

Université des Sciences et Technologies de Lille

U.F.R de Chimie

Doctorat

Chimie

Sigrid MIRABAUD

**Développements méthodologiques en spectrométrie
de masse pour l'analyse des composés organiques
amorphes archéologiques**

Etude du site néolithique de Clairvaux XIV (Jura, France)

Thèse dirigée par C. Rolando
Et codirigée par M. Regert

Soutenue le 3 décembre 2007

Jury:

Mr. Gérard Bolbach
Mr. Yves Chilliard
Mr. Carl Heron
Mr. Pierre Pétrequin
Mme. Martine Regert
Mr. Christian Rolando
Mr. Marc Warengem

Rapporteur
Examineur
Rapporteur
Examineur
Directrice de thèse
Directeur de thèse
Président du jury

Volume 1 : Texte

2007

A Grand-père

Remerciements

Je remercie en tout premier lieu le CNRS et la Région Nord-Pas-de-Calais, qui m'ont accordé une bourse de docteur ingénieur, me permettant de faire ma thèse sous la direction de Christian Rolando, Directeur de Recherche au CNRS et Directeur de l'UMR 8009 à l'Université de Lille 1. Je tiens à faire part de ma profonde reconnaissance à Monsieur Christian Rolando, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir formée à la spectrométrie de masse. Je le remercie de la confiance qu'il m'a accordée durant ces années et de l'autonomie qu'il m'a laissée dans l'organisation de mon travail de thèse.

Je voudrais également remercier Madame Christiane Naffah, Directrice du Centre de Recherche et de Restauration des Musées de France et Monsieur Jean-Pierre Mohen, Directeur de l'UMR 171, pour m'avoir permis de travailler au C2RMF dans le cadre de ma thèse. Je tiens à leur exprimer ma gratitude, ainsi qu'à Monsieur Michel Menu, qui m'a donné la chance de faire mon DEA au laboratoire et à Madame Béatrice Sarrazin, qui a permis que je termine ma thèse dans les meilleures conditions possibles, en parallèle de ma prise de fonction au sein du département Restauration du C2RMF.

Je tiens à remercier Madame Martine Regert, Chargée de Recherche au CNRS, co-directeur de cette thèse, pour son encadrement, son soutien et ses conseils. J'ai beaucoup appris à ses côtés, tant sur le plan humain que professionnel, en Chimie analytique et en Archéologie. Elle m'a fait découvrir le potentiel de la chimie analytique dans le domaine de l'archéologie, que je compte bien utiliser dans celui de l'art et des peintures désormais.

J'adresse un immense merci à Anne-Marie et Pierre Pétrequin, qui m'ont accueillie à la base archéologique du CNRS au Frasnais. Ils m'ont non seulement fourni les échantillons archéologiques qui sont le cœur de cette thèse, mais ils ont surtout su être attentifs et disponibles, prêts à répondre à toutes mes questions de chimiste novice en archéologie. Cela a été un véritable enrichissement de pouvoir travailler avec eux et de partager le quotidien d'un chantier de fouille aussi passionnant que Clairvaux XIV. Je voudrais également remercier Monsieur Didier Binder, grâce à qui j'ai découvert un autre type de contexte archéologique, à Pendimoun. Sa patience et sa culture ont fait de ce chantier un apprentissage captivant de l'archéologie.

Je voudrais remercier Madame Cécile Cren-Olivé, qui m'a formée en spectrométrie de masse et qui a su me guider dans les labyrinthes de l'interprétation des spectres de masse. Ses conseils et son soutien sont pour une bonne part dans l'achèvement de ce travail. Que Monsieur Yves Chilliard, Directeur de Recherche à l'INRA, trouve ici mes remerciements les plus sincères, pour m'avoir fourni les échantillons de référence de produits laitiers, et pour nos longues discussions sur la caractérisation des produits laitiers.

Je tiens à exprimer toute mon affection et mon respect à mes parents, qui ont su m'épauler dans les moments difficiles et être heureux avec moi dans les moments de découvertes. Mes frères et sœurs et leur famille, Guillaume et Fleur, Astrid et Alexis, Mahaut et Aymeric, et Nicolas, ont toujours été là, chacun à sa manière, pour me remonter le moral, me faire rire ou tout simplement discuter. Je leur en suis extrêmement reconnaissante, et j'espère être, moi aussi, disponible pour eux. Un grand merci à Grand-Mère, qui a fait preuve d'une générosité sans faille en m'accueillant chez elle au début de ma thèse, et qui continue à soutenir cette petite-fille qui fait des études si longues.

Je vais essayer de remercier toutes les personnes, qui, plus ou moins proches, scientifiques ou non, ont été présentes tout au long de ma thèse. Je les remercie de leur aide, de leurs conseils et de leur attention. Que toutes les personnes non citées considèrent que ce paragraphe leur est dédié. Tout d'abord mes plus vifs remerciements vont au personnel, présent et passé, des deux équipes dans lesquelles j'ai travaillé, l'équipe Physico-Chimie pour l'Analyse et la Biologie de l'Université de Lille et l'équipe du laboratoire du C2RMF.

Florence Guérard, Adeline Page, Fabrice Cantais, François Dupire et Mohammed Kajout ont permis que mes longues séances sur les différents spectromètres de masse de l'Université de Lille se passent dans la bonne humeur. Je remercie tout particulièrement Adeline Page, toujours présente pour résoudre les menus problèmes techniques.

Je voudrais dire un immense merci à Juliette Langlois, responsable du laboratoire de chimie organique au C2RMF. Sans Juliette, "la bonne fée du labo", mon efficacité n'aurait pas été la même. Elle est toujours là pour aider à la mise en place des analyses, parler à un appareil récalcitrant, ou gérer les nombreux échantillons dans les moments de panique. Je voudrais également remercier Vanessa Alexandre, qui m'a beaucoup aidée pour l'analyse des échantillons d'adhésifs de Clairvaux XIV. Que Sandrine Pagès-Camagna, Anne-Solemn Le Hô, Maria-Filomena Guerra, Nathalie Balcar, Ina Reiche, Michel Dubus et Yvan Coquinot, chercheurs au C2RMF, soient remerciés de leurs précieux conseils et des nombreuses discussions que nous avons eues. Je tiens à inclure dans ces remerciements Abdelkader "Albert" Ouharani et Rémi

Brageu, nos informaticiens, sauveurs de données et pourvoyeurs de logiciels ainsi que l'ensemble du secrétariat du laboratoire du C2RMF, pour leur gentillesse et leur grande efficacité. Qu'Agnès Genevey, Eric Laval, Denis Pitzalis et Ruven Pillay, trouvent ici l'expression de mon amitié et de ma reconnaissance pour nos sorties, leurs blagues et leur gentillesse. Enfin, je ne voudrais pas oublier les thésards du laboratoire, Véronique, Sophia, Eléonore, Emilien, Céline, Laurence, Julien et Thibaut sans qui les journées auraient paru plus mornes... Je tiens tout particulièrement à remercier Véronique Wright, pour nos pauses, nos joies et nos découragements communs lors de la rédaction de nos thèses. Elsa et elle ont été des rayons de bonne humeur dans la grisaille de la rédaction.

Mes amis, qui bien qu'ignorant tout de mon domaine, m'ont entourée, et m'ont permis de me rappeler qu'il y a une vie en dehors de la thèse : Nathalie, Fleur et Charlotte, qui ont pris le temps de me relire et de corriger les nombreux participes passés mal accordés; Love-Love, Erwan, Sabine, Philippe, Marie et Amicie, qui m'ont obligée à garder un pied dans la vie réelle pendant ma rédaction. Je tiens à remercier tout particulièrement Love-love, qui est là depuis le début de ma thèse, toujours à l'écoute et prête à me remettre d'aplomb.

Résumé

L'analyse de la matière organique conservée dans les céramiques archéologiques est une voie très prometteuse pour appréhender la fonction des poteries à partir de leur contenu. La première étape de la méthodologie développée au cours de ce travail de recherche consiste en un *screening* de la composition moléculaire des extraits lipidiques archéologiques par chromatographie en phase gazeuse (CPG), couplée ou non à la spectrométrie de masse (CPG/SM). Nous avons étudié les résidus organiques de 80 céramiques du site lacustre de Clairvaux XIV (Néolithique, Jura, France). Différentes classes de matériaux ont été identifiées, cire d'abeille, brai de bouleau, matières grasses végétales et grasses animales. Ces dernières sont caractérisées par leur composition en triglycérides (TAG). Or ces composés sont très fragiles et peu volatils; ils sont donc difficilement analysables avec des techniques classiques telles que la CPG et la CPG/SM. C'est pourquoi différents modes d'ionisation en SM ont été évalués pour élucider la structure moléculaire des TAG. Grâce à la spectrométrie de masse tandem (SM/SM) avec une ionisation par nano-électrospray, en infusion directe, des critères de discrimination des grasses animales ont été déterminés. Ces critères ont été obtenus sur des grasses animales de référence (grasses sous-cutanées et produits laitiers; bovinés, ovinés et caprinés, fraîches et vieilles) et sont basés sur la distribution en acides gras de chaque groupe de triglycérides isobares. Pour la première fois, il a été possible d'identifier des produits laitiers de bovinés et de caprinés dans des céramiques archéologiques vieilles de plusieurs millénaires.

Mots-clés: céramiques archéologiques, matière organique, chromatographie en phase gazeuse, spectrométrie de masse, nano-électrospray, MALDI, DIOS, Q-q-TOF, FT-ICR, spectrométrie de masse tandem, produits laitiers, vieillissement

Abstract

Lipid materials are known to be preserved for millennia when trapped into the porous clay matrix of archaeological ceramic vessels or as carbonised matter adhering to the pottery. Until now, their characterisation mostly relied on gas chromatography (GC) investigations that enabled the identification of waxes, resins, tars, oils and fats. Animal fats are characterised by their triacylglycerol (TAG) composition. However, because of their low volatility and fragility, GC does not allow the determination of either their precise distribution nor their molecular structure. In order to establish new criteria for the differentiation of dairy products and adipose fats and for their specific identification, a new methodology was developed to characterise the structure of archaeological TAGs. Therefore, we analysed total and fractionated lipid extracts from archaeological potsherds (Clairvaux XIV, Neolithic, Jura, France; 80 vessels, 93 samples) along with reference animal dairy and adipose fats. The identification of the global molecular composition of the samples was achieved using GC and GC/MS as rapid screening methods, and different classes of natural products were identified. Due to the highly favourable preservation context, it was possible to select samples with a well-preserved TAG distribution, characteristic of animal fats. Several soft ionisation MS techniques were implemented, in order to ascertain the best structural characterisation of TAGs. Using nanoelectrospray MS and MS/MS, criteria based on the fatty acid distribution of isobaric TAGs were determined, for discriminating adipose and dairy fats and for the identification of their specific origin. Animal fats have been identified in 25 archaeological vessels, and the presence of both goat and cow adipose and dairy fats was assessed.

Key-words: Animal fats, archaeology, GC, GC/MS, NanoESI, MALDI, DIOS, FTICR, QqTOF, ageing, MS, MS/MS

Sommaire

Résumé.....	7
Abstract	8
Sommaire	9
Acronymes et abréviations courantes.....	13
Table des figures, tableaux et cartes.....	14
Tableaux	26
Cartes.....	31
Introduction générale.....	33
Chapitre I.....	39
Les matériaux organiques amorphes conservés dans les céramiques archéologiques: un état de la question	39
Introduction	41
A. Les premiers pas analytiques – Les analyses préliminaires	43
B. Du prélèvement à l'interprétation, les premières méthodologies développées.....	47
C. Les matières grasses animales et végétales : graisses, huiles et cires.....	52
C.1. Apports de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	52
C.1.1. les méthodologies analytiques développées pour l'identification des matières grasses	52
C.1.1.1. Extraction et analyse de l'extrait lipidique total.....	53
C.1.1.2. Analyse des acides gras	56
C.1.1.3. Analyse de la fraction insoluble	59
C.1.2. les biomarqueurs des matières grasses	64
C.1.2.1. Les matières grasses animales	64
C.1.2.2. Les huiles végétales.....	72
C.1.2.3. Les cires végétales	75
C.1.2.4. La cire d'abeille.....	76
C.1.3. les limites de la chromatographie en phase gazeuse.....	78
C.2. Les analyses isotopiques.....	79
C.2.1. Prérequis	80
C.2.1.1. Le fractionnement isotopique des plantes	81
C.2.1.2. Etude de la corrélation entre le $\delta^{13}\text{C}$ du régime alimentaire et les tissus animaux	82
C.2.2. L'analyse isotopique comme outil.....	86
C.2.2.1. Les cires végétales	87
C.2.2.2. Les cétones de condensation.....	88
C.2.2.3. La cire d'abeille	89
C.2.3. Les graisses animales.....	89
C.2.3.1. Ruminants vs. non ruminants	89
C.2.3.2. Les produits laitiers	91
C.2.3.3. Les autres graisses animales	95
C.2.4. Le site de Qasr Ibrîm	98
C.2.5. Le cas du maïs en Amérique.....	99
C.3. La chromatographie liquide et les analyses immunologiques	101
C.3.1. les lipides	101

C.3.1.1. La mise au point de l'HPLC pour l'analyse des triglycérides	102
C.3.1.2. L'analyse de résidus organiques archéologiques	109
C.3.2. les protéines	113
C.3.2.1. La chromatographie liquide	113
C.3.2.2. Les analyses immunologiques	115
C.3.2.3. La protéomique	118
D. Les matériaux résineux et bitumineux	122
D.1. Prérequis sur les résines, les brais et les goudrons	122
D.1.1. Vocabulaire	122
D.1.2. Les terpènes	123
D.1.3. Les échantillons	125
D.2. Les protocoles analytiques	126
D.2.1. Extraction/dérivation	127
D.2.2. Préfractionnement	128
D.2.3. Conditions analytiques en chromatographie en phase gazeuse	130
D.2.4. Spectrométrie de masse à introduction directe	132
D.2.5. La microextraction en phase solide couplée à la CPG et à la CPG/SM	135
D.3. Les marqueurs des composés terpéniques	136
D.3.1. Le brai de bouleau	136
D.3.2. Les dérivés du pin dans l'ancien monde	139
D.3.3. Les dérivés du pin dans le nouveau monde	141
D.3.4. Les autres composés terpéniques	142
D.4. Les adhésifs à base de bitume	144
E. Les autres types de matériaux détectés dans les céramiques archéologiques	147
E.1. Les boissons fermentées	147
E.1.1. Les premières études	147
E.1.2. La caractérisation des polyphénols par py-CPG/SM	149
E.1.3. Analyse en HPLC-ESI-MS/MS	152
E.2. Les cosmétiques	153
E.2.1. Les vases "plastiques" de Corinthe	153
E.2.2. Les pots à cosmétiques	154
Conclusion	157
Chapitre II	161
Développements méthodologiques réalisés pour l'analyse des matériaux organiques lipidiques	161
Introduction	163
A. Méthodologie analytique élaborée : objectifs et choix réalisés	165
A.1. Les lipides dans les céramiques	165
A.2. Les développements en spectrométrie de masse pour l'analyse des triglycérides ..	168
B. Les échantillons considérés	171
B.1. Les échantillons archéologiques	171
B.2. Les modèles naturels	177
B.2.1. Les graisses animales de référence	177
B.2.2. Les huiles végétales de référence	178
B.3. Les modèles vieilliss	179
C. Les modes de préparation des échantillons	181
C.1. Extraction des lipides	181
C.1.1. Les tessons et les résidus carbonisés	181
C.1.2. Les adhésifs	182
C.2. Dérivation des lipides pour l'analyse en chromatographie en phase gazeuse	183

C.2.1. Triméthylsilylation	183
C.2.2. Dérivation des acides gras	184
C.3. Fractionnement et purification des triglycérides	185
C.3.1. Le fractionnement sur silice	186
C.3.2. Le fractionnement acide/neutre	189
C.4. Dopage des solutions de lipides pour les analyses en spectrométrie de masse	192
C.4.1. Le dopage à l'argent pour l'analyse en MALDI	193
C.4.2. Le dopage au lithium pour l'analyse en ESI	194
D. Protocoles d'analyse en chromatographie en phase gazeuse	196
D.1. L'extrait lipidique total	196
D.1.1. Analyse en chromatographie en phase gazeuse haute température	196
D.1.2. Analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	198
D.2. Analyse des acides gras	200
D.3. Analyse des composés terpéniques	201
E. Protocoles d'analyse des graisses animales en spectrométrie de masse	204
E.1. <i>Screening</i> par désorption laser	204
E.1.1. Le MALDI	204
E.1.2. Le DIOS	206
E.2. Analyses structurales en nanoélectrospray	208
E.2.1. NanoESI avec un analyseur hybride Q-q-TOF	209
E.2.2. NanoESI avec un analyseur FT-ICR	212
Conclusion	215
Chapitre III	219
Résultats sur les substances naturelles de référence: élaboration de nouveaux critères d'identification et de discrimination des graisses animales	219
Introduction	221
A. Evaluation du potentiel de différentes techniques de spectrométrie de masse: gain en sensibilité et en résolution	223
A.1. Les échantillons de référence	223
A.2. Ionisation/désorption laser	224
A.2.1. Le MALDI	224
A.2.1.1. Le principe de l'ionisation MALDI	224
A.2.1.2. Les résultats obtenus en MALDI-TOF MS	225
A.2.2. le DIOS	227
A.2.2.1. Le principe de l'ionisation DIOS	227
A.2.2.2. Les résultats obtenus en DIOS-TOF MS	228
A.3. Ionisation par électrospray	230
A.3.1. Le principe de l'électrospray	230
A.3.2. NanoESI MS	233
A.3.2.1. Spectrométrie de masse avec un analyseur hybride Q-q-TOF	233
A.3.2.1.1. Le principe de l'analyseur Q-q-TOF	233
A.3.2.1.2. Les résultats obtenus en nanoESI Q-q-TOF MS	233
A.3.2.2. Spectrométrie de masse avec un analyseur FT-ICR	235
A.3.2.2.1. Le principe de l'analyseur FT-ICR	235
A.3.2.2.2. Les résultats obtenues en FT MS	237
A.3.2.3. Comparaison Q-q-TOF vs FT-ICR	239
A.3.3. Spectrométrie de masse tandem	240
A.3.3.1. La dissociation induite par collision (CID)	240
A.3.3.2. La photodissociation induite par laser (IRMPD)	244

B. Critères de discrimination des graisses animales	247
B.1. Lait vs graisse sous-cutanée de bovidé.....	248
B.2. Différenciation des espèces	249
B.2.1. Les extraits de tessons imprégnés de lait.....	250
B.2.2. Les extraits de graisses sous-cutanées	251
C. Stabilité des critères de discrimination en fonction de l'espèce.....	254
D. Stabilité des critères de discrimination en fonction de la dégradation	259
D.1. Suivi de la dégradation de tessons modèles par HT CPG	259
D.2. Variabilité après vieillissement	265
Conclusion.....	269
Chapitre IV.....	271
Le contenu des céramiques du site néolithique de Clairvaux XIV	271
Introduction	273
A. Mise en contexte.....	276
A.1. Le site de Clairvaux XIV.....	276
A.2. L'échantillonnage.....	278
A.2.1. L'ensemble céramique	278
A.2.2. Les prélèvements.....	280
A.3. Comparaison avec les corpus du Néolithique final de Chalain et Clairvaux	290
A.4. Comment interpréter la fonction des céramiques.....	291
B. Les matières naturelles identifiées dans les céramiques de Clairvaux XIV	294
B.1. Bilan global.....	294
B.2. Les matières grasses végétales	297
B.2.1. Identification des huiles végétales par HT CPG.....	297
B.2.2. Analyse chromatographique des huiles végétales sur colonne polaire.....	299
B.2.2.1. Analyse des huiles de référence.....	299
B.2.2.2. Analyse des échantillons archéologiques	303
B.2.3. Discussion.....	306
B.3. La cire d'abeille.....	309
B.3.1. Les biomarqueurs de la cire d'abeille	310
B.3.2. La cire d'abeille mélangée à des graisses animales.....	311
B.3.3. Discussion.....	314
B.4. Les adhésifs	318
B.4.1. Les données chromatographiques.....	318
B.4.2. Discussion.....	321
B.5. Conclusion	327
C. Le cas des graisses animales.....	328
C.1. La chromatographie en phase gazeuse, extraction A	328
C.1.1. Résultats.....	328
C.1.2. Classement des échantillons	330
C.2. La spectrométrie de masse.....	334
C.2.1. Préparation des échantillons.....	335
C.2.2. Analyse en spectrométrie de masse.....	336
C.2.3. Identification des graisses animales	339
C.3. Discussion.....	342
Conclusion.....	350
Conclusion Générale	355
Bibliographie.....	361
Annexes.....	375

Acronymes et abréviations courantes

Acronyme utilisé

Techniques chromatographiques

HT CPG (HT GC)	Chromatographie en phase gazeuse haute température
FID	Détecteur à ionisation de flamme
HT CPG/SM (HT GC/MS)	Chromatographie en phase gazeuse haute température couplée à la spectrométrie de masse
Py-CPG/SM (Py-GC/MS)	Pyrolyse couplée à la CPG/SM
THM-GC/MS	Thermochimiolyse couplée à la CPG/SM
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
CCM (TLC)	Chromatographie sur couche mince

Spectrométrie de masse

SM (MS)	Spectrométrie de masse
IE (EI)	Ionisation par impact électronique
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique
MALDI	Désorption/ionisation laser assistée par matrice
TOF	Analyseur à temps de vol
ESI	Ionisation électrospray (électronébullition)
Q-q-TOF	Analyseur à double quadripôle couplés à un temps de vol
FT-ICR	Analyseur à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier
MRM MS	Spectrométrie de masse en mode <i>multiple reaction monitoring</i>
SIM MS	Spectrométrie de masse en mode <i>single ion monitoring</i>
MS/MS	Spectrométrie de masse en mode tandem
CID	Dissociation induite par collision
IRMPD	<i>Infrared multiphoton dissociation</i> ; photodissociation induite par laser

Techniques de préparations des échantillons

SPE	Extraction en phase solide
SPME	Microextraction en phase solide

Autres techniques analytiques

IRTF (FTIR)	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
RMN (NMR)	Résonance magnétique nucléaire
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbant assay</i>
DACIA	<i>Digestion and capture immunoassay</i>

Réactifs chimiques et solvants

BSTFA	N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide
TMCS	Triméthylchlorosilane
BF ₃	Trifluorure de bore
TMAH	Hydroxyde de tetraméthylammonium
DMDS	Disulfure de méthyle
HF	Acide fluorhydrique
HCl	Acide chlorhydrique
CCl ₃	Chloroforme

Abréviations courantes

FA	Acide gras
FAME	Acides gras méthylés
TAG	Triglycéride
Esters TMS	Esters de triméthylsilyl
DCM	Dichlorométhane
MeOH	Méthanol
COV	Composés organiques volatils

Table des figures, tableaux et cartes

Figures

- Figure 1 : Profil de concentration en lipides dans une amphore ayant contenu de l'huile, d'après Condamin *et al.* 1976. [Lipid concentration profile in an amphora used to contain oil] 48
- Figure 2 : Profil de concentration en lipides dans un débris d'amphore retrouvé dans les rejets d'un four de potier, d'après Condamin *et al.* 1976. [Lipid concentration profile in a potsherd from a non used amphora, excavated near a pottery maker shop]..... 48
- Figure 3 : Schéma d'échantillonnage et protocole analytique pour l'extraction de tessons et des sédiments associés, d'après Heron *et al.* 1991. [Sampling scheme and analytical protocol employed for the extraction and analysis of freshly excavated sherds with adhering burial soil]. 49
- Figure 4 : Sites d'accumulation des lipides sur une jarre expérimentales (graisse d'agneau, à gauche) et sur une jarre archéologique (graisse animale, à droite) provenant du site de West Cotton (Northamptonshire, Royaume-Uni, Epoque saxonne – Moyen-Age ancien), d'après Evershed *et al.* 1995a. [Histogram showing the sites of accumulation of lipid in an experimental vessel used in the boiling of lamb. The histogram on the right shows the concentrations of lipid in the base, body and rim sherds of a vessel that contained degraded animal fat] 50
- Figure 5 : Schéma des différents protocoles analytiques mis au point sur les extraits lipidiques de céramiques archéologiques {Charters *et al.* 1993b; Evershed *et al.* 1990a; Evershed 1993a, 1993c, 1993d; Evershed *et al.* 1995a; Evershed 1996; Evershed *et al.* 1997a; Evershed 2000; Garnier 2003; Heron *et al.* 1991; Mottram *et al.* 1999; Regert *et al.* 1998a; Regert *et al.* 2003a}. [Scheme of the different analytical protocols developed for the analysis of organic extracts from archaeological ceramics] 53
- Figure 6 : Schéma de fragmentation du dérivé DMDS de l'oléate de méthyle (Z-9-octadécenoate) et spectre de masse associé {Evershed 1993c}. [Fragmentation scheme of the DMDS-derivatised of methyl-oléate (Z-9-octadecenoate) with the corresponding mass spectrum] 59
- Figure 7 : Schéma des protocoles analytiques mis en place pour l'analyse de la fraction insoluble de tessons et résidus carbonisés archéologiques. [Scheme of the different analytical protocols developed for the analysis of the insoluble fraction of archaeological potsherds and carbonised residues] 60
- Figure 8 : Relation entre acides aminés et marqueurs protéiques détectés par pyrolyse couplée à la CPG et à la CPG/SM, d'après Regert *et al.* communication orale. [Relation between amino acids and proteinaceous markers, by pyrolysis coupled to GC and GC/MS]..... 63
- Figure 9 : Schéma d'un triglycéride; exemple avec deux entités saturées en rouge et une entité insaturée en vert et leurs positions indiquées (*sn*-1 ou 3, *sn*-2). [General structure of a triacylglycerol; example with two saturated moieties (red) and one unsaturated (green), with the position on the glycerol backbone indicated]..... 65
- Figure 10 : Spectres de la trilinoléine en impact électronique (a) et en ionisation chimique négative avec NH₃ (b) {Evershed 1996}. [Mass spectra of trilinolein (a) with electronic impact ionisation and (b) with negative NH₃ chemical ionisation]..... 66
- Figure 11 : Chromatogramme partiel d'un extrait lipidique de beurre, avec une colonne à phase polarisable, les numéros sous chaque pics correspondent au nombre d'atomes de carbone des triglycérides {Evershed 1996}. [Partial gas chromatogram of butter lipid extract, with a polarisable stationary phase; numbers under each peak relate to the number of carbon atoms of triacylglycerols]..... 67

Figure 12 : Profils de triglycérides de produits laitiers et de graisses sous-cutanées frais, et de produits laitiers dégradés {Dudd & Evershed 1998; Dudd et al. 1998}. [Distribution profiles of triacylglycerols in fresh milk and adipose fat and in degraded dairy products].....	67
Figure 13 : Chromatogrammes partiels des acides gras méthylés d'extraits lipidiques provenant de tessons de plat à rôtir (a) et de lampes (b), caractéristiques de graisse de non ruminants (a) et de graisse de ruminants (b) {Mottram et al. 1999}. [Gas chromatograms of fatty acid methyl esters recovered from (a) a “dripping dish”; and (b) a lamp].....	68
Figure 14 : Chromatogramme partiel de la fraction insoluble d'un vase à cuire du site néolithique de Chalain {Regert et al. 1998a}. [Partial gas chromatogram of the base treated residue (as methyl ester-trimethylsilyl ether derivatives) of a potsherd from a neolithic cooking vessel]	70
Figure 15 : Acide ω -(o-alkylphényl)alkaloïque, son acide triunsaturé précurseur a $x = n + m + 4$ atomes de carbone. [ω -(o-alkylphenyl)alkaloic acid, its precursor triunsaturated fatty acid is composed of $x = n + m + 4$ carbon atoms].....	72
Figure 16 : Chromatogramme de la fraction acide de l'échantillon 307 caractérisé comme de l'huile de graines de la famille des Brassicaceae (Crucifères) {Colombini et al. 2004b}. [Total ion chromatogram of the acidic fraction of the sample 307; i.s., internal standards; *, phtalate; DDA, didehydroabietic acid; DA, dehydroabietic acid; 7ODA, 7-oxo-dehydroabietic acid; OA, 7-oxo-abietic acid; 15Hy7ODA, 15-hydroxy-7-oxo-dehydroabietic acid; 15HyDA, 15-hydroxy-dehydroabietic acid].....	74
Figure 17 : Les différentes fonctions de la cire d'abeille depuis la préhistoire, d'après Regert et al. 2001 et Regert 2006. [The various functions of beeswax through time]	76
Figure 18 : Principaux biomarqueurs esters de la cire d'abeille, d'après Garnier et al. 2002. [The major biomarkers of beeswax]	77
Figure 19 : Echelle du déplacement isotopique du carbone en fonction du standard PD Belemnite, et vocabulaire associé {O'Leary 1981}. [Carbon isotopic scale and vocabulary as a function of the PD Belemnite standard].....	81
Figure 20 : Valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ de tissus de souris et de leur alimentation, sauf indication, chaque point correspond à une souris {DeNiro & Epstein 1978}. [$\delta^{13}\text{C}$ values of tissues of mice and their diets. Each point represents the analysis of tissues dissected from a single moused, except as indicated].....	83
Figure 21 : Valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ mesurées pour les acides gras et le cholestérol d'os de porcs nourris avec des régime C_3 et C_4 , ainsi que les valeurs des acides gras alimentaires {Stott <i>et al.</i> 1997a}. [$\delta^{13}\text{C}$ values measured for the C_3 and C_4 porcine bone fatty acids, cholesterol and dietary fatty acids by on-line GC-C-IRMS]	85
Figure 22 : Composition isotopique de plantes préhistoriques carbonisées, seules les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ des plantes de la Haute Vallée de Mantaro sont indiquées. Les encadrés représentent les distributions attendues pour les différents type de plantes {DeNiro & Hastorf 1985}. [Isotopic composition of prehistoric carbonized plants of the indicated carbon dioxide fixation and nitrogen assimilation type; the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of plants from the Upper Mantaro Valley are plotted]	86
Figure 23 : Valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ pour les acides palmitique $\text{C}_{16:0}$ et stéarique $\text{C}_{18:0}$, pour des extraits lipidiques archéologiques de tessons de lampes, de plats à rôtir et d'un chaudron, ainsi que pour des graisses sous-cutanées de référence (vache, mouton et porc) {Mottram et al. 1999}. [Plot showing the $\delta^{13}\text{C}$ values of the 16:0 and 18:0 fatty acids from archaeological vessels (lamps, “dripping dishes” and cauldron) and from modern reference fats (cattle, sheep and pig)].....	90

