

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Institut de Chimie de Strasbourg – UMR 7177

THÈSE présentée par :
Julien PERTHUISON

soutenue le : **7 mai 2020**

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

Discipline/ Spécialité : Chimie Analytique

**Préparation et vieillissement de
matières organiques en contexte
archéologique : approche analytique et
expérimentale**

THÈSE dirigée par :

M. ADAM Pierre

Directeur de recherche CNRS, Université de Strasbourg

M. SCHAEFFER Philippe

Directeur de recherche CNRS, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme LATTUATI-DERIEUX Agnès

Ingénieure de recherche, C2RMF

M. GROSSI Vincent

Directeur de recherche CNRS, Université Claude Bernard

« La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. Ici, nous avons réuni théorie et pratique :

Rien ne fonctionne... et personne ne sait pourquoi ! »

Albert Einstein

A ma grand-mère, qui serait contente d'apprendre que son petit-fils a enfin terminé ses études et qu'il a suivi les traces de sa mère, première alien de la famille à avoir fait une thèse.

Remerciements

Ce travail de thèse n'aurait pas pu aboutir sans mes deux directeurs de thèse, le Dr Pierre Adam et le Dr Philippe Schaeffer. Ils ont su m'apporter, pendant plus de trois ans, leur incroyable savoir, se montrer disponible à tout heure pour la moindre question, mais également m'aider à me canaliser quand cela s'avérait nécessaire. Grâce à eux, ma mentalité et mes méthodes de travail ont évolué, et pour cela je tiens à leur adresser toute ma reconnaissance.

Mes remerciements vont également au Dr Agnès Lattuati-Derieux et au Dr Vincent Grossi qui ont accepté, sans hésitation, de juger ce travail de thèse.

J'adresse aussi mes remerciements à l'ensemble des archéologues, acteurs majeurs de ma thèse, pour m'avoir fait confiance et m'avoir ainsi fourni de nombreux échantillons à étudier. A cet égard, je remercie particulièrement Mmes Fanny Chenal (INRAP), Pauline Debels (Doctorante de l'université Paul Valéry Montpellier 3), Delphine Minni (INRAP), M. Eric Boës (INRAP), le Dr Michael Flecker (ISEAS) et M. Philippe Galant (DRAC d'Occitanie).

Je remercie particulièrement Mme Estelle Motsch pour son aide, plus qu'importante, sur les différentes techniques instrumentales que j'ai utilisées tout au long de ma thèse, mais également pour sa sympathie, pour nos discussions du midi, et pour ses savoureux bredele ou bredala.

Un énorme merci au Dr Gaël Martin, et à Mme Yu Min Kiw, autrefois doctorant pour le premier, et actuelle doctorante pour la seconde de mon laboratoire d'accueil, pour avoir partagé avec moi de forts moments.

Je ne saurais oublier de remercier le Dr Jérémie Giorgetti, et MM. Christophe Giorgiutti et Antony Lechner avec qui j'ai discuté moult fois en soirée, et échangé sur des sujets divers et variés.

Un grand merci à Alison, Blandine, Manon, Margot, Ivan, Killian, Maxime, Swann, ancienne doctorante du laboratoire, anciens stagiaires, ou actuels doctorants d'autres structures, pour leur sympathie et la bonne ambiance qu'elles ou ils ont su installer lors de leur présence au laboratoire.

Une dédicace à mon chat, γαλεη, pour s'être mise devant mes écrans d'ordinateur, ou assise sur mes genoux, lors de mes journées de rédaction à la maison.

Enfin, ma dernière pensée va à ma mère, le Dr Brigitte Leblanc que je tiens particulièrement à remercier pour ses contributions morale et orthographique pour moi-même ou ma thèse.

SOMMAIRE

Remerciements	5
Liste des abréviations et des acronymes	11
NOMENCLATURE	13
INTRODUCTION GENERALE	15
<hr/>	
CHAPITRE 1 LES SUBSTANCES ORGANIQUES EN CONTEXTE ARCHEOLOGIQUE	21
<hr/>	
1.1. Introduction	23
1.2. Diversité des substances organiques utilisées par l'Homme	24
1.2.1. Les résines végétales	24
1.2.2. Goudrons de végétaux	25
1.2.3. Les cires animales	25
1.2.4. Les huiles et graisses	26
1.3. L'archéologie moléculaire : une science d'identification basée sur les biomarqueurs	26
1.3.1. Les biomarqueurs natifs : cas des résines terpéniques	27
1.3.2. Les biomarqueurs de dégradation	31
1.4. La préservation de la matière organique	34
1.5. L'étude des macromolécules : état de la question	36
1.5.1. Intérêt de l'étude de la fraction macromoléculaire/polymérique	36
1.5.2. Les études menées sur les macromolécules dans le domaine de l'archéologie moléculaire	39
1.5.3. Les dégradations chimiques sélectives de macromolécules en géochimie organique	41
1.6. Positionnement du sujet de thèse	42
<hr/>	
CHAPITRE 2 ETUDE EXPERIMENTALE DE PROCESSUS OXYDANTS DE VIEILLISSEMENT AFFECTANT LES SUBSTANCES ORGANIQUES TROUVEES EN CONTEXTE ARCHEOLOGIQUE	45
<hr/>	
2.1. Introduction	47
2.2. L'autoxydation : Histoire et principe général	48
2.3. Catalyse de la réaction d'autoxydation	50
2.3.1. Le choix de la catalyse pour l'autoxydation	50
2.3.2. Le cycle catalytique du NHPI	51
2.4. Etude de la dégradation de l'huile essentielle de cèdre de l'Atlas par autoxydation	54
2.4.1. Contexte de l'étude	54

2.4.2.	Choix des conditions expérimentales d'autoxydation avec NHPI/Co(acac) ₂	56
2.4.3.	Autoxydation de l'huile essentielle de cèdre de l'Atlas	56
2.4.4.	Conclusion	63
2.5.	Expériences d'altération oxydante de mélanges binaires de substances naturelles d'intérêt archéologique : formation d'adduits ?	63
2.5.1.	Choix des substrats pour les expériences d'altération oxydante de mélanges binaires de substances naturelles	64
2.5.2.	Choix des conditions expérimentales pour les expériences d'altération oxydante de mélanges binaires de substances naturelles	66
2.5.3.	Expériences d'altération oxydante d'un mélange d'huile essentielle de baies de genévrier et d'oléate de butyle	66
2.5.4.	Expériences d'altération oxydante de linoléate de méthyle I5 seul ou en mélange avec de l'huile essentielle de baies de genévrier	80
2.5.5.	Etude de la dégradation par autoxydation d'un mélange de linoléate de méthyle et de résine de pin sylvestre	87
2.6.	Conclusion	103
	ANNEXES DU CHAPITRE 2	105
	ARTICLE SCIENTIFIQUE	107
	CHAPITRE 3 ANALYSE DE DAMMARS TROUVES EN CONTEXTE MARITIME	109
3.1.	Introduction	111
3.2.	Les résines de Dipterocarpaceae	112
3.2.1.	La famille des Dipterocarpaceae	112
3.2.2.	Le gemmage du dammar	114
3.2.3.	Utilisation du dammar	115
3.3.	Présentation des échantillons étudiés	116
3.3.1.	Présentation des épaves	116
3.3.2.	Les résines trouvées dans les épaves	117
3.4.	Résultats	118
3.4.1.	Etude du contenu lipidique de la résine du Flying Fish	118
3.4.2.	Etude du contenu lipidique de la résine du Lingga	134
3.5.	Conclusion	137
	ANNEXES DU CHAPITRE 3	138

CHAPITRE 4 IDENTIFICATION DE BRAIS DE BOULEAU ARCHEOLOGIQUES	141
4.1. Introduction	143
4.2. Le brai de bouleau	143
4.3. Les brais de bouleau des sites de La Rouvière et du Claux : un adhésif pour la réparation de céramiques	146
4.3.1. Contexte archéologique	146
4.3.2. Substance organique de la céramique I15	148
4.3.3. Les autres échantillons archéologiques	159
4.4. Les brais de bouleau du site de Rosheim : adhésifs pour la fixation d'outils	161
4.4.1. Les échantillons du site archéologique de Rosheim	161
4.4.2. Identification de brai de bouleau sur des outils lithiques du site de Rosheim	162
4.5. Conclusion	164
ARTICLE SCIENTIFIQUE	166
CHAPITRE 5 CONCLUSION GENERALE	167
CHAPITRE 6 PARTIE EXPERIMENTALE	175
6.1. Traitement géochimique des échantillons	177
6.1.1. Précautions particulières	177
6.1.2. Protocole général de traitement de la matière organique lipidique	177
6.2. Expériences de dégradation par autoxydation	178
6.2.1. Préparation des substrats de départ	178
6.2.2. Protocole général d'autoxydation A	179
6.2.3. Protocole général d'autoxydation B	179
6.2.4. Protocole général d'autoxydation C	180
6.2.5. Réduction des liaisons peroxydes par NaBH ₄	182
6.2.6. Dégradation chimique séquentielle des constituants macromoléculaires	182
6.3. Analyse des résines de Dipterocarpaceae	183
6.3.1. Etude des terpènes volatils	183
6.3.2. Etude des des-A triterpènes	184
6.3.3. Expérience d'autoxydation de l'acétate d'euphol T33	185
6.4. Analyse des brais de bouleau	185
6.4.1. Fractionnement des esters lourds dérivés de bétuline	185

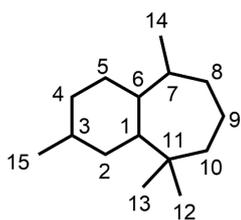
6.4.2. Hydrogénolyse des esters lourds dérivés de bétuline des séries E1 et E2 par LiAlH ₄	186
6.4.3. Synthèse de composés de référence	186
6.5. Instrumentation	190
6.5.1. Chromatographie en phase gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme (GC-FID)	190
6.5.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)	190
6.5.3. Résonance magnétique nucléaire (RMN)	191
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	193
APPENDICE	227

Liste des abréviations et des acronymes

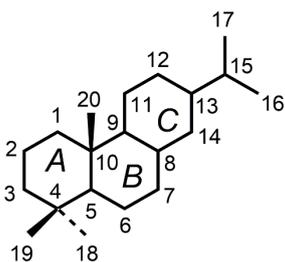
Ac ₂ O	anhydride acétique
AcOEt	acétate d'éthyle
AcOH	acide acétique
AIBN	azoisobutyronitrile
BCE	Before the Common Era
BSTFA	N,O-bis (triméthylsilyl)trifluoroacétamide
BuOH	butanol
C _{18:2} BuO	linoléate de butyle
CI	ionisation chimique
Co(acac) ₂	acétylacétonate de cobalt (II)
Da	dalton
DEAD	diéthylazodicarboxylate
GC	chromatographie gazeuse
GC-FID	chromatographie gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme
GC-MS	chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
HPLC-MS	chromatographie phase liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse
IE	impact électronique
INRAP	Institut National de Recherches Archéologiques Préventives
MHz	mégahertz
<i>m/z</i>	rapport masse sur charge
NHPI	N-hydroxyphthalimide
N-Me Im	1-méthylimidazole
NIST	National Institute of Standards and Technology
PINO	radical phthalimide <i>N</i> -oxyl

Py-GC-MS	pyrolyse – chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse
Py-TMAH-GC/MS	pyrolyse – en présence d'hydroxyde de tétra-méthyl-ammonium – chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse
RMN	résonance magnétique nucléaire
SM	spectre de masse
TD-GC-MS	thermodésorption – chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse
THF	tétrahydrofurane
t-BuOOH	hydroperoxyde de <i>tert</i> -butyle
TMCS	chlorotriméthylsilane
TMSI	iodure de triméthylsilyle
V ₀	volume mort

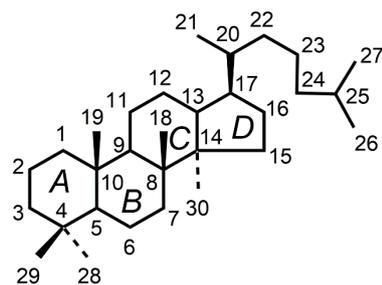
NOMENCLATURE



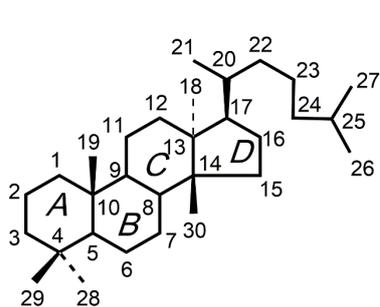
Himachalane



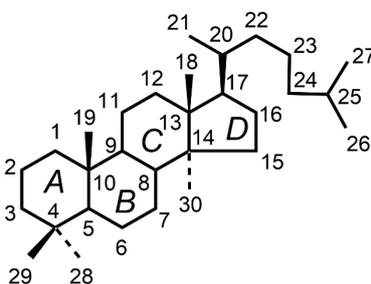
Abiétane



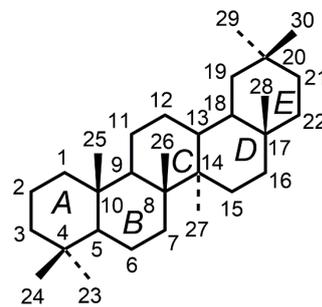
Dammarane



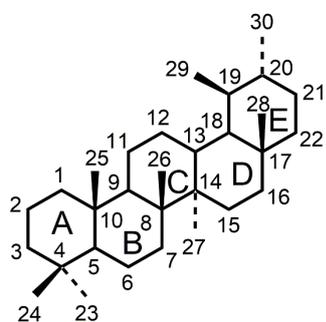
Euphane



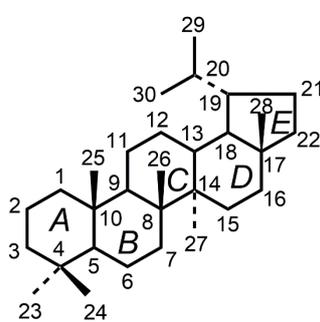
Lanostane



Oléane



Ursane



Lupane

Introduction générale

Introduction générale

L'archéologie¹, discipline consistant à étudier l'activité humaine du passé à travers l'analyse des vestiges matériels, est une science relativement ancienne : dès le III^{ème} millénaire avant notre ère, en Egypte et en Mésopotamie, des scribes ont étudié et restauré des monuments et des statues. Au V^{ème} siècle avant notre ère, l'historien Hérodote est le premier écrivain à s'intéresser et à traiter d'histoire en utilisant des méthodes d'investigation faisant notamment appel à la récolte d'artéfacts du passé qu'il a par la suite étudiés et classifiés pour en tirer une histoire narrative décrite dans sa grande œuvre « les Histoires ». L'apport de ses recherches est tel qu'il fut surnommé quelques siècles plus tard « le père de l'Histoire » par Cicéron. Plus récemment, durant la Renaissance en Europe, le mouvement humaniste a vu le jour, dans lequel les « antiquaires », personnes férues d'histoire et d'antiquité, ont étudié de nombreux écrits anciens, et également procédé à de nombreuses fouilles archéologiques pour enrichir leurs collections d'artéfacts. Ce mouvement s'est ensuite nationalisé, menant notamment à l'ouverture de musées où les collections, jusqu'à alors relevant du privé, ont commencé à être exposées. Cette discipline qu'est l'archéologie a donc connu un engouement croissant au fil du temps à travers la passion pour l'histoire de nombreux érudits, et a mené à la professionnalisation de cette discipline qui est, de nos jours, internationalement reconnue.

Plus récemment, une discipline connexe à l'archéologie, nommée archéométrie, s'est développée. Il s'agit d'une discipline scientifique mettant en œuvre des méthodes physiques ou chimiques pour les études archéologiques. Cette science a vu le jour en France après la seconde guerre mondiale, notamment à travers la création en 1976 d'une structure associative qu'est le GMPCA (Groupe des Méthodes Physiques et Chimiques de l'Archéologie) par plusieurs chercheurs parmi lesquels figure le physicien et archéologue Maurice Picon, pionnier de l'Archéométrie Française. Cette science a permis d'insuffler un nouvel élan aux études archéologiques et, par l'utilisation de méthodes pluridisciplinaires, de compléter le savoir déjà acquis. Au milieu des nombreuses disciplines que comprend l'archéométrie figurent la sédimentologie, la botanique, l'archéozoologie, l'anthropologie, ou encore la chimie. L'archéologie moléculaire, dans laquelle s'inscrivent nos travaux de thèse, consiste en l'étude de substances organiques mises au jour au cours des fouilles archéologiques. Comme pour toutes les disciplines de l'archéométrie, l'archéologie moléculaire s'est développée avec l'avènement de technologies instrumentales toujours plus poussées et performantes. Ainsi, les

¹ Les lignes qui vont suivre sur l'Histoire de l'Archéologie et de l'Archéométrie ont été inspirées des informations générales disponibles sur les sites de Wikipédia et de l'INRAP

Introduction générale

premières études d'intérêt dans cette thématique remontent à l'arrivée des méthodes spectroscopiques telles que les spectroscopies infrarouge et Raman, ou encore la résonance magnétique nucléaire par lesquelles il a été possible pour la première fois d'obtenir des « empreintes moléculaires » des résidus organiques analysés, comme par exemple l'ambre. Toutefois, de par la nature complexe de ces matériaux organiques généralement composés de très nombreux constituants, les spectres obtenus par les méthodes spectroscopiques globales correspondent à la superposition des spectres de chacun des constituants qui les composent et sont de ce fait complexes à interpréter. C'est seulement à l'avènement des méthodes de chromatographie gazeuse dans la seconde moitié du XX^{ème} siècle que l'archéologie moléculaire s'est particulièrement développée. Ces techniques analytiques ont été les premières en la matière à permettre la séparation des différents constituants d'une substance organique, suivie de leur identification grâce au couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse. Depuis lors, par la mise en évidence de marqueurs moléculaires spécifiques, également appelés biomarqueurs, parmi les constituants d'une matière organique archéologique, il a été possible d'identifier l'origine biologique de nombre de ces substances, parfois d'en déduire l'origine géographique et d'en tirer des conclusions quant à de possibles voies d'échanges commerciales, ou encore d'en déterminer le mode de préparation.

Une difficulté majeure de cette approche moléculaire en contexte archéologique est liée aux processus d'altération que subissent les substances organiques mises au jour. Ces processus, qu'ils soient anthropiques (e.g. traitement thermique des substances) ou simplement liés à une dégradation naturelle due aux conditions d'enfouissement et de préservation de la matière organique, peuvent entraîner une modification plus ou moins importante d'une partie ou de la totalité du signal moléculaire originel de ces substances organiques. La compréhension des mécanismes d'altération a donc été, dès les premières études moléculaires, une nécessité afin de pouvoir remonter aux constituants originels d'une matière organique archéologique, d'en déterminer l'origine biologique, et d'identifier la nature des processus d'altération subis. Ces derniers peuvent notamment induire une perte sélective d'une partie des constituants des substances naturelles originellement utilisées, notamment par évaporation, lessivage, oxydation, biodégradation, mais également engendrer des réactions de polymérisation entre ingrédients. Dans ce dernier cas, des informations sur les ingrédients originels, perdus sous forme libre, peuvent potentiellement être conservés à l'échelle macromoléculaire par piégeage au sein de ces structures.

Introduction générale

Les travaux effectués au cours de cette thèse ont été consacrés en grande partie à la problématique de l'altération des substances organiques rencontrées en contexte archéologique, que ce soit lors de leur préparation (chauffage, mélange de substances...) ou au cours du vieillissement naturel au cours du temps, avec pour objectifs de donner des clés analytiques et expérimentales pour étudier et comprendre les processus d'altération mis en jeu, d'identifier de nouveaux outils moléculaires pour caractériser la nature des processus subis par les matériaux organiques archéologiques et d'interpréter l'impact de ces processus sur les signatures moléculaires de ces matériaux.

Ainsi, après un premier chapitre dans lequel nous situerons le contexte général de nos travaux de thèse dans le cadre d'études menées en archéométrie, nous décrirons, dans une seconde partie, la mise au point d'un protocole expérimental de vieillissement en laboratoire afin de reproduire de manière pertinente les processus de vieillissement observés dans le cas de substances organiques archéologiques (chapitre 2). Une partie de ces travaux sera consacrée à l'étude de l'altération par oxydation de mélanges de substances naturelles de natures différentes à l'aide d'expériences en laboratoire afin d'établir des voies d'altération de différentes substances naturelles (acides gras, composés terpéniques) lors du vieillissement au cours du temps. La possibilité de formation de produits de réactions croisées conduisant à des composés oligo-/polymériques sera plus particulièrement appréhendée, cet aspect étant relativement peu documenté dans la littérature à ce jour. De telles substances sont en effet susceptibles d'être formées lors du vieillissement des matériaux organiques archéologiques, et des informations concernant les ingrédients mis en œuvre pour préparer ces matériaux peuvent potentiellement être obtenues, même dans le cas de matériaux très altérés, par l'étude de ces constituants macromoléculaires à l'aide de réactions de dégradation chimique.

Un autre volet de cette thèse sera consacré à l'étude de matériaux organiques archéologiques : des substances résineuses trouvées dans des épaves asiatiques du XII^{ème} siècle (chapitre 3) et des matériaux utilisés pour réparer des céramiques et coller des objets lithiques datant du Néolithique (chapitre 4) afin d'en identifier l'origine et de mettre en évidence d'éventuels marqueurs de processus d'altération.

Une conclusion générale résumant les principaux résultats obtenus et les perspectives émanant de ces travaux sera ensuite donnée en chapitre 5.

Chapitre 1

**Les substances organiques en contexte
archéologique**

1.1. Introduction

L'Homme a su dès les temps les plus anciens mettre à profit son environnement pour sa survie et l'amélioration de son confort de vie. Il a donc utilisé à son avantage de nombreux matériaux naturels. Ces derniers ont notamment été utilisés pour la confection d'objets, par exemple des outils (Andrefsky, 1994 ; Backwell et al., 2008) ou des contenants en céramique (Sciau et Goudeau, 2015 ; Drieu, 2017 ; Maritan, 2017), mais également à des fins artistiques et culturelles (Sandars, 1995) (e.g. peintures rupestres, sculptures), ou encore comme substances médicinales ou cosmétiques (Lucas, 1930 ; Evershed et al., 2004 ; Tchaplal et al., 2004 ; David, 2008 ; Aboelsoud, 2010), sans oublier les denrées alimentaires qu'il consommait. Toutes ces activités sont à l'origine d'importants dépôts d'artéfacts macroscopiques, minéraux ou organiques, donnant des indices précieux sur son environnement et sur la manière dont il l'a mis à profit dans son quotidien. Parmi ces nombreux artéfacts figurent des résidus organiques amorphes qui se sont trouvés être d'une incroyable diversité en fonction des applications faites par l'Homme, preuve d'un savoir-faire important dès la Préhistoire. L'appréhension de ces substances organiques à travers l'analyse des lipides et plus particulièrement par l'identification des composés spécifiques (« biomarqueurs ») dont sont constitués ces matériaux est donc d'une grande importance afin d'en déterminer l'origine biologique et d'appréhender les éventuelles modifications apportées par l'Homme à ces substances pour en adapter les propriétés physiques, chimiques et biologiques en fonction de l'application désirée.

Au cours de ce premier chapitre, nous présenterons, dans un premier temps, un aperçu des substances organiques les plus fréquemment rencontrées en contexte archéologique, suivi d'une introduction à la science des biomarqueurs permettant l'identification de ces matériaux organiques. A cet égard, nous nous attarderons plus particulièrement sur les difficultés rencontrées par les chercheurs suite aux processus d'altération subis par la matière organique au cours du temps, qui peuvent alors mener à la modification du profil moléculaire originel voire même à la perte d'informations sur certains ingrédients utilisés par le passé. Dans le cas de substances très altérées, il a été envisagé que les constituants macromoléculaires des substances organiques archéologiques puissent contenir sous forme liée certains lipides qui ont par ailleurs disparu à l'état libre en raison de leur sensibilité aux processus d'altération. Les constituants macromoléculaires sont de ce fait susceptibles de recéler des informations concernant l'origine et le mode de préparation des substances organiques archéologiques complémentaires de celles qui peuvent être obtenues par l'analyse de composés de bas poids

moléculaire. Un état de l'Art sera également présenté, mettant en lumière les techniques analytiques et opératoires mises en œuvre pour leur étude moléculaire.

1.2. Diversité des substances organiques utilisées par l'Homme

De nombreux matériaux organiques naturels ont été utilisés par l'Homme. Ces substances ont pu soit être utilisées telles quelles, ou subir des traitements anthropiques afin d'en modifier les propriétés physiques, chimiques ou biologiques pour une application spécifique. Nous proposons ici une description non exhaustive des substances organiques les plus communément rencontrées lors de découvertes archéologiques.

1.2.1. Les résines végétales

Avant toute chose, il est important de se poser la question de la définition du terme « résine ». En effet, ce terme a été souvent associé à la notion « d'exsudat de végétaux » qui s'applique à bien d'autres substances, entraînant donc un certain flou dans la terminologie de ce mot. Ainsi, par le passé, ont été souvent associés à cette notion certains exsudats comme les gommés, les mucilages ou les latex (Burger, 2008). C'est seulement à partir des années 1940 et 1950, avec l'avènement des technologies d'identification moléculaire chromatographiques séparatives et spectroscopiques que les premières distinctions entre les différents exsudats ont pu être réalisées. Toutefois, il a fallu attendre les années 2000 pour avoir une définition précise de ce terme (Langenheim, 2003). Ainsi, une résine consiste en « un mélange liposoluble de terpénoïdes et/ou de composés phénoliques volatils ou non volatils qui est généralement sécrété par des structures spécialisées localisées à l'intérieur ou à la surface de la plante » (Langenheim, 2003). Ces résines, qui sont donc séparées en deux catégories selon la composition moléculaire, font partie des matériaux organiques qui ont été dès le départ les plus facilement accessibles à l'Homme grâce à leur exsudation par les plantes, qu'elle soit naturelle ou induite par un stress comme par exemple une simple blessure.

a) Les résines phénoliques

Les résines phénoliques sont composées de molécules à structures phénoliques mais également de terpènes pouvant représenter une part plus ou moins importante du mélange (Langenheim, 2003). Ces résines ne sont produites que par un nombre limité d'espèces d'angiospermes, les plus connues étant le baume du Pérou, ou encore le Storax qui fut

notamment utilisé en médecine, dans les procédés d'embaumement en Egypte antique et au Levant (Langenheim, 2003 ; Modugno et al., 2006a).

b) Les résines terpéniques

Contrairement à leurs homologues phénoliques, les résines terpéniques sont composées essentiellement de terpènes et leur production est la plus répandue chez les végétaux supérieurs. De ce fait, elles ont été plus largement utilisées par le passé et ont trouvé, de par leurs propriétés d'adhésivité et d'hydrophobicité, une large palette d'applications en tant qu'adhésif et revêtement (Colombini et al., 2003 ; Helwig et al., 2008 ; Mitkidou et al., 2008 ; Mayyas et al., 2013).

1.2.2. Goudrons de végétaux

Les goudrons de végétaux désignent généralement des produits issus de la pyrolyse d'écorce ou de bois d'arbres, mais il est également fait mention de production de goudron par pyrolyse de résine (Colombini et Modugno, 2009 ; Bailly, 2015). Ces matériaux, désignés de manière plus spécifique par les termes de poix pour les goudrons issus de la pyrolyse de bois de conifères ou encore de brai pour les goudrons issus de la pyrolyse d'écorce de bouleau, ont été largement utilisés dès le Paléolithique (Koller et al., 2001), comme dans le cas des résines, pour leur hydrophobicité et leurs propriétés d'adhésivité particulièrement importantes. A cet égard, la poix produite à partir de bois de conifères a été particulièrement employée dans l'industrie navale pour le calfatage des navires (Connan et al., 2000 ; Colombini et al., 2003 ; Laurent et al., 2011).

1.2.3. Les cires animales

Les produits issus du règne végétal ne sont pas les seuls à avoir été utilisés par l'Homme dans le passé. En effet, un certain nombre de cires animales ont également été employées et le sont encore aujourd'hui. On peut notamment citer la cire sécrétée par l'insecte *Ceroplastes ceriferus* qui est utilisée dans les vernis, comme cire pour bougies, ou encore comme ingrédient en médecine chinoise (Colombini et Modugno, 2009). Mais c'est incontestablement la cire d'abeille qui a vu son application la plus diversifiée, et ce dès la Préhistoire (Regert et al., 2001). Cette dernière, composée d'une série d'alcane, d'acides gras, et plus particulièrement d'esters à longues chaînes, notamment d'esters d'acide palmitique (Regert et al., 2001 ; Rageot, 2015), a été notamment employée en tant qu'agent imperméabilisant (Heron et al., 1994), dans la

composition de baumes funéraires (Colombini et al., 2000), ou encore dans le domaine de l'art (Regert et al., 2001).

1.2.4. Les huiles et graisses

Les huiles et graisses animales ou végétales sont composées principalement d'un mélange complexe de triglycérides d'acides gras, souvent présents sous une forme mixte (un triglycéride estérifié avec des acides gras différents) les rendant particulièrement délicats à identifier (Fig. 1.1). Les acides gras les plus communément rencontrés dans les huiles et graisses sont les acides palmitique (1), stéarique (2), oléique (3), linoléique (4) et linoléique (5) (Fig. 1.1).

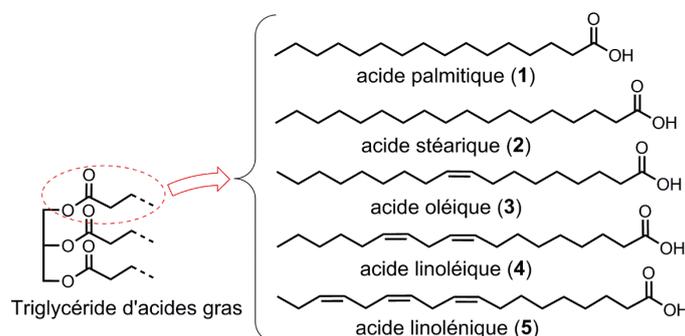


Figure 1.1 : Structure générale d'un triglycéride et des principaux acides gras rencontrés dans le règne animal et végétal.

Les huiles et graisses ont été par le passé utilisées de manière intensive, bien entendu pour la consommation alimentaire, mais également comme combustible pour l'éclairage (Kimpe et al., 2001), dans la cosmétique et dans la composition de médicaments (Evershed et al., 2004 ; Tchaplal et al., 2004). A ce titre, les huiles et graisses ne sont que rarement utilisées seules mais plutôt en mélange avec d'autres substances organiques.

1.3. L'archéologie moléculaire : une science d'identification basée sur les biomarqueurs

L'identification de l'origine biologique des substances naturelles utilisées pour la préparation de substances organiques trouvées en contexte archéologique, permise grâce à l'avancée technologique de la seconde moitié du XX^{ème} siècle, s'est effectuée par la caractérisation des lipides constituant ces matériaux et plus précisément par la recherche de lipides spécifiques possédant un potentiel taxonomique. Ces composés, également appelés biomarqueurs, ont une structure suffisamment caractéristique pour être reliée à un organisme

producteur. Dans le cas de substances organiques altérées par l'intervention de processus de dégradation naturels ou anthropiques fréquemment rencontrés en archéologie, ces constituants correspondent à des composés ayant conservé une structure suffisamment spécifique pour que l'on puisse la rattacher sans ambiguïté à une molécule précurseur fonctionnalisée, elle-même caractéristique d'un organisme vivant.

De ce fait, les biomarqueurs peuvent être classés en deux catégories :

- Les biomarqueurs natifs : lipides spécifiques présents à l'état natif dans l'organisme source.
- Les biomarqueurs d'altération : lipides spécifiques issus des composés biologiques mais ayant subi différents processus d'altération naturels ou anthropiques.

Ces lipides caractéristiques permettent donc, dans le domaine de l'archéologie moléculaire, de déterminer l'origine taxonomique de nombreuses substances organiques archéologiques (e.g. Colombini et al., 2005a ; Regert et al., 2008 ; Burger et al., 2009 ; Sarret et al., 2017 ; Courel et al., 2018), mais il est également possible par l'analyse des biomarqueurs d'altération de déterminer les processus de dégradation subis par les substances organiques archéologiques, d'en déduire l'origine naturelle ou anthropique, et donc de distinguer un éventuel traitement induit par l'Homme (e.g. chauffage).

En ce sens, les terpènes, dont font partie les monoterpènes (C_{10}), les sesquiterpènes (C_{15}), les diterpènes (C_{20}), et les triterpènes (C_{30}), constituent une des classes de lipides fréquemment utilisée pour l'identification de biomarqueurs de végétaux en archéologie moléculaire. Ceci concerne plus spécifiquement les diterpènes et triterpènes, qui, grâce à leur volatilité compatible avec les méthodes de chromatographie en phase gazeuse et à leur bonne résistance face aux processus d'altération (Charters et al. 1993 ; Regert et al., 2006 ; Courel, 2016 ; Sarret et al., 2017 ; Courel et al., 2018), mais également pour leur grande diversité et spécificité au sein du règne végétal (Langenheim, 2003 ; Evershed, 2008 ; Courel, 2016), font partie des composés à fort potentiel chimiotaxonomique en contexte archéologique.

1.3.1. Les biomarqueurs natifs : cas des résines terpéniques

Un des cas les plus marquants, quand nous parlons de l'identification de biomarqueurs natifs, est celui des résines terpéniques. En effet, ces dernières, universellement réparties dans le monde, ont été particulièrement exploitées par l'Homme. Ceci en a fait l'un des matériaux organiques les plus fréquemment identifiés en contexte archéologique et a donc mené à l'identification de nombreux biomarqueurs spécifiques de ce type de substance.

Ces résines végétales sont produites à partir des plantes de genres spécifiques appartenant aux deux principales sous-divisions de la classification du règne végétal, les gymnospermes et les angiospermes. Cette distinction entre ces deux sous-divisions peut généralement être visualisée à travers l'étude des composantes terpéniques : les résines de gymnospermes se distinguent par une prédominance de diterpènes, tandis que celles des angiospermes s'illustrent par la prédominance de triterpènes. Cette différence de composition moléculaire a mené à classer les résines produites comme « diterpéniques » pour celles issues des gymnospermes, et « triterpéniques » pour celles issues des angiospermes, même s'il existe certaines exceptions. En effet, il a été montré que certaines familles, genres, et espèces d'angiospermes pouvaient produire à la fois des di- et triterpènes. Nous pouvons notamment citer le genre *Bursera* de la famille tropicale des Burseraceae qui possède cette particularité (Becerra et al., 2001 ; Langenheim, 2003), mais également certaines plantes de la famille des Fabaceae (aussi connue sous le nom de Leguminosae) de la sous-division des angiospermes produisant aussi des résines diterpéniques (Croteau et Johnson, 1985).

a) Les résines issues des angiospermes

Les résines triterpéniques sont principalement produites par les familles des Anacardiaceae, des Burseraceae, et des Dipterocarpaceae dont les principaux constituants triterpéniques appartiennent aux séries du lupane, de l'ursane, de l'oléanane, du dammarane et de l'euphane (Fig. 1.2 ; Mills et White, 1977 ; Langenheim, 2003 ; Burger, 2008). Parmi les plus connus et exploités par l'Homme figurent le mastic, l'oliban, et le dammar.

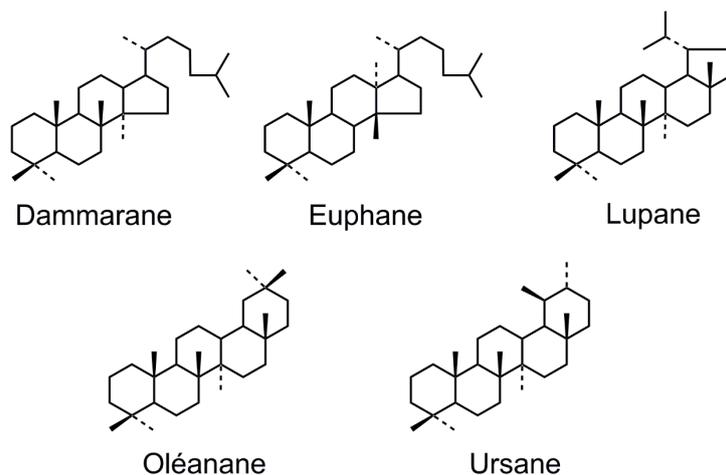


Figure 1.2 : Squelettes terpéniques des principales séries de triterpènes rencontrées chez les familles des Anacardiaceae, Burseraceae, et Dipterocarpaceae productrices de résines.

Les résines de mastic sont produites par la famille des Anacardiaceae et plus spécifiquement par des espèces végétales du genre *Pistacia*, genre particulièrement représenté dans le bassin méditerranéen (Langenheim, 2003 ; Yi et al., 2008 ; Xie et al., 2014). On peut notamment citer les espèces *Pistacia lentiscus* et *Pistacia atlantica*. Ces mastics, caractérisés par la présence des acides moronique (**6**), masticadiénonique (**7**)², et isomasticadiénonique (**8**) (Fig. 1.3 ; Buckley et Evershed, 2001 ; Stern et al., 2003 ; Modugno et al., 2006b), ont été largement employés dans les procédés d'embaumement en Egypte antique (Buckley et Evershed, 2001), mais également en tant qu'encens (Serpico et White, 2000), ou encore plus récemment comme vernis pictural (Van der Doelen et al., 1998a). La composition moléculaire de la résine de mastic sera étudiée de manière plus approfondie dans le chapitre 3.

L'oliban est produit à partir du genre *Boswellia* des Burseraceae, dont les principales espèces végétales exploitées sont : *Boswellia carterii*, *Boswellia papyrifera*, *Boswellia sacra* et *Boswellia serrata* (Langenheim, 2003 ; Burger, 2008 ; Bailly, 2015). Il est facilement identifié par la présence caractéristique des acides α -boswellique (**9**) et β -boswellique (**10**) (Fig. 1.3) (Modugno et al., 2006b). Il a été utilisé en médecine, mais également dans les procédés d'embaumement ou encore dans la cosmétique (Langenheim, 2003 ; Modugno et al., 2006b).

Le dammar, qui fait l'objet de l'étude du chapitre 3 et qui, de ce fait, sera présenté de manière plus détaillée, est issu de la famille des Dipterocarpaceae. Il est caractérisé par l'association de triterpènes des séries oléanane, ursane et dammarane (Van der Doelen, 1999 ; Burger, 2008). Le dammaradiénone (**11**) ou encore l'acide dammarénolique (**12**) font partie des triterpènes les plus abondants de ces résines (Fig. 1.3).

² Il est important de signaler que dans l'ensemble de la littérature, une grande confusion existe quant à la position de l'insaturation des acides masticadiénonique et isomasticadiénonique (et également de leur version alcool en C-3). Ainsi l'insaturation de l'acide masticadiénonique est souvent faussement considérée comme étant en position 8(9), et non en position 7(8) comme cela a été démontré par Barton et Seoane en 1956.

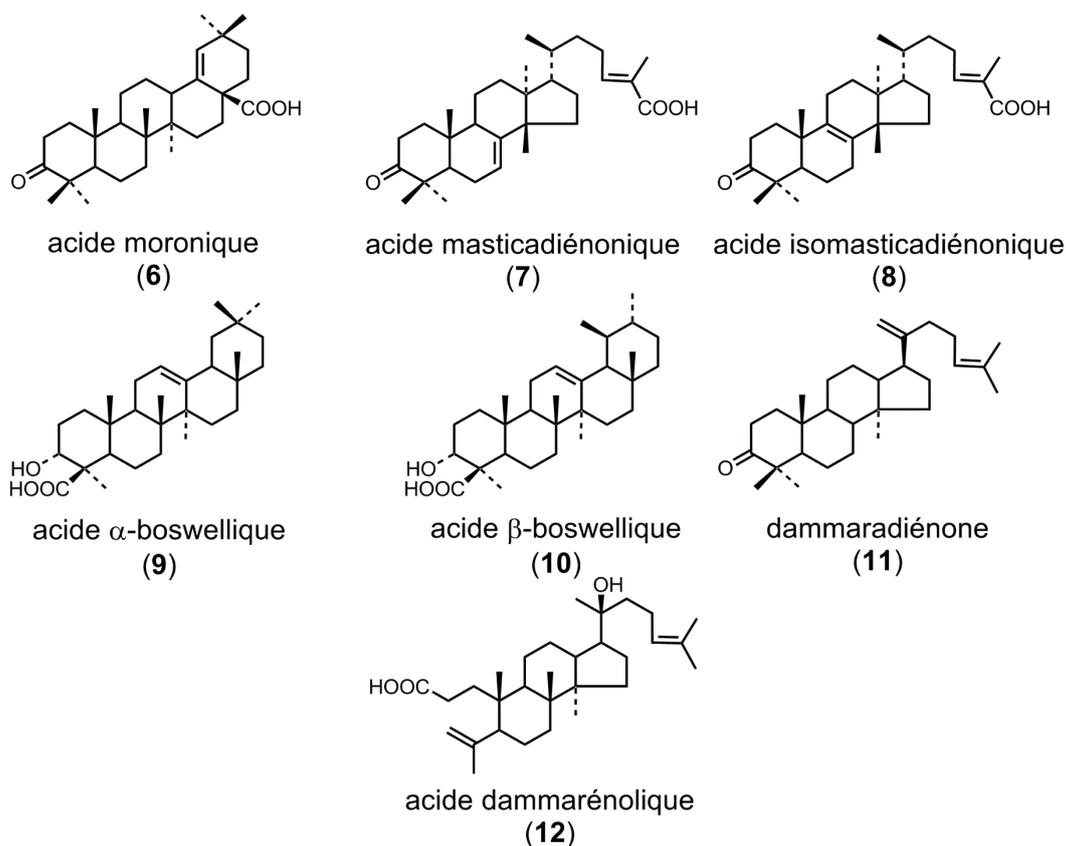


Figure 1.3 : Principaux biomarqueurs caractéristiques du mastic (6-8), de l'oliban (9-10), et du dammar (11-12).

b) Les résines issues des gymnospermes

Les résines diterpéniques sont produites en majorité, comme cela a été présenté antérieurement, par des arbres de l'ordre des conifères qui font partie des gymnospermes.

Les résines de conifères sont produites par 5 des 7 familles composant cet ordre, mais de manière abondante uniquement dans les familles des Pinaceae, Araucariaceae et, dans une moindre mesure, des Cupressaceae (Langenheim, 2003). Ces résines se composent, outre d'une fraction volatile comprenant des mono et sesquiterpènes allant de 20 à 50 % de la masse totale de la résine, d'acides diterpéniques des séries de l'abiétane, du labdane et du pimarane (Langenheim, 2003) (Fig. 1.4). On peut notamment citer les acides abiétique (13), *trans*-communiqué (14), pimarique (15) qui sont parmi les plus connus et répandus (Langenheim, 2003 ; Fig. 1.4).

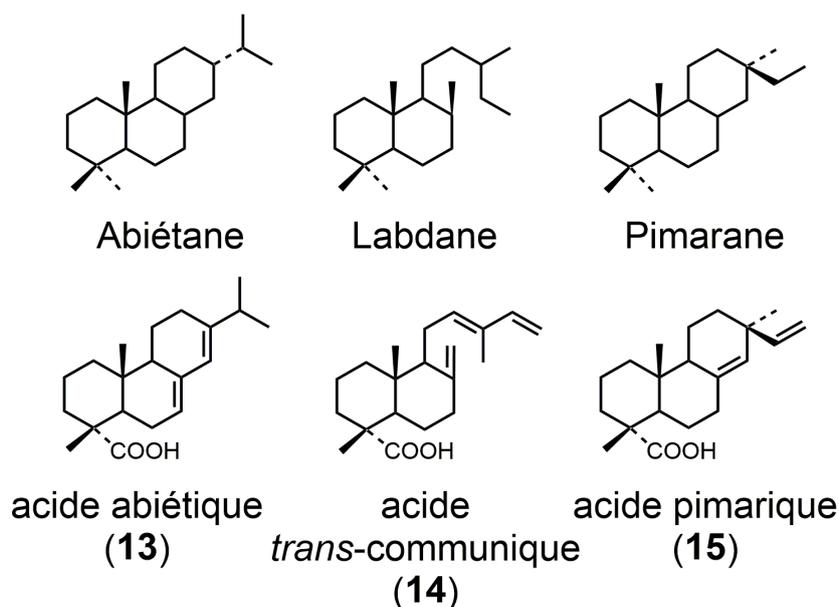


Figure 1.4 : Squelettes terpéniques des principales séries de diterpènes des résines produites par les familles des Pinaceae, Araucariaceae et Cupressaceae et exemples de diterpènes fréquemment rencontrés dans les résines de conifères.

Contrairement aux résines triterpéniques, les résines de conifères présentent généralement une composition moléculaire comprenant simultanément les trois séries de diterpènes, limitant donc grandement la possibilité de déterminer des biomarqueurs spécifiques aux différents genres ou familles des conifères (Hautevelle et al., 2006 ; Bailly, 2015 ; Courel, 2016 ; Steigenberger, 2013). La distinction entre les différentes résines se fonde donc principalement sur les abondances relatives des différents constituants, et ne sera pas présentée plus amplement dans ce travail de thèse (Hautevelle et al., 2006 ; Bailly, 2015 ; Courel, 2016 ; Steigenberger, 2013).

1.3.2. Les biomarqueurs de dégradation

Outre l'identification taxonomique, il est aussi possible, à travers l'analyse des biomarqueurs issus d'une substance organique altérée, de déterminer la nature des processus d'altération qu'elle a subis. Ces processus peuvent affecter cette substance lors de sa phase d'utilisation ou après son abandon, et être d'origine anthropique ou naturelle.

a) Processus anthropiques

Un des processus anthropiques le plus fréquemment rencontré en contexte archéologique est bien entendu le traitement thermique. Ses effets apparaissent clairement lors de l'analyse

des goudrons de végétaux qui sont issus de pyrolyse de bois ou d'écorce d'arbre. Parmi les plus connus figurent le brai de bouleau qui fera l'objet du chapitre 4, et les goudrons de conifères.

De manière générale, le traitement pyrolytique d'un bois de conifère va entraîner l'exsudation d'une substance visqueuse appelée goudron qui se compose principalement de diterpènes. Ces derniers vont être transformés par l'action du chauffage en condition anoxique, et vont notamment subir, à des températures modérées (155-200 °C), des réactions d'isomérisation (Loeblich et al., 1955 ; Loeblich et Lawrence, 1957 ; Joye et Lawrence, 1961 ; Chen, 1992). Ainsi par exemple, lors de la pyrolyse, des réactions de migration/isomérisation des insaturations des acides abiétique (**13**), néoabiétique (**16**), palustrique (**17**) et lévopimarique (**18**) entraînent un équilibre en faveur de l'acide abiétique (**13**), conduisant donc à l'enrichissement de ce dernier dans le milieu (Fig. 1.5 ; Loeblich et al., 1955 ; Loeblich et Lawrence, 1957 ; Joye et Lawrence, 1961 ; Chen, 1992). Au-delà de 210 °C (et plus largement au-delà de 300 °C), des réactions de déshydrogénation et de décarboxylation se produisent également, entraînant donc la formation d'hydrocarbures aromatiques, notamment le rétène (**19**) (Fig. 1.5 ; Chen, 1992 ; Connan et al., 2002 ; Colombini et Modugno, 2009). Ce dernier est souvent utilisé comme molécule diagnostique d'un traitement thermique d'un matériau issu de conifère (bois ou encore résine), mais des précautions sont à prendre en fonction du lieu de la découverte du matériel archéologique. En effet, comme nous le verrons par la suite, le rétène (**19**) peut également être formé par transformation microbienne de l'acide abiétique en conditions anoxiques, notamment en milieu sédimentaire ou aquatique (Tavendale et al., 1997 ; Martin et al., 1999). En revanche, si le rétène (**19**) ne peut être considéré comme un biomarqueur spécifique d'un traitement thermique d'un matériau issu de conifère, le méthylrétène (**20**) (Fig. 1.5), également formé lors de la pyrolyse de bois de conifère, peut, quant à lui, être réellement considéré comme un biomarqueur de goudron de conifère (Carpy et Marchand-Geneste, 2003 ; Connan et Nissenbaum, 2003 ; Bailly et al., 2016). Plus récemment, des esters mixtes d'acide déhydroabiétique et d'alkylméthoxyphénols (**21**) ont été identifiés dans différents goudrons de conifères et ont été interprétés comme de nouveaux biomarqueurs de ces substances traitées thermiquement (Fig. 1.5 ; Bailly et al., 2016).

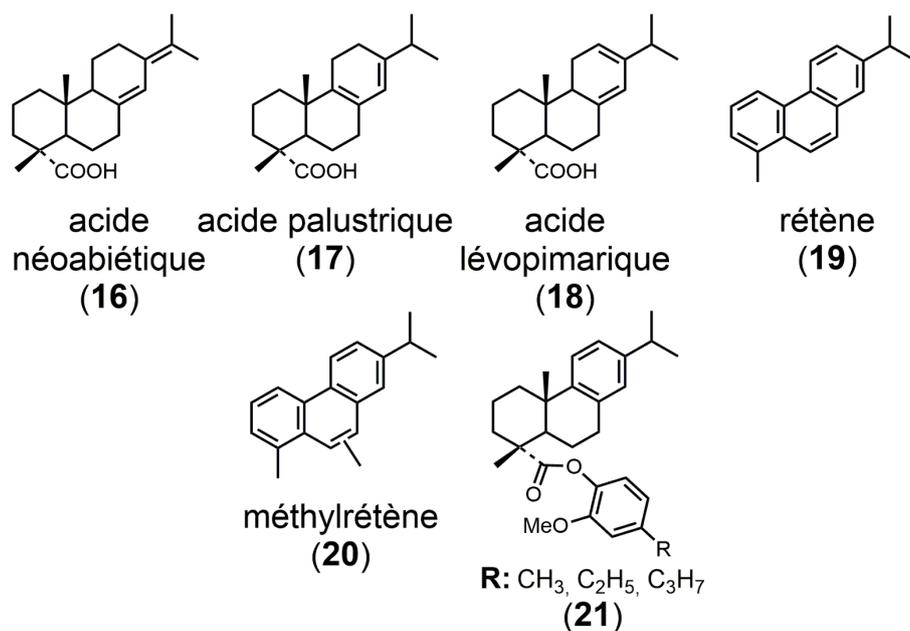


Figure 1.5 : Exemples de diterpènes rencontrés dans les goudrons de conifères.

b) Processus naturels

Outre les processus d'altération induits par l'Homme lors de la confection de mélanges par traitement thermique (cuisson, pyrolyse), de nombreux processus de dégradation naturelle sont susceptibles d'affecter les substances organiques après leur abandon, ou lors de leur phase d'utilisation. Ces processus d'altération de nature biologique ou abiotique peuvent intervenir dans tous types de milieux, qu'ils soient oxygènes ou anoxiques, et entraîner une altération importante dans la composition originelle de la substance organique par des changements d'abondance relative des différents constituants et/ou la dégradation de certaines molécules particulièrement sensibles. Nous pouvons notamment citer les réactions d'autoxydation ou encore des processus de dégradation microbienne en milieu anoxique. Les effets de ces processus, qui seront d'ailleurs présentés de manière plus détaillée dans le chapitre 2 (autoxydation), et le chapitre 3 (dégradation microbienne en milieu anoxique), peuvent être facilement identifiés dans les substances organiques archéologiques. Ainsi, en prenant l'exemple d'une résine de conifère conservée en milieu oxygène, il est possible de mettre en évidence l'action de l'oxydation par la détection des acides déhydroabiétique (22), 7-oxodéhydroabiétique (23), 15-hydroxy-déhydroabiétique (24), ou encore le 15-hydroxy-7-oxodéhydroabiétique (25) qui ne sont que peu abondants à l'état natif dans les résines (Fig. 1.6 ; Van den Berg et al., 2000).

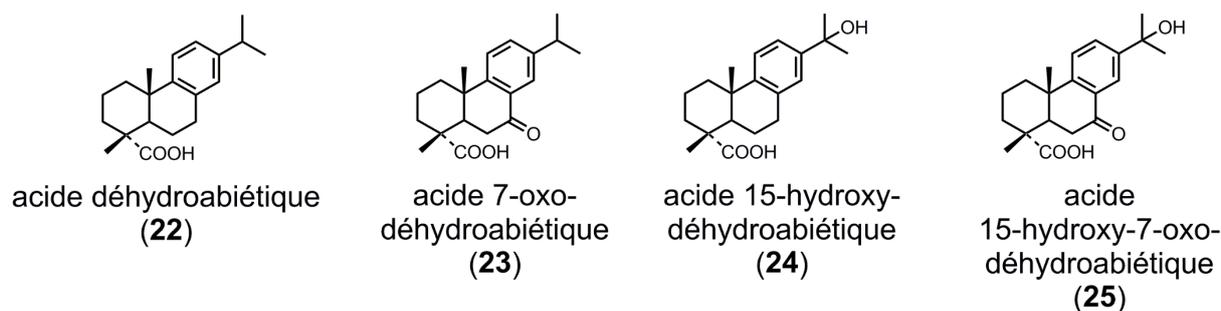


Figure 1.6 : Exemples de diterpènes formés par oxydation d'une résine de conifère.

Par ailleurs, la dégradation microbienne en conditions anoxiques d'une résine ou de bois de conifère en milieu aquatique se traduit par la présence de dérivés aromatiques tels les 18-norabiétatriène (26), 19-norabiétatriène (27), tétrahydrorétène (28) et le rétène (19), mais également de composés réduits comme le 18-norabiétane (29) (Fig. 1.7 ; Simoneit et al., 1986 ; Martin et al., 1999 ; Serebrennikova et al., 2017). L'altération microbienne en milieu anaérobie est également susceptible d'affecter les triterpènes oxygénés en C-3. Dans ce cas, cela peut se traduire par la perte du cycle A selon un mécanisme qui sera présenté dans le chapitre 3 ou par l'aromatisation partielle des structures (Trendel et al., 1989 ; Wolff et al., 1989 ; Lohmann et al., 1990).

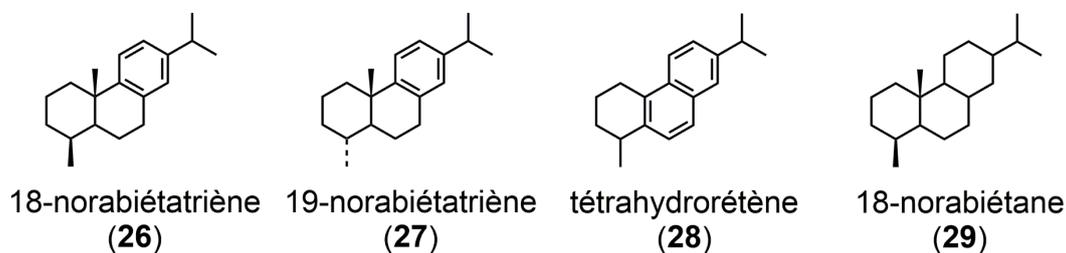


Figure 1.7 : Exemples de diterpènes de conifères formés par dégradation microbienne en condition anoxique.

1.4. La préservation de la matière organique

Comme nous venons de le voir dans la partie précédente, les substances organiques trouvées en contexte archéologique peuvent subir de nombreuses altérations anthropiques ou naturelles, entraînant des changements importants au niveau des profils moléculaires originels, à travers la dégradation plus ou moins importante de certaines structures. Ces processus rendent l'identification des substances originelles parfois difficile, et une bonne connaissance des voies d'altération susceptibles d'affecter les biomarqueurs est nécessaire.

En ce sens, il est courant que l'altération naturelle ou anthropique d'une substance organique entraîne la perte sélective d'une partie des constituants d'une substance organique archéologique, pouvant alors induire une perte d'information importante quant à la nature des ingrédients utilisés pour préparer cette substance. Outre l'oxydation et la biodégradation précédemment évoquées, d'autres voies d'altération peuvent en être responsables. Ainsi, par simple chauffage/évaporation, les composés volatiles (e.g. mono et sesquiterpènes) sont facilement perdus, par lessivage les composés organiques les plus hydrosolubles peuvent avoir été entraînés, et enfin par réaction de polymérisation, des constituants ont pu être liés dans des structures macromoléculaires qui sortent généralement de la fenêtre analytique classiquement utilisée (analyse des lipides par GC-MS), pour disparaître des constituants de bas poids moléculaire.

De ce fait, de nombreux ingrédients ne sont connus pour leur utilisation qu'au travers d'écrits anciens ou encore d'illustrations picturales, et ne furent jusqu'à présent jamais mis en évidence lors de l'analyse des substances organiques archéologiques. A titre d'exemple, le papyrus Ebers, relatant des pratiques médicales en Egypte et datant de 1550 BCE, indique l'utilisation d'épices comme le cumin ou d'herbes aromatiques du genre *Ammi* des Apiaceae en mélange avec d'autres substances (e.g. une résine aromatique provenant du genre *Boswellia* de la famille des Burseraceae) pour le traitement de l'inflammation de la langue mais ces ingrédients n'ont jamais été identifiés dans des substances organiques archéologiques (David, 2008).

Dans ce contexte, les études réalisées jusqu'à présent sur des échantillons organiques archéologiques en vue d'identifier les substances naturelles utilisées pour leur préparation ont porté principalement sur la caractérisation de composés de bas poids moléculaire (Regert, 2004 ; Lucquin et al., 2007 ; Burger et al., 2010 ; Sarret et al., 2017 ; Courel et al., 2018). Ces composés présentent l'avantage d'être facilement analysables par les méthodes analytiques conventionnellement employées pour l'analyse moléculaire de mélanges complexes, comme la GC-MS (Charters et al., 1993 ; Modugno et al., 2006b ; Regert et al., 2006 ; Burger et al., 2009, 2010 ; Courel et al., 2018), la HPLC-MS (Van der Doelen et al., 1998a ; Charrié-Duhaut et al., 2007), ou encore la Py-GC-MS (Pyrolyse – chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse), et la TD-GC-MS (Thermodésorption – Chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse) (Buckley et al., 1999, 2004 ; Languri, 2004 ; Hao et al., 2019).

Or, les composés de bas poids moléculaire comme les lipides ne constituent généralement qu'une partie (mineure) des substances organiques. Effectivement, cette composante

monomérique est souvent associée à une composante polymérique dans les substances organiques archéologiques, mais cette dernière n'a été que peu étudiée jusque-là.

1.5. L'étude des macromolécules : état de la question

Les composantes polymériques ou macromoléculaires peuvent être natives, c'est-à-dire présentes initialement dans les différents ingrédients employés pour préparer les substances organiques trouvées en contexte archéologique. On peut notamment évoquer les bitumes dont certains constituants peuvent atteindre 10 000 Da (Hellmuth, 1989) ou certaines résines comme par exemple les résines de Dipterocarpaceae composées de constituants polymériques basés sur des sous-unités de type cadinène (Van Aarssen et al., 1990a, 1990b, 1991, 1992 ; Murray et al., 1994). Mais il est également possible que certaines de ces composantes polymériques ou macromoléculaires soient issues de réactions de condensation/polymérisation impliquant les composés de bas poids moléculaire intervenant pendant une activité de préparation faite par l'Homme (e.g. confection de mélanges d'ingrédients à chaud), ou encore pendant le vieillissement des matériaux organiques. A ce titre, les triglycérides d'acides gras insaturés sont connus pour polymériser facilement en condition oxydante par la création de liaisons C-C ou C-O (Ohfujii et Kaneda, 1973 ; Ioakimoglou et al., 1999 ; Lazzari et Chiantore, 1999 ; Mallégo et al., 2000 ; Bouwman et van Gorkum, 2007) et cette particularité à polymériser fait même que ces composés sont utilisés en tant que matériaux pour le vernissage des tableaux et instruments de musique (Ioakimoglou et al., 1999 ; Bouwman et van Gorkum, 2007 ; Tirat et al., 2016).

1.5.1. Intérêt de l'étude de la fraction macromoléculaire/polymérique

La formation de macromolécules à partir de composés de bas poids moléculaire par des réactions de condensation/polymérisation semble particulièrement intéressante et mériterait d'être étudiée de manière approfondie en contexte d'études moléculaires dans le domaine de l'archéologie.

En effet, il est envisageable que des molécules, disparues à l'échelle monomérique, soient préservées ou emprisonnées dans des structures macromoléculaires, ces dernières étant naturellement plus résistantes face aux différents processus d'altération. De ce fait, à travers l'étude de ces structures de haut poids moléculaire, il pourrait être possible d'identifier des biomarqueurs de substances organiques jusque-là non répertoriées et uniquement connues par le biais des textes antiques, mais également d'identifier de nouveaux biomarqueurs potentiels de matériaux organiques déjà connus. Cette hypothèse de préservation de biomarqueurs à

travers des réactions de condensation entre molécules se trouve d'ailleurs confortée par deux exemples d'études d'archéologie moléculaire effectuées dans notre laboratoire et rapportés dans la littérature.

Dans le premier exemple, Charrié-Duhaut et al. (2007) se sont intéressés à l'identification du contenu organique de céramiques supposées être les vases canopes de Ramsès II, mais qui se sont par la suite avérées être des vases contenant des offrandes pour les divinités (ou situles). Parmi les substances organiques présentes ont été identifiés des triglycérides d'acides gras, des acides gras libres, tous rapportés à une composante de type graisse animale, mais également des esters entre un alcool sesquiterpénique, probablement du longibornéol (**29**), et des acides gras (e.g. palmitate de longibornéyle (**30**)). La contribution de cet alcool sesquiterpénique, absent à l'état libre mais préservé sous forme d'ester, est particulièrement intéressante et a été interprétée comme correspondant à l'ajout d'une huile essentielle de conifère à une graisse animale dans le cadre d'une préparation à chaud (Fig. 1.8). Ainsi, la réaction de condensation ou d'estérification impliquée dans la création de ce type d'esters mixtes a permis de préserver une partie du signal moléculaire de l'huile essentielle de conifère principalement constituée de composés mono- et sesquiterpéniques et qui ont été perdus au cours du temps en raison de leur volatilité. De ce fait, en l'absence de ces esters, qui ont en quelque sorte piégé les terpènes volatils, il n'aurait pas été possible de déterminer cet apport d'huile essentielle de conifère à la graisse animale.

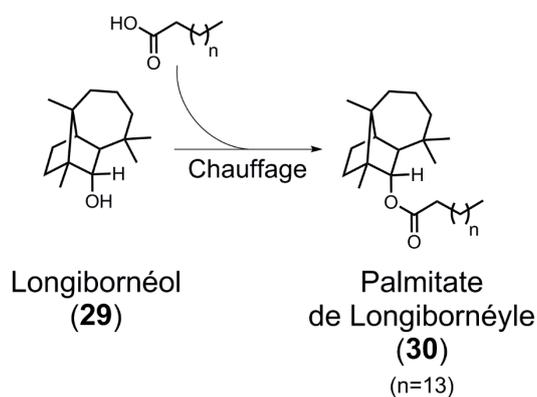


Figure 1.8 : Voie de formation d'esters mixtes (30) entre le longibornéol (29) et des acides gras par chauffage d'un mélange entre une graisse animale et une huile essentielle de conifère (Charrié Duhaut et al., 2007).

Une seconde étude illustrant l'intérêt d'étudier les macromolécules a été réalisée par Bailly et al. (2016). Cette étude a relevé la présence d'esters mixtes d'acide déhydroabiétique ou 7-oxo-déhydroabiétique et d'alkylméthoxyphénols dans des goudrons de Pinaceae (conifères).

L'implication des alkylméthoxyphénols (**31**) dans ces esters est particulièrement intéressante. En effet, les alkylméthoxyphénols sont des marqueurs caractéristiques de pyrolyse de bois qui sont libérés à partir de la lignine (Brebou et Vasile, 2010), un biopolymère important du bois (Mohan et al., 2006 ; Brebou et Vasile, 2010). Une fois libérés, ces composés, par leur solubilité dans l'eau et leur volatilité importante, sont facilement perdus au cours du temps, et sont de ce fait bien souvent absents du profil moléculaire d'échantillons archéologiques qui, dans ce cas, pourraient être identifiés de manière erronée comme étant des résines (matériau non chauffé) et non des goudrons résultant d'un traitement thermique. Ainsi, par la préservation des alkylméthoxyphénols sous forme estérifiée (esters mixtes entre acides diterpéniques et composés phénoliques), il a pu être déterminé que les substances organiques analysées étaient bien issues de la pyrolyse de bois de conifère. Les esters mixtes d'acide déhydroabiétique et d'alkylméthoxyphénols (**21**) auraient ainsi été formés selon un processus comprenant la libération pyrolytique des unités alkylméthoxyphénols (**31**) de la lignine, suivie d'une réaction d'estérification avec l'acide déhydroabiétique (**22**), les deux étapes se produisant pendant la pyrolyse du bois de conifère mise en œuvre pour la fabrication du goudron (Fig. 1.9). Les esters mixtes d'acide 7-oxo-déhydroabiétique et d'alkylméthoxyphénols (**32**) auraient, quant à eux, été formés à partir des esters **21** par simple oxydation naturelle, formant alors la cétone en C-7 sur la moitié diterpénique (Fig. 1.9).

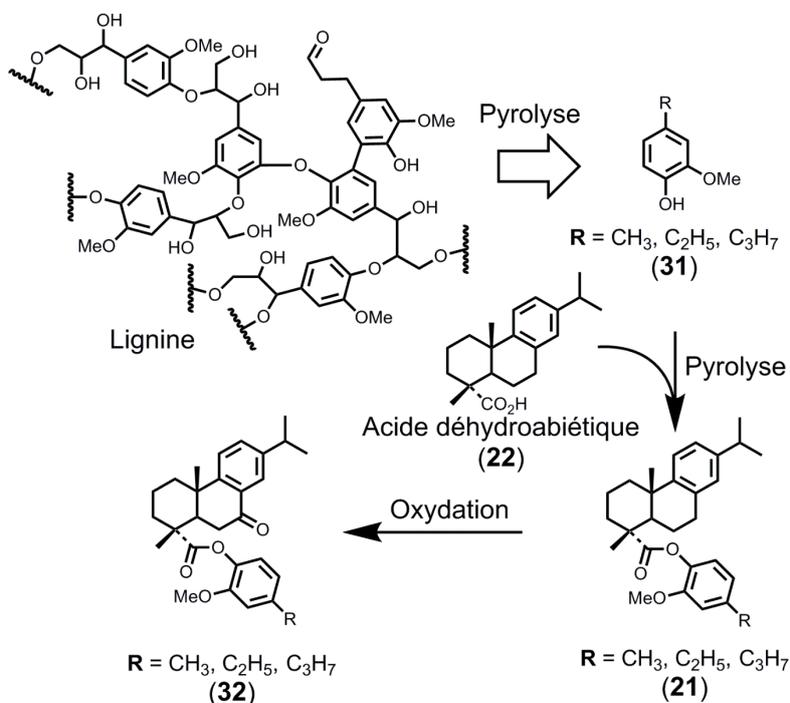


Figure 1.9 : Voie de formation d'esters mixtes entre acide déhydroabiétique ou 7-oxo-déhydroabiétique et alkylméthoxyphénols lors de pyrolyse de bois de conifères (Bailly et al., 2016).

1.5.2. Les études menées sur les macromolécules dans le domaine de l'archéologie moléculaire

Comme nous l'avons évoqué précédemment, les constituants macromoléculaires n'ont été que peu étudiés en archéologie moléculaire. Leur étude, souvent complexe, a été réalisée jusqu'à présent essentiellement par des méthodes pyrolytiques, des réactions d'hydrolyse alcaline ou de méthanolyse afin d'obtenir des sous-unités structurales facilement identifiables par les méthodes d'analyse moléculaire couramment utilisées (GC-MS, essentiellement).

La Py-GC-MS, la TD-GC-MS ou encore la Py-TMAH-GC/MS (Pyrolyse – en présence d'hydroxyde de tétra-méthyl-ammonium – chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse) sont les techniques pyrolytiques qui ont été les plus utilisées pour étudier les macromolécules dans des échantillons archéologiques (Buckley et al., 1999, 2004 ; Buckley et Evershed, 2001 ; Languri, 2004 ; Hao et al., 2019). Toutefois, ces techniques pyrolytiques ont été appliquées dans le cas d'échantillons entiers et non pas à leur composante macromoléculaire seule qui aurait pu être isolée par des techniques séparatives comme la chromatographie liquide. Ainsi, lorsqu'une structure est identifiée par GC-MS après pyrolyse, il n'est pas possible de déterminer si elle provient d'une molécule de bas poids moléculaire, ou si elle a été libérée à partir d'une structure macromoléculaire. Par contre, l'utilisation de la TD-GC-MS et de la Py-GC-MS en séquence permet de réaliser une séparation entre composés de bas poids moléculaire et composés issus de la pyrolyse des macromolécules (Buckley et al., 1999 ; Hardy et al., 2012 ; Jones et al., 2018). En effet, par l'application de températures modérées (290-400 °C) en TD-GC-MS, seuls les composés de bas poids moléculaire suffisamment volatils sont analysés (Buckley et al., 1999). Une fois cette étape de volatilisation des composés de bas poids moléculaire réalisée, l'échantillon est ensuite analysé en Py-GC-MS avec une température de 610°C, permettant alors d'étudier la composante macromoléculaire proprement dite par coupure pyrolytique des différentes liaisons impliquées dans la réticulation des macromolécules. Néanmoins, cette association en série de la TD-GC-MS avec la Py-GC-MS, bien qu'elle permette d'étudier les constituants monomériques des macromolécules et ainsi de déterminer des biomarqueurs potentiellement préservés, ne permet pas de résoudre le problème du manque de sélectivité des coupures pyrolytiques de liaisons dans les structures macromoléculaires. En effet, par une action pyrolytique à haute température, des réactions de déshydratation, de déshydrogénation, de transméthylation et de décarboxylation interviennent, entraînant la défonctionnalisation et l'aromatisation des sous-unités libérées des

macromolécules, rendant donc l'identification de la nature et de la position des liaisons impliquées dans les macromolécules impossible.

L'hydrolyse alcaline suivie de la triméthylsilylation, sans séparation préalable des constituants macromoléculaires des échantillons archéologiques, a été employée par certains chercheurs, notamment pour convertir les triglycérides d'acides gras et les esters à longue chaîne en acides et alcools, facilement analysables en GC-MS après dérivation (Colombini et al., 2000, 2005b ; Facchetti et al., 2012). L'hydrolyse alcaline a également été employée par Regert et al. (1998) pour étudier le résidu insoluble d'une substance organique présente dans un récipient en céramique. Les produits obtenus par hydrolyse ont été comparés à ceux présents dans la fraction organique soluble obtenue par extraction avec des solvants organiques (Regert et al., 1998). Il est apparu que la composition moléculaire du résidu insoluble était différente de celle de l'extrait organique et était particulièrement enrichie en produits d'oxydation d'acides gras. En raison de l'absence de ces derniers dans l'extrait organique, certainement perdus par lessivage, les auteurs ont conclu à une possible préservation de ces lipides dégradés grâce à leur incorporation dans des structures de haut poids moléculaire (Regert et al., 1998). A l'issue de cette étude, l'hydrolyse alcaline est devenue une technique opératoire couramment employée pour étudier les lipides piégés dans des structures macromoléculaires dans le cas de substances organiques présentes sur des céramiques anciennes (Craig et al., 2004 ; Hansel et al., 2011 ; Mayyas et al., 2013 ; Mayyas et Douglas, 2015). Plus récemment, l'extraction acide $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ a été développée et est de nos jours une des techniques d'extraction les plus utilisées pour étudier les lipides pouvant être absorbés dans la matrice des tessons de céramiques (Correa-Ascencio et Evershed, 2014 ; Papakosta et al., 2015).

La méthanolyse acide, autre réaction chimique visant à couper les liaisons esters et glycosidiques, a été utilisée dans l'étude des baumes de momification mais également dans l'étude des liants des peintures pour déterminer l'apport de gomme à travers la libération des sous-unités des chaînes complexes de polysaccharides qui la composent, mais également pour déterminer la présence de méthoxyacides aromatiques pouvant provenir du tannin particulièrement abondant chez certaines plantes (Mejanella et al., 1997 ; Tchapla et al., 2004 ; Brettell et al., 2017 ; Brøns et al., 2018).

1.5.3. Les dégradations chimiques sélectives de macromolécules en géochimie organique

Une difficulté majeure dans l'étude de la matière organique sédimentaire est liée aux processus d'altération qu'elle subit et qui influent sur son état de préservation. En effet, dans la plupart des cas, la grande majorité de la matière organique est reminéralisée par des processus biologiques et géochimiques intervenant dans ces milieux, mais par certaines spécificités physico-chimiques dans certains milieux de dépôt, il arrive qu'une partie des matériaux organiques y échappe. Cette matière organique va subir différents processus d'altérations bactériennes ou non biologiques qui vont entraîner, notamment, des réactions de condensation/polymérisation. De tels processus sont responsables de la formation de constituants macromoléculaires sédimentaires comme les kérogènes (« constituants organiques contenus dans les roches sédimentaires insolubles dans les solvants organiques et aqueux » ; Tissot et Welte, 1978), la part insoluble dans les solvants organiques de la matière organique sédimentaire représentant au moins 90% de la masse totale de la composante organique, les ± 10% restants correspondant quant à eux à des composés de bas poids moléculaire (Tissot et Welte, 1978). Parmi les procédés les plus utilisés pour l'identification moléculaire des constituants des kérogènes figurent la pyrolyse (Goth et al., 1988 ; Blokker et al., 1998), mais également les réactions de dégradation chimique sélectives (Hofmann et al., 1992 ; Koopmans et al., 1997 ; Blokker et al., 1998 ; Putschew et al., 1998 ; Schaeffer-Reiss et al., 1998). Cette approche a connu un véritable essor autour des années 90, et a permis d'étudier la composante macromoléculaire de la matière organique sédimentaire de manière plus détaillée qu'avec les méthodes pyrolytiques grâce à la spécificité des réactifs de coupure choisis en fonction de la nature des liaisons impliquées dans la constitution de ces structures macromoléculaires. Ainsi, à travers l'utilisation de voies de dégradations chimiques sélectives seules ou en séquence, de nombreuses sous-unités de natures variées ont pu être libérées et étudiées par coupures de liaisons (poly)sulfures (Rullkötter et Michaelis, 1989 ; Hofmann et al., 1992 ; Schaeffer et al., 1995a ; Koopmans et al., 1997 ; Putschew et al., 1998 ; Schaeffer-Reiss et al., 1998), esters (Rullkötter et Michaelis, 1989 ; Schaeffer-Reiss et al., 1998 ; Glombitza et al., 2009), éthers (Rullkötter et Michaelis, 1989 ; Koopmans et al., 1997 ; Putschew et al., 1998 ; Schaeffer-Reiss et al., 1998 ; Glombitza et al., 2011), ou encore C-C (Rullkötter et Michaelis, 1989 ; Richnow et al., 1992, 1993 ; Schaeffer-Reiss et al., 1998). Quelques exemples de réactifs utilisés pour la coupure de liaisons covalentes impliquées dans la réticulation de sous-unités dans les kérogènes sont donnés dans le tableau 1.1. L'étude de ces composés libérés de manière sélective a permis

non seulement de déterminer leur mode de liaison dans les structures macromoléculaires, mais bien souvent également d'identifier des biomarqueurs qui ne sont présents que sous forme liée et, de ce fait, de mettre ainsi en évidence des sources de la matière organique qui seraient passées inaperçues sur la base de l'étude des seuls composés libres (Kohnen et al., 1991 ; Adam et al., 1993 ; Schaeffer et al., 1993, 1995a).

Tableau 1.1 : Exemple de quelques réactifs utilisés dans le domaine de la géochimie pour couper les liaisons impliquées dans le kérogène (Rullkötter et Michaelis, 1989; Schaeffer-Reiss et al. 1998)

Type de liaison	Réactifs de coupure chimique
Ester	Hydrolyse alcaline (e.g. MeOH/KOH)
Amide	Hydrolyse acide (e.g. MeOH/HCl)
Ether	BCl ₃ , BBr ₃ , TMSI/LiAlH ₄ , HI/LiAlH ₄
Sulfure	Ni de Raney/H ₂ , Li/EtNH ₂
Ar-C-	RuO ₄
-C=C-	RuO ₄ , O ₃

Outre ces quelques exemples de réactifs connus pour leur utilisation en géochimie dans l'étude des kérogènes, d'autres réactifs utilisés dans d'autres domaines peuvent montrer un certain intérêt pour la coupure des liaisons covalentes présentes dans les macromolécules. En ce sens, le réactif NaBH₄, classiquement utilisé pour réduire les hydroperoxydes en alcools dans l'étude des produits issus de l'autoxydation (e.g. Frankel et al., 1977 ; Marchand et Rontani, 2001), pourrait permettre d'examiner les sous-unités des macromolécules liées par ponts peroxydes.

1.6. Positionnement du sujet de thèse

L'analyse des substances organiques archéologiques est d'une grande complexité, notamment par la diversité des matériaux organiques utilisés par l'Homme, mais également par les différents processus d'altérations anthropiques ou naturels que peuvent subir ces substances au cours du temps. Jusqu'à présent, la vaste majorité des analyses réalisées à partir de telles substances organiques afin d'en déterminer l'origine biologique et les altérations naturelles ou anthropiques subies a été largement consacrée aux composés de bas poids moléculaires. L'étude des macromolécules, formées notamment lors du traitement thermique de substances ou encore par des processus de vieillissement, est encore largement sous-exploitée, et semble être la suite logique à donner aux études chimiotaxonomiques des matériaux organiques trouvés en contexte archéologique. Cette étude pourrait permettre d'identifier de nouveaux ingrédients jusque-là

connus uniquement grâce aux sources littéraires, mais également de déterminer les différentes altérations subies par les substances organiques pendant leur préparation, leurs phases d'utilisation et d'abandon. L'étude de ces composantes polymériques ou macromoléculaires pourrait s'avérer particulièrement utile dans le cas d'échantillons organiques archéologiques sévèrement altérés, échantillons susceptibles d'avoir perdu certaines composantes originelles comme par exemple les composés les plus volatils (e.g., mono- et sesquiterpènes), qui représentent potentiellement de bons marqueurs chimiotaxonomiques.

Ainsi, dans la première partie de notre thèse (chapitre 2), nous nous sommes particulièrement intéressés à l'étude des réactions de condensation/polymérisation pouvant entraîner la formation de produits de réactions croisées entre constituants de différents ingrédients, réactions intervenant lors du vieillissement ou lors de la préparation de mélanges d'ingrédients. Pour ce faire, des expériences de dégradation par autoxydation, processus bien connu pour être à l'origine de la polymérisation de nombreux matériaux organiques (Lazzari et Chiantore, 1999 ; Bouwman et van Gorkum, 2007 ; Tolvanen et al., 2008), ont été réalisées à partir de mélanges de substances souvent présentes en contexte archéologique, dans l'objectif de former des produits de condensation entre ingrédients (formation de constituants « polymériques »). Pour l'étude moléculaire des composantes macromoléculaires ainsi formées, une approche s'inspirant des expérimentations réalisées sur les kérogènes dans le domaine de la géochimie et faisant appel à des réactions de dégradation chimique séquentielles des liaisons peroxydes, esters et éthers a été élaborée.

Dans la seconde partie de notre thèse, nous nous sommes intéressés, de manière plus conventionnelle, aux substances organiques trouvées en contexte archéologique dans l'objectif d'en identifier l'origine biologique, mais également, plus spécifiquement, dans le but d'étudier les processus d'altération qu'elles ont pu subir et de déterminer des biomarqueurs de ces substances utilisables dans les conditions subies par ces substances depuis leur abandon. Ainsi, il sera présenté en chapitre 3 une étude moléculaire menée sur des résines de Dipterocarpaceae découvertes parmi la cargaison de deux épaves asiatiques du XII^{ème} siècle. Enfin, nos travaux ont été complétés par l'étude moléculaire de brais de bouleau du Néolithique, étude qui nous a conduits à identifier de nouveaux marqueurs moléculaires formés par condensation et potentiellement utilisables comme indicateurs de traitements thermiques poussés (chapitre 4).

Chapitre 2

**Etude expérimentale de processus
oxydants de vieillissement affectant les
substances organiques trouvées en
contexte archéologique**

2.1. Introduction

Après une introduction consacrée aux processus d'autoxydation susceptibles d'affecter les matériaux organiques archéologiques, une première partie de ce chapitre a porté sur l'étude expérimentale des processus d'altération oxydante qui ont affecté des substances organiques archéologiques très altérées prélevées dans des vases provenant de tombes égyptiennes, constituées d'huile essentielle de cèdre et de genévrier (Sarret et al., 2017). Ces expériences d'autoxydation en laboratoire ont été réalisées à partir d'une huile essentielle provenant de bois de cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica*) et ont mis en jeu des initiateurs de radicaux (*N*-hydroxyphthalimide -NHPI- et acétylacétonate de Co (II)) en présence d'oxygène. Un des objectifs de cette étude était également la mise au point de conditions expérimentales d'oxydation susceptibles de reproduire de manière pertinente les processus de vieillissement observés dans le cas de substances organiques archéologiques.

L'étude des processus de vieillissement subis par des matériaux organiques archéologiques à l'aide d'expériences de laboratoire en conditions oxydantes a été poursuivie par des travaux qui ont porté plus particulièrement sur l'oxydation de mélanges de substances organiques afin d'étudier notamment la formation de produits de réactions croisées. Ainsi, nous nous sommes intéressés à l'altération de mélanges constitués de dérivés d'acides gras insaturés, l'ester butylique de l'acide oléique et l'ester méthylique de l'acide linoléique (en tant que substitués de triglycérides contenant des acides gras insaturés), et de substances terpéniques telles que de l'huile essentielle de baies de genévrier (*Juniperus communis*) ou de la résine de pin sylvestre (*Pinus sylvestris*). Des mélanges entre matières grasses et substances terpéniques ont en effet été assez fréquemment mis en évidence dans le cas de résidus organiques trouvés en contexte archéologique (e.g. Buckley et al., 2004 ; Charrié-Duhaut et al., 2007 ; Scholz-Böttcher et al., 2013) et sont également attestés dans la littérature dans le cas de vernis de tableaux (Tirat et al., 2016). Des conditions opératoires adaptées de celles utilisées lors des expériences réalisées sur l'huile essentielle de cèdre de l'Atlas ont été mises en œuvre. Les produits de réaction obtenus lors de ces expériences ont tout d'abord été étudiés par GC-MS afin d'identifier la nature des produits d'oxydation des dérivés d'acides gras insaturés et des substances naturelles utilisées et de reconstituer les voies d'altération de ces composés en conditions oxydantes. Par ailleurs, nous avons également cherché à mettre en évidence la formation de produits dimériques issus de réactions croisées entre acides gras et composés monoterpéniques, produits qui peuvent résulter de réactions d'addition entre espèces radicalaires formées lors de l'autoxydation des

doubles liaisons. Enfin, nous avons essayé de mettre en évidence la formation de substances polaires de nature oligo-/polymérique à l'aide de réactions de dégradation chimique de coupure des liaisons peroxydes (NaBH_4) ou esters et éthers (acide iodhydrique puis LiAlH_4), réactions utilisées seules ou de manière séquentielle. Ces méthodes de dégradations chimiques sont en effet susceptibles de libérer les sous-unités liées par des liaisons peroxydes et/ou éthers/esters à partir des structures oligo-/polymériques formées lors du processus d'altération.

Il s'agissait de voir par cette approche si, dans le cas de matériaux organiques archéologiques même sévèrement altérés, il était possible que des ingrédients, dont les constituants analysables directement par GC-MS ont été perdus en raison de leur volatilité ou sensibilité aux processus de dégradation/lessivage, puissent néanmoins être mis en évidence par l'étude des structures de haut poids moléculaire dans lesquelles des constituants de ces ingrédients auraient été piégés et préservés.

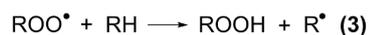
2.2. L'autoxydation : Histoire et principe général

L'autoxydation, définie comme étant la réaction spontanée de l'oxygène de l'air sur les composés organiques dans des conditions opératoires douces (Frankel, 2005), a fait l'objet de nombreuses études, et ce dès les années 40, étant donné son rôle important dans l'augmentation de la toxicité, la détérioration du goût des aliments lors de l'altération des lipides, mais également pour son rôle dans certaines maladies, notamment les cancers (Gardner, 1975 ; Frankel, 1980, 1985 ; Frankel et al., 1984 ; Spiteller, 1998 ; Spiteller et Spiteller, 1998). Dans ce processus, les lipides sont oxydés par l'oxygène de l'air, principalement présent sous sa forme triplet, à travers un mécanisme radicalaire comprenant trois étapes : initiation, propagation et terminaison (Fig. 2.1) (Frankel, 2005 ; Bastien, 2011).

Initiation



Propagation



Terminaison



Figure 2.1 : Etapes principales de l'autoxydation des composés organiques.

Comme le spécifie la définition même de l'autoxydation, l'oxygène triplet de l'air peut directement réagir sur un lipide, notamment quand celui-ci présente une insaturation, pour former une espèce oxygénée, mais cette réaction est extrêmement lente (Jefford et al., 1976 ; Graziano et al., 1977). En raison de cela, l'initiation de l'autoxydation est généralement induite par l'intervention d'une espèce appelée initiateur, permettant l'abstraction d'un atome d'hydrogène du lipide menant à la formation d'un radical alkyle libre (Fig. 2.1, équation 1). Cette étape est dépendante de l'énergie de dissociation (ΔH) de la liaison C-H nécessaire pour former le radical alkyle libre. Plus celle-ci sera faible, plus l'abstraction de l'atome d'hydrogène sera facile, et plus l'autoxydation sera favorisée. Ainsi, les atomes d'hydrogène comptant parmi les plus facilement abstraits sont ceux situés sur un méthylène situé en position allylique pour lesquels l'énergie de dissociation est de 88 Kcal/mol (75 Kcal/mol pour une position bisallylique) contre 100 Kcal/mol dans le cas d'un méthylène en position non allylique (Gardner, 1989 ; Porter et al., 1995 ; Blanksby et Ellison, 2003 ; Luo, 2007). C'est la raison pour laquelle les composés insaturés, notamment les acides gras insaturés qui ont fait l'objet de nombreuses études, sont particulièrement sensibles aux mécanismes d'autoxydation.

Les radicaux initiant l'autoxydation, et donc l'abstraction d'un atome d'hydrogène, peuvent provenir de différentes sources. Il peut s'agir, notamment, de radicaux alkoxydes ou peroxydes issus d'hydroperoxydes présents dans le milieu lipidique provenant d'autres processus d'oxydation (e.g. photooxydation) (Frankel, 2005). Ces derniers peuvent en effet mener à des radicaux alkoxydes par dissociation thermique (Fig. 2.2 équation 5 ; Gardner, 1975 ; Frankel, 1980, 2005 ; Paquette et al., 1985), à des radicaux alkoxydes au travers de réactions de type Fenton avec des métaux de transition (Fig. 2.2 équation 6 ; Gardner et al., 1974 ; Gardner, 1975, 1989 ; Frankel, 2005), ou encore à des radicaux peroxydes par réaction avec des métaux de transition à leur plus haut degré d'oxydation (Fig. 2.2 équation 7 ; Gardner, 1975 ; Frankel, 2005). Ces initiateurs peuvent aussi correspondre à des photosensibilisateurs, par exemple des cétones, qui, par exposition à la lumière, sont susceptibles de mener à la formation de radicaux acyles et alkyles (Fig. 2.2 équation 8 ; Frankel, 1980, 2005 ; Paquette et al., 1985).

Dissociation thermique



Décomposition par métaux de transition



Exposition à la lumière

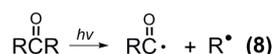


Figure 2.2 : Voies possibles de formation de radicaux capables d'initier les processus d'autoxydation (Schaich, 2013).

Une fois l'étape d'initiation réalisée, le radical alkyle résultant va réagir avec l'oxygène de l'air pour former un radical peroxyde (Fig. 2.1 équation 2) qui, par abstraction d'un atome d'hydrogène sur un autre lipide insaturé, va mener à la formation de l'hydroperoxyde correspondant (Fig. 2.1 équation 3). Ces deux réactions constituent l'étape de propagation de l'autoxydation. La recombinaison de radicaux, interrompant la propagation, correspond à l'étape de terminaison du processus d'autoxydation (Fig. 2.1 équation 4).

2.3. Catalyse de la réaction d'autoxydation

Comme nous venons de le détailler, l'autoxydation est un mécanisme particulièrement lent en l'absence d'initiateurs de radicaux. De ce fait, il est important, pour la réalisation d'expériences d'autoxydation artificielle de substrats organiques seuls ou en mélange, d'utiliser des catalyseurs pour accélérer ce processus.

2.3.1. Le choix de la catalyse pour l'autoxydation

De nombreux catalyseurs existent pour induire l'autoxydation. Parmi les initiateurs fréquemment utilisés figurent les métaux de transition, métaux qui sont largement utilisés dans l'étape de séchage par polymérisation oxydante des vernis fraîchement appliqués sur les peintures (Madhava Reddy et al., 1995 ; Punniyamurthy et al., 1995, 1997 ; da Silva et al., 2003 ; Bouwman et van Gorkum, 2007 ; Parreira et al., 2016). De manière alternative, le chauffage à des températures plus ou moins élevées a été également utilisé pour initier l'autoxydation de substances organiques (Fioriti et al., 1967 ; Lazzari et Chiantore, 1999 ; Lampi et al., 2002 ; Bastien, 2011 ; Huang et al., 2014, 2015).

Des expériences d'autoxydation réalisées au laboratoire antérieurement à nos travaux ont été conduites en utilisant la combinaison de deux initiateurs de radicaux que sont l'azobisisobutyronitrile (AIBN) et le tert-butyl hydroperoxide (t-BuOOH). L'utilisation de cette combinaison d'initiateurs a permis de reproduire expérimentalement l'altération par autoxydation subie par différentes substances organiques exposées à des conditions d'altération oxydantes en contexte archéologique et a permis de reproduire au laboratoire par autoxydation de substances naturelles fraîches la formation de produits d'oxydation identiques à ceux identifiés dans des objets archéologiques très altérés. Nous pouvons notamment citer les travaux de Solazzo et al. (2016), qui ont fait appel à ce procédé pour simuler l'autoxydation de résine de *Styrax officinalis*, mais également les travaux d'Ebert (2016) qui a réalisé l'autoxydation d'une huile essentielle de cèdre de l'Atlas à l'aide du couple AIBN/t-BuOOH en présence d'O₂.

Toutefois, cette catalyse présente un problème majeur vis-à-vis de l'utilisation du t-BuOOH. En effet, ce réactif est disponible en solution dans le décane qui, lors de l'autoxydation, forme des produits d'oxydation non désirés. Ainsi, une autre combinaison de catalyseurs, à savoir le N-hydroxyphthalimide (NHPI) et l'acétylacétonate de Cobalt (II) (Co(acac)₂), dont l'utilisation pour des réactions d'oxydation est bien documentée (Ishii et al., 1995 ; Yoshino et al., 1997 ; Wentzel et al., 2000 ; Matsushita et al., 2010 ; Houssini et al., 2014) a été employée.

2.3.2. Le cycle catalytique du NHPI

La première utilisation du NHPI par Grochowski et son équipe (Grochowski et al., 1977 ; Coseri, 2009 ; Melone et Punta, 2016) pour catalyser l'autoxydation remonte à 1977, mais c'est seulement à partir de 1995 que les mécanismes mis en jeu dans la catalyse de l'autoxydation par le NHPI ont été totalement élucidés grâce à l'étude de Ishii et al. (1995) qui ont, notamment, mis en évidence expérimentalement la formation du radical phthalimide N-oxy (*appelé radical PINO*) issu de l'abstraction de l'atome d'hydrogène porté par l'atome d'oxygène du NHPI. Un schéma catalytique a ainsi été proposé (Melone et Punta, 2016) (Fig. 2.3a).

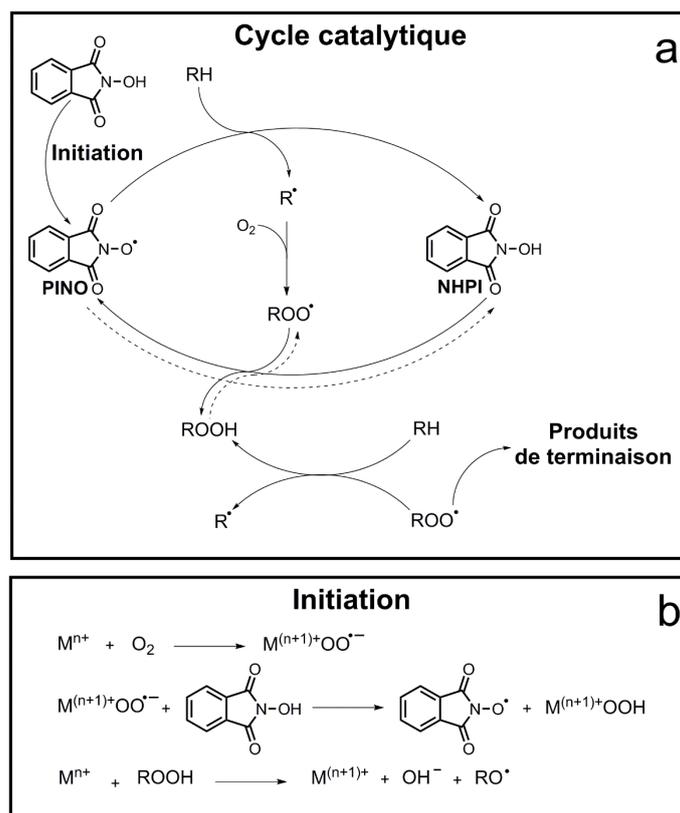


Figure 2.3 : (a) Cycle catalytique du NHPI, (b) étape d'initiation du radical PINO induite par les métaux de transition (Melone et Punta, 2016).

La première étape d'initiation est la formation du radical PINO à partir du NHPI (Fig. 2.3a). Ce rôle d'initiation peut être joué notamment par un métal de transition capable de transférer un électron sur de l'oxygène pour générer une espèce réactive (ion superoxyde) lui-même capable d'abstraire un atome d'hydrogène au niveau du NHPI pour former le radical PINO (Melone et Punta, 2016) (Fig. 2.3b). L'utilisation d'un tel co-catalyseur permet de s'affranchir de l'utilisation de températures élevées pour former le radical PINO, températures qui favoriseraient également la décomposition de ce dernier (Fig. 2.4). Toutefois, ce processus de dégradation ne devient notable qu'au-delà de 80 °C (Melone et Punta, 2016).

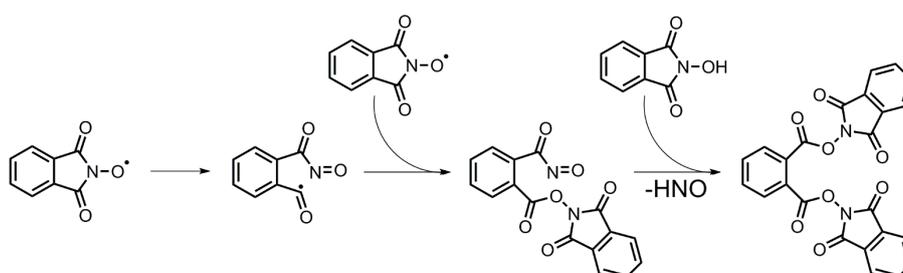


Figure 2.4 : Voie de décomposition du radical PINO (Melone et Punta, 2016).

Suite à l'étape d'initiation, le radical PINO est capable d'abstraire un atome d'hydrogène sur une molécule organique pour former un radical alkyle et régénérer le NHPI (Fig. 2.3a). Ce nouveau radical va ensuite réagir avec l'oxygène pour former le radical peroxyde qui pourra ensuite mener à l'hydroperoxyde correspondant par abstraction de l'atome d'hydrogène actif du NHPI, régénérant également le radical PINO. L'hydroperoxyde sera par la suite décomposé par le métal de transition pour former notamment le radical alkoyle (Fig. 2.3b), ou par le radical PINO menant alors à la formation du radical peroxyde (Fig. 2.3a). Ces radicaux pourront ensuite réagir dans le processus d'autoxydation à travers des étapes de propagation ou de terminaison.

Ce cycle catalytique est particulièrement efficace dans les étapes d'initiation et de propagation de l'autoxydation des substrats organiques. Cette efficacité est liée à trois principaux effets du NHPI :

- L'effet enthalpique : pour que le NHPI fonctionne efficacement en tant que catalyseur d'autoxydation, il est nécessaire que l'énergie de la liaison O-H du NHPI soit du même ordre de grandeur que celle des atomes d'hydrogène à abstraire sur le substrat organique, afin que la catalyse soit exothermique ou légèrement endothermique. Dans le cas du NHPI, en fonction du solvant, le ΔH de la liaison O-H est situé entre 85 et 95 Kcal/mol, ce qui est donc tout à fait compatible avec le ΔH des liaisons C-H allyliques d'un substrat organique insaturé (pour rappel, 88 Kcal/mol pour une liaison allylique, et 75 Kcal/mol pour une liaison en position bisallylique) (Coseri, 2009 ; Melone et Punta, 2016).
- L'effet polaire : par le caractère électrophile du radical PINO plus important que celui du radical peroxyde, le radical PINO va abstraire des atomes d'hydrogène plus facilement que le radical peroxyde (Melone et Punta, 2016).
- En dernier lieu, le radical PINO montre une efficacité catalytique importante pour l'abstraction d'atomes d'hydrogène tandis que le NHPI est un bon donneur d'hydrogène. Ce dernier est donc capable de piéger efficacement les radicaux peroxydes sous la forme d'hydroperoxydes, ce qui a pour effet de limiter les réactions de terminaison de ce radical et ainsi de favoriser les étapes de propagation (Melone et Punta, 2016).

2.4. Etude de la dégradation de l'huile essentielle de cèdre de l'Atlas par autoxydation

Nous avons tout d'abord cherché à évaluer la pertinence des conditions envisagées pour réaliser des expériences d'autoxydation en laboratoire censées reproduire les processus d'autoxydation naturels subis par des substances organiques archéologiques. Dans ce but, nous avons cherché à réaliser une expérience d'autoxydation dans les conditions discutées plus haut à partir d'une substance pour laquelle nous disposions d'un analogue archéologique naturellement autoxydé.

Dans une telle situation, il est possible de comparer les produits d'oxydation obtenus de manière artificielle à ceux observés en contexte archéologique, permettant alors de valider ou non l'utilisation de la combinaison NHPI/Co(acac)₂ comme initiateurs pour simuler de manière pertinente les mécanismes d'autoxydation.

Nous avons de ce fait étudié l'autoxydation de l'huile essentielle de cèdre de l'Atlas en utilisant la combinaison NHPI/Co(acac)₂ comme initiateurs. Nous disposions en effet, pour point de comparaison, d'un échantillon archéologique très altéré constitué principalement par de l'huile essentielle de cèdre qui avait été étudié précédemment au laboratoire (Sarret et al., 2017).

2.4.1. Contexte de l'étude

Les expériences d'autoxydation de substances organiques d'intérêt archéologique que nous avons réalisées dans le cadre de ces premiers travaux se sont ainsi inscrites dans une étude plus globale menée au sein du laboratoire sur l'identification de substances organiques présentes dans le fond de trois vases égyptiens datant des deux premières dynasties égyptiennes et trouvés à Abydos (3100-2700 BCE) (Sarret et al., 2017). Cette étude a permis de révéler que ces substances étaient principalement composées d'une huile essentielle de cèdre de l'Atlas avec une contribution d'une huile essentielle provenant d'un arbre de la famille des Cupressaceae (Sarret et al., 2017). Ce mélange s'apparente à la substance appelée « Cedrium » qui, dans l'antiquité, était utilisée pour l'embaumement des défunts à travers différentes techniques de momification (Lucas, 1931 ; Koller et al., 2005 ; Abdel-Maksoud et El-Amin, 2011).

Toutefois, bien que les conditions de préservation aient été idéales (jarres scellées stockées dans un milieu sec), la substance organique contenue dans les vases avait tout de même subi des altérations par autoxydation, ce qui a mené à la disparition de la plus grande partie des

terpènes originels au profit de molécules oxydées, rendant ainsi plus difficile l'identification des ingrédients utilisés pour la préparation de ces substances archéologiques (Fig. 2.5). Une partie des constituants terpéniques de ces substances a pu être identifiée par synthèse de composés de référence, études de RMN et comparaison des temps de rétention et des spectres de masse entre composés présents dans les jarres égyptiennes et leurs homologues synthétiques (Sarret et al., 2017) (Fig. 2.5).

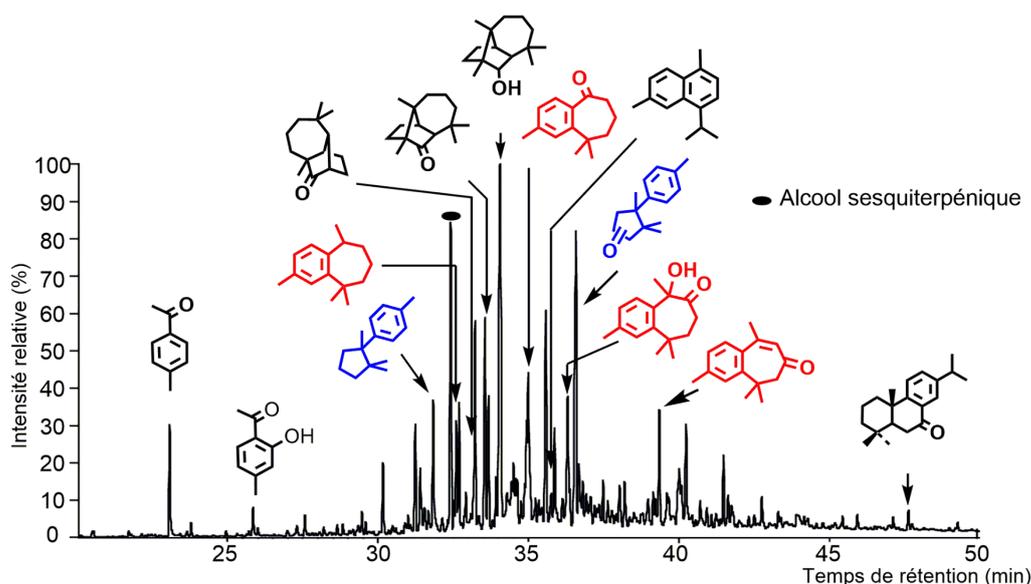


Figure 2.5 : Chromatogramme en phase gazeuse partiel (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction volatile de la substance organique présente dans le fond de la jarre E21727 trouvée à Abydos en Egypte. Les composés en bleu correspondent à des sesquiterpènes de la famille du cuparène, et les composés en rouge à des sesquiterpènes de la famille de l'himachalène (Sarret et al., 2017).

Ainsi, bien que l'origine taxonomique des molécules oxydées observées dans l'extrait lipidique de la substance organique archéologique ne fasse que peu de doute, il était toutefois nécessaire de compléter ces travaux par l'élaboration d'une expérience d'autoxydation en laboratoire de l'huile essentielle de cèdre de l'Atlas afin de confirmer que les molécules oxydées observées étaient bien issues de processus d'autoxydation ayant affecté les terpènes de l'huile essentielle de cèdre de l'Atlas utilisée pour préparer les substances trouvées dans les vases, mais également afin de nous permettre de tester la validité des expériences de simulations effectuées avec le couple NHPI/Co(acac)₂, et d'optimiser les conditions opératoires.

2.4.2. Choix des conditions expérimentales d'autoxydation avec NHPI/Co(acac)₂

Un certain nombre d'études sur l'oxydation de divers matériaux organiques ont été réalisées avec le NHPI avec de nombreuses variations concernant les conditions expérimentales portant sur la nature du co-catalyseur, la température ou le choix du solvant (Yoshino et al., 1997 ; Wentzel et al., 2000 ; Recupero et Punta, 2007 ; Coseri, 2009 ; Cheng et al., 2014 ; Melone et Punta, 2016).

Les conditions qui ont été choisies pour notre étude, dont le détail est disponible en partie expérimentale (cf. § 6.2.2), sont notamment basées sur les travaux de Houssini et al. (2014). Ces auteurs ont évalué l'influence du solvant, de la température, et du co-catalyseur sur le rendement et la sélectivité des produits formés lors de l'autoxydation de l'aryl-himachalène. Ainsi, nous avons choisi d'expérimenter l'autoxydation de l'huile essentielle de cèdre de l'Atlas en utilisant le couple NHPI/Co(acac)₂ comme catalyseur et de l'acide acétique (AcOH) ou de l'acétonitrile (CH₃CN) comme solvants. La température, quant à elle, a été fixée à 70 °C, température qui correspond à un bon compromis permettant une catalyse efficace du processus d'oxydation sans favoriser de manière trop importante les réactions de décomposition du radical PINO (Houssini et al., 2014 ; Petroselli et al., 2014). Les quantités d'initiateurs ont quant à elles été fixées de manière arbitraire comme indiqué dans la partie 6.2.2 pour les premiers essais d'autoxydation.

2.4.3. Autoxydation de l'huile essentielle de cèdre de l'Atlas

Trois prélèvements à 20, 42 et 92 h ont été réalisés au cours des expériences. Chaque prélèvement est extrait successivement avec du pentane et avec du CH₂Cl₂ (cf. § 6.2.2). Le choix d'une extraction au pentane a été décidé en raison du faible point d'ébullition de ce solvant qui permet, si nécessaire, de concentrer la matière organique qui y est dissoute en limitant l'impact de l'évaporation sous flux d'argon sur les molécules les plus volatiles présentes. Le pentane est, par ailleurs, un mauvais solvant pour le NHPI et ses produits de transformation (contrairement au CH₂Cl₂) qui ne vont de ce fait interférer que de manière limitée avec les produits d'oxydation issus de l'huile essentielle de cèdre. L'extraction au CH₂Cl₂ (solvant à faible point d'ébullition également) permet quant à elle de récupérer les molécules plus polaires (acides ou alcools) qui seraient peu solubles dans le pentane (cf. § 6.2.2).

a) Composition de l'huile essentielle de cèdre de l'Atlas

Le cèdre de l'Atlas fait partie de la famille des Pinaceae. Le genre *Cedrus*, composé de 4 espèces (*deodora*, *brevifolia*, *atlantica*, *libani*), est largement réparti sur les côtes méditerranéennes, mais également dans les montagnes de l'Himalaya (Agrawal et Rastogi, 1984 ; Yilmaz et al., 2005). L'huile essentielle produite à partir d'arbres du genre *Cedrus* est connue depuis l'Egypte antique, comme précédemment discuté, notamment pour son utilisation dans les procédés d'embaumement (e.g. Buckley et al., 2004 ; Koller et al., 2005 ; Scholz-Böttcher et al., 2013 ; Sarret et al., 2017). Cette huile essentielle est principalement composée de sesquiterpènes de la famille de l'himachalène dont les représentants majeurs sont les α , β , γ -himachalènes (**S1**, **S2** et **S3**) (Başer et Demirçakmak, 1995 ; Kurt et al., 2008 ; Loizzo et al., 2008 ; Paoli et al., 2011). L'huile essentielle de cèdre de l'Atlas étudiée au laboratoire présente également la même prédominance des α , β , γ -himachalènes (**S1**, **S2**, **S3** ; Fig. 2.6a).

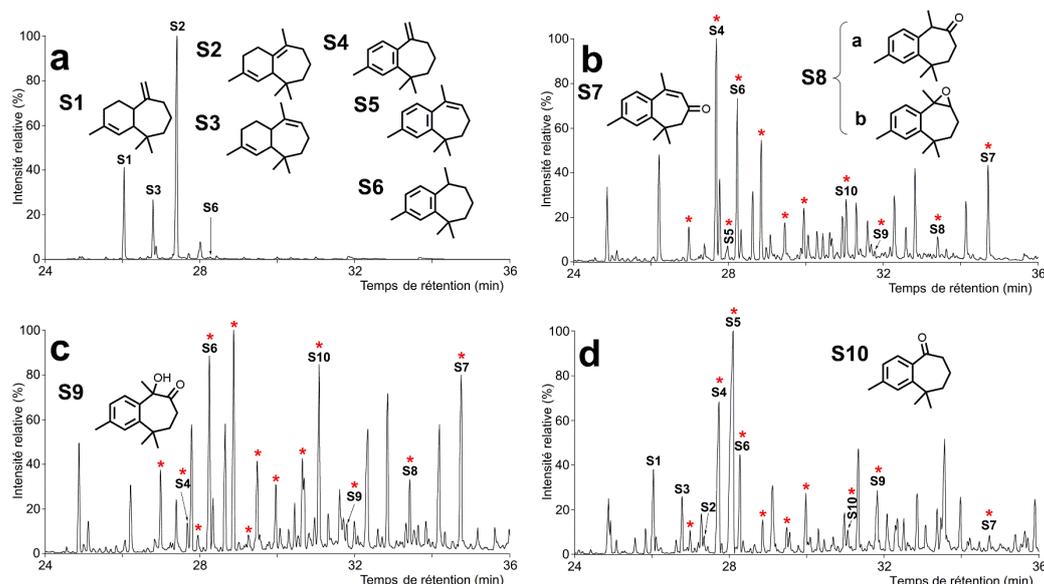


Figure 2.6 : Chromatogrammes en phase gazeuse partiels (GC-MS, IE, 70 eV) de l'huile essentielle de cèdre de l'Atlas avant oxydation (a) ; de l'extrait au pentane après 20 h et 92 h d'oxydation dans CH₃CN (b, c) ; de l'extrait au pentane après 92 h d'oxydation dans AcOH (d). Les étoiles rouges indiquent les composés également mis en évidence dans des vases égyptiens (Sarret et al., (2017). Les structures des composés numérotés sont représentées dans l'Appendice de la thèse. Programme A de température du four GC (cf. § 6.5.2).

b) Etude des extraits au pentane après autoxydation artificielle de l'huile essentielle du cèdre de l'Atlas

L'analyse par GC-MS de l'extrait au pentane obtenu après 20 h de vieillissement par autoxydation de l'huile essentielle de cèdre de l'Atlas dans CH₃CN a montré la disparition totale

des sesquiterpènes originaux au profit des composés oxydés **S4-S10** qui ont été identifiés par comparaison avec des produits de synthèse, à l'exception du composé **S8** pour lequel deux possibilités de structures ont été proposées (**S8a,b** ; Fig. 2.6a,b ; Sarret et al., 2017). Ces molécules ont également été mises en évidence dans l'échantillon archéologique analysé précédemment (Sarret et al., 2017 ; Fig. 2.6b, étoiles rouges), montrant donc que les conditions mises en œuvre dans les expériences d'autoxydation réalisées dans CH₃CN semblent bien reproduire l'altération naturelle subie par la matière organique archéologique.

Les sesquiterpènes aromatiques **S4-S6** ont très probablement été formés par des processus de déshydrogénation affectant les trois isomères d'himachalène **S1-S3** lors de l'expérience d'oxydation (Fig. 2.7). Ces réactions de déshydrogénation conduisant à la formation des composés **S4-S5** mettent vraisemblablement en jeu, pour chaque double liaison formée, un processus en deux étapes présenté dans la Fig. 2.8. Ce processus comprend en premier lieu la formation d'un hydroperoxyde en position allylique, position qui est particulièrement sensible à l'abstraction d'un atome d'hydrogène (cf. § 2.2), suivie d'une élimination de peroxyde d'hydrogène menant alors à la formation d'une insaturation supplémentaire (Fig. 2.8). Dans ce contexte, le composé **S6** dérive vraisemblablement du β -himachalène **S2** selon une voie comprenant une première étape d'isomérisation de l'insaturation située dans le cycle à sept atomes de carbone. L'étape d'aromatisation conduisant à l'aryl-himachalène **S6** fait intervenir, comme décrit pour la formation des composés **S4** et **S5**, la formation d'un hydroperoxyde suivie de l'élimination de H₂O₂ (Fig. 2.8).

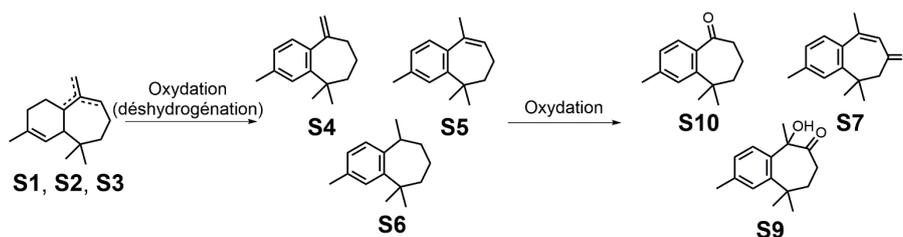


Figure 2.7 : Voie d'autoxydation supposée des himachalènes S1-S3 de l'huile essentielle de cèdre de l'Atlas menant à la formation des sesquiterpènes altérés.

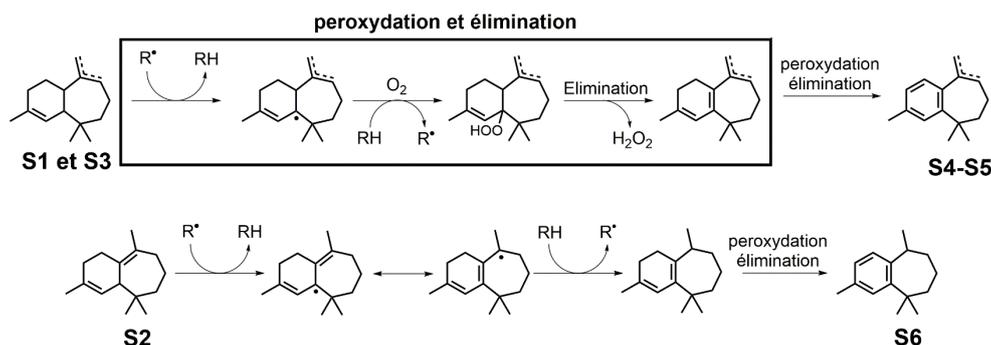


Figure 2.8 : Voie de formation proposée pour les composés aromatiques S4-S6 à partir des himachalènes S1-S3 lors des expériences d'autoxydation.

Parmi les molécules oxygénées formées, les composés **S7-S9** dérivent très probablement du sesquiterpène aromatique **S5** comme décrit dans la Fig. 2.9. Ainsi, la formation du composé **S7** s'explique simplement par une oxydation en position allylique du composé **S5** (Fig. 2.9a voie 1) (Petrúj et Marchal, 1980). Les molécules **S8** (a ou b) et **S9**, quant à elles, pourraient être formées à partir du composé **S5** (Fig. 2.9a voie 2) par un processus comprenant une première étape commune consistant en l'addition d'un radical peroxyde sur l'insaturation du composé **S5** (Romanus et al., 2008 ; Schaich, 2013). L'espèce radicalaire ainsi formée peut ensuite, après abstraction d'un atome d'hydrogène et décomposition de la fonction peroxyde, conduire à la cétone **S8a** correspondante selon le mécanisme discuté précédemment, ou, alternativement, conduire par cyclisation à un époxyde **S8b** (Romanus et al., 2008 ; Fig. 2.9a voie 2). Ce dernier peut alors subir une attaque nucléophile par H₂O pour conduire au diol correspondant qui peut s'oxyder pour former le composé **S9** (Romanus et al., 2008 ; Fig. 2.9a voie 2).

A la différence des composés oxygénés **S7-S9**, le composé **S10** est vraisemblablement issu du composé **S4** selon une voie comprenant la formation d'un hydroperoxyde en C-13 suivie de la coupure de celui-ci via un réarrangement de Hock appelée « fragmentation de Hock » (Rontani, 1998; Marchand et Rontani, 2001; Frankel, 2005 ; Fig. 2.7 et 2.9b).

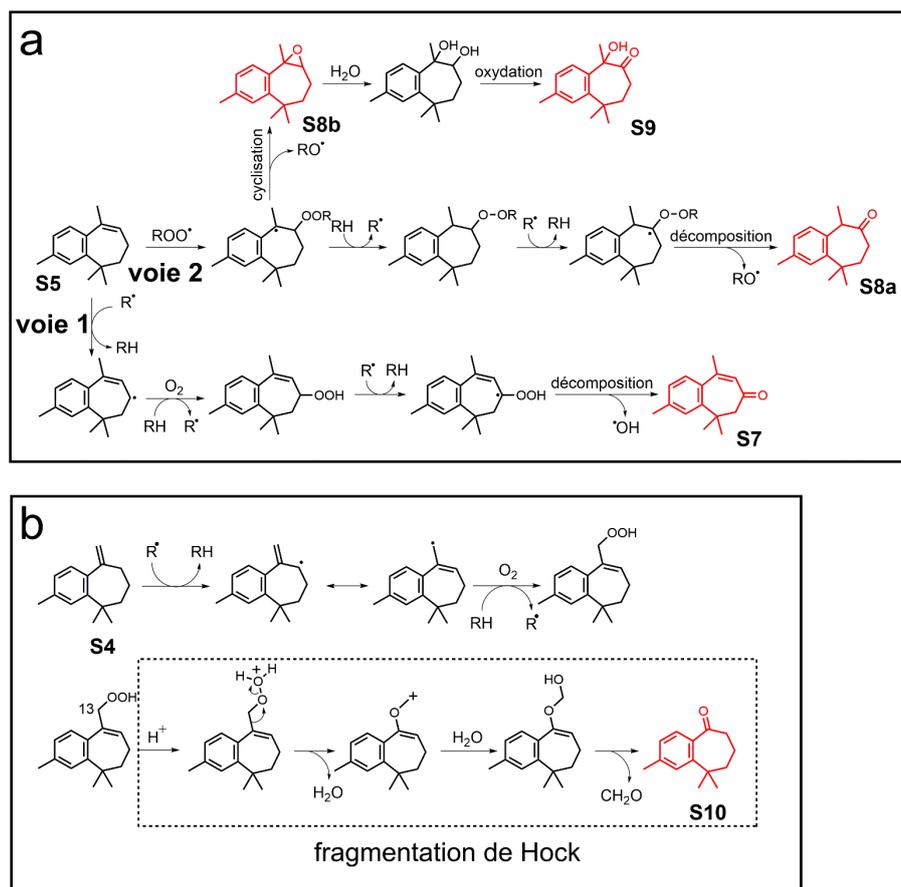


Figure 2.9 : Voies de formation proposées pour (a) les composés S7-S9 (en rouge) à partir du composé S5, (b) et le composé S10 (en rouge) à partir du composé S4.

L'analyse de l'extrait au pentane obtenu après 20 h d'oxydation de l'huile essentielle de cèdre de l'Atlas dans CH_3CN a ainsi permis de révéler la formation d'un certain nombre de produits d'altération (S4-S10) également observés dans des vases égyptiens, montrant ainsi la pertinence des conditions expérimentales mises en œuvre pour l'autoxydation de l'huile de cèdre réalisée en laboratoire (Fig. 2.6a et b, étoiles rouges). Cette expérience a donc été prolongée jusqu'à une durée de 92 h afin d'observer la formation éventuelle de produits d'altération supplémentaires également présents dans les échantillons archéologiques. Il en ressort que l'analyse de l'extrait au pentane obtenu après 92 h, outre des abondances relatives différentes de produits d'oxydation déjà précédemment identifiés, n'a pas permis d'identifier de nouveaux produits d'oxydation (Fig. 2.6c).

A la différence de l'expérience d'autoxydation réalisée dans CH_3CN qui a donné des résultats concluants, l'expérience réalisée dans $AcOH$ s'est révélée être un échec (cf. § 6.2.2). En effet, après 92 h d'autoxydation, l'extrait au pentane montrait encore la présence importante des sesquiterpènes originaux S1-S3 (Fig. 2.6d). De plus, seuls les composés aromatiques S4-

S6 ont été formés en quantités notables, tandis que les produits oxygénés **S7**, **S9**, **S10** ne représentaient que des constituants mineurs du brut réactionnel (Fig. 2.6d). Houssini et al. (2014) ont également montré que la conversion de l'aryl-himachalène **S6** est plus lente dans AcOH que dans CH₃CN, ce qui pourrait notamment être lié au ΔH de la liaison O-H du NHPI qui est différente selon les solvants employés (Coseri, 2009). En effet, comme nous avons pu le voir précédemment (cf. § 2.3.2), il est impératif que la liaison O-H soit de force similaire à celle des liaisons C-H des atomes d'hydrogène à abstraire. Dans le cas d'une réaction d'autoxydation réalisée dans CH₃CN, cela est bien vérifié dans la mesure où la force de la liaison O-H du NHPI est de 88,1 Kcal/mol contre 88,0 Kcal/mol pour celle d'un atome d'hydrogène situé sur un méthylène en position allylique (Coseri, 2009). Or dans le cas d'une expérience d'oxydation réalisée dans AcOH, le ΔH de la liaison O-H du NHPI est d'environ 90 Kcal/mol (Coseri, 2009).

Compte tenu de ces observations, les expériences d'autoxydation ont par la suite été réalisées dans CH₃CN. Précisons également que AcOH étant un acide, il peut entraîner des réactions de réarrangement au niveau de composés polycycliques insaturés dans lequel un atome d'hydrogène, un groupe alkyle ou un groupe acyle peuvent migrer sur un carbone voisin. Par exemple, il est possible de former le camphène à partir de l'isobornéol par simple catalyse acide induite par AcOH (Birladeanu, 2000).

c) Etude des extraits au CH₂Cl₂ de l'huile essentielle du cèdre de l'Atlas après autoxydation artificielle

Les extraits obtenus avec du pentane lors des expériences de vieillissement par autoxydation de l'huile essentielle de cèdre de l'Atlas ont permis d'éviter la perte de la part la plus volatile des constituants du mélange réactionnel. Toutefois, de par le côté apolaire de ce solvant, il est possible que certains produits d'altération formés à partir des α , β , γ -himachalènes (**S1**, **S2** et **S3**), plus polaires, n'aient pas été extraits avec le pentane. Ainsi, une deuxième extraction au CH₂Cl₂ suivant celle au pentane a été réalisée sur le mélange réactionnel obtenu après autoxydation de l'huile essentielle de cèdre de l'Atlas en solution dans CH₃CN au bout de 20 h. Les extraits obtenus ont été méthylés par le diazométhane afin d'étudier les acides éventuellement formés au cours de la réaction (cf. § 6.2.2).

Les chromatogrammes en phase gazeuse obtenus pour les deux extraits traités avec le diazométhane sont remarquablement similaires, preuve qu'une seule extraction est suffisante pour obtenir une vision globale et représentative de l'échantillon (Fig. 2.10). La méthylation

par le diazométhane a permis de révéler la présence de produits de dégradation du NHPI (molécules en rouge sur la Fig. 2.10), et la présence de trois acides sesquiterpéniques (présence d'un fragment à $[M^+ - 31]$ caractéristique des esters méthyliques dans leur spectre de masse). La structure **S11** a pu être proposée pour l'un d'entre eux sur la base de l'interprétation de son spectre de masse. Ce composé a également été mis en évidence dans les vases égyptiens analysés par Sarret et al. (2017).

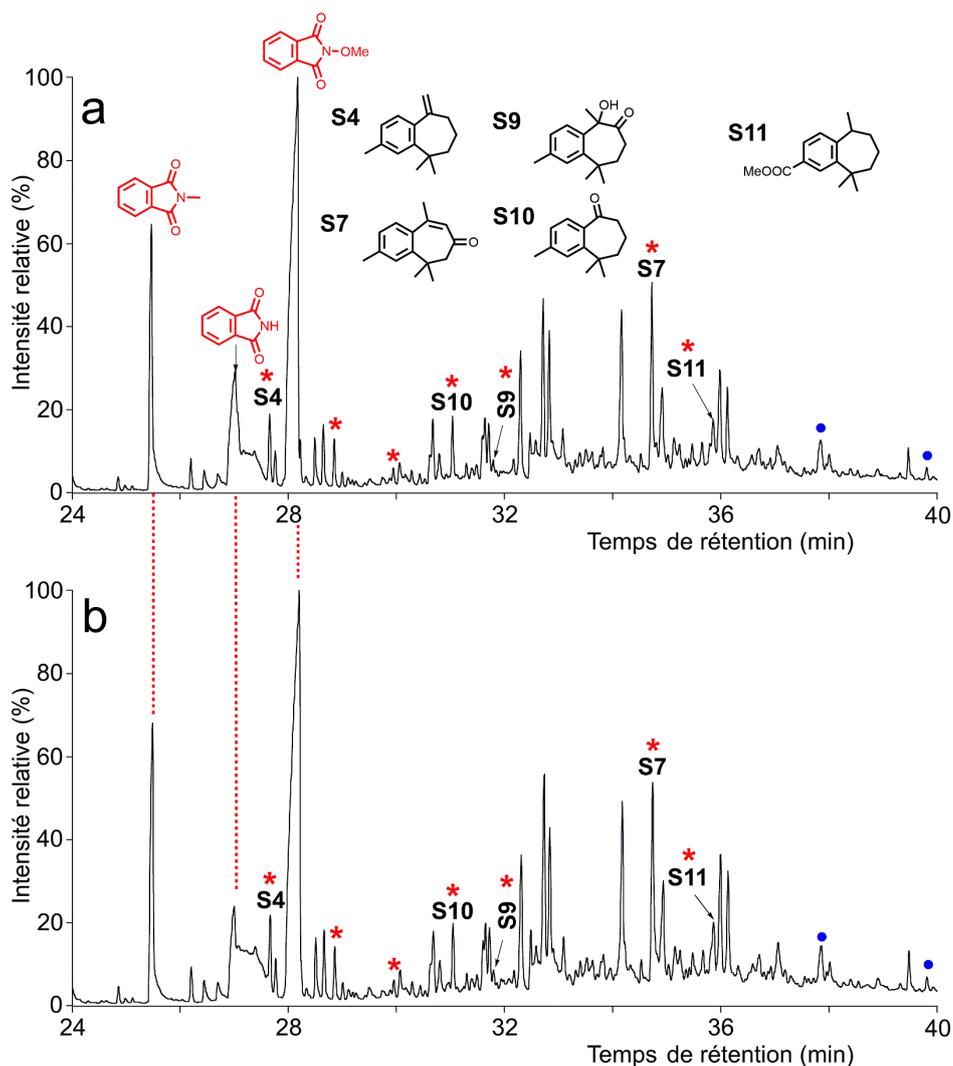


Figure 2.10 : Chromatogrammes en phase gazeuse partiels (GC-MS, IE, 70 eV) de l'extrait lipidique obtenu à partir de l'huile essentielle de cèdre de l'Atlas par extraction au pentane (a) et au CH_2Cl_2 (b) après 20 h de vieillissement dans CH_3CN et dérivation par le diazométhane. Les étoiles rouges indiquent les composés également présents dans les vases égyptiens analysés par Sarret et al. (2017). Les cercles bleus indiquent la présence d'acides sesquiterpéniques. Les acides sont analysés sous forme d'esters méthyliques. Les structures des composés numérotés sont représentées dans l'Appendice de la thèse. Programme A de température du four GC (cf. § 6.5.2).

2.4.4. Conclusion

Les travaux réalisés lors de cette première étude nous ont permis de tester une nouvelle combinaison d'initiateurs de radicaux pour simuler l'autoxydation de l'huile essentielle de cèdre de l'Atlas en comparaison avec cette même substance trouvée en contexte archéologique et précédemment étudiée au laboratoire. Il ressort des résultats obtenus que l'utilisation de CH_3CN en tant que solvant et un temps d'exposition de 20 h à l'oxydation de l'huile essentielle de cèdre de l'Atlas permettent de former de manière assez proche les principaux produits d'oxydation observés dans l'échantillon archéologique, validant donc l'utilisation de la combinaison d'initiateurs $\text{NHPI}/\text{Co}(\text{acac})_2$ pour la simulation des mécanismes d'autoxydation observés en contexte archéologique.

Dans ce même contexte, ces expériences d'autoxydation nous ont également permis de confirmer le lien entre les produits d'altération observés dans la substance organique archéologique et les molécules natives de l'huile essentielle de cèdre de l'Atlas, permettant donc de valider sans ambiguïté l'emploi de cette huile essentielle dans la substance organique archéologique.

2.5. Expériences d'altération oxydante de mélanges binaires de substances naturelles d'intérêt archéologique : formation d'adduits ?

En continuité de ces travaux réalisés à partir de l'huile essentielle de cèdre de l'Atlas, nous avons poursuivi l'étude des processus d'altération oxydante subis par des matériaux organiques archéologiques à l'aide d'expériences de laboratoire mettant en œuvre des mélanges constitués de dérivés d'acides gras insaturés (esters des acides oléique et linoléique) et de substances terpéniques telles que l'huile essentielle de baies de genévrier ou la résine de pin sylvestre. Pour comparaison, les expériences de dégradation ont également été réalisées sur chacun des substrats étudiés séparément. Les conditions opératoires de ces expériences sont largement inspirées de celles mises en œuvre dans le cas des expériences sur l'huile essentielle de cèdre de l'Atlas, tant au niveau des températures et des durées que du choix des initiateurs (couple $\text{NHPI}/\text{Co}(\text{acac})_2$) et du solvant (CH_3CN) (cf. § 6.2.3 et 6.2.4).

Un intérêt particulier a été porté au cours de cette étude à la formation de produits de réactions croisées dimériques ou oligomériques mettant en jeu des constituants d'ingrédients différents. La formation de tels produits peut en effet se produire selon différentes voies au cours des processus d'autoxydation. On peut notamment évoquer les étapes de terminaison de

l'autoxydation consistant en l'addition de deux radicaux pour former une espèce non active (cf. § 2.2). Toutefois, cette voie de formation ne devrait sans doute contribuer que de manière mineure à la formation de produits de réactions croisées en raison de la faible probabilité de rencontre entre deux radicaux. Une voie alternative de formation de produits dimériques ou oligomériques au cours de processus d'autoxydation, qui est d'ailleurs avérée dans la littérature (Schaich, 2013), concerne les lipides insaturés tels qu'on peut en trouver dans la plupart des huiles d'origine végétale et dans les substances terpéniques. En effet, dans ce cas, de tels produits peuvent être issus de l'addition d'espèces radicalaires formées lors de l'autoxydation, comme des radicaux alkyle, hydroxyle ou peroxyde (cf. § 2.2) sur l'un des carbones sp² d'un lipide insaturé pour former une structure dimérique radicalaire (Fig. 2.11). Cette dernière, après addition d'oxygène, pourra ensuite à son tour s'ajouter sur la double liaison d'un autre lipide (Fig. 2.11) ou abstraire un atome d'hydrogène sur un autre lipide. Des produits oligomériques/polymériques peuvent ainsi être formés au cours de processus d'autoxydation à travers la création de liaisons C-C, éther ou ester.

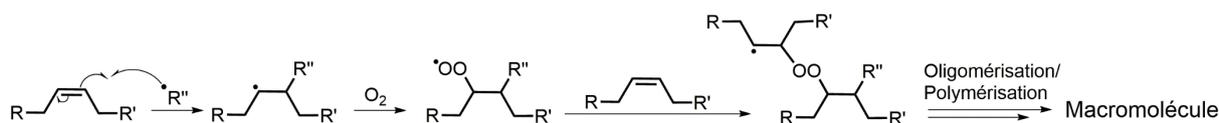


Figure 2.11 : Addition d'un radical alkyle, alkoxyde ou peroxyde (R'') sur la double liaison d'un lipide insaturé puis réaction de condensation menant à la formation de macromolécules.

2.5.1. Choix des substrats pour les expériences d'altération oxydante de mélanges binaires de substances naturelles

De nombreuses substances naturelles ont été utilisées par le passé pour préparer les matériaux organiques mis au jour lors de fouilles archéologiques. Elles comprennent notamment des résines, des corps gras d'origine animale ou végétale, des gommes, des huiles essentielles, des goudrons, du bitume ou encore de la cire d'abeille (Connan et al., 2000, 2005 ; Regert et al., 2001 ; Colombini et al., 2003 ; Evershed, 2008 ; Sarret et al., 2017). De nombreux matériaux organiques archéologiques se sont révélés correspondre à des mélanges parfois complexes de plusieurs substances naturelles, comme par exemple les baumes de momies.

Pour cette étude expérimentale de l'altération de mélanges binaires de substances organiques dans la perspective d'étudier plus particulièrement la formation de produits di-ou oligomériques résultant de réactions croisées entre ingrédients, nous avons choisi d'utiliser des dérivés d'acides gras insaturés abondants dans les huiles d'origine végétale en association avec

des substances terpéniques, huiles essentielles ou résines. Il s'agit là de substances fréquemment trouvées seules ou en association en contexte archéologique, notamment dans les baumes de momies (Colombini et al., 2000b ; Buckley et Evershed, 2001 ; Buckley et al., 2004 ; Abdel-Maksoud et El-Amin, 2011 ; Scholz-Böttcher et al., 2013 ; Ménager et al., 2014) ou dans le cas de substances identifiées comme des onguents (Colombini et al., 2005c, 2009a ; Charrié-Duhaut et al., 2007 ; Ribechini et al., 2008) ou encore pour la constitution de vernis utilisés en peinture (Colombini et al., 2000a ; Abdel-Ghani et al., 2009 ; Tirat et al., 2016).

Comme substrats représentatifs des constituants des huiles végétales ou animales à teneur significative en acides gras insaturés, nous avons renoncé à utiliser directement des corps gras naturels. En effet, leur composition moléculaire est souvent complexe et dominée par des triglycérides basés sur de nombreux acides gras différents plus ou moins insaturés. Par ailleurs, les triglycérides ne peuvent pas être analysés directement par GC-MS dans des conditions « classiques » (nécessité de faire appel à la GC haute température ; Ruiz-Samblás et al., 2015) et l'analyse des acides gras ou de leurs produits de transformation liés au glycérol demande l'utilisation de méthodes de dégradations chimiques comme la méthanolyse, par exemple. Pour des raisons de simplicité, nous avons alors choisi d'utiliser directement des acides gras insaturés, comme l'acide oléique et linoléique sous la forme d'esters de butyle ou de méthyle pour représenter un modèle simplifié de triglycérides analysable directement en GC. Ces acides gras insaturés sont largement répandus aussi bien dans le règne animal que végétal (Bockisch, 1998 ; Malainey et al., 1999 ; Köckritz et Martin, 2008 ; Orsavova et al., 2015), et la présence de doubles liaisons les rend particulièrement sensibles à l'autoxydation et, potentiellement, à la formation de produits dimériques ou oligomériques par addition radicalaire comme discuté précédemment (Frankel et al., 1977, 1981 ; Neff et al., 1978 ; Schaich, 2013) (cf. § 2.2 et 2.5).

En ce qui concerne le choix des ingrédients terpéniques pour ces expériences d'altération, notre choix s'est porté sur une huile essentielle de baies de genévrier (*Juniperus communis*) et une résine de pin (*Pinus sylvestris*).

L'huile de baies de genévrier (*Juniperus communis*) a été choisie en raison de sa disponibilité dans le commerce et de sa teneur élevée en composés terpéniques volatils comme l' α -pinène **M1**. En raison de la faible masse et de la volatilité importante des monoterpènes comme l' α -pinène, les composés dimériques éventuellement formés par réaction avec des dérivés d'acides gras lors de l'autoxydation sont susceptibles d'être détectés directement par GC-MS.

La résine de conifère de la famille des *Pinaceae*, quant à elle, a été choisie comme autre substrat terpénique, mais non volatil, et est essentiellement constituée d'acides diterpéniques de la série de l'abiétane (Silvestre et Gandini, 2008). Les résines de cette famille ont été largement utilisées par le passé lors de la pratique de l'embaumement (Koller et al., 1998 ; Buckley and Evershed, 2001 ; Buckley et al., 2004 ; Bailly, 2015), pour aromatiser le vin (McGovern et al., 2013 ; Bailly, 2015), pour le scellage de poteries (Reber et Hart, 2008 ; Bailly, 2015 ; Ebert, 2016), ou encore dans la composition de vernis (Pitthard et al., 2011 ; Bailly, 2015 ; Tirat et al., 2016). Dans ces deux derniers exemples, les résines ont parfois été utilisées en mélange avec des corps gras. Ainsi, des vernis préparés en mélangeant résines et huile de lin ont été utilisés jusque dans les années 1900 avant l'arrivée des vernis synthétiques qui les ont progressivement, mais pas complètement remplacés (Tirat et al., 2016). Par ailleurs, un mélange entre une huile végétale de Brassicaceae et une résine de conifère a été identifié dans une substance organique utilisée pour sceller une jarre égyptienne trouvée à Abydos en Egypte (Ebert, 2016).

2.5.2. Choix des conditions expérimentales pour les expériences d'altération oxydante de mélanges binaires de substances naturelles

Les conditions opératoires des expériences d'autoxydation réalisées tout d'abord sur chacun des substrats séparément puis sur des mélanges sont inspirées de celles mises en œuvre lors des expériences d'autoxydation de l'huile essentielle de cèdre de l'Atlas (cf. § 2.4.2) tant au niveau de la température (70 °C) que de la durée (20 h) et que du choix des initiateurs (couple NHPI/Co(acac)₂) et du solvant (CH₃CN) (cf. § 6.2.3 et 6.2.4).

2.5.3. Expériences d'altération oxydante d'un mélange d'huile essentielle de baies de genévrier et d'oléate de butyle

Pour les expériences d'altération par autoxydation du mélange entre huile essentielle de baies de genévrier et oléate de butyle **II**, ainsi que de chacun des substrats seuls, chaque prélèvement a été extrait avec du CH₂Cl₂. Ce solvant a été préféré au pentane en raison de sa polarité plus importante, susceptible de favoriser l'extraction de composés poly-oxygénés polaires pouvant avoir été formés par autoxydation (cf. § 6.2.3). Les lipides ainsi extraits ont ensuite été dérivés et analysés par GC-FID et GC-MS sans fractionnement préalable (cf. § 6.2.3).

a) Autoxydation de l'huile essentielle de baies de genévrier

L'huile essentielle de baies de genévrier utilisée provient de baies du genévrier commun (*Juniperus communis*), espèce dominante dans l'hémisphère nord (Mao et al., 2010). L'analyse de cette huile essentielle par GC-MS sans dérivation préalable a permis, de manière concordante avec les données disponibles dans la littérature, de révéler une distribution de composés terpéniques dominée par les monoterpènes **M1-M10**, et plus particulièrement l' α -pinène **M1**, avec une contribution moins marquée de sesquiterpènes **S12-S20** (Fig. 2.12) (Butkienė et al., 2007 ; Vourlioti-Arapi et al., 2012 ; Höferl et al., 2014).

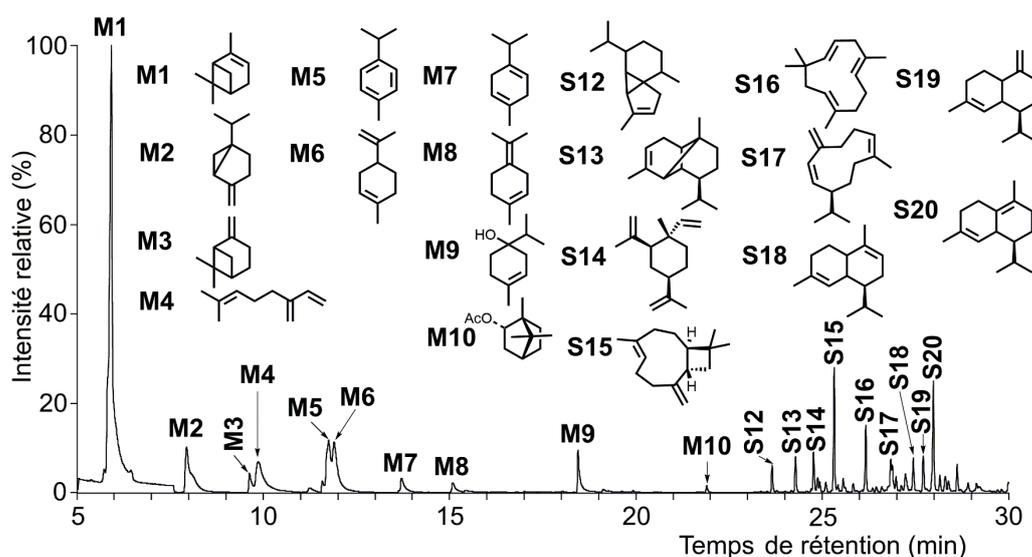


Figure 2.12 : Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de l'huile essentielle de baies de genévrier. Les structures des composés numérotés sont représentées dans l'Appendice de la thèse. Programme A de température du four GC (cf. § 6.5.2).

L'autoxydation de cette huile essentielle a principalement mené à la formation de la cétone allylique **M11** issue de l'altération de l' α -pinène **M1**, ainsi que de la 4-méthylacétophénone **M12** issue de l'altération des monoterpènes **M5-M8** (Fig. 2.13). Les produits d'altération des sesquiterpènes **S12-S20** n'ont pu être identifiés à cause de la prédominance, dans cette zone d'élution, de dérivés du NHPI (Fig. 2.13). Au-delà de 44 min, un massif est également observé (Fig. 2.13) et a été interprété comme étant constitué d'adduits entre les constituants terpéniques de l'huile essentielle de baies de genévrier et les dérivés du NHPI d'après la spectrométrie de masse (présence d'ions $[M+H]^+$ pairs en mode CI à l'isobutane).

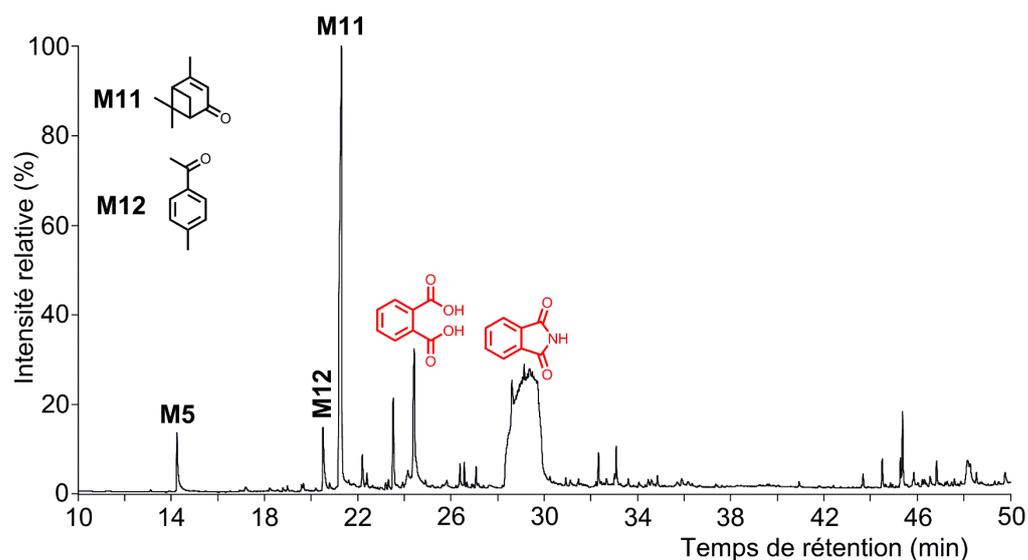


Figure 2.13 : Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de l'huile essentielle de baies de genévrier après 20 h d'oxydation. Les structures des composés numérotés sont représentées dans l'Appendice de la thèse. Programme A de température du four GC (cf. § 6.5.2).

b) Autoxydation de l'oléate de butyle **I1**

L'oléate de butyle **I1** a été préparé par estérification de l'oléate de méthyle avec du butanol en conditions acides (cf. § 6.2.1). Cette estérification a également mené à la formation d'un sous-produit **I2** (Fig. 2.14a) qui, sur la base de la spectrométrie de masse, semble correspondre au produit d'addition de chlore sur l'insaturation de l'oléate de butyle **I1**.

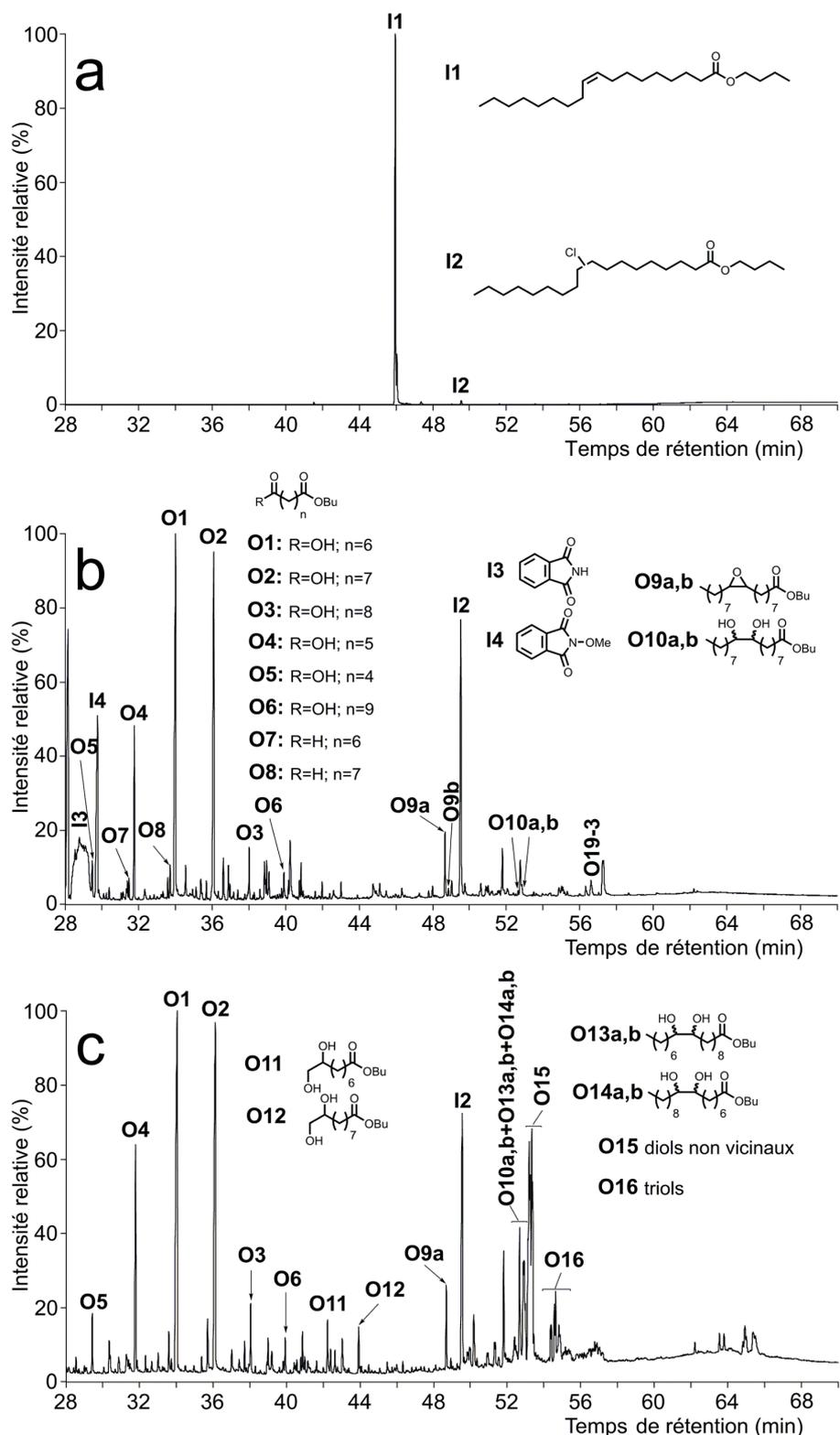


Figure 2.14 : Chromatogrammes en phase gazeuse partiels (GC-MS, IE, 70 eV) (a) de l'oléate de butyle I1 utilisé comme substrat et des extraits lipidiques obtenus (b) après 20 h d'oxydation de l'oléate de butyle I1, (c) après 20 h d'oxydation de l'oléate de butyle I1 et réduction de l'extrait avec NaBH₄. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides sous forme d'esters méthyliques. Les structures des composés numérotés sont représentées dans l'Appendice de la thèse. Programme A de température du four GC (cf. § 6.5.2).

L'expérience d'autoxydation réalisée à partir de l'oléate de butyle **I1** a mené à la formation d'un mélange complexe de produits d'oxydation (Fig. 2.14b). Parmi ces produits, nous trouvons notamment une distribution de diacides (**O1-O6**) entre C₆ et C₁₁ (Fig. 2.14b). Cette large distribution de diacides est notamment liée à la diversité des hydroperoxydes pouvant être formés lors de l'autoxydation de l'oléate de butyle **I1**. En effet, de par la position de la double liaison de l'oléate de butyle **I1** située en milieu de chaîne, il existe deux méthylènes en position allylique, offrant donc deux sites potentiels pour l'abstraction d'un atome d'hydrogène. En conséquence, deux radicaux différents possédant chacun deux formes mésomères peuvent être formés (Fig. 2.15) permettant ainsi l'addition d'oxygène sur quatre positions et, en principe, la formation de quatre hydroperoxydes **H1-H4** (Fig. 2.15). La formation de ces derniers lors de l'autoxydation d'acides gras insaturés est d'ailleurs attestée dans la littérature (Frankel, 1980, 1985, 2005). En réalité, huit hydroperoxydes différents peuvent être formés à partir de l'acide oléique. La formation de ces composés est liée à la possibilité d'isomérisation *Z/E* de la double liaison. Le changement de configuration de l'insaturation, initialement *Z* sur l'oléate de butyle **I1**, peut se produire par isomérisation au niveau des radicaux alkyles formés lors de l'étape d'initiation de l'autoxydation, mais elle peut également être liée à des réactions de réarrangement des radicaux peroxydes formés par addition d'oxygène sur les radicaux allyliques issus de l'étape d'initiation (Frankel et al., 1984 ; Frankel, 1985, 2005 ; Gardner, 1989 ; Porter et al., 1995).

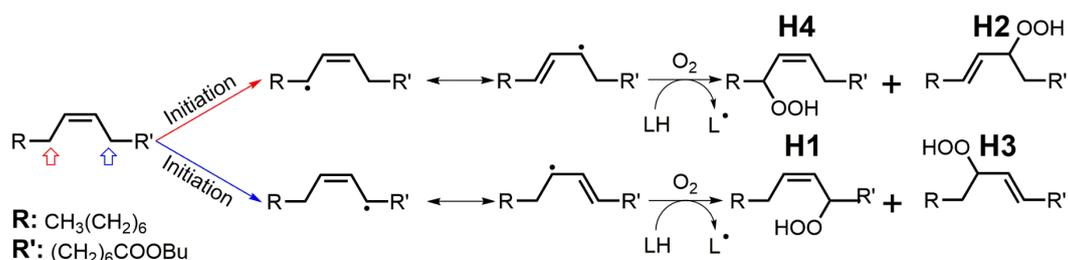


Figure 2.15 : Voie de formation par autoxydation des hydroperoxydes **H1-H4** à partir de l'oléate de butyle **I1**.

La formation des diacides **O1-O3** (C₈-C₁₀) – étudiés dans le cas présent sous la forme de monoesters de butyle – peut être facilement expliquée par une réaction de coupure appelée fragmentation de Hock affectant les hydroperoxydes **H1**, **H2**, **H3** et **H4** et dont le mécanisme est décrit sur la Fig. 2.9b (Rontani, 1998 ; Marchand et Rontani, 2001). Ce processus mène en premier lieu à la formation d'acides gras à chaînes courtes possédant une fonction aldéhyde en bout de chaîne (Rontani, 1998 ; Marchand et Rontani, 2001). Parmi ceux-ci, les composés **O7**

et **O8** ont été identifiés sur la base de la SM et comparaison avec des spectres de masses de composés référencés dans la banque de données NIST Wiley. Ces composés conduisent ensuite par oxydation aux diacides **O1-O3** (Rontani, 1998 ; Marchand et Rontani, 2001). Le diacide **O4** (en C₇) – sous la forme de monoester butylé dans le cas présent –, relativement abondant dans l'extrait lipidique (Fig. 2.14b), ne peut être expliqué par cette unique voie de formation qui à elle seule ne peut conduire qu'à la formation des diacides allant de C₈ à C₁₀. En effet, la formation du diacide **O4** doit probablement faire appel à une étape de peroxydation préalable intervenant sur l'hydroperoxyde **H3**, suivie d'une réaction de fragmentation de Hock et de l'oxydation de l'aldéhyde terminal en acide (Fig. 2.16).

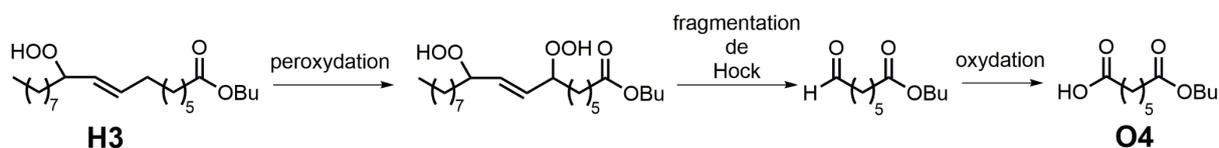


Figure 2.16 : Voie de formation proposée du diacide **O4** à partir de l'hydroperoxyde **H3**.

Les « diacides » **O5** et **O6**, avec une chaîne en C₆ et C₁₁ respectivement, ne sont présents qu'en quantités mineures par rapport à leurs homologues en C₇-C₁₀. Comme pour le « diacide » **O4**, la formation des composés **O5** et **O6** ne peut être expliquée par la seule intervention d'une réaction de fragmentation de Hock. Ainsi, les composés **O5** et **O6** pourraient résulter, par exemple, de processus comprenant une première étape de migration oxydante de la double liaison de l'oléate de butyle **I1** induite par abstraction d'un atome d'hydrogène, suivie de l'isomérisation de l'insaturation en position 9,10 vers les positions 10,11 ou 8,9 et de l'abstraction d'un atome d'hydrogène à partir d'un autre lipide insaturé. Les dérivés d'oléate de butyle isomérisés peuvent ensuite être oxydés pour former des hydroperoxydes allyliques qui, par fragmentation de Hock, vont mener aux diacides **O5** et **O6**.

Outre les dérivés de diacides (**O1-O8**) représentant la majorité des produits d'oxydation formés à partir de l'oléate de butyle **I1**, nous observons également les composés **O9a** et **O9b** qui ont pu être identifiés comme étant les deux isomères, respectivement, *trans* et *cis* du 9,10-époxyatéarate de butyle sur la base de leur fragmentation en spectrométrie de masse qui présente de grandes similitudes avec celle du *cis*-9,10-époxyatéarate de méthyle (Kaneshiro et al., 1996) également disponible dans la banque de données NIST Wiley. L'isomère prédominant est celui ayant le temps de rétention le plus court en chromatographie. Si l'on considère que l'ordre d'élution respectif en chromatographie gazeuse des isomères *cis* et *trans* du 9,10-époxyatéarate de butyle est comparable à l'ordre d'élution des esters méthyliques correspondants (Velasco et

al., 2002), l'isomère largement majeur formé lors de l'oxydation de l'oléate de butyle est l'isomère *trans* **O9a**.

Deux voies de formation par autoxydation peuvent être proposées pour ces composés. La première fait intervenir une réaction de cyclisation intramoléculaire des radicaux alkoxydes formés par décomposition des hydroperoxydes **H2** ou **H3** comme présenté sur la Fig. 2.17a (Frankel, 1985, 1987). Ce mécanisme semble toutefois exclu dans notre cas. En effet, dans la mesure où les hydroperoxydes **H1** et **H4** devraient également subir cette voie de transformation, nous devrions également observer la présence des époxydes en positions 8,9 et 10,11 qui avaient déjà été identifiés auparavant parmi les produits d'autoxydation de l'oléate de méthyle (Frankel et al., 1977 ; Frankel, 1985, 1987) mais qui n'ont apparemment pas été formés dans les expériences que nous avons réalisées (Fig. 2.14b).

Une seconde voie de formation est décrite dans la Fig. 2.17b et comprend une première étape d'addition d'un radical peroxyde sur l'insaturation de l'oléate de butyle **I1**, suivie d'une étape de cyclisation conduisant à la coupure de la liaison peroxyde et à la formation des époxydes **O9a,b** (Romanus et al., 2008 ; Schaich, 2013). Dans ce processus, deux diastéréoisomères (sous la forme de paires d'énantiomères) peuvent en principe être formés (e.g. Hansel et Evershed, 2009) quelle que soit la stéréochimie de la double liaison comme cela a été montré, notamment, lors d'expériences d'altération thermo-oxydante réalisées sur des isomères *cis* et *trans* d'acides gras insaturés (Lercker et al., 2003). La prédominance de l'isomère *trans* **O9a** dans le cas des expériences que nous avons réalisées peut s'expliquer par le fait que l'étape de cyclisation conduisant à l'isomère *trans* est favorisée pour des raisons stériques, les substituants les plus encombrants d'un point de vue stérique étant localisés sur des côtés opposés de l'époxyde. Cette prédominance est plus importante que celle observée dans le cas d'autres expériences de dégradation oxydante d'acides gras insaturés reportée dans la littérature (Lercker et al., 2003), et ce peut-être en raison des conditions de températures plus basses mises en œuvre dans les expériences réalisées.

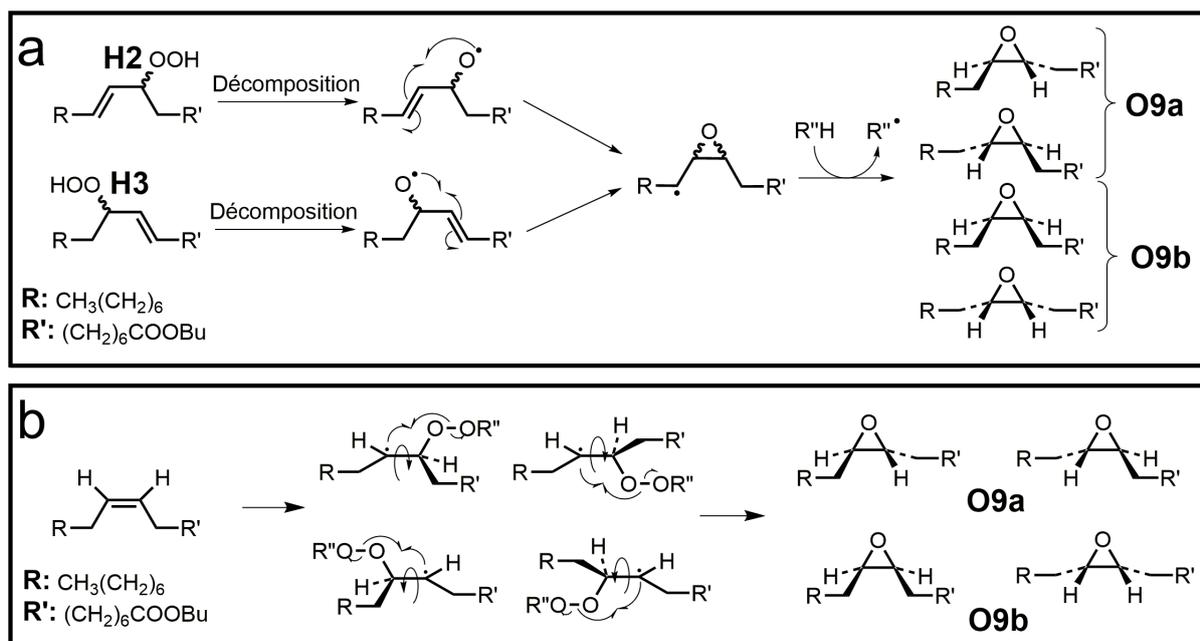


Figure 2.17 : Voie de formation des époxydes **O9a** et **O9b** (a) par décomposition des hydroperoxydes **H2** et **H3**, (b) par addition d'un radical peroxyde sur la double liaison de l'oléate de butyle **II**.

Deux isomères (threo et erythro) du 9,10-dihydroxyoctadécanoate de butyle **O10a,b** (Fig. 2.14b) ont été identifiés sur la base de la comparaison des spectres de masse de ces composés sous forme de butylesters acétylés avec celui de l'un des isomères acétylés du 9,10-dihydroxyoctadécanoate de méthyle (Bastien, 2011). Ces composés ont très probablement été formés par ouverture des époxydes **O9a,b** par substitution nucléophile par H_2O (Fig. 2.18 ; Gardner, 1989 ; Köckritz et Martin, 2008 ; Romanus et al., 2008).

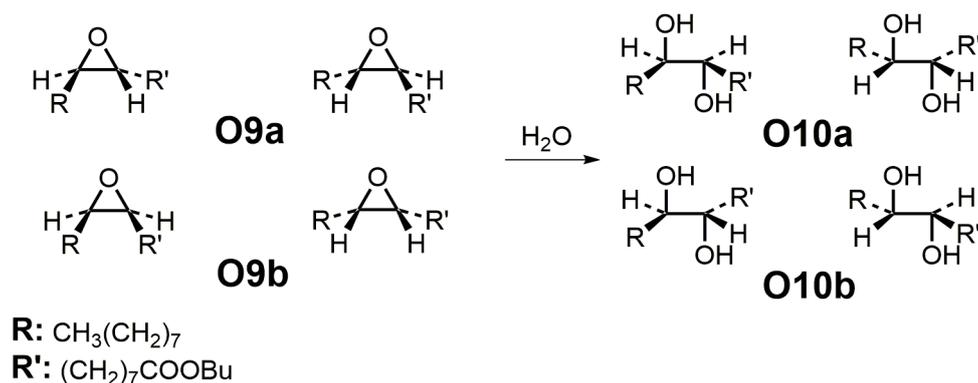


Figure 2.18 : Voie de formation proposée des composés **O10a,b** à partir de l'époxyde **O9**.

En parallèle de l'analyse effectuée après simple dérivation avec Ac_2O et CH_2N_2 d'une partie de l'extrait obtenu après 20 h d'autoxydation de l'oléate de butyle **II**, un traitement de réduction chimique par NaBH_4 a également été réalisé sur une autre partie de l'extrait (cf. § 6.2.3 et 6.2.5).

L'objectif de cette étape de réduction chimique est de couper les ponts peroxydes pouvant s'être formés entre des constituants de l'extrait pendant l'autoxydation de l'ester d'acide gras, et qui se seraient produits, notamment, par addition d'un radical peroxyde sur la double liaison d'un autre lipide (cf. § 2.5). Les composés résultant de ces réactions de couplage intermoléculaire, de par leur nature oligomérique plus ou moins importante, sont susceptibles de ne pas être élués de la colonne de chromatographie gazeuse en raison de leur masse moléculaire élevée. Le chromatogramme de l'extrait lipidique obtenu après traitement par NaBH₄ et dérivation (Ac₂O, CH₂N₂) a été comparé avec celui de l'extrait lipidique dérivé mais non traité, et nous a permis de mettre en évidence quelques composés supplémentaires apparemment liés au traitement par NaBH₄ (Fig. 2.14c).

Parmi ceux-ci, deux composés **O11** et **O12**, non décrits dans la littérature, ont été formés lors du traitement par NaBH₄ et semblent, de par leur fragmentation identique en MS mais décalée de 14 Da, correspondre à des composés homologues qui diffèrent de par la présence d'un méthylène supplémentaire pour le composé **O12**. Dans le cas du composé **O11**, l'analyse par spectrométrie de masse en mode d'ionisation chimique à l'isobutane a permis d'établir non seulement une masse moléculaire de 330 Da, mais également la présence de deux fonctions alcools acétylées révélée par la perte successive de deux unités de 60 Da (2 x AcOH). Par ailleurs, le mode de fragmentation observé sur le spectre de masse obtenu en impact électronique (Fig. 2.19) présente des analogies avec celui de l'ester méthylique d'un acide carboxylique portant deux fonctions alcools vicinales reporté par Bastien (2011). Par exemple, le fragment à m/z 257 est analogue à celui résultant de la coupure homolytique de la liaison située entre les deux fonctions alcools dans le spectre présenté par Bastien (2011). Ainsi, sur la base de la spectrométrie de masse, nous proposons que le composé **O11** corresponde à l'ester butylique d'un acide carboxylique en C₉ portant deux fonctions alcools en C-8 et C-9 et dont la structure est présentée en figure 2.19. Comme le mode de fragmentation du composé **O12** est similaire à celui observé pour le composé **O11** mais avec un décalage de 14 Da pour les fragments principaux, nous proposons que **O12** corresponde à l'homologue en C₁₀ du composé **O11** portant les deux fonctions alcools en positions ω et $\omega-1$. Ces molécules libérées lors du traitement par NaBH₄ sont donc vraisemblablement issues de sous-unités liées par des ponts peroxydes dans des structures oligomériques formées lors de l'autoxydation de l'oléate de butyle **I1** comme présenté sur la figure 2.20.

Il est intéressant de noter que la littérature mentionne la formation d'analogues (sous forme libre) des composés **O11** et **O12** portant une fonction aldéhyde en position terminale parmi les

produits d'autoxydation de l'acide linoléique (Loidl-Stahlhofen et al., 1994 ; Mlakar et Spiteller, 1994 ; Spiteller et al., 2001 ; Kawai et al., 2007).

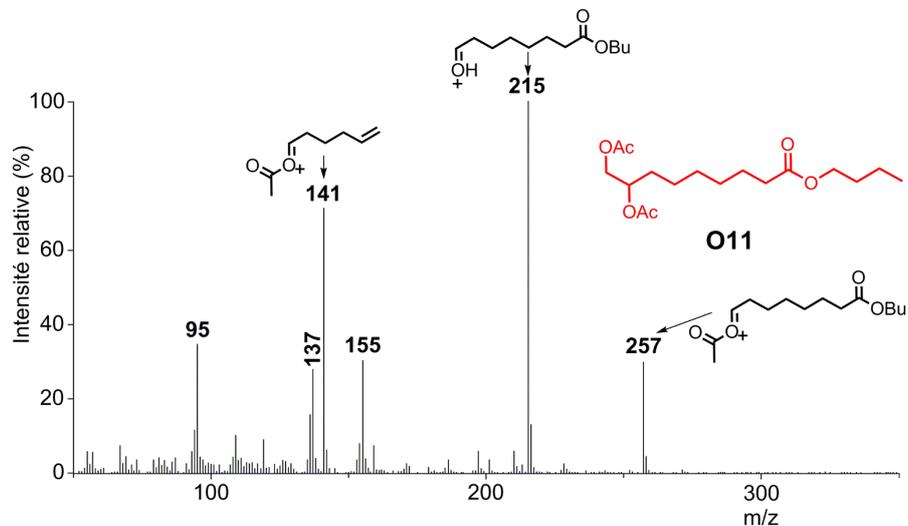


Figure 2.19 : Spectre de masse (IE, 70 eV) du composé O11.

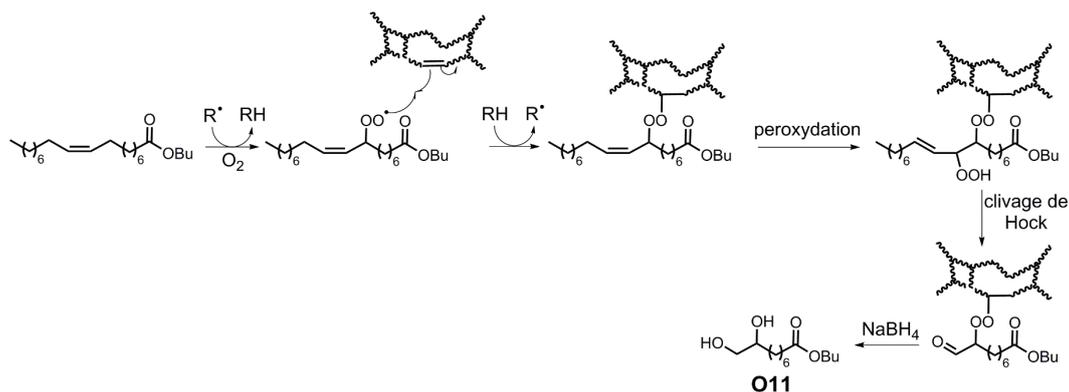


Figure 2.20 : Origine possible du composé O11 obtenu après traitement par NaBH₄.

Par ailleurs, trois massifs de composés apparaissent en fin de chromatogramme à des temps de rétention situés entre 52 et 56 min (Fig. 2.14c). Sur la base des masses moléculaires déterminées par GC-MS en mode CI à l'isobutane, il a été possible de proposer que les deux premiers massifs comprennent les composés **O10**, **O13**, **O14** et **O15** correspondant à des diols saturés dérivés de l'oléate de butyle **II** sous la forme de mélanges d'isomères tandis que le dernier massif (**O16**) correspondrait très probablement à un mélange d'isomères de triols saturés de l'oléate de butyle **II**. Dans le premier massif, nous retrouvons notamment les diols vicinaux **O10a,b** précédemment rencontrés (Fig. 2.14b,c) mais également les composés **O13** et **O14** qui présentent en spectrométrie de masse un mode de fragmentation similaire à celui

observé pour les composés **O10a,b**. Certains fragments sont cependant décalés de +14 Da (**O13**) ou -14 Da (**O14**), indiquant donc qu'il s'agit également là de diols vicinaux mais avec des fonctions alcools localisées en 10,11 (**O13**) et 8,9 (**O14**) plutôt qu'en 9,10 (**O10**). Comme dans le cas des composés **O10a,b**, deux diastéréomères (erythro et threo) ont pu être mis en évidence pour chacun de ces diols. Ces composés libérés par traitement par NaBH₄, déjà décrits dans les travaux de Frankel et al. (1977) après cette même étape de réduction, peuvent être issus de structures dimériques/oligomériques formées par l'addition d'un radical peroxyde sur le carbone sp² situé en α de la fonction oxygénée d'un des hydroperoxydes **H1-H4** (cf. Fig. 2.21 voie 1 pour la formation des diols **O14a,b** à partir de **H1**). Le traitement par NaBH₄ de ces structures conduit ainsi à la libération des diols vicinaux correspondants (Fig. 2.21 voie 1). Le massif **O15** correspond également à des diols saturés dérivés de l'oléate de butyle **I1**. Toutefois, les spectres de masse de ces composés sont très différents de ceux des diols vicinaux **O10a,b**, **O13a,b** et **O14a,b**, et se rapprochent de ceux du linoléate de butyle. La fragmentation spécifique de ces composés en spectrométrie de masse (mode IE) est caractérisée par deux pertes successives d'acide acétique (- 2 x 60 Da) correspondant à l'élimination des deux fonctions alcools acétylées pour former un diène conjugué dont le mode de fragmentation est tout à fait similaire à celui d'un ester d'acide linoléique. Ces diols non vicinaux **O15** ont pu être formés par un mécanisme analogue à celui proposé dans le cas des diols vicinaux, la différence principale étant liée au site d'attaque du radical peroxyde sur la double liaison de l'hydroperoxyde allylique intermédiaire (Fig. 2.21 voie 2).

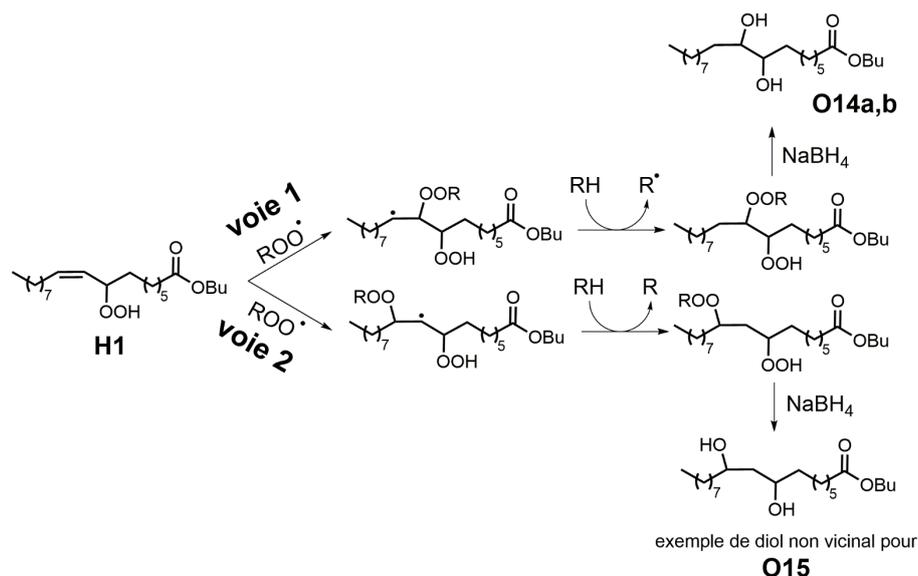


Figure 2.21 : Voie de formation possible de structures oligomériques conduisant à la libération de diols vicinaux (e.g. O14 ; voie 1) ou non vicinaux (e.g. O15 ; voie 2) lors du traitement par NaBH₄ de l'extrait organique obtenu après autoxydation de l'oléate de butyle I1. R= structure lipidique.

En ce qui concerne les triols **O16**, une voie de formation possible de structures oligomériques susceptible de conduire à la libération de ces triols lors du traitement par NaBH₄ est présentée sur la figure 2.22. Cette voie fait intervenir, notamment, des étapes impliquées dans la formation des époxydes et des diols vicinaux (Fig. 2.17 et 2.18).

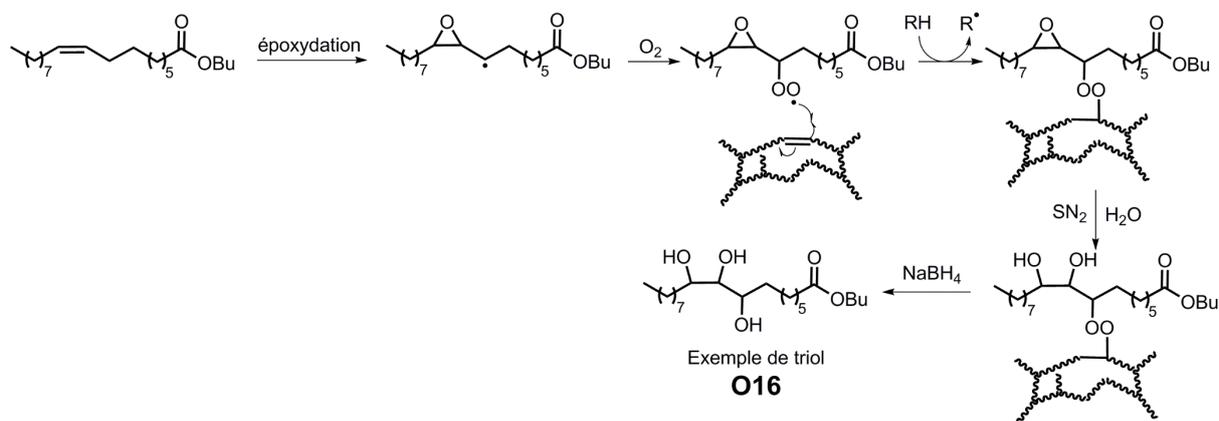


Figure 2.22 : Voie de formation possible de structures oligomériques à l'origine des triols O16 obtenus après traitement par NaBH₄ de l'extrait organique obtenu après autoxydation de l'oléate de butyle I1.

Les composés apparaissant à la fin du chromatogramme correspondant aux produits issus de la dégradation par NaBH₄ (Fig. 2.14c) pourraient être des composés possédant un ou trois

atome(s) d'azote (ions $[M+H]^+$ pairs ; GC-MS, CI isobutane) et seraient des adduits entre les produits d'oxydation de l'oléate de butyle **I1** et les produits de dégradation du NHPI.

c) Autoxydation d'un mélange d'oléate de butyle **I1** et d'huile essentielle de baies de genévrier

L'analyse par GC-MS de l'extrait lipidique obtenu après oxydation du mélange d'oléate de butyle **I1** et d'huile essentielle de baies de genévrier a permis de mettre en évidence quelques produits qui n'avaient pas été détectés dans les extraits obtenus après oxydation des deux substrats oxydés séparément (composés **O17-O21**, Fig. 2.23). Toutefois, aucun de ces produits ne semble relever de la formation de produits de condensation issus de réactions croisées entre les deux ingrédients.

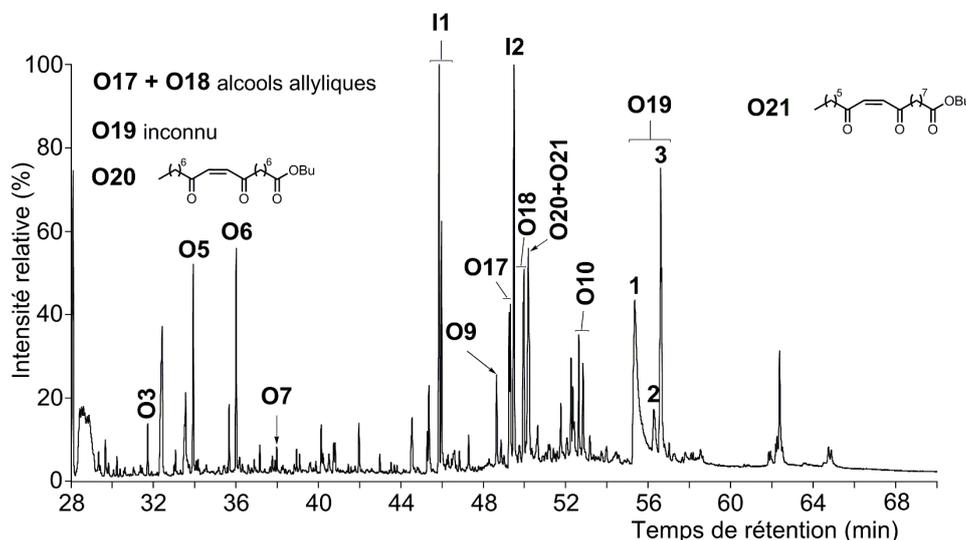


Figure 2.23 : Chromatogramme en phase gazeuse partiel (GC-MS, IE, 70 eV) de l'extrait lipidique obtenu après oxydation d'un mélange d'oléate de butyle **I1** et d'huile essentielle de baies de genévrier. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides sous forme d'esters méthyliques. Les structures des composés numérotés sont représentées dans l'Appendice de la thèse. Programme A de température du four GC (cf. § 6.5.2).

En effet, les composés **O17** et **O18** ont été identifiés comme étant des alcools allyliques dérivés de l'oléate de butyle **I1** portant la fonction alcool sur les mêmes positions que la fonction hydroperoxyde dans le cas des composés **H1-H4** (Fig. 2.15). Les structures proposées pour ces composés sont basées sur l'interprétation des spectres de masse des acétates mais également des dérivés silylés correspondants (cf. § 6.1.2.c). De tels composés avaient déjà été mentionnés dans la littérature (Frankel et al., 1977 ; Marchand et Rontani, 2001).

En ce qui concerne le massif de composés noté **O19** (Fig. 2.23), il correspond à des produits qui n'ont pas pu être identifiés mais qui sont également formés lors de l'altération par autoxydation de l'oléate de butyle **I1** seul (Fig. 2.14b et 2.23). Quant aux composés **O20-O21**, ceux-ci pourraient correspondre à un mélange de dicétones issues de l'oxydation de l'acide oléique dont la structure a pu être proposée sur la base de leur ion moléculaire à 366 Da ($[M+H]^+ = 367$; CI isobutane) et sur la base de leur fragmentation caractérisée par un ion majeur à m/z 181 (**O20**) ou m/z 167 (**O21**).

Les composés apparaissant en fin de chromatogramme (au-delà de 60 min ; Fig. 2.23) présentent tous des ions moléculaires impairs trahissant donc la présence d'un nombre impair d'azote dans leur structure. Ces composés ont donc très probablement été formés par addition de produits de dégradation du NHPI sur les substrats oxydés et n'ont pas été étudiés plus amplement.

Comme dans le cas des expériences réalisées sur l'oléate de butyle **I1** seul, le même traitement par NaBH_4 a été effectué dans le cas du mélange oxydé d'oléate de butyle **I1** et de l'huile essentielle de baies de genévrier après 20 h, mais n'a pas permis de révéler la présence de nouvelles molécules d'intérêt.

d) Conclusion

L'altération par autoxydation de l'oléate de butyle, de l'huile essentielle de baies de genévrier et du mélange des deux avec la combinaison du couple d'initiateurs NHPI/ $\text{Co}(\text{acac})_2$ a permis de mettre en évidence la complexité et la diversité des produits d'oxydation pouvant être formés pendant ce processus. Nous avons notamment découvert quelques produits d'oxydation de l'oléate de butyle impliqués dans des structures oligomériques/macromoléculaires qui ont été libérés lors de la réduction des ponts peroxydes par NaBH_4 , relevant donc de produits de condensation de l'acide gras dans le cas du composé utilisé seul. Malheureusement, aucun produit de condensation relevant de réactions croisées entre ingrédients n'a été mis en évidence dans le cas de l'expérience réalisée sur le mélange d'oléate de butyle et d'huile essentielle de baies de genévrier.

Deux hypothèses ont été envisagées afin d'expliquer l'absence de formation de produits de condensation mixtes. La première pourrait être liée à l'utilisation d'une quantité de NHPI trop importante, ce qui aurait tendance à favoriser la formation des adduits azotés issus du NHPI avec les produits d'oxydation du mélange de substrats, au détriment de la formation des adduits désirés. La seconde hypothèse serait que la concentration des substrats à oxyder n'est pas

suffisante pour favoriser les réactions intermoléculaires. Toutefois, malgré des essais en jouant sur la quantité d'initiateurs et sur la concentration en substrats, nous n'avons jamais pu observer la formation directe d'adduits mixtes.

2.5.4. Expériences d'altération oxydante de linoléate de méthyle **I5** seul ou en mélange avec de l'huile essentielle de baies de genévrier

Les différents changements de conditions expérimentales testés précédemment pour les expériences réalisées sur le mélange entre huile essentielle de baies de genévrier et oléate de butyle **I1**, portant notamment sur les quantités d'initiateurs et du solvant, n'ont pas permis de trouver des conditions favorisant la formation de produits de condensation inter-substrats. Ainsi, nous avons décidé de réaliser des expériences en remplaçant l'oléate de butyle par un ester dérivé de l'acide linoléique. En effet, ce dernier possédant deux insaturations non conjuguées séparées par un méthylène, il présente de ce fait deux sites allyliques et un site bisallylique le rendant donc, en théorie, plus sensible et donc plus réactif face à l'autoxydation. Cette réactivité plus importante pourrait ainsi favoriser la formation d'adduits inter-substrats.

a) Aspects expérimentaux

a.1) Préparation du linoléate de méthyle **I5**

Comme dans le cas de l'acide oléique, nous avons préféré utiliser l'acide linoléique sous forme estérifiée dans la mesure où ces acides se trouvent sous forme d'esters dans les triglycérides. L'utilisation d'un ester de butyle dans le cas de l'acide oléique a cependant soulevé de nombreux problèmes vis-à-vis de l'interprétation des spectres de masse des composés formés. En effet, il est très rare de trouver dans la littérature ou dans la banque de données NIST Wiley des spectres de masse de dérivés butylés des acides gras insaturés, contrairement aux dérivés de type esters méthyliques. Nous avons donc préféré réaliser les expériences d'altération avec l'ester méthylique de l'acide linoléique **I5** (cf. § 6.2.1). Par ailleurs, les produits d'oxydation et autres produits dérivés de l'acide linoléique sont généralement analysés sous la forme d'esters de méthyle (Sessa et al., 1978 ; Spiteller et Spiteller, 2000 ; Spiteller et al., 2001). L'influence de ce changement de la nature du groupe ester a été évaluée en réalisant des expériences de dégradation oxydante de mélanges d'huile essentielle de baies de genévrier avec le linoléate de méthyle **I5** et le linoléate de butyle **I6**, expériences qui n'ont révélé aucune différence en ce qui concerne le type de produits d'oxydation formés selon le substrat utilisé.

a.2) Conditions expérimentales mises en œuvre pour les expériences d'altération oxydante du linoléate de méthyle **I5** seul ou en mélange

Par rapport aux expériences d'autoxydation réalisées sur l'oléate de butyle seul ou en mélange avec de l'huile essentielle de baies de genévrier (cf. § 2.5.3), les quantités des initiateurs NHPI et Co(acac)₂ ont été augmentées afin d'accélérer l'oxydation et d'obtenir un taux de conversion important après seulement 24 h (cf. § 6.2.4). Le volume de CH₃CN a également été réduit au minimum afin de se rapprocher le plus possible d'un mélange de substances organiques archéologiques ne faisant bien entendu pas appel à ce solvant. Ce dernier est toutefois nécessaire pour solubiliser les initiateurs (cf. § 6.2.4). Les prélèvements effectués au cours des expériences réalisées ne sont pas extraits au CH₂Cl₂ comme précédemment mais simplement dilués dans ce solvant (cf. § 6.2.4) avant méthylation des acides (CH₂N₂) et silylation des alcools (BSTFA). L'échantillon est ensuite analysé par GC-MS (cf. § 6.2.4).

b) Expériences d'altération oxydante du linoléate de méthyle **I5**

L'altération par autoxydation de l'acide linoléique est largement documentée en raison du rôle de ses produits d'oxydation dans de nombreuses maladies (Spiteller, 1998 ; Spiteller et al., 2001). De ce fait, un bon nombre de ces produits a été identifié. Ainsi, par comparaison avec les spectres de masse disponibles dans la littérature, il a été possible d'identifier les composés **O22-O35** dans l'extrait lipidique obtenu après simple dérivation (CH₂N₂ ; BSTFA) d'un prélèvement réalisé après 20 h d'autoxydation du linoléate de méthyle **I5** (Hamberg, 1983 ; Dix et Marnett, 1985 ; Ozawa et al., 1986 ; Spiteller et Spiteller, 1998) (Fig. 2.24).

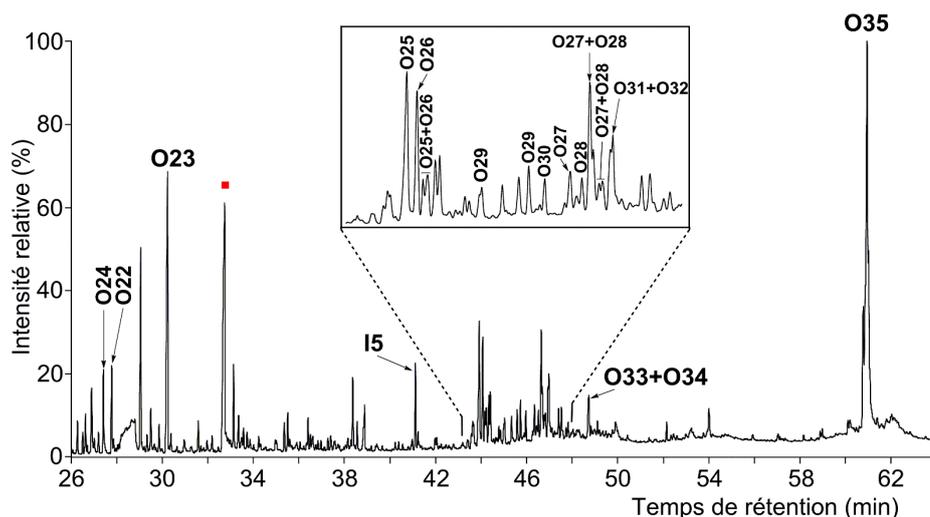


Figure 2.24 : Chromatogramme en phase gazeuse partiel (GC-MS, IE, 70 eV) de l'extrait lipidique obtenu après oxydation pendant 20 h du linoléate de méthyle **I5**. Le carré rouge indique la présence d'un composé azoté dérivé du NHPI. Les alcools sont analysés sous forme d'éthers de triméthylsilyle et les acides sous forme d'esters méthyliques. Les structures des composés numérotés sont représentées dans l'Appendice de la thèse. Programme A de température du four GC (cf. § 6.5.2).

Parmi ces composés, nous trouvons notamment deux diacides, **O22** et **O23**, respectivement en C₈ et C₉, ainsi que l'aldéhyde **O24**, un précurseur potentiel de **O23**. Ces composés sont issus de l'évolution des deux hydroperoxydes **H5** et **H6** (ou de leurs isomères issus de l'isomérisation *Z/E* des doubles liaisons) généralement formés lors de l'autoxydation du linoléate de méthyle **I5** (Fig. 2.25 et 2.26). En effet, malgré la présence de trois sites d'abstraction possibles sur le système diénique non conjugué, l'abstraction d'un atome d'hydrogène se produit essentiellement sur le méthylène bisallylique puisque le ΔH de la liaison C-H est plus faible dans ce cas que pour une liaison C-H en position allylique simple (pour rappel, 77 Kcal/mol contre 88 Kcal/mol). Une fois l'abstraction réalisée, il y a trois sites possibles d'addition de l'oxygène pour raison de mésomérie, menant ainsi à la formation de trois radicaux peroxydes **P1-P3**. Le radical peroxyde **P1** (Fig. 2.25), de par l'absence de la conjugaison du diène, n'est pas stabilisé et évolue par β -élimination de l'oxygène au contraire des radicaux peroxydes **P2-P3** plus stables en raison de la conjugaison des deux insaturations (Schaich, 2013). De ce fait, les hydroperoxydes **H5** et **H6** sont généralement les principaux hydroperoxydes observés lors de l'autoxydation du linoléate de méthyle **I5** (Frankel, 1980, 1985, 2005 ; Gardner, 1989). Cependant, en fonction des conditions expérimentales mises en œuvre, des isomères de **H5** et **H6** issus de l'isomérisation *Z/E* des doubles liaisons et qui sont aussi des précurseurs potentiels de **O22** et **O23** peuvent également être formés en proportions significatives.

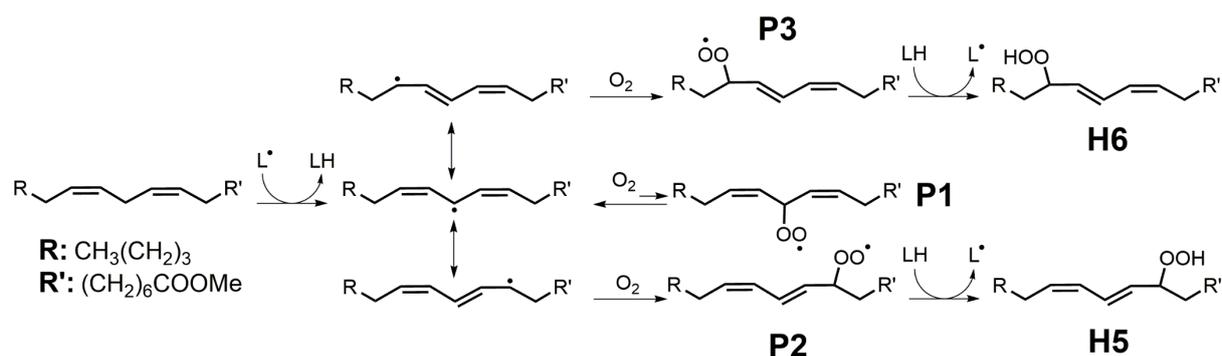


Figure 2.25 : Principaux hydroperoxydes formés lors de l'autoxydation du linoléate de méthyle **15**.

Le diacide **O23** pourrait être formé par un processus mettant en jeu une réaction de fragmentation de Hock affectant l'hydroperoxyde **H5**. En ce qui concerne le diacide **O22**, sa formation pourrait faire intervenir une première étape de peroxydation en position C-8 de l'hydroperoxyde **H6** suivie d'une fragmentation de Hock (Fig. 2.26). L'oxydation de l'aldéhyde ainsi formé va alors conduire au diacide **O22** (Fig. 2.26).

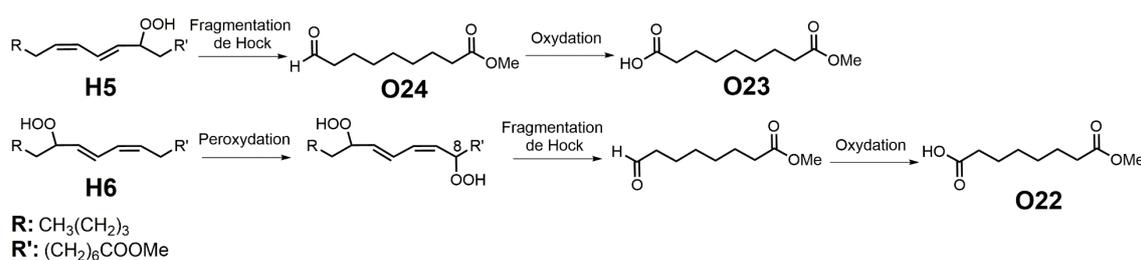


Figure 2.26 : Voies de formations possibles des diacides **O22-O23** à partir des hydroperoxydes **H5-H6**.

Outre les diacides représentant encore une fois une part importante des produits d'oxydation formés à partir d'acides gras (di)insaturés, les composés **O25** et **O26** ont également été détectés en quantités notables et identifiés grâce aux spectres de masse disponibles dans la littérature (Ozawa et al., 1986) comme étant des époxydes insaturés dérivés de l'acide linoléique portant l'oxygène au niveau des positions C-12/C13 et C-9/C-10, respectivement (Fig. 2.24 et 2.27). Chacun de ces composés apparaît en chromatographie gazeuse sous la forme de deux pics distincts associés au même spectre de masse et liés à une isomérisation au niveau de la double liaison et/ou au niveau de l'époxyde. Leur formation (Fig. 2.27 voie 1) peut s'expliquer par l'époxydation d'une des doubles liaisons du linoléate de méthyle **15** selon le mécanisme décrit dans la Fig. 2.17b (cf. § 2.5.3b). Les époxydes **O25** et **O26** ainsi formés se trouvent être des intermédiaires potentiels dans la formation des composés **O27** et **O28** (Fig. 2.24) comme

présenté sur la Fig. 2.27 voie 1. Ces composés (sous forme dérivée) ont été identifiés par comparaison de leurs spectres de masse avec des spectres publiés par Spiteller et Spiteller (1998). Les composés **O27** et **O28** apparaissent sous la forme de plusieurs isomères (présence de plusieurs pics en GC ; Fig. 2.24), dont la présence peut être liée à une isomérisation *Z/E* au niveau de la double liaison restante mais également aux configurations des trois centres asymétriques portant un atome d'oxygène.

Les composés **O29-O32** qui apparaissent également sous la forme de plusieurs isomères ont, quant à eux, été identifiées par comparaison des spectres de masse de ces composés sous forme dérivée avec des spectres de la littérature (Dix et Marnett, 1985 ; Spiteller et Spiteller, 1998) et des spectres de la banque de données NIST Wiley comme étant des alcools (**O29**, **O30**) et cétones (**O31**, **O32**) allyliques. Ces composés sont directement apparentés aux hydroperoxydes **H5** et **H6** (et à leurs isomères), les produits primaires de l'autoxydation de l'acide linoléique **I5**. La voie de formation des composés **O29** et **O31** dérivant de l'hydroperoxyde diinsaturé fonctionnalisé en C9 **H5** est présentée sur la Fig. 2.17 (voie 2). La voie de formation des composés **O30** et **O32** dérivant d'hydroperoxydes diinsaturés fonctionnalisés en C13 comme **H6**, non représentée, est tout à fait similaire.

Une oxydation ultérieure des alcools **O29-O30** conduit à des diols diinsaturés portant les fonctions hydroxyles en 9-14 (**O33**) et 8-13 (**O34**) (Fig. 2.24 et 2.27 voie 2) qui ont également été identifiés parmi les produits d'oxydation du linoléate de méthyle **I5** sur la base de leur fragmentation en spectrométrie de masse (Hamberg, 1983).

Enfin, dans le massif de composés notés **O35** élué en fin de chromatogramme, les produits majeurs formés par autoxydation du linoléate de méthyle **I5** (Fig. 2.24) pourraient correspondre à des tétrols saturés sur la base de la masse moléculaire à 650 Da des dérivés silylés et méthylés ($[M+H]^+$ à 651, CI à l'ammoniaque]. Ces derniers n'ont, à notre connaissance, jamais été reportés dans la littérature parmi les produits d'autoxydation du linoléate de méthyle **I5** et n'ont donc pu être identifiés de manière formelle sur la base de la seule spectrométrie de masse. Ces composés ont sans doute été formés par époxydation des deux insaturations du linoléate de méthyle, suivie de l'ouverture des fonctions époxydes par substitution nucléophile avec de l'eau (cf. Fig. 2.18) comme présenté en figure 2.27 voie 1.

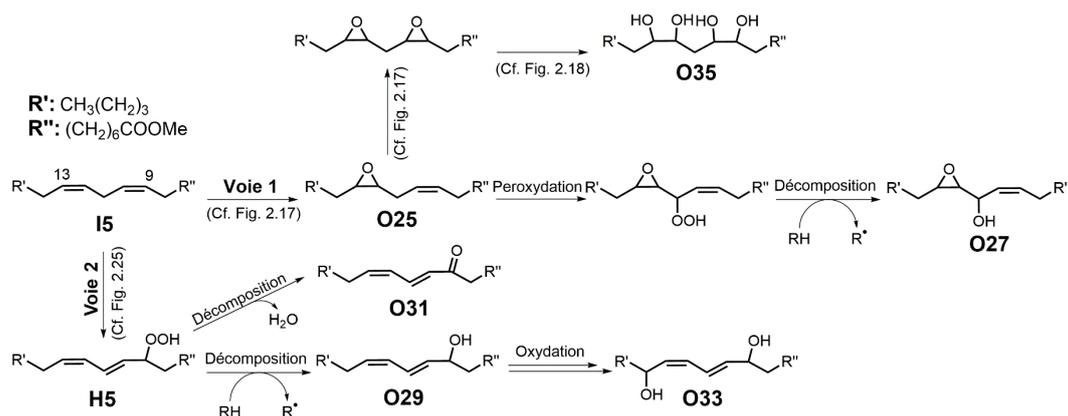


Figure 2.27 : Voies de formation (voie 1) des composés O25, O27 et O35 et (voie 2) des composés O29, O31 et O33 à partir du linoléate de méthyle I5.

En parallèle de l'analyse par GC-MS après dérivation de l'extrait lipidique obtenu après autoxydation artificielle du linoléate de méthyle I5 pendant 20 h, un traitement par NaBH₄ a été réalisé sur ce même extrait afin de libérer d'éventuels composés liés par des ponts peroxydes. Cette étude qui n'a révélé aucun nouveau produit ne sera pas présentée.

c) Autoxydation d'un mélange de linoléate de méthyle I5 et d'huile essentielle de baies de genévrier

Le chromatogramme de l'extrait obtenu après autoxydation du mélange entre huile essentielle de baies de genévrier et linoléate de méthyle I5 a permis d'identifier quelques composés nouveaux numérotés de 1 à 6 (carrés bleus) sur la Fig. 2.28 par rapport à ceux obtenus par autoxydation du linoléate de méthyle I5 seul (Fig. 2.24). Toutefois, les analyses par GC-MS en mode CI réalisées en utilisant l'ammoniaque et l'isobutane comme gaz d'ionisation ont permis de déterminer que les composés 1-4 possèdent une masse impaire, indiquant donc la présence d'un nombre impair d'atomes d'azote dans leur structure. De ce fait, ces composés correspondent sans doute à des sous-produits formés par réaction entre le linoléate de méthyle I5 et le NHPI et non à des adduits issus de réactions d'addition entre les deux substrats du mélange. Les structures des composés 5 et 6 n'ont quant à elles pas pu être identifiées sur la base de la spectrométrie de masse (Annexe 2.1).

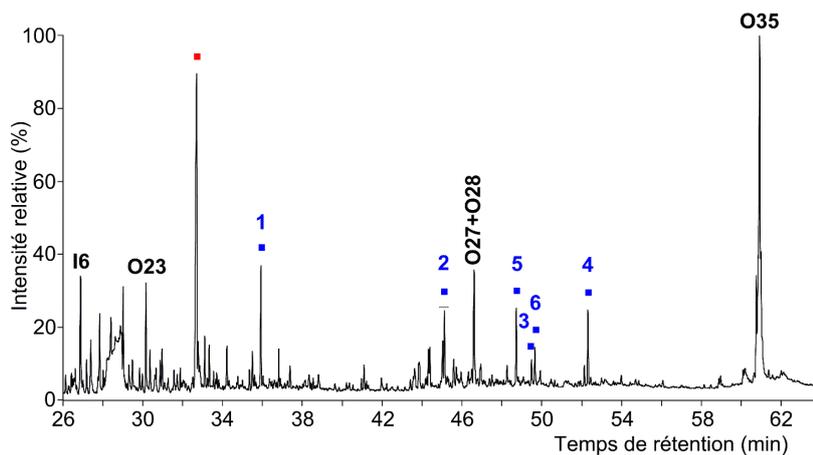


Figure 2.28 : Chromatogramme en phase gazeuse partiel (GC-MS, IE, 70 eV) de l'extrait lipidique obtenu après oxydation pendant 20 h d'un mélange d'huile essentielle de baies de genévrier et de linoléate de méthyle **I5**. Le carré rouge indique la présence d'un composé azoté dérivé du NHPI. Les carrés bleus numérotés de 1 à 6 correspondent à de nouveaux composés mis en évidence par rapport à l'altération par autoxydation du linoléate de méthyle **I5** seul. Les alcools sont analysés sous forme d'éthers de triméthylsilyle et les acides sous forme d'esters méthyliques. Les structures des composés numérotés sont représentées dans l'Appendice de la thèse. Programme A de température du four GC (cf. § 6.5.2).

Le même traitement avec NaBH_4 que celui réalisé dans le cas de l'expérience d'autoxydation réalisée sur le linoléate de méthyle **I5** seul a été effectué dans le cas de l'expérience impliquant le mélange d'huile de baies de genévrier et de linoléate de méthyle **I5**. Comme nous n'avons pas pu mettre en évidence la formation de composés autres que ceux déjà présentés ci-dessus, les résultats de cette expérience ne seront pas discutés plus avant. On peut noter néanmoins que si des composés issus de l'huile essentielle de baies de genévrier ont été libérés par traitement de la fraction oligo- ou polymérique par NaBH_4 , ces composés ont pu être facilement perdus compte tenu de la prédominance de monoterpènes volatils dans l'huile de baies de genévrier.

d) Conclusion

Hormis la présence de deux composés de structures non déterminées formés par autoxydation artificielle du mélange entre le linoléate de méthyle **I5** et l'huile essentielle de baies de genévrier, aucun composé relevant de réactions croisées entre les deux ingrédients de départ, tels des produits d'addition entre monoterpènes issus de l'huile essentielle de baies de genévrier et dérivés oxydés de linoléate de méthyle, n'a été observé, et ce alors que leur masse moléculaire serait compatible avec leur analyse directe par GC-MS.

Néanmoins, l'absence de tels produits n'est avérée que pour la fraction analysable en GC-MS sans traitement de coupure de liaisons chimiques. De ce fait, la partie

oligomérique/macromoléculaire, qui n'a été que très peu étudiée à travers le traitement par NaBH_4 , pourrait donc receler des produits de condensation entre composés d'ingrédients différents liés par des liaisons autres que peroxydes qui auraient été coupées par NaBH_4 .

Ainsi, dans un dernier volet de notre étude visant à étudier la formation de produits de couplage inter-ingrédients induite par des processus d'oxydation, il était important de s'intéresser de manière plus approfondie aux oligomères/macromolécules ayant pu être formés lors de nos essais d'autoxydation à partir de mélanges en utilisant NaBH_4 comme réactif de coupure de liaison peroxydes, mais aussi d'autres réactifs comme la combinaison HI/LiAlH_4 qui permet de couper des liaisons de type éther et ester. Pour pallier au problème des composés volatils (petits terpènes) éventuellement libérés des macromolécules par dégradation chimique, nous avons choisi comme substrat un mélange de linoléate de méthyle et de résine de pin, cette dernière étant principalement constituée de diterpènes, composés peu volatils en comparaison des monoterpènes présents dans l'huile essentielle de baies de genévrier.

2.5.5. Etude de la dégradation par autoxydation d'un mélange de linoléate de méthyle et de résine de pin sylvestre

Les liaisons peroxydes dans les macromolécules, dont nous avons abordé l'étude par dégradation à l'aide de NaBH_4 , ne sont pas les seules à servir de réticulation dans les macromolécules. En effet, comme nous l'avons vu précédemment (cf. § 2.5), il est possible de procéder à des réactions d'addition d'un radical alkyle ou d'un radical alkoxy sur l'insaturation d'un autre lipide lors de l'autoxydation et de ce fait de créer des structures oligomériques/macromoléculaires dont les sous-unités constitutives sont réticulées par des ponts éthers et des liaisons carbone-carbone. Pour étudier ce type de structures, nous nous sommes inspirés des nombreuses études dans le domaine de la géochimie faisant appel à des coupures de liaisons chimiques afin d'étudier les macromolécules présentes dans la matière organique des sédiments et des pétroles (Koopmans et al., 1997 ; Putschew et al., 1998 ; Schaeffer-Reiss et al., 1998). Il a ainsi été décidé de réaliser un traitement chimique séquentiel des macromolécules. Dans un premier temps, la coupure des liaisons peroxydes par réduction avec NaBH_4 des fractions polaires issues de l'autoxydation des différents substrats impliqués est effectuée. Ensuite, après dérivation et fractionnement pour séparer les molécules libérées lors du traitement et les oligomères/macromolécules résiduels, un traitement par HI/LiAlH_4 de ces derniers est réalisé pour couper de manière sélective les liaisons éthers et esters (cf. § 6.2.4 expériences 6-8 et 6.2.6).

a) Etude des produits apolaires formés lors des expériences d'autoxydation mettant en jeu la résine de pin sylvestre seule ou en mélange avec du linoléate de méthyle

Nous avons réalisé des expériences d'autoxydation de la résine de pin sylvestre seule et en mélange avec du linoléate de méthyle **I5** afin d'étudier, dans un premier temps, les produits d'oxydation directement analysables par GC-MS (constituants non macromoléculaires). (cf. § 6.2.4 ; expérience 4 et 5).

Les conditions expérimentales mises en œuvre sont presque identiques à celles utilisées pour les expériences réalisées précédemment mettant en jeu le linoléate de méthyle (cf. § 2.5.4.a), à ceci près que la quantité de solvant a été adaptée afin de permettre la solubilisation de la résine (cf. § 6.2.4).

a.1) Autoxydation de la résine de pin sylvestre seule

L'analyse de la résine de conifère utilisée comme substrat pour les expériences d'autoxydation montre la prédominance des acides abiétique **D1**, lévopimarique **D2**, pimarique **D3** et déhydroabiétique **D4** (Fig. 2.29a). Ces acides sont fréquemment prédominants parmi les acides diterpéniques dans les résines de Pinacées (Mills et White, 1977 ; Chen, 1992 ; Colombini et al., 2005a ; Rezzi et al., 2005 ; Courel, 2016). La prédominance de l'acide déhydroabiétique **D4** dans le cas de cette résine ainsi que la présence des composés **D5-D9**, analogues issus de processus d'altération oxydante de l'acide abiétique qui ont pu être identifiés par comparaison avec des spectres de masse de la littérature (Mills et al., 1984 ; Koller et al., 1998 ; Van den Berg et al., 2003) ou de la bibliothèque de spectres de masse NIST Wiley, montrent que cette résine a subi des processus d'oxydation depuis qu'elle a été produite par l'arbre. Ces processus d'oxydation n'ont toutefois affecté la résine que de manière limitée (Pastorova et al., 1997 ; Van den Berg et al., 2000 ; Colombini et al., 2005a).

Ainsi, l'acide déhydroabiétique **D4** et le composé **D5** ont été formés par déshydrogénation, très probablement induite par le mécanisme discuté en Partie 4 de ce chapitre (cf. § 2.4.3.b), de l'acide abiétique **D1**, de l'acide lévopimarique **D2** et du composé **D6**. Les produits d'oxydation **D7-D9**, quant à eux, proviennent de l'autoxydation de l'acide déhydroabiétique **D4** par oxydation des positions allyliques en C-7 ou C-15 (Van den Berg et al., 2000, 2003). Le composé **D10**, autre composé absent des résines fraîches, a pu être identifié sur la base de la spectrométrie de masse comme étant un phénol (analysé sous forme acétylée) dérivé de l'acide déhydroabiétique **D4**. En effet, la présence d'un pic intense à $[M-42]^+$ et une masse moléculaire de 372 Da sont caractéristiques de la présence d'un phénol. Toutefois, la position de la fonction

phénol n'a pas pu être établie de manière certaine. Néanmoins, nous proposons que la fonction puisse être située sur la position C-12. En effet, la fonctionnalisation sur cette position aurait pu être induite par autoxydation de cette position située en position allylique au niveau de l'acide abiétique **D1**, suivie d'une étape de déshydrogénation conduisant ensuite au composé **D10**.

L'expérience d'autoxydation de cette résine a été réalisée sur une période de 24 h dans les conditions indiquées en partie expérimentale (cf. § 6.2.4, expérience 4). La distribution des produits obtenus est présentée sur la figure 2.29b. Il apparaît que les acides abiétique **D1** et lévopimarique **D2** ont disparu au profit de l'acide déhydroabétique **D4** et des composés **D7-D9** même s'il est difficile, dans le cas de ces composés, d'évaluer la part formée lors de l'expérience d'autoxydation par rapport à la part déjà présente au départ dans la résine utilisée comme substrat.

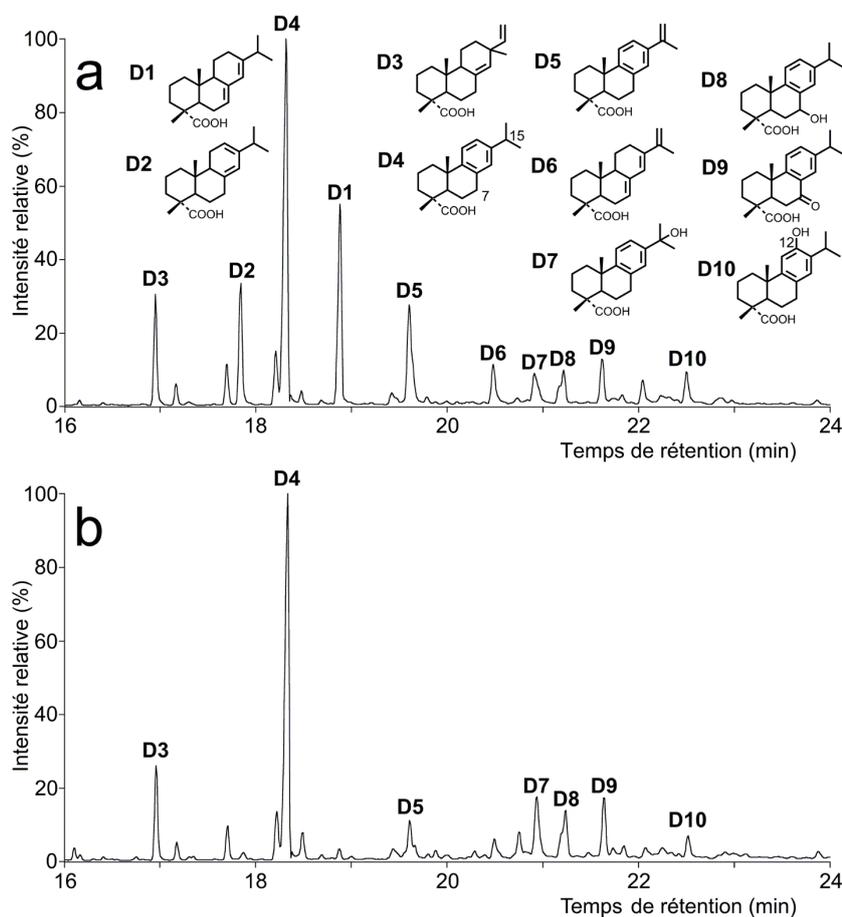


Figure 2.29 : Chromatogrammes en phase gazeuse partiels (GC-MS, IE, 70 eV) de l'extrait lipidique obtenu à partir de la résine de pin sylvestre (a) avant oxydation, (b) après 24 h d'oxydation. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides sous forme d'esters méthyliques. Les structures des composés numérotés sont représentées dans l'Appendice de la thèse. Programme B de température du four GC (cf. § 6.5.2).

a.2) Expériences d'autoxydation du mélange entre résine de pin sylvestre et linoléate de méthyle I5

L'autoxydation artificielle pendant 24 h du mélange de résine de pin et de linoléate de méthyle conduit à un résultat surprenant (Fig. 2.30a,b). En effet, en dehors de la disparition de l'acide abiétique **D1** et de l'acide lévopimarique **D2** au profit de l'acide déhydroabiétique **D4** et de ses produits d'oxydation **D7-D9**, aucun produit d'oxydation du linoléate de méthyle **I5** n'a pu être observé en dehors des tétrols **O35**. Il semble néanmoins qu'une part significative du linoléate de méthyle **I5** ait réagi comme le suggère l'évolution (diminution) d'un facteur 6 du rapport des aires entre les pics du linoléate de méthyle **I5** et de l'acide déhydroabiétique **D4** si l'on compare les chromatogrammes en phase gazeuse (FID) du mélange de résine et du composé **I5** avant et après oxydation (Annexe 2.2).

L'expérience d'autoxydation a été donc poursuivie jusqu'à 48 h puis 92 h afin de voir si de nouveaux produits d'oxydation diterpéniques ou issus de l'altération du linoléate de méthyle **I5** avaient été formés. Toutefois, hormis l'apparition du diacide **O23**, aucun autre composé formé par oxydation du linoléate de méthyle **I5** n'a pu être mis en évidence. Il est tout de même à noter qu'au bout de 92 h d'oxydation, le diterpène **D9** formé par autoxydation de l'acide déhydroabiétique **D4** a vu son abondance relative augmenter significativement.

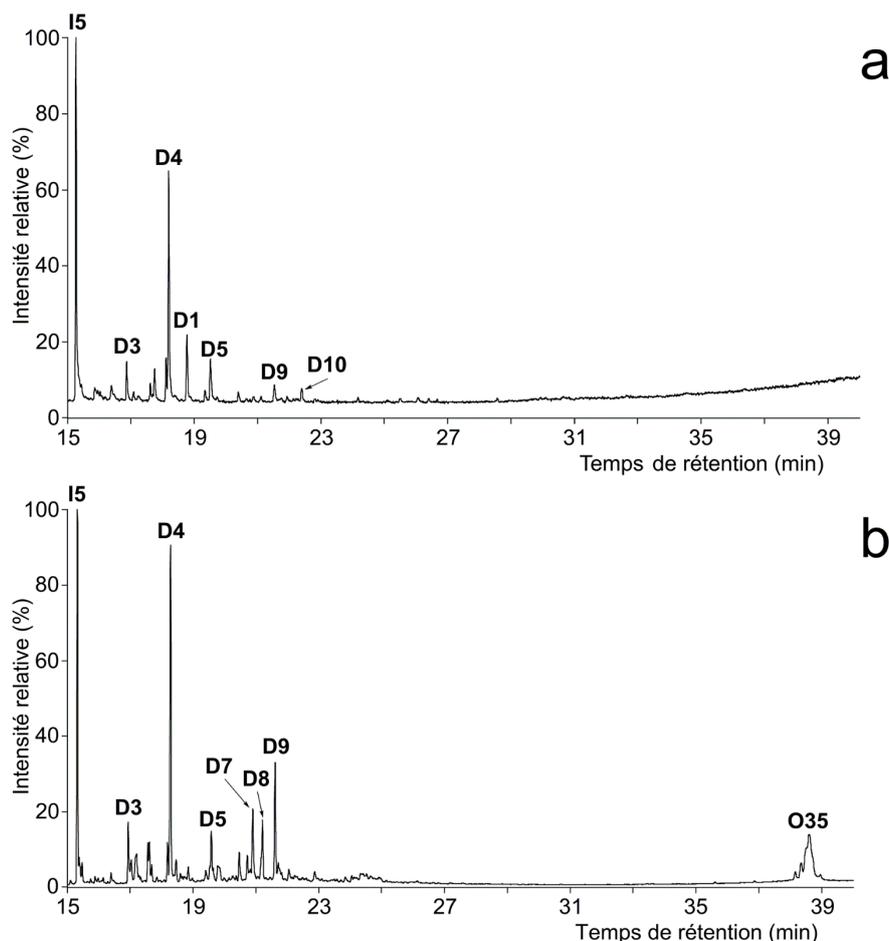


Figure 2.30 : Chromatogrammes en phase gazeuse partiel (GC-MS, IE, 70 eV) de l'extrait lipidique obtenu à partir du mélange entre la résine de pin sylvestre et du linoléate de méthyle **I5 (a) avant oxydation ; (b) après 24 h d'oxydation. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides sous forme d'esters méthyliques. Les structures des composés numérotés sont représentées dans l'Appendice de la thèse. Programme B de température du four GC (cf. § 6.5.2).**

a.3) Conclusion

Les expériences d'autoxydation réalisées sur le linoléate de méthyle **I5** et la résine de pin sylvestre seul ou en mélange avec pour objectif d'étudier les composés non oligo- / polymériques directement analysables par GC-MS a permis de mettre en évidence une influence très nette de l'ajout de résine de pin sur l'oxydation du linoléate de méthyle. En effet, malgré une durée d'exposition importante du mélange, très peu de produits d'oxydation du linoléate de méthyle ont été détectés dans le cas de l'expérience réalisée à partir du mélange de résine et de linoléate de méthyle par rapport à l'expérience réalisée sur l'ester seul (Fig. 2.24). Toutefois, nous avons observé une diminution nette du rapport linoléate de méthyle/acide déhydroabiétique au bout de 24 h d'autoxydation. Ceci peut peut-être s'expliquer par une formation favorisée de constituants oligomériques ou macromoléculaires lors des expériences

réalisées sur le linoléate de méthyle en mélange avec de la résine de pin par rapport aux expériences réalisées sur le linoléate de méthyle seul. Il n'est pas exclu que les constituants diterpéniques de la résine soient particulièrement sensibles à l'oxydation et protègent dans une certaine mesure le linoléate de méthyle.

b) Etude par dégradation chimique des composés formés lors de l'autoxydation de la résine de pin sylvestre et du linoléate de méthyle seuls ou en mélange

Les expériences présentées ci-dessus ont permis de mettre en lumière un changement dans les produits d'oxydation formés à partir du linoléate de méthyle **I5** lorsque les expériences sont réalisées sur ce substrat seul ou en mélange avec de la résine de pin. Comme cela a été évoqué plus haut, il a été envisagé que cela puisse être lié, au moins dans une certaine mesure, à la possibilité de formation de produits oligomériques issus de réactions croisées.

Afin d'évaluer cette possibilité, des expériences d'autoxydation (cf. § 6.2.4 ; expériences 6-8) ont été réalisées sur une durée de 48 h à partir de chacun des substrats séparés et sur le mélange des deux substrats avec pour objectif spécifique d'étudier les produits obtenus par dégradation chimique sélective des fractions polaires des extraits organiques après autoxydation. Ces fractions peuvent, en effet, être en partie constituées de structures oligomériques ou macromoléculaires formées par des processus de recombinaisons intermoléculaires induits par l'autoxydation, comme discuté plus haut (cf § 2.5). Nous avons plus particulièrement utilisé NaBH₄ pour la coupure des liaisons peroxydes (Frankel et al., 1977 ; Marchand et al., 2005) et la combinaison en séquence de HI et LiAlH₄ qui permet de couper les liaisons éthers et esters (Schaeffer-Reiss et al., 1998 ; Koopmans et al., 1997 ; Putschew et al., 1998).

Les fractions polaires utilisées pour le traitement par NaBH₄ (F2, Fig. 2.31) ont été séparées par fractionnement sur colonne de silice sèche à partir des extraits totaux préalablement acétylés et traités par le diazométhane (cf. § 6.2.4 ; expériences 6-8 et § 6.2.6). Une partie de l'extrait organique obtenu (1-2 mg) après dégradation (F2_{NaBH₄}, Fig. 2.31) a ensuite été dérivée à l'aide de BSTFA (F2_{NaBH₄} Dérivée, Fig. 2.31) avant analyse par GC-MS. Les alcools silylés correspondent ainsi à des positions ayant porté initialement soit une fonction cétone (qui aurait été réduite en alcool par NaBH₄, puis silylée), soit à des ponts peroxydes ayant été coupés et qui représentent donc, potentiellement, des sites de liaison dans une structure oligomérique ou macromoléculaire. De même, les acides silylés correspondent potentiellement à des sous-unités liées dans des structures de haut poids moléculaire par des liaisons peresters. Il n'est cependant

pas exclu qu'une partie de ces acides silylés proviennent de peracides libres formés lors de l'autoxydation.

Le reste de l'extrait organique obtenu après traitement au NaBH_4 ($\text{F2}_{\text{NaBH}_4}$, Fig. 2.31) a été fractionné sur colonne de silice après acétylation des alcools et méthylation des acides, afin de séparer les composés de bas poids moléculaire libérés lors du traitement au NaBH_4 ($\text{F1}'$, Fig. 2.31) de la composante polaire de l'extrait, de nature potentiellement oligo-/polymérique ($\text{F2}'$, Fig. 2.31). Cette dernière a ensuite été soumise à un traitement par HI/LiAlH_4 , puis fractionnée sur colonne de silice après acétylation (Fig. 2.31). La fraction apolaire ainsi obtenue ($\text{F1}''$, Fig. 2.31) comprenant les composés formés par réduction des ponts éthers et esters par HI/LiAlH_4 a ensuite été analysée par GC-MS.

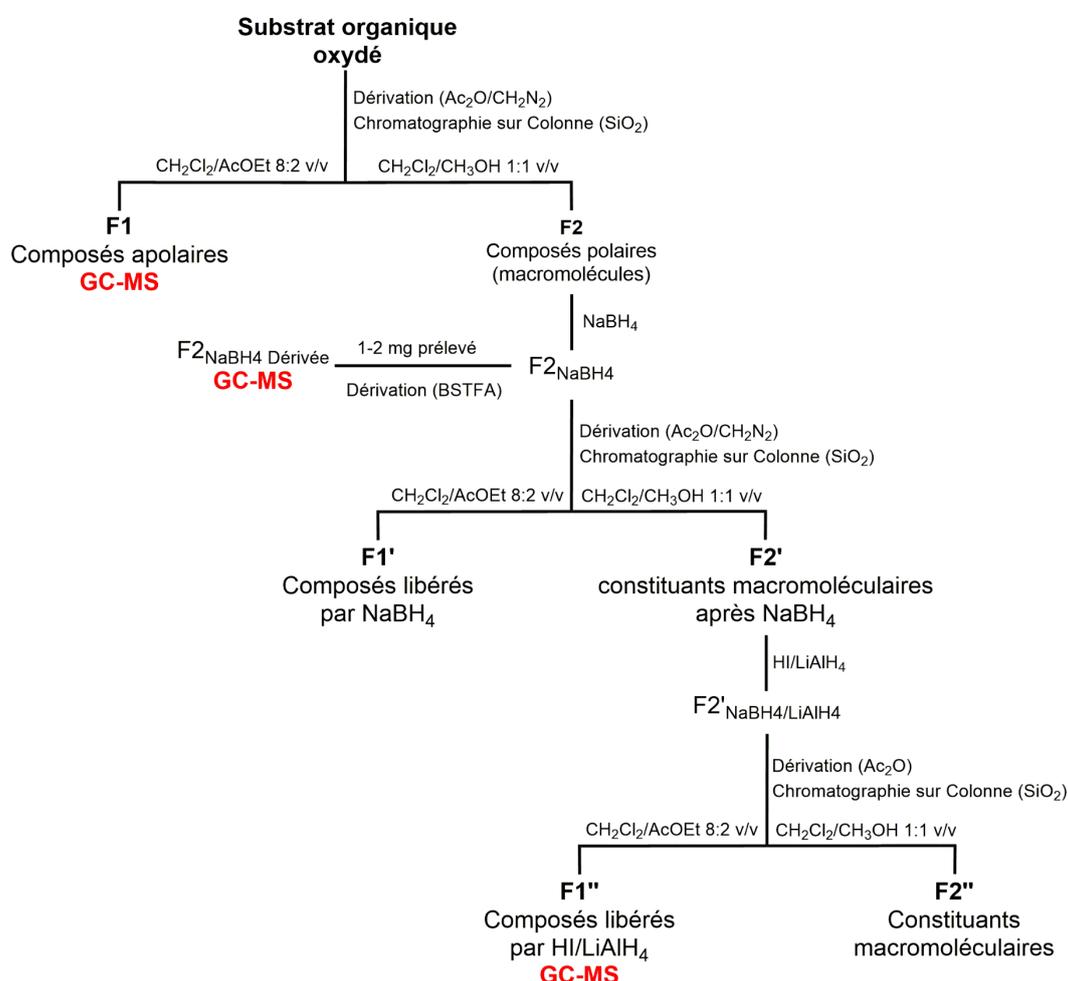


Figure 2.31 : Protocole analytique mis en œuvre pour l'étude des composés oligo-/polymériques formés lors de l'autoxydation de substances organiques à l'aide de réactions de dérivation et de dégradation chimique en séquence (NaBH_4 ; HI/LiAlH_4).

b.1) Etude des composés libérés par traitement des fractions polaires par NaBH₄

Résine de pin sylvestre seule

La résine de pin sylvestre ayant subi un processus d'autoxydation naturelle avant son utilisation pour des expériences d'autoxydation artificielle a pu d'ores et déjà subir des réactions d'oligo- / polymérisation oxydantes naturelles. De ce fait, la fraction polaire originelle de cette résine a été également étudiée par dégradation chimique avec NaBH₄ afin de la comparer avec celle de la résine après 48 h d'autoxydation en laboratoire. Les chromatogrammes présentés sur la figure 2.32 donnent la distribution des composés obtenus après dégradation dans le cas de la résine originelle et de la résine après 48 h d'autoxydation en laboratoire.

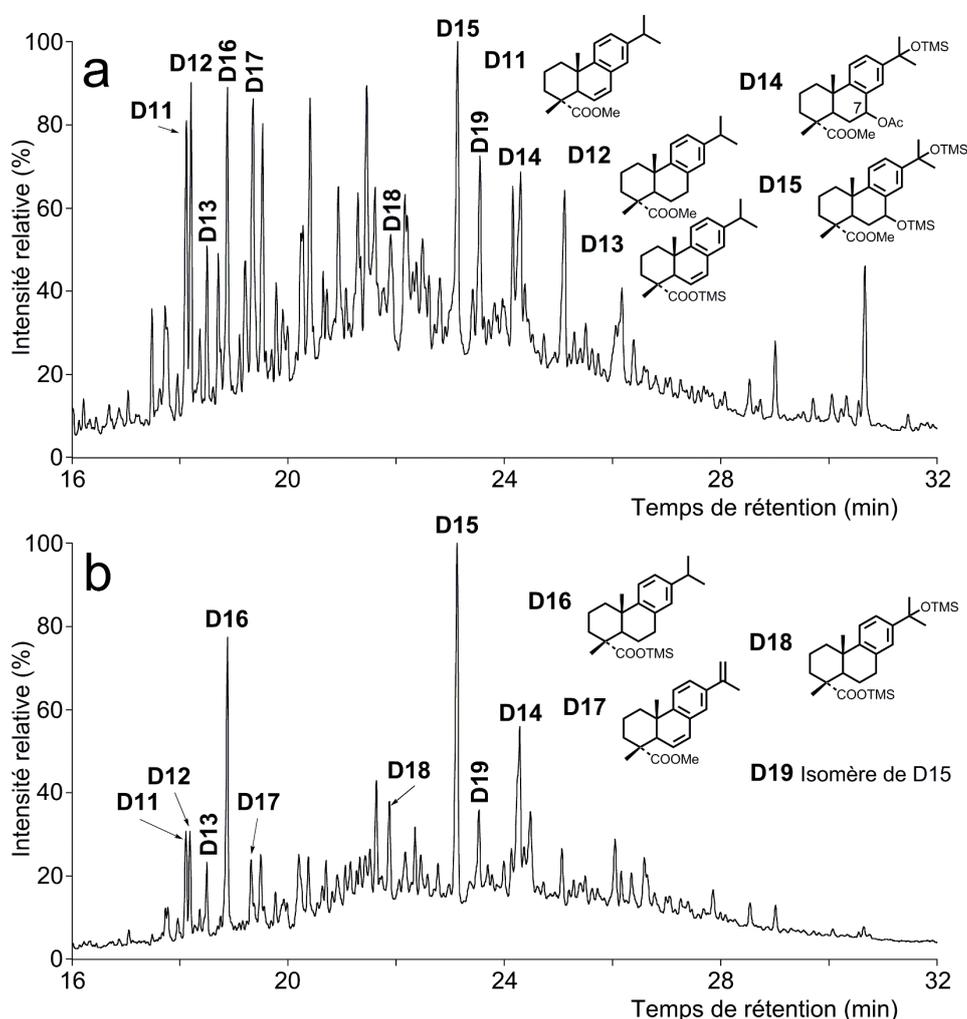


Figure 2.32 : Chromatogrammes en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de l'extrait lipidique dérivé au BSTFA obtenu après traitement par NaBH₄ de la fraction polaire dérivée (Ac₂O/CH₂N₂) de la résine de pin sylvestre (a) avant autoxydation, (b) après 48 h d'autoxydation. Les structures des composés numérotés sont représentées dans l'Appendice de la thèse. Programme B de température du four GC (cf. § 6.5.2).

L'analyse par GC-MS des produits obtenus par traitement par NaBH₄ de la fraction polaire originelle de la résine a mené à la mise en évidence des composés **D11-D19** (Fig. 2.32a). Les composés **D11-D12** et **D15-D19** ont été identifiés sur la base de leur spectre de masse par comparaison avec les données disponibles dans la banque de données NIST Wiley et dans la littérature (Mills et al., 1984 ; Rontani et al., 2015). Le composé **D13**, dont le spectre de masse n'est pas disponible dans la littérature, a été identifié comme étant l'analogue silylé de l'ester méthylique du composé **D11** sur la base des similitudes entre son mode de fragmentation en spectrométrie de masse et celui du composé **D11** caractérisé par un ion majeur à m/z 237. Le composé **D14** a, quant à lui, été identifié comme correspondant à l'analogue acétylé de l'alcool en C-7 de la molécule **D15** par la présence d'une masse moléculaire de 460 Da et d'un ion [M⁺-60] caractéristique de la perte d'acide acétique correspondant à la déshydratation d'un alcool pouvant se produire avec un alcool localisé en position C-7 d'un diterpène.

Les composés **D11-D12** correspondent sans doute à une « contamination » (Fig. 2.32a). En effet, l'absence de fonction OTMS sur ces acides indique clairement que ces molécules n'ont pas été libérées lors du traitement au NaBH₄ à partir de constituants de haut poids moléculaire mais correspondent à des composés sans doute mal séparés lors du fractionnement sur colonne de silice mis en œuvre pour la préparation de la fraction polaire sur laquelle la dégradation par NaBH₄ a été réalisée.

Les diterpènes **D11** à **D19** ont également été identifiés lors du traitement par NaBH₄ du mélange réactionnel de la résine après autoxydation artificielle au bout de 48 h, mais avec une contribution plus significative des composés **D14-D16** (Fig. 2.32b), tous silylés, ce qui est compatible avec le fait qu'ils seraient issus de sous-unités liées par des ponts peroxydes. Ces composés étaient nettement moins abondants dans la résine originelle (Fig. 2.32a). Par cette différence dans les intensités relatives en faveur des composés **D14-D16** dans le cas de la résine après altération artificielle, il semble clair que l'autoxydation artificielle a bel et bien favorisé des réactions intermoléculaires conduisant à la formation de ponts peroxydes entre molécules d'un même substrat pour former des constituants oligomériques ou macromoléculaires dont les principaux représentants monomériques sont les composés précédemment cités. De plus, grâce au traitement avec le BSTFA, qui a pour effet de silyler les fonctions oxygénées libérées par réduction des ponts peroxydes, il est possible de localiser les positions possibles des liaisons peroxydes au niveau des sous-unités diterpéniques (cf. § 2.5.5.b) et de proposer un mode de liaison possible de celles-ci dans des structures de haut poids moléculaire (Fig. 2.33). Ainsi, les positions probables des ponts peroxydes sur les molécules **D14-D16** se trouvent sur la fonction

acide en C-18 (liaison de type peracide), en C-7 et en C-15 (Fig. 2.33). Toutefois, bien qu'il soit indéniable que les structures **D14-D16** soient impliquées dans une structure macromoléculaire/oligomérique à travers au minimum un pont peroxyde, on ne peut affirmer qu'un pont peroxyde a été forcément réduit par NaBH_4 uniquement par la localisation d'une fonction OTMS. En effet, la fonction OTMS en C-7 peut provenir de la réduction de la cétone correspondante par NaBH_4 , et la fonction OTMS en C-15 peut simplement correspondre à l'alcool libre qui, de par sa position encombrée, ne peut être acétylé dans les conditions opératoires utilisées (cf. § 6.1.2.b), mais peut être silylé. Ce cas de figure concerne exclusivement le composé **D15** où deux scénarios d'implication de cette molécule dans une structure de haut poids moléculaire peuvent être imaginés. En effet, le composé **D15** peut être lié par un seul pont peroxyde en C-7 ou en C-15 avec respectivement un alcool tertiaire libre en C-15 et une cétone en C-7 (Fig. 2.33), ou être lié par deux ponts peroxydes en C-7 et en C-15 (Fig. 2.33).

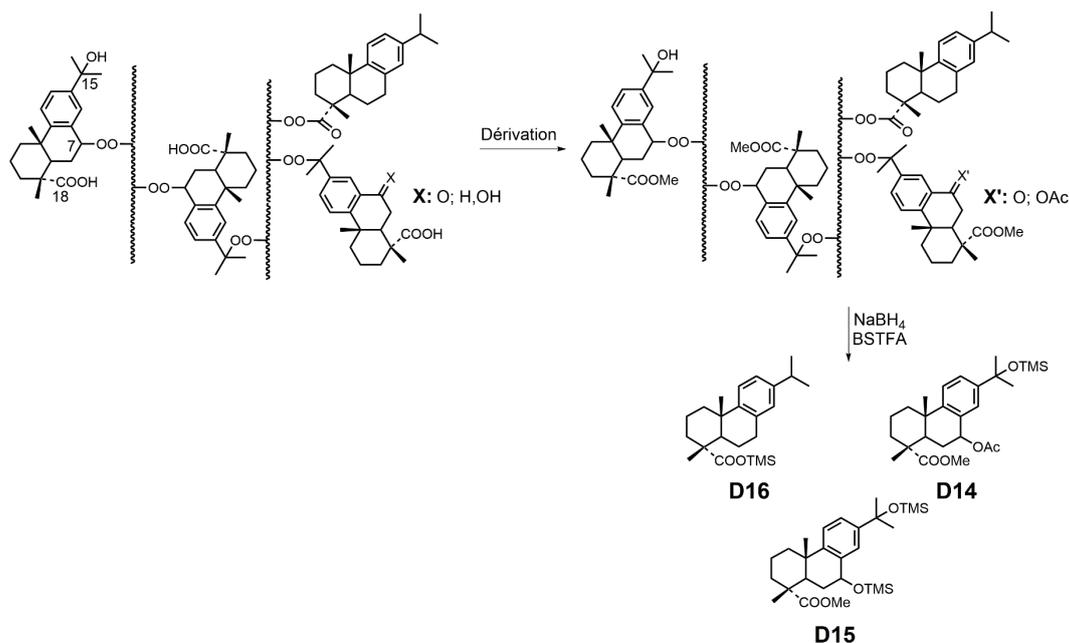
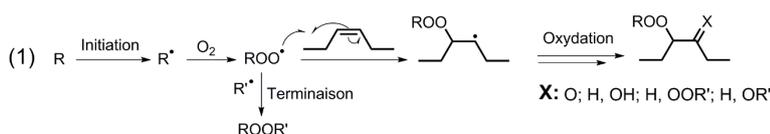


Figure 2.33 : Mode de liaison dans une structure oligomérique/macromoléculaire formée par autoxydation des molécules D14-D16 obtenues par réduction avec NaBH_4 d'une fraction polaire isolée (après dérivation avec CH_2N_2 et Ac_2O) d'une résine de pin sylvestre soumise à 48 h d'autoxydation.

La formation de ces ponts peroxydes et peresters à l'origine de processus d'oligomérisation entre lipides lors de processus d'oxydation peut s'expliquer par de nombreux mécanismes réactionnels. Pour le cas des liaisons peroxydes, une des voies les plus probables, et qui a été présentée précédemment (cf. § 2.5) est l'addition d'un radical peroxyde sur une insaturation

conduisant à la formation d'un composé dimérique radicalaire qui pourra à son tour s'oxyder et éventuellement propager l'oligomérisation, ou simplement conduire à une cétone ou un alcool (Fig. 2.34, équation 1). Une alternative à ce mécanisme est bien entendu la réaction de terminaison par addition entre deux radicaux (Fig. 2.34, équation 1) (Frankel, 1980, 2005 ; Paquette et al., 1985 ; Gardner, 1989 ; Schaich, 2013). Pour la formation des liaisons de type peracide dans des structures oligo- ou polymériques, deux voies possibles de formation peuvent être envisagées. La première implique un aldéhyde, qui peut notamment correspondre à une espèce formée comme intermédiaire dans une étape de fragmentation de Hock (Fig. 2.34, équation 2) (Fig. 2.9b). Dans cette voie, on peut envisager, tout d'abord, la formation d'un radical acyle par abstraction d'un atome d'hydrogène d'un aldéhyde, une réaction éventuellement catalysée par la présence de métaux de transition (Iqbal et al., 1994 ; Chatgililoglu et al., 1999). Ce radical peut ensuite, par une réaction de terminaison avec un radical peroxyde, conduire à une espèce dimérique liée par une fonction perester, ou réagir avec de l'oxygène. Le radical peracide ainsi formé pourra à son tour s'ajouter sur l'insaturation d'un autre lipide et former un dimère lié par un pont perester (Fig. 2.34, équation 2). La seconde voie à la formation de constituants oligomériques ou polymériques à travers des ponts peresters est simplement une réaction d'estérification impliquant un acide carboxylique et un hydroperoxyde (Fig. 2.34, équation 3). Il a par ailleurs été montré que cette réaction pouvait effectivement se produire lors de processus d'autoxydation (Sy et al., 1999 ; Sy et Brown, 2002).

Voie de formation possible des ponts peroxydes



Voies de formation possibles des ponts peracides

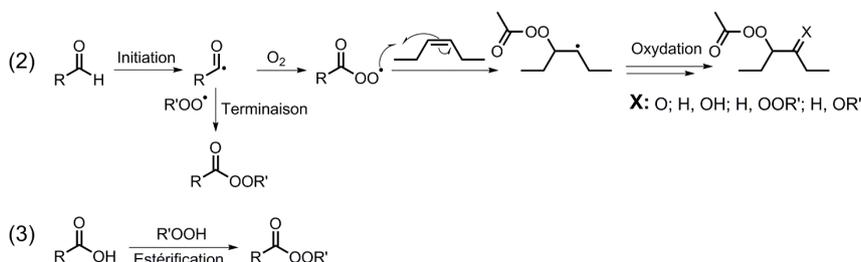


Figure 2.34 : Voies proposées pour la formation des ponts peroxydes et peresters à l'origine de l'oligomérisation de la résine lors de l'autoxydation

Linoléate de méthyle

Une réduction des ponts peroxydes par NaBH_4 a également été réalisée sur la fraction polaire de l'extrait lipidique issu de l'autoxydation artificielle du linoléate de méthyle **I5** pendant 48 h (cf. § 6.2.4 et 6.2.6) et a mené à la libération des α,ω -hydroxyacides **O36-O40**, et d'un diacide **O41**, tous identifiés par comparaison de leurs spectres de masse avec des spectres de la bibliothèque NIST Wiley et des spectres publiés par Rontani et Auber (2004) (Fig. 2.35). Dans le cas des α,ω -hydroxyacides, la fonction alcool terminale est présente sous sa forme silylée, tandis que la fonction acide peut être silylée (**O36-O38**) ou sous la forme d'ester de méthyle (**O39** et **O40**). Ces composés possèdent, à priori, au minimum un pont peroxyde impliqué dans une structure macromoléculaire. On peut exclure que les composés **O39** et **O40** soient issus d' α,ω -oxoacides (sous forme d'esters méthyliques) libres dont la fonction aldéhyde aurait été ensuite réduite par NaBH_4 . En effet, la faible polarité de ces composés aurait conduit à leur élution dans la fraction apolaire lors de l'étape de fractionnement chromatographique de l'extrait organique dérivé issu de l'expérience d'autoxydation du linoléate de méthyle, mise en œuvre pour la séparation de la fraction polaire. De ce fait, l'alcool silylé des molécules **O39** et **O40** provient forcément de la réduction d'un pont peroxyde lié à une structure oligo-ou polymérique (Fig. 2.36).

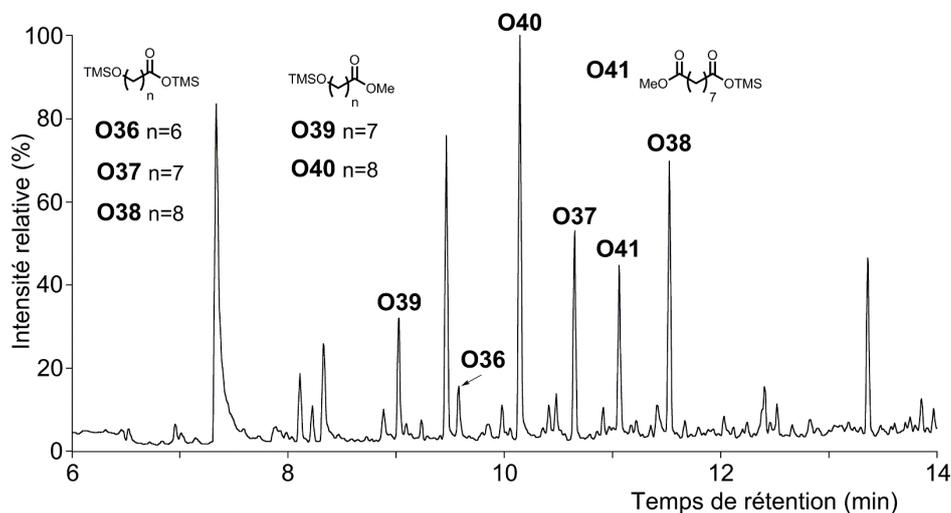


Figure 2.35 : Chromatogramme en phase gazeuse partiel (GC-MS, IE, 70 eV) de l'extrait lipidique obtenu après traitement par NaBH_4 de la fraction polaire séparée du mélange réactionnel (dérivé avec CH_2N_2 et Ac_2O) obtenu après autoxydation du linoléate de méthyle seul pendant 48 h. Les structures des composés numérotés sont représentées dans l'Appendice de la thèse. Programme B de température du four GC (cf. § 6.5.2).

Pour les composés **O36-O38**, puisque leur fonction acide est également présente sous forme silylée, on peut proposer qu'ils étaient initialement liés dans une structure macromoléculaire formée lors de l'autoxydation du linoléate de méthyle par un pont perester du côté de l'acide, par un peroxyde du côté de la fonction alcool ou à la fois par les deux types de fonctions (Fig. 2.36). Néanmoins, dans le cas où ces composés auraient été liés par une liaison perester, la fonction alcool silylée pourrait également être issue d'une fonction aldéhyde de bout de chaîne qui aurait été réduite lors du traitement par NaBH_4 (Fig. 2.36). Ce type de composés possédant un aldéhyde en bout de chaîne a d'ailleurs été observé lors de l'analyse par GC-MS de l'extrait oxydé du linoléate de méthyle (Fig. 2.24). Comme déjà mentionné, ils correspondent à des intermédiaires réactionnels dans la voie de formation des diacides à partir des acides gras insaturés (Fig. 2.9b). A cet égard, il est à noter qu'un dérivé de diacide, le composé **O41**, portant une fonction ester méthylique sur l'un des groupements acides, a également été libéré par réduction au NaBH_4 de la fraction polaire obtenue après oxydation du linoléate de méthyle au bout de 48 h (Fig. 2.35). Ce composé était vraisemblablement lié dans une structure oligo-ou polymérique par une liaison perester (Fig. 2.36).

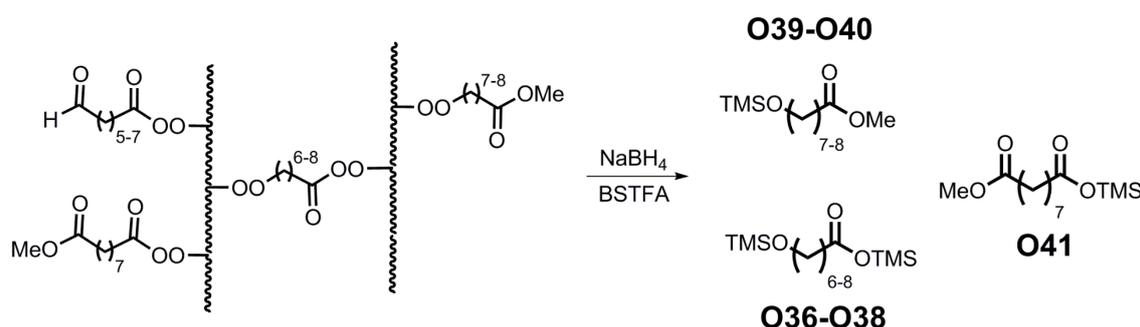


Figure 2.36 : Modes de liaison dans une structure oligomérique/macromoléculaire de produits d'oxydation du linoléate de méthyle tels que déduits par l'expérience de dégradation par NaBH_4 de macromolécules polaires ayant été préalablement dérivées avec CH_2N_2 et Ac_2O .

Mélange linoléate de méthyle et résine de pin sylvestre

L'étude des produits libérés par réduction par NaBH_4 de la fraction polaire de l'extrait obtenu après autoxydation du mélange entre le linoléate de méthyle et la résine de pin sylvestre pendant 48 h a mené à la libération des mêmes produits que ceux précédemment observés parmi les composés obtenus par réduction par NaBH_4 des fractions polaires de chacun des substrats oxydés de manière individuelle mais avec quelques changements mineurs d'abondances relatives (Fig. 2.37).

Ce résultat suggère que les substances polaires formées lors d'expériences réalisées à partir d'un mélange de résine et des dérivés d'acides gras insaturés sont de nature oligo/polymérique et présentent, en partie tout au moins, des sous-unités liées par des liaisons peroxydes. Ces substances oligo/polymériques sont constituées à la fois des sous-unités issues de la résine et de celles issues du linoléate de méthyle puisqu'en effet, différents composés dérivés de produits d'oxydation d'acides gras insaturés et de composés diterpéniques ont pu être libérés suite au traitement par NaBH_4 . Ces substances pourraient donc, de ce fait, être issues de processus faisant intervenir des réactions croisées entre substrats.

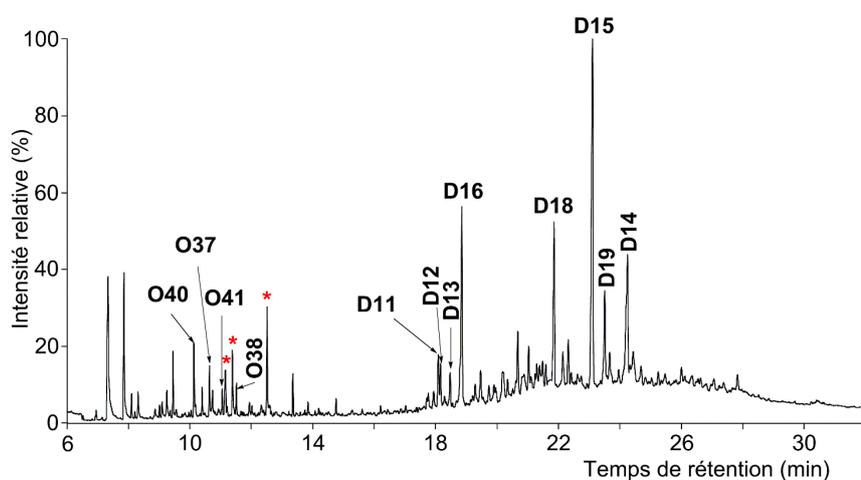


Figure 2.37 : Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de l'extrait lipidique obtenu après traitement par NaBH_4 de la fraction polaire isolée (après dérivaison avec CH_2N_2 et Ac_2O) du mélange réactionnel obtenu après autoxydation d'un mélange de résine de pin et de linoléate de méthyle pendant 48 heures. Les étoiles rouges indiquent des composés ayant une masse moléculaire impaire (dérivés du NHPI). Les structures des composés numérotés sont représentées dans l'Appendice de la thèse. Programme B de température du four GC (cf. § 6.5.2).

b.2) Etude des composés libérés des fractions polaires lors du traitement par HI/LiAlH_4

Afin d'évaluer si, en plus des liaisons de type peroxyde ou perester, d'autres liaisons comme les liaisons éthers ou esters, qui ne sont pas coupées par NaBH_4 , peuvent également jouer un rôle dans la réticulation des fractions polaires formées après autoxydation de la résine de pin et de linoléate de méthyle seuls ou en mélange, nous avons repris une aliquote des fractions polaires séparées après dérivaison (Ac_2O , CH_2N_2) des produits de dégradation par NaBH_4 (cf. Fig. 2.31) afin de les soumettre à une autre méthode de dégradation permettant de couper les liaisons éthers ou esters. Nous avons utilisé pour cela de l'acide iodhydrique (formation d'iodures à partir d'éthers) suivi de l'hydrogénolyse de ceux-ci avec LiAlH_4 (Fig. 2.38 ; Schaeffer-Reiss et al., 1998 ; Koopmans et al., 1997 ; Putschew et al., 1998).

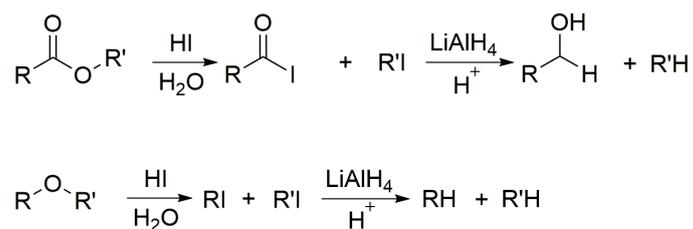


Figure 2.38 : Mode d'action du traitement HI/LiAlH₄ sur les liaisons esters et éthers.

Le traitement par HI/LiAlH₄ ainsi réalisé sur les fractions polaires obtenues après traitement par NaBH₄ des produits d'autoxydation polaires dans le cas de la résine de pin seule et du mélange résine de pin/linoléate de méthyle (Fig. 2.31), a mené principalement à la libération du diterpène **D20** (Fig. 2.39) et à un certain nombre de composés diterpéniques mineurs dont seuls les composés **D21** ont pu se voir proposer une structure sur la base de la spectrométrie de masse. Ces derniers, qui apparaissent sous la forme de deux isomères présentant des spectres de masse très semblables caractérisés par un ion à [M⁺-42] et un ion moléculaire décalé de +58 uma par rapport à celui du composé **D20**, semblent correspondre à des analogues du composé **D20** portant en plus une fonction alcool phénol acétylée. Ces deux isomères diffèrent vraisemblablement par la position de la fonction phénol sur le cycle aromatique.

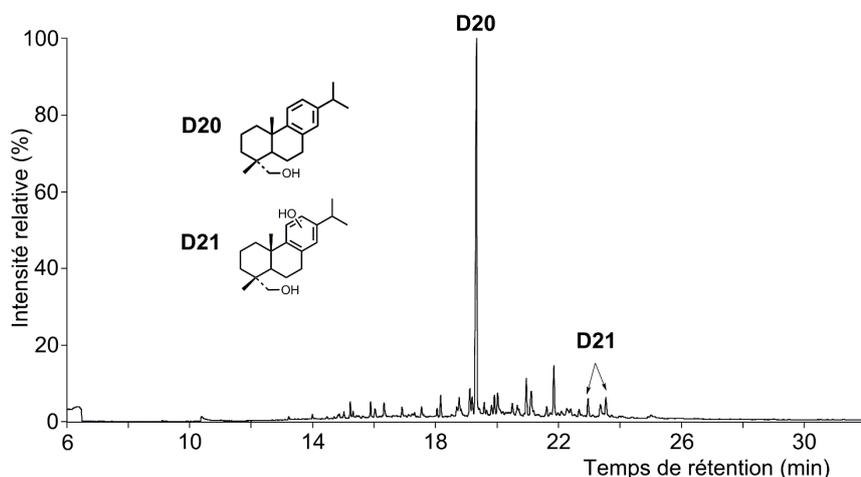


Figure 2.39 : Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de l'extrait lipidique obtenu après traitement au HI/LiAlH₄ de la fraction polaire obtenue après autoxydation pendant 48 h d'un mélange de résine de pin et de linoléate de méthyle et préalablement traitée par NaBH₄. Les fonctions alcools sont analysées sous la forme d'acétates. Les structures des composés numérotés sont représentées dans l'Appendice de la thèse. Programme B de température du four GC (cf. § 6.5.2).

Le diterpène **D20**, constituant majeur libéré, semble donc être la principale structure liée par une ou plusieurs liaisons éthers ou esters dans les constituants oligo-/polymériques issus de l'autoxydation de la résine de pin oxydée et du mélange résine de pin/linoléate de méthyle. Ce

composé est donc lié par au moins un pont éther ou ester qu'il n'est cependant pas possible de localiser précisément. En effet, la fonction alcool acétylée en C-18 peut être issue de la réduction d'une fonction ester liant la structure diterpénique aux constituants oligo-/polymériques issus de l'autoxydation (A, Fig. 2.40), en plus, éventuellement, d'une liaison éther (B, Fig. 2.40). Elle peut cependant également provenir de la réduction de la fonction ester méthylique formée par la méthylation par le diazométhane de la fonction acide libre d'une sous-unité déhydroabiétique liée, par ailleurs, par une liaison C-O d'éther ou d'ester (partie acyle de l'ester) au niveau d'une autre position du squelette (C, D, Fig. 2.40). La localisation de ces liaisons C-O sur le squelette des structures diterpéniques obtenues après dégradation est cependant impossible. En effet, dans le cas de ces liaisons, le traitement par HI/LiAlH₄ mène au remplacement des liaisons C-O par des liaisons C-H (cf Fig. 2.38 et Fig. 2.40). Malgré cela, il ne semble pas déraisonnable de proposer, outre une liaison ester en C-18 (A, B, Fig. 2.40), l'implication également de liaisons C-O d'éthers ou d'esters (partie acyle de l'ester) sur les positions C-7 et C-15 (B, C, D, Fig. 2.40). Ces positions sont en effet les plus sensibles face à l'autoxydation (Van den Berg et al., 2000 ; Colombini et al., 2005a), et ont également montré leur importance dans les liaisons peroxydes impliquées dans la réticulation des constituants oligo-/polymériques issus de l'autoxydation de la résine de pin et du mélange résine de pin/linoléate de méthyle (cf. § 2.5.5.b.1). Une illustration du mode de liaison des sous-unités diterpéniques à l'origine du composé **D20** formé après traitement par HI/LiAlH₄ dans une structure oligo-/polymérique est proposée en figure 2.40.

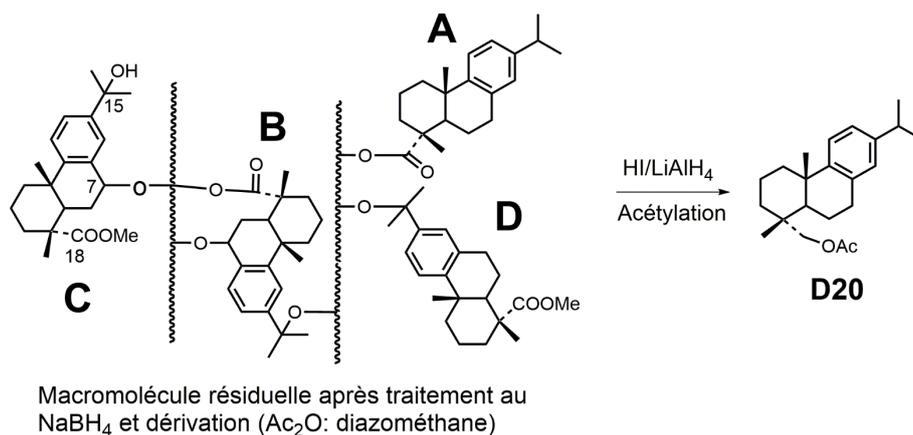


Figure 2.40 : Mode de liaison dans une structure oligomérique/macromoléculaire formée par autoxydation d'un mélange de linoléate de méthyle et de résine de pin du composé **D20** obtenu par réduction au HI/LiAlH₄ de la fraction polaire résiduelle isolée après traitement au NaBH₄ et dérivation avec Ac₂O et CH₂N₂ d'un mélange de résine de pin sylvestre et de linoléate de méthyle **I5** soumis à 48 h d'autoxydation.

Il est remarquable que, dans le cas de l'expérience d'autoxydation du mélange résine de pin/linoléate de méthyle pendant 48 h, aucun dérivé du linoléate de méthyle n'ait été libéré lors du traitement de la fraction polaire par HI/LiAlH₄ (Fig. 2.39). Un résultat similaire a été obtenu lors de la dégradation par HI/LiAlH₄ de la fraction polaire obtenue après autoxydation du linoléate de méthyle seul pendant 48 h où aucun dérivé monomérique du linoléate de méthyle n'a été libéré. Ceci est peut-être dû au fait que les produits d'autoxydation du linoléate de méthyle sont liés par des liaisons trop nombreuses ou de natures différentes (C-C) qui n'ont pu être toutes coupées dans les conditions réactionnelles mises en œuvre.

2.6. Conclusion

Les travaux sur l'autoxydation artificielle de différentes substances organiques ont permis d'atteindre un certain nombre d'objectifs dans la compréhension des mécanismes d'autoxydation que peuvent subir les substances organiques trouvées en contexte archéologique.

Ainsi, une première approche nous a conduit à tester la validité du couple NHPI/Co(acac)₂ pour reproduire aussi justement que possible et de manière accélérée en laboratoire les effets des processus d'autoxydation « naturelle ». Nous avons pu observer que tel était le cas avec les terpènes issus de l'huile essentielle de cèdre de l'Atlas, dont l'autoxydation en laboratoire a conduit à l'obtention de produits d'oxydation identiques à ceux identifiés dans le cas d'une substance archéologique (« Cedrium ») constituée de ce même ingrédient.

Dans une seconde partie, ce protocole d'autoxydation en laboratoire a été appliqué à des substances susceptibles d'avoir été utilisées en contexte archéologique : des dérivés d'acides gras insaturés, une huile essentielle de conifère et une résine de conifère, utilisés seuls ou en mélange. L'analyse des composés de bas poids moléculaires issus de ces substances organiques après autoxydation a permis de mettre en évidence la grande diversité des produits d'oxydation pouvant être formés, et plus particulièrement ceux issus de l'altération des esters d'acides gras insaturés. De nombreuses voies de formation ont pu être ainsi proposées, permettant d'accroître notre connaissance des mécanismes d'autoxydation.

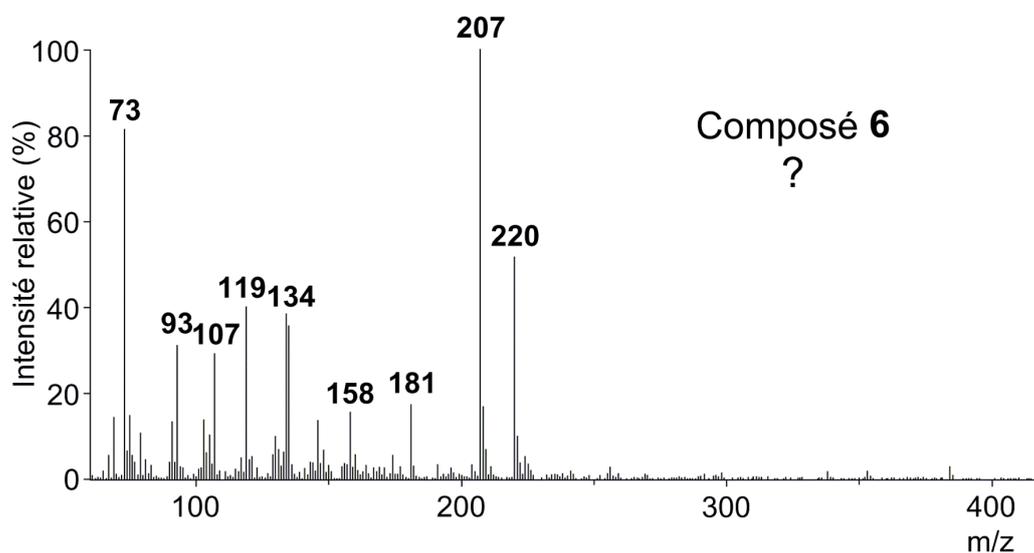
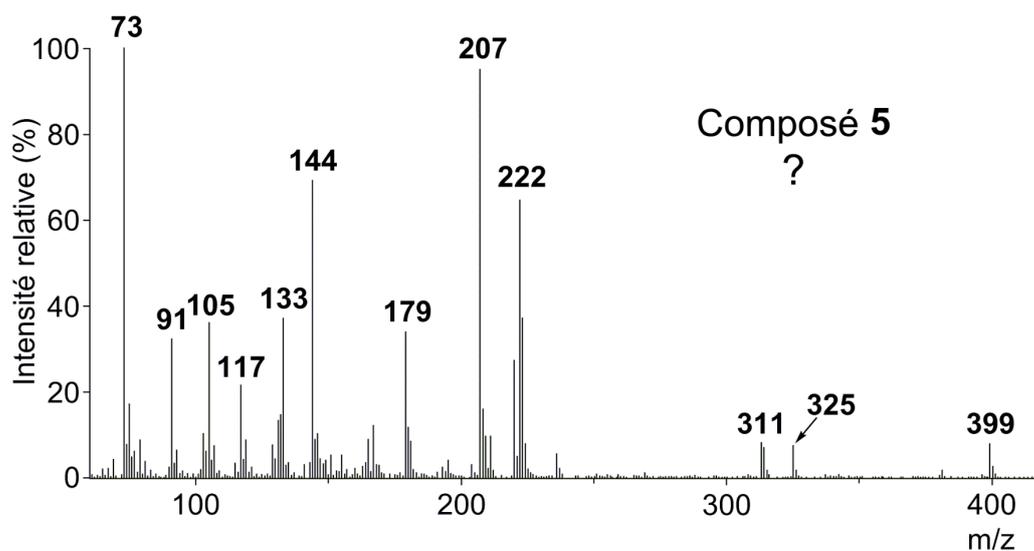
Une étude des structures formées lors d'expériences d'autoxydation mettant en jeu des dérivés insaturés d'acides gras et des composés terpéniques seuls ou en mélange et susceptibles de comprendre des espèces oligo-/polymériques a également été réalisée à l'aide de réactions de dégradation chimique. L'objectif de ces travaux était, notamment, de mettre en évidence la

formation éventuelle de produits de réactions croisées entre substrats. Ainsi, notamment, le traitement des fractions polaires formées lors d'expériences d'autoxydation d'un mélange de linoléate de méthyle et de résine de pin sylvestre par NaBH_4 (un réactif capable de couper les liaisons peroxydes) a conduit à la libération de structures issues de l'oxydation de composés diterpéniques et de dérivés d'acides gras insaturés vraisemblablement incluses dans des constituants oligo-/polymériques de ces fractions polaires auxquelles elles sont liées par des ponts peroxydes. Enfin, l'application, en séquence, d'une réaction de dégradation des liaisons éther/ester (HI/LiAlH_4) sur les résidus obtenus après dégradation des peroxydes par NaBH_4 a conduit exclusivement à la libération de dérivés terpéniques, mais pas à celle de composés dérivés d'acides gras insaturés. Ceci est peut-être dû au fait que ces derniers sont liés par des liaisons trop nombreuses ou qui n'ont pu être toutes coupées avec les réactifs utilisés.

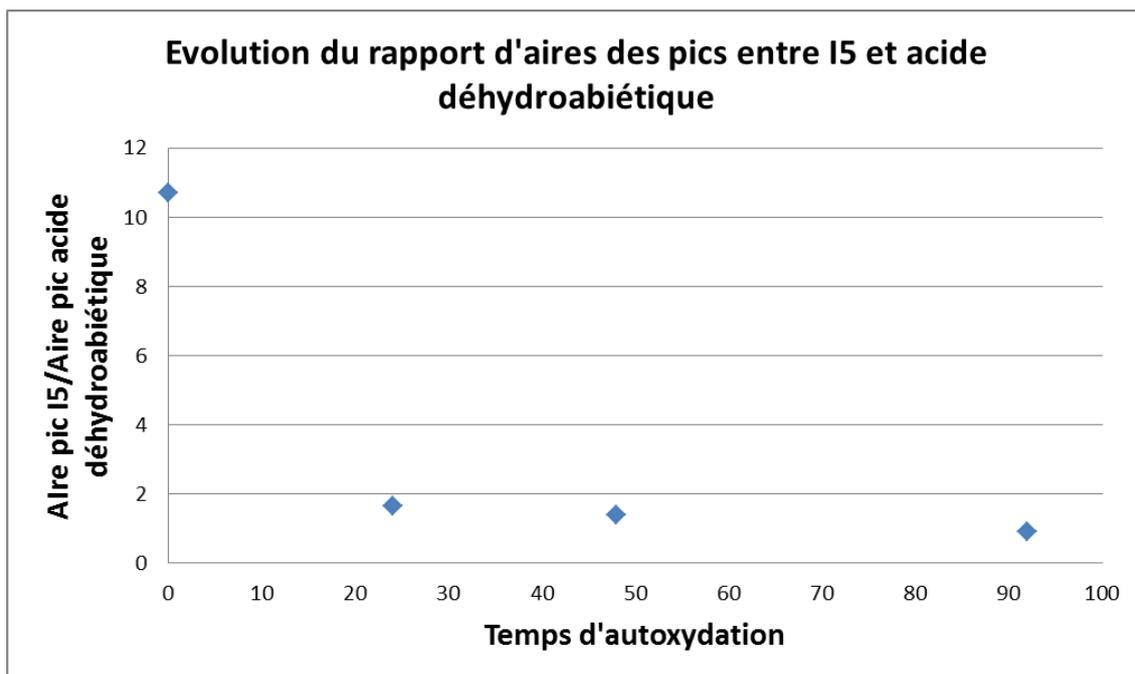
Les résultats obtenus montrent donc que les fractions polaires formées par autoxydation de substances naturelles en mélange sont constituées en partie par des constituants oligo-/polymériques réticulés par des ponts peroxyde, éther et ester qui peuvent résulter, au moins partiellement, de réactions croisées entre substrats et que ces constituants recèlent donc une information moléculaire concernant les substrats mis en œuvre qui peut être révélée à l'aide de réactions de dégradation chimique.

L'ensemble de ces travaux sur la dégradation de macromolécules nous a montré également le potentiel de l'analyse par dégradation chimique sélective des structures macromoléculaires trouvées en contexte archéologique. Ces structures macromoléculaires peuvent constituer, en effet, une part non négligeable des matériaux organiques archéologiques, même altérés par des processus oxydants, et peuvent receler une information moléculaire concernant les substances naturelles originelles mises en œuvre et dont les marqueurs moléculaires caractéristiques ont éventuellement été perdus lors du vieillissement au cours du temps en raison de leur volatilité ou de leur sensibilité aux processus d'altération. Il s'agira donc, par la suite, de compléter cette approche par l'application de ce protocole de dégradation séquentielle dans le cas d'échantillons archéologiques.

ANNEXES DU CHAPITRE 2



Annexe 2.1 : Spectres de masse (IE, 70 eV) des composés inconnus 5 et 6 présents dans l'extrait lipidique du mélange entre huile essentielle de baies de genévrier et linoléate de méthyle oxydé pendant 20 h. Les alcools sont analysés sous forme d'éthers de triméthylsilyle et les acides sous forme d'esters méthyliques.



Annexe 2.2 : Evolution du rapport des aires des pics du linoléate de méthyle I5 et de l'acide déhydroabiétique D4 en fonction du temps d'autoxydation

ARTICLE SCIENTIFIQUE

Journal of Archaeological Science: Reports 14 (2017) 420–431



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Archaeological Science: Reports

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jasrep



Organic substances from Egyptian jars of the Early Dynastic period (3100–2700 BCE): Mode of preparation, alteration processes and botanical (re)assessment of “cedrium”



Mathilde Sarret^a, Pierre Adam^{a,*}, Philippe Schaeffer^a, Quentin Ebert^a, Julien Perthuisson^a, Geneviève Pierrat-Bonnefois^b

^a Université de Strasbourg, CNRS, Institut de Chimie de Strasbourg UMR 7177, F-67000 Strasbourg, France

^b Département des Antiquités Égyptiennes, Musée du Louvre, F-75058 Paris, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Ancient Egypt
Sesquiterpenoids
Cedar
Juniper
Oxidation
Archaeometry
Cedrium

ABSTRACT

Organic substances from three jars found at Abydos in the tombs of Kings from the two first Egyptian dynasties (3100–2700 BCE) were investigated using gas chromatography–mass spectrometry in order to assess their biological origin, use and mode of preparation. The organic material was found to correspond to essential oils from conifers severely altered/oxidized. A predominant contribution from *Cedrus libani* was determined from the identification of sesquiterpenoid derivatives of the himachalene series which constitute new molecular tools for the identification of ancient oils made from real cedars. The presence of cuparene-related terpenoids suggests an additional contribution of members from the Cupressaceae family (junipers, cypresses). The genuine substances were most likely prepared in the Levant since neither *C. libani* nor junipers or cypresses are native from Egypt. Despite obvious analogies with “cedrium” used for embalming during later periods, their use as ingredients for embalming remains uncertain because true embalming only began in Egypt after 2500 BCE. Instead, it is proposed that these substances have been used as cosmetics, medicinal substances or for cultural purposes. The predominance of low molecular weight sesquiterpenoids and the absence of typical markers for wood tars indicate that the substances have possibly been prepared by steam-distillation of odiferous plant material rather than by pyrolysis. Our study gives clues to the controversy concerning the composition of “cedrium”, indicating that it most likely originates from mixed true cedar and junipers or cypresses, and not exclusively from real cedar vs. juniper oil.

1. Introduction

Archaeological excavations of the tombs of Kings from the two first Egyptian dynasties (3100–2700 BCE) in Abydos (Egypt) in the late 19th century directed by Emile Amélineau (Amélineau, 1901, 1902, 1904) led to the discovery of a series of ceramics. Several of the jars discovered are presently located in the Louvre Museum in Paris. They were postulated having been imported from the Levant based on the typology relating them to the so-called “Abydos ware” (Hennessy and Millett, 1963; Serpico and White, 1996; Braun, 2009). Three of them, of similar typology, contain a material made of sand particles and black amorphous, resin-like, grains, likely of organic nature, of unknown origin and function. Although several hypotheses have been proposed concerning the content of this type of jars, postulated to correspond to oil, perfume or coniferous resin (Serpico and White, 1996), there is, to our knowledge, only one molecular study dedicated to the investigation of

the organic content of potteries from the same period (Serpico and White, 1996). The latter, discovered by Petrie (1901) in the tomb of Djer at Abydos, correspond to ceramics now being part of the collections of the British Museum, of the Petrie Museum of London, and of the Ashmolean Museum. The present molecular study aims at identifying the molecular composition of the resin-like material from the jars from Abydos using gas-chromatography-mass spectrometry (GC–MS), in order to assess its biological and geographical origin, as well as its use and mode of preparation. In addition, laboratory experiments involving essential oils from conifers were conducted in order to reproduce the oxidative alteration processes affecting sesquiterpenoids when exposed to air atmosphere upon ageing.

* Corresponding author.

E-mail address: padam@unistra.fr (P. Adam).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jasrep.2017.06.021>

Received 23 March 2017; Received in revised form 7 June 2017; Accepted 13 June 2017

Available online 21 June 2017

2352-409X/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Chapitre 3

**Analyse de dammars trouvés en contexte
maritime**

3.1. Introduction

Comme nous l'avons vu précédemment au travers des expériences de vieillissement en conditions oxydantes, la signature moléculaire de substances organiques seules ou en mélanges est altérée rapidement, que cela soit lié à la formation de produits d'oxydation par autoxydation, à la perte sélective de composés par simple évaporation ou à des réactions de polymérisation. Toutefois, ce ne sont pas là les seuls processus d'altération que peuvent subir les substances organiques archéologiques. En effet, certains processus d'altération subis par ces substances peuvent également avoir une origine microbienne (biodégradation) ou anthropique (traitement thermique, par exemple, dans le cas d'échantillons archéologiques), ou encore être liés aux conditions du milieu (milieu humide, anaérobie, ...) qui permettent une préservation plus ou moins bonne. Il convient donc pour la suite de notre étude de ne pas nous limiter aux expériences de laboratoire réalisées, et de nous intéresser également à l'étude de substances organiques archéologiques afin de trouver de nouveaux outils moléculaires non seulement pour déterminer la nature et l'origine de ces substances, mais également pour mieux comprendre la nature des processus d'altération subis par ces substances lors de leur préparation ou de leur vieillissement après leur abandon au niveau des sites où ils ont été mis au jour. Ceci passe, entre autres, par l'identification de nouveaux biomarqueurs d'altération ayant une structure suffisamment spécifique pour permettre de remonter aux lipides biologiques dont ils dérivent, lipides qui peuvent parfois être reliés à une source biologique précise mais également à un processus d'altération donné.

Dans ce chapitre sera présentée l'étude moléculaire menée sur des résines archéologiques découvertes parmi le mobilier présent dans deux épaves du XII^{ème} siècle mises au jour au large des côtes malaisiennes et indonésiennes par le Dr. Michael Flecker de l'ISEAS (Institute of Southeast Asian Studies), à Singapour. De par leur localisation, ces résines sont supposées provenir de la famille des Dipterocarpaceae dont le nom commun est dammar. L'objectif de notre étude était d'en vérifier l'origine taxonomique, mais également d'en déterminer la provenance. Outre l'identification taxonomique, le contexte d'enfouissement sédimentaire en conditions anaérobies dans lequel ont été trouvées les résines nous a permis d'étudier les effets de processus d'altération microbienne sur le contenu organique. De nombreux marqueurs moléculaires de ces processus ont ainsi été mis en évidence, parmi lesquels certains étaient inconnus. L'un d'entre eux a été partiellement identifié au cours de notre étude et peut

potentiellement être utilisé comme un nouveau biomarqueur d'altération des résines de la famille des Dipterocarpaceae.

3.2. Les résines de Dipterocarpaceae

3.2.1. La famille des Dipterocarpaceae

L'ordre des Malvales, issu de la division des angiospermes, comprend à l'heure actuelle 10 familles parmi lesquelles se trouve la grande famille tropicale des Dipterocarpaceae (The Angiosperm Phylogeny Group et al., 2016). Jusqu'à récemment, la famille des Dipterocarpaceae était divisée en trois sous-familles (Maury-Lechon et Curtet, 1998 ; Langenheim, 2003) : les Monotoideae (originaires d'Afrique et d'Amérique du sud), les Pakarainoideae (originaires d'Amérique du sud), et enfin les Dipterocarpoideae (originaires d'Asie). Depuis la mise en place de la classification APG IV (Angiosperm Phylogeny Group), les Pakarainoideae ont été transférés des Dipterocarpaceae vers les Cistaceae du même ordre (The Angiosperm Phylogeny Group et al., 2016), réduisant donc à deux sous-familles les Dipterocarpaceae. A l'heure actuelle, les Dipterocarpaceae comprennent environ 695 espèces réparties dans 16 genres (Tab. 3.1) (Maury-Lechon et Curtet, 1998 ; Gunasekara, 2004 ; Christenhusz et Byng, 2016).

Tableau 3.1 : Classement phylogénétique des genres dans la famille des Dipterocarpaceae

Sous-familles	Dipterocarpoideae	Monotoideae
Genres	Dryobalanops, Hopea, Neoblanocarpus, Parashorea, Shorea, Anisoptera, Cotylelobium, Dipterocarpus, Stemonoporus, Upuna, Vateria, Vateriopsis, Vatica	Marquesia, Monotes, Pseudomonotes

Selon les genres et les espèces, les Dipterocarpaceae correspondent à des arbustes ou à des arbres tropicaux à feuilles persistantes pouvant atteindre 40 à 70 m de haut (Burger, 2008). Fait remarquable, le record de hauteur chez les Dipterocarpaceae est attribué à un exemplaire de *Shorea faguetiana* nommé « Menara » avoisinant les 100 m de hauteur, découvert à Sabah sur

l'île de Bornéo (Malaisie). Il est également considéré comme l'un des plus grands angiospermes connus au monde (Shenkin et al., 2019).

La sous-famille des Dipterocarpoideae, la plus grande parmi les Dipterocarpaceae (plus de 470 espèces ; Langenheim, 2003), constitue une part importante des formations forestières équatoriales asiatiques. Les espèces de cette sous-famille sont distribuées dans une grande variété d'habitats s'étendant du littoral à l'intérieur des terres, de la plaine jusqu'en montagne aux environs de 1200 m d'altitude. Elles sont réparties sur une large surface géographique délimitée au nord par la chaîne de l'Himalaya et l'île de Haiman, en passant approximativement par les frontières de l'Assam, de l'Arunachal Pradesh, de la Birmanie, du Laos et du Vietnam. Cinq zones phytogéographiques sont reconnues dans lesquelles la distribution des espèces présentes varie de manière plus ou moins importante. Ces zones englobent la Malaisie, l'Indonésie, les Philippines, la Nouvelle-Guinée, la Birmanie, la Thaïlande, le Cambodge, le Laos, le Vietnam, le sud de la Chine, l'Inde, les îles Andaman-et-Nicobar, le Bangladesh, le Népal, le Sri-Lanka et les Seychelles (Maury-Lechon et Curtet, 1998).

Les Dipterocarpaceae sont exploités par les natifs notamment pour leur bois qui est réputé pour sa résistance aux attaques biologiques comme par exemple les champignons ou les bactéries (Langenheim, 2003) mais également pour leur résine. Dans cette famille, seuls les Dipterocarpoideae sont producteurs de résine, avec pour principaux genres *Shorea* (194 espèces), *Hopea* (102 espèces), *Dipterocarpus* (69 espèces), *Vatica* (65 espèces), et *Anisoptera* (11 espèces) (Langenheim, 2003 ; Burger, 2008). Dans la littérature, ces résines sont divisées en deux types (Shiva et Jantan, 1998 ; Langenheim, 2003) :

- Les oléorésines, qui sont des résines fluides composées majoritairement de sesquiterpènes volatils. Elles sont principalement produites par les genres *Dipterocarpus* et *Anisoptera*. A titre d'exemple, *D. alatus* produit une résine composée à 71,6% d'une « huile volatile » (Shiva et Jantan, 1998).

- Les dammars, qui correspondent à une résine dure, solide ou cassante principalement composée de triterpènes.

Outre cette définition du terme dammar, ce même mot signifiant « résine » en Malais a également été utilisé pour désigner les résines de plantes provenant des tropiques asiatiques (Langenheim, 2003 ; Burger, 2008). Ainsi ont été appelées dammars des résines provenant des familles des Dipterocarpaceae, des Burseraceae et des Araucariaceae, ce qui conduit à une grande confusion terminologique dans de nombreux écrits (Langenheim, 2003 ; Burger, 2008).

Dans la présente thèse, le terme dammar sera utilisé pour désigner toutes les résines produites par la famille des Dipterocarpaceae.

3.2.2. *Le gemmage du dammar*

La récolte de résine est généralement faite par gemmage de l'arbre (« tapping » en anglais). Elle ne se pratique que sur quelques espèces de Dipterocarpaceae (par exemple : *D. turbinatus*, *H. odorata*, *S. robusta*, *V. indica*), les autres étant peu rentables en quantité de résine produite (Shiva and Jantan, 1998). Cette technique consiste à blesser l'arbre par incision du tronc afin que la résine exsude, puis à la récolter et enfin à raviver la plaie. En fonction des régions, cette pratique diffère quelque peu (méthode d'exsudation du dammar, saison de récolte).

A Sumatra, la première incision de l'arbre se fait quand le tronc fait approximativement 25 cm de diamètre à hauteur de poitrine (arbre d'environ 20 ans), et se pratique ensuite pendant 30 ans. Les incisions ont au début une forme triangulaire (Fig. 3.1), devenant circulaire avec le temps et sont disposées en rangées verticales. Ces rangées sont réalisées de manière à permettre aux gemmeurs de grimper et de continuer à inciser le tronc à la verticale (Fig. 3.1). Ainsi, pour un arbre de 30-35 m, 5 séries de 11 incisions ont pu être observées. La résine est récoltée au minimum une fois par mois, et, à cette occasion, les blessures sont ravivées. Après quelques années de gemmage, certaines incisions atteignent le centre du tronc, auquel cas celles-ci sont abandonnées, remplies de terre et d'autres sont réalisées à proximité. A noter que la production de résine diminue grandement (environ 50%) pendant la saison de floraison et de fructification. Avec cette technique, jusqu'à 48 kg de dammar peuvent être récoltés en une saison pour un seul arbre (Torquebiau, 1984).

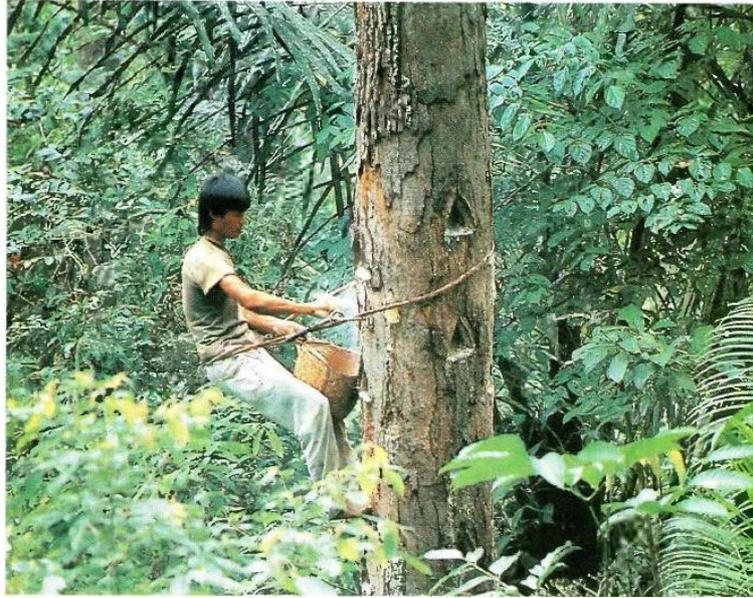


Figure 3.1 : Gemmeur récoltant du dammar, Sumatra, Indonésie (source photographique : H. de Foresta ; Coppen, 1995)

En Inde, la méthode traditionnelle consiste à faire des incisions verticales à la base du tronc et à appliquer à proximité directe un feu afin de stimuler le flux de résine (Shiva et Jantan, 1998 ; Langenheim, 2003).

Au Bangladesh, le gemmage consiste à blesser l'arbre et à placer dans la blessure du charbon incandescent durant la nuit. Le dammar fraîchement exsudé est récupéré dans la matinée et de nouveaux charbons incandescents sont placés. Généralement, 3 ou 4 incisions de ce type sont réalisées, entraînant généralement la mort prématurée de l'arbre (Shiva et Jantan, 1998).

En Birmanie, 2-3 blessures profondes de forme triangulaire sont réalisées à la base du tronc, puis un feu est allumé. Le dammar est ensuite récolté tous les 3 ou 4 jours, et un nouveau feu est appliqué systématiquement après chaque récolte. Les blessures, quant à elles, sont rafraîchies 3 ou 4 fois au courant de la saison (Shiva et Jantan, 1998).

3.2.3. Utilisation du dammar

La résine de dammar est exploitée pour ses propriétés adhésives, hydrophobes et médicinales. Elle est notamment utilisée en médecine traditionnelle pour son effet diurétique et contre les infections cutanées, dans la confection de torches, pour l'étanchéification des navires, et plus récemment comme vernis pictural (première utilisation en Europe par Lucanus en 1829) (Torquebiau, 1984 ; Coppen, 1995 ; Shiva et Jantan, 1998 ; Van der Doelen et al., 1998b ;

Langenheim, 2003). Ce panel d'utilisations variées explique la fréquence des découvertes archéologiques de dammars en Asie (Burger, 2008 ; Burger et al., 2009, 2010).

3.3. Présentation des échantillons étudiés³

3.3.1. Présentation des épaves

Deux épaves nommées « Flying Fish » et « Lingga » ont été mises au jour par le Dr Michael Flecker de l'ISEAS et son équipe en Asie du Sud-Est. Ces deux navires ont été construits selon la méthode du « lashed-lug ». Elle consiste, pour former la coque d'un navire, en l'utilisation de chevilles en bois pour fixer ensemble les bords des planches en bois, tandis que des cordages en fibre végétale sont utilisés pour attacher les planches sur la carlingue du navire (Heng, 2018).

a) L'épave du Flying Fish

Le navire « Flying Fish » a été construit à Java en Indonésie et s'est échoué au large de Sabah en Malaisie. Le contenu du navire trouvé sur place consiste principalement en des céramiques (Fig. 3.2), du fer forgé et de la fonte. D'après les informations fournies par le Dr Flecker, le navire chargeait sa cargaison probablement à Quanzhou en Chine, puis se rendait à Bornéo en passant par l'Est des Philippines. Son port d'attache à Bornéo était probablement Brunei ou Santubong. L'épave a été datée au ¹⁴C et par l'analyse des céramiques entre 1100 et 1125 CE.

b) L'épave du Lingga

Le navire nommé Lingga, quant à lui, s'est échoué au Nord-Ouest des îles Lingga. Le navire chargeait sa cargaison à Guanzhou en Chine et se dirigeait ensuite vers Riau en Indonésie. Comme pour le Flying Fish, sa cargaison comprend des céramiques (Fig. 3.2), du fer forgé et de la fonte. Grâce à une date peinte en caractères chinois sur un bol de Xicun, l'épave a pu être datée très précisément de 1111 CE.

³ D'après les informations transmises par le Dr Michael Flecker lors d'un échange d'e-mails. Les travaux archéologiques effectués sur ces épaves n'ont pas encore été publiés.



Figure 3.2 : Céramiques trouvées dans les cargaisons des deux épaves. A gauche : Flying Fish, à droite : Lingga (source des photographies : Dr Michael Flecker).

3.3.2. Les résines trouvées dans les épaves

Dans les deux cas, les résines trouvées dans les épaves consistent en un seul bloc d'une dizaine de cm de long (Fig. 3.3). De par cette quantité peu importante au regard d'autres découvertes (Lambert et al., 2017), les archéologues ont supposé que ces résines étaient utilisées pour la maintenance du navire plutôt que pour le commerce de résine. Du fait de l'origine géographique de leur découverte et des trajets déduits des deux navires, les résines ont été supposées correspondre à du dammar, avec toutefois une incertitude quant à leur origine géographique. Dans le cadre des travaux effectués au laboratoire, il s'est agi de confirmer l'origine taxonomique de ces résines, mais également de tenter de déterminer leur provenance probable.



Figure 3.3 : Résines trouvées dans les cargaisons des deux épaves. A gauche : Flying Fish, à droite : Lingga (source des photographies : Dr Michael Flecker).

3.4. Résultats

3.4.1. Etude du contenu lipidique de la résine du Flying Fish

L'analyse par GC-MS de l'extrait lipidique de la résine du Flying Fish après purification en suivant le protocole décrit dans la partie expérimentale (cf. § 6.1.2) a permis de mettre en évidence un mélange complexe de terpènes se répartissant en deux zones sur le chromatogramme (Fig. 3.4a). La première, correspondant aux composés possédant un temps de rétention court, comprend des sesquiterpènes et des *des-A*-triterpènes, tandis que la seconde est composée exclusivement de triterpènes élués plus tardivement (Fig. 3.4a).

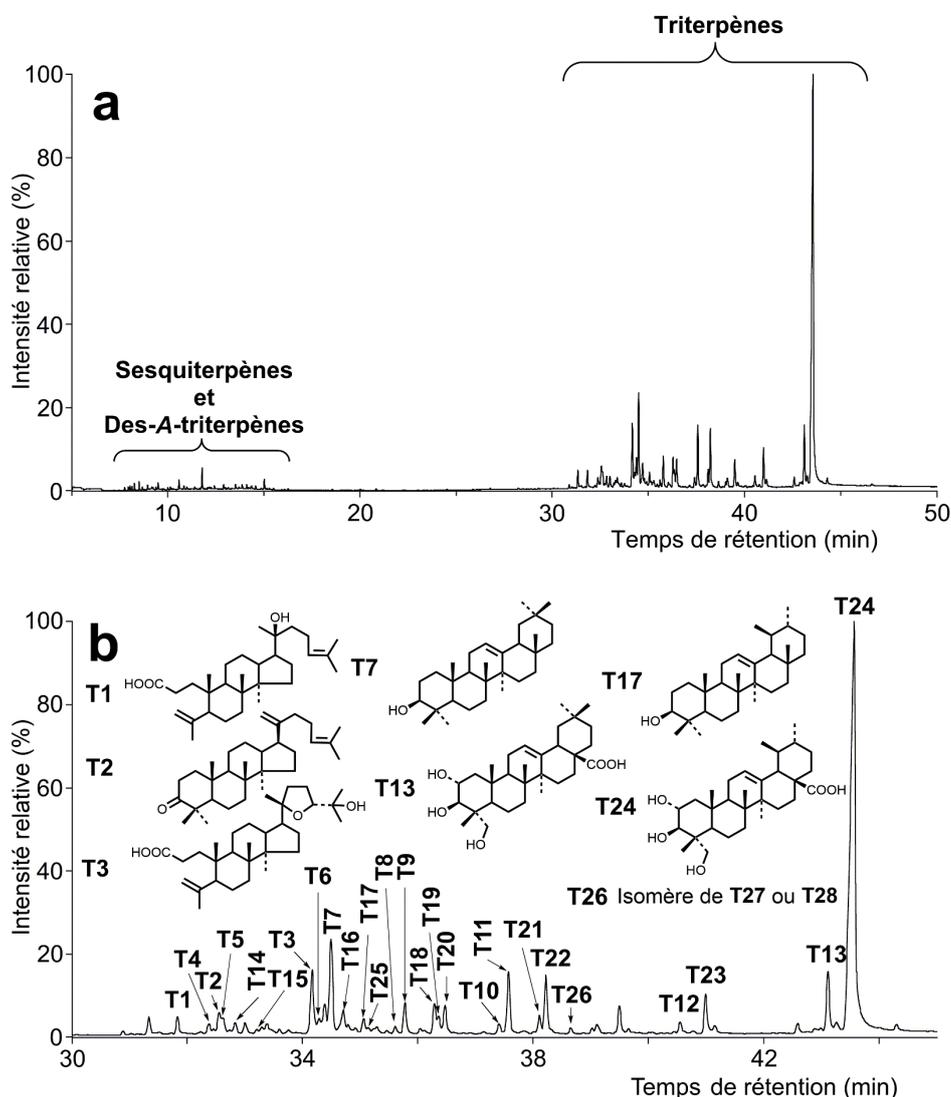


Figure 3.4 : Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de l'extrait lipidique obtenu à partir de la résine du Flying Fish. (a) vue d'ensemble, (b) zoom centré sur les composés triterpéniques élués au-delà de 30 min. Les alcools sont analysés sous la forme d'acétates et les acides sous la forme d'esters méthyliques. Les structures des composés numérotés sont représentées dans l'Appendice de la thèse. Programme B de température du four GC (cf. § 6.5.2).

a) Composés triterpéniques en C₃₀

L'examen des spectres de masse des composés triterpéniques élués au-delà de 30 minutes en GC et leur comparaison avec des données disponibles dans la littérature (e.g., Budzikiewicz et al., 1963 ; Sakakibara et Kaiya, 1983 ; Diallo et al., 1989 ; Van der Doelen et al., 1998a, 1998b ; Van der Doelen, 1999 ; Sandison et al., 2003 ; Burger, 2008 ; Dutta et al., 2009, 2014 ; Mallick et al., 2014 ; Bonaduce et al., 2016) et les spectres de masse de la bibliothèque NIST Wiley ont conduit à l'identification de triterpènes des familles du dammarane (**T1-T3**), de l'oléanane (**T4-T13**) et de l'ursane (**T14-T24**) avec quelques traces de composés de la série du lupane (**T25**) (Fig. 3.4b). L'association de ces trois premières familles a été présentée dans la littérature comme étant une caractéristique des résines de Dipterocarpaceae, confirmant donc l'hypothèse de départ et identifiant cette résine comme étant du dammar (Van der Doelen, 1999 ; Burger, 2008).

Parmi les autres molécules identifiées, le triterpène **T26** n'appartient à aucune des familles citées précédemment. De par son spectre de masse dominé par les ions m/z 437 et m/z 497 et avec un ion moléculaire à m/z 512, celui-ci pourrait s'apparenter à l'acide masticadiénolique **T27** ou isomasticadiénolique **T28** (sous forme acétylée) (Fig. 3.5) comme l'atteste son spectre de masse presque identique aux spectres de masse des composés **T27** et **T28** présentés dans la littérature (Papageorgiou et al., 1997 ; Van der Doelen et al., 1998a, 1998b ; Van der Doelen, 1999 ; Assimopoulou et Papageorgiou, 2005). Toutefois, les acides **T27** et **T28** n'ont jusqu'à présent jamais été rapportés dans les dammars, et sont plus souvent rencontrés dans les mastics, une résine produite par les arbres du genre *Pistacia* de la famille des Anacardiaceae. Le mastic, comme illustré dans la Figure 3.5, se caractérise par la présence de triterpènes des séries de l'euphane (**T27-T30**), du dammarane et de l'oléanane (**T8-T10**) (Van der Doelen, 1999) et les triterpènes sont généralement dominés par les acides masticadiénolique **T29**, isomasticadiénolique **T30**, et moronique **T31**, qui constituent ainsi les principaux biomarqueurs utilisés en contexte archéologique pour l'identification des mastics (Buckley et Evershed, 2001 ; Stern et al., 2003 ; Modugno et al., 2006b ; Colombini et Modugno, 2009).

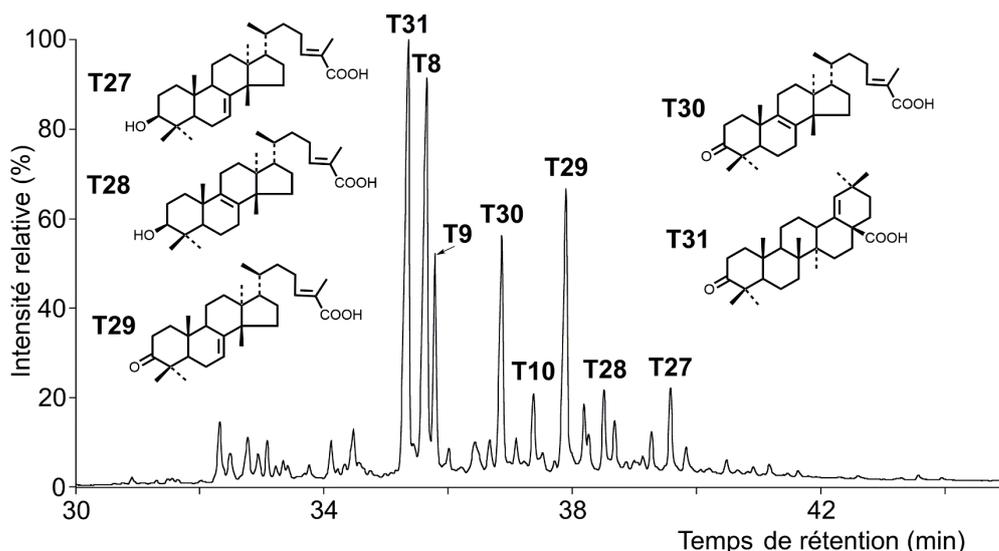


Figure 3.5 : Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de l'extrait lipidique de mastic (résine de *Pistacia lentiscus*). Les alcools sont analysés sous la forme d'acétates et les acides sous la forme d'esters méthyliques. Les structures des composés numérotés sont représentées dans l'Appendice de la thèse. Programme B de température du four GC (cf. § 6.5.2).

Pour autant, dans la résine du Flying Fish, en dehors de la présence possible d'acide masticadiénolique **T27** ou isomasticadiénolique **T28**, aucun des autres biomarqueurs caractéristiques du mastic n'a pu être mis en évidence, écartant donc la possibilité d'un mélange entre ces deux substances. Cette dernière possibilité aurait par ailleurs été peu vraisemblable si l'on considère l'origine géographique du mastic, essentiellement circumméditerranéenne. Compte tenu de ces observations, il a été décidé, afin de procéder à l'identification du triterpène **T26**, de réaliser une coinjection entre l'extrait lipidique (dérivé) d'un mastic et celui (dérivé) de la résine du Flying Fish. Elle a permis de révéler que le produit **T26** n'a pas le même temps de rétention que les acides **T27** et **T28**, bien que ces trois composés aient des spectres de masse très semblables. Il semble cependant raisonnable de proposer que ce dernier puisse correspondre à un isomère de **T27** ou **T28**. La présence d'un isomère de **T27** ou **T28** dans la résine du Flying Fish pourrait s'expliquer par l'oxydation en acide carboxylique du CH₃-27 d'un triterpène appartenant à la série de l'euphane ou du lanostane. A cet égard, il est intéressant de noter que deux composés ayant des spectres de masse très similaires à ceux du lanostérol **T32** et de l'euphol **T33** (Annexe 3.1a et b), mais avec des temps de rétention plus élevés, ont été mis en évidence à l'état de traces dans le contenu lipidique de la résine du Flying Fish (non représentés sur la Fig. 3.4b). Ces composés, correspondant peut-être à des isomères de position de la double liaison localisée au niveau de la jonction des cycles B et C, pourraient donc être les précurseurs potentiels du triterpène **T26**. Cette piste a été étudiée en réalisant une expérience

d'autoxydation de l'acétate d'euphol **T33**, mais n'a pas permis de mettre en évidence la formation d'un acide résultant de l'oxydation du CH₃-27 (Fig. 3.6) (cf. § 6.3.3).

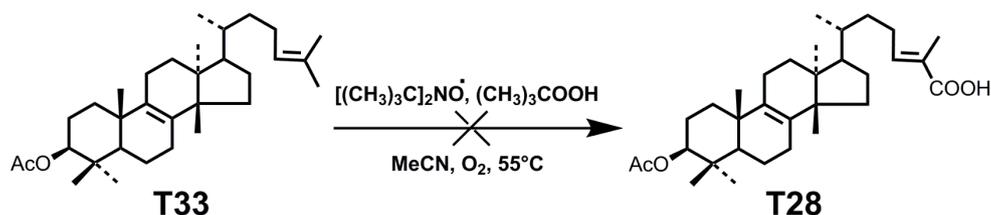


Figure 3.6 : Conditions oxydantes utilisées pour tenter de former l'acide isomasticadiénolique **T28** à partir de l'acétate d'euphol **T33**.

Outre les triterpènes des séries de l'oléanane et de l'ursane identifiés et qui sont largement répartis dans toutes les résines de Dipterocarpaceae (Burger, 2008), ceux appartenant à la série du dammarane peuvent éventuellement se montrer plus spécifiques et être plus ou moins représentés selon les espèces et les genres. C'est dans cette volonté de distinguer chimiquement les résines des différents genres de la famille des Dipterocarpaceae que des chercheurs de l'Institut de Chimie de Strasbourg et de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif-Sur-Yvette ont entrepris dans les années 60 et 70 la plus grande étude chimiotaxonomique de cette famille faite à ce jour (Bisset et al., 1966, 1967, 1971 ; Diaz et al., 1966). Ainsi, parmi les trois triterpènes de la série dammarane identifiés dans notre échantillon que sont l'acide dammarénolique **T1**, la dammaradiénone **T2** et l'acide shoréique **T3**, ce dernier n'a été jusqu'à présent détecté que dans le genre *Shorea* des Dipterocarpaceae et a été par conséquent présenté comme une particularité de ce genre (Bisset et al., 1971). Il semblerait donc que la résine du Flying Fish en soit issue mais il est néanmoins important de prendre quelques précautions par rapport à cette possibilité. En effet, si cette interprétation est effectivement valide dans le cas d'une résine fraîche, dans le cas d'une résine ayant subi des processus d'altération au cours du temps, l'acide shoréique **T3** pourrait correspondre à un produit de transformation d'un triterpène tétracyclique de la famille du dammarane et non à un produit natif de la résine. En effet, dans une étude menée par Colombini et al. (2000a) sur la caractérisation de vernis pictural, il a été montré que la formation par photochimie de l'acide shoréique **T3** est possible à partir de l'acide dammarénolique **T1** par cyclisation oxydante de la chaîne latérale. Comme ce dernier a été jusqu'à présent identifié dans les genres *Shorea* et *Hopea* (Mills et Werner, 1955 ; Bisset et al., 1971), la présence d'acide shoréique pourrait donc également être observée dans une résine altérée de *Hopea*, tout au moins si elle a été soumise à des conditions oxydantes.

La résine du Flying Fish, tout comme celle du Lingga, a été trouvée en milieu sédimentaire, ainsi les processus d'altération anaérobies et microbiens semblent donc devoir être prédominants par rapport aux processus photochimiques ou à l'autoxydation. Cependant, les processus d'altération de ces résines n'ont pas débuté à leur enfouissement après le naufrage du navire, mais dès la récolte des résines. Il est alors possible d'imaginer que des processus oxydants aient ainsi pu mener à la formation de l'acide shoréique **T3** à partir de l'acide dammarénolique **T1** pendant le stockage de la résine à bord des navires. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé l'analyse d'une résine d'*Hopea odorata*, qui s'est avérée avoir subi des processus d'altération par autoxydation lors de son entreposage pendant plus de 40 ans dans un bocal fermé et placé à l'abri de la lumière.

Cette analyse a révélé la présence, en plus des triterpènes naturellement présents dans la résine fraîche (**T7**, **T8**, **T10**, **T12**, **T13**, **T14**, **T19**, **T21**, **T23**, **T24**, **T34**) (eg. Van der Doelen et al., 1998 ; Van der Doelen, 1999 ; Burger, 2008 ; Burger et al., 2009, 2010), des triterpènes altérés de la série du dammarane (**T3**, **T35**-**T38**) parmi lesquels figurent l'acide shoréique **T3** et probablement un isomère de celui-ci **T35** possédant le même spectre de masse (Fig. 3.7).

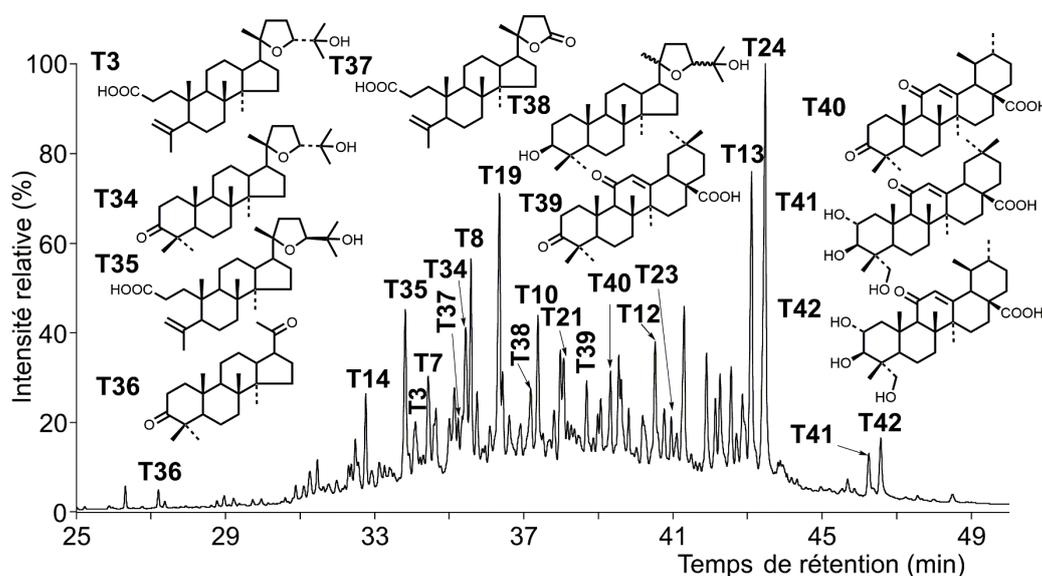
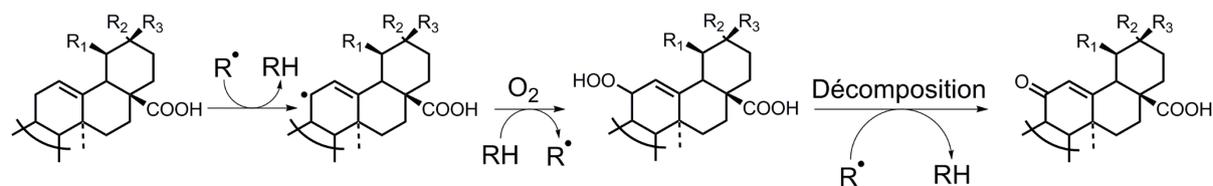


Figure 3.7 : Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de l'extrait lipidique de la résine d'*Hopea odorata* altérée. Les alcools sont analysés sous la forme d'acétates et les acides sous la forme d'esters méthyliques. Les structures des composés numérotés sont représentées dans l'Appendice de la thèse. Programme B de température du four GC (cf. § 6.5.2).

L'acide shoréique **T3** étant présent à l'état natif uniquement dans le genre *Shorea* des Dipterocarpaceae, celui identifié dans la résine d'*Hopea odorata* a donc été formé par altération. Comme dans le cas de l'étude de Colombini et al. (2000a), le précurseur probable du



Série oléanane: $R_1=H$, $R_2=CH_3$, $R_3=CH_3$

Série ursane: $R_1=CH_3$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$

Figure 3.9 : Voie de formation de cétones allyliques apparentées à l'acide oléanolique et ursolique par autoxydation.

De l'ensemble de ces observations faites à partir de la résine altérée d'*Hopea odorata*, nous pouvons déduire que l'acide shoréique **T3** présent dans la résine du Flying Fish est très vraisemblablement d'origine biosynthétique et n'a pas été formé par oxydation de l'acide dammarénolique **T1**. Effectivement, dans ce dernier cas, nous aurions dû observer la présence de l'acide eichlérianique **T35** ainsi que celle d'autres molécules oxydées appartenant aux séries de l'oléanane, de l'ursane et du dammarane, comme les triterpènes **T41** et **T42**. Toutefois, il est important de préciser que l'acide eichlérianique **T35** avait déjà été identifié dans certaines résines fraîches, comme par exemple dans le *Shorea javanica* (Poehland et al., 1987 ; Ukiya et al., 2010). Compte tenu de ces informations, il est possible de conclure que la résine du Flying Fish provient bien d'un arbre du genre *Shorea* appartenant aux Dipterocarpaceae.

b) Composés sesquiterpéniques et *des-A*-triterpéniques

En parallèle des triterpènes, des sesquiterpènes et des *des-A*-triterpènes, principalement sous la forme d'hydrocarbures, ont également été observés (Fig. 3.4a). Pour leur étude, un protocole d'extraction et de fractionnement spécifique a été utilisé afin de limiter la perte par évaporation des constituants les plus volatils (cf. § 6.3.1). Sur les quatre fractions obtenues, seule l'étude de la fraction la moins polaire F1 sera détaillée, les autres comprenant principalement les triterpènes déjà identifiés précédemment (cf. § 3.4.1.a).

L'analyse par GC-MS de la fraction F1 a ainsi permis de mettre en évidence des sesquiterpènes, des *des-A*-triterpènes mais également des dimères et trimères de sesquiterpènes (Fig. 3.10).

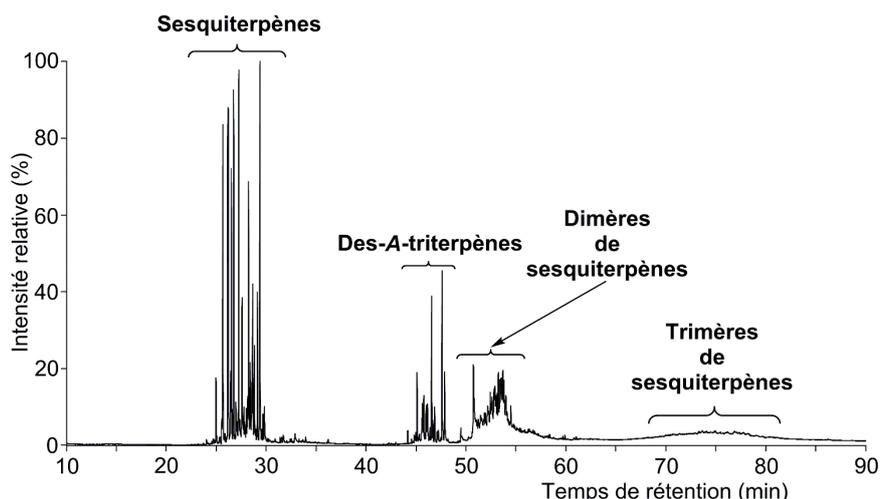


Figure 3.10 : Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire F1 obtenue à partir de la résine du Flying Fish avec le protocole d'extraction spécifique des composés volatils. Programme A de température du four GC (cf. § 6.5.2).

Les sesquiterpènes de la résine du Flying Fish ont pu être identifiés par comparaison avec la distribution des sesquiterpènes d'une huile essentielle de baies de genévrier (*Juniperus communis*) de référence, analysée en parallèle, et dont le cortège moléculaire est bien connu et détaillé dans la littérature (Vourlioti-Arapi et al., 2012). Par comparaison des spectres de masse et des temps de rétention, nous avons ainsi pu identifier un certain nombre d'hydrocarbures sesquiterpéniques (**S13-S20**) dans la résine du Flying Fish, dont l' α -copaène **S13**, le β -élémane **S14**, et le caryophyllène **S15** (Fig. 3.11). L'association de ces trois sesquiterpènes a été présentée dans la littérature comme étant une autre particularité du genre *Shorea* de la famille des Dipterocarpaceae (Bisset et al., 1971), semblant donc confirmer l'origine taxonomique déduite précédemment de la présence de l'acide shoréique **T3**. En revanche, dans des études plus anciennes, cette association avait déjà été mise en évidence dans le genre *Doona* (Diaz et al., 1966), mais également dans le genre *Cotylelobium* (Bisset et al., 1967). Cependant, depuis l'étude de Diaz et collègues en 1966, le genre *Doona* a été classé comme une section du genre *Shorea*, ce qui est compatible avec cette association de sesquiterpènes chez *Doona* (Maury-Lechon et Curtet, 1998). Le genre *Cotylelobium*, quant à lui, est toujours classé comme un genre des Dipterocarpaceae, et comprend 6 espèces réparties au Sri-Lanka, en Thaïlande, à Bornéo, et à Sumatra (Maury-Lechon et Curtet, 1998 ; Gunasekara, 2004). Il ne serait donc a priori pas exclu qu'un arbre de ce genre soit à l'origine de la résine du Flying Fish. Toutefois, à notre connaissance, le genre *Cotylelobium* ne produit pas l'acide shoréique **T3** trouvé également dans le cortège moléculaire, écartant donc cette possibilité (Bisset et al., 1967).

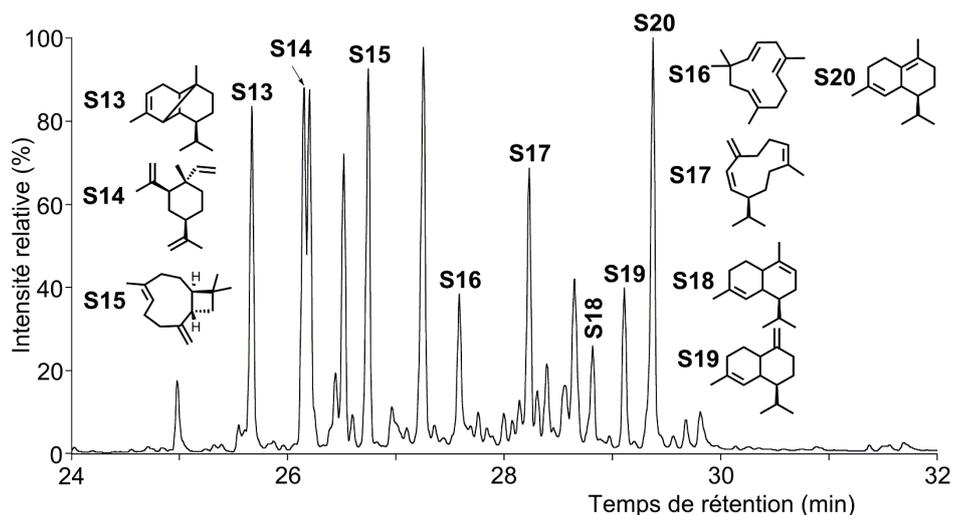


Figure 3.11 : Chromatogramme en phase gazeuse partiel (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire F1 obtenue à partir de la résine du Flying Fish centré sur les composés sesquiterpéniques (cf. Fig. 3.10). Les structures des composés numérotés sont représentées dans l'Appendice de la thèse. Programme A de température du four GC (cf. § 6.5.2).

Dans cette même fraction, des composés possédant des ions moléculaires s'échelonnant de 274 à 326 Da ont pu être identifiés comme étant des hydrocarbures tétracycliques issus de la dégradation des triterpènes grâce aux spectres de masse disponibles dans la littérature (Trendel, 1985 ; Trendel et al., 1989 ; Lohmann et al., 1990) (Fig. 3.10). Ces hydrocarbures tétracycliques, nommés *des-A*-triterpènes, font partie des nombreux produits d'altération des triterpènes oxygénés en C-3 trouvés en contexte sédimentaire. Ces derniers sont largement répartis chez les végétaux supérieurs (Pant et Rastogi, 1979 ; Das et Mahato, 1983 ; Lohmann, 1988 ; Mahato et Sen, 1997), et leur présence, ainsi que celle de leurs dérivés altérés, est considérée comme étant caractéristique de l'apport de matière organique terrestre au sédiment (Albrecht et Ourisson, 1971). Les dérivés de triterpènes oxygénés de végétaux, parmi lesquels figurent les *des-A*-triterpènes, sont issus des transformations diagénétiques se produisant dès les premiers stades de la sédimentation. L'étude de ces transformations, appréhendées notamment dans un premier temps par des travaux d'isolement et d'identification structurale de ces molécules altérées (Spyckerelle, 1975 ; Spyckerelle et al., 1977a, 1977b ; Ten Haven et al., 1992 ; Schaeffer et al. 1995b ; Borrego et al., 1997), puis par la réalisation d'expériences d'incubation à l'aide de précurseurs radioactifs dans des sédiments (Trendel, 1985 ; Lohmann, 1988 ; Lohmann et al., 1990), a permis de mettre en évidence que ces processus se divisent en trois grandes voies de dégradation et que toutes sont liées à l'influence prépondérante des microorganismes présents dans les sédiments. Ainsi, un schéma hypothétique illustrant les trois

principaux modes de transformation des triterpènes oxygénés en C-3 a pu être proposé (Fig. 3.12) :

- Aromatisations successives du cycle A vers le cycle E donnant lieu à la formation des hydrocarbures pentacycliques mono à penta aromatiques (Trendel, 1985 ; Ries-Kautt, 1986 ; Lohmann, 1988 ; Wolff et al. 1989 ; Lohmann et al., 1990 ; Stout, 1992).
- Perte du cycle A éventuellement suivie d'une aromatisation progressive du cycle B à D menant aux *des-A*-triterpènes (Trendel, 1985 ; Ries-Kautt, 1986 ; Lohmann, 1988 ; Trendel et al., 1989 ; Wolff et al. 1989 ; Lohmann et al., 1990 ; Stout, 1992).
- Ouverture du cycle A conduisant à la formation d'acides de type seco-triterpènes, qui, par des transformations ultérieures, peuvent mener à la formation des *des-A*-triterpènes (Trendel, 1985 ; Ries-Kautt, 1986 ; Lohmann, 1988 ; Lohmann et al., 1990).

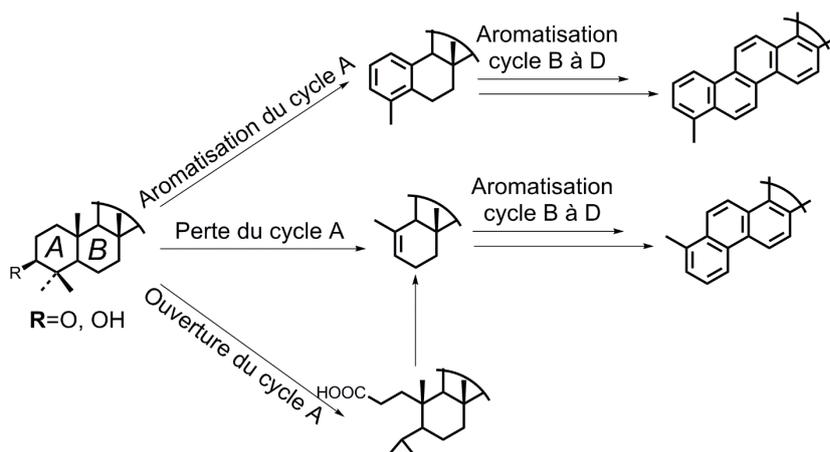


Figure 3.12 : Schéma hypothétique de dégradation des triterpènes de végétaux oxygénés en C-3 (Trendel, 1985)

Les *des-A*-triterpènes **A1-A5** identifiés dans la résine du Flying Fish (Fig. 3.13) révèlent clairement que cette résine a subi des processus diagénétiques microbiens en conditions anoxiques dans le contexte sédimentaire subaquatique où elle a été trouvée. Ces molécules appartiennent aux séries de l'oléanane et de l'ursane avec des degrés d'aromatisation plus ou moins importants (Fig. 3.13). Les précurseurs de ces deux séries appartiennent aux familles de l' α et de la β -amyrine (**T17** et **T7**), des triterpènes de végétaux particulièrement représentés chez les angiospermes (Xu et al., 2004) qui, par perte du cycle A, vont mener aux *des-A*-

triterpènes **A1** et **A2** puis, par aromatisations successives, aux dérivés di-aromatiques **A3** et **A4** et à un composé tri-aromatique **A5** dans le cas de la série de l'oléanane (Fig. 3.14).

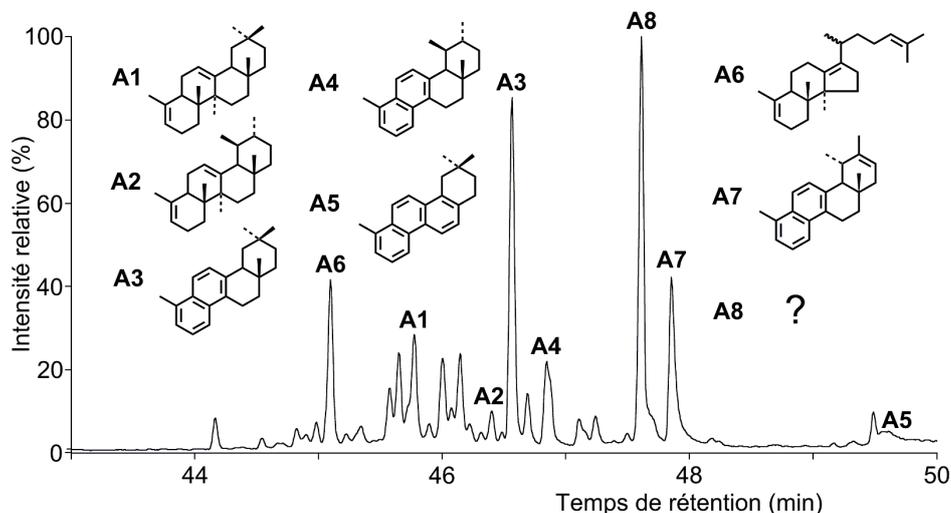


Figure 3.13 : Chromatogramme en phase gazeuse partiel (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire **F1** obtenue à partir de la résine du Flying Fish centré sur les *des-A*-triterpènes (cf. Fig. 3.10). Les structures des composés numérotés sont représentées dans l'Appendice de la thèse. Programme A de température du four GC (cf. § 6.5.2).

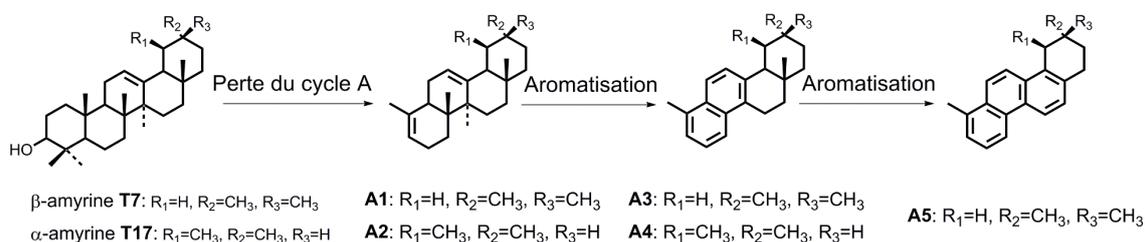


Figure 3.14 : Processus diagenétiques microbiens conduisant de l' α et de la β amyryne aux *des-A*-triterpènes **A1-A5**.

Parmi les composés présents dans la distribution présentée sur la figure 3.13, trois composés majeurs **A6-A8**, dont les spectres de masse sont représentés sur la figure 3.15, n'ont pas pu être identifiés sur la base des données disponibles dans la littérature. Ces composés, correspondant très probablement à des *des-A*-triterpènes, pourraient potentiellement représenter des marqueurs diagenétiques spécifiques des résines de Dipterocarpaceae et ainsi être utilisés comme marqueurs d'altération de ces résines en conditions anaérobies. C'est pourquoi nous avons cherché à les identifier.

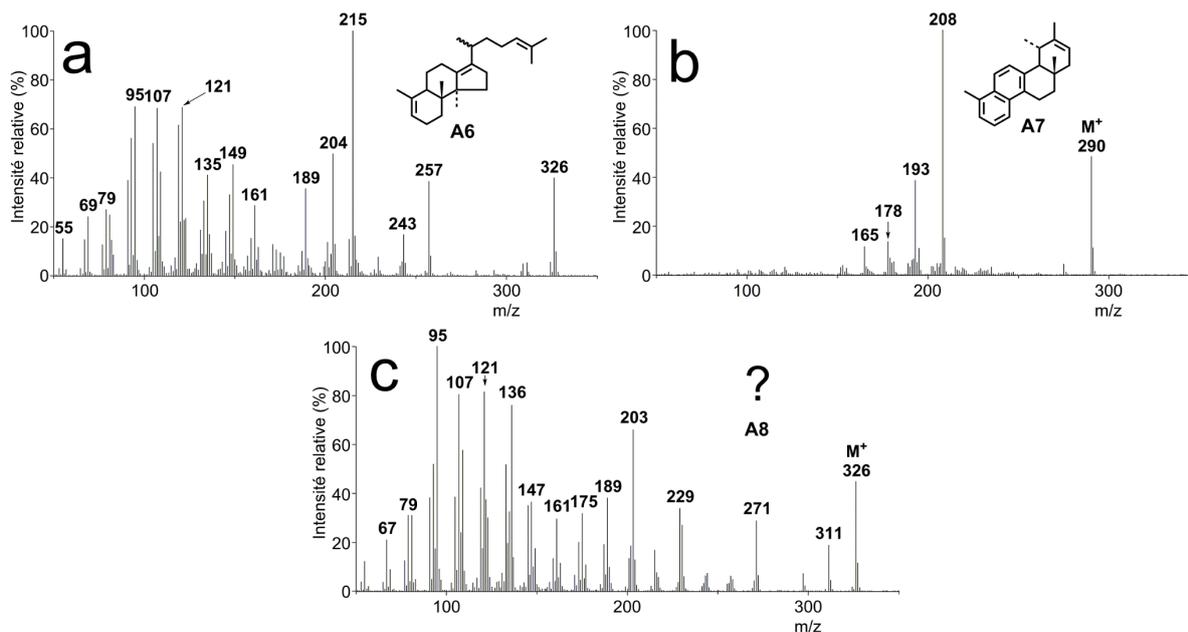


Figure 3.15 : Spectres de masse (IE, 70 eV) des composés inconnus (a) A6, (b) A7 et (c) A8 avec leurs structures supposées. Aucune structure n'a pu être proposée pour le composé A8.

Pour mener à bien cette étude, un fractionnement fin de l'extrait lipidique brut de la résine du Flying Fish par chromatographie sur colonne a été réalisé afin d'obtenir des fractions enrichies en ces composés inconnus (cf. § 6.3.2.a). Les fractions F₃, F₆, et F_{11.1} ainsi obtenues contiennent, respectivement, les produits **A8**, **A6** et **A7** concentrés. Les quantités potentiellement disponibles se sont cependant avérées insuffisantes pour espérer pouvoir isoler suffisamment de chacun des produits à l'aide de fractionnements ultérieurs (par HPLC, notamment) et identifier ces composés par RMN. En effet, à partir d'environ 1 g de résine, il n'a été possible d'obtenir que 1,7 mg de fraction F₃, 0,9 mg de fraction F₆ et 7,4 mg de fraction F_{11.1}. De plus les composés d'intérêt ne représentent qu'une petite partie de ces fractions souvent dominées par les sesquiterpènes (Annexe 3.2). Il aurait ainsi été nécessaire de disposer de plusieurs dizaines de grammes de résine pour pouvoir espérer isoler suffisamment de ces composés inconnus pour en faire l'étude par RMN. C'est pourquoi nous avons adopté une autre approche pour obtenir des informations structurales concernant ces produits inconnus. Les fractions enrichies ont ainsi été soumises à une étape d'hydrogénation catalysée avec du PtO₂ afin d'obtenir des informations concernant le nombre d'insaturations, le nombre de cycles ou la présence éventuelle d'un cycle aromatique et faciliter ainsi l'identification du squelette terpénique de ces composés (cf. § 6.3.2.b).

Le spectre de masse du composé inconnu **A6** (Fig. 3.15a), présent dans la fraction F₆, est caractérisé par un ion moléculaire à m/z 326 et un pic de base à m/z 215. Cette différence de 111 Da est caractéristique de la perte d'une chaîne latérale telle qu'on peut en trouver chez les triterpènes des séries de l'euphane, du lanostane ou du dammarane et il est en effet possible d'imaginer des structures de *des-A*-triterpénoïdes triplement insaturées appartenant à ces trois séries de triterpènes et dont la masse moléculaire serait de 326 Da. De telles hypothèses structurales sont présentées sur la figure 3.16. Chacune des structures possède une chaîne latérale insaturée pouvant rendre compte d'une fragmentation en spectrométrie de masse conduisant à la perte de 111 Da par rapport à l'ion moléculaire (m/z 326).

Dans tous les cas, une insaturation est sans doute présente en position 5(10), ceci étant lié au mécanisme de perte du cycle A des triterpènes pentacycliques (Trendel, 1985 ; Lohmann, 1988 ; Lohmann et al., 1990), et vraisemblablement aussi en position 24 comme sur les précurseurs postulés. La dernière insaturation pourrait, quant à elle, être localisée en position 7(8), 8(9) ou 9(11) pour les structures des séries du lanostane et de l'euphane, comme c'est le cas pour les triterpènes biologiques de ces deux séries, ou en position 13(17), 17(20) ou 20(21) dans le cas de la série du dammarane puisque les triterpènes biologiques de cette série possèdent une double liaison ou une fonction oxygénée sur ou à proximité de la position 20.

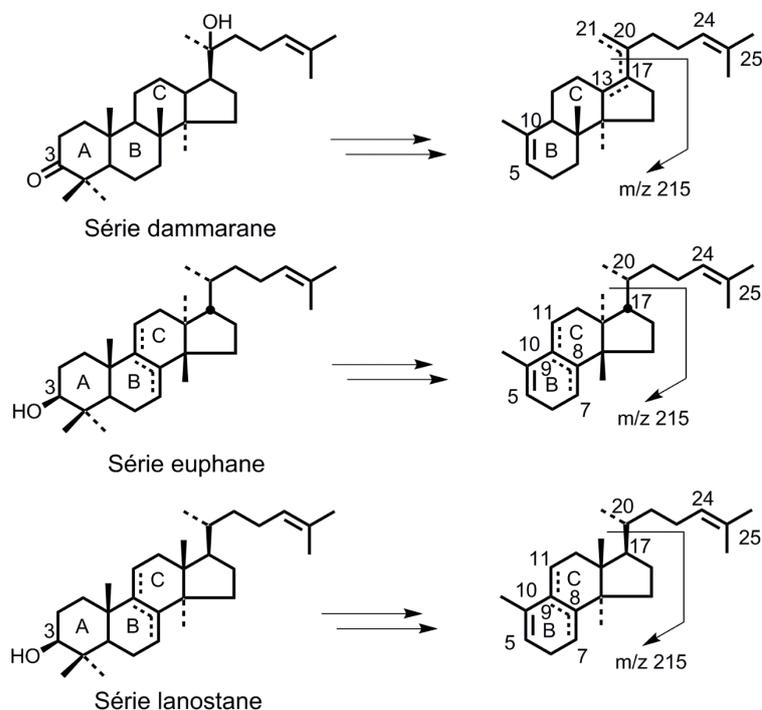


Figure 3.16 : Hypothèses de structure pour le composé A6 et triterpènes précurseurs possibles

L'hydrogénation de la structure **A6** (cf. § 6.3.2.b) a conduit à la formation de quatre isomères majeurs possédant des spectres de masse très similaires avec un ion moléculaire à m/z 330 et un pic de base à m/z 217, ainsi qu'à plusieurs autres composés avec un ion moléculaire à m/z 332 et un ion majeur à m/z 219. Ce résultat montre que le composé **A6** est en effet tricyclique et possède trois doubles liaisons. Cependant, l'une d'entre elles semble bien plus difficile à hydrogéner, sans doute en raison d'un encombrement stérique important comme ce peut être le cas pour une double liaison située au niveau de la jonction des cycles *B/C* pour les triterpénoïdes des séries de l'euphane et du lanostane (Fig. 3.16) ou en position 13(17) dans le cas des triterpénoïdes de la série du dammarane (Fig. 3.16). Par ailleurs, la perte de 113 Da entre l'ion moléculaire et le fragment principal dans les spectres de masse des produits d'hydrogénation indique que l'insaturation présente sur la chaîne latérale a bien été hydrogénée. La double liaison en position 5(10) a sans doute également été réduite de par sa localisation sur une position peu encombrée, qui la rend facilement hydrogénable.

Parmi les trois types de structures présentées sur la figure 3.16, celle basée sur la série du dammarane semble être la plus probable. En effet, les spectres de masse (IE, 70 eV) des dérivés acétylés du lanostérol **T32** et de l'euphol **T33** (Annexe 3.1) ne présentent pas de fragments correspondant à la coupure de la chaîne latérale insaturée [$M^+ - 111$], alors que le fragment [$M^+ - 113$] correspondant à la perte de la chaîne latérale observée dans le cas du spectre de masse du dammar-13(17)-ène (Meunier-Christmann et al., 1991) est prédominant et est sans doute favorisé par la localisation de la double liaison située à proximité du point d'attache de la chaîne latérale sur le squelette polycyclique. On peut en conclure que la structure **A6** correspond très probablement à un *des-A*-triterpène de la série du dammarane avec trois insaturations localisées en position 5(10), sur la chaîne latérale en 24(25) et au niveau de la jonction entre la chaîne latérale et le système tricyclique en position 20(21), 17(20) ou, plus vraisemblablement, en 13(17). Cette position de la double liaison est, en effet, très stable en série dammarane (Meunier-Christmann, 1988 ; Meunier-Christmann et al., 1991) et est compatible avec le mode de fragmentation en spectrométrie de masse (fragment intense correspondant à la perte de la chaîne latérale). Une insaturation en position 13(17) pourrait provenir de l'isomérisation d'une des insaturations en position 20 présente dans le cas de nombreux triterpènes de la série du dammarane (Connolly et Hill, 2003 ; Connolly et Hill, 2008 ; Dinda et al. 2010 ; Cao et al., 2015) ou provenir de l'isomérisation d'une double liaison issue de l'élimination d'une fonction alcool en position 20 présente au niveau de certains triterpènes de la série du dammarane comme le diptérocarpol **T43** (Connolly et Hill, 2003 ; Connolly et Hill, 2008 ; Dinda et al. 2010 ; Cao

et al., 2015). A cet égard, on peut signaler que Meunier-Christmann et al. (1991) ont utilisé cette voie pour synthétiser les dammar-13(17)-ènes 20*R* et 20*S* en partant du dammaran-20-ol.

Pour conclure, nous proposons que l'hydrocarbure **A6** peut correspondre à un *des-A* triterpène de la série du dammarane avec trois insaturations en positions 5(10), 13(17) et 24(25) comme présenté sur la figure 3.15a. Un des précurseurs probables est le diptérocarpol **T43**, un triterpène présent dans le genre *Shorea* (Bisset et al., 1971) qui, par perte du cycle *A* et migration de la double liaison formée par élimination de l'alcool en C-20 vers la position 13(17), peut mener au composé **A6** (Fig. 3.17). Ce *des-A*-triterpène, qui n'a jamais été décrit dans la littérature auparavant, constitue potentiellement un nouveau biomarqueur d'altération des résines de Dipterocarpaceae en conditions anaérobies.

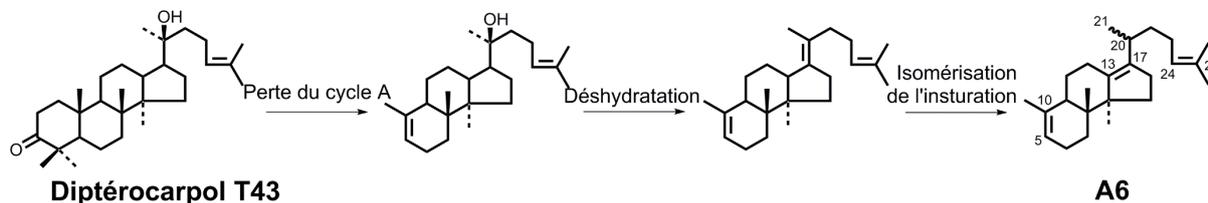


Figure 3.17 : Voie de formation possible du composé **A6** à partir du diptérocarpol **T43**

Le spectre de masse du composé **A7**, quant à lui, est caractérisé par un ion moléculaire à m/z 290 et un pic de base à m/z 208 (Fig. 3.15b), un fragment pair qui pourrait être issu d'une fragmentation de type rétro Diels-Alder (Budzikiewicz et al., 1963). La masse moléculaire de ce composé est décalée de 2 Da par rapport à celle des *des-A*-triterpénoïdes diaromatiques (**A4** et **A3**) dérivés de l' α et de la β -amyrine (**T17** et **T7**). Sur cette base, on peut proposer que le composé **A7** possède une structure di-aromatique basée sur un squelette de type ursane avec une insaturation supplémentaire en position 20(21) permettant d'expliquer la fragmentation de type rétro Diels-Alder observée. Ce composé, dont la structure hypothétique est présentée en Figure 3.15b, dériverait du ψ -taraxastérol **T18** par perte du cycle *A* en conditions anoxiques suivie par l'aromatisation des cycles *B* et *C* comme illustré dans la figure 3.14. Cette hypothèse est confortée par la mise en évidence du ψ -taraxastérol **T18** dans la résine du Flying Fish (Fig. 3.4b).

En dehors des *des-A*-triterpènes, deux massifs de composés non résolus ont été observés sur le chromatogramme de la figure 3.10, les composés constituant ces massifs affichant pour le premier un ion moléculaire à m/z 408 et un pic de base à m/z 203, et pour le second un ion moléculaire à m/z 612 et un pic de base à m/z 203. Tous deux présentent également un fragment

[M⁺-43] caractéristique de la perte d'un groupe isopropyle. A la vue de ces données, nous proposons que ces massifs non résolus correspondent à des dimères et trimères de sesquiterpènes très probablement basés sur le squelette du cadinène (Van Aarssen et al., 1990a). Ces composés correspondent à des analogues di- et trimériques des polymères de cadinène qui constituent la fraction macromoléculaire des résines de dammar (Van Aarssen et al., 1990a, 1990b, 1991, 1992 ; Murray et al., 1994). Ces polymères de cadinène ont été proposés, dans la littérature, comme étant des précurseurs des bi- et tricadinanes trouvés dans certains pétroles et sédiments anciens avec pour intermédiaires les dimères et trimères de cadinène. La formation de ces bi- et tricadinanes intervient lors de la diagénèse des résines de dammar et nécessite des températures élevées que seul l'enfouissement géologique permet d'obtenir, comme cela a été démontré lors de travaux d'expérimentation en laboratoire (Van Aarssen et al., 1991 ; Murray et al., 1994). De ce fait, la découverte de ces dimères et trimères de cadinène dans l'échantillon de résine est surprenante. On peut, en effet, se poser la question de savoir si ces di- et trimères sont des composés natifs de la résine ou si leur formation passe par des processus thermiques ayant affecté la partie macromoléculaire (polycadinènes) de la résine de dammar. Cela pourrait alors indiquer un éventuel traitement thermique de la résine lors de sa récolte ou de son conditionnement, ou pour en modifier les propriétés. Il est à noter, cependant, qu'une étude réalisée par Stout (1996) a également mis en évidence la présence de ces dimères et trimères de cadinène à l'état libre dans des résines récentes, permettant a priori d'écarter l'hypothèse d'une origine thermique des bi- et tricadinènes au profit d'une origine biosynthétique (Stout, 1996).

c) Conclusion

L'objectif principal de l'étude de la résine du Flying Fish qui consistait à en déterminer l'origine taxonomique et géographique a été atteint. En effet, la résine a pu être identifiée comme étant du dammar appartenant au genre *Shorea*, ce qui a conduit à exclure une provenance chinoise, puisque ce genre végétal est absent de cette zone géographique. En revanche, le genre *Shorea* est présent à Bornéo (Maury-Lechon et Curtet, 1998), ce qui nous amène à proposer que cette résine a été acquise lors de l'escale du navire à Brunei ou Santubong.

Outre ces identifications taxonomique et géographique, le contexte de préservation dans lequel a été trouvée la résine nous a permis d'étudier les processus d'altération des triterpènes oxygénés en position 3 par perte du cycle A en milieu anaérobie. Parmi les *des-A*-triterpènes identifiés, deux structures sont proposées pour la première fois. Ces deux composés n'ont pu être identifiés que partiellement comme étant des *des-A*-triterpènes issus respectivement d'un triterpène de la famille du diptérocarpol **T43** et du ψ -taraxastérol **T18**. Le premier peut être

considéré comme un nouveau biomarqueur d'altération des résines de Dipterocarpaceae en milieu anaérobie. Toutefois, il serait utile de confirmer les structures hypothétiques proposées soit par la synthèse de références, soit par isolement et études de RMN à partir de sources naturelles.

3.4.2. Etude du contenu lipidique de la résine du Lingga

a) Identification taxonomique

L'analyse moléculaire de la résine de l'épave du Lingga a permis de mettre en évidence les mêmes triterpènes des séries oléanane (**T7**, **T9-T13**), ursane (**T16-T18**, **T20-T24**), dammarane (**T2**) que ceux de la résine du Flying Fish avec une distribution proche de celle-ci, menant donc à son identification comme une résine de dammar (Annexe 3.3b). Il est tout de même à noter que seule la trace d'un triterpène de la série du dammarane, le dammaradiénone (**T2**), a pu être relevée dans la résine du Lingga, ce qui reste toutefois compatible avec une résine de Dipterocarpaceae. En effet, Burger (2008) avait observé que dans certaines résines de Dipterocarpaceae, seule une faible proportion de triterpènes de cette série était présente.

Outre les triterpènes, des sesquiterpènes ont également été trouvés (Annexe 3.3a), et ont fait l'objet du même protocole d'extraction et de fractionnement que celui utilisé pour l'autre échantillon afin de limiter leur perte par évaporation (cf. § 6.3.1). Dans la fraction F1 (Annexe 3.4), la même association de sesquiterpènes que celle trouvée dans la résine du Flying Fish (α -copaène **S13**, β -élémane **S14**, et caryophyllène **S15**), caractéristique des genres *Shorea* et *Cotylelobium*, a été découverte (Annexe 3.5). L'absence de l'acide shoréique **T3** parmi les triterpènes (Annexe 3.3b) ne nous permet pas d'attribuer préférentiellement la résine du Lingga au genre *Shorea* comme précédemment. Inversement, son absence ne peut être utilisée comme un critère de distinction entre ces deux genres, et ainsi relier la résine au genre *Cotylelobium*. En effet, au sein même du genre *Shorea*, toutes les espèces ne présentent pas forcément l'acide shoréique **T3**, comme par exemple certaines espèces de la section *Anthoshorea* (Bisset et al., 1971). A ce stade, il est donc impossible d'attribuer de manière certaine la résine à l'un des deux genres.

b) Triterpénoïdes aromatiques

Au-delà des sesquiterpènes observés, des marqueurs d'altération de triterpènes ont également été mis en évidence dans cette même fraction. Ces composés, ayant des masses moléculaires comprises entre 324 et 378 Da, ont été identifiés, sur la base de la GC-MS et par

comparaison avec des spectres de masse publiés (Spyckerelle, 1975 ; Saptorahardjo, 1985 ; Wolff et al. 1989 ; Jacob et al., 2007), comme étant des triterpènes tétra- et pentacycliques mono à tétra-aromatiques (Fig. 3.18). Ces composés sont donc à relier à l'altération de précurseurs triterpéniques oxygénés en C-3 par des processus microbiens en conditions anoxiques, comme nous en avons discuté dans le paragraphe 3.4.1.b (Trendel, 1985 ; Ries-Kautt, 1986 ; Lohmann, 1988 ; Wolff et al. 1989 ; Lohmann et al., 1990 ; Stout, 1992). De nombreuses études ont été menées sur ces composés étant donné la part importante que peuvent représenter ces triterpènes dans les sédiments, dans les schistes bitumeux ou dans la houille, ce qui a conduit à de nombreuses identifications moléculaires (Spyckerelle, 1975 ; Wakeham et al., 1980 ; Chaffee et Johns, 1983 ; Saptorahardjo, 1985 ; Chaffee et Fookes, 1988 ; Wolff et al., 1989 ; Loureiro et Cardoso, 1990 ; Jacob et al., 2007). Cependant, seules certaines d'entre elles ont été effectuées par synthèse de composés de référence ou par isolement des molécules en vue de leur étude structurale par RMN (e.g., Spyckerelle, 1975 ; Saptorahardjo, 1985 ; Chaffee et Fookes, 1988 ; Wolff et al. 1989).

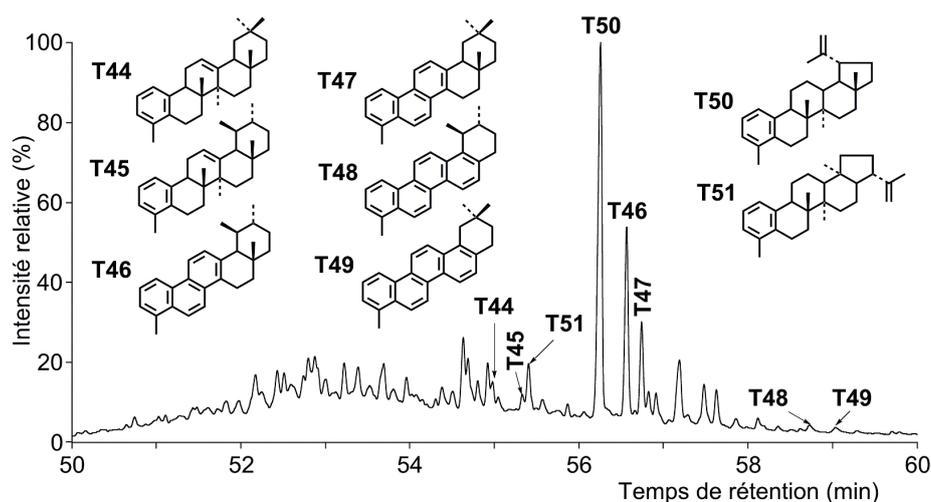


Figure 3.18 : Chromatogramme en phase gazeuse partiel (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire F1 obtenue à partir de la résine du Lingga centrée sur les triterpénoïdes aromatiques (cf. Annexe 3.4). Les structures des composés numérotés sont représentées dans l'Appendice de la thèse. Programme A de température du four GC (cf. § 6.5.2).

Les triterpènes aromatiques **T44-T49** (Fig. 3.18) de la famille de l'oléanane et de l'ursane ont pu être identifiés dans la résine du Lingga grâce aux données disponibles dans la littérature (Spyckerelle, 1975 ; Wolff et al., 1989).

Les composés **T50** et **T51** présentent des spectres de masse très similaires caractérisés par un ion moléculaire à m/z 376 et un pic de base à m/z 145 proches du spectre de masse du 24,25-dinorlupa-1,3,5(10),20(29)-tétraène identifié par Saptorahardjo (1985) (Fig. 3.18). D'après son

temps de rétention relatif par rapport à son homologue saturé **T52**, dont nous disposons de la référence synthétique (Wolff et al., 1989), nous avons pu attribuer la structure **T50** à l'isomère majeur par comparaison avec une distribution reportée dans la littérature (Saptorahardjo, 1985). Celui-ci provient très probablement de l'aromatisation du cycle A du lupéol **T25** induite par des processus microbiens en conditions anoxiques, comme décrit précédemment. Le triterpène **T51** pourrait, quant à lui, être un produit de transformation de l'hydroxyhopanone **T53** dont il dériverait par aromatisation du cycle A en conditions anoxiques suivi de la déshydratation de l'alcool localisé sur la chaîne isopropyle. Le lupéol **T25** et l'hydroxyhopanone **T53**, précurseurs des composés **T50** et **T51**, ont par ailleurs été identifiés dans les résines de dammar (Mills and Werner, 1955 ; Poehland et al., 1987 ; Burger, 2008).

c) Conclusion

Nous avons pu déterminer, d'après son contenu en sesqui- et triterpènes, que la résine transportée par le navire Lingga correspond à du dammar appartenant soit au genre *Shorea* soit au genre *Cotylelobium*. Il n'a toutefois pas été possible, sur une base moléculaire, de déterminer plus précisément de quel genre végétal la résine est issue. Tout au plus peut-on proposer que le genre *Shorea* est à l'origine de la résine du Lingga compte tenu de la diversité des espèces présentes dans le genre *Shorea* par rapport aux seules six espèces du genre *Cotylelobium*. Quoiqu'il en soit, ces deux genres sont absents de la Chine mais sont présents en Indonésie (Maury-Lechon et Curtet, 1998) et il peut donc être proposé sur ces bases que la résine du Lingga a été embarquée lors de l'escale du navire à Riau en Indonésie.

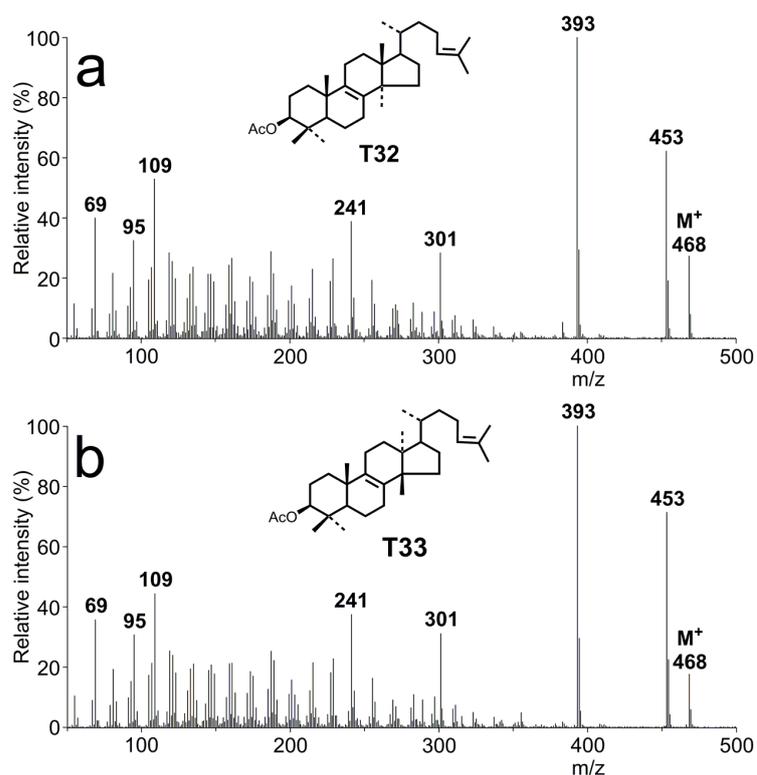
Cette résine, tout comme celle de l'épave du Flying Fish, s'est également avérée avoir subi des processus d'altération par voie microbienne en conditions anoxiques lors de son séjour dans les sédiments après le naufrage du navire. Contrairement à la résine du Flying Fish, les processus d'altération n'ont pas mené à la perte du cycle A mais simplement à l'aromatisation successive des cycles A à D des précurseurs triterpéniques oxygénés en C-3 dans le cas de la résine du Lingga. Parmi l'ensemble des structures identifiées, la structure du composé **T51** est proposée ici pour la première fois sur la base de la spectrométrie de masse. Ce composé est un dérivé aromatisé de l'hydroxyhopanone – une molécule précurseur largement distribuée chez les angiospermes – et ne constitue de ce fait pas un marqueur suffisamment spécifique pour être relié directement aux dammars.

3.5. Conclusion

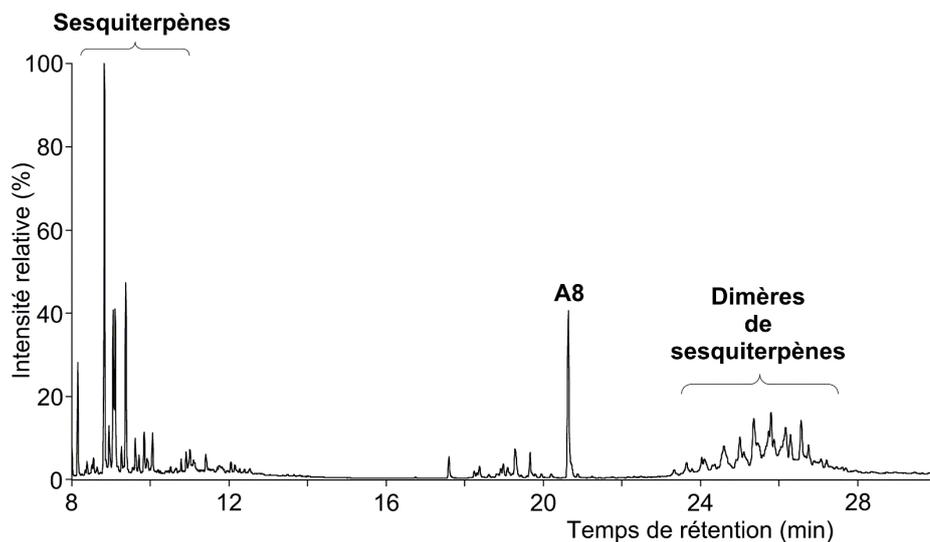
Les analyses réalisées dans le cadre de cette étude nous ont permis d'identifier deux résines provenant de deux épaves trouvées au large de Sabah et des îles Lingga comme étant des dammars. L'une d'entre elles a pu être rattachée au genre *Shorea* grâce à la présence de l'acide shoréique, tandis que l'autre, de manière plus incertaine, semble provenir également du genre *Shorea* bien qu'une autre source végétale, appartenant au genre *Cotylelobium*, ne puisse être complètement exclue. Dans l'hypothèse où les deux résines proviendraient du même genre botanique, l'absence de l'acide shoréique dans l'une d'elles indique clairement qu'elles ne proviennent pas de la même espèce. Toutefois, dans les deux cas, il a été possible de répondre à la question de la provenance géographique de ces résines, à savoir la Malaisie pour la résine du Flying Fish et l'Indonésie pour la résine du Lingga, et d'écarter une éventuelle provenance chinoise.

Outre l'analyse chimiotauxonomique, le contexte sédimentaire dans lequel ont été trouvées ces résines nous a également permis d'étudier les processus d'altération induits par l'activité microbienne en conditions anoxiques et subis par la matière organique post-enfouissement dans les sédiments, à la suite du naufrage des navires. Les *des-A*-triterpènes des séries de l'oléanane et de l'ursane, ainsi que les triterpènes (poly)aromatiques de ces mêmes séries, ont déjà été bien étudiés par le passé. Par contre, un certain nombre de nouvelles molécules altérées par ces mêmes processus ont pu être identifiées partiellement dans le cadre de nos travaux. L'une d'entre elles a été caractérisée comme étant un *des-A* triterpène de la famille du diptérocarpol, famille qui est particulièrement abondante dans les dammars, constituant ainsi un nouveau biomarqueur d'altération des résines de Dipterocarpaceae en milieu anaérobie.

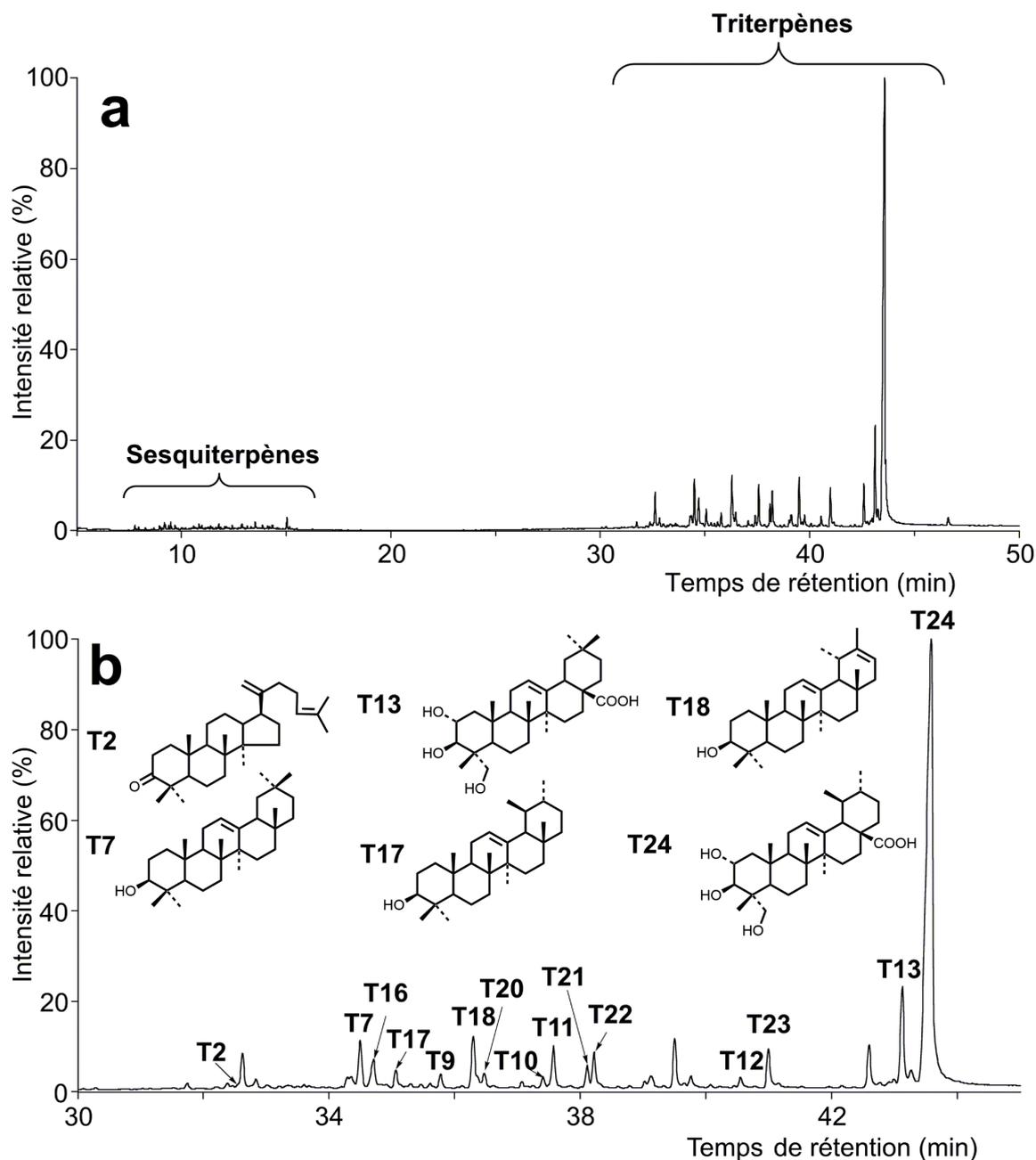
ANNEXES DU CHAPITRE 3



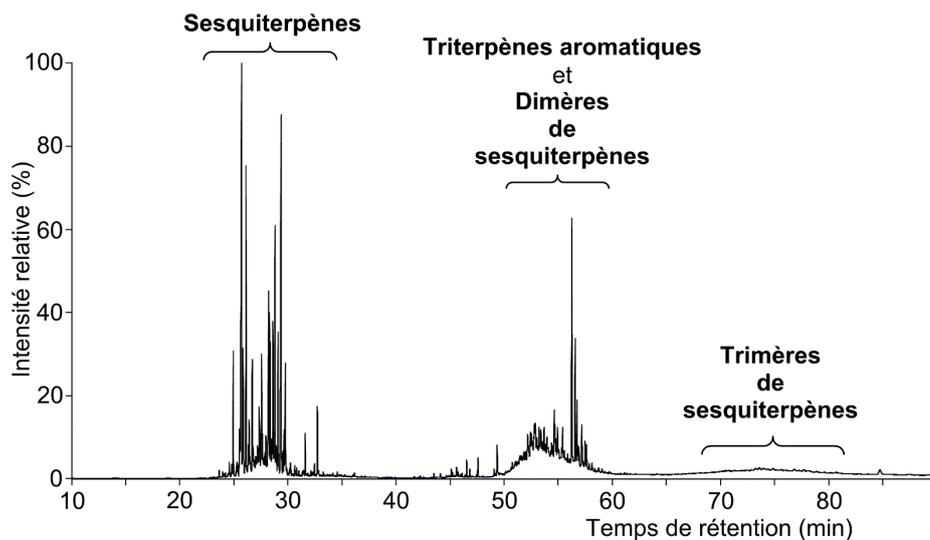
Annexe 3.1 : Spectres de masse (IE, 70 eV) du lanostérol T32 (a) et de l'euphol T33 (b). Les alcools sont analysés sous forme d'acétates.



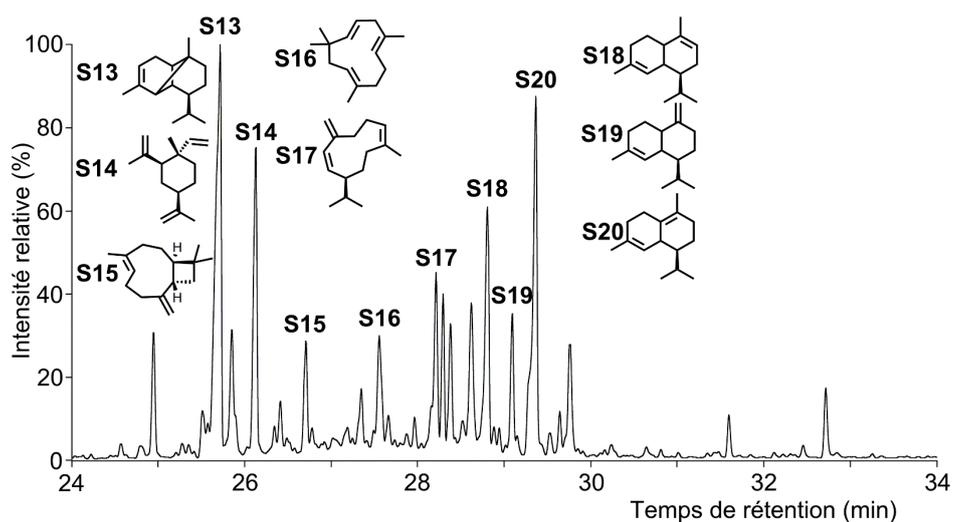
Annexe 3.2 : Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction F₃ (cf. § 6.3.2.a) comprenant le composé inconnu A8. Les structures des composés numérotés sont représentées dans l'Appendice de la thèse. Programme B de température du four GC (cf. § 6.5.2).



Annexe 3.3 : Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de l'extrait lipidique obtenu à partir de la résine du Lingga. (a) vue d'ensemble, (b) zoom centré sur les composés triterpéniques. Les alcools sont analysés sous la forme d'acétates et les acides sous la forme d'esters méthyliques. Les structures des composés numérotés sont représentées dans l'Appendice de la thèse. Programme B de température du four GC (cf. § 6.5.2).



Annexe 3.4 : Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire F1 obtenue à partir de la résine du Lingga avec le protocole d'extraction spécifique des composés volatils. Programme A de température du four GC (cf. § 6.5.2).



Annexe 3.5 : Chromatogramme en phase gazeuse partiel (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction apolaire F1 obtenue à partir de la résine du Lingga centré sur les composés sesquiterpéniques (cf. Annexe 3.4). Les structures des composés numérotés sont représentées dans l'Appendice de la thèse. Programme A de température du four GC (cf. § 6.5.2).

Chapitre 4
Identification de brais de bouleau
archéologiques

4.1. Introduction

Les matériaux organiques résineux issus du gemmage des arbres, comme ceux étudiés dans le chapitre 3, ne sont pas les seuls matériaux à avoir été utilisés par le passé. Effectivement, d'autres substances organiques provenant de la pyrolyse de bois ou d'écorce, appelés goudrons, poix⁴ ou encore brais⁵ ont largement été employés dès les temps les plus anciens par l'Homme et ont fait l'objet de nombreuses études (Colombini et Modugno, 2009 et références citées ; Robinson et al., 1987 ; Loewen, 2005 ; Bailly, 2015 ; Courel et al., 2018).

Dans le cadre de ce chapitre, nous nous sommes intéressés plus spécifiquement au brai de bouleau, un goudron végétal produit par pyrolyse de l'écorce de bouleau fréquemment rencontré en contexte archéologique (Aveling et Heron, 1999 ; Charters et al., 1993 ; Courel et al., 2018). Pour ce faire, un corpus d'échantillons archéologiques provenant de trois sites datant du Néolithique nous a été confié au travers de collaborations avec l'INRAP⁶ (Mmes Fanny Chenal et Delphine Minni), l'Université Paul Valéry Montpellier 3 (Mme Pauline Debels, doctorante) et la DRAC⁷ d'Occitanie (M. Philippe Galant). Au-delà de la présentation du profil moléculaire de chacun des échantillons analysés ayant mené à leur identification taxonomique en tant que brai de bouleau, il sera également question de certaines de leurs particularités. Ainsi, dans certains cas, il sera discuté d'un possible apport de résine de conifère au brai de bouleau. Par ailleurs, l'identification de nouveaux biomarqueurs sera décrite, marqueurs potentiellement indicateurs du mode de fabrication du brai de bouleau.

4.2. Le brai de bouleau

Le brai de bouleau est un goudron produit à partir de la pyrolyse d'écorce de bouleau. Cette substance a été utilisée par le passé en Europe dès le Paléolithique Moyen, ce qui en fait un des plus anciens matériaux organiques façonnés par la main de l'Homme connu à ce jour (Koller et al., 2001 ; Grünberg, 2002 ; Niekus et al., 2019). Ce n'est toutefois qu'à partir du Néolithique qu'il a été plus fréquemment mis en évidence dans les découvertes archéologiques (Ottaway, 1992 ; Lucquin et al., 2007 ; Mitkidou et al., 2008 ; Morandi et al., 2018).

⁴ Le terme de « poix » est également utilisé pour désigner des matériaux issus du traitement thermique de résines de Pinaceae (Bailly, 2015)

⁵ Le terme de « brai » désigne généralement le goudron produit à partir d'écorce de bouleau (Bailly, 2015)

⁶ Institut National de Recherche en Archéologie Préventive

⁷ « DRAC » : Direction Régionale des Affaires Culturelles

Grâce à l'apport de l'archéologie expérimentale, il a été possible de définir les conditions opératoires nécessaires pour la production du brai de bouleau : une température de chauffe d'au moins 340 °C et des conditions anoxiques pour assurer une pyrolyse (Koller et al., 2001 ; Rageot, 2015). En tenant compte de ces contraintes, plusieurs systèmes de production ont pu être imaginés, se divisant en deux types de procédés nommés autothermiques et allothermiques (Rageot et al., 2019). Dans les procédés autothermiques, l'écorce de bois est directement exposée au feu (Kurt et al., 2008), tandis que dans le cas des procédés allothermiques, un « conducteur » est placé entre la source de chaleur et l'écorce (Rageot et al., 2019). Selon Rageot et al. (2019), les processus autothermiques ont été principalement utilisés pour la production de goudron de conifère et non pour la production de brai de bouleau étant donné le caractère très inflammable de l'écorce de bouleau. Parmi les procédés allothermiques, deux types de systèmes ont été décrits, l'un faisant intervenir une étape de séparation de l'exsudat de l'écorce de bouleau (brai) alors qu'aucune séparation n'est effectuée dans le cas du deuxième système (Rageot et al., 2019).

La méthode dite du « double-pot », encore appelée « per descensum » (Fig. 4.1a) est un exemple de procédé allothermique avec séparation des produits de pyrolyse et de l'écorce. Ce système fait appel à un dispositif fermé, composé de deux céramiques superposées, scellées avec de l'argile afin d'assurer des conditions de pyrolyse parfaitement anoxiques. Le fond de la céramique supérieure est perforé de plusieurs trous, l'ensemble du dispositif étant ensuite enfoui à mi-hauteur dans le sol. Un foyer en surface permet alors de chauffer la céramique supérieure contenant les écorces de bouleau. Le brai exsudé descend par gravité dans la céramique inférieure et se retrouve ainsi isolé du foyer (Rageot, 2015 ; Rageot et al., 2019).

A l'inverse du système du « double-pot », la technique du « simple-pot » (Fig. 4.1b) correspond, quant à elle, à un système allothermique qui ne fait pas intervenir de séparation entre le brai de bouleau généré et l'écorce. Un tel dispositif est donc constitué d'un unique récipient en céramique contenant l'écorce de bouleau, scellé afin d'assurer des conditions anoxiques. Ainsi, lors du chauffage du récipient par un feu extérieur, le brai exsudé reste en contact avec l'écorce et est soumis à des conditions de températures élevées tout au long de la production (Rageot, 2015 ; Rageot et al., 2019).

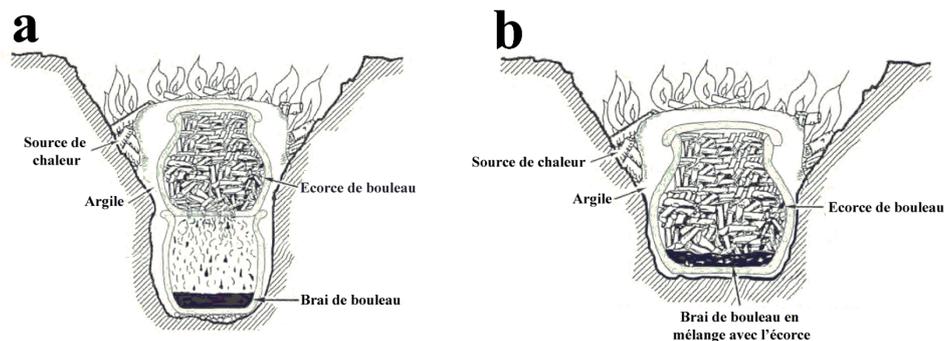


Figure 4.1 : Schéma des dispositifs mis en œuvre pour la préparation de brai de bouleau par la méthode dite (a) du double-pot ; (b) du simple-pot (Dessin modifié d'après Pietrzak, 2012).

Les deux méthodes, « simple pot » et « double-pot », sont les plus connues parmi les procédés allothermiques, mais elles n'ont pu être pratiquées qu'à partir du moment où la fabrication et l'usage des céramiques se sont répandus, au début du Néolithique. Ainsi, pour produire du brai de bouleau durant les périodes antérieures, les sociétés précéramiques ont procédé d'une autre façon en réalisant le chauffage de l'écorce dans des dômes constitués d'argile, de sable, de terre et de cendre (Osipowicz, 2005 ; Groom et al., 2015 ; Kozowyk et al., 2017 ; Schenck et Groom, 2018). Il est même envisageable, comme l'ont démontré les travaux récents de Schmidt et al. (2019), que la production de brai de bouleau ait pu s'effectuer en l'absence de tout dispositif particulier, en faisant simplement brûler de l'écorce de bouleau mise en contact avec des pierres, le brai ainsi généré et s'étant déposé sur les pierres pouvant ensuite être récupéré par grattage de la surface des pierres.

Les fouilles archéologiques ont également apporté leur lot d'informations sur le mode de production de goudron de végétaux en général. Elles ont conduit principalement à la mise en évidence de mobilier en rapport avec le système du « double-pot ». A cet égard, le plus ancien dispositif « double-pot » connu à ce jour date de l'Âge du Bronze (Dal Ri et Tecchiati, 2003), mais c'est surtout à l'époque romaine et au Moyen-Âge que l'utilisation de tels dispositifs est la plus marquée (Balsan, 1951 ; Regert et al., 2003 ; Trintignac, 2003 ; Burri, 2009, 2010 ; Burri et al., 2018). Par contre, aucune preuve archéologique n'a pu être apportée pour la production en système « simple-pot ». Une raison simple pour expliquer l'absence de telles découvertes archéologiques est que la préparation de brai selon la méthode du « simple-pot » ne fait pas appel à du matériel spécifique facilement identifiable comme matériel destiné à la préparation de goudron comme, par exemple, des céramiques avec un fond percé de trous. En ce qui concerne les sociétés antérieures à l'Âge du Bronze, malgré la découverte de nombreuses

substances adhésives apparentées au brai de bouleau, aucun système de production n'a pu être mis en évidence, amenant de ce fait un certain flou sur les techniques utilisées à ces époques. Pour les sociétés précéramiques, l'absence de preuves archéologiques est logique dans le sens où aucun mobilier spécifique en céramique ou métal n'a été utilisé pour produire du brai, seuls de l'argile, du sable, de la terre ou de la cendre étant employés. Pour les sociétés datant du Néolithique, l'absence de mobilier typique de production de brai est plus problématique, à tel point que certains auteurs suggèrent que ces sociétés aient encore largement utilisé les techniques ne faisant pas appel aux céramiques pour produire du brai de bouleau ou des techniques de type « simple-pot » (Pietrzak, 2012).

Le brai de bouleau ainsi préparé a été largement exploité pour ses propriétés adhésives et hydrophobes. Grâce aux découvertes archéologiques, son utilisation a été démontrée pour l'emmanchement d'outils et la fixation de bijoux (Sauter et al., 2000 ; Bosquet et al., 2001 ; Koller et al., 2001 ; Courel et al., 2018), pour la réparation et l'imperméabilisation de céramiques (Charters et al., 1993 ; Reunanen et al., 1993 ; Connan et al., 2000 ; Bosquet et al., 2001 ; Urem-Kotsou et al., 2002 ; Rageot et al., 2016), pour la décoration de céramiques (Vogt, 1949), et également comme chewing-gum (Aveling and Heron, 1999 ; Karg et al., 2014).

4.3. Les brais de bouleau des sites de La Rouvière et du Claux : un adhésif pour la réparation de céramiques

4.3.1. Contexte archéologique⁸

a) Le site de La Rouvière

Le site de La Rouvière est situé à Rogues en Occitanie, France. Il a été découvert en 1989 par J. Halgand et ses collègues du groupe de recherche et d'explorations souterraines du Vigan, et a été fouillé de 1989 à 2004 par P. Galant (Galant et al., 2000). Le site est composé d'un aven (découvert en 1989) et d'un établissement extérieur (découvert en 1999) qui sont reliés par un étroit corridor (Fig. 4.2). Il a été très probablement utilisé pour collecter et stocker de l'eau (Galant et Halgand, 2004). Deux phases d'occupation, toutes deux datant de la fin du Néolithique, ont été mises en évidence, dont la dernière (3000 BCE) s'est terminée par un

⁸ D'après les informations fournies dans un rapport transmis par P. Debels

incendie. Plus de 40 jarres datant de cette dernière phase d'occupation ont été découvertes dans l'établissement.

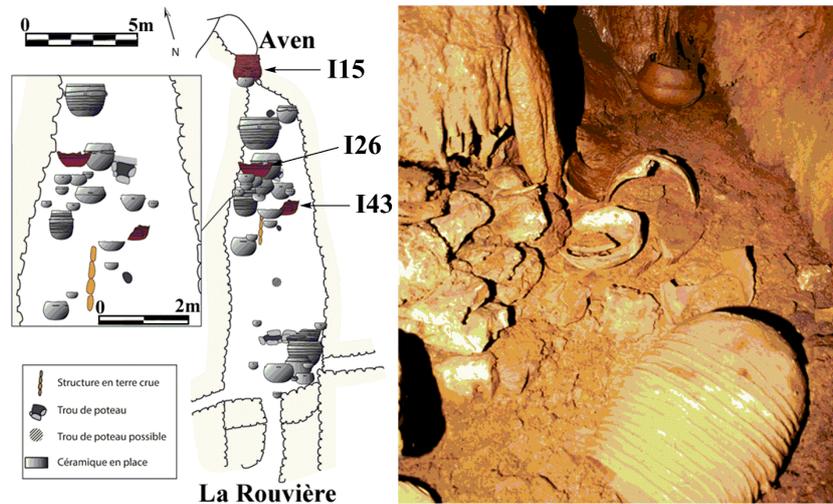


Figure 4.2 : Plan du site archéologique de La Rouvière avec la localisation des céramiques (Plan réalisé par P. Debels). Photographie illustrant la première salle de la cavité avec le mobilier en place (Galant et Halgand, 2004).

b) Le site du Claux

La grotte du Claux est située dans les gorges de la Vis, affluent de l'Hérault, en Occitanie, France. Cette grotte, bien que connue depuis 1934, n'a été fouillée qu'à partir de 1951 avec la réalisation de quelques sondages par J. Audibert. En 1978, G. Hodot, membre du Spéléo-Club Alpin du Languedoc, découvre un prolongement de la grotte où repose un abondant mobilier préhistorique. Depuis lors, de nombreuses autres galeries ont été découvertes avec la mise au jour de plus de 500 kg de céramiques et également de squelettes d'une trentaine d'individus (Fig. 4.3). La plupart des céramiques étaient posées à même le sol et sont en parfait état de conservation. Parmi elles, 130 ont été individualisées, dont trois appartiennent à la culture Campaniforme, deux datent de l'Âge du Bronze, les 125 restantes datent du Néolithique. Les céramiques ont été datées entre 2800-2300 BCE sur la base de la typologie des céramiques. De l'ensemble de ces informations, les archéologues ont pu conclure que la grotte a tout d'abord été utilisée pour des sépultures puis, après purification par le feu et placement des restes humains dans un espace muré, elle a été réutilisée pour la collecte et le stockage d'eau pendant le Néolithique.

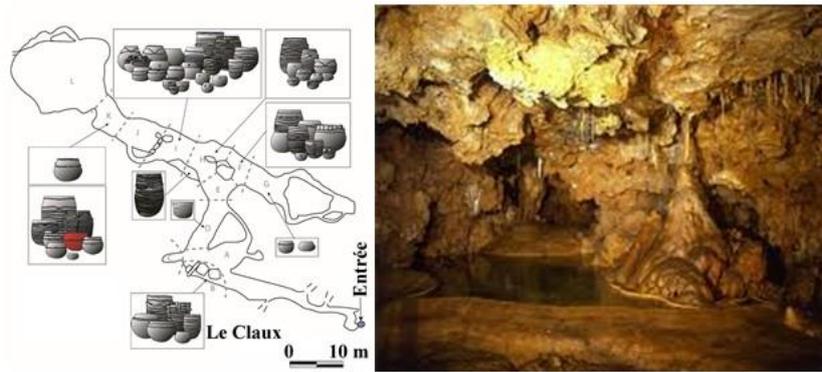


Figure 4.3 : Plan du site archéologique du Claux avec la localisation des céramiques (Plan réalisé par P. Debels). Photographie de la grotte (Photographie par Alain Aigouin).

c) Les échantillons étudiés

Dans le corpus de céramiques qui a été mis au jour sur les deux sites présentés ci-dessus, certaines présentent des dépôts noirs localisés sur d'anciennes fissures, et qui pourraient s'apparenter à une substance organique adhésive ayant pu être utilisée pour la réparation des céramiques. Ainsi, dans le cadre d'une collaboration avec la doctorante Pauline Debels et monsieur Philippe Galant, nous avons procédé à l'analyse de sept de ces échantillons organiques provenant de cinq céramiques différentes afin d'en identifier la nature et l'origine.

4.3.2. Substance organique de la céramique I15

La céramique I15 a été découverte sur le site de La Rouvière à l'entrée de l'aven (Fig. 4.2 et 4.4). Elle a été utilisée pour stocker de l'eau, en lien avec l'activité de stockage d'eau du site.

Dans cette jarre, un résidu organique a été découvert le long d'une ancienne fissure et aurait pu être utilisé pour réparer la céramique (Fig. 4.4). Vu l'épaisseur de ce dépôt, deux prélèvements ont été réalisés, correspondant au contour et au cœur du résidu, mais ils se sont avérés être identiques lors de leur analyse par GC-MS. Il sera donc question par la suite de la substance organique de cette céramique dans sa globalité.



Figure 4.4 : Céramique I15 (A gauche), et dépôt carboné associé (A droite). (Photographies par P. Debels).

a) Les triterpènes, biomarqueurs de brai de bouleau

Le chromatogramme de la fraction lipidique obtenue selon le protocole décrit en partie expérimentale (cf. § 6.1.2) est dominé par des triterpènes de la série du lupane caractérisés par un fragment à m/z 189 dans leurs spectres de masse (Budzikiewicz et al., 1963) (Fig. 4.5). Nous trouvons, notamment, le lupéol **T25**, la bétuline **T54**, et la bétulone **T55** qui sont des triterpènes natifs de l'écorce de bouleau (Hayek et al., 1989, 1990 ; Schnell et al., 2014). La bétuline, malgré sa large répartition chez les angiospermes, n'est présente en quantité remarquable que dans le genre *Betula*, et de ce fait est considérée dans la littérature comme un biomarqueur important d'une contribution végétale provenant de bouleau dans les échantillons archéologiques (Hayek et al., 1989). Ces molécules, et plus particulièrement la bétuline **T54**, sont en effet de loin les triterpènes majeurs dans les extraits d'écorces de bouleau fraîches ou altérées (Hayek et al., 1990 ; Aveling et Heron, 1998 ; Schnell et al., 2014 ; Courel et al., 2018). Toutefois, ces composés n'apparaissent qu'en proportions mineures dans notre échantillon (Fig. 4.5).

En revanche, il est intéressant de noter que la distribution est dominée par les composés **T56-T60** qui sont des molécules appartenant aux séries des Δ^2 -triterpènes. Ces composés, en combinaison avec les dérivés de type allobétulane **T59-T62** également identifiés grâce à leur mode de fragmentation et aux spectres de masse disponibles dans la littérature (Budzikiewicz et al., 1963 ; Schmidt and Huneck, 1979 ; Li et al., 1989 ; Aveling et Heron, 1998 ; Rageot, 2015 ; Courel, 2016 ; Courel et al., 2018), sont connus pour être des marqueurs d'altération issus de la pyrolyse des triterpènes natifs de l'écorce de bouleau. De ce fait, ils sont utilisés comme des biomarqueurs importants pour l'identification de brais de bouleau, substance qui

semble donc constituer notre échantillon archéologique (Bosquet et al., 2001 ; Modugno et al., 2006b ; Regert et al., 2006 ; Courel et al., 2018 ; Rageot et al., 2019).

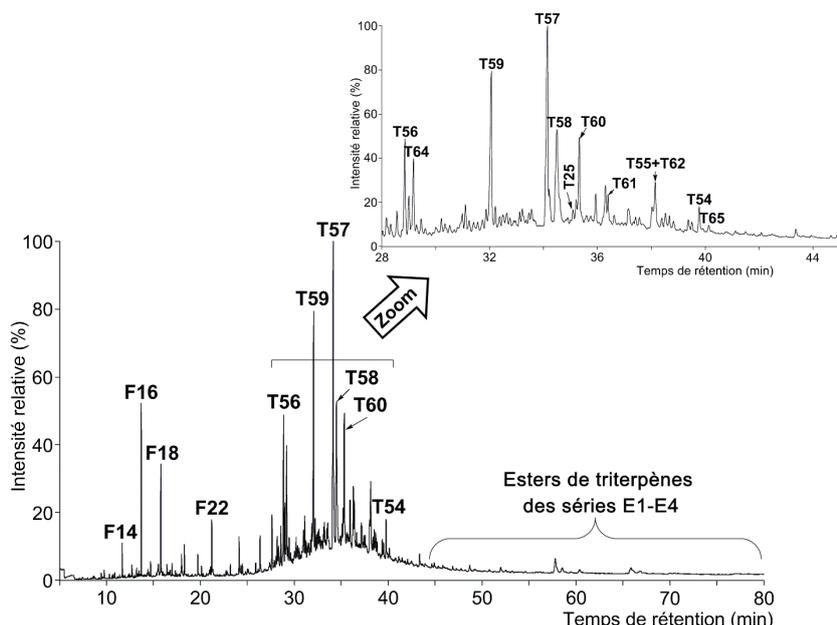


Figure 4.5 : Chromatogramme en phase gazeuse (GC-MS, IE, 70 eV) de l'extrait lipidique de l'échantillon de la céramique I15. F_x : acide gras avec x atomes de carbone. Les alcools sont analysés sous la forme d'acétates et les acides sous la forme d'esters méthyliques. Les structures des composés numérotés sont représentées en Appendice. Programme B de température du four GC (cf. § 6.5.2).

Ainsi, les Δ^2 -triterpènes **T56-T57** sont formés respectivement par élimination de la fonction alcool en C-3 du lupéol **T25** et de la bétuline **T54** (Fig. 4.6). Cette réaction est généralement induite par un traitement thermique comme celui intervenant pendant la préparation du brai de bouleau (Courel et al., 2018 ; Rageot et al., 2019). Toutefois, il nous semble important de signaler que la présence de ces Δ^2 -triterpènes a, par le passé, été mise en évidence dans de l'écorce de bouleau altérée n'ayant pas subi de traitement thermique (Aveling et Heron, 1998). Néanmoins, les composés **T56-T57** y sont uniquement présents à l'état de traces et pourraient, dans ce cas, correspondre à des artefacts liés au système d'injection en GC-MS utilisé (dégradation/déshydratation thermique de triterpènes oxygénés en C-3 dans l'injecteur chauffé) plutôt qu'à des molécules présentes à l'état natif dans l'échantillon analysé. Ce point a d'ailleurs déjà été soulevé lors d'une thèse précédente réalisée dans notre laboratoire (Courel, 2016).

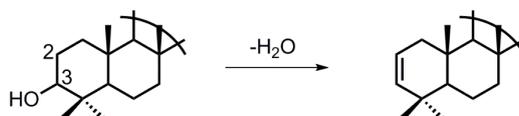


Figure 4.6 : Voie de formation des Δ^2 -triterpènes par déshydratation de triterpènes oxygénés en C-3.

De manière similaire, il a été montré que la formation des allobétulanes **T61** et **T62** par réarrangement acido-catalysé du cycle *E* de la bétulone **T55** et de la bétuline **T54**, respectivement, est également induite par un traitement thermique tel que celui mis en œuvre lors de la préparation de brai de bouleau (Davy et al., 1951a, 1951b ; Green et al., 2007 ; Salvador et al., 2009 ; Courel, 2016) (Fig. 4.7). La formation des allobétulanes **T59** et **T60**, issus respectivement de la bétuline **T54** et de l'acide bétulinique **T63** comprend, de plus, une étape de déshydratation de la fonction hydroxyle en C-3.

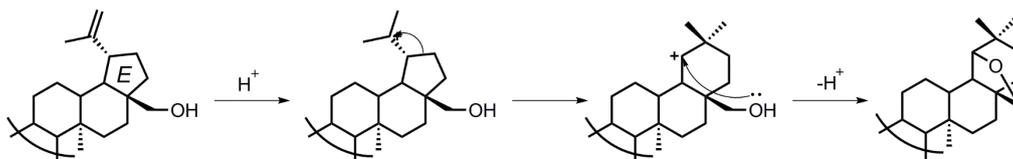


Figure 4.7 : Mécanisme de réarrangement intramoléculaire à l'origine des allobétulanes (Green et al., 2007 ; Salvador et al., 2009).

Néanmoins, la bétuline **T54** est anormalement peu abondante par rapport aux marqueurs d'altération si l'on compare le profil moléculaire de notre échantillon de brai de bouleau archéologique aux distributions de triterpénoïdes de brais archéologiques « classiquement » décrits dans la littérature (Aveling et Heron, 1998, 1999 ; Sauter et al., 2000 ; Koller et al., 2001 ; Courel et al., 2018). Toutefois, il existe quelques exemples de distributions de triterpènes de brais assez semblables à la nôtre, et qui ont été interprétées comme résultant d'un chauffage intense durant la préparation du brai (Urem-Kotsou et al., 2002 ; Regert et al., 2003). A cet égard, un stress thermique important pourrait également expliquer l'inhabituelle présence des triterpènes **T58**, **T64** et **T65** correspondant aux versions hydrogénées en position 20(29) des triterpènes **T57**, **T56** et **T54** (Fig. 4.5). Ceux-ci pourraient, en effet, avoir été formés par un processus thermique réducteur ou des processus de dismutation induits par la chaleur, ou encore correspondre à des composés mineurs, plus stables, qui se seraient trouvés enrichis par rapport à leurs analogues insaturés ($\Delta^{20(29)}$) plus fragiles.

b) Esters de triterpènes des séries E1-E4

En plus des triterpènes classiquement trouvés dans les brais de bouleau, 4 séries de molécules **E1-E4** éluées à des temps de rétention plus élevés ont été détectées (Fig. 4.5). Les composés des séries **E1-E4** présentent des modes de fragmentation en spectrométrie de masse similaires à ceux de la Δ^2 bétuline **T57** ou de la Δ^2 dihydrobétuline **T58** (sous forme acétylée), mais avec des masses moléculaires plus élevées comprises entre 494 et 748 Da. Afin de pouvoir

analyser de manière plus précise les distributions de ces composés, un protocole d'extraction et d'analyse spécifique a été développé (cf. § 6.4.1).

La fraction $F_{1,2}$ s'est révélée être enrichie en composés appartenant aux séries **E1** et **E2** (Fig. 4.8). Les composés de la série **E1** ont des spectres de masse très proches de celui de la Δ^2 bétuline **T57** acétylée (Fig. 4.9a) avec des ions moléculaires à m/z $466 + n \times 14$ Da ($n = 2-20$) (Fig. 4.9c pour $n = 7$), tandis que les composés issus de la série **E2** ont des spectres de masse très proches de celui de la Δ^2 dihydrobétuline **T58** acétylée (Fig. 4.9b) avec des ions moléculaires à m/z $468 + n \times 14$ Da ($n = 2-20$) (Fig. 4.9d pour $n = 7$). Lors d'une étude précédente, l'identification des composés de la série **E1** avait été proposée comme étant des dérivés de la Δ^2 bétuline **T57** estérifiée en C-28 avec des acides monocarboxyliques ayant différentes longueurs de chaîne (Dudd et Evershed, 1999). Par analogie, nous proposons que les composés de la série **E2** ont cette même structure mais sans insaturation en $\Delta^{20(29)}$. Dans le cas de ces deux séries, la distribution de la partie acide monocarboxylique s'étend de C_4 à C_{22} comme illustré sur la figure 4.8. Toutefois, la proposition de structure rapportée par Dudd et Evershed (1999) pour la série **E1** était uniquement basée sur l'interprétation des spectres de masse et sur des expériences d'hydrolyse alcaline, ce qui ne représente qu'une identification partielle. De ce fait, nous avons entrepris la synthèse des homologues **E1a** et **E2a** des séries **E1** et **E2** (Fig. 4.9c et 4.9d) selon le protocole décrit en partie expérimentale (cf. § 6.4.3) en vue d'une identification rigoureuse de ces séries d'esters. Pour résumer le schéma synthétique suivi, la fonction hydroxyle en C-3 de la bétuline **T54** (resp. dihydrobétuline **T65**) a tout d'abord été déshydratée de manière sélective suivant un protocole décrit dans la littérature (Sun et al., 1998b), menant à la formation de la Δ^2 bétuline **T57** (resp. Δ^2 dihydrobétuline **T58**). La fonction alcool en C-28 a ensuite été estérifiée avec du chlorure de nonanoyle, menant à la formation du composé **E1a** (resp. **E2a**) dont les structures ont été confirmées par GC-MS et RMN (cf. § 6.4.3). Les spectres de masse et les temps de rétention obtenus pour les composés synthétiques et ceux obtenus pour les composés archéologiques étant identiques, cela confirme donc l'identification des esters triterpéniques des deux séries.

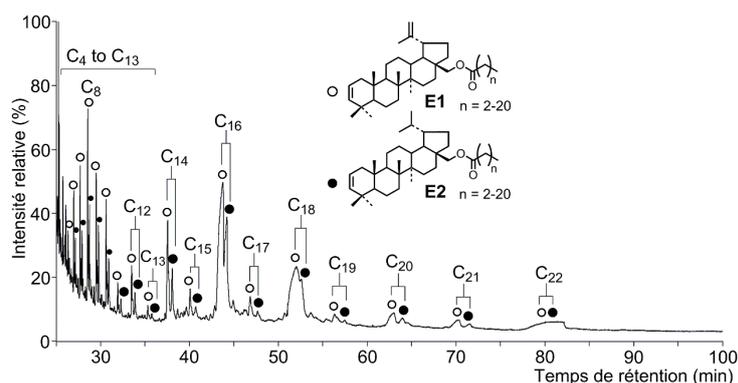


Figure 4.8 : Chromatogramme en phase gazeuse partiel (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction F_{1.2} montrant la distribution des esters de triterpènes des séries E1 et E2. Les structures des composés numérotés sont représentées en Appendice. Programme C de température du four GC (cf. § 6.5.2).

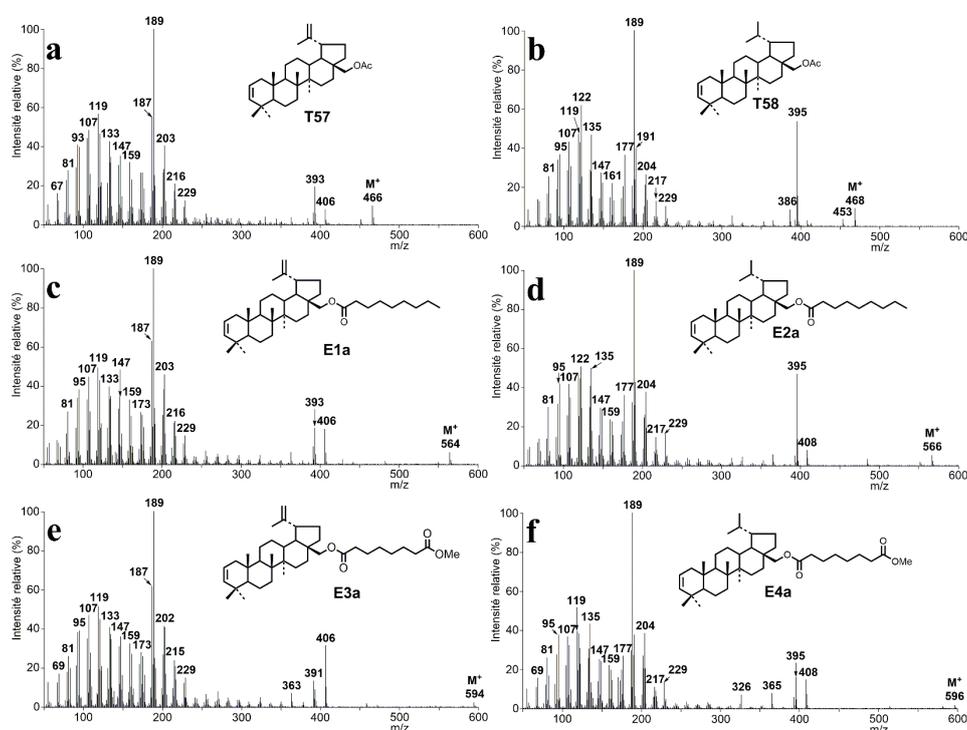


Figure 4.9 : Spectres de masse (IE, 70 eV) des composés T57, T58 et des composés E1a-E4a.

La fraction F_{2.2}, quant à elle, est enrichie en composés des séries E3 et E4 (Fig. 4.10). Comme pour la série E1, les spectres de masse des composés de la série E3 montrent une similarité importante avec celui de la Δ^2 bétuline T57 acétylée (Fig. 4.9a), mais avec une masse moléculaire de $510 + n \times 14$ ($n = 2-8$) (Fig. 4.9e pour $n = 6$). De manière similaire, les spectres de masse des composés de la série E4 montrent une ressemblance importante avec celui de la Δ^2 dihydrobétuline T58 acétylée (Fig. 4.9b), mais avec une masse moléculaire de $512 + n \times 14$ ($n = 2-8$) (Fig. 4.9f pour $n = 6$). Sur la base de ces données, nous proposons que les composés

des séries **E3** et **E4** correspondent respectivement à des acides dicarboxyliques estérifiés au niveau de l'alcool en position C-28 de la Δ^2 bétuline **T57** et de la Δ^2 dihydrobétuline **T58** avec une distribution allant de C₄ à C₁₀ pour la partie diacide carboxylique (Fig. 4.10). Ces composés n'ayant jamais été identifiés dans la littérature, et afin de confirmer nos hypothèses structurales, la synthèse des homologues **E3a** et **E4a** (Fig. 4.9e et 4.9f) des séries **E3** et **E4** a été effectuée selon le protocole décrit en partie expérimentale (cf. § 6.4.3). La synthèse de ces composés a été identique à celle des esters **E1a** et **E2a**, à l'exception de l'utilisation du 8-chloro-8-oxooctanoate de méthyle à la place du chlorure de nonanoyle lors de l'étape d'estérification. Les structures des composés **E3a** et **E4a** ainsi obtenus ont été ensuite confirmées par GC-MS et RMN (cf. § 6.4.3). La comparaison des spectres de masse et des temps de rétention en chromatographie gazeuse des composés synthétisés et de ceux présents dans l'échantillon archéologique, identiques en tout point, confirme donc les structures des séries **E3** et **E4**.

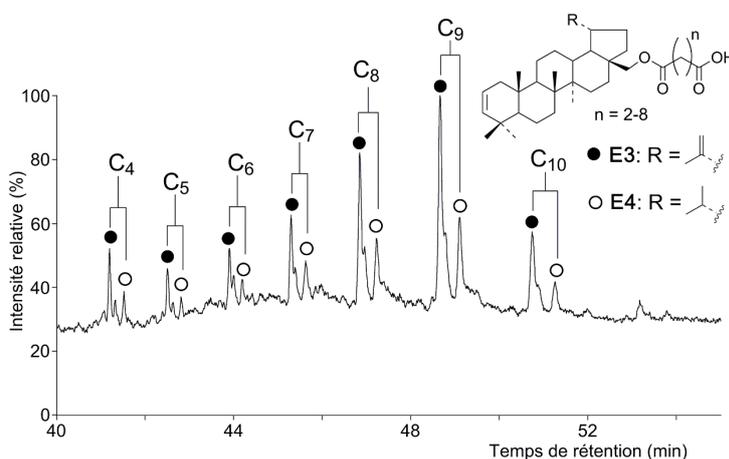


Figure 4.10 : Chromatogramme en phase gazeuse partiel (GC-MS, IE, 70 eV) de la fraction **F_{2.2}** montrant la distribution des esters de triterpènes des séries **E3** et **E4**. Les acides sont analysés sous forme d'esters méthyliques. Les structures des composés numérotés sont représentées en Appendice. Programme C de température du four GC (cf. § 6.5.2).

c) Mode de formation des esters de triterpènes des séries **E1-E4**

Lors de la découverte des esters de triterpènes des séries **E1** et **E2** et de leur identification partielle par Dudd et Evershed en 1999, une voie de formation a également été proposée pour expliquer l'origine de ces composés. Elle implique une réaction d'estérification entre un triterpène de la famille de la bétuline (de la Δ^2 bétuline **T57** dans le cas de la série **E1**) et un acide monocarboxylique pendant la fabrication du brai de bouleau. Dudd et Evershed (1999) ont proposé que ces composés puissent résulter de réactions croisées lors du chauffage à haute température soit d'un mélange fait d'écorce de bouleau et de graisse animale soit d'un mélange

de brai de bouleau et de graisse animale, la graisse étant ajoutée pour modifier les propriétés originelles du brai.

Pour notre part, nous proposons que les acides monocarboxyliques estérifiés aux dérivés de la bétuline puissent provenir plutôt de la dégradation thermique de la subérine – un biopolymère important de l'écorce de bouleau (Gandini et al., 2006 ; Pinto et al., 2009 ; Ferreira et al., 2013) – que d'une graisse animale (Fig. 4.11). Cette hypothèse est notamment basée sur la présence dans l'extrait lipidique d'acides gras libres avec une distribution qui s'étend de C₁₄ à C₂₄ dominée par les homologues en C₁₆, C₁₈, C₂₂, mais également sur la présence d' α,ω -hydroxyacides C₂₀ et C₂₂, et de diacides en C₁₆-C₂₂ (Fig. 4.12a et b). Cette distribution est typique des sous-unités aliphatiques liées dans la structure macromoléculaire de la subérine de l'écorce de bouleau (Holloway, 1972 ; Ekman, 1983 ; Ferreira et al., 2013). De telles distributions avaient, d'ailleurs, déjà été mises en évidence dans certains brais de bouleau (Charters et al., 1993 ; Reunanen et al., 1993, 1996 ; Courel, 2016 ; Rageot et al., 2019). Par ailleurs, la fraction F_{1.2} contenant les esters de triterpènes des séries **E1** et **E2** a été traitée avec LiAlH₄, un réactif d'hydrogénolyse coupant les liaisons esters pour conduire aux alcools correspondant aux parties alcools et acyles des esters (Anand et al., 1987) (cf. § 6.4.2). La comparaison entre la distribution des alcools issus de la partie acyle des esters triterpéniques et celle des acides gras libres présents dans l'extrait lipidique (Fig. 4.12c) fait ressortir une nette similitude des prédominances entre les acides gras libres et les alcools issus du traitement par LiAlH₄, avec C₁₆ > C₁₈ > C₂₂ > C₂₀ = C₂₁, confirmant que les acides gras liés dans les séries **E1** et **E2** proviennent bien de la subérine.

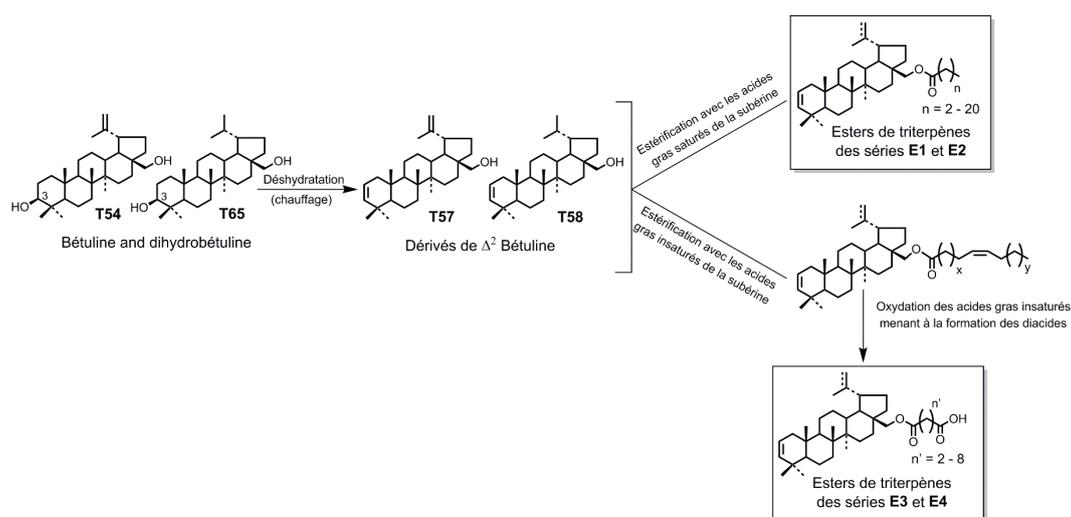


Figure 4.11 : Voie de formation supposée des esters de triterpènes des séries E1-E4.

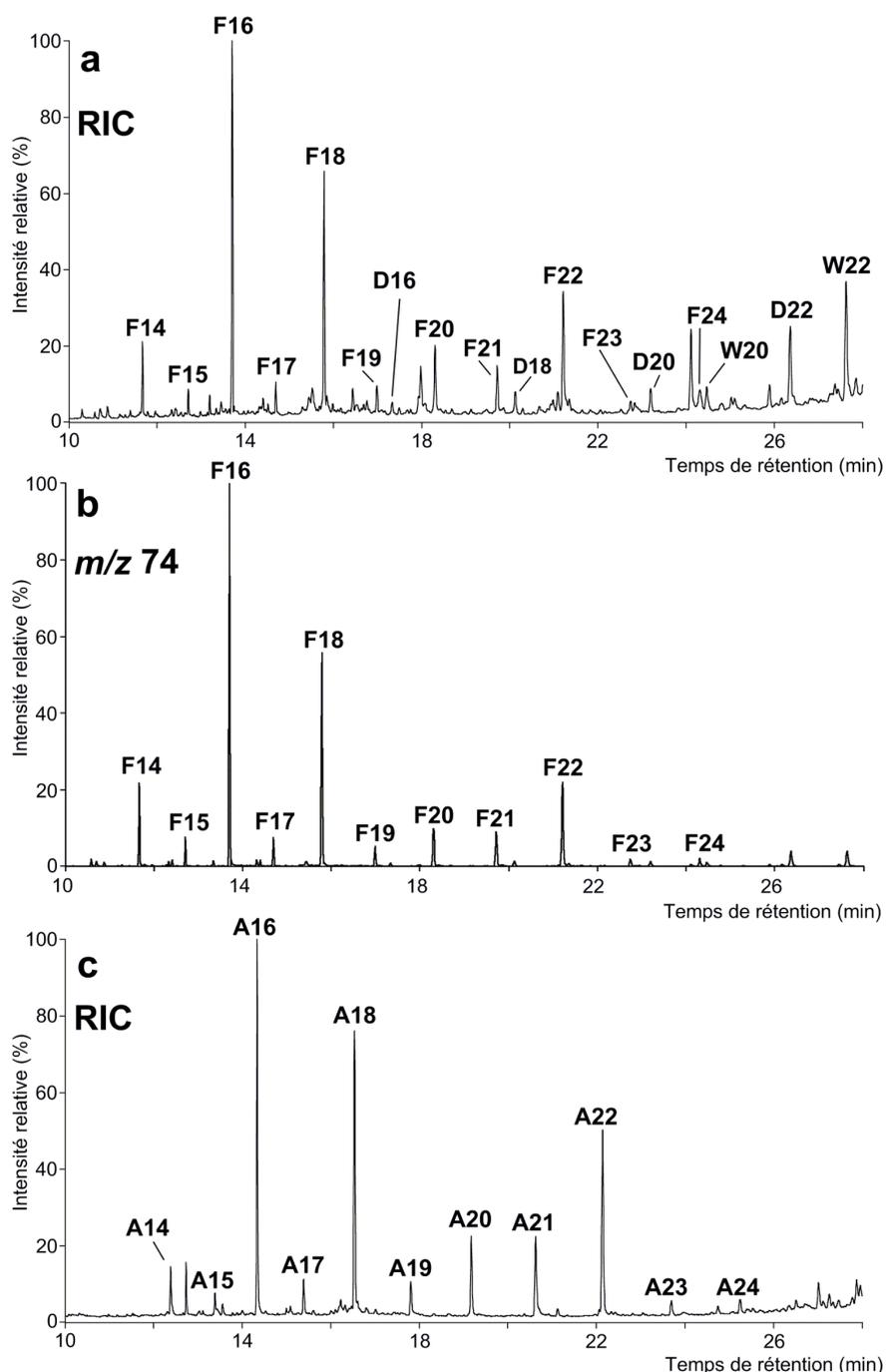


Figure 4.12 : (a) Chromatogramme en phase gazeuse partiel (RIC ; GC-MS, IE, 70 eV) montrant la distribution des composés aliphatiques de la fraction F₁. F_x : acide monocarboxylique, D_x : diacide, W_x : α,ω -hydroxyacide. x : nombre d'atomes de carbone. (b) Chromatogramme de masse *m/z* 74 partiel (GC-MS, IE, 70 eV) montrant la distribution des acides gras de la fraction F₁. (c) Chromatogramme en phase gazeuse partiel (RIC ; GC-MS, IE, 70 eV) montrant la distribution des alcools gras libérés après traitement par LiAlH₄ des esters E1-E2 présents dans la fraction F_{1,2}. A_x : alcool avec x nombre d'atomes de carbone. Les alcools sont analysés sous forme d'acétates et les acides sous forme d'esters méthyliques. Programme B de température du four GC (cf. § 6.5.2).

Les esters des séries E₃ et E₄, quant à eux, pourraient correspondre à des produits formés par l'oxydation d'esters issus à l'origine de l'estérification entre triterpènes T₅₇ et T₅₈ et acides

gras insaturés issus de la subérine (Ekman, 1983 ; Ferreira et al., 2013) (Fig. 4.11). Ces esters se seraient ensuite dégradés pour conduire à la formation des esters des séries **E3** et **E4** soit pendant le traitement thermique, ou ultérieurement, durant le vieillissement de la matière organique (Fig. 4.11). En ce sens, il est intéressant de noter que les acides oléique et linoléique sont les acides gras insaturés prédominants de la subérine et ont révélé, lors des expériences d'autoxydation présentées dans le chapitre 2, la nette formation d'une distribution des diacides entre C₆-C₁₁, proche de celle observée pour les esters des séries **E3** et **E4**, avec la prédominance de l'acide azélaïque (C₉) majeur dans les deux séries (Fig. 4.10).

d) Mode de préparation du brai de bouleau archéologique

L'analyse par GC-MS de la substance organique provenant de la céramique I15 a permis de révéler une majorité de biomarqueurs de la série du lupane comprenant à la fois des composés naturellement présents dans l'écorce de bouleau, mais aussi, et surtout, des produits de dégradation thermique de ceux-ci, menant donc à son identification comme étant du brai de bouleau. Celui-ci ayant été trouvé le long d'une ancienne fissure de la céramique, il a très probablement été utilisé pour la réparer (Charters et al., 1993 ; Connan et al., 2000 ; Bosquet et al., 2001 ; Urem-Kotsou et al., 2002 ; Rageot et al., 2016). Toutefois, la distribution en triterpènes de cet enduit, mêlant un faible taux de bétuline **T54** et la prédominance des marqueurs d'altération/déshydratation, interroge sur son mode de fabrication et suggère l'utilisation de conditions thermiques particulièrement drastiques.

Comme présenté précédemment, de par le caractère très inflammable de l'écorce de bouleau, seuls les processus allothermiques, pouvant faire appel ou non à un système de séparation, sont susceptibles d'avoir été utilisés pour la fabrication de brai de bouleau. En l'absence de séparation, le goudron végétal fraîchement exsudé continue à être chauffé en présence de l'écorce de bouleau jusqu'à la fin du traitement thermique. Au contraire, dans le cas d'un système avec séparation, le brai exsudé tombe dans un contenant inférieur isolé du foyer, le protégeant ainsi d'altérations ultérieures induites par la chaleur. Il semblerait donc, du point de vue de la distribution observée dans notre échantillon caractérisée par la prédominance de produits d'altération thermique et la quasi-absence de bétuline **T54**, que celui-ci ait été préparé selon un procédé allothermique sans séparation, dont le plus connu est le système du « simple-pot », où le brai formé est soumis aux conditions thermiques les plus drastiques. Cette hypothèse serait en accord avec les résultats issus de la vaste étude moléculaire réalisée par Rageot et al. (2019) sur la production de brai de bouleau en méthodes « simple-pot » et

« double-pot ». Effectivement, seules les productions réalisées avec la méthode du « simple-pot » ont conduit à des taux de bétuline **T54** particulièrement bas.

e) Les esters de triterpènes **E1-E4** comme nouveaux biomarqueurs de brais de bouleau fortement chauffés

Jusqu'à présent, les esters de triterpènes dérivés de la bétuline, notamment ceux de la série **E1** décrite précédemment par Dudd et Evershed (1999), ont été considérés comme des marqueurs d'altération thermique impliquant un mélange entre de la graisse animale et du brai de bouleau. Cependant, en se basant sur le présent travail, il semblerait que ces composés puissent également provenir de réactions d'estérification impliquant des triterpènes issus de la famille de la bétuline provenant d'écorce de bouleau et des produits de dégradation thermique de subérine de bouleau (acides monocarboxyliques, diacides) libérés pendant la fabrication du brai de bouleau (Fig. 4.11). Ainsi donc, la génération des esters de triterpènes **E1-E4** irait dans le sens d'un processus de fabrication de brai de bouleau impliquant à la fois des températures élevées (formation prépondérante de Δ^2 -triterpènes) et un contact prolongé entre triterpènes et acides gras issus de la dégradation de la subérine de bouleau conduisant à leur estérification.

De ce fait, les esters **E1-E4** pourraient être considérés comme des indicateurs moléculaires de processus thermiques intenses se produisant pendant la préparation du brai de bouleau, comme ceux intervenant dans le procédé du « simple-pot ». Les réactions de condensation/estérification entre les alcools triterpéniques et les composés comportant au moins une fonction acide ont pu être favorisées par une catalyse acide (Dudd et Evershed, 1999), peut-être fournie par les phénols provenant de la pyrolyse de la lignine (Faix et al. 1990 ; Reunanen et al. 1996 ; Regert et al., 2006 ; Colombini et al., 2009b ; Orsini et al., 2015).

Il est intéressant de souligner qu'une étude récente (Urem-Kotsou et al., 2018) a également conduit à la détection des esters gras de triterpènes de la série **E1** dans des échantillons de brais archéologiques, ces composés ayant été interprétés, comme dans l'étude de Dudd et Evershed (1999), comme résultant d'un mélange entre du brai de bouleau et une graisse. Toutefois, les acides monocarboxyliques et les diacides à chaînes courtes et longues mis en évidence dans ces échantillons présentent également une distribution typique de celle de la subérine. Ceci pourrait donc indiquer que les esters de triterpènes identifiés dans l'étude de Urem-Kotsou et al. (2018) ont également été formés lors de la préparation du brai de bouleau par interaction entre produits de pyrolyse de la subérine et triterpènes, et ne seraient donc pas le résultat du mélange entre deux substances.

L'étude d'autres d'échantillons archéologiques et des expériences de production de brai de bouleau seront nécessaires à l'avenir pour clarifier les conditions dans lesquelles ces esters de triterpènes sont formés. Ces derniers représentent potentiellement de nouveaux outils moléculaires pour la distinction entre les différents modes de préparation des brais de bouleau, et pourront éventuellement se montrer spécifiques du système de préparation de brai sans séparation comme la méthode du « simple-pot ».

4.3.3. *Les autres échantillons archéologiques*

Nous avons analysé, par ailleurs, des résidus organiques échantillonnés sur d'autres céramiques, I26, I43, et Sd 299 dec 2, provenant également du site de la Rouvière. Les deux premières ont été découvertes dans l'enceinte de l'établissement (Fig. 4.2), tandis que la dernière a été trouvée à l'extérieur. Les résidus organiques présents sur ces céramiques sont situés le long de cassures pour I26 et I43, et dans un trou pour Sd 299 dec 2, s'apparentant donc à des substances organiques qui auraient été utilisées pour réparer ces céramiques.

La céramique n°5, quant à elle, a été retrouvée dans le secteur K inférieur de la grotte du Claux (Fig. 4.3 ; céramique en rouge). Celle-ci présente également un dépôt organique le long d'une fissure qui s'apparente à une substance également utilisée pour sa réparation.

L'analyse par GC-MS de ces quatre substances a révélé sans grande surprise la présence des mêmes triterpènes de la famille du lupane (e.g. **T54**, **T56**, **T57**) que ceux présents dans l'échantillon de la céramique I15, caractéristiques du brai de bouleau. Il existe toutefois certaines subtilités dans les distributions, qui permettent de classer ces brais en trois groupes :

- Le brai de l'échantillon présent sur la céramique I26 (Fig. 4.13a) est marqué, comme celui de la céramique I15, par une faible teneur en bétuline **T54** au profit des marqueurs de dégradation thermique comme les composés **T57** et **T58**, indiquant donc un chauffage intense lors de la production du brai. Il semblerait donc que, pour les raisons exposées dans la partie précédente (cf. § 4.3.2.d), celui-ci ait été préparé selon un système de production sans séparation comme celui dit du « simple-pot ».
- La substance organique de la céramique I43 (Fig. 4.13b) présente principalement des marqueurs de chauffe (**T57** et **T58**) issus de la bétuline **T54** et de la dihydrobétuline **T65** ici totalement absentes. Il doit donc s'agir d'un brai de bouleau particulièrement chauffé, proche du stade de la carbonisation, ce qui expliquerait l'absence totale des marqueurs issus de l'écorce de bouleau (e.g. bétuline **T54**) ainsi que celle de certains marqueurs d'altération (e.g. **T56**). Il est d'ailleurs intéressant

de remarquer que le seul marqueur présent en quantité importante est le composé **T58**, l'analogue saturé en position 20(29) de la Δ^2 bétuline **T57** et qui semble donc avoir particulièrement bien résisté à ces conditions de pyrolyse intense. Cette résistance avait d'ailleurs été proposée précédemment pour expliquer l'importance des dérivés saturés en position 20(29) de la Δ^2 bétuline dans le brai de bouleau de la céramique I15 (cf. § 4.3.2.a).

- Les dépôts organiques de la céramique Sd 299 dec 2 de la Rouvière, et de la céramique n°5⁹ du Claux présentent un taux de bétuline **T54** extrêmement important par rapport à ceux décrits jusque-là (Fig. 4.13c et d), et en conséquence une présence moindre des marqueurs d'altération comme la Δ^2 bétuline **T57**. On note également la présence plus importante de la bétulone **T55**, mais également l'apparition de l'acide bétulinique **T63** et de la lupénone **T66** jusque-là non observés. Parmi les produits à temps de rétention plus faibles en chromatographie gazeuse, on peut également noter la présence d'acides gras saturés, de diacides et d' α,ω -hydroxyacides dont la distribution est typique de produits de dégradation de la subérine (non représentés dans la figure 4.13). A cet égard, l'étude menée par Rageot et al. (2019) a révélé que l'association de ces acides gras avec l'acide bétulinique **T63** est un critère pour distinguer la préparation de brai de bouleau en « double-pot » par rapport à la méthode du « simple-pot ». Il semblerait donc, en nuancant les propos compte tenu de l'âge des échantillons qui datent du Néolithique, que les substances organiques de la céramique Sd 299 dec 2 et de la céramique n°5 aient été préparées selon un système faisant appel à la séparation de l'exsudat comme cela est le cas dans le procédé « double-pot ». Dans le cas de la substance organique de la céramique Sd 299 dec 2, il est intéressant de noter que l'analyse moléculaire suggère également l'utilisation du système « double-pot » sur le site de la Rouvière pour la production de brai de bouleau, à côté du système « simple-pot » précédemment proposé pour les échantillons provenant des céramiques I15 et I26.

⁹ Deux prélèvements ont été effectués sur la substance organique présente sur la céramique n°5 de la grotte du Claux mais se sont montrés extrêmement proches chimiquement. Nous ne décrivons donc que l'un des deux.

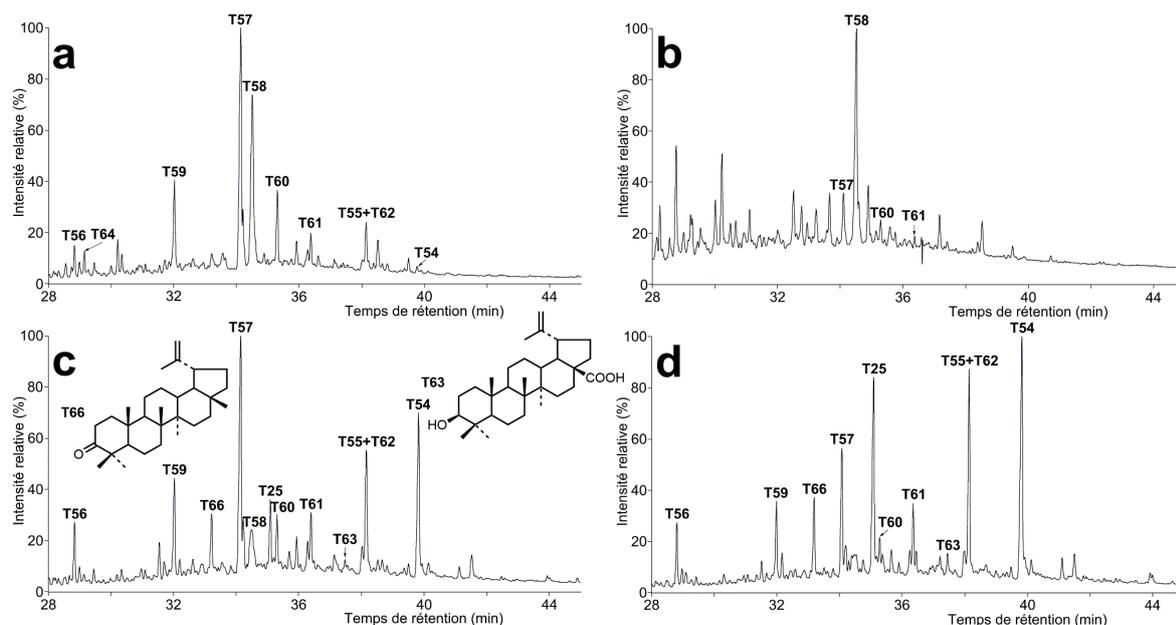


Figure 4.13 : Chromatogrammes en phase gazeuse partiels (GC-MS, IE, 70 eV) des extraits lipidiques de résidus organiques provenant des céramiques (a) I26, (b) I43, (c) Sd 99 dec 2, (d) n°5. Les alcools sont analysés sous la forme d'acétates et les acides sous la forme d'esters méthyliques. Les structures des composés numérotés sont représentées en Appendice. Programme B de température du four GC (cf. § 6.5.2).

4.4. Les brais de bouleau du site de Rosheim : adhésifs pour la fixation d'outils

4.4.1. Les échantillons du site archéologique de Rosheim

Des campagnes de fouilles menées par l'INRAP par C. Jeunesse puis par E. Boës à Rosheim entre 1996 et 2000 ont permis de mettre au jour une nécropole datant du Néolithique Moyen (4800-4700 BCE) comprenant 119 sépultures. A côté des défunts, un important mobilier a été découvert dans chaque tombe et, parmi celui-ci, un certain nombre d'outils lithiques présentant la trace d'une substance noire semblant correspondre à un adhésif utilisé pour fixer ensemble différents éléments en silex pour former une faucille. Cinq échantillons de cette substance nous ont été fournis (collaboration INRAP, Mme Chenal et Minni) pour en réaliser l'analyse moléculaire afin d'en déterminer la nature et l'origine biologique. Ces échantillons ont tous été prélevés sur des éléments de faucilles découvertes dans les tombes 39, 58, 91, 100 et 115 présentées en Figure 4.14.

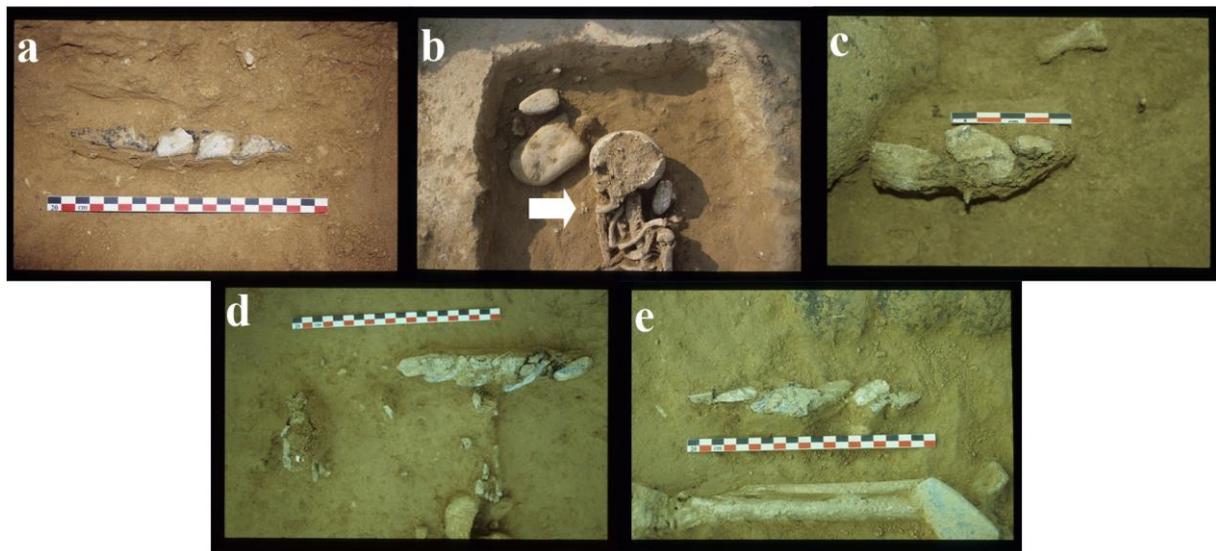


Figure 4.14 : Faucilles mises au jour dans les tombes (a) 39, (b) 58, (c) 91, (d) 100, (e) 115 de la nécropole du Néolithique Moyen localisée à Rosheim (source des photographies : INRAP).

4.4.2. Identification de brai de bouleau sur des outils lithiques du site de Rosheim

L'étude moléculaire par GC-MS de cette substance organique a révélé la présence de triterpènes de la famille du lupane, comme pour les échantillons des deux sites précédemment étudiés (Fig. 4.15). Nous trouvons notamment la bétuline **T54** en tant que composé majeur, le lupéol **T25**, la bétulone **T55** et la lupénone **T66**, tous caractéristiques d'écorce de bouleau. Sont également présents des marqueurs de transformation thermique des composés natifs de l'écorce de bouleau comme, par exemple, la Δ^2 bétuline **T57**, et des allobétulanes (e.g. **T59-T61**) menant de ce fait à l'identification de ces substances organiques comme étant du brai de bouleau. Cette substance a donc dû être utilisée comme adhésif pour fixer entre eux les éléments en silex des faucilles. De par les profils moléculaires dominés par les triterpènes natifs de l'écorce de bouleau (e.g. lupéol **T25**, bétuline **T54**), la présence de l'acide bétulinique **T63**, et des acides gras provenant de la subérine en traces, il semblerait que cette substance organique ait été préparée selon une méthode comprenant la séparation du brai du reste de l'écorce lors de la pyrolyse en utilisant le système du « double-pot ».

Par ailleurs, dans le cortège moléculaire des échantillons provenant des tombes 39, 91, 115, des composés diterpéniques, comme les acides déhydroabiétique **D4**, 7-oxodéhydroabiétique **D9**, et le composé **D22**, un dérivé hydroxylé en C-15 du composé **D9**, ont également été identifiés (Fig. 4.15a, 4.15c, 4.15e). Ces trois diterpènes sont formés par oxydation de l'acide abiétique **D1** (Regert et Rolando, 2002 ; Bailly, 2015 ; Popova et al., 2017), un diterpène

largement distribué dans les résines de conifères (Otto and Wilde, 2001), et particulièrement abondant chez les Pinacées (Otto et al., 2007). Ainsi, la présence des composés **D4**, **D9**, **D22** dans trois de nos échantillons indique clairement une contribution végétale issue de conifères en plus de celle de brai de bouleau, et il semblerait logique de proposer qu'un apport de résine ou de poix produite par pyrolyse de bois de conifère ait été effectué (Bailly, 2015). Par ailleurs, l'absence de marqueurs typiquement formés pendant la pyrolyse de bois de conifère (Robinson et al., 1987 ; Connan et Nissenbaum, 2003), comme par exemple le rétène **D23**, semble écarter la possibilité d'un ajout de poix au profit d'un apport de résine de conifère aux brais de bouleau dans le cas des échantillons provenant des tombes 39, 91, 115.

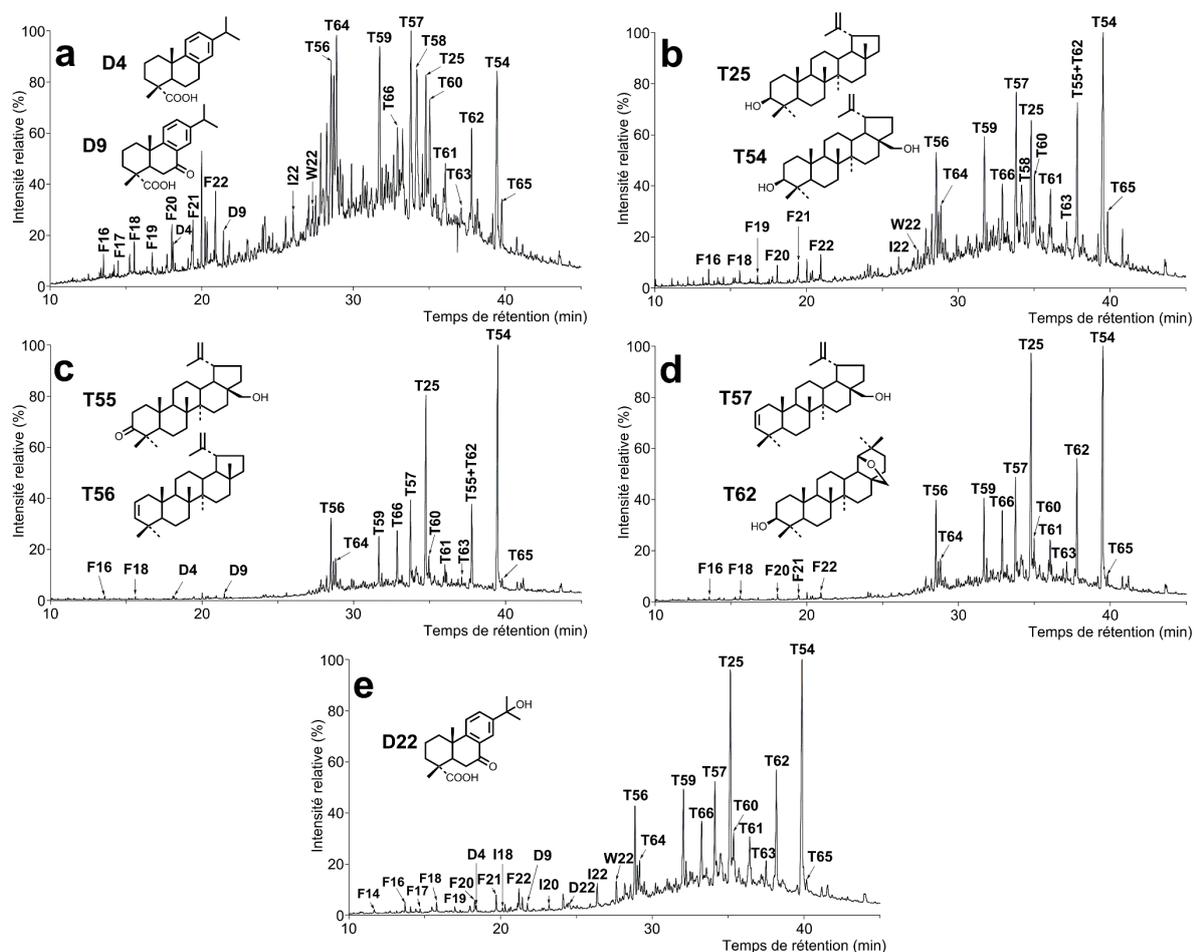


Figure 4.15 : Chromatogrammes en phase gazeuse partiels (GC-MS, IE, 70 eV) des extraits lipidiques des substances organiques provenant des objets lithiques des tombes (a) 39, (b) 58, (c) 91, (d) 100, (e) 115 du site de Rosheim. Les alcools sont analysés sous la forme d'acétates et les acides sous la forme d'esters méthyliques. Les structures des composés numérotés sont représentées en Appendice. Programme B de température du four GC (cf. § 6.5.2).

Des cas de mélanges entre brai de bouleau et une autre substance ont déjà été mis en évidence dans la littérature. Effectivement, le brai de bouleau a déjà été trouvé en mélange avec

de la graisse animale – encore que ce point soit discutable, comme nous l’avons détaillé précédemment – (Dudd et Evershed, 1999), de la cire d’abeille (Regert et al., 2003 ; Regert, 2004 ; Rageot et al., 2016), et même de la résine de conifère (Rageot et al., 2016 ; Courel et al., 2018). Ceci montre bien que cette pratique de mélange devait être assez courante et était pratiquée partout en Europe dans l’objectif de modifier certaines des propriétés du brai de bouleau comme par exemple son adhésivité ou sa malléabilité.

Dans notre étude, la présence des acides diterpéniques en très faibles quantités est problématique et pourrait simplement relever d’une contamination, liée par exemple à la réutilisation d’un récipient ayant contenu préalablement de la résine de conifère pour ensuite stocker le brai de bouleau. Il est également possible d’envisager, pour expliquer cette faible concentration en acides diterpéniques, que, dans un premier temps, la teneur en diterpènes était initialement plus élevée (notamment celle de l’acide abiétique **D1**) puis, après altération/oxydation, ceux-ci auraient été convertis en diterpènes oxygénés (notamment **D9** et **D22**). Ces derniers auraient par la suite été pratiquement intégralement éliminés par lessivage. De manière alternative, il est connu dans la littérature que les acides diterpéniques polymérisent facilement quand ceux-ci sont chauffés (Tirat et al., 2016). Cette dernière hypothèse pourrait donc expliquer également la faible teneur en diterpènes monomériques détectés. Une dernière piste envisageable serait simplement que l’apport de résine de conifère au brai de bouleau n’aurait été que très faible. Ainsi, au stade actuel, avec un corpus d’échantillons relativement réduit, il nous semble difficile d’établir le caractère intentionnel ou non de l’apport de résine au brai de bouleau. Cette même problématique a d’ailleurs été rencontrée précédemment au laboratoire (Courel, 2016 ; Courel et al., 2018).

4.5. Conclusion

L’analyse du contenu lipidique des différents échantillons archéologiques fournis pour cette étude a permis de déterminer qu’il s’agissait de brais de bouleau, qui auraient été utilisés pour la réparation de céramiques (échantillons des sites de la Rouvière et du Claux), mais également pour la confection d’outils (échantillons du site de Rosheim).

Outre les triterpènes de la série du lupane communément identifiés dans les brais de bouleau, nous avons également relevé, dans l’échantillon de la céramique I15, la présence inhabituelle de quatre séries d’esters de triterpènes dont trois étaient totalement inconnues dans la littérature. Ces séries, présentes dans l’échantillon archéologique le plus altéré de notre

corpus, pourraient correspondre à de nouveaux marqueurs potentiels de chauffe intense se formant pendant la préparation des brais de bouleau notamment à travers la méthode du type « simple-pot ». Une étude en archéologie expérimentale visant à la fabrication de brais de bouleau sera nécessaire afin de clarifier dans quelles conditions se forment ces composés.

Dans certains des échantillons de brais archéologiques analysés, il a également été relevé la présence à l'état de traces d'acides diterpéniques caractéristiques de l'apport d'une résine de conifère. Toutefois, il n'est pas possible d'établir le côté intentionnel ou non de cet apport aux différents brais archéologiques concernés. En ce sens, il serait intéressant, à l'avenir, d'analyser un corpus plus large d'échantillons de brais archéologiques afin de voir si cette particularité se généralise à un nombre plus important d'échantillons. Par ailleurs, pour confirmer ou infirmer l'apport de résine de conifères, il serait intéressant d'analyser la composante polaire des brais contenant des diterpènes. En effet, cette dernière est susceptible de contenir des composés macromoléculaires formés par polymérisation des constituants de la résine, et dont l'étude pourrait être appréhendée grâce à l'utilisation de techniques de dégradations chimiques sélectives.

ARTICLE SCIENTIFIQUE

Organic Geochemistry 139 (2020) 103944



Contents lists available at ScienceDirect

Organic Geochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/orggeochem

Betulin-related esters from birch bark tar: Identification, origin and archaeological significance

Julien Perthuison^a, Philippe Schaeffer^{a,*}, Pauline Debels^b, Philippe Galant^c, Pierre Adam^a^aUniversity of Strasbourg, CNRS – UMR 7177, Strasbourg, France^bUniversity Paul Valéry Montpellier 3 – UMR 5140 and UMR 8215, Montpellier and Paris, France^cRegional Service of Archaeology – Occitania, Montpellier, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 July 2019

Received in revised form 13 September 2019

2019

Accepted 8 October 2019

Available online 25 October 2019

Keywords:

Archaeology
 Birch bark tar
 Lupane-related triterpenoids
 Triterpenoid esters
 Neolithic

ABSTRACT

Birch bark tar, an organic material frequently encountered during archaeological excavations, has been identified from its lipid composition on the cracks of a ceramic dated to the late Neolithic. Lipids of this black substance were dominated by a characteristic triterpenoid assemblage of lupane-related triterpenoids from birch bark, together with their thermal degradation products formed during preparation of the tar. Among the latter, four main series of unusual triterpenoid esters have been detected and were postulated to correspond to esters of Δ^2 -betulin and Δ^2 -dihydrobetulin based on their mass spectra and hydrolysis experiments. Their conclusive identification has been achieved by synthesis of reference compounds. These compounds most likely originate from the esterification between triterpenoid alcohols related to betulin and fatty acids from suberin formed upon heating of birch bark tar. They could be considered as markers of intense heating during birch bark tar preparation using the “single pot” procedure.

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Natural plant resins and resinous materials have played an important role in the daily life of humans since ancient times, explaining their frequent occurrence at archaeological sites. Among them, birch bark tar is a vegetal substance produced by dry distillation of birch bark (Aveling and Heron, 1998; Urem-Kotsou et al., 2002; Rageot et al., 2016; Courel et al., 2018). This sticky and hydrophobic material has been used since the Paleolithic (Koller et al., 2001; Grünberg, 2002) for various purposes, such as the hafting of lithic tools or jewellery (Sauter et al., 2000; Bosquet et al., 2001; Koller et al., 2001; Courel et al., 2018), the repairing or caulking of ceramics (Charters et al., 1993; Connan et al., 2000; Bosquet et al., 2001; Rageot et al., 2016; Reunanen et al., 1993; Urem-Kotsou et al., 2002), the decorating of ceramic vessels (Vogt, 1949) and has even been used as chewing-gum (Aveling and Heron, 1999; Karg et al., 2014). Birch bark tar has a typical molecular composition, making it easy to identify by detection of predominant lupane-related triterpenoids using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC–MS: Hayek et al., 1989, 1990; Reunanen et al., 1996; Aveling and Heron, 1998; Schnell et al., 2014).

As part of a study dedicated to the use of pottery during the Neolithic, we have investigated an organic black substance having most likely served to repair different ceramics (Fig. 1), found at the site of La Rouvière (Rogues, Gard, Occitania, Southern France) and dated to the late Neolithic (ca. 3000 BCE). GC–MS analysis of this substance led to its identification as birch bark tar. Along with typical triterpenoid markers from the lupane series, four series of late eluting uncommon compounds were detected. Based on MS interpretations, they were postulated to correspond to triterpene esters of monocarboxylic or dicarboxylic acids. One of this compound series was previously reported to occur in birch bark tar samples from Roman archaeological sites in Great Britain, but the identification, based on interpretations of mass spectra and hydrolysis experiments, remained tentative (Dudd and Evershed, 1999). We report here the conclusive identification of the four series of compounds by synthesis of one homologue of each series. Their origin and significance with regard to the mode of preparation of the organic material are discussed.

2. The archaeological site of La Rouvière

The site of La Rouvière corresponds to a settlement unearthed in the city of Rogues (Southern France). It was discovered in 1989 by J. Halgand and colleagues (members of the «Groupe de Recherches et d'Explorations Souterraines du Vigan») and exca-

* Corresponding author.

E-mail address: p.schaeff@unistra.fr (P. Schaeffer).

Chapitre 5

Conclusion générale

Le travail réalisé au cours de cette thèse a été consacré en grande partie à la problématique de l'altération des substances organiques rencontrées en contexte archéologique, que ce soit lors de leur préparation (chauffage, mélange de substances...) ou au cours du vieillissement naturel. Notre objectif était de donner des clés analytiques et expérimentales pour étudier et comprendre les processus d'altération mis en jeu, d'identifier de nouveaux outils moléculaires pour caractériser la nature des processus subis par les matériaux organiques archéologiques et d'interpréter l'impact de ces processus sur les signatures moléculaires de ces matériaux. Deux axes majeurs ont ainsi été développés : (1) une approche expérimentale visant à simuler l'altération par autoxydation de différentes substances organiques seules ou en mélanges, et (2) une approche analytique consistant en l'identification de substances organiques trouvées en contexte archéologique, et à en étudier les processus d'altération. Nous voudrions donc conclure ce travail de thèse en dressant un bilan des principaux résultats obtenus et en éclaircissant les perspectives futures qui en découlent.

- **Etude expérimentale par autoxydation artificielle de substrats organiques seuls ou en mélange**

En premier lieu, nos travaux se sont intéressés au problème de la perte sélective d'une partie des constituants des substances naturelles archéologiques par altération, entraînant donc une perte d'information sur des ingrédients éventuellement utilisés par le passé. Une étude bibliographique, présentée en chapitre 1, a mis en évidence que les produits de condensation entre ingrédients (i.e., formation de dimères, oligomères, macromolécules) pouvaient préserver ces constituants sous forme liée et, de ce fait, correspondre à des composés d'intérêt à étudier en complément de l'identification des composés libres. Nos recherches se sont donc concentrées sur ces constituants à travers l'étude de leur voie de formation et de leur capacité à préserver des molécules sensibles aux processus d'altérations (cf. § Chapitre 2). Pour ce faire, nous avons développé un protocole expérimental de vieillissement en laboratoire par autoxydation, processus d'altération bien connu pour être à l'origine de la polymérisation de nombreuses substances organiques. Ce protocole a ensuite été utilisé pour altérer par autoxydation une huile essentielle de cèdre de l'Atlas, et comparer les produits ainsi obtenus à ceux identifiés dans des résidus organiques provenant de vases découverts à Abydos et datant des premières dynasties égyptiennes (3100-2700 BCE). Ainsi, la formation en laboratoire des mêmes sesquiterpènes aromatiques et oxygénés issus de la dégradation des sesquiterpènes de

la série des himachalènes a été observée, ce qui a permis de confirmer la pertinence de notre protocole d'autoxydation artificielle pour simuler de manière accélérée l'autoxydation.¹⁰

En continuité de ces travaux réalisés à partir de l'huile essentielle de cèdre de l'Atlas, l'étude des processus de vieillissement subis par des matériaux organiques archéologiques a été poursuivie à l'aide du même protocole d'altération par autoxydation mais à partir de mélanges de substances organiques susceptibles d'avoir été utilisées en contexte archéologique. Ces mélanges ont compris des dérivés estérifiés d'acides gras insaturés (représentant un modèle simplifié de triglycérides) et de substances terpéniques (huile essentielle de baies de genévrier et résine de pin sylvestre). Les produits d'oxydation formés ont été identifiés par GC-MS, et leurs voies de formation à partir des constituants originels ont été reconstruites. Cependant, aucun produit issu de réactions croisées entre acides gras et terpénoïdes directement analysable en GC-MS n'a été formé, ou, tout au moins, identifié. Ces expériences ont toutefois conduit à la formation de substances polaires, de nature macromoléculaire. Ces dernières, dont l'analyse directe par GC-MS n'est pas possible, ont été étudiées à l'aide de réactions de dégradation chimique de coupure des liaisons peroxydes (NaBH_4), esters ou éthers (acide iodhydrique puis LiAlH_4), réactions employées seules ou en séquence. Il est ainsi apparu que les substances polaires formées lors d'expériences réalisées avec un mélange de résine et de dérivés d'acides gras insaturés sont de nature oligo/polymérique et sont vraisemblablement issues de processus faisant intervenir des réactions croisées. En effet, différents composés dérivés de produits d'oxydation d'acides gras insaturés et de constituants de résines ont été libérés suite au traitement par NaBH_4 (sous-unités analysables par GC-MS) et ont permis de démontrer la présence de sous-unités liées, au moins partiellement, par des liaisons peroxydes dans les structures macromoléculaires. Dans le cas de l'oxydation d'un mélange entre ester d'acide gras di-insaturé et résine de pin sylvestre, l'application, en séquence, d'une réaction de dégradation des liaisons peroxydes (NaBH_4), suivie par celle de liaisons éthers/esters (HI/LiAlH_4) de composés polaires a conduit à la libération exclusive après traitement par HI/LiAlH_4 de dérivés terpéniques. L'absence de dérivés issus de l'ester d'acide gras insaturé pourrait être due au fait

¹⁰ (a) Sarret, M., Adam, P., Schaeffer, P., Ebert, Q., Perthuisson, J., Pierrat-Bonnefois, G., 2017. Organic substances from Egyptian jars of the Early Dynastic period (3100-2700 BCE): Mode of preparation, alteration processes and botanical (re)assessment of "cedrium3. *Journal of Archaeological Science: Reports* 14, 420-431.

(b) Ebert, Q., Sarret, M., Perthuisson, J., Adam, P., Schaeffer, P., Pierrat-Bonnefois, G., 2017. Organic substances from a Thinite jar: identification and simulation of ageing processes. *28th International Meeting on Organic Geochemistry*, 17-22 Septembre 2017, Florence, Italie.

(c) Perthuisson, J., Ebert, Q., Sarret, M., Adam, P., Schaeffer, P., Pierrat-Bonnefois, G., 2018. Résidus organiques provenant d'un vase datant des premières dynasties égyptiennes: identification et simulation de processus de vieillissement. *4^{ème} Réunion des Géochimistes Organiciens*, 10-11 Juillet 2018, Lyon, France.

que ces derniers sont liés par des liaisons trop nombreuses ou de nature différente (C-C) qui n'ont pu être libérées par les réactifs de coupure employés.

Les travaux réalisés montrent ainsi le potentiel de l'analyse par dégradation chimique sélective des structures macromoléculaires constituant une part non négligeable des matériaux organiques archéologiques, même altérés. En effet, ces structures peuvent receler une information moléculaire concernant les substances naturelles originelles mises en œuvre, substances dont les marqueurs moléculaires caractéristiques ont éventuellement été perdus lors du vieillissement en raison de leur volatilité ou de leur sensibilité aux processus d'altération.

▪ Etude moléculaire de substances organiques archéologiques

A côté de l'approche expérimentale visant à étudier les processus de vieillissement de substances organiques en laboratoire, une approche plus conventionnelle portant sur l'étude de substances organiques archéologiques a été réalisée. L'objectif était double : identifier la nature et l'origine géographique de ces substances, et étudier les voies d'altérations anthropiques ou naturelles et leur impact sur le profil moléculaire originel de ces substances.

Ainsi, des échantillons organiques de type résine issus de la cargaison de deux épaves asiatiques datant du XII^{ème} siècle découvertes lors de fouilles archéologiques sur la côte est de la Malaisie et la côte nord-ouest de l'Indonésie ont été étudiés (cf. § Chapitre 3). Ces substances ont été identifiées comme étant des résines provenant des Dipterocarpaceae appartenant au genre botanique *Shorea*, aussi connues sous le nom de dammars, sur la base de la distribution des composés triterpéniques appartenant aux séries de l'oléanane, de l'ursane, et du dammarane. Ces résines se sont révélées également avoir subi des processus d'altération en conditions anaérobies liées à leur enfouissement en milieu sédimentaire à la suite du naufrage. La structure de certains composés issus de ces processus d'altération n'étant pas connue, ils ont fait l'objet d'isolement (partiel) et de traitement par hydrogénation en vue de les identifier. Ainsi, une structure a notamment pu être partiellement identifiée comme étant un produit d'altération de triterpènes de la famille du diptérocarpol, constituant donc un nouveau biomarqueur d'altération des résines de Dipterocarpaceae.¹¹

¹¹ (a) Perthuisson, J., Adam, P., Schaeffer, P., Flecker, M., 2018. Chemical investigation of two resins from shipwrecks found in Indonesia. 8th International Symposium on Biomolecular Archaeology, 18-21 Septembre 2018, Jena, Allemagne.

(b) Perthuisson, J., Adam, P., Schaeffer, P., Flecker, M., 2018. Analyse moléculaire de résines provenant de deux épaves asiatiques du XII^{ème} siècle. 4^{ème} Réunion des Géochimistes Organiciens, 10-11 Juillet 2018, Lyon, France.

Une seconde étude archéologique a porté sur l'identification d'un corpus de dépôts carbonés trouvés sur six céramiques réparties sur trois sites datant du Néolithique final (3000 BCE), ainsi que sur des résidus de colles présents sur des outils lithiques du Néolithique moyen (4800-4700 BCE). L'étude moléculaire des dépôts carbonés présents sur les céramiques nous a permis de révéler la présence de nombreux dérivés triterpéniques de la série de la bétuline. Ceci a conduit à identifier ces dépôts organiques comme étant du brai de bouleau, un goudron produit par pyrolyse d'écorce de bouleau qui a vraisemblablement été utilisé comme colle pour la réparation des céramiques. Les distributions moléculaires atypiques de ces composés, caractérisées par la prédominance de produits issus de réactions d'élimination ou de réarrangement ayant affecté les triterpénoïdes originels de l'écorce de bouleau, montrent que ces matériaux ont été soumis à un stress thermique particulièrement intense pendant leur préparation. Par ailleurs, parmi les structures identifiées, nous avons mis en évidence des composés mixtes (adduits) formés par estérification entre triterpènes altérés apparentés à la bétuline et acides gras ou diacides issus de l'autoxydation d'acides gras insaturés. L'identification de ces structures a été confirmée par synthèse de composés de référence au laboratoire. D'après la distribution des acides et diacides liés aux triterpènes, il apparaît que la formation de ces composés est liée au chauffage intense subi par l'écorce de bouleau lors de la préparation du brai. En effet, ce chauffage aurait conduit à l'estérification entre produits d'altération de la bétuline et acides gras libérés par le traitement thermique de la subérine, un constituant polymérique de l'écorce comprenant des sous-unités aliphatiques. Les esters de diacides carboxyliques auraient ensuite été formés par oxydation au cours du temps des esters d'acides gras insaturés associés aux triterpènes. Cette nouvelle série de composés représente de nouveaux biomarqueurs potentiels de chauffage intense, comme celui intervenant dans la méthode dite du « simple-pot » lors de la préparation du brai de bouleau.¹²

En terme de perspectives, ce travail de thèse a permis de mettre en lumière l'intérêt d'étudier les fractions macromoléculaires susceptibles d'être présentes sur des objets archéologiques. Il serait donc utile à l'avenir de mettre en œuvre ce type d'études dans le cadre de l'archéologie moléculaire. Les expériences d'altération en laboratoire s'avèrent être également un outil puissant qui mériterait d'être plus largement employé dans le domaine de l'archéologie

¹² (a) Perthuisson, 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.

(b) Perthuisson, J., Schaeffer, P., Adam, P., Debels, P., Galant, P., **2019**. Identification of betulin-related esters in archaeological birch bark tar: origin and significance. *29th International Meeting on Organic Geochemistry*, 1-6 Septembre 2019, Gothenburg, Suède.

moléculaire. En effet, nous avons vu qu'il est possible de conforter les hypothèses élaborées quant à l'origine de certaines molécules sévèrement altérées via ce type de simulations d'autoxydation accélérée.

Chapitre 6

Partie expérimentale

6.1. Traitement géochimique des échantillons

6.1.1. Précautions particulières

Les analyses effectuées dans le cadre de cette thèse ont concerné des quantités souvent faibles de composés organiques. Ainsi, afin d'éviter toute contamination, notamment par les plastifiants (présence de phtalates), un certain nombre de précautions ont été prises :

- Tous les solvants utilisés sont redistillés puis conservés dans des bouteilles en verre soigneusement lavées et fermées avec une feuille d'aluminium.
- La verrerie est systématiquement lavée à l'eau, séchée à l'acétone, puis rincée au CH_2Cl_2 redistillé.
- Tout le matériel (pipettes, silice, célite, sable, coton) est nettoyé au CH_2Cl_2 dans un soxhlet. La silice, quant à elle, est ensuite séchée à l'air, sous sorbonne, puis activée dans une étuve à 120 °C pendant 12 heures.
- Tous les échantillons traités sont conservés au congélateur à -20 °C.

6.1.2. Protocole général de traitement de la matière organique lipidique

a) Extraction

La matière organique lipidique des échantillons est extraite au moyen d'un mélange de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1, v/v) à l'aide d'un bain à ultra-sons, suivi d'une filtration sur célite puis de l'élimination des solvants sous pression réduite. Tout ou partie de l'extrait organique est ensuite soumis successivement à deux étapes de dérivation (cf. § 6.1.2.b).

b) Dérivation

- Acétylation

Dans un premier temps, les alcools sont acétylés en ajoutant à l'échantillon, préalablement évaporé à sec sous flux d'argon, un mélange comprenant 1 mL de pyridine et 1 mL d'anhydride acétique. Ce mélange est ensuite laissé à 60 °C dans un four pendant 2 heures. Le solvant et l'excès de réactif sont ensuite évaporés sous pression réduite en ajoutant du CH_3OH , ce qui permet d'éliminer l'excès d'anhydride acétique, et du toluène, qui aide à entraîner la pyridine.

De manière alternative, les alcools sont acétylés, en ajoutant à l'échantillon solubilisé dans du CH_2Cl_2 environ 1 mL d'anhydride acétique et 20 μL de N-méthylimidazole (catalyseur). Le

mélange est laissé à température ambiante pendant 30 min. Le solvant et les réactifs sont ensuite évaporés sous pression réduite en ajoutant du CH₃OH et du toluène.

- Estérification par le diazométhane

Dans un second temps, les acides sont méthylés avec l'ajout d'environ 1 mL d'une solution étherée de diazométhane à l'échantillon dissous dans du CH₂Cl₂. Ce mélange est ensuite laissé 30 min à température ambiante puis évaporé sous flux d'argon afin d'éliminer le diazométhane résiduel ainsi que le solvant.

c) Dérivation des fonctions acides et/ou alcools par le N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA)

Dans certains cas, un autre protocole de dérivation a été mis en place pour la dérivation des acides et/ou des alcools.

A l'échantillon, éventuellement solubilisé dans deux gouttes de pyridine, sont ajoutées une dizaine de gouttes de BSTFA avec 1% de TMCS. L'ensemble est ensuite placé au four à 70 °C pendant 2 heures, puis évaporé à sec sous flux d'argon, resolubilisé dans un solvant organique puis analysé par GC-FID et GC-MS.

d) Fractionnement global

L'extrait dérivé est solubilisé et fractionné sur colonne de silice sèche, permettant l'obtention d'une fraction apolaire (élution avec un mélange CH₂Cl₂/AcOEt, 8:2 v/v, 3 volumes morts -V₀-) et d'une fraction plus polaire (CH₂Cl₂/CH₃OH 1:1 v/v, 2 V₀). La fraction apolaire est ensuite analysée par GC-FID puis GC-MS.

6.2. Expériences de dégradation par autoxydation

6.2.1. Préparation des substrats de départ

L'oléate de butyle **I1**, le linoléate de butyle **I6** et le linoléate de méthyle **I5** sont préparés par traitement de l'oléate de méthyle (200 mg) ou de l'acide linoléique (200 mg) avec HCl/BuOH (1,33M ; 2 mL) ou HCl/CH₃OH (1,33M ; 2 mL) dans un tube à essai muni d'un bouchon étanche possédant un joint en téflon. Le tube est placé dans un four à 110 °C (HCl/BuOH) ou 70 °C (HCl/CH₃OH) pendant environ 7 heures. Après retour à température ambiante, le solvant est évaporé sous pression réduite et le mélange réactionnel fractionné sur

colonne de silice sèche (élution avec du CH₂Cl₂; 2 V₀). Les esters sont obtenus avec un rendement de 75 % pour l'oléate de butyle **II** et 94% pour les esters de linoléate.

6.2.2. Protocole général d'autoxydation A

Dans un tube à essai muni d'un bouchon étanche possédant un joint en téflon sont placés 15 mg d'huile essentielle de cèdre de l'Atlas, 15 mg de N-hydroxyphthalimide (NHPI), 100 µL d'une solution d'acétylacétonate de cobalt Co(acac)₂ (20 mg/mL) dans AcOH ou CH₃CN (selon le solvant utilisé pour la réaction), puis 2,9 mL d'AcOH ou de CH₃CN et 100 µL d'H₂O sont ajoutés. Le tube est ensuite purgé avec de l'oxygène, fermé de manière étanche puis mis dans un four à 70 °C. Les substrats et les quantités de réactifs et de solvant mis en œuvre dans les expériences d'autoxydation selon le protocole A sont présentés dans le Tableau 6.1. Des prélèvements de 0,5 mL sont effectués à 20, 42 et 92 h. Chaque prélèvement est extrait avec du pentane après adjonction d'eau distillée. La phase organique est analysée par GC-FID et GC-MS sans traitement additionnel ou après méthylation des fonctions acides (cf. § 6.1.2.b). Une seconde extraction du brut réactionnel est effectuée avec 3 mL de CH₂Cl₂ après adjonction de 3 mL d'eau distillée. La phase organique obtenue est alors méthyliée (cf. § 6.1.2.b) puis analysée par GC-FID et GC-MS.

Tableau 6.1 : Substrats et quantités de réactifs et de solvants mis en œuvre lors des expériences de vieillissement par autoxydation selon le protocole A

Substrat	Cèdre ^a	Cèdre ^a
NHPI	15 mg	15 mg
Co(acac) ₂	2 mg	2 mg
Solvant	CH ₃ CN	AcOH

^a : huile essentielle de cèdre de l'Atlas

6.2.3. Protocole général d'autoxydation B

Ces expériences d'autoxydation sont réalisées dans un tube à essai muni d'un bouchon étanche possédant un joint en téflon dans lequel ont été mis le substrat à oxyder, du NHPI, une solution de Co(acac)₂, CH₃CN comme solvant et H₂O dans certains cas. La nature des substrats et les quantités de réactifs et de solvant mises en œuvre pour les expériences d'autoxydation réalisées selon le protocole d'autoxydation B sont résumées dans le Tableau 6.2. Le tube est ensuite purgé avec de l'oxygène (renouvelé toutes les 24 h), fermé de manière étanche puis chauffé à 70 °C.

Dans le cas des expériences 1 à 4, un prélèvement de 1 mL est effectué au bout de 20 h. Ce prélèvement est extrait avec du CH_2Cl_2 après ajout d'eau distillée. La phase organique obtenue est dérivée selon le protocole décrit précédemment (cf. § 6.1.2.b) et analysée par GC-FID et GC-MS sans séparation préalable. La phase organique obtenue à partir de l'expérience 1 est également analysée sans dérivation par GC-FID et GC-MS.

Pour les expériences 5 et 6, 12 prélèvements de 10 μL sont effectués à intervalles de temps réguliers sur 286 h. Les différents prélèvements sont ensuite dérivés (cf. § 6.1.2.b) et analysés par GC-FID et GC-MS sans séparation préalable. Un ajout d'initiateurs (NHPI, $\text{Co}(\text{acac})_2$) et de CH_3CN est réalisé dans le cas où les profils moléculaires n'ont pas évolué entre deux prélèvements.

Tableau 6.2 : Substrats et quantités de réactifs et de solvants mis en œuvre lors des expériences de vieillissement par autoxydation selon le protocole B. « % » : pourcentage molaire par rapport aux substrats.

	1	2	3	4	5	6
Substrat 1	Genévrier ^a 15 mg	I1 15 mg	I1 15 mg	I1 30 mg	I1 115 mg	I1 61 mg
Substrat 2	X	X	Genévrier ^a 15 mg	Genévrier ^a 30 mg	X	Genévrier ^a 61 mg
NHPI	15 mg	15 mg	15 mg	20% (10 mg)	3% (1,66 mg)	3% (3 mg)
$\text{Co}(\text{acac})_2$	2 mg	2 mg	2 mg	2% (0,8 mg)	0,3% (0,26 mg)	0,3% (0,5 mg)
CH_3CN (au total)	3 mL	3 mL	3 mL	3 mL	100 μL	200 μL
H_2O	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	X	X

^a : huile essentielle de baies de genévrier

6.2.4. Protocole général d'autoxydation C

Ces expériences d'autoxydation sont réalisées dans un tube à essai muni d'un bouchon étanche possédant un joint en téflon dans lequel ont été mis le substrat à oxyder, du NHPI, une solution de $\text{Co}(\text{acac})_2$ et CH_3CN comme solvant. La nature des substrats et les quantités de réactifs et de solvant mises en œuvre pour les expériences d'autoxydation réalisées selon le protocole C sont résumées dans le Tableau 6.3. Le tube est ensuite purgé avec de l'oxygène (renouvelé toutes les 24 h), fermé de manière étanche puis chauffé à 70 °C.

Dans le cas des expériences 1 à 3, des prélèvements de 40 µL sont effectués au bout de 20 et 44 h et sont dilués dans 1 mL de CH₂Cl₂. De ces solutions, un aliquote de 300 µL est prélevé, puis dérivé au diazométhane (cf. § 6.1.2.b) et au BSTFA (cf. § 6.1.2.c) avant d'être analysé en GC-FID et GC-MS.

Pour l'expérience 4, un prélèvement de 400 µL est effectué au bout de 24 h. La moitié de celui-ci est dérivée, fractionnée et analysée par GC-FID et GC-MS (cf. § 6.1.2).

Dans le cas de l'expérience 5, des prélèvements de 0,5 mL sont réalisés au bout de 24, 48 et 96 h. 150 µL de ceux-ci sont dérivés, fractionnés et analysés en GC-FID et GC-MS (cf. § 6.1.2).

Les expériences 6 à 8 ont été plus spécifiquement réalisées pour étudier les fractions polaires/macromoléculaires formées. De par les quantités importantes de substrats à oxyder, le substrat et les réactifs ont été répartis dans 4 tubes à essais munis d'un bouchon étanche possédant un joint en téflon afin d'éviter un défaut en oxygène (renouvelé au bout de 24 h). Après 48 h d'expérience d'autoxydation, les échantillons ont été dérivés et fractionnés (cf. § 6.1.2). Les fractions apolaires obtenues ont été analysées par GC-FID et GC-MS, tandis que les fractions polaires ont été traitées selon le protocole décrit ci-après (cf. § 6.2.6).

Tableau 6.3 : Substrats et quantités de réactifs et de solvants mis en œuvre lors des expériences de vieillissement par autoxydation selon le protocole C. « % » : pourcentage molaire par rapport aux substrats.

	1	2	3	4	5	6	7	8
Substrat 1	I5 (100 mg)	I5 (50 mg)	I6 (50 mg)	Résine ^b (28 mg)	I5 (26 mg)	I5 (100 mg)	Résine ^b (100 mg)	I5 (100 mg)
Substrat 2	X	Genévrier ^a (50 mg)	Genévrier ^a (50 mg)	X	Résine ^b (25 mg)	X	X	Résine ^b (100 mg)
NHPI	60% (33,3 mg)	60% (52,7 mg)	60% (50,6 mg)	60% (8,6 mg)	60% (17 mg)	60% (33,5 mg)	60% (33,4 mg)	60% (66,6 mg)
Co(acac) ₂	6% (5,3 mg)	6% (8,3 mg)	6% (8 mg)	6% (1,36 mg)	6% (2,66 mg)	6% (5 mg)	6% (5 mg)	6% (10 mg)
CH ₃ CN (au total)	400 µL	400 µL	400 µL	3 mL	3 mL	12 mL	12 mL	12 mL

^a : huile essentielle de baies de genévrier ; ^b : Résine de pin sylvestre

6.2.5. Réduction des liaisons peroxydes par NaBH_4

Une partie des prélèvements provenant des expériences d'autoxydation des substrats organiques a été traitée par NaBH_4 afin de libérer les sous-unités lipidiques liées par des liaisons peroxydes.

Pour cela, l'échantillon à traiter est transféré dans un ballon puis le solvant est évaporé sous pression réduite. La quantité (en poids) de NaBH_4 ajoutée correspond à 10 fois celle de l'échantillon. L'ensemble est alors solubilisé dans un mélange d'éther éthylique (3 mL) et de toluène (2 mL). Le montage est ensuite placé sous argon et agitation pendant 30 min à température ambiante. 10 mL de HCl 0,5 N sont alors ajoutés afin d'éliminer l'excès de réactif. L'ensemble est évaporé sous pression réduite afin d'éliminer les solvants. Le brut réactionnel est transféré dans une ampoule à décanter, et 2 mL de CH_2Cl_2 y sont ajoutés. La phase CH_2Cl_2 est récupérée, lavée à l'eau distillée (1 x) puis le solvant est évaporé sous flux d'argon et dérivé selon le protocole décrit ci-dessus (cf. § 6.1.2.b). Dans certains cas, un fractionnement sur colonne de silice sèche de l'échantillon est effectué selon le protocole décrit auparavant (cf. § 6.1.2.d). La fraction apolaire ainsi obtenue est analysée par GC-FID et GC-MS.

6.2.6. Dégradation chimique séquentielle des constituants macromoléculaires

Afin d'étudier les sous-unités constituant les macromolécules présentes dans les fractions polaires formées par autoxydation (protocole C, cf. § 6.2.4), une série de réactions de dégradation a été mise en place afin de procéder à la coupure successive des liaisons peroxydes, esters et éthers, pour libérer les sous-unités lipidiques, qui peuvent alors être analysées par GC-MS.

Les fractions polaires récupérées après les expériences d'autoxydation sont dans un premier temps traitées avec NaBH_4 selon un protocole légèrement différent de celui décrit précédemment (cf. § 6.2.5). La fraction polaire est transférée dans un ballon puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Du THF (5 mL) et un excès de NaBH_4 (10 fois en poids par rapport au substrat) sont alors ajoutés. Le montage est laissé sous air et le mélange est agité pendant 30 min à température ambiante. Le mélange est ensuite transféré dans un ballon de 100 mL et est acidifié avec une solution aqueuse d'HCl (1 N) jusqu'à l'obtention d'un pH de 1 puis le THF est éliminé sous pression réduite. Le résidu aqueux est transféré dans une ampoule à décanter et est extrait 3 fois avec du CH_2Cl_2 puis 1 fois avec de l'AcOEt. Les phases organiques sont regroupées et évaporées sous pression réduite. L'extrait organique est ensuite solubilisé dans de l'AcOEt, lavé à l'eau (x 1), puis le solvant est éliminé sous pression réduite. 1 à 2 mg

de cet extrait sont prélevés, puis sont dérivés avec du BSTFA selon le protocole décrit précédemment (cf. § 6.1.2.c) et analysés par GC-FID et GC-MS. Le mélange réactionnel résiduel est dérivé et fractionné comme décrit dans les paragraphes 6.1.2.b et d.

Pour couper les liaisons ester et éther, les fractions polaires obtenues par fractionnement sur colonne de silice (cf. § 6.1.2.d) après traitement au NaBH₄ sont traitées par de l'acide iodhydrique (HI_{aq.}, 57 %). Pour cela, l'échantillon est transféré en solution dans un tube à essai muni d'un bouchon étanche possédant un joint en téflon, puis le solvant est évaporé sous flux d'argon. 3 mL d'une solution aqueuse de HI sont ajoutés et l'ensemble est placé dans un four à 110 °C pendant 6 h 30. Le mélange est ensuite transféré dans une ampoule à décanter et, après ajout d'eau distillée, est extrait avec du CH₂Cl₂ (x 3). Les phases organiques regroupées sont ensuite lavées une fois à l'eau, puis évaporées sous pression réduite dans un ballon. A l'extrait solubilisé dans du THF est ajouté du LiAlH₄ préalablement lavé avec du cyclohexane. L'ensemble est placé sous argon et mis à reflux sous agitation pendant environ 1 h. Après retour à température ambiante, l'excès de réactif est détruit en transférant progressivement le milieu réactionnel dans de l'eau. L'ensemble est alors placé dans une ampoule à décanter et extrait avec du CH₂Cl₂ (x 3). Les phases organiques regroupées sont ensuite lavées à l'eau et évaporées sous pression réduite. L'extrait organique obtenu est acétylé et fractionné selon les protocoles décrits auparavant (cf. 6.1.2.b et d) et analysé par GC-FID et GC-MS.

6.3. Analyse des résines de Dipterocarpaceae

Un protocole spécifique de purification chromatographique a été développé pour l'étude moléculaire des résines archéologiques de Dipterocarpaceae.

6.3.1. Etude des terpènes volatils

Un protocole spécifique d'extraction et de purification chromatographique a été développé pour l'étude moléculaire des résines archéologiques de Dipterocarpaceae, ceci afin de conserver les constituants volatils qui seraient perdus lors d'une analyse « classique ».

Une petite quantité de résine est prélevée et extraite avec du CH₂Cl₂ aux ultrasons pendant 5 min. Le mélange est alors filtré sur célite et concentré sous pression réduite évitant une évaporation à sec pour préserver les composés volatils dans l'extrait. Un premier fractionnement sur colonne de silice sèche est effectué, permettant de récupérer une fraction F₁ (élution au CH₂Cl₂ ; 1,3 V₀), une fraction F₂ (élution au CH₂Cl₂ ; 2 V₀), une fraction F₃ (élution à l'AcOEt ; 2 V₀), et une fraction F₄ (élution CH₂Cl₂/CH₃OH 1:1 v/v ; 2 V₀). Ces fractions sont

ensuite concentrées à l'évaporateur rotatif et transférées dans des piluliers. Les fractions F₁ et F₂ sont analysées sans traitement additionnel par GC-FID et GC-MS. Les fractions F₃ et F₄ sont quant à elles dérivées selon le protocole décrit ci-dessus (cf. § 6.1.2.b). La fraction F₄ est refractionnée comme décrit précédemment (cf. § 6.1.2.d) pour en éliminer la composante la plus polaire. Ces fractions sont ensuite analysées par GC-FID et GC-MS.

6.3.2. Etude des *des-A* triterpènes

Dans le cas de l'échantillon de résine provenant de l'épave du Flying Fish (cf. chapitre 3), le protocole de fractionnement décrit en § 6.3.1 a permis de mettre en évidence dans la fraction F₁, en plus des sesquiterpènes, la présence de triterpènes diéniques, mono-, di- et triaromatiques présentant un cycle A dégradé (*des-A* triterpènes). Pour étudier de manière plus détaillée ces composés, un protocole de fractionnement fin a été mis en place pour séparer chaque classe de molécules (diènes, monoaromatiques, diaromatiques,...).

a) Protocole de fractionnement des *des-A* triterpènes

Environ 1 g de résine provenant de l'épave du Flying Fish est extrait avec un mélange CH₂Cl₂/CH₃OH (1:1 v/v) et conduit à l'obtention, après filtration sur célite, de 524 mg d'extrait organique. Cet extrait est ensuite adsorbé sur silice et fractionné sur une colonne de silice sèche. Dans un premier temps, du cyclohexane est utilisé comme éluant et permet l'obtention de sous-fractions F₁ à F₁₀ récupérées chacune à l'aide de 0,5 V₀ de solvant. La fraction suivante (F₁₁), quant à elle, est obtenue par élution de 2 V₀ de CH₂Cl₂/CH₃OH (1:1 v/v). Cette dernière est refractionnée sur colonne de silice sèche en une fraction F_{11.1} (élution CH₂Cl₂ ; 1,3 V₀) et une fraction F_{11.2} (élution CH₂Cl₂/CH₃OH, 1:1 v/v ; 2 V₀). Les fractions F₁ à F₁₀ et F_{11.1} sont analysées par GC-FID et GC-MS.

b) Hydrogénation catalytique

Les fractions F₃, F₆ et F_{11.1} sont transférées dans un ballon de 10 mL et évaporées à sec à l'évaporateur rotatif. Environ 4 mL de cyclohexane ou d'AcOEt sont ajoutés et également, dans certains cas, de l'AcOH qui facilite l'hydrogénation de certaines doubles liaisons stériquement encombrées. Quelques pointes de spatule de PtO₂ sont ensuite ajoutées au mélange puis le montage est placé sous H₂ et chauffé à reflux sous agitation pendant 4 h. Après retour à température ambiante et purge du montage à l'azote, le brut réactionnel est prélevé à la pipette, filtré sur silice, transféré dans un ballon et le solvant évaporé sous pression réduite. Les échantillons sont alors solubilisés dans du cyclohexane et analysés par GC-FID et par GC-MS.

6.3.3. *Expérience d'autoxydation de l'acétate d'euphol T33*

De l'acétate d'euphol **T33** (12 mg) est placé dans un tube à essai muni d'un bouchon étanche possédant un joint en téflon. 5,3 mg de nitroxyde de *tert*-butyle, 100 μL d'hydroperoxyde de *tert*-butyle dans le décane (5-6 M) et 200 μL de CH_3CN sont alors ajoutés, puis l'ensemble est placé sous O_2 à 55 °C. Des prélèvements de 100 μL sont effectués au bout de 24 h et 47 h, ceux-ci étant ensuite dérivés et fractionnés selon les protocoles ci-dessus (cf. § 6.1.2.b et d) puis analysés par GC-FID et GC-MS.

6.4. Analyse des brais de bouleau

Dans le cadre des analyses menées sur les brais de bouleau et plus particulièrement sur celui présent sur la céramique I15, il a été nécessaire de procéder à une analyse des lipides plus fine que celle obtenue classiquement par le protocole d'analyse globale de la matière organique (cf. § 6.1.2.). En effet, dans cette étude, quatre séries principales (appelées par la suite **E1**, **E2**, **E3** et **E4**) d'esters lourds dérivés de bétuline présents en faibles quantités ont été découvertes. Ainsi, il a été nécessaire d'obtenir des fractions chromatographiques enrichies en ces composés afin de pouvoir les étudier plus en détail. Nous avons par ailleurs procédé également à la synthèse de composés de référence pour confirmer les hypothèses de structures émises sur la base de la spectrométrie de masse concernant ces quatre séries de composés.

6.4.1. *Fractionnement des esters lourds dérivés de bétuline*

102 mg d'échantillon provenant de la céramique I15 sont extraits, conduisant à l'obtention de 11,2 mg d'extrait organique. Cet extrait est ensuite fractionné (sans dérivation) sur colonne de silice sèche afin d'obtenir une fraction F_1 (élution au CH_2Cl_2 ; 1,4 V_0) et une fraction F_2 (élution au $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 1:1 v/v ; 2 V_0). La fraction F_1 contenant les esters lourds dérivés de la bétuline des séries **E1** et **E2** est re-fractionnée pour obtenir une fraction $F_{1.1}$. (élution au cyclohexane ; 2 V_0), et une fraction $F_{1.2}$. (élution au CH_2Cl_2 ; 2 V_0). Cette dernière est analysée par GC-MS et comprend les esters lourds des séries **E1** et **E2**. La fraction F_2 de l'extrait organique, quant à elle, est méthylée avec du diazométhane, puis re-fractionnée sur colonne de silice sèche, conduisant à l'obtention d'une fraction $F_{2.1}$. (élution au CH_2Cl_2 ; 1,25 V_0), d'une fraction $F_{2.2}$. (élution au CH_2Cl_2 ; 2 V_0) et d'une fraction $F_{2.3}$. (élution au $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 1:1 v/v ; 2 V_0). La fraction $F_{2.2}$. est analysée par GC-MS et comprend les esters lourds dérivés de la bétuline des séries **E3** et **E4**.

6.4.2. Hydrogénolyse des esters lourds dérivés de bétuline des séries E1 et E2 par LiAlH_4

Pour étudier la distribution et la prédominance des acides gras estérifiés aux dérivés de bétuline, une étape d'hydrogénolyse par LiAlH_4 a été effectuée.

La fraction F_{1.2} comprenant les esters lourds dérivés de bétuline des séries **E1** et **E2** est transférée dans un pilulier puis évaporée à sec sous flux d'argon. L'extrait est ensuite solubilisé dans un minimum de THF, et une petite quantité de LiAlH_4 préalablement nettoyé avec du cyclohexane est ajoutée. Le mélange est laissé à température ambiante environ 1 h puis est transféré goutte à goutte dans un ballon contenant du CH_3OH afin d'éliminer le LiAlH_4 résiduel, et est ensuite évaporé à sec sous pression réduite. Le brut obtenu est filtré sur une colonne de silice avec l'AcOEt comme éluant. Les alcools obtenus après hydrogénolyse sont alors acétylés, puis analysés par GC-MS (cf. § 6.5).

6.4.3. Synthèse de composés de référence

Pour confirmer les hypothèses structurales émises sur la base de la spectrométrie de masse à propos des esters lourds dérivés de bétuline, la synthèse de composés de référence a été effectuée. Les protocoles utilisés sont basés sur les travaux de Sun et al. (1998a, 1998b).

a) Déshydratation en position 3 de la bétuline T54 et de la dihydrobétuline T65

Un mélange composé de bétuline **T54** (100 mg) (respectivement dihydrobétuline **T65**, 100 mg), de triphénylphosphine (4 eq), et de 3,3-diméthylglutarimide (4 eq) dans 3 mL de THF (resp. 4 mL) est placé dans un bain de glace, sous argon et sous agitation. 0,15 mL (4 eq.) de diéthylazodicarboxylate (DEAD) sont ajoutés et l'ensemble est maintenu à température ambiante pendant 3 h. Après évaporation sous pression réduite, le brut réactionnel est adsorbé sur silice et filtré sur colonne de silice sèche. Une élution avec un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (95:5 v/v) permet d'obtenir 68,2 mg (R=71%) de Δ^2 -bétuline pure (resp. 46,0 mg de Δ^2 -dihydrobétuline ; R=48%) (Fig. 6.1).

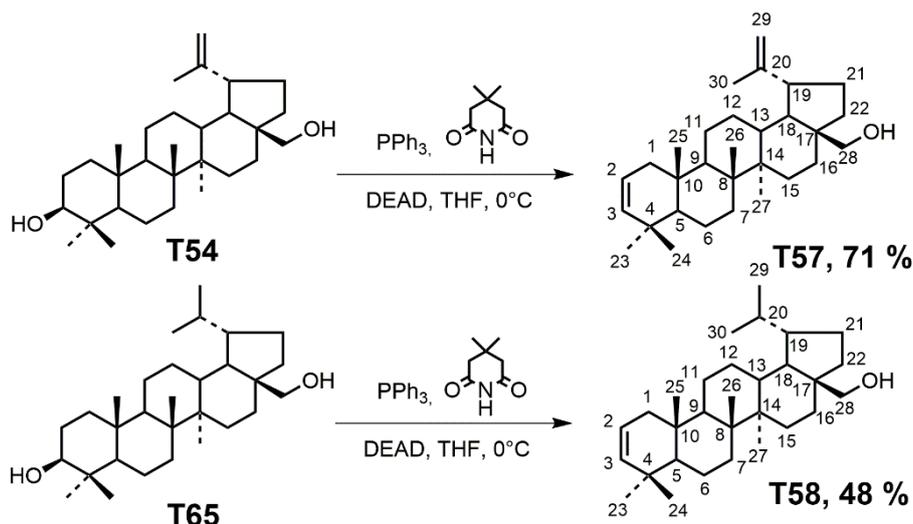


Figure 6.1 : Schéma de synthèse de la Δ^2 bétuline **T57** et de la Δ^2 dihydrobétuline **T58**.

Δ^2 bétuline **T57** : ^1H RMN (500 MHz; CDCl_3): 0,86 (3H, s), 0,87 (3H, s), 0,94 (3H, s), 0,99 (3H, s), 1,05 (3H, s), 1,69 (3H, s, H-30), 2,40 (1H, ddd, $J = 5,5 ; 11,5 ; 11,5$ Hz, H-19), 3,34 (1H, d, $J = 10,5$ Hz, H-28), 3,82 (1H, d, $J = 10,5$ Hz, H-28), 4,59 (1H, s, H-29), 4,69 (1H, s, H-29), 5,35 (1H, dd, $J = 2,0 ; 10,0$ Hz, H-3), 5,40 (1H, ddd, $J = 1,0 ; 5,5 ; 10,0$ Hz, H-2), ^{13}C RMN (500 MHz; CHCl_3): 14,9 ; 15,8 ; 16,5 ; 19,2 ; 19,6 ; 21,4 ; 22,7 ; 25,5 ; 27,2 ; 29,3 ; 29,9 ; 31,9 ; 33,5 ; 34,1 ; 34,8 ; 36,5 ; 37,6 ; 41,1 ; 41,4 ; 42,9 ; 47,9 ; 48,0 ; 48,9 ; 49,2 ; 52,2 ; 60,7 ; 109,8 ; 121,7 ; 138,1 ; 150,7.

Δ^2 dihydrobétuline **T58** : ^1H RMN (500 MHz; CDCl_3): 0,77 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, H-29 or H-30), 0,84 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, H-29 or H-30), 0,87 (3H, s), 0,88 (3H, s), 0,95 (3H, s), 0,97 (3H, s), 1,06 (3H, s), 3,31 (1H, d, $J = 11,0$ Hz, H-28), 3,79 (1H, d, $J = 11,0$ Hz, H-28), 5,36 (1H, dd, $J = 2,5 ; 10,0$ Hz, H-3), 5,40 (1H, ddd, $J = 1,5 ; 5,5 ; 10,0$ Hz, H-2), ^{13}C RMN (500 MHz; CHCl_3): 14,8 ; 15,1 ; 15,8 ; 16,5 ; 19,6 ; 21,4 ; 21,9 ; 22,8 ; 23,1 ; 27,1 ; 27,1 ; 29,4 ; 29,6 ; 31,9 ; 33,6 ; 34,2 ; 34,8 ; 36,5 ; 37,1 ; 41,2 ; 41,4 ; 43,0 ; 44,7 ; 48,1 ; 48,2 ; 48,9 ; 52,2 ; 60,8 ; 121,7 ; 138,1.

b) Esters lourds **E1a** et **E2a** dérivés de la bétuline des séries **E1** et **E2**

A de la Δ^2 -bétuline (14,7 mg) (resp. Δ^2 -dihydrobétuline ; 17,9 mg) dans un pilulier sont ajoutés 50 μL de chlorure de nonanoyle, 1 goutte de 1-méthylimidazole (N-Me Im) et 0,6 mL de pyridine. L'ensemble est maintenu à 90 °C pendant 4 h. Le milieu réactionnel est ensuite transféré dans une ampoule à décanter, puis 3 mL d'une solution aqueuse de CuSO_4 (9/1 wt:wt) sont ajoutés pour piéger la pyridine et le 1-méthylimidazole dans la phase aqueuse. L'ensemble

est alors agité puis extrait avec du CH_2Cl_2 . L'extrait organique est ensuite lavé à l'eau distillée. Le brut réactionnel obtenu après évaporation sous pression réduite est fractionné sur colonne de silice sèche avec du toluène comme éluant, conduisant à l'obtention de 4,3 mg (R=22%) du dérivé estérifié de la bétuline **E1a** (resp. 4,4 mg du dérivé estérifié de la dihydrobétuline **E2a** ; R=19 %) (Fig. 6.2).

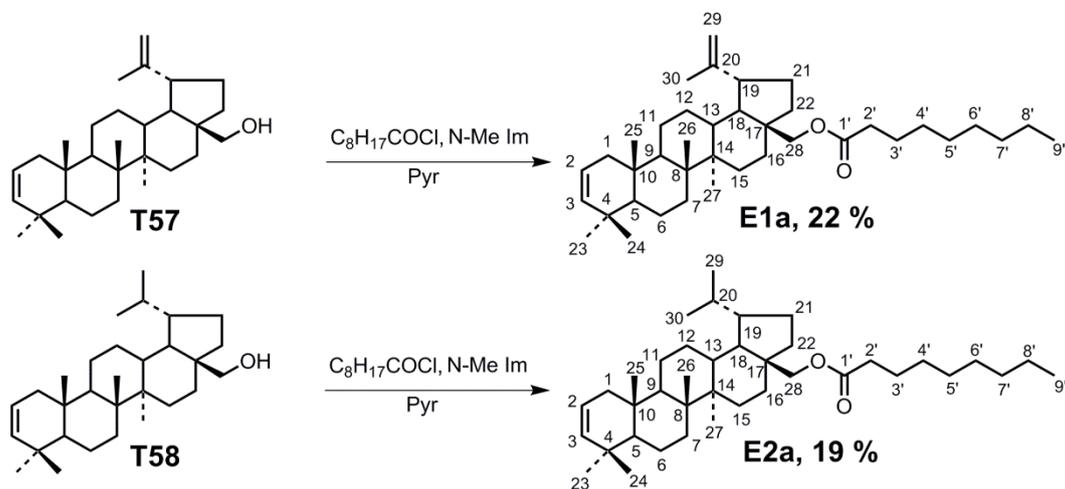


Figure 6.2 : Schéma de synthèse des esters de Δ^2 bétuline et Δ^2 dihydrobétuline **E1a** et **E2a**.

Composé E1a : ^1H RMN (500 MHz; CDCl_3): 0,94 (3H, s), 0,99 (3H, s), 1,06 (3H, s), 1,69 (3H, s, H-30), 2,32 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, H-2'), 2,46 (1H, ddd, $J = 6,0 ; 11,5 ; 11,5$ Hz, H-19), 3,86 (1H, d, $J = 11,0$ Hz, H-28), 4,26 (1H, d, $J = 11,0$ Hz, H-28), 4,59 (1H, s, H-29), 4,69 (1H, s, H-29), 5,35 (1H, dd, $J = 2,0 ; 10,0$ Hz, H-3), 5,40 (1H, ddd, $J = 1,0 ; 5,5 ; 10,0$ Hz, H-2), ^{13}C RMN (500 MHz; CHCl_3): 14,2 ; 14,9 ; 15,9 ; 16,5 ; 19,3 ; 19,6 ; 21,3 ; 22,8 ; 22,8 ; 25,3 ; 25,5 ; 27,2 ; 29,3 ; 29,4 ; 29,4 ; 29,8 ; 29,9 ; 31,9 ; 32,0 ; 33,5 ; 34,7 ; 34,8 ; 34,8 ; 36,5 ; 37,8 ; 41,1 ; 41,4 ; 42,9 ; 46,6 ; 47,9 ; 48,9 ; 49,2 ; 52,3 ; 62,7 ; 109,9 ; 121,7 ; 138,1 ; 150,4 ; 174,5.

Composé E2a : ^1H RMN (500 MHz; CDCl_3): 0,77 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, H-29 or H-30), 0,84 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, H-29 or H-30), 0,87 (3H, s), 0,88 (3H, s), 1,07 (3H, s), 2,31 (2H, t, $J = 8,0$ Hz, H-2'), 3,83 (1H, d, $J = 11,0$ Hz, H-28), 4,26 (1H, d, $J = 11,0$ Hz, H-28), 5,36 (1H, dd, $J = 2,0 ; 10,0$ Hz, H-3), 5,41 (1H, ddd, $J = 1,0 ; 6,0 ; 10,0$ Hz, H-2), ^{13}C RMN (500 MHz; CHCl_3): 14,2 ; 14,8 ; 15,1 ; 15,9 ; 16,5 ; 19,6 ; 21,3 ; 21,8 ; 22,8 ; 22,8 ; 23,1 ; 25,3 ; 27,1 ; 27,1 ; 29,3 ; 29,4 ; 29,4 ; 29,6 ; 30,1 ; 31,9 ; 32,0 ; 33,6 ; 34,7 ; 34,8 ; 34,9 ; 36,5 ; 37,4 ; 41,1 ; 41,4 ; 43,0 ; 44,7 ; 46,7 ; 48,3 ; 48,9 ; 52,2 ; 62,7 ; 121,7 ; 138,1 ; 174,5.

c) Esters lourds **E3a** et **E4a** dérivés de la bétuline des séries **E3** et **E4**

A de la Δ^2 -bétuline (12,9 mg) (resp. Δ^2 -dihydrobétuline ; 13,0 mg) dans un pilulier sont ajoutés 50 μ L de 8-chloro-8-oxooctanoate de méthyle, 1 goutte de 1-méthylimidazole (N-Me Im) et 0,6 mL de pyridine. L'ensemble est maintenu à 90 °C pendant 4 h. Le milieu réactionnel est ensuite transféré dans une ampoule à décanter, puis 3 mL d'une solution aqueuse de CuSO_4 (9/1 wt:wt) sont ajoutés pour piéger la pyridine et le 1-méthylimidazole dans la phase aqueuse. L'ensemble est alors agité puis extrait avec du CH_2Cl_2 (x 2) puis de l'AcOEt (x 2). Les phases organiques sont regroupées, évaporées sous pression réduite puis le brut réactionnel est solubilisé dans de l'AcOEt et lavé à l'eau distillée. Après évaporation du solvant, le brut réactionnel est fractionné sur colonne de silice sèche. Une élution avec un mélange de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (95:5 v/v) conduit à l'obtention de 8,9 mg (R=49%) du dérivé estérifié de la bétuline **E3a** (resp. 10,1 mg du dérivé estérifié de la dihydrobétuline **E4a** ; R=55%) (Fig. 6.3).

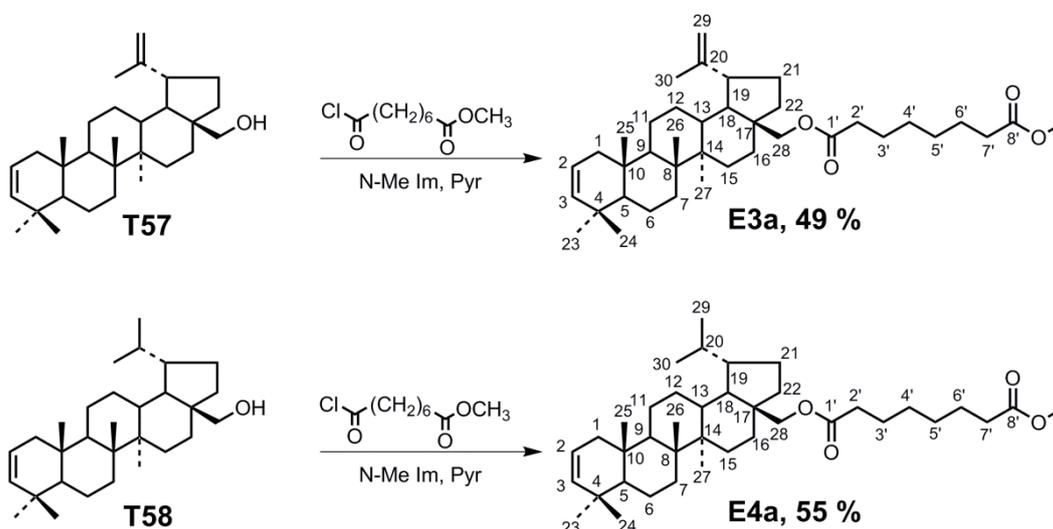


Figure 6.3 : Schéma de synthèse des esters de Δ^2 bétuline et Δ^2 dihydrobétuline **E3a** et **E4a**.

*Composé **E3a*** : ^1H RMN (500 MHz; CDCl_3): 0,86 (3H, s), 0,87 (3H, s), 0,94 (3H, s), 0,98 (3H, s), 1,06 (3H, s), 1,68 (3H, s, H-30), 2,30 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, H-2' or H-7'), 2,32 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, H-2' or H-7'), 2,45 (1H, ddd, $J = 5,5 ; 11,5 ; 11,5$ Hz, H-19), 3,66 (3H, s, OCH_3), 3,86 (1H, d, $J = 11,5$ Hz, H-28), 4,27 (1H, d, $J = 11,0$ Hz, H-28), 4,59 (1H, s, H-29), 4,69 (1H, s, H-29), 5,35 (1H, dd, $J = 2,0 ; 10,0$ Hz, H-3), 5,39 (1H, ddd, $J = 1,0 ; 5,5 ; 10,0$ Hz, H-2), ^{13}C RMN (500 MHz; CHCl_3): 14,9 ; 15,9 ; 16,5 ; 19,3 ; 19,6 ; 21,3 ; 22,8 ; 24,9 ; 25,0 ; 25,5 ; 27,2 ; 28,9 ; 28,9 ; 29,8 ; 29,9 ; 31,9 ; 33,5 ; 34,1 ; 34,5 ; 34,7 ; 34,8 ; 36,5 ; 37,8 ; 41,1 ; 41,4 ; 42,9 ; 46,6 ; 47,9 ; 48,9 ; 49,2 ; 51,6 ; 52,3 ; 62,7 ; 110,0 ; 121,7 ; 138,1 ; 150,4 ; 174,3 ; 174,3.

Composé **E4a** : ^1H RMN (500 MHz; CDCl_3): 0,77 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, H-29 or H-30), 0,84 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, H-29 or H-30), 0,87 (3H, s), 0,88 (3H, s), 0,94 (3H, s), 0,96 (3H, s), 1,07 (3H, s), 2,30 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, H-2' or H-7'), 2,31 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, H-2' or H-7'), 3,66 (3H, s, OCH₃), 3,83 (1H, d, $J = 11,0$ Hz, H-28), 4,26 (1H, d, $J = 11,0$ Hz, H-28), 5,36 (1H, dd, $J = 2,0$; 10,0 Hz, H-3), 5,40 (1H, ddd, $J = 1,0$; 5,5; 10,0 Hz, H-2), ^{13}C RMN (500 MHz; CHCl_3): 14,8; 15,1; 15,9; 16,5; 19,6; 21,3; 21,8; 22,8; 23,1; 24,9; 25,0; 27,1; 27,1; 28,9; 28,9; 29,6; 30,0; 31,9; 33,5; 34,1; 34,5; 34,8; 34,9; 36,5; 37,4; 41,1; 41,4; 43,0; 44,7; 46,7; 48,3; 48,9; 51,6; 52,2; 62,8; 121,7; 138,1; 174,3; 174,3.

6.5. Instrumentation

6.5.1. Chromatographie en phase gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme (GC-FID)

Avant d'être analysés par GC-MS, les échantillons sont analysés au moyen d'un appareil de chromatographie en phase gazeuse HEWLETT-PACKARD HP 6890 series, équipé d'un injecteur « on-column » utilisé en mode « oven track », d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et d'une colonne capillaire HP-5 (30 m x 0,32mm x 0,25 μm). Le débit du gaz vecteur (H_2) est de 2,5 mL/min (débit constant) et la température du détecteur est de 310 °C.

6.5.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

Les analyses de GC-MS ont été réalisées en impact électronique (EI, 70 eV), ou dans certains cas, en ionisation chimique (CI, avec de l'isobutane ou de l'ammoniac comme gaz réactant, avec un débit de 1,3 mL/min) avec un spectromètre de masse TSQ Quantum (THERMO Scientific) couplé à un chromatographe en phase gazeuse TRACE GC ULTRA (THERMO Scientific) équipé d'un passeur automatique d'échantillons Tri Plus (THERMO Scientific), d'un injecteur PTV en mode « simili on-column » et d'une colonne HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,1 μm). Le balayage en masse est effectué de 50 à 700 m/z en 0,4 s ou jusqu'à 900 dans certains cas. Le programme de température du four est choisi parmi l'un des suivants :

Programme A : 40 °C isotherme 10 min, 70 °C-200 °C (10 °C/min), 200 °C-300 °C (4 °C/min), 300 °C isotherme de 30 min

Programme B : 70 °C isotherme 1 min, 70 °C-200 °C (10 °C/min), 200 °C-320 °C (4 °C/min), 320 °C isotherme de 40 min

Programme C : 70 °C isotherme 1 min, 70 °C-320 °C (10°C/min), 320 °C isotherme de 80 min

Le gaz vecteur employé est l'hélium avec un débit constant de 1,1 mL/min. La source est chauffée à 220°C et la ligne de transfert à 320 °C. Les données sont analysées avec le logiciel Xcalibur et les spectres de masse sont comparés avec les données de la banque de données NIST et celles de la littérature.

6.5.3. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de résonance magnétique nucléaire 1D (^1H -RMN et ^{13}C -RMN) ont été réalisés au moyen d'un spectromètre Bruker Avance 500 (500 MHz pour ^1H ; 125 MHz pour ^{13}C). Les spectres sont enregistrés en solution dans le chloroforme deutérié (CDCl_3). Les déplacements chimiques δ sont exprimés en parties par million (ppm) par rapport au tétraméthylsilane en utilisant comme référence interne les protons résiduels du CDCl_3 (CHCl_3 : $\delta^1\text{H}$ 7.26 ppm ; $\delta^{13}\text{C}$ 77.16 ppm). Les constantes de couplage (J) sont exprimées en Hz. La multiplicité est transcrite de la manière suivante : singulet (s), doublet (d), triplet (t), doublet de doublet (dd), doublet de doublet de doublet (ddd), triplet de doublet (td).

Références bibliographiques

- Abdel-Ghani, M., Edwards, H.G.M., Stern, B., Janaway, R., **2009**. Characterization of paint and varnish on a medieval Coptic-Byzantine icon: Novel usage of dammar resin. *Spectrochimica Acta Part A* 73, 566-575.
- Abdel-Maksoud, G., El-Amin, A.-R., **2011**. A review on the materials used during the mummification processes in ancient Egypt. *Mediterranean Archaeology and Archaeometry* 11, 129–150.
- Aboelsoud, N.H., **2010**. Herbal medicine in ancient Egypt. *Journal of Medicinal Plants Research* 4, 82–86.
- Adam, P., Schmid, J.C., Mycke, B., Strazielle, C., Connan, J., Huc, A., Riva, A., Albrecht, P., **1993**. Structural investigation of nonpolar sulfur cross-linked macromolecules in petroleum. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 57, 3395–3419.
- Agrawal, P.K., Rastogi, R.P., **1984**. Chemistry of the true cedars. *Biochemical Systematics and Ecology* 12, 133–144.
- Albrecht, P., Ourisson, G., **1971**. Biogenic substances in sediments and fossils. *Angewandte Chemie International Edition in English* 10, 209–225.
- Anand, N., Bindra, J.S., Ranganathan, S., **1987**. Art in organic synthesis. John Wiley & Sons, New York.
- Andrefsky, W., **1994**. The geological occurrence of lithic material and stone tool production strategies. *Geoarchaeology* 9, 375–391.
- Assimopoulou, A.N., Papageorgiou, V.P., **2005**. GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part II. *Pistacia terebinthus* var. Chia. *Biomedical Chromatography* 19, 586–605.
- Aveling, E.M., Heron, C., **1998**. Identification of birch bark tar at the Mesolithic site of Star Carr. *Ancient Biomolecules* 2, 69–80.
- Aveling, E.M., Heron, C., **1999**. Chewing tar in the early Holocene: an archaeological and ethnographic evaluation. *Antiquity* 73, 579–584.
- Backwell, L., d’Errico, F., Wadley, L., **2008**. Middle Stone Age bone tools from the Howiesons Poort layers, Sibudu Cave, South Africa. *Journal of Archaeological Science* 35, 1566–1580.

Références bibliographiques

- 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.
- Bailly, L., Adam, P., Charrié, A., Connan, J., **2016**. Identification of alkyl guaiacyl dehydroabietates as novel markers of wood tar from Pinaceae in archaeological samples. *Organic Geochemistry* 100, 80–88.
- Balsan, L., **1951**. L'industrie de la résine dans les Causses et son extension dans l'Empire romain. *Gallia* 9, 53–55.
- Barton, D.H.R., Seoane, E., **1956**. 801. Triterpenoids. Part XXII. The constitution and stereochemistry of masticadienonic acid. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* 4150–4157.
- Başer, K.H.C., Demirçakmak, B., **1995**. The essential oil of taurus cedar (*Cedrus libani* A. rich): recent results. *Chemistry of Natural Compounds* 31, 16–20.
- Bastien, C., **2011**. Etude chimique des substances contenues dans une collection exceptionnelle de poteries provenant de Deir-El-Medineh (Egypte) : une population et ses produits. Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, France.
- Becerra, J.X., Venable, D.L., Evans, P.H., Bowers, W.S., **2001**. Interactions between chemical and mechanical defenses in the plant genus *Bursera* and their implications for herbivores. *American Zoologist* 41, 865–876.
- Birladeanu, L., **2000**. The story of the Wagner-Meerwein rearrangement. *Journal of Chemical Education* 77, 858.
- 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.
- 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.
- 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.
- Blanksby, S.J., Ellison, G.B., **2003**. Bond dissociation energies of organic molecules. *Accounts of Chemical Research* 36, 255–263.

Références bibliographiques

- Blokker, P., Schouten, S., Van den Ende, H., de Leeuw, J.W., Hatcher, P.G., Sinninghe Damsté, J.S., **1998**. Chemical structure of algaenans from the freshwater algae *Tetraedron minimum*, *Scenedesmus communis* and *Pediastrum boryanum*. *Organic Geochemistry* 29, 1453–1468.
- Bockisch, M. (Ed.), **1998**. Chapter 3 - Animal fats and oils, in: *Fats and Oils Handbook*. AOCS Press, pp. 121–173.
- Bosquet, D., Regert, M., Dubois, N., Jadin, I., **2001**. Identification de brai de bouleau sur quatre vases du site rubané de Fexhe-le-Haut-Clocher “Potri l’Cortri”. Premiers résultats. *Notae Praehistoricae* 21, 119–127.
- Bouwman, E., Van Gorkum, R., **2007**. A study of new manganese complexes as potential driers for alkyd paints. *Journal of Coatings Technology and Research* 4, 491–503.
- Bonaduce, I., Girolamo, F.D., Corsi, I., Degano, I., Tinè, M.R., Colombini, M.P., **2016**. Terpenoid oligomers of dammar resin. *Journal of Natural Products* 79, 845–856.
- Borrego, A.G., Blanco, C.G., Püttmann, W., **1997**. Geochemical significance of the aromatic hydrocarbon distribution in the bitumens of the Puertollano oil shales, Spain. *Organic Geochemistry* 26, 219–228.
- Brebu, M., Vasile, C., **2010**. Thermal degradation of lignin – A review. *Celulose Chemistry and Technology* 44, 353–363.
- Brettell, R., Martin, W., Atherton-Woolham, S., Stern, B., McKnight, L., **2017**. Organic residue analysis of Egyptian votive mummies and their research potential. *Studies in Conservation* 62, 68–82.
- Brøns, C., Rasmussen, K.L., Di Crescenzo, M.M., Stacey, R., Lluveras-Tenorio, A., **2018**. Painting the palace of Apries I: ancient binding media and coatings of the reliefs from the palace of Apries, Lower Egypt. *Heritage Science* 6. doi:10.1186/s40494-018-0170-9
- Buckley, S.A., Stott, A.W., Evershed, R.P., **1999**. Studies of organic residues from ancient Egyptian mummies using high temperature-gas chromatography-mass spectrometry and sequential thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *The Analyst* 124, 443–452.
- Buckley, S.A., Evershed, R.P., **2001**. Organic chemistry of embalming agents in Pharaonic and Graeco-Roman mummies. *Nature* 413, 837–841.

Références bibliographiques

- Buckley, S.A., Clark, K.A., Evershed, R.P., **2004**. Complex organic chemical balms of Pharaonic animal mummies. *Nature* 431, 294–299.
- 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.
- Burger, P., **2008**. Caractérisation moléculaire de résines végétales archéologiques et actuelles: étude de résines de Dipterocarpaceae. Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, France.
- Burger, P., Charrié-Duhaut, A., Connan, J., Flecker, M., Albrecht, P., **2009**. Archaeological resinous samples from Asian wrecks: taxonomic characterization by GC–MS. *Analytica Chimica Acta* 648, 85–97.
- Burger, P., Charrié-Duhaut, A., Connan, J., Albrecht, P., Flecker, M., **2010**. The 9th-Century-AD Belitung Wreck, Indonesia: analysis of a resin lump. *International Journal of Nautical Archaeology* 39, 383–386.
- Burri, S., **2009**. La fouille programmée d'un site de distillation du bois à la Roche Redonne (Le Castellet, Var). *Revue du Centre Archéologique du Var* 31–34.
- Burri, S., **2010**. Production et commerce de la poix et de l'huile de cade en basse Provence au Moyen Âge. *Anthropobotanica* 1, 4–17.
- Burri, S., Alifriqui, M., Bun, S.-S., Cigerci, I.H., Robles, A.A.D., Marmouzi, I., **2018**. Des ressources naturelles à la santé: Approche interdisciplinaire de la production des goudrons de conifères et de leur usage médicinal en Méditerranée sur la longue durée. *Les Nouvelles de l'Archéologie* 62–69.
- Butkienė, R., Nivinskienė, O., Mochutė, D., Miliūtė, A., **2007**. Variety of the essential oils composition of wood, needles (leaves), unripe and ripe berries of *Juniperus communis* var. *communis* growing wild in Druskininkai district. *Chemija* 18, 35–40.
- Cao, J., Zhang, X., Gu, F., Guo, Z., Zhao, Y., **2015**. Dammarane triterpenoids for pharmaceutical use: a patent review (2005-2014). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 25, 805–817.
- Carpy, A., Marchand-Geneste, N., **2003**. Molecular characterization of retene derivatives obtained by thermal treatment of abietane skeleton diterpenoids. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* 635, 45–53.

- Chaffee, A.L., Johns, R.B., **1983**. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Australian coals. I. Angularly fused pentacyclic tri- and tetraaromatic components of Victorian brown coal. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 47, 2141–2155.
- Chaffee, A.L., Fookes, C.J.R., **1988**. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Australian coals— III. Structural elucidation by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Organic Geochemistry* 12, 261–271.
- Charrié-Duhaut, A., Connan, J., Rouquette, N., Adam, P., Barbotin, C., de Rozières, M.-F., Tchaplal, A., Albrecht, P., **2007**. The canopic jars of Rameses II: real use revealed by molecular study of organic residues. *Journal of Archaeological Science* 34, 957–967.
- Charters, S., Evershed, R.P., Goad, L.J., Heron, C., Blinkhorn, P., **1993**. Identification of an adhesive used to repair a Roman jar. *Archaeometry* 35, 91–101.
- Chatgililoglu, C., Crich, D., Komatsu, M., Ryu, I., **1999**. Chemistry of acyl radicals. *Chemical Reviews* 99, 1991–2070.
- Chen, G.-F., **1992**. Developments in the field of rosin chemistry and its implications in coatings. *Progress in Organic Coatings* 20, 139–167.
- Cheng, D., Sun, R., Ye, X., Cui, W., Yan, J., **2014**. Oxidative ether formation between 1,3-diarylpropene and alcohol promoted by *N*-hydroxyphthalimide/O₂. *Journal of Chemical Research* 38, 420–422.
- Christenhusz, M.J.M., Byng, J.W., **2016**. The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa* 261, 201.
- Colombini, M.P., Modugno, F., Giannaralli, S., Fuoco, R., Matteini, M., **2000a**. GC-MS characterization of paint varnishes. *Microchemical Journal* 67, 385-396.
- Colombini, M.P., Modugno, F., Silvano, F., Onor, M., **2000b**. Characterization of the balm of an Egyptian mummy from the seventh century B.C. *Studies in Conservation* 45, 19–29.
- Colombini, M.P., Giachi, G., Modugno, F., Pallecchi, P., Ribechini, E., **2003**. The characterization of paints and waterproofing materials from the shipwrecks found at the archaeological site of the Etruscan and Roman Harbour of Pisa (Italy). *Archaeometry* 45, 659–674.

- Colombini, M.P., Modugno, F., Ribechini, E., **2005a**. Direct exposure electron ionization mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry techniques to study organic coatings on archaeological amphorae. *Journal of Mass Spectrometry* 40, 675–687.
- Colombini, M.P., Modugno, F., Ribechini, E., **2005b**. Organic mass spectrometry in archaeology: evidence for Brassicaceae seed oil in Egyptian ceramic lamps. *Journal of Mass Spectrometry* 40, 890–898.
- Colombini, M.P., Giachi, G., Modugno, F., Ribechini, E., **2005c**. Characterisation of organic residues in pottery vessels of the Roman age from Antinoe (Egypt). *Microchemical Journal* 79, 83–90.
- Colombini, M.P., Giachi, G., Iozzo, M., Ribechini, E., **2009a**. An Etruscan ointment from Chiusi (Tuscany, Italy): its chemical characterization. *Journal of Archaeological Science* 36, 1488–1495.
- Colombini, M.P., Lucejko, J.J., Modugno, F., Orlandi, M., Tolppa, E.-L., Zoia, L., **2009b**. A multi-analytical study of degradation of lignin in archaeological waterlogged wood. *Talanta* 80, 61–70.
- Colombini, M.P., Modugno, F., **2009**. Organic mass spectrometry in art and archaeology. John Wiley & Sons, Pisa.
- Connan, J., Adam, P., Dessort, D., Albrecht, P., **2000**. Apport de la chimie moléculaire à la connaissance des enduits utilisés pour le traitement des bois et le calfatage des bateaux romains de la Saône, in: *Archéologie des Fleuves et des Rivières*. Bonnamour L. (Ed.), Errance, Paris, pp. 40–47.
- Connan, J., Maurin, B., Long, L., Sebire, H., **2002**. Identification de poix et de résine de conifère dans des échantillons archéologiques du lac de Sanguinet: exportation de poix en Atlantique à l'époque gallo-romaine. *Revue d'Archéométrie* 26, 177–196.
- Connan, J., Nissenbaum, A., **2003**. Conifer tar on the keel and hull planking of the Ma'agan Mikhael Ship (Israel, 5th century BC): identification and comparison with natural products and artefacts employed in boat construction. *Journal of Archaeological Science* 30, 709–719.
- Connan, J., Carter, R., Crawford, H., Charrié-Duhaut, A., Jarvie, D., Albrecht, P., Norman, K., **2005**. A comparative geochemical study of bituminous boat remains from H3, As-

Références bibliographiques

- Sabiyah (Kuwait), and RJ-2, Ra's al-Jinz (Oman). *Arabian Archaeology and Epigraphy* 16, 21–66.
- Connolly, J.D., Hill, R.A., **2003**. Triterpenoids. *Natural Product Reports* 20, 640–659.
- Connolly, J.D., Hill, R.A., **2008**. Triterpenoids. *Natural Product Reports* 25, 794–830.
- Coppen, J.J.W., **1995**. Hard resins, in: Gums, Resins, and Latexes of Plant Origin. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, p. 142.
- Correa-Ascencio, M., Evershed, R.P., **2014**. High throughput screening of organic residues in archaeological potsherds using direct acidified methanol extraction. *Analytical Methods* 6, 1330–1340.
- Coseri, S., **2009**. Phthalimide-*N*-oxyl (PINO) radical, a powerful catalytic agent: its generation and versatility towards various organic substrates. *Catalysis Reviews* 51, 218–292.
- Courel, B., **2016**. Caractérisation de substances naturelles en contexte archéologique : apport des études moléculaires, isotopiques et de la datation au ¹⁴C. Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, France.
- Courel, B., Schaeffer, P., Féliu, C., Thomas, Y., Adam, P., **2018**. Birch bark tar and jewellery: The case study of a necklace from the Iron Age (Eckwersheim, NE France). *Journal of Archaeological Science: Reports* 20, 72–79.
- Craig, O.E., Love, G.D., Isaksson, S., Taylor, G., Snape, C.E., **2004**. Stable carbon isotopic characterisation of free and bound lipid constituents of archaeological ceramic vessels released by solvent extraction, alkaline hydrolysis and catalytic hydrolysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 71, 613–634.
- Croteau, R., Johnson, M.A., **1985**. Biosynthesis of terpenoid wood extractives, in: Higuchi, T. (Ed.), *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*. Academic Press, Orlando, San Diego, New York, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, pp. 379–439.
- Da Silva, M.J., Robles-Dutenhefner, P., Menini, L., Gusevskaya, E.V., **2003**. Cobalt catalyzed autoxidation of monoterpenes in acetic acid and acetonitrile solutions. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 201, 71–77.

- Dal Ri, L., Tecchiati, U., **2003**. Una distilleria per la pece della fine dell'età del Bronzo dal lago di Ledro nel Trentino (loc. Longhini-Assat). Dans: Attraverso Le Alpi. Stuttgart: Uomini, Vie, Beni, Konrad Theiss Verlag, pp. 175–181.
- Das, M.C., Mahato, S.B., **1983**. Triterpenoids. *Phytochemistry* 22, 1071–1095.
- David, R., **2008**. Egyptian mummies and modern science. Cambridge University Press, Manchester.
- Davy, G.S., Halsall, T.G., Jones, E.R.H., Meakins, G.D., **1951a**. The chemistry of the triterpenes. Part X. The structures of some isomerisation products from betulin and betulinic acid. *Journal of the Chemical Society* 2702–2705.
- Davy, G.S., Halsall, T.G., Jones, E.R.H., Meakins, G.D., **1951b**. The chemistry of the triterpenes. Part IX. Elucidation of the betulin-oleanolic acid relationship. *Journal of the Chemical Society*, 2696–2702.
- Diallo, B., Vanhaelen, M., Vanhaelen-Fastré, R., Konoshima, T., Kozuka, M., Tokuda, H., **1989**. Studies on inhibitors of skin-tumor promotion. Inhibitory effects of triterpenes from *Cochlospermum tinctorium* on Epstein-Barr virus activation. *Journal of Natural Products* 52, 879–881.
- Diaz, M.A., Ourisson, G., Bisset, N.G., **1966**. Etudes chimio-taxonomiques dans la famille des diptérocarpacées-I. *Phytochemistry* 5, 855–863.
- Dinda, B., Debnath S., Mohanta, B.C., Harigaya, Y., **2010**. Naturally occurring triterpenoid saponins. *Chemistry & Biodiversity* 7, 2327–2580.
- Dix, T.A., Marnett, L.J., **1985**. Conversion of linoleic acid hydroperoxide to hydroxy, keto, epoxyhydroxy, and trihydroxy fatty acids by hematin. *The Journal of Biological Chemistry* 260, 5351–5357.
- Drieu, L., **2017**. Fabrication et usages des poteries durant le Néolithique et la Protohistoire en Europe : les apports de l'archéologie biomoléculaire. Thèse de doctorat, Université Côte d'Azur, France.
- Dudd, S.N., Evershed, R.P., **1999**. Unusual triterpenoid fatty acyl ester components of archaeological birch bark tars. *Tetrahedron Letters* 40, 359–362.

Références bibliographiques

- Dutta, S., Mallick, M., Bertram, N., Greenwood, P.F., Mathews, R.P., **2009**. Terpenoid composition and class of Tertiary resins from India. *International Journal of Coal Geology* 80, 44–50.
- Dutta, S., Saxena, R., Singh, H., **2014**. Exceptional preservation of angiosperm markers in Miocene and Eocene ambers. *Geology* 42, 155–158.
- Ebert, Q., **2016**. Substances organiques en contexte archéologique : Etude des processus d'altération et caractérisation d'ingrédients cachés par dégradations chimiques sélectives. Mémoire de Master 2, Université de Strasbourg, France.
- Ekman, R., **1983**. The suberin monomers and triterpenoids from the outer bark of *Betula verrucosa* Ehrh. *Holzforschung* 37, 205–211.
- Evershed, R.P., Berstan, R., Grew, F., Copley, M.S., Charmant, A.J.H., Barham, E., Mottram, H.R., Brown, G., **2004**. Formulation of a Roman cosmetic. *Nature* 432, 35–36.
- Evershed, R.P., **2008**. Organic residue analysis in archaeology: the archaeological biomarker revolution. *Archaeometry* 50, 895–924.
- Facchetti, F., Ribechini, E., Betrò, M., Colombini, M.P., **2012**. Organic residues analysis: the case of a beaker found in Theban necropolis, Egypt. *International Journal of Conservation Science* 3, 259–264.
- Faix, O., Meier, D., Fortmann, I., **1990**. Thermal degradation products of wood. *Holz als Roh- und Werkstoff* 48, 281–285.
- Ferreira, R., Garcia, H., Sousa, A.F., Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D., Rebelo, L.P.N., Silva Pereira, C., **2013**. Isolation of suberin from birch outer bark and cork using ionic liquids: A new source of macromonomers. *Industrial Crops and Products* 44, 520–527.
- Fioriti, J.A., Krampl, V., Sims, R.J., **1967**. Lactones in autoxidized vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 44, 534–538.
- Frankel, E.N., Neff, W.E., Rohwedder, W.K., Khambay, B.P.S., Garwood, R.F., Weedon, B.C.L., **1977**. Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry: I. Methyl oleate. *Lipids* 12, 901–907.
- Frankel, E.N., **1980**. Lipid oxidation. *Progress in Lipid Research* 19, 1–22.
- Frankel, E.N., Neff, W.E., Selke, E., **1981**. Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry: VII. Volatile thermal decomposition products of pure

Références bibliographiques

- hydroperoxides from autoxidized and photosensitized oxidized methyl oleate, linoleate and linolenate. *Lipids* 16, 279–285.
- Frankel, E.N., Garwood, R.F., Khambay, B.P.S., Moss, G.P., Weedon, B.C.L., **1984**. Stereochemistry of olefin and fatty acid oxidation. Part 3. The allylic hydroperoxides from the autoxidation of methyl oleate. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 2233.
- Frankel, E.N., **1985**. Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids. *Progress in Lipid Research* 23, 197–221.
- Frankel, E.N., **1987**. Secondary products of lipid oxidation. *Chemistry and Physics of Lipids* 44, 73–85.
- Frankel, E.N., **2005**. Lipid oxidation. Woodhead Publishing, Davis, California.
- Galant, P., Halgand, J., Camus, H., Delaporte, S., **2000**. L’aven de la Rouvière: de la découverte spéléologique à l’étude archéologique. *Grands Causses – Préhistoire et Archéologie* 1, 32-63.
- Galant, P., Halgand, J., **2004**. Rogues - Aven de la Rouvière-. *ADLFI. Archéologie de la France - Informations, Languedoc-Roussillon*, 2-11.
<http://journals.openedition.org/adlfi/11582>
- Gandini, A., Neto, C.P., Silvestre, A.J.D., **2006**. Suberin: a promising renewable resource for novel macromolecular materials. *Progress in Polymer Science* 31, 878-892.
- Gardner, H.W., Kleiman, R., Weisleder, D., **1974**. Homolytic decomposition of linoleic acid hydroperoxide: identification of fatty acid products. *Lipids* 9, 696–706.
- Gardner, H.W., **1975**. Decomposition of linoleic acid hydroperoxides. Enzymic reactions compared with nonenzymic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 23, 129–136.
- Gardner, H.W., **1989**. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Biology and Medicine* 7, 65–86.
- Glombitza, C., Mangelsdorf, K., Horsfield, B., **2009**. Maturation related changes in the distribution of ester bound fatty acids and alcohols in a coal series from the New Zealand Coal Band covering diagenetic to catagenetic coalification levels. *Organic Geochemistry* 40, 1063–1073.

- Glombitza, C., Mangelsdorf, K., Horsfield, B., **2011**. Structural insights from boron tribromide ether cleavage into lignites and low maturity coals from the New Zealand Coal Band. *Organic Geochemistry* 42, 228–236.
- Goth, K., de Leeuw, J.W., Püttmann, W., Tegelaar, E.W., **1988**. Origin of Messel Oil Shale kerogen. *Nature* 336, 759–761.
- Graziano, M.L., Carotenuto, A.T., Iesce, M.R., Scarpati, R., **1977**. Comparison between triplet and singlet molecular oxygen oxidation of fully substituted alkoxyoxazoles. *Journal of Heterocyclic Chemistry* 14, 1215–1219.
- Green, B., Bentley, M.D., Chung, B.Y., Lynch, N.G., Jensen, B.L., **2007**. Isolation of betulin and rearrangement to allobetulin. A biomimetic natural product synthesis. *Journal of Chemical Education* 84, 1985.
- Grochowski, E., Bolesławska, T., Jurczak, J., **1977**. Reaction of diethyl azodicarboxylate with ethers in the presence of *N*-Hydroxyimides as catalysts. *Synthesis*, 718-720.
- Groom, P., Schenck, T., Pedersen, G.M., **2015**. Experimental explorations into the aceramic dry distillation of *Betula pubescens* (downy birch) bark tar. *Archaeological and Anthropological Sciences* 7, 47–58.
- Grünberg, J.M., **2002**. Middle Palaeolithic birch-bark pitch. *Antiquity* 76, 15–16.
- Gunasekara, N., **2004**. Phylogenetic and molecular dating analyses of the tropical tree family Dipterocarpaceae based on chloroplast *matK* nucleotide sequence data. Thèse de doctorat, Université de Concordia, Canada.
- Hamberg, M., **1983**. Autoxidation of linoleic acid isolation and structure of four dihydroxyoctadecadienoic acids. *Biochimica et Biophysica Acta* 752, 353–356.
- Hansel F.A., Evershed R.P., **2009**, Formation of dihydroxy acids from *Z*-monounsaturated alkenoic acids and their use as biomarkers for the processing of marine commodities in archaeological pottery vessels. *Tetrahedron*, 50, 5562–5564.
- Hansel, F.A., Bull, I.D., Evershed, R.P., **2011**. Gas chromatographic mass spectrometric detection of dihydroxy fatty acids preserved in the ‘bound’ phase of organic residues of archaeological pottery vessels: GC/MS of dihydroxy fatty acids in pottery vessels. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 25, 1893–1898.

- Hao, X., Schilling, M.R., Wang, X., Khanjian, H., Heginbotham, A., Han, J., Auffret, S., Wu, X., Fang, B., Tong, H., **2019**. Use of THM-PY-GC/MS technique to characterize complex, multilayered Chinese lacquer. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 140, 339–348.
- Hardy, K., Buckley, S., Collins, M.J., Estalrich, A., Brothwell, D., Copeland, L., García-Taberner, A., García-Vargas, S., Rasilla, M., Lalueza-Fox, C., Huguet, R., Bastir, M., Santamaría, D., Madella, M., Wilson, J., Cortés, Á.F., Rosas, A., **2012**. Neanderthal medics? Evidence for food, cooking, and medicinal plants entrapped in dental calculus. *Naturwissenschaften* 99, 617–626.
- Hauteville, Y., Michels, R., Malartre, F., Trouiller, A., **2006**. Vascular plant biomarkers as proxies for palaeoflora and palaeoclimatic changes at the Dogger/Malm transition of the Paris Basin (France). *Organic geochemistry* 37, 610–625.
- Hayek, E.W.H., Jordis, U., Moche, W., Sauter, F., **1989**. A bicentennial of betulin. *Phytochemistry* 28, 2229–2242.
- Hayek, E.W.H., Krenmayr, P., Lohninger, H., Jordis, U., Moche, W., Sauter, F., **1990**. Identification of archaeological and recent wood tar pitches using gas chromatography/mass spectrometry and pattern recognition. *Analytical Chemistry* 62, 2038–2043.
- Hellmuth, K.-H., **1989**. Natural analogues of bitumen and bituminized radioactive waste. Finnish Centre for Radiation and Nuclear Safety, Helsinki.
- Helwig, K., Monahan, V., Poulin, J., **2008**. The identification of hafting adhesive on a slotted antler point from a southwest Yukon ice patch. *American Antiquity* 73, 279–288.
- Heng, D., **2018**. Ships, shipwrecks, and archaeological recoveries as sources of Southeast Asian history. Oxford research encyclopedia of Asian history, Arizona.
- Heron, C., Nemcek, N., Bonfield, K.M., Dixon, D., Ottaway, B.S., **1994**. The chemistry of Neolithic beeswax. *Naturwissenschaften* 81, 266–269.
- Höferl, M., Stoilova, I., Schmidt, E., Wanner, J., Jirovetz, L., Trifonova, D., Krastev, L., Krastanov, A., **2014**. Chemical composition and antioxidant properties of Juniper berry (*Juniperus communis* L.) essential oil. Action of the essential oil on the antioxidant protection of *Saccharomyces cerevisiae* model organism. *Antioxidants* 3, 81–98.

- Hofmann, I.C., Hutchison, J., Robson, J.N., Chicarelli, M.I., Maxwell, J.R., **1992**. Evidence for sulphide links in a crude oil asphaltene and kerogens from reductive cleavage by lithium in ethylamine. *Organic Geochemistry* 19, 371–387.
- Holloway, P.J., **1972**. The composition of suberin from the corks of *Quercus suber* L. and *Betula pendula* roth. *Chemistry and Physics of Lipids* 9, 158–170.
- Houssini, I., Harrad, M.A., Boualy, B., Ouahrouch, A., **2014**. Aerobic oxidation of aryl-himachalene using a combination of N-hydroxy phthalimide and cobalt(II) acetoacetate. *Chemistry and Materials Research* 6, 110–114.
- Huang, A.-C., Burrett, S., Sefton, M.A., Taylor, D.K., **2014**. Production of the pepper aroma compound, (-)-rotundone, by aerial oxidation of α -guaiene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 10809–10815.
- Huang, A.-C., Sefton, M.A., Sumbly, C.J., Tiekink, E.R.T., Taylor, D.K., **2015**. Mechanistic studies on the autoxidation of α -guaiene: Structural diversity of the sesquiterpenoid downstream products. *Journal of Natural Products* 78, 131–145.
- Ioakimoglou, E., Boyatzis, S., Argitis, P., Fostiridou, A., Papapanagiotou, K., Yannovits, N., **1999**. Thin-film study on the oxidation of linseed oil in the presence of selected copper pigments. *Chemistry of Materials* 11, 2013–2022.
- Iqbal, J., Bhatia, B., Nayyar, N.K., **1994**. Transition metal-promoted free-radical reactions in organic synthesis: The formation of carbon-carbon bonds. *Chemical Reviews* 94, 519–564.
- Ishii, Y., Nakayama, K., Takeno, M., Sakaguchi, S., Iwahama, T., Nishiyama, Y., **1995**. Novel catalysis by N-hydroxyphthalimide in the oxidation of organic substrates by molecular oxygen. *The Journal of Organic Chemistry* 60, 3934–3935.
- Jacob, J., Disnar, J.-R., Boussafir, M., Albuquerque, A.L.S., Sifeddine, A., Turcq, B., **2007**. Contrasted distributions of triterpene derivatives in the sediments of Lake Caçó reflect paleoenvironmental changes during the last 20,000 yrs in NE Brazil. *Organic Geochemistry* 38, 180–197.
- Jefford, C.W., Boschung, A.F., Rimbault, C.G., **1976**. The reaction of singlet and triplet oxygen with 2-phenylnorbornene. *Helvetica Chimica Acta* 59, 2542–2550.
- Jones, J., Higham, T.F.G., Chivall, D., Bianucci, R., Kay, G.L., Pallen, M.J., Oldfield, R., Ugliano, F., Buckley, S.A., **2018**. A prehistoric Egyptian mummy: evidence for an

- 'embalming recipe' and the evolution of early formative funerary treatments. *Journal of Archaeological Science* 100, 191–200.
- Joye, N.M., Lawrence, R.V., **1961**. The thermal isomerization of palustric acid. *Journal of Organic Chemistry* 26, 1024–1026.
- Kaneshiro, E.S., Ellis, J.E., Guo, Z., Jayasimhulu, K., Maiorano, J.N., Kallam, K.A., **1996**. Characterizations of neutral lipid fatty acids and *cis*-9,10-epoxy octadecanoic acid in *Pneumocystis carinii carinii*. *Infection and Immunity* 64, 4105-4114.
- Karg, S., Hansen, U.L., Walldén, A.M., Glastrup, J., Ærenlund Pedersen, H., Sonne Nielsen, F.O., **2014**. Vegetal grave goods in a female burial on Bornholm (Denmark) from the Late Roman Iron Age period interpreted in a comparative European perspective. *Danish Journal of Archaeology* 3, 52–60.
- Kawai, Y., Takeda, S., Terao, J., **2007**. Lipidomic analysis for lipid peroxidation-derived aldehydes using gas chromatography-mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology* 20, 99–107.
- Kimpe, K., Jacobs, P.A., Waelkens, M., **2001**. Analysis of oil used in late Roman oil lamps with different mass spectrometric techniques revealed the presence of predominantly olive oil together with traces of animal fat. *Journal of Chromatography A* 937, 87–95.
- Köckritz, A., Martin, A., **2008**. Oxidation of unsaturated fatty acid derivatives and vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* 110, 812–824.
- Kohnen, M.E.L., Sinninghe Damsté, J.S., De Leeuw, J.W., **1991**. Biases from natural sulphurization in palaeoenvironmental reconstruction based on hydrocarbon biomarker distributions. *Nature* 349, 775–778.
- Koller, J., Baumer, U., Kaup, Y., Etspüler, H., Weser, U., **1998**. Embalming was used in Old Kingdom. *Nature* 391, 343–344.
- Koller, J., Baumer, U., Mania, D., **2001**. High-tech in the middle Palaeolithic: Neandertal-manufactured pitch identified. *European Journal of Archaeology* 4, 385–397.
- Koller, J., Baumer, U., Kaup, Y., Weser, U., **2005**. Herodotus' and Pliny's embalming materials identified on ancient Egyptian mummies. *Archaeometry* 47, 609–628.
- Koopmans, M.P., Schaeffer-Reiss, C., de Leeuw, J.W., Lewan, M.D., Maxwell, J.R., Schaeffer, P., Sinninghe Damsté, J.S., **1997**. Sulphur and oxygen sequestration of *n*-C₃₇ and *n*-C₃₈

- unsaturated ketones in an immature kerogen and the release of their carbon skeletons during early stages of thermal maturation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 61, 2397–2408.
- Kozowyk, P.R.B., Soressi, M., Pomstra, D., Langejans, G.H.J., **2017**. Experimental methods for the Palaeolithic dry distillation of birch bark: implications for the origin and development of Neandertal adhesive technology. *Scientific Reports* 7. doi:10.1038/s41598-017-08106-7
- Kurt, Y., Suleyman Kaçar, M., Isik, K., **2008**. Traditional tar production from *Cedrus libani* A. Rich on the Taurus mountains in southern Turkey. *Economic Botany* 62, 615–620.
- Lambert, J.B., Levy, A.J., Niziolek, L.C., Feinman, G.M., Gayford, P.J., Santiago-Blay, J.A., Wu, Y., **2017**. The resinous cargo of the Java Sea Wreck. *Archaeometry* 59, 949–964.
- Lampi, A.-M., Juntunen, L., Toivo, J., Piironen, V., **2002**. Determination of thermo-oxidation products of plant sterols. *Journal of Chromatography B* 777, 83–92.
- Langenheim, J.H., **2003**. Plant resins: chemistry, evolution, ecology, and ethnobotany. Timber Press, Portland, Cambridge.
- Languri, G.M., **2004**. Molecular studies of asphalt, mummy and Kassel earth pigments: their characterisation, identification and effect on the drying of traditional oil paint. Thèse de doctorat, Université d'Amsterdam, Pays-Bas.
- Laurent, F., Minvielle, J.M., Connan, J., Darnell, M., Bissada, A., Poveda, P., **2011**. La pirogue gallo-romaine de Sassenay (Saône-et-Loire). *Revue Archéologique de l'Est* 60, 537–552.
- Lavie, D., Frolow, F., Meshulam, H., **1984**. The X-ray structure of methyl shoreate and the stereochemistry of eichlerianic acid, cabraleone and ocotillone. *Tetrahedron* 40, 419–420.
- Lazzari, M., Chiantore, O., **1999**. Drying and oxidative degradation of linseed oil. *Polymer Degradation and Stability* 65, 303–313.
- Lercker, G., Rodriguez-Estrada, M.T., Bonoli, M., **2003**. Analysis of the oxidation products of *cis*- and *trans*-octadecenoate methyl esters by capillary gas chromatography-ion-trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 985, 333–342.

Références bibliographiques

- Li, T.-S., Li, Y.-L., Liang, X.-T., **1989**. Studies on the synthesis of biomarkers: V. Synthesis of γ -lupane and its epimer. *Acta Chimica Sinica* 7, 544–548.
- Loeblich, V.M., Baldwin, D.E., O'Connor, R.T., Lawrence, R.V., **1955**. Thermal isomerization of levopimaric acid. *Journal of the American Chemical Society* 77, 6311–6313.
- Loeblich, V.M., Lawrence, R.V., **1957**. The thermal isomerization of neoabietic acid. *Journal of the American Chemical Society* 79, 1497–1499.
- Loewen, B., **2005**. Resinous paying materials in the French Atlantic, AD 1500-1800. History, technology, substances. *International Journal of Nautical Archaeology* 34, 238–252.
- Lohmann, F., **1988**. Aromatisations microbiennes de triterpènes végétaux. Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur de Strasbourg, France.
- Lohmann, F., Trendel, J., Hetru, C., Albrecht, P., **1990**. C-29 tritiated β -amyrin: chemical synthesis aiming at the study of aromatization processes in sediments. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 28, 377–386.
- Loidl-Stahlhofen, A., Hannemann, K., Spitteller, G., **1994**. Generation of α -hydroxyaldehydic compounds in the course of lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1213, 140–148.
- Loizzo, M.R., Saab, A., Tundis, R., Statti, G.A., Lampronti, I., Menichini, F., Gambari, R., Cinatl, J., Doerr, H.W., **2008**. Phytochemical analysis and in vitro evaluation of the biological activity against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) of *Cedrus libani* A. Rich. *Phytomedicine* 15, 79–83.
- Loureiro, M.R.B., Cardoso, J.N., **1990**. Aromatic hydrocarbons in the Paraiba Valley oil shale. *Organic Geochemistry* 15, 351–359.
- Lucas, A., **1930**. Cosmetics, perfumes and incense in Ancient Egypt. *The Journal of Egyptian Archaeology* 16, 41–53.
- Lucas, A., **1931**. “Cedar”-tree products employed in mummification. *Journal of Egyptian Archaeology* 17, 13–21.
- Lucquin, A., March, R.J., Cassen, S., **2007**. Analysis of adhering organic residues of two “coupes-à-socles” from the Neolithic funerary site “La Hougue Bie” in Jersey: evidences of birch bark tar utilisation. *Journal of Archaeological Science* 34, 704–710.

- Luo, Y.R., **2007**. Bond dissociation energies, in: Handbook of Chemistry and Physics 87th edition. Lide, D. R., London, pp. 9-54–9-82.
- Madhava Reddy, M., Punniyamurthy, T., Iqbal, J., **1995**. Cobalt catalyzed oxidation of cyclic alkenes with molecular oxygen: Allylic oxidation versus double bond attack. *Tetrahedron Letters* 36, 159–162.
- Mahato, S.B., Sen, S., **1997**. Advances in triterpenoid research, 1990-1994. *Phytochemistry* 44, 1185-1236.
- Malainey, M.E., Przybylski, R., Sherriff, B.L., **1999**. The fatty acid composition of native food plants and animals of Western Canada. *Journal of Archaeological Science* 26, 83–94.
- Mallégol, J., Gardette, J.-L., Lemaire, J., **2000**. Long-term behavior of oil-based varnishes and paints. Photo- and thermooxidation of cured linseed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77, 257–263.
- Mallick, M., Dutta, S., Greenwood, P.F., **2014**. Molecular characterization of fossil and extant dammar resin extracts: Insights into diagenetic fate of sesqui- and triterpenoids. *International Journal of Coal Geology* 121, 129–136.
- Mao, K., Hao, G., Liu, J., Adams, R.P., Milne, R.I., **2010**. Diversification and biogeography of *Juniperus* (Cupressaceae): variable diversification rates and multiple intercontinental dispersals. *New Phytologist* 188, 254–272.
- Marchand, D., Rontani, J.-F., **2001**. Characterisation of photo-oxidation and autoxidation products of phytoplanktonic monounsaturated fatty acids in marine particulate matter and recent sediments. *Organic Geochemistry* 32, 287–304.
- Marchand, D., Marty, J.-C., Miquel, J.C., Rontani, J.-F., **2005**. Lipids and their oxidation products as biomarkers for carbon cycling in the northwestern Mediterranean Sea: results from a sediment trap study. *Marine Chemistry* 95, 129–147.
- Maritan, L., **2017**. Ceramic materials, in: Nicosia, C., Stoops, G. (Eds), Archaeological soil and sediment micromorphology. John Wiley & Sons, Oxford, United Kingdom.
- Martin, V.J.J., Yu, Z., Mohn, W.W., **1999**. Recent advances in understanding resin acid biodegradation: microbial diversity and metabolism. *Archives of Microbiology* 172, 131–138.

- Matsushita, Y., Sugamoto, K., Iwakiri, Y., Yoshida, S., Chaen, T., Matsui, T., **2010**. Aerobic oxidation of 8,11,13-abietatrienes catalyzed by *N*-hydroxyphthalimide combined with 2,2'-azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitrile) and its application to synthesis of naturally occurring diterpenes. *Tetrahedron Letters* 51, 3931–3934.
- Maury-Lechon, G., Curtet, L., **1998**. Biogeography and evolutionary systematics of Dipterocarpaceae, in: Appanah, S., Turnbull, J.M. (Eds.), *A Review of Dipterocarps: Taxonomy; Ecology, and Silviculture*. Center for International Forestry Research ; Forest Research Institute Malaysia, Bogor, Indonesia, p. 220.
- Mayyas, A., Douglas, K., Hoffmann, T., Thorenz, U., Yaseen, I.B., Mohammed, E.-K., **2013**. Organic residues preserved in archaeological ceramics from the early Bronze Age site of Khirbet Al-Batrawy in north-central Jordan. *Mediterranean Archaeology and Archaeometry* 13, 189–206.
- Mayyas, A.S., Douglas, K.A., **2015**. Organic residues in Iron Age II pottery vessels from Jneneh, Jordan. *Mediterranean Archaeology and Archaeometry* 15, 31–44.
- McGovern, P.E., Luley, B.P., Rovira, N., Mirzoian, A., Callahan, M.P., Smith, K.E., Hall, G.R., Davidson, T., Henkin, J.M., **2013**. Beginning of viniculture in France. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 110, 10147–10152.
- Mejanelle, P., Bleton, J., Goursaud, S., Tchaplal, A., **1997**. Identification of phenolic acids and inositols in balms and tissues from an Egyptian mummy. *Journal of Chromatography A* 767, 177–186.
- Melone, L., Punta, C., **2016**. *N*-hydroxyphthalimide (NHPI)-organocatalyzed aerobic oxidations: advantages, limits, and industrial perspectives, in: Stahl, S.S., Alsters, P.L. (Eds.), *Liquid phase aerobic oxidation catalysis: industrial applications and academic perspectives*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp. 253–265.
- Ménager, M., Azémard, C., Vieillescazes, C., **2014**. Study of Egyptian mummification balms by FT-IR spectroscopy and GC-MS. *Microchemical Journal* 114, 32–41.
- Meunier-Christmann, C., **1988**. *Géochimie organique de phosphates et schistes bitumineux marocains : étude du processus de phosphatogénèse*. Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur de Strasbourg, France.

Références bibliographiques

- Meunier-Christmann, C., Albrecht, P., Brassell, S.C., Ten Haven, H.L., Van der Linden, B., Rullkötter, J., Trendel, J., **1991**. Occurrence of dammar-13(17)-enes in sediments: Indications for a yet unrecognized microbial constituent ?. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 55, 3475–3483.
- Mills, J.S., Werner, A.E.A., **1955**. The chemistry of dammar resin. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 3132–3140.
- Mills, S.M., White, R., **1977**. Natural resins of art and archaeology. Their sources, chemistry, and identification. *Studies in Conservation* 22, 12–31.
- Mills, J.S., White, R., Gough, L.J., **1984**. The chemical composition of Baltic amber. *Chemical Geology* 47, 15–39.
- Mitkidou, S., Dimitrakoudi, E., Urem-Kotsou, D., Papadopoulou, D., Kotsakis, K., Stratis, J.A., Stephanidou-Stephanatou, I., **2008**. Organic residue analysis of Neolithic pottery from north Greece. *Microchimica Acta* 160, 493–498.
- Mlakar, A., Spiteller, G., **1994**. Reinvestigation of lipid peroxidation of linolenic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1214, 209–220.
- Modugno, F., Ribechini, E., Colombini, M.P., **2006a**. Aromatic resin characterisation by gas chromatography – mass spectrometry. Raw and archaeological materials. *Journal of Chromatography A* 1134, 298–304.
- Modugno, F., Ribechini, E., Colombini, M.P., **2006b**. Chemical study of triterpenoid resinous materials in archaeological findings by means of direct exposure electron ionisation mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20, 1787–1800.
- Mohan, D., Pittman, C.U., Steele, P.H., **2006**. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: A critical review. *Energy & Fuels* 20, 848–889.
- Morandi, L.F., Porta, S.N., Ribechini, E., **2018**. Evidence for birch bark tar use as an adhesive and decorative element in early Iron Age Central Italy: technological and socio-economic implications. *Archaeometry* 60, 1077–1087.
- Murray, A.P., Padley, D., McKirdy, D.M., Booth, W.E., Summons, R.E., **1994**. Oceanic transport of fossil dammar resin: The chemistry of coastal resinites from South Australia. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58, 3049–3059.

Références bibliographiques

- Neff, W.E., Frankel, E.N., Scholfield, C.R., Weisleder, D., **1978**. High-pressure liquid chromatography of autoxidized lipids: I. Methyl oleate and linoleate. *Lipids* 13, 415–421.
- Niekus, M.J.L.Th., Kozowyk, P.R.B., Langejans, G.H.J., Ngan-Tillard, D., Van Keulen, H., Van der Plicht, J., Cohen, K.M., Van Wingerden, W., Van Os, B., Smit, B.I., Amkreutz, L.W.S.W., Johansen, L., Verbaas, A., Dusseldorp, G.L, **2019**. Middle Paleolithic complex technology and a Neandertal tar-backed tool from the Dutch North Sea. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 116, 22081–22087.
- Ohfuji, T., Kaneda, T., **1973**. Characterization of toxic compound in thermally oxidized oil. *Lipids* 8, 353–359.
- Orsavova, J., Misurcova, L., Ambrozova, J., Vicha, R., Mlcek, J., **2015**. Fatty acids composition of vegetable oils and its contribution to dietary energy intake and dependence of cardiovascular mortality on dietary intake of fatty acids. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 12871–12890.
- Orsini, S., Ribechini, E., Modugno, F., Klügl, J., Di Pietro, G., Colombini, M., **2015**. Micromorphological and chemical elucidation of the degradation mechanisms of birch bark archaeological artefacts. *Heritage Science* 3, 2. doi: 10.1186/s40494-015-0032-7
- Osipowicz, G., Dvoráková, J.K., Dohnálková, H., Kelm, R., Paardekooper, R.P., **2005**. A method of wood tar production without the use of ceramics. (Re)construction and Experiment in Archaeology – European Platform 2, 11–17.
- Ottaway, B.S., **1992**. The Fischergasse: a wetland site in Lower Bavaria. *Antiquity* 66, 689–701.
- Otto, A., Wilde, V., **2001**. Sesqui-, di-, and triterpenoids as chemosystematic markers in extant conifers-A review. *The Botanical Review* 67, 141–238.
- Otto, A., Simoneit, B.R.T., 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.
- Ozawa, T., Hayakawa, M., Takamura, T., Sugiyama, S., Suzuki, K., Iwata, M., Taki, F., Tomita, T., **1986**. Biosynthesis of leukotoxin, 9, 10-epoxy-12 octadecenoate, by leukocytes in lung lavages of rat after exposure to hyperoxia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 134, 1071–1078.

- Pant, P., Rastogi, R.P., **1979**. The triterpenoids. *Phytochemistry* 18, 1095–1108.
- Paoli, M., Nam, A.-M., Castola, V., Casanova, J., Bighelli, A., **2011**. Chemical variability of the wood essential oil of *Cedrus atlantica manetti* from Corsica. *Chemistry & Biodiversity* 8, 344–351.
- Papageorgiou, V.P., Bakola-Christianopoulou, M.N., Apazidou, K.K., Psarros, E.E., **1997**. Gas chromatographic–mass spectroscopic analysis of the acidic triterpenic fraction of mastic gum. *Journal of Chromatography A* 769, 263–273.
- Papakosta, V., Smittenger, R.H., Gibbs, K., Jordan, P., Isaksson, S., **2015**. Extraction and derivatization of absorbed lipid residues from very small and very old samples of ceramic potsherds for molecular analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and single compound stable carbon isotope analysis by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS). *Microchemical Journal* 123, 193-200.
- Paquette, G., Kupranycz, D.B., Van de Voort, F.R., **1985**. The mechanisms of lipid autoxidation I. primary oxidation products. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* 18, 112–118.
- Pastorova, I., Van der Berg, K.J., Boon, J.J., Verhoeven, J.W., **1997**. Analysis of oxidised diterpenoid acids using thermally assisted methylation with TMAH. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 43, 41–57.
- Parreira, L.A., Gonçalves, D.C., Menini, L., Gusevskaya, E.V., **2016**. Aerobic oxidation of naturally occurring α -bisabolol catalyzed by palladium(II) salts as sole catalysts. *Applied Catalysis A: General* 524, 126–133.
- Petroselli, M., Franchi, P., Lucarini, M., Punta, C., Melone, L., **2014**. Aerobic oxidation of alkylaromatics using a lipophilic *N*-hydroxyphthalimide: overcoming the industrial limit of catalyst solubility. *ChemSusChem* 7, 2695–2703.
- Petrůj, J., Marchal, J., **1980**. Mechanism of ketone formation in the thermooxidation and radiolytic oxidation of low density polyethylene. *Radiation Physics and Chemistry* (1977) 16, 27–36.
- Pietrzak, S., **2012**. Wood tar in the Dnieper and Elbe communities: VI - II millenium BC. Dans: *Baltic-Pontic Studies* 17, Kosko, A. (Ed), p. 44.

- Pinto, P.C.R.O., Sousa, A.F., Silvestre, A.J.D., Neto, C.P., Gandini, A., Eckerman, C., Holmbom, B., **2009**. *Quercus suber* and *Betula pendula* outer barks as renewable sources of oleochemicals: a comparative study. *Industrial Crops and Products* 29, 126–132.
- Pitthard, V., Stone, R., Stanek, S., Griesser, M., Claudia-Kryza-Gersch, Hanzer, H., **2011**. Organic patinas on Renaissance and Baroque bronzes—Interpretation of compositions of the original patination by using a set of simulated varnished bronze coupons. *Journal of Cultural Heritage* 12, 44–53.
- Poehland, B.L., Carté, B.K., Francis, T.A., Hyland, L.J., Allaudeen, H.S., Troupe, N., **1987**. In vitro antiviral activity of dammar resin triterpenoids. *Journal of Natural Products* 50, 706–713.
- Popova, L., Matveenko, J.L., Vershilov, S., **2017**. Oxidation of derivatives of polyfluoroalkyl esters of resin acids. *Fluorine Notes* 3, 1–5.
- Porter, N.A., Caldwell, S.E., Mills, K.A., **1995**. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* 30, 277–290.
- Punniyamurthy, T., Bhatia, B., Reddy, M.M., Maikap, G.C., Iqbal, J., **1997**. A versatile cobalt(II)-Schiff base catalyzed oxidation of organic substrates with dioxygen: Scope and mechanism. *Tetrahedron* 53, 7649–7670.
- Punniyamurthy, T., Kalra, S.J.S., Iqbal, J., **1995**. Cobalt(II) catalyzed biomimetic oxidation of hydrocarbons in the presence of dioxygen and 2-methylpropanal. *Tetrahedron Letters* 36, 8497–8500.
- Putschew, A., Schaeffer-Reiss, C., Schaeffer, P., Koopmans, M.P., de Leeuw, J.W., Lewan, M.D., Sinninghe, D.J.S., Maxwell, J.R., **1998**. Release of sulfur- and oxygen-bound components from a sulfur-rich kerogen during simulated maturation by hydrous pyrolysis. *Organic Geochemistry* 29, 1875–1890.
- Rageot, M., **2015**. Les substances naturelles en Méditerranée nord-occidentale (VIe-Ier millénaire BCE) : chimie et archéologie des matériaux exploités pour leurs propriétés adhésives et hydrophobes. Thèse de doctorat, Université de Nice Sophia-Antipolis, France.

- Rageot, M., Pêche-Quilichini, K., Py, V., Filippi, J.-J., Fernandez, X., Regert, M., **2016**. Exploitation of beehive products, plant exudates and tars in Corsica during the early Iron Age. *Archaeometry* 58, 315–332.
- Rageot, M., Théry-Parisot, I., Beyries, S., Lepère, C., Carré, A., Mazuy, A., Filippi, J.-J., Fernandez, X., Binder, D., Regert, M., **2019**. Birch bark tar production: experimental and biomolecular approaches to the study of a common and widely used prehistoric adhesive. *Journal of Archaeological Method and Theory* 26, 276–312.
- Reber, E.A., Hart, J.P., **2008**. Pine resins and pottery sealing: analysis of absorbed and visible pottery residues from central New York State. *Archaeometry* 50, 999–1017.
- Recupero, F., Punta, C., **2007**. Free radical functionalization of organic compounds catalyzed by *N*-hydroxyphthalimide. *Chemical Reviews* 107, 3800–3842.
- Regert, M., Bland, H.A., Dudd, S.N., Bergen, P.F.V., Evershed, R.P., **1998**. Free and bound fatty acid oxidation products in archaeological ceramic vessels. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 265, 2027–2032.
- Regert, M., Colinart, S., Degrand, L., Decavallas, O., **2001**. Chemical alteration and use of beeswax through time: accelerated ageing tests and analysis of archaeological samples from various environmental contexts. *Archaeometry* 43, 549–569.
- Regert, M., Rolando, C., **2002**. Identification of archaeological adhesives using direct inlet electron ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 74, 965–975.
- Regert, M., Vacher, S., Moulherat, C., Decavallas, O., **2003**. Adhesive production and pottery function during the Iron Age at the site of Grand Aunay (Sarthe, France). *Archaeometry* 45, 101–120.
- Regert, M., **2004**. Investigating the history of prehistoric glues by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 27, 244–254.
- Regert, M., Alexandre, V., Thomas, N., Lattuati-Derieux, A., **2006**. Molecular characterisation of birch bark tar by headspace solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry: a new way for identifying archaeological glues. *Journal of Chromatography A* 1101, 245–253.
- Regert, M., Devise, T., Le Hô, A.-S., Rougeulle, A., **2008**. Reconstructing ancient Yemeni commercial routes during the Middle Ages using structural characterization of terpenoid resins. *Archaeometry* 50, 668–695.

- Reunanen, M., Holmbom, B., Edgren, T., **1993**. Analysis of archaeological birch bark pitches. *Holzforschung* 47, 175–177.
- Reunanen, M., Ekman, R., Hafizoğlu, H., **1996**. Composition of tars from softwoods and birch. *Holzforschung* 50, 118–120.
- Rezzi, S., Bighelli, A., Castola, V., Casanova, J., **2005**. Composition and chemical variability of the oleoresin of *Pinus nigra* ssp. *laricio* from Corsica. *Industrial Crops and Products* 21, 71–79.
- Ribechini, E., Modugno, F., Colombini, M.P., Evershed, R.P., **2008**. Gas chromatographic and mass spectrometric investigations of organic residues from Roman glass unguentaria. *Journal of Chromatography A* 1183, 158–169.
- Richnow, H.H., Jenisch, A., Michaelis, W., **1992**. Structural investigations of sulphur-rich macromolecular oil fractions and a kerogen by sequential chemical degradation. *Organic Geochemistry* 19, 351–370.
- Richnow, H.H., Jenisch, A., Michaelis, W., **1993**. The chemical structure of macromolecular fractions of a sulfur-rich oil. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 57, 2767–2780.
- Ries-Kautt, M., **1986**. Etude des lipides dans divers types de sols. Aspects moléculaires. Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur de Strasbourg, France.
- Robinson, N., Evershed, R.P., Higgs, W.J., Jerman, K., Eglinton, G., **1987**. Proof of a pine wood origin for pitch from Tudor (Mary Rose) and Etruscan shipwrecks: application of analytical organic chemistry in archaeology. *The Analyst* 112, 637–644.
- Romanus, K., Neer, W.V., Marinova, E., Verbeke, K., Luypaerts, A., Accardo, S., Hermans, I., Jacobs, P., Vos, D.D., Waelkens, M., **2008**. Brassicaceae seed oil identified as illuminant in Nilotic shells from a first millennium AD Coptic church in Bawit, Egypt. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390, 783–793.
- Rontani, J.-F., **1998**. Photodegradation of unsaturated fatty acids in senescent cells of phytoplankton: photoproduct structural identification and mechanistic aspects. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 114, 37–44.
- Rontani, J.-F., Aubert, C., **2004**. Trimethylsilyl transfer during electron ionization mass spectral fragmentation of some ω -hydroxycarboxylic and ω -dicarboxylic acid trimethylsilyl derivatives and the effect of chain length. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18, 1889–1895.

- Rontani, J.-F., Aubert, C., Belt, S.T., **2015**. EIMS fragmentation pathways and MRM quantification of 7 α / β -hydroxy-dehydroabietic acid TMS derivatives. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 26, 1606–1616.
- Ruiz-Samblás, C., González-Casado, A., Cuadros-Rodríguez, L., **2015**. Triacylglycerol determination by high-temperature gas chromatography in the analysis of vegetable oils and foods: a review of the past 10 years. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55, 1618–1631.
- Rullkötter, J., Michaelis, W., **1989**. The structure of kerogen and related materials. A review of recent progress and future trends. *Organic Geochemistry* 16, 829–852.
- Sakakibara, J., Kaiya, T., **1983**. Terpenoids of *Rhododendron japonicum*. *Phytochemistry* 22, 2547–2552.
- Salvador, J.A.R., Pinto, R.M.A., Santos, R.C., Le Roux, C., Beja, A.M., Paixão, J.A., **2009**. Bismuth triflate-catalyzed Wagner-Meerwein rearrangement in terpenes. Application to the synthesis of the 18 α -oleanane core and A-neo-18 α -oleanene compounds from lupanes. *Organic and Biomolecular Chemistry* 7, 508–517.
- Sandars, N.K., **1995**. Prehistoric art in Europe. Yale University Press. ed. New Haven, London.
- Sandison, C.M., Alexander, R., Kagi, R.I., Boreham, C.J., **2003**. Early diagenetic transformation of organic matter in a marine-influenced lignite. *Organic Geochemistry* 34, 1081–1102.
- Saptorahardjo, A., **1985**. Diagénèse précoce de la matière organique dans la série sédimentaire du delta de la Mahakam, Indonésie : Aspects moléculaires. Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur de Strasbourg, France.
- Sarret, M., Adam, P., Schaeffer, P., Ebert, Q., Perthuisson, J., Pierrat-Bonnefois, G., **2017**. Organic substances from Egyptian jars of the Early Dynastic period (3100–2700 BCE): Mode of preparation, alteration processes and botanical (re)assessment of “cedrium.” *Journal of Archaeological Science: Reports* 14, 420–431.
- Sauter, F., Jordis, U., Graf, A., Werther, W., Varmuza, K., **2000**. Studies in organic archaeometry I: Identification of the prehistoric adhesive used by the “Tyrolean Iceman” to fix his weapons. *Arkivoc* 2000, 735–747.

- Schaeffer, P., Ocampo, R., Callot, H.J., Albrecht, P., **1993**. Extraction of bound porphyrins from sulphur-rich sediments and their use for reconstruction of palaeoenvironments. *Nature* 364, 133–136.
- Schaeffer, P., Reiss, C., Albrecht, P., **1995a**. Geochemical study of macromolecular organic matter from sulfur-rich sediments of evaporitic origin (Messinian of Sicily) by chemical degradations. *Organic Geochemistry* 23, 567–581.
- Schaeffer, P., Trendel, J., Albrecht P., **1995b**. An unusual aromatization process of higher plant triterpenes in sediments. *Organic Geochemistry* 23, 273–275.
- Schaeffer-Reiss, C., Schaeffer, P., Putschew, A., Maxwell, J.R., **1998**. Stepwise chemical degradation of immature S-rich kerogens from Vena del Gesso (Italy). *Organic Geochemistry* 29, 1857–1873.
- Schaich, K.M., **2013**. Challenges in Elucidating Lipid Oxidation Mechanisms, in: Logan, A., Nienaber, U., Pan, X. (Eds.), Lipid Oxidation. Elsevier, pp. 1–52.
- Schenck, T., Groom, P., **2018**. The aceramic production of *Betula pubescens* (downy birch) bark tar using simple raised structures. A viable Neanderthal technique? *Archaeological and Anthropological Sciences* 10, 19–29.
- Schmidt, J., Huneck, S., **1979**. Mass spectroscopy of natural products. V—Mass spectroscopic studies of ring a substituted allobetulane derivatives. *Organic Mass Spectrometry* 14, 646–655.
- Schmidt, P., Blessing, M., Rageot, M., Lovita, R., Pfleging, J., Nickel, K.G., Righetti, L., Tennie, C., **2019**. Birch tar production does not prove Neanderthal behavioural complexity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 116, 17707–17711.
- Schnell, G., Schaeffer, P., Tardivon, H., Motsch, E., Connan, J., Ertlen, D., Schwartz, D., Schneider, N., Adam, P., **2014**. Contrasting diagenetic pathways of higher plant triterpenoids in buried wood as a function of tree species. *Organic Geochemistry* 66, 107–124.
- Scholz-Böttcher, B.M., Nissenbaum, A., Rullkötter, J., **2013**. An 18th century “Mumia vera aegyptica” – fake or authentic? *Organic Geochemistry* 65, 1–18.
- Sciau, P., Goudeau, P., **2015**. Ceramics in art and archaeology: a review of the materials science aspects. *The European Physical Journal B* 88, 132. doi:10.1140/epjb/e2015-60253-8

Références bibliographiques

- Serebrennikova, O.V., Strel'nikova, E.B., Russkikh, I.V., **2017**. Composition of organic compounds in bottom sediments of lakes in the Taiga and Steppe zones in Siberia. *Geochemistry International* 55, 1090–1104.
- Serpico, M., White, R., **2000**. The botanical identity and transport of incense during the Egyptian New Kingdom. *Antiquity* 74, 884–897.
- Sessa, D.J., Gardner, H.W., Kleiman, R., Weisleder, D., **1978**. Oxygenated fatty acid constituents of soybean phosphatidylcholines. *Lipids* 13, 458–458.
- Silvestre, A.J.D., Gandini, A., **2008**. Rosin: major sources, properties and applications, in: Belgacem, M.N., Gandini, A. (Eds.), *Monomers, polymers and composites from renewable resources*. Elsevier, pp. 67–88.
- 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 fossil woods, ambers and coals. *Organic Geochemistry* 10, 877–889.
- Shenkin, A., Chandler, C.J., Boyd, D.S., Jackson, T., Disney, M., Majalap, N., Nilus, R., Foody, G., bin Jami, J., Reynolds, G., Wilkes, P., Cutler, M.E.J., Van der Heijden, G.M.F., Burslem, D.F.R.P., Coomes, D.A., Bentley, L.P., Malhi, Y., **2019**. The world's tallest tropical tree in three dimensions. *Frontiers in Forests and Global Change* 2. doi:10.3389/ffgc.2019.00032
- Shiva, M.P., Jantan, I., **1998**. Non-timber forest products from dipterocarps, in: Appanah, S., Turnbull, J.M. (Eds.), *A Review of Dipterocarps: Taxonomy; Ecology, and Silviculture*. Center for International Forestry Research ; Forest Research Institute Malaysia, Bogor, Indonesia, p. 220.
- Solazzo, C., Courel, B., Connan, J., Van Dongen, B.E., Barden, H., Penkman, K., Taylor, S., Demarchi, B., Adam, P., Schaeffer, P., Nissenbaum, A., Bar-Yosef, O., Buckley, M., **2016**. Identification of the earliest collagen- and plant-based coatings from Neolithic artefacts (Nahal Hemar cave, Israel). *Scientific Reports* 6, 31053. doi: 10.1038/srep31053.
- Spiteller, G., **1998**. Linoleic acid peroxidation—the dominant lipid peroxidation process in low density lipoprotein—and its relationship to chronic diseases. *Chemistry and Physics of Lipids* 95, 105–162.

Références bibliographiques

- Spiteller, P., Spiteller, G., **1998**. Strong dependence of the lipid peroxidation product spectrum whether $\text{Fe}^{2+}/\text{O}_2$ or $\text{Fe}^{3+}/\text{O}_2$ is used as oxidant. *Biochimica et Biophysica Acta* 1392, 23–40.
- Spiteller, D., Spiteller, G., **2000**. Oxidation of linoleic acid in low-density lipoprotein: an important event in atherogenesis. *Angewandte Chemie International Edition* 39, 585–589.
- Spiteller, P., Kern, W., Reiner, J., Spiteller, G., **2001**. Aldehydic lipid peroxidation products derived from linoleic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1531, 188–208.
- Spyckerelle, C., **1975**. Constituants aromatiques de sédiments. Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur de Strasbourg, France.
- Spyckerelle, C., Greiner, A.Ch., Albrecht, P., Ourisson, G., **1977a**. Aromatic hydrocarbons from geological sources. Part III. A tetrahydrochrysene derived from triterpenes, in recent and old sediments: 3,3,7-trimethyl-1,2,3,4-tetrahydrochrysene. *Journal of Chemical Research* 330–331.
- Spyckerelle, C., Greiner, A.Ch., Albrecht, P., Ourisson, G., **1977b**. Aromatic hydrocarbons from geological sources. Part IV. An octahydrochrysene derived from triterpenes, in oil shale: 3,3,7,12a-tetramethyl-1,2,3,4,4a,11,12,12a-octahydrochrysene. *Journal of Chemical Research* 332–333.
- Steigenberger, G. **2013**. The Vigani Cabinet – Analysis of historical resinous materials by gas chromatography-mass spectrometry and infrared spectroscopy. Thèse de doctorat, Université de Dresde, Allemagne.
- Stern, B., Heron, C., Corr, L., Serpico, M., Bourriau, J., **2003**. Compositional variations in aged and heated *Pistacia* resin found in late Bronze Age Canaanite amphorae and bowls from Amarna, Egypt. *Archaeometry* 45, 457–469.
- Stout, S.A., **1992**. Aliphatic and aromatic triterpenoid hydrocarbons in a Tertiary angiospermous lignite. *Organic Geochemistry* 18, 51–66.
- Stout, S.A., **1996**. Resin-derived hydrocarbons in fresh and fossil dammar resins and Miocene rocks and oils in the Mahakam Delta, Indonesia, in: Anderson, K.B., Crelling, J.C. (Eds.), *Amber, Resinite and Fossil Resins*. American Chemical Society, Washington.

- Sun, I.-C., Shen, J.-K., Wang, H.-K., Cosentino, L.M., Lee, K.-H., **1998a**. Anti-AIDS agents. 32.1 Synthesis and anti-HIV activity of betulin derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 8, 1267–1272.
- Sun, I.-C., Wang, H.-K., Kashiwada, Y., Shen, J.-K., Cosentino, L.M., Chen, C.-H., Yang, L.-M., Lee, K.-H., **1998b**. Anti-AIDS Agents. 34. † Synthesis and structure–activity relationships of betulin derivatives as anti-HIV Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* 41, 4648–4657.
- Sy, L.-K., Ngo, K.-S., Brown, G.D., **1999**. Biomimetic synthesis of arteannuin h and the 3,2-rearrangement of allylic hydroperoxides. *Tetrahedron* 55, 15127–15140.
- Sy, L.-K., Brown, G.D., **2002**. The mechanism of the spontaneous autoxidation of dihydroartemisinic acid. *Tetrahedron* 58, 897–908.
- Tavendale, M.H., McFarlane, P.N., Mackie, K.L., Wilkins, A.L., Langdon, A.G., **1997**. The fate of resin acids-2. The fate of resin acids and resin acid derived neutral compounds in anaerobic sediments. *Chemosphere* 35, 2153–2166.
- Tchapla, A., Méjanelle, P., Bleton, J., Goursaud, S., **2004**. Characterisation of embalming materials of a mummy of the Ptolemaic era. Comparison with balms from mummies of different eras. *Journal of Separation Science* 27, 217–234.
- Ten Haven, H.L., Peakman, T.M., Rullkötter, J., **1992**. Δ^2 -triterpenes: Early intermediates in the diagenesis of terrigenous triterpenoids. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 56, 1993–2000.
- The Angiosperm Phylogeny Group, Chase, M.W., Christenhusz, M.J.M., Fay, M.F., Byng, J.W., Judd, W.S., Soltis, D.E., Mabberley, D.J., Sennikov, A.N., Soltis, P.S., Stevens, P.F., **2016**. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* 181, 1–20.
- Tirat, S., Degano, I., Echard, J.-P., Lattuati-Derieux, A., Lluveras-Tenorio, A., Marie, A., Serfaty, S., Huerou, J.-Y.L., **2016**. Historical linseed oil/colophony varnishes formulations: Study of their molecular composition with micro-chemical chromatographic techniques. *Microchemical Journal* 126, 200–213.
- Tissot, B.P., Welte, D.H., **1978**. Petroleum Formation and Occurrence. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo. Tolvanen, P., Mäki-Arvela, P.,

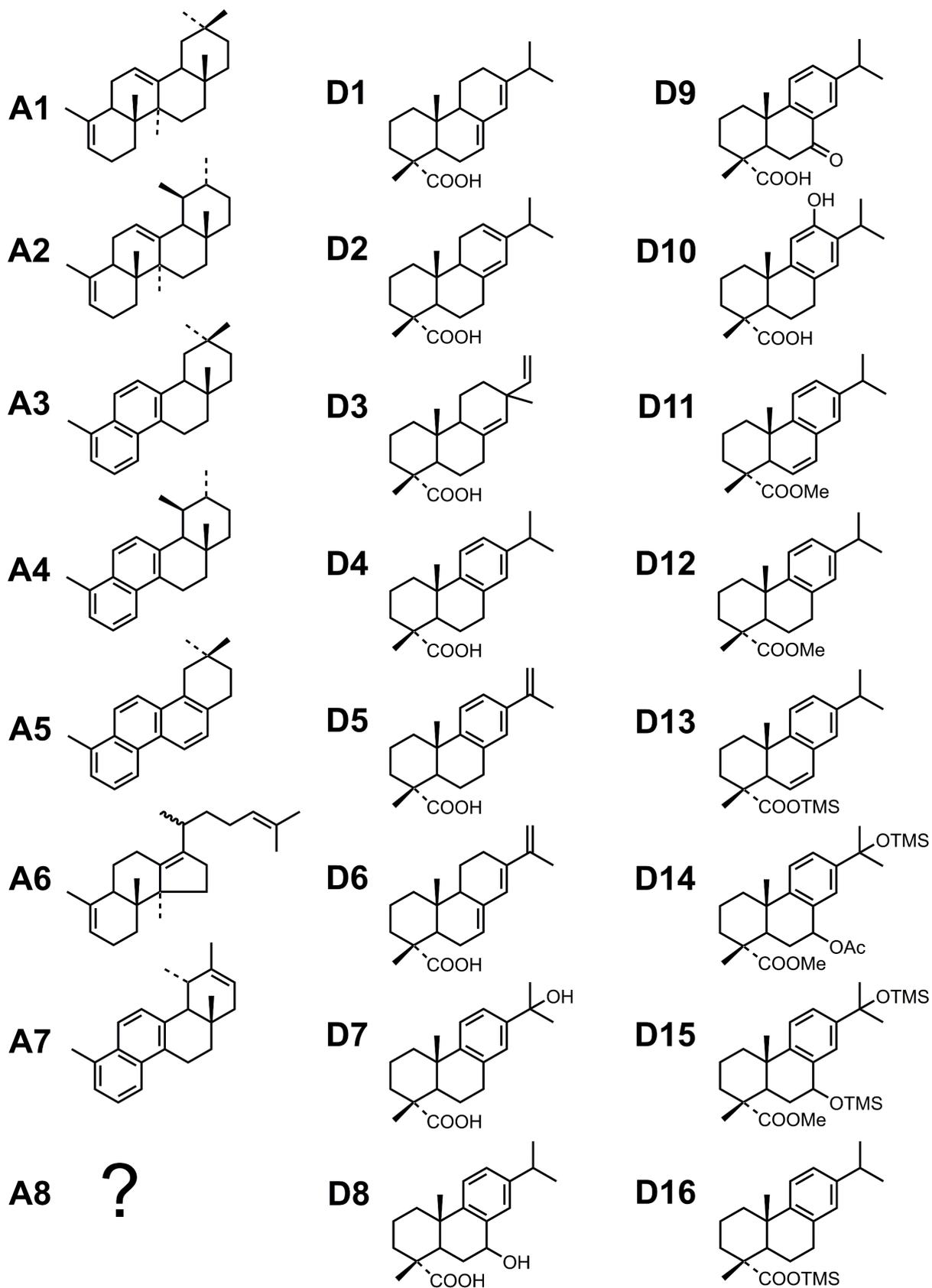
Références bibliographiques

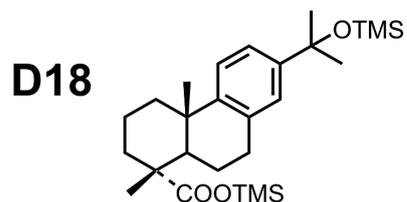
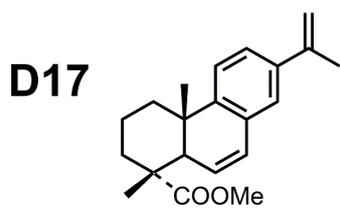
- Eränen, K., Wärnå, J., Holmbom, B., Salmi, T., Murzin, D.Yu., **2008**. Thermal polymerisation and autoxidation of technical grade linoleic acid. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 85, 567–572.
- Torquebiau, E., **1984**. Man-made dipterocarp forest in Sumatra. *Agroforestry Systems* 2, 103–127.
- Trendel, J., **1985**. Dégénération de triterpènes dans les sédiments. Aspects photochimiques et microbiologiques. Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur de Strasbourg, France.
- Trendel, J.M., Lohmann, F., Kintzinger, J.P., Albrecht, P., Chiarone, A., Riche, C., Cesario, M., Guilhem, J., Pascard, C., **1989**. Identification of *des-A*-triterpenoid hydrocarbons occurring in surface sediments. *Tetrahedron* 45, 4457–4470.
- Trintignac, A., **2003**. La production de poix dans la cité des Gabales (Lozère) à l'époque gallo-romaine. *Revue archéologique de Picardie* 1, 239–248.
- Ukiya, M., Kikuchi, T., Tokuda, H., Tabata, K., Kimura, Y., Arai, T., Ezaki, Y., Oseto, O., Suzuki, T., Akihisa, T., **2010**. Antitumor-promoting effects and cytotoxic activities of dammar resin triterpenoids and their derivatives. *Chemistry & Biodiversity* 7, 1871–1884.
- Urem-Kotsou, D., Stern, B., Heron, C., Kotsakis, K., **2002**. Birch-bark tar at Neolithic Makriyalos, Greece. *Antiquity* 76, 962–967.
- Urem-Kotsou, D., Mitkidou, S., Dimitrakoudi, E., Kokkinos, N., Ntinou, M., **2018**. Following their tears: Production and use of plant exudates in the Neolithic of North Aegean and the Balkans. *Quaternary International* 496, 68–79.
- Van Aarssen, B.G.K., Cox, H.C., Hoogendoorn, P., De Leeuw, J.W., **1990a**. A cadinene biopolymer in fossil and extant dammar resins as a source for cadinanes and bicadinanes in crude oils from South East Asia. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 54, 3021–3031.
- Van Aarssen, B.G.K., Kruk, C., Hessels, J.K.C., de Leeuw, J.W., **1990b**. Cis-cis-trans-bicadinane, a novel member of an uncommon triterpane family isolated from crude oils. *Tetrahedron Letters* 31, 4645–4648.
- Van Aarssen, B.G.K., de Leeuw, J.W., Horsfield, B., **1991**. A comparative study of three different pyrolysis methods used to characterise a biopolymer isolated from fossil and extant dammar resins. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 20, 125–139.

- Van Aarssen, B.G.K., Hessels, J.K.C., Abbink, O.A., de Leeuw, J.W., **1992**. The occurrence of polycyclic sesqui-, tri-, and oligoterpenoids derived from a resinous polymeric cadinene in crude oils from southeast Asia. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 56, 1231–1246.
- Van den Berg, K.J., Boon, J.J., Pastorova, I., Spetter, L.F.M., **2000**. Mass spectrometric methodology for the analysis of highly oxidized diterpenoid acids in Old Master paintings. *Journal of Mass Spectrometry* 35, 512–533.
- Van den Berg K. J., **2003**, Analysis of diterpenoid resins and polymers in paint media and varnishes, *MOLART and MOLART Report*, Amsterdam, 2003.
- Van der Doelen, G.A., Van den Berg, K.J., Boon, J.J., Shibayama, N., De la Rie, E.R., Genuit, W.J.L., **1998a**. 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.
- Van der Doelen, G.A., Van den Berg, K.J., Boon, J.J., **1998b**. Comparative chromatographic and mass-spectrometric studies of triterpenoid varnishes: Fresh material and aged samples from paintings. *Studies in Conservation* 43, 249–264.
- Van der Doelen, G.A., **1999**. Molecular studies of fresh and aged triterpenoid varnishes. Thèse de doctorat, Université d'Amsterdam, Pays-Bas.
- Velasco, J., Berdeaux, O., Márquez-Ruiz, G., Dobarganes, M.C., **2002**. Sensitive and accurate quantitation of monoepoxy fatty acids in thermoxidized oils by gas-liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 982, 145–152.
- Vogt, E., **1949**. The birch as a source of raw material during the Stone Age. *Proceedings of the Prehistoric Society* 15, 50–51.
- Vourlioti-Arapi, F., Michaelakis, A., Evergetis, E., Koliopoulos, G., Haroutounian, S.A., **2012**. Essential oils of indigenous in Greece six *Juniperus* taxa: chemical composition and larvicidal activity against the West Nile virus vector *Culex pipiens*. *Parasitology Research* 110, 1829–1839.
- Wakeham, S.G., Schaffner, C., Giger, W., **1980**. Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent lake sediments—II. Compounds derived from biogenic precursors during early diagenesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 44, 415–429.

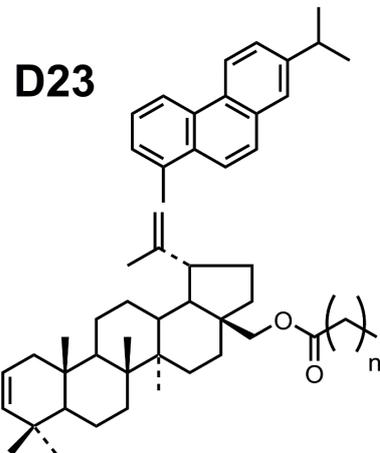
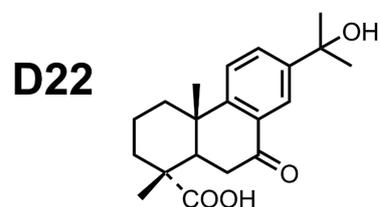
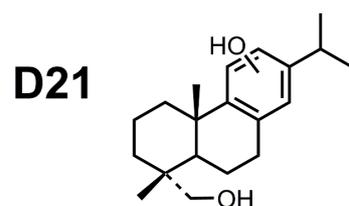
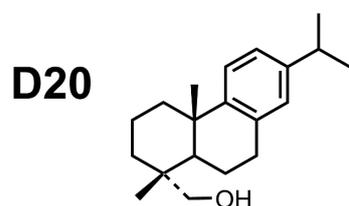
- Wentzel, B.B., Donners, M.P.J., Alsters, P.L., Feiters, M.C., Nolte, R.J.M., **2000**. N-hydroxyphthalimide/Cobalt(II) catalyzed low temperature benzylic oxidation using molecular oxygen. *Tetrahedron* 56, 7797–7803.
- Wolff, G.A., Trendel, J.M., Albrecht, P., **1989**. Novel monoaromatic triterpenoid hydrocarbons occurring in sediments. *Tetrahedron* 45, 6721–6728.
- Wyrzykiewicz, E., Wrzeciono, U., Zaprutko, L., **1989**. Triterpenoids. Part IV. Mass spectrometry of pentacyclic triterpenoids: 18 β - and 18 α -11-oxooleanolic acid derivatives. *Organic Mass Spectrometry* 24, 105-108.
- Xie, L., Yang, Z.-Y., Wen, J., Li, D.-Z., Yi, T.-S., **2014**. Biogeographic history of *Pistacia* (Anacardiaceae), emphasizing the evolution of the Madrean-Tethyan and the eastern Asian-Tethyan disjunctions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 77, 136–146.
- Xu, R., Fazio, G.C., Matsuda, S.P.T., **2004**. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry* 65, 261–291.
- Yi, T., Wen, J., Golan-Goldhirsh, A., Parfitt, D.E., **2008**. Phylogenetics and reticulate evolution in *Pistacia* (Anacardiaceae). *American Journal of Botany* 95, 241–251.
- Yilmaz, N., Alma, M.H., Nitz, S., Kollmannsberger, H., Efe, F.T., **2005**. Chemical composition of the essential oils from oleoresin on cones of *Cedrus libani*. *Asian Journal of Chemistry* 17, 2300–2306.
- Yoshino, Y., Hayashi, Y., Iwahama, T., Sakaguchi, S., Ishii, Y., **1997**. Catalytic oxidation of alkylbenzenes with molecular oxygen under normal pressure and temperature by N-hydroxyphthalimide combined with Co(OAc)₂. *The Journal of Organic Chemistry* 62, 6810–6813.

Appendice

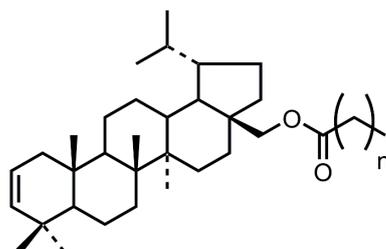




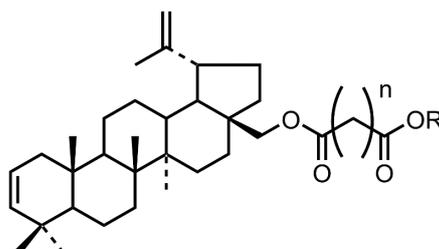
D19 Isomère de **D15**



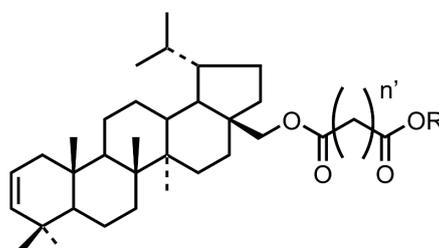
E1: $n = 2-20$
E1a: $n = 7$



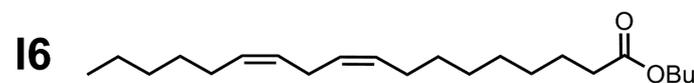
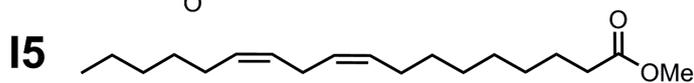
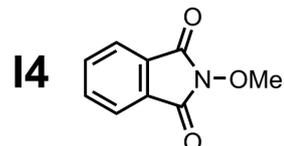
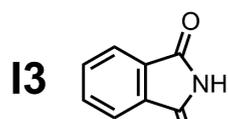
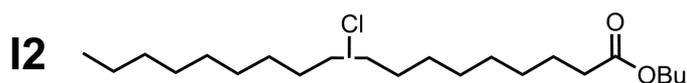
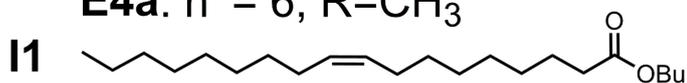
E2: $n = 2-20$
E2a: $n = 7$

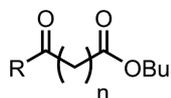
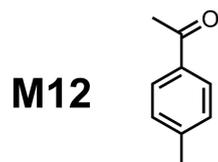
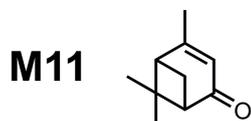
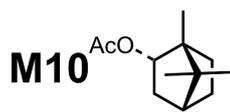
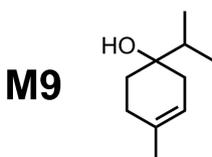
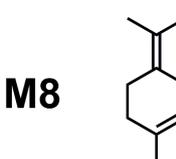
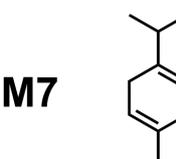
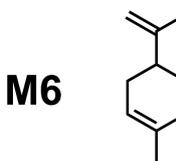
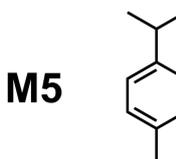
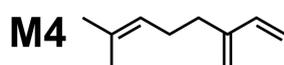
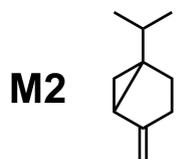
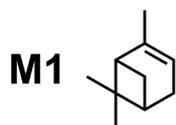


E3: $n' = 2-8, R=H$
E3a: $n' = 6, R=CH_3$



E4: $n' = 2-8, R=H$
E4a: $n' = 6, R=CH_3$





O1: R=OH; n=6

O2: R=OH; n=7

O3: R=OH; n=8

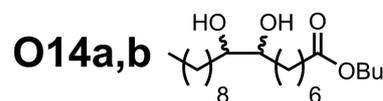
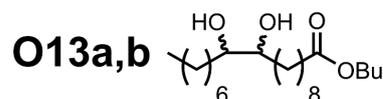
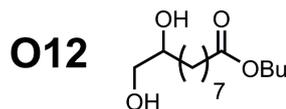
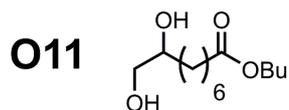
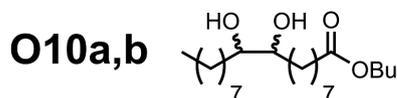
O4: R=OH; n=5

O5: R=OH; n=4

O6: R=OH; n=9

O7: R=H; n=6

O8: R=H; n=7

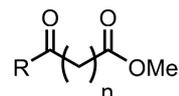
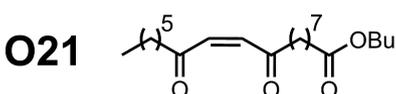
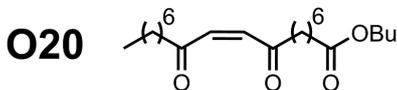


O15 diols non vicinaux de I1

O16 triols de I1

O17 + O18 alcool allylique de I1

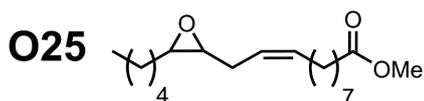
O19 inconnu

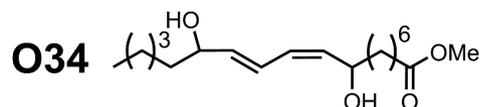
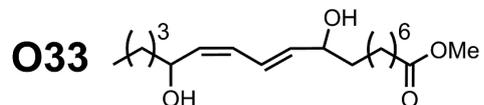
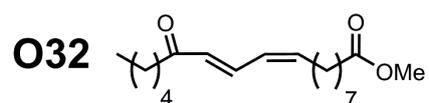
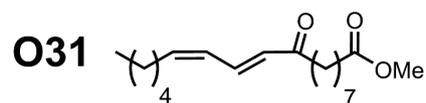
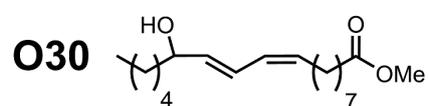
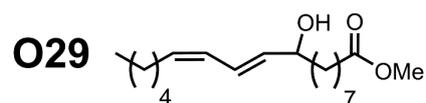
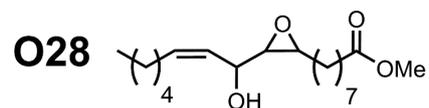
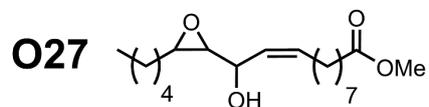
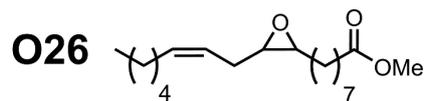


O22: R=OH; n=6

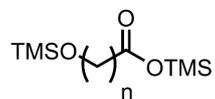
O23: R=OH; n=7

O24: R=H; n=7





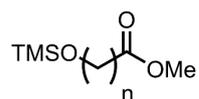
O35 tétrols de I5



O36 n=6

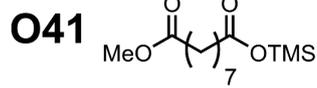
O37 n=7

O38 n=8



O39 n=7

O40 n=8



S1

S2

S3

S4

S5

S6

S7

S8a

S8b

S9

S10

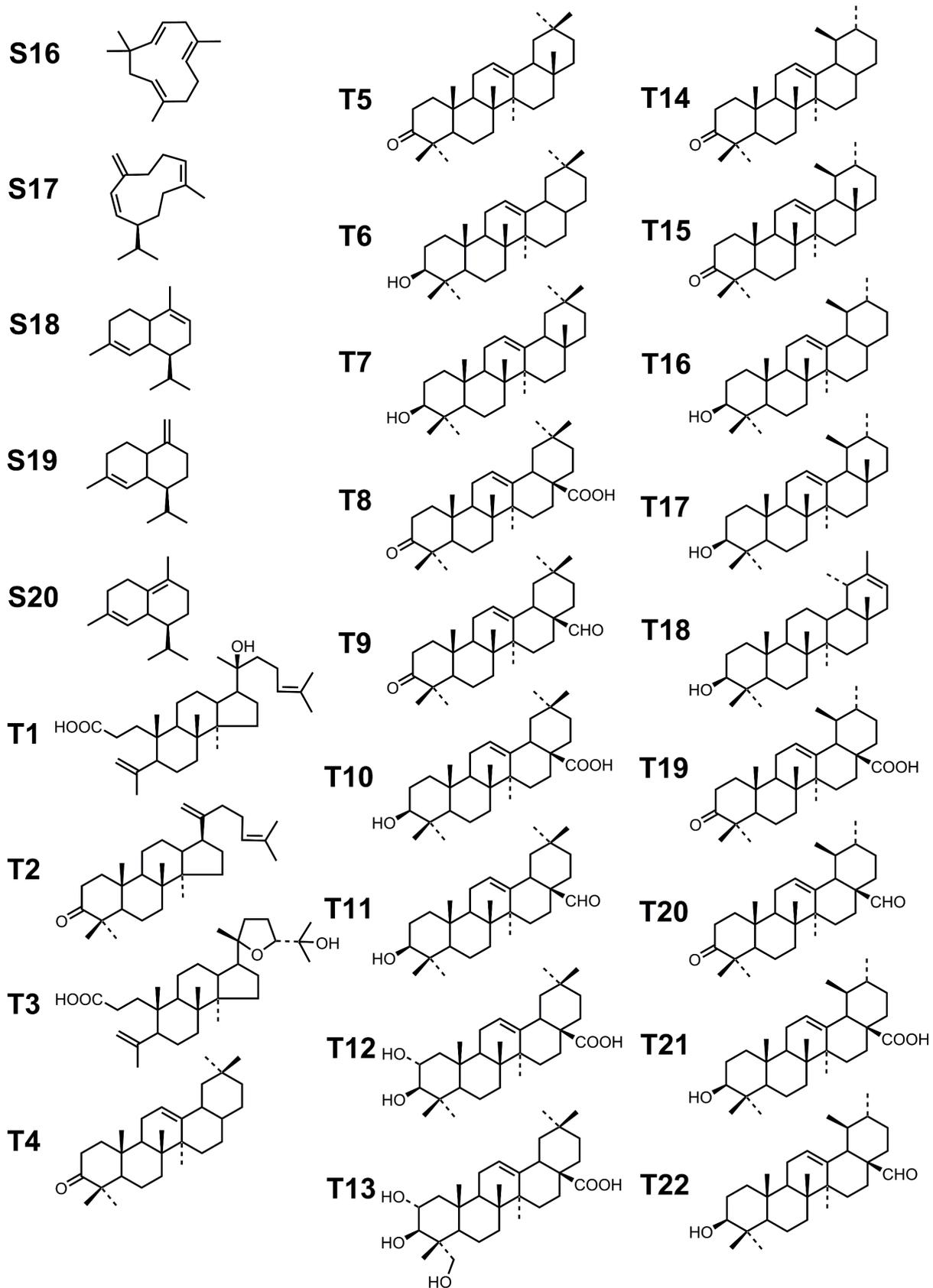
S11

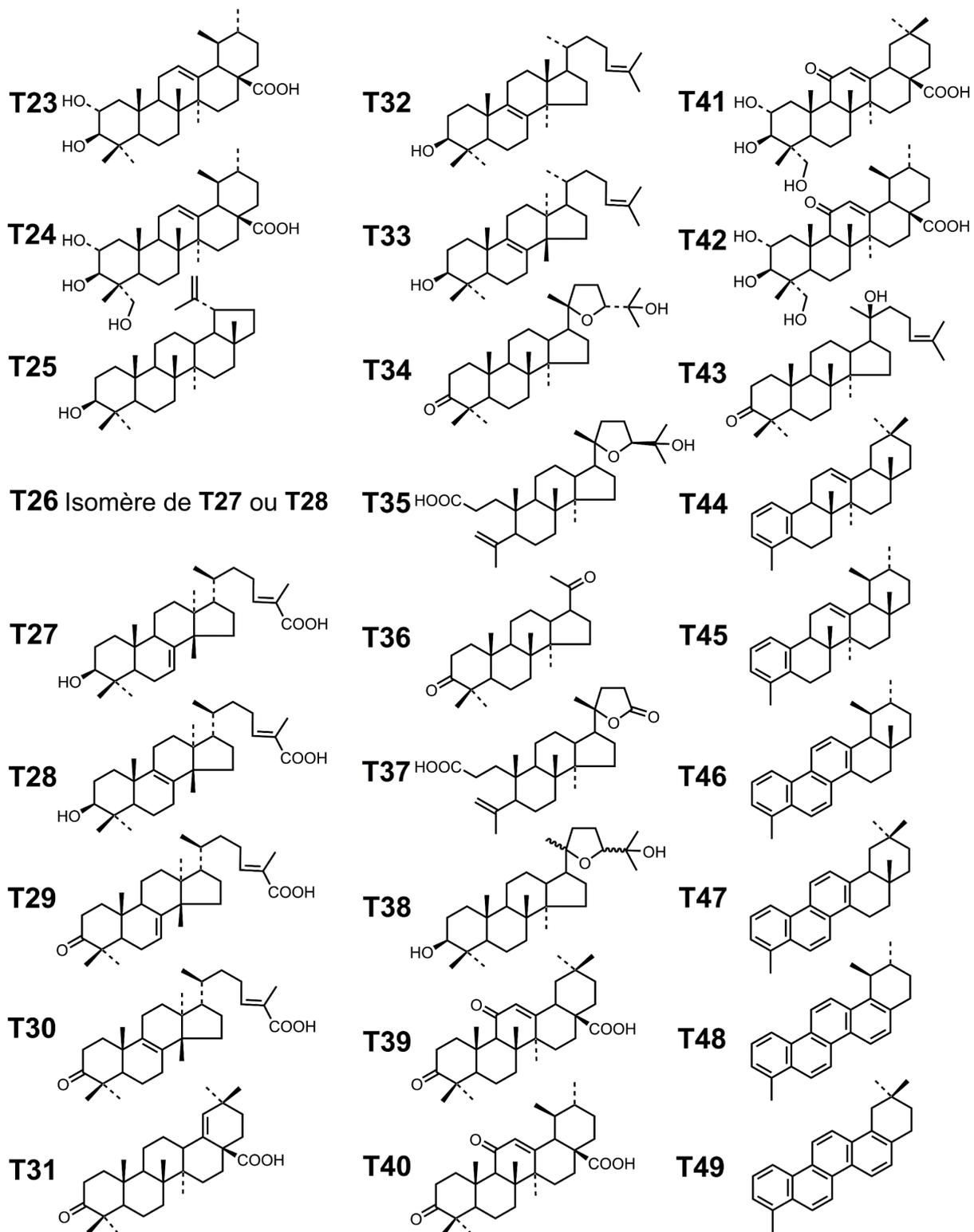
S12

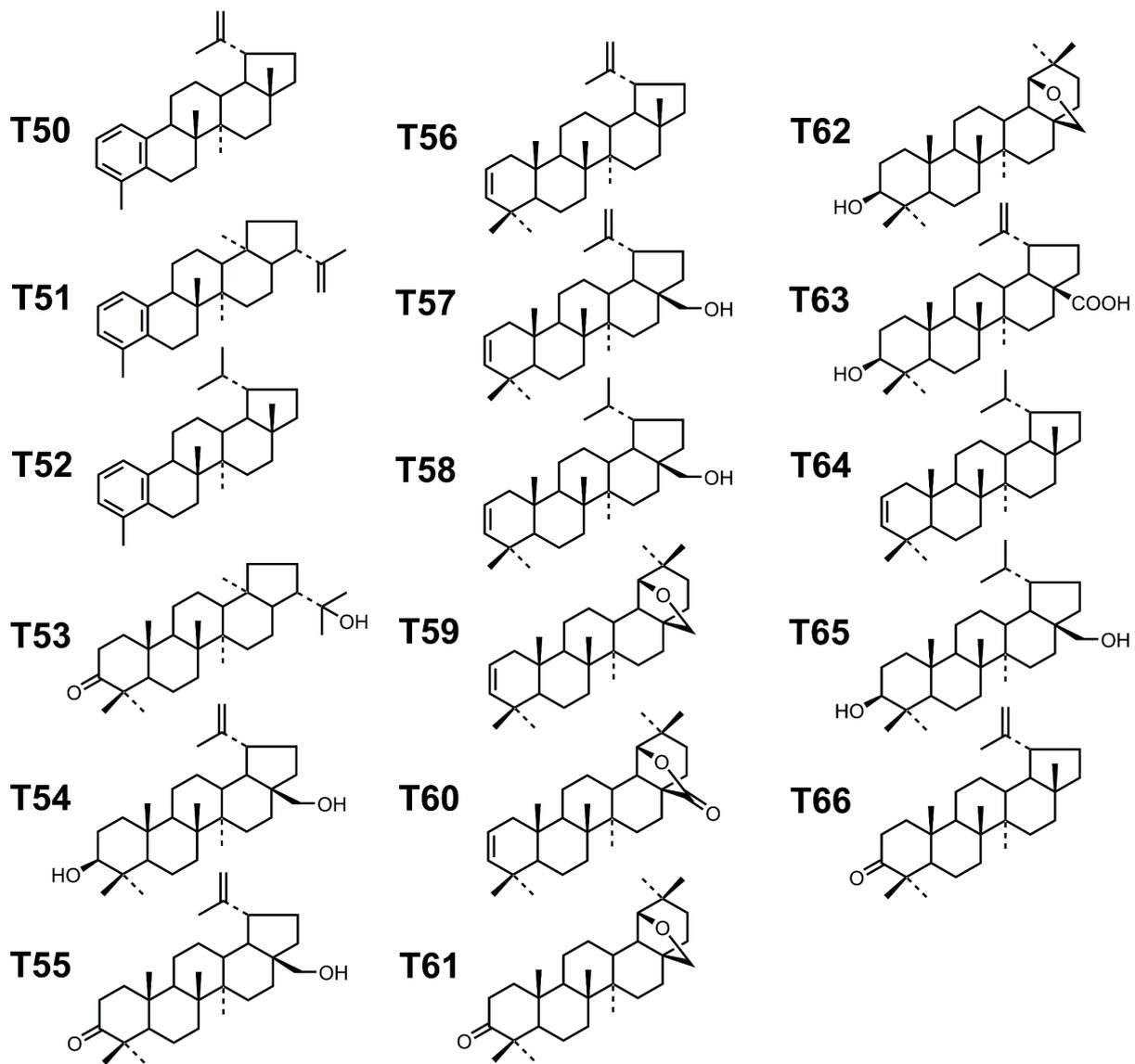
S13

S14

S15







Préparation et vieillissement de matières organiques en contexte archéologique : approche analytique et expérimentale

Cette thèse a été consacrée à la problématique de l'altération de substances organiques en contexte archéologique, avec pour objectifs de donner des clés analytiques et expérimentales pour étudier les processus mis en jeu, d'identifier de nouveaux outils moléculaires indicateurs des processus subis par les matériaux organiques archéologiques et d'interpréter l'impact de ces processus sur les signatures moléculaires de ces matériaux.

Après la mise au point d'un protocole expérimental de vieillissement en laboratoire reproduisant les processus « naturels » de vieillissement de substances organiques archéologiques, nous avons déterminé que les réactions croisées entre ingrédients (esters d'acides gras, terpènes) conduit à la formation de composés oligo-/polymériques intéressants à étudier à l'aide de réactions de dégradation chimique.

L'étude moléculaire de matériaux organiques archéologiques a aussi été abordée. Ainsi, de la résine de diptérocarpacées provenant de deux épaves asiatiques du XII^{ème} siècle et du brai de bouleau utilisé pour réparer des céramiques néolithiques ont été identifiés. De nouveaux biomarqueurs triterpéniques d'altération issus de la dégradation anaérobie en milieu sédimentaire de triterpènes précurseurs (résine), et des biomarqueurs de traitement thermique intense (brai) ont été caractérisés.

Mots clés :

Archéométrie, Autoxydation, Biomarqueurs, GC-MS, Terpènes, Brai de bouleau, Diptérocarpacées, Résine végétale, Biodégradation.

The present PhD thesis was devoted to the alteration processes affecting organic substances in an archaeological context, and aimed at providing analytical and experimental keys to investigate the nature of the alteration processes, to identify new molecular tools indicators of archaeological alteration processes and to interpret the impact of these processes on the molecular signatures of these organic materials.

Following the development of a laboratory ageing experimental protocol able to reproduce "natural" alteration of archaeological organic substances, we could establish that cross reactions between ingredients (esters of fatty acids, terpenoids) result in the formation oligo/polymeric material worth to be investigated by means of chemical degradation reactions.

Additionally, investigation of archaeological organic substances was carried out. Thus, dipterocarpaceae resins from two Asian shipwrecks from the XIInd Century and birch bark tar used to fix Neolithic ceramics have been identified. New triterpenoid biomarkers resulting from the sedimentary anaerobic degradation of parent triterpenoids (resins) and markers indicative of intense thermal treatment (tar) have been characterized.

Key words:

Archaeometry, Autoxidation, Biomarkers, GC-MS, Terpenes, Birch bark tar, Dipterocarpaceae, Plant resin, Biodegradation.