; Cox et al., 2007 ; Otto et Wilde, 2001) est donc étonnante. Ce type moléculaire a été détecté parmi les ambres des sites de Peñacerrada, Sant Just, Fronfria et Reocín (Álvarez-Parra et al., 2021 ; Menor-Salván et al., 2016). Celui-ci semble être le plus répandu parmi les ambres espagnols.

Un dernier type moléculaire présente une proportion faible de biomarqueurs de type labdanoïde et contient plus particulièrement de l'ambérène (**11**) (Menor-Salván et al., 2016). Ce type d'ambre est le plus rare et n'a été identifié que dans les sédiments turoniens de Soto del Real (Madrid). Il est caractérisé par des proportions importantes d'acide déhydroabiétique (**9**), d'acide callitrisique (**1**) et de leurs dérivés dans les extraits organiques. L'absence de biomarqueurs typiques des Cupressacées a conduit Menor-Salván et al. (2016) à proposer comme origine botanique une Pinacée. Cependant, l'acide callitrisique (**1**), qui est considéré comme un marqueur relativement robuste des Cupressacées, est actuellement essentiellement associé aux résines de cette famille (Anderson, 2006 ; Simoneit et al., 2018).

La répartition des types moléculaires révèle qu'ils sont issus de sédiments liés à des paléoenvironnements différents. Par exemple, le type moléculaire d'ambre présentant des diterpénoïdes phénoliques est présent principalement dans les zones plus continentales tandis que les autres types se trouvent essentiellement le long des anciens traits de côtes (Menor-Salván et al., 2016).

III.2.3.2. Résultats et Discussion

Caractérisation du type moléculaire n°1 – Ambre de Uña

Les échantillons d'ambre de Uña présentent tous une distribution moléculaire dominée par des diterpènes, et, plus particulièrement, par des diterpènes dérivant de l'acide pimarique (**32**) ou isopimarique (**55**) (**Figure III.30** et I**II.31**), indiquant une source de type conifères (Langenheim, 2003; Otto et Wilde, 2001).





Parmi les composés majoritaires dans l'ambre de U<u>ña</u>, on observe les composés (**79**) et (**78**) qui sont issus de l'aromatisation et/ou de l'hydrogénation de dérivés de l'acide pimarique (**32**) ou sandaracopimarique (**33**). Quelques labdanoïdes dérivant de l'acide communique (**7**) ont également été détectés dans l'échantillon, comme le composé (**17**) qui serait issu de la cyclisation/aromatisation de labdanoïdes (cf. **Figure II.9**) De même, il est possible que le composé (**77**) corresponde à un analogue du composé

(17) possédant un groupement éthyle sur le cycle aromatique et qui, comme le composé (17), pourrait être issu de la cyclisation de labdanoïdes (Figure II.31).



Figure III.31. Mécanisme proposé pour la formation diagénétique du composé (77) par cyclisation/aromatisation de labdanoïdes apparentés à l'acide communique (7). Ce mécanisme est analogue à celui proposé pour la formation du composé (17) (cf. Figure II9) (adapté d'après De Lama-Valderrama et al., 2022).

Il est donc probable que la résine à l'origine de cet ambre ait été majoritairement composée de labdanoïdes et d'acide pimarique (**32**) et/ou sandaracopimarique (**33**) et/ou isopimarique (**55**). La prédominance de ces deux séries est plutôt commune chez les Cupressacées. Par exemple, la distribution moléculaire de la résine de *Chamaecyparis lawsoniana* est dominée par l'acide sandaracopimarique (**33**) et quelques composés qui lui sont apparentés, ainsi que par le communol (**80**), un labdanoïde (Chapitre I, **Figure I.17**). Aucun composé affilié à l'acide abiétique (**8**) n'a été identifié. L'absence des diterpènes de cette série est relativement commune dans les résines actuelles de Cupressacées (Chapitre I, §I.2.3.1.2.).

Cependant, la résine de *C. lawsoniana*, comme beaucoup de résines de Cupressacées, comprend également des diterpénoïdes phénoliques en grandes quantités, alors qu'aucun de ceux-ci, ni aucun biomarqueur strict de Cupressacées, n'a pu être identifié parmi les terpénoïdes de l'ambre de U<u>ñ</u>a, ce qui rend difficile d'établir avec certitude un lien entre ce type d'ambre et cette famille botanique.

Certains échantillons d'ambre de Uña présentent, en plus de ces composés, un nombre important de composés soufrés non identifiés à ce jour (**Figure III.32**). Comme

cela a été discuté dans le chapitre II, la formation de ces composés implique un milieu de dépôt anoxique favorable à la sulfuration.



Figure III.32. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre de Uña (Type moléculaire 1 bis). En bleu sont représentés les composés de la série de l'acide (iso)pimarique, et en violet sont représentés les labdanoïdes. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques. Les cercles noirs sont des composés soufrés dont la structure est inconnue.

Il est à noter que ce type moléculaire ne fait pas partie des ambres espagnols discutés par Menor-Salván et al. (2016, 2010) et Najarro et al. (2010).

Caractérisation du deuxième type moléculaire

Ce second type moléculaire est caractérisé par l'écrasante prédominance de labdanoïdes décrite par Menor-Salván et al. (2016) (composés (11), (25), (26) ; Figure II.34) dans un extrait d'ambre du bassin de la Peñacerrada. Ces labdanoïdes font partie de la série « régulière » (par opposition à ceux liés à la série « enantio ») Cette distribution moléculaire est très proche de celles observées précédemment pour les ambres des sites de Saint-Lon-Les-Mines (Landes), ainsi que pour les ambres du type moléculaire **Arc 2** d'Archingeay (Charente-Maritime) et a déjà été décrite par Menor-Salván et al. (2016) dans des ambres provenant du même site.

Comme cela a été discuté précédemment, parmi les résines de conifères, les résines d'Araucariacées sont les plus riches en labdanoïdes avec les résines de Cupressacées (Chapitre I ; Cox et al., 2007). L'absence de diterpénoïdes phénoliques et de biomarqueurs caractéristiques des Cupressacées semble cependant infirmer l'hypothèse d'une origine parmi celles-ci. Ce type d'ambre pourrait donc être issu d'une résine d'Araucariacées. Pour le composé (**29**), nous proposons qu'il s'agisse de l'acide kujigambéroïque qui a notamment aussi été identifié dans les ambres « coca » (Type 2) d'Archingeay (Takahashi et al., 2019).



Figure III.33. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) des fractions apolaires isolées à partir des extraits organiques méthylés d'un ambre (A) de Teruel (collection C.du Gardin) et (B) de Alava (bassin de la Peñacerrada, collection de Jan Panczak). En violet sont représentés les labdanoïdes. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Comme les ambres espagnols du bassin de la Peñacerrada sont relativement proches des ambres de Saint-Lon-Les-Mines et d'Archingeay d'un point de vue de l'âge et de la répartition géographique et présentent des distributions moléculaires très similaires, il est possible que les essences qui ont produit les résines à l'origine de ces ambres soient assez proches phylogénétiquement, sans nécessairement correspondre au même genre ou à la même espèce. Comme nous l'avons vu précédemment, il est possible que même si les résines présentent à l'origine quelques différences du côté de leurs compositions moléculaires, ces différences peuvent avoir été « gommées » lors de la diagenèse.

Caractérisation du troisième type moléculaire des ambres espagnols (El Soplao)

Ce troisième type moléculaire a été identifié à partir d'ambre du site d'El Soplao et est caractérisé par un ensemble de diterpènes de la série de l'acide (iso)pimarique (32)/(55) et de labdanoïdes (Figure III.34). Un diterpénoïde phénolique, le ferruginol (2) (Figure III.34), a également été détecté dans l'échantillon étudié. Ces caractéristiques moléculaires sont assez communes chez les résines de Cupressacées (Otto et al., 2001 ; Simoneit et al., 2019, 2018; Chapitre I, I.2.3).

Ainsi par exemple, la résine de *Cupressus sempervirens* comprend comme composés majoritaires l'acide sandaracopimarique (**33**), l'acide communique (**7**) ainsi que le sempervirol (**45**) (Chapitre I, **Figure I.15**).

La distribution moléculaire de l'ambre d'El Soplao présentée sur la **Figure III.34** montre de faibles proportions de composés organiques soufrés (**47**), (**48**), (**50/50'**), (**51**) et (**81**) (**Chapitre II**). Ceux-ci proviennent de la sulfuration de l'acide isopimarique (**55**) pour (**47**), (**48**) et (**81**), et de labdanoïdes comme l'acide agathique (**6**) pour (**50/50'**) et (**51**). La résine à l'origine de cet ambre devait donc être dominée par des labdanoïdes comme l'acide agathique (**6**) (et leurs dérivés), l'acide isopimarique (**55**) et/ou sandaracopimarique (**33**). Cette résine devait de plus contenir du ferruginol (**2**). Cette distribution est donc relativement proche de la résine de Cupressacées actuelles (Chapitre I, **Figure I.14**).

Comme cela a été présenté précédemment, les ambres du site d'El Soplao sont accompagnés par des restes fossiles de Cheirolepidiacées, de Miroviacées et de Ginkgoacées. Les Ginkgoacées n'étant pas vraiment connues pour leur production de résines diterpéniques, ce type de source botanique potentielle peut donc être exclu (Langenheim, 2003).

L'hypothèse d'une origine parmi les Cheirolepidiacées, d'après Menor-Salván et al. (2016, 2010) est peu probable du fait de la faible proportion de diterpénoïdes de la série de l'acide abiétique (8). En effet, comme cela a été discuté précédemment (§III.2.1.2 et §III.2.2.3) les résines de Cheirolepidiacées présenteraient des caractéristiques moléculaires mixtes entre les résines de Pinacées et de Cupressacées, et donc seraient dominées par les composés dérivant de l'acide abiétique (8).



Figure III.34. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre d'El Soplao (Peñacerrada (Collection de Jan Pànczak)). En violet sont représentés les labdanoïdes, en bleu les composés de la série de l'acide (iso)pimarique, en vert les composés de la série de l'acide abiétique et en orange le ferruginol (2). Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques. X : Contamination.

Les Miroviacées constituent une famille éteinte de conifères en principe apparentée aux Sciadopityacées actuelles (Menor-Salvan et al., 2016) . Les résines de Sciadopityacées sont dominées par des labdanoïdes comme l'acide lambertianique (82) (Chapitre I, figure I.23) et ne comprennent pas de diterpènes apparentés à l'acide abiétique (8) et à l'acide pimarique (32) (Hasegawa et al., 1985), ce qui semble a priori exclure une telle origine botanique.

Cependant, les Miroviacées appartenant à une famille éteinte, il est difficile de connaître la composition de leur résine en l'absence de réels équivalents actuels, et même si les Miroviacées sont apparentées aux Sciadopityacées de par leur morphologie (Gomez, 2002 ; Nosova et Kiritchkova, 2015), il est possible que les distributions moléculaires de leurs résines soient très éloignées. En effet, les

Sciadopityacées et les Cupressacées sont censées être relativement proches phylogénétiquement (Langenheim, 2003 ; Mazliak, 2010 ; Savidge, 2008), or les résines des membres de ces deux familles présentent des types de distributions moléculaires très distincts. On ne peut pas non plus totalement exclure que les résines de Miroviacées partagent des caractéristiques moléculaires plus proches de celles des Cupressacées que les Sciadopityacées actuelles.

III.2.3. 3. Conclusion

Les résultats obtenus montrent une variabilité dans la constitution moléculaire des ambres crétacés espagnols, comme cela avait déjà été mis en évidence précédemment (Álvarez-Parra et al., 2021 ; Menor-Salván et al., 2016, 2010, 2009). Il apparait qu'il existe plusieurs sources botaniques à l'origine de ces ambres et que celles-ci appartiennent à des familles distinctes de conifères (Cupressacées et Araucariacées, plus particulièrement). Le premier type moléculaire mis en évidence a uniquement été trouvé dans le site de Uña et est dominé par les diterpènes des séries dérivant de l'acide (iso)pimarique (**32**)/(**55**). La prédominance de ces séries semble plutôt être caractéristique des résines actuelles de Cupressacées (Cox et al., 2007 ; Chapitre I, §I.2.3.1.2).

Le second type moléculaire mis en évidence a été observé au niveau de plusieurs sites (Alava, Teruel) et avait déjà été décrit précédemment (Menor-Salvan et al., 2010, 2016). Celui-ci est dominé par les labdanoïdes et ressemble très fortement aux ambres « coca » d'Archingeay (Type 2) et de Saint-Lon-Les-Mines. Il est possible que les ambres espagnols du bassin de la Peñacerrada, les deux ambres d'Archingeay du type **Arc 2** et les ambres de Saint-Lon-Les-Mines proviennent d'espèces botaniques relativement proches phylogénétiquement appartenant vraisemblablement à la famille des Araucariacées. En effet, ces ambres datent de la même période et les flores associées sont très proches.

Le dernier type moléculaire a été uniquement identifié à partir des ambres d'El Soplao. Ce type moléculaire avait aussi été auparavant décrit (Menor-Salvan et al., 2010, 2016). Celui-ci est dominé par les labdanoïdes, les dérivés de l'acide (iso)pimarique (**32**)/(**55**) et présente des terpénoïdes phénoliques. Ces caractéristiques sont typiques des Cupressacées actuelles (Cox et al., 2007 ; Otto et Wilde, 2001 ; Simoneit et al., 2018), mais il n'est pas possible d'exclure une origine parmi les Miroviacées étant donné la présence importante de fossiles appartenant à cette famille de végétaux au niveau de ce site (Menor-Salvan et al., 2010).

III.3. Les ambres du Liban

Les ambres du Liban sont connus depuis l'époque phénicienne (McDonald, 1940). En effet, les Phéniciens ont été les premiers à établir des routes commerciales impliquant de l'ambre entre le XIII^{ème} et le XVI^{ème} siècle avant J-C. Le mot « Liban » dérive du mot « Louban », signifiant « blanc » en référence aux montagnes libanaises, mais aussi « encens » en lien avec la résine de cèdre et l'ambre, abondants dans ce pays. En effet, près de 375 affleurements contenant de l'ambre ont été recensés à travers le Liban (Azar et al., 2010). La majorité de ces affleurements datent du Mésozoïque et certains figurent parmi les plus anciens d'Europe contenant de l'ambre (Azar, 2007 ; Maksoud et Azar, 2020).

III.3.1. Contexte de l'étude

Les ambres libanais sont ainsi les plus anciens ambres du Gondwana, et la faune présente sous forme d'inclusions a été bien décrite, avec plus de 180 taxons identifiés (Maksoud et Azar, 2020 ; Veltz et al., 2013).

Les premières études portant sur les ambres du Liban sont datées du début du XIX^{ème} siècle (Botta, 1831; Cuinet, 1896; Desmaret, 1811). Celles-ci montrent que près de 10% de la surface du Liban est associée à de l'ambre. La plupart des affleurements sont datés du Crétacé inférieur (du Néocomien à l'Aptien inférieur ; de -145 à -100 Ma). Cependant, parmi les 350 affleurements, une quinzaine sont datés du Jurassique supérieur (Kimmeridigen ; -155 à -149 Ma), un est daté de l'Albien (-113 à -100 Ma) et un autre du Cénomanien (-100 à -94 Ma) (Azar, 2012 ; Azar et al., 2003 ; Azar et al, 2010a).

Presque la totalité des ambres libanais est associée à des dépôts fluviatiles ou lacustres riches en matière organique et plus particulièrement en lignite. Alors que seule une faible partie des affleurements est liée à des dépôts littoraux intertidaux (Azar, 2007), la majorité des affleurements d'ambre correspondent à des dépôts

comprenant des lentilles de lignite avec des cuticules de plantes fossiles au milieu de bancs de grès ou de grès argileux appartenant à l'unité des « grès du Liban ». Ceuxci sont datés du Crétacé inférieur (Maksoud et al., 2017).

L'ensemble des sédiments repose sur des reliefs magmatiques datant du Jurassique. En effet, ceux-ci ont créé des reliefs dans une mer continentale de faible profondeur. Ces reliefs ont permis l'installation de végétation qui s'accumule entre les différents reliefs et/ou les failles au sein de ces reliefs (Azar et al., 2010).

L'âge des ambres libanais est discuté, ceux-ci n'étant pas forcément authigènes au sein des sédiments les contenant (Langenheim, 2003, Chapitre I). Une partie des auteurs place l'âge des ambres libanais entre le Hauterivien et le Barrémien (entre - 133 et 121 Ma; e.g. Poinar et Milki, 2001), tandis que d'autres les estiment se situer dans une plage de temps plus large, entre le Jurassique supérieur et l'Aptien basal (- 160 à -113 Ma; Dietrich, 1976).

Cependant, il est consensuel que la majorité des ambres libanais appartiennent à la période Néocomienne (Berriasien, Valanginien, Hauterivien et Barrémien) (Azar et al., 2010b ; Dietrich, 1976 ; Maksoud et Azar, 2020 ; Poinar et Milki, 2001 ; Veltz et al., 2013). Ces datations sont essentiellement basées sur l'étude des inclusions dans l'ambre (insectes, micro-organismes, etc ...).

Les analyses de micro-inclusions dans les ambres ainsi que l'analyse des cuticules associées aux sédiments contenant les ambres ont aussi permis de déterminer que le climat dans lequel la flore se développait devait être tropical à subtropical avec des températures chaudes et une pluviométrie importante (Maksoud et al., 2017 ; Maksoud et Azar, 2020 ; Veltz et al., 2013).

Études précédentes et origines botaniques des ambres libanais

Les premières études portant sur les ambres libanais étaient basées sur la spectroscopie infrarouge (IR) et la résonance magnétique nucléaire (RMN) (Azar, 2000 ; Azar et al., 2010b ; Lambert et al., 1996, 1995 ; Poinar et Milki, 2001). Ces analyses ont montré des ressemblances avec des ambres crétacés européens et les auteurs de ces études ont donc proposé une Araucariacée comme source botanique. Cependant, ces méthodes d'analyse globale, même si elles peuvent permettre de distinguer des ambres entre eux, ne peuvent pas conduire à identifier des

biomarqueurs robustes susceptibles de déterminer les origines botaniques des ambres. Poinar et Milki (2001) ont notamment décrit une Araucariacée nommée *Agathis levantensis* Poinar et Miki dont les restes fossiles sont fréquemment associés aux ambres et en ont conclu que cette Araucariacée serait à l'origine des ambres libanais. D'autres auteurs ont toutefois noté que ce fossile n'est pas présent dans l'ensemble des affleurements contenant de l'ambre (e.g. Azar, 2012 ; Azar et al,, 2010a). En outre, les études xylologiques ont montré qu'il existait également des restes fossiles d'autres espèces d'Araucariacées (*Araucaroxylon sp.*) et de Cheirolepidiacées (*Protocarpoxylon sp.*) (Penney, 2010) dans les sédiments où ces ambres ont été trouvés. Il est donc difficile, à partir de l'analyse spectrale et de l'étude paléontologique des sédiments associés, d'établir l'origine botanique des ambres du Liban.

Pour trancher parmi diverses origines possibles, des études des composés volatils et semi-volatils des ambres crétacés ont permis de mettre en évidence que certains ambres libanais contenaient des composés communs avec les résines d'Araucariacées actuelles (McCoy et al., 2021 ; Nohra et al., 2013, 2015).

Des analyses d'ambre du jurassique d'Aintourine (Liban) par pyrolyse-GC-MS ont été réalisées (Vršanský et al., 2024). Celles-ci ont révélé qu'une majeure partie des composés présents dans cet ambre possédaient un squelette hydrocarboné apparenté à celui de l'acide abiétique (8). De faibles quantités de diterpénoïdes phénoliques tels que le ferruginol (2) et le totarol (46) ont également été détectées, ainsi que l'acide callitrisique (1), un composé commun chez les Cupressacées (Simoneit et al., 2018). Ces caractéristiques moléculaires sont similaires à celles des ambres de Fouras (Nohra et al., 2015), d'Espagne (El Soplao; Menor-Salván et al., 2016; 2010) et de l'île de Wight (Grande-Bretagne ; Bray et Anderson, 2008). Vršanský et al. (2024) en ont donc conclu que les ambres d'Aintourine auraient des Cheirolepidiacées pour origine. Cela est également cohérent avec la présence de restes fossiles de Protopodocarpoxylon et de Brachyphyllum (Cheirolepidiacées) associés à cet ambre. De plus, l'étude de Vršanský et al. (2024) a montré que les ambres d'Aintourine sont significativement distincts des ambres d'autres sites libanais tels que les ambres d'Hammana, mettant en évidence des sources distinctes pour les ambres trouvés sur des sites différents au Liban.

Présentation des échantillons

L'ensemble des échantillons d'ambre du Liban analysés provient de la collection personnelle de D. Azar (Université du Liban). Les ambres d'une dizaine d'affleurements au Liban et en Syrie (Jurassique à Cénomanien) ont été étudiés. Un seul grain d'ambre a été analysé pour chaque site.

III.3.2. Résultats et Discussion

Parmi l'ensemble des ambres libanais analysés, plusieurs grands types moléculaires peuvent être distingués. Le premier type moléculaire, le plus rare, est relié à un grain d'ambre provenant de Meyrouba. Le second type moléculaire est le plus répandu, car il correspond à celui de la majorité des grains d'ambre du Liban analysés. Un troisième type moléculaire correspond à celui des ambres du site de Sfiré.

Caractérisation moléculaire de l'ambre de Meyrouba (Lib 1)

L'ambre de Meyrouba est caractérisé par la présence exclusive de labdanoïdes (**Figure III.35**). Comme cela a été discuté auparavant (cf. partie sur les ambres Archingeay), le composé (**17**) est issu de la cyclisation de labdanoïdes de la série dite « régulière » (cf. **Figure III.9**), et il est donc logique de penser que l'ensemble des composés présents font partie de cette même série. Les composés principaux sont les labdanoïdes également décrits dans des ambres espagnols (Menor-Salván et al., 2016) que sont l'ambérène (**11**) et ses dérivés (e.g. (**25**), (**26**), (**62**)).

Il semblerait que l'ambre de Meyrouba ressemble aux ambres de Montbrun et de Sainte-Croix, caractérisés, notamment, par la prédominance du 4-méthylambérène (**64**) par rapport à l'ambérène (**11**), un type de prédominance assez rarement observé. Il semblerait donc que l'origine de ces ambres soit très proche et qu'ils puissent être issus d'un même genre botanique. Il a été proposé précédemment une origine parmi les Araucariacées pour les ambres de Montbrun/Sainte-Croix.

La résine à l'origine de cet ambre devait donc, à l'instar de celles à l'origine des ambres Montbrun/Sainte-Croix, être dominée par des labdanoïdes et probablement comprendre également quelques diterpènes tricycliques en plus faibles proportions comme l'actuelle résine d'*Araucaria araucana*. Cependant, ces résines semblent présenter (quasi) exclusivement des labdanoïdes possédant une fonction acide en C-4 sur le cycle A, contrairement à la résine probablement à l'origine labdanoïdes sans fonction acide sur le cycle A, contrairement à la probable résine à l'origine de l'ambre de Meyrouba.

Il est peu probable cependant que cet ambre soit issu de la résine d'*Agathis levantesis* comme cela avait été proposé précédemment par Poinar et Milki (2001). En effet, les résines actuelles du genre *Agathis* (Chapitre I, **Figure I.28**) sont co-dominées par les labdanoïdes et les diterpènes de la série de l'acide abiétique (8). Ce dernier compte d'ailleurs parmi les composés majoritaires des résines d'*Agathis moorei* (**Figure I.28**), d'*Agathis lanceolata* (**Figure I.28**).

En revanche, il est possible que la composition des résines des espèces anciennes du genre *Agathis* se rapprochent plus de celle des résines actuelles d'*Araucaria*, qui contiennent principalement des labdanoïdes et des diterpènes de la série de l'acide pimarique (**32**)/sandaracopimarique (**33**) (Azar et al., 2010).



Figure III.35. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un échantillon d'ambre de Meyrouba (Néocomien, Liban). En violet sont représentés les labdanoïdes. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques. Pour finir, comme cela a été discuté auparavant, il est peu probable, malgré les ressemblances avec les autres ambres du Crétacé inférieur de ce type, qu'ils proviennent tous d'une même espèce productrice, mais il demeure possible que les sources soient relativement proches phylogénétiquement.

Caractérisation moléculaire du second type moléculaire d'ambre du Liban (Lib 2)

Le second type d'ambre, d'après sa composition moléculaire, est dominée par les diterpènes dérivant de l'acide abiétique (8), de l'acide (iso)pimarique (32)/(55) et de labdanoïdes (Figure III.36) qui apparaissent, notamment, sous la forme d'hydrocarbures. Les trois séries diterpéniques semblent être présentes en proportions comparables, ce qui est plutôt typique des résines d'Araucariacées (Cox et al., 2007, Chapitre I, §I.2.3.1.5).

En effet, la résine d'*Araucaria cunninghami*, par exemple, (Chapitre I, **Figure I.26**) présente comme composés majoritaires l'acide abiétique (**8**), l'acide pimarique (**32**), un diterpène de la série du kaurane (**37**) et des dérivés de type labdanoïdes. Or ici, des composés diterpéniques tétracycliques tels que le composé (**35**), qui fait partie de la série du kaurane (**37**) ont également été détectés. La structure présentée pour le composé **35** sur la **Figure III.36** a été proposée sur la base de l'analogie de son spectre de masse (sous forme d'ester méthylique) avec celui de l'ester méthylique du dihydrostéviol (**83**) accessible dans la banque de spectres de masse NIST. Les diterpénoïdes tétracycliques sont communs chez les Araucariacées, où leur présence est le plus souvent localisée dans les feuilles (Lu et al., 2013). Ce type d'ambre présente donc des caractéristiques chimiques compatibles avec des résines d'Araucariacées.

Ce type moléculaire d'ambre présente, par certains aspects, des caractéristiques des résines actuelles d'*Agathis*. En effet, dans ces résines, les composés des séries de l'acide abiétique (**8**) et de l'acide pimarique/sandaracopimarique (**32**)/(**33**), ainsi que des labdanoïdes sont représentés en proportions presque égales. Par exemple, les constituants principaux de la résine d'*Agathis robusta* sont l'acide pimarique (**32**) et sandaracopimarique (**33**), l'acide communique (**7**) et ses dérivés, ainsi que l'acide abiétique (**8**) et ses dérivés (Chapitre I ; **Figure I.28.**).

Cependant, des variations moléculaires existent au sein de ce type d'ambre. Ainsi, l'ambre jurassique d'Aintourine, qui semble appartenir à ce type en raison, notamment, de la présence de diterpénoïdes tétracycliques, diffère d'autres ambres de cette catégorie par la présence de composés soufrés (**Figure II.37**), qui sont prédominants. Enfin, les résultats que nous avons obtenus ne concordent pas totalement avec ceux reportés dans le cadre d'études précédentes (Vršanský et al., 2024).

En effet, nous n'avons pas pu détecter de diterpénoïdes phénoliques. Inversement, aucun diterpénoïde tétracyclique n'a été mis en évidence par Vršanský et al. (2024). Il est possible qu'il existe donc plusieurs types d'ambre à Aintourine, un premier type présentant des diterpènes tétracycliques et le second non.



Figure III.36. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un échantillon d'ambre d'Aintourine (Jurassique supérieur, Liban). En violet sont représentés les labdanoïdes, en bleu les composés de la série de l'acide (iso)pimarique, en vert les composés de la série de l'acide abiétique et en marron les diterpénoïdes tétracycliques. Les cercles noirs correspondent à des diterpènes soufrés. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

La variabilité chimique au sein de ce type moléculaire est relativement importante. En effet, pour certains échantillons, la proportion d'hydrocarbures est beaucoup plus importante et une partie des composés n'a pu être identifiée. Cependant, une majorité d'entre eux présentent dans leur spectre de masse un fragment à m/z 123 qui est

assez typique des dérivés de diterpènes tétracycliques et un fragment à m/z 163 qui est commun dans le cas des hydrocarbures de la série du pimarane (Lu et al., 2013).

Les diterpènes tétracycliques étant surtout identifiés chez les Araucariacées (Lu et al., 2013), nous pouvons supposer que les ambres d'Aintourine proviennent d'une résine d'Araucariacées. Un ambre similaire présentant un diterpène tétracyclique a été analysé (Ambre de Sfiré ; **Figure III.37**). Celui-ci présente aussi les trois séries de diterpènes appartenant à la série de l'acide abiétique (**8**), de l'acide (iso)pimarique (**32**)/(**55**) et de l'acide communique (**7**).

D'autres similarités ont été aussi observées parmi les ambres de Sheabeh analysés, excepté que ceux-ci présentaient une distribution moléculaire avec des caractéristiques d'une matière organique encore plus mature. Les deux ambres (Aintourine et Sfiré) contiennent de l'acide callitrisique (1), ce qui n'est pas réellement cohérent avec une origine de type Araucariacées, ce composé étant essentiellement identifié dans les résines actuelles de Cupressacées (Anderson, 2006). Il est donc possible que ces deux ambres proviennent d'une résine de Cupressacées. Cependant, malgré leurs ressemblances, il est quasiment impossible qu'ils proviennent de la même source botanique du fait de l'important écart d'âge entre les deux ambres (Jurassique *vs.* Crétacé).



Figure III.37. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un échantillon d'ambre de Sfiré (Crétacé inférieur, Liban) En violet sont représentés les labdanoïdes, en bleu les composés de la série de l'acide (iso)pimarique, en vert les composés de la série de l'acide abiétique et en marron les diterpénoïdes tétracycliques. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Ce type moléculaire d'ambre du Liban est proche du type moléculaire **Arc 3** décrit pour le site d'Archingeay, excepté que l'ambre du Liban présente une proportion plus importante d'hydrocarbures, peut-être en raison d'une maturité plus élevée. Même s'ils ne partagent probablement pas une origine botanique commune, il est possible que ces ambres proviennent de sources végétales phylogénétiquement proches.

III.3.3. Conclusion et perspectives

Notre étude a permis de mettre en évidence une complexité chimique importante au sein des ambres du Liban, et deux types d'ambre ont ainsi été définis sur la base de critères moléculaires. Ces résultats vont à l'encontre de travaux précédents qui ont conduit à proposer que l'ambre libanais était produit par un unique producteur, *Agathis levantesis* (Azar et al. , 2010 ; Poinar et Milki, 2001). Nous proposons que ces deux

types moléculaires correspondent probablement à des ambres issus de résines d'Araucariacées.

Au sein des ambres appartenant à une même famille, il semble exister au moins deux sources distinctes. En effet, le type moléculaire identifié à Meyrouba semble très différent du type moléculaire identifié à Aintourine en termes de distribution moléculaire. Il est possible que les résines à l'origine de ces deux ambres appartiennent à deux genres distincts d'Araucariacées.

Notre échantillonnage ayant été relativement limité, avec seulement une douzaine d'échantillons d'ambre analysée, il est envisageable que d'autres types d'ambre puissent également exister. Par ailleurs, comme une partie des ambres du second type moléculaire présentent des composés dont la structure n'est pas élucidée, il pourrait être intéressant de les identifier d'un point de vue structural pour pousser plus en avant la caractérisation de ces ambres et de leur(s) origine(s) botanique(s).

III.4. La valchovite, un type d'ambre crétacé d'Europe de l'Est

III.4.1. Contexte de l'étude

Il n'existe que peu de dépôts d'ambre décrits en République tchèque et en Autriche. Actuellement, les principaux affleurements contenant de l'ambre dans ces pays sont datés du Crétacé (Cénomanien) ou du Cénozoïque (Eocène, Oligocène et Miocène) (Havelcová et al., 2018, 2016, 2014). La plupart des ambres de cette région sont connus par leurs noms minéralogiques, comme la duxite (cf. Chapitre IV), la neudorfite, la muckite, la studlovite et la valchovite. Ici, nous nous sommes intéressés à la valchovite qui englobe la majeure partie des ambres crétacés de la République tchèque et une partie des ambres crétacés autrichiens. Le nom valchovite provient de la ville Valchov (Moravie centrale), où a été décrit ce type d'ambre pour la première fois (Jehlička et al., 2004 ; Streibl et al., 1976).

Contexte géologique et origines botaniques de l'ambre

Les premières descriptions de la valchovite datent du XIX^{ème} siècle (Haidinger, 1845). Elle a été trouvée dans des sédiments datant du Cénomanien du bassin morave (République tchèque). Ces sédiments sont décrits comme étant des argilites et des grès typiques d'environnements fluvio-lacustres riches en matière organique et en pyrite, indiquant un milieu de dépôt anoxique et riche en soufre (Havelcová et al., 2016, 2014).

Les premières analyses moléculaires de valchovite ont été réalisées à l'aide de la Py-GC-MS par Streibl et al. (1976), qui ont analysé cinq échantillons et ont mis en évidence une homogénéité moléculaire entre ceux-ci. Il a alors été conclu que l'ensemble des valchovites analysées provenaient probablement d'une Araucariacée étant donné la proportion importante de labdanoïdes.

Cette hypothèse a été reprise par Havelcovà et al. (2016) qui ont réalisé l'analyse par GC-MS de l'ensemble des types d'ambres de République tchèque, et donc notamment celui correspondant à la valchovite. Il en est ressorti que les valchovites sont dominées par les labdanoïdes, avec notamment la détection du communol (**80**) et de l'acide communique (**7**).

Présentation des échantillons

Les échantillons de valchovite analysés proviennent de plusieurs collections. Un des échantillons est issu de la collection personnelle de C. Du Gardin et provient de Moravie (République tchèque) . Les deux autres échantillons de valchovite ont été fournis par J. Panczak (AGH University of Science and Technology, Faculty of Geology, Geophysics and Environmental Protection, Cracovie) et proviennent, respectivement, de République tchèque et d'Autriche.

III.4.2. Résultats et discussion

Les échantillons de valchovite analysés présentent des distributions moléculaires dominées par les labdanoïdes associés à quelques dérivés de l'acide pimarique (32)/sandaracopimarique (33) (Figure III.38). La distribution présentée sur la Figure II.37 ressemble fortement aux distributions obtenues pour les ambres du Mas d'Azil, de Fourtou et de Salignac-Sisteron (Figures III.21, III.28 et III.26, respectivement). Comme cela a été discuté auparavant (cf. la partie consacrée à l'ambre du Mas d'Azil), il est probable que l'ensemble de ces ambres soit issu de résines provenant de sources botaniques proches appartenant à la famille des Araucariacées. Cependant, l'écart d'âge entre les échantillons de valchovite et les échantillons français est relativement



important et peut se compter en dizaines de millions d'années. Il est donc peu probable qu'une même espèce soit à l'origine de l'ensemble de ces ambres.

Figure III.38. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un échantillon cénomanien de valchovite (République tchèque). En violet sont représentés les labdanoïdes et en bleu les composés de la série de l'acide (iso)pimarique. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Il est à noter qu'un des échantillons de valchovite analysé contient des proportions importantes de composés soufrés tels que les composés (**50/50**') et (**51/51**'). Cela est cohérent avec l'analyse géochimique des sédiments, qui a mis en évidence un taux important de soufre et de pyrite (Havelcová et al., 2016, 2014).

III.4.3. Conclusion

Les différents échantillons de valchovite analysés semblent présenter des caractéristiques moléculaires très similaires avec une prédominance de labdanoïdes et la présence de dérivés de l'acide pimarique (**32**)/sandaracopimarique (**33**). L'un d'entre eux contient par ailleurs une proportion significative de composés soufrés dérivant de ces mêmes séries diterpéniques et dont la présence est liée au caractère anoxique et favorable au développement de bactéries sulfato-réductrices du sédiment dans lequel la résine a été initialement enfouie. Ces résultats confortent l'hypothèse

d'une origine botanique commune pour tous les ambres de type valchovite et justifient ainsi l'utilisation d'une appellation unique pour ces ambres. Les distributions moléculaires de ces ambres sont proches de celles observées pour les ambres de Salignac-Sistéron (Cénomanien), Fourtou (Cénomanien) et du Mas d'Azil (Maastrichtien). Il est donc vraisemblable que les résines à l'origine de ces ambres soient proches et soient issues de producteurs de la famille des Araucariacées. Cette interprétation rejoint celles qui avaient été proposées à partir des études paléontologiques et chimiques réalisées précédemment (Havelcová et al., 2016 ; Streibl et al., 1976).

III.5. Synthèse et perspectives : les grands producteurs d'ambre au Crétacé dans les forêts de l'actuelle Europe

Principales familles productrices en Europe au Crétacé

L'étude d'une partie des ambres crétacés et jurassiques d'Europe a donc permis de mettre en évidence qu'il a existé une grande diversité de producteurs de résine à l'origine des ambres durant ces périodes. Les principaux producteurs font partie de la famille des Cupressacées, de celle des Araucariacées et de celle des Cheirolepidiacées, les ambres de Cupressacées et d'Araucariacées étant largement majoritaires parmi les ambres étudiés. Ainsi, les ambres de Cupressacées sont majoritaires par exemple parmi les ambres de Charente-Maritime et d'Anjou tout comme parmi les ambres santoniens de Provence, alors que les ambres provenant du sud-ouest français, d'Espagne (Teruel, Alava), du Liban et d'Autriche-Tchéquie (valchovite) sont plutôt issus d'Araucariacées.

Il apparaît qu'il existe même, au sein des différentes familles, une certaine variabilité chimique. Par exemple, l'ensemble des ambres de Cupressacées étudiés peuvent présenter des caractéristiques moléculaires très différentes. Les ambres d'Archingeay (Arc 1) présentent, par exemple, en majorité des labdanoïdes ainsi que de l'acide callitrisique (1) et des dérivés de l'acide pimarique (32)/sandaracopimarique (33), alors que les ambres de Uña sont plutôt dominés par l'acide pimarique (32)/sandaracopimarique (33). De même, les ambres de cette famille ne présentent pas systématiquement de diterpénoïdes phénoliques (p. ex., ambre de la Bouilladisse) ou de biomarqueurs spécifiques comme le cédrène/cuparène (59)/(5) (p. ex. ambre

d'El Soplao). Cependant, la plupart des ambres de cette famille présente au moins un marqueur typique de Cupressacées. De grands types moléculaires ont cependant pu être dégagés au sein de cette famille.

De la même façon, au moins quatre types moléculaires ont été mis en évidence chez les Araucariacées. Le premier type moléculaire se caractérise par la présence exclusive de labdanoïdes. Les ambres de ce type ont été trouvés sur un grand nombre de sites (Saint-Lon-Les-Mines, Archingeay, Montbrun/Sainte-Croix, Meyrouba, Alava, Teruel). Les ambres de Montbrun/Sainte Croix constituent un cas particulier car les composés majeurs de ces ambres sont des labdanoïdes qui n'ont pas été déméthylés en position C-4 sur le cycle A, indiquant que les labdanoïdes dont ils dérivent ne portaient pas de fonction acide carboxylique ou méthylène fonctionnalisé en C-4, sur le cycle A. Ce type d'ambre exclusivement constitué de labdanoïdes est remarquable dans le sens où il n'existe pas de résines actuelles contenant uniquement ce type de diterpènes. Outre la possibilité qui ne peut être exclue de l'existence d'une espèce d'Araucariacée produisant une résine purement constituée de labdanoïdes ayant existé dans le passé, mais désormais éteinte, une seconde source possible pour ce type d'ambre peut être envisagée. En effet, en partant d'une résine d'Araucariacée initialement riche en labdanoïdes et plutôt pauvre en diterpènes des autres séries, il est possible qu'au cours de la diagenèse, la composante résinique macromoléculaire riche en labdanoïdes ait progressivement relargué des diterpènes appartenant à cette série par maturation, masquant ainsi progressivement la contribution des diterpénoïdes des autres séries originellement présentes dans la résine.

Le second type est relativement proche excepté que celui-ci est caractérisé par la présence des dérivés de l'acide (iso)pimarique (**32**)/(**55**). Il est également assez répandu (ambre du Mas d'Azil, de Salignac-Sisteron, de Fourtou/Sougraine et valchovite). Ces deux types moléculaires ressemblent à la résine actuelle d'*Araucaria araucana*. Cependant, il n'est pas possible de les relier de façon certaine au genre *Araucaria*. En effet, les résines de certaines espèces du genre *Araucaria* n'ont pas du tout ce type de distribution moléculaire et présentent des distributions qui peuvent, par exemple, être dominées par les composés de la série de l'acide abiétique (**8**) comme *Araucaria heterophylla* (Chapitre I, **Figure I.26**).

Cependant, les résines du genre *Agathis* que nous avons étudiées présentaient toutes des composés de la série de l'acide abiétique (**8**), contrairement aux résines issues du genre *Araucaria* (Cox et al., 2007; Chapitre I, §I.2.3.1.5.).

Le dernier grand type moléculaire associé aux Araucariacées présente des labdanoïdes, des dérivés de l'acide abiétique (8) et des acides pimarique (32) / sandaracopimarique (33) en proportions comparables (El Soplao, Aintourine, Sfiré, Archingeay Arc 3). Celui-ci est un type moléculaire bien plus rare mais reconnaissable, cependant, par la présence de composés apparentés aux diterpènes tétracycliques, plutôt typiques des Araucariacées (Lu et al., 2013). Une contribution importante de l'acide abiétique (8) parmi les constituants de la résine est rencontrée actuellement dans les résines d'*Agathis*. Il est donc possible que les résines à l'origine de ces ambres soient plutôt affiliées à ce genre.

Pour finir, notre étude a permis de dégager et confirmer les caractéristiques moléculaires des résines de Cheirolepidiacées, une famille éteinte de conifères. Celleci était considérée comme une famille productrice majeure de résine durant le Crétacé (p. ex. Langenheim, 2003 ; Menor-Salván et al., 2009 ; Nohra et al., 2015). Des études précédentes portant sur les cuticules de *Frenelopsis* (une Cheirolepidiacée) ont montré la présence de diterpénoïdes phénoliques (Menor-Salván et al., 2009 ; Nguyen Tu et al., 2000). Les premières études sur la chimie de cette famille ont donc conduit à proposer que les diterpénoïdes phénoliques étaient des constituants des résines de Cheirolepidiacées, à l'instar des résines de Cupressacées/Podocarpacées. De plus, il est également apparu que ces résines devaient aussi présenter un grand nombre de composés de la série de l'acide l'abiétique (**8**) (Bray et Anderson, 2008 ; Najarro et al., 2010 ; Nguyen Tu et al., 2000).

Afin de vérifier ces hypothèses, notre étude a ciblé deux sites : Scorbé-Clairvaux et Piolenc, qui présentent des affleurements contenant de l'ambre ainsi que de nombreux restes fossiles de *Frenelopsis*. Il s'avère que les ambres des deux sites présentent une contribution majeure de dérivés de l'acide (iso)pimarique (**32**)/(**55**) et de l'acide abiétique (**8**), ce qui est une caractéristique des résines de Pinacées/Araucariacées actuelles. Les ambres de Scorbé-Clairvaux présentent, en plus, des diterpénoïdes phénoliques en proportions significatives, ce qui est plutôt une caractéristique des résines de Cupressacées/Podocarpacées. Nous en avons donc conclu que les ambres de Scorbé-Clairvaux proviennent effectivement de résines de Cheirolepidiacées, celles-ci partageant des caractéristiques moléculaires communes aux résines de plusieurs familles actuelles de conifères. Les ambres de Piolenc provenant des niveaux bas de l'affleurement sont plus difficiles à relier aux Cheirolépidiacées en

l'absence de diterpénoïdes phénoliques. Cependant, il est possible qu'à l'instar des Cupressacées actuelles, la quantité de diterpénoïdes phénoliques varie beaucoup entre les différentes résines. Il est aussi possible que les ambres de Piolenc aient été formés à partir de résines présentant à l'origine de faibles quantités de diterpènes phénoliques et que ceux-ci aient été altérés au cours de la diagenèse. Par la suite, ce type de distribution moléculaire a été mis en évidence dans le cas d'ambre provenant d'autres sites comme Fouras et La Garnache. Dans certains cas, il a été difficile de différencier les ambres de Cupressacées et de Cheirolepidiacées. Par exemple, dans le cas de l'ambre d'El Soplao, les dérivés de l'acide abiétique (**8**) sont présents, mais en faibles proportions, ce que l'on peut observer également chez certaines résines actuelles de Cupressacées (Cox et al., 2007 ; Chapitre I, §I.2.3.1.2.). De plus, il y a des restes fossiles de Cheirolepidiacées et de Cupressacées au niveau du site d'El Soplao. Les limites entre les caractéristiques moléculaires des résines de Cheirolepidiacées et celles des résines issues des autres familles proches des conifères sont donc parfois difficiles à établir.



III.6. Molécules citées dans le chapitre



CHAPITRE IV - ANALYSE D'AMBRES GÉOLOGIQUES EUROPÉENS DU CÉNOZOÏQUE : IDENTIFICATION DE DIFFÉRENTES SOURCES BOTANIQUES



IV.1. Introduction

La production d'ambre au cours des temps géologiques a été relativement épisodique, avec un premier gros épisode lors du Crétacé (Langenheim, 2003, cf. Chapitre II) suivi par un second épisode durant le Cénozoïque, et plus particulièrement pendant l'Eocène (-56 à -34 Ma) et le Miocène (-23 à -5 Ma). Durant ces périodes du Cénozoïque, les grandes familles de plantes actuelles étaient déjà présentes et la production végétale (i.e. formation de biomasse végétale) a été relativement importante (Eberle et Greenwood, 2012 ; Konrad et al., 2023). Comme cela a été discuté dans les chapitres précédents, une production considérable d'ambre semble être reliée à un climat plutôt chaud et subtropical (Langenheim, 2003). C'est notamment durant l'Eocène que les plus hautes températures jamais observées sur Terre auraient été enregistrées, particulièrement durant l'Optimum Climatique de l'Eocène, où des espèces tropicales ont été trouvées aux Pôles (Zachos et al., 2008). Par la suite, le climat s'est légèrement refroidi jusqu'à la fin du Miocène, où on observe une chute de la température globale océanique associée à la mise en place des cycles glaciaires/interglaciaires tels qu'on les connaît actuellement. Ce chapitre est consacré à l'étude d'ambres européens datés de cette période.

La première partie de ce chapitre sera dédiée à la description des principaux dépôts d'ambre en Europe datés du Cénozoïque, les dépôts baltiques, les ambres baltiques étant actuellement trouvés principalement sur les rivages de la mer du même nom. Cette dénomination est très ancienne et provient du latin succinum qui signifie suc, résine. Dans la littérature, la succinite baltique a une origine botanique incertaine puisque différentes études peuvent l'associer aux Pinacées (Conwentz, 1890 ; Schubert, 1961 ; Larsson, 1978) aussi bien qu'aux Araucariacées (Gough et Mills, 1972). L'analyse par GC-MS d'extraits lipidiques d'échantillons d'ambre de la Baltique nous a permis, dans cette partie, de présenter les principales caractéristiques moléculaires de ce type d'ambre et de discuter de son origine botanique potentielle,en comparant les distributions moléculaires avec celles d'ambres d'autres sites de l'Eocène et de résines de conifères actuelles provenant d'espèces végétales bien identifiées.

Une deuxième partie de ce chapitre traitera des « ambres frères » des ambres baltiques, les ambres de la région de Bitterfeld (Allemagne), qui sont des ambres

proches en termes de distance géographique, mais aussi en âge estimé (e.g. Kosmowska-Ceranowicz et Krumbiegel, 1989 ; Langenheim, 2003 ; Wimmer et al., 2008). Les études spectrales mettent en évidence qu'une grande majorité des ambres de Bitterfeld contiennent de l'acide succinique (1), à l'instar des ambres baltiques, et sont donc aussi nommés succinites (Barthel et Hetzer, 1982; Knuth et al., 2002b; Kosmowska-Ceranowicz et Krumbiegel, 1989). Cependant, certaines études montrent qu'outre ces succinites, il existe d'autres types moléculaires présents à Bitterfeld (e.g. Beck et al., 1965; Kosmowska-Ceranowicz et Krumbiegel, 1989; Standke, 2008; Yamamoto et al., 2006). Dans cette partie, le lien entre succinites de Bitterfeld et succinites baltiques et leur origine potentiellement commune seront donc discutés. Associés à ces succinites, d'autres types d'ambres avec des distributions moléculaires ne contenant pas d'acide succinique ont été trouvés dans la région saxonne, à proximité de la localité de Bitterfeld. Ces types incluent des ambres nommés glessite, krantzite, siegburgite, goitschite et gédanite dans la littérature (Knuth et al., 2002 ; Yamamoto et al., 2006). Cette partie sera dédiée à l'analyse par GC-MS d'extraits des différentes catégories d'ambre de la vallée saxonne et à leur affiliation à différentes origines botaniques. La justification de cette distinction entre différents types d'ambres et de la dénomination de ces différents types moléculaires sera discutée. L'implication de l'existence des différentes sources botaniques à l'origine de ces ambres dans la compréhension de la dynamique écologique des forêts de la région saxonne durant l'Éocène sera aussi discutée dans cette partie.

Une troisième partie de ce chapitre sera consacrée à un type d'ambre particulier nommé Duxite trouvé en Europe centrale. Cet ambre, principalement originaire de la République tchèque, est généralement associé à des intrusions magmatiques (e.g. Havelcová et al., 2018 ; Krumbiegel, 2002). Classé dans une catégorie à part par Anderson (1995), cet ambre présente des caractéristiques moléculaires particulières qui seront détaillées. Son origine botanique et l'implication des intrusions magmatiques sur la fossilisation de résines végétales seront aussi discutées dans cette partie.

Une quatrième partie s'intéressera au type d'ambre le plus abondant en France : l'ambre de l'Oise.

Dans la littérature, l'ambre de l'Oise se rapproche des ambres dominicains et mexicains et aux copals africains. Celui-ci est par conséquent relié aux Fabacées, qui sont des Angiospermes dont les résines sont dominées par des diterpénoïdes
(Jossang et al., 2008 ; Langenheim et Beck, 1965 ; Riquelme et al., 2014 ; Stach et al., 2021, cf. Chapitre I). Si ces ambres sont associés à cette même famille botanique, la littérature place tout de même le producteur de l'ambre de l'Oise dans un genre différent de ses cousins américains et africains. Ce point sera débattu à l'aide des analyses moléculaires, qui mettent en évidence des différences d'assemblages moléculaires entre les ambres/copals de ces différentes origines.

IV.2. L'ambre baltique ou succinite, la source d'ambre la plus importante en Europe

L'ambre baltique est l'ambre le plus étudié et exploité par l'Homme au cours de l'Histoire. En effet, les premières références à cet ambre datent de l'Antiquité, celui-ci étant principalement utilisé pour la fabrication de bijoux depuis le Néolithique (Chapitre V). D'un point de vue paléontologique, celui-ci est aussi très intéressant, car il contient de nombreuses inclusions d'organismes (Penney et Green, 2010). Principalement trouvé le long des plages de la Mer Baltique, l'ambre baltique est un mystère quant à son origine botanique (Langenheim, 2003 ; Weitschat et Wichard, 2002).

IV.2.1. Contexte de l'étude

IV.2.1.1. Aspect de l'ambre balte et présentation des échantillons

L'aspect macroscopique des ambres baltiques est relativement varié avec des couleurs pouvant varier du jaune clair au rouge très foncé, voire au noir.

Certains rares spécimens peuvent même être verts ou bleus. Plus de 200 variétés de couleurs sont décrites dans la littérature (Weitschat et Wilfried, 2002, 2010). L'opacité occasionnelle de l'ambre est liée à la présence de micro-inclusions (Weitschat et Wilfried, 2002).

Les échantillons étudiés ici proviennent de plusieurs sites de la Baltique et sont issus principalement des collections du Musée de Minéralogie de Strasbourg et d'ambre baltique commercial acheté dans le cadre du projet « Origine et façonnage d'ambres archéologiques » (Appel à projet MITI-CNRS 2023 : Défi nouvelles frontières de l'archéologie : connaissance et préservation des matériaux anciens) auquel je participe

dans le cadre de cette thèse (collaboration entre l'équipe de Biogéochimie Moléculaire et M. Mischler, E. Boës et S. Diemer, INRAP Grand Est). Les ambres de la collection de Strasbourg étaient tous étiquetés « succinites » et proviennent des côtes de la Mer Baltique ou de la péninsule du Samland. D'autres échantillons provenant de Żuławy (Pologne) possédant des couleurs non usuelles et provenant des collections personnelles de C. du Gardin ont aussi été analysés. Outre ces échantillons provenant de la zone autour de la mer Baltique, des échantillons provenant du Groenland et du Spietzberg, offerts par le Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris, ont aussi été analysés à titre de comparaison.

Certains autres échantillons, provenant du Musée National de Varsovie, ont été étudiés dans le cadre d'une collaboration avec Jan Pańczak (doctorant, Université de Cracovie, Pologne), ainsi que certains autres échantillons issus de la collection privée de J.M. Pouillon.

IV.2.1.2. Âge et description des dépôts sédimentaires associés à l'ambre baltique

Une partie de l'ambre baltique est trouvé sur les bords de la mer Baltique (**Figure III.1**). Cet ambre provient de couches sédimentaires situées sous le niveau de la mer, qui ont été progressivement érodées par les vagues, entraînant ainsi le remaniement de l'ambre contenu dans ces strates. Cependant, il est possible d'avoir accès à certains de ces sédiments sur les bords de mer, dans des fjords glaciaires (Weitschat et Wichard, 2002, 2010). Par exemple, dans la péninsule du Samland, il est possible d'apercevoir les différentes couches sédimentaires contenant l'ambre baltique (Weitschat et Wichard, 2002).

Des dépôts contenant de l'ambre baltique sont aussi visibles dans les terres, particulièrement en Europe de l'Est. Ceux-ci sont cependant des dépôts secondaires (i.e. ayant subi un remaniement). Il est supposé en effet que durant les différentes glaciations, une partie des sédiments contenant de l'ambre baltique ait été chariée par des glaciers jusqu'au centre de l'Europe. Ces remaniements expliquent l'étendue du dépôt de l'ambre baltique, formant ainsi le dépôt le plus large du monde (Langenheim, 2003).

L'origine paléogéographique de l'ambre baltique est en revanche mal connue. En effet, à l'Eocène, une grande partie de l'Europe de l'Est devait être recouverte par d'immenses forêts comprenant une ou des essences végétales à la source de résine qui deviendra l'ambre baltique (Weitschat et Wilfried, 2002, 2010). En effet, un climat très chaud et humide a permis le développement de forêts « tropicales » et « subtropicales » favorables au développement d'espèces végétales à la base de la production importante de résine (Langenheim, 2003). Les dépôts sédimentaires hypothétiques de l'ambre baltique devaient donc recouvrir l'ensemble de la zone où s'étendaient ces forêts recouvrant l'Europe de la Fennoscandie à l'Ukraine (Langenheim, 2003 ; Wolfe et al., 2016). La forêt baltique, extrêmement humide, était soumise à des inondations saisonnières qui emportaient via des rivières et des fleuves les bois et la résine qui leur était associée (Weitschat et Wilfried, 2002, 2010).

Au niveau de deltas, un taux de sédimentation important a ainsi conduit à un enfouissement rapide de la matière organique (dont la résine végétale), avec une bonne préservation de celle-ci (Kosmowska-Ceranowicz et al., 1996). La mer Baltique étant en phase de transgression et progressant vers l'Est, l'espace d'accommodation (c.-à-d. l'espace disponible pour la sédimentation) a donc été important. Les sédiments auxquels est associé l'ambre baltique sont donc essentiellement des sédiments deltaïques, donc plutôt associés à des environnements saumâtres à marins. Ces dépôts sont ainsi contemporains de l'ambre baltique, et même s'ils ne proviennent pas directement de l'environnement où a été produite la résine, ceux-ci peuvent être considérés comme les dépôts autochtones (c.-à-d. n'ayant pas subi de remaniement) et synchrones. Une grande partie de ces dépôts sont actuellement érodés par l'action des vagues, dans la mer Baltique, expliquant ainsi l'abondance d'ambre sur les plages de celle-ci. (Figure IV.1). Les sédiments autochtones contenant les plus grandes quantités d'ambre baltique sont nommés « blue earth », leur couleur bleue étant due à la présence de glauconite, un phyllosilicate de teinte bleu glauque à bleu vert. Ils sont principalement trouvés au nord et nord-ouest de la péninsule du Samland, dans le district russe de Kaliningrad (Arnold, 1998 ; Berry, 1927 ; Weitschat et Wilfried, 2002). L'épaisseur de cette couche varie entre 2 et 10 m et peut contenir plusieurs kg d'ambre par m³.



Figure IV.1. Carte représentant la zone entourant la Mer Baltique. En jaune, les zones où se situent les ambres baltiques charriés par la mer. En rouge, les principaux sites dans les terres où les ambres de type « succinites » sont extraits. D'après Weitschat et Wilfried, 2010.

Sur les bordures de la mer Baltique, ces sédiments se trouvent au niveau de la mer, tandis que dans les terres, ceux-ci sont recouverts de 30 à 40 m de sédiments plus récents ne contenant pas d'ambre (**Figure IV.2**).

Une première estimation de leur âge a été réalisée par Noetling (1883 ; 1886), qui date ces sédiments de l'Oligocène (-38 Ma) à partir de l'analyse des organismes marins contenus. Une datation absolue réalisée plus récemment par Odin et Lutterbacher (1992) sur la glauconite contenue dans les sédiments permet de dater celle-ci du Lutécien (milieu de l'Eocène ; -47 à -41 Ma). D'autres dépôts plus anciens, nommés « wild earth », sont également visibles dans la péninsule du Samland. Ceux-ci sont les plus vieux sédiments associés à l'ambre baltique et sont datés de l'Éocène inférieur (-55 à -40 Ma), mais ils ne contiennent que des quantités faibles d'ambre.



Figure IV.2. Schéma représentant une coupe de la côte proche de Yantarnyi (district de Kaliningrad, Russie). D'après Weitschat et Wichard (2010).

De plus, durant le Pléistocène, lors des différentes glaciations, des remaniements massifs des sédiments contenant l'ambre balte ont eu lieu. En effet, des glaciers provenant de la Scandinavie ont engendré des déplacements de gigantesques masses de roches, incluant les sédiments marins contenant l'ambre évoqué précédemment jusqu'aux terres intérieures (Weitschat et Wilfried, 2002, 2010. C'est pourquoi de nombreux morceaux allochtones (i.e. ayant subi des remaniements et donc ayant été déplacés après leur dépôt) de « blue earth » et « wild earth » peuvent se trouver dans des sédiments pléistocènes à l'intérieur des terres (Weitschat et Wilfried, 2002, 2010).

Cela explique donc que l'ambre baltique recouvre une immense partie de l'Europe, des contours de la Mer Baltique aux bordures de l'Ukraine (Langenheim, 2003).

IV.2.1.3. Origines possibles de l'ambre baltique

Les premières études des fossiles associés à l'ambre baltique datent du milieu du XIX^{ème} siècle, avec les descriptions de Goeppert (1836) qui constate que l'ambre baltique est essentiellement associé à un conifère qu'il considère comme l'unique producteur de la succinite. L'étude de bois et de cônes de résineux fossiles trouvés dans l'ambre baltique place ce producteur potentiel dans la famille des Pinacées et a été nommé *Pinites succinifera* (Goeppert, 1850 ; Goeppert et Berendt, 1845). Plus tardivement, Conwentz (1890) décrit ce bois fossile comme ayant des caractéristiques mixtes de sapin et de pin, et donc rapproche la source botanique du genre *Pinus* et le nomme *Pinus succinifera*. Ces analyses botaniques ont été par la suite confirmées par des études paléontologiques et paléohistologiques des morceaux de fossiles de végétaux dans l'ambre (Arnold, 1998 ; Schubert, 1961 ; Turkin, 1997).

Cependant, la présence de ces fossiles dans l'ambre n'est pas forcément indicatrice d'une filiation ambre/espèce végétale. En effet, il existe dans l'ambre baltique de nombreux fossiles, animaux et végétaux notamment, qui n'ont pas forcément de lien avec l'origine botanique de celui-ci. La résine s'écoulant le long du tronc d'arbre et tombant souvent dans la litière du sol, elle peut piéger des organismes n'étant pas forcement en relation avec celle-ci, mais avec son environnement (Langenheim, 2003). À ce jour, aucun échantillon fossile de bois de *Pinus succinifera* contenant de l'ambre directement localisé dans des canaux résinifères n'a été mis au jour. Il est

donc possible que l'essence végétale à l'origine de la résine dont est issu l'ambre baltique soit différente du bois et des cônes fossiles identifiés dans l'ambre et supposés appartenir au genre *Pinus*.

Au début du XX^{ème} siècle, des premières tentatives d'études chimiques de l'ambre baltique ont été réalisées et ont été consacrées, notamment, au titrage des acides présents dans l'ambre. Il a ainsi été mis en évidence que l'ambre baltique contenait un acide, nommé acide succinique (1) (acide butane-1,4-dioïque ; **Figure IV.3.**), qui est relativement facile à titrer (Viollet et Reutter, 1916).

Malheureusement, par la suite, il s'est avéré que la méthode de titration utilisée ne permettait pas de différencier l'acide succinique des autres acides présents dans l'ambre (du Gardin, 1986). Ainsi, cette méthode n'a pas permis de proposer des origines botaniques pour les ambres analysés et permettait uniquement de faire la distinction entre ambres contenant de l'acide succinique et ambres n'en contenant pas.



Figure IV.3. Structure de l'acide succinique (ou acide butane-1,4-dioïque) (1)

Des études spectrales menées ultérieurement et basées sur la spectroscopie infrarouge ont été effectuées sur plus de 2 500 échantillons d'ambre provenant de différents sites à l'échelle mondiale (Beck et al., 1965 ; Beck, 1986 ; Langenheim et Beck, 1965). Cette méthode a ainsi permis d'établir une première classification basée sur la chimie des ambres (cf. Chapitre I) et plus particulièrement sur la partie macromoléculaire des ambres. Ainsi, au sein des ambres baltiques, il a été mis en lumière sur la base des analyses spectrales par spectroscopie infrarouge que plus de 99% des ambres étaient chimiquement identiques. Le type chimique majoritaire, identifié par Viollet et Reutter (1916) comme contenant de l'acide succinique (1), a été nommé par la suite *succinite*. Il a été proposé par Mills et White (1987) que l'acide succinique ferait partie de la composante insoluble de l'ambre baltique et que celle-ci serait constituée de labdanoïdes polymérisés et d'acides succiniques. Cette hypothèse a été confirmée par Poulin et Helwig (2014) qui ont pu mettre en évidence, à l'aide de la pyrolyse-GC-MS, que l'acide succinique (1) reliait bien des unités labdanoïdes dans

les ambres baltiques. Les autres classes d'ambre ne possédant pas d'acide succinique (1) et qui peuvent parfois accompagner les succinites sont extrêmement rares dans la péninsule du Samland et le long des plages baltiques et seront présentées dans la partie suivante (ambre de Bitterfeld).

Ces études spectroscopiques ont également permis de mettre en évidence que les ambres baltiques présentent des spectres infrarouges extrêmement proches, avec une absorption particulière entre 1250 et 1175 cm⁻¹, nommée « épaule baltique », observée uniquement dans le cas des ambres baltiques (Beck, 1986 ; Langenheim et Beck, 1965). Cela va dans le sens de l'hypothèse selon laquelle l'immense majorité de l'ambre baltique provient de la même source botanique, comme cela a été proposé sur la base d'études paléontologiques (Berry, 1927 ; Conwentz, 1890 ; Schubert, 1961).

La comparaison avec des résines actuelles a également été effectuée en utilisant la spectroscopie infrarouge. Il a ainsi été mis en évidence que les spectres infrarouge de l'ambre baltique possèdent plus de similarité avec les résines d'Araucariacées (*Agathis australis*) qu'avec les résines de Pinacées (Langenheim et Beck, 1965 ; Thomas, 1969). De plus, les Araucariacées tropicales et subtropicales produisent d'importantes quantités de résine contrairement aux pins actuels. Basées sur ces arguments, certaines études viennent appuyer l'hypothèse d'une filiation entre ambre baltique et Araucariacées par comparaison avec les caractéristiques écologiques des Araucariacées productrices de résines actuelles (Kurcharska et Kwiatkowska, 1978 ; Poinar, 1992). Toutefois, nous pouvons noter que la comparaison entre résines actuelles et ambre présente des limitations, notamment liées au fait que les spectres infrarouges d'ambre vont être fortement influencés par le degré d'altération des échantillons considérés.

Des études moléculaires basées sur la spectrométrie de masse ont mis en évidence que l'acide succinique (1), composé majeur de l'ambre de la Baltique, n'est jamais trouvé dans les résines d'Araucariacées (Frezza et al., 2020 ; Wolfe et al., 2016). De plus, des analyses ont mis en évidence qu'en dehors de l'acide succinique (1), les ambres baltiques présentent en majorité des diterpènes de la série de l'acide abiétique (2) et (iso)pimarique (3/4), qui ne sont pas les diterpènes dominants chez les Araucariacées (Czechowski et al., 1996 ; Mills et al., 1984). Wolfe et al. (2009) ont donc proposé une nouvelle origine botanique potentielle, les Sciadopityacées, une

famille rare actuellement (il n'en existe qu'une seule espèce de nos jours), dont le spectre infrarouge de la résine présente un épaulement très similaire à celui des spectres infrarouges de l'ambre baltique.

En revanche, à ce jour, aucun fossile appartenant aux Sciadopityacées n'a été retrouvé directement associé à l'ambre baltique, ce qui irait à l'encontre d'une telle hypothèse. Wolfe et al. (2016) ont également comparé les spectres infrarouges de la résine de l'espèce actuelle de Sciadopityacées avec ceux d'échantillons d'ambre baltique, les similitudes observées confirmant, selon ces auteurs, une filiation entre l'ambre baltique et un précurseur botanique de la famille des Sciadopityacées.

Toutefois, comme nous l'avons évoqué précédemment, cette approche analytique présente ses limitations, liées notamment à l'influence du degré d'altération au niveau des spectres infrarouge, qui, de toutes manières, ne fournissent que des caractéristiques très globales de l'objet étudié. L'hypothèse d'une origine parmi les Pinacées ne peut pas de ce fait être rejetée, d'autant plus qu'il a été découvert dans cette famille des espèces actuelles produisant des dérivés d'acide succinique (1), dont des associations acide succinique/diterpénoïdes (Jiang et al., 2022 ; Xue et al., 2004 ; Zinkel et al., 1991), bien que ces dernières aient été identifiées dans des compartiments des végétaux autres que dans les résines (notamment aiguilles et écorce).

Par ailleurs, des études palynologiques viennent également appuyer cette hypothèse et montrent que les pollens majoritaires dans l'ambre baltique sont rattachés à des pollens de Pinacées (Arnold, 1998 ; Turkin, 1997).

L'ambre baltique étant principalement trouvé dans des sédiments relativement distaux de leur lieu de production originel, il est difficile d'appréhender le paléoenvironnement dans lequel pouvaient évoluer les espèces végétales à l'origine de cet ambre. Des études de fossiles provenant de forêts contemporaines à la forêt baltique ont été effectuées pour comparaison, afin de proposer potentiellement des origines botaniques.

Notamment, sur l'île d'Axel Heiberg, dans la partie arctique du Canada, des spécimens très bien conservés de fossiles de végétaux datant de la même période (Éocène) ont été découverts. Les espèces végétales principales appartiennent aux Taxodiacées des genres *Metasequoia* et *Glyptostrobus*, ainsi qu'aux Pinacées avec des fossiles du genre *Pinus* et *Pseudolarix* (Anderson et LePage, 1995).

En outre, l'analyse par Py-GC-MS d'un échantillon de bois fossile de *Pseudolarix* par Anderson et LePage (1995) a montré que celui-ci contenait de l'acide succinique (1). Bien que les fossiles étudiés ici soient issus d'une forêt du même âge que celle associée à l'ambre baltique, cette forêt était toutefois située à une haute latitude, et il n'est donc pas évident d'effectuer une simple comparaison entre les fossiles issus d'un type de forêt à ceux liés à l'autre type. De plus, les labdanoïdes identifiés dans le cas des échantillons canadiens possèdent une configuration qui les rattache à des précurseurs comme l'acide ozique (5) (diterpénoïdes en série « enantio »), ce qui n'est pas le cas des labdanoïdes provenant de l'ambre baltique, qui appartiennent à la série « régulière » (comme l'acide communique (6) ; **Figure IV.4**).



Figure IV.4. Structure de labdanoïdes appartenant à la série « enantio » (cas de l'acide ozique (5)) et à la série « régulière » (cas de l'acide communique (6).

Anderson et LePage (1995) ont cependant proposé qu'il était possible qu'une autre espèce de *Pseudolarix* vivant dans des conditions tropicales puisse être à l'origine de l'ambre baltique. Ils ont noté en revanche qu'aucun fossile issu de *Pseudolarix*, à l'instar de fossiles provenant d'*Agathis* et de Sciadopityacées, n'est présent dans l'ambre baltique.

L'origine botanique de l'ambre baltique est donc loin d'être identifiée clairement. En effet, les observations paléobotaniques et palynologiques semblent indiquer plutôt une origine à partir de Pinacées, tandis que les études basées sur la spectroscopie infrarouge semblent indiquer plutôt une origine de type Araucariacées.

Afin de tenter d'apporter un élément de réponse à cette problématique concernant l'origine botanique de la succinite baltique, les extraits lipidiques d'un ensemble d'échantillons de succinite de divers sites ont été analysés par GC-MS et les distributions moléculaires ont été comparées à celles issues de résines actuelles. Les ambres baltiques n'étant pas directement trouvés dans leur environnement de production, il est extrêmement difficile d'avoir une idée de la diversité écologique et spécifique de leur environnement de dépôt. Afin de pallier ce problème, des ambres provenant de deux sites situés au Groenland et au Spitzberg, où de l'ambre supposé contemporain à l'ambre baltique a été trouvé, ont également été analysés afin de pouvoir faire une comparaison entre ambre baltique et ambre provenant de sites pour lesquels des informations concernant l'écosystème ont pu être obtenues par l'étude des fossiles.

IV.2.2. Résultats et discussion

IV.2.2.1. Caractéristiques moléculaires des échantillons

Les ambres étudiés, provenant des rivages de la mer Baltique ou de la mine du Samland, présentent des empreintes moléculaires montrant de grandes analogies (**Figure IV.5**). Par exemple, trois échantillons de morphologie distinctes provenant de différents sites des pourtours de la mer Baltique ont été analysés par GC-MS (**Figure IV.5**). Malgré des origines géographiques et des aspects distincts, il apparait que les trois échantillons présentent un cortège moléculaire proche.

Le chromatogramme en phase gazeuse annoté de l'échantillon C issu de la mine de Żuławy, au nord de la Pologne (échantillon provenant de sédiments deltaïques contemporains à la production de l'ambre) est présenté sur la **Figure IV.6.** Les composés majeurs sont l'acide sandaracopimarique (**7**) et ses dérivés (**Figure IV.6**).



Figure IV.5. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de fractions apolaires isolées à partir des extraits organiques méthylés de trois échantillons d'ambre provenant des pourtours de la mer Baltique. A) Échantillon provenant d'une plage baltique (musée de Minéralogie de Strasbourg). B) Échantillon provenant de Suède (collection personnelle de J.M. Pouillon). C) Échantillon provenant de la cuvette de Żuławy (collection personnelle de C. Du Gardin). En rouge, la zone contenant les dérivés d'acide succinique, en bleu, la zone contenant les composés dérivant de l'acide (iso)pimarique, et en vert la zone contenant les dérivés de l'acide abiétique.

Des dérivés de l'acide abiétique (2) sont également visibles dans la fraction apolaire, ainsi que l'acide agathique (8) et des labdanoïdes qui en dérivent (9) et (10) (Figure IV.6). Le composé (11) correspond, quant à lui, à un composé issu de la cyclisation diagénetique de l'acide cupressique (12) ou du torulosol (13) (De Lama Valderrama et al., 2022 ; Figure IV.7).

Des monoterpènes couplés par estérification à de l'acide succinique ont été identifiés sur la base de leur spectre de masse ((17), (18) et (19); Czechowski et al., 1996 ; Mills et al., 1984). Ceux-ci présentent un fragment caractéristique à 115 Da (Figure IV.8) et correspondent à des monoesters d'acide succinique estérifiés avec des alcools monoterpéniques (fenchol (24), bornéol (25), isobornéol (26) ; Figure IV.9).



Figure IV.6. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'un ambre baltique de Żuławy (Pologne). En bleu, les diterpénoïdes de la série de l'acide (iso)pimarique, en vert les diterpénoïdes de la série de l'acide abiétique, en violet les labdanoïdes et en rouge les dérivés de l'acide succinique. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.



Figure IV.7. Mode de formation hypothétique des composés (11) et (23). D'après De Lama Valderama et al. (2022).

Un ester de déhydroabiétol estérifié à de l'acide succinique (succinate de déhydroabiétyle (**20**)) a aussi été mis en évidence dans l'échantillon (**Figure III.6**). La présence de ces composés est cohérente avec l'hypothèse émise par Mils et al. (1984) et Poulin et Helwig (2014), notamment, sur la fonction de l'acide succinique (**1**) dans l'ambre baltique. En effet, ces auteurs considèrent que la constitution de la partie macromoléculaire de l'ambre de la Baltique fait intervenir des liaisons esters entre alcools terpéniques ou oligomères d'alcools terpéniques (poylabdanoïdes) et l'acide succinique.

Il est donc cohérent de trouver, dans la partie apolaire, des sous-unités provenant de la composante polymérique de l'ambre qui auraient été partiellement hydrolysées, ou alors qui n'auraient pas été intégrées dans la partie macromoléculaire de l'ambre.



Figure IV.8. Spectre de masse (IE, 70 eV) des composés (**17**), (**18**) et (**19**) présents dans l'ensemble des échantillons d'ambre baltique et structures hypothétiques associées. Les acides sont analysés sous forme d'esters méthyliques. Hypothèses structurales d'après Czechowski et al. (1996) et Mills et al. (1984).

Afin de vérifier que l'acide succinique (1) est en effet un constituant important de la partie macromoléculaire de l'ambre baltique où il jouerait le rôle d'agent réticulant lié par des liaisons esters, des expériences de butanolyse (HCI/BuOH) ont été effectuées à partir d'extraits organiques d'ambres, à partir des fractions polaires des extraits (F2, DCM/MeOH; cf. Matériel et Méthodes, Chapitre VI) ou encore à partir de la composante insoluble dans les solvants organiques de l'ambre. La **Figure III.10** présente le résultat d'une des expériences de butanolyse sur un échantillon d'ambre de la collection de J.M. Pouillon.



Figure IV. 9. Monoterpénols (fenchol (**24**), isobornéol (**25**) et bornéol (**26**)) *associés par estérification à l'acide succinique dans l'ambre baltique (Figure IV.4).*

La butanolyse a ainsi permis la libération de l'acide succinique (1) (sous forme de diester butylique) par transestérification des liaisons esters. La présence de monoesters d'alcools monoterpéniques indique que la butanolyse n'a pas été complète.



Figure IV.10. Chromatogramme (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire obtenue après butanolyse (BuOH/HCI) de la partie non solubilisée dans un mélange MeOH/CH₂Cl₂ (1:1, v/v) d'un ambre de la Baltique (collection J.M. Pouillon). En rouge, les esters butyliques dérivant de l'acide succinique (**1**).

L'obtention du diester butylique de l'acide succinique suite à la réaction de butanolyse montre que cet acide joue en effet un rôle dans la constitution de la partie macromoléculaire de l'ambre de la mer Baltique, comme l'avaient supposé Mills et al. (1984). Cependant, il est à noter que l'hydrolyse n'a pas libéré les acides terpéniques auxquels l'acide succinique était lié. Poulin et Helwig (2014) ont utilisé la Py-GC-MS pour explorer plus en avant la structure macromoléculaire de l'ambre baltique (**Figure IV.11**).

La pyrolyse provoquant la rupture de liaisons C-C au niveau des constituants macromoléculaires polylabdanoïdes de l'ambre, le résultat de l'analyse par py-GC-MS montre l'existence de dimères d'alcools terpéniques apparentés au communol (27) liés entre eux par un pont qui est constitué par l'acide succinique (1) (Figure IV.11). Mills et al. (1984) ont donc émis l'hypothèse que les entités macromoléculaires de l'ambre baltique possèdent une structure comme celle représentée en Figure IV.11 contenants des entités polylabdanoïdes liées au niveau des chaînes latérales de labdanoïdes par une liaison ester à l'acide succinique.

Dans le cas de la butanolyse, seules les liaisons esters sont hydrolysées. Les oligomères de labdanoïdes liés par des liaisons C-C ou des liaisons C-O (éthers) ne sont pas touchés par ce traitement et sont donc préservés sous forme macromoléculaire. De ce fait, possédant une masse moléculaire élevée, ils ne peuvent

pas être détecté par chromatographie gazeuse. Cela explique donc qu'en GC-MS, seul le succinate de dibutyle a été détecté.



Figure IV.11. Structures hypothétiques des sous-unités constituant la composante macromoléculaire contenue dans l'ambre baltique et effets d'un traitement par butanolyse et par pyrolyse sur celle-ci (Poulin et Helwig, 2014).

Pour conclure, les ambres baltiques présentent une composante macromoléculaire dominée par les labdanoïdes présentant une configuration similaire à celle de l'acide communique (6). Ceux-ci se présentent sous forme de motifs structuraux oligomériques impliquant des liaisons C-O (éthers) et C-C non hydrolysables. L'acide succinique (1) semble jouer un rôle d'agent de réticulation entre les sous-unités basées sur les labdanoïdes (polylabdanoïdes) ou entre ces groupements et des monoterpénoïdes. La présence (quasi) exclusive d'acide succinique (1) et d'esters de monoterpénois (et par conséquent l'absence de diterpénoïdes) parmi les produits libérés par butanolyse indique que les terpénoïdes sont reliés entre eux par des liaisons covalentes autres que des liaisons esters hydrolysables au sein de la structure macromoléculaire de l'ambre baltique (Schmitt et al., 2021) (Figure IV.11).

IV.2.2.2. Variabilité moléculaire et effet de l'altération

La **Figure IV.5** montre que malgré une ressemblance importante entre les différents échantillons, une variabilité moléculaire peut néanmoins être observée. Par exemple, l'abondance relative des dérivés de l'acide succinique (**17**), (**18**) et (**19**) est beaucoup plus marquée dans l'échantillon A que dans les échantillons B et C. Il en va de même

pour le dérivé de l'acide abiétique (2) qui est beaucoup plus abondant dans l'échantillon A que dans les échantillons B et C. L'observation macroscopique des échantillons indique la présence d'une croûte d'altération opaque sur l'échantillon A alors que les échantillons B et C sont translucides. L'hypothèse la plus probable pour les variations observées entre les échantillons serait que celles-ci soient dues à de l'altération et/ou à une variabilité dans la composition de la résine produite par l'arbre producteur.

En ce qui concerne l'impact des processus d'altération sur les distributions moléculaires, on s'attendrait, tout d'abord, à une augmentation relative des proportions de dérivés d'acide succinique par rapport aux composés diterpéniques avec une altération croissante. En effet, une telle augmentation pourrait être le résultat d'une hydrolyse partielle des liaisons ester associées à l'acide succinique (1) dans la composante macromoléculaire de l'ambre induite par lessivage. D'autre part, l'altération de l'ambre sous l'effet d'une exposition à l'air pourrait également s'accompagner d'une augmentation relative des dérivés de l'acide abiétique (2) parmi les acides résiniques, et également de la formation de composés oxydés. Une plus grande susceptibilité à l'altération des dérivés (iso)pimariques (3)/(4) par rapport aux dérivés de l'acide déhydroabiétique (16) serait également attendue en raison de la présence de doubles liaisons isolées (et notamment exocycliques) plus sensibles à l'oxydation que les cycles aromatiques (Lattuati-Derieux et al., 2014 ; Scaralone, 2002 ; Scaralone et al., 2003 ; Van den Berg, 1996).

Afin de tenter de vérifier ces hypothèses, plusieurs analyses ont été effectuées.

Premièrement, deux séries d'analyses ont été réalisées en étudiant des croûtes d'altération d'ambre et des éclats d'ambre de petite taille censés être plus sensibles à l'altération que de gros morceaux. La première série d'analyses a été réalisée dans le cadre d'un stage de Master 2 (Schmitt et al., 2021a) à partir d'échantillons de très faibles tailles et la seconde a été réalisée dans le cadre de nos travaux sur des échantillons non façonnés trouvés en contexte archéologique, et donc susceptibles d'avoir subi des processus d'altération comme le lessivage et l'oxydation. Ces analyses ont ainsi permis d'établir que les échantillons de petite taille et les croûtes de surface (donc directement au contact de l'air) sont effectivement plus riches relativement en dérivés d'acide succinique (e.g., (17)/(18)/(19) ou (20)), comme ce que

l'on avait supposé. De la même façon, les diterpènes de la série de l'acide pimarique (3) sont relativement peu présents dans ces échantillons par rapport aux dérivés de la série de l'acide abiétique (2), et plus particulièrement de l'acide déhydroabiétique (16) (Figure IV.12). Cette série d'analyses confirme donc qu'une altération forte d'ambre baltique conduit à la libération d'acide succinique (1) contenu dans la matrice moléculaire, ainsi qu'à la dégradation des composés présentant des doubles liaisons isolées (notamment exocycliques) particulièrement sensibles à l'altération (Anderson et al., 1992 ; Clifford et Hatcher, 1995).

Deuxièmement, afin de tester si des différences d'aspect des ambres pouvaient être mises en relation avec des variations de leur composition chimique, les extraits organiques de trois échantillons d'ambre provenant de la cuvette de Żuławy (Pologne) collectés dans la même mine, mais présentant des aspects très différents potentiellement attribuables à des différences de degré d'altération (Weitschat et Wilfried, 2002), ont été analysés par GC-MS (**Figure IV.13**).



Figure IV.12. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) d'une fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé d'une croûte d'altération de surface d'un échantillon d'ambre baltique (coll. Musée Minéralogique de Strasbourg). En bleu, les diterpénoïdes de la série de l'acide (iso)pimarique, en vert les diterpénoïdes de la série de l'acide abiétique, en violet les labdanoïdes et en rouge les dérivés de l'acide succinique. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.



Figure IV.13. Photographie de trois échantillons d'ambre collectés dans la même mine de la cuvette de Żuławy (Pologne), mais qui présentent des différences d'aspect marquées pouvant être associées à des états d'altération plus ou moins importants.

La **Figure IV.14** met en lumière des contradictions en ce qui concerne les distributions moléculaires des extraits et le degré d'altération tel qu'évalué sur la base de critères visuels. En effet, l'ambre B, le plus transparent d'aspect et donc supposément le moins altéré, possède la plus grande abondance relative de dérivés d'acide succinique (17)/(18)/(19), alors qu'on se serait attendu à l'inverse (dérivés libérés par lessivage ; voir le paragraphe précédent). Cet échantillon présente également la proportion relative d'acide déhydroabiétique (16) la plus importante par rapport aux dérivés (iso)pimariques (3/4), alors que celui-ci possède un cycle aromatique qui est supposé être moins sensible à l'altération que les doubles liaisons isolées des dérivés (iso)pimariques (3)/(4) (Anderson et al., 1992 ; Clifford et Hatcher, 1995).



Figure IV.14. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) des fractions apolaires isolées à partir des extraits organiques méthylés d'échantillons d'ambre de la cuvette de Żuławy. A) Échantillon « osseux », B) Échantillon transparent C) Échantillon noir.

Inversement, l'ambre A, dit « osseux », a priori le plus altéré d'après son aspect, présente une proportion plus importante de dérivés d'acides diterpéniques (abiétique (2) et (iso)pimarique (3/4)) par rapport aux succinates et une plus grande variété de structures. L'échantillon C, quant à lui, présente la plus faible proportion de dérivés d'acide succinique (17)/(18)/(19) et une proportion relative plus importante de composés dérivés de l'acide (iso)pimarique (3)/(4), des caractéristiques que l'on pourrait en principe associer à un faible niveau d'altération.

En réalité, les différences visibles au niveau des distributions moléculaires entre ces échantillons sont relativement subtiles et il est difficile d'expliquer ces variations par des différences de niveaux d'altération, d'autant que les critères visuels pour évaluer cette altération ne sont sans doute pas très fiables. En effet, les disparités observées entre ces ambres sont moins importantes, par exemple, que les différences observées entre des résines provenant d'un même arbre et collectées à des saisons différentes (cf. Chapitre I). Ainsi, les différences d'aspect au niveau des ambres de Żuławy sont probablement dues à des facteurs non liés au lessivage ou à l'oxydation et qui n'ont que peu d'impact sur les distributions moléculaires observées. Weitschat et Wilfried (2002) ont proposé que l'aspect de l'ambre pouvait aussi être relié aux inclusions gazeuses présentes dans les ambres. Ici, les différences moléculaires étant plutôt minimes, l'hypothèse d'inclusions semblerait donc la plus plausible pour expliquer ces différences d'aspect.

Pour conclure, les échantillons d'ambre baltique sont très proches chimiquement et présentent des distributions moléculaires similaires. Il apparaît que des variations de couleur et d'aspect des ambres baltiques ne peuvent pas être directement reliées à des différences au niveau des empreintes moléculaires, quel que soit le niveau d'altération atteint et sont probablement principalement dues aux inclusions présentes dans les ambres.

Cependant, il existe certaines variations subtiles dans les proportions relatives entre les différentes familles moléculaires identifiées dans les extraits organiques des échantillons d'ambre. L'hypothèse la plus plausible serait donc que cette variabilité moléculaire, certes légère, soit imputable aux états d'altération, qui ne sont pas forcément visibles à l'œil nu.

IV.2.2.3. Origine botanique de l'ambre baltique

Les échantillons d'ambre baltique analysés étant proches chimiquement, il est très probable que ceux-ci soient issus d'une même source botanique. Ces échantillons présentent notamment une écrasante prédominance d'acides résiniques en série abiétique (2) et (iso)pimarique (3)/(4), ce qui tout d'abord confirme que l'essence botanique productrice est une Gymnosperme, et plus spécifiquement un conifère.

L'abondance des composés dérivant de l'acide abiétique (2) et (iso)pimarique (3)/(4) est plutôt une caractéristique des résines de Pinacées (cf. Chapitre I). Par exemple, dans le cas de la résine de *Pinus sylvestris*, une des espèces de pins commune dans les forêts européennes, les composés diterpéniques sont constitués principalement par des dérivés de l'acide (iso)pimarique (3)/(4) et abiétique (2) (Figure I.9 Chapitre I ; Cox et al., 2007 ; Langenheim, 2003 ; Otto et Wilde, 2001). Les résines du genre *Pinus* sont surtout dominées par la série de l'acide abiétique (2), alors que les résines du genre *Cedrus* (Figure 1.12) (Langenheim, 2003 ; Otto et Wilde, 2001 ; Steigenberger, 2013) sont plutôt dominées par la série de l'acide (iso)pimarique (3)/(4) (Nam et al., 2011). Cependant, l'ambre baltique contient également des labdanoïdes, composés plutôt rares dans les résines de Pinacées (Cox et al., 2007 ; Croteau et Johnson, 1985 ; Keeling et Bohlmann, 2006 ; Langenheim, 2003 ; Mills et White, 1977). En effet, parmi l'ensemble des résines de Pinacées étudiées dans le Chapitre I, seules les résines de *Larix decidua* et de *Pinus cembra* contiennent des labdanoïdes. D'après

la littérature, des labdanoïdes ont aussi été detectés dans d'autres résines de cette famille (Song et al., 1995). De plus, certaines études suggèrent que la composante macromoléculaire des résines de Pinacées est peu abondante, cela expliquant leur faible contenu en labdanoïdes (Anderson, 1995 ; Gough and Mills, 1972 ; Mills et al., 1984) qui pourrait être lié à un faible taux de polymérisation (e.g. Langenheim, 2003 ; Gough and Mills, 1972 ; Mills et al., 1984). Aucune étude formelle n'a cependant démontré clairement ce point, et cette possibilité repose avant tout sur le fait que les résines de Pinacées sont très solubles dans les solvants organiques.

L'ensemble des échantillons d'ambre baltique analysé contient des dérivés de labdanoïdes diagénétiques, comme le composé (**11**). Ce composé, initialement identifié dans un échantillon d'ambre crétacé du site d'Archingeay, peut être issu de la transformation diagénétique de l'acide cupressique (**12**) et/ou du torulosol (**13**) (De Lama Valderrama et al., 2022 ; Chapitre III, § III.2.1.1), des composés plutôt communs chez les Cupressacées actuelles (cf. Chapitre I ; Cartoni et al., 2004 ; Cox et al., 2007 ; Wang et al., 2008). On pourrait également envisager une voie de formation par hydratation de l'acide communique (**6**) ou de sous-unités dérivées de cet acide présent dans la composante macromoléculaire de la résine.

Dans la mesure où l'acide communique (6) a été mis en évidence dans la résine de certaines espèces de Pinacées (e.g. Song et al., 1995), cela pourrait suggérer que l'ambre baltique est associé à une telle origine botanique, malgré la présence de composés a priori structurellement apparentés aux labdanoïdes. De la même façon, l'acide dihydroagathique (9) est un composé surtout présent chez les Araucariacées et les Cupressacées (Cox et al., 2007). Bien que les résines de Cupressacées présentent le plus souvent des dérivés de l'acide (iso)pimarique (3)/(4) et des labdanoïdes, à l'instar de l'ambre baltique, elles sont cependant très souvent associées à la présence de composés diterpéniques phénoliques (Cox et al., 2007 ; Chapitre I). Ainsi par exemple, la résine de *Cupressus sempervirens* (cf. Chapitre I, **Figure 1.15**) est dominée par des labdanoïdes comme l'acide agathique (8) et le sempervirol (28), un diterpénoïde phénolique. L'absence totale de diterpénoïdes phénoliques dans les ambres baltiques ne plaide donc pas en faveur de l'hypothèse selon laquelle les Cupressacées ou les Taxodiacées seraient les familles botaniques

productrices de la résine à l'origine de cet ambre (Cox et al., 2007 ; Otto et al., 2007 ; Simoneit et al., 2021a).

Certaines hypothèses relient également l'ambre baltique aux Araucariacées (e.g. Beck, 1986; Mills et White, 1987), les résines d'Araucariacées contenant pour la plupart les trois grandes familles de diterpènes, à l'instar de l'ambre baltique (Abdel-Sattar et al., 2009.; Frezza et al., 2020; Santos et al., 2021). Par exemple, la résine d'*Araucaria columnaris* (Chapitre I, **Figure I.26**) est dominée par les dérivés de l'acide abiétique (2) et de l'acide agathique (8). Les dérivés de l'acide (iso)pimarique (3)/(4) sont également présents, mais en plus faibles proportions. La composition moléculaire de l'ambre baltique et celle de la résine d'*Agathis*, un autre genre d'Araucariacées, est comparée dans la littérature (Gough and Mills, 1972; Mills et al., 1984). Ainsi, les résine d'*Agathis moorei* et d'*Agathis lanceolata* (cf. Chapitre I, **Figures I.28**), sont relativement proches des résines d'*Araucaria* d'un point de vue des distributions moléculaires, à ceci près que la proportion relative des dérivés de l'acide (iso)pimarique (3)/(4) est bien inférieure dans les résines appartenant au genre *Agathis*.

Les résines d'Araucariacées étant en revanche très riches en labdanoïdes - ils sont par exemple majeurs chez *Araucaria araucana* (Chapitre I, **Figure I.25**) -. et ces composés étant nettement mineurs dans les ambres baltiques, une filiation ambre baltique/Araucariacées semble peu cohérente.

Ainsi, le rattachement de l'ambre baltique à une source botanique précise n'est pas évident. En effet, la composition des extraits lipidiques de ce type d'ambre est dominée par les dérivés de l'acide (iso)pimarique (**3**)/(**4**) et abiétique (**2**), comme cela est le cas chez les Pinacées. En revanche, contrairement à la plupart des résines de Pinacées, l'ambre baltique contient des labdanoïdes en quantités non négligeables. Par ailleurs, l'ambre baltique possède des représentants des trois familles de diterpènes, comme dans le cas de résines d'Araucariacées, mais les labdanoïdes sont loin d'être prédominants, contrairement aux résines de ces dernières.

De plus, des dérivés contenant de l'acide succinique (1) liés à des terpénoïdes ont uniquement été identifiés chez les Pinacées (cf. **Tableau IV.1**) (Jiang et al., 2022 ; Xue et al., 2004 ; Zinkel et al., 1991).

Finalement, les labdanoïdes, même s'ils sont rares dans les résines de Pinacées à l'exception de certains genres comme *Larix (e.g.* Mills,1973, Chapitre I), peuvent être trouvés, même dans la résine de conifères du genre *Pinus*. Par exemple, il est possible de trouver de l'acide dihydroagathique (9) dans la résine de *Pinus latteri* (Song et al., 1995) et de l'acide communique (6) dans la résine de nombreuses espèces du genre *Pinus* (Song et al., 1995).

Tableau IV.1. Comparaison entre compositions moléculaires de l'ambre baltique et de résines actuelles provenant des familles de Gymnospermes proposées comme étant potentiellement à l'origine de l'ambre baltique. Ces comparaisons ont été effectuées à partir de résines fraîches collectées en Nouvelle-Calédonie et au Jardin Botanique de Strasbourg. Les chiffres en gras correspondent aux structures moléculaires présentées en fin de chapitre

Composés	Ambre baltique	Résines de Pinacées	Résines d'Araucariacées
Dérivés d'acide succinique (1)	+++	+1	-
Acide abiétique (2) et dérivés	++	+++	++
Acide (iso)pimarique (3)/(4) et dérivés	+++	+++	+
Labdanoïdes	++	+	+++

(§ IV.8).	(§	IV.8)	
-----------	----	-------	--

¹Dérivés identifiés dans des compartiments de la plante autres que la résine

IV.2.2.4. Apports de l'étude de sites géologiques contemporains à ceux de l'ambre baltique

L'ambre baltique ayant été transporté à l'état de résine par des processus fluviatiles au moment (ou peu après) de sa production, celui-ci est principalement associé à des sédiments dont l'étude ne permet pas d'obtenir des informations concernant le paléoenvironnement dans lequel se développait son espèce végétale productrice. Il est donc difficile d'émettre une hypothèse quant à son origine botanique exacte en l'absence d'une connaissance de la flore peuplant les forêts baltiques à l'Éocène. Dans la littérature, les descriptions paléontologiques et palynologiques font souvent référence à des restes fossiles microscopiques fragmentaires difficiles à identifier.

Afin d'établir des comparaisons avec la paléoflore existant à l'Eocene, des échantillons d'ambre issus de sites contemporains à l'ambre baltique, mais n'ayant pas subi de processus de transport post-production, ont été étudiés. Ces échantillons proviennent

du Groenland et font partie de la collection du Museum National d'Histoire Naturelle de Paris.

Ainsi, plusieurs échantillons d'ambre ont été analysés : un premier lot constitué de grains transparents d'ambre de petite taille collecté sur les plages du Groenland et un deuxième lot d'échantillons d'ambre associé à du lignite. Les analyses moléculaires ont cependant démontré que malgré leurs aspects différents, leur distribution moléculaire est identique et indique une origine commune. La **Figure IV.15** présente en détail la distribution moléculaire d'un des échantillons d'ambre du Groenland. Celuici présente une prédominance des composés diterpéniques dérivant de l'acide abiétique (2) et de l'acide sandaracopimarique (7), avec des proportions relatives des différentes familles proches de celles observées dans les échantillons d'ambre baltique.



Figure IV.15. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique méthylé d'un échantillon d'ambre du Groenland (Musée d'Histoire Naturelle de Paris). En bleu les diterpénoïdes de la série de l'acide (iso)pimarique, en vert les diterpénoïdes de la série de l'acide abiétique et en violet les labdanoïdes. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

De plus, comme le montre la **Figure IV.16** qui présente le courant d'ion m/z 115 de cet échantillon, des dérivés d'acide succinique sont visibles.



Figure IV.16. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique méthylé d'un ambre du Groenland (A) TIC et (B) fragmentogramme de masse m/z 115. En rouge, les dérivés de l'acide succinique. Les acides carboxyliques ont été analysés sous forme d'esters méthyliques.

Il est cependant à noter qu'il existe quelques différences notables au niveau moléculaire entre les ambres du Groenland et les succinites baltiques. Tout d'abord, la proportion relative des dérivés d'acide succinique (17)/(18)/(19) est plus faible dans les ambres du Groenland que dans les ambres de la Baltique. Comme cela a été discuté auparavant, il est possible que ces différences de proportions soient attribuables à des degrés d'altération différents des échantillons. Il est difficile, en l'absence d'expériences de butanolyse, de comparer les quantités d'acide succinique entre ces deux séries d'échantillons. Ensuite, les ambres du Groenland analysés présentent une plus grande variété de composés diterpéniques et notamment des composés issus de l'altération et/ou de l'oxydation de diterpènes comme le composé (30) probablement issu de l'oxydation de l'acide déhydroabiétique (16). Ceci n'est donc sans doute pas lié à la source botanique, mais plutôt aux processus d'altération auxquels les ambres ont été soumis.

L'hypothèse la plus probable serait que les ambres du Groenland proviendraient d'une source végétale très proche phylogénétiquement de celle produisant la résine à l'origine de l'ambre baltique (mais pas strictement identique), probablement associée au même genre botanique. Or, il a été proposé par Anderson et LePage (1995) que *Pseudolarix* (une Pinacée) pourrait être une des meilleures sources potentielles de l'ambre de l'île d'Axel Heiberg (située en bordure du Groenland) et dont les

caractéristiques moléculaires sont proches de celles des ambres analysés dans cette étude avec, notamment, la présence de dérivés de l'acide succinique (Anderson et LePage, 1995; Poulin et Helwig, 2012, 2014). En outre, l'analyse par Py-GC-MS d'ambre directement associé aux fossiles de cônes de conifères du genre *Pseudolarix* a montré la présence de dérivés d'acide succinique (Anderson et LePage, 1995). Par ailleurs, la morphologie du bois fossile de *Pseudolarix* est proche de celle du bois appartenant au genre *Pinus* (Anderson et LePage, 1995).

Si les espèces principales décrites dans la flore éocène arctique sont *Pseudolarix* robusta (proche du Pseudolarix amabilis, espèce actuelle), et Pseudolarix wehrii, qui étaient localement très importantes, il est à noter que ces espèces ont coexisté avec d'autres Pinacées un peu moins abondantes comme Picea sverdrupii, Picea nansenii, Pinus sp. et Tsuga swedaea, celles-ci ne pouvant a priori pas être exclues en tant qu'espèces productrices potentielles d'ambre (Eberle et Greenwood, 2012). Nous pouvons donc proposer que *Pseudolarix* est bien une source possible des ambres du Groenland analysés, ambres qui sont proches géographiquement et chronologiquement des ambres de l'île d'Axel Heiberg. De plus, chez Pseudolarix, appartenant aux Pinacées, la résine est dominée par les dérivés de l'acide abiétique (2) et pimarique (3) à l'instar des ambres du Groenland (Anderson et LePage, 1996). Cependant, comme cela a été clairement montré par Anderson et LePage (1996), ainsi que par Poulin et Helwig (2012, 2014), l'ambre de l'île d'Axel Heiberg peut être rangé dans une nouvelle classe d'ambre, la classe ld, qui correspond aux succinites basées sur des polylabdanoïdes appartenant à la série de l'acide ozique (5) (série « enantio »). Cette série diffère clairement des succinites baltiques dont la composante macromoléculaire est basée sur l'acide communique (classe la).

Nous ne savons pas, à ce stade, si les succinites du Groenland que nous avons analysé doivent être classées parmi les ambres de classe la ou ld. Pour des raisons de proximité géographique et chronologique, il est toutefois vraisemblable que les ambres du Groenland s'apparentent plutôt à l'ambre de l'île d'Axel Heiberg.

Comme l'ont proposé Anderson et LePage (1996), il est donc possible que la succinite baltique provienne également d'une espèce botanique du genre *Pseudolarix* adaptée à des latitudes plus basses. Les compositions des résines fossiles associées à *Pseudolarix* et les ambres de l'arctique canadien (île d'Axel Heiberg), du Groenland et

de la Baltique sont toutes basées sur des structures polylabdanoïdes ayant incorporé de l'acide succinique (1). De plus, comme l'ont montré Poulin et Helwig (2014) en étudiant les succinites baltiques et canadiennes, l'acide succinique joue un même rôle d'agent réticulant entre les sous-unités (poly)ladanoïdes (de type (poly)communol (27) et (poly)ozol (31), respectivement) constituant la composante macromoléculaire de ces ambres.

Cependant la relation entre l'ambre Baltique et celui du genre *Pseudolarix* n'est pas directe, en raison des différences au niveau de la configuration des unités labdanoïdes de base. De ce fait, plusieurs hypothèses ont été proposées par Anderson et LePage (1996), dont les suivantes:

 Il aurait pu exister différents écotypes ou espèces de *Pseudolarix* durant l'Eocène, les uns produisant des labdanoïdes réguliers et les autres des labdanoïdes de la série dite « enantio ».

 - Pseudolarix et le conifère à l'origine de l'ambre Baltique sont issus d'un ancêtre commun capable de biosynthétiser les deux séries de (poly)labdanoïdes et d'incorporer de l'acide succinique dans la résine.

- Les succinites de classe la ont été produites par une plante d'un genre dont les réprésentants actuels ont perdu la capacité de produire des résines incorporant de l'acide succinique, mais dont la constitution moléculaire présente des analogies avec celles de l'ambre baltique. Ce pourrait alors être le cas de conifères des genres *Agathis* ou *Pinus* qui ont été proposés comme origines botaniques possibles de l'ambre baltique.

A cet égard, il est intéressant de noter que plusieurs espèces actuelles de Pinacées des genres *Larix* et *Pinus* sont, de manière remarquable, capables de biosynthétiser des succinates de dérivés terpéniques (Jiang et al., 2022 ; Venditti et al., 2013 ; Xue et al., 2004 ; Zinkel et al., 1991), bien que ceux-ci ne se trouvent pas dans la résine, mais dans d'autres parties de la plante.

En particulier, les dérivés de type succinate de di-torulosyl (**32**) (**Figure IV.7**) identifiés par Jiang et al. (2022) et Xue et al. (2004) dans des branches, aiguilles ou écorces d'espèces du genre *Larix* présentent de grandes analogies avec les sous-unités labdanoïdes liées par de l'acide succinique (**33**) identifiées par Poulin et Helwig (2014) et obtenues par pyrolyse d'ambre de la Baltique (**Figure IV.17**).



Figure IV.17. (A) Succinate de di-torulosyl (32) identifié dans des conifères du genre Larix (Jiang et al., 2022 ; Xue et al., 2004) ; (B) exemple de diester d'acide succinique (33) détecté après Py-GC-MS d'ambre de la Baltique (classe la).

IV.2.3. Conclusion

Les ambres baltiques étudiés présentent des empreintes moléculaires très similaires comprenant des dérivés de l'acide succinique (e.g., (17), (18), (19)), qui sont des biomarqueurs typiques de ces ambres, et ce en dépit de leur aspect visuel très variable. Leur origine botanique n'est pas facile à attribuer, et ils n'ont pas pu être directement affiliés à une résine actuelle, ces ambres possédant des caractéristiques qui leur sont propres. Cependant, il est possible de les rapprocher des Pinacées sur la base de la prédominance des familles de diterpènes dérivant de l'acide abiétique (2) et (iso)pimarique (3)/(4).

Cette hypothèse est soutenue par l'étude des ambres du Groenland qui sont contemporains de l'ambre baltique et qui sont associés à des dépôts sédimentaires possédant une flore théoriquement similaire. En effet, les résines à l'origine des ambres baltiques ayant été transportées par des voies fluviatiles et déposées dans des deltas, les fossiles associés aux sédiments, en dehors de ceux présents dans l'ambre, ne sont pas représentatifs de l'environnement dont ils proviennent. L'étude des ambres du Groenland présentant un âge similaire et localisés à une latitude proche permet donc d'avoir un équivalent floristique réaliste et de proposer des candidats fossiles décrits dans les sédiments.

Les ambres du Groenland étudiés possèdent des caractéristiques moléculaires similaires à celle de l'ambre baltique avec, notamment, la présence de faibles quantités d'acide succinique (1). Des études antérieures ont notamment montré que de la

résinite associée à des cônes fossiles de Pseudolarix -une Pinacée de la sous-famille des Abiétoïdes- provenant de l'île de Axel Heiberg - une île géographiquement proche des sites d'origine de l'ambre groenlandais étudié -, présentait également des dérivés d'acide succinique (Anderson et LePage, 1996), ce qui ferait de ce genre botanique le meilleur candidat en tant que source potentielle de l'ambre groenlandais. Comme le genre Pseudolarix existait sur l'ensemble du globe à l'Éocène (LePage et Basinger, 1995), il est donc envisageable qu'une espèce botanique appartenant à ce genre ait aussi été présente dans les forêts de la zone baltique, et ait donc été à l'origine de la succinite baltique. Cependant, les polylabdanoïdes qui constituent la composante macromoléculaire de l'ambre issu de Pseudolarix sont basés sur des labdanoïdes de la série dite « enantio » (série de l'ozol (31)), contrairement à ceux de l'ambre de la Baltique qui sont basés sur des labdanoïdes de la série dite « régulière » du communol (27). La relation entre la résine issue d'arbres du genre Pseudolarix et l'ambre baltique n'est donc pas directe, bien que la coïncidence dans les deux cas d'une fraction macromoléculaire basée à la fois sur des polylabdanoïdes et de l'acide succinique (1) soit troublante. Une autre hypothèse envisageable serait que les ambres de la Baltique dérivent de résines produites par des genres de Pinacées, éventuellement différents de Pseudolarix, dont les représentants actuels auraient perdu la capacité de produire de la résine de polylabdanoïdes incorporant de l'acide succinique (1).

En effet, l'analogie des distributions de diterpénoïdes de l'ambre baltique avec celles de résines de Pinacées fait de ces dernières une source botanique de l'ambre baltique crédible. A cet égard également, il est remarquable que certaines Pinacées actuelles du genre *Larix* et *Pinus* soient capables de synthétiser des succinates de labdanoïdes qui présentent des analogies structurales avec les sous-unités labdanoïdes constituant l'ambre de la Baltique (voir plus haut). Bien que ces succinates ne se trouvent pas dans la résine, mais dans d'autres parties de la plante, il reste envisageable que des espèces maintenant éteintes des genres *Larix* ou *Pinus*, notamment, aient été capables, comme certaines espèces actuelles, de synthétiser des esters mixtes liant acide succinique (1) et alcools de labdanoïdes et d'incorporer de tels composés dans la résine.

IV.3. Les ambres saxons (Allemagne), des ambres "frères" de l'ambre baltique

En Allemagne, dans la vallée saxonne, se trouvent de nombreuses mines de charbon/lignite associées à des ambres. Par exemple, la mine de Bitterfeld est l'une des mines les plus exploitées en termes d'excavation d'ambre ainsi que d'études paléontologiques. Schumann et Wendt (1989) ont estimé que la biodiversité végétale présente à Bitterfeld comprend cent cinquante familles avec de nombreuses espèces. Parmi ces espèces, vingt-deux d'entre elles n'avaient encore jamais été décrites. D'après la littérature, ces ambres sont souvent associés aux ambres baltiques, car la plupart des gisements sont datés de l'Éocène/Oligocène et sont donc (en partie tout au moins) contemporains des succinites baltiques. L'une des préoccupations majeures pour les paléontologues et les archéologues est de savoir si les ambres de Bitterfeld proviennent de la même source botanique ou non que les ambres baltiques.

Dès le Moyen Age, des sites ont été exploités pour l'ambre en même temps que le charbon. La mine proche de Bitterfeld par exemple, nommée Goitzsche, a été abandonnée à la fin du XX^{ème} siècle et le site minier a été transformé en lacs dont l'un a été nommé « amber lake ». Lors de son exploitation, plus de 400 tonnes d'ambre ont été excavées et de nombreux fossiles ont été découverts (oiseaux, tortues, poissons, plantes, etc...; Barthel et Hetzer, 1982; Dunlop, 2010; Weitschat et Wilfried, 2002 ; Wimmer et al., 2008). Pour étudier les ambres provenant de ce site, les extraits lipidiques d'un ensemble d'échantillons provenant de collections diverses ont été analysés (Tableau IV.2). Une partie de ces échantillons a été étudiée en collaboration avec Jan Pànczak, un doctorant de l'Université de Cracovie (Pologne) dans le cadre d'un programme financé par une bourse « EAOG Research Awards » attribuée par l'European Association of Organic Geochemistry. Nous nous concentrerons dans cette partie sur les ambres issus de la localité de Bitterfeld (Allemagne), qui est l'un des sites où le plus grand nombre de types d'ambre différents ont été découverts. Il est toutefois à noter qu'il existe de nombreuses autres mines dans la vallée saxonne fournissant des ambres du même âge. Cependant, ne possédant pas d'échantillons provenant de ces autres mines, il ne nous a pas été possible d'en effectuer l'analyse moléculaire.

IV.3.1. Les ambres de Bitterfeld, des ambres contemporains à ceux de la Baltique ?

IV.3.1.1. Contexte géologique : sédiments, paléoenvironnement et âge des ambres de Bitterfeld et alentours

L'ambre dit de Bitterfeld provient de plusieurs sites en Allemagne, proches de la cité de Bitterfeld située dans le Land de Saxe-Anhalt (**Figure IV.1**). De nombreux documents historiques existent retraçant l'exploitation des différentes mines de charbon/lignite et décrivant les fossiles/ambres trouvés dans ces mines (Kosmowska-Ceranowicz et Krumbiegel, 1989). Les ambres de Bitterfeld sont associés à des silts et des sables, nommés « Bernsteinschluff », dans la formation de Cottbus datée initialement du Miocène par de premières études polliniques (Barthel et Hetzer, 1982). Plus tard, des analyses géochimiques des sédiments ont permis de ré-évaluer l'âge de cette formation et de la dater de l'Oligocène inférieur (Chattien ; -23 à -28 Ma ; Knuth et al., 2002).

L'environnement de dépôt lié à ces ambres correspond à un lagon associé à des dunes. La résine originelle devait être formée par des arbres évoluant dans une forêt proche de la côte, qui était régulièrement inondée lors d'épisodes de fortes pluies (Dunlop, 2010 ; Wimmer et al., 2008). Le paléoenvironnement durant le milieu du Cénozoïque est supposé correspondre à un delta, alimenté par plusieurs rivières et fleuves. Dans ce contexte, ce sont principalement des alluvions provenant de rivières qui ont constitué les sédiments contenant de l'ambre. Le fait que le réseau fluviatile se jetait dans un lagon assez confiné et de faible profondeur aurait privilégié la préservation de la matière organique et donc la fossilisation de l'ambre et des organismes. Wimmer et al. (2008), qui avancent cette hypothèse, ont nommé cette zone « Goitzsche amber trap ». Les couches sédimentaires de cette formation contenant de l'ambre font entre 4 et 6 m d'épaisseur.

Durant cette période, ce qui est aujourd'hui l'Allemagne était localisé légèrement plus au Sud par rapport à nos jours (de 5 à 10°). Une paléo-latitude plus basse que la latitude actuelle couplée à une température mondiale relativement chaude durant le milieu du Cénozoïque fait que le climat était tropical malgré une latitude élevée, à l'instar de ce qui a été décrit pour la forêt baltique. Des études paléontologiques sur les inclusions de l'ambre de Bitterfeld ont conclu à des similarités en termes de faune et flore (Dunlop, 2010 ; Schmidt et al., 2008 ; Weitschat et Wilfried, 2002). D'après Schmidt (2008), il est probable que l'environnement ait été similaire à celui décrit pour les forêts baltiques. La différence la plus notable entre le paléoenvironnement des forêts à l'origine des ambres de Bitterfeld et celui correspondant aux forêts baltiques serait que dans le premier cas, on aurait affaire à un milieu de type marécageux avec des eaux douces à saumâtres, alors que dans le second cas, on se situerait plutôt dans le cadre de forêts situées en pleine terre et qui seraient inondées ponctuellement, lors d'épisodes de crues.

Des études paléontologiques ont amené la question de l'âge réel des ambres de Bitterfeld. En effet, il est possible qu'à l'instar de l'ambre baltique, l'âge des ambres de Bitterfeld soit largement antérieur à celui des sédiments dans lesquels on les trouve, et que ces ambres aient été redéposés plus tard lors du remaniement de formations sédimentaires plus anciennes occasionné par des épisodes de crues. Toutefois, certaines études concernant l'aspect de l'ambre semblent montrer que les ambres de Bitterfeld auraient été en réalité peu transportés ou alors uniquement sur de faibles distances (Barthel et Hetzer, 1982 ; Standke, 2008). Ces études amènent à la conclusion que l'ambre de Bitterfeld est bien daté de l'Oligocène inférieur, et est de ce fait contemporain aux sédiments qui le contient.

Cependant, certaines espèces d'insectes et d'araignées sont présentes à la fois dans l'ambre de Bitterfeld et dans l'ambre baltique, alors que ces espèces sont connues pour avoir une vitesse d'évolution très rapide. Ceci serait donc en contradiction avec une différence d'âge de plus de 10 millions d'années entre ces deux types d'ambre (Alekseev et al., 2024 ; Bukejs et al., 2021 ; Dunlop et al., 2018 ; Dunlop, 2010). Il n'est donc pas évident de trancher quant à l'âge des ambres de Bitterfeld. Cependant, la présence d'inclusions communes dans les ambres de Bitterfeld et baltiques semble plutôt indiquer un âge proche. Nous supposerons donc dans ces travaux que les ambres de Bitterfeld sont contemporains des ambres baltiques.

IV.3.1.2. Etudes antérieures et origines proposées des ambres de Bitterfeld

IV.3.1.2.1. Variabilités des ambres de Bitterfeld

Les premières articles de synthèse concernant les ambres de Bitterfeld datent de la fin du XX^{ième} siècle (Kosmowska-Ceranowicz et Krumbiegel, 1989 ; Krumbiegel,

1997), mais la découverte de l'ambre lui-même est estimé être daté du XVII^{ième} siècle. Le référencement des sites contenant de l'ambre en Allemagne a mis en évidence qu'il existait quelques sites saxons présentant des pièces d'ambre connues comme des « Honigsteine » (i.e. pierres de miel). L'absence de traces écrites concernant l'exploitation de l'ambre de Bitterfeld rend difficile l'estimation de la date de sa découverte. Cependant, certains objets contenant de l'ambre de Bitterfeld ont été trouvés dans des cabinets de curiosité de bourgeois saxons, et l'ambre était parfois utilisé pour faire des têtes de pipes et de cigarettes, indiquant ainsi une exploitation avant la date des premières études scientifiques. Contenant de nombreux insectes sous forme d'inclusions, à l'instar de l'ambre baltique, les ambres de Bitterfeld ont été largement exploités à partir du début du XX^{ième} siècle (Krumbiegel, 1997).

Les études paléontologiques des inclusions semblent indiquer un âge commun avec l'ambre baltique (e.g. Weitschat et Wichard, 2010, Szwedo et Sontag, 2013) et certains proposent même une origine commune. Cette hypothèse d'une origine commune est soutenue par des études de spectroscopie infrarouge (e.g. Wolfe et al., 2009 ; 2016) qui mettent en évidence des ressemblances entre l'ambre de Bitterfeld et celui de la Baltique. Cependant, d'autres études mettent en lumière que les ambres de Bitterfeld présentent une plus grande hétérogénéité moléculaire que les ambres baltiques (Yamamoto et al., 2016). Ainsi, même si le type moléculaire majeur contient de l'acide succinique (1) comme l'ambre baltique, certains n'en contiendraient pas du tout (e.g. Kosmowska-Ceranowicz et Krumbiegel, 1989, Yamamoto et al., 2016). Cette constatation confirme la proposition de l'existence de variants de Bitterfeld émise par Barthel et Hetzer (1982) qui constatent des morphotypes au sein des ambres de Bitterfeld. Ainsi, une classification basée sur les caractères physiques (et parfois chimiques) des ambres de Bitterfeld a été proposée et est présentée dans le **tableau IV.2** et la **figure IV.18**.



Figure IV.18. Photographies des différents échantillons étudiés dans Chapitre IV. Les échantillons de stantiénite, de glessite et de krantzite proviennent des collections du Musée National de Varsovie (Pologne), la gédanite provient de la collection personnelle de C. du Gardin et la succinite des collections du Muséum d'Histoire Naturelle de Berlin.

IV.3.1.2.2. La succinite de Bitterfeld

Les premières études moléculaires portant sur la succinite de Bitterfeld suggèrent une origine botanique commune avec les succinites baltiques (Beck, 1986 ; Langenheim, 1964 ; Weitschat et Wilfried, 2002). Ces études se fondent sur la présence d'acide succinique (1) dans les deux cas, ainsi que sur la similitude de leurs spectres infrarouge. Cependant, d'autres études amènent à se questionner sur une potentielle origine commune. Par exemple, les travaux de Barthel et Hetzer (1982) basés sur la spectroscopie infrarouge et le contenu des inclusions fossiles suggèrent qu'il est possible que les succinites de Bitterfeld soient issues d'une résine provenant de Cupressospermum saxonicum (Cupressacée) ou de Geinitzia formosa (genre éteint de Pinales). De la même façon, Yamamoto et al. (2006) ont analysé par GC-MS l'extrait lipidique de succinite de Bitterfeld et il a été montré que celui-ci présente une proportion beaucoup plus importante de diterpènes de la série de l'acide abiétique que dans le cas des ambres baltiques. Ils ont donc proposé une origine proche, à savoir une Pinacée du genre Pinus ou Picea, mais avec une ascendance botanique différente de celle liée à l'ambre baltique. Ultérieurement, Wolfe et al. (2016) ont réalisé des analyses isotopiques et chimiques sur les succinites de Bitterfeld et de la Baltique et ont conclu, eux aussi, qu'il existe des différences entre ces deux types de succinites. Antérieurement, une étude basée sur de la Py-GC-MS avait également mis en évidence des différences pouvant être expliquées par une origine botanique distincte, bien qu'impliquant des sources botaniques vraisemblablement du même genre (Sorg et Krebs, 1986).

Selon ces études, les sources botaniques seraient donc proches, mais avec des origines géographiques distinctes issues de forêts similaires, mais non identiques (à savoir différenciées dans le temps et dans l'espace).

Type d'ambre	Spécificités moléculaires	Origine(s) botanique(s) d'après la littérature	Références bibliographiques	Provenance de l'échantillon étudié ici
Succinite	Cf. ambre baltique. Acide succinique (1) abondant	Cf. ambre baltique	Czechowski et al., 1996 ; Kosmowska-Ceranowicz et al., 1996 ; Yamamoto et al., 2006	Musée d'Histoire Naturelle de Berlin
Goitschite	Cf. succinite mais peu d'acide succinique (1)	Inconnue(s)	Fuhrmann et Borsdorf, 1986 ; Kosmowska-Ceranowicz, 1999 ; Yamamoto et al., 2006	J. Panczak (musée de Varsovie)
Gédanite	Cf. ambre baltique mais absence d'acide succinique (1)	Cf. ambre baltique ?	Kosmowska-Ceranowicz, 1999 ; Stout et al., 1996	Collection C. Du Gardin
Stantiénite	Nombreux marqueurs associés à une matière organique mature (alcanes, aromatiques). Peu de diterpénoïdes	Pinus ou Cupressospermum saxonicum	Caspary, 1882 ; Yamamoto et al., 2006	J. Panczak (musée de Varsovie)
Beckerite	Cf. succinite mais peu d'acide succinique (1)	Cf. ambre baltique	Beck et al., 1986	Non étudié
Krantzite	Triterpènes prédominants	Burséracées (Angiospermes)	Kosmowska-Ceranowicz, 1999 ; Kosmowska-Ceranowicz et al., 1996 ; Weitschat et Wilfried, 2002 ; Yamamoto et al., 2006	J. Panczak (musée de Varsovie)
Glessite	Triterpènes prédominants	Burseracées (Angiospermes). <i>Betula</i>	Anderson et Botto, 1993 ; Yamamoto et al., 2006	J. Panczak (musée de Varsovie)
Siegburgite	Triterpènes prédominants	Altingiacées (Liquidambar)	Dietz et al ., 2014 ; Simoneit et al., 2021	Non étudié

Tableau IV.2. Présentation des différents types d'ambre de la région de Bitterfeld, principales spécificités moléculaires, origines botaniques proposées dans la littérature et provenance des échantillons étudiés dans ce chapitre.

IV.3.1.2.3. La goitschite et la beckerite

La goitschite (Kosmowska-Ceranowicz, 1999) et la beckerite (Beck et al., 1986) ont été identifiées comme des ambres présentant des dérivés d'acide succinique (**1**), mais en faibles quantités. L'analyse des spectres infrarouge de la beckerite a révélé que celleci est très proche de la succinite évoquée précédemment (Beck et al., 1986) qui proposent une origine botanique commune pour ces deux ambres.

L'extrait lipidique de la goitschite, quant à lui, a été analysé par GC-MS par Yamamoto et al. (2006). La présence de dérivés d'acide succinique a été identifiée, et une certaine similarité avec la distribution des lipides de la succinite a été relevée. Les composés principaux identifiés sont des diterpènes des séries de l'acide abiétique (2) et de l'acide (iso)pimarique (3)/(4), à l'instar de la succinite. Ces auteurs en ont donc conclu que la goitschite, malgré des proportions relatives légèrement plus faibles des dérivés de l'acide succinique, provient de la même source botanique que la succinite. De plus, les différents types d'ambre de Bitterfeld ayant été distingués uniquement sur des critères morphologiques, il est possible que ces différences de teneurs en acide succinique (1) puissent être expliquées, en partie tout au moins, par des différences du degré d'altération des ambres considérés.

IV.3.1.2.4. La stantiénite

La stantiénite, un ambre noir brillant opaque, a été décrit pour la première fois par Caspary (1882). Celui-ci en a conclu que c'est bien un ambre, car il observe des aiguilles d'un pin fossile qu'il nomme *Pinus kunowi* associées à la stantiénite. Plus tard, *P. kunowi* sera identifié par Schubert (1961) comme appartenant à l'espèce *Pinus succinifera*, proposée comme source de l'ambre baltique (Goeppert, 1836 ; Conwentz, 1890).L'étude par spectroscopie infrarouge de cet ambre soulève néanmoins des questions quant à sa composition moléculaire (Fuhrmann et Borsdorf, 1986 ; Kosmowska-Ceranowicz, 1999 ; Kosmowska-Ceranowicz et Krumbiegel, 1989). En effet, usuellement, les ambres sont constitués de sesqui-, di- ou triterpénoïdes (cf. Chapitre I), alors que dans le cas présent, le spectre infrarouge présente des caractéristiques typiques de matériaux organiques très matures.

Yamamoto et al. (2006) ont également analysé l'extrait lipidique d'un échantillon d'ambre de ce type par GC-MS et ont identifié des acides et diacides linéaires peut-
être issus de biopolymères végétaux, ainsi que des hopanes diagénétiques (C27, C29-C₃₁), qui sont des produits de transformation de biohopanoïdes bactériens (Peters et al., 2005). Une association de tels composés est généralement observée dans le cas d'extraits lipidiques de charbons (Peters et Moldovan, 1993; Peters et al., 2005). Yamamoto et al. (2006) ont également mis en évidence des dérivés aromatiques de triterpènes d'Angiospermes à l'état de traces, des diterpénoïdes en faibles quantités ainsi que des composés inconnus de masse moléculaire de 400 Da, ces derniers composés ayant également été observés dans une résine fossile de Cupressospermum saxonicum. Ces auteurs ont néanmoins conclu, malgré la présence de composés triterpéniques, que ce type d'ambre pourrait correspondre à de la résine de C. saxonicum qui aurait été contaminée par des constituants organiques associés à des tourbe/lignite/charbon. Lambert et al. (2015) quant à eux ont exclu au contraire, sur la base d'études de RMN du solide que la stantiénite est de l'ambre et ont proposé qu'elle se rapproche plutôt de matériaux carbonés comme le jais, la tourbe ou le charbon.

IV.3.1.2.5. La glessite

La glessite est un type d'ambre qui présente deux grands variants en termes d'aspect : un variant brun-noir d'aspect grumeleux et un variant brun opaque d'aspect lisse (cf. Figure **III.16**). Elle a été mise évidence dans la mine de Goitsche, mais également ailleurs, certes en faibles quantités, notamment dans la péninsule du Samland et dans les mines de Golpa (Langenheim et Beck, 1968). Les études antérieures de la glessite visant à déterminer son origine botanique sont relativement contradictoires. Ainsi, par exemple, Frondel (1967) a identifié, sur la base des spectres de diffraction aux rayons X, des triterpènes dérivant des amyrines dans un échantillon de glessite et en a déduit que la glessite est apparentée aux résines de type élémi issues d'Angiospermes appartenant à la famille des Burséracées.

La présence de triterpènes a été confirmée par des études ultérieures qui ont mis en évidence une ressemblance entre la glessite et le genre actuel *Canarium* (Burseracée) (Kosmowska-Ceranowicz et al., 1993). Dans la même lignée, Yamamoto et al. (2006) ont mis aussi mis en évidence par GC-MS la présence de triterpénoïdes comme des

amyrines et des triterpènes apparentés à l'allobétulane, confortant l'hypothèse selon laquelle la glessite serait issue d'une résine d'Angiospermes. Ces auteurs ont même proposé, en raison de la présence de dérivés d'allobétulane, que les producteurs de la résine à l'origine de la glessite pourraient être des Bétulacées. Cette possibilité semble toutefois peu vraisemblable, les Bétulacées actuelles ne produisant pas de résine.

Au contraire, Anderson et Botto (1993) ont montré, sur la base d'études par RMN du ¹³C et par Py-GC-MS, de claires similitudes entre un échantillon de glessite et les succinites baltiques. L'étude par Py-GC-MS de la glessite a ainsi fourni des pyrolysats caractéristiques issus de polylabdanoïdes, ce qui a conduit à ranger la glessite dans la classe **Ia** des ambres comme les succinites. Ces contradictions dans la littérature quant à l'origine botanique de la glessite proviennent vraisemblablement du fait que la classification des ambres sur une base visuelle ou de leurs propriétés physiques ne convient pas pour différencier leurs sources botaniques et qu'en fait, le mot « glessite » recouvre différents types moléculaires et donc des sources botaniques diverses.

IV.3.1.2.6. La siegburgite

La siegburgite, nommée ainsi car la première description de cet ambre a été réalisée à partir d'un échantillon provenant du voisinage de la ville de Siegburg (Allemagne). Ce type morphologique se retrouve aussi à Bitterfeld (Kosmowska-Ceranowicz et al., 1993) possède comme particularité d'appartenir à la classe III des ambres dont la partie macromoléculaire est supposée être issue de la polymérisation de monomères apparentés au styrène (Kosmowska-Ceranowicz et Krumbiegel, 1990). Un fossile d'Angiosperme de la famille des Altingiacées, *Liquidambar europaeum* Bgt, a été trouvé en association avec cet ambre. Les liquidambars sont connus pour former une résine particulière comprenant des constituants macromoléculaires basés sur des sous-unité apparentées au styrène (Grimaldi et al., 1989 ; Langenheim, 2003 ; Pastorova et al., 1998 ; Courel et al., 2019).

Outre cette constitution particulière de la composante macromoléculaire de l'ambre, la siegburgite présente des triterpènes typiques des Angiospermes comme l'acide oléanolique et ses dérivés. La ressemblance très forte entre la siegburgite et la résine de liquidambar laisse donc penser que celle-ci a effectivement pour origine *Liquidambar europaeum* auquel cet ambre est associé (Pastorova et al., 1998).

IV.3.1.2.7. La gédanite

Helm (1877) s'est aperçu en étudiant des ambres de Gdansk (Pologne) que certains d'entre eux présentaient une grande friabilité, contrairement aux succinites baltiques.Il a nommé ce type d'ambre gédanite en rapport avec le nom latin de Gdansk (Gedanum), où a été trouvé pour la première fois ce morphotype d'ambre.

Stout et al. (1996) ont montré que les gédano-succinites contiennent au maximum 2% d'acide succinique, contre plus de 3% pour les succinites baltiques, mais que les diterpènes associés à ces deux types moléculaires sont identiques. Cependant, il a également été montré dans cette même étude qu'en dehors des différences de proportions en acides succiniques, ces deux types d'ambre sont chimiquement très proches (Stout et al., 1996). Il en a été conclu que l'origine botanique de la gédanite et la gédano-succinite est la même que celle des succinites baltiques et que les différences au niveau des quantités d'acide succinique sont uniquement dues à des processus d'altération.

IV. 3.1.2.8. La krantzite

La krantzite est un type d'ambre assez rare à Bitterfeld et dans la région environnante. Elle est décrite pour la première fois par Bergemann (1859) comme un ambre physiquement différent de la succinite, plus sombre et plus cassant. Peu d'études ont été réalisées sur la krantzite, mais la plupart des hypothèses relient ce type d'ambre aux Angiospermes et plus particulièrement aux Burséracées, à l'instar de la glessite (Pańczak et al., 2024 ; Simoneit et al., 2021a).

IV.3.2. Caractérisation moléculaire et origine botanique des ambres de Bitterfeld

IV.3.2.1. Analyse moléculaire de la succinite de Bitterfeld

Les succinites provenant de Bitterfeld que nous avons analysées (collection du Muséum d'Histoire Naturelle de Berlin) présentent toutes des caractéristiques moléculaires similaires, avec une prédominance des diterpènes de la série de l'acide

abiétique (2) (Figure IV.19) et de l'acide pimarique (3). À l'instar des succinites baltiques, un labdanoïde cyclisé (11) provenant de l'altération de l'acide cupressique (12) a été détecté. Associés à ce composé, on observe également des succinates de monoterpénols (17), (18), (19) (Figure IV.19). Ces échantillons ressemblent donc fortement aux succinites de la Baltique évoquées précédemment, et plus particulièrement aux échantillons présentant un caractère altéré. En effet, on peut observer des proportions relatives plutôt élevées de dérivés de l'acide succinique (17), (18) et (19) ainsi que des diterpènes dérivés de l'acide abiétique (2) par rapport aux diterpènes dérivant de l'acide (iso)pimarique (3)/(4). Ici, l'hypothèse la plus vraisemblable serait donc que les succinites de Bitterfeld ont la même origine botanique que les succinites baltiques (§IV.2.2.3).

Des diterpènes soufrés (cf. Chapitre II), certes à l'état de traces, ont également été détectés dans les ambres de Bitterfeld. Les composés présents sont vraisemblablement issus de la sulfuration de l'acide isopimarique (**4**) dans des sédiments anoxiques riches en soufre.

Les différences entre les succinites baltiques et de Bitterfeld sont donc minimes, et il est difficile de les distinguer sur la base d'une approche moléculaire. Il est notable cependant que les résines à l'origine des ambres de Bitterfeld ont sans doute été déposées dans un environnement de dépôt différent de celui à l'origine des ambres baltiques, étant donné la présence de composés organiques soufrés dans les ambres de Bitterfeld, qui sont beaucoup plus rares dans les ambres baltiques (cf. Chapitre II). Cette différence de milieux de dépôt pourrait aussi expliquer les différences au niveau des compositions isotopiques de l'hydrogène (²H/¹H) entre les deux types d'ambre (Wolfe et al., 2016).



Figure IV.19. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique méthylé d'un ambre de Bitterfeld de type succinite provenant du Musée d'Histoire Naturelle de Berlin. En bleu diterpénoïdes de la série de l'acide (iso)pimarique, en vert diterpénoïdes de la série de l'acide abiétique, en violet les labdanoïdes et en rouge les dérivés de l'acide succinique. Les cercles noirs correspondent à des diterpènes soufrés. Les acides sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

IV.3.2.2. Analyse moléculaire de la gédanite

Les échantillons de gédanite analysés (collection de J. Panczak,Université de Cracovie, Pologne et collection personnelle de C. Du Gardin) présentent un cortège moléculaire dominé par les diterpènes de la série de l'acide (iso)pimarique (**3**), (**4**), (**14**) et (**15**) (**Figure IV.20**). Des labdanoïdes apparentés à l'acide agathique (**8**) et (**9**) et des diterpènes de la série de l'acide abiétique (e.g., (**16**)) sont aussi présents en moindre abondance. L'ensemble de ces composés est aussi présent dans la succinite baltique (**Figure IV.19**). En revanche, aucun dérivé d'acide succinique tels que (**17**), (**18**) ou (**19**) n'a été détecté dans les extraits organiques, pas même à l'état de traces. Ceci a par ailleurs été confirmé par des expériences de butanolyse effectuées sur les fractions polaires des extraits organiques, expériences qui n'ont pas conduit à la libération du diester butylique de l'acide succinique (**1**).



Figure IV.20. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique méthylé d'une gédanite de la collection personnelle de C. du Gardin. En bleu, diterpénoïdes de la série de l'acide (iso)pimarique, en vert, diterpénoïdes de la série de l'acide abiétique, et en violet, les labdanoïdes. Les acides carboxyliques sont analysés sous la forme d'esters méthyliques.

Les échantillons de gédanite présentent donc un cortège moléculaire proche de celui des succinites de Bitterfeld, à l'exception de l'absence de dérivés de l'acide succinique tels que (**17**), (**18**) ou (**19**). L'hypothèse la plus raisonnable serait que la source botanique à l'origine de ce type d'ambre soit donc proche de celle de la succinite baltique, mais cette espèce végétale ne produirait pas d'acide succinique (**1**). De par la dominance des dérivés de la série de l'acide pimarique (**3**), l'hypothèse d'une source botanique appartenant aux Pinacées, et plus particulièrement aux Abiétoidées, est plus que probable (cf. Chapitre I). En effet, les résines d'Abiétoïdées, à l'instar des résines de *Cedrus, Abies* et *Pseudolarix*, sont dominées par les dérivés de la série de l'acide pimarique (**3**) et sandaracopimarique (**7**) (cf. Chapitre I, (Anderson et LePage, 1996; Bray et Anderson, 2008; Cox et al., 2007; Croteau et Johnson, 1985; Keeling et Bohlmann, 2006; Langenheim, 2003; Otto et al., 2007).

Stout et al. (1996) ont proposé qu'une même source botanique serait à l'origine de la gédanite et de la succinite. Il pourrait être possible en effet que les différences chimiques soient dues à des variations d'ordre biologique. Ainsi, l'acide succinique (**1**)

pourrait être produit par une espèce végétale donnée en réponse à un stimulus environnemental. Il est également possible que les sources botaniques soient proches et appartiennent au même genre, mais à des espèces distinctes, l'une générant de l'acide succinique (1) et l'autre non.

IV.3.2.3. Caractérisation moléculaire de la glessite de Bitterfeld

Les échantillons de glessite étudiés proviennent des collections de J. Panczak (Université de Cracovie, Pologne). Ils peuvent être séparés en deux catégories, les variants bruns et les variants brun-noirs qui se distinguent par leurs propriétés physiques et leur couleur. Ces lots présentent tous deux une prédominance de triterpènes qui sont des biomarqueurs d'Angiospermes (Langenheim, 2003). En dehors de cela, les deux variants montrent des différences laissant penser à des origines botaniques distinctes.

L'échantillon provenant du lot de variants noirs (**Figure IV.21**) que nous avons analysé contient principalement des triterpènes dérivant de l'α-amyrine (44) et de la β-amyrine (43). Des dérivés de type amyrénones ont également été détectés (38-41). Associés à ces composés, un dérivé en série lupane (45) a été détecté. La prépondérance des triterpènes possédant les squelettes de l'oléanane (47), de l'ursane (48) et du lupane (49) laisse penser à une origine à partir de Burséracées (cf. Chapitre I). Chez les Burséracées actuelles productrices de résine, il existe les genres *Canarium* (élémi, Chapitre I, **Figure 1.37**), *Boswellia* (oliban), *Bursera, Commiphora* (myrrhe) et *Protium (elemi).*



Figure IV.21. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) partiel (zone des triterpènes) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique acétylé et méthylé d'un variant noir de la glessite de Bitterfeld. En violet, les triterpènes. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques et les alcools sous forme d'acétates.

Le genre *Canarium* est caractérisé par la prédominance des amyrines (**43**) et (**44**), comme dans le cas de l'échantillon de glessite présent. De plus, les rapports entre les différentes amyrines (**43**) et (**44**) sont plutôt proches de celui observé dans les résines actuelles d'arbres du genre *Canarium* (Bisset et al., 1966 ; Burger, 2008 ; Diaz et al., 1966). Cependant, les résines de *Canarium* actuelles contiennent des composés possédant un squelette de type euphane (**50**), alors que ceux-ci sont absents dans l'échantillon de glessite (Cartoni et al., 2004 ; Cotterrell et al., 1970). Par ailleurs, l'absence de dérivés de l'acide α -boswellique (**51**) (**Figure IV.22**) semble écarter le genre *Boswellia* comme producteur potentiel (cf. Chapitre I; Cotterrell et al., 1970 ; Fattorusso et al., 1983). Le genre *Bursera* quant à lui est caractérisé par l'abondance de l' α -amyrine (**44**) et du lupéol (**45**), et constituerait de ce fait une source possible pour la glessite (Lucero-Gómez et al., 2014 ; Stacey et al., 2006). Cependant, dans les résines provenant de végétaux appartenant au genre *Bursera*, l' α -amyrine (**44**) est largement minoritaire par rapport à la β -amyrine (**43**), ce qui n'est pas le cas dans l'échantillon de glessite analysé.

Enfin, le genre *Protium* est caractérisé par l'abondance des amyrines (**43**) et (**44**) et par la présence de breine (**52**) et de maniladiol (**53**) (Stacey et al., 2006, **Figure IV.20**). Ces composés étant absents ici, cela semble aussi écarter cette source.



Figure IV.22. Structure de l'acide α-boswellique (51), la breine (52), du maniladiol (53), du dipterocarpol (54) et des composés supposés en dériver (55) et (56). Ces derniers n'ont été détectés que dans l'échantillon de glessite brune.

Pour conclure, il apparait que les variants noirs de la glessite sont plutôt affiliés à la famille des Burséracées, une famille d'Angiospermes connue actuellement en tant que productrice de résines appelées élémi (*Canarium* et *Protium*), myrrhe (*Commiphora*) ou oliban (*Boswellia*) (cf. Chapitre I, Figure I.37). L'échantillon de glessite noire présente le plus de ressemblances avec les résines des genres *Canarium* et *Bursera*. Cependant, il existe quelques différences moléculaires entre les résines actuelles et l'échantillon de glessite noire, ce qui rend son rattachement à une source botanique précise non évidente. Il est possible que l'espèce productrice de résine à l'origine de la glessite noire de Bitterfeld soit une espèce éteinte de *Canarium* ou de *Bursera*, comme le proposent Yamamoto et al. (2006), ou alors que la glessite noire soit liée à un genre botanique relativement proche de ceux-ci.

Les variants bruns de glessite présentent également des triterpènes comme composés principaux (**Figure IV.23**).

Ceux-ci possèdent les squelettes hydrocarbonés de l'oléanane ((40), (43), (57), (59), (62), (64)), de l'ursane ((41), (44), (58), (60), (63), (65), (66)) et du dammarane (55) et

(56), indiquant plutôt une origine de type Diptérocarpacées (Burger, 2008; Steigenberger, 2013; Chapitre I, Figure I.41).



Figure IV.23. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) partiel (zone des triterpènes) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique acétylé et méthylé d'un variant brun de la glessite de Bitterfeld. En violet, les triterpènes. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques et les alcools sous forme d'acétates.

L' α -amyrine (44) et la β -amyrine (43) sont des composés importants, mais ils ne sont pas dominants de façon écrasante, comme cela est le cas avec le variant noir de la glessite. Les composés (55) et (56), même si leur structure n'est pas complètement élucidée, semblent appartenir à la série du diptérocarpol (54) (Figure IV.22; Burger, 2008 ; Cheung et Feng, 1968), un des composés communs dans la famille des Diptérocarpacées, et plus particulièrement dans le genre *Dipterocarpus* (Burger, 2008 ; van der Doelen et al., 1998). Les structures proposées pour les composés (55) et (56) sont présentées en Figure IV.22. Leurs spectres de masse présentent comme fragment principal un ion à *m*/*z* 149, qui est un fragment fréquemment rencontré dans les spectres de masse des triterpènes de la famille du dammarane (Betancor et al., 1983 ; Burger, 2008 ; Van der Doelen, 1998 ; Perthuison, 2020).

Associé à ces composés se trouve l'acide asiatique (**66**) qui est un triterpène principalement présent chez les Diptérocarpacées (Bandaranayake et al., 1975 ; Bisset et al., 1971 ; Perthuison, 2020). Cependant, il semble relativement difficile de relier cet échantillon à un genre actuel.

IV.3.2.4. Caractérisation moléculaire de la stantiénite de Bitterfeld

La stantiénite présente une distribution moléculaire tout à fait inhabituelle pour un ambre, caractérisée par un fond moléculaire non résolu important (**Figure IV.24a**). Cela est généralement caractéristique d'une matière organique très mature et altérée par la diagenèse, voire la catagenèse, comme dans le cas de charbons, de pétroles ou de bitumes (Eglinton et al., 1990 ; Oros and Simoneit, 2000 ; Stefanova et al., 1995). L'échantillon comprend également une série d'alcanes linéaires allant de C₁₂ à C₃₄ sans prédominance paire/impaire, et d'apparence typiquement pétrolière. La distribution de ces composés peut être mise en avant à l'aide du fragmentogramme de masse m/z 71 (**Fig. IV.24b**), qui permet également de détecter le pristane et le phytane, hydrocarbures typiquement présents dans les pétroles et bitumes (Peters and Moldowan, 1993).



Figure IV.24. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique méthylé d'une stantiénite de Bitterfeld (Collection de J.Pànczak) (A) Courant d'ion total ; (B) Fragmentogramme de masse m/z 71.

En accord avec ces premières observations, nous notons également la présence, grâce au fragmentogramme de masse m/z 191 (**Figure IV.25**) des séries de biomarqueurs que l'on observe classiquement dans les extraits organiques de sédiments matures, de pétroles ou de charbons, comme les hopanes d'origine bactérienne dont la distribution dominée par le terme en C₃₀ s'étend de C₂₇ à C₃₅ (Peters et al., 2005) ou les polyterpénoïdes réguliers tricycliques (Peters et al., 2005))

dont la distribution s'étend du terme en C₁₉ jusqu'au terme en C₃₀ au moins. De même, l'examen du fragmentogramme de masse m/z 217 permet d'identifier la présence de stéranes à chaine courte (à partir de C₁₉) ainsi que de stéranes à chaînes longues (C₂₇-C₂₉) dominés par les composés en C₂₉ (Peters et al., 2005). La distribution des isomères des hopanes, dominée, respectivement, par les isomères 17 α (H)21 β (H) 22*S* et celle des stéranes caractérisés par une contribution comparable des isomères 14 α (H)17 α (H) et 14 β (H)17 β (H) ainsi que le rapport des isomères 20*R* et 20*S*, est typique d'une matière organique sédimentaire relativement mature (Peters et al., 2005). Les caractéristiques moléculaires de la stantiénite évoquent ainsi plutôt une matière organique sédimentaire de type pétrolière mature ou issue de charbons et éventuellement biodégradée (présence d'un fond moléculaire non résolu important).



Figure IV.25. Fragmentogrammes de masse (GC-MS, IE, 70 eV) (**a**) m/z 217 et (**b**) m/z 191 de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique acétylé et méthylé d'une stantiénite de Bitterfeld.

Contrairement à Yamamoto et al. (2006), notre analyse n'a pas permis de mettre en évidence des composés diterpéniques ou des mono- et diacides gras linéaires dont la présence semblerait d'ailleurs incompatible avec le niveau de maturité tel que déduit d'après les distributions des hopanes (67) et des stéranes (68). Nous n'avons pas non plus mis en évidence les composés issus de l'aromatisation diagénétique de triterpènes d'Angiospermes rapportés par Yamamoto et al. (2006). Cependant, en

contradiction nette avec le caractère mature de cet extrait lipidique, nous avons clairement mis en évidence, sur la base de la spectrométrie de masse, la présence des α - et β -amyrénones (**41**) et (**40**) ainsi que des analogues déméthylés sur les cycles *A* ou *B* des α - et β -amyrines (**71**) et (**70**) (fragmentogramme de masse *m/z* 218 ; **Figure IV.26b**). Nous avons également détecté les analogues déméthylés en position C-19 de ces composés (28-nor-amyrénones (**57**)/(**58**) et bisnor-amyrines (**72**)/(**73**)). Ces derniers sont caractérisés par la prédominance d'un fragment à *m/z* 204 dans leurs spectres de masse et des ions moléculaires décalés de 14 Da par rapport aux triterpènes non déméthylés en C-19 (cf. fragmentogramme de masse *m/z* 204 ; **Figure IV.26a**).



Figure IV.26. Fragmentogrammes de masse (GC-MS, 70 eV, IE) (**a**) m/z 204 et (**b**) m/z 218 de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique acétylé et méthylé d'une stantiénite de Bitterfeld (GC-MS, IE, 70 eV).

La présence de ces composés indique clairement une contribution de matière organique issue d'Angiospermes que l'on pourrait trouver, notamment, dans de l'ambre issue de résine d'arbres de la famille des Burseracées. Les composés (**70**) et (**71**), notamment, pourraient être issus de la décarboxylation de triterpènes comme les acides a-et *b*-boswelliques (**51**)/(**74**) qui portent un groupement carboxy sur le cycle *A* et qui sont présents dans les résines d'arbres du genre *Boswellia*, notamment (e.g. Al-Harrasi et al., 2021).

La présence de 28-nor-amyrinénones (57)/(58) issues de la décarboxylation de composés portant une fonction carboxy en C-19 est souvent rapportée dans le cas de résines et d'ambres issus de Diptérocarpacées (Burger, 2008). A cet égard, cette composante végétale identifiée dans la stantiénite n'est pas sans rappeler la distribution des triterpènes observée dans le variant brun de la glessite que nous avons analysé (Figure IV.23), bien que la présence de triterpénoïdes déméthylés sur les cycles A ou B n'ait pas été mise en évidence dans le cas de la glessite. La présence de composés organiques fonctionnalisés très proches de leurs précurseurs moléculaires biologiques suggère une immaturité de la matière organique extraite, ce qui est en contradiction totale avec le caractère mature (et biodégradé) tel qu'indiqué par l'analyse de la composante « pétrolière » de l'extrait. Il semble clair cependant que la stantiénite n'est pas un ambre, mais présente les caractéristiques principales de bitumes pétroliers très altérés tels ceux provenant de zones de suintement de pétrole de surface et dont l'aspect peut se rapprocher de celui observé ici (Oros et Simoneit, 2000). Les marqueurs de végétaux seraient quant à eux le résultat de la contamination d'un bitume ancien par de la matière organique d'origine végétale issue de sédiments immatures avec lesquels le bitume aurait été mis en contact.

IV.3.2.5. Caractérisation moléculaire de la kranzite

Deux lots distincts d'ambre associés à la krantzite ont été analysés lors de cette étude. Il s'est avéré que les deux lots étaient identiques d'un point de vue moléculaire, avec quelques variations de proportions relatives minimes entre les différents composés. (**Figure IV.27**).

Les extraits organiques des deux échantillons de krantzite analysés comprennent principalement des triterpènes dérivant des acides oléanolique (**81**) et ursolique (**83**) et leurs produits de décarboxylation en C-19. Ces composés sont relativement communs parmi les résines d'Angiospermes (Burger, 2008 ; Steigenberger, 2013 ; Chapitre I, §I.2.3.2.).



Figure IV.27. Chromatogramme en phase gazeuse partiel (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique acétylé et méthylé d'une kranzite. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques et les alcools sous forme d'acétates.

Les amyrines (43) et (44) ne sont pas présentes alors qu'elles sont souvent prédominantes dans les résines de Burséracées. Nous proposons donc une origine parmi les Diptérocarpacées. Cependant, il est à noter que les krantzites analysées ne contiennent pas de composés « typiques » des résines de Diptérocarpacées, comme le diptérocarpol (54) ou l'acide asiatique (66) (Burger, 2008).

IV.3.3. Conclusion

La région de Bitterfeld et ses environs recèlent une variété importante d'ambres présentant des types moléculaires différents. La majorité des ambres se rapproche des succinites baltiques, ce qui est en accord avec l'hypothèse d'une origine commune entre les succinites baltiques et celles de Bitterfeld.

Les différences majeures sont liées à la présence, dans les succinites de Bitterfeld, de diterpènes soufrés (cf. Chapitre II). Cela pourrait s'expliquer par un milieu de fossilisation différent, et suggère ainsi que les succinites de Bitterfeld et de la Baltique proviendraient d'arbres issus de deux types de forêts géographiquement distinctes. Toutefois, la ressemblance entre les échantillons de succinites de la Baltique et celles

de Bitterfeld suggère que celles-ci proviennent de sources botaniques proches telles que des Pinacées, d'un même genre, si ce n'est d'une même espèce productrice. Les distributions moléculaires des succinites présentent également des analogies avec celles des gédanites, qui sont identiques, à l'exception de l'absence de dérivés d'acide succinique (1) parmi les composés libres ou liés dans la partie macromoléculaire des gédanites. Cela pourrait s'expliquer par une source botanique légèrement différente. Il est également possible qu'une source botanique donnée soit capable de produire de la résine contenant de l'acide succinique (1) uniquement dans certains contextes environnementaux.

En dehors des succinites et des gédanites ayant les Pinacées comme sources botaniques possibles, des origines botaniques très différentes, notamment associées aux Angiospermes, ont pu être proposées pour les autres ambres de Bitterfeld. Ces ambres révèlent donc une certaine diversité écologique de ces forêts comprenant des espèces résinifères reliées aux Angiospermes et aux Gymnospermes à l'origine de ces ambres (Simoneit et al., 2021a ; Weitschat et Wilfried, 2002 ; Wolfe et al., 2016). De plus, l'identification de certaines catégories d'ambres, telles que la glessite, semble en réalité plus complexe que ce que pouvait laisser supposer l'analyse morphologique. En effet, si toutes les glessites partagent un aspect visuel similaire et des propriétés physiques analogues, il s'avère que plusieurs types moléculaires peuvent être distingués. Ainsi, si on considère les études antérieures de la glessite (e.g. Anderson et Botto, 1993 ; Yamamoto et al., 2006) et les analyses que nous avons réalisées, il y aurait pour cette catégorie d'ambre aux moins trois sources botaniques distinctes comprenant des Burséracées, des Diptérocarpacées et des conifères. La goitschite semble aussi avoir une variabilité chimique insoupçonnée, puisque l'échantillon analysé lors de cette étude semble provenir d'une résine de Diptérocarpacées et non pas d'un conifère comme cela était le cas dans l'étude de Yamamoto et al. (2006).

En revanche, d'autres types d'ambre semblent posséder une certaine similitude au niveau moléculaire, et donc d'un point de vue sources botaniques. Ainsi par exemple, les kranzites semblent toutes issues d'une plante associée aux Diptérocarpacées. Si l'on accepte que les ambres de Bitterfeld datent de l'Eocène (et non de l'Oligocène inférieur, comme cela a également été proposé), notre étude permettrait donc de mettre en évidence que même s'il existe une majorité d'ambres (succinites) qui est produite par un producteur principal, celui-ci n'est de loin pas la seule espèce

productrice durant l'Éocène dans la région saxonne. Notamment, il semble y avoir une certaine diversité de végétaux producteurs parmi les Angiospermes, puisqu'il y a au moins plusieurs sources parmi les Diptérocarpacées et les Burséracées. Il est d'ailleurs plus que probable que cette variabilité soit sous-estimée en raison du faible échantillonnage (n<5) pour les différentes catégories d'ambres analysées.

IV.4. La duxite, un ambre appartenant à une catégorie à part

IV.4.1. Contexte de l'étude

IV.4.1.1. Contexte géologique

À la fin du XIX^{ème} siècle, dans la mine de Duchov au cœur du massif de Bohême (République tchèque) ont été trouvées des quantités importantes d'ambre associé à des lignites (Doelter, 1874). Cet ambre a été par la suite nommé duxite en l'honneur de la ville allemande de Dux. Ces ambres provenant de la mine sont relativement cassants et présentent un aspect similaire, avec un couleur marron très foncée. Par la suite, des ambres identifiés comme étant de la duxite ont également été découverts dans d'autres mines de la région du massif de Bohème (Bittner, 1913 ; Bouška et al., 1999 ; Jurasky, 1940 ; Kuhlwein, 1951). Ces mines sont caractérisées par la présence de niveaux ligneux secondaires et tertiaires entrecoupés par des coulées volcaniques intrusives plus tardives et datées entre l'Oligocène et le Miocène. Le massif de Bohème qui contient la majorité des mines où l'on trouve de la duxite est composé de deux grands bassins : le bassin de Most et le bassin de Solokov (**Figure IV.28b**). Ce massif appartient au système orogénique de Ohre.

Les sédiments ont été principalement déposés dans des environnements dulcicoles tels que des fleuves et des lacs. Les différentes sous-unités du bassin du Most par exemple sont associées à un système de delta couplé à un lac (Havelcová et al., 2018, 2014). L'âge miocène de la duxite plus particulièrement est estimé entre -17,5 et -20 Ma (Matys Grygar et al., 2014).



Figure IV.28. A) Echantillon de duxite étudié B) Localisation des bassins du massif de Bohême et des bassins associés avec la position des mines principales contenant de la duxite (modifié d'après Havelcová et al., 2018). La flèche indique le site de prélèvement de l'échantillon étudié.

IV.4.1.2. Études précédentes et origines supposées

Les premières études portant sur la duxite décrivent essentiellement sa couleur brunnoire particulière (Doelter, 1874) et certaines hypothèses ont été émises pour tenter d'expliquer cette couleur relativement rare chez les ambres. L'une des premières hypothèses serait que la résine, lors de son dépôt, aurait été chauffée par les intrusions volcaniques et aurait migré jusqu'aux couches de charbon/lignite (Jurasky, 1940). Stach (1966), lors de l'étude de la fossilisation des charbons du bassin de Bohème, fait l'hypothèse que la duxite serait un produit de l'activité volcanique et du stress thermique qui y est associé. Cet auteur a aussi proposé que la couleur noire ou marron foncé de l'ambre serait due à des composés humiques associés aux charbons.

Les premières études par spectroscopie infrarouge réalisées par Langenheim et Beck (1965) ont permis de mettre en évidence que les spectres de la duxite sont assez peu communs pour de l'ambre, ce qui semble indiquer qu'il s'agit d'un matériau ayant subi une polymérisation très particulière, qui n'aurait été que partielle. De même, selon Murchison et Jones (1964), la structure de ce type d'ambre aurait été influencée par le stress thermique, car les études de spectroscopie infrarouge montrent des absorptions typiques de noyaux aromatiques dont la formation pourrait être liée à des

processus d'aromatisation en relation avec une pyrolyse naturelle. De plus, la duxite est toujours trouvée en association directe avec des arbres et des fossiles carbonisés (Bouška et al., 1999 ; Dvořák, 1999 ; Zelenka, 1972). Zelenka (1972) a toutefois réfuté l'hypothèse selon laquelle les caractéristiques particulières de la duxite seraient dues à un stress thermique lié au volcanisme. Selon cet auteur, la fossilisation particulière de la duxite serait due à un contexte local d'augmentation de température lors du processus d'houillification. De plus, d'autres ambres, qui ne sont que faiblement polymérisés et qui possèdent des caractéristiques similaires aux duxites, ont été découverts dans d'autres contextes en Angleterre (Devon) et aux États-Unis (Californie) (Grantham et Douglas, 1980 ; Streibl et al., 1976).

Finalement, par la suite, Anderson et al., (1992) a placé la duxite dans une catégorie à part dans sa classification des ambres, la classe IV, regroupant des ambres qui ne seraient pas des substances principalement macromoléculaires (faible taux de polymérisation) (cf. Chapitre I). Cette hypothèse aurait été proposée en raison de l'importante solubilité de ce type d'ambre dans les solvants organiques usuels.

Les premières études portant sur la duxite réalisées par GC-MS ont révélé que les échantillons de duxite présentent une certaine hétérogénéité moléculaire (Vavrà et al., 1997). Ainsi, même si celles-ci présentent toutes des diterpènes, des variations sont visibles parmi les composés majeurs en termes de quantités relatives et de la présence/absence de certaines familles. Les échantillons de duxite étudiés ont cependant tous montré la présence des dérivés du labdane (86), de l'abiétane (87) et de l'(iso)pimarane (88)/(89). Associés aux diterpènes, de nombreux sesquiterpènes ont été identifiés. Selon Vavrà (2009), dont les travaux avaient mis en évidence la présence d'un certain nombre d'hydrocarbures diterpéniques (Vavrà et al., 1997), en contradiction avec les résultats de Zelenka (1982) qui rapporte la présence de cires et de résines, il faudrait pousser plus en avant l'étude moléculaire de la duxite, d'autant plus que d'autres études, réalisées ultérieurement par Krumbiegel (2002), suggèrent que la duxite est constituée d'un mélange de bitume et de différentes résines.

Afin de discuter de la variabilité moléculaire de la duxite et de son ou ses origine(s) botanique(s) potentielle(s), Havelcová et al. (2018) ont étudié un ensemble d'échantillons provenant de différentes mines et collections. Il s'est avéré que l'ensemble des échantillons étudiés pouvaient être rattachés à une même origine, à l'exception de l'un d'entre eux qui comportait des alcanes typiquement pétroliers. Les autres échantillons étudiés présentaient tous, en quantités variables, des composés

diterpéniques de la série de l'abiétane (87) et de l'(iso)pimarane (88)/(89), des labdanoïdes, du phyllocladane/kaurane (90)/(91) et des phénols diterpéniques en faibles quantités. La plupart des dérivés diterpéniques étudiés étaient cependant présents sous la forme d'hydrocarbures et non pas d'acides résiniques, comme il est commun d'en trouver dans les ambres. La présence de diterpénoïdes phénoliques, même en faibles quantités, serait caractéristique des résines de Cupressacées (Chapitre I, §I.2.3.1.2, Cox et al., 2007 ; Langenheim, 2003 ; Otto et Wilde, 2001). Cela serait également cohérent avec la présence, dans certains échantillons, de cédrane (92), un hydrocarbure dérivé du cédrol (94), ainsi que de cuparène (93), tous deux étant des sesquiterpènes typiques de cette famille (Enzell et Erdtman, 1958 ; Simoneit et al., 2018). Selon Havelcova et al. (2018), les différences détectées entre les échantillons, comme par exemple des variations dans les proportions relatives de phyllocladane/kaurane (90)/(91), s'expliqueraient par un niveau d'altération thermique différent lié à une maturation différente associée aux intrusions volcaniques.

Pour étayer cette hypothèse, des expériences de maturation par chauffage en laboratoire ont permis de mettre en évidence que les principales différences au sein des échantillons étudiés seraient dues à des niveaux d'enfouissement et de température associée aux intrusions volcaniques différents. Malgré un niveau d'altération thermique avancé apparemment subi par les échantillons, Havelcová et al. (2018) émettent l'hypothèse que la duxite serait issue d'une source botanique affiliée aux Cupressacées, en se basant sur la présence de cédrane (92), de cuparène (93) et de diterpénoïdes phénoliques. Cela est en accord avec les études paléontologiques qui montrent que les fossiles les plus présents dans les niveaux de lignite où l'on trouve de la duxite sont *Glyptostrobus europaeus*, *Quasisequoia couttsiae* et *Taxodium dubium*, qui sont des Cupressacées (Havelcová et al., 2013; Teodoridis et Sakala, 2008). De plus, de l'ambre a directement été trouvé en contact avec du bois et des cônes fossiles de *Taxodium dubium* (Kvaček et al., 2004).

IV.4.2. Résultats et discussion

L'échantillon de duxite étudié se présente sous la forme d'un ensemble d'éclats englobés dans du lignite. La solubilité de la duxite dans les solvants organiques utilisés est très importante, ce qui est cohérent avec les hypothèses précédentes proposant que la duxite correspond à une résine fossile très peu polymérisée (Havelcová et al., 2018 ; Krumbiegel, 2002). L'échantillon étudié ici contient principalement des sesquiterpènes dont une partie pourrait correspondre à des produits de maturation de labdanoïdes et des diterpènes (**Figure IV.29**) caractéristiques des résines et des ambres de conifères (Langenheim, 2003 ; Otto and Wilde, 2001).



Figure IV.29. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique méthylé d'un échantillon de Duxite (Bílina, République tchèque, collection J. Pànczak, Université de Cracovie). En noir, les sesquiterpènes, en vert, les diterpénoïdes de la série de l'abiétane, en bleu, les diterpénoïdes de la série du (iso)pimarane. Les acides carboxyliques ont été analysés sous la forme d'esters méthyliques.

A l'instar des échantillons de duxite étudiés par Havelcová et al. (2018), le sesquiterpène majoritaire est le α -cédrane (92) dérivé du cédrol (94), qui est usuellement rattaché aux Cupressacées (Enzell et Erdman, 1958). Associé à ces sesquiterpènes apparaissent également des diterpènes de la série de l'abiétane (87) et de l'(iso)pimarane (88)/(89).

En accord avec ce qui a été évoqué précédemment, une particularité notable de cet échantillon est qu'il ne présente que très peu d'acides résiniques alors que ceux-ci sont usuellement majoritaires dans les ambres et les résines (Anderson, 1995 ; Langenheim, 2003 ; Otto et Wilde, 2001). La plupart des composés présents le sont sous la forme d'hydrocarbures ((87), (92), (95-110), (112) ; Figure IV.29), dont de nombreux diterpènes aromatiques ((102), (104-108) ; Figure IV.29).

Il est également remarquable que les diterpénoïdes identifiés sont généralement diméthylés sur la position C-4. Si la duxite était la version d'une résine de conifères « classique » ayant subi un stress thermique important lors de la diagenèse en raison d'un contexte volcanique local, on se serait attendu à la présence d'hydrocarbures diterpénoïdes ne portant qu'un seul méthyle sur la position C-4 (**Figure IV.29**). En effet, les résines de conifères étant généralement dominées par des acides diterpéniques (acides résiniques) portant une fonction acide carboxylique en C-4, ce méthyle fonctionnalisé est susceptible d'être facilement perdu (par décarboxylation) sous l'effet d'un stress thermique important (e.g. Carpy et Marchand-Geneste, 2003). Ceci conduirait donc à la formation d'hydrocarbures diterpéniques pour lesquels un carbone aurait été perdu en C-4. Il en résulte donc que la résine à l'origine de la duxite étudiée ici pourrait ne pas présenter les caractéristiques d'une résine classique de conifères, même si les biomarqueurs qu'elle contient peuvent indéniablement être associés aux conifères et peut être même plus précisément aux Cupressacées.

Les seuls composés qui pourraient être rattachés aux labdanoïdes généralement présents dans les résines de conifères qui apparaissent sur le chromatogramme de la Figure III.29 sont les composés bicycliques saturés ou partiellement insaturés à chaîne courte ((95-99), (103)) élués en début de chromatogramme. Ils pourraient être le résultat de réactions de la coupure de la chaîne latérale de labdanoïdes en C₂₀ sous l'effet des températures élevées auxquelles a visiblement été soumise la duxite. Il est à noter que ces dérivés sont tous diméthylés en position C-4, ce qui indique que les composés précurseurs de ces dérivés diagénétiques ne possédaient sans doute pas de fonction carboxy ou hydroxyméthyle en position C-4 en opposition à ce qui est généralement le cas pour les labdanoïdes apparentés à l'acide communique (6) et au communol (27) présents dans les résines de conifères. Comme cela a été évoqué dans le cas de diterpénoïdes tricycliques, la présence de tels précurseurs fonctionnalisés aurait vraisemblablement conduit à la formation de composés déméthylés en C-4 sous l'effet d'un stress thermique intense, ce qui n'est pas le cas dans l'échantillon étudié dans lequel seuls des dérivés diméthylés ont été identifiés. Il est à noter que l'échantillon étudié présente également un diterpénoïde phénolique, le ferruginol (111), en quantités non négligeables. Ces diterpénoïdes phénoliques sont typiques des Cupressacées actuelles (cf. Chapitre I ; Cox et al., 2007). Par exemple, la résine de Taxodium distichum (cf. Chapitre I, Figure I.19) est caractérisée par la prédominance de composés phénoliques.

Dans le cas de la duxite, celle-ci présente d'autres séries des diterpènes, à l'instar de la résine de *Cupressus sempervirens* qui possède en quantités presque égales des composés phénoliques, des labdanoïdes et des dérivés de l'acide (iso)pimarique (**3**)/(**4**).

La duxite possède donc des caractéristiques typiques des Cupressacées, comme la présence de diterpénoïdes phénoliques (Cox et al., 2007) et de cédrane (**92**) (Enzell et Erdtman, 1958 ; Otto et Wilde, 2001). Cependant, l'absence d'acides résiniques typiques des Cupressacées, comme l'acide sandaracopimarique (**7**) (Cox et al., 2007) remet en cause cette attribution. L'hypothèse proposée par Havelcovà et al. (2018) expliquant cette absence par une maturation thermique est peu probable, dans le cas de notre échantillon tout au moins, dans la mesure où les diterpènes et leurs dérivés identifiés sont diméthylés en C-4, et ne correspondent donc pas à des produits d'altération thermique d'acides résiniques. En revanche, il semblerait que les molécules précurseurs présentes dans la résine à l'origine de notre échantillon de duxite possédaient des structures bien particulières, avec notamment l'absence de fonctionnalité(s) en C-4.

IV.4.3. Conclusion et perspectives

La composition moléculaire de notre échantillon de duxite suggère que celle-ci proviendrait d'une résine de Cupressacées n'ayant pas d'équivalent actuel à notre connaissance. En effet, celle-ci serait majoritairement constituée de diterpénoïdes non fonctionnalisés en C-4, donc différents des acides résiniques les plus « classiques ». En termes de perspectives, il serait intéressant d'étudier la composante macromoléculaire de ce type d'échantillons, ainsi que de compléter nos travaux par l'analyse moléculaire d'autres échantillons de duxite de la République tchèque, et, plus largement, d'ambre de type IV (e.g. Ambre du Devon, Angleterre).

IV.5. L'ambre de l'Oise (France), un ambre d'Angiospermes dépourvu de triterpènes

L'Oise est le département de France où les plus grandes quantités d'ambre ont été trouvées. Lacroix (1910) a listé plus d'une dizaine de sites présentant de l'ambre dans ce département. L'exploitation de la zone à ambre dans l'Oise est relativement tardive

puisque les premières traces écrites d'exploitation de sites ambrifères en France sont datées de la deuxième partie du XX^{ème} siècle. De 1950 à 1980, quelques carrières ont été ouvertes autour de Paris et exploitées uniquement à des fins scientifiques (Nel et Brasero, 2010). L'ambre est trouvé principalement dans des niveaux de lignite datés de l'Eocène inférieur (De Franceschi et al., 2000). L'ambre de l'Oise, souvent translucide, contient de nombreuses inclusions, principalement des insectes, mais aussi des fragments de plantes (De Franceschi et al., 2000). L'ensemble diversifié d'organismes présents dans l'ambre de l'Oise semble indiquer que l'ambre provient d'un environnement complexe et riche en espèces. Cette partie est consacrée à l'analyse de l'ambre de l'Oise afin de déterminer si celui-ci provient d'une unique source botanique comme le supposent de nombreuses études (De Franceschi et al., 2000; Nel et al., 1999, 2004) ou si l'ambre est issu de sources distinctes.

IV.5.1. Contexte de l'étude

IV.5.1.1. Contexte géologique

Le Bassin Parisien abrite des dizaines de sites contenant de l'ambre (Lacroix, 1910 ; **Figure IV.30**). Les sédiments associés à l'ambre sont des sables bruns d'une épaisseur importante datant du début de l'Éocène. Les faciès typiques liés à cet ambre de la région de l'Oise sont décrits sous le nom d'«argiles à lignite » pour la première fois en détail dans les environs de Soissons (Nel et al., 1999). Des paléochenaux sont visibles dans les sédiments et ceux-ci recoupent des sédiments marins de couleur verte, qui sont datés du Thanétien (-59,2 à -56 Ma). Les argiles à lignite du Soissonnais sont sous la forme de lenticules et sont datées du Sparnacien (-55,8 à -53 Ma) comprenant deux grands faciès. Le premier faciès correspond à du sable argileux riche en lignite pyritisé contenant de l'ambre tandis que le second est moins riche en lignite, mais recèle plus de fossiles de vertébrés (Nel et al., 1999). La rareté des fossiles de mollusques et de charophytes associés à la présence de pyrite laisse penser à un environnement hypoxique voir anoxique avec un fort taux de soufre (Nel et Brasero, 2010).

Le paléoenvironnement de dépôt lié à ce faciès serait donc de type continental fluviatile. Les fossiles de végétaux y étant associés suggèrent la présence d'une forêt humide semi-décidue se développant sous un climat relativement chaud (Nel et al.,

2004). Cependant, des fossiles caractéristiques de zones plus arides ont également été trouvés. Cela laisserait penser à un environnement typiquement deltaïque sous un climat présentant une alternance de saisons sèches et humides. La flore en présence aurait été diversifiée et principalement dominée par les Angiospermes, et plus particulièrement les dicotylédones. Les fossiles de la plante les plus fréquemment identifiés dans les sédiments sont apparentés à *Aulacoxylon sparnacense* (Combes 1907), plante qui est décrite pour la première fois dans les sédiments sparnaciens.



Figure IV.30. A) Carte géologique de la zone de l'Oise (France) avec en vert, les sites principaux où de l'ambre a été trouvé (d'après De Franceschi et de Ploëg, 2003; Nel et al, 2004). B) Les échantillons étudiés dans cette partie proviennent des sites suivants : Le Quesnoy (Collection du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris), Moru (Collection de C. du Gardin) et Gisors (collection Muséum National d'Histoire naturelle de Paris, A. Nel).

IV.5.1.2. Etudes précédentes de l'ambre de l'Oise. Origines botaniques proposées

Combes (1907), lors de sa description des fossiles présents dans les sédiments sparnaciens, a décrit des restes fossiles de bois d'une Angiosperme qu'il a nommé

Aulacoxylon sparnense. Ces restes fossiles sont souvent trouvés dans les lentilles les plus riches en ambre. Il en a donc conclu qu'il s'agissait probablement de l'espèce productrice de la résine à l'origine de l'ambre de l'Oise. Par la suite, de Franceschi et de Plöeg (2003) ont décrit plus en détail ce bois fossile qu'ils considèrent comme étant très similaire à celui des actuelles Fabacées et Combretacées (Rosidées).

Plus particulièrement, ces auteurs ont observé dans les différents organes fossiles une ressemblance avec le genre *Daniellia*, une fabacée actuelle. Cependant, d'autres fossiles de végétaux ont aussi été trouvés associés à l'ambre de l'Oise (Nel et al., 1999). Des feuilles de Lauracées et des fruits et pollens de Caesalpiniacées ont notamment été identifiés dans les sites à ambre de la région, rendant de ce fait la détermination de l'origine botanique de l'ambre de l'Oise incertaine (Nel et al., 1999). Au niveau moléculaire, des études en spectroscopie infrarouge ont été réalisées pour déterminer l'origine botanique de l'ambre. Il est évident que celui-ci se distingue des autres ambres décrits précédemment et présenterait des similitudes avec les copals malgaches de l'Holocène qui sont associés au genre *Hymenea* (Fabacée). En effet, les spectres infrarouge présentent un épaulement caractéristique à 1263 cm⁻¹ (Nel et al., 1999). Les ambres de l'Oise peuvent donc être reliés à la classe Ic de la classification d'Anderson et al. (1992) qui comporte les ambres dont la composante macromoléculaire est constituée d'unités de labdanoïdes de la série dite « enantio » et comprenant des dérivés tels que l'acide ozique (**5**).

L'étude structurale par RMN d'un composé isolé à partir d'un échantillon d'ambre de l'Oise a permis d'identifier la quesnoïne (**113**) (**Figure IV.31**), un composé diterpénique oxygéné qui est spécifiquement rattaché à l'ambre de l'Oise (Jossang et al., 2008). Ce composé aurait comme molécule précurseur l'acide isoozique (**114**), un diterpène présent dans la résine de Fabacées actuelles comme *Hymenea oblongifolia*, et dont la molécule précurseur aurait été cyclisée soit dans un contexte diagénétique (i.e. durant l'enfouissement), soit de manière biosynthétique par la plante productrice.



Figure IV.31. Structure de la quesnoïne (113) d'après Jossang et al. (2008).

Par ailleurs, la comparaison des analyses globales de l'ambre de l'Oise et de résines actuelles de Fabacées par RMN montre une grande affinité avec la résine de l'espèce actuelle *Hymenea oblongifolia (*Nel et Brasero, 2010 ; Jossang et al., 2008).

Nohra et al. (2015) ont comparé les spectres infrarouges et les spectres de RMN (¹H et ¹³C) de l'ambre de l'Oise avec ceux obtenus dans le cas d'échantillons d'ambre mexicain du Chiapas (Langenheim et Beck, 1965 ; 1968 ; Langenheim, 1969), qui sont également issus du genre *Hymenea* et qui sont contemporains de l'ambre de l'Oise. Ces analyses ont permis de confirmer la ressemblance de l'ambre de l'Oise avec des résines et copals issus du genre *Hymenea*. Parallèlement, Nohra et al. (2015) ont réalisé une étude par thermochemolyse-GC-MS (TMAH-Pyr-GC-MS), qui a mis en évidence que la composante macromoléculaire de l'ambre de l'Oise devait être majoritairement constituée d'acide ozique (**5**) et zanzibarique (**115**). Il en a été conclu que l'origine botanique de l'ambre de l'Oise est bien liée à une Fabacée.

Les études moléculaires concernant l'origine botanique de l'ambre de l'Oise semblent donc converger vers une source de type Fabacées, et plus particulièrement une source affiliée au genre *Hymenea*. En revanche, les études paléontologiques semblent plutôt relier l'ambre de l'Oise à un autre genre de Fabacées, le genre *Aulacoxylon,* qui est proche du genre actuel *Daniellia* (Nel et Brasero, 2010).

IV.5.2. Résultats et discussion

Les échantillons d'ambre de l'Oise étudiés dans le cadre de nos travaux sont majoritairement composés de labdanoïdes (**Figure IV.32**). Il est important, dans le contexte de l'étude d'ambre du Tertiaire, de déterminer si les labdanoïdes présents dans l'ambre de l'Oise appartiennent plutôt à la série de l'acide communique (**6**) (série dite « normale ») ou à la série de l'acide ozique (**5**) (série dite « enantio »), ce qui est

capital pour distinguer une source botanique de type « Angiosperme » d'une source de type « Gymnosperme » (**Figure IV.33**). L'identification de la quesnoïne (**113**) par Jossang et al. (2008) indique que pour ce composé en tout cas, on se situe en série « enantio », ce qui suggère une origine de type Angiosperme.



Figure IV.32. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique méthylé d'un ambre de l'Oise (collection du Muséum National d'Histoire Naturelle, ambre provenant des alentours de Paris). Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques. En violet, les composés liés



Figure IV.33. Structures de l'acide communique (6) et de l'acide ozique (5).

En effet, la série « normale » est généralement associée aux résines de conifères alors que la série dite « enantio » est généralement liée aux Angiospermes (mais pas strictement, cf. le début de ce chapitre) et plus particulièrement aux Fabacées (Anderson, 1995 ; Bray et Anderson, 2009 ; Lambert et al., 1985 ; Langenheim, 2003 ; Riquelme et al., 2014). La détermination de la série à laquelle appartiennent les labdanoïdes identifiés dans les échantillons d'ambre de l'Oise est donc susceptible de fournir des informations importantes concernant l'origine botanique de l'ambre. Il se trouve que les ambres contiennent généralement des composés bicycliques qui sont issus de l'altération diagénétique de labdanoïdes initialement présents dans la résine. Les labdanoïdes dans les résines ou les copals/ambres aux premiers stades de la diagenèse se trouvent principalement liés dans des structures macromoléculaires (polylabdanoïdes) (**Figure IV.34**). Sous l'effet de l'altération thermique se produisant lors de l'enfouissement dans le sous-sol, des composés bicycliques issus des sous-unités polylabdanoïdes comme les composés (123) et (124) en série communique, (respectivement (117) et (118) en série ozique) (**Figure IV.34**) sont libérés. Les composés (123) et (117) (respectivement, (124) et (118)) ne sont pas des énantiomères et bien qu'ayant des spectres de masse pratiquement identiques, ils peuvent être distingués sur la base de leurs temps de rétention en chromatographie gazeuse. Anderson (1995) a en effet montré, notamment, que les composés issus de la série de l'acide ozique (5) ont des temps de rétention supérieurs à ceux de la série de l'acide communique (6).



Figure IV.34. Effets de la pyrolyse sur la composante macromoléculaire des ambres présentant des sous-unités labdanoïdes (d'après Anderson (1995) et Bray et Anderson (2009).

Ces composés sont également générés par pyrolyse des ambres et la comparaison des temps de rétention des dérivés de labdanoïdes générés lors de l'analyse par py-GC-MS des ambres a largement été utilisée pour déterminer si les labdanoïdes qui

constituent la composante macromoléculaire de ces ambres font partie de la série normale ou de la série « enantio » (e.g. Anderson, 1995 ; Anderson et LePage, 1995 ; Bray et Anderson, 2009 ; Poulain et Helwig, 2012). Ainsi, nous avons comparé les temps de rétention en chromatographie gazeuse lors d'analyses réalisées dans des conditions identiques des composés bicycliques (123) et (124) (ou (117) et (118)) présents dans l'ambre de l'Oise avec ceux de composés bicycliques (123) et (124) présents dans des ambres issus de conifères et contenant des labdanoïdes dont la configuration est connue (e.g. ambre de Fouras, daté du Cénomanien, Chapitre II, §III.2.1.1.). Il s'est avéré que les composés bicycliques présents dans les ambres de l'Oise ont des temps de rétention supérieurs à ceux des composés (123) et (124) présents dans l'ambre de Fouras et correspondent de ce fait aux composés (117) et (118) de la série de l'acide ozique (5). En effet, à titre d'exemple, le temps de rétention du composé (123) dans l'ambre de Fouras est de 26,80 min tandis que celui du composé bicyclique analogue (117) dans les échantillons de l'ambre de l'Oise est de 27,53 min. Cela confirme donc que les labdanoïdes des ambres de l'Oise font partie de la série dite « enantio » associée aux Angiospermes, et plus particulièrement aux Fabacées (Anderson, 1995; Bray et Anderson, 2009; Lambert et al., 1985; Langenheim, 2003 ; Riquelme et al., 2014).

Si l'ambre de l'Oise contient des labdanoïdes caractéristiques de la classe lc à l'instar des ambres du Chiapas (Mexique), de la République dominicaine et de Madagascar, elle présente cependant quelques spécificités.

Ainsi, certains échantillons prélevés sur le site de Le Quesnoy contiennent un composé unique à l'ambre de l'Oise, la quesnoïne (**113**), isolée par Jossang et al. (2008), et que nous avons évoqué précédemment. La quesnoïne (**113**) (**Figure IV.35 et IV.36**) est supposée être formée par un processus d'oxydation à partir de l'acide isoozique (**114**).



Figure IV.35. Mode de formation de la quesnoïne (**113**) à partir de l'acide isoozique (**114**) (d'après Jossang et al., 2008).

Il est à noter que la quesnoïne (**113**) n'est pas présente dans l'ensemble des échantillons, mais uniquement dans les échantillons provenant du site de Le Quesnoy qui se situe en bordure du Bassin parisien (**Figure IV.36**). Il est possible que la quesnoïne (**113**) soit, comme le propose Jossang et al. (2008), formée par un processus d'oxydation ayant affecté la résine à un stade précoce de la diagenèse (**Figure IV.35**).



Figure IV.36. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique méthylé d'un ambre du site de Le Quesnoy (Oise ; collection Musée National d'Histoire Naturelle). Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques. En noir sont représentés les produits d'altération thermique de labdanoïdes et en violet les labdanoïdes. Les cercles rouges représentent des sulfoxides diterpéniques (cf. **Chapitre II**).

En effet, les échantillons contenant la quesnoïne (**113**) montrent aussi la présence de sulfoxydes (cf. **Chapitre II**) qui sont des composés organiques soufrés ayant été oxydés. Il est donc raisonnable de proposer que les échantillons du site de Le Quesnoy aient été fossilisés dans un environnement différent de ceux du site de Moru ou des sites localisés autour de Paris. Lors de la fossilisation de la résine, il a dû y avoir un épisode anoxique expliquant la présence des composés soufrés, épisode qui aurait été suivi par un épisode oxique à l'origine des sulfoxydes et de la quesnoïne (**113**). Il est difficile de savoir cependant à quel moment cet épisode a eu lieu.

L'ensemble de ces caractéristiques moléculaires laisse penser que les ambres de l'Oise n'ont pas exactement la même origine botanique que l'ambre dominicain,

l'ambre du Mexique (Chiapas) ou le copal de Madagascar, qui font également partie des ambres de la classe 1c issus de Fabacées.

En effet, l'ambre dominicain est constitué majoritairement du composé (**119**) et des composés (**125**) et (**126**), ces derniers ayant été identifiés par Wang et al. (2017) (**Figure IV.37**) et dérivent de l'acide kovalénique (**127**) Les composés de la série du clérodane (**128**) comme les composés (**125**) et (**126**) sont très souvent associés au genre *Hymenea* (Abe et al., 2016 ; Nogueira et al., 2001). Dans la littérature, l'ambre dominicain est botaniquement associé à *Hymenea protera* d'après les études chimiques (Abe et al., 2016 ; Cunningham et al., 1983 ; Stach et al., 2021 ; Wang et al., 2017) et paléontologiques (Poinar, 1991, 1992) réalisées.

La résine d'*Hymenea courbaril* (Chapitre I, **Figure I.34**), résine la plus proche actuellement de *H. protera*, est composée principalement d'acide ozique (**5**), d'acide (-)-copalique (**129**) et d'acide éperuique (**130**). Il est à noter que notre analyse de la résine actuelle d'*Hymenea* (Chapitre I, **Figure I.34., §I.2.3.2.1**) n'a pas permis l'identification de composés possédant un squelette de type clérodane.

Par ailleurs, aucune mention n'est faite de la présence d'acide daniellique (**120**) dans l'ambre dominicain, et notre analyse semble confirmer cette observation (Abe et al., 2016 ; Lambert et al., 1985). Il est donc probable que les origines de l'ambre de l'Oise et celle de l'ambre dominicaine soient distinctes.

L'ambre du Chiapas (Miocène), également associé aux ambres rattachés à la classe lc, est largement dominé par les produits de pyrolyse de labdanoïdes (**Figure IV.38**). La distribution moléculaire particulière de l'ambre du Chiapas pourrait s'expliquer par le fait que celui-ci est essentiellement associé à des intrusions volcaniques (Riquelme et al., 2014 ; Solórzano-Kraemer, 2010 ; Solórzano-Kraemer et al., 2020) et il est en effet possible que le stress thermique ait altéré les labdanoïdes initialement présents.

Les acides bicycliques en C₁₅ (**117**) et (**118**) issus de la pyrolyse des labdanoïdes font bien partie de la série dite « enantio » des dérivés de labdanoïdes, comme l'indique leurs temps de rétention en chromatographie gazeuse, qui sont identiques à ceux des acides bicycliques ayant le même spectre de masse présents dans l'ambre de l'Oise.



Figure IV.37. Chromatogramme en phase gazeuse partiel (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique méthylé d'un ambre provenant de République dominicaine (Collection du Muséum National d'Histoire Naturelle). Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques. En violet sont représentés les labdanoïdes. Les composés (**125**) et (**126**) ont été identifiés d'après Wang et al. (2017).

Par ailleurs, deux composés qui semblent apparentés au dérivé (**125**) ont aussi été détectés en faibles quantités, ce qui confirmerait que l'ambre du Chiapas ait pour origine une résine d'*Hymenea*, à l'instar de l'ambre dominicain. En effet, la littérature associe l'ambre du Chiapas à *Hymenea mexicana* (Lambert et al., 1989 ; Poinar et Brown, 2002 ; Solórzano-Kraemer, 2010). De la même façon ici, il semblerait que l'ambre de l'Oise ait une origine différente de celle de l'ambre du Chiapas.

Sur le continent africain, de nombreux copals, plus récents que les ambres, tel que le copal de Madagascar, sont présents. Celui-ci est associé à une espèce d'*Hymenea* africaine, *Hymenea verrucosa* existant encore actuellement. Le copal de Madagascar est caractérisé par la prédominance de l'acide ozique (5) (Figure IV.39) et l'acide (-)-copalique (129) (Figure IV.39).



Figure IV.38. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique méthylé d'un ambre provenant du Chiapas (Collection de M.M. Solórzano-Kraemer, Senckenberg Research Institute, Allemagne) En violet sont représentés les labdanoïdes. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

IV.5.3. Conclusion

L'ambre de l'Oise, présente en grandes quantités dans le Bassin Parisien, appartient à l'un des seuls types d'ambre français appartenant à la classe lc, et dont la composante macromoléculaire est principalement constituée de labdanoïdes en série « enantio » appartenant à la série de l'acide ozique (5). La faible variabilité moléculaire de l'ambre de l'Oise laisse penser qu'un unique producteur en serait à l'origine, à l'instar de la succinite de la Baltique. Son origine n'est cependant pas la même que celle à l'origine des autres ambres de la classe lc répertoriés dans le reste du Monde. En effet, contrairement à ceux-ci, l'un des composés majeurs de l'ambre de l'Oise est l'acide daniellique (120), caractéristique de Fabacées du genre *Daniellia*.

L'ambre de l'Oise se distingue aussi par la présence d'un composé unique, la quesnoïne (**113**), qui n'est cependant trouvé que dans des échantillons issus de l' ambre provenant d'un site spécifique (Jossang et al., 2008).



Figure IV.39. Chromatogramme en phase gazeuse partiel (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique méthylé d'un copal de Madagascar (Collection du Muséum National d'Histoire Naturelle). En violet sont représentés les labdanoïdes. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

De faibles quantités d'acide daniellique (**120**) ont été détectées dans le copal de Madagascar (**Figure IV.39**), ce composé étant relativement rare dans les résines des espèces actuelles d'*Hymenea*, et qui est surtout présent dans les résines issues de Fabacées du genre *Daniellia* (Atolani et Olatunji, 2014 ; Mills, 1973 ; Nacoulma et al., 2021).

IV.6. Des sources plus localisées : l'ambre des Allinges

Outre les sites évoqués précédemment occupant des régions étendues et contenant des quantités importantes d'ambre, il existe en France quelques zones plus restreintes associées à de rares occurrences d'ambre. Par exemple, à Allinges, en Haute-Savoie, des morceaux d'ambre ont été trouvés dans des sédiments issus de remaniement glaciaire. Ce site est intéressant dans le cadre des travaux de cette thèse, car malgré la faible quantité d'ambre trouvée, la proximité géographique de ces zones par rapport aux sites où des échantillons d'ambre archéologique ont été mis au jour en fait des sources d'ambre potentielles ayant pu être exploitées pour la confection d'objets archéologiques (du Gardin, 1986 ; Chapitre V).

IV.6.1. Contexte de l'étude

C'est en 1894 qu'Aweng (1894) a constaté la présence d'éclats ressemblant à de l'ambre translucide dans des sédiments glaciaires à Allinges en Haute-Savoie. Il a donc nommé ces éclats « allingite ». En raison de son association avec les molasses du Miocène du massif du Voiron, l'allingite a été datée du Miocène inférieur (Lacroix, 1910 ; Savkevitch et Popkova, 1978). Comme ces sédiments sont allochtones et proviennent du charriage par des glaciers des Alpes, de nouvelles études ont plutôt placé la formation de l'allingite à une période antérieure et suggèrent l'Oligocène voir l'Éocène comme âge réel (Ospina-Ostios et al., 2013 ; Ragusa, 2015). Savkevitch et Popkova (1978) ont analysé par spectroscopie infrarouge un morceau d'allingite qu'ils nomment « copalite » étant donné sa forte solubilité dans les solvants organiques qui les laisse supposer que la proportion que représente la composante macromoléculaire est faible. Ils notent que les spectres infrarouges de l'allingite présentent un épaulement entre 1100 et 800 cm⁻¹ observé également dans le cas de spectres infrarouge de la résine actuelle d'*Hymenea courbaril*.

IV.6.2. Résultats et discussion

L'analyse moléculaire des distributions des terpénoïdes de trois échantillons d'ambre d'Allinges montre que ceux-ci sont très proches en termes de composition, et de ce fait, seule la distribution de l'un d'entre eux est représentée dans ces travaux. Les terpénoïdes analysés appartiennent tous à la série des diterpènes, ce qui est généralement caractéristique d'un matériau issu de Gymnospermes.

Parmi ces diterpènes, deux principales familles ont été identifiées : les diterpènes de la série de l'abiétane ((5), (16), (30), (132 à 135) ; Figure IV.40), composés majeurs, et ceux de la série de l'(iso)pimarane (3)/(4), légèrement moins abondants ((3), (4), (7), (14) ; Figure IV.40). Ce cortège moléculaire suggère que ces échantillons sont apparentés à une résine de conifères issue de Pinacées.


Figure IV.40. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir d'un extrait organique méthylé d'un ambre provenant d'Allinges (Collection personnelle de J.M. Pouillon). En bleu sont représentés les diterpénoïdes de la série du (iso)pimarane et en vert les diterpénoïdes de la série de l'abiétane. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

En effet, la distribution des diterpènes des échantillons d'Allinges est très proche de celles d'une résine contemporaine de *Pinus sylvestris* altérée à différents degrés (Figure I.9, Chapitre I). Ainsi, nous observons, dans le cas des échantillons contemporains, une nette prédominance des dérivés de la série de l'abiétane (**87**), et une contribution moindre des dérivés en série (iso)pimarane (**88**)/(**89**). La distribution des diterpènes des échantillons d'Allinges est toutefois plus complexe (présence de composés plus nombreux), ce qui peut s'expliquer, en partie tout au moins, par le fait que certains des composés originellement présents dans la résine ont été progressivement transformés/altérés par des processus diagénétiques. Ceci explique par exemple la formation des dérivés (**30**) et (**135**) qui correspondent à des produits formés par oxydation de terpénoïdes précurseurs tels que le composé (**2**).

En conclusion, on retiendra que la distribution des diterpènes extraits à partir des échantillons d'« ambre» d'Allinges indique une origine botanique très certainement liée à un conifère rattaché à la famille des Pinacées. La présence exclusive de dérivés de type acides carboxyliques, l'absence d'hydrocarbures et notamment la prédominance du composé (**132**) en tant que diterpène majeur indique que l'on est très certainement le présence d'un matériau ayant subi une maturation thermique faible durant la diagenèse. Ceci est caractéristique d'un matériau assez récent, qui se rapprocherait

plus d'une résine de conifères ancienne issue de Pinacées que d'un matériau plus évolué de type copal, et encore moins d'ambre.

IV.7. Conclusion

Durant le cénozoïque, les producteurs d'ambres sont plus diversifiés. En effet, cette période marque l'apparition des ambres d'Angiospermes (e.g. variétés d'ambres de Bitterfeld, ambres de l'Oise). De la même façon, une grande diversité peut s'observer au sein des ambres d'angiosperrmes. Certains présentent une distribution moléculaire constituées uniquement de labdanoïdes appartenant à la série de l'acide ozique (114) (ambre de l'Oise), d'autres présentent des triterpènes typiques des burséracées (e.g. glessite variant noir) tandis que d'autres présentent des triterpènes typiques des Dipterocarpacées (e.g. glessite variant brun). Ainsi, au cénozoïque, la plupart des familles productrices actuelles de résines sont représentées dans les ambres.

Cette période est aussi caractérisée par la production d'un des sites d'ambre les plus exploités, l'ambre baltique. Cet ambre, qui a pour origine un conifère, ne présente actuellement pas encore de consensus sur son origine botanique. La présence de caractéristiques moléculaires typiques de pinacées laisse cependant entendre une origine parmi cette famille.



IV.8. Molécules citées dans le chapitre

















92 Cédrane

93 Cuparène

94 Cédrol

95



96







V.1. Introduction

L'ambre a joué un rôle important pour de nombreuses cultures dans le Monde pour des raisons économiques, religieuses et ornementales. Plus particulièrement, en Europe, les premières communautés ayant utilisé de l'ambre datent de la préhistoire (Langenheim, 2003; Rice, 1987; White et Normand, 2015). En effet, de nombreux artefacts en ambre datant du Paléolithique ont été trouvés sous la forme de bijoux et de statuettes (Murillo-Barroso et Martinon-Torres, 2012 ; Murillo-Barroso et al., 2018). L'ambre a été trouvé dans d'anciens lieux de vie, comme des grottes (e.g. Péquart et Péquart, 1960 ; Ragazzi et al., 2003 ; White et Normand, 2015), mais il a surtout été trouvé dans des nécropoles (Langenheim, 2003 ; Schaeffer, 1930). Les plus anciens objets en ambre sculptés sont datés de l'Aurignacien ancien (43 000 à 31 000 AP) et proviennent de la grotte d'Isturitz (White et Normand, 2015). Des restes de parures en ambre datant du Solutréen (23 000 à 18 000 AP) ont également été trouvés dans la grotte d'Altamira en Espagne, ainsi que des perles datant du Magdalénien (17 000 à 14 000 AP) dans les grottes d'Enlène et du Mas d'Azil (Hoellinger, 2021 ; Jarry et al., 2017 ; Péquart et Péquart, 1941, 1960 ; Ramis et al., 2015). Par la suite, durant l'Age du Bronze (4700 à 2800 AP), le nombre de sites archéologiques où de l'ambre a été trouvé se multiplie en Europe (Du Gardin, 1986 ; Langenheim, 2003). En effet, près de 200 sites archéologiques datant de l'Age du Bronze et où de l'ambre a été mis au jour ont été décrits en France (Du Gardin, 1986). Cet ambre est principalement présent sous la forme de perles associées à des parures trouvées dans des contextes d'inhumation. L'ambre devait, durant cette période, être une marque de richesse (Causey, 2011, 2020; Du Gardin, 1986) et/ou revêtir un aspect religieux. En effet, par exemple, durant l'Age du Bronze, l'ambre était lié au culte du soleil et de nombreuses amulettes liées à ce culte ont été trouvées dans toute l'Europe (Rice, 1987).

En ce qui concerne l'origine de l'ambre, il a pu être montré que les sources d'ambre, initialement provenant de ressources locales, se sont progressivement diversifiées (Murillo-Barroso et al., 2018). Ainsi, Murillo-Barroso et Martinon-Torres (2012) ont pu montrer, à l'aide d'analyses spectroscopiques (FT-IR), qu'un commerce à longue distance de l'ambre s'est probablement mis en place entre Ibérie/Sicile d'une part, et Ibérie/région baltique d'autre part, et ce dès l'Age du Cuivre (ou Chalcolithique, période précédant l'âge du Bronze ; 4800 à 2200 AP). Ensuite, il semblerait que la très grande majorité de l'ambre trouvé en Europe à partir de l'Age du Bronze soit d'origine baltique,

suggérant l'existence de voies commerciales majeures qui reliaient l'Europe du Nord à la mer Méditerranée (De Navarro, 1925). Il est possible, cependant, que cette importance dans l'utilisation de l'ambre baltique par ces civilisations passées soit surévaluée, dans la mesure où il n'est pas toujours possible d'attribuer une origine certaine à l'ambre, en raison notamment de son degré de préservation/altération (cf. Chapitre I).

Les premières traces écrites concernant l'exploitation et le commerce de l'ambre, avec la description de ce qui a été appelé les « routes de l'ambre », remontent à l'Antiquité (Pline l'Ancien ; ler siècle ap. J.-C.). Il est probable, cependant, que les routes de l'ambre aient été mises en place bien plus tôt, durant le milieu de l'Age de Bronze (1800- 1200 AP) (Spekke, 1957), ou parfois même avant cette période selon les régions considérées (Murillo-Barroso et Martinon-Torres, 2012 ; Murillo-Barroso et al., 2018). Dans ce contexte archéologique, il est donc important d'obtenir des méthodes permettant d'identifier la provenance de l'ambre employé pour la fabrication de bijoux et d'objets d'art afin de pouvoir dater plus précisément la mise en place de ces routes commerciales et d'appréhender les questions d'échanges et de mobilité à partir du Paléolithique jusqu'au Moyen Age en Europe (mise en place, changement ou persistance des réseaux d'échange et d'approvisionnement).

Ainsi, un certain nombre de techniques analytiques ont été développées pour identifier l'origine géographique des ambres. En effet, comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents liés aux ambres « géologiques », l'ambre étant un matériau organique fossile issu de résines d'origines botaniques diverses, il présente une immense variabilité chimique dépendant notamment de ces sources botaniques (Chapitre III et IV). Il est donc en principe possible, à partir d'analyses chimiques, de réaliser des études de corrélation entre des échantillons d'ambre trouvés sur des sites archéologiques et d'ambres provenant de différents sites géologiques, dans la mesure où un référentiel « chimique » a été établi pour ces derniers.

Les premières analyses chimiques d'ambres archéologiques réalisées afin d'en déterminer l'origine géographique datent du début du XX^{ème} siècle et étaient basées sur le titrage de l'acide succinique (1) des ambres (Violler et Reutter, 1916) afin de distinguer les ambres baltiques qui en contiennent des autres ambres européens qui n'en contiennent pas. Cette technique s'est révélée être peu concluante car les acides résiniques étaient également détectés par la méthode utilisée, et elle a donc été

rapidement abandonnée. Plus tard, des analyses par spectroscopie infrarouge (IR, FT-IR) ont été utilisées pour déterminer l'origine géographique d'un ambre (e.g. Angelini et Bellintani, 2005 ; Beck, 1985 ; Garrido-Cordero et al., 2024). Cette méthode, peu invasive, s'est révélée être très efficace pour distinguer l'ambre baltique des autres ambres. Le spectre infrarouge des ambres baltiques présente, en effet, ce qui est appelé dans la littérature un épaulement caractéristique, qui a été nommé « épaule baltique » (Chapitre IV. §IV.2.). Cette méthode spectroscopique a ainsi permis de confirmer l'origine baltique d'un grand nombre d'objets archéologiques en ambre (e.g. Beck, 1965, 1985) et reste encore largement utilisée actuellement pour l'étude des ambres archéologiques, malgré certaines limitations (e.g. Angelini et Bellintani, 2005 ; Garrido-Cordero et al., 2024 ; Truică et al., 2012). En effet, elle ne permet pas de distinguer entre eux les ambres d'autres origines que baltique et l'interprétation des spectres infrarouge est très tributaire du degré d'altération de l'échantillon considéré (Zhao et al., 2023). Ainsi, dans le cas d'ambres baltiques fortement altérés, les spectres infrarouges obtenus ne sont pas suffisamment spécifiques ou le signal obtenu est trop modifié par l'altération de l'échantillon pour permettre l'attribution d'une origine géographique précise (Du Gardin, 1986). A titre d'exemple, dans le cas de l'analyse de trois perles d'ambre provenant du grand dolmen à Viols-le-Fort (Hérault), l'origine de l'une d'entre elles n'a pas pu être déterminée à cause de l'altération et de la présence de contaminations (Du Gardin, 1986). Il est donc difficile, dans le cas où l'ambre a été altéré, ou s'il a fait l'objet de restauration avec diverses substances organiques après mise au jour, de déterminer si celui-ci est un ambre baltique ou bien d'une autre provenance.

Parmi les autres techniques analytiques auxquelles il a été fait appel pour la caractérisation d'ambre archéologique figure la pyrolyse couplée à la chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse (Py-GC-MS), en présence ou non d'un agent méthylant ou silylant (TMAH ou HMDS) (e.g. Mukherjee et al., 2008 ; Colombini et al., 2013). Cette technique est micro-destructrice et permet, comme nous l'avons vu précédemment, de caractériser les constituants moléculaires des ambres, ces derniers étant spécifiquement liés à l'origine botanique de l'ambre et à son degré de maturation et d'altération. Toutefois, dans la mesure où cette approche repose sur un processus pyrolytique impliquant des réactions de craquage thermique, celui-ci conduit à une altération des sous-unités structurales de l'ambre (réactions de décarboxylation ou de déshydratation, par exemple). Ces réactions peuvent de ce fait entraîner une perte

d'information et une difficulté à distinguer des ambres d'origines botaniques proches (e.g. Nohra et al., 2015).

Une autre approche pourrait consister à analyser la composante lipidique, non macromoléculaire, des ambres archéologiques directement par GC-MS (avec ou sans une étape de dérivation), sans faire intervenir une pyrolyse préalable de l'échantillon. Les lipides constitutifs de l'ambre pourraient ainsi être analysés sans être altérés et la distribution moléculaire caractéristique de chaque ambre et de son origine botanique et géographique pourraient être utilisées pour établir des corrélations entre ambres archéologiques et ambres géologiques. Toutefois, cette technique, utilisée pour l'étude des échantillons d'ambre « géologiques », généralement présents en quantités relativement abondantes, a été relativement peu utilisée jusque-là pour l'étude d'ambre archéologique (Bonaduce et al., 2016 ; Langenheim, 2003 ; Serpico et al., 2000). Cette approche présente toutefois des aspects qui peuvent sembler peu compatibles pour une application sur des objets archéologiques ou issus de collections de musées. En effet, cette méthode est destructrice et peut sembler gourmande en quantités d'échantillons, car seule la composante non macromoléculaire, généralement mineure, des ambres, est analysée. Elle présente en revanche le meilleur potentiel en termes de spécificité, comme nous l'avons vu dans le cadre de l'étude d'ambres « géologiques » et de résines contemporaines. Par ailleurs, même dans le cas d'échantillons archéologiques fortement altérés, l'identification de leur source géologique demeure possible dans la mesure où l'impact des processus d'altération (oxydation, lessivage, ...) sur les empreintes moléculaires peut être anticipé (cf. Chapitre III, IV). Son application à la détermination de l'origine d'ambres archéologiques nécessite cependant de pouvoir disposer d'un référentiel moléculaire aussi large que possible d'ambres géologiques européens établi avec cette même approche. De plus, il implique la mise en œuvre/mise au point d'une méthode d'échantillonnage aussi peu gourmande en matériel archéologique que possible.

Dans ce chapitre seront présentés le développement et l'application d'une méthodologie permettant l'identification fiable de l'origine d'ambres archéologiques sur la base de l'étude de leurs lipides constitutifs par GC-MS. La difficulté principale de cette approche est liée à la quantité de matière à prélever, qui se doit d'être minimale. Cela a demandé la mise au point d'une méthodologie permettant le prélèvement et l'analyse de très petites quantités d'échantillons prélevés sur des objets en ambre archéologiques ou provenant de collections de musées. Cette approche a ensuite été

appliquée à une série d'échantillons d'ambre provenant de fouilles archéologiques (INRAP, Association Begouën) et de collections de musées ou de collections de particuliers (Musée Historique de Haguenau, Musée Unterlinden de Colmar, coll. C. Du Gardin, etc ...), d'âges variés (du Paléolithique au Haut Moyen Age) et de diverses provenances en France (**Tableau V.1**). Cette étude a bénéficié du référentiel moléculaire d'ambres géologiques européens que nous avons établi (cf. Chapitres III et IV).

V.2. Développement d'une méthode de prélèvement peu invasive d'échantillons archéologiques

L'analyse moléculaire par GC-MS d'ambres archéologiques a nécessité la mise en place d'une méthode permettant des prélèvements aussi petits et précis que possibles (≈ 1 mg). Les détails expérimentaux liés à cette méthode de prélèvement et de préparation des échantillons sont reportés en partie expérimentale (cf. Chapitre VI). Cette méthode repose sur le prélèvement par application d'un coton imbibé d'éthanol au bout d'une curette métallique de manière très localisée au niveau d'un échantillon archéologique. Cette étape permet d'effectuer les prélèvements sur site, directement au musée, ce qui évite d'avoir à sortir les objets des collections du musée. Elle permet également de réaliser un prélèvement précis sur les parties les moins visibles des objets de collections muséales. L'éthanol a été choisi en tant que solvant d'extraction, car il s'agit d'un solvant « modéré » (i.e., pas trop « agressif » en termes de pouvoir dissolvant), mais qui permet de récupérer suffisamment de matière pour réaliser des analyses moléculaires sans affecter la surface de l'ambre de manière notable, en préservant ainsi l'aspect de l'objet en ambre et en laissant, notamment, la possibilité d'étudier les traces résiduelles laissées en surface au cours de la fabrication et de l'utilisation de l'objet en ambre pour reconstituer les différentes phases du façonnage. Au laboratoire, le coton, après prélèvement, est extrait à l'aide de solvants organiques, puis l'extrait ainsi récupéré est méthylé et fractionné sur colonne de silice (fractionnement chromatographique effectué quand les quantités récupérées le permettent). Les fractions apolaires ainsi obtenues sont analysées par GC-MS (Figure V.1).



Figure V.1. Protocole non invasif de prélèvement mis au point pour l'analyse moléculaire (GC-MS) d'échantillons archéologiques en ambre.

V.3. Analyses moléculaires d'ambres archéologiques : détermination de leurs origines géographiques et mise en évidence de procédures de restauration

V.3.1. Mise en évidence d'ambre baltique archéologique

V.3.1.1. Echantillons d'ambre du Musée Historique de Haguenau

V.3.1.1.1. La forêt de Haguenau durant l'Age du Bronze et l'Age du Fer

Actuellement sixième plus grande forêt de France, la forêt de Haguenau est un lieu de vie depuis la préhistoire. Les premières fouilles archéologiques au niveau de cette région ont eu lieu en 1861 et, à la suite de celles-ci, de nombreux tumuli (i.e. tombes funéraires enfouies ; **Figure V.2**) ont été découverts (Schaeffer, 1930).



Figure V.2. Représentation d'une section de tumulus

Les traces d'occupation par l'Homme les plus anciennes découvertes dans la forêt de Haguenau datent du Mésolithique (10 000 – 7000 AP), mais les seuls objets datant de cette période qui ont été mis au jour sont des flèches, harpons et autres objets en silex.

C'est à partir du Néolithique (7000 et 4000 AP) que les populations occupantes l'actuelle forêt de Haguenau ont commencé à se sédentariser, et des indices de constructions datant de cette époque ont été mis en évidence, indiquant que les ces populations devaient pratiquer l'élevage et l'agriculture (Abert et al., 2010 : Schaeffer, 1930). Les objets datant de cette période et trouvés lors des fouilles comprennent des haches et des céramiques. L'Age du Bronze, tel qu'il apparait au niveau de l'actuelle forêt de Haguenau, est caractérisé par l'apparition de tumuli, qui sont des buttes en terre et en pierre faisant office de sépultures (Abert et al., 2010 ; Cormier et al., 2016 ; Schaeffer, 1930). Ces tombeaux ont été étudiés principalement par Xavier Nessel qui a collecté un grand nombre d'objets donnés au Musée Historique de Haguenau. Parmi ces objets figurent de nombreuses armes en bronze et des bijoux, reflétant probablement la richesse des défunts (Carnets de Xavier Nessel, non publiés). Parmi les bijoux mis au jour ont été identifiés certains objets contenant de l'ambre, sous la forme de perles, de têtes d'épingle ou de fibules (Du Gardin, 1986). Plus de 750 sépultures ont été à ce jour identifiées (Abert et al., 2010). A la fin de l'Age du Bronze, les tumuli se sont faits plus rares et ont été remplacés par des urnes funéraires (Wassong, 2012). Ces urnes pouvaient aussi contenir les objets les plus précieux appartenant aux défunts. Les sépultures féminines renfermaient essentiellement des céramiques richement décorées, des bijoux en bronze, en corail et en ambre, alors que celles des hommes contenaient des armes en bronze et des plaques d'ambre (Causey, 2011, 2020; Du Gardin, 1986).

L'Age du Fer au niveau de la forêt de Haguenau (2750 – 2050 AP) a été marqué par l'apparition de classes sociales et d'une aristocratie dont la présence est matérialisée par une évolution dans la qualité des sépultures. En effet, des tombeaux de grande taille et contenant des objets très précieux ont été mis au jour. Cette époque a aussi été marquée par l'arrivée des Celtes venus d'Europe centrale qui ont amené la culture et le savoir-faire de l'utilisation du fer, celui-ci étant essentiellement réservé à la fabrication d'armes et de bijoux (Wassong, 2015). Les bijoux en fer sont cependant relativement rares et restent principalement réalisés en bronze, même pendant cette période (Wassong, 2015). Les bijoux, armes et céramiques se sont progressivement complexifiés durant cette période et le façonnage d'objets en ambre est devenu plus élaboré, avec l'apparition de gravures sur des perles en ambre. Durant cette période, le commerce avec les régions méditerranéennes était très actif, notamment avec

l'Italie, comme l'indique la présence de cruches à vin en bronze très typiques des régions méditerranéennes (Dillmann, 1961 ; Schaeffer, 1930 ; Wassong, 2015).

V.3.1.1.2. Présentation des échantillons archéologiques étudiés

Deux campagnes de prélèvement ont eu lieu au Musée Historique de Haguenau. A chaque campagne, des prélèvements ont été réalisés sur plusieurs objets datant de l'Age du Bronze (première campagne) et de l'Age du Fer (seconde campagne). Il s'agissait principalement de perles et de têtes d'épingles trouvées dans des sépultures féminines (**Figure V.3**) et proviennent de la partie de collections non visibles par le publique et n'ont en principe pas été restaurées.

Lors de la première campagne d'échantillonnage, 15 prélèvements pour analyse au laboratoire ont été réalisés sur 15 objets datant de l'Age du Bronze, tandis que lors de la seconde campagne, 18 prélèvements ont été réalisés sur 13 objets (**Table V.1**). En effet, pour certaines perles, des prélèvements ont été réalisés en différents endroits pour vérifier l'homogénéité chimique des échantillons.



Ensemble de têtes d'épingle et leur épingle en fer (ref 171)

Figure V.3. Photographies de certains objets en ambre provenant du Musée Historique de Haguenau sur lesquels des prélèvements ont été réalisés en vue de leur analyse moléculaire.

V.3.1.1.3. Caractérisation moléculaire des ambres du Musée Historique de Haguenau

Une origine commune des échantillons

Les distributions moléculaires d'échantillons d'ambre du Musée Historique de Haguenau datant de l'Age du Bronze et de l'Age du Fer sont représentées sur les **figures V.4** et **V.5**. Ainsi, les chromatogrammes en phase gazeuse des extraits dérivés de plusieurs échantillons archéologiques datant de ces deux périodes mettent en évidence une grande homogénéité entre les différents échantillons. Nous présenterons ici plus en détail les distributions moléculaires de deux échantillons représentatifs des collections de l'Age du Bronze (N617a ; **Figure V.6**) et de l'Age du Fer (N171a ; **Figure V.7**).



Figure V.4. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) des fractions apolaires isolées à partir des extraits organiques méthylés de 4 échantillons d'ambre du Musée Historique de Haguenau datant de l'Age du Bronze. Sur la figure sont représentées les zones d'élution des principales familles moléculaires mises en évidence dans ces ambres.



Figure V.5. Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) des fractions apolaires isolées à partir de extraits organiques méthylés de 3 échantillons d'ambre du Musée Historique de Haguenau datant de l'Age du Fer. Sur la figure sont représentées les zones d'élution des principales familles moléculaires mises en évidence dans ces ambres.

Trois grandes familles de terpènes ont été identifiées dans l'ensemble des échantillons. Il s'agit d'une part des composés diterpéniques de la série de l'acide (iso)pimarique (5)/(6) et de la série dérivant de l'acide abiétique (7), avec l'acide déhydroabiétique (8) en tant que composé majeur qui dominent généralement cette série (Figures V.6 et V.7). Enfin, en début des chromatogrammes apparaissent des dérivés de l'acide succinique (9), (10) et (11), généralement sous la forme d'esters (succinates) comprenant l'acide succinique (1) liés à des monoterpénols (12)/(13)/(14) (Czechowski et al., 1996 ; Mills et al., 1984 ; Yamamoto et al., 2006) (Figures V.6 et V.7). Certains échantillons peuvent également comprendre une dernière famille de diterpènes, généralement présente en faibles quantités, les labdanoïdes. Il est à noter qu'en fonction des échantillons, les composés dominants peuvent faire partie de la série de l'acide (iso)pimarique (5)/(6) ou de l'acide abiétique (7). Les succinates, comme cela a été discuté dans le Chapitre III, ont été mis en évidence en Europe dans les ambres appelés succinites provenant des pourtours de la mer Baltique (Czechowski et al., 1996; Mills et White, 1987), mais sont également présents dans quelques autres ambres d'Europe centrale comme la roumanite (Roumanie) (Teodor et al., 2009) ou dans certains ambres de Bitterfeld (Allemagne) (Yamamoto et al., 2006). Les résines à l'origine des succinites, en Europe, ont probablement été

produites par une source botanique spécifique qui pourrait faire partie de la famille des Pinacées (cf. Chapitre IV, §IV.2).

La présence de succinates et les distributions des composés diterpéniques dans les ambres du Musée Historique de Haguenau sont compatible avec celles généralement rencontrées dans le cas des succinites (cf. Chapitre IV.2 et IV.3, Chapitre IV). Cette présence de composés peu répandus de manière générale dans les ambres montre que ces ambres sont très vraisemblablement tous issus de la région baltique où les succinites sont les plus abondantes et les plus facilement accessibles en Europe (Mills et White, 1986 ; Weitschat et Wichard, 2002 ; Chapitre IV).



Figure V.6. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé de l'échantillon N617-A (Age du Bronze, Musée Historique de Haguenau). En bleu les composés de la série du pimarane, en vert les composés de la série de l'abiétane, en violet les labdanoïdes et en rouge les dérivés de l'acide succinique. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

On observe néanmoins une certaine variabilité dans les distributions moléculaires et dans l'abondance relative des différentes familles selon les échantillons. Ainsi, par exemple, les succinates (9), (10) et (11) sont plus abondants dans l'échantillon N171a (Figure V.7) que dans l'échantillon N617-A (Figure V.6). De même, les proportions relatives entre les différentes séries diterpéniques varient (cf. Figure V.6 et V.7).

Comme cela a été discuté dans le Chapitre IV, ces variations s'observent aussi parmi les ambres géologiques, et peuvent s'expliquer, comme cela a été discuté préalablement, par des différences de niveaux d'altération (Chapitre IV, § IV.2.2.2).



Figure V.7. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, 70 eV, IE) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé de l'échantillon N171a (Age du Fer, Musée Historique de Haguenau). En bleu les composés de la série du pimarane, en vert les composés de la série de l'abiétane, en violet les labdanoïdes et en rouge les dérivés de l'acide succinique. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

Compte tenu des faibles quantités d'extraits obtenues lors des prélèvements réalisés sur les échantillons archéologiques, il est arrivé que les distributions moléculaires de certains échantillons soient caractérisées par une prédominance de contaminants d'origine anthropique comme des plastifiants (dérivés de type phtalates, notamment). Dans ce cas, des expériences de butanolyse ont été réalisées pour mettre en évidence la présence/absence d'acide succinique (1) (sous forme d'ester butylique (23)) à partir de la composante macromoléculaire de l'ambre (cf. Chapitre IV, §VI.2.2.2., Figure V.8). Il est ainsi possible de libérer des quantités plus importantes d'acide succinique (1) à partir des succinates présents dans la partie macromoléculaire, qui peut ensuite être plus facilement détecté sous la forme d'ester butylique (23) malgré la présence de contaminations d'origine anthropiques. L'ensemble des expériences de butanolyse

réalisées (**Table V.1**) ont conduit à la libération de succinate de butyle (**23**) et ont donc permis de confirmer l'origine baltique de tous les échantillons.

Cependant, les sites géologiques où on peut trouver de l'ambre de la Baltique étant d'une vaste étendue géographique, il est impossible d'être plus précis quant à l'origine géographique précise d'un échantillon d'ambre donné.

Mise en évidence de substances ayant servi à la restauration d'objets archéologiques en ambre

Les extraits de certains échantillons de l'Age du Fer (échantillons N168, N169, N320c, N347c-2, N677, N90c), et de l'Age du Bronze (échantillon N543) présentent, en plus des familles moléculaires caractéristiques de l'ambre baltique ou clairement issues de contaminations (plastifiants), un certain nombre de marqueurs moléculaires susceptibles d'être issus de substances ayant servi à la restauration des objets en ambre. Deux types de distributions moléculaires distincts ont été mis en évidence dans ce cas.

Le premier type est plus représenté parmi les échantillons de l'Age du Fer. Il est caractérisé par une abondance d'acides gras et de *n*-alcanes, ainsi que par des proportions relatives d'acide déhydroabiétique (8) plus importante par rapport aux autres marqueurs moléculaires. Ce type moléculaire est associé à des échantillons qui présentent un aspect verni. Ainsi, l'échantillon N90c, qui fait partie de cette catégorie, présente en surface une zone particulièrement brillante suggérant un traitement par un vernis. Un prélèvement a donc été réalisé spécifiquement au niveau de cette zone et a été analysé à part pour tenter de caractériser la présence d'un éventuel vernis (Figure V.8). Cette analyse a été comparée à celle réalisée sur un prélèvement réalisé sur le même objet, en dehors de la zone brillante apparemment vernie. Cette comparaison a permis de mettre en évidence que la distribution moléculaire du prélèvement réalisé sur la zone vernie présentait effectivement une plus grande proportion d'acides gras et d'acide déhydroabiétique (8) que celle du prélèvement réalisé en dehors de cette zone. L'augmentation de la proportion de composés appartenant à la série dérivant de l'acide abiétique (7) dans ces échantillons pourrait s'expliquer par l'utilisation de colophane lors le traitement de restauration. En effet, la colophane est la fraction non volatile obtenue après distillation d'une résine, provenant souvent de conifères appartenant au genre Pinus.

Cette substance est fréquemment utilisée comme adhésif et vernis (Baldwin et al., 1958 ; Francès, 2020). La colophane possède une fraction diterpénique semblable à celle de la résine dont elle est issue (ici probablement *Pinus pinaster* qui est caractérisé par une grande quantité d'acide abiétique (**7**). Cependant, l'utilisation de la colophane seule n'explique pas la présence des acides gras dans les différents échantillons cités ci-dessus. L'hypothèse la plus probable est que la colophane ait été mélangée à une huile végétale. A cet égard, les vernis constitués d'un mélange d'une huile végétale et d'une substance résineuse comme la colophane, encore appelés « vernis gras », ont été largement utilisés dans le cadre d'opérations d'entretien ou de restauration, en lutherie, notamment (Francès, 2019).

Les échantillons N543 et N169 font partie d'une seconde catégorie d'ambres qui ont apparemment subi un traitement de restauration. Les distributions moléculaires sont caractérisées par la présence, en fin de chromatogramme, de triterpènes de la famille du dammarane (24) (Figure V.9), notamment. Ces composés sont caractéristiques des résines d'Angiospermes de la famille des Diptérocarpacées (Bandaranayake et al., 1975 ; Burger, 2008 ; Cheung, 1968 ; Chapitre I, § I.2.3.2.4).



Figure V.8. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé de l'échantillon N90c (Age du Fer, Musée Historique de Haguenau) présentant un vernis de restauration. En bleu les composés de la série du pimarane, en vert les composés de la série de l'abiétane, en violet les triterpénoïdes et en rouge les dérivés de l'acide succinique. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques. X : contaminations.



Figure V.9. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé de l'échantillon N543 présentant un vernis de restauration (Age du Bronze, Musée Historique de Haguenau). En bleu les composés de la série du pimarane, en vert les composés de la série de l'abiétane, en violet les triterpénoïdes et en rouge les dérivés de l'acide succinique. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques. En haut à droite : photographie de l'échantillon avec les zones de cassures présentant du vernis.

Ce type de résine, encore appelé résine de Dammar, est classiquement utilisé pour la restauration d'objets de musées (Burger, 2008 ; Dewick, 2002 ; Mallick et al., 2014). Son utilisation pour le traitement d'échantillons d'ambre provenant de résines de conifères qui à l'origine ne contiennent pas de triterpènes est donc facilement identifiable, à l'inverse de l'utilisation de colophane. Ainsi, la détection des composés (25), (26) et (28), qui font partie de la série du dammarane (24), dans l'extrait organique de l'ambre N543 (Figure V.9) indique clairement l'ajout d'une composante issue de résine de Dammar (Burger, 2008 ; van der Doelen et al., 1998). A cet égard, la distribution moléculaire d'une résine de Dammar, qui a été analysée au laboratoire (cf. Chapitre I ; Figure 1.41), comprend, elle aussi, les composés (25) et (26) ainsi que des composés apparentés. Il est à noter que la résine de Dammar commerciale est

généralement préparée à partir d'un mélange de résines de plusieurs espèces de *Dipterocarpus* et de *Shorea* (Burger, 2008). Il n'a pas été possible ici de déterminer si

la résine utilisée provenait plutôt d'arbres du genre *Dipterocarpus* ou du genre *Shorea* ou si on a eu affaire à un mélange. L'utilisation de résine de Diptérocarpacées pour la restauration d'ambres archéologiques s'est révélée être plutôt rare parmi les échantillons analysés puisqu'elle ne concerne que deux échantillons des collections du Musée Historique de Haguenau.

Il est à noter que l'utilisation de vernis pour la restauration des ambres n'était pas connue par les conservateurs du Musée Historique de Haguenau.

V.3.1.1.4. Conclusion

La méthode utilisée lors de cette étude a permis de mettre en évidence de façon robuste l'origine baltique de l'ensemble des échantillons d'ambre des collections du Musée Historique de Haguenau qui ont été analysés et cela, malgré la présence, dans certains cas, de substances utilisées pour la restauration des objets en ambre. Peu de matériel a été nécessaire puisque la masse moyenne des extraits prélevés à l'aide du coton imbibé d'éthanol représentait autour d'1 mg. De plus, les observations, après prélèvement, réalisées par les conservateurs du musée et les archéologues participant à l'analyse de ces ambres (D. Mathiot et E. Demongin (Musée Historique de Haguenau); M. Michler et E. Boës (INRAP)) ont observé que les objets n'avaient pas été endommagés lors de la procédure de prélèvement pour les analyses moléculaires, et que les traces de façonnage, par exemple, avaient été conservées.

Une partie des substances utilisées pour la restauration des objets en ambre a pu être identifiée. Il apparait toutefois que certains ingrédients utilisés pour la restauration d'ambre pourraient être plus difficiles à mettre en évidence avec notre approche, notamment dans le cas de l'utilisation de substances industrielles de nature polymérique qui sont en dehors de notre fenêtre analytique.

V.3.1.2. La grotte d'Enlène : un lieu de vie au Magdalénien

La grotte d'Enlène fait partie d'une ensemble karstique nommé cavernes du Volp, dans l'Ariège. Cet ensemble est constitué de trois grottes : la grotte d'Enlène, celle des

Trois-Frères et celle du Tuc d'Audoubert. Il est situé à une dizaine de kilomètres au sud-ouest du Mas d'Azil (Chapitre III, §III.2.2.2). La grotte d'Enlène est particulière puisqu'elle a servi de lieu de vie pour les hommes dès le Gravettien (dès 29700 AP) (Averbouh, 1999). Cependant, c'est durant le Magdalénien ancien et moyen (dès 19000 AP) que cette grotte est occupée de façon durable (Averbouh, 1999). La découverte de cette grotte date de 1805, mais les premières fouilles ont été réalisées de 1976 à 2018 lors d'un programme conduit par J. Clottes et R. Bégouën, avec la collaboration de J-P Guiraud et F. Rouzaud (D.R.A.P Midi-Pyrénées) (Averbouh, 1999 ; Begouën et al., 2014, 2019). La grotte se situe à 469 m d'altitude et possède plusieurs entrées se rejoignant sous terre pour former un long couloir. Plusieurs diverticules partent de ce couloir. La salle la plus profonde (i.e. Salle du Fond, ESF) constitue l'un des rares habitats connus en grotte profonde. On y trouve des objets et traces témoignant de toutes les activités traditionnelles domestigues, comme la fabrication d'outils, d'objets et de bijoux (os, silex, ambre), la préparation et la consommation d'aliments (dépeçage, cuisson des animaux) et les activités artistiques (usage de l'ocre, création de bijoux, statuette) (Averbouh, 1999). Des restes de foyers sont encore visibles, indiquant des phases d'occupation successives.

Les objets trouvés sur le site comprennent, notamment, des fragments d'ambre ayant probablement servi à la création d'ornements, comme des bijoux. En ce qui concerne l'origine possible de cet ambre, de nombreuses hypothèses soutiennent qu'avant l'Age du Bronze, l'ambre utilisé était principalement issu de sources locales (Averbouh, 1999 ; R. Begouen et F. Loiret, communication personnelle).

Par exemple, l'ambre archéologique mis au jour à Isturitz (Grotte dans les Pyrénées occupée durant l'Aurignacien) provient d'une source locale, comme l'ont montré les études spectrales et moléculaires effectuées sur ces ambres par White et Normand (2015). Certains archéologues ont également proposé que l'ambre du Mas d'Azil a été exploité par des populations locales durant le Néolithique (Péquart et Péquart, 1964, 1960).

Il est donc possible que l'ambre de la grotte d'Enlène provienne également d'une source locale, à l'instar de l'ambre d'Isturitz. Cependant, il est possible aussi que l'ambre provienne des pourtours baltiques comme les ambres de la grotte de Lombrives, dont certains échantillons ont été analysés durant les travaux de cette thèse (**Tableau V.1**). La grotte de Lombrive se trouve relativement proche du Mas d'Azil et a connu une occupation humaine depuis le Magdalénien jusqu'à l'Age du

Bronze ancien, où la grotte a servi de nécropole. Nos analyses avaient montré que les perles d'ambre analysées provenaient de la Baltique (**Tableau V.1**). Il n'a cependant pas été possible de déterminer à quelle époque les objets d'où provenaient les échantillons d'ambre analysés avaient été fabriqués. En l'absence d'analyses moléculaires, et sur la base des différentes études réalisées jusqu'à ce jour, aucune des hypothèses concernant l'origine de l'ambre de la grotte d'Enlène (baltique *vs.* non-baltique) ne peut *a priori* être exclue.

V.3.1.2.1. Présentation des échantillons étudiés

Deux échantillons ont été analysés à partir d'ambre trouvé dans la salle du fond de la grotte d'Enlène. Ces échantillons nous ont été fournis par R. Begouën (propriétaire de la grotte d'Enlène) qui a participé aux nombreuses fouilles dans cette grotte.

V.3.1.2.2. Caractérisation moléculaire des échantillons de la grotte d'Enlène

Les extraits organiques des deux échantillons provenant de la grotte d'Enlène présentent majoritairement des composés de la famille des labdanoïdes. Certains de ces labdanoïdes ((**29-33**) ; **Figure V.10**) ont été décrits pour la première fois dans certains ambres espagnols par Menor-Salván et al. (2016), notamment. Associés à ces composés, on trouve des labdanoïdes soufrés (**34**), (**35**) et (**36**) (**Figure V.10**). Ces composés, décrits dans le chapitre III (§III.2.2.2) et II (§II.3.3.3), proviennent de la sulfuration de labdanoïdes comme l'acide agathique (**37**). Cette distribution moléculaire, qui est assez typique des ambres crétacés européens, est caractérisée par l'absence de composés apparentés aux acides (iso)pimariques (**5**)/(**6**) et présente des analogies avec les distributions moléculaires des ambres de Montbrun/Sainte-Croix et du Mas d'Azil (Ariège), de Saint-Lon-Les-Mines (Landes) ou d'Archingeay (Charente-Maritime). Cependant, il est à noter que la présence des composés soufrés n'a été observée que dans le cas des ambres des sites de Montbrun, de Sainte-Croix et du Mas d'Azil.



Figure V.10. Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire isolée à partir de l'extrait organique méthylé de l'échantillon ESF 4060 (ambre trouvé dans la salle du fond de la grotte d'Enlène lors des premières fouilles) (A) Courant d'ion total ; (B) Fragmentogramme de masse m/z 155. En violet sont représentés les labdanoïdes. Les carrés noirs correspondent à des composés inconnus présents également dans l'ambre du Mas d'Azil, mais non détectés dans les ambres de Montbrun/Sainte Croix. Les acides carboxyliques sont analysés sous forme d'esters méthyliques.

L'hypothèse la plus raisonnable serait que l'ambre de la grotte d'Enlène proviennent du même gisement local d'Ariège que l'ambre du Mas d'Azil, plutôt que de celui de Montbrun/Sainte Croix. En effet, les ambres de Montbrun/Sainte Croix se distinguent des ambres du Mas d'Azil et de la grotte d'Enlène par l'importance de biomarqueurs labdanoïdes qui portent un *gem*-diméthyle en position C-4 (cf. Chapitre III, §III.3.3.3) comme le méthylambérène (**32**) ou l'analogue diméthylé en position C-4 des composés soufrés (**34**) et (**35**) présentés sur la **Figure V.10**. D'autre part, un groupe de trois composés indiqués par un carré noir sur la **Figure V.10** et pour lesquels il n'a pas été possible de proposer une hypothèse structurale sur la seule base de leur spectre de masse, ont été détectés à la fois dans les ambres du Mas d'Azil et de la grotte d'Enlène. En revanche, ces composés ne sont pas présents dans les ambres de Montbrun/Sainte-Croix. Les différences observées au niveau des distributions moléculaires de l'ambre du Mas d'Azil et de l'ambre de la grotte d'Enlène, comme la moindre proportion relative de composés soufrés dans l'ambre de la grotte d'Enlène, comme la

pourraient alors être expliquées par des phénomènes d'altération oxydante qui ont affecté l'ambre archéologique de la grotte d'Enlène.

V.3.1.1.3. Conclusion

Notre méthode d'analyse permet de déterminer de façon robuste l'origine géographique d'ambres archéologiques, et ce même lorsqu'ils ne sont pas issus de la Baltique, contrairement aux techniques spectrales comme la spectroscopie infrarouge qui ne permettent que de distinguer des échantillons provenant de la Baltique d'échantillons d'autres sources. De plus, nos analyses moléculaires de différents ambres européens nous ont permis de proposer des sites géologiques possibles d'où les ambres seraient issus. En effet, malgré la ressemblance entre certains ambres crétacés du sud-ouest de la France, il existe certaines différences de composition liées, notamment, à des processus diagenétique comme la sulfuration, mais sans doute également à des différences au niveau des sources botaniques qui nous ont permis de les distinguer sur la base des analyses de biomarqueurs par GC-MS. Ici, les ambres de la grotte d'Enlène proviennent donc vraisemblablement d'un gisement local (Mas d'Azil) se trouvant à une dizaine de kilomètres seulement de la grotte.

Notre étude a ainsi permis de montrer que, durant le Gravettien et/ou le Magdalénien, les populations vivant dans la grotte d'Enlène exploitaient des ambres locaux.

D'autres ambres trouvés dans des salles de la grotte d'Enlène (échantillons ELB) occupées postérieurement ont également été analysés dans le cadre de nos travaux (**Tableau V.1**). L'analyse de ces ambres a montré la présence de succinates, indiquant une origine baltique pour ces échantillons. Il y a donc, dans la grotte d'Enlène, de l'ambre d'origine locale, mais aussi de l'ambre ayant été importé depuis la région Baltique (**Tableau V.1**). Il est donc possible que les premières populations occupant la grotte aient exploité l'ambre à partir d'une source locale, mais qu'avec la mise en place ultérieure de voies commerciales (« routes de l'ambre ») qui reliaient l'Europe du Nord (Côte baltique et mer du Nord) à la mer Méditerranée (De Navarro, 1925), l'ambre baltique ait fini par être utilisé pour fabriquer des objets ornementaux comme des bijoux.

V.4 Synthèse des résultats obtenus pour les autres échantillons archéologiques analysés

Un grand nombre d'échantillons d'ambre archéologiques ont été analysés en utilisant la méthode décrite précédemment. Ces échantillons proviennent de plusieurs sites archéologiques en France et datent de différentes périodes allant du Néolithique au Moyen-Age (**Tableau V.1**). Les analyses réalisées ont permis de montrer que la plupart des échantillons autres que ceux présentés en détail dans ce chapitre provenaient de la Baltique et donc que les routes commerciales avec cette région étaient bien en place durant les périodes concernées.

En revanche, une origine différente a pu être déterminée pour de l'ambre provenant de Fort Froide (Alpes, France) qui présente une empreinte moléculaire constituée uniquement de diterpènes de la série de l'acide abiétique (7) et dès l'acides (iso)pimariques (5)/(6). Cet échantillon a pu être affilié géographiquement à « l'ambre » d'Allinges (Chapitre IV, IV.6), qui est de la résine de Pinacées subfossilisée provenant de sédiments glaciaires alpins et qui peut être reliée à de la résine de *Pinus sylvestris*.

Les analyses réalisées ont également permis de mettre en évidence des cas de restauration, en plus de ceux déjà mis en évidence dans le cas des ambres du Musée Historique de Haguenau, dans le cas de deux colliers en perles d'ambre appartenant aux collections du Musée Unterlinden de Colmar. Ces restaurations ont été réalisées avec des substances constituées de résine de Dammar et de composés industriels dérivant de l'acide adipique (**38**) (stabilisateur de pH). (Annexe, Rapport échantillons de Colmar).

V.5. Conclusions et perspectives

Une méthode permettant le prélèvement et l'analyse par GC-MS de très petites quantités d'échantillons a été développée et utilisée dans le cas d'ambres issus de fouilles archéologiques et de collections muséales. L'application de cette approche pour l'analyse de tels échantillons d'ambre a permis une identification fiable de leur origine géographique. Contrairement aux analyses spectrales effectuées précédemment (Du Gardin, 1986), toutes nos analyses ont abouti à des résultats concluants, mettant en lumière les origines géographiques des ambres, même lorsque

les échantillons avaient subi une altération significative ou un processus de restauration.

Echantillons	Lieu des fouilles	Nombre d'échantillons analysés	Age des échantillons	Description	Prélèvements	Origine géographique	Remarques et particularités
Collection 1 Musée de Haguenau	Tumuli forêt de Haguenau (Alsace)	15	Age du Bronze (2700-800 BCE)	Eclats, perles isolées, perles de collier	15	Région baltique	Vernis sur certains échantillons (dammar)
Collection 2 Musée de Haguenau	Tumuli forêt de Haguenau (Alsace)	13	Age du Fer (800- 200 BCE)	Perles isolées, perles de collier têtes d'épingles	18	Région baltique	Certains échantillons vernis (dammar, colophane,)
Collection musée Unterlinden (Colmar)	Sépulture Benwihr et Appenwihr (Alsace)	4	Age du Bronze et Age du Fer	Collier 1 (3 perles) et collier 2 (1 perle)	3	Région baltique	Vernis sur tous les échantillons (dammar)
Ambre de M. Michler et A. Tsuvaltsidis	Vases de Guines (Nord-Pas-de- Calais)	4	Epoque gallo-romaine (IV ^{ème} siècle CE)	Blocs d'ambre brut	4 éclats (1 échantillon / vase)	Région baltique	Butanolyse effectuée
Echantillons M. Michler	Stenner (fouille 2021 site 166 bloc 1, 3 et 4)	3	Antiquité	Eclats d'ambre	3	Région baltique	_
Coll. C. Du Gardin	Fort Froide (Centre-Val de Loire)	1 (éclat)	Non déterminé	Non déterminé	1	Allinges (Haute-Savoie)	_
Coll. C. Du Gardin	Fort Harrouard (Eure-et-Loire)	1	Néolithique moyen - Age du Fer	Eclats d'ambre	1	Région baltique	Butanolyse effectuée
Coll. C. Du Gardin	Dolmen de Thiré (Vendée)	2	Néolithique - Age du Bronze	Eclats d'ambre	1	Région baltique	Butanolyse effectuée
Coll. C. Du Gardin	Grotte de Perrats (Charente- Maritime)	1	Néolithique moyen - Age du Fer	Eclats d'ambre	1	Région baltique	Butanolyse effectuée
Echantillons M. Michler	Alsace	12	Age du Bronze - Age du Fer	Non déterminé	12	Région baltique	_
Echantillons M. Michler	Alsace	17	Age du Bronze - Moyen Age	Bijoux, têtes d'épingles	17	Région baltique	_
Echantillons F. Loiret	Mas d'Azil (Arriège) – Grotte de Lombrive	3	Age du Bronze	Non déterminé	3	Région baltique	_
Echantillons R. Begouën	Grotte d'Enlène	Salle du fond (ESF)	Magdalénien	Petits éclats d'ambre	Eclats	Montbrun/ Sainte-Croix	_
Echantillons R. Begouën	Grotte d'Enlène	3, dernières fouilles (ELB)	Magdalénien -Age du Bronze	Perles façonnées	Micro- prélèvements	Région baltique	_

Tableau V.1. Synthèse des échantillons archéologiques en ambre analysés et origines
géographiques de l'ambre identifiées

S'il s'est avéré que la plupart des échantillons d'ambre archéologiques et provenant de musées que nous avons analysés ont été identifiés comme étant de l'ambre baltique, nous avons pu également identifier l'origine d'ambres archéologiques non baltiques grâce au référentiel moléculaire d'ambres européens que nous avons mis en place (cf. Chapitres III et IV). Nous avons, notamment, pu distinguer des ambres géographiquement proches, tels que ceux de Saint-Lon-Les-Mines, Montbrun et du Mas d'Azil et ainsi affiner les hypothèses concernant l'origine locale des ambres de la grotte d'Enlène.

Par ailleurs, lorsque des vernis ont été utilisés dans le cadre d'opérations anciennes de restauration pour traiter les ambres des collections muséales, cette étude moléculaire nous a permis de les mettre en évidence et de révéler leur composition. Les matériaux utilisés comprennent notamment de la résine de dammar, de la colophane et de l'huile végétale. Il est également possible qu'une portion significative des composants des vernis n'ait pas pu être détectée par GC-MS lorsque ceux-ci comprennent une composante polymérique ou très polaire.



V.6. Molécules citées dans ce chapitre



CONCLUSION GÉNÉRALE



Cette thèse a été consacrée à l'étude moléculaire d'échantillons d'ambre en suivant deux axes principaux. Le premier axe a porté, dans le cadre d'études de paléobotanique, sur l'analyse par GC-MS de distributions moléculaires d'ambres provenant de différents sites en Europe afin d'en déterminer les sources botaniques possibles (Chapitres III et IV). Cette étude s'est appuyé, notamment, sur l'analyse moléculaire de résines de diverses essences actuelles (Chapitre I). Ces travaux ont également permis de mettre en évidence pour la première fois la présence de composés organo-soufrés terpéniques dans les ambres, composés dont la diversité structurale et la répartition ont été étudiées au cours de cette thèse (Chapitre II).

Le deuxième axe avait pour objectif l'élaboration d'une méthode permettant la détermination de l'origine géographique d'échantillons d'ambre trouvés dans un contexte archéologique (Chapitre V). Cette approche s'est appuyée sur des études de corrélation entre les distributions moléculaires (obtenues par GC-MS) d'échantillons d'ambre trouvés sur des sites archéologiques et celles d'ambres provenant de différents sites géologiques étudiés dans le cadre du premier axe de cette thèse (Chapitres III et IV). L'identification des origines géographiques d'un ambre trouvé en contexte archéologique est, en effet, une question importante pour les archéologues puisqu'elle permet d'établir l'existence de liens commerciaux entre différentes régions à des époques où il n'existe pas de traces écrites attestant de ces liens.

Analyses moléculaires d'ambres géologiques

L'analyse moléculaire par GC-MS des ambres géologiques provenant de différents sites a révélé une grande complexité moléculaire au sein des différents échantillons étudiés. Cette section de la thèse a été divisée en deux parties principales consacrées à deux "âges d'or" de l'ambre, correspondant à des périodes géologiques particulièrement favorables à la formation de résines végétales.

Le premier âge d'or correspond à la période du Jurassique et du Crétacé, avec un point culminant pour ce dernier. De nombreux sites géologiques ambrifères datent, en effet, de cette période qui est marquée par une importante diversification des plantes et l'apparition des Angiospermes, en particulier durant le Crétacé. Cette diversité s'observe aussi parmi les ambres car des sources botaniques appartenant à plusieurs familles de plantes ont pu être distinguées. Cependant, malgré l'apparition des Angiospermes durant cette période, les sources botaniques des ambres du Crétacé

étudiés sont uniquement issus de conifères, leurs signatures lipidiques étant essentiellement dominées par des composés diterpéniques. Parmi l'ensemble des signatures lipidiques, plusieurs grands types ont pu être distingués lors de nos travaux selon leurs caractéristiques moléculaires dominantes.

Le premier type moléculaire mis en évidence est caractérisé par une dominance des diterpénoïdes dérivant de l'acide pimarique, de l'acide agathique, avec une plus faible proportion de diterpénoïdes apparentés à l'acide abiétique et de diterpénoïdes phénoliques comme le ferruginol. Les signatures moléculaires des ambres de ce type ont été rapprochées de celles des résines des Cupressacées actuelles qui sont le plus souvent dominées par les mêmes familles de composés (Chapitre I). Ce type de signature est relativement répandu parmi les ambres du Crétacé puisqu'on trouve des ambres de ce type moléculaire dans de nombreux sites en France (e.g. Archingeay, La Bouilladisse, Piolenc Bas) et, plus largement, en Europe et au Proche-Orient (e.g. Espagne-El Soplao et Una ; Liban-Tarchich). Il est cependant apparu que malgré des caractéristiques générales communes, des variations moléculaires ont été observées parmi ces ambres. Par exemple, les ambres de Una (Espagne) sont largement dominés par les diterpénoïdes de la série de l'acide pimarique tandis que les ambres d'Archingeay (Type 1) sont plutôt dominés par les labdanoïdes dérivant de l'acide agathique.

Le second type de signature moléculaire est caractérisé par la présence quasi exclusive de labdanoïdes apparentés à l'acide communique. Aucune résine actuelle ne présente une telle prédominance. Cependant, nous proposons de rapprocher ce type de signature moléculaire à celui des résines d'Araucariacées actuelles, celles-ci contenant très souvent une écrasante dominance des diterpénoïdes de cette famille. Parmi les ambres présentant ce type de signature moléculaire, certains sont caractérisés par la prédominance des labdanoïdes présentant un groupement carboxylique en C-4 (e.g. Ambres de Saint-Lon-Les-Mines, Fourtou, Teruel), tandis que d'autres sont dominés par des labdanoïdes diméthylés C-4 (e.g. Ambre du Mas d'Azil), mais, globalement, la variabilité chimique au sein de ce type moléculaire est relativement limitée comparée à celle des ambres de Cupressacées discutés précédemment. Ce type moléculaire est très largement répandu parmi les ambres du Crétacé puisque l'on en retrouve dans plusieurs régions (France, Espagne, Liban), mais aussi dans des dépôts sédimentaires datant de différentes périodes (du Cénomanien au Maastrichtien). La prédominance quasi-exclusive des labdanoïdes
dans les extraits organiques des ambres de ce type reflète l'importance des labdanoïdes dans les résines de la source botanique postulée, les Araucariacées, bien que celle-ci soit moins marquée dans les résines contemporaines. L'hypothèse la plus plausible est que cette prédominance exceptionnelle dans les ambres ait été amplifiée par la libération de composés labdanoïdes au cours de la diagenèse à partir de la composante macromoléculaire des résines d'Araucariacées, ces dernières étant particulièrement riches en polylabdanoïdes.

Pour finir, l'analyse des ambres géologiques crétacés a permis de mettre en évidence un type moléculaire n'ayant pu être affilié à aucune des familles de conifères actuelles. En effet, les signatures moléculaires des ambres de ce type présentent une prédominance de diterpénoïdes de la famille de l'acide abiétique, ce qui est caractéristique des résines de Pinacées et Araucariacées actuelles, mais comprennent également des diterpénoïdes phénoliques absents dans les résines de ces familles mais couramment détectés dans les résines de Cupressacées et de Podocarpacées. Ce type moléculaire présente donc des caractéristiques moléculaires hybrides. Nous proposons que ce type soit lié à une famille éteinte de conifères, très répandue à cette époque d'après l'abondance des mégafossiles préservés : les Cheirolepidiacées. En effet, les dépôts sédimentaires dans lesquels ce type d'ambre a été trouvé se caractérisent, notamment, par l'importance des restes fossiles de Cheirolepidiacées comme a Scorbé-Clairvaux. D'autre part, la composition moléculaire de ce type d'ambre est compatible avec la proximité phylogénétique des Cheirolepidiacées avec les Araucariacées et les Cupressacées proposées sur des bases morphologiques, puisqu'elles partagent des caractéristiques moléculaires communes avec les résines de ces deux familles de conifères. La détermination des ambres provenant des Cheirolepidiacées peut cependant s'avérer difficile en fonction de l'importance relative des caractéristiques propres aux résines d'Araucariacées ou de Cupressacées. Ainsi, bien que nos travaux aient pu permettre de proposer un profil moléculaire type pour un ambre issu de Cheirolepidiacées, il est difficile, à ce stade, d'estimer la variabilité moléculaire au sein de cette famille.

La seconde période géologique étudiée lors de cette thèse est le Cénozoïque. Cette période est caractérisée par des sites géologiques dont la richesse en ambre est colossale (sites baltiques, Mexique, République dominicaine). Ces sites sont notamment ceux qui sont encore exploités commercialement de nos jours.

Actuellement, l'ambre baltique est encore l'ambre le plus commercialisé et utilisé en bijouterie. Celui-ci a donc été étudié beaucoup plus extensivement que les autres ambres. Son origine botanique est encore largement discutée car ses caractéristiques moléculaires spécifiques, notamment la présence de dérivés de l'acide succinique, sont sans équivalent dans les résines actuelles. Notre étude a ainsi pu mettre en lumière la distribution singulière des ambres baltiques et leur homogénéité, mais aussi leurs caractéristiques moléculaires qui possèdent plusieurs caractéristiques communes avec les résines des Pinacées actuelles. Nos analyses ont aussi confirmé la présence de dérivés d'acide succinique dans d'autres ambres de la même période provenant du Groenland, non loin de l'île d'Axel Heiberg, dans la partie arctique du Canada, où de la succinite a également été trouvée.

En raison de l'analogie entre les distributions des diterpénoïdes de l'ambre baltique, de l'ambre de l'arctique canadien et du Groenland et celles de certaines résines de Pinacées actuelles, caractérisées par la prédominance des dérivés de l'acide abiétique et de l'acide (iso)pimarique, et en dépit de différences notamment en ce qui concerne la structure des labdanoïdes (série « régulière » *vs.* série « enantio » ; cf. Chapitre III), nous avons pu proposer les Pinacées en tant que source botanique possible de l'ambre baltique et des succinites plus généralement. Cette hypothèse est confortée par le fait que certaines Pinacées actuelles sont capables de synthétiser des succinates de labdanoïdes qui présentent des analogies avec des constituants de l'ambre de la Baltique, même si ces succinates ne se trouvent pas dans la résine, mais dans d'autres compartiments de la plante.

En parallèle de cette étude sur l'ambre baltique, nous avons réalisé l'analyse moléculaire d'ambres provenant d'une dizaine de sites datant du Cénozoïque. Nos travaux ont permis de mettre en évidence la diversification des sources botaniques des ambres puisqu'une partie des échantillons analysés a pu, par exemple, être reliée à différentes familles d'Angiospermes (e.g. ambre de l'Oise, glessite de Bitterfeld, goitschite de Bitterfeld) en plus des conifères (succinite de Bitterfeld, gédanite). Il apparaît aussi que les ambres issus d'Angiospermes sont relativement diversifiés durant cette période puisque certains présentent des distributions moléculaires dominées uniquement par des labdanoïdes apparentés à l'acide ozique (série « enantio ») typiques de résines de Fabacées (e.g. Ambre de l'Oise, de Chiapas, de

la République dominicaine), tandis que d'autres présentent des triterpénoïdes typiques de la famille des Burséracées et des Diptérocarpacées (e.g. glessite, goitschite de Bitterfeld, krantzite). Ainsi, il apparaît que la diversité des sources d'ambre est beaucoup plus importante durant le Cénozoïque que durant le Crétacé, ce qui est à mettre en relation avec la radiation évolutive des Angiospermes à partir du Tertiaire.

Le nombre d'échantillons d'ambre étudiés pour certains sites durant ces travaux étant relativement faible, il est fort possible que cette diversité soit encore largement sousestimée. Par exemple, l'étude moléculaire d'ambres du site d'Archingeay, qui a été étudié plus extensivement que la plupart des autres sites, nous a conduit à distinguer trois types moléculaires différents, révélant ainsi l'existence d'au moins trois sources botaniques différentes à l'origine de ces ambres. Un de ces types moléculaires étant présent en écrasante majorité, une étude moins extensive n'en aurait révélé probablement qu'un.

Par ailleurs, pour compléter ce type d'études, une comparaison plus systématique des extraits de cuticules fossiles (quand cela est possible) avec les distributions moléculaires des ambres trouvés sur les mêmes sites pourrait peut-être faciliter la corrélation entre les ambres et leurs sources botaniques, plus particulièrement dans le cas d'espèces ou de familles éteintes. Idéalement, il faudrait analyser des échantillons d'ambre associés à des bois fossiles, mais ce type d'association est malheureusement très rare en milieu sédimentaire.

Il serait également pertinent de réaliser, l'étude de la composition isotopique des constituants des ambres (¹³C/¹²C, ²H/¹H), méthode qui pourrait potentiellement permettre de différencier des ambres de même origine botanique, mais d'origine géographiques distinctes. Certains auteurs ont notamment suggéré d'utiliser cette approche pour distinguer les succinites baltiques de celles de Bitterfeld. Cependant, il est à noter que cette approche est très dépendante du contexte de fossilisation et pourrait aussi potentiellement augmenter artificiellement la diversité des ambres.

Identification des composés organiques soufrés

Lors de l'étude de l'ambre de Piolenc, une nouvelle série de composés inconnus a pu être mise en évidence. Des membres de cette série ont été isolés et identifiés à l'aide d'études de RMN et de spectrométrie de masse en haute résolution comme étant des sulfures diterpénoïdes apparentés à la série de l'acide isopimarique. Notre étude a ainsi permis de fournir la toute première évidence de la présence de composés organiques soufrés dans les ambres.

L'analyse d'ambres géologiques de divers sites a permis de montrer que les composés soufrés ne sont pas rares parmi les ambres et sont présents dans les ambres de nombreux sites indépendamment de leur âge, localisation ou source botanique. Ils ont ainsi été identifiés dans les ambres de différents sites français (e.g. Ambres de Montbrun/Sainte-Croix, du Mas d'Azil, de Piolenc), mais aussi espagnols (Una) et tchèque (valchovite). La proportion relative des composés organiques soufrés par rapport aux autres constituants des ambres peut être très variable, ces composés pouvant être prédominants dans certains cas (e.g. ambre de La Garnache) ou n'apparaitre qu'en très faibles quantités (e.g. succinite de Bitterfeld). Enfin, les composés soufrés dans les ambres présentent une grande variété structurale puisque, outre les diterpénoïdes soufrés de l'ambre de Piolenc identifiés par RMN, nous avons également détecté des composés que nous avons identifiés comme étant des labdanoïdes soufrés sur la base de la comparaison de leurs spectres de masse avec ceux de labdanoïdes soufrés sédimentaires identifiés lors d'études précédentes.

Nous avons proposé sur la base de ces résultats que les composés soufrés dans les ambres ont été formés par des processus de sulfuration mettant en jeu des espèces soufrées issues de la réduction microbienne des sulfates dans des environnements sédimentaires anoxiques et affectant les résines lors des premières phases de la diagenèse. A cet égard, des expériences de sulfuration en laboratoire mettant en jeu des constituants ou fractions de résines actuelles et des polysulfures dans des conditions géochimiquement vraisemblables ont conduit à la formation de composés soufrés détectés, par ailleurs, dans les ambres.

La présence des composés organo-soufrés dans les ambres fournit des informations précieuses sur les environnements et écosystèmes où évoluaient les organismes producteurs de ces ambres. Ils peuvent, en effet, constituer d'excellents indicateurs environnementaux et peuvent être utilisés comme indicateurs de processus de réduction des sulfates dans des environnements de dépôt anciens et marqueurs de milieux sédimentaires anoxiques/disoxyques comme les marais ou mangroves dans lesquels se seraient déposés les résines végétales à l'origine des ambres.

Les structures d'un grand nombre de composés organiques soufrés n'ont cependant pas pu être caractérisées au cours de ces travaux car ces composés sont souvent présents en faibles quantités et sous la forme de mélanges très complexes difficiles à purifier. Il serait donc pertinent de poursuivre l'isolement et l'identification de composés de cette nouvelle famille présents dans les ambres. En effet, approfondir notre compréhension de la structure de ces composés nous permettrait d'en apprendre davantage sur leurs molécules précurseurs, offrant ainsi une vision plus précise de la distribution moléculaire des résines à l'origine des ambres.

Analyses d'ambres archéologiques

Le second axe de cette thèse a porté sur l'analyse moléculaire à l'aide de la GC-MS d'ambres trouvés dans un contexte archéologique. Un des objectifs principaux était de déterminer l'origine géographique de ces ambres afin d'établir l'existence d'anciennes voies d'échanges commerciales. Cette étude s'est appuyée sur la comparaison entre les distributions moléculaires d'ambres archéologiques et celles d'ambres géologiques analysés dans le cadre du volet paléobotanique de cette thèse et qui constituent un référentiel moléculaire. Cette approche est toutefois destructrice par rapport à d'autres approches comme la spectroscopie infrarouge utilisées pour étudier les ambres archéologiques. En revanche, elle a un meilleur potentiel en termes de spécificité et peut être utilisée de manière fiable même dans le cas d'échantillons altérés.

Les ambres archéologiques étant précieux, il a été nécessaire de mettre en place un protocole expérimental permettant de réaliser, de manière locale et ciblée, le prélèvement d'échantillons très petits sur les parties les moins exposées et visibles d'objets en ambre archéologiques ou provenant de collections muséales. Cette méthode a permis d'analyser plusieurs dizaines d'échantillons provenant de collections diverses.

Les principales collections analysées proviennent du Musée Historique de Haguenau et du Musée Unterlinden de Colmar et sont datées de l'âge du Bronze et du Fer. Il est apparu, à la suite de cette étude, que les signatures moléculaires des échantillons analysés étaient similaires et pouvaient être associées à une origine baltique. Nos travaux ont également permis de révéler la composition de vernis utilisés pour des opérations anciennes de restauration de certaines perles d'ambre, opérations qui n'étaient pas connues par les conservateurs des musées. Deux grands types de vernis ont été ainsi caractérisés. Le premier correspond un mélange de colophane (résine de Pinacée distillée) et d'huile végétale et n'a été observé que dans le cas de quelques échantillons du Musée Historique de Haguenau. Le second type de vernis a, quant à lui, été utilisé pour des perles d'ambre des collections des deux musées. Ce vernis est constitué par un mélange d'huile végétale et de résine de Dammar (résine de Diptérocarpacées).

Cette approche a ensuite été utilisée sur d'autres échantillons archéologiques provenant de régions diverses (Ennery, Guînes, Alsace), et a permis de mettre en évidence l'origine baltique de l'ensemble de ces échantillons. L'analyse d'échantillons archéologiques plus anciens datant du Magdalénien et provenant de la grotte d'Enlène (Ariège) a montré, au contraire, une signature moléculaire dominée par les labdanoïdes typiques des ambres géologiques locaux provenant du Mas d'Azil (Ariège). En revanche, des échantillons plus tardifs (Age du Bronze) provenant de cette même grotte présentaient la signature moléculaire typique des ambres baltiques. Ainsi, nos travaux ont pu mettre en évidence que les populations vivant à proximité du Mas d'Azil durant le Magdalénien exploitaient de l'ambre local, tandis que les populations vivant sur le même site à une époque postérieure utilisaient de l'ambre importé de la Baltique.

CHAPITRE VI :

PARTIE EXPÉRIMENTALE



VI.1. Analyses chromatographiques et méthodes spectrométriques

VI.1.1. Chromatographie en phase gazeuse équipée d'un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID)

Les analyses en GC-FID ont été réalisées avec un chromatographe en phase gazeuse Helwett-Packard HP 6890 Series. L'injecteur est de type « on-column » et le détecteur est à ionisation de flamme (FID). La colonne capillaire utilisée est de type HP-5 (phase 5% phényl-méthylpolysiloxane) de dimensions 30 m x 0,32 mm avec une épaisseur de film de 0,25 µm. Le gaz vecteur est l'hydrogène et son débit constant est de 2,5 ml min⁻¹. Le programme utilisé pour l'analyse des échantillons était le suivant : 70 °C (1 min), 70-200 °C (10 °C min⁻¹), 200-300 °C (4 °C min⁻¹) puis isotherme à 300 °C durant 40 min.

VI.1.2. Chromatographie gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse (GC-MS)

Les analyses de GC-MS par impact électronique (IE, 70eV, balayage de masse entre 50 et 700 *m/z*) ont été réalisées avec un spectromètre de masse Thermo Scientific triple quadripôle TSQ Quantum couplé à un chromatographe en phase gazeuse Trace GC Ultra de la même marque. Le spectromètre est équipé d'un injecteur PTV (Programmed Temperature Vaporization) utilisé en mode « simili on-column » et d'une colonne capillaire en silice fondue (HP-5MS, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). L'hélium est utilisé comme gaz vecteur avec un débit constant de 1,2 ml min⁻¹. L'appareil est piloté par un ordinateur muni du logiciel XCalibur (Thermo Fisher). Le programme utilisé pour l'analyse des échantillons était le suivant : 70 °C (5 min), 70-240 °C (4 °C min⁻¹), 240-300 °C (10 °C min⁻¹) puis isotherme à 300 °C durant 40 min. La température initiale de l'injecteur était de 70 °C.

Pour l'ensemble des échantillons, le solvant d'injection est l'acétate d'éthyle (AcOEt).

VI.1.3. Spectrométrie de masse de haute résolution

Les analyses de spectrométrie de masse de haute résolution ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre de masse Bruker microTOF-Q II[™] ESI-Qq-TOF équipé d'une source de type electrospray fonctionnant en mode « ions positifs ».

VI.2. Analyses géochimiques des ambres géologiques, des résines et des ambres archéologiques

VI.2.1. Précautions particulières

Les quantités d'échantillons étant parfois très faibles (de l'ordre du mg), il a été nécessaire de mettre en place un certain nombre de précautions pour éviter l'introduction de contaminants (plastifiants, stabilisants industriels, ou encore squalène (1) et cholestérol (2) introduits lors de la manipulation des échantillons, ou cross-contamination entre échantillons, etc...). Ainsi :

- ➔ L'ensemble des solvants a été distillé afin d'en éliminer les contaminants comme les plastifiants de type phtalates. De la même façon, cette étape de distillation permet d'éliminer les stabilisateurs éventuellement présents dans les solvants.
- ➔ Tout matériel en plastique est à proscrire lors du traitement des échantillons, et seul du matériel en verre est employé. Celui-ci, avant utilisation, subit trois étapes de lavage successives : une première à l'eau distillée, une seconde à l'acétone pour sécher la verrerie, et une dernière au dichlorométhane distillé pour éliminer toute trace de substances organiques éventuellement présente.
- → Le sable, le coton, la silice utilisés sont pré-extraits au dichlorométhane à l'aide d'un Soxhlet. La silice ainsi extraite est ensuite séchée sous sorbonne pendant quelques jours, puis activée à l'étuve à 120 °C pendant environ 24 h.

VI.2.2. Extraction et préparation des échantillons géologiques et des résines

Dans le cas des échantillons d'ambre, il est nécessaire de les broyer à l'aide d'un mortier jusqu'à obtenir une poudre fine afin d'en faciliter la solubilisation. Dans le cas des résines (cf. Chapitre I), qui sont relativement visqueuses, elles peuvent être extraites directement sans traitement préalable.

Un mélange de dichlorométhane (DCM) et de méthanol (MeOH) de rapport volumique 9/1 est utilisé pour extraire les échantillons d'ambre broyés ou les résines. L'ensemble est ensuite placé dans un bain à ultrasons durant 30 min chauffé à 35 °C. Après décantation, le surnageant est récupéré et l'étape d'extraction est renouvelée une seconde fois, les extraits lipidiques étant combinés. Les solvants sont alors éliminés sous flux d'argon pour les petits volumes d'extraction (cas des extraits de quelques mg) ou à l'évaporateur rotatif pour les extraits plus conséquents. Les extraits lipidiques ainsi obtenus sont alors dérivés (cf. § VI.2.4) avant fractionnement sur silice (cf. § VI.2.5) et analyse par GC-MS (cf. §VI.1.2).

VI.2.3 Extraction et préparation à l'analyse par GC-MS des échantillons archéologiques

Les échantillons d'ambre archéologique peuvent être divisés en deux catégories : soit il s'agit d'échantillons se présentant sous la forme d'éclats, provenant généralement d'ambre de bijoux abimés trouvés dans des sépultures, soit il s'agit d'objets archéologiques (perles, fibules) bien préservés provenant de collections de musées, ou destinés à en faire partie.

Dans le premier cas, l'extraction et la préparation de l'échantillon sont similaires à ce qui est décrit dans la partie §VI.2.2 pour les échantillons géologiques.

Dans le second cas, nous avons été amenés à mettre en place une méthode de prélèvement aussi peu invasive que possible. Ainsi, le prélèvement repose sur l'utilisation d'une petite quantité de coton (pré-extrait aux solvants organiques et fixé à l'extrémité d'une curette métallique) imbibé d'éthanol redistillé - l'éthanol étant le solvant généralement utilisé par les archéologues pour nettoyer les échantillons en ambre suite à leur découverte sur site archéologique - afin de frotter légèrement l'objet en ambre. Ce mode de prélèvement a entre autres l'avantage de pouvoir être mis en œuvre directement sur site dans les musées et, spécifiquement, être appliqué sur les parties les moins visibles des objets en ambre (par exemple, au niveau du trou de perçage, dans le cas de perles) en laissant peu ou pas de traces apparentes. De retour au laboratoire, le résidu lipidique est ensuite extrait du coton avec un mélange de méthanol et de dichlorométhane, puis dérivé (cf. § VI.2.4) pour rendre les composés

polaires qu'il contient compatibles avec les analyses de GC-MS. Les extraits organiques ainsi traités sont alors analysés par GC-MS après éventuellement l'élimination des constituants les plus polaires et macromoléculaires par chromatographie sur silice. En effet, lorsque les extraits lipidiques issus des échantillons archéologiques sont d'une masse très faible (< 2 mg), ceux-ci ne sont pas séparés sur colonne de silice, mais analysés directement par GC-MS après méthylation par la DMA/DMF (cf. § VI.2.4.2).

VI.2.4. Dérivation des échantillons

VI.2.4.1. Acétylation des fonctions alcools

Les extraits lipidiques des échantillons susceptibles de contenir des fonctions alcools, comme les résines, par exemple **(Tableau VI.1)** sont solubilisés dans un mélange pyridine/anhydride acétique (1:1 v/v) en excès afin de convertir les fonctions alcools en acétates (**Figure VI.1** ; Bonner et al., 1968). La solution est ensuite chauffée à 60 °C durant 2 h. Suite à cela, l'excès de réactifs est éliminé sous argon ou à l'aide d'un évaporateur rotatif. Du méthanol est ajouté afin de faciliter l'élimination des réactifs et d'éviter la présence d'anhydrides mixtes.



Figure VI.1. Mécanisme d'acétylation des fonctions alcools à l'aide d'anhydride acétique en présence de pyridine.

VI.2.4.2. Méthylation des acides par la N,N-diméthylformamide dimétyle acétal (DMA/DMF)

Afin de convertir les acides carboxyliques en esters méthyliques, une étape de méthylation en présence de DMA/DMF en excès est effectuée (**Figure VI.2**). Ce

protocole a été adapté à partir de celui mis au point par De Lama Valderrama et al. (2022).

Les échantillons sont tout d'abord solubilisés dans du toluène, puis de la DMA/DMF est ajoutée. En général, 70 µl de DMA-DMF sont utilisés pour 1 ml de toluène. La solution est ensuite chauffée à 70 °C durant 3 h. Le brut réactionnel est alors séché sous un flux d'argon. Lors de cette étape de méthylation, il a été observé par De Lama Valderrama et al. (2022) que les fonctions alcools libres (i.e., non acétylées) sont partiellement converties en dérivés de type formiates, sans que nous ne puissions proposer un mécanisme expliquant la présence de ces composés. Il en ressort en tout cas que pour éviter cette réaction secondaire non souhaitée (les dérivés de type formiates étant peu documentés dans la littérature, donc difficiles à identifier), il est préférable de passer par une étape d'acétylation, préalablement à cette étape de méthylation, pour convertir les alcools en acétates.



Figure VI.2. Mécanisme de méthylation des fonctions acides carboxyliques à l'aide de la DMA/DMF.

VI.2.5. Fractionnement chromatographique sur colonne de silice

Les extraits organiques dérivés ou issus des dégradations chimiques (cf. § VI.2.6) sont séparés sur colonne de silice sèche activée. Les extraits lipidiques dérivés sont solubilisés dans un mélange DCM/AcOEt (8:2 v/v) - ou, lorsqu'ils ne sont pas solubles dans ce mélange, adsorbés sur silice - et sont déposés en tête de colonne. Une élution à l'aide d'un mélange DCM/AcOEt (8:2, 4 volumes morts -Vm-) conduit à l'obtention d'une fraction « apolaire » F1. L'utilisation d'un mélange DCM/MeOH (1:1 v/v ; 2 à 3 Vm) permet de recueillir une seconde fraction F2 contenant les constituants les plus polaires. La fraction F1 est systématiquement analysée par GC-MS, tandis que la seconde ne peut être analysée par GC-MS qu'après dégradation chimique

(saponification, butanolyse ; cf. § VI.2.6) étant donné sa composante principalement macromoléculaire.

VI.2.6. Dégradations chimiques : butanolyse et saponification

Dans le cas de certains échantillons géologiques et archéologiques, les fractions polaires, les résidus insolubles, ou l'échantillon d'ambre entier (cf. Tableau VI.1) ont subi une étape de dégradation chimique, à savoir une étape de saponification (KOH/MeOH 1 N) ou une étape de butanolyse (BuOH/HCI 1,2 N). Les fractions polaires, les résidus solides, ou les échantillons d'ambre broyés sont placés dans un tube Pyrex© doté d'un bouchon à vis. Environ 3 ml de réactif sont alors ajoutés, l'ensemble est fermé de manière étanche, et est placé dans un four à 90 °C pendant 3 h. Dans le cas de la butanolyse, l'excès de réactif est éliminé à l'évaporateur rotatif et du méthanol est ajouté pour en faciliter l'évaporation. Dans le cas de la saponification liquide/liquide est nécessaire et est effectuée après ajout d'eau et d'acétate d'éthyle. Après récupération de la phase organique, l'acétate d'éthyle est éliminé sous pression réduite.

VI.3. Isolement et identification des composés organiques soufrés (COS) à partir d'ambre

Note préalable : Ces travaux d'identification de COS ont été réalisés dans le cadre d'un stage de master I (L. Lenen, 2022) que j'ai co-encadré, et qui a donné lieu à une publication dont je suis co-autrice (Lenen et al., 2023).

VI.3.1. Préparation de l'échantillon

En vue de l'isolement et de l'identification structurale par RMN de COS individuels détectés dans des échantillons d'ambre des niveaux bas de Piolenc (France, Vaucluse, Santonien, -86,3 à -83,6 Ma ; cf. **Chapitre II, II.2**), environ 1 g d'échantillon a été broyé en fine poudre, puis extrait suivant la procédure décrite en section VI.2.3. Après centrifugation (2800 rpm, 10 min), le surnageant a été collecté, puis le solvant est éliminé sous pression réduite, conduisant à l'obtention de 286 mg d'extrait organique. Cet extrait a ensuite été méthylé à l'aide de DMA/DMF (cf. § VI.2.4.2).

VI.3.2. Purification de l'extrait méthylé par chromatographie liquide sur colonne de silice

Le fractionnement de l'extrait lipidique méthylé a été réalisée par chromatographie sur colonne de silice a conduit à l'obtention de 28 fractions. Une première fraction (F1) a été obtenue suite à l'élution avec un mélange de cyclohexane/DCM (6:4 v/v, 1,5 Vm). Quatre fractions (F2 à F5) ont ensuite été obtenues par élution avec 0,75 Vm du même mélange de solvants, puis 12 autres en éluant d'un mélange de cyclohexane/DCM (1:1, v/v ; 3 Vm). Les neufs fractions suivantes (F18 et F26) ont été obtenues par élution de 3 Vm de DCM. Enfin, deux dernières fractions (F27 et F28) ont été éluées avec un mélange de DCM/AcOEt (8:2, v/v, 2 Vm). L'éventuelle présence de COS dans chacune des fractions isolées a été contrôlée par GC-MS, ce qui a permis de déterminer que les COS étaient principalement concentrés dans les fractions de F15 à F18 (21,5 mg au total).

VI.3.3. Purification par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) des fractions F15-F18

La purification par HPLC des diterpènes soufrés à partir des fractions F15 à F18 par HPLC a été réalisé à l'aide d'une pompe HPLC Waters 590, d'un injecteur de type Rhéodyne et d'un détecteur de type refractomètre différentiel Waters 401. La séparation des composés a été effectuée à l'aide d'une colonne HPLC en phase directe (Zorbax Sil, 4,6 x 250 mm ; 5 μ m) avec pour phase mobile un mélange *n*-heptane/AcOEt (98:2, v/v) et avec un débit de 1 ml min⁻¹. Les composés ont été détectés à l'aide d'un module traceur Kipp et Zonen BD40 et les composés d'intérêt ont été collectés manuellement, conduisant à l'obtention de 1,4 mg et 0,5 mg de deux COS individuels sous la forme d'esters méthylique (**3b-4b**) dont la structure a pu être identifiée ensuite par RMN.

VI.3.4. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les études de résonance magnétique nucléaire 1D (¹H-RMN et ¹³C-RMN, DEPT) et 2D de corrélation homonucléaires ¹H (COSY- Correlation Spectroscopy et NOESY-Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) et hétéronucléaires ¹H-¹³C à courtes distances (¹J, HSQC - Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy) et longues distances (^{2,3}J – HMBC - Heteronuclear Multiple-Bond Correlation Spectroscopy) ont été réalisées en solution dans du chloroforme deutérié sur un appareil BRUKER AVANCE I (500 MHz) opérant à des fréquences de 500 MHz (¹H) et 125 MHz (¹³C). Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane, la référence interne étant le chloroforme résiduel du solvant deutérié (CHCl₃ : δ^{1} H = 7.26 ppm ; δ^{13} C = 77.2 ppm).

VI.4. Sulfuration de composés issus de résines actuelles

Note préalable : Ces travaux d'expériences de sulfuration en laboratoire ont été réalisés dans le cadre d'un stage de master I (L.P. Magnin, 2023) que j'ai co-encadré.

VI.4.1. Préparation des échantillons

Les expériences de sulfuration ont été réalisées à partir d'une fraction apolaire de la résine méthylée de *Cedrus atlantica* (104 mg) et d'un extrait enrichi en acide agathique (57 mg) obtenu à partir de la résine méthylée d'*Araucaria columnaris*. Les détails concernant la préparation de ces fractions utilisées pour les expériences de sulfuration peuvent être trouvés dans Magnin (2023).

VI.4.2. Réaction de sulfuration (Magnin, 2023)

Le protocole de sulfuration a été adapté d'après Adam et al. (2009) et le protocole décrit ci-dessous reprend celui mis en œuvre par Magnin (2023).

Typiquement, pour sulfurer 104 mg de fraction apolaire de la résine préalablement méthylée de *Cedrus atlantica*, Na₂S (615 mg, 7,88 mmol) et S₀ (151 mg, x 4,72 mmol) sont tout d'abord solubilisés dans 6 mL de DMF, puis chauffés à 60 °C sous atmosphère inerte pendant 1 h, conduisant à la formation d'une solution de polysulfures (Na₂S_x) de teinte verte. La fraction apolaire de la résine préalablement méthylée est alors solubilisée dans un minimum de diméthylformamide (DMF ; 2 à 3 mL) puis additionnée à la solution de polysulfures. De l'acide acétique (150 µL, 2.10⁻³ mmol) est ensuite ajouté pour favoriser la formation des espèces NaSxH et le milieu réactionnel remis sous atmosphère inerte est placé à l'étuve pour 24 h à 60 °C. Après retour à la température ambiante, le brut réactionnel est versé dans de l'eau (10 mL, 2x) et extrait avec du cyclohexane (20 mL, 3x). Les phases organiques sont combinées

puis le mélange obtenu est lavé avec de l'eau distillée (20 mL, 2x). La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de sodium et évaporée sous pression réduite.

VI.5. Isolement de l'ester méthylique du wollémolide (5b) à partir de la résine de *Wollemia nobilis*

Au cours de l'analyse par GC-MS de la fraction apolaire de la résine méthylée de *Wollemia nobilis* (cf. Chapitre I, § I.2.3.1.5), un composé majeur, possédant un spectre de masse inconnu à notre connaissance, a été observé. Il a donc été décidé d'isoler celui-ci afin d'en établir la structure

VI.5.1. Extraction et purification chromatographique de la résine

La résine de *W. nobilis* analysée (509 mg) a été collectée au Jardin Botanique de Strasbourg. Après acétylation et méthylation de la résine, celle-ci a été fractionnée sur colonne de silice. Une première fraction (F1) a été obtenue par élution à l'aide de DCM (1 Vm), puis 5 autres fractions (F2 à F6) ont été recueillies par élution avec un mélange DCM/ AcOEt (95:5 ; 1/3 Vm). Ces différentes fractions ont ensuite été analysées par GC-MS et ont permis de mettre en évidence la présence du composé d'intérêt dans les fractions F5-7, celui-ci étant le plus abondant dans la fraction F5 (50 mg).

VI.5.2. Isolement de l'ester méthylique du wollémolide (5b) par chromatographie sur couche mince (CCM)

Une partie de la fraction F5 (10 mg) a ensuite été purifiée par CCM préparative sur gel de silice en utilisant pour éluant un mélange cyclohexane/AcOEt (5:1, v/v). Après migration, 4 zones ont été identifiées à l'aide d'une lampe UV, et celles-ci ont été récupérées et analysées par GC-MS. La fraction 3 (Rf = 0.4 ; 9 mg) s'est avérée contenir l'ester méthylique du wollémolide (**5b**) (**Figure VI.3**) avec une pureté supérieure à 90% ; détermination par GC-FID), la structure de celui-ci ayant ensuite été déterminée par des études de RMN 1D et 2D. Les déplacements chimiques de tous les atomes d'hydrogène et de carbone sont indiqués dans le **Tableau VI.1**.



Figure VI.3. Structure de l'ester méthylique du wollémolide (5b) et numérotation des atomes de carbone.

Tableau VI.1. Déplacements chimiques	¹ H (500 MHz) et ¹³ C (125 MHz) de l'ester méthylique
du wollém	olide (5b) dans CDCl₃.

Position	δc	$\delta_{\rm H}$	$\delta_{\rm H}$	Position	δc	$\delta_{\rm H}$	δ _H
1	38,1	2,20eq	1,28ax	11	21,7	1,79	1,39
2	21,3	1,67ax	1,79eq	12	39,9	2,32	1,99
3	40,1	1,88eq	1,50ax	13	159,7	-	-
4	43,9	-	-	14	115,8	5,64	
5	49,6	1,50	-	15	167,2	-	-
6	27,4	2,01eq	1,18ax	16	19,0	2,16	-
7	37,0	2,47eq	1,98ax	17	109,5	5,04 (Droite)	4,64 (Gauche)
8	146,1	-	-	18	23,5	1,19	-
9	50,4	1,81	-	19	176,4	-	-
10	38,9	-	-	20	73,2	4,38 (Droite)	4,02 (Gauche)
				1'	51,1	3,69	-

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- Abdel-Kader, M., Alqasoumi, S., 2008. Efficacy and safety of *Juniperus phoenicea* extracts used as remedy for liver in Saudi Arabia. Planta Medica 74. <u>https://doi.org/10.1055/s-0028-1084169</u>
- Abdel-Sattar, E., Monem, A.R.A., Ezzat, S.M., El-Halawany, A.M., Mouneir, S.M., 2009. Chemical and biological investigation of Araucaria heterophylla Salisb. Resin. Zeitschrift für Naturforschung C 64, 819–823. https://doi.org/10.1515/znc-2009-11-1211
- Abe, T., Kobayashi, M., Okawa, Y., Inui, T., Yoshida, J., Higashio, H., Shinden, H., Uesugi, S., Koshino, H., Kimura, K., 2016. Yeast Ca2+-signal transduction inhibitors isolated from Dominican amber prevent the degranulation of RBL-2H3 cells through the inhibition of Ca2+-influx. Fitoterapia 113, 188–194. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.07.018
- Abert, F., Bevilacqua, D., Delrieu, F., Rieth, P., 2010. Les tertres funéraires du Schirrheinerweg et du Kurzgeländ de la forêt de Haguenau. Revue d'Alsace 7–32. <u>https://doi.org/10.4000/alsace.72</u>
- Albert,F., Rieth, P., 2010, Rapport de prospection n° d'opération 5493, Brumath, Bas-Rhin, Forêt de Brumath, Pôle archéologique interdépartemental rhénan
- Adam, P., Schaeffer, P., Gug, S., Motsch, E., Albrecht, P., 2009. Identification of a sulfide derivative with a bicyclic hydrocarbon skeleton related to squalene. Part II: synthesis of a S-spiro-like dithiolane triterpenoid. Organic Geochemistry 40, 885–894. <u>https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2009.04.010</u>
- Adam, P., Schmid, J. C., Connan, J., Albrecht, P., 1991a. 2α- and 3β-steroid thiols from reductive cleavage of macromolecular petroleum fraction. Tetrahedron Letters 32, 2955–2958. <u>https://doi.org/10.1016/0040-4039(91)80661-0</u>
- Adam, P., Trendel, J.M., Connan, J., Albrecht, P., 1991b. Novel thiophene derived from higher plant triterpenes in sediments. Tetrahedron Letters 32, 4179–4182. <u>https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)79898-4</u>
- Adam, P., Schmid, J.C., Mycke, B., Strazielle, C., Connan, J., Huc, A., Riva, A., Albrecht, P., 1993. Structural investigation of non-polar sulfur cross-linked macromolecules in petroleum. Geochimica et Cosmochimica Acta 57, 3395–3419. <u>https://doi.org/10.1016/0016-7037(93)90547-A</u>
- Adam, P., Philippe, E., Albrecht, P., 1998. Photochemical sulfurization of sedimentary organic matter: A widespread process occurring at early diagenesis in natural environments. Geochimica et Cosmochimica Acta 62, 265–271. <u>https://doi.org/10.1016/S0016-7037(97)00332-3</u>
- Adam, P., Schneckenburger, P., Schaeffer, P., Albrecht, P., 2000. Clues to early diagenetic sulfurization processes from mild chemical cleavage of labile sulfur-rich geomacromolecules. Geochimica et Cosmochimica Acta 64, 3485–3503. <u>https://doi.org/10.1016/S0016-7037(00)00443-9</u>
- Adams, R. P., von Rudloff, E., Zanoni, T. A. and Hogge L. 1980. The terpenoids of an ancestral/advanced species pair of *Juniperus*. Biochem. Systematics and Ecology 8: 35–37
- Agrawal, P.K., Rastogi, R.P., 1984. Chemistry of the true cedars. Biochemical Systematics and Ecology 12, 133– 144. <u>https://doi.org/10.1016/0305-1978(84)90025-5</u>
- Agricola, 1846. De ortu et causis subterraneorum. Forben, Basel.
- Aksamija, A., 2012. Etude chimique des matériaux résineux : oliban, dammar : application à des prélèvement artistiques et archéologiques. Thèse de Doctorat, Université d'Avignon et des pays de Vaucluse, France. <u>http://www.theses.fr/2012AVIG0245.pdf</u>
- Al-Harrasi, A., Khan, A.L., Rehman, N.U., Csuk, R., 2021. Biosynthetic diversity in triterpene cyclization within the Boswellia genus. Phytochemistry 184, 112660. <u>https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112660</u>

- Alekseev, V.I., Bukejs, A., Pollock, D.A., 2024. The first fossil of a tenebrionoid taxonomic enigma: Agnathus Germar (Coleoptera: Pyrochroidae: Agnathinae) in Bitterfeld amber, with remarks about age and geographic origin of the fossil. Historical Biology 1–6. <u>https://doi.org/10.1080/08912963.2024.2327082</u>
- Alez-Martin, L, Fradet, A., Schaffer P., Néraudeau, D., Adam, P., 2022 Analyse moléculaire de différents types d'ambres crétacés du gisement d'Archingeay (Charente-Maritime), poster FROG V, Rennes
- Alonso, J., Arillo, A., Barrón, E., Corral, C., Grimalt, J., López, J.F., López, R., Martínez-Delclòs, X., Ortuño, V., Peñalver, E. & Trincão, P.R. 2000. A new fossil resin with biological inclusions in Lower Cretaceous deposits from Álava (Northern Spain, Basque-Cantabrian Basin). Journal of Paleontology, 74 (1), 158– 178.
- Alvin, K. L. Cheirolepidiaceae : Biology, structure and paleoecology. Review Of Palaeobotany And Palynology 1982, 37(1-2), 71-98. <u>https://doi.org/10.1016/0034-6667(82)90038-0</u>
- Ambrose, E., McDermott, C., Flanders, P., 2022. Analysis of Abietane-Type Diterpenoids from Baltic Amber Samples. American Chemical Society (ACS). <u>https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2022-48kmn</u>. This content is a preprint and has not been peer-reviewed.
- Amrani, A., 2014. Organosulfur compounds: molecular and isotopic evolution from biota to oil and gas. Annual Review of Earth and Planetary Sciences 42, 732–768. <u>http://dx.doi.org/10.1146/annurev-earth-050212-124126</u>.
- Amrani, A., Aizenshtat, Z., 2004. Reaction of polysulfide anions with α,β-unsaturated isoprenoid aldehydes in aquatic media: simulation of oceanic conditions. Organic Geochemistry 35, 909-921. <u>https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2004.04.002</u>
- Anderson, K.B., Botto, R.E., 1993. The nature and fate of natural resins in the geosphere—III. Re-evaluation of the structure and composition of Highgate Copalite and Glessite. Organic Geochemistry 20, 1027–1038. https://doi.org/10.1016/0146-6380(93)90111-n
- Anderson, K.B., 1994. The nature and fate of natural resins in the geosphere—IV. Middle and Upper Cretaceous amber from the Taimyr Peninsula, Siberia—evidence for a new form of polylabdanoid of resinite and revision of the classification of Class I resinites. Organic Geochemistry 21, 209–212. https://doi.org/10.1016/0146-6380(94)90155-4
- Anderson, K.B., 1996. New evidence concerning the structure, composition and maturation of Class 1 (polylabdanoid) resinites. Dans: Anderson, K.B., Crelling, J.C. (Eds.), Amber, Resinite, and Fossil Resins. American Chemical Society Symposium Series 617, Washington, DC, pp. 105–129. <u>https://doi.org/10.1021/bk-1995-0617.ch006</u>
- Anderson, K.B., Crelling, J.C., 1995. Introduction. In: Amber, resinite, and fossil resins: 1–10. Washington, DC: American Chemical Society Symposium (ACS), Series 617, Washington, DC.
- Anderson, K.B., LePage, B.A., 1996. Analysis of fossil resins from Axel Heiberg Island, Canadian arctic. In: Anderson, K.B., Crelling, J.C. (Eds.): amber, resinite, and fossil resins. American Chemical Society Symposium series 617, Washington, DC, pp. 170–192. <u>https://doi.org/10.1021/bk-1995-0617.ch009</u>
- Anderson, K.B., Winans, R.E., 1991. Nature and fate of natural resins in the geosphere. I. Evaluation of pyrolysisgas chromatography mass spectrometry for the analysis of natural resins and resinites. Analytical Chemistry 63, 2901–2908. <u>https://doi.org/10.1021/ac00024a019</u>
- Anderson, K.B., Winans, R.E., Botto, R.E., 1992. The nature and fate of natural resins in the geosphere—II. Identification, classification and nomenclature of resinites. Organic Geochemistry 18, 829–841. <u>https://doi.org/10.1016/0146-6380(92)90051-x</u>

- Anfray R., 2004, Excursion: le bassin de Challans-Commequiers, Bulletin Annuel de l'Association Vendéenne de Géologie.
- Angelini, I., Bellintani, P., 2005. Archaeological ambers from northern Italy: an FTIR–drift study of provenance by comparison with the geological amber database*. Archaeometry 47, 441–454. <u>https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.2005.00212.x</u>
- Appanah S., Ashton M.S., Bawa K.S., Curtet L., Elouard C., Jantan I., Krishnapillay B.,Lee S.S., Maury-Lechon G., Shiva M.P., Tompsett P.B. and Weinland G., 1998. A review of dipterocarps: taxonomy, ecology and silviculture. Appanah S., Turnbull J.W. (Eds.), Bogor
- Arbizu, M., Bernárdez, E., Peñalver, E., Prieto, M. A., 1999. El ámbar de Asturias (España). Estudios del Museo de Cienca Natural de Alava 14 (2), 245-254
- Arnold, V., 1998. Vergessen Einschlüsse Blütenstaub im Baltischen Berstein. Mitteilungen aus dem Geologisch-Paläontologischen Institut der Universität Hamburg 269–282.
- Arruda, C., Aldana Mejía, J.A., Ribeiro, V.P., Gambeta Borges, C.H., Martins, C.H.G., Sola Veneziani, R.C., Ambrósio, S.R., Bastos, J.K., 2019. Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on *Copaifera* genus—A review. Biomedicine & Pharmacotherapy 109, 1–20. <u>https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.030</u>
- Atolani, O., Olatunji, G.A., 2014. Isolation and evaluation of antiglycation potential of polyalthic acid (furano-terpene) from *Daniella oliveri*. Journal of Pharmaceutical Analysis 4, 407–411. <u>https://doi.org/10.1016/j.jpha.2014.05.002</u>
- Averbouh, A., 1999. Un fragment de percuteur sur partie basilaire de la grotte magdalénienne d'Enlène (Ariège). Bulletin de la Société préhistorique française 96, 497–504.
- Aweng, E. 1894. Untersuchungen über die Secrete. Ueber den Succinit. Archiv der Pharmazie, 232(7), 660-688.
- Azar, D., 2000. Les ambres mésozoïques du Liban. Thèse de doctorat, Université de Paris 11, France.
- Azar, D., 2007. Preservation and accumulation of biological inclusions in Lebanese amber and their significance. Comptes Rendus Palevol 6, 151-156 <u>https://doi.org/10.1016/j.crpv.2006.10.004</u>
- Azar, D., 2012. Lebanese amber: a "Guinness Book of Records". Annales Universitatis Paedagogicae Cracoviensis. Folia 111, 44-60.
- Azar, D., Perrichot, V., Néraudeau, D., Nel, A., 2003. New psychodids from the Cretaceous ambers of Lebanon and France, with a discussion of *Eophlebotomus connectens* Cockerell, 1920 (Diptera, Psychodidae). Annals of the Entomological Society of America 96, 117–126. <u>https://doi.org/10.1603/0013-8746(2003)096[0117:NPFTCA]2.0.CO;2</u>
- Azar, D., Gèze R., Acra F., 2010. Lebanese amber. In: Biodiversity of fossils in amber from the major world deposits, Penney (ed.), Siri Scientific Manchester Press.
- Azar, D., Gèze, R., El-Samrani, A., Maalouly, J., Nel, A., 2010. Jurassic amber in Lebanon. Acta Geological Sinica – English Edition 84, 977-983, <u>https://doi.org/10.1111/j.1755-6724.2010.00228.x</u>
- Azéma, C., Viaud, J.M., 1979. Sur l'existence d'une flore du Sénonien inférieur (Santonien) dans le Bassin de Commequiers (Vendée). Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances. Série D. Sciences Naturelles 288. 815-817.
- Azéma, C., Durand, S., Medus, J., 1972. Des miospores du Cénomanien moyen. Dans : Paleobiologie continentale, Vol III, n°4, 1-54.
- Azéma, C., Fauconnier, D., Viaud, J.M., 1981. Microfossils from the Upper Cretaceous of Vendée (France). Review of Palaeobotany and Palynology 35, 237–281. <u>https://doi.org/10.1016/0034-6667(81)90111-1</u>

- Azéma, C., 1979. Le pollen du genre *Classopollis* dans la carrière du Brouillard (Anjou, France). Comptes Rendus du 104^e Congrès National des Sociétés Savantes, Bordeaux, 197-208
- Azemard, C., Menager, M., Vieillescazes, C., 2016. Analysis of diterpenic compounds by GC-MS/MS: contribution to the identification of main conifer resins. Analytical and Bioanalytical Chemistry 408, 6599–6612. <u>https://doi.org/10.1007/s00216-016-9772-9</u>
- Bachhuber, C., 2012. Uluburun shipwreck. The Encyclopedia of Ancient History. https://doi.org/10.1002/9781444338386.wbeah02186
- 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.
- Baldwin, D., Loeblich, V., Lawrence, R., 1958. Acidic Composition of Oleoresins and Rosins. Industrial & Engineering Chemistry Chemical and Engineering Data Series 3, 342–346. <u>https://doi.org/10.1021/i460004a036</u>
- Bandaranayake, W.M., Gunasekera, S.P., Karunanayake, S., 1975. Terpenes of *Dipterocarpus* and *Doona* species. Phytochemistry 14, 2043–2048. <u>https://doi.org/10.1016/0031-9422(75)83122-0</u>
- Barrón López, E., Comas-Rengifo, M.J., Elorza, L., 2001. Contributions to the palynological study of Lower Cretaceous of the Vasco-Cantabrian Basin: the outcrops with amber from Peñacerrada (Spain). Coloquios de Paleontología, 52, 135–156.
- Barrón, E., Peyrot, D., Rodríguez-López, J.P., Meléndez, N., López del Valle, R., Najarro, M., Rosales, I., Comas-Rengifo, M.J., 2015. Palynology of Aptian and upper Albian (Lower Cretaceous) amber-bearing outcrops of the southern margin of the Basque-Cantabrian basin (northern Spain). Cretaceous Research 52, 292– 312. <u>https://doi.org/10.1016/j.cretres.2014.10.003</u>
- Barry, T.H., Drummond, A.A., Morrell, R.S., 1926. The Chemistry of the Natural and Synthetic Resins. London: Ernest Benn publisher.
- Barthel, M., Hetzer, H., 1982. Bernstein-Inklusen aus dem Miozän des Bitterfelder Raumes. Zeitschrift für angewandte Geologie 28: 314–336.
- Basar, S., Koch, A., König, W.A., 2001. A verticillane-type diterpene from *Boswellia carterii* essential oil. Flavour and Fragrance Journal 16, 315–318. <u>https://doi.org/10.1002/ffj.992</u>
- Bastard, J.; Khac Duc, D.; Fetizon, M.; Francis, M. J.; Grant, P. K.; Weavers, R. T., 1984. CMR spectroscopy of labdanic diterpenes and related substances. Journal of Natural products 47, 592-599. <u>https://doi.org/10.1021/np50034a004</u>
- Bechtel, A., Karayigit, A.I., Bulut, Y., Mastalerz, M., Sachsenhofer, R.F., 2016. Coal characteristics and biomarker investigations of Dombayova coals of Late Miocene–Pliocene age (Afyonkarahisar-Turkey). Organic Geochemistry 94, 52–67. <u>https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2015.12.008</u>
- Beck, C.W., 1985. The role of the scientist: The amber trade, the chemical analysis of amber, and the determination of Baltic provenience. Journal of Baltic Studies 16, 191–199. <u>https://doi.org/10.1080/01629778500000111</u>
- Beck, C.W., 1986. Spectroscopic Investigations of Amber. Applied Spectroscopy Reviews 22, 57–110. https://doi.org/10.1080/05704928608060438
- Beck, C.W., Harding, A., Hughes-Brock, H., 1974. Amber in the Mycenaean World. The Annual of the British School at Athens 69, 145–172. <u>https://doi.org/10.1017/s0068245400005505</u>
- Beck, C.W., Liu, T., 1976. II. Origine de l'ambre des grottes du Hasard et du Prevel. Gallia Préhistoire 19, 201–208.

- Beck, C., Wilbur, E., Meret, S., Kossove, D., Kermani, K., 1965. The infrared spectra of amber and the identification of Baltic amber. Archaeometry 8, 96–109. <u>https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.1965.tb00896.x</u>
- Bégouën, R., Clottes, J., Feruglio, J., Pastoors, V., et al., 2014. La caverne des Trois-frères, anthologie d'un exceptionnel sanctuaire préhistorique. Bulletin de la Société Préhistorique Française 112-3, 571-572.
- Bégouën, R., Pastoors, A., Clottes, J., 2019. La grotte d'Enlène, immersion dans un habitat magdalénien. Montesquieu-Avantès / Paris, <u>Association Louis Begouën / In Fine éditions d'art</u>, 408 p.
- Behrens, A., Schaeffer, P., Albrecht, P., 1997. 14β,22R-epithiosteranes, a novel series of fossil steroids widespread in sediments. Tetrahedron Letters 38, 4921–4924. <u>https://doi.org/10.1016/S0040-4039(97)01059-9</u>
- Bergemann, C., 1859. Ueber ein neues fossiles Harz aus der Braunkohle (Krantzit). Journal für Praktische Chemie 76, 65–69. <u>https://doi.org/10.1002/prac.18590760115</u>
- Bernard-Dagan, C., C. Fillon, G. Pauly, P. Baradat, and G. Illy. 1971. Les terpènes du pin maritime. I. Variabilité de la composition monoterpènique dans un individu, entre individus et entre provenances. Annales des Sciences Forestières 223–258.
- Bernard-Dagan, C. 1988. Seasonal variations in energy sources and biosynthesis of terpenes and maritime pine. dans: Mechanisms of Woody Plant Defenses Against Insects, 93–116. W. J. Mattson, J. Levieux, and C. Bernard-Dagan (eds). Springer-Verlag,New York
- Berry, E.W., 1927. The Baltic amber deposits. Scientific Monthly 24, 268–278.
- Berthelin, M., Pons, D., 1999. Signification des caractères partagés entre Bennettitales et Cycadales. Implications de la découverte d'une Cycadale nouvelle du Cénomanien de l'Anjou (France). Annales de Paléontologie 85, 227–239.
- Betancor, C., Freire, R., Hernández, R., Suárez, E., Cortés, M., Prangé, T., Pascard, C., 1983. Dammarane triterpenes of *Trevoa trinervis*: structure and absolute stereochemistry of trevoagenins A, B, and C. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 1119–1126. <u>https://doi.org/10.1039/p19830001119</u>
- Bi, X., Simoneit, B.R.T., Sheng, G., Fu, J., 2008. Characterization of molecular markers in smoke from residential coal combustion in China. Fuel 87, 112–119. <u>https://doi.org/10.1016/j.fuel.2007.03.047</u>
- Billet, D., Heitz, S., Raulais, D., Matschenko, A., 1971. Constituants terpéniques de *Canarium boivinii* Engl. Phytochemistry 10, 1681–1683. <u>https://doi.org/10.1016/0031-9422(71)85050-1</u>
- Bilotte, M., 1973. Le Cénomanien des Corbières méridionales (Pyrénées). Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de Toulouse 109, 7–22.
- Bilotte, M., 1985. Le Crétacé supérieur des plates-formes est-pyrénéennes. Strata 5, 1–438.
- Bisset, N.G., Diaz, M.A., Ehret, C., Ourisson, G., Palmade, M., Patil, F., Pesnelle, P., Streith, J., 1966. Etudes chimio-taxonomiques dans la famille des diptérocarpacées-II. Phytochemistry 5, 865–880. <u>https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)82783-1</u>
- Bisset, N.G., Diaz-Parra, M.A., Ehret, C., Ourisson, G., 1967. Etudes chimio-taxonomiques dans la famille des diptérocarpacées-III. Phytochemistry 6, 1396–1405. <u>https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)82882-4</u>
- Bisset, N.G., Chavanel, V., Lantz, J.-P., Wolff, R.E., 1971. Constituants sesquiterpéniques et triterpéniques des résines du genre *Shorea*. Phytochemistry 10, 2451–2463. <u>https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)89892-1</u>
- Bittner, H., 1913. Streifzüge im Reich der Steine und Versteinerungen. Lotos: Zeitschrift für Naturwissenschaften 79–83.

- Blancas, J., Abad-Fitz, I., Beltrán-Rodríguez, L., Cristians, S., Rangel-Landa, S., Casas, A., Torres-García, I., Sierra-Huelsz, J.A., 2022. Chemistry, Biological Activities, and Uses of Copal Resin (*Bursera* spp.) in Mexico. In: Reference Series in Phytochemistry. Springer, Cham. <u>https://doi.org/10.1007/978-3-030-91378-6 21</u>
- Bohlmann, J. ; Meyer-Gauen, G. ; Croteau, R. 1998 Plant terpenoid synthases : Molecular biology and phylogenetic analysis. Proceedings Of The National Academy Of Sciences, 95(8), 4126-4133. https://doi.org/10.1073/pnas.95.8.4126
- Bol'shakova, V. I. ; Demenkova, L. I. ; Schmidt, N. ; Pentegova, V. A. 1987. Resin acids of the oleoresins of conifers growing in Transcarpathia. Chemistry Of Natural Compounds, 23(2), 173-175. <u>https://doi.org/10.1007/bf00598751</u>
- Bonaduce, I., Ribechini, E., Modugno, F., Colombini, M.P., 2016. Analytical Approaches Based on Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS) to Study Organic Materials in Artworks and Archaeological Objects. Topics in Current Chemistry 374. https://doi.org/10.1007/s41061-015-0007-x
- Boone, C. K. ; Aukema, B. H. ; Bohlmann, J. ; Carroll, A. L. ; Raffa, K. F. 2011 Efficacy of tree defense physiology varies with bark beetle population density : a basis for positive feedback in eruptive species. Canadian Journal Of Forest Research, 41(6), 1174-1188. <u>https://doi.org/10.1139/x11-041</u>
- Botta, P.E., 1831. Sur la structure géognostique du Liban et de l'Anti-Liban. Bulletin de la Société Géologique de France 10, 234–239.
- Bouška, V., Galek, V., Rojík, P., Sýkorová, I., Vašíček, M., 1999. The find of duxite in the Sokolov Basin. Bulletin Mineralogicko-Petrologického Oddělení Národního Muzea 7, 139–142.
- Brassell, S.C., Lewis, C.A., de Leeuw, J.W., de Lange, F., Sinninghe Damsté, J.S., 1986. Isoprenoid thiophenes: a novel product of sediment diagenesis? Nature 320, 160–162. <u>https://doi.org/10.1038/320160a0</u>
- Bray, P.S., Anderson, K.B., 2008. The nature and fate of natural resins in the geosphere XIII: a probable pinaceous resin from the early Cretaceous (Barremian), Isle of Wight. Geochemical Transactions 9, 3. <u>https://doi.org/10.1186/1467-4866-9-3</u>
- Bray, P.S., Anderson, K.B., 2009. Identification of carboniferous (320 million years old) class Ic Amber. Science 326, 132–134. <u>https://doi.org/10.1126/science.1177539</u>
- Bréhéret, J., 1995. L'Aptien et l'Albien de la fosse vocontienne (des bordures au bassin): évolution de la sédimentation et enseignements sur les évènements anoxiques. Thèse de doctorat, Université François Rabelais Tours, France.
- Breton, G., 2007. La bioaccumulation de microorganismes dans l'ambre : analyse comparée d'un ambre cénomanien et d'un ambre sparnacien, et de leurs tapis algaires et bactériens. Comptes Rendus Palevol 6, 125–133. <u>https://doi.org/10.1016/j.crpv.2006.09.002</u>
- Breton, G., Bilotte, M., Eychenne, G., 2013. L'ambre campanien du Mas d'Azil (Ariège, France) : gisement, microinclusions, taphonomie. Annales de Paléontologie 99, 317–337. <u>https://doi.org/10.1016/j.annpal.2013.06.001</u>
- Bruni, S., Guglielmi, V., 2014. Identification of archaeological triterpenic resins by the non-separative techniques
 FTIR and ¹³C NMR: The case of *Pistacia* resin (mastic) in comparison with frankincense. Spectrochimica
 Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 121, 613–622.
 https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.10.098

- 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. <u>https://doi.org/10.1021/ja00905a036</u>
- Bukejs, A., Bezděk, J., Kairišs, K., Alekseev, V.I., 2021. The first extinct species of *Monolepta* Chevrolat (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae) from Bitterfeld amber, described using X-ray micro-computed tomography. Zootaxa 4995, 345–356. <u>https://doi.org/10.11646/zootaxa.4995.2.7</u>
- Burger, P., 2008. Caractérisation moléculaire de résines végétales archéologiques et actuelles : étude de résines de Diptérocarpacées. Thèse de Doctorat, Université de Strasbourg, France. <u>http://www.theses.fr/2008STR13150</u>
- Burger, J.J., Cuvillier, J., 1946. Les pointements crétacés de Saint-Lon-les-Mines et de Belus (Landes). Bulletin de la Société Géologique de France S5-XVI, 4-6, 323–330. <u>https://doi.org/10.2113/gssgfbull.S5-XVI.4-6.323</u>
- Burger, P., Charrié-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. <u>https://doi.org/10.1007/s12520-010-0050-z</u>
- Buscalioni, A.D., Fregenal-Martinez, M.A., 2010. A holistic approach to the palaeoecology of Las Hoyas Konservat-Lagerstätte (La Huérguina Formation, Lower Cretaceous, Iberian Ranges, Spain)/Una aproximación holística a la palaeoecología del Konservat-Lagerstätte de Las Hoyas (Formación La Huérguina, Cretácico Inferior, Cordillera Ibérica, España). Journal of Iberian Geology 36, 297–326.
- Cannac, M., Barboni, T., Ferrat, L., Bighelli, A., Castola, V., Costa, J., Trecul, D., Morandini, F., Pasqualini, V., 2009. Oleoresin flow and chemical composition of Corsican pine (*Pinus nigra* subsp. laricio) in response to prescribed burnings. Forest Ecology and Management 257, 1247–1254. https://doi.org/10.1016/j.foreco.2008.11.017
- Caputo, R., Mangoni, L., Monaco, P., Palumbo, G., Aynehchi, Y., Bagheri, M., 1978. Triterpenes from the bled resin of *Pistacia vera*. Phytochemistry 17, 815–817. https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)94245-6
- Carde, J. P., C. Bernard-Dagan, and M. Gleizes. 1980. Membrane systems involved in synthesis and transport of monoterpene hydrocarbons in pine leaves. dans: Biogenesis and Function of Plant Lipids, 441–444, P. Mazliak, P. Benveniste, C. Costes and R. Douce (eds.), Elsevier, Amsterdam.
- Cariou, E., Joubert, J. M. ,1989. Carte géologique de la France à 1/50 000: Mirebeau-en-Poitou. Editions du Bureau de Recherches Géologiques et Minières (BRGM), Orléans Cedex 2, France.
- Carman, R., Deeth, H., 1971. Diterpenoids XXVI. A new diterpenoid acid from the oleoresin of *Callitris columellaris*. Australian Journal of Chemistry 24, 353-359. <u>https://doi.org/10.1071/CH9710353</u>
- Carroll, J.F., Tabanca, N., Kramer, M., Elejalde, N.M., Wedge, D.E., Bernier, U.R., Coy, M., Becnel, J.J., Demirci, B., Başer, K.H.C., Zhang, J., Zhang, S., 2011. Essential oils of *Cupressus funebris*, *Juniperus communis*, and *J. chinensis* (Cupressaceae) as repellents against ticks (Acari: Ixodidae) and mosquitoes (Diptera: Culicidae) and as toxicants against mosquitoes. Journal of Vector Ecology 36, 258–268. https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2011.00166.x
- Cartoni, G., Russo, M.V., Spinelli, F., Talarico, F., 2004. GC-MS Characterisation and Identification of Natural Terpenic Resins Employed in Works of Art. Annali di Chimica 94, 767–782. <u>https://doi.org/10.1002/adic.200490098</u>
- Casal, G., 1762. Succini Asturici, a Doctore Gafpar Cafal. Almae Ecle.

- Caspary, R., 1882. Neue fossile Pflanzen der blauen Erde, d. h. des Bernsteins, des Schwarzharzes und des Braunharzes. Schriften der Physikalisch-Ökonomischen Gesellschaft zu Königsberg 22, 22–31.
- Casse, J.-P., 2014. La mine de charbon de Saint-Lon-les-Mines (Landes). Le Mois Scientifique d'Aquitaine 347-348, 1-4. <u>http://www.usaquitaine.fr/wp-content/uploads/mine-st-lon-msa-2014-03-04.pdf</u>
- Cassini, 1723 Mémoire sur l'ambre jaune dans : Traité de la grandeur et de la figure de la terre. de Coup.
- Causey, F., 2011. Amber and the Ancient World. Getty Publications.
- Causey, F., 2020. Ancient Carved Ambers in the J. Paul Getty Museum. Getty Publications.
- Cavoleau, J.A., 1844. Statistique ou description générale du département de la Vendée: annotée et considérablement augmentée par de la Fontenelle de Vaudoré (Ed.). Paris : Dumoulin.
- Chang, T.-L., Mead, T.E., Zinkel, D.F.,1971. Mass spectra of diterpene resin acid methyl esters. Journal of the American Oils' Chemists Society 48, 455–461. <u>https://doi.org/10.1007/BF02544660</u>
- Charles, R.P., Guilaine, J., 1963. Une grotte sépulcrale du bronze moyen en Languedoc : la grotte au collier, commune de Lastours (Aude). Gallia Préhistoire 6, 149–163. <u>https://doi.org/10.3406/galip.1963.1226</u>
- Cheung, H.T., Feng, M.C., 1968. Constituents of Dipterocarpaceae resins. Part I. Triterpene acids of *Dryobalanops* aromatica. Journal of the Chemical Society C: Organic 1047-1051. <u>https://doi.org/10.1039/j39680001047</u>
- Chiavari, G.; Fabbri, D. Mazzeo, R.; Bocchini, P.; Galletti, G. C. 1995a, Pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry of natural resins used for artistic objects. Chromatographia, 41(5-6), 273-281. https://doi.org/10.1007/bf02688040
- Chiavari, G. ; Fabbri, D. ; Galletti, G. C. ; Mazzeo, R. 1995b, Use of analytical pyrolysis to characterize Egyptian painting layers. Chromatographia, 40(9-10), 594-600. <u>https://doi.org/10.1007/bf02290274</u>
- Chiavari, G., Montalbani, S., Otero, V., 2008. Characterisation of varnishes used in violins by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry 22, 3711–3718. https://doi.org/10.1002/rcm.3785
- Clark, K.A., Ikram, S., Evershed, R.P., 2013. Organic chemistry of balms used in the preparation of pharaonic meat mummies. Proceedings of the National Academy of Sciences 110, 20392–20395. https://doi.org/10.1073/pnas.131516011
- Clifford, D.J., Hatcher, P.G., 1995. Structural transformations of polylabdanoid resinites during maturation. Organic Geochemistry 23, 407–418. <u>https://doi.org/10.1016/0146-6380(95)00022-7</u>
- Clifford, D.J., Hatcher, P.G., Botto, R.E., Muntean, J.V., Anderson, K.B., 1999. The nature and fate of natural resins in the geosphere. IX. Organic Geochemistry 30, 635–650. <u>https://doi.org/10.1016/s0146-6380(99)00018-</u> <u>2</u>
- Cline, E.H., 2012. The Oxford Handbook of the Bronze Age Aegean. Oxford University Press.
- Coiffard, C., Gomez, B., Kvacek, J., Thévenard, F., 2006. Early angiosperm ecology: evidence from the Albian-Cenomanian of Europe. Annals of Botany 98, 495–502. <u>https://doi.org/10.1093/aob/mcl125</u>
- Coiffard, C., Gomez, B., Thiébaut, M., Kvaček, J., Thévenard, F., Néraudeau, D., 2009. Intramarginal veined Lauraceae leaves from the Albian–Cenomanian of Charente-Maritime (western France). Palaeontology 52, 323–336. <u>https://doi.org/10.1111/j.1475-4983.2009.00845.x</u>
- Collot, L., 1890. Description du terrain crétacé dans une partie de la Basse-Provence. Bulletin de la Société Géologique de France 18, 49–102.

- Colombini, M.P., Ribechini, E., Rocchi, M., Selleri, P., 2013. Analytical pyrolysis with in-situ silylation, Py(HMDS)-GC/MS, for the chemical characterization of archaeological and historical amber objects. Heritage Science 1, 6. <u>https://doi.org/10.1186/2050-7445-1-6</u>
- Conwentz, H., 1890. Monographie der Baltischen Bersteinbäume. Naturforschende Gesellschaft, Danzig .
- Coquand, H., 1856. Notice sur la formation crétacée du département de la Charente. Bulletin de la Société Géologique de France 14, 55–98.
- Cormier, L.T., Véber, C., Bride, M., et al., 2016. Les nécropoles protohistoriques du massif forestier de Haguenau : synthèse des travaux et ré-étude des collections.
- Cotterrell, G.P., Halsall, T.G., Wriglesworth, M.J., 1970. The chemistry of triterpenes and related compounds. Part XLVII. Clarification of the nature of the tetracyclic triterpene acids of elemi resin. Journal of the Chemical Society C: Organic 5, 739-743. <u>https://doi.org/10.1039/j39700000739</u>
- Couffon, O., 1934. Précis de géologie angevine. Imprimerie centrale. Angers. 1-199
- Couffon, O., 1936. La période Crétacé en Anjou. Revue d'Hydro-géologie Angevine 1, 1-128.
- Couffon, O., Dollfus, G., 1928. A summary of the geology of Maine-et-Loire. Proceedings of the Geologists Association 39, 369–428.
- Courel, B., Adam, P., Schaeffer, P., 2019. The potential of triterpenoids as chemotaxonomic tools to identify and differentiate genuine, adulterated and archaeological balsams. Microchemical Journal 147, 411–421. https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.03.035
- Cox, R.E., Yamamoto, S., Otto, A., Simoneit, B.R.T., 2007. Oxygenated di- and tricyclic diterpenoids of southern hemisphere conifers. Biochemical Systematics and Ecology 35, 342–362. https://doi.org/10.1016/j.bse.2006.09.013
- Crié, L., 1890. Recherches sur les végétaux fossiles de l'île d'Aix (Charente-inférieure). Annales de la Société de Sciences Naturelles de Charente Inférieure (La Rochelle) 26, 231–237.
- Croteau, R., Johnson, M.A., 1985. Biosynthesis of Terpenoid Wood Extractives. In: Higuchi, T. (ed.): Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components. Elsevier, pp. 379–439. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-347880-1.X5001-6
- Croteau, R., 1987. Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. Chemical Reviews 87, 929–954. https://doi.org/10.1021/cr00081a004
- Cuinet, V., 1896. Syrie, Liban et Palestine, géographie administrative, statistique descriptive et raisonnée, Ernest Leroux (ed.), Paris.
- Cunningham, A., Gay, I.D., Oehlschlager, A.C., Langenheim, J.H., 1983. ¹³C NMR and IR analyses of structure, aging and botanical origin of Dominican and Mexican ambers. Phytochemistry 22, 965–968. https://doi.org/10.1016/0031-9422(83)85031-6
- Czechowski, F., Simoneit, B.R.T., Sachanbiński, M., Chojcan, J., Wołowiec, S., 1996. Physicochemical structural characterization of ambers from deposits in Poland. Applied Geochemistry 11, 811–834. https://doi.org/10.1016/s0883-2927(96)00046-7
- da Silva Oliveira, F.G., de Souza Araújo, C., Rolim, L.A., Barbosa-Filho, J.M., da Silva Almeida, J.R.G., 2018. The Genus *Hymenaea* (Fabaceae): A Chemical and Pharmacological Review. In: Studies in Natural Products Chemistry. Elsevier, pp. 339–388. <u>https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64056-7.00012-x</u>
- Damotte, R., Babinot, J.-F., Colin, J.-P., 1981. Les ostracodes du Crétacé moyen Européen. Cretaceous Research 2, 287–306. <u>https://doi.org/10.1016/0195-6671(81)90018-5</u>

- Daviero, V., Gomez, B., Philippe, M., 2001. Uncommon branching pattern within conifers: *Frenelopsis turolensis*, a Spanish Early Cretaceous Cheirolepidiaceae. Canadian Journal of Botany 79, 1400–1408. <u>https://doi.org/10.1139/b01-131</u>
- De Franceschi, D., de Plöeg, G., 2003. Origine de l'ambre des faciès sparnaciens (Eocène inférieur) du Bassin de Paris : le bois de l'arbre producteur. Geodiversitas 4, 633–647. <u>g2003n4a2.pdf</u>
- De Graaf, W., Damsté, J.S.S., de Leeuw, J.W., 1992. Laboratory simulation of natural sulphurization: I. Formation of monomeric and oligomeric isoprenoid polysulphides by low-temperature reactions of inorganic polysulphides with phytol and phytadienes. Geochimica et Cosmochimica Acta 56, 4321–4328. https://doi.org/10.1016/0016-7037(92)90275-N
- De Graaf, W., Sinninghe Damsté, J.S., de Leeuw, J.W., 1995. Low-temperature addition of hydrogen polysulfides to olefins: formation of 2,20-dialkyl polysulfides from alk-1-enes and cyclic (poly)sulfides and polymeric organic sulfur compounds from α,ω-dienes. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 635– 640. https://doi.org/10.1039/P19950000635
- De la Cruz-Cañizares, J., Doménech-Carbó, M.-T., Gimeno-Adelantado, J.-V., Mateo-Castro, R., Bosch-Reig, F., 2005. Study of Burseraceae resins used in binding media and varnishes from artworks by gas chromatography–mass spectrometry and pyrolysis-gas chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1093, 177–194. <u>https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.07.058</u>
- De Lama Valderrama, N., Schaeffer, P., Leprince, A., Schmitt, S., Adam, P., 2022. Novel oxygenated fossil norditerpenoids from Cretaceous amber (South-Western France) as potential markers from Cupressaceae and/or Cheirolepidiaceae. Organic Geochemistry 167, 104372. <u>https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2022.104372</u>
- de Leeuw, J.W., Sinninghe Damsté, J.S., 1990. Organic sulfur compounds and other biomarkers as indicators of palaeosalinity. In: Orr, W. L. et White, C.L. (eds), Geochemistry of Sulfur in Fossil Fuels, ACS Symposium Series. American Chemical Society, pp. 417–443. <u>https://doi.org/10.1021/bk-1990-0429.ch024</u>
- de Navarro, J.M., 1925. Prehistoric Routes between Northern Europe and Italy Defined by the Amber Trade. The Geographical Journal 66, 481-503. <u>https://doi.org/10.2307/1783003</u>
- Dejax, J., Masure, E., 2005. Analyse palynologique de l'argile lignitifère à ambre de l'Albien terminal d'Archingeay (Charente-Maritime, France). Comptes Rendus Palevol 4, 53–65. <u>https://doi.org/10.1016/j.crpv.2004.12.002</u>
- Delbos, J., 1854. Essai d'une description du Bassin de l'Adour, suivi de considérations sur l'âge et le classement des terrains nummulitiques (Rapport), Faculté des Sciences de Paris. France.
- Delclòs, X., Arillo, A., Peñalver, E., Barrón, E., Soriano, C., Valle, R.L.D., Bernárdez, E., Corral, C., Ortuño, V.M., 2007. Fossiliferous amber deposits from the Cretaceous (Albian) of Spain. Comptes Rendus Palevol 6, 135–149. <u>https://doi.org/10.1016/j.crpv.2006.09.003</u>
- Delclòs, X., Peñalver, E., Barrón, E., Peris, D., Grimaldi, D.A., Holz, M., Labandeira, C.C., Saupe, E.E., Scotese, C.R., Solórzano-Kraemer, M.M., Álvarez-Parra, S., Arillo, A., Azar, D., Cadena, E.A., Dal Corso, J., Kvaček, J., Monleón-Getino, A., Nel, A., Peyrot, D., Bueno-Cebollada, C.A., Gallardo, A., González-Fernández, B., Goula, M., Jaramillo, C., Kania-Kłosok, I., López-Del Valle, R., Lozano, R.P., Meléndez, N., Menor-Salván, C., Peña-Kairath, C., Perrichot, V., Rodrigo, A., Sánchez-García, A., Santer, M., Sarto i Monteys, V., Uhl, D., Viejo, J.L., Pérez-de la Fuente, R., 2023. Amber and the Cretaceous resinous interval. Earth-Science Reviews 243, 104486. <u>https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2023.104486</u>
- Delgado Buscalioni, Á., Poyato Ariza, F.J., Marugán Lobón, J., Fregenal Martínez, M.A., Sanisidro, O., Navalón, G., Miguel, C. de, 2016. The wetland of Las Hoyas, 238–253. In: Las Hoyas: A Cretaceous Wetland: A

Multidisciplinary Synthesis after 25 Years of Research on an Exceptional Fossil Lagerstätte from Spain. F.J. Poyato-Ariza and A.D. Buscalioni (eds.), Friedrich Verlag.

- Dénès, F., Pichowicz, M., Povie, G., Renaud, P., 2014. Thiyl radicals in organic synthesis. Chemical Reviews 114, 2587–2693. https://doi.org/10.1021/cr400441m
- Desmaret, M., 1811. Encyclopédie méthodique, ou par ordre de matières: par une société de gens de lettres, de savants et d'artistes, Agasse, H. (ed.), Géographie Physique. Paris.
- Dev, S., 1989. Terpenoids. In: Natural Products of Woody Plants: Chemicals Extraneous to the Lignocellulosic Cell Wall. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 691–807.
- Dewick, P.M., 2002. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. John Wiley & Sons.
- Diaz, M.A., Ourisson, G., Bisset, N.G., 1966. Etudes chimio-taxonomiques dans la famille des diptérocarpacées-I. Phytochemistry 5, 855–863. <u>https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)82782-x</u>
- Diéguez, C., Meléndez, N., 2000. Early Cretaceous ferns from lacustrine limestones at Las Hoyas, Cuenca Province, Spain. Palaeontology 43, 1113–1141. <u>https://doi.org/10.1111/1475-4983.00163</u>
- Dietrich, H.G., 1976. Zur Entstehung von Bernstein Lagerstaetten. II. Bernstein-Lagerstaetten im Libanon. Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie 152, 222–279.
- Dillmann, E., 1961. Nouvelles découvertes protohistoriques de la forêt de Haguenau. Etudes haguenoviennes 3, 71–76.
- Doménech-Carbó, M.T., de la Cruz-Cañizares, J., Osete-Cortina, L., Doménech-Carbó, A., David, H., 2009. Ageing behaviour and analytical characterization of the Jatobá resin collected from *Hymenaea stigonocarpa* Mart. International Journal of Mass Spectrometry 284, 81–92. <u>https://doi.org/10.1016/j.ijms.2008.12.015</u>
- Doyle, J.A., 1978. Origin of angiosperms. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 9, 365–392. https://doi.org/10.1146/annurev.es.09.110178.002053
- Drzewicz, P., Natkaniec-Nowak, L., Czapla, D., 2016. Analytical approaches for studies of fossil resins. TrAC Trends in Analytical Chemistry 85, 75–84. https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.06.022
- Dubey, V. S.; Bhalla, R.; Luthra, R. 2003 An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. Journal Of Biosciences, 28(5), 637-646. <u>https://doi.org/10.1007/bf02703339</u>
- Du Gardin, C., 1986. La parure d'ambre à l'âge du Bronze en France. Bulletin de la Société Préhistorique Française 83, 546–588. <u>https://doi.org/10.3406/bspf.1986.8725</u>
- Dunlop, J.A., Kotthoff, U., Hammel, J.U., Ahrens, J., Harms, D., 2018. Arachnids in Bitterfeld amber: a unique fauna of fossils from the heart of Europe or simply old friends? Evolutionary Systematics 2, 31–44. <u>https://doi.org/10.3897/evolsyst.2.22581</u>
- Duplessis, B., 2006. Le Cénomanien de la carrière du Brouillard (Anjou). Intérêt géologique et pédagogique (Rapport de Master 1), Université d'Angers, France.
- Dupouy-Camet, J., 1947. Observations sur la ride triasique de Belus (Landes). Bulletin de la Société Géologique de France S5-XVII, 503–511. <u>https://doi.org/10.2113/gssgfbull.S5-XVII.7-9.503</u>
- Durand, S., Ters, M., 1958. L'analyse pollinique d'argiles des environs de Challans (Vendée) révèle l'existence d'une flore cénomanienne. Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences 247, 684-686.
- Durand, S., Ters, M., Verger, F., 1963. Sur un nouveau gisement d'argile noire cénomanienne dans le marais de Monts (Vendée) et sa signification paléogéographique. Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences, Paris 257, 1492-1494.

- 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. <u>https://doi.org/10.1016/j.coal.2010.09.006</u>
- Dvořák, Z., 1999. Duxite-Czech fossil amber. Minerál 7, 366-367.
- Eberle, J.J., Greenwood, D.R., 2011. Life at the top of the greenhouse Eocene world-A review of the Eocene flora and vertebrate fauna from Canada's high Arctic. Geological Society of America Bulletin 124, 3–23. <u>https://doi.org/10.1130/b30571.1</u>
- Edgecombe, G.D., Minelli, A., Bonato, L., 2009. A geophilomorph centipede (Chilopoda) from La Buzinie amber (Late Cretaceous, Cenomanian), SW France. Geodiversitas 31, 29–39. <u>https://doi.org/10.5252/g2009n1a3</u>
- Eglinton, T.I., Sinninghe Damsté, J.S., Kohnen, M.E.L., de Leeuw, J.W., 1990. Rapid estimation of the organic sulphur content of kerogens, coals and asphaltenes by pyrolysis-gas chromatography. Fuel 69, 1394–1404. <u>https://doi.org/10.1016/0016-2361(90)90121-6</u>
- Eisenreich, W. ; Bacher, A. ; Arigoni, D. ; Rohdich, F. 2004. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. Cellular And Molecular Life Sciences, 61(12). doi : 10.1007/s00018-004-3381-z.
- Endress, P.K., 2011. Angiosperm ovules: diversity, development, evolution. Annals of Botany 107, 1465–1489. https://doi.org/10.1093/aob/mcr120
- Enzell, C., Appleton, R., Wahlberg, I., 1972. Terpenes and terpenoids. In: Waller, G.R., Demer, O.C. (ed), Biochemical Application of Mass Spectrometry: First Supplementary Volume. Wiley, pp. 311–406.
- Erdtman, H., Kimland, B., Norin, T., Daniels, P.J.L., Paasivirta, J., 1968. The Constituents of the "Pocket Resin" from Douglas Fir *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco. Acta Chemica Scandinavica 22, 938–942. <u>https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.22-0938</u>
- Fattorusso, E., Santacroce, C., Xaasan, C.F., 1983. 4(23)-Dihydroroburic Acid from the resin (incense) of *Boswellia carterii*. Phytochemistry 22, 2868–2869. <u>https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)97720-3</u>
- Feist, M., Lamprecht, I., Müller, F., 2007. Thermal investigations of amber and copal. Thermochimica Acta, XIVth ISBC Proceedings Special Issue 458, 162–170. <u>https://doi.org/10.1016/j.tca.2007.01.029</u>
- Filley, T.R., Freeman, K.H., Wilkin, R.T., Hatcher, P.G., 2002. Biogeochemical controls on reaction of sedimentary organic matter and aqueous sulfides in Holocene sediments of Mud Lake, Florida. Geochimica et Cosmochimica Acta 66, 937-954. <u>https://doi.org/10.1016/S0016-7037(01)00829-8</u>
- Fischer, T.C., Sonibare, O.O., Aschauer, B., Kleine-Benne, E., Braun, P., Meller, B., 2017. Amber from the Alpine Triassic of Lunz (Carnian, Austria): A classical palaeobotanical site. Palaeontology 60, 743–759. <u>https://doi.org/10.1111/pala.12313</u>
- Fleuriau de Bellevue, L.B., 1817. Carte de l'île d'Aix, de l'île d'Enet et de Fouras. Archive de la Société de Sciences Naturelles. Charente-Maritime.
- Fradet, A. 2021. Caractérisation moléculaire d'une angiosperme crétacée Montsechia vidalii et de genres associés. Mémoire de Master 2, Sciences Technologies Santé, Ecole Normale Supérieure de Lyon / Université Claude Bernard Lyon 1, France.
- Fradet, A., Adam, P., Schaeffer, P., Gomez, B. 2023, Amber Diterpenoid Distributions as a Key to Identify Cheirolepidiaceae, an Extinct Major Conifer Family. dans 31st International Meeting on ORGANIC GEOCHEMISTRY (IMOG 2023). European Association of Geoscientists & Engineers.
- Francès, M., 2020. Étude de la mise au point d'un vernis industriel à base de colophane et d'huile végétale. Thèse de Doctorat, Université de Pau et des Pays de l'Adour, France.

- Fregenal-Martínez, M.A., Meléndez, N., 1993. Sedimentología y evolución paleogeográfica de la cubeta de Las Hoyas (Cretácico inferior, Serranía de Cuenca). Cuadernos de Geologia Iberica, 17, 231-256
- Fregenal-Martinez, M.-A., Melendez, N., 1994. Sedimentological analysis of the Lower Cretaceous lithographic limestones of the "Las Hoyas" fossil site (Serrania de Cuenca, Iberian Range, Spain). Geobios 27, 185– 193. <u>https://doi.org/10.1016/S0016-6995(94)80033-2</u>
- Freneix, S., Viaud, J.M., 1983. Bivalves du Sénonien de Vendée (Bassin de Challans-Commequiers). Signification biostratigraphique, paléobiogéographique, paléoécologique. Géologie Méditerranéenne 10, 199–211. <u>https://doi.org/10.3406/geolm.1983.1262</u>
- Frezza, C., Venditti, A., De Vita, D., Toniolo, C., Franceschin, M., Ventrone, A., Tomassini, L., Foddai, S., Guiso, M., Nicoletti, M., Bianco, A., Serafini, M., 2020. Phytochemistry, Chemotaxonomy, and Biological Activities of the Araucariaceae Family—A Review. Plants 9, 888. <u>https://doi.org/10.3390/plants9070888</u>
- Frondel, J.W., 1967. X-Ray Diffraction Study of Fossil Elemis. Nature 215, 1360–1361. https://doi.org/10.1038/2151360a0
- Furhmann, R., Borsdorf, R., 1986. Die Bernsteinarten des Untermiozäns von Bitterfeld. Zeitschrift für angewandte Geologie 32, 309–316.
- García, P.A., de Oliveira, A.B., Batista, R., 2007. Occurrence, biological activities and synthesis of kaurane diterpenes and their glycosides. Molecules 12, 455–483. <u>https://doi.org/10.3390/12030455</u>
- Garrido-Cordero, J.A., Odriozola, C.P., Sousa, A.C., Romero-García, G., Sánchez-Gómez, D., Blanes, J.M.M., Lázarich, M., Zambrana-Vega, M.D., Gonçalves, J.L.V., 2024. Amber provenance as a Chrono-Cultural Proxy: Insights from FTIR analysis in the Iberian Peninsula. Journal of Archaeological Science: Reports 57, 104647. <u>https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2024.104647</u>
- Gelmini, F., Beretta, G., Anselmi, C., Centini, M., Magni, P., Ruscica, M., Cavalchini, A., Maffei Facino, R., 2013.
 GC–MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary in vivo evaluation of its antipsoriatic effect. International Journal of Pharmaceutics 440, 170–178. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.08.021
- Gernandt, D., Arias, C., Terrazas, T., Dugua, X., Willyard, A., 2020. Incorporating fossils into the Pinaceae tree of life [X27058] Morphological Matrix from Gernandt et al., 2018. MorphoBank datasets. <u>https://doi.org/10.7934/x27058</u>
- Gezici, S., 2019. Cancer preventive and neuroprotective potentials of red hulls, kernels and oleo-gum resins from *Pistachio.* International Journal of Agriculture Environment and Food Sciences 3, 137–143. <u>https://doi.org/10.31015/jaefs.2019.3.4</u>
- Gigliarelli, G., Becerra, J., Curini, M., Marcotullio, M., 2015. Chemical Composition and Biological Activities of Fragrant Mexican Copal (*Bursera* spp.). Molecules 20, 22383–22394. <u>https://doi.org/10.3390/molecules201219849</u>
- Girard, V., 2008. Microcénoses des ambres médio-crétacés français. Taphonomie, systématique, paléoécologie et reconstitution du paléoenvironnement. Thèse de Doctorat, Université Rennes 1, France.
- Girard, V., Breton, G., Perrichot, V., Bilotte, M., Le Loeuff, J., Nel, A., Philippe, M., Thevenard, F., 2013. The Cenomanian amber of Fourtou (Aude, Southern France): Taphonomy and palaeoecological implications. Annales de Paléontologie 99, 301–315. <u>https://doi.org/10.1016/j.annpal.2013.06.002</u>
- Girard, V., Néraudeau, D., Breton, G., Morel, N., 2013. Palaeoecology of the Cenomanian amber forest of Sarthe (western France). Geologica Acta 11, 321–330. <u>https://doi.org/10.1344/105.000001873</u>

- Gomez, B., 2002. A new species of *Mirovia* (Coniferales, Miroviaceae) from the Lower Cretaceous of the Iberian Ranges (Spain). Cretaceous Research 23, 761–773. <u>https://doi.org/10.1006/cres.2002.1023</u>
- Gomez, B., Martín-Closas, C., Méon, H., Thévenard, F., Barale, G., 2001. Plant taphonomy and palaeoecology in the lacustrine Uña delta (Late Barremian, Iberian Ranges, Spain). Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 170, 133–148. <u>https://doi.org/10.1016/S0031-0182(01)00232-2</u>
- Gomez, B., Martín–Closas, C., Barale, G., Solé de porta, N., Thévenard, F., Guignard, G., 2002. *Frenelopsis* (Coniferales: Cheirolepidiaceae) and related male organ genera from the Lower Cretaceous of Spain. Palaeontology 45, 997–1036. <u>https://doi.org/10.1111/1475-4983.00273</u>
- Gomez, B., Barale, G., Saad, D., Perrichot, V., 2003. Santonian angiosperm-dominated leaf-assemblage from Piolenc (Vaucluse, Sud-Est de la France). Comptes Rendus Palevol 2, 197–204. <u>https://doi.org/10.1016/S1631-0683(03)00041-1</u>
- Gomez, B., Daviero-Gomez, V., Perrichot, V., Thévenard, F., Coiffard, C., Philippe, M., Néraudeau, D., 2004. Assemblages floristiques de l'Albien-Cénomanien de Charente-Maritime (SO France). Annales de Paléontologie 90, 147–159. <u>https://doi.org/10.1016/j.annpal.2004.03.003</u>
- Gomez, B., Coiffard, C., Dépré, É., Daviero-Gomez, V., Néraudeau, D., 2008. Diversity and histology of a plant litter bed from the Cenomanian of Archingeay–Les Nouillers (southwestern France). Comptes Rendus Palevol 7, 135–144. <u>https://doi.org/10.1016/j.crpv.2007.12.006</u>
- Gomez, B., Daviero-Gomez, V., Coiffard, C., Martín-Closas, C., Dilcher, D.L., 2015. *Montsechia*, an ancient aquatic angiosperm. Proceedings of the National Academy of Sciences 112, 10985–10988. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.1509241112</u>
- Gomez, B., Daviero Gomez, V., Fradet, A., Barral, A., 2018. Plant cuticles from the Albian of El Soplao, Cantabria, Northern Spain. In: 10th European Paleobotany & Palynology Conference, University College Dublin, Ireland, 12-17 August 2018, Abstract book, 245.
- Gomez, B., Daviero-Gomez, V., Coiffard, C., Barral, A., Martín-Closas, C., Dilcher, D.L., 2020. *Montsechia vidalii* from the Barremian of Spain, the earliest known submerged aquatic angiosperm, and its systematic relationship to *Ceratophyllum*. TAXON 69, 1273–1292. <u>https://doi.org/10.1002/tax.12409</u>
- González-Fernández, B., Gutiérrez Claverol, M., Menéndez Casares, E., García Ramos, J.C., 2004. Litoestratigráfica del sector occidental de la cuenca cretácica de Asturias. Trabajos de Geología 24, 43– 80.
- Goodwin, T.W, 1973. Recent developments in the biosynthesis of triterpenes. Recent Advances in Phytochemistry pp. 97-114.
- Göppert, H.R., 1836. Bemerkungen über die Abstammung des Bernsteins. Naturgeschichte und Pharmacognosie 21, 624–625. <u>https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jlac.18370210111</u>
- Göppert, H.R., 1850. Monographie der fossilen Coniferen, Leiden. (ed.)
- Gough, L.J., Mills, J.S., 1972. The Composition of Succinite (Baltic Amber). Nature 239, 527–528. https://doi.org/10.1038/239527a0
- Grantham, P.J., Douglas, A.G., 1980. The nature and origin of sesquiterpenoids in some Tertiary fossil resins. Geochimica et Cosmochimica Acta 44, 1801–1810. <u>https://doi.org/10.1016/0016-7037(80)90229-x</u>
- Gras, S., 1862. Description géologique du département de Vaucluse (Notice), Librairie de la Société Géologique de France, Paris.
- Grimaldi, D., Beck, C.W., Boon, J.J., 1989. Occurrence, chemical characteristics and paleontology of the fossil resins from New Jersey. New York, American Museum of Natural History (publisher), pp. 27.

Grimaldi, D. A. 1996 Amber: Window to the Past ; Abrams

- Grimaldi, D. 2009 Pushing back amber production. Science, 326(5949), 51-52. https://doi.org/10.1126/science.1179328
- Grimalt, J.O., Simoneit, B.R.T., Hatcher, P.G., Nissenbaum, A., 1988. The molecular composition of ambers. Organic Geochemistry 13, 677–690. https://doi.org/10.1016/0146-6380(88)90089-7
- Guelorget, O., Perthuisot, J.P., 1992. Paralic ecosystems Biological organization and functionning. Vie et Milieu/Life & Environment, 215–251.
- Gug, S., Schaeffer, P., Adam, P., Klein, S., Motsch, E., Albrecht, P., 2009. Identification of a sulfide derivative with a bicyclic hydrocarbon skeleton related to squalene. Part I: synthesis of a dithiane triterpenoid. Organic Geochemistry 40, 876–884. <u>https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2009.04.013</u>
- Haidinger, W., 1845. Ubersicht der Resultate Mineralogischer Forschungen im Jahre 1843. Erlangen: Enke.
- Hasegawa, S., Hirose, Y., 1985. Diterpenes from the seed of *Sciadopitys verticillata*. Phytochemistry 24, 2041–2046. <u>https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)83118-0</u>
- Havelcová, M., Sýkorová, I., Bechtel, A., Mach, K., Trejtnarová, H., Žaloudková, M., Matysová, P., Blažek, J.,
 Boudová, J., Sakala, J., 2013. "Stump Horizon" in the Bílina Mine (Most Basin, Czech Republic) GC–
 MS, optical and electron microscopy in identification of wood biological origin. International Journal of Coal
 Geology 107, 62–77. <u>https://doi.org/10.1016/j.coal.2012.09.008</u>
- Havelcová, M., Sýkorová, I., Mach, K., Dvořák, Z., 2014. Organic Geochemistry of Fossil Resins from the Czech Republic. Procedia Earth and Planetary Science 10, 303–312. <u>https://doi.org/10.1016/j.proeps.2014.08.021</u>
- Havelcová, M., Machovič, V., Linhartová, M., Lapčák, L., Přichystal, A., Dvořák, Z., 2016. Vibrational spectroscopy with chromatographic methods in molecular analyses of Moravian amber samples (Czech Republic). Microchemical Journal 128, 153–160. <u>https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.04.010</u>Hegnauer, R., 1986. Chemotaxonomie der Pflanzen. Birkhäuser Basel, Basel.
- Havelcová, M., Machovič, V., Sýkorová, I., Lapčák, L., Špaldoňová, A., Mach, K., Dvořák, Z., 2018. Duxite Fossil resin of Miocene age. Organic Geochemistry 124, 190–204. https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2018.07.014
- Helm, O., 1877. Notizen über die chemische und physikalische Beschaffenheit des Bernsteins. Archiv der Pharmazie 211, 229–246. <u>https://doi.org/10.1002/ardp.18772110304</u>
- Hernandez-Castillo, G.R., Rothwell, G.W., Mapes, G., 2001. Compound pollen cone in a Paleozoic conifer. American Journal of Botany 88, 1139–1142. <u>https://doi.org/10.2307/2657097</u>
- Hoellinger, S., 2021. Les dépôts sédimentaires et les occupations humaines de la Rive Gauche du Mas d'Azil. Etude du sondage Péquart. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse Jean-Jaurès, France.
- Hovaneissian, M. ; Archier, P. ; Mathe, C. ; Vieillescazes, C. Contribution de la chimie analytique à l'étude des exsudats végétaux styrax, storax et benjoin. Comptes Rendus Chimie 2006, 9(9), 1192-1202. https://doi.org.10.1016/j.crci.2005.12.010
- Ioannou, E., Koutsaviti, A., Tzakou, O., Roussis, V., 2014. The genus *Pinus*: a comparative study on the needle essential oil composition of 46 pine species. Phytochemistry Reviews 13, 741–768. https://doi.org/10.1007/s11101-014-9338-4
- Jarry, M., Pallier, C., Bruxelles, L., Bon, F., Lejay, M., Anderson, L., Lacombe, S., Lelouvier, L.-A., Martin, H., Pétillon, J.-M., Potin, Y., Rabanit, M., Simonnet, R., Wattez, J., Arrighi, V., Callède, F., 2017. L'Aurignacien

de la grotte du Mas d'Azil (Ariège): résultats 2011-2016. Bulletin de la Société Préhistorique Française 114, 575–579. <u>https://doi.org/10.2307/44870350</u>

- Jehlička, J., 2012. Resins and Fossil Resins. In: Analytical Archaeometry. The Royal Society of Chemistry, 426– 448.
- Jehlička, J., Jorge Villar, S.E., Edwards, H.G.M., 2004. Fourier transform Raman spectra of Czech and Moravian fossil resins from freshwater sediments. Journal of Raman Spectroscopy 35, 761–767. <u>https://doi.org/10.1002/jrs.1191</u>
- Jensen, M.A., Jelby, M., Jochmann, M., Marshall, C., 2023. Palaeo-coastal and vegetation response to warming a high Arctic – using the Paleogene – Eocene in Svalbard, Arctic Norway as a laboratory for future change. EGU General Assembly 2023, Vienna, Austria, 23–28 Apr 2023, EGU23-12414, https://doi.org/10.5194/egusphere-egu23-12414, 2023.
- Jiang, W., Zhao, Z.Y., Tong, Y.P., Ma, G.L., Zang, Y., Osman, E.E.A., Jin, Z.X., Xiong, J., Li, J., Hu, J.F., 2022.
 Phytochemical and biological studies on rare and endangered plants endemic to China. Part XXV.
 Structurally diverse triterpenoids and diterpenoids from two endangered Pinaceae plants endemic to the Chinese Qinling Mountains and their bioactivities. Phytochemistry 203, 113366.
 https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113366
- Jim-Min, F., Yi-Chien, S., Yu-Hung, C., Yu-Shia, C., 1993. Diterpenes from the bark of *Juniperus chinensis*. Phytochemistry 34, 1581–1584. <u>https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90849-5</u>
- Joly, B., 2008. Aptian and Albian Phylloceratids (Ammonoideae) from the Vocontian Basin (SE France). Carnets de Géologie 4, 1–60.
- Jones, S.O., Reid, E.E., 1938. The addition of sulfur, hydrogen sulfide and mercaptans to unsaturated hydrocarbons. Journal of the American Chemical Society 60, 2452–2455. https://doi.org/10.1021/ja01277a045
- Jones, W., Hill, K., Allen, J., 1995. *Wollemia nobilis*, a new living Australian genus and species in the Araucariaceae. Telopea 6, 173–176. <u>https://doi.org/10.7751/telopea19953014</u>
- Jossang, J., Bel-Kassaoui, H., Jossang, A., Seuleiman, M., Nel, A., 2008. Quesnoin, a novel pentacyclic *ent*diterpene from 55 Million Years Old Oise amber. Journal of Organic Chemistry 73, 412–417. <u>https://doi.org/10.1021/jo701544k</u>.
- Jurasky, K.A., 1940. Pflanzliche Urstoffe der Kohlen. Die Herkunft der in den Kohlen gespeicherten Spannkraft. In: Verständliche Wissenschaft. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 59–71.
- Kaneko, C., Tsuchiya, T., Ishikawai, M., 1963a. Isolation and structure of new diterpenes, dimethylsciadinonate and sciadinone, from *Sciadopitys verticillata*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 11, 271-274. https://doi.org/10.1248/cpb.11.271
- Kaneko, C., Tsuchiya, T., Ishikawai, M., 1963b. Relative configuration of sciadin, dimethylsciadinonate. and sciadinone, and substitution of oxygen in the lactone ring of sciadin with nitrogen. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 11, 1346-1349. <u>https://doi.org/10.1248/cpb.11.1346</u>
- Karlsson, B., Pilotti, A.-M., Söderholm, A.-C., Norin, T., Sundin, S., Sumimoto, M., 1978. The structure and absolute configuration of verticillol, a macrocyclic diterpene alcohol from the wood of *Sciadopitys verticillata* sieb. et zucc. (taxodiaceae). Tetrahedron 34, 2349–2354. <u>https://doi.org/10.1016/0040-4020(78)89049-8</u>
- Kawamura, T., Koshino, H., Nakamura, T., Nagasawa, Y., Nanao, H., Shirai, M., Uesugi, S., Ohno, M., Kimura, K.,
 2018. Amberene and 1-methylamberene, isolated and identified from Kuji amber (Japan). Organic
 Geochemistry 120, 12–18. <u>https://doi.org/10.1016/j.orgqeochem.2018.02.014</u>
- Keeling, C.I., Bohlmann, J., 2006. Diterpene resin acids in conifers. Phytochemistry 67, 2415–2423. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.08.019
- Kennedy, J., Gale Andy, S., Hubert, B., Petrizzo, M., Bown, P., Jenkyns, C., 2017. The Global Boundary Stratotype Section and Point (GSSP) for the base of the Albian Stage, of the Cretaceous, the Col de Pré-Guittard sectop, Arnayon, Dôme, France. Episodes 40, 177-188. <u>10.18814/epiiugs/2017/v40i3/017021</u>
- Kennett, J.P., Stott, L.D., 1991. Abrupt deep-sea warming, palaeoceanographic changes and benthic extinctions at the end of the Palaeocene. Nature 353, 225–229. <u>https://doi.org/10.1038/353225a0</u>
- Kieken, M., Tibault, C., et al., 1975. Carte Géologique de la France à 1/50000, Saint-Vincent-de-Tyrosse (Notice), Bureau des Recherches Géologiques et Minières.
- Kikuchi, T., Watanabe, K., Tochigi, Y., Yamamoto, A., Fukatsu, M., Ezaki, Y., Tanaka, R., Akihisa, T., 2012.
 Melanogenesis Inhibitory Activity of Sesquiterpenes from *Canarium ovatum* Resin in Mouse B16
 Melanoma Cells. Chemistry & Biodiversity 9, 1500–1507. https://doi.org/10.1002/cbdv.201200111
- Kimura, K., Minamikawa, Y., Ogasawara, Y., Yoshida, J., Saitoh, K., Shinden, H., Ye, Y.Q., Takahashi, S., Miyakawa, T., Koshino, H., 2012. Kujigamberol, a new dinorlabdane diterpenoid isolated from 85 million years old Kuji amber using a biotechnological assay. Fitoterapia 83, 907–912. <u>https://doi.org/10.1016/j.fitote.2012.03.024</u>
- Knuth, G., Koch, T., Rappsilber, I., Volland, I., 2002. Concerning amber in the Bitterfeld region geological and genetic aspect. Hallesches Jahrbuch für Geowissenschaften 24, 35–46.
- Koeniguer, J.-C., 1977. Les arbres fossiles du Cénomanien inférieur. Annales de la Societé des Sciences Naturelles. Charente-Maritime, supplément, 59–63.
- Koeniguer, J.-C., 1981. Les milieux forestiers littoraux du Cénomanien inférieur des Charentes. Cretaceous Research 2, 351–352.
- Koeniguer, J.-C., 1992. Les minéralisations des fossiles végétaux. Bulletin de la Société Botanique de France. Actualités Botaniques 139, 57–67. <u>https://doi.org/10.1080/01811789.1992.10827088</u>
- Kohnen, M.E.L., Sinninghe Damsté, J.S., ten Haven, H.L., de Leeuw, J.W., 1989. Early incorporation of polysulphides in sedimentary organic matter. Nature 341, 640–641. <u>https://doi.org/10.1038/341640a0</u>
- Kok, M.D., Rijpstra, W.I.C., Robertson, L., Volkman, J.K., Sinninghe Damsté, J.S., 2000. Early steroid sulfurization in surface sediments of a permanently stratified lake (Ace Lake, Antarctica). Geochimica et Cosmochimica Acta 64, 1425–1436. <u>https://doi.org/10.1016/S0016-7037(99)00430-5</u>
- Konrad, W., Roth-Nebelsick, A., Traiser, C., 2023. High productivity at high latitudes? Photosynthesis and leaf ecophysiology in Arctic forests of the Eocene. Paleoceanography and Paleoclimatology 38, e2023PA004685. <u>https://doi.org/10.1029/2023pa004685</u>
- Kosmowska-Ceranowicz, B., 1999. Succinite and some other fossil resins in Poland and Europe (deposits, finds, features and differences in IRS). Estudios del Museo de Ciencias Naturales de Alava 14, 73–117.
- Kosmowska-Ceranowicz, B., Krumbiegel, G., 1989. Geologie und Geschichte des Bitterfelder Bernsteins und anderer fossiler Harze. Hallesches Jahrbuch für Geowissenschaften 14, 1–25.
- Kosmowska-Ceranowicz, B., Krumbiegel, G., 1990. The Bitterfeld (saxonian) Amber and Other Fossil Resins from the Halle Region. Przegląd Geologiczny 38, 394-400.
- Kosmowska-Ceranowicz, B., Krumbiegel, G., Vávra, N., 1993. Glessite, a Tertiary resin produced by *Burseraceae* angiosperms. Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie Abhandlungen 187, 299–324. <u>https://doi.org/10.1127/njgpa/187/1993/299</u>

- Kosmowska-Ceranowicz, B., Ganzelewki, M., Slotta, R., 1996. Die tertiären und quartiären Bernsteinvorkommen in Polen. In: Bernstein - Tränen Der Götter. Deutsches Bergbau Museum, Bochum., pp. 299–310
- Kosolapov, D., Jáč, P., Riasová, P., Poušková, J., Polášek, M., Nováková, L., 2024. Advances and challenges in the analysis of boswellic acids by separation methods. Critical Reviews in Analytical Chemistry 1–27. <u>https://doi.org/10.1080/10408347.2024.2312502</u>
- Krumbiegel, G., 1990. Duxite, fossil resin. Przegląd Geologiczny 3, 237-239.
- Krumbiegel, G., 1997. Beckerit aus dem Tagebau Goitsche bei Bitterfeld Sachsen-Anhalt, Deutschland. In: Investigations into Amber, Proceedings of the International Interdisciplinary Symposium: Baltic Amber and other Fossil Resins, 2–6 September 1997, Gdansk, 231-239.
- Krumbiegel, G., Krumbiegel, B., 1994. Bernstein: fossile Harze aus aller Welt; Geschichte, Harze, Vorkommen, Gewinnung, Inklusen. Goldschneck-Verlag.
- Kuhlwein, F.L., 1951. Influence of volcanic heat on the rank of Bohemian brown coal. Fuel 30, 25–30.

Kumar, A., Singh, S., Singh, M.K., Gupta, A., Tandon, S., Verma, R.S., 2022. Chemistry, Biological Activities, and Uses of *Araucaria* Resin. In: Murthy, H.N. (eds) Gums, Resins and Latexes of Plant Origin. Reference Series in Phytochemistry. Springer, Cham. <u>https://doi.org/10.1007/978-3-030-91378-6_28</u>

- Kurcharska, A., Kwiatkowska, A., 1978. Research methods for the chemical composition of amber and problems concerning the origin of amber. Prace Muzeum Ziemi Journal 29, 149–156.
- Kvaček Z., Böhme, R., Dvořák, M., Konzalová, P., Early Miocene freshwater and swamp ecosystems of the Most Basin (northern Bohemia) with particular reference to the Bílina Mine section, Journal of the Czech Geological Society 49, issue 1-2, 1 - 40
- Lacroix, A., 1910. Groupe des résines fossiles. Minéral 4, 637-645.
- Lambert, J.B., Frye, J.S., 1982. Carbon functionalities in amber. Science 217, 55–57. https://doi.org/10.1126/science.217.4554.55
- Lambert, J.B., Frye, J.S., Poinar, G.O., 1985. Amber from the Dominican Republic: Analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Archaeometry 27, 43–51. <u>https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.1985.tb00345.x</u>
- Lambert, J.B., Frye, J.S., Lee, T.A., Jr., Welch, C.J., Poinar, G.O., Jr., 1989. Analysis of Mexican amber by carbon-13 NMR spectroscopy. In: Advances in Chemistry. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 381– 388.
- Lambert, J.B., Johnson, S.C., Poinar, G.O., 1996. Nuclear magnetic resonance characterization of Cretaceous amber. Archaeometry 38, 325–335. <u>https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.1996.tb00780.x</u>
- Lambert J. B., Poinar G. O., Jr., 2002a. Amber the organic gemstone. Accounts of Chemical Research 35, 628 636. <u>https://doi.org/10.1021/ar0001970</u>
- Lampert, C.D., Glover, I.C., Heron, C.P., Stern, B., Shoocongdej, R., Thompson, G.B., 2002b. Characterization and radiocarbon dating of archaeological resins from southeast. dans: ACS Symposium Series. 831. 10.1021/bk-2002-0831.ch007.
- Lambert, J.B., Wu, Y., Santiago-Blay, J.A., 2005. Taxonomic and chemical relationships revealed by nuclear magnetic resonance spectra of plant exudates. Journal of Natural Products 68, 635–648. <u>https://doi.org/10.1021/np050005f</u>
- Lambert, J.B., Santiago-Blay, J.A., Anderson, K.B., 2008. Chemical signatures of fossilized resins and recent plant exudates. Angewandte Chemie International Edition 47, 9608–9616. <u>https://doi.org/10.1002/anie.200705973</u>

- Lange, B. M.; Wildung, M. R.; McCaskill, D.; Croteau, R. 1998 A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. Proceedings Of The National Academy Of Sciences, 95(5), 2100-2104. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2100</u>
- Langenheim, J.H., 1964. Present Status of Botanical Studies of Ambers. Botanical Museum leaflets, Harvard University 20, 225–288. <u>https://doi.org/10.5962/p.295189</u>
- Langenheim, J.H., 1969. Amber: A Botanical Inquiry: Amber provides an evolutionary framework for interdisciplinary studies of resin-secreting plants. Science 163, 1157-1169. <u>https://doi.org/10.1126/science.163.3872.1157</u>
- Langenheim, J.H., 2003. Plant Resins: Chemistry, Evolution, Ecology, and Ethnobotany. Portland, Cambridge: Timber Press
- Langenheim, J.H., Beck, C.W., 1965. Infrared spectra as a means of determining botanical sources of amber. Science 149, 52–55. <u>https://doi.org/10.1126/science.149.3679.52</u>
- Langenheim, J.H., Beck, C.W., 1968. Catalogue of infrared spectra of fossil resins (ambers) in North and South America. Botanical Museum leaflets, Harvard University 22, 65–120. <u>https://doi.org/10.5962/p.168367</u>
- Lattuati-Derieux, A., Gomes, S., Tirat, S., Thao-Heu, S., Echard, J.P., 2014. New insights into molecular evolution of oil/colophony varnishes: towards pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry-based quantitation. e-Preservation Science 11, 54-63.
- Larousse, 2024. Ambre. Dans Dictionnaire.
- Larsson, S. G. 1978. Baltic Amber a Paleobiological Study. Scandinavian Science Press, Klampenburg, Denmark
- Lavoisier, A.L., 1765. Sur des morceaux de succin ou ambre jaune qui se trouvent dans une fouille aux environs de Dangu. Ministère de l'Instruction Publique, Imprimerie Nationale.
- Le Métayer, P., Schaeffer, P., Adam, P., Albrecht, P., Roussé, S., Duringer, P., 2008. An unprecedented condensation pathway leading to the formation of phenolic C₄₀ *bis*-diterpenoids in sediments from the Lower Oligocene of the Rhine Rift Valley. Organic Geochemistry 39, 658–675. https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2008.02.020
- Legrand, J., Viaud, J.M., Pons, D., 2006. Upper Cretaceous woody structures and associated microfloral data from Western France. In: International Organisation of Paleobotany. 7th European Paleobotany-Palynology Conference, Prague, p.80.
- Legroux, O., 1979. Etude palynologique de quelques échantillons de terrain du Crétacé supérieur d'Aquitaine Est, Rapport interne SNEAP, 11p.
- Lenen, L., 2022. Identification d'une nouvelle série de diterpènes fossiles soufrés isolés à partir d'ambre du Crétacé. Mémoire de Master 1 "Chimie, Biologie et Médicament", Université de Strasbourg, France.
- Lenen, L., Fradet, A., Schaeffer, P., Gomez, B., Adam, P., 2023. Sulfurized diterpenoids in amber as diagenetic indicators of sulfate-reducing processes in past depositional environments. Organic & Biomolecular Chemistry 21, 768–774. <u>https://doi.org/10.1039/d2ob02017c</u>
- LePage, B.A., Basinger, J.F., 1995. Evolutionary history of the genus *Pseudolarix* Gordon (Pinaceae). International Journal of Plant Sciences 156, 910–950. <u>https://doi.org/10.1086/297313</u>
- LeTouzé de Longuemar, M.A., 1866. Etudes géologiques et agronomiques sur le département de la Vienne. Imprimerie de A.Dupré, Poitiers.
- Lin, C.-P., Huang, J.-P., Wu, C.-S., Hsu, C.-Y., Chaw, S.-M., 2010. Comparative chloroplast genomics reveals the evolution of Pinaceae genera and subfamilies. Genome Biology and Evolution 2, 504–517. https://doi.org/10.1093/gbe/evq036

- Lu, Y., Hautevelle, Y., Michels, R., 2013. Determination of the molecular signature of fossil conifers by experimental palaeochemotaxonomy Part 1: The Araucariaceae family. Biogeosciences 10, 1943–1962. https://doi.org/10.5194/bg-10-1943-2013
- Lucero-Gómez, P., Mathe, C., Vieillescazes, C., Bucio, L., Belio, I., Vega, R., 2014. Analysis of Mexican reference standards for *Bursera spp*. resins by Gas Chromatography–Mass Spectrometry and application to archaeological objects. Journal of Archaeological Science 41, 679–690. <u>https://doi.org/10.1016/j.jas.2013.07.021</u>
- 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. <u>https://doi.org/10.1016/j.coal.2009.07.015</u>
- McCaskill, D. ; Croteau, R. 1998. Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants. Trends In Biotechnology, 16(8), 349-355. doi : 10.1016/s0167-7799(98)01231-1.
- Maffi, D., Maffi, S., 1992. Le più antiche ambre delle Alpi. Paleocronache 1, 39-48.
- Maksoud, S., Azar, D., 2020. Lebanese amber: latest updates. Palaeoentomology 3, 125–155. https://doi.org/10.11646/palaeoentomology.3.2.2
- Maksoud, S., Azar, D., Granier, B., Gèze, R., 2017. New data on the age of the Lower Cretaceous amber outcrops of Lebanon. Palaeoworld 26, 331–338. <u>https://doi.org/10.1016/j.palwor.2016.03.003</u>
- Malartre, F., 1994. Stratigraphie séquentielle du Crétacé supérieur du Bassin vocontien occidental (Sud-Est France). Comparaison avec d'autres bassins. Travaux et Documents des laboratoires de Géologie de Lyon 131, pp. 219.
- Mangoni, L., Caputo, R., 1967. Sempervirol, a novel type of diterpene phenol. Tetrahedron Letters 8, 673–675. https://doi.org/10.1016/s0040-4039(00)90571-9
- Mann, J., 1994. Terpenoids and steroids—the isoprenoids. In : Chemical Aspects of Biosynthesis. Oxford University Press.
- Marchand-Geneste, N. ; Carpy, A. 2003. Theoretical study of the thermal degradation pathways of abietane skeleton diterpenoids: aromatization to retene. Journal Of Molecular Structure THEOCHEM, 635(1-3), 55-82. <u>https://doi.org/10.1016/s0166-1280(03)00401-9</u>
- Martin, V.J., Yu, Z., Mohn, W.W., 1999. Recent advances in understanding resin acid biodegradation: microbial diversity and metabolism. Archives of Microbiology 172, 131-138. <u>https://doi.org/10.1007/s002030050752</u>
- Martínez-Torres, L.M., Alonso-Ramírez, J., 2003. Geología de los Yacimientos de ámbar aptiense de Peñacerrada (Alava, Cuenca Vasco-Cantábrica). Studios del Museo de Ciencias Naturales de Alava 14, 7–21.
- Martínez-Torres, L.M., Alonso, J., Valle, J.M., 2011. The Upper Aptian–Lower Albian amber deposit of the Peñacerrada II geosite (Basque–Cantabrian Basin, Northern Spain): Geological context and protection. Geoheritage 3, 55–61. <u>https://doi.org/10.1007/s12371-010-0030-9</u>
- Martínez, M.A.F., Meléndez, N., 2000. The lacustrine fossiliferous deposits of the Las Hoyas subbasin (Lower Cretaceous, Serranía de Cuenca, Iberian Ranges, Spain). In: Gierlowski-Kordesch, E.H., Kelts, K.R. (Eds.), Lake Basins Through Space and Time. American Association of Petroleum Geologists, pp. 303-313. <u>https://doi.org/10.1306/St46706C25</u>
- Mastalerz, M., Zodrow, E.L., 2022. Note on the discovery of Carboniferous amber associated with the seed fern *Linopteris obliqua*, Sydney Coalfield, Nova Scotia, Canada. Atlantic Geoscience 58, 147–153. <u>https://doi.org/10.4138/atlgeo.2022.006</u>

- Matys Grygar, T., Mach, K., Schnabl, P., Pruner, P., Laurin, J., Martinez, M., 2014. A lacustrine record of the early stage of the Miocene Climatic Optimum in Central Europe from the Most Basin, Ohře (Eger) Graben, Czech Republic. Geological Magazine 151, 1013–1033. <u>https://doi.org/10.1017/s0016756813001052</u>
- Maury-Lechon, G., Curtet, L., 1998. Biogeography and evolutionary systematics of Dipterocarpaceae. In : A review of dipterocarps: taxonomy, ecology and silviculture, 5-44.
- Mazliak, P., 2010. L'évolution chez les végétaux : des bactéries aux arbres et aux plantes à fleurs. Inflexions. Vuibert, Paris.
- McCoy, V.E., Barthel, H.J., Boom, A., Peñalver, E., Delclòs, X., Solórzano-Kraemer, M.M., 2021. Volatile and semivolatile compositions of Cretaceous amber. Cretaceous Research 127, 104958. <u>https://doi.org/10.1016/j.cretres.2021.104958</u>
- McCoy, V.E., Boom, A., Solórzano Kraemer, M.M., Gabbott, S.E., 2017. The chemistry of American and African amber, copal, and resin from the genus *Hymenaea*. Organic Geochemistry 113, 43-54. https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2017.08.005
- McDonald, A.H., 1940. The study of the ancient background of history. Historical Studies: Australia and New Zealand 1, 4-20. <u>https://doi.org/10.1080/10314614008594771</u>
- Médus, J., 1970a. Une analyse morphologique de quelques populations polliniques du Santonien de Piolenc (France). Paleontographica B 130, 1–11.
- Médus, J., 1970b. Contribution à la connaissance des associations polliniques du Crétacé terminal dans le Sud-Est de la France et le Nord-Est de l'Espagne. Revue de Micropaléontologie 13, 45–50.
- Mendes, M.M., Dinis, J.L., Gomez, B., Pais, J., 2010. Reassessment of the cheirolepidiaceous conifer *Frenelopsis teixeirae* Alvin et Pais from the Early Cretaceous (Hauterivian) of Portugal and palaeoenvironmental considerations. Review of Palaeobotany and Palynology 161, 30–42. https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2010.03.002
- Mennessier, G., 1949. Sur la présence de rudistes dans un sédiment hautement ligniteux à Piolenc. Comptes Rendus Sommaires des Séances de la Société Géologiques de France 19, 215–217.
- Mennessier, G., 1950. Monographie géologique du Massif d'Uchaux (Vaucluse). Bulletin du Service de la Carte Géologique de la France 48, 1-50.
- Menor-Salván, C., Najarro, M., Rosales, I., Velasco, F., Tornos, F., 2009. Quimiotaxonomía y origen botánico del ámbar de El Soplao (Cantabria, España). Macla 11, 123–124.
- Menor-Salván, C., Najarro, M., Velasco, F., Rosales, I., Tornos, F., Simoneit, B.R.T., 2010. Terpenoids in extracts of Lower Cretaceous ambers from the Basque-Cantabrian Basin (El Soplao, Cantabria, Spain): Paleochemotaxonomic aspects. Organic Geochemistry 41, 1089–1103. https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2010.06.013
- Menor-Salván, C., Simoneit, B.R.T., Ruiz-Bermejo, M., Alonso, J., 2016. The molecular composition of Cretaceous ambers: Identification and chemosystematic relevance of 1,6-dimethyl-5-alkyltetralins and related bisnorlabdane biomarkers. Organic Geochemistry 93, 7–21. <u>https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2015.12.010</u>
- Mills, J.S., 1973. Diterpenes of *Larix* oleoresins. Phytochemistry 12, 2407–2412. <u>https://doi.org/10.1016/0031-9422(73)80447-9</u>
- Mills, J.S., 1973. Identity of daniellic acid with illurinic acid. Phytochemistry 12, 2479–2480. https://doi.org/10.1016/0031-9422(73)80457-1

- Mills, J.S., White, R., 1977. Natural resins of art and archaeology their sources, chemistry, and identification. Studies in Conservation 22, 12–31. <u>https://doi.org/10.1179/sic.1977.003</u>
- Mills, J.S., White, R., Gough, L.J., 1984. The chemical composition of Baltic amber. Chemical Geology 47, 15–39. https://doi.org/10.1016/0009-2541(84)90097-4
- Mills, J. S., and R. White. 1994. Natural resins and lacquers. dans: The Organic Chemistry of Museum Objects, ed. 2, 95–128. Butterworth Heinemann, London
- Mirov, N.T., 1961. Composition of Gum Turpentines of Pines. Agriculture Forest Service Technical Bulletin 1239, pp. 158.
- Moncel, M.-H., Fröhlich, F., 2009. L'homme et le précieux : matières minérales précieuses. British Archaeological Reports Oxford Limited.
- Moore, M.J., Bell, C.D., Soltis, P.S., Soltis, D.E., 2007. Using plastid genome-scale data to resolve enigmatic relationships among basal angiosperms. Proceedings of the National Academy of Sciences 104, 19363– 19368. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.0708072104</u>
- Moore, T.S., 2018. Lipid metabolism in plants. CRC Press. https://doi.org/10.1201/9781351074070
- Morayma Solórzano Kraemer, M., 2007. Systematic, palaeoecology, and palaeobiogeography of the insect fauna from Mexican amber. Palaeontographica Abteilung A Band 282 Lieferung 1-6, 1–133. https://doi.org/10.1127/pala/282/2007/1
- Moreau, J.-D., Néraudeau, D., Perrichot, V., Tafforeau, P., 2017a. 100-million-year-old conifer tissues from the mid-Cretaceous amber of Charente (western France) revealed by synchrotron microtomography. Annals of Botany 119, 117–128. <u>https://doi.org/10.1093/aob/mcw225</u>
- Moreau, J.-D., Néraudeau, D., Philippe, M., Dépré, É., 2017b. Albian flora from Archingeay-Les Nouillers (Charente-Maritime): comparison and synthesis of Cretaceous meso- and macro-remains from the Aquitaine Basin (southwestern France). Geodiversitas 39, 729–740. <u>https://doi.org/10.5252/g2017n4a5</u>
- Moreau, P., 1976. Cadre stratigraphique et rythmes sédimentaires du Cénomanien nord-Aquitain (région de Rochefort). Bulletin de la Société Géologique de France S7-XVIII, 747–755. https://doi.org/10.2113/gssgfbull.S7-XVIII.3.747
- Moreau, P., 1996. Analyse de la transgression cénomanienne sur la bordure nord-occidentale du Bassin de l'Aquitaine. Géologie de la France 1, 3–16.
- Mosini, V., Samperi, R., 1985. Correlations between Baltic amber and *Pinus* resins. Phytochemistry 24, 859–861. https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)84910-9
- Mukherjee, A.J., Roßberger, E., James, M.A., Pfälzner, P., Higgitt, C.L., White, R., Peggie, D.A., Azar, D., Evershed, R.P., 2008. The Qatna lion: scientific confirmation of Baltic amber in late Bronze Age Syria. Antiquity 82, 49–59. <u>https://doi.org/10.1017/s0003598x00096435</u>
- Murchison, D.G., Jones, J.M., 1964. Resinite in bituminous coals. U. Colombo, G.D. Hobson (Eds.), Advances in Organic Geochemistry 1962, Monograph No. 15, Earth Sci. Series, Pergamon Press, Oxford, pp. 49-69.
- Murillo-Barroso, M., Martinón-Torres, M., 2012. Amber Sources and Trade in the Prehistory of the Iberian Peninsula. European Journal of Archaeology 15, 187–216. <u>https://doi.org/10.1179/1461957112y.0000000009</u>
- Murillo-Barroso, M., Peñalver, E., Bueno, P., Barroso, R., de Balbín, R., Martinón-Torres, M., 2018. Amber in prehistoric Iberia: New data and a review. PLOS ONE 13, e0202235. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202235
- Nacoulma, A.P., Compaoré, M., Meda, N.-B.R., Pottier, L., Megalizzi, V., Some, I., Kiendrebeogo, M., 2021. Antimelanogenesis effect of daniellic acid isolated from *Daniellia oliveri* (Rolfe) Hutch & Dalziel (Leguminosae)

Oleoresin of Burkina Faso. Open Journal of Medicinal Chemistry 11, 41–57. https://doi.org/10.4236/ojmc.2021.114004

- Najarro, M., Peñalver, E., Pérez-de la Fuente, R., Ortega-blanco, J., Menor-salván, C., Barrón, E., Soriano, C., Rosales, I., López del Valle, R., Velasco, F., Tornos, F., Daviero-gomez, V., Gomez, B., Delclòs, X., 2010.
 Review of the El Soplao Amber outcrop, early cretaceous of Cantabria, Spain. Acta Geologica Sinica -English Edition 84, 959–976. <u>https://doi.org/10.1111/j.1755-6724.2010.00258.x</u>
- Nam, A. M., Paoli, M., Castola, V., Casanova, J., & Bighelli, A. 2011. Identification and quantitative determination of lignans in Cedrus atlantica resins using 13C NMR spectroscopy. Natural Product Communications, 6(3), 1934578X1100600316.
- Neale, D.B., Wheeler, N.C., 2019. The Conifers. In: The Conifers: Genomes, Variation and Evolution. Springer Cham, pp. 1–21.
- Nel, A., Perrault, G., Néraudeau, D., 2004. The oldest ant in the Lower Cretaceous amber of Charente-Maritime (SW France) (Insecta: Hymenoptera: Formicidae). Geologica Acta: An International Earth Science Journal 2, 23–30.
- Nel, A., de Plöeg, G., Dejax, J., Dutheil, D., de Franceschi, D., Gheerbrant, E., Godinot, M., Hervet, S., Menier, J.-J., Augé, M., Bignot, G., Cavagnetto, C., Duffaud, S., Gaudant, J., Hua, S., Jossang, A., de Lapparent de Broin, F., Pozzi, J.-P., Paicheler, J.-C., Beuchet, F., Rage, J.-C., 1999. Un gisement sparnacien exceptionnel à plantes, arthropodes et vertébrés (Éocène basal, MP7): Le Quesnoy (Oise, France). Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Series IIA Earth and Planetary Science 329, 65–72. https://doi.org/10.1016/S1251-8050(99)80229-8
- Nel, A., Ploëg, G., Menier, J.-J., Waller, A., 2004. The French ambers: a general conspectus and the lowermost Eocene amber deposit of Le Quesnoy in the Paris Basin. Geologica Acta: an International Earth Science Journal 2, 1695–6133.
- Néraudeau, D., 2008. Les lignites à ambre de l'archipel charentais. Bulletin de l'AMARAI 21, 5–15.
- Néraudeau, D., Moreau, P., 1989. Paléoécologie et paléobiogéographie des faunes d'échinides du Cénomanien nord-aquitain (Charente-Maritime, France). Geobios 22, 293–324. <u>https://doi.org/10.1016/S0016-6995(89)80134-2</u>
- Néraudeau, D., Perrichot, V., Dejax, J., Masure, E., Nel, A., Philippe, M., Moreau, P., Guillocheau, F., Guyot, T., 2002. Un nouveau gisement à ambre insectifère et à végétaux (Albien terminal probable) : Archingeay (Charente-Maritime, France). Geobios 35, 233–240. <u>https://doi.org/10.1016/S0016-6995(02)00024-4</u>
- Néraudeau, D., Allain, R., Perrichot, V., Videt, B., de Broin, F. de L., Guillocheau, F., Philippe, M., Rage, J.-C., Vullo, R., 2003. Découverte d'un dépôt paralique à bois fossiles, ambre insectifère et restes d'*Iguanodontidae* (Dinosauria, Ornithopoda) dans le Cénomanien inférieur de Fouras (Charente-Maritime, Sud-Ouest de la France). Comptes Rendus Palevol 2, 221–230. <u>https://doi.org/10.1016/S1631-0683(03)00032-0</u>
- Néraudeau, D., Vullo, R., Gomez, B., Perrichot, V., Videt, B., 2005. Stratigraphie et paléontologie (plantes, vertébrés) de la série paralique Albien terminal–Cénomanien basal de Tonnay-Charente (Charente-Maritime, France). Comptes Rendus Palevol 4, 79–93. <u>https://doi.org/10.1016/j.crpv.2004.11.008</u>
- Néraudeau, D., Perrichot, V., Colin, J.-P., Girard, V., Gomez, B., Guillocheau, F., Masure, E., Peyrot, D., Tostain,
 F., Videt, B., Vullo, R., 2008. A new amber deposit from the Cretaceous (uppermost Albian-lowermost Cenomanian) of southwestern France. Cretaceous Research 29, 925–929.
 https://doi.org/10.1016/j.cretres.2008.05.009

- Néraudeau, D., Vullo, R., Gomez, B., Girard, V., Lak, M., Videt, B., Dépré, É., Perrichot, V., 2009. Amber, plant and vertebrate fossils from the Lower Cenomanian paralic facies of Aix Island (Charente-Maritime, SW France). Geodiversitas 31, 13–27. <u>https://doi.org/10.5252/g2009n1a2</u>
- Néraudeau, D., Redois, F., Ballèvre, M., Duplessis, B., Girard, V., Gomez, B., Daviero-Gomez, V., Mellier, B., Perrichot, V., 2013. L'ambre cénomanien d'Anjou : stratigraphie et paléontologie des carrières du Brouillard et de Hucheloup (Ecouflant, Maine-et-Loire). Annales de Paléontologie 99, 361–374. <u>https://doi.org/10.1016/j.annpal.2013.10.001</u>
- Néraudeau, D., Perrichot, V., Batten, D.J., Boura, A., Girard, V., Jeanneau, L., Nohra, Y.A., Polette, F., Saint Martin, S.S., Saint Martin, J.-P., Thomas, R., 2017. Upper Cretaceous amber from Vendée, north-western France: Age dating and geological, chemical, and palaeontological characteristics. Cretaceous Research 70, 77– 95. <u>https://doi.org/10.1016/j.cretres.2016.10.001</u>
- Néraudeau, D., Saint Martin, J.-P., Saint Martin, S., Jeanneau, L., Moreau, J.-D., Marc, P., Polette, F., Gendry, D., Brunet, J., Tréguier, J., 2020a. Amber- and plant-bearing deposits from the Cenomanian of Neau (Mayenne, France). Bulletin de la Société Géologique de France 191, 39, pp. 19. <u>https://doi.org/10.1051/bsgf/2020039</u>
- Néraudeau, D., Vullo, R., Bénéfice, P., Breton, G., Dépré, É., Gaspard, D., Girard, V., Le Couls, M., Moreau, J.-D.,
 Nel, A., Perrichot, V., Solórzano-Kraemer, M.M., Wappler, T., 2020b. The paralic Albian–Cenomanian
 Puy-Puy Lagerstätte (Aquitaine Basin, France): An overview and new data. Cretaceous Research 111, 104124. https://doi.org/10.1016/j.cretres.2019.03.022
- Nguyen Tu, T.T., Derenne, S., Largeau, C., Mariotti, A., Bocherens, H., Pons, D., 2000. Effects of fungal infection on lipid extract composition of higher plant remains: comparison of shoots of a Cenomanian conifer, uninfected and infected by extinct fungi. Organic Geochemistry 31, 1743–1754. https://doi.org/10.1016/S0146-6380(00)00077-2
- Niitsu, A. L., Bornhofen, E., Bergonci, T., 2022. Biosynthesis of terpenoids by plants. In Terpenoids: Recent Advances in Extraction, Biochemistry and Biotechnology (pp. 1–16). Bentham Science publishers <u>http://dx.doi.org/10.2174/9781681089645122010003</u>
- Nogueira, R.T., Shepherd, G.J., Laverde Jr, A., Marsaioli, A.J., Imamura, P.M., 2001. Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. Phytochemistry 58, 1153–1157. <u>https://doi.org/10.1016/s0031-9422(01)00303-x</u>
- Noetling, F. (1883). Ueber das Alter der samländischen Tertiärformation. Zeitschrift der deutschen geologischen Gesellschaft, 671-694.
- Noetling, F. (1885). Die Fauna des samländischen Tertiärs (No. 3). dans Commission bei der S. Schropp'schen Hoflandkartenhandlung (JH Neumann).
- Nohra, Y., Azar, D., Gèze, R., Maksoud, S., El-Samrani, A., Perrichot, V., 2013. New Jurassic amber outcrops from Lebanon. Terrestrial Arthropods Review 6, 27-51. <u>https://doi.org/10.1163/18749836-06021056</u>
- Nohra, Y., Perrichot, V., Gèze, R., Azar, D., 2014. Lebanese Jurassic versus Cretaceous amber: Chemical characterization. In: 20th LAAS International Science Conference.
- Nohra, Y.A., Perrichot, V., Jeanneau, L., Le Pollès, L., Azar, D., 2015. Chemical characterization and botanical origin of French ambers. Journal of Natural Products 78, 1284–1293. <u>https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00093</u>
- Norin, T., 1972. Some aspects of the chemistry of the order Pinales. Phytochemistry 11, 1231–1242. https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)90069-4

- Nosova, N., Kiritchkova, A., 2015. New data on the Mesozoic conifer genus *Sciadopityoides Sveshnikova* (Miroviaceae). Review of Palaeobotany and Palynology 221, 1–21. <u>https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2015.04.011</u>
- Odriozola, C.P., Garrido Cordero, J.Á., Daura, J., Sanz, M., Martínez-Blanes, J.M., Avilés, M.Á., 2019. Amber imitation? Two unusual cases of Pinus resin-coated beads in Iberian Late Prehistory (3rd and 2nd millennia BC). PLOS ONE 14, e0215469. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215469</u>
- Onoratini, G., Guilliano, M., Asia, L., Mille, G., Simon, P., 2009. L'ambre dans le sud-est de la France, ressources géologiques et utilisation archéologique. Bulletin du Musée d'Anthropologie Préhistorique de Monaco 49,3–20.
- Oros, D.R., Simoneit, B.R.T., 2000. Identification and emission rates of molecular tracers in coal smoke particulate matter. Fuel 79, 515–536. <u>https://doi.org/10.1016/s0016-2361(99)00153-2</u>
- Osete-Cortina, L., Doménech-Carbó, M.T., Mateo-Castro, R., Gimeno-Adelantado, J.V., Bosch-Reig, F., 2004. Identification of diterpenes in canvas painting varnishes by gas chromatography–mass spectrometry with combined derivatisation. Journal of Chromatography A 1024, 187–194. <u>https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.10.066</u>
- Ospina-ostios, L.M., Ragusa, J., Wernli, R., Kindler, P., 2013. Planktonic foraminifer biostratigraphy as a tool in constraining the timing of flysch deposition: Gurnigel flysch, Voirons massif (Haute-Savoie, France). Sedimentology 60, 225–238. <u>https://doi.org/10.1111/sed.12013</u>
- Otto, A., Wilde, V., 2001. Sesqui-, di-, and triterpenoids as chemosystematic markers in extant conifers—A review. The Botanical Review 67, 141–238. <u>https://doi.org/10.1007/bf02858076</u>
- Otto, A., Simoneit, B.R.T., Lesiak, M., Wilde, V., Worobiec, G., 2001. Resin and wax biomarkers preserved in Miocene *Cupressaceae* s.l. from Belchatow and Lipnica Wielka, Poland. Acta Palaeobotanica 41, 195-206.
- 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. https://doi.org/10.1016/S0034-6667(02)00072-6
- 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. https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2007.00638.x
- Ourisson, G., Bisset, N.G., Diaz, M.A., Ehret, Ch., Palmade, M., Pesnelle, P., Streith, J., 1965. Etudes chimiotaxonomiques dans la famille des Diptérocarpacées. Bulletin de la Société Botanique de France 112, 141– 142. <u>https://doi.org/10.1080/00378941.1965.10838293</u>
- Ovid, 1802. Les Métamorphoses d'Ovide. Eustache Davbin
- Pańczak, J., Kosakowski, P., Drzewicz, P., Zakrzewski, A., 2024. Fossil resins A chemotaxonomical overview. Earth-Science Reviews 252, 104734. <u>https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2024.104734</u>
- Pant, P., Rastogi, R., 1979. The triterpenoids. Phytochemistry 18, 1095–1108. <u>https://doi.org/10.1016/0031-9422(79)80115-6</u>
- Pastorova, I., 1997. Chemically linking past and present: comparative studies of chars and resins. PhD Thesis, University of Amsterdam, Pays-Bas.
- 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. <u>https://doi.org/10.1016/s0146-6380(98)00068-0</u>

- Paul, M., Brüning, G., Bergmann, J., Jauch, J., 2011. A Thin-layer Chromatography Method for the identification of three different olibanum resins (*Boswellia serrata, Boswellia papyrifera* and *Boswellia carterii*, respectively, *Boswellia sacra*). Phytochemical Analysis 23, 184–189. <u>https://doi.org/10.1002/pca.1341</u>
- Peñalver E, Delclos D., 2010. Spanish amber. In: Biodiversity of fossils in amber from the major world deposits. Penney (ed.), Siri Scientific Press Manchester, chapter 13, 236-270.
- Peñalver, E., Martínez-Delclòs, X., Arillo, A., 2022. Yacimientos con insectos fósiles en España. Spanish Journal of Palaeontology 14, 231–245. <u>https://doi.org/10.7203/sjp.23796</u>
- Peñalver, E., Ortega-Blanco, J., Nel, A., Delclòs, X., 2010. Mesozoic *Evaniidae* (Insecta: Hymenoptera) in spanish amber: Reanalysis of the phylogeny of the *Evanioidea*. Acta Geologica Sinica - English Edition 84, 809– 827. <u>https://doi.org/10.1111/j.1755-6724.2010.00257.x</u>
- Penney and Green, 2010. Introduction, Preparation, Study & conservation of amber inclusions. Dans: Biodiversity of fossils in amber from the major world deposits, Penney, Siri Scientific Press, Manchester, UK.
- Péquart, M., Péquart, S.J., 1941. Nouvelles découvertes à la grotte du Mas d'Azil. Bulletins et Mémoires de la Société d'Anthropologie de Paris 2, 128–130. <u>https://doi.org/10.3406/bmsap.1941.2776</u>
- Péquart, S.J., Péquart, M.L.N., 1960. Grotte du Mas d'Azil (Ariège): une nouvelle galerie magdalénienne. Masson et Cie, Paris.
- Perrichot, V., 2003. Environnements paraliques à ambre et à végétaux du Crétacé Nord-Aquitain (Charentes, Sud-Ouest de la France). Thèse de Doctorat, Université Rennes 1, France.
- Perrichot, V., 2004. Early Cretaceous amber from south-western France: insight into the Mesozoic litter fauna. Geologica Acta: An International Earth Science Journal 2, 9–22.
- Perrichot, V., Néraudeau, D., Nel, A., De Ploëg, G., 2007. A reassessment of the Cretaceous amber deposits from France and their palaeontological significance. African Invertebrates 48, 213–227. <u>https://doi.org/10.10520/EJC84579</u>
- Perrichot, V., Lacau, S., Néraudeau, D., Nel, A., 2008. Fossil evidence for the early ant evolution. Naturwissenschaften 95, 85–90. <u>https://doi.org/10.1007/s00114-007-0301-8</u>
- Perrichot V., Néraudeau D., Tafforeau P., 2010, Charentese amber. In: Biodiversity of fossils in amber from the major world deposits, Penney (ed.), Siri Scientific Press Manchester
- Perthuison, J., 2020. Préparation et vieillissement de matières organiques en contexte archéologique : approche analytique et expérimentale. Thèse de Doctorat, Université de Strasbourg, France.
- Perthuison, J., Schaeffer, P., Debels, P., Galant, P., Adam, P., 2020. Betulin-related esters from birch bark tar: Identification, origin and archaeological significance. Organic Geochemistry 139, 103944. <u>https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2019.103944</u>
- Peters, K.E., Walters, C.C., Moldowan, J.M., 2005. The Biomarker Guide. Cambridge University Press.
- Peyrot, D., Jolly, D., Barrón, E., 2005. Apport de données palynologiques à la reconstruction paléoenvironnementale de l'Albo-Cénomanien des Charentes (Sud-Ouest de la France). Comptes Rendus Palevol 4, 151–165. <u>https://doi.org/10.1016/j.crpv.2004.11.016</u>
- Peyrot, D., Barrón, E., Polette, F., Batten, D.J., Néraudeau, D., 2019. Early Cenomanian palynofloras and inferred resiniferous forests and vegetation types in Charentes (southwestern France). Cretaceous Research 94, 168–189. <u>https://doi.org/10.1016/j.cretres.2018.10.011</u>
- Philip, J., 1974. Les formations calcaires à rudistes du Crétacé supérieur provençal et rhodanien : stratigraphie et paléo-géographie. Thèse de Doctorat, Université de Marseille, France.

- Philp, R.P., 1985. Fossil Fuel Biomarkers: Applications and Spectra. Elsevier, Amsterdam.
- Plotnick, R.E., Kenig, F., Scott, A.C., Glasspool, I.J., Eble, C.F., Lang, W.J., 2009. Pennsylvanian paleokarst and cave fills from northern Illinois, USA: A window into late Carboniferous environments and landscapes. PALAIOS 24, 627–637. <u>https://doi.org/10.2110/palo.2009.p09-012r</u>
- Poinar, G.O., Jr, 1991. *Hymenaea protera* sp.n. (Leguminosae, Caesalpinioideae) from Dominican amber has African affinities. Experientia 47, 1075–1082. https://doi.org/10.1007/bf01923347
- Poinar, G.J., 1992a. Cretaceous Amber. In: Life in Amber. Stanford University Press, pp. 50-63.
- Poinar, G.J., 1992b. Copal and Amber: Definitions and Characteristics. In: Life in Amber. Stanford University Press, pp. 5–12.
- Poinar, G.O., Jr., 2001. Dominican Amber. Briggs, D.E.G, Crowther, P.R. (eds.), Palaeobiology II, 362–364. https://doi.org/10.1002/9780470999295.ch86
- Poinar, G.O., Milki, R., 2001. Lebanese Amber: The Oldest Insect Ecosystem in Fossilized Resin. Oregon State University press.
- Poinar, G., JR, Brown, A.E., 2002. *Hymenaea mexicana* sp. nov. (Leguminosae: Caesalpinioideae) from Mexican amber indicates Old World connections. Botanical Journal of the Linnean Society 139, 125–132. https://doi.org/10.1046/j.1095-8339.2002.00053.x
- Poinsot, J., 1997. Identification de nouveaux marqueurs biologiques polyterpéniques d'intérêt géochimique. Thèse de Doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.
- Poinsot, J., Schneckenburger, P., Adam, P., Schaeffer, P., Trendel, J., Albrecht, P., 1997. Novel polycyclic polyprenoid sulfides in sediments. Chemical Communications 22, 2191–2192. https://doi.org/10.1039/a704649i
- Poinsot, J., Schneckenburger, P., Adam, P., Schaeffer, P., Trendel, J.M., Riva, A., Albrecht, P., 1998. Novel polycyclic sulfides derived from regular polyprenoids in sediments: Characterization, distribution, and geochemical significance. Geochimica et Cosmochimica Acta 62, 805–814. https://doi.org/10.1016/S0016-7037(98)00022-2
- Polette, F., Licht, A., Cincotta, A., Batten, D.J., Depuydt, P., Néraudeau, D., Garcia, G., Valentin, X., 2019.
 Palynological assemblage from the lower Cenomanian plant-bearing Lagerstätte of Jaunay-Clan-Ormeau-Saint-Denis (Vienne, Western France): Stratigraphic and paleoenvironmental implications. Review of Palaeobotany and Palynology 271, 104102. https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2019.104102
- Pons, D., 1979. Les organes reproducteurs de *Frenelopsis alata* (K. Feistm) Knobloch, Cheirolepidiaceae du Cénomanien de l'Anjou, France. In: Paléobotanique: Comptes Rendus du 104^e Congrès National Des Sociétés Savantes, Bordeaux.
- Pons, D., Lauverjat, J., Broutin, J., 1980. Paléoclimatologie comparée de deux gisements du Crétacé supérieur d'Europe occidentale. Mémoires de la Société Géologique de France 139, 151–158.
- Pons, D., Vozenin-Serra, C., 1992. Un nouveau bois de Ginkgoales du Cénomanien de l'Anjou, France. Courier Forschungsinstitut Senckenberg 147, 199-213.
- Poulin, J., Helwig, K., 2012. Class Id resinite from Canada: A new sub-class containing succinic acid. Organic Geochemistry 44, 37–44. <u>https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2011.11.012</u>
- Poulin, J., Helwig, K., 2014. Inside Amber: The Structural Role of Succinic Acid in Class Ia and Class Id Resinite. Analytical Chemistry 86, 7428–7435. <u>https://doi.org/10.1021/ac501073k</u>
- Pulak, C., 2012. Uluburun Shipwreck. In: The Oxford Handbook of the Bronze Age Aegean. Oxford University Press, pp. 862–876.

- Querol, X., Salas, R., Pardo, G., Ardevol, L., 1992. Albian coal-bearing deposits of the Iberian Range in Northeastern Spain. In: McCabe, P.J., Parrish, J.T. (Eds.), Controls on the Distribution and Quality of Cretaceous Coals. Geological Society of America, p. 193. <u>https://doi.org/10.1130/SPE267-p193</u>
- Ragazzi, E., Schmidt, A.R., 2011. Amber, dans: Encyclopedia of Earth Sciences Series. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 24–36.
- Ragazzi, E., Giaretta, A., Perrichot, V., Néraudeau, D., Schmidt, A.R., Roghi, G., 2009. Thermal analysis of Cretaceous ambers from Southern France. Geodiversitas 31, 163–175. <u>https://doi.org/10.5252/g2009n1a15</u>
- Ragazzi, E., Roghi, G., Giaretta, A., Gianolla, P., 2003. Classification of amber based on thermal analysis. Thermochimica Acta 404, 43-54. <u>https://doi.org/10.1016/S0040-6031(03)00062-5</u>.
- Ragusa, J., 2015. Pétrographie, stratigraphie et provenance du Flysch des Voirons (Nappe du Gurnigel, Haute-Savoie, France).
- Raldugin, V.A., Demenkova, L.I., Pentegova, V.A., 1985. Labdane acids and other components of the needles of *Pinus pumila*. Chemistry of Natural Compounds 21, 192–197. <u>https://doi.org/10.1007/bf00714911</u>
- Raldugin, V.A., Khan, V.A., Dubovenko, Zh.V., Pentegova, V.A., 1976. Scheme for the group separation of the components of conifer oleoresins. Terpenoids of the oleoresin of *Pinus cembra*. Chemistry of Natural Compounds 12, 545–548. <u>https://doi.org/10.1007/bf00565180</u>
- Raldugin, V.A., Demenkova, L.I., Pentegova, V.A., 1991. Terpenoids of the oleoresin of the Schrenk spruce. Chemistry of Natural Compounds 27, 279–282. <u>https://doi.org/10.1007/bf00630309</u>
- Ramis, P., Jarry, M., Bon, F., Potin, Y., 2015. Préhistoire du Mas d'Azil. Grottes et Archéologies. Les Carnets du Mas d'Azil 1, 44–45.
- Rappsilber, I., Wendel, A., 2019. Bernsteingewinnung aus dem Bernsteinsee bei Bitterfeld und erste wissenschaftliche Ergebnisse. Mauritiana (Altenburg) 37, 87–112.
- Rat, P., 1988. The Basque-Cantabrian basin between the Iberian and European plates: some facts but still many problems. Revista de la Sociedad Geologica de Espana 1, 327–348.
- Rice, P.C., 1987. The golden gem of the ages. Kosciusko Fondation, New York: Van Nostrand Reinhold (Editor).
- Ridgway, D.W.R., 2016. Picenum, dans: Oxford Research Encyclopedia of Classics. Oxford University Press.
- Riquelme, F., Northrup, P., Ruvalcaba-Sil, J.L., Stojanoff, V., Peter Siddons, D., Alvarado-Ortega, J., 2014. Insights into molecular chemistry of Chiapas amber using infrared-light microscopy, PIXE/RBS, and sulfur K-edge XANES spectroscopy. Applied Physics A 116, 97–109. <u>https://doi.org/10.1007/s00339-013-8185-2</u>
- Rivière, A., 1840. Sur le terrain crétacé de la Vendée. Bulletin de la Société Géologique de France Série 1, 330– 333.
- Rivière, A., 1842. Groupe crétacique ou terrains crétacés de la Vendée. Annales Sciences Géologiques 1, 617– 653.
- Roghi, G., Ragazzi, E., Gianolla, P., 2006. Triassic Amber of the Southern Alps (Italy). PALAIOS 21, 143–154. https://doi.org/10.2110/palo.2005.p05-68
- Rohdich, F. ; Kis, K. ; Bacher, A. ; Eisenreich, W. 2001. The non-mevalonate pathway of isoprenoids : genes, enzymes and intermediates. Current Opinion In Chemical Biology, 5(5), 535-540. <u>https://doi.org/10.1016/s1367-5931(00)00240-4</u>
- Rosa, M.J, Normand, C., White, R, 2015. Analyse de la résine fossile archéologique de l'Aurignacien d'Isturitz (Pyrénées-Atlantiques ; France). Rapport non publié.

- Rüdiger, A., Siani, A., Junior, V., 2007. The chemistry and pharmacology of the South America genus *Protium* Burm. f. (Burseraceae). Pharmacognosy Review 1, 93–104.
- Runeckles, V.C., Mabry, T.J., 2013. Terpenoids: Structure, biogenesis, and distribution: Recent advances in phytochemistry. Elsevier.
- Saint Martin, S., Saint Martin, J.-P., Girard, V., Néraudeau, D., 2013. Organismes filamenteux de l'ambre du Santonien de Belcodène (Bouches-du-Rhône, France). Annales de Paléontologie 99, 339–360. https://doi.org/10.1016/j.annpal.2013.03.001
- Saint Martin, J.-P., Dutour, Y., Ebbo, L., Frau, C., Mazière, B., Néraudeau, D., Saint Martin, S., Tortosa, T., Turini,
 E., Valentin, X., 2021. Reassessment of amber-bearing deposits of Provence, southeastern France. BSGF
 Earth Sciences Bulletin 192, 5. <u>https://doi.org/10.1051/bsgf/2020048</u>
- Salas, R., Guimera, J., Mas, R., Martin-Closas, C., Melendez, A., Alonso, A., 2001. Evolution of the Mesozoic central Iberian Rift System and its Cainozoic inversion (Iberian chain). Mémoires du Museum d'Histoire Naturelle, Peri-Tethys Memoir 6, 145–186.
- Santos, M.F.C., Oliveira, L.C., Ribeiro, V.P., Soares, M.G., Morae, G. de O.I., Sartori, A.G. de O., Rosalen, P.L., Bastos, J.K., de Alencar, S.M., Veneziani, R.C.S., Ambrósio, S.R., 2021. Isolation of diterpenes from *Araucaria* sp. Brazilian brown propolis and development of a validated high-performance liquid chromatography method for its analysis. Journal of Separation Science 44, 3089–3097. <u>https://doi.org/10.1002/jssc.202100374</u>
- Savidge, R.A., 2008. Learning from the past the origin of wood. The Forestry Chronicle 84, 498–503. https://doi.org/10.5558/tfc84498-4
- Savkevitch, S.-S., Popkova, T.N., 1978. Données nouvelles dans l'étude minéralogique de résines fossiles de France. Bulletin de Minéralogie 101, 442–447. <u>https://doi.org/10.3406/bulmi.1978.7213</u>
- Scalarone, D., Lazzari, M., Chiantore, O. 2002. Ageing behaviour and pyrolytic characterisation of diterpenic resins used as art materials: colophony and Venice turpentine. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 64, 345-361. <u>https://doi.org/10.1016/S0165-2370(02)00046-3</u>
- Scalarone, D., Lazzari, M., Chiantore, O., 2003. Ageing behaviour and analytical pyrolysis characterisation of diterpenic resins used as art materials: Manila copal and sandarac. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis 68–69, 115–136. <u>https://doi.org/10.1016/s0165-2370(03)00005-6</u>
- Schaeffer, F.A., 1930. Les tertres funéraires préhistoriques dans la forêt de Haguenau. G. Gromer (ed). Imprimerie de la Ville.
- Schaeffer, P., Ocampo, R., Callot, J., Albrecht, P., 1993. Extraction of bound porphyrins from sulfur-rich sediments and their use for reconstruction of palaeoenvironments. Nature 364, 133-136. <u>https://doi.org/10.1038/364133a0</u>
- Schaeffer, P., Reiss, C., Albrecht, P., 1995. Geochemical study of macromolecular organic matter from sulfur-rich sediments of evaporitic origin (Messinian of Sicily) by chemical degradations. Organic Geochemistry 23, 567–581. <u>https://doi.org/10.1016/0146-6380(95)00045-G</u>
- Schaeffer, P., Adam, P., Philippe, E., Trendel, J.M., Schmid, J.C., Behrens, A., Connan, J., Albrecht, P., 2006. The wide diversity of hopanoid sulfides evidenced by the structural identification of several novel hopanoid series. Organic Geochemistry 37, 1590-1616. <u>https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2006.04.005</u>
- Schaeffer, P., Bailly, L., Motsch, E., Adam, P., 2019. The effects of diagenetic aromatization on the carbon and hydrogen isotopic composition of higher plant di- and triterpenoids: evidence from buried wood. Organic Geochemistry 136, 103889. <u>https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2019.06.010</u>

- Schenk, A., 1869. Beiträge zur Flora der Vorwelt. 3. Die fossilen Pflanzen der Wernsdorfer Schichten in den Nordkarpathen. Paleontographica (1846-1933) 1–34.
- Schmeda-Hirschmann, G., Astudillo, L., Rodríguez, J., Theoduloz, C., Yáñez, T., 2005. Gastroprotective effect of the Mapuche crude drug *Araucaria araucana* resin and its main constituents. Journal of Ethnopharmacology 101, 271–276. <u>https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.027</u>
- Schmid, J.C., Connan, J., Albrecht, P., 1987. Occurrence and geochemical significance of long-chain dialkylthiacyclopentanes. Nature 329, 54–56. <u>https://doi.org/10.1038/329054a0</u>
- Schmidt, A.R., Ragazzi, E., Coppellotti, O., Roghi, G., 2006. A microworld in Triassic amber. Nature 444, 835–835. https://doi.org/10.1038/444835a
- Schmidt, C., Kalbus, E., Krieg, R., Bayer-Raich, M., Leschik, S., Reinstorf, F., Martienssen, M., Schirmer, M., 2008. Schadstoffmassenströme zwischen Grundwasser, Flussbettsedimenten und Oberflächenwasser am regional kontaminierten Standort Bitterfeld. Grundwasser 13, 133–146. <u>https://doi.org/10.1007/s00767-008-0076-7</u>
- Schmitt, S., Adam, P., Schaeffer, P., Féliu, C., Schneider-Schwien, N., Minni, D., Châtelet, M., Boës, E., Azar, D., Nel, A., 2021a. Molecular investigation of archaeological ambers from Alsace (NE France): origins and alteration processes. Poster at the 30th International Meeting on Organic Geochemistry, Montpellier, 12– 17 September 2021. <u>https://doi.org/10.3997/2214-4609.202134073</u>
- Schmitt, S., Schaeffer, P., Adam, P., Féliu, C., Schneider-Schwien, N., Minni, D., Châtelet M., Boes, E., Azar.D., Nel, A., 2021b. Structural investigation of the macromolecular component of Baltic amber by selective chemical degradation. Poster at the 30th International Meeting on Organic Geochemistry, Montpellier, 12– 17 September 2021. https://doi.org/10.3997/2214-4609.202134076
- Schneckenburger, P., 1997. Sulfuration et réduction de composés organiques par les sulfures: mécanismes et implications géochimiques. Thèse de Doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.
- Schneckenburger, P., Adam, P., Albrecht, P., 1998. Thioketones as key intermediates in the reduction of ketones to thiols by HS⁻ in natural environments. Tetrahedron Letters 39, 447–450. <u>https://doi.org/10.1016/S0040-4039(97)10572-X</u>
- Schouten, S., van Driel, G.B., Sinninghe Damsté, J.S., de Leeuw, J.W., 1994. Natural sulphurization of ketones and aldehydes: A key reaction in the formation of organic sulphur compounds. Geochimica et Cosmochimica Acta 58, 5111–5116. <u>https://doi.org/10.1016/0016-7037(93)90613-2</u>
- Schubert, K., 1961. Neue Untersuchngen über Bau und Leben der Bersteinkiefer (*Pinus succinifera* (Conw.) emend. Geologisches Jahrbuch 45, 1–149.
- Schumann, H., Wendt, H., 2008. Zur Kenntnis der tierischen Inklusen des Sächsischen Bernsteins. Deutsche Entomologische Zeitschrift 36, 33–44. <u>https://doi.org/10.1002/mmnd.19890360105</u>
- Serpico, M., White, R., 2000. Resins, amber and bitumen. Ancient Egyptian materials and technology, Cambridge University Press.
- Serrano-Sanchez, M.L., Hegna, T.A., Schaaf, P., Perez, L., Centeno-Garcia, E., Vega, J.J., 2015. The aquatic and semiaquatic biota in Miocene amber from the Campo La Granja mine (Chiapas, Mexico):
 Paleoenvironmental implications. Journal of South American Earth Sciences 62, 243-256. http://dx.doi.org/10.1016/j.jsames.2015.06.007
- Seyfullah, L.J., Beimforde, C., Dal Corso, J., Perrichot, V., Rikkinen, J., Schmidt, A.R., 2018. Production and preservation of resins past and present. Biological Reviews 93, 1684–1714. https://doi.org/10.1111/brv.12414

- Shen, T., Li, G.-H., Wang, X.-N., Lou, H.-X., 2012. The genus *Commiphora*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. Journal of Ethnopharmacology 142, 319–330. https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.05.025
- Siani, A.C., Nakamura, M.J., Tappin, M.R.R., Monteiro, S.S., Guimarães, A.C., Ramos, M.F.S., 2012. Chemical Composition of South American Burseraceae non-volatile oleoresins and preliminary solubility assessment of their commercial blend. Phytochemical Analysis 23, 529–539. <u>https://doi.org/10.1002/pca.2351</u>
- Silori, G.K., Kushwaha, N., Kumar, V., 2019. Essential Oils from Pines: Chemistry and Applications. In: Essential Oil Research. Springer International Publishing, Cham, pp. 275–297. <u>10.1007/978-3-030-16546-8_10</u>
- Simoneit, B.R.T., 2002. Biomass burning a review of organic tracers for smoke from incomplete combustion. Applied Geochemistry 17, 129–162. <u>https://doi.org/10.1016/s0883-2927(01)00061-0</u>
- 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. Organic Geochemistry 10, 877–889. https://doi.org/10.1016/S0146-6380(86)80025-0
- Simoneit, B.R.T., Otto, A., Kusumoto, N., Basinger, J.F., 2016. Biomarker compositions of *Glyptostrobus* and Metasequoia (Cupressaceae) fossils from the Eocene Buchanan Lake Formation, Axel Heiberg Island, Nunavut, Canada reflect diagenesis from terpenoids of their related extant species. Review of Palaeobotany and Palynology 235, 81–93. <u>https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2016.07.012</u>
- Simoneit, B.R.T., Cox, R.E., Oros, D.R., Otto, A., 2018. Terpenoid Compositions of Resins from *Callitris* Species (Cupressaceae). Molecules 23, 3384. <u>https://doi.org/10.3390/molecules23123384</u>
- Simoneit, B.R.T., Otto, A., Oros, D.R., Kusumoto, N., 2019. Terpenoids of the swamp cypress subfamily (Taxodioideae), Cupressaceae, an overview by GC-MS. Molecules 24, 3036. https://doi.org/10.3390/molecules24173036
- Simoneit, B.R.T., Otto, A., Menor-Sálvan, C., Oros, D.R., Wilde, V., Riegel, W., 2021a. Composition of resinites from the Eocene Geiseltal brown coal basin, Saxony-Anhalt, Germany and comparison to their possible botanical analogues. Organic Geochemistry 152, 104138. <u>https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2020.104138</u>
- Simoneit, B.R.T., Rybicki, M., Goryl, M., Bucha, M., Otto, A., Marynowski, L., 2021b. Monoterpenylabietenoids, novel biomarkers from extant and fossil Taxodioideae and sedimentary rocks. Organic Geochemistry 154, 104172. <u>https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2020.104172</u>
- Sinninghe Damsté, J.S., De Leeuw, J.W., 1990. Analysis, structure and geochemical significance of organically bound sulphur in the geosphere: State of the art and future research. Proceedings of the 14th International Meeting on Organic Geochemistry 16, 1077–1101. <u>https://doi.org/10.1016/0146-6380(90)90145-P</u>
- Sinninghe Damsté, J.S., Rijpstra, W.I.C., de Leeuw, J.W., Schenck, P.A., 1988. Origin of organic sulphur compounds and sulphur-containing high molecular weight substances in sediments and immature crude oils. In: Mattavelli, L., Novelli, L. (Eds.), Advances in Organic Geochemistry 1987. Pergamon Press, Oxford, pp. 593–606. <u>https://doi.org/10.1016/0146-6380(88)90079-4</u>
- Sinninghe Damsté, J.S., van Koert, E.R., Kock-van-Dalen, A.C., de Leeuw, J.W., Schenck, P.A., 1989. Characterisation of highly branched isoprenoid thiophenes occurring in sediments and immature crude oils. Organic Geochemistry 14, 555–567. <u>https://doi.org/10.1016/0146-6380(89)90035-1</u>
- Solórzano-Kraemer, M.M., Delclòs, X., Engel, M.S., Peñalver, E., 2020. A revised definition for copal and its significance for palaeontological and Anthropocene biodiversity-loss studies. Scientific Reports 10, 19904. <u>https://doi.org/10.1038/s41598-020-76808-6</u>

- Song, Z., Liang, Z., Liu, X., 1995. Chemical characteristics of oleoresins from Chinese pine species. Biochemical Systematics and Ecology 23, 517–522. <u>https://doi.org/10.1016/0305-1978(95)00042-s</u>
- Sorg, B., Krebs, B., 1986. Zur Anwendung der Pyrolyse-Gaschromatographie auf vergleichende chemische Untersuchungen fossiler Harze. Zeitschrift für Angewandte Geologie 3, 76–77.
- Soto, R., Casas-Sainz, A.M., Villalaín, J.J., Oliva-Urcia, B., 2007. Mesozoic extension in the Basque–Cantabrian basin (N Spain): Contributions from AMS and brittle mesostructures. Tectonophysics 445, 373–394. <u>https://doi.org/10.1016/j.tecto.2007.09.007</u>
- Soyocak, A. ; Ak, A. ; Önem, E. Anti-quorum sensing and cytotoxic activity of elemi essential oil. International Journal Of Secondary Metabolite 2022, 9(3), 258-267. <u>https://doi.org/10.21448/ijsm.1059886</u>
- Spath, L.F., 1926. Notes on some new or incompletely known Ammonites. Quarterly Journal of the Geological Society of London 82, 165–179. <u>https://doi.org/10.1144/GSL.JGS.1926.082.01-04.12</u>
- Stacey, E.M., Harris, J.F., 1963. Formation of carbon-heteroatom bonds by free radical chain additions to carboncarbon multiple bonds. In Organic Reactions (Cope, A.C. et al. Eds.), Vol. 13. pp.150 –377. Wiley.
- Stacey, R.J., Cartwright, C.R., McEwan, C., 2006. Chemical characterization of ancient mesoamerican 'copal' resins: preliminary results. Archaeometry 48, 323–340. <u>https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.2006.00259.x</u>
- Stach, P., Natkaniec-Nowak, L., Dumańska-Słowik, M., Kosakowski, P., Naglik, B., Drzewicz, P., Misiak, J., Pršek, J., George, C., Gomez, R.E.R., 2021. The characteristics and origin of amber deposits in the Dominican Republic. Research Square Platform LLC. DOI: https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-564160/v1
- Stach, P., Natkaniec-Nowak, L., Wagner, M., Dumanska-Słowik, M., Mroczkowska-Szersze, M., Wesełucha-Birczynska, A., Drzewicz, P., George, C., Garcia, E., 2020. A study on the formation environment of the La Cumbre amber deposit, from Santiago province, the northwestern part of the Dominican Republic. Minerals 10, 736. <u>https://doi.org/10.3390/min10090736</u>
- Standke, G., 2008. Bitterfeld Berstein gleich Baltischer Bernstein? eine geologische Raum-Zeit- Betrachtung und genetische Schlussfolgerungen. Exkursionsführer und Veröffentlichungen der Deutschen Gesellschaft für Geowissenschaften 236, 11–33.
- Stefanova, M., Magnier, C., Velinova, D., 1995. Biomarker assemblage of some Miocene-aged Bulgarian lignite lithotypes. Organic Geochemistry 23, 1067–1084. <u>https://doi.org/10.1016/0146-6380(95)00080-1</u>
- Steigenberger, G., 2013. The Vigani Cabinet-Analysis of historical resinous materials by gas chromatography-mass spectrometry and infrared spectroscopy. Thèse de Doctorat, Technische Universität Desden, Allemagne.
- Steigenberger, G., Herm, C., 2011. Natural resins and balsams from an eighteenth-century pharmaceutical collection analysed by gas chromatography/mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry 401, 1771–1784. <u>https://doi.org/10.1007/s00216-011-5169-y</u>
- Stout, E.C., Beck, C.W., Kosmowska-Ceranowicz, B., 1995. Gedanite and gedano-succinite. In: ACS Symposium Series. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 130–148.
- Stout, E.C., Beck, C.W., Anderson, K.B., 2000. Identification of rumanite (Romanian amber) as thermally altered succinite (Baltic amber). Physics and Chemistry of Minerals 7, 665–678. https://doi.org/10.1007/s002690000111
- Streibl, M., Vašíčková, S., Herout, V., Bouška, V., 1976. Chemical composition of Cenomanian fossil resins from Moravia. Collection of Czechoslovak Chemical Communications 41, 3138–3145. <u>https://doi.org/10.1135/cccc19763138</u>
- Stull, G.W., Qu, X.-J., Parins-Fukuchi, C., Yang, Y.-Y., Yang, J.-B., Yang, Z.-Y., Hu, Y., Ma, H., Soltis, P.S., Soltis, D.E., Li, D.-Z., Smith, S.A., Yi, T.-S., 2021. Gene duplications and phylogenomic conflict underlie major

pulses of phenotypic evolution in gymnosperms. Nature Plants 7, 1015–1025. https://doi.org/10.1038/s41477-021-00964-4

- Sturm, U., Francke, W., Mittak, W.L., Vité, J.P., 1983. Chemische Charakteristik des Kiefernharzes (*Pinus spp.*)1. Zeitschrift für Angewandte Entomologie 96, 132–139. <u>https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1983.tb03653.x</u>
- Sumimoto, M., 1963. Heartwood constituents of *Sciadopitys verticillata* Sieb. et Zucc. I: The constitution of sciadin. Tetrahedron 19, 643-655. https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)98550-3
- Szwedo, J., Sontag, E. 2013. The flies (Diptera) say that amber from the Gulf of Gdańsk, Bitterfeld and Rovno is the same Baltic amber. Polish Journal of Entomology, 82, 379-388. <u>https://doi.org/10.2478/pjen-2013-0001</u>
- Tanaka, R., Ohtsu, H., Matsunaga, S., 1997. Abietane diterpene acids and other constituents from the leaves of *Larix kaempferi*. Phytochemistry 46, 1051–1057. <u>https://doi.org/10.1016/s0031-9422(97)84396-8</u>
- Tang, X., Li, Y., Feng, Y., 2024. Gemmological Characteristics of Copal from Sumatra, Indonesia, Resembling 'Root Amber.' The Journal of Gemmology 39, 120–122. <u>https://doi.org/10.15506/jog.2024.39.2.120</u>
- Tappert, R., Wolfe, A.P., McKellar, R.C., Tappert, M.C., Muehlenbachs, K., 2011. Characterizing modern and fossil gymnosperm exudates using micro-Fourier transform infrared spectroscopy. International Journal of Plant Sciences 172, 120–138. <u>https://doi.org/10.1086/657277</u>
- Tavendale, M.H., McFarlane, P.N., Mackie, K.L., Wilkins, A.L., Langdon, A.G., 1997a. The fate of resin acids-1.
 The biotransformation and degradation of deuterium labelled dehydroabietic acid in anaerobic sediments.
 Chemosphere 35, 2137-2151. <u>https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00293-2</u>
- Tavendale, M.H., McFarlane, P.N., Mackie, K.L., Wilkins, A.L., Langdon, A.G., 1997b. The fate of resin acids-2.
 The fate of resin acids and resin acids derived neutral compounds in anaerobic sediments. Chemosphere 35, 2153-2166. <u>https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00294-4</u>
- Taylor, T., 2009. Conifers. In: Biology and Evolution of Fossil Plants. Elsevier, pp. 805-871. 10.2307/1223352
- Teodor, E., Liţescu, S., Neacşu, A., Truică, G., Albu, C., 2009. Analytical methods to differentiate Romanian amber and Baltic amber for archaeological applications. Open Chemistry 7, 560–568. <u>https://doi.org/10.2478/s11532-009-0053-8</u>
- Teodoridis, V., Sakala, J., 2008. Early Miocene conifer macrofossils from the Most Basin (Czech Republic). Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie - Abhandlungen 250, 287–312. <u>https://doi.org/10.1127/0077-7749/2008/0250-0287</u>
- Ters, M., Viaud, J.M., 1983. Carte Géologique de la France à 1/50 000. Notice de la carte géologique Challans. Bureau de Recherches Géologiques et Minières.
- Tholl, D., 2015. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. dans: Schrader, J., Bohlmann, J. (eds) Biotechnology of Isoprenoids. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, vol 148. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/10_2014_295
- Thomas, B.R., 1969. Kauri Resins—Modern and Fossil. In: Organic Geochemistry. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 599–618.
- Tschirch, A. 1906. Die Harze und die Harzebehälter. Borntraeger, Leipzig.
- Tschirch, A., Aweng, E., de Jong, C., Hermann, E.S., 1923. Über den Bernstein. Helvetica Chimica Acta 6, 214– 225. <u>https://doi.org/10.1002/hlca.19230060116</u>
- Turkin, A., 1997. Preliminary results of microscopic research of tangential wood imprints in Baltic amber. Metalla (Sonderheft) 66, 55–56.

- Valentin, X., Gomez, B., Daviero-Gomez, V., Charbonnier, S., Ferchaud, P., Kirejtshuk, A.G., Licht, A., Néraudeau, D., Vullo, R., Garcia, G., 2014. Plant-dominated assemblage and invertebrates from the Lower Cenomanian of Jaunay-Clan, western France. Comptes Rendus Palevol 13, 443–454. https://doi.org/10.1016/j.crpv.2014.04.001
- Valentin, X., Garcia, G., Gomez, B., Daviero Gomez, V., Boiteau, J.-M., Saint Martin, S., Saint Martin, J.-P., 2020.
 New fossil assemblage with amber, plants and vertebrates from the lower Cenomanian near Châtellerault (Vienne, western France). Bulletin de la Société Géologique de France 191, 29. https://doi.org/10.1051/bsgf/2020034
- Valisolalao, J., Perakis, N., Chappe, B., Albrecht, P., 1984. A novel sulfur containing C₃₅ hopanoid in sediments. Tetrahedron Letters 25, 1183–1186. <u>https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)91555-2</u>
- van Bergen, P.F., Collinson, M.E., Scott, A.C., de Leeuw, J.W., 1995. Unusual Resin Chemistry from Upper Carboniferous Pteridosperm Resin Rodlets. In: ACS Symposium Series. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 149–169.
- van den Berg, K.J., 2012. Analysis of diterpenoid resins and polymers in paint media and varnishes with an atlas of mass spectra. Molart Report 10, Amsterdam: FOM Institute AMOLF Amsterdam 2013.
- van den Berg, K.J., Pastorova, I., Spetter, L., Boon, J.J, 1996. State of oxidation of diterpenoid *Pinaceae* resins in varnish, wax lining material, 18th century resin oil paint, and a recent copper resinate glaze. In: ICOM Committee for Conservation 11th Triennial Meeting, Edinburgh, 930-937.
- van den Berg, K., van der Horst, J., Boon, J., 1999. Recognition of copals in age resin/oil paint and varnishes. Presented at the 12th Triennial ICOM Meeting, James and James (Publishers) Ltd, London, pp. 855–861.
- van den Berg, K.J., Ossebaar, J., van Keulen, H., 2002. Analysis of copal resins in 19th Century oil paints and resin/oil varnishes. In: Antwerp-Wilrijk. Presented at the 7th International Conference on Non-destructive Testing and Microanalysis for the Diagnostics and Conservation of Cultural and Environmental Heritage, van Grieken, R., Janssens, K., Van't dack, L., Meersman, G. (Eds.), pp. 1–10.
- van der Doelen, G.A., van den Berg, K.J., Boon, J.J., 1998a. Comparative Chromatographic and Mass-Spectrometric Studies of Triterpenoid Varnishes: Fresh Material and Aged Samples from Paintings. Studies in Conservation 43, 249-264. <u>https://doi.org/10.2307/1506734</u>
- van der Doelen, G.A., van den Berg, K.J., Boon, J.J., Shibayama, N., de la Rie, E.R., Genuit, W.J.L., 1998b. Analysis of fresh triterpenoid resins and aged triterpenoid varnishes by high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionisation (tandem) mass spectrometry. Journal of Chromatography A 809, 21–37. <u>https://doi.org/10.1016/s0021-9673(98)00186-1</u>
- van der Werf, I.D., van den Berg, K.J., Schmitt, S., Boon, J.J., 2000. Molecular Characterization of Copaiba Balsam as Used in Painting Techniques and Restoration Procedures. Studies in Conservation 45, 1. <u>https://doi.org/10.2307/1506679</u>
- van der Werf, I.D., Fico, D., De Benedetto, G.E., Sabbatini, L., 2016. The molecular composition of Sicilian amber. Microchemical Journal 125, 85–96. <u>https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.11.012</u>
- van Zijll Langhout, W.C., Waterman, H.I., 1954. The addition of hydrogen sulphide on alkenes. Journal of Applied Chemistry 4, 285–288. <u>https://doi.org/10.1002/jctb.5010040601</u>
- Vaquette, J., Leboeuf, M., 1985. Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales. Book Review. Phytochemistry 24, 3087. <u>https://doi.org/10.1016/0031-9422(85)80073-x</u>

- Vávra, N., 2009. The Chemistry of Amber Facts, Findings and Opinions. Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien. Serie A für Mineralogie und Petrographie, Geologie und Paläontologie, Anthropologie und Prähistorie 111, 445–473. <u>https://doi.org/10.2307/41701795</u>
- Vávra, N., Bouška, V., Dvořák, B. 1997. Duxite and its geochemical biomarkers ("chemofossils") from Bilina opencast mine in the North Bohemian Basin (Miocene, Czech Republic). Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie-Monatshefte, 223-243.
- Veltz, I., Paicheler, J.-C., Maksoud, S., Gèze, R., Azar, D., 2013. Context and genesis of the Lebanese amberiferous palaeoenvironments at the Jurassic-Cretaceous transition. Terrestrial Arthropods 6, 11-26. https://doi.org/10.1163/18749836-06021055-
- Venditti, A., Serrilli, A.M., Vittori, S., Papa, F., Maggi, F., DilCecco, M., Ciaschetti, G., Bruno, M., Rosselli, S., Bianco, A., 2013. Secondary metabolites from *Pinus mugo* Turra subsp. *mugo* growing in the Majella National Park (Central Apennines, Italy). Chemistry & Biodiversity 10, 2091-2100. https://doi.org/10.1002/cbdv.201300098
- Venditti, A., Frezza, C., Sciubba, F., Foddai, S., Serafini, M., Bianco, A, 2017. Terpenoids and more polar compounds from the male cones of *Wollemia nobilis*. Chemistry & Biodiversity 14, e1600332. https://doi.org/10.1002/cbdv.201600332
- Viaud, J., 1981. Données lithologiques et biostratigraphiques dans le Crétacé supérieur du bassin de Challans (Vendée). Bulletin de la Société de Sciences Naturelles (Ouest France) 3, 79-87.
- Vilas, L., Alonso, A., Arias, C., Garcia, A., Mas, J.R., Rincón, R., Meléndez, N., 1983. The Cretaceous of the southwestern Iberian Ranges (Spain). Zitteliana 10, 245–254.
- Viollet, D., Reutter, L., 1916. Contribution à l'étude de l'ambre préhistorique. Abzeiger für scheizrische Altertums kunde 56, 49–54.
- Vršanský, P., Sendi, H., Kotulová, J., Szwedo, J., Havelcová, M., Palková, H., Vršanská, L., Sakala, J., Puškelová,
 L'., Golej, M., Biroň, A., Peyrot, D., Quicke, D., Néraudeau, D., Uher, P., Maksoud, S., Azar, D., 2024.
 Jurassic Park approached: a coccid from Kimmeridgian cheirolepidiacean Aintourine Lebanese amber.
 National Science Review 12, nwae200 . <u>https://doi.org/10.1093/nsr/nwae200</u>
- Wang, H., Dutta, S., Kelly, R.S., Rudra, A., Li, S., Zhang, Qing-Qing, Zhang, Qian-Qi, Wu, Y.-X., Cao, M.-Z., Wang, B., Li, J.-G., Zhang, H.-C., 2018. Amber fossils reveal the Early Cenozoic dipterocarp rainforest in central Tibet. Palaeoworld 27, 506–513. <u>https://doi.org/10.1016/j.palwor.2018.09.006</u>
- Wang, X., Liu, Y.-S., Nair, U.B., Armstrong, D.W., Ellis, B., Williams, K.M., 1997. Enantiomeric composition of monoterpenes in conifer resins. Tetrahedron: Asymmetry 8, 3977–3984. <u>https://doi.org/10.1016/s0957-4166(97)00600-9</u>
- Wang, Y.-Z., Tang, C.-P., Ke, C.-Q., Weiss, H.-C., Gesing, E.-R., Ye, Y., 2008. Diterpenoids from the pericarp of *Platycladus orientalis*. Phytochemistry 69, 518–526. <u>https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.07.023</u>
- Wang, Y., Jiang, W., Feng, Q., Lu, H., Zhou, Y., Liao, J., Wang, Q., Sheng, G., 2017. Identification of 15-norcleroda-3,12-diene in a Dominican amber. Organic Geochemistry 113, 90–96. <u>https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2017.08.013</u>
- Wassong, R., 2012. Organisation spatiale des nécropoles tumulaires de la forêt de Haguenau. Rapport de Master, Université de Strasbourg, France.
- Wassong, R., 2015. Tumulus et milieux humides. Rites, ostentation et lieux de passage : les tertres de l'âge du Fer dans le fossé Rhénan. In: Les Gaulois au fil de l'eau. Actes du 37e colloque de l'Association française

pour l'étude de l'âge du Fer (Montpellier, 7-11 mai 2013), Mémoires (39), <u>Ausonius Éditions</u>, pp.1153-1162.

- Weeks, A., Daly, D.C., Simpson, B.B., 2005. The phylogenetic history and biogeography of the frankincense and myrrh family (Burseraceae) based on nuclear and chloroplast sequence data. Molecular Phylogenetics and Evolution 35, 85–101. <u>https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.12.021</u>
- Weitschat, W., Wichard, W., 2002. Atlas of Plants and Animals in Baltic Amber. Verlag Dr. Friedrich Pfeil München, pp. 256.
- Weitschat, W., Wichard, W., 2003. Atlas of plants and animals in Baltic amber. Review of Palaeobotany and Palynology 123, 347–348. <u>https://doi.org/10.1016/s0034-6667(02)00225-7</u>
- Weitschat, W., Wichard, W., 2010. Baltic amber. dans: Biodiversity of fossils in amber from the major world deposits, Penney, D. (ed.), 79-116.
- Welch, S.C., Kim, J.H., 1976. A stereoselective total synthesis of (±)-callitrisic acid. Synthetic Communications 6, 27–31. <u>https://doi.org/10.1080/00397917608062129</u>
- Werne, J.P., Hollander, D.J., Behrens, A., Schaeffer, P., Albrecht, P., Sinninghe Damsté, J.S., 2000. Timing of early diagenetic sulfurization of organic matter: a precursor-product relationship in Holocene sediments of the anoxic Cariaco Basin, Venezuela. Geochimica et Cosmochimica Acta 64, 1741-1751. <u>https://doi.org/10.1016/S0016-7037(99)00366-X</u>
- White, R., Normand, C., 2015. Les parures de l'Aurignacien ancien et archaïque de la grotte d'Isturitz : perspectives technologiques et régionales. In: White R., Bourrillon R. (dir.) avec la collaboration de Bon F., Aurignacian Genius : art, technologie et société des premiers hommes modernes en Europe, Actes du Symposium International, 8-10 avril 2013, New York University, Palethnologie 7. 140-166. https://doi.org/10.4000/palethnologie.784
- Wimmer, R., Pester, L., Eissmann, L., 2008. Geologie der Bitterfeldder Bersteinlagerstätte unter Berucksichtigung neuer Erkenntnisse. Bitterfelder Bernstein versus Baltischer Bernstein. Hypothesen, Fakten, Fragen—II. Bitterfelder Bernsteinkolloquium Exkursionsführer und Veröffentlichungen der Deutschen Gesellschaft für Geowissenschaften. Bitterfeld 34–45.
- Wolfe, A.P., McKellar, R.C., Tappert, R., Sodhi, R.N.S., Muehlenbachs, K., 2016. Bitterfeld amber is not Baltic amber: Three geochemical tests and further constraints on the botanical affinities of succinite. Review of Palaeobotany and Palynology 225, 21–32. <u>https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2015.11.002</u>
- Wolfe, A.P., Tappert, R., Muehlenbachs, K., Boudreau, M., McKellar, R.C., Basinger, J.F., Garrett, A., 2009. A new proposal concerning the botanical origin of Baltic amber. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 276, 3403–3412. <u>https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0806</u>
- Wolfe, A.P., Tappert, R., Muehlenbachs, K., Boudreau, M., McKellar, R.C., Basinger, J.F., Garrett, A., 2009. A new proposal concerning the botanical origin of Baltic amber. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 276, 3403–3412. <u>https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0806</u>
- Woo, K.W., Choi, S.U., Park, J.C., Lee, K.R., 2011. A new lignan glycoside from *Juniperus rigida*. Archives of Pharmacal Research 34, 2043–2049. <u>https://doi.org/10.1007/s12272-011-1206-9</u>
- Xue, J.J., Fan, C.Q., Dong, L., Yang, S.P., Yue, J.M., 2004. Novel antibacterial diterpenoids from *Larix chinensis* BEISSN. Chemistry & Biodiversity 1, 2091-2100. <u>https://doi.org/10.1002/cbdv.200490128</u>
- Yamamoto, S., Otto, A., Krumbiegel, G., Simoneit, B.R.T., 2006. The natural product biomarkers in succinite, glessite and stantienite ambers from Bitterfeld, Germany. Review of Palaeobotany and Palynology 140, 27–49. <u>https://doi.org/10.1016/i.revpalbo.2006.02.002</u>

- Yang, Z.-Y., Ran, J.-H., Wang, X.-Q., 2012. Three genome-based phylogeny of Cupressaceae s.l.: Further evidence for the evolution of gymnosperms and Southern Hemisphere biogeography. Molecular Phylogenetics and Evolution 64, 452–470. <u>https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.05.004</u>
- Yates, D., 2016. Antibacterial Activity and Chemical Characterization of Resin from *Sciadopitys verticillata* (Thunb.) Siebold and Zuccarini. Thèse de Doctorat, University of Tennessee, Knoxville, USA.
- Yener, K.A., Schloen, J.D., Fink, A.S., 2004. Reliving the Legend: The Expedition to Alalakh 2003. The Oriental Institute, News and Notes 181, 1-6.
- Zachos, J.C., Dickens, G.R., Zeebe, R.E., 2008. An early Cenozoic perspective on greenhouse warming and carbon-cycle dynamics. Nature 451, 279–283. <u>https://doi.org/10.1038/nature06588</u>
- Zelenka, O., 1972. Fossil resins in the North Bohemian Basin. Zprávy a studie Okresního vlastivědného muzea Teplice 8, 19–28.
- Zhao, T., Peng, M., Yang, M., Lu, R., Wang, Y., Li, Y., 2023. Effects of weathering on FTIR spectra and origin traceability of archaeological amber: The case of the Han Tomb of Haihun Marquis, China. Journal of Archaeological Science 153, 105753. <u>https://doi.org/10.1016/j.jas.2023.105753</u>
- Zhou, Z., 1995. On some Cretaceous pseudofrenelopsids with a brief review of cheirolepidiaceous conifers in China. Review of Palaeobotany and Palynology 84, 419–438. <u>https://doi.org/10.1016/0034-6667(94)00078-X</u>
- Zinkel, D.F., Clarke, W.B., 1985. Resin acids of *Pinus resinosa* needles. Phytochemistry 24, 1267–1271. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81113-9
- Zinkel, D.F., Magee, T.V., 1991. Resin acids of *Pinus ponderosa* needles. Phytochemistry 30, 845-848. https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)85265-2

ANNEXES



RAPPORT D'ANALYSE

Analyses moléculaires de quatre prélèvements issus de deux colliers en perles d'ambre de l'âge du Fer (musée Unterlinden, Colmar, Haut Rhin)

Alice Fradet, Philippe Schaeffer, Pierre Adam, Estelle Motsch

Equipe de Biogéochimie Moléculaire, UMR 7177 du CNRS, Université de Strasbourg

Résumé

Les extraits lipidiques échantillonnés à partir de quatre perles d'ambre issues de deux colliers de l'Age du Fer ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse. Les trois premières perles émanent d'un collier découvert à Appenwihr et la dernière provient d'un collier découvert à Bennwihr. La distribution des lipides a permis de mettre en évidence l'origine baltique des échantillons étudiés. De plus, cette étude moléculaire a mis en évidence la présence d'un vernis utilisé pour la restauration des deux colliers. La restauration a impliqué, entre autres, de la résine de dammar associée à une huile végétale.

1. Introduction

L'ambre est un matériau d'origine organique issu de la fossilisation d'une résine. Cette fossilisation consiste en la polymérisation et la condensation de sous-unités naturellement présentes dans les résines et en la transformation partielle de certains de ces composés (cyclisation, oxydation, aromatisation). De par l'origine botanique de la résine dont il découle, l'ambre hérite alors d'une partie de la signature moléculaire de cette résine (Anderson, 1995; Langenheim, 2003). À l'instar de celle-ci, l'ambre est



par conséquent principalement constitué d'une partie macromoléculaire engendrée par la réticulation de sous-unités et de composés terpéniques libres (Fig. 1)

Figure 1. Schéma de la formation de résine puis de l'ambre qui en découle par fossilisation

Les terpénoïdes constituent un groupe moléculaire très diversifié puisque plus de 30 000 composés ont été identifiés à ce jour. Parmi ceux-ci, une importante partie provient de plantes chez qui les terpénoïdes sont les plus variés. Ces molécules sont en effet issues du métabolisme secondaire des plantes et leurs structures sont hautement spécifiques. Ce sont donc des biomarqueurs robustes (composés dont la présence à elle seule peut permettre d'identifier une famille, un genre ou une espèce dont ils sont issus). Il existe plusieurs grands groupes de terpénoïdes : par exemple, les monoterpènes comportant dix carbones (C_{10}), les sesquiterpènes (C_{15}), les diterpènes



(C₂₀), les triterpènes (C₃₀) et les tétraterpènes (C₄₀). Les proportions de ces différentes familles et la dominance de certains biomarqueurs varient en fonction de la famille botanique dont la résine ou l'ambre sont issus. Ainsi, les conifères produisent des résines contenant essentiellement des diterpènes. Parmi ces diterpènes, on observe la présence de plusieurs sous-familles (Fig. 2) dont les proportions relatives varient selon la famille de résineux considérée (Bohlmann et Croteau, 1999.; Cox et al., 2007; Czechowski et al., 1996; Lambert et al., 2008; Menor-Salván et al., 2010).

Figure 2. Groupes principaux des familles de terpénoïdes avec composés représentatifs de chaque groupe.

Les Angiospermes génèrent quant à elles des résines contenant dans la majorité des cas des triterpènes. Il existe chez les triterpènes différentes familles « génériques » dont les proportions relatives varient aussi selon les espèces (Burger, 2008; Diefendorf et al., 2012; Nakamura et al., 2010; Yamamoto et al., 2006). Par exemple, la série des dammaranes est caractéristique des diptérocarpacées (Fig. 2, Dammaradiénone) L'analyse chimique de l'ambre permet ainsi en théorie de remonter totalement ou partiellement à la résine dont elle est issue par la compréhension des transformations lors de la fossilisation que celle-ci subit. Il est donc envisageable par cette compréhension de reconnaître l'essence botanique productrice de chaque ambre par

l'étude de ses composés terpéniques. La mise en place d'un référentiel moléculaire établi à partir d'ambres de sites géologiques bien identifiés d'un point de vue âge et localisation permet donc de déterminer la source botanique et le site géologique d'origine d'un échantillon d'ambre inconnu mis au jour en contexte archéologique grâce à sa signature moléculaire.

Notre étude a pour objectif d'identifier l'origine géographique/géologique d'échantillons d'ambre archéologique par l'analyse de leur signature moléculaire en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Cette approche est toutefois « destructrice », dans la mesure où des prélèvements de matériau sont nécessaires. Ceci peut a priori sembler peu compatible avec l'analyse d'échantillons archéologiques d'ambre, matériau généralement rare, précieux et assez fragile. C'est pourquoi notre équipe a mis en place un protocole permettant de travailler sur des quantités les plus petits possibles en prélevant des échantillons de façon au peu invasive que possible.

Les échantillons d'ambres étudiés ici proviennent du musée Unterlinden situé à Colmar (Haut Rhin) et ont été prélevés à partir de quatre perles provenant de deux colliers mis au jour lors de fouilles archéologiques. Les trois premières perles (CAP1, CAP2 et CAP3) proviennent d'un collier découvert à proximité de la localité d'Appenwihr lors de fouilles réalisées en 1954 dans la forêt de Kastenwald. L'ensemble des objets mis au jour sur ce site ont été datés entre le VIII^{ème} et le VII^{ème} siècle avant J-C (Jehl et Bonnet, 1968). La dernière perle provient d'un collier découvert dans l'une des deux sépultures mises au jour à Bennwihr et est daté du Bronze final (cf. https://www.musee-unterlinden.com/bennwihr/).

2. Matériel et méthodes

2.1. Prélèvement des échantillons

Les échantillons ont été prélevés en frottant les surfaces des perles d'ambre à l'aide d'un coton préextrait imbibé d'éthanol redistillé (Fig. 3), le coton étant fixé à l'extrémité d'une curette métallique de manière à former un embout aussi fin que possible. Ceci permet en effet de bien cibler la zone à échantillonner, idéalement située soit au niveau de la zone de perçage de la perle, soit au niveau d'une zone qui sera la

moins exposée lors de la mise en exposition de l'objet dans le musée (Fig. 3). Ici, la première perle (CAP1) a été échantillonnée sur une cassure fraîche, la seconde perle (CAP2) sur l'intérieur d'une face, la troisième (CAP3) sur une tranche et la dernière (CBP1) sur le côté d'une face uniquement. Après prélèvement, les cotons contenant l'ambre solubilisé grâce à l'éthanol sont placés dans des piluliers en verre fermés hermétiquement qui sont alors ramenés au laboratoire pour analyse.



Figure 3. Méthode de prélèvement des échantillons archéologiques. DCM : dichlorométhane ; MeOH : méthanol.

2.2. Extraction, dérivation et analyse par GC-MS

Les cotons de prélèvement sont extraits (deux fois) au laboratoire avec un mélange de dichlorométhane (DCM) et de méthanol (MeOH) redistillés en rapport volumique 8/2. Après évaporation du solvant sous un flux d'argon, les extraits lipidiques ainsi obtenus sont ensuite pesés puis solubilisés dans du toluène. L'ajout de N,N-dimethylformamide diméthyle acétal (DMA/DMF) permet de méthyler les fonctions acides carboxyliques des acides terpéniques potentiellement présents dans les échantillons (3 h, 70 °C) afin de convertir ces composés polaires en composés apolaires compatibles avec des analyses par chromatographie gazeuse (GC). L'analyse par GC couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) a alors révélé la présence d'un certain nombre de dérivés possédant une fonction alcool (ce qui n'est généralement pas le cas lors de l'analyse d'ambre), ce qui nous a alors amenés à effectuer une étape supplémentaire de dérivation consistant à convertir les fonctions alcools en acétates correspondants. Tout comme dans le cas des acides, cette étape a pour but de rendre les dérivés de type alcools moins polaires et compatibles avec les analyses de GC-MS. Ainsi, les échantillons sont solubilisés dans un mélange de

pyridine et d'anhydride acétique (1:1 v/v). L'ensemble est chauffé à 60 °C pendant 2 h, puis l'excès de réactif est éliminé sous un flux d'argon.

Nom de l'échantillon	Provenance	Masse prélevée (mg)
CAP1	Appenwihr	0,6
CAP2	Appenwihr	2,3
CAP3	Appenwihr	2,7
CBP1	Bennwihr	1,8

Tableau 1. Quantités d'échantillon prélevées sur les perles sélectionnées

Les extraits méthylés et acétylés sont par la suite analysés par GC-MS. La partie chromatographie est réalisée au moyen d'un chromatographe en phase gazeuse de type Trace GC Ultra (Thermo Scientific) équipé d'un injecteur PTV (Programmed Temperature Vaporization) utilisé en mode "simili on column". La colonne utilisée est de type HP-5-MS (30 m x 0,25 mm ; 0,1 µm). Ce chromatographe est couplé à un spectromètre de masse triple quadripôle TSQ Quantum (Thermo Scientific) dont la source est utilisée en mode impact électronique (EI, 70 eV, balayage allant de 50 à 700 m/z). Le gaz vecteur est l'hélium et son débit est fixé à 1,1 ml/min. Le programme de température est le suivant : 70 °C durant 10 min, 70-200 °C (10 °C/min) ; 200-300 °C (4 °C/min) puis isotherme à 300 °C durant 30 min. L'ensemble est piloté par le logiciel Xcalibur 2.1 (Thermo Scientific) et le traitement des données se fait à l'aide du même logiciel. L'identification des différents composés est effectuée par comparaison des spectres de masse avec ceux de composés de références, de composés publiés dans la littérature ou de composés enregistrés dans la bibliothèque de spectres de masse NIST (National Institute of Standards and Technology).

2.3. Butanolyse des échantillons CAP3 et CBP1

Comme nous le verrons plus loin, les échantillons sont fortement dominés par des composés issus de produits de restauration, les composés propres à l'ambre luimême n'étant que minoritaires. Pour tenter de palier à ce problème, une étape d'hydrolyse acide (Butanol/HCI) a été mise en place, celle-ci ayant pour but de mettre en évidence de l'acide succinique (sous forme d'ester butylique). En effet, l'acide succinique est un composé très spécifique de l'ambre de la Baltique, et son identification dans des échantillons d'ambre permet de ce fait d'en identifier l'origine géographique. Ainsi, pour effectuer ce traitement, les échantillons CAP3 et CBP1 ont été solubilisés dans 1 ml de solution 1,33 N d'acide chlorhydrique (HCI) dans du *n*- butanol (BuOH). L'ensemble est ensuite chauffé à 90 °C durant 3 h. Après retour à température ambiante, les solvants sont éliminés avec un évaporateur rotatif. La fraction obtenue est ensuite analysée par GC-MS.

3. Résultats et Discussion

Dans le cas des quatre échantillons étudiés, les extraits lipidiques dérivés présentent en GC-MS des signatures moléculaires très proches. Celle de l'échantillon CAP 3 est représentée à titre d'exemple sur la Figure 4. Lors de l'analyse de ces distributions, une première source d'étonnement est venue du fait de la prédominance de composés élués en fin de chromatogramme, dans la zone entre 50 et 60 minutes (Fig. 4). En effet, d'après leur temps de rétention et leur spectre de masses, ceux-ci correspondent à des triterpènes, qui sont des composés issus d'Angiospermes, et que l'on ne s'attend pas à observer dans le cas d'ambres issus de conifères, comme dans le cas de l'ambre de la Baltique que l'on s'attendait à identifier au niveau de ces perles. Nous reviendrons plus loin sur l'étude détaillée de la distribution de ces triterpènes et sur leur probable origine.



Figure 4. Chromatogramme en phase gazeuse d'un extrait lipidique représentatif des quatre échantillons analysés (ici, échantillon CAP3 représenté). En vert : diterpènes dérivés de l'abiétane ; en violet : triterpènes. AA : dérivés de l'acide adipique. Les

symboles de forme ovale représentent des triterpènes dont la structure n'a pas été déterminée. Les acides sont analysés sous forme d'esters méthyliques et les alcools sous forme d'acétates

En ce qui concerne la possibilité d'ambre issu de conifères, l'examen détaillé des différents composés des extraits dérivés a permis de mettre en évidence quelques diterpènes mineurs, notamment des dérivés de l'abiétane (Fig. 4). Si la présence de ces composés atteste bien de la contribution d'une composante issue de conifères (Burger, 2008; Cox et al., 2007), il est toutefois impossible, sur ces bases, de déterminer de quel type d'ambre de conifère il pourrait s'agir, ou même si la présence de ces composés ne pourrait être liée à l'utilisation d'un matériau de type colophane utilisé dans le cadre d'une restauration.

Afin de trancher en faveur ou non d'une de ces possibilités, nous avons alors eu recours à une étape de traitement chimique des extraits, à savoir la butanolyse (cf. 2.3.). En effet, si l'on considère la possibilité que l'ambre analysé provienne de la région baltique -hypothèse plus que vraisemblable dans la mesure où à ce jour, tous les échantillons archéologiques alsaciens que nous avons étudiés ont montré une telle origine-, il suffirait de mettre en évidence de l'acide succinique dans ces échantillons (Poulin and Helwig, 2014). Dans la mesure où cet acide sert d'agent réticulant au niveau de la structure macromoléculaire de l'ambre de la Baltique, une étape d'hydrolyse de type butanolyse permet de libérer celui-ci sous forme d'ester butylique, qui peut être identifié lors d'une analyse par GC-MS (Fig. 5, Annexe 1 et Annexe 2).



Figure 5. (a) Structure macromoléculaire proposée pour l'ambre de la Baltique. Dans ce cas bien particulier d'ambre, les sous-unités diterpéniques sont notamment réticulées entre elles à l'aide de ponts de type « acide succinique ; (b) identification par GC-MS du succinate de butyle libéré par butanolyse des constituants macromoléculaires de l'ambre de la Baltique. Modifié d'après Schmitt (2019).

Nous avons alors réalisé cette étape de butanolyse à partir des échantillons CAP3 et CBP1, et l'analyse par GC-MS de l'extrait résultant de ce traitement nous a permis de mettre en évidence sans ambiguïté l'existence d'acide succinique (sous forme d'ester butylique) dans les deux cas (cf. Fig. 6, échantillon CBP représenté). Nous pouvons ainsi en déduire que les échantillons d'ambre étudiés correspondent bien à de l'ambre de la Baltique, en excluant de ce fait la possibilité de la présence de diterpènes liée à l'utilisation de colophane.



Figure 6. Chromatogramme en phase gazeuse de l'échantillon CAP3 après butanolyse. En vert : dérivés de l'abiétane (diterpènes) ; en violet : triterpènes. ; en rouge : acide succinique. AG : acides gras (16 et 18 carbones) Les symboles de forme ovale représentent des composés dont la structure n'a pas été déterminée. Les carrés noirs représentent des pollutions (plastifiants).

L'identification de l'origine baltique des perles en ambre des colliers d'Appenwihr et de Bennwihr étant établie, il se pose toutefois le problème lié à la présence prédominante de dérivés triterpéniques dans les extraits analysés, et l'hypothèse la plus probable à envisager est que cette contribution peut être rattachée à l'utilisation d'une résine d'Angiospermes utilisée dans le cadre d'une opération de restauration. Il existe en effet plusieurs résines d'Angiospermes potentiellement utilisées à cet effet dont l'élémi, le mastic et la résine de dammar qui en sont les principales (Fig.7 présentant une analyse de résine de dammar et Annexe 3 présentant une distribution caractéristique de résine d'Elemi). D'après la littérature et nos propres travaux effectués à partir de résines et mastics contemporains, la distribution des triterpènes identifiés à partir des échantillons du musée Unterlinden de Colmar se rapprocherait le plus d'une résine de type dammar, étant donné, notamment, la présence de dérivés tétracycliques de la série du dammarane (Fig.6, Burger, 2008; van der Doelen et al., 1998).



Figure 7 - Chromatogramme en phase gazeuse d'un échantillon de résine de dammar. En violet : triterpènes. Les fonctions alcools ont été acétylées et les fonctions acides ont été méthylées

L'hypothèse la plus plausible est donc que les échantillons ont été restaurés à l'aide d'une substance composée en partie de résine de dammar. De plus, la présence importante d'acides gras en C₁₆ et C₁₈ (Fig. 6) pourrait indiquer qu'une huile végétale a été ajoutée à la préparation (afin de la stabiliser, de la fluidifier, et/ou d'en augmenter la brillance ?). La présence de dérivés d'acide adipique (AA, Fig. 4) pourrait également entrer dans la composition du vernis utilisé pour la restauration, les dérivés (esters) de

Annexes

l'acide adipique étant fréquemment utilisés comme régulateurs de pH dans les préparations et comme stabilisateurs en cosmétique. Enfin, lors de l'échantillonnage, nous avions observé que le collier provenant de Bennwihr présentait une brillance très marquée, très certainement liée à l'utilisation, outre celle de la résine de dammar, d'un vernis pour la restauration. Il est à noter à ce propos que cet aspect brillant est très probablement dû à une composante chimique de nature polymérique dont la structure ne peut être identifiée par le type d'approche moléculaire que nous avons mis en œuvre.

Conclusion

L'analyse a permis de mettre en évidence l'origine baltique des perles en ambre, malgré une couche épaisse de vernis de restauration dont les constituant masquaient en grande partie les composés propres à l'ambre. Cette analyse a aussi permis de déterminer la composition des produits (ou, tout au moins, une partie des produits) utilisés pour la restauration des colliers en ambre, à savoir de la résine de dammar associée à une huile végétale et éventuellement des stabilisateurs divers comme des dérivés de l'acide adipique. Dans le cas de l'échantillon de Bennwihr, une substance polymérique non identifiable par notre approche a sans doute été utilisée. L'identification de cette dernière pourrait être établie à l'aide d'études complémentaires mettant en œuvre une méthode telle que la pyrolyse-GC-MS, notamment.

Références bibliographiques

Anderson, K.B., 1995. Amber, Resinite, and Fossil Resins. American Chemical Society.

Bohlmann, J., Croteau, R., 1999. Diversity and Variability of Terpenoid Defences in Conifers: Molecular Genetics, Biochemistry and Evolution of the Terpene Synthase Gene Family in Grand Fir (Abies Grandis), in: Chadwick, D.J., Goode, J.A. (Eds) Novartis Foundation Symposium 223 - Insect–Plant Interactions and Induced Plant Defence. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 132–146. https://doi.org/10.1002/9780470515679.ch9

Burger, P., 2008. Caractérisation moléculaire de résines végétales archéologiques et actuelles : étude de résines de Diterocarpacées (Thèse de doctorat). Université de Strasbourg, France.

Cox, R.E., Yamamoto, S., Otto, A., Simoneit, B.R.T., 2007. Oxygenated di- and tricyclic diterpenoids of southern hemisphere conifers. Biochemical Systematics and Ecology 35, 342–362. https://doi.org/10.1016/j.bse.2006.09.013

Czechowski, F., Simoneit, B.R.T., Sachanbiński, M., Chojcan, J., Wołowiec, S., 1996. Physicochemical structural characterization of ambers from deposits in Poland. Applied Geochemistry 11, 811–834. https://doi.org/10.1016/S0883-2927(96)00046-7

Diefendorf, A.F., Freeman, K.H., Wing, S.L., 2012. Distribution and carbon isotope patterns of diterpenoids and triterpenoids in modern temperate C3 trees and their geochemical significance. Geochimica et Cosmochimica Acta 85, 342–356. https://doi.org/10.1016/j.gca.2012.02.016

Jehl, M., Bonnet, C., 1968. La pyxide d'Appenwihr (Haut-Rhin). Gallia - Fouilles et monuments archéologiques en France métropolitaine 26, 295. https://doi.org/10.3406/galia.1968.2500

Lambert, J.B., Santiago-Blay, J.A., Anderson, K.B., 2008. Chemical Signatures of Fossilized Resins and Recent Plant Exudates. Angewandte Chemie International Edition 47, 9608–9616. https://doi.org/10.1002/anie.200705973

Langenheim, J.H., 2003. Plant Resins: Chemistry, Evolution, Ecology, and Ethnobotany. Timber Press.

Menor-Salván, C., Najarro, M., Velasco, F., Rosales, I., Tornos, F., Simoneit, B.R.T., 2010. Terpenoids in extracts of Lower Cretaceous ambers from the Basque-Cantabrian Basin (El Soplao, Cantabria, Spain): Paleochemotaxonomic aspects. Organic Geochemistry 41, 1089– 1103. https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2010.06.013

Nakamura, H., Sawada, K., Takahashi, M., 2010. Aliphatic and aromatic terpenoid biomarkers in Cretaceous and Paleogene angiosperm fossils from Japan. Organic Geochemistry, Advances in Organic Geochemistry 2009 41, 975–980. https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2010.03.007

Nouvelle salle d'archéologie : focus sur les urnes funéraires de Bennwihr, 2020. . Musée Unterlinden. URL https://www.musee-unterlinden.com/bennwihr/ (accessed 7.5.23).

Poulin, J., Helwig, K., 2014. Inside Amber: The Structural Role of Succinic Acid in Class Ia and Class Id Resinite. Anal. Chem. 86, 7428–7435. https://doi.org/10.1021/ac501073k

Schmitt, S., 2019. Analyse moléculair d'échantillons d'ambres géologiques et archéologiques : origines botaniques et géographiques.

van der Doelen, G.A., van den Berg, K.J., Boon, J.J., Shibayama, N., René de la Rie, E., L. Genuit, W.J., 1998. Analysis of fresh triterpenoid resins and aged triterpenoid varnishes by high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionisation (tandem) mass spectrometry. Journal of Chromatography A 809, 21–37. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00186-1

Yamamoto, S., Otto, A., Krumbiegel, G., Simoneit, B.R.T., 2006. The natural product biomarkers in succinite, glessite and stantienite ambers from Bitterfeld, Germany. Review of Palaeobotany and Palynology 140, 27–49. https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2006.02.002




Annexe 1. Chromatogramme en phase gazeuse d'un ambre de la baltique (en bleu les dérivés du pimaranes, en vert les dérivés de l'abiétane et en rouge les dérivés de l'acide succinique). Les ovales représentent des composés dont la structure n'est pas explicitée ici. Les fonctions alcools ont été acétylées et les fonctions acides ont été méthylées.



Annexe 2 . Chromatogramme en phase gazeuse d'une butanolyse d'un ambre de la Baltique (en rouge les dérivés de l'acide succinique). Les fonctions alcools ont été acétylées et les fonctions acides ont été méthylées.



Annexe 3. Chromatogramme en phase gazeuse d'une résine d'Elemi (Burseracée). Les fonctions alcools ont été acétylées et les fonctions acides ont été méthylées.

RAPPORT D'ANALYSE



Analyses moléculaires d'ambres archéologiques du musée historique de Haguenau

Age du bronze – Age du Fer

Fradet Alice, Pierre Adam et Philippe Schaeffer

Equipe de Biogéochimie Moléculaire / UMR 7177 / Université de Strasbourg | 2022

Introduction

L'ambre, un matériau organique semi-précieux

L'ambre est un matériau relativement rare d'origine organique de couleur jaune à rouge, opaque ou transparent. C'est un matériau semi-précieux, voir précieux et possède une dimension économique dès le Néolithique. En effet, des centaines de sites archéologique présentent des objets en ambre dans toute l'Europe que ce soit pour des pratiques ornementales (bracelets, parures) ou religieuses (statuettes).

Il est retrouvé la plupart du temps de façon allochtone le long des cours d'eau et des plages. En Europe, notamment, les plages autour de la Baltique sont les principales sources d'ambres. Le mot ambre provient notamment de l'arabe "anbar" qui désigne initialement l'ambre gris (concrétion sécrétée par l'intestin des cachalots). L'ambre gris et jaune étaient souvent confondus malgré leurs origines différentes car les deux étaient retrouvés le plus souvent en bord de plage. L'ambre peut aussi être retrouvé de façon autochtone dans des sédiments riches en fossiles et les charbons. On en trouve dans de nombreux sites d'Europe (Menor-Salván et al., 2010; Nohra et al., 2015; Teodor et al., 2010; van der Werf et al., 2016; Wolfe et al., 2016). Il existe aussi quelques sites en Asie comme par exemple en Birmanie dont les sites sont connus pour leur grand nombre d'inclusions fossilifères (Neubauer et al., 2019; Xing et al., 2020; Xing and Qiu, 2020). Il existe aussi quelques sites connus en Amérique et ils sont souvent associés à des sites fossilifères (Grimaldi, 2009; Langenheim, 1990; Langenheim and Beck, 1968; Pereira et al., 2009; Solórzano Kraemer, 2010).

Le plus vieux site contenant de l'ambre est situé dans l'Illinois (Etats-Unis) et est daté de 320 millions d'années soit du Carbonifère (Bray and Anderson, 2009). Quelques sites sont recensés durant le carbonifère, essentiellement en Angleterre et aux Etats-Unis (Langenheim, 2003; van Bergen et al., 1996). Durant le Mésozoïque, le nombre de site recensés augmente et notamment durant le Crétacé où une explosion du nombre de site d'ambre en termes de quantité de matériel et de localités est observée. Par exemple, en Espagne, il existe plus de 120 gisements dont plus de la majorité sont datés du Crétacé et plus particulièrement de l'Albien (Penney, 2010). Il existe quelques sites durant le Cénozoïque comme par exemple les sites présents au Nyanmar (Miocène et Eocène), les sites dans l'Oise en France, et les sites autour de la Baltique (Langenheim, 2003).

L'âge des ambres s'explique par le fait que celui-ci dérive de la fossilisation de résines exsudées par des arbres, le plus souvent des conifères (Anderson, 1995; Otto et al., 2007)

Dans *Plant resin* (Langenheim, 2003), une résine est définie comme "un mélange lipidique soluble de composés volatiles ou non, de type terpénoïdes ou phénoliques sécrétées par des parties spécialisées de la plante", celle-ci possède une signature moléculaire dominée par des



Unité terpénique Unité phénolique

composés issus d'unités terpéniques en C5 (Fig.1), les terpénoïdes (Fig.2).

Figure 1 – Présentation des sous-unités principales constituants les composés présents dans les résines



Figure 2- Principales familles de terpènes présentes dans les résines et les ambres

Ces composés sont issus du métabolisme secondaire de la plante et peuvent être hautement spécifiques. Il existe plusieurs types de terpènes : les monoterpènes en C10, les sesquiterpènes en C15, les diterpènes en C20 et les triterpènes en C30 (Langenheim, 2003)(Langenheim, 2003 ; Bailly, 2015). Les proportions des différents types composés terpéniques varient en fonction de la famille botanique dont la résine est issue. Par exemple chez les conifères, ce sont les diterpènes en C20 qui sont majoritaires (Czechowski et al., 1996 ; Lambert et al., 2008 ; Ménor-Salvan, 2010 ; Otto et al., 2008). Chez les plantes à fleurs, aussi appelées Angiospermes, ce sont les triterpènes en C30 qui sont dominants (Yamamoto et al., 2006).

Lors de l'enfouissement de la résine exsudée, les unités sesquiterpéniques et diterpéniques présentes dans la résine se condensent et polymérisent (Lambert, et al., 2008). Une partie des composés volatils est perdue par évaporation (Fig.3)



Figure 3- Processus de fossilisation de la résine (d'après Pastorelli et al, 2009)

La composition moléculaire d'un ambre diffère cependant de la composition de la résine correspondante. En effet, la diagénèse peut modifier les molécules initiales par des processus de perte de carbone, cyclisation etc. Ces processus sont néanmoins souvent connus et il est donc possible à partir d'une étude moléculaire d'un ambre de remonter à la composition totale ou partielle de la résine à l'origine de celui-ci. Les terpènes étant issus du métabolisme secondaire spécifique à chaque genre et famille de plante, il est donc théoriquement possible d'identifier la source botanique de chaque ambre à partir de l'identification de ses composés. Un type d'ambre étant restreint dans le temps et l'espace, il est possible d'identifier en même temps que la source botanique, la source géographique d'un échantillon d'ambre trouvé, par exemple, dans un contexte archéologique.

L'étude présente se place donc dans cet objectif de remonter à l'origine géographique d'un ambre archéologique à partir de son étude moléculaire en chromatographie à phase gazeuse couplée à de la spectroscopie de masse (GC-MS). Les ambres archéologiques etant des objets précieux, une nouvelle méthode d'étude permettant un prélèvement le moins invasif possible a été utilisée. Les ambres étudiés dans cette étude proviennent tous des collections de l'âge du Bronze et du Fer du musée Historique de Haguenau (Bas-Rhin). Pour chaque période, une dizaine d'objets ont été analysés provenant de parures et sépultures différentes afin d'avoir une image la plus complète des sources d'ambres utilisées.

Matériel et méthodes

1. Protocole expérimental d'extraction

Les échantillons ont été extraits selon une méthode commune consistant au frottement de la surface des ambres analysés par un coton imbibés d'éthanol. Cette méthode permet de limiter les quantités prélevées (généralement entre 0,5 et 5 mg) et de sélectionner de façon



Figure 4- (a) Etapes du protocole expérimental permettant l'extraction des ambres ; (b) photographie de l'extraction de la perle 657-3.

précise l'endroit du prélèvement sur l'objet archéologique (partie non visible, cassure, etc.) afin de l'altérer le moins possible. Au moins deux cotons ont été utilisé par échantillon (Fig.4)

2. Préparation des échantillons

Les cotons sont ensuite extraits avec un mélange de dichlorométhane (DCM) et de méthanol (MeOH) de rapport 3/1. Les extraits lipidiques (TLE) obtenus sont ensuite pesés (tableau 1 et 2).

Echantillon	Masse du TLE	Echantillon	Masse du TLE	Echantillon	Masse du TLE
	(mg)		(mg)		(mg)
657-3-15 ?	24.4	N376	0.9	N543a-2	1,0
N97b	0.9	234-1-a	0.1	657-3-14	2.5
N528b-3	1,0	234-1-с	0.8	657-3-15	6,0
N617a-1	4.6	N614-b-3	0.9	657-3-23	1.8
N617a-6	2,0	N614-2	0.5	N617a	6.1

Tableau 1 - Masse des extraits lipidiques (TLE) obtenus pour les perles d'ambres de l'âge du Bronze

Echantillon	Masse	Echantillon	Masse du	Echantillon	Masse
	du TLE		TLE (mg)		du TLE
	(mg)				(mg)
N320c intérieur	0,8	N12 poudre	20,2	N343 b,c/1,2,3	1,3
				N343c-2	
N320c extérieur	11,0	N168g-1	2,2	N347 c-3	12,9
N169g poudre	0,6	N168g-2	3,3	N677b intérieur	15,7
N169g extérieur	2,4	N429b/429-1	4,1	N677b extérieur	4,0
N90c extérieur	12,3	N171a morceaux	8,5	N305 intérieur	1,4
N90c adhésif	1,2	N171a bis	2,3	N305 extérieur	1,2

Tableau 2 – Masse des extraits lipidiques (TLE) obtenus pour les perles d'ambres de l'âge de Fer

Les TLE obtenus sont situés entre 0,1 et 24 mg pour une moyenne de 4,8 et un écart type de 6,01. Les masses importantes s'expliquent par l'ajout de petits éclats qui ne pouvait pas être restaurés.

Après cette extraction, les acides présents dans les échantillons méthylés. Cela permet de les rendre moins polaire et ainsi compatible au passage en GC-MS (Fig.5).



Figure 5 – Méthylation des acides

La méthylation se réalise par réaction de l'extrait organique avec le diméthyl-acétal (DMA/DMF) dans le toluène. Après chauffage à 70°C pendant 3h, le solvant et le réactif sont éliminés sous pression réduite.

Les extraits organiques méthylés les plus abondants (m> 10 mg) ont ensuite été fractionnés sur une colonne de silice. Une première fraction apolaire est éluée avec trois volumes mort de DCM:Acétate d'éthyl (8:2). Une fraction polaire est ensuite récupérée avec deux volumes morts de DCM:Methanol (3:1). Cette fraction contient la partie macromoléculaire des ambres et n'est donc pas analysable par GC-MS.

L'ensemble des échantillons à la suite de l'extraction, sont resolubilisés dans l'acétate d'éthyle.

3. Analyse des échantillons

Une fois méthylés, les échantillons sont tout d'abord analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID). Cette étape permet de connaître la concentration des échantillons et de l'ajuster afin de pouvoir détecter les molécules sans saturer par la suite le spectromètre de masse. Ces analyses ont été effectuées sur un appareil Helwlett Packard HP 6890 Series GC system équipé d'un injecteur on-column et d'une colonne capillaire HP-5 (30 m x 0,32 mm ; 0,25 µm) Le gaz vecteur utilisé est l'hydrogène avec un débit constant de 3,2 mL/min. Le programme de température du four est le suivant : 70-200°C (10 °C/min) ; 200-300°C (4°C/min) avec ensuite l'isotherme à 300°C durant 40 min.

Une fois les concentrations des échantillons déterminées, ceux-ci sont analysés par GC-MS. Les analyses ont été réalisée en impact électronique (EI, 70 eV, balayage allant de 50 m/z à 700 m/z) avec un spectromètre triple quadripôle TSQ Quantum (Thermo Scientific) couplé à un chromatographe Trace GC Ultra (Thermo Scientific) équipé d'un injecteur PTV (Programmed Temperature Vaporization) en mode "simili on column" et d'une colonne de type HP-5 MS (30 m x 0,25 mm ; 0,1 \$\mu m\$).

L'ensemble des analyses a été traité via le logiciel Xcalibur (Thermo Scientific). L'identification des différentes structures s'est réalisée par comparaison avec des spectres de masse de la bibliothèque moléculaire NIST (National Institute of Standards and Technology) et sur la base de l'interprétation du mode de fragmentation en spectrométrie de masse.

résultats et discussion

1. L'origine baltique des échantillons

L'ensemble des échantillons, des deux époques étudiées, présentent presque 80% de molécules en commun. La figure 6 présente deux échantillons représentatifs de la collection de l'âge de Bronze (N617a) et de l'âge de Fer (N171a) étudiées.



Fig. 6 – Chromatogrammes à phases gazeuses de (A) l'échantillon N617a (âge de Bronze) et (B) l'échantillon 171a (âge de
Fer). En rouge les succinates, en bleus les dérivés pimaranes et en vert les dérivés abiétanes.

Trois grandes familles de terpènes sont identifiées dans l'ensemble des échantillons. Des composés de la série pimarane sont présents dans l'ensemble des échantillons et sont parfois même majoritaire dans certains d'entre eux. P1 et P2 sont les composés dominants dans cette série. Des composés de la série de l'abiétane avec l'acide déhydroabiétique (D11) majoritaire sont aussi présents dans l'ensemble des échantillons. Dans certains échantillon cette série est plus importante que la série pimarane. Certains échantillons possèdent aussi une dernière famille de diterpène, les labdanoïdes, en faible quantité (Fig.6.B). Par ailleurs, les composés

les plus notables dans les molécules identifiées sont les succinates ou dérivés d'acides succiniques. En effet, on observe dans l'ensemble des échantillons la présence des molécules E1, E2 et E3 (Czechowski et al., 1996) qui sont même parfois majoritaires dans certains échantillons. Les proportions des succinates entre eux ne varient cependant pas entre les différentes perles d'ambres étudiées.

Les séries du pimarane et de l'abiétane sont des familles de diterpènes qui se retrouvent très souvent chez les conifères, et, dans ces proportions, plus précisément chez les Pinacées (Mosini et Samperi, 1985). Cependant la présence de succinates est assez remarquable. Les succinates dans les ambres correspondent à des mono et diesters d'acides succiniques d'alcools monoterpéniques ou d'acides diterpéniques (Mills et al., 1984 ; Czechowski et al, 1996 et Yamamoto et al., 2006). Ils ont été pour la première fois mis en évidence dans les **ambres de la Baltique.** La formation de ces succinates n'est associée, en Europe, qu'à une seule espèce de conifère de l'Eocène de la famille des Sciadopithyacées, un groupe de conifères proche des Cupressacées s.I (Wolfe et al., 2009). Cette affiliation ne se base pas sur les critères chimiques mais uniquement sur des critères polliniques et l'analyse des inclusions botaniques dans les ambres de la Baltique.

Aucun autre site répertorié en Europe ne produit d'ambre contenant des succinates. Même si actuellement on comptabilise quelques espèces de pinacées pouvant former des succinates, ces composés restent extrêmement rares et sont donc des **biomarqueurs robustes** des ambres de la Baltique (Jiang et al, 2022 ; Xue et al, 2004).

L'ensemble des échantillons provient donc bien des plages en bordure de la Baltique. Cependant, le site géologique associé à la Baltique étant large, il est impossible d'être géographiquement plus précis.

2. Variabilité des proportions entre les différentes familles moléculaires

Malgré leur ressemblance forte, il existe une certaine variabilité dans les distributions moléculaires des différents échantillons étudiés quelle que soit la période considérées (Fig.7





Figure 7 – Comparaison des distributions moléculaires de quatre échantillons de l'âge de Bronze : N617A, N528b-3, N376, N2341-A. Ces échantillons d'ambres sont issus de parures et sépultures différentes.

Les proportions des séries changent d'échantillons en échantillons. Par exemple, les succinates E1, E2 et E3 sont soit le groupe minoritaire comme dans les échantillons N617a, N528 et N347-3, soit c'est le groupe majoritaire comme dans les échantillons N677b, 234 1a. Il semble que la quantité de composés dérivés de la série pimaranes est inversement proportionnelle à la quantité de succinates. En effet, les composés de la série pimaranes sont majoritaires lorsque les succinates sont minoritaires. Dans les composés de la série abiétane, il semble que le D11 ou l'acide déhydroabiétique reste toujours la molécule principale de la série. Les composés dérivés de la série de l'abietane sont quant à eux, proportionnel à la quantité de succinates (Fig.7 et 8).

Ces variations de proportions peuvent s'expliquer par deux phénomènes : une variabilité chimique de la source botanique elle-même ou une différence d'altération entre les différents échantillons. En effet, la diagenèse et l'altération peuvent modifier la structure des molécules (cyclisation, perte de carbone, perte de doubles liaisons) et dans certains cas provoquer la perte de certains composés. L'altération étant principalement due au lessivage, l'hydrolyse,



celle-ci est donc plus forte dans les objets dont le rapport surface/volume est important. *Figure 8* – Comparaison de trois échantillons de l'âge de Fer : N171A, N347-3, N677B. Les échantillons appartiennent à des parures différentes. La zone rouge correspond à la zone des succinates, (E1,E2 et E3), la zone verte correspond à la zone comprenant la série pimaranes et la zone verte correspond à la série abiétane.

Pour vérifier les deux hypothèses, un ensemble d'échantillons d'ambre de la Baltique ont été analysés, en séparant les cœurs, logiquement moins altérés, des croûtes des ambres étudiés. Il s'avère qu'au seins des cœurs ou des croûtes d'ambre de la Baltique, il existe peu de variabilité chimique et les variabilités visibles concernent uniquement quelques molécules. L'hypothèse d'une variabilité due à la source botanique est donc écartée. Cependant, lorsque l'on compare une analyse un cœur d'ambre de gros volume logiquement peu altéré et un ambre de faible volume logiquement très altéré, les mêmes variations de proportions des familles moléculaires sont observées (Fig.10).



Figure 1 – (A) Chromatogramme en phase gazeuse de la fraction apolaire d'un cœur d'ambre de la Baltique. (B) Chromatogramme en phase gazeuse de la fraction apolaire d'un ambre

L'ambre altérée présente des rapports succinates/pimaranes et abiétanes/pimaranes beaucoup plus important que ceux des cœurs d'ambres. Il semble donc qu'une altération plus ou moins importante explique les variations de proportions entre les échantillons.

3. Les restaurations et leur influence sur les distributions moléculaires

Certains échantillons de l'âge de Fer (N168, N169, N320c, N347c-2, N677, N90c), et l'échantillon N543 (âge de Bronze) présentent une proportion importante d'acides gras et d'alcanes. En parallèle, ceux-ci montrent une présence très importante de l'acide déhydroabiétique (D11) par rapport à la série des succinates qui est comparable dans les autres échantillons. On observe deux types d'échantillons. Les échantillons N543 et N169 par exemple sont un premier type et présentent en fin de chromatogramme des triterpènes de la famille des dammaranes (Fig.12). Ces molécules sont typiques d'un type de résine servant à la restauration : la résine de dammar (Dewick, 2002, Malick et al, 2014). C'est une résine



Temps de rétention (min)

d'Angiospermes de la famille des Diterocarpacées et est donc composée principalement de triterpènes (Burger, 2009). Ce type de résine est donc facilement identifiable sur des ambres de conifères qui ne possèdent pas de triterpènes.

Figure 11- Chromatogramme à phase gazeuse de l'échantillon N543 (âge de Bronze). La zone violette correspond à la zone des triterpènes.

La deuxième catégorie présente aussi des acides gras et alcanes mais par contre aucun triterpène. Il est de plus caractérisé par une augmentation de l'acide déhydroabiétique (D11). L'échantillon N90c présente une zone brillante ressemblant à du vernis. Cette zone a donc été analysé à part pour tenter de caractériser le vernis utilisé sur le deuxième type de perle (Fig.12). Cette analyse a été comparée à celle de la perle en dehors de la zone brillante apparemment vernie. Cela a permis de mettre en évidence que la zone vernie possédait une plus grande proportion d'acides gras et d'acide déhydroabiétique qu'en dehors de la zone. De plus, l'échantillon présente la présence de molécules typiquement anthropiques comme les phtalates qui sont probablement des polluants dus à la conservation dans des sachets plastifié. L'augmentation de la série abiétique dans ces échantillons pourrait s'expliquer par la présence de colophane. En effet, la colophane est la fraction solide et non volatile obtenu après distillation d'une résine, souvent du genre *Pinus*. Il est utilisé fréquemment comme adhésif et vernis (Baldwin, 1958 ; Wang et al, 2018). La colophane possède une fraction diterpénique semblable à celle de la résine dont elle est issue (ici probablement *Pinus pinaster*) avec une grande quantité d'acide abiétique. L'utilisation de colophane pourrait expliquer la quantité importante de la série abiétique dans ces échantillons. Cependant, la présence unique de colophane n'expliquerait pas l'observation des acides gras dans les différents échantillons cités ci-dessus. L'hypothèse la plus probable est que la colophane ait été couplée avec une huile (Francès, 2019).

4. Différences entre les différents échantillons entre les deux périodes

Quelques différences moléculaires sont visibles entre les deux périodes. Celles-ci concernent essentiellement les restaurations. En effet, parmi les perles de l'âge de Bronze étudiées seule une semble présenter une restauration alors que dans les perles de l'âge de Fer, il en existe une proportion non négligeable. De plus, il semble de la restauration par utilisation de résine



de dammar soit minoritaire. En effet, celle concernant la résine semble concerner

Figure 12 – Présentation de l'échantillon N90c avec en haut la zone brillante apparemment vernie et en bas la zone moins brillante.

Essentiellement les colmatages de brèche dans les ambres. Les principales restaurations sont à base de vernis contenant de la colophane et une huile végétale. Ces restaurations seraient probablement plus de nature esthétique.

Conclusion

Les deux études réalisées au musée historique de Haguenau semblent dégager plusieurs conclusions. Tout d'abord, la méthode de prélèvement mise en place semble efficace, peu invasive et peu consommatrice de matériel archéologique. Une analyse moléculaire a ainsi pu être réalisée pour chacun des échantillons étudiés malgré les très faibles quantités prélevées. Ces études ont permis de montrer de façon robuste l'origine Baltique des ambres étudiées et indiquent donc que dès l'âge de Bronze, les perles et objets en ambres proviennent de cette région. Cette approche a donc permis en l'absence de traces écrite de déterminer l'origine des ambres. Finalement, l'analyse moléculaire a également montré la mise en œuvre de procédures de restauration pour une partie des échantillons d'ambre étudiés soit dans un but de consolidation (utilisation de résine de dammar) ou dans un but purement esthétique (utilisation de vernis à base d'huile végétale et de colophane). La présence de substances organiques ayant servi à la restauration des ambres et les différences significatives de niveau d'altération subis par les ambres n'ont pas empêché la détermination de leur origine. En effet, les constituants moléculaires originaux des ambres et ceux des substances ayant servi à la restauration sont en grande partie distincts et spécifiquement reconnaissables. A cet égard, la détermination de l'origine d'échantillons d'ambres à l'aide de méthodes globales comme la spectroscopie infrarouge semble plus difficile dans le cas d'échantillons contaminés par des substances ayant servi à la restauration ou très altérés

Bibliographie :

Anderson, K.B., 1995. Amber, Resinite, and Fossil Resins. American Chemical Society.

Bray, P.S., Anderson, K.B., 2009. Identification of Carboniferous (320 Million Years Old) Class Ic Amber. Science 326, 132–134. https://doi.org/10.1126/science.1177539

Grimaldi, D., 2009. Pushing Back Amber Production. Science 326, 51–52. https://doi.org/10.1126/science.1179328

Langenheim, J.H., 2003. Plant Resins: Chemistry, Evolution, Ecology, and Ethnobotany. Timber Press.

Langenheim, J.H., 1990. Plant Resins. American Scientist 78, 16-24.

Langenheim, J.H., Beck, C.W., 1968. CATALOGUE OF INFRARED SPECTRA OF FOSSIL RESINS (AMBERS) I NORTH AND SOUTH AMERICA. Botanical Museum Leaflets, Harvard University 22, 65–120.

Menor-Salván, C., Najarro, M., Velasco, F., Rosales, I., Tornos, F., Simoneit, B.R.T., 2010. Terpenoids in extracts of Lower Cretaceous ambers from the Basque-Cantabrian Basin (El Soplao, Cantabria, Spain): Paleochemotaxonomic aspects. Organic Geochemistry 41, 1089–1103. https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2010.06.013

Neubauer, T.A., Páll-Gergely, B., Jochum, A., Harzhauser, M., 2019. Striking case of convergence — Alleged marine gastropods in Cretaceous Burmese amber are terrestrial cyclophoroids. Comment on Yu et al. Palaeoworld, Virtual Palaeontology: when fossils reconstructed by X-ray tomography 28, 572–575. https://doi.org/10.1016/j.palwor.2019.05.015

Nohra, Y.A., Perrichot, V., Jeanneau, L., Le Pollès, L., Azar, D., 2015. Chemical Characterization and Botanical Origin of French Ambers. J. Nat. Prod. 78, 1284–1293. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00093

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. https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2007.00638.x

Penney, D., 2010. Biodiversity of Fossils in Amber from the Major World Deposits. Siri Scientific Press.

Pereira, R., Carvalho, I. de S., Simoneit, B.R.T., Azevedo, D. de A., 2009. Molecular composition and chemosystematic aspects of Cretaceous amber from the Amazonas, Araripe and Recôncavo basins, Brazil. Organic Geochemistry 40, 863–875. https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2009.05.002

Solórzano Kraemer, M.M., 2010. Mexican amber. pp. 42-56.

Teodor, E.S., Teodor, E.D., Virgolici, M., Manea, M.M., Truică, G., Liţescu, S.C., 2010. Nondestructive analysis of amber artefacts from the prehistoric Cioclovina hoard (Romania). Journal of Archaeological Science 37, 2386–2396. https://doi.org/10.1016/j.jas.2010.04.011

Van Bergen, P.F., Collinson, M.E., Scott, A.C., de Leeuw, J.W., 1996. Unusual Resin Chemistry from Upper Carboniferous Pteridosperm Resin Rodlets, in: Amber, Resinite, and Fossil Resins, ACS Symposium Series. American Chemical Society, pp. 149–169. https://doi.org/10.1021/bk-1995-0617.choo8

Van der Werf, I.D., Fico, D., De Benedetto, G.E., Sabbatini, L., 2016. The molecular composition of Sicilian amber. Microchemical Journal 125, 85–96. https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.11.012

Wolfe, A.P., McKellar, R.C., Tappert, R., Sodhi, R.N.S., Muehlenbachs, K., 2016. Bitterfeld amber is not Baltic amber: Three geochemical tests and further constraints on the botanical affinities of succinite. Review of Palaeobotany and Palynology 225, 21–32. https://doi.org/10.1016/j.revpalb0.2015.11.002

Xing, L., McKellar, R.C., O'Connor, J.K., 2020. An unusually large bird wing in mid-Cretaceous Burmese amber. Cretaceous Research 110, 104412. https://doi.org/10.1016/j.cretres.2020.104412

Xing, L., Qiu, L., 2020. Zircon UPb age constraints on the mid-Cretaceous Hkamti amber biota in northern Myanmar. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 558, 109960. https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2020.109960

Caractérisation moléculaire d'ambres géologiques et

archéologiques : origines botaniques et

géographiques

Résumé

Les travaux de cette thèse comprennent deux volets dédiés à l'étude moléculaire d'ambres issus de formations géologiques et trouvés en contexte archéologique. Le premier volet, d'ordre paléobotanique, vise à établir une corrélation entre les signatures moléculaires d'ambres et leurs sources botaniques. Un référentiel moléculaire d'ambre de différents sites européens et méditerranéens a ainsi été établi. Cette étude a notamment permis de proposer une typologie moléculaire pour les ambres de Cheirolepidiacées, une famille éteinte de conifères, et de mettre en évidence une nouvelle famille de composés organo-soufrés en tant que marqueurs environnementaux. Dans le second volet, une méthode permettant le prélèvement et l'analyse de très petits échantillons a été développée et utilisée dans le cas d'ambres archéologiques afin d'en déterminer l'origine géographique. Cette étude a mis en évidence l'origine baltique d'un grand nombre d'échantillons de l'Age du Fer et du Bronze, l'origine plus locale d'échantillons plus anciens et d'identifier la nature de matériaux utilisés pour des opérations de restauration dans le cas d'ambre de collections de musées.

Mots clés : Ambre, Biomarqueurs lipidiques, GC-MS, Archéologie, Paléobotanique, Terpénoïdes, Conifères, Angiospermes

Abstract

This PhD thesis, which comprises two main parts, is dedicated to the molecular study of geological ambers and ambers found in an archaeological context. The first palaeobotanical part is related to palaeobotany and aims at establishing a correlation between the molecular signatures of ambers and their botanical origin. A molecular referential of ambers from various European and Mediterranean sites could thus be established. A molecular typology for ambers derived from Cheirolepidiaceae, an extinct family of conifers, could also be proposed and a novel series of organo-sulfur compounds with a palaeoenvironmental significance was identified. In the second part of the thesis, a method for sampling and analysing very small-scale samples was developed and used for rare archaeological ambers to determine their geographical origin. This study revealed a Baltic origin for many samples from the Iron Age and Bronze Age and the more local origin of some older samples. The nature of substances used in restoration operations of some objects from museum collections could also be identified.

Keywords : Amber, Lipid Biomarkers, GC-MS, Archeology, Paleobotany, Terpenoids, Conifers, Angiosperms