- Figure 24 : Histogramme des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ du glucose et du $\text{C}_{18:3}$ extraits de plantes en C_3 (a) et schéma des chemins biosynthétiques des acides gras et des sucres depuis les aliments jusqu'aux graisses sous-cutanées ou aux produits laitiers, avec le fractionnement isotopique qui en découle, d'après {Copley et al. 2003}. [Histogram of the $\delta^{13}\text{C}$ values of $\text{C}_{18:3}$ fatty acids and glucose extracted from C_3 plants (a); diagram showing the routing of dietary fatty acids and carbohydrates in the rumen, adipose tissues and mammary gland of the ruminant animal (b)]..... 92
- Figure 25 : Graphe traçant le $\Delta^{13}\text{C} = \delta^{13}\text{C}_{18:0} - \delta^{13}\text{C}_{16:0}$ (a) et graphe traçant $\delta^{13}\text{C}_{18:0}$ en fonction de $\delta^{13}\text{C}_{16:0}$, pour des graisses sous-cutanées de références de porcs, de ruminants et des produits laitiers de ruminants d'après Copley et al. 2003. [(a) Plot of the difference in the $\delta^{13}\text{C}$ values of the $\text{C}_{18:0}$ and $\text{C}_{16:0}$ fatty acids ($\Delta^{13}\text{C}$) obtained from the modern reference fats and (b) plot of the $\delta^{13}\text{C}$ values of the major fatty acid components of modern reference fats (domesticates known to comprise the major component of prehistoric economies in Britain, animals raised on C_3 diets)] 93
- Figure 26 : Valeurs du $\delta^{13}\text{C}_{18:0}$ en fonction du $\delta^{13}\text{C}_{16:0}$ extrait de céramiques issues de différents sites du Néolithique Ancien, de tessons de contrôle et de graisses de référence (a- lait d'Inde, b,d- lait de brebis (b) et de chèvre (d) nourries avec un supplément en C_4 , Angleterre, c- lait de vaches nourries avec 60% de maïs, Angleterre, e- lait bouilli de vaches avec un supplément en C_4 , Angleterre, f- lait de vaches nourries avec 65% de riz et 35% de sorgho, Inde, g, h lait de vaches nourries en C_3 , Angleterre (g) et Iles Shetland (h)) {Craig et al. 2005b}. [Plot of the $\delta^{13}\text{C}$ values of $\text{C}_{18:0}$ and $\text{C}_{16:0}$ fatty acids extracted from various Early Neolithic potsherds, control samples and reference milk fats]..... 94
- Figure 27 : Valeurs de $\delta^{13}\text{C}_{18:0}$ et $\delta^{13}\text{C}_{16:0}$ (graphe de gauche) et valeurs du $\Delta^{13}\text{C}$ par rapport au $\delta^{13}\text{C}_{16:0}$ (graphe de droite) pour les extraits lipidiques des céramiques du site néolithique d'Abingdon (Royaume-Uni) {Copley et al. 2005c}. [(Left) Plot of the $\delta^{13}\text{C}$ values of the FAMES of $\delta^{13}\text{C}_{16:0}$ and $\delta^{13}\text{C}_{18:0}$, prepared from lipid extracts from the pottery assemblage of the néolithic site of Abingdon. The ellipses indicate the $\delta^{13}\text{C}$ values of the reference animal fats, based on which the archaeological extracts are classified. (Right) $\Delta^{13}\text{C}$ values of the extracts plotted against their $\delta^{13}\text{C}_{16:0}$ values] 96
- Figure 28 : Valeurs du $\delta^{13}\text{C}_{18:0}$ par rapport au $\delta^{13}\text{C}_{16:0}$ et au $\delta^{13}\text{C}_{18:1}$ pour des composés de référence (graisses animales, produits laitiers et plantes) {Spangenberg 2004}. [Carbon isotope composition of stearic ($\delta^{13}\text{C}_{18:0}$) versus palmitic ($\delta^{13}\text{C}_{16:0}$) and oleic ($\delta^{13}\text{C}_{18:1}$) acids of reference of modern animal and plant fats]..... 97
- Figure 29 : Formule semi-développée d'un triglycéride avec les positions des acides gras indiquées. [General structure of a triacylglycerol, with the position of the fatty acids on the glycerol backbone indicated]..... 103
- Figure 30 : Spectre de masse APCI du triglycéride 1,3-distéarine-2-oléine (SOS) {Mottram & Evershed 1996}. [The APCI mass spectrum of 1,3-distearoyl-2-oleoyl glycerol (SOS)] 104
- Figure 31 : Chromatogramme obtenue en HPLC/APCI MS de lait de vache entier {Mottram & Evershed 2001}. [The HPLC–APCI–MS profile of whole milk fat]..... 106
- Figure 32 : Spectres de masse en impact électronique (a) et en APCI (b) du triglycéride $\text{C}_{4:0}\text{-C}_{14:0}\text{-C}_{16:0}$ {Mottram & Evershed 2001}. [The mass spectra of butyroylmyristoylpalmitoyl glycerol (4:0-14:0-16:0) resulting from (a) electron ionisation and (b) atmospheric pressure chemical ionisation]..... 108
- Figure 33 : Chromatogramme obtenu en HPLC/APCI MS d'un extrait lipidique d'une lampe antique (P- acide palmitique $\text{C}_{16:0}$, S- acide stéarique $\text{C}_{18:0}$, O- acide oléique $\text{C}_{18:1}$, L- acide linoléique $\text{C}_{18:2}$) {Kimppe et al. 2001}. [Ion chromatogram of triacylglycerols of the lipid extract of an antique oil lamp analysed with LC–APCI–MS]..... 110

Figure 34 : Schéma du protocole DACIA (<i>Digestion and Capture ImmunoAssay</i>) en deux étapes, la phase de digestion et la phase de détection {Craig & Collins 2000}. [A schematic diagram of the Digestion and Capture Immunoassay (DACIA) shown in two steps: the initial digestion phase and the immunological detection of any released antigen after neutralisation]	117
Figure 35 : Spectre MALDI de lait de chèvre uht ½ écrémé, digéré directement et dessalé par colonne Zip-Tip. Les pics identifiés sont indiqués (Cas signifie caséine et lb pour lactalbumine) d'après Burgaud 2003. [MALDI mass spectrum of semi-skimmed UTH goat milk, digested without prior extraction and desalted on a Zip Tip column]	119
Figure 36 : Spectre MALDI d'un tesson imprégné pendant 2 fois 15 minutes de lait de vache pasteurisé. De l'eau acidifiée a servi comme solvant d'extraction. Les cinq pics indexés correspondent à des peptides caractéristiques (m/z =830.45 ; 975.60 ; 979.56 ; 1337.68 ; 1591.93) d'après Burgaud 2003. [MALDI mass spectrum of the protein extract (acidified water) of a model potsherd impregnated with cow milk]	121
Figure 37 : Structure de la molécule d'isoprène, à la base des composés terpéniques. [Molecular structure of isoprene]	123
Figure 38 : Structures de l'acide abiétique (a, squelette abiétane), de l'acide pimarique (b, squelette pimarane) et de l'acide <i>trans</i> -communiqué (c, squelette labdane). [Molecular structure of abietic, pimaric and transcommunic acids]	124
Figure 39 : Structures de triterpènes retrouvés dans l'écorce de bouleau (<i>Betula</i>), le lupéol et la bétuline. [Molecular structure of the main triterpenoids of birch bark, lupeol and betuline]	124
Figure 40 : Structure de quelques triterpènes couramment retrouvés dans les résines utilisées pour les beaux-arts {Scaralone <i>et al.</i> 2003}. [Molecular structure of some triterpenoids found in resins used in art]	125
Figure 41 : Spectres de masse en introduction directe (IE, 70 eV), du brai de bouleau, de la cire d'abeille, et d'un adhésif préhistorique provenant du site du Grand Aunay, identifié à un mélange de brai de bouleau et de cire d'abeille {Regert & Rolando 2002}. [Mass spectra obtained by direct inlet electron ionization mass spectrometry on reference birch bark tar, beeswax and a solid microsample of a brownish residue from the Iron Age site of Grand Aunay characteristic of a mixture of birch bark tar (m/z 189, 424, and 426) and beeswax]	133
Figure 42 : Spectres de masse de la résine de pin, obtenus avec deux méthodes de désorption directe en spectrométrie de masse à impact électronique (70 eV, trappe ionique) d'après Colombini <i>et al.</i> 2005 et Regert et Rolando 2002. [Mass spectra of pine resin, obtained with different conditions in direct inlet electronic impact ionisation mass spectrometry (70 eV, ion trap)]	134
Figure 43 : Structures et mécanismes de transformation et mécanismes de transformation des biomarqueurs et marqueurs de dégradation du brai de bouleau {Regert 2004}. [Formula and putative transformation mechanisms of the main biomarkers identified in various samples containing birch bark tar]	138
Figure 44 : Structures des biomarqueurs et marqueurs de dégradation de la résine et du goudron de résine de pin (<i>Pinus sylvestris</i>), de type abiétane, {Colombini <i>et al.</i> 2005a}. [Structure of the main biomarkers and degradation markers of pine resin and pine pitch, from the abietane chemical family]	139
Figure 45 : Biomarqueurs et marqueurs de dégradation des résines de pistachier, d'après {Stern <i>et al.</i> 2003}. [Some biomarkers and degradation markers of pistacia resins]	144
Figure 46 : Relations entre les marqueurs pyrolytiques et leurs précurseurs monomères, flavan-3-ols standards, par thermochimolyse en présence de TMAH, py-CPG/SM {Garnier <i>et al.</i> 2003}.	

[Relationships between benzenoid pyrolytic products and their monomer precursors, standards flavan-3-ols, during thermochemolysis in the presence of TMAH].....	150
Figure 47 : Pyrogrammes partiels (THM-CPG/SM) d'un échantillon de vin romain <i>Caecuban</i> et d'un échantillon de vin béotien <i>Defrutum</i> {Garnier <i>et al.</i> 2003}. [Partial pyrograms (THM-GC/MS) from a Roman <i>Caecuban</i> wine and a Baetican boiled-down wine (<i>defrutum</i>)]	151
Figure 48 : Chromatogramme en phase gazeuse de l'extrait lipidique total de la crème, C _{14:0} à C _{18:0} : acides gras saturés linéaires, C _{15:0br} et C _{17:0br} : acides gras saturés ramifiés <i>iso-</i> et <i>anteiso-</i> , C _{18:0OH} ; acide gras hydroxylé, C _{18:1} : acide gras mono-insaturé {Evershed <i>et al.</i> 2004}. [Partial gas chromatogram of extracted lipids, C _{14:0} to C _{18:0} , saturated straight-chain fatty acids, C _{15:0br} and C _{17:0br} , <i>iso-</i> and <i>anteiso-</i> branched-chain fatty acids, C _{18:0OH} , hydroxylated fatty acid, C _{18:1} , monounsaturated fatty acid]	155
Figure 49 : Photo de la crème (a) retrouvée dans le pot romain et (b) formulée sur la base des données analytiques (qualitatives et quantitatives) obtenues sur la crème ancienne, photo Evershed <i>et coll.</i> {Evershed <i>et al.</i> 2004} [Appearance of the cream (a), Roman canister containing the original cream. (b), A synthetic version prepared according to the formulation obtained after the analysis of the material shown in (a), image from Evershed <i>et al.</i> 2004]	156
Figure 50 : Schéma de l'origine naturelle des matériaux organiques amorphes archéologiques {Regert 2006}[Natural origin of amorphous organic materials in archaeology]	158
Figure 51 : Principaux sites et régions pour lesquels des graisses animales, des produits laitiers et des matières grasses végétales ont été identifiées dans des céramiques, adapté de Regert 2006. [Archaeological sites where animal fats, dairy products and vegetable fats were identified in ceramics]	158
Figure 52 : Principaux sites et régions pour lesquels de la cire d'abeille et des boissons fermentées ont été identifiées dans des céramiques, adapté de Regert 2006. [Archaeological sites where beeswax, beer and wine were identified in ceramics]	159
Figure 53 : Principaux adhésifs et enduits identifiés sur des sites datant du Paléolithique jusqu'aux âges des métaux, en fonction de leur localisation spatio-temporelle. [Main adhesives identified from Palaeolithic to Iron Age sites]	160
Figure 54 : Protocole d'analyse des échantillons archéologiques par chromatographie en phase gazeuse (DCM: dichlorométhane; MeOH: méthanol; BSTFA: <i>N,O</i> -bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide; BF ₃ /PrOH: trifluorure de bore dans le propanol; HT CPG: chromatographie en phase gazeuse haute température; HT CPG/SM: HT CPG couplée à la spectrométrie de masse). [Scheme of the analytical protocol applied to archaeological samples by gas chromatography]	166
Figure 55 : Protocole d'analyse des résines et goudrons végétaux (DCM: dichlorométhane; BSTFA: <i>N,O</i> -bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide; Esters TMS: esters triméthylsilylés; HT CPG: chromatographie en phase gazeuse haute température; HT CPG/SM: HT CPG couplée à la spectrométrie de masse). [Scheme of the analytical protocol developed for the analyse of vegetable resins and tars]	167
Figure 56 : Protocole d'analyse des échantillons de référence pour l'évaluation du potentiel de différentes techniques de spectrométrie de masse à ionisation douce, pour la caractérisation des triglycérides des graisses animales (SPE: <i>solid-phase extraction</i> ; MALDI-TOF MS: <i>matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry</i> ; DIOS-TOF MS: <i>desorption/ionisation on porous silicon time-of-flight mass spectrometry</i> ; MS: <i>mass spectrometry</i> ; MSMS: <i>tandem mass spectrometry</i> ; nanoESI: <i>nanoelectrospray</i> ; Q-q-TOF: <i>quadrupole time-of-flight</i> ; CID: <i>collision induced dissociation</i> ; FT-ICR: <i>Fourier transform ion cyclotron resonance</i> ; IRMPD: <i>infrared multiphoton dissociation</i>). [Scheme of the analytical protocol developed on	

reference samples, evaluation of the analytical potential of different mass spectrometry techniques, for the characterisation of animal fats triacylglycerols].....	169
Figure 57 : Protocole analytique en spectrométrie de masse mis au point pour l'analyse de triglycérides archéologiques. [Scheme of the analytical protocol in mass spectrometry developed for the analysis of archaeological triacylglycerols].....	170
Figure 58 : Chromatogrammes de la solution standard S040 avant et après fractionnement sur colonne de silice (méthode MR1CER, encadrés 5, 3 et 9). [Gas chromatograms of the standard solution S040 before and after fractionation on a silica column].....	187
Figure 59 : Chromatogrammes de l'extrait lipidique total et des fractions A (alcane) et B (triglycérides) de l'échantillon T1050A après fractionnement sur colonne de silice (méthode MR1CER, encadrés 5, 3 et 9). [Gas chromatograms of the total lipid extract of sample T1050A and of fraction A, containing the alkane and fraction B, containing the triacylglycerols, obtained after silica fractionation].....	188
Figure 60 : Chromatogrammes des fractions acide et neutre d'une solution standard S040 (Cf. figure 5), après fractionnement sur colonne aminopropyle (méthode MR1CER, encadrés 6, 3 et 9). [Gas chromatograms of the acid and neutral fractions of the standard solution S040, obtained by aminopropyl fractionation].....	190
Figure 61 : Chromatogrammes de l'échantillon T1035B, avant et après fractionnement sur colonne aminopropyle (méthode MR1CER, encadrés 6, 3 et 9). [Gas chromatograms of sample T1035B, before and after aminopropyl fractionation]	190
Figure 62 : Formule semi-développée d'un triglycéride avec en rouge, l'exemple d'acides gras saturés, et en vert l'exemple d'un acide gras insaturé. [General structure of a triacylglycerol, with the example of two saturated fatty acid moieties in red, and an unsaturated moiety in green]....	192
Figure 63 : Photo d'une cible MALDI (Applied Biosystems) sur laquelle des échantillons sont déposés, photo Rolando. [MALDI target plate, on which samples are deposited prior to analysis]	193
Figure 64 : Photo d'une plaque DIOS, avec, en noir, les points de silicium poreux sur une plaque de silicium cristallin. [DIOS target plate with the black dots corresponding to porous silicon, on a crystalline silicon plate].....	194
Figure 65 : Chromatogramme d'une solution standard (méthode MR1CER, encadrés 3 et 9). [Gas chromatogram of a standard solution].....	197
Figure 66 : Spectre de masse du <i>n</i> -triacontanol <i>n</i> -C ₃₀ OH en impact électronique +70eV, avec un analyseur à trappe d'ion (méthode CERAM15M, encadrés 3 et 10). [Mass spectrum of <i>n</i> -triacontanol <i>n</i> -C ₃₀ OH by electronic impact (+70eV) with an ion trap analyser].....	199
Figure 67 : Spectres de masse du cholestérol, de la <i>n</i> -16-tritriacontanone, de la 1,2-dipalmitine et de la 1,3-dipalmitine, obtenus en impact électronique à +70 eV (méthode CERAM15M, encadrés 3 et 10) pour un échantillon archéologique provenant du site de Chalain 4 {Mirabaud 2004}. [Mass spectra of cholesterol, <i>n</i> -16-tritriacontanone, 1,2-dipalmitin and 1,3-dipalmitin, by EI mass spectrometry, +70 eV, from an archaeological sample from the neolithic site of Chalain 4].....	200
Figure 68 : Chromatogramme d'une huile de noix (H004) obtenu avec une colonne polaire de 50 m (méthode FAME, encadrés 4 et 11). [Gas chromatogram of a reference nut oil sample obtained with a 50 m polar column]	201
Figure 69: Chromatogrammes de l'échantillon MR1108, analysé après triméthylsilylation sur colonnes apolaires de 15m (méthode CERAM15M, encadrés 3 et 12) et 30 m (méthode ADHESIF30M, encadrés 3 et 13). [Gas chromatograms of an archaeological adhesive, MR1108, trimethylsilylated prior to analysis on 15 m and 30 m apolar columns]	203

Figure 70: Spectre de masse MALDI d'un extrait lipidique non fractionné d'un tesson imprégné de lait de vache (cf. B) et détail de la zone correspondant aux triglycérides T ₃₈ . [MALDI mass spectrum of the total lipid extract of a model potsherd impregnated with cow milk and detail of the T ₃₈ peak pattern]	205
Figure 71 : Spectres de masse obtenu en DIOS et en MALDI pour une solution de triglycérides standards, de T _{36:0} à T _{54:0} , à une concentration de 10 ⁻² mg/mL dans le dichlorométhane/méthanol. [DIOS and MALDI mass spectra for a standard solution of triacylglycerols T _{36:0} to T _{54:0} at a concentration of 10 ⁻² mg/mL in DCM/MeOH]	208
Figure 72 : Spectre de masse nanoESI d'un échantillon de lait de vache extrait d'un tesson modèle et spectre de fragmentation de l'ion <i>m/z</i> 757 correspondant à l'ensemble des triglycérides isobares T _{44:0} . [NanoESI Q-q-TOF mass spectrum of the total lipid extract of a model potsherd impregnated with cow milk and CID fragmentation spectrum of <i>m/z</i> 757, corresponding to T _{44:0} lithiated]	211
Figure 73 : Spectre de masse FT-ICR de l'échantillon V0117B et spectre de fragmentation obtenu par IRMPD MS/MS du pic <i>m/z</i> 645.5 (T _{36:0}). [FT-ICR mass spectrum of model sample V0117B and IRMPD fragmentation spectrum of peak at <i>m/z</i> 645.5 (T _{36:0})]	213
Figure 74 : Méthodologie novatrice développée pour la caractérisation des graisses animales archéologiques. [Scheme of the innovative methodology developed for the characterisation of archaeological animal fats].....	217
Figure 75: Schéma de principe de l'ionisation/désorption laser assistée par matrice. [Schematic view of the matrix assisted laser desorption/ionisation]	225
Figure 76 : Spectres de masse MALDI-TOF de deux échantillons de référence (extrait d'un tesson imprégné de lait de vache et extrait de graisse sous-cutanée de bœuf), matrice DHB, dopage au nitrate d'argent. [MALDI-TOF mass spectra of reference samples (total lipid extracts of a potsherd impregnated with cow milk and cow adipose fat), DHB matrix and silver salts doping]	226
Figure 77 : Détail du spectre de masse MALDI-TOF de l'échantillon de graisse sous-cutanée de vache, autour du groupe de triglycéride T50. [Partial Ag ⁺ -MALDI mass spectrum of the total lipid extract of cow adipose fat, T50].....	227
Figure 78: Photo d'une plaque DIOS. [DIOS target plate].....	228
Figure 79 : Chromatogramme de la fraction A de l'extrait lipidique du tesson V0117 et spectre de masse DIOS de la fraction B de l'extrait lipidique du tesson V0117. [Gas chromatogram of the total lipid extract of sample V0117A (with internal standard) and DIOS mass spectrum of the total lipid extract of sample V0117B (without internal standard)].....	229
Figure 80 : Mécanisme schématisé de l'ionisation électrospray {Kebarle & Peschke 2000; Smyth 1999}. [Scheme of the electrospray ionisation mechanism]	231
Figure 81 : Spectre de masse Li ⁺ -nanoESI Q-q-TOF de l'extrait lipidique d'un tesson imprégné de lait de vache, et pics identifiés. [Li ⁺ -nanoESI Q-q-TOF mass spectrum of the total lipid extract of a potsherd impregnated with cow milk, and list of the TAG peaks identified].....	234
Figure 82 : Spectre de masse nanoESI Q-q-TOF de l'extrait de graisse sous-cutanée de bœuf. [Li ⁺ -nanoESI Q-q-TOF mass spectrum of the total lipid extract of the cow adipose fat reference sample]	235
Figure 83 : Spectre de masse de l'extrait B (sans standard interne) du tesson V0117, en spectrométrie de masse nanospray FT-ICR et pics attribués. [Li ⁺ -nanoESI FT-ICR mass spectrum of the total lipid extract B of reference sample V0117, and list of the TAG peaks identified]....	238

Figure 84 : Spectres de masse de l'échantillon T1050 fractionné, avec un spectromètre de masse Q-q-TOF (QStar Pulsar, Applied Biosystems) et un spectromètre de masse FT-ICR (Apex 9.4T, Bruker Daltonics) et histogrammes représentant leur composition en triglycérides. [Li ⁺ -nanoESI mass spectra of the fractionated archaeological sample T1050, with Q-q-TOF and FT-ICR analysers, and histograms of their TAG composition].....	239
Figure 85 : Spectres de fragmentation des triglycérides T _{40:0} et T _{52:2} de l'extrait de lait de vache, par CID MS/MS avec un analyseur Q-q-TOF. [Li ⁺ -nanoESI fragmentation mass spectra of T _{40:0} and T _{52:2} from the total lipid extract of a potsherd impregnated with cow milk, using CID MS/MS with a Q-q-TOF analyser]	241
Figure 86 : Photo de l'optique de transfert du laser à l'intérieur de la cellule ICR pour la fragmentation par IRMPD. [Transfer line between the infrared laser and the ICR cell, for the IRMPD MS/MS mode]	245
Figure 87 : Spectres de fragmentation des ions <i>m/z</i> 701.63 (T _{40:0}) et <i>m/z</i> 865.79 (T _{52:2}) de l'extrait du tesson V0117B, en nanoESI IRMPD FT-ICR MS/MS. [Li ⁺ -nanoESI IRMPD FT-ICR fragmentation mass spectra of ions at <i>m/z</i> 701.63 (T _{40:0}) and <i>m/z</i> 865.79 (T _{52:2}) of the total lipid extract B of reference sample V0117].....	245
Figure 88: Courbes traçant les intensités relatives des pics de perte des acides gras lithiés pour les triglycérides T _{40:0} et T _{52:2} des échantillons de référence, en nanoESI CID MS/MS. [Graph of the relative intensities of the [M + Li -RCOOLi] ⁺ peaks vs RCOOLi, for TAGS T _{40:0} and T _{52:0} from the total lipid extracts of reference samples, by nanoESI CID MS/MS].....	247
Figure 89 : Courbes de distributions des acides gras pour les triglycérides saturés des extraits de lait de vache et de graisse sous-cutanée de bœuf, données obtenues en Li ⁺ -nanoESI CID MS/MS. [Fatty acid distribution curves of saturated TAGs from the total lipid extracts of cow adipose fat and the potsherd impregnated with cow milk, data obtained by Li ⁺ -nanoESI CID MS/MS]	248
Figure 90 : Courbes de distribution des acides gras des triglycérides insaturés des extraits de lait et de graisse sous-cutanée de bovidé, données obtenues en Li ⁺ -nanoESI CID MS/MS. [Fatty acid distribution curves of unsaturated TAGs from the total lipid extracts of cow adipose fat and the potsherd impregnated with cow milk, data obtained by Li ⁺ -nanoESI CID MS/MS].....	249
Figure 91 : Courbes de distribution des acides gras pour des triglycérides saturés extraits de tessons imprégnés de lait de vache et de lait de chèvre à partir des données nanoESI CID MS/SM. [Fatty acid distribution curves of saturated TAGs from the total lipid extracts of potsherds impregnated with cow and goat milks reference samples, data obtained by Li ⁺ -nanoESI CID MS/MS].....	250
Figure 92 : Courbes de distributions des acides gras pour des triglycérides insaturés des extraits de tessons imprégnés de lait de vache et de lait de chèvre obtenues à partir des données Li ⁺ -nanoESI CID MS/MS. [Fatty acids distribution curves of some unsaturated TAGs from the total lipid extracts of potsherds impregnated with cow and goat milks reference samples, data obtained by Li ⁺ -nanoESI CID MS/MS].....	251
Figure 93 : Courbes de distribution des acides gras pour les triglycérides discriminants des extraits de graisses sous-cutanées de bœuf et de mouton, obtenues à partir des données Li ⁺ -nanoESI CID MS/MS. [Fatty acids distribution curves of discriminating TAGs from the total lipid extracts of cow and sheep adipose fats, data obtained by Li ⁺ -nanoESI CID MS/MS].....	252
Figure 94 : Spectre de fragmentation obtenue en Li ⁺ -nanoESI FT-ICR IRMPD MS/MS du pic <i>m/z</i> 701.63, T _{40:0} , de l'échantillon V0117B. [Li ⁺ -nanoESI IRMPD FT-ICR fragmentation spectrum of peak at <i>m/z</i> 701.63, T _{40:0} , sample V0117B].....	255
Figure 95 : Courbes de distribution d'acides gras des triglycérides saturés, extraits de tessons imprégnés de lait de vaches d'un même troupeau, obtenues par spectrométrie de masse tandem	

nanospray IRMPD FT-ICR. [Fatty acids distribution curves of saturated TAGs from the total lipid extracts of potsherds impregnated with the INRA cow milks, data obtained by Li ⁺ -nanoESI IRMPD FT-ICR MS/MS].....	256
Figure 96 : Courbes de distribution d'acides gras des triglycérides mono-insaturés, extraits de tessons imprégnés de lait de vaches d'un même troupeau, obtenues par spectrométrie de masse tandem nanospray IRMPD FT-ICR. [Fatty acids distribution curves of mono-unsaturated TAGs from the total lipid extracts of potsherds impregnated with the INRA cow milks, data obtained by Li ⁺ -nanoESI IRMPD FT-ICR MS/MS].....	257
Figure 97 : Courbes de distribution d'acides gras des triglycérides di-insaturés (sauf le T _{54:2}), extraits de tessons imprégnés de lait de vaches d'un même troupeau, obtenues par spectrométrie de masse tandem nanospray IRMPD FT-ICR. [Fatty acids distribution curves of di-unsaturated TAGs from the total lipid extracts of potsherds impregnated with the INRA cow milks, data obtained by Li ⁺ -nanoESI IRMPD FT-ICR MS/MS].....	258
Figure 98 : Histogrammes des moyennes des concentrations en lipides dans les tessons imprégnés de lait de vache vieillis, à différents stades de vieillissement. [Histograms of the mean lipid concentration of aged samples (potsherds with INRA cow milks) at different aging steps]	261
Figure 99: Histogrammes des proportions moyennes de triglycérides et d'acides gras à différents stades du vieillissement. [Histograms of the TAG and fatty acid mean proportions at different aging steps].....	261
Figure 100 : Facteur de dispersion en fonction de la moyenne d'atomes de carbone, en fonction du temps de vieillissement, données obtenues en HT CPG (méthode MR1CER); V0../.V5: étapes du vieillissement. [Dispersion factor vs. the average number of carbon atoms for all the aged samples, data obtained by HT GC; V0../.V5 corresponds to the aging stages].....	262
Figure 101 : Droite de corrélation du facteur de dispersion vs. la moyenne du nombre d'atome de carbone, pour les valeurs moyennes du vieillissement. [Straight correlation between the dispersion factor and the average number of carbon atoms. Each dot corresponds to the average value of each aging stage]	263
Figure 102 : Facteur de dispersion en fonction de la moyenne du nombre d'atomes de carbone (a) pour les extraits B et (b) comparaison entre les valeurs obtenues pour les extraits A et les extraits B des tessons vieillis. [Dispersion factor vs. average number of carbon atoms for (a) the total lipid extracts B of ages potsherds impregnated with cow milks and (b) both the total lipid extracts A and B of the aged samples].....	264
Figure 103 : Courbes de distribution d'acides gras des triglycérides saturés (sauf le T _{54:0}), des extraits des tessons V0013 et V2037 et de la moyenne des courbes des tessons extraits à t=0 (tessons V0), obtenues par spectrométrie de masse tandem nanoESI IRMPD FT-ICR. [Fatty acids distribution curves of saturated TAGs (except for T _{54:0}), of samples V0013 (extracted at t = 0 jour), V2037 (extracted at t = 10 jours) and the curves corresponding to the average of all the V0 samples (extracted at t = 0 jour, V0007, V0013, V0020, V0026 et V0117), data obtained by Li ⁺ -nanoESI IRMPD FT-ICR MS/MS].....	266
Figure 104 : Courbes de distribution d'acides gras des triglycérides mono-insaturés (sauf le T _{54:1}), des extraits des tessons V0013 et V2037 ainsi que de la moyenne des courbes des tessons extraits à t = 0 (tessons V0), obtenues par spectrométrie de masse tandem nanoESI IRMPD FT-ICR. [Fatty acids distribution curves of mono-unsaturated TAGs (except for T _{54:0}), of samples V0013 (extracted at t = 0 jour), V2037 (extracted at t = 10 jours) and the curves corresponding to the average of all the V0 samples (extracted at t = 0 jour, V0007, V0013, V0020, V0026 et V0117), data obtained by Li ⁺ -nanoESI IRMPD FT-ICR MS/MS].....	267
Figure 105 : Courbes de distribution d'acides gras des triglycérides di-insaturés, des extraits des tessons V0013 et V2037 ainsi que de la moyenne des courbes des tessons extraits à t=0 (tessons	

V0), obtenues par spectrométrie de masse tandem nanoESI IRMPD FT-ICR. [Fatty acids distribution curves of di-unsaturated TAGs (except for T _{54:0}), of samples V0013 (extracted at t = 0 jour), V2037 (extracted at t = 10 jours) and the curves corresponding to the average of all the V0 samples (extracted at t = 0 jour, V0007, V0013, V0020, V0026 et V0117), data obtained by Li ⁺ -nanoESI IRMPD FT-ICR MS/MS].....	268
Figure 106 : Synthèse de la séquence stratigraphique de Clairvaux XIV, après les deux campagnes de fouille et corrélation avec les décapages (© P. Pétrequin). [Stratigraphy of the neolithic site Clairvaux XIV, following a 2-year excavation].....	278
Figure 107 : Ensemble des céramiques mis au jour à Clairvaux XIV, réparties suivant leur profil, leur provenance et leur unicité, avec le nombre total de chaque groupe et le nombre de céramiques prélevées par groupe indiqués. [Pottery assemblage excavated from Clairvaux XIV, divided into groups according to the state of preservation of their shape, their origin and their uniqueness, with the total and sampled numbers of ceramics in each group indicated for each shape].....	279
Figure 108 : Sériation des céramiques du Néolithique Moyen Bourguignon, sites de Concise, CL XIV, CL VII et CL MM V (© P. Pétrequin). [Pottery seriation of some well-dated middle neolithic sites close to CL XIV].....	280
Figure 109 : Dessin d'un gobelet, n°213, avec la paroi du fond amincie après le montage. [Drawing of a goblet, n° 213, with a thinner bottom wall].....	290
Figure 110 : Matériaux hors adhésifs identifiés dans les céramiques prélevées sur le site de Clairvaux XIV. [Organic materials, except for the adhesives, that were identified in the ceramics from Clairvaux XIV].....	294
Figure 111 : Chromatogramme de l'échantillon MR1073RA (vase à épaulement 267), caractéristique d'une huile végétale (méthode MR1CER, encadrés 3 et 9). [Gas chromatogram of sample MR1073RA (shouldered vessel 267), characteristic of degraded vegetable oil].....	298
Figure 112 : Chromatogrammes des huiles de référence (huile de lin clarifiée, huile de noix, huile de noisette et huile de palme, méthode FAME, encadrés 4 et 11). [Gas chromatograms of some reference oils (linseed oil, walnut oil, hazelnut oil and palm oil), analysed using a fatty-acid specific column].....	301
Figure 113 : Composition en acides gras (aires normalisées par rapport à la somme des aires) des huiles de référence, données obtenues en CPG sur colonne apolaire de 50 m (méthode FAME, encadrés 4 et 11). [Fatty acid composition of reference oils, obtained by GC on a fatty-acid specific column].....	302
Figure 114 : Diagramme ternaire des aires normalisées des acides gras C _{16:0} , C _{18:0} et C _{18:1} pour les huiles de référence, données obtenues en CPG sur colonne polaire de 50 m (méthode FAME, encadrés 4 et 11). [Ternary diagram of the normalised areas of C _{16:0} , C _{18:0} and C _{18:1} from reference oils, data obtained by GC on a fatty-acid specific column].....	302
Figure 115 : Chromatogrammes de l'échantillon R1065A1, obtenus en CPG sur colonne apolaire de 15m (méthode MR1CER, encadrés 3 et 9) et sur colonne polaire de 50 m (méthode FAME, encadrés 4 et 11). [Gas chromatograms of sample R1065A1 by HT HC on an apolar column and by GC on a fatty-acid specific column].....	304
Figure 116 : Composition en acides gras (aires normalisées par rapport à la somme des aires) des huiles de référence et des échantillons archéologiques. Les échantillons d'huiles de lin, de noix, d'olive et de pistachier ont été moyennés pour plus de clarté, données obtenues en CPG sur colonne apolaire de 50 m (méthode FAME). [Fatty acid composition of the reference samples and the archaeological samples, data obtained by GC using a fatty-acid specific column].....	304
Figure 117 : Diagramme ternaire des aires des pics de C _{16:0} , C _{18:0} et C _{18:1} , avec, en rouge, les huiles de référence et, en bleu, les échantillons archéologiques (méthode FAME). [Ternary diagram	

of the normalised areas of C _{16:0} , C _{18:0} and C _{18:1} of the reference oils (red) and the archaeological samples (blue)]	305
Figure 118 : Chromatogrammes de l'échantillon T1090A (assiette 365) sur colonne apolaire de 15m (méthode MR1CER, encadrés 3 et 9) et sur colonne select FAME de 50 m (méthode FAME, encadrés 4 et 11). [Gas chromatogram of sample T1090A, by HT GC on an apolar 15-m column and by GC on a fatty-acid specific 50-m column]	306
Figure 119: Chromatogramme de l'échantillon T1057A (vase 190) caractéristique de la cire d'abeille (méthode MR1CER, encadré 3 et 9). [Gas chromatogram of sample T1075A, vessel 190, characteristic of beeswax]	311
Figure 120: Chromatogrammes du tesson MR1075, gobelet 281, extrait A, extrait B et fraction neutre de l'extrait B, caractéristiques d'un mélange de cire d'abeille et de graisse animale (méthode MR1CER, encadrés 3, 6 et 9). [Gas chromatograms of sample MR1075, goblet 281, total lipid extract A, total lipid extract B and neutral fraction of extract B, characteristic of a mixture of animal fat and beeswax]	313
Figure 121: Chromatogramme de l'adhésif MR1109, gobelet 42, en CPG (méthode ADHESIF30M, encadrés 3 et 13). [Gas chromatogram of adhesive MR1109, goblet 42, by HT GC using a 30-m non polar column]	319
Figure 122 : Chromatogramme de l'adhésif MR1110, gobelet 60, en CPG (méthode ADHESIF30M, encadrés 3 et 13). [Gas chromatogram of adhesive MR1110, goblet 60, by HT GC using a 30-m non polar column]	319
Figure 123 : Chromatogramme de l'échantillons T1055A (vase 184) en HT CPG (méthode MR1CER, encadrés 3 et 9), caractéristique d'une graisse animale indéterminée. [Gas chromatogram of sample T1055A, vessel 184, by HT GC, characteristic of an unknown animal fat]	329
Figure 124 : Chromatogramme de l'échantillon T1096A (profil 388) obtenu en HT CPG (méthode MR1CER, encadrés 3 et 9). [Gas chromatogram of sample T1096A, bowl 388, by HT GC]	329
Figure 125 : Distribution des échantillons archéologiques en fonction de leur facteur de dispersion (FD) autour de la moyenne du nombre d'atomes de carbone (M), par HT CPG (méthode MR1CER, encadrés 3 et 9); Chaque point correspond à une céramique dont le numéro de référence est donné à côté, tableau 19). [Dispersion factor (FD) vs. average value of the number of carbon atoms (M) of the triglycerides for each archaeological sample, identified by the reference number of its vessel, by HT GC]	333
Figure 126 : Distribution des échantillons archéologiques et des échantillons de tessons imprégnés de lait vieillis, en fonction leur facteur de dispersion autour de la moyenne d'atomes de carbone, par HT CPG (méthode MR1CER, encadrés 3 et 9); les couleurs des échantillons archéologiques correspondent aux couleurs du graphe précédent, vert: produits laitiers dégradés, bleu: graisses animales, distribution moyenne en TAGs, rouge: graisses animales, distribution étroite en TAGs. [Dispersion factor vs. average number of carbon atoms for the triglycerides of the archaeological samples and of the aged samples (Cf. chapitre 3), by HT GC; for the archaeological samples, green: degraded dairy products, blue: animal fats, medium distribution of TAGs, red: narrow distribution of TAGs]	334
Figure 127 : Spectre de masse en nanoESI Q-q-TOF MS de la fraction triglycéride de l'échantillon T1050A (encadrés 15 et 16) et chromatogramme de l'échantillon T1050A non fractionné (méthode MR1CER, , encadrés 3 et 9). [Mass spectrum of the TAG fraction of sample T1050A by Li ⁺ -nanoESI Q-q-TOF MS, and gas chromatogram of the silylated total lipid extract of the same sample]	337
Figure 128 : Spectres de fragmentation obtenus en nanoESI MS/MS du pic <i>m/z</i> 785 (T _{46:0}) de l'échantillon FM1050B (encadré 5) et du pic <i>m/z</i> 839 (T _{50:1}) de l'échantillon T1096BFN (encadré	

6). [Fragmentation mass spectra of peak m/z 785 ($T_{46:0}$) from TAG fraction FM1050B and peak m/z 839 ($T_{50:1}$) from TAG fraction T1096BFN, obtained by Li^+ -nanoESI MS/MS]	338
Figure 129 : Courbes de distribution des acides gras des triglycérides $T_{46:0}$, $T_{48:1}$ et $T_{50:1}$ obtenues par nanoESI MS/MS de l'échantillon T1035BFN, coupe 12. [Fatty acid distribution curves for TAGs $T_{46:0}$, $T_{48:1}$ et $T_{50:1}$, obtained by Li^+ -nanoESI MS/MS of the TAG fraction T1035BFN] ..	339
Figure 130: Courbes de distribution des acides gras des triglycérides $T_{38:0}$, $T_{42:0}$, $T_{46:0}$ et $T_{48:0}$, obtenues par nanoESI MS/MS de l'échantillon T1058BFN, vase 195. [Fatty acid distribution curves of TAGs $T_{38:0}$, $T_{42:0}$, $T_{46:0}$ and $T_{48:0}$ obtained by Li^+ -nanoESI MS/MS of the TAG fraction T1058BFN]	340
Figure 131 : Courbes de pourcentage du nombre de restes d'espèces domestiques et d'espèces chassées mis au jour à Clairvaux XIV, par phase d'occupation du site (Données R.-M. Arbogast). [Domestic and hunted animal remains, calculated by number of bones vs. the chronological phases]	344
Figure 132 : Photos et dessin du vase 130, coulures extérieures en haut et résidu carbonisé en bas (dessin A.-M. Pétrequin, photo S. Mirabaud). [Images and drawing of vessel 130, with the exterior and interior residues]	345
Figure 133 : Amphore 432, photo du bas de la panse, extérieur en haut et de la panse, intérieur, en bas (dessin A.-M. Pétrequin, photos S. Mirabaud).	349

Tableaux

Tableau 1: Résultats obtenus chromatographie en phase gazeuse pour différents types d'échantillons modèle de graisse de phoque et pour un échantillon archéologique mis au jour à Kasteelberg (Afrique du Sud), d'après Patrick <i>et al.</i> 1985. [Results of the GC analyses of different kinds of modern and archaeological samples from the archaeological site of Kasteelberg (South Africa), Patrick <i>et al.</i> 1985.].....	45
Tableau 2 : Liste des différentes conditions opératoires développées en chromatographie en phase gazeuse pour l'analyse des acides gras extraits de tessons et résidus archéologiques. [Gas chromatographic experimental conditions developed for the analysis of fatty acids extracted from archaeological potsherds and carbonised residues].....	58
Tableau 3 : Conditions chromatographiques utilisées pour l'analyse de la fraction insoluble de tessons archéologiques, après hydrolyse alcaline. [Chromatographic experimental conditions for the analysis of the insoluble fraction of archaeological potsherds, following alkaline hydrolysis]61	
Tableau 4 : Biomarqueurs et marqueurs de dégradation des graisses animales, identifiés dans les céramiques archéologiques par HT CPG et HT CPG/SM. [Biomarkers and degradation markers of animal fats identified in archaeological ceramics by HT GC and HT GC/MS].....	71
Tableau 5 : Critères isotopiques de différenciation des graisses sous-cutanées. [Isotopic criteria for the discrimination of adipose fats]	91
Tableau 6 : Rapport des intensités de pics correspondant à la perte des acides gras, en spectrométrie de masse à ionisation APCI pour des triglycérides de type AAB et ABA {Mottram & Evershed 1996}. [Relative abundances of [AA] ⁺ and [AB] ⁺ ions in ABA and AAB type triacylglycerols, using APCI MS]	104
Tableau 7 : Distributions des acides gras en position <i>sn</i> -2 (pourcentage par rapport à la somme des acides gras à cette position) pour 4 échantillons de graisses sous-cutanées de référence {Mottram et al. 2001}. [Distribution of fatty acids in the <i>sn</i> -2-position, determined by quantification of the TAG species present in the HPLC-APCI MS profiles].....	105
Tableau 8 : Résumé des procédés géochimiques impliqués dans les interactions minéral/protéines {Craig & Collins 2002}. [Summary of geochemical processes involved in protein mineral interactions].....	115
Tableau 9 : Peptides caractéristiques du lait de vache et du lait de chèvre respectivement, pour les caséines du lait {Burgaud 2003}. [Characteristic peptides of cow and goat milks respectively, for the milk caseins].....	120
Tableau 10 : Solvants utilisés lors des différentes étapes d'extraction des résines, brais et bitumes archéologiques, et composés extraits, d'après Koller <i>et al.</i> 2001. [Extraction solvents used for the extraction of resins, tars and bitumen]	127
Tableau 11 : Conditions analytiques en chromatographie en phase gazeuse couplée ou non à la spectrométrie de masse pour les résines et brais (P-C: pré-colonne; DB-1: 100% diméthylpolysiloxane; DB-5: 5% phényl-95% diméthylpolysiloxane; FID: détecteur à ionisation de flamme; IE: spectrométrie de masse à impact électronique). [Experimental conditions in gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of resins and tars].....	131
Tableau 12 : Biomarqueurs et marqueurs de l'écorce de bouleau et du brai de bouleau (<i>Betula pendula</i>), {Aveling & Heron 1998; Regert <i>et al.</i> 2003b; Ukkonen & Erä 1979}. [Biomarkers and degradation markers of birch bark and birch bark tar].....	137
Tableau 13 : Bandes caractéristiques en spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier de l'acide tartrique et des sels de tartrate {McGovern <i>et al.</i> 1996; McGovern 1997; McGovern <i>et al.</i>	

1999; McGovern <i>et al.</i> 2004} [Characteristic absorption peaks of tartaric acid and tartrate salts by FTIR].....	148
Tableau 14 : Liste des tessons et résidus archéologiques analysés en chromatographie en phase gazeuse et en spectrométrie de masse. [Archaeological potsherds and carbonized residues analysed by high temperature gas chromatography and mass spectrometry]	175
Tableau 15 : Liste des échantillons d'adhésifs prélevés sur les céramiques de Clairvaux XIV et analysés en CPG, Les standards choisis sont le lupéol et la bétuline, principaux biomarqueurs du brai de bouleau, adhésif le plus couramment retrouvé sur les sites néolithiques en Europe. [Archaeological adhesives sampled on pottery from Clairvaux XIV and analysed by gas chromatography. Lupeol and betulin were chosen as standards as there are the main biomarkers of birch bark tar, the most widely used adhesives during the Neolithic period in Europe].....	176
Tableau 16 : Caractéristiques des échantillons modèles préparés pour les développements en spectrométrie de masse. [Model samples prepared for the analytical developments in mass spectrometry].....	177
Tableau 17 : Références des tessons imprégnés de lait de vache du troupeau INRA, prélevés juste après leur imprégnation. [Potsherds impregnated with INRA cow milks, extracted just after the impregnation]	178
Tableau 18 : Echantillons d'huiles de référence analysés en CPG sur colonne select FAME, après dérivation au BF ₃ /PrOH (transpropylation). [Reference oil samples analysed by GC on a select FAME column, after a propylation by BF ₃ /PrOH]	178
Tableau 19 : Références des tessons vieillis, avec les références des vaches dont le lait provient et les étapes du vieillissement auxquelles ils ont été prélevés. [Aged potsherds impregnated with INRA cow milks, with their stage of ageing and their reference numbers]	179
Tableau 20 : Liste des tessons vieillis, avec les conditions d'extraction et les données d'analyse (F: fractionnement sur colonne aminopropyle). [Extraction and analytical conditions used for the analysis of the aged model samples, F: fractionation on aminopropyle cartridges]	180
Tableau 21 : Echantillons archéologiques fractionnés sur colonne de silice et fichier CPG correspondants (DAGs: diglycérides, TAGs: triglycérides; méthode MR1CER, encadrés 5, 3 et 9). [Archaeological samples fractionated on silica columns and corresponding GC filename].....	187
Tableau 22 : Liste des échantillons fractionnés sur colonne aminopropyle et conditions d'analyse en chromatographie en phase gazeuse le cas échéant (méthode MR1CER, encadrés 6, 3 et 9). [Archaeological samples fractionated on aminopropyle cartridges and experimental conditions in GC].....	191
Tableau 23 : Liste des échantillons modèles et archéologiques analysés en spectrométrie de masse nanospray sur le spectromètre de masse Q-q-TOF. [Model and archaeological samples analysed by nanoelectrospray mass spectrometry, with a Q-q-TOF analyser]	210
Tableau 24 : Liste des échantillons analysés par FT-ICR MS et MS/MS. [Model samples analysed by FT-ICR MS and MS/MS].....	212
Tableau 25 : Echantillons de référence et analyses dont ils ont fait l'objet. [Reference model samples and the analyses they have been subjected to]	223
Tableau 26 : Comparaison entre les espèces de triglycérides détectées par HPLC APCI MS {Mottram <i>et al.</i> 2001} et celles détectées par nanoESI MS/MS (les positions sur le squelette de glycérol ne sont pas indiquées). Les abréviations correspondent aux acides gras: My acide myristique C _{14:0} , Mx acide myristoléique C _{14:1} , P acide palmitique C _{16:0} , Po acide palmitoléique C _{16:0} , S acide stéarique C _{18:0} , O acide oléique C _{18:1} , L acide linoléique C _{18:2} , Ln acide linoléique C _{18:3} , A acide arachidique C _{20:0} . [Comparison of the triacylglycerol species detected in cow	

adipose fat, by HPLC APCI MS and nanoESI MS/MS (the position on the fatty acids on the glycerol backbone are not indicated)]	243
Tableau 27 : Liste des triglycérides discriminants des graisses animales. [Animal fats discriminating TAG species].....	253
Tableau 28 : Données obtenues en chromatographie en phase gazeuse pour les fractions A des extraits lipidiques des tessons imprégnés de lait de vache vieillis, % TAG (ou acides gras): pourcentage de triglycérides (ou acides gras) détectés par rapport à la totalité des lipides extraits. [Data obtained by HT GC of the total lipid extracts A of aged potsherds impregnated with the INRA cow milks, % TAG (ou acides gras): triacylglycerol percentage of total lipids detected (or fatty acids)].....	260
Tableau 29 : Profils des récipients et types d'échantillons prélevés. [Shapes of the pottery sampled, and kind of sample taken]	282
Tableau 30 : Indications sur l'état de surface, le niveau de savoir-faire et la couleur des céramiques prélevées, déterminées par A.-M. et P. Pétrequin. [Surface treatment, level of expertise and colour of the sampled pottery].....	283
Tableau 31 : Vases à épaulement et vases à profil en S sur lesquels des tessons et des résidus carbonisés ont été prélevés, correspondant aux planches 1, 2 et 3; T: tesson (potsherd), R: résidu (residue), A: adhésif (adhesive), ES: état de surface (surface treatment), NSF: niveau de savoir-faire (level of expertise), C: couleur (colour), D: dégraissant (temper), abondance: abondance de dégraissant (temper abundance). [Shouldered vessels and S-shaped vessels, on which potsherds and carbonised residues were sampled, their drawings are shown in the appendix, boards 1, 2 and 3].....	284
Tableau 32 : Vases tulipiformes et pseudo-tulipiformes sur lesquels des tessons, des résidus carbonisés et des adhésifs ont été prélevés, correspondant aux planches 4 et 5; T: tesson (potsherd), R: résidu (residue), A: adhésif (adhesive), ES: état de surface (surface treatment), NSF: niveau de savoir-faire (level of expertise), C: couleur (colour), D: dégraissant (temper), abondance: abondance de dégraissant (temper abundance). [Tulipiform vessels and pseudo-tulipiforme vessels, on which potsherds, carbonised residues and adhesives were sampled, their drawings are shown in the appendix, boards 4 and 5].....	285
Tableau 33 : Jarres, amphores et bouteilles sur lesquelles des tessons, des résidus carbonisés et des adhésifs ont été prélevés, correspondant à la planche 6; T: tesson (potsherd), R: résidu (residue), A: adhésif (adhesive), ES: état de surface (surface treatment), NSF: niveau de savoir-faire (level of expertise), C: couleur (colour), D: dégraissant (temper), abondance: abondance de dégraissant (temper abundance). [Jars, amphorae and bottle on which potsherds, carbonised residues and adhesives were sampled, their drawings are shown in the appendix, board 6]	286
Tableau 34 : Gobelets, bol et marmite pour lesquels des tessons, des résidus carbonisés et des adhésifs ont été prélevés, correspondant à la planche 7; T: tesson (potsherd), R: résidu (residue), A: adhésif (adhesive), ES: état de surface (surface treatment), NSF: niveau de savoir-faire (level of expertise), C: couleur (colour), D: dégraissant (temper), abondance: abondance de dégraissant (temper abundance). [Goblets, bowl and pot on which potsherds, carbonised residues and adhesives were sampled, their drawings are shown in the appendix, board 7].....	287
Tableau 35 : Coupes et assiettes ainsi que les petits bols/godets, les microvases et le plat à pain sur lesquels des tessons, des résidus carbonisés et des adhésifs ont été prélevés, correspondant aux planches 8 et 9; T: tesson (potsherd), R: résidu (residue), A: adhésif (adhesive), ES: état de surface (surface treatment), NSF: niveau de savoir-faire (level of expertise), C: couleur (colour), D: dégraissant (temper), abondance: abondance de dégraissant (temper abundance). [Cups, plates, microvases, small bowls and a so-called "bread plate" on which potsherds, carbonised residues and adhesives were sampled, their drawings are shown in the appendix, boards 8 and 9]	288

Tableau 36 : Tessons sans morphologie reconnue sur lesquels des adhésifs ont été prélevés; T: tesson (potsherd), R: résidu (residue), A: adhésif (adhesive), ES: état de surface (surface treatment), NSF: niveau de savoir-faire (level of expertise), C: couleur (colour), D: dégraissant (temper), Abondance: abondance de dégraissant (temper abundance). [Potsherds, with an incomplete profile, on which adhesives were sampled].....	289
Tableau 37 : Liste des céramiques de CLXIV dans lesquelles aucune trace de lipides ou seules des traces de matières grasses indéterminées ont été détectées (exception faite des adhésifs, cf. paragraphe B.4). [List of the pottery vessels that did not show any lipids left, or just traces of unidentified fatty matter].....	296
Tableau 38 : Critères d'identification des huiles végétales en HT CPG et HT CPG/SM de l'extrait lipidique total après triméthylsilylation et analyse sur colonne apolaire, méthode MR1CER (encadrés 3 et 9) , pour le site de CL XIV. [Molecular markers of vegetable oil, identified by HT GC and HT GC/MS, after trimethylsilylation and analysis on an apolar column]	298
Tableau 39 : Résultats obtenus en HT CPG pour les céramiques dans lesquelles des marqueurs de graisses végétales ont été détectés (méthode MR1CER, encadrés 3 et 9). [Ceramics where vegetable oil markers were detected using HT GC on an apolar column]	299
Tableau 40 : Liste des échantillons d'huiles de références analysés sur colonne Select FAME (méthode FAME, encadrés 4 et 11). [Vegetable oil reference samples analysed by GC on a fatty-acid-specific column]	300
Tableau 41 : Echantillons archéologiques analysés après transpropylation sur colonne select FAME (méthode FAME, encadrés 4 et 11). [Archaeological samples analysed by GC with a fatty-acid specific column, after transpropylation].....	303
Tableau 42 : Liste des céramiques de CLXIV ayant contenu des matières grasses végétales, planche 10 (ES: état de surface (surface treatment), NSF: niveau de savoir-faire (level of expertise), C: couleur (colour), D: dégraissant (temper), Abondance: abondance de dégraissant, T: tesson (potsherd), R: résidu (residue)). [Ceramic vessels that show the presence of vegetable fats, board 10]	307
Tableau 43 : Echantillons dans lesquels de la cire d'abeille a été identifiée en HT CPG, méthode MR1CER; AG: acides gras (fatty acids), TAGs: triglycérides, EP: esters palmitiques (palmitic esters). [Ceramic vessels where beeswax was identified using HT GC]	310
Tableau 44 : Liste des céramiques de CLXIV ayant contenu de la cire d'abeille, planche 11 (ES: état de surface (surface treatment, NSF: niveau de savoir-faire (level of expertise), C: couleur (colour), D: dégraissant (temper), Abondance: abondance de dégraissant, T: tesson (potsherd), R: résidu (residue), A: adhésif (adhesive)). [Ceramic vessels where beeswax was detected, board 11]	315
Tableau 45 : Proportions relatives des triterpènes du brai de bouleau identifiés dans les échantillons d'adhésifs de Clairvaux XIV, par CPG (méthode ADHESIF30M, encadrés 3 et 13) et rapport marqueurs de dégradation / biomarqueurs. [Relative proportions of birch bark tar triterpenoid biomarkers and degradation markers, detected in adhesives sampled on ceramic vessels from CLXIV, and ratio of degradation markers / biomarkers]	320
Tableau 46 : Liste des céramiques de CLXIV sur lesquelles des adhésifs ont été observés et prélevés, planches 12 et 13 (ES: état de surface (surface treatment), NSF: niveau de savoir-faire (level of expertise), C: couleur (colour), D: dégraissant (temper), Abondance: abondance de dégraissant). [Ceramic vessels and potsherds with adhesives identified as birch bark tar, boards 12 and 13].....	324

Tableau 47 : Liste des échantillons dont les chromatogrammes sont caractéristiques de graisses animales (HT CPG, méthode MR1CER, encadrés 3 et 9). [Samples whose chromatograms are characteristic of animal fats]	331
Tableau 48 : Classement des échantillons en fonction de leur distribution en triglycérides, données obtenues en HT CPG, méthode MR1CER, encadrés 3 et 9. [Sample classification based on the TAG distribution, data obtained by HT GC].....	332
Tableau 49 : Liste des échantillons archéologiques préparés et analysés en spectrométrie de masse nanoSpray Q-q-TOF.....	336
Tableau 50 : Résultats et interprétation des données obtenues en nanoESI MS et MS/MS des échantillons fractionnés. [Analytical results and subsequent identification of the type of fat contained in the samples subjected to analysis by nanoESI MS and MS/MS]	341
Tableau 51 : Liste des céramiques de Clairvaux XIV ayant contenu des produits laitiers, planches 14 et 15 (ES: état de surface (surface treatment), NSF: niveau de savoir-faire (skill), C: couleur (colour), D: dégraissant (temper), Abondance: abondance de dégraissant, T: tesson (potsherd), R: résidu (residue), A: adhésif (adhesive)). [Ceramic vessels that contained dairy products, corresponding to boards 14 and 15]	343
Tableau 52 : Liste des céramiques de Clairvaux XIV ayant contenu des graisses sous-cutanées et des graisses animales indéterminées, planches 16 et 17 (ES: état de surface (surface treatment), NSF: niveau de savoir-faire (skill), C: couleur (colour), D: dégraissant (temper), Abondance: abondance de dégraissant, T: tesson (potsherd), R: résidu (residue), A: adhésif (adhesive)). [Ceramic vessels that contained adipose fats and undetermined animal fats, corresponding to boards 16 and 17]	347
Tableau 53 : Synthèse des matériaux organique identifiés dans les céramiques de Clairvaux XIV. [Organic materials identified in the ceramic vessels from Clairvaux XIV].....	352

Cartes

- Carte 1 : Situation géographique des lacs de Chalain et Clairvaux (© P. Pétrequin). [Map of the geographical localisation of lakes Chalain and Clairvaux] 276
- Carte 2 : Localisation des différents sites archéologiques situés autour du lac de Clairvaux (© P. Pétrequin). [The archaeological sites located around lake Clairvaux] 276
- Carte 3 : Carte des sites archéologiques européens pour lesquels l'exploitation des produits de la ruche, en relation avec la céramique, a été montrée d'après Regert et al., communication orale, photo des lampes de Mochlos par Evershed et coll. {Charters *et al.* 1995; Evershed *et al.* 1997c; Evershed *et al.* 2003; Garnier *et al.* 2002; Heron *et al.* 1994; Kimpe *et al.* 2002; Regert *et al.* 1999; Regert *et al.* 2001a; Regert *et al.* 2003b; Regert 2007}. [Map of the prehistoric and protohistoric archaeological sites where beeswax was detected, images of the lamps from Mochlos by Evershed et coll.] 318

Introduction générale

Les matériaux organiques amorphes retrouvés en contexte archéologique font, depuis une trentaine d'années, l'objet d'études dans le domaine de la chimie analytique, seul moyen de remonter à leur composition moléculaire et par là même à leur origine naturelle. Mais qu'appelle-t-on matière organique amorphe? La matière organique est définie, d'un point de vue chimique, comme étant majoritairement constituée d'atomes de carbone, d'hydrogène, d'oxygène et d'azote, avec parfois du soufre et du phosphore. La matière organique amorphe est, elle, définie par l'absence de morphologie caractéristique, qui permettrait de l'identifier par examen macroscopique ou microscopique. La grande majorité des matériaux organiques archéologiques sont en réalité des matériaux organiques qui ont été minéralisés, naturellement ou par carbonisation, et qui, de ce fait, sont bien conservés. Leur identification se fait par les techniques d'examens développées en Sciences Naturelles, par le biais de leur morphologie. Il s'agit des bois, des pollens, des graines, des charbons ou encore des ossements. A contrario, la matière organique amorphe, plus difficile à reconnaître en contexte archéologique, ne peut pas être caractérisée par les méthodes naturalistes, et nécessite le passage à l'analyse chimique au niveau moléculaire et/ou isotopique, pour être identifiée {Evershed *et al.* 1990a; Evershed *et al.* 1990b; Evershed *et al.* 1992a; Evershed *et al.* 1994; Heron *et al.* 1989b; Heron & Evershed 1993; Regert 1996; Spangenberg 2004}. Les méthodes d'analyse biochimiques peuvent aussi apporter une aide précieuse pour leur identification {Craig *et al.* 2000; Shanks *et al.* 2001}. Les matériaux organiques amorphes sont constitués de composés qui peuvent être amorphes de nature, sang, graisses, cires, résines, etc. ou de composés qui sont devenus amorphes sous le fait de contraintes anthropiques, goudrons végétaux, huiles, etc. En contexte archéologique, ce sont des résidus macroscopiques, retrouvés dans le sédiment, dans les céramiques, liés à des outils lithiques ou comme enduits. Les matériaux organiques ont également pu s'imprégner dans la paroi poreuse des céramiques. Leur identification en contexte archéologique est donc difficile. En effet, si les résidus carbonisés ou adhérent à des objets sont reconnus depuis longtemps comme matériaux organiques, ceux retrouvés dans le sédiment sont plus difficilement identifiables et sont généralement récupérés par flottation. Pour les matériaux piégés dans la matrice des céramiques, seule une extraction en laboratoire, suivie d'analyses chimiques ou biochimiques, permet de déterminer leur présence et de les identifier. Nous avons choisi de travailler sur des matériaux organiques provenant d'un contexte villageois lacustre, datant du Néolithique moyen, dans le Jura. Il s'agit du site de Clairvaux XIV, situé au bord du lac de Clairvaux (commune de Clairvaux-les-Lacs, Jura, France). Ce site appartient à la culture du Néolithique Moyen Bourguignon, culture dont les dernières

études remontent au milieu des années 80, et dont la connaissance, tant chronologique que socioéconomique est devenue obsolète {Pétrequin & Gallay 1983; Pétrequin & Pétrequin 2004}. Le fait qu'il s'agisse d'un contexte lacustre a laissé présager d'une bonne conservation de la matière organique, d'où notre choix d'étude {Regert 1996; Regert et al. 1998b; Regert et al. 2001b; Regert et al. 2003a}. Il s'agit du premier site de cette culture pour lequel ce type d'étude, à l'interface entre la chimie analytique et l'archéologie, est effectué, depuis la fouille archéologique jusqu'aux investigations en laboratoire.

Ce mémoire est axé autour de l'analyse de matériaux organiques amorphes, liés à des céramiques. Ils sont de trois types:

- les résidus carbonisés, retrouvés sous forme d'encroûtements à la surface de la céramique,
- les résidus non carbonisés, retrouvés au bord de cassures anciennes ou comme décors ou support de décors,
- les résidus non visibles, piégés dans la matrice argileuse des céramiques.

La caractérisation des matériaux organiques retrouvés dans des céramiques, permet d'appréhender le contenu de ces dernières, leur mode de fabrication et/ou de réparation et ainsi leur place au sein de la société {Evershed et al. 1999; Heron & Evershed 1993; Regert 2007}. La compréhension des modes d'utilisation de la céramique, de gestion des ressources naturelles, sauvages ou domestiques, dans un contexte néolithique encore très axé sur la chasse, est essentielle à la compréhension globale de cette culture et à son insertion au sein des cultures contemporaines voisines. La mise en relation des données obtenues à Clairvaux XIV avec celles obtenues sur les sites voisins des lacs de Clairvaux et Chalain, datant du Néolithique final est également très intéressante pour comprendre l'évolution culturelle de la région des lacs du Jura. Le principe de l'interprétation des données obtenues par l'analyse repose sur le concept de biomarqueurs, emprunté aux géochimistes. Les biomarqueurs sont des molécules caractéristiques d'une ou plusieurs origines naturelles. Les marqueurs de dégradation anthropique sont formés par transformation du matériau par action de l'homme. Enfin les marqueurs de dégradation naturelle sont formés par dégradation du matériau après son enfouissement {Regert }. La connaissance de l'ensemble de ces marqueurs permet de renseigner les matériaux naturels qui ont été contenus ou utilisés avec les céramiques dont ils ont été prélevés ou extraits – nature, mode d'obtention, mode de préparation, etc. Ces marqueurs des matières naturelles sont des molécules souvent complexes, couvrant une très large gamme de structures et de fonctions chimiques. Seule la caractérisation d'un ensemble cohérent de marqueurs permet de remonter à une identification de la matière d'origine. Les marqueurs les mieux conservés sont généralement les lipides, particulièrement en milieu lacustre, car ce sont des biomolécules hydrophobes, avec des squelettes carbonés

majoritairement saturés, qui résistent mieux aux dégradations que d'autres biomolécules comme les protéines et les polysaccharides {Eglinton & Logan 1991; Evershed et al. 1999; Regert et al. 2003a}. Les lipides sont un ensemble de molécules regroupant une très large gamme de fonctions chimiques, de polarité et de volatilité variées. Leur caractérisation moléculaire et isotopique a permis d'identifier un grand nombre de matériaux organiques conservés en contexte archéologique, tels que les graisses animales, les huiles végétales, les cires végétales et animales, les résines et leurs dérivés thermiques, etc.

Du point de vue de la chimiste que je suis, l'étude de tels composés représentait un challenge analytique. Ce sont des composés moléculaires complexes, souvent dégradés, présents en faible quantité dans une matrice dont il faut les extraire, sans perte de matière ni contamination. Les progrès techniques de ces trente dernières années, particulièrement en chromatographie en phase gazeuse, en spectrométrie de masse, mais aussi en analyse isotopique, ont ouvert de nouveaux champs d'investigation pour l'analyse des composés organiques amorphes. En prenant comme point de départ les études déjà réalisées sur ce type de matériaux, nous avons choisi d'explorer de nouvelles pistes analytiques, pour la caractérisation de biomarqueurs peu utilisés pour la caractérisation des résidus organiques archéologiques. Il s'agit des triglycérides, biomarqueurs ubiquistes des graisses animales et végétales. Pour la grande majorité des équipes ayant travaillé sur le sujet, la première étape d'analyse est la chromatographie en phase gazeuse, couplée à la spectrométrie de masse, qui permet la caractérisation moléculaire globale des lipides extraits. Les choix de ces équipes ont ensuite porté sur la caractérisation isotopique des marqueurs de dégradation, acides gras en particulier, des graisses animales et des huiles végétales. Il est ainsi devenu possible de discriminer les graisses de ruminants et de celles de non ruminants ainsi que d'identifier la présence de produits laitiers. De grandes classes d'animaux peuvent ainsi être déterminées, mais sans jamais atteindre une identification au niveau spécifique {Dudd & Evershed 1998; Evershed et al. 1997a; Evershed et al. 2002; Spangenberg 2004}. Des développements en analyse immunologique, sur les résidus protéiques, se sont également révélés prometteurs, mais il s'agit de protocoles très particuliers, et difficiles à mettre en œuvre dans un laboratoire non spécialisé en biochimie {Craig et al. 2000}. C'est pourquoi nous avons choisi d'explorer un voie peu empruntée jusqu'à présent, qui est l'étude des biomarqueurs les plus caractéristiques des graisses animales, les triglycérides. Ces derniers, bien que communs aux graisses animales et végétales, sont, par leur structure et les acides gras qui les composent, caractéristiques de la nature des graisses – graisses sous-cutanées, produits laitiers et huiles végétales. Ils recèlent également des informations au niveau spécifique, particulièrement en ce qui concerne les produits laitiers comme les études dans le domaine de l'industrie laitière l'ont montré {Alonso et al. 1999; Ruiz-Sala et al. 1996}. Ce sont des composés peu volatils, très peu polaires,

qui nécessitent donc la mise en place de techniques autres que la chromatographie en phase gazeuse pour en caractériser la structure. Les techniques de chromatographie en phase liquide, plus adaptées pour l'analyse de ce type de composés, sont difficiles à mettre en œuvre dans le cas de mélanges dégradés, comme les échantillons archéologiques.

C'est pourquoi nous avons choisi de développer des techniques de spectrométrie de masse, sans séparation préalable par chromatographie, avec des ionisations douces. En caractérisant la structure des triglycérides, nous avons cherché à obtenir des critères de discrimination des graisses animales et d'identification de l'origine spécifique des résidus organiques archéologiques. Nous avons également cherché à caractériser de manière plus fine les marqueurs de dégradation des matières grasses végétales, les acides gras insaturés. L'ensemble des données acquises par le biais de la chimie analytique nous a permis d'identifier les matériaux organiques lipidiques, graisses animales, matières grasses végétales, brais végétaux et cire d'abeille. Nous avons ainsi pu bénéficier d'éléments supplémentaires pour la compréhension de l'utilisation de la céramique, la place de la céramique au sein de la société de Clairvaux XIV et des modes de gestion des ressources naturelles disponibles, sauvages et domestiques.

Nous commençons ce mémoire par une bibliographie raisonnée des recherches qui ont été entreprises sur les résidus organiques amorphes archéologiques. Nous avons essayé de mettre en lumière les apports, les avantages et les inconvénients des méthodologies développées par différentes équipes dans le monde. Nous verrons dans le deuxième chapitre la méthodologie que nous avons mise en place, pour l'analyse des résidus organiques amorphes archéologiques, et les différentes techniques de spectrométrie de masse qui ont été développées pour la caractérisation structurale des triglycérides des graisses animales et des acides gras insaturés des huiles végétales. Dans le troisième chapitre, nous montrerons, à l'aide de la caractérisation d'un référentiel de graisses animales, fraîches, absorbées dans des céramiques modèles et vieilles, les avantages et les inconvénients des différentes techniques de spectrométrie de masse à ionisation douce. Nous avons mis en regard l'ionisation par désorption laser (LDI) et l'ionisation par électrospray (ESI), en comparant leur sensibilité, leur résolution et leur potentiel informatif. Au sein de l'ionisation par désorption laser, nous avons confronté deux méthodes, le MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation*) et le DIOS (*Desorption/Ionisation On porous Silicon*). Au sein de l'ionisation par électrospray, nous avons comparé les résultats obtenus avec deux analyseurs et les deux techniques de spectrométrie de masse tandem qui leur sont associés (Q-q-TOF CID, *double Quadrupole/Time-of-Flight and Collision Induced Dissociation* et FT-ICR IRMPD, *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance and InfraRed MultiPhoton Dissociation*). Ces deux dernières techniques permettent la caractérisation structurale des triglycérides analysés. Après avoir évalué le potentiel de ces techniques, nous avons mis en place des critères de discrimination des graisses

animales, par le biais de la comparaison de la composition en acides gras de chaque triglycéride, entre différentes espèces de ruminants (graisses sous-cutanées de boeuf et de mouton et produits laitiers de chèvre et de vache). Nous avons ensuite cherché à déterminer la variabilité de tels critères, au sein d'un troupeau de vaches, de la même race, avec une alimentation de prairie. Nous avons mis en place un mode opératoire de vieillissement de ces échantillons modèles, et suivi l'effet de la dégradation, en contexte humide et anaérobie, sur les courbes de distribution en acides gras par triglycéride. Enfin, dans le dernier chapitre, nous présenterons les résultats obtenus sur les échantillons prélevés à Clairvaux XIV. Nous avons tout d'abord analysé l'ensemble des échantillons archéologiques par chromatographie en phase gazeuse, ce qui a permis d'identifier des matières grasses animales, des matières grasses végétales, de la cire d'abeille et du brai de bouleau. Nous avons ensuite appliqué le protocole mis en place dans le chapitre précédent à des échantillons archéologiques de graisses animales, et déterminé, grâce aux critères de discrimination déterminés dans le chapitre III, la nature et l'origine spécifique d'un certain nombre de résidus archéologiques. Nous présenterons l'intégration de ces résultats dans le cas précis du contexte de Clairvaux XIV.

Chapitre I

**Les matériaux organiques amorphes conservés dans
les céramiques archéologiques: un état de la question**

Introduction

Les résidus organiques amorphes retrouvés en contexte archéologique comprennent une très large gamme de matériaux, des restes humains dans les tourbières aux enduits de bateaux, des traces de sang sur des armes/outils aux restes carbonisés adhérant aux céramiques ou encore aux agrégats et autres résidus dans le sédiment. Nous ne consacrerons cette partie bibliographique qu'à l'étude des résidus organiques amorphes que l'on retrouve dans les céramiques archéologiques. C'est en effet un des contextes préférentiels de conservation de la matière organique {Evershed *et al.* 1992a; Evershed 1993b; Heron *et al.* 1989b}. Celle-ci peut être piégée dans la matrice argileuse poreuse lors de l'utilisation de la céramique, où elle est protégée des attaques microbiennes et/ou oxydantes, de même que dans les résidus carbonisés. Les céramiques sont les artefacts que l'on retrouve le plus souvent et en grande quantité sur la plupart des sites archéologiques à partir du Néolithique. L'analyse et l'identification subséquente de leur contenu permettent d'avoir accès à des informations directes sur leur mode d'utilisation, ce qui n'était pas possible avec les seules données typologiques, ethnoarchéologiques et matérielles. Ce sont donc à des témoins directs de la vie de tous les jours, les céramiques et leur contenu, que les études réalisées au cours des 30 dernières années se sont attaquées, afin de mieux comprendre les modes d'alimentation des populations du passé, les modes de gestion de la céramique, l'utilisation des ressources naturelles, sauvages (le miel et la cire d'abeille) ou d'origine domestique (les produits laitiers, les graisses animales) et également certaines productions techniques (les adhésifs).

Le manque de données morphologiques inhérent aux matériaux organiques amorphes a conduit à la mise en œuvre d'analyses au niveau moléculaire et isotopique, qui permettent d'identifier la nature de ces matériaux à partir de leur composition moléculaire et isotopique. La bibliographie raisonnée que nous présentons dans ce chapitre concernera les différentes classes de composés qui ont été identifiés depuis une trentaine d'années dans les céramiques, grâce à leur composition en biomarqueurs lipidiques et protéiques, ainsi que grâce à leur composition en isotopes stables du carbone et de l'azote. Il s'agit des matières grasses, graisses et cires animales, des huiles et cires végétales, des composés terpéniques tels que les résines et les brais ou encore des composés phénoliques (boissons fermentées). Les premiers pas analytiques utilisant les tests microchimiques, la spectroscopie infrarouge et la chromatographie en phase gazeuse avec des colonnes remplies jusqu'à la fin des années 80, ont permis de jeter les bases de l'analyse de ce type de matériaux. C'est en effet grâce à ces méthodologies que la présence de matière organique a été démontrée et que, parallèlement aux progrès techniques, de nouvelles méthodologies ont pu voir le jour, notamment en chromatographie en phase gazeuse. Au début des années 90, de nouvelles stratégies analytiques, englobant toutes les étapes depuis le prélèvement jusqu'à l'interprétation

des données chimiques ont été mises en place. Nous les présenterons brièvement avant de passer aux données chimiques, isotopiques et biochimiques ayant donné lieu à l'identification des graisses animales, des composés terpéniques puis des boissons fermentées et des cosmétiques.

A. Les premiers pas analytiques – Les analyses préliminaires

L'identification des résidus organiques repose sur la caractérisation couplée de leur composition chimique (type de molécules, proportions et distribution au sein de séries homologues) avec celles de matériaux de référence susceptibles d'avoir été utilisés. Les premières analyses, dès le 19^{ème} siècle, sont discutées dans *Ancient Egyptian Materials and Industry*, de A. Lucas, régulièrement mis à jour de 1926 à 1962. Elles ne concernent pas forcément les résidus trouvés dans des céramiques, et font surtout appel aux tests microchimiques, aux tests de solubilité et aux tests de point de fusion. Des tests similaires ont été réalisés sur des céramiques par des équipes allemandes dans les années 30, sans que les données soient suffisamment pertinentes pour permettre une identification des matériaux {Evershed *et al.* 1992b; Heron & Evershed 1993}. Ces études ont montré qu'il était possible de trouver de la matière organique dans les résidus archéologiques, ce qui va permettre, avec les avancées technologiques, de mettre au point des méthodologies mieux adaptées.

Les examens à l'œil nu ou sous microscope (optique ou électronique à balayage), s'ils ne permettent pas d'identifier la matière organique amorphe, permettent de détecter des restes morphologiquement identifiables contenus dans les résidus carbonisés. Les analyses élémentaires permises notamment grâce à la microscopie électronique à balayage (MEB) couplée à un analyseur à rayons X (*Energy-dispersive X Ray analysis*) ont donné lieu à des publications plus ou moins contradictoires sur le phosphore contenu dans les céramiques, dont l'interprétation reste sujette à discussion {Heron & Evershed 1993; Sanchez *et al.* 1998}. Elles permettent cependant la discrimination entre résidus carbonisés et résidus noirs minéraux {Regert *et al.* 2003a}.

La spectroscopie infrarouge (IR), a elle aussi été utilisée, afin d'identifier les composés organiques sans extraction préalable. Mais dans la plupart des cas, les minéraux présents dans les céramiques ou le sédiment environnant sont de meilleurs absorbants, et dominent le spectre {Heron *et al.* 1989b}. L'analyse de la matière organique extraite a toutefois été réalisée avec quelque succès, permettant d'identifier des résines dans des céramiques archéologiques ou des œuvres d'art {Beck *et al.* 1989; Mills & White 1994}. Cette technique est toujours utilisée, en méthode préliminaire permettant d'identifier la présence de certains composés absorbant très bien dans l'infrarouge et présentant une empreinte caractéristique, tels que les résines et les composés bitumineux {Beck *et al.* 1989; Colombini *et al.* 2003; Koller *et al.* 2001; Mills & White 1989; Pollard & Heron 1996; Regert *et al.* 2003b; Regert 2004; Regert *et al.* 2007; Robinson *et al.* 1987} ou encore certains composés du vin {McGovern *et al.* 1996; McGovern *et al.* 1999;

McGovern *et al.* 2004}. Elle n'est cependant pas suffisamment sensible pour caractériser les mélanges moléculaires complexes, comme ceux susceptibles de se trouver dans les résidus organiques. Certains auteurs utilisent la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF), comme méthode diagnostique, mais leur résultats, que nous présenterons suivant les classes de composés identifiés, sont à prendre avec précaution {McGovern *et al.* 1999}. Une étude de Biek en 1963 fait part de l'identification d'une trace colorée retrouvée sur le fond d'un vase {Biek 1963}, par spectroscopie de réflexion visible, comme de la garance.

L'utilisation de la résonance magnétique nucléaire (RMN) n'a pas fait l'objet de beaucoup de publications, mais se révèle peu adaptée à ce type d'échantillons. Ses performances sont "idéales" dans le cas de composés purs, en quantité relativement élevée. Ce n'est pas le cas de la plupart des échantillons provenant de céramiques archéologiques. Les indications fournies par la RMN seront alors de type "empreinte", les informations structurales étant noyées sous la masse de pics obtenus {Evershed *et al.* 1992b; Heron & Evershed 1993; Lambert *et al.* 2000; Sherriff *et al.* 1995}.

Les premières études en chromatographie en phase gazeuse portant sur les résidus organiques retrouvés en contexte archéologique, sédimentaire ou céramique, ont posé les bases des recherches ultérieures, qui ont permis de pousser les interprétations plus loin grâce aux progrès de l'instrumentation, et à une meilleure connaissance des processus d'altération des biomarqueurs, notamment lipidiques. Il faut attendre le milieu des années 70 pour que soient publiées les premières études sur des tessons et des sédiments archéologiques. Condamine et ses collaborateurs identifient des traces d'huile d'olive à partir de la fraction saponifiée et méthylée d'extraits lipidiques d'amphores romaines {Condamine *et al.* 1976}. L'huile d'olive est alors identifiée par la présence majoritaire d'acide octadécénoïque, présenté comme de l'acide oléique ($\Delta^9\text{-C}_{18:1}$) et par une étude comparée du gradient de concentration des acides gras dans la paroi des amphores à huile avec celui obtenu sur des amphores retrouvées sur un site de cuisson (rejets). L'équipe de Rottländer à l'université de Tübingen lance à cette époque la première étude généralisée, sur le contenu en corps gras de sédiments d'habitats paléolithiques et de céramiques datant du Néolithique au Moyen-Age {Rottländer & Schlichtherle 1979; Rottländer 1981; Rottländer & Hartke 1982; Rottländer 1983, 1986, 1990}. Le premier référentiel digne de ce nom est mis en place, regroupant une centaine de produits, depuis des huiles végétales et animales jusqu'aux graisses animales d'espèces diverses et variées. Les étapes analytiques ne varieront pas, avec une extraction sans broyage de la céramique ou du sédiment, avec un mélange de chloroforme et de benzène, avant une étape d'hydrolyse à la soude et de méthylation. Les données

expérimentales sont très peu décrites dans les articles qui sont alors publiés. Les interprétations données à partir des seuls acides gras paraissent aujourd'hui relativement risquées, grâce à la meilleure connaissance que nous avons non seulement des produits naturels mais aussi des mécanismes de dégradation, par les microorganismes, l'air, la lumière ou encore l'homme. En effet, si quelques essais de suivi de la dégradation de la matière organique dans le sol, ou dans des céramiques, sont tout de même menés {Morgan & Conford 1973; Patrick *et al.* 1985; Thornton *et al.* 1970}, ils restent relativement rares et ne concernent que peu de matériaux. La plupart des références proviennent donc de produits modernes, et quelques-uns de produits archéologiques, telles que des huiles extraites de graines conservées et bien identifiées. La validation de ce type de produits n'a jamais été menée. Il est de plus très difficile d'appréhender les critères de comparaison des données obtenues, celles-ci n'étant pas à notre connaissance toutes publiées. Une équipe sud-africaine {Patrick *et al.* 1985} a montré, toujours par le biais de la distribution globale en acides gras, la présence de graisse de phoque dans des céramiques retrouvées en contexte de bord de mer (Tableau 1). C'est la première fois qu'est mentionnée l'utilisation d'une colonne capillaire pour la chromatographie (encore qu'aucune description des colonnes ne soit disponible dans les articles de Rottländer). Ces résultats, basés sur les rapports acide palmitique sur acide stéarique ($C_{16:0}/C_{18:0}$) et acide oléique sur acide vaccénique ($\Delta 9-C_{18:1}/\Delta 7-C_{18:1}$) et sur la présence d'acide nervonique $C_{24:1}$, en comparaison avec de la graisse de phoque fraîche (2 échantillons) et vieillie (cuite puis chauffée 72 jours à 55°C et à nouveau chauffée 17 jour à 120°C) dans une céramique, montrent la présence d'une graisse d'origine marine.

	$C_{16:0}/C_{18:0}$	$\Delta 9-C_{18:1}/\Delta 7-C_{18:1}$	$C_{24:1}$
Echantillon archéologique KBB	2.28	5.04	5.8 %
Graisse de phoque fraîche	4.91 - 4.97	5.71 - 6.67	0.3 - 0.4 %
Graisse de phoque, vieillissement 1	4.25	6.43	0.6 %
Graisse de phoque, vieillissement 2	4.03	6.11	0.8 %
Graisse/huile d'anchois	6.33	2.0	1 %

Tableau 1: Résultats obtenus chromatographie en phase gazeuse pour différents types d'échantillons modèle de graisse de phoque et pour un échantillon archéologique mis au jour à Kasteelberg (Afrique du Sud), d'après Patrick *et al.* 1985. [Results of the GC analyses of different kinds of modern and archaeological samples from the archaeological site of Kasteelberg (South Africa), Patrick *et al.* 1985.]

La faiblesse de l'interprétation fournie par les auteurs réside dans le manque d'explication sur la différence notoire entre la quantité extrêmement élevée d'acide nervonique détectée dans l'échantillon archéologique par rapport aux autres échantillons (interprétation erronée, pollution par le sédiment ou les artefacts environnants, etc.). Les données archéozoologiques disponibles

sur le site permettent de pencher en faveur de la graisse de phoque. Malgré ces faiblesses, il s'agit de la première étude où un protocole de vieillissement est mis en place pour étayer des conclusions, et où les données chimiques sont couplées aux données archéologiques.

C'est à partir des années 90 que les progrès en chromatographie en phase gazeuse, le couplage chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse et l'appréhension globale des problèmes d'altération et de dégradation vont permettre des avancées spectaculaires dans le domaine.

B. Du prélèvement à l'interprétation, les premières méthodologies développées

Les résidus organiques issus des céramiques archéologiques analysés en chromatographie en phase gazeuse sont de deux types: les résidus carbonisés que l'on retrouve adhérent aux céramiques et les résidus non visibles, ayant migré dans la paroi des céramiques au cours de l'utilisation de celles-ci. L'équipe de R. P. Evershed a montré qu'il était possible d'analyser de tels résidus, par HT CPG (chromatographie en phase gazeuse haute température) et HT CPG/SM (HT CPG couplée à la spectrométrie de masse) sans avoir à recourir à la saponification des lipides. En effet, les nouvelles colonnes capillaires présentent deux avantages majeurs par rapport aux colonnes remplies jusqu'alors utilisées {Condamin *et al.* 1976; Evershed *et al.* 1990c; Evershed 1993a}. Elles permettent d'utiliser des températures plus élevées (jusqu'à 350°C), et d'obtenir une bien meilleure résolution pour les composés éluant en fin d'analyse, notamment grâce à la stabilité des phases stationnaires greffées. Les composés de haut poids moléculaire tels que les triglycérides et les esters de la cire d'abeille sont donc susceptibles d'être séparés et détectés sur de telles colonnes, sans avoir à être saponifiés {Evershed *et al.* 1990b; Evershed *et al.* 1990c; Evershed *et al.* 1992a; Evershed *et al.* 1992b; Evershed 1993b; Heron *et al.* 1989b; Heron & Evershed 1993}. Suivant les cas, des colonnes plus ou moins polaires et polarisables sont utilisées. La dérivation des composés polaires tels que les acides gras ou les alcools, par triméthylsilylation, a rendu possible l'analyse sur colonnes apolaires des échantillons en une seule étape. Lorsque cela s'avère nécessaire, pour obtenir une meilleure résolution sur certaines classes de composés, d'autres types de colonnes sont utilisées, polaires pour l'analyse des acides gras, polarisables pour l'analyse des triglycérides {Evershed 1996}. Les différents types de colonnes utilisées et leurs applications sont décrits dans les annexes. Il s'agit encore des prémices de l'analyse des résidus organiques, où de petites séries d'échantillons sont analysées. Les résultats présentés sont très prometteurs et très vite, différentes équipes vont mettre en place un certain nombre de méthodologies pour essayer de tester les différents paramètres entrant en jeu.

Une des premières étapes a consisté à déterminer l'intégrité de ces résidus, à savoir s'ils sont réellement caractéristiques des matières organiques contenues dans la céramique, en testant les probabilités de pollution par le sédiment environnant {Condamin *et al.* 1976; Condamin & Formenti 1978; Heron *et al.* 1991}.

La première étude {Condamin *et al.* 1976; Condamin & Formenti 1978} a concerné des tessons provenant d'amphores romaines. En parallèle de l'identification d'acides gras caractéristiques de l'huile d'olive, par comparaison avec des huiles de référence, l'étude du gradient de concentration au sein de la paroi a permis de caractériser la validité des lipides

identifiés. En effet, le gradient de concentration en lipides à travers la paroi d'une céramique utilisée pour contenir une matière grasse est décroissant de l'intérieur vers l'extérieur, alors que dans le cas d'amphores non utilisées, le profil est linéaire. La comparaison de la concentration dans les tessons avec celles du sol environnant est aussi un indicateur de pollution (Figure 1 & Figure 2).

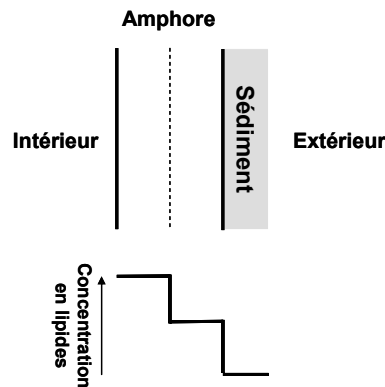


Figure 1 : Profil de concentration en lipides dans une amphore ayant contenu de l'huile, d'après Condamin *et al.* 1976. [Lipid concentration profile in an amphora used to contain oil]

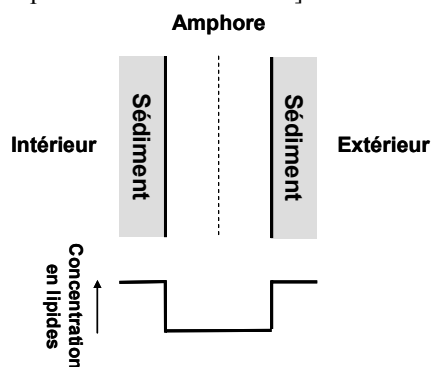


Figure 2 : Profil de concentration en lipides dans un débris d'amphore retrouvé dans les rejets d'un four de potier, d'après Condamin *et al.* 1976. [Lipid concentration profile in a potsherd from a non used amphora, excavated near a pottery maker shop]

Ce n'est qu'une quinzaine d'années plus tard que les problèmes d'intégrité des lipides retrouvés dans les parois des céramiques, et de validité des interprétations données sur le contenu des céramiques à partir de ces lipides vont être à nouveau étudiés. Dix tessons datant de l'époque saxonne (Moyen-Age ancien) sont prélevés à West Cotton (Raunds Area Project, Northamptonshire, Royaume-Uni), sans être débarrassés de leur sédiment, ainsi que trois échantillons de sédiments prélevés au hasard sur le site. L'analyse en parallèle des tessons et du sédiment associé montre une très nette différence de composition lipidique dans 6 cas, avec de plus une concentration en lipides dans les tessons bien plus élevée que dans les sédiments (Figure 3).

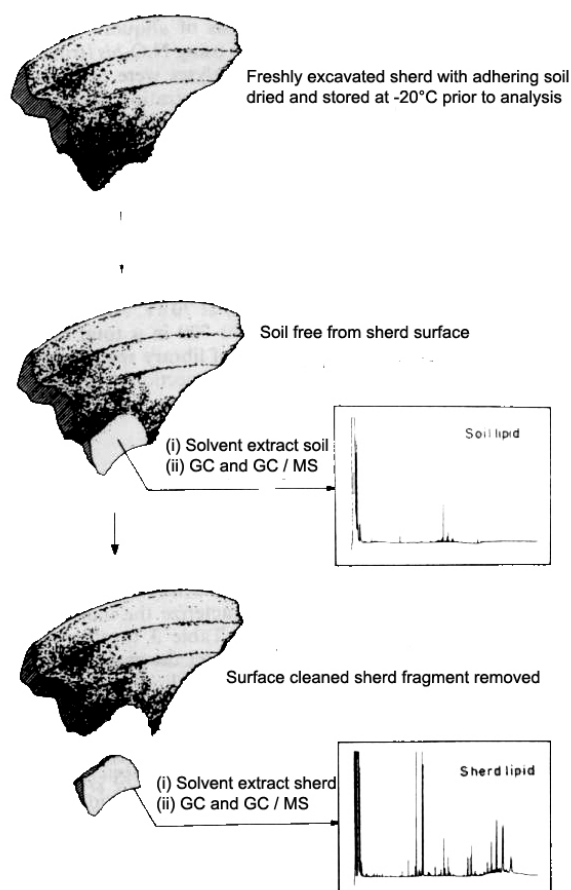


Figure 3 : Schéma d'échantillonnage et protocole analytique pour l'extraction de tessons et des sédiments associés, d'après Heron et al. 1991. [Sampling scheme and analytical protocol employed for the extraction and analysis of freshly excavated sherds with adhering burial soil]

Trois tessons et sédiments ont montré une quantité similaire de lipides mais avec des compositions très différentes. Seul un tesson et son résidu ont présenté de grandes similitudes de composition et de quantité. L'analyse de tessons non utilisés, provenant d'un four de potier de la même région, a montré une très faible quantité de lipides dans la plupart (<10 µg/g de tesson). Ces résultats montrent que la pollution par les lipides du sol, provenant de la décomposition par les microorganismes des matières organiques, était mineure. Les effets des microorganismes sont aussi considérés comme mineurs, aucun lipide caractéristique de ces derniers n'ayant été identifié dans les tessons.

La question de l'échantillonnage au sein de la céramique s'est ensuite posée. L'étude de la distribution des lipides en fonction de la localisation du prélèvement a été réalisée sur 62 céramiques du site de West Cotton (Raunds Area Project, Northamptonshire, Royaume-Uni, époques saxonne et médiévale), sur lesquelles ont été prélevés 105 tessons {Charters *et al.* 1993b}. Ces prélèvements ont été réalisés au niveau du fond, de la panse et du bord pour les céramiques les plus grandes (les jarres par exemple) et uniquement au fond et sur le bord pour les

plus petites (assiettes). En effet, le type de matière grasse et sa façon d'être stockée/cuisinée vont influencer son imprégnation dans la paroi de la céramique et les endroits où elle va s'accumuler. La quantification des lipides en fonction de leur localisation et de la forme de la céramique va permettre d'identifier des modes de cuisson et des modes d'utilisation de la céramique, ceci par comparaison avec des céramiques expérimentales. Les jarres par exemple ont des concentrations de lipides plus élevées que les bols, mais l'ensemble des jarres ne présentent pas de concentration homogène. Celles-ci ont probablement servi à contenir/cuire des matières grasses, ce qui semble être moins le cas pour les bols. Elles ont certainement rempli plus de fonctions différentes que les vases "chapeaux" dont les concentrations, à la fois à l'intérieur de cette classe de céramiques et pour chaque vase, sont plus homogènes. Les jarres présentent également une plus grande accumulation de lipides sur le haut de la panse et près du bord, ce qui suggère que les graisses ont été chauffées en une sorte de ragoût, où les composés hydrophobes flottent en surface, et sont préférentiellement absorbés en haut de la panse et près du bord (Figure 4). Ceci a été démontré par des simulations de cuisson de viande de mouton dans des céramiques de type jarre {Evershed *et al.* 1995a}.

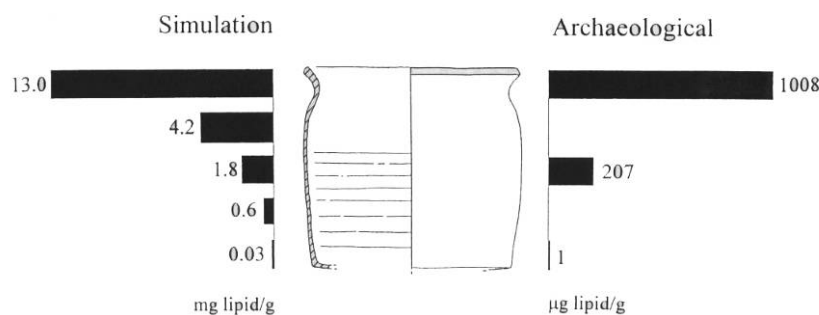


Figure 4 : Sites d'accumulation des lipides sur une jarre expérimentale (graisse d'agneau, à gauche) et sur une jarre archéologique (graisse animale, à droite) provenant du site de West Cotton (Northamptonshire, Royaume-Uni, Epoque saxonne – Moyen-Age ancien), d'après Evershed *et al.* 1995a. [Histogram showing the sites of accumulation of lipid in an experimental vessel used in the boiling of lamb. The histogram on the right shows the concentrations of lipid in the base, body and rim sherds of a vessel that contained degraded animal fat]

Une fois ces bases posées, conservation de la matière organique dans les céramiques, faisabilité de l'extraction, pas ou très peu d'interactions avec les lipides du sédiment et mise au point du protocole d'échantillonnage, l'interprétation des principaux biomarqueurs, la détermination de nouveaux biomarqueurs et marqueurs de dégradation s'est mise en place.

Ce concept de biomarqueurs a été emprunté aux géochimistes, qui en donnent la définition suivante: composés organiques présents dans le matériau d'origine, dont le squelette carboné est conservé à l'échelle géologique {Eglinton & Logan 1991; Philp & Oung 1988}. A l'échelle archéologique, ce sont des molécules d'origine biologique qui sont caractéristiques de leur origine naturelle, par leur structure, proportion ou encore par la présence de séries homologues. Les

biomolécules telles qu'elles sont définies par Eglinton sont les acides nucléiques (ADN/ARN), les protéines, les polysaccharides, les lipides ou encore les lignines {Eglinton & Logan 1991}. Leur conservation en contexte archéologique est assez variable, les lignines et les biopolymères lipidiques (cutine, subérine) étant les mieux conservés. Les lipides sont définis comme les biomolécules solubles dans les solvants organiques. Cette classe regroupe une très large gamme de familles chimiques, avec des squelettes carbonés divers, globalement plutôt saturés ce qui leur confère des propriétés hydrophobes, même si certains composés comprennent des doubles liaisons, des cycles et des fonctions hydroxyles ou carboxyles. Dans la nature, ce sont des molécules qui sont liées chimiquement, par des fonctions esters principalement (triglycérides, esters des cires), mais qui peuvent également exister sous forme libre (stéroïdes, terpènes). Ce sont donc des composés qui vont être résistants à l'échelle géologique et archéologique. Leurs principales dégradations, que nous présenterons en détail dans ce chapitre, sont dues à l'hydrolyse des fonctions esters, à l'oxydation des doubles liaisons et aux attaques des microorganismes. Ce sont les biomolécules parmi les mieux référencées et décrites {Eglinton & Logan 1991}. Elles sont synthétisées par tous les organismes vivants et vont donc pouvoir être utilisées comme biomarqueurs de la plupart des composés retrouvés dans des céramiques.

Ce sont ces données que nous présentons dans les prochaines parties, avec tout d'abord les résultats obtenus pour les graisses, animales ou végétales, grâce à la mise en œuvre de méthodologies analytiques de plus en plus complètes, puis des composés terpéniques et enfin des boissons fermentées et des cosmétiques.

C. Les matières grasses animales et végétales : graisses, huiles et cires

Les composés le plus souvent identifiés dans les céramiques archéologiques sont les matières grasses. Nous présenterons tout d'abord les apports de la chromatographie en phase gazeuse haute température, couplée ou non à la spectrométrie de masse pour l'identification des différents types de matières grasses, animales et végétales. Puis nous discuterons des avancées réalisées en analyse isotopique notamment grâce à l'application de l'analyse isotopique spécifique aux résidus organiques archéologiques. Nous verrons ensuite les données obtenues grâce à la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse. Enfin nous ferons un point sur les études menées sur les protéines.

C.1. Apports de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Après avoir décrit les différents protocoles analytiques qui ont été développés au cours des 15 dernières années, nous nous attacherons à présenter les différentes études de vieillissement qui ont permis une meilleure appréhension des phénomènes de dégradation et donc une meilleure compréhension des résidus organiques amorphes. Nous ferons ensuite le point sur les différentes classes de produits identifiés grâce à la chromatographie en phase gazeuse, les graisses animales, les huiles végétales, les cires végétales et enfin la cire d'abeille, en décrivant notamment leur biomarqueurs et marqueurs de dégradation.

C.1.1. les méthodologies analytiques développées pour l'identification des matières grasses

Ce sont les progrès techniques liés à la chromatographie en phase gazeuse dans les années 90 qui ont permis la mise en place de stratégies analytiques encore utilisées aujourd'hui. La première méthodologie est axée sur l'analyse globale de ces extraits lipidiques, afin d'obtenir le plus d'informations possibles en une seule étape. Elle permet l'analyse en routine d'un grand nombre d'échantillons, et la classification de ces échantillons en catégories de composés naturels. La Figure 5 résume les différents protocoles disponibles pour l'analyse de l'extrait lipidique total. Cette étape de *screening* est nécessaire et recèle toutes les informations qui vont permettre de développer de nouvelles stratégies basées cette fois sur certaines fractions, acides gras, triglycérides ou encore fraction insoluble.

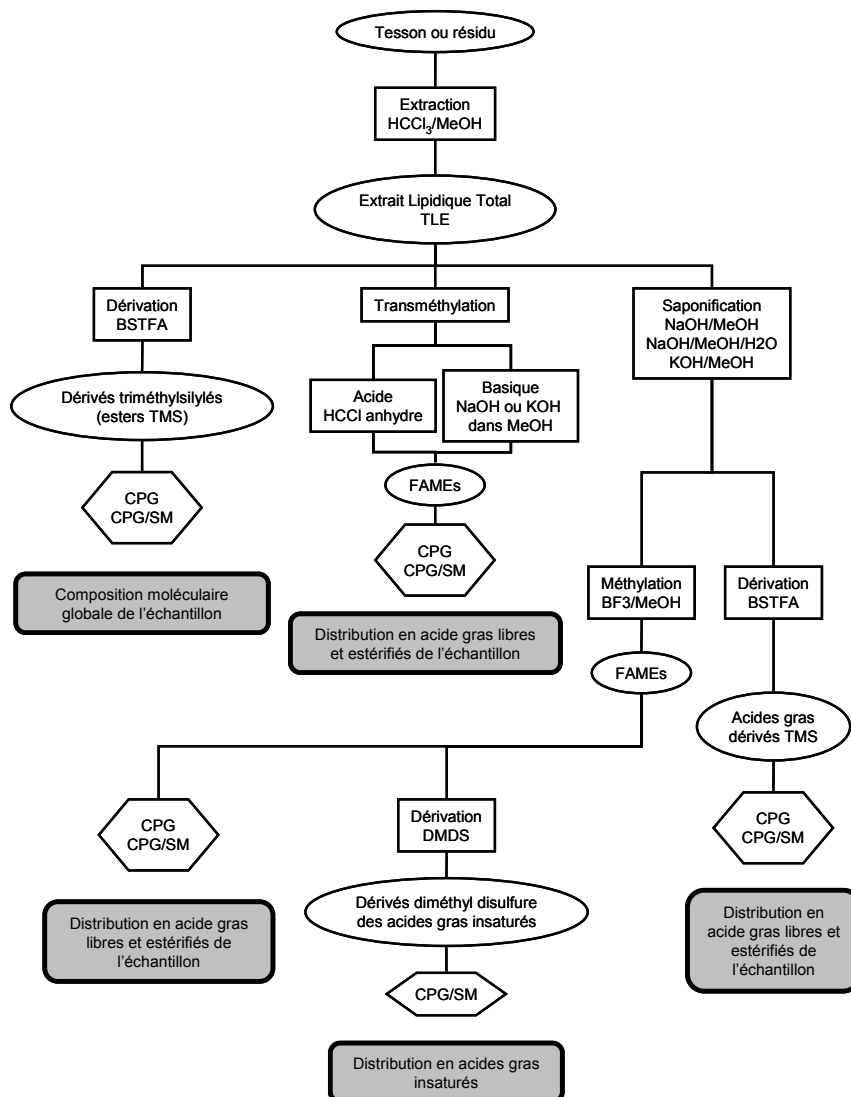


Figure 5 : Schéma des différents protocoles analytiques mis au point sur les extraits lipidiques de céramiques archéologiques {Charters *et al.* 1993b; Evershed *et al.* 1990a; Evershed 1993a, 1993c, 1993d; Evershed *et al.* 1995a; Evershed 1996; Evershed *et al.* 1997a; Evershed 2000; Garnier 2003; Heron *et al.* 1991; Mottram *et al.* 1999; Regert *et al.* 1998a; Regert *et al.* 2003a}. [Scheme of the different analytical protocols developed for the analysis of organic extracts from archaeological ceramics]

C.1.1.1. Extraction et analyse de l'extrait lipidique total

Le protocole d'extraction décrit par Charters *et al.* en 1993 ne va plus varier, ou alors très peu. Il s'agit de l'extraction des composés lipidiques présents dans les tessons de céramique après broyage de ces derniers ou de celle des résidus carbonisés par un solvant organique binaire chloroforme/méthanol. Ce protocole est basé sur les protocoles utilisés à l'époque pour l'extraction de la fraction lipidique d'échantillons de plasma {Charters *et al.* 1993b; Evershed 1993a}. L'utilisation de ces solvants de polarité intermédiaire permet l'extraction de composés présentant une gamme de polarité étendue, depuis des acides gras jusqu'aux triglycérides, des alcanes à longue chaîne aux esters de la cire d'abeille (Encadré a).

a. Extraction

Broyage du tesson (2 g) ou du résidu (jusqu'à 200 mg) dans un mortier en verre ou en Agathe après nettoyage de la surface.

Ajout d'un standard interne, le *n*-tétratriacontane (*n*-C₃₄) en quantité connue (20 µg en général, 20 µL à 1 mg/mL).

Extraction par un solvant organique (chloroforme/méthanol HCCL₃/MeOH 2:1 v/v; 10 mL) aux ultrasons (2 × 15 min).

Centrifugation de l'échantillon afin de séparer les restes de minéral de la fraction organique.

Evaporation à sec sous azote, 40°C.

Mise en solution de l'extrait lipidique total (500 µL, HCCL₃/MeOH 2:1 v/v).

Stockage du TLE (*Total Lipid Extract*) au congélateur (-20°C) jusqu'à analyse.

La quantité d'échantillon extraite et éventuellement la quantité de solvant peuvent parfois être modifiées, afin de s'adapter à des contraintes spécifiques aux échantillons. Ces derniers sont parfois extraits avec un mélange binaire dichlorométhane/méthanol (2:1 ou 1:1 v/v), ou alors juste au dichlorométhane {Bourgeois & Gouin 1995; Charrié-Duhaut *et al.* 2007; Colombini *et al.* 2004b}.

Le protocole d'analyse de l'extrait lipidique total est très simple et bien adapté à l'analyse de séries conséquentes d'échantillons. Il s'agit tout d'abord de la dérivation des molécules possédant un site protique (acides ou alcools), afin de les rendre plus volatiles et moins polaires avant leur analyse par chromatographie en phase gazeuse haute température sur colonne apolaire (Encadré b).

b. Préparation à l'analyse en CPG et CPG/SM

Evaporation à sec d'un *aliquot* (100 µL) de l'extrait lipidique total, sous azote, 40°C.

Ajout de *N,O*-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA, 20 µL, 60°C, 10 min) dopé avec 1% de chlorure de triméthylsilyl (TMCS).

Evaporation à sec de l'excès de réactif de silylation.

Dilution de l'extrait dérivé sec dans un volume donné de cyclohexane.

Injection dans le chromatographe (1 µL).

La triméthylsilylation est une dérivation très efficace pour ce type d'échantillons complexes, car elle permet de dériver tous les sites protiques (fonctions carboxyliques et fonctions hydroxyles), sans risque de transestérification des esters tels que les triglycérides ou les esters de la cire {Evershed 1993a}. Ce protocole, décrit dans l'encadré c, permet d'analyser en une seule étape toute la gamme de composés extraits précédemment, depuis les acides gras jusqu'aux triglycérides, et depuis les alcanes jusqu'aux esters de la cire {Barnard *et al.* 2007; Charters *et al.*

1993b; Charters *et al.* 1995; Charters *et al.* 1997; Copley *et al.* 2003; Copley *et al.* 2004a; Copley *et al.* 2005e; Craig *et al.* 2004; Dudd *et al.* 1998; Dudd *et al.* 1999; Evershed *et al.* 1990b; Evershed *et al.* 1990c; Evershed *et al.* 1991; Evershed *et al.* 1995a; Evershed *et al.* 1997c; Evershed *et al.* 2003; Heron *et al.* 1991; Heron *et al.* 1994; Kimpe *et al.* 2004; Mottram *et al.* 1999; Raven *et al.* 1997; Regert *et al.* 1998a; Regert *et al.* 2001a; Regert *et al.* 2001b; Sauter *et al.* 2001}.

c. Conditions opératoires en HT CPG

Injection: *on-column* préconisée.

Précolonne: 60 cm à 1 m de longueur.

Température: 50°C (1 à 2 min) jusqu'à 350°C (10 à 15 min), à 10°C/min.

Gaz vecteur: Hélium ou hydrogène, 15 à 25 psi en tête de colonne.

Détecteur: à ionisation de flamme (FID), 350°C.

Colonne: phase apolaire diméthylpolysiloxane (équivalent OV-101, BP 1, DB-1, CP Sil-1CB, CP Sil-5CB, SPB-1), 12 m × 0.22 mm ou 15 m × 0.32 mm, avec une épaisseur de phase de 0.1 µm.

Les rares changements ont surtout concerné les colonnes utilisées, leurs dimensions et plus rarement leur phase stationnaire. Récemment la mise au point d'une programmation en flux de gaz vecteur a permis d'obtenir une meilleure résolution pour les composés de plus haut poids moléculaire (Encadré d) {Regert *et al.* 2001a; Regert *et al.* 2003a}.

d. Conditions opératoires en HT CPG-2

Injection : *on-column*.

Précolonne: 1 m × 0.32 mm, non greffée.

Température: 50°C (1 min) à 350°C (10 min), 10°C/min.

Gaz vecteur: Hélium, 2 mL/min (17 min) à 4 mL/min (4 min), 1 mL/min² puis 4 mL/min à 6 mL/min (16 min), 1 mL/min.

Détecteur: FID, 350°C.

Colonne: phase apolaire CP Sil-5CB (diméthylpolysiloxane), 15 m × 0.32 mm, épaisseur de phase 0.1 µm.

Le fait de travailler directement sur la fraction soluble non hydrolysée est extrêmement intéressant. Cela permet de rendre compte de l'état réel de dégradation de l'échantillon, notamment grâce à la quantité de lipides non hydrolysés. De plus, la classification en diverses matières naturelles s'en trouve facilitée, comme nous le verrons par la suite, grâce à la présence de biomarqueurs natifs et non plus hydrolysés comme c'était le cas avec l'analyse des seuls acides gras.

Cependant, l'analyse des acides gras n'est pas dénuée d'intérêt, et continue à être menée le plus souvent en parallèle de l'analyse de l'extrait lipidique total (TLE).

C.1.1.2. Analyse des acides gras

On a vu que les premières études publiées sur des matériaux organiques retrouvés dans des céramiques portaient sur l'analyse des acides gras après saponification des extraits lipidiques. Si la majorité des études porte désormais sur l'analyse des extraits lipidiques non saponifiés, plus informatifs, l'identification des acides gras en parallèle de l'identification des biomarqueurs non saponifiés comme les triglycérides peut apporter des informations complémentaires. La distribution en acides gras, la présence de certains acides gras très caractéristiques ou encore la position des doubles liaisons sur les acides gras insaturés peuvent être des indicateurs des graisses de ruminants par exemple, des produits marins aussi. Le nombre de protocoles publiés est trop important pour en faire une description détaillée. Les colonnes utilisées et les conditions chromatographiques sont aussi variées que les protocoles, et sont regroupées avec les références de publications dans le tableau qui suit (Tableau 2). Il est difficile de faire la part des choses face à ces multiples protocoles. Les études ne se basant que sur les acides gras sont à considérer avec précaution, car ces derniers ne sont pas suffisamment caractéristiques des matières grasses pour être utilisés comme seuls critères d'identification {Barnard *et al.* 2007; Bourgeois & Gouin 1995; Charters *et al.* 1997; Copley *et al.* 2003; Copley *et al.* 2004a; Copley *et al.* 2005e; Craig *et al.* 2004; Dudd *et al.* 1998; Dudd *et al.* 1999; Evershed *et al.* 2003; Hansel *et al.* 2004; Kimpe *et al.* 2004; Maier *et al.* 2005; Malainey *et al.* 1999b, 1999c; Sauter *et al.* 2001; Sauter *et al.* 2003}.

Il existe tout de même quelques cas particuliers pour lesquels des acides gras spécifiques sont bien conservés {Colombini *et al.* 2005b; Copley *et al.* 2005e}.

Les protocoles de transméthylation directe semblent moins utilisés que le protocole d'hydrolyse basique suivi de la méthylation au BF_3/MeOH (complexe de trifluorure de bore dans le méthanol). Ce dernier sera aussi utilisé pour l'analyse isotopique des acides gras, que nous verrons dans le paragraphe C.2. C'est celui-ci que nous avons choisi de décrire un peu plus précisément dans l'encadré e {Barnard *et al.* 2007; Copley *et al.* 2003; Copley *et al.* 2004a; Copley *et al.* 2005e; Dudd *et al.* 1998; Dudd *et al.* 1999; Evershed *et al.* 2003; Hansel *et al.* 2004; Mottram *et al.* 1999; Sauter *et al.* 2001}. La dérivation des acides gras en composés alkylés permet de diminuer leur réactivité, tout en augmentant leur volatilité (www.cyberlipid.org/index.htm et www.lipidlibrary.co.uk/index.html). L'analyse des acides gras méthylés, aussi appelés FAMES (*Fatty Acid Methyl Esters*) se fait sur des colonnes plus polaires (phenylmethylsiloxane par exemple) que celles utilisées pour l'analyse des extraits

lipidiques, plus longues aussi afin d'améliorer la séparation des isomères. Les paramètres d'analyse sont assez variés, c'est pourquoi nous les présentons sous forme de tableau. Les colonnes disponibles sur le marché pour l'analyse des FAMES sont désormais très répandues, ce qui explique aussi le nombre de protocoles disponibles (Tableau 2).

e. Hydrolyse basique de l'extrait lipidique total

Ajout d'hydroxyde de sodium dans du méthanol (5% v/v ou 2 M).

Variante : hydroxyde de sodium dans une mélange méthanol/eau (9 :1 v/v ; 0.5 M).

Chauffage à 70°C pendant 1h.

Neutralisation : acide chlorhydrique (0.5-3 M) jusqu'à pH 3.

Extraction des lipides à l'hexane.

Méthylation des acides gras

Ajout de BF₃/MeOH (2 mL, 14% w/v).

Chauffage à 70°C pendant 1h.

Extraction au diéthyléther (3 mL) après ajout d'eau (6 mL).

Variante : extraction au chloroforme (6 mL) après ajout d'eau (2 mL).

Dans certains protocoles, les acides gras, obtenus après saponification de l'extrait lipidique total, ne sont pas méthylés. Ils sont triméthysilylés au BSTFA, et sont alors analysés sur le même type de colonne qu'un extrait lipidique total dérivé classiquement {Dudd *et al.* 1998; Evershed *et al.* 2003}. Dans le premier cas, il s'agit de l'étude de la dégradation d'huile d'olive et de lait imprégnés dans des tessons {Dudd *et al.* 1998}. Le but est de déterminer la contribution des lipides de microorganismes. L'étude est réalisée sur l'analyse des extraits lipidiques totaux et des extraits saponifiés, et le fait d'utiliser la même colonne, donc le même type de dérivation, peut s'avérer intéressant pour pouvoir comparer les différentes distributions obtenues. Il s'agit certainement aussi d'une volonté de simplification du protocole. Pour la deuxième référence, le choix d'une dérivation au BSTFA semble être liée à la présence de composés de la cire d'abeille, qui ne sont pas dérivables au BF₃/MeOH, tels que les alcools {Evershed *et al.* 2003}. La triméthysilylation permet alors de s'affranchir de ce problème, en dérivant à la fois les acides gras et les alcools résultants de l'hydrolyse.

Référence de la colonne	Phase stationnaire	Dimensions (Longueur × Diamètre × épaisseur de phase)	Conditions de températures	Référence
CP wax 52 CB	Polyéthylène glycol	50 m × 0.32 mm × 0.2 µm	40°C – 100°C à 10°C/min 100°C – 40°C (20 min) à 4°C/min	{Copley <i>et al.</i> 2005e}
BPX70	70% cyanopropyl équivalent siloxane modifié	60 m × 0.32 mm × 0.25 µm	40°C – 100°C à 10°C/min 100°C – 240°C (20 min) à 4°C/min	{Kimpe <i>et al.</i> 2004}
DB-225	50% Cyanopropyl-phenyl 50% dimethyl polysiloxane	30 m × 0.32 mm × 25 µm	90°C (4 min) – 160°C à 10°C/min 160°C – 220°C (7 min) à 5°C/min	{Sauter <i>et al.</i> 2001; Sauter <i>et al.</i> 2003}
VF3-23ms	Cyanopropyl méthylpolysiloxane modifié	60 m × 0.32 mm × 0.15 µm	40°C – 100°C à 10°C/min 100°C – 240°C (20 min) à 4°C/min	{Copley <i>et al.</i> 2004a; Hansel <i>et al.</i> 2004}
BPX70	70% cyanopropyl équivalent siloxane modifié	25 m × 0.32 mm × 0.12 µm	40°C (2 min) – 200°C (10 min) à 4°C/min	{Mottram <i>et al.</i> 1999}
CPSil-8-CB	5% Phenyl 95% dimethylpolysiloxane	50 m × 0.32 mm × ?	150°C – 300°C à 4°C/min	{Bourgeois & Gouin 1995; Kimpe <i>et al.</i> 2004}
Supelcowax 10	Polyéthylène glycol	30 m × 0.25 mm × ?	190°C (3 min) – 235°C (10 min) à 2°C/min	{Malainey <i>et al.</i> 1999a, 1999b, 1999c}
DB-5	5% Phenyl 95% dimethylpolysiloxane	30 m × ? × ?	?	{Barnard <i>et al.</i> 2007}

Tableau 2 : Liste des différentes conditions opératoires développées en chromatographie en phase gazeuse pour l'analyse des acides gras extraits de tessons et résidus archéologiques. [Gas chromatographic experimental conditions developed for the analysis of fatty acids extracted from archaeological potsherds and carbonised residues]

En parallèle de l'analyse des acides gras sous forme d'esters méthylés, il peut être intéressant de déterminer la position des doubles liaisons des acides insaturés. En effet, on verra plus loin qu'un des critères de différenciation des graisses de ruminants et de non ruminants est basé sur la présence d'une multitude d'isomères de l'acide octadécénoïque (C_{18:1}) dans les graisses de ruminants par rapport à la présence du seul isomère Δ^9 -C_{18:1} pour les non ruminants {Evershed *et al.* 1997a; Evershed *et al.* 2002; Mottram *et al.* 1999}. L'analyse des FAMES en HT CPG/SM ne permet pas de déterminer la position des doubles liaisons car celles-ci migrent durant l'ionisation {Evershed 2000}. La dérivation des doubles liaisons au diméthyle disulfure (DMDS) est considérée comme une approche donnant de très bons résultats. Elle est facilement mise en œuvre, notamment par rapport à l'ozonolyse des doubles liaisons {Lattuati 1998}. Le DMDS en présence d'iode s'additionne quantitativement sur les liaisons éthyléniques des composés mono-insaturés et conduit à des composés thiométhylés par une réaction stéréosélective (Encadré f).

f. Dérivation au diméthyle disulfure

Ajout de DMDS (100 µL) et d'iode (6% w/v, diéthyle éther, 2 gouttes) à la solution de FAMES (12h à température ambiante).

Arrêt de la réaction avec ajout de thiosulfate de sodium aqueux (5% w/v, 500 µL).

Extraction des dérivés thiométhylés à l'hexane (1 mL).

Injection de la solution dans le chromatographe.

Le clivage en spectrométrie de masse va s'effectuer préférentiellement entre les deux entités thiométhyles. L'ion moléculaire est alors visible, même en impact électronique, ainsi que les deux fragments caractéristiques de chaque entité thiométhyle et du fragment caractéristique des thiométhyles $[\text{CH}_2=\text{SCH}_3]^+$ (Figure 6). Les dérivés thiométhyles sont analysés sur le même type de colonnes que les esters méthyliques d'acides gras.

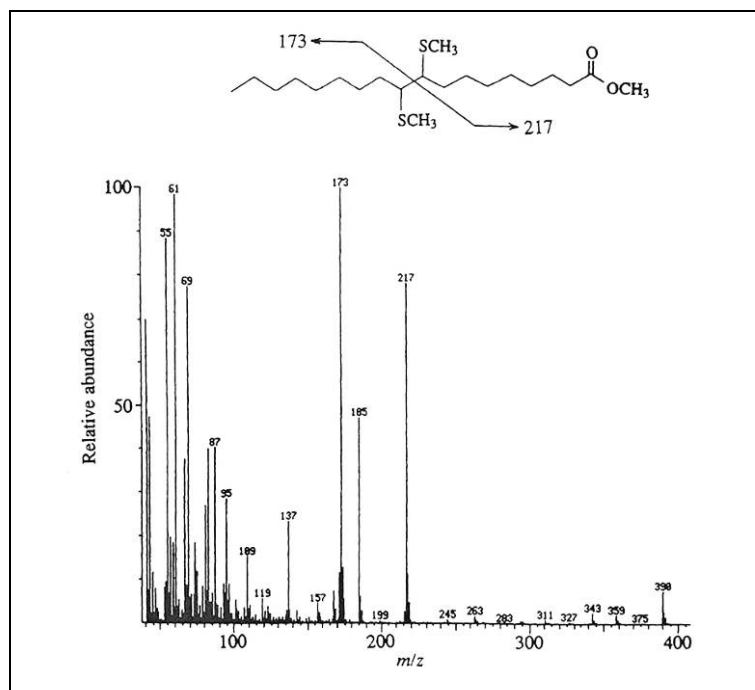


Figure 6 : Schéma de fragmentation du dérivé DMDS de l'oléate de méthyle (Z-9-octadécenoate) et spectre de masse associé {Evershed 1993c}. [Fragmentation scheme of the DMDS-derivatised of methyl-oléate (Z-9-octadecenoate) with the corresponding mass spectrum]

En parallèle de l'analyse de la fraction soluble, celle de la fraction qui n'a pas été solubilisée dans les solvants organiques peut s'avérer très intéressante, et révéler de nouveaux biomarqueurs.

C.1.1.3. Analyse de la fraction insoluble

Le troisième type de protocole développé pour l'analyse des tessons en chromatographie en phase gazeuse concerne l'analyse de la fraction insoluble conservée. Deux types de protocole sont développés, le premier par hydrolyse alcaline de cette fraction avant analyse en CPG et CPG/SM, et le deuxième par pyrolyse couplée à la CPG et à la CPG/SM (Figure 7). L'hydrolyse alcaline est une dépolymérisation chimique qui concerne certaines liaisons spécifiques, notamment celles entre les composés oxydés et la matrice argileuse. La pyrolyse correspond à une

dépolymérisation thermique, beaucoup plus "anarchique", donnant lieu à des réarrangements au niveau moléculaire. Les signaux obtenus sont beaucoup plus complexes et difficiles à interpréter. A cause de ces réarrangements, les informations structurales sont en partie perdues. Elle permet donc d'obtenir des empreintes caractéristiques de matériaux fortement polymérisés, ou encore de détecter des marqueurs de certaines biomolécules comme les protéines.

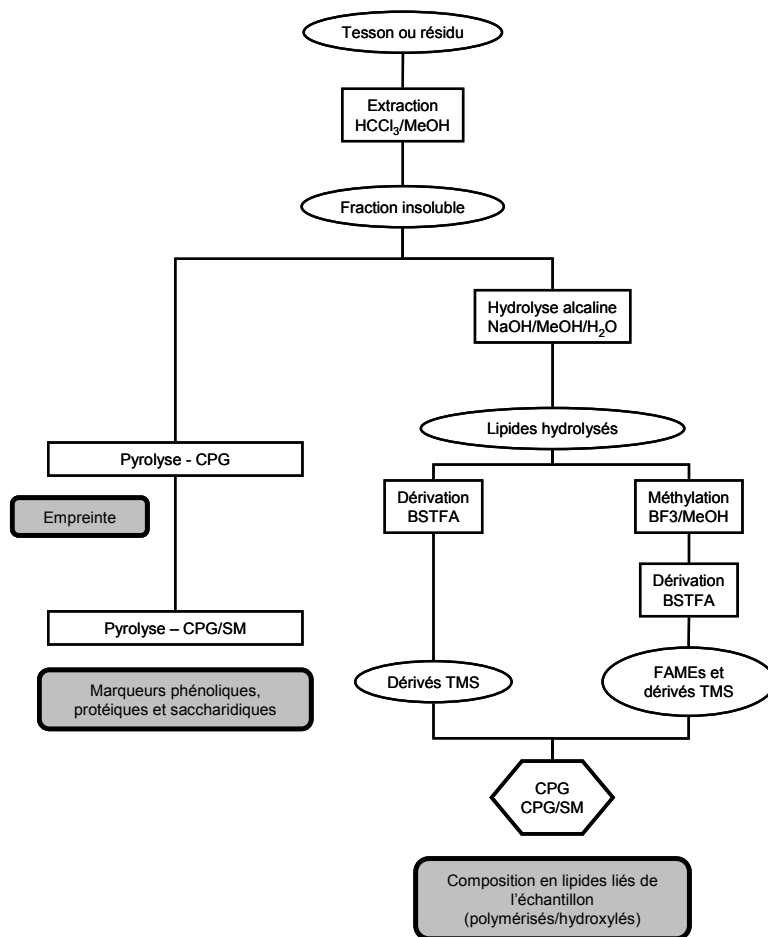


Figure 7 : Schéma des protocoles analytiques mis en place pour l'analyse de la fraction insoluble de tessons et résidus carbonisés archéologiques. [Scheme of the different analytical protocols developed for the analysis of the insoluble fraction of archaeological potsherds and carbonised residues]

Durant l'utilisation des céramiques, pour la cuisson notamment, la formation de composés oxydés et/ou polymérisés est attendue. Or aucune étude d'extrait lipidique n'a montré la présence de tels composés. Afin de tester l'hypothèse de la formation de composés oxydés lors d'utilisation de céramiques, des tessons provenant de vases à cuire d'un site lacustre (Chalain, Néolithique Final) et de lampes d'un site aride (Qasr Ibrîm, 6^{ème} siècle AD) ont été étudiés {Regert *et al.* 1998a}.

L'étude de la fraction insoluble de tessons extraits a permis de montrer la présence de composés, diacides, mono- et dihydroxyacides résultant de l'oxydation des doubles liaisons des acides insaturés. Ils sont probablement liés sous forme chimique ou physique au minéral constituant la céramique, alors que les formes libres ont disparu. La lixiviation de tels composés sous forme libre par l'eau du sol est certainement la cause de la perte de ces composés lors de l'enfouissement. Afin de tester cette hypothèse, des tessons de lampes provenant d'un site extrêmement aride (Qasr Ibrîm, Egypte) ont été analysés. L'étude de la fraction lipidique totale a montré la présence de ces composés. Ce qui tend à conforter l'hypothèse de la lixiviation des composés oxydés, ces derniers étant bien conservés en contexte aride (sans lixiviation possible). Nous ne décrivons que le protocole d'hydrolyse alcaline de la fraction insoluble (Encadré g).

g. Hydrolyse alcaline de la fraction insoluble

Ajout d'hydroxyde de sodium à une fraction du tesson extrait (0.5 M, MeOH/H₂O 9:1 v/v, 10 mL).

Chauffage à 70°C et agitation pendant 90 min.

Après refroidissement et centrifugation, prélèvement de 3 mL.

Acidification (HCl 1M) et extraction au chloroforme (3 × 3 mL).

Evaporation à sec du solvant.

Séchage au dessiccateur.

Dérivation au BF₃/MeOH et/ou triméthylsilylation au BSTFA (les protocoles sont décrits plus haut).

Reprise dans un volume d'hexane avant l'analyse en HT CPG et HT CPG/SM.

Suivant le type de dérivation, différentes colonnes sont utilisées. En cas de méthylation, les colonnes seront du même type que celles décrites plus haut (Tableau 2). En cas de méthylation suivie d'une triméthylsilylation ou d'une triméthylsilylation seule, ce sont des colonnes apolaires qui sont utilisées (Tableau 3).

Référence de la colonne	Phase stationnaire	Dimensions (Longueur × Diamètre × épaisseur de phase)	Conditions de températures	Référence
CP Sil-5 CB	Diméthylpolysiloxane	50 m × 0.32 mm × 0.12 µm	40°C (1 min) – 230°C à 20°C/min 230°C – 300°C (10 min) à 4°C/min	{Regert <i>et al.</i> 1998a; Regert <i>et al.</i> 2001b}
CP Sil-5 CB	Diméthylpolysiloxane	50 m × 0.32 mm × 0.12 µm	40°C – 200°C à 10°C/min 200°C – 300°C (10 min) à 4°C/min	{Copley <i>et al.</i> 2005e}

Tableau 3 : Conditions chromatographiques utilisées pour l'analyse de la fraction insoluble de tessons archéologiques, après hydrolyse alcaline. [Chromatographic experimental conditions for the analysis of the insoluble fraction of archaeological potsherds, following alkaline hydrolysis]

D'autres études ont ensuite été menées, afin de déterminer la présence de tels composés dans les fractions insolubles de tessons provenant de différents sites {Copley *et al.* 2004a; Copley *et al.* 2005e; Regert *et al.* 2001b; Regert *et al.* 2003a}.

La pyrolyse de la fraction insoluble, pour déterminer la présence de composés polymérisés et/ou insolubles a aussi été mise en place pour ce type d'échantillon, permettant d'identifier des marqueurs phénoliques, protéiques, saccharidiques et terpéniques. C'est une technique très largement utilisée pour l'analyse des composés polymérisés retrouvés dans les matériaux constitutifs des œuvres d'art et des objets archéologiques {Bonaduce & Colombini 2004; Buckley *et al.* 1999; Burmester 1983; Cappitelli *et al.* 2002; Carbini *et al.* 1996; Chiavari *et al.* 1993; Colombini *et al.* 2004a; Craig *et al.* 2004; Garnier *et al.* 2003; Niimura *et al.* 1999; Oudemans & Boon 1991; Regert *et al.* 2001b; Shedrinsky *et al.* 1989; van Bergen *et al.* 1997a}. Cette bibliographie est loin d'être exhaustive mais elle permet de se rendre compte des nombreux domaines pour lesquels la pyrolyse couplée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse est utilisée. Une partie des informations structurales est perdue, notamment à cause des réarrangements à haute température. Si elle est souvent utilisée pour identifier, par comparaison d'empreinte, des matériaux polymériques modernes, elle permet aussi de détecter des marqueurs de certaines biomolécules. Nous ne présenterons ici que les études axées sur les résidus directement liés aux graisses animales et végétales retrouvés dans les céramiques. Il s'agit principalement des résidus protéiques ou cireux {Craig *et al.* 2004; Oudemans & Boon 1991; Regert *et al.* 2001b; Regert *et al.* 2003a; Shedrinsky *et al.* 1989}. Les études sur les marqueurs phénoliques et terpéniques seront présentées dans les paragraphes consacrés aux boissons fermentées et aux composés terpéniques respectivement.

La pyrolyse présente des avantages certains, particulièrement en ce qui concerne la simplicité de mise en œuvre (pas ou peu de préparation de l'échantillon), la taille d'échantillon nécessaire (quelques μg) et la reproductibilité des analyses grâce aux colonnes capillaires utilisées depuis 20 ans. Elle est cependant assez peu utilisée pour la détermination des résidus organiques amorphes, absorbés ou visibles, car elle est peu diagnostique des graisses. Pour la fraction insoluble, par rapport à l'hydrolyse alcaline qui permet de mettre en évidence les composés oxydés, elle permet de diagnostiquer la présence de composés protéiques. Lors de leur cuisson ou de leur enfouissement dans le sédiment, les protéines sont sujettes à hydrolyse. Leurs produits de dégradation sont alors les peptides et les acides aminés. Or la pyrolyse des acides aminés est caractérisée par un certain nombre de molécules, plus ou moins directement liées avec les dits acides aminés. Un critère de présence/absence peut donc être mis en place, basé sur la détection d'un pôle de molécules simples, caractéristiques d'acides aminés telles que le benzène, le toluène pour la phénylalanine, le pyrrole et ses dérivés pour la proline etc. (Figure 8) {Oudemans & Boon 1991; Ratcliff *et al.* 1974; Regert *et al.* 2001b; Sharma *et al.* 2003; Sharma *et al.* 2004; Smith *et al.* 1988}.

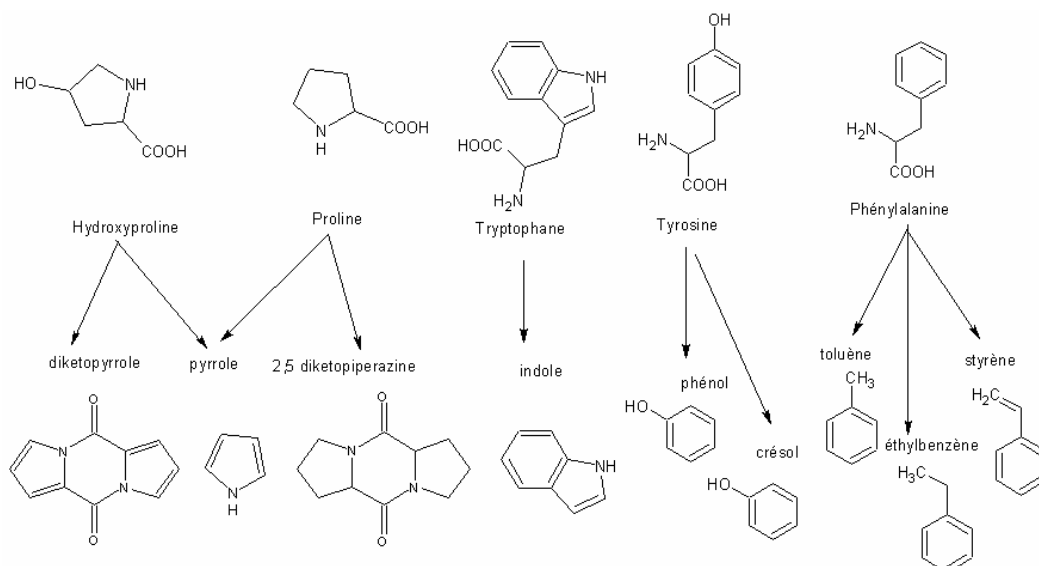


Figure 8 : Relation entre acides aminés et marqueurs protéiques détectés par pyrolyse couplée à la CPG et à la CPG/SM, d'après Regert et al. communication orale. [Relation between amino acids and proteinaceous markers, by pyrolysis coupled to GC and GC/MS]

Relativement peu d'études ont été publiées à ce jour sur l'analyse des résidus protéiques dans les céramiques par pyrolyse. En effet, si cette technique permet de conclure à la présence probable de peptides dans le résidu, elle ne permet pas d'identifier un type de protéine. Il faudra donc mettre en œuvre d'autres techniques, chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, protéomique ou analyses immunologiques pour pouvoir caractériser la matière naturelle initiale (protéine animale ou végétale, espèce) {Burgaud 2003; Craig & Collins 2000}. De plus, la probabilité pour que les protéines soient suffisamment bien conservées pour être encore caractéristiques de leur origine n'est pas réellement connue, même si de récentes publications en immunologie sont prometteuses.

Une équipe a également mis en évidence des marqueurs saccharidiques par pyrolyse des résidus organiques {Oudemans & Boon 1991}.

Nous avons vu qu'il existait une quantité de protocoles variés pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse de la fraction soluble et de la fraction insoluble de tessons et de résidus carbonisés de céramiques archéologiques. Il est alors possible de détecter et d'identifier un ensemble de biomarqueurs et de marqueurs de dégradation, tels que les acides gras, les triglycérides, les stérols, les alcools, les alcanes, les esters palmitiques, les cétones etc. qui vont permettre la classification des matières grasses en graisses animales, huiles végétales, cires animales et cires végétales.

C.1.2. les biomarqueurs des matières grasses

Les matières grasses retrouvées dans les céramiques archéologiques sont de différentes natures. Il peut s'agir de graisses animales, de type sous-cutanées ou produits laitiers, d'huiles végétales, de cires de feuilles de végétaux ou encore de cire d'abeille. La chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse permettent de détecter et de caractériser un certain nombre de biomarqueurs de ces composés.

C.1.2.1. Les matières grasses animales

Ce sont les matériaux le plus souvent retrouvés dans les récipients en céramique. Si leur fonction alimentaire ne fait pas de doute, elles ont pu remplir d'autres rôles. Ainsi leur rôle dans l'éclairage sera identifiable en corrélation avec des typologies de céramiques bien particulières, les lampes par exemple {Kimpe *et al.* 2001}. Il en est de même pour un rôle de plastifiant dans des adhésifs, qui sera déduit du mélange d'un adhésif à base de brai d'écorce et de graisse animale {Dudd & Evershed 1999; Regert *et al.* 2000; Regert 2004}. Par contre, leur utilisation dans des onguents, des médicaments ou des cosmétiques sera plus difficile à établir, sauf dans le cas où la fonction du vase ne fait pas de doute (récipients à cosmétique) {Evershed *et al.* 2004}. Cette difficulté illustre bien la complémentarité des études archéologiques sur les céramiques (typologie, contexte, type de pâte, etc.) et des analyses physico-chimiques des résidus organiques contenus dans ces dernières. Que ce soit la fonction de la matière grasse retrouvée dans une céramique ou la fonction de la céramique elle-même, elles ne peuvent être dissociées.

Les graisses animales sont caractérisées par la présence de stérols animaux, tels que le cholestérol et le cholestanol, son produit de dégradation et par la présence d'acides gras saturés dans la gamme C_{14:0}-C_{18:0}, avec le C_{18:0} généralement majoritaire et des traces d'acides gras insaturés tels que le C_{18:1}. Les acides gras sont les produits d'hydrolyse des triglycérides. Dans les cas les mieux conservés, des triglycérides peuvent être détectés, de T₄₀ à T₅₄ ainsi que des mono- et des diglycérides, qui sont leurs produits d'hydrolyse {Charters *et al.* 1995; Dudd *et al.* 1999; Evershed *et al.* 1990a; Evershed *et al.* 1992a; Evershed *et al.* 1995a; Evershed *et al.* 1997a; Evershed *et al.* 2002; Kimpe *et al.* 2004}. Le cholestérol et les triglycérides sont des biomarqueurs des graisses, alors que les acides gras et les mono- et diglycérides sont des marqueurs de dégradation. Dans certains cas, des marqueurs de dégradation anthropique peuvent aussi être présents, ainsi que des composés oxydés.

Ce sont les triglycérides qui sont les biomarqueurs les plus caractéristiques des graisses animales. Il s'agit d'esters du glycérol, avec trois entités acides gras (Figure 9). Ce sont des

biomarqueurs difficilement caractérisables en CPG. En effet, l'utilisation de colonnes capillaires apolaires haute température permet bien de les détecter, mais sans séparer les isomères co-élués.

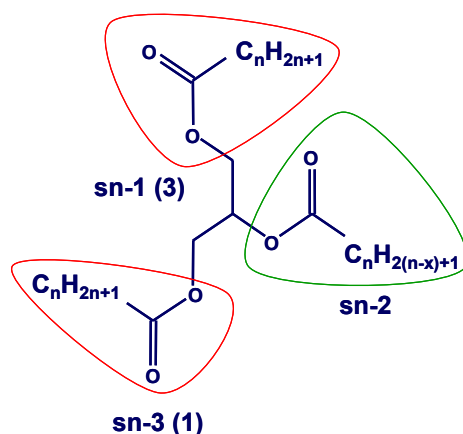


Figure 9 : Schéma d'un triglycéride; exemple avec deux entités saturées en rouge et une entité insaturée en vert et leurs positions indiquées (*sn*-1 ou 3, *sn*-2). [General structure of a triacylglycerol; example with two saturated moieties (red) and one unsaturated (green), with the position on the glycerol backbone indicated]

L'analyse de tels composés en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse pose un certain nombre de problèmes. Ils sont en effet très labiles, et leur ionisation par impact électronique classique (IE, 70 eV) conduit à une multitude de fragments qui ne permettent pas de remonter à une ou des structures. Le pic moléculaire n'est pas présent. Afin de pallier le manque d'informations en IE SM, des études en ionisation chimique ont été menées. Il s'est agi tout d'abord de les séparer sur une colonne apolaire classique de type diméthylpolysiloxane, et de les analyser en spectrométrie de masse à ionisation chimique négative avec de l'ammoniac {Evershed *et al.* 1990c}. Lors de l'ionisation, une ammonolyse en phase gazeuse a lieu, qui conduit à 3 types de fragments, sans fragmentation ultérieure. Les spectres de la trilinoléine (T_{54:6}), en impact électronique et en ionisation chimique sont présentés en Figure 10. Les spectres obtenus en ionisation chimique avec l'ammoniac sont relativement simples à interpréter. Il est cependant difficile de déduire les structures précises des triglycérides à partir des seuls fragments car le pic moléculaire n'est pas présent, d'autant plus que les isomères ne sont pas séparés en CPG. Pour chaque pic chromatographique, on peut donner la composition en acides gras. Le nombre d'atomes de carbone total, pour chaque pic chromatographique, est déduit des temps de rétention de composés de référence, ce qui pose problème à cause de la co-élution des triglycérides saturés et insaturés. Le risque de discrimination à l'ionisation avec [NH₂]⁺ est aussi non négligeable. Les triglycérides avec des résidus acides gras à chaîne courte présentent moins d'encombrement stérique et ont donc un meilleur taux d'ionisation.

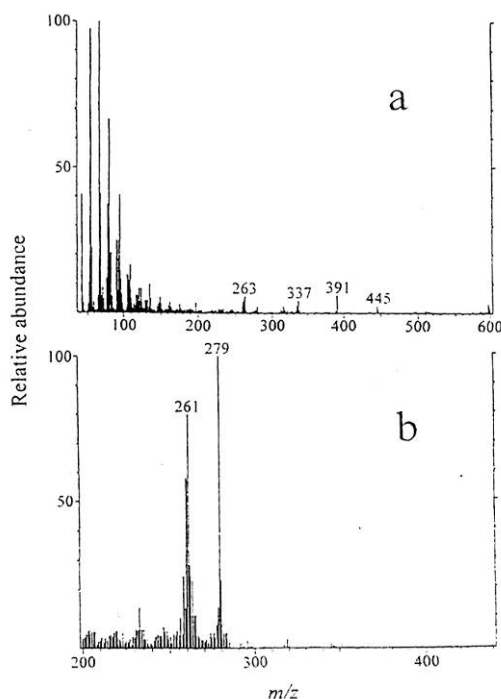


Figure 10 : Spectres de la trilinoléine en impact électronique (a) et en ionisation chimique négative avec NH_3 (b) {Evershed 1996}. [Mass spectra of trilinolein (a) with electronic impact ionisation and (b) with negative NH_3 chemical ionisation]

Une étude décrit l'utilisation de colonnes polarisables à haute température de type 65% phénylméthylpolysiloxane {Evershed 1996}. Les conditions en spectrométrie de masse sont les mêmes que celles décrites plus haut (ionisation chimique négative, ammoniac). La séparation des triglycérides est bien meilleure, avec notamment la séparation des saturés, mono-insaturés et di-insaturés (Figure 11). Pour les temps de rétention élevés, la séparation est basée sur le nombre de doubles liaisons présentes. Les saturés éluent avant les mono-insaturés qui eux-mêmes éluent avant les poly-insaturés. Pour les temps de rétention plus faibles, l'ordre d'élution est basé sur la taille des chaînes. La présence en *sn*-3 de résidu à chaîne courte permet une meilleure interaction entre les résidus phényle de la phase stationnaire grâce au moindre encombrement stérique. Ces composés sont donc mieux retenus que ceux avec des chaînes plus longues. Ainsi, pour les triglycérides à 42 atomes de carbone, le $\text{T}_{42:0}$ ($\text{C}_{18:0}/\text{C}_{18:0}/\text{C}_{6:0}$) élue après le $\text{T}_{42:1}$ ($\text{C}_{8:0}/\text{C}_{16:0}/\text{C}_{18:1}$ ou $\text{C}_{10:0}/\text{C}_{14:0}/\text{C}_{18:1}$) qui élue après le $\text{T}_{42:0}$ ($\text{C}_{14:0}/\text{C}_{14:0}/\text{C}_{14:0}$). Ces études ont été mises en œuvre sur des composés de référence, et sur un échantillon de beurre (Figure 11), mais n'ont pas encore été appliquées à des échantillons archéologiques.

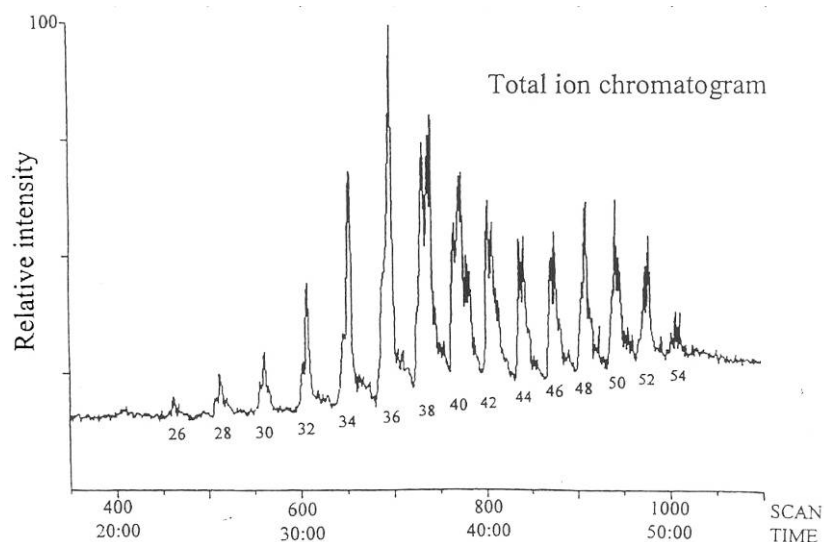


Figure 11 : Chromatogramme partiel d'un extrait lipidique de beurre, avec une colonne à phase polarisable, les numéros sous chaque pic correspondent au nombre d'atomes de carbone des triglycérides {Evershed 1996}. [Partial gas chromatogram of butter lipid extract, with a polarisable stationary phase; numbers under each peak relate to the number of carbon atoms of triacylglycerols]

L'utilisation de la chromatographie liquide haute performance et/ou de la spectrométrie de masse tandem est certainement mieux adaptée à ce type de composés.

Un essai de discrimination des graisses sous-cutanées/produits laitiers peut tout de même être fait à partir des distributions en triglycérides {Dudd *et al.* 1998}. Le profil en triglycérides d'un produit laitier non dégradé est relativement large, de T₂₆ à T₅₄. Lors de la dégradation, la quantité de triglycérides diminue très rapidement, de l'ordre de 95% en 10 jours, avec une inversion dans les proportions relatives en triglycérides de petites tailles (T₂₆-T₄₄) et en triglycérides de grandes tailles (T₄₆-T₅₄). L'hydrolyse commence par les triglycérides avec des acides gras à chaîne courte. Le profil des produits laitiers devient peu à peu indissociable de celui des graisses sous-cutanées (Figure 12).

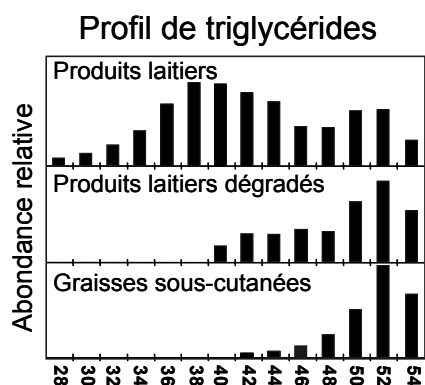


Figure 12 : Profils de triglycérides de produits laitiers et de graisses sous-cutanées frais, et de produits laitiers dégradés {Dudd & Evershed 1998; Dudd *et al.* 1998}. [Distribution profiles of triacylglycerols in fresh milk and adipose fat and in degraded dairy products]

Lorsque la distribution obtenue pour un échantillon archéologique contient des triglycérides plus petits que le T₄₂, alors il s'agit très probablement de résidus de produits laitiers. Dans le cas où la distribution s'étend de T₄₄ à T₅₄, alors il peut s'agir de produits laitiers très dégradés ou de graisses sous-cutanées. Ce critère a été utilisé dans un certain nombre de publications, mais est peu à peu remplacé par les critères obtenus par analyse isotopique, qui permettent de discriminer plus précisément les graisses de ruminants de celles de non ruminants ainsi que les produits laitiers {Dudd *et al.* 1999; Evershed *et al.* 1997a; Evershed *et al.* 2002; Regert *et al.* 1999}. Les mono- et diglycérides ne sont pas des marqueurs de dégradation très pertinents. Il a en effet été montré qu'ils ne s'accumulaient pas en quantité significative lors de l'hydrolyse des triglycérides. Une fois commencée, elle s'accélère en effet jusqu'à disparition des esters du glycérol {Dudd *et al.* 1998; Hita *et al.* 1996}.

Les acides gras, biomarqueurs de dégradation, peuvent aussi être utilisés en complément des autres biomarqueurs pour discriminer les graisses de ruminants de celles de non ruminants. La présence de certains acides gras, leur structure et leur distribution peuvent en effet être caractéristiques. Ainsi, la présence des 3 isomères des acides gras impairs C_{15:0} et C_{17:0}, à savoir ramifié iso et antéiso ou linéaire, ainsi que la présence d'une multitude d'isomères de position pour le C_{18:1} sont caractéristiques des graisses de ruminants (Figure 13). La présence des multiples isomères du C_{18:1} est due à la biohydrogénation des acides gras polyinsaturés C_{18:2} et C_{18:3} dans le rumen, qui n'a pas lieu chez les animaux monogastriques {Copley *et al.* 2003; Dudd & Evershed 1998; Evershed *et al.* 2002; Raclot 2003}. De même, la présence d'isomères des acides gras impairs est caractéristique des bactéries présentes dans le rumen.

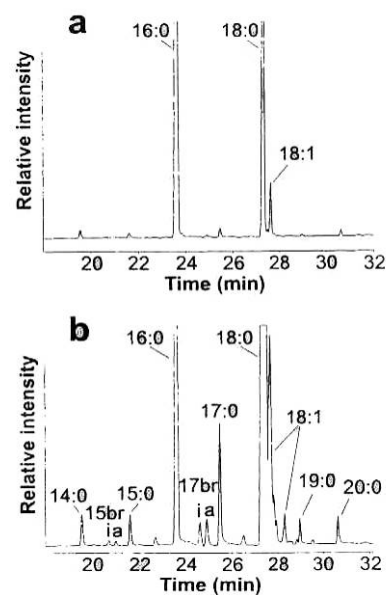


Figure 13 : Chromatogrammes partiels des acides gras méthylés d'extraits lipidiques provenant de tessons de plat à rôtir (a) et de lampes (b), caractéristiques de graisse de non ruminants (a) et de graisse de ruminants (b) {Mottram *et al.* 1999}. [Gas chromatograms of fatty acid methyl esters recovered from (a) a “dripping dish”; and (b) a lamp].

Ces données sont obtenues par analyse des FAMES pour la distribution en acides gras saturés, et par analyse des dérivés thiométhylés pour les acides gras insaturés. Si en plus la distribution en triglycérides est large, de T₄₀ à T₅₄, alors l'échantillon est probablement un produit laitier. Si par contre la distribution est plus resserrée, de T₄₄ à T₅₄, on ne peut pas conclure quant au type de graisse, mais juste conclure à la présence de graisse de ruminant. La présence de graisses de non ruminants est donc déduite de la présence d'un isomère majoritaire, en général l'isomère linéaire pour les acides gras insaturés et l'isomère Z, Δ 9-C_{18:1} (double liaison en position 9, *trans*), et d'une distribution en triglycérides assez resserrée, T₄₄-T₅₄, avec le T₄₄ et le T₄₆ présents en très faible quantité {Dudd *et al.* 1999; Evershed *et al.* 1997a; Evershed *et al.* 2002; Mottram *et al.* 1999}.

Un point qui porte à controverse est la formation d'acide palmitique par β -oxydation et réduction de l'acide C_{18:1}. Les essais de vieillissement de trioléine et de tristéarine dans des flacons remplis de terreau fongique, ont montré qu'il y avait apparition en quantités mineures non seulement de C_{16:0}, mais aussi de C_{14:0}, C_{15:0} et C_{17:0}, ramifiés, à partir de 57 jours seulement {Dudd *et al.* 1998}. Il semblerait donc que ces acides proviennent de la biomasse créée par les bactéries mortes, dont on sait qu'elles contiennent des acides impairs ramifiés. Si le C_{16:0} provenait de la dégradation du C_{18:1}, son apparition serait plus rapide, et serait majoritaire par rapport aux autres acides. Le problème de raccourcissement de chaîne n'est donc probablement pas à l'origine de l'acide palmitique retrouvé dans les céramiques, pas plus que la contamination d'origine bactérienne n'intervient de manière conséquente dans la composition en acides gras d'un échantillon archéologique.

Les marqueurs de dégradation anthropique que l'on retrouve le plus souvent pour les graisses animales sont des cétones, avec une longueur de chaîne de 31 à 35 atomes de carbone et la fonction cétone en position 15 ou 17 {Evershed *et al.* 1995b; Raven *et al.* 1997}. Elles ont été caractérisées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, et par corrélation de leur déplacement isotopique avec celui des acides gras présents dans le mélange, démontrant ainsi une relation précurseur/produit. Ce sont les produits de condensation à haute température des acides gras libérés par hydrolyse des triglycérides, en général C_{16:0} et C_{18:0} ou leurs homologues insaturés. En l'absence de traces d'incendie dans la couche d'où proviennent les tessons/résidus concernés, ce sont des marqueurs de dégradation anthropique, qui caractérisent une action de l'homme sur la céramique et la matière grasse d'origine. Dans ce cas il s'agit de la cuisson de graisses animales {Evershed *et al.* 1995b; Raven *et al.* 1997}.

Enfin, les derniers marqueurs des graisses animales détectés sont des marqueurs de dégradation liés à l'oxydation des biomarqueurs. Nous avons décrit plus haut le protocole

d'extraction et d'analyse de ces composés oxydés. Il s'agit des α,ω -diacides, des ω -hydroxyacides et des dihydroxyacides, qui proviennent de l'oxydation des doubles liaisons des acides gras insaturés, ils sont donc caractéristiques de leurs précurseurs {Copley *et al.* 2005e; Evershed *et al.* 2002; Regert *et al.* 1998a; Regert *et al.* 2003a}. Mis à part dans les contextes très arides, ces composés ne sont retrouvés que dans la fraction insoluble, après une hydrolyse alcaline. Ils sont en effet sensibles à la lixiviation par l'eau du sol, contrairement aux lipides non oxydés. Ils sont retrouvés dans les céramiques qui ont été mises en contexte d'oxydation, telles que les vases à cuire ou encore les lampes. Il s'agit des diacides C₇ à C₁₂, avec l'acide azélaïque C₉ majoritaire (Figure 14).

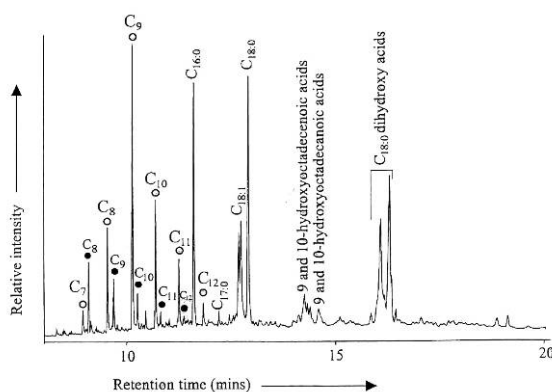


Figure 14 : Chromatogramme partiel de la fraction insoluble d'un vase à cuire du site néolithique de Chalain {Regert *et al.* 1998a}. [Partial gas chromatogram of the base treated residue (as methyl ester-trimethylsilyl ether derivatives) of a potsherd from a neolithic cooking vessel]

Ce diacide est caractéristique des acides insaturés avec une double liaison en C₉. Les ω -hydroxyacides sont formés à partir de l'oxydation et de la scission de la double liaison. La longueur de la chaîne renseigne donc sur la position de la double liaison. La position des fonctions hydroxyles dans les dihydroxyacides est elle aussi caractéristique de la position de la double liaison de l'acide insaturé précurseur. Ainsi, plus il y a de diacides, d'hydroxyacides et d'isomères de dihydroxyacides, plus les acides gras insaturés présentent d'isomères de position. C'est un moyen de corroborer les données trouvées avec la dérivation au DMDS des composés insaturés. Dans le cas où les insaturés sont mal conservés, cela permet d'obtenir des informations sur l'état d'isomérisation de ces derniers et donc d'avoir un critère supplémentaire pour discriminer les graisses de ruminants de celles de non ruminants.

Dans le cas d'analyse par chromatographie en phase gazeuse, couplée ou non à la spectrométrie de masse, un certain nombre de critères peuvent être mis en place, pour identifier les graisses animales et dans les cas les mieux préservés, discriminer les graisses de ruminants de

celles de non ruminants, et parfois des produits laitiers. Ceci n'est possible qu'avec l'ensemble des biomarqueurs décrits ci-dessus (Tableau 4).

Biomarqueurs	Produits laitiers	Graisses de ruminants	Graisses de non ruminants
Acides gras saturés linéaires	C _{12:0} -C _{20:0}	C _{14:0} -C _{18:0}	C _{14:0} -C _{18:0}
Acides gras saturés ramifiés	C _{15:0} et C _{17:0} , parfois C _{19:0} ; plusieurs isomères	C _{15:0} et C _{17:0} ; plusieurs isomères	C _{15:0} et C _{17:0} , un seul isomère
Acides gras insaturés	C _{18:1} , différents isomères, parfois C _{16:1}	C _{18:1} , différents isomères, parfois C _{16:1}	Z, Δ 9-C18:1
Stérols	Cholestérol, cholestanol		
Triglycérides	T ₄₀ -T ₅₄	T ₄₄ -T ₅₄	T ₄₄ -T ₅₄ , T ₄₄ et T ₄₆ en faible quantité
Cétones 15-K ₃₁ , 15-K ₃₃ , 17-K ₃₅	Oui: produit chauffé à haute température		
	Non: produit non chauffé ou chauffé à basse température		
Diacides	C ₇ à C ₁₂		
	C ₉ majoritaire, mais présence conséquente des autres diacides	C ₉ très largement majoritaire	
ω -hydroxyacides	C ₇ à C ₁₂ , C ₉ majoritaire		C ₉ très largement majoritaire
Dihydroxyacides	9,10-dihydroxy majoritaire, mais présence conséquente des autres isomères		9,10-dihydroxy très largement majoritaire

Tableau 4 : Biomarqueurs et marqueurs de dégradation des graisses animales, identifiés dans les céramiques archéologiques par HT CPG et HT CPG/SM. [Biomarkers and degradation markers of animal fats identified in archaeological ceramics by HT GC and HT GC/MS]

L'utilisation d'un seul de ces biomarqueurs, ou d'un seul type de biomarqueurs conduit à des conclusions qui peuvent être erronées. C'est cependant encore le cas dans certaines publications, qui ne mettent en avant que les données obtenues sur les acides gras. Or ces derniers sont très sensibles à la dégradation, notamment par oxydation et sont également très sensibles aux pollutions. Se baser uniquement sur leur distribution et composition n'est donc pas suffisamment fiable. Certains auteurs utilisent le rapport de l'acide palmitique sur l'acide stéarique. Or ces deux acides gras sont parmi les plus répandus dans la nature, et peuvent être des contaminations de la biomasse du sédiment. Ce rapport peut également évoluer en fonction des conditions de dégradation, et n'est donc pas caractéristique des matières grasses {Bourgeois & Gouin 1995; Maier *et al.* 2005; Sauter *et al.* 2001; Sauter *et al.* 2003}.

Le référentiel aussi est essentiel. Il est en effet très difficile, pour ne pas dire impossible, d'identifier l'espèce à laquelle appartient la matière grasse à partir des seules données chromatographiques. Les biomarqueurs des graisses animales sont en effet ubiquistes, présents dans toutes les graisses animales mais également dans les huiles végétales. A ceci s'ajoute le fait que les distributions en acides gras ne sont pas suffisamment caractéristiques d'un type de matériau pour pouvoir conclure à une origine spécifique. Des études menées en Amérique, sur un très large référentiel de produits alimentaires, végétaux et animaux, semblent un peu plus fiables

{Malainey *et al.* 1999a, 1999b, 1999c}. En effet, non seulement les auteurs ont identifié les compositions en acides gras des produits natifs, mais également des produits dégradés, et ont traité les données obtenues statistiquement. Il est cependant difficile de faire la part des choses, car ce sont des aliments que l'on ne trouve pas en Europe, et pour lesquels il n'existe pas de point de comparaison.

Un cas particulier peut se présenter lorsque les échantillons proviennent de sites côtiers. En effet, la composition des matières grasses marines, huiles ou graisses de poisson, est relativement différente de celle des animaux terrestres. Ainsi, des acides isopréniques ont été retrouvés dans des céramiques de deux sites côtiers, l'un en Afrique du Sud, Kasteelberg, l'autre au Brésil, Santa Catarina {Copley *et al.* 2004a; Hansel *et al.* 2004}. Ce sont les acides phytanique (acide tetraméthylhexadécanoïque) et triméthyltridécanoïque. Des acides ω -(*o*-alkylphényl)alkanoïques ont aussi été détectés, dans les mêmes céramiques (Figure 15).

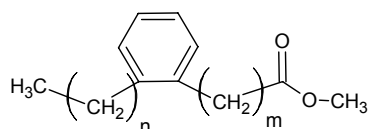


Figure 15 : Acide ω -(*o*-alkylphényl)alkanoïque, son acide triinsaturé précurseur a $x = n + m + 4$ atomes de carbone. [ω -(*o*-alkylphenyl)alkanoic acid, its precursor triunsaturated fatty acid is composed of $x = n + m + 4$ carbon atoms]

Ils sont caractéristiques de la dégradation des acides triinsaturés. Leur formation à haute température (lors de la cuisson par exemple) est catalysée par l'argile de la céramique. La présence de $C_{16:3}$, $C_{18:3}$ et $C_{20:3}$, et de leur produits de dégradation, est caractéristique des graisses d'origine marine. Les acides polyinsaturés à très longue chaîne, C_{22} ou C_{24} sont caractéristiques de certains animaux marins {Malainey *et al.* 1999c}. La présence majoritaire de $C_{18:3}$, et de traces de $C_{16:3}$ ainsi que de leurs produits de dégradation est quant à elle caractéristique de certaines huiles végétales, comme nous allons le voir.

C.1.2.2. Les huiles végétales

Les huiles végétales ont elles aussi pu remplir un certain nombre de fonctions. Pour les huiles comestibles telles que l'huile d'olive par exemple, elles ont certainement eu une fonction alimentaire {Colombini *et al.* 2004b; Condamin *et al.* 1976; Condamin & Formenti 1978; Dudd *et al.* 1998; Regert *et al.* 2003a}. Mais elles peuvent aussi avoir été utilisées dans l'éclairage {Kimpe *et al.* 2001}. Les huiles non comestibles ont quant à elle pu avoir des fonctions médicinales,

cosmétiques ou encore techniques {Colombini *et al.* 2005b; Copley *et al.* 2005e}. On peut également imaginer que les propriétés siccatives de certaines huiles telle que l'huile de lin ont été utilisées {Colombini *et al.* 1999}. Toutes ces fonctions ne sont pas forcément identifiables, mais peuvent parfois être déduites des céramiques dans lesquelles les huiles sont retrouvées (jarre, amphore ou lampe) ou encore grâce au contexte dans lequel ces céramiques ont été retrouvées (domestique ou public).

On a vu dans le premier paragraphe que l'huile d'olive (fruit de l'arbre *Olea europaea*, famille des Oleaceae) a, au départ, été caractérisée par la présence d'acide oléique, majoritaire, dans des amphores {Condamin *et al.* 1976; Condamin & Formenti 1978}. On sait désormais que cela n'est pas suffisant pour l'identifier, l'acide oléique étant un acide gras ubiquiste des huiles végétales. Les triglycérides sont les biomarqueurs des huiles végétales, de même que des graisses animales. Cependant, dans le cas des huiles, ils sont beaucoup plus insaturés, et sont donc plus sensibles aux différentes dégradations, particulièrement l'oxydation {Dudd *et al.* 1998}. Il est extrêmement rare d'en identifier dans les extraits de tessons ou résidus organiques, et encore plus rare de réussir à les détecter en chromatographie en phase gazeuse {Garnier 2003}. C'est pourquoi l'identification d'huiles végétales par chromatographie en phase gazeuse se base presque exclusivement sur l'identification des phytostérols et de certains acides gras. La présence de β -sitostérol, de stigmastérol et de campestérol est caractéristique des végétaux {Evershed *et al.* 1992a}. Il faut cependant faire attention à ce que ces stérols ne proviennent pas d'une pollution extérieure. Les stérols sont présents à moins de 1 % dans les tissus des plantes. Si la concentration dans un extrait lipidique est très supérieure à cela, alors il s'agit probablement d'une pollution par les végétaux qui se trouvent dans le sédiment.

Il y a peu de publications qui traitent des huiles végétales, certainement parce qu'il est très difficile de discriminer les différentes espèces. Elles sont composées majoritairement d'acides gras polyinsaturés, avec les C₁₆ et les C₁₈ majoritaires. Il est possible de faire des regroupements de végétaux présentant le même type de composition, mais il est difficile d'aller plus loin {Malainey *et al.* 1999c}. Cependant, quelques acides sont très caractéristiques d'huiles de certaines plantes. C'est le cas de l'acide ricinoléique, 12-hydroxy- Δ^9 -C_{18:1}, caractéristique de l'huile de ricin (fruit de l'arbrisseau *Ricinus communis*, de la famille des Euphorbiaceae), des acides érucique, Δ^{13} -C_{22:0} et godoïque, Δ^{15} -C_{24:0} qui sont caractéristiques des huiles de graines de la famille des Brassicaceae (aussi appelée famille des Crucifères) comme l'huile de radis (*Raphanus sativus*) {Colombini *et al.* 2005b; Copley *et al.* 2005e} (Figure 16). Dans les céramiques ayant servi de lampe, la présence de composés oxydés, diacides ou hydroxyacides est fortement favorisée du fait des conditions oxydantes dues au chauffage et à la combustion. Cependant, ces composés oxydés ne seront pas forcément présents dans la fraction lipidique extraite, et il faut parfois recourir à

l'analyse de la fraction insoluble afin de les mettre en évidence. Seuls les échantillons provenant de sites très arides, tel que Qasr Ibrîm dans le sud de l'Égypte, sont susceptibles de conserver leurs composés oxydés dans la fraction lipidique soluble {Copley *et al.* 2005e}. Ces composés oxydés sont plus ou moins caractéristiques de leurs précurseurs. Les diacides, formés par le clivage de la double liaison, reflètent les différents isomères de position des doubles liaisons. Les hydroxyacides vicinaux comme l'acide 9,10-dihydroxyoctadécanoïque, sont eux aussi caractéristiques de la position de la double liaison dans l'acide gras insaturés précurseurs. Mais la stéréochimie thréo ou erythro n'est pas caractéristique de la stéréochimie des doubles liaisons *cis* ou *trans* respectivement, car les phénomènes d'oxydation sont le plus souvent accompagnés de stéréomutation. Si ces deux types de produits oxydés reflètent donc la composition en acides gras initiale, ils ne sont pas plus caractéristiques que ces derniers, sauf dans les cas bien particuliers décrits plus haut, de l'huile de ricin et des huiles de Brassicaceae {Colombini *et al.* 2004b; Colombini *et al.* 2005b; Copley *et al.* 2005e} (Figure 16).

En règle générale, en présence de phytostérols et de composés insaturés en C₁₆ et C₁₈, avec, de plus, une plus grande quantité d'acide palmitique par rapport à l'acide stéarique, on peut conclure en la présence d'une huile végétale. {Colombini *et al.* 2004b; Dudd *et al.* 1998; Evershed 2000; Garnier 2003; Regert *et al.* 2003a}.

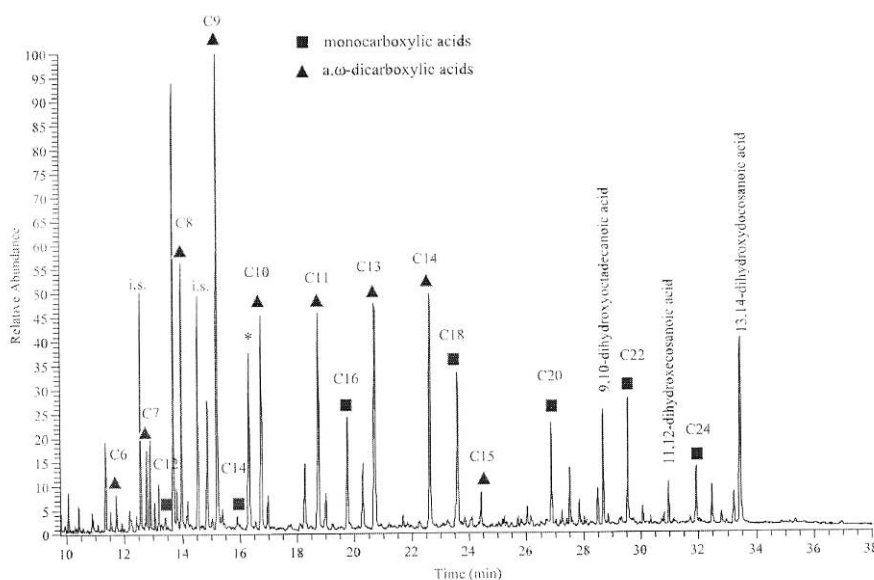


Figure 16 : Chromatogramme de la fraction acide de l'échantillon 307 caractérisé comme de l'huile de graines de la famille des Brassicaceae (Crucifères) {Colombini *et al.* 2004b}. [Total ion chromatogram of the acidic fraction of the sample 307; i.s., internal standards; *, phthalate; DDA, didehydroabiétique acid; DA, dehydroabiétique acid; 7ODA, 7-oxo-dehydroabiétique acid; OA, 7-oxo-abiétique acid; 15Hy7ODA, 15-hydroxy-7-oxo-dehydroabiétique acid; 15HyDA, 15-hydroxy-dehydroabiétique acid]

L'autre type de composés végétaux que l'on peut retrouver dans les céramiques archéologiques est de type cireux.

C.1.2.3. Les cires végétales

Les cires végétales qui ont été retrouvées dans des céramiques, en l'état actuel des recherches la cire des feuilles de chou (*Brassica oleracea*, variété *oleracea* pour le chou sauvage, famille des Brassicaceae), sont considérées comme caractéristiques de bouillies de végétaux. Leur distribution dans la céramique ainsi que les traces de cuisson semblent montrer leur fonction alimentaire et la fonction de cuisson des céramiques associées {Charters *et al.* 1993b; Charters *et al.* 1997; Evershed *et al.* 1991; Evershed *et al.* 1992a; Evershed *et al.* 1995a}.

Au début des recherches sur les composés organiques amorphes par HT CPG et HT CPG/SM, des molécules très différentes des biomarqueurs et marqueurs de dégradation des graisses animales, habituellement trouvées, ont été détectées dans un grand nombre de céramiques domestiques du site médiéval de West Cotton, dans le Northamptonshire, Royaume Uni {Charters *et al.* 1997; Evershed *et al.* 1990a; Evershed *et al.* 1991; Evershed *et al.* 1992a; Evershed *et al.* 1995a; Evershed *et al.* 1999}. Il s'agit d'une série "homologue", composée d'hydrocarbures de même longueur de chaîne mais avec des fonctions différentes. Ils ont été identifiés par HT CPG/SM comme du nonacosane, C₂₉, de la nonacosan-15-one, 15-K₂₉, et du nonacosan-15-ol, 15-C₂₉OH. Ce sont des biomarqueurs des cires de feuilles de choux, dont les proportions relatives sont similaires à celles des composés archéologiques. D'autres plantes dont les feuilles sont connues pour être consommées ont été analysées, notamment le poireau commun (*Allium porrum*, famille des Alliaceae). La cire des feuilles de poireaux est composée principalement de l'hentricontan-16-one, 16-K₃₁. Cette espèce n'a cependant jamais été retrouvée dans des échantillons archéologiques {Evershed *et al.* 1992a}.

Il ne faut pas confondre ces composés avec les cétones que l'on peut retrouver dans des céramiques ayant servi à cuire des graisses animales. Ce sont à la fois la position de la fonction cétone, et la distribution et les proportions des cétones qui sont caractéristiques de cires végétales ou de graisses animales chauffées. La différenciation a été clairement établie par leur analyse en chromatographie couplée à un spectromètre de masse de rapport isotopique, ce que nous verrons dans la partie qui traite des analyses isotopiques. L'autre type de cire que l'on rencontre dans les céramiques archéologiques est bien évidemment la cire d'abeille.

C.1.2.4. La cire d'abeille

La cire d'abeille est une matière grasse animale qui possède des propriétés particulièrement hydrophobes. Elle est extrêmement bien conservée à travers le temps, quel que soit le contexte archéologique dans lequel elle est retrouvée. Si des témoignages picturaux de la collecte des produits de la ruche existent dès le Néolithique, la majeure partie de nos connaissances datent de l'antiquité, et se basent sur des documents écrits ou picturaux {Charters *et al.* 1995; Regert *et al.* 2001a}. Ainsi de l'utilisation de la cire d'abeille pour l'imperméabilisation de céramiques, dans la fabrication d'onguents et/ou de cosmétiques, dans les produits d'éclairage ou encore sur des tablettes en bois comme support d'écriture réutilisable. Elle a également pu servir de plastifiant dans différentes recettes d'adhésifs par exemple {Colombini *et al.* 2003; Regert *et al.* 2003b; Regert 2004}. Le miel a probablement été utilisé dès le début de l'exploitation des produits de la ruche, en tant qu'agent sucrant/adoucissant, en médecine ou encore comme offrande culturelle (Figure 17).

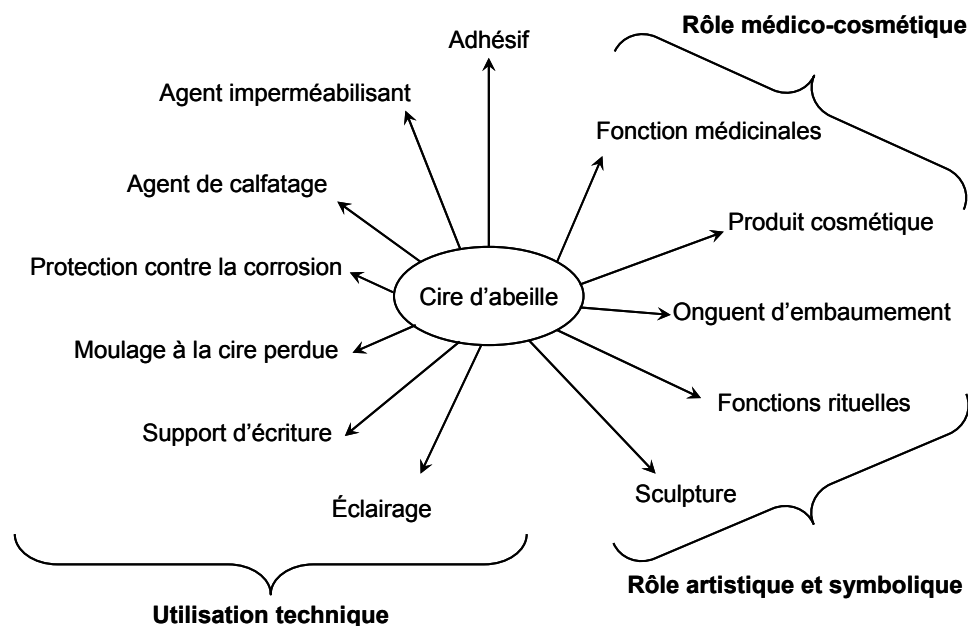


Figure 17 : Les différentes fonctions de la cire d'abeille depuis la préhistoire, d'après Regert *et al.* 2001 et Regert 2006. [The various functions of beeswax through time]

Les biomarqueurs de la cire d'abeille sont désormais bien connus. Il s'agit principalement d'esters palmitiques de 40 à 52 atomes de carbone (E_{40} - E_{52} , max E_{46}), d'acides gras à longue chaîne $C_{22:0}$ à $C_{30:0}$ (max $C_{24:0}$), et d'alcane linéaires impairs C_{21} à C_{33} (max C_{27}). Les proportions de ces différents constituants diffèrent suivant les cires analysées {Heron *et al.* 1994; Regert *et al.* 2001a}. La présence d'alcènes C_{21} à C_{33} est aussi notée, mais ce sont des composés très peu

stables, qu'on ne retrouve pas dans les échantillons archéologiques, et rarement dans les échantillons de cire moderne {Garnier *et al.* 2002}. Grâce à la mise en œuvre de techniques de spectrométrie de masse avec une ionisation par électrospray, les biomarqueurs les plus lourds de la cire d'abeille, qui étaient en partie détectés en CPG sans être toujours caractérisés, ont pu être identifiés avec certitude {Garnier *et al.* 2002}. Ainsi, en plus des esters palmitiques, des monoesters insaturés, esters palmitoléiques et oléiques ont pu être mis en évidence. De la même manière, des esters monohydroxylés et des diesters D₅₆-D₆₆, hydroxylés ou non, ont également été identifiés (Figure 18).

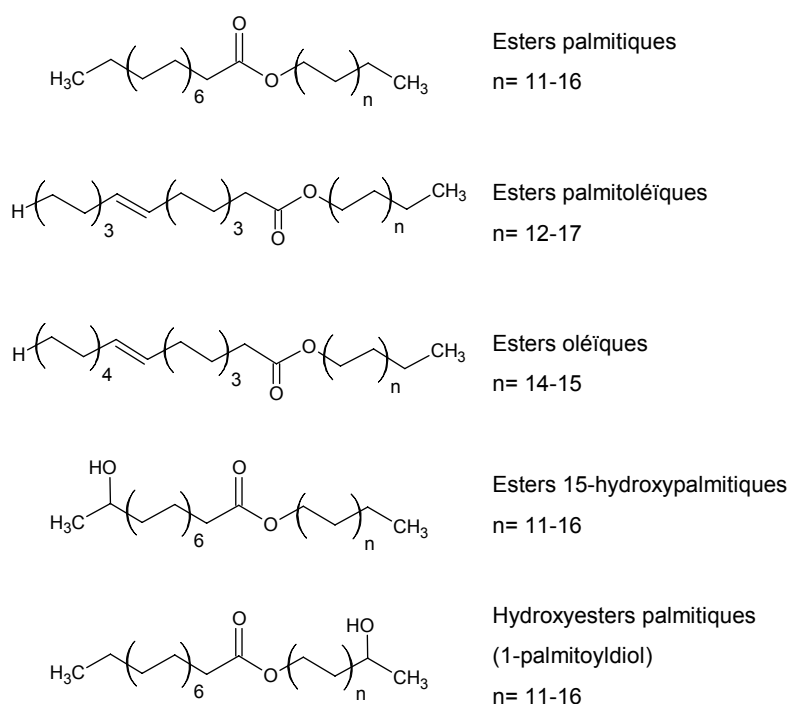


Figure 18 : Principaux biomarqueurs esters de la cire d'abeille, d'après Garnier *et al.* 2002. [The major biomarkers of beeswax]

L'étude de tessons et de résidus amorphes archéologiques ainsi que la mise en place de protocoles de vieillissement ont permis une meilleure connaissance des marqueurs de dégradation de la cire d'abeille. Ceux-ci sont principalement liés à l'hydrolyse des esters. Il s'agit d'une série homologue d'alcools terminaux linéaires, à nombre pair d'atomes de carbone, C₂₄OH à C₃₄OH. L'acide palmitique est également un marqueur de dégradation de la cire d'abeille {Charters *et al.* 1995; Evershed *et al.* 1997c; Evershed *et al.* 2003; Garnier *et al.* 2002; Heron *et al.* 1994; Kimpe *et al.* 2002; Regert *et al.* 1999; Regert *et al.* 2001a}. La distribution en esters palmitique reste stable, même si il peut y avoir une diminution de la proportion des plus petits esters. L'hydrolyse des esters, de la même manière que l'hydrolyse des triglycérides, est dépendante de la taille des chaînes à hydrolyser, et commence donc préférentiellement avec les plus courtes. Enfin, on note

dans certains cas l'absence d'alcanes, ou la modification de leur profil de distribution, alors qu'ils sont la deuxième fraction la plus importante de la cire d'abeille. Regert *et al.* ont montré que leur absence était due à la sublimation de ces composés, soit naturelle dans le cas de contexte chaud, soit anthropique quand la cire a été utilisée comme agent d'éclairage ou qu'elle a été chauffée intentionnellement {Charters *et al.* 1995; Heron *et al.* 1994; Regert *et al.* 2001a}.

C.1.3. les limites de la chromatographie en phase gazeuse

Grâce à la chromatographie en phase gazeuse haute température, couplée à la spectrométrie de masse, un certain nombre de biomarqueurs des matières grasses peuvent être détectés et identifiés. Il est ainsi possible de discriminer les matières grasses animales d'origine terrestre, les matières grasses animales d'origine marine, les huiles végétales, les cires végétales et la cire d'abeille. C'est pour les graisses animales que cette technique montre ses limites. En effet, s'il est parfois possible de distinguer les graisses de ruminants de celles de non ruminants, notamment grâce à la composition en acides gras insaturés et ramifiés, l'identification est dépendante de l'état de conservation de la matière grasse. Il en est de même pour les produits laitiers, dont la présence peut être déduite de la distribution en triglycérides lorsque celle-ci est suffisamment bien conservée. Dans le cas d'une distribution moyenne, de T₄₄ à T₅₄, l'identification est très difficile. Ce type de distribution peut être caractéristique d'une graisse sous-cutanée, ou bien d'un produit laitier très dégradé.

Aucune identification de l'espèce d'origine n'est possible pour la plupart des matières grasses à partir des seules données obtenues en chromatographie en phase gazeuse. Seules quelques huiles sont caractérisées par des acides gras très particuliers, qui permettent de remonter à l'espèce. Il faut lire avec beaucoup de précaution les publications qui, à partir des seuls acides gras, donnent une interprétation au niveau spécifique, particulièrement dans le cas des produits laitiers. Leur composition en acides gras est dépendante de trop nombreux facteurs pour pouvoir être utilisée dans leur assignation. Leur composition en triglycérides, déjà plus caractéristique, n'est pas suffisamment bien détaillée en HT CPG et HT CPG/SM pour permettre une corrélation correcte.

C'est à partir de ces différents problèmes que d'autres techniques ont été développées pour l'analyse des matériaux organiques amorphes, notamment l'analyse isotopique spécifique, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse et les analyses immunologiques.

C.2. Les analyses isotopiques

Une autre approche, explorée depuis les années 70, consiste à mesurer les rapports des isotopes stables du carbone ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) et de l'azote ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) de tissus animaux. Il a en effet été montré que ces rapports, ou déplacements isotopiques $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$, reflètent, pour les tissus animaux, la composition isotopique du régime alimentaire {Evershed *et al.* 1994}. Cette approche a été menée tout d'abord sur le collagène des os, qui à partir d'expérimentations sur des animaux dont le régime alimentaire était contrôlé, a montré une bonne corrélation entre le régime alimentaire et les rapports isotopiques mesurés {Ambrose & Krigbaum 2003; DeNiro & Epstein 1978; DeNiro & Hastorf 1985; Jim *et al.* 2004; Milner *et al.* 2004; Stott *et al.* 1997a; Stott *et al.* 1997b}. L'étude des rapports des isotopes stables de la dentine des dents d'animaux a également été développée en parallèle des progrès réalisés dans l'étude du collagène des os pour la reconstruction des habitudes alimentaires des populations du passé {Ambrose & Krigbaum 2003; Balasse *et al.* 1997; Bocherens 1997; Lee-Thorp & Sponheimer 2003}. Nous ne développerons pas les études isotopiques menées sur les ossements et la reconstruction des régimes alimentaires des populations du passé, sauf dans certains cas particuliers, mais c'est à partir de ces dernières et des données connues sur le fractionnement isotopique que se sont développées les études sur les résidus organiques retrouvés dans des céramiques. Il existe deux méthodes de travail pour les études isotopiques. La première est basée sur l'analyse du fractionnement isotopique global d'un échantillon (*bulk* $\delta^{13}\text{C}$). C'est celle-ci qui a été développée la première et qui continue d'être utilisée pour les analyses d'ossement par exemple {Copley *et al.* 2004b; Craig *et al.* 2005b; DeNiro & Epstein 1978; DeNiro & Hastorf 1985; Milner *et al.* 2004} mais également dans certaines études sur les résidus organiques retrouvés dans des céramiques {Hart *et al.* 2007; Hastorf & DeNiro 1985; Marino & DeNiro 1987; Morton & Schwarcz 2004; Spangenberg 2004; Spangenberg *et al.* 2006}. La deuxième méthode d'analyse isotopique consiste en l'analyse du déplacement isotopique de composés spécifiques, comme les acides gras ou d'autres molécules suivant le type d'échantillon (alcanes, cétones, cholestérol, alcools, esters de la cire...). Il s'agit d'une méthode mettant en jeu le couplage chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse isotopique, via une interface de combustion dont l'acronyme courant est GC-C-IRMS (*Gas Chromatography - Combustion - Isotope Ratio Mass Spectrometry*) {Meier-Augenstein 2002}. Elle est appliquée à des échantillons archéologiques pour la première fois par Evershed et col. dans le courant des années 90 {Evershed *et al.* 1994}. Seules 3 équipes sont de nos jours équipées pour les analyses isotopiques spécifiques, dédiées aux résidus organiques archéologiques {Craig *et al.* 2004; Evershed *et al.* 1994; Spangenberg *et al.* 2006}. C'est une technique qui exige un certain nombre de précautions, qui sont bien décrites par Meier-Augenstein dans sa revue

bibliographique sur l'analyse des acides gras par GC-C-IRMS {Meier-Augenstein 2002}. Brièvement, le principal souci est le fractionnement isotopique qui peut intervenir lors de la préparation des échantillons. Lorsqu'il n'est pas possible d'éviter certaines étapes induisant un fractionnement isotopiques, alors l'utilisation de standard, en quantité similaire au composé d'intérêt et avec une composition isotopique proche, est nécessaire. L'étape de dérivation peut également poser problème, et doit être choisie de manière à minimiser le fractionnement isotopique {Rieley 1994}. Certaines dérivations comme l'acétylation ou la dérivation au diazométhane sont déconseillées. De plus, pendant la durée d'une étude, les réactifs doivent avoir la même signature isotopique pour éviter des déplacements isotopiques qui ne seraient pas caractéristiques. Enfin, la sensibilité de la méthode repose sur la pureté des pics chromatographiques et leur résolution, et constitue donc l'étape limitante. Il est nécessaire de mettre au point la partie chromatographique avec beaucoup de soin {Evershed *et al.* 1994; Meier-Augenstein 2002}.

Les études des rapports isotopiques peuvent être classées en deux types, d'une part celles où les analyses isotopiques ont permis de corroborer des résultats obtenus en HT CPG et HT CPG/SM, et d'autre part celles ayant permis de mettre au point de nouveaux critères, notamment pour la différenciation des graisses animales de ruminants et de non ruminants et l'identification des produits laitiers. Nous ferons également un point sur les études menées sur l'utilisation du maïs dans différentes traditions amérindiennes.

C.2.1. Prérequis

L'analyse isotopique est basée sur la mesure des rapports des isotopes stables du carbone et de l'azote, par spectrométrie de masse. On calcule ainsi le déplacement isotopique $\delta^{13}\text{C}$ ou $\delta^{15}\text{N}$ par rapport à un standard, qui correspond à :

$$\delta = \left(\frac{R_{éch} - R_{std}}{R_{std}} \right) \times 1000 \text{ avec } R^{13}\text{C} = \left[\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right] \text{ ou } R^{15}\text{N} = \left[\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}} \right]$$

Le standard (noté std) utilisé pour l'azote est le diazote de l'air. Le standard utilisé pour le carbone est le Pee Dee Belemnite, qui est un carbonate de calcium provenant d'un rostre fossile de bélemnite, céphalopode apparenté à la seiche datant du crétacé (-145.5 à -65.5 Ma), extrait de la formation géologique Pee Dee de Caroline du Sud (USA). Ce standard primaire est épuisé depuis longtemps. D'autres matériaux certifiés servent à la calibration des appareils mais les mesures sont toujours exprimées par rapport au PDB. On note alors V-PDB (Vienna-PDB) pour préciser

cette nuance. Le PDB étant très riche en ^{13}C ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = 0.01124$), la plupart des produits organiques en abondance naturelle auront des déviations isotopiques négatives (Figure 19) {O'Leary 1981}.

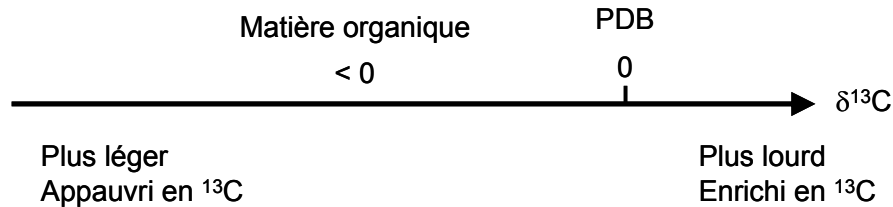


Figure 19 : Echelle du déplacement isotopique du carbone en fonction du standard PD Belemnite, et vocabulaire associé {O'Leary 1981}. [Carbon isotopic scale and vocabulary as a function of the PD Belemnite standard]

C.2.1.1. Le fractionnement isotopique des plantes

Les différences de réactivité des isotopes d'un élément se traduisent par un fractionnement isotopique, relatif à la fixation/assimilation des matières premières et aux réactions qui ont lieu dans l'organisme (biosynthèses) {DeNiro & Epstein 1978; DeNiro & Hastorf 1985; Evershed *et al.* 1994; Hastorf & DeNiro 1985; Meier-Augenstein 2002; O'Leary 1981; Rieley 1994; Santrock *et al.* 1985}. Nous ne rentrerons pas dans les détails des mécanismes de fractionnement, mais décrivons leur effet sur les plantes et sur les tissus des espèces les consommant.

En fonction de la manière dont les plantes fixent le CO_2 atmosphérique, le fractionnement isotopique du carbone sera plus ou moins important. Les plantes dites en C_3 , qui regroupent la plupart de plantes que l'on retrouve en milieu tempéré, fixent le CO_2 gazeux par carboxylation de la ribulose biphosphate (cycle de Calvin). Elles montrent une plus grande discrimination isotopique à cause de l'étape de carboxylation. Elles vont être enrichies en l'isotope le plus léger et avoir un $\delta^{13}\text{C}$ compris entre -34 ‰ et -22 ‰ (équivalent à une déplétion en ^{13}C) {O'Leary 1981}.

Les plantes en C_4 utilisent le cycle de Hatch-Stack pour fixer le CO_2 , par carboxylation de la phosphoenolpyruvate, avec un intermédiaire à 4 atomes de carbone. Le transfert de ce composé carboxylé de l'extérieur vers l'intérieur de la plante est suivi d'une décarboxylation puis d'une refixation de la ribulose biphosphate. Elles sont enrichies en ^{13}C par rapport aux plantes en C_3 et ont un $\delta^{13}\text{C}$ plus élevé, de -16 ‰ à -9 ‰. Il s'agit des plantes et herbes tropicales, comme le maïs, le millet et le sorgho. Ces valeurs peuvent être influencées par la température, la concentration en CO_2 et l'intensité lumineuse. La fraction lipidique est plus légère que les autres fractions de la plante. Mais ces variations ne conduisent jamais à un renversement des valeurs {O'Leary 1981}.

Il existe une dernière voie métabolique pour fixer le dioxyde de carbone gazeux, appelée CAM (*Crassulacean Acid Metabolism*), utilisée par les plantes poussant en milieu désertique telles que les cactus ou encore les ananas. Ces plantes fixent le CO₂ atmosphérique directement comme les plantes en C₃ pendant la journée (~ -27 ‰) et suivant un schéma se rapprochant des plantes en C₄ pendant la nuit (~ -13 ‰). Il s'agit d'un mécanisme en plusieurs étapes, séparées dans le temps. La phosphoenolpyruvate est carboxylée puis réduite en malate la nuit. Pendant la journée, le malate est décarboxylé et le CO₂ ainsi formé est fixé par la ribulose biphosphate. Leur fractionnement isotopique peut varier de -33 ‰ à -11 ‰ {O'Leary 1981}. L'effet de la température est important, car elle peut être la cause du changement de la balance de fixation de jour/fixation de nuit.

Pour ce qui est du rapport isotopique de l'azote, les plantes de type légumineuses ainsi que les algues bleues et vertes fixent l'azote directement à partir de l'air, sans fractionnement isotopique, ou très peu, et ont donc un déplacement isotopique nul (le standard utilisé est le diazote de l'air). Les autres plantes fixent le N₂ à partir du sol et ont un $\delta^{15}\text{N}$ variant de +2 à +4 ‰. Tout le long de la chaîne alimentaire, à chaque saut trophique correspond une augmentation de +2 à +4 ‰ en ^{15}N {Marino & DeNiro 1987; O'Leary 1981; Spangenberg 2004; Spangenberg *et al.* 2006}. Ainsi, pour schématiser le mécanisme, si une plante a un $\delta^{15}\text{N}$ de +3 ‰, l'herbivore qui la mange a un $\delta^{15}\text{N}$ de +6 ‰ et le carnivore qui à son tour le mange aura un déplacement isotopique en ^{15}N de +9 ‰ environ.

C.2.1.2. Etude de la corrélation entre le $\delta^{13}\text{C}$ du régime alimentaire et les tissus animaux

Un certain nombre d'études ont montré qu'entre les plantes et les tissus du consommateur, un décalage de +1 à +2 ‰ a lieu pour le fractionnement isotopique du carbone {Copley *et al.* 2004b; DeNiro & Epstein 1978; O'Leary 1981; Spangenberg 2004; Stott *et al.* 1997a; Woodbury *et al.* 1995}. C'est ce que nous allons présenter ci-dessous.

Afin de montrer une corrélation isotopique entre le régime alimentaire des animaux et les tissus de ces animaux, une étude a été menée sur 13 espèces d'animaux, depuis la mouche jusqu'à la souris {DeNiro & Epstein 1978}. Le rapport isotopique $\delta^{13}\text{C}$ a été mesuré pour le carbonate de calcium (coquille des escargots), pour le carbone organique ainsi que pour le carbone respiré et expiré. Le carbone animal global est enrichi en ^{13}C par rapport au carbone alimentaire. Le $\delta^{13}\text{C}$ d'individus distincts d'une même espèce, élevés avec le même régime alimentaire peut varier, mais deux espèces élevées avec le même régime alimentaire ont des valeurs similaires de $\Delta^{13}\text{C} = \delta^{13}\text{C}(\text{animal}) - \delta^{13}\text{C}(\text{régime alimentaire})$. De même, les valeurs de $\Delta^{13}\text{C}$ pour des individus d'une

même espèce élevés avec différents régimes alimentaires sont similaires (<1 ‰). Ce sont des résultats globaux, pour l'ensemble des animaux. Pour les souris, la détermination du $\delta^{13}\text{C}$ de différents tissus permet de mieux estimer le $\delta^{13}\text{C}$ du régime alimentaire que la mesure du $\delta^{13}\text{C}$ d'un seul type de tissu (Figure 20).

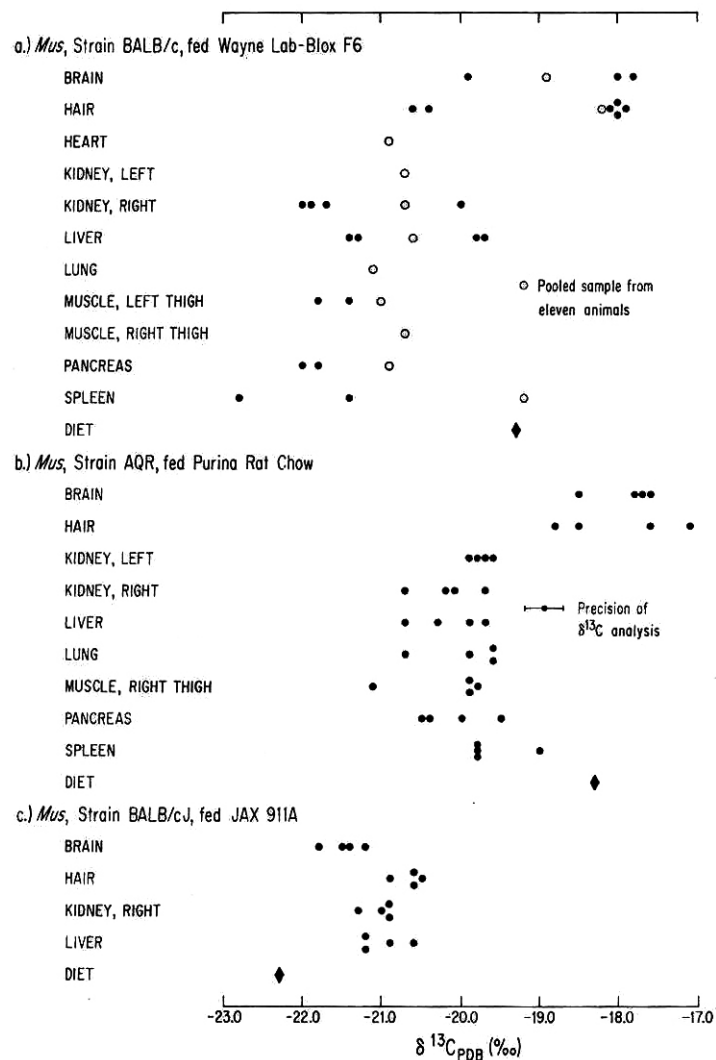


Figure 20 : Valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ de tissus de souris et de leur alimentation, sauf indication, chaque point correspond à une souris {DeNiro & Epstein 1978}. [$\delta^{13}\text{C}$ values of tissues of mice and their diets. Each point represents the analysis of tissues dissected from a single moused, except as indicated]

Si on regarde les relations entre les fractions biochimiques (lipides, protéines) de l'animal et de son régime alimentaire, on peut remarquer que la plupart des relations isotopiques entre les fractions biochimiques à un niveau trophique sont héritées au niveau supérieur. L'analyse du $\delta^{13}\text{C}$ de la matière organique totale donne une mesure plus fiable du $\delta^{13}\text{C}$ de l'alimentation que la détermination du $\delta^{13}\text{C}$ des fractions biochimiques. Les conclusions que l'on peut tirer de l'article de DeNiro et Epstein, 1978, très complexe, sont que pour pouvoir déterminer une relation entre le

$\delta^{13}\text{C}$ de certains composés biochimiques conservés dans le matériel fossile et celui de l'alimentation, deux conditions sont nécessaires. Tout d'abord, la valeur du $\delta^{13}\text{C}$ des composés synthétisés par l'animal et conservés dans le matériel fossile ne doit pas être altérée par les processus diagénetiques. Ceci est vrai pour le collagène, la chitine et la fraction organique des coquilles. De plus, la relation entre le $\delta^{13}\text{C}$ de ce composé et celui du régime alimentaire doit être connue. Ceci est vrai pour le collagène et la fraction organique des coquilles, mais n'est pas connu pour la chitine. Le processus interprétatif mis en place les auteurs peut être scindé en deux étapes. Il faut tout d'abord estimer le rapport isotopique du régime alimentaire à partir de celui du carbone animal (avec toutes les précautions d'usage, décrites plus haut). Puis il faut déterminer les contributions relatives des sources potentielles d'alimentation de $\delta^{13}\text{C}$ connu, qui pourraient être à l'origine du $\delta^{13}\text{C}$ du régime alimentaire estimé dans la première étape. Deux autres conclusions très intéressantes de cet article concernent les organismes marins et les différences entre les plantes en C_3 et C_4 . Ce sont ces conclusions qui vont le plus nous servir pour comprendre l'apport des analyses isotopiques à l'étude des matériaux organiques retrouvés dans des céramiques. En effet, le $\delta^{13}\text{C}$ des plantes et animaux aquatiques ne recoupe généralement pas le $\delta^{13}\text{C}$ des organismes terrestres. On peut donc utiliser cette différence pour déterminer les contributions relatives de ces deux types d'organismes dans le régime alimentaire d'animaux vivant en bord de mer ou de rivière. De même, la différence de $\delta^{13}\text{C}$ entre les plantes en C_3 et les plantes en C_4 est suffisamment grande pour permettre de déterminer leur part relative dans le régime alimentaire.

Une étude menée sur des porcs nourris avec des régimes 100 % C_3 ou C_4 totalement contrôlés a été menée, pour pallier les faiblesses des études menées sur des espèces sauvages dont le régime alimentaire n'est pas entièrement contrôlé, afin de suivre les processus d'incorporation des acides gras dans les tissus animaux, notamment les os {Stott *et al.* 1997a}. Les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ des acides gras extraits de tissus animaux, $\text{C}_{16:0}$ et $\text{C}_{18:1}$, sont enrichies en ^{13}C d'environ 4-5 ‰ pour un régime en C_3 , et d'environ 2-4 ‰ pour un régime en C_4 , par rapport aux composés analogues présents dans les aliments (Figure 21).

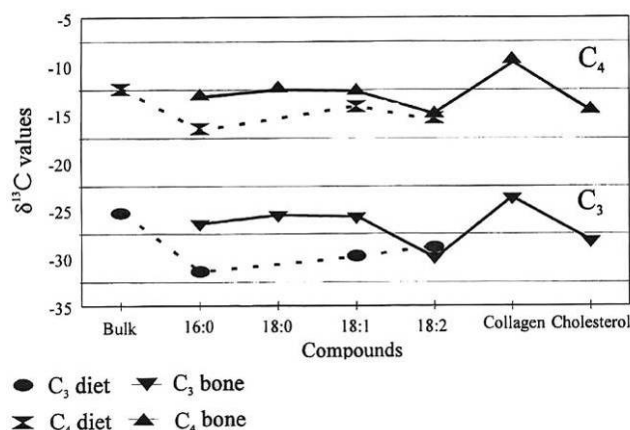


Figure 21 : Valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ mesurées pour les acides gras et le cholestérol d'os de porcs nourris avec des régime C₃ et C₄, ainsi que les valeurs des acides gras alimentaires {Stott *et al.* 1997a}. [$\delta^{13}\text{C}$ values measured for the C₃ and C₄ porcine bone fatty acids, cholesterol and dietary fatty acids by on-line GC-C-IRMS]

Mais ces mêmes valeurs sont proches des valeurs globales de $\delta^{13}\text{C}$ du régime alimentaire. Pour les acides gras qui ne peuvent être synthétisés directement tels que l'acide linoléique C_{18:2}, les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ sont très similaires de celles de ces mêmes composés présents dans les aliments, ce qui démontre bien leur assimilation directe {Stott *et al.* 1997a}.

Dans un article publié en 2004, Spangenberg revoit les différentes corrélations entre les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ et de $\delta^{15}\text{N}$ pour les plantes et leurs consommateurs. Ainsi, les animaux consommant une part majoritaire de plantes en C₄ (comme le maïs) ont un déplacement isotopique en ^{13}C proche ou supérieur à -12 ‰, alors que les animaux ayant un régime majoritairement C₃ ont un $\delta^{13}\text{C}$ proche ou inférieur à -22 ‰. La bibliographie de cet article est très intéressante dans le sens où elle reprend les différents articles parus sur le fractionnement isotopique et ses conséquences dans l'identification des résidus organiques retrouvés en contexte archéologique {Spangenberg 2004}.

Enfin, pour terminer cette partie d'introduction à l'analyse isotopique, il nous a paru important de décrire l'étude de résidus de plantes, découverts en milieu archéologique au Pérou (400 à 4000 BP) {DeNiro & Hastorf 1985}. Certains résidus étaient carbonisés, d'autres non, ce qui a permis de comprendre les contributions de la carbonisation et des altérations post-dépositionnelles aux déplacements isotopiques en ^{13}C et ^{15}N de ces résidus. Des plantes péruviennes modernes, carbonisées ou non, ont servi de référence. Les rapports isotopiques du ^{13}C et du ^{15}N des plantes carbonisées sont stables après la carbonisation, lors de l'enfouissement, ce qui n'est pas le cas des plantes non-carbonisées. En effet, une fois carbonisées, les plantes sont conservées pratiquement en l'état, ce qui n'est pas le cas pour les plantes non carbonisées qui subissent un ensemble de dégradations plus ou moins importantes, avec pour conséquence un fractionnement isotopique qui évolue. Il est donc possible pour des résidus carbonisés de

discriminer les légumes des autres plantes (^{15}N), et de discriminer les plantes en C_3 des plantes en C_4 (Figure 22).

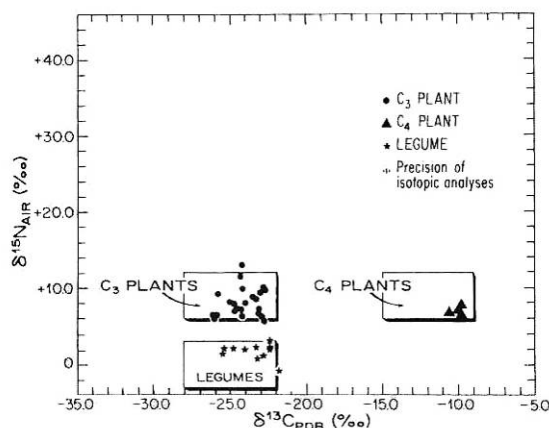


Figure 22 : Composition isotopique de plantes préhistoriques carbonisées, seules les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ des plantes de la Haute Vallée de Mantaro sont indiquées. Les encadrés représentent les distributions attendues pour les différents type de plantes {DeNiro & Hastorf 1985}. [Isotopic composition of prehistoric carbonized plants of the indicated carbon dioxide fixation and nitrogen assimilation type; the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of plants from the Upper Mantaro Valley are plotted]

Il est donc possible de comparer les variations de productions de certaines plantes (abondance des résidus carbonisés) et leur fréquence de cuisson (fréquence d'occurrence dans des céramiques). Pour les plantes non carbonisées, les méthodes botaniques restent les plus informatives.

Ce paragraphe consacré aux bases de l'analyse isotopique est loin d'être exhaustif, mais permet de mieux comprendre l'utilisation des analyses isotopiques pour l'identification des résidus organiques retrouvés dans des céramiques.

C.2.2. L'analyse isotopique comme outil

Mis à part les études isotopiques menées par de Niro *et al.* à la fois sur les résidus organiques et sur les ossements, c'est dans les années 90 que se sont développées les études centrées sur les résidus organiques conservés dans les céramiques archéologiques. Celles-ci ont tout d'abord permis de mettre en évidence des relations entre biomarqueurs et marqueurs de dégradation comme pour les cétones de condensation des acides gras, ou de confirmer les attributions de certains biomarqueurs, comme pour les cires végétales et la cire d'abeille.

C.2.2.1. Les cires végétales

Une étude menée sur un ensemble de tessons datant du Moyen-Age britannique (Raunds Area Project, Northamptonshire, Royaume-Uni) a permis de détecter des biomarqueurs supposés de cire végétale d'une variété de chou (Famille des Brassicaceae, genre *brassica*, espèce *oleracea*, le chou sauvage est le type de cette espèce, variété *oleracea*) {Evershed *et al.* 1991}. Afin de vérifier ces données, l'étude comparée du $\delta^{13}\text{C}$ des principaux biomarqueurs de la cire de feuilles de chou, les alcanes C_{29} et C_{31} et la cétone 15-K₂₉, et de ces mêmes biomarqueurs retrouvés dans deux échantillons archéologique a été menée {Evershed *et al.* 1994}. Cette étude est la première mettant en place le couplage chromatographie en phase gazeuse et analyse isotopique avec une interface de combustion, appliquée à des résidus organiques archéologiques. Les échantillons archéologiques et de référence ont tout d'abord été fractionnés en chromatographie flash afin de purifier la fraction alcane et la fraction cétone avant leur analyse par GC-C-IRMS (Encadré h).

Les résultats obtenus corroborent le fait qu'il s'agit bien d'une plante en C_3 , avec des $\delta^{13}\text{C}$ pour les deux échantillons archéologiques variant de -34.8 ‰ à -32.4 ‰. Ces valeurs sont légèrement plus élevées que celles trouvées pour la cire de feuille de chou de référence, qui sont comprises entre -37.1 et -35.4 ‰. Il peut y avoir plusieurs explications à ces différences. Tout d'abord, la déplétion en ^{13}C résultant de la révolution industrielle. La teneur en ^{13}C de l'atmosphère était avant ce phénomène enrichie d'environ 1 ‰ par rapport à la teneur actuelle. Dans les publications suivantes, ceci sera toujours corrigé pour les valeurs des références modernes.

h. Fractionnement flash sur colonne de silice

Après nettoyage au dichlorométhane, activation de la silice dans un four à 150°C.

Conditionnement de la colonne avec 2 volumes d'hexane.

Dépôt de la solution à fractionner.

Fraction 1 (alcanes) : 6 mL hexane.

Fraction 2 : 6 mL hexane/dichlorométhane (9:1 v/v).

Fraction 3 (cétones) : 6 mL dichlorométhane.

Fraction 4 : 6 mL dichlorométhane/méthanol (1:1 v/v).

Analyse en GC-C-IRMS

Colonne HP-5 (5%diphényl-95%diméthylpolysiloxane), 25 m × 0.32 mm × 0.33 μm.

70°C (2 min) – 150°C à 10°C/min puis 150°C – 290°C (5 min) à 5°C/min.

Interface de combustion : 860°C, oxydation en CO₂ dans un fourneau avec oxyde de cuivre.

Spectromètre de masse : ionisation sur filament.

Amplification du signal pour m/z 44, 45 et 46 ($^{12}\text{CO}_2$, $^{13}\text{CO}_2$ et $^{14}\text{CO}_2$).

Deuxièmement, les alcanes présents dans les cires épicuticulaires sont connus pour présenter de très grandes variations de $\delta^{13}\text{C}$ en fonction de la localisation du prélèvement sur la feuille, pouvant aller jusqu'à + 6 ‰. Enfin, le chauffage et les dégradations qui peuvent s'ensuivre sont aussi une possibilité de fractionnement du carbone, d'environ +/- 3 ‰. Cependant, pour qu'il y ait fractionnement il faut que des liaisons C-C soient coupées, ce qui n'est pas le cas pour ces composés lipidiques, il est donc peu probable que ce paramètre joue un rôle important. C'est un phénomène qui est assez visible dans le cas de l'analyse du déplacement isotopique global (*bulk* $\delta^{13}\text{C}$), et qui est dû notamment à la dégradation des composés autres que les lipides tels que les polysaccharides et les protéines.

A partir de ces résultats l'analyse isotopique spécifique (*compound-specific isotopic analysis*) va être utilisée pour permettre de confirmer des résultats obtenus en chromatographie, notamment sur les cétones.

C.2.2.2. Les cétones de condensation

Au cours de l'analyse de tessons archéologiques datant de l'Age du Bronze jusqu'au Moyen-Age, cette même équipe a pu détecter dans un certain nombre d'échantillons la présence d'une famille de cétones à longue chaîne, de K_{29} à K_{35} , avec une prédominance des cétones 15-K_{31} , 15-K_{33} et 17-K_{35} par chromatographie en phase gazeuse {Evershed *et al.* 1995b}. Les cétones sont connues pour être des biomarqueurs des cires végétales, comme on l'a vu précédemment. Cependant, plusieurs paramètres ont permis de se rendre compte que ce n'était pas des marqueurs des cires végétales. En effet, ces cétones n'étaient présentes que dans des échantillons montrant la présence de marqueurs de graisses animales, en l'absence d'autres marqueurs des cires tels que les alcanes et les alcools. Les analyses complémentaires en GC-C-IRMS ont montré que le $\delta^{13}\text{C}$ de ces cétones (~ -26 ‰) était relativement éloigné de celui des cétones de chou (~ -35 ‰), et proche de celui des acides gras $\text{C}_{16:0}$ et $\text{C}_{18:0}$ (~ -26 ‰). Cela suggère une relation précurseurs/produits entre les cétones et les acides gras. Leur structure, ainsi qu'il a été confirmé par des essais de pyrolyse des acides gras et des graisses animales, est elle aussi caractéristique d'une condensation des acides gras à haute température {Raven *et al.* 1997}.

C'est ainsi qu'il a été possible de confirmer le fait que les cétones peuvent être des marqueurs de dégradation, probablement anthropique, des graisses animales, correspondant à un chauffage à haute température. Une dernière étude sur les biomarqueurs de la cire d'abeille va être menée, avant que l'analyse isotopique spécifique ne soit utilisée à part entière pour la détermination de nouveaux critères d'identification des matières grasses.

C.2.2.3. La cire d'abeille

L'analyse d'une série de tessons provenant de lampes du site de Mochlos en Crète datant de la période minoenne (1600-1450 av. J.-C.) a montré que celles-ci contenaient des composés habituellement associés à la cire d'abeille {Evershed *et al.* 1997c}. Cependant leur état de dégradation, ainsi que la situation géographique de cette civilisation, où les auteurs s'attendaient à trouver de l'huile d'olive comme produit d'éclairage principal, les ont décidé à mesurer les $\delta^{13}\text{C}$ des principaux marqueurs détectés, alcools pairs C_{24}OH à C_{32}OH et acide palmitique $\text{C}_{16:0}$. Ils ont ensuite comparé ces données avec celles obtenues pour les marqueurs d'une cire d'abeille ethnographique de Crète vieille d'une centaine d'année. La similitude des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ est excellente, permettant de confirmer la présence de cire d'abeille dans ces lampes, et son utilisation comme agent d'éclairage dès cette époque.

C.2.3. Les graisses animales

Les apports les plus importants de l'analyse des rapports isotopiques des résidus organiques amorphes concernent les matières grasses animales, avec la possibilité de discriminer les graisses de ruminants des graisses de non ruminants, puis les produits laitiers.

C.2.3.1. Ruminants vs. non ruminants

Le premier point très intéressant est la synthèse différentielle du $\text{C}_{18:0}$ chez les ruminants et les non ruminants qui conduit à des valeurs de $\delta^{13}\text{C}_{18:0}$ et $\delta^{13}\text{C}_{16:0}$ caractéristiques. Ainsi, chez les ruminants, l'acide palmitique $\text{C}_{16:0}$ est enrichi en ^{13}C par rapport à l'acide stéarique $\text{C}_{18:0}$ alors que chez les animaux monogastriques c'est l'acide stéarique qui est enrichi en ^{13}C par rapport à l'acide palmitique. Ces résultats ont été obtenus sur des animaux nourris avec un régime exclusivement C_3 {Evershed *et al.* 1997a; Mottram *et al.* 1999}. Il est connu que la biosynthèse ou l'assimilation des acides gras diffère notablement chez les ruminants et les non ruminants, à cause de la présence du rumen chez les ruminants. Mais il n'existe pas à notre connaissance de publication comparant les données isotopiques obtenues sur les acides gras pour les ruminants et les non ruminants, qui explique ce changement de $\delta^{13}\text{C}_{18:0}$ et $\delta^{13}\text{C}_{16:0}$. Le fractionnement isotopique dû aux réactions qui ont lieu dans le rumen semble être plus important que pour les animaux monogastriques. Ceci est aussi perceptible dans les compositions en acides gras des graisses de ruminants et de non ruminants. En effet, pour les premières, la présence de nombreux isomères de position pour l'acide $\text{C}_{18:1}$ (dont l'acide stéarique est le produit principal de

dégradation dans les échantillons archéologiques) est due à la biohydrogénation des acides C₁₈ polyinsaturés provenant du régime alimentaire, qui n'a pas lieu dans un estomac simple. De la même manière, la présence de mélanges d'isomères des acides gras impairs C_{15:0}, C_{17:0} et C_{19:0}, linéaires, iso et antéiso est caractéristique des ruminants {Dudd *et al.* 1999; Evershed *et al.* 1997a; Evershed *et al.* 2002; Mottram *et al.* 1999; Spangenberg 2004}. Cette plus grande variabilité de composés, donc de réactions dans le système digestif des ruminants conduit certainement à l'augmentation du fractionnement isotopique chez les ruminants, qui se traduit, pour le C_{16:0} et le C_{18:0}, par une diminution globale de leur δ¹³C et par un enrichissement en ¹³C de l'acide palmitique par rapport à l'acide stéarique (Figure 23). Comme nous l'avons noté pour les analyses en chromatographie en phase gazeuse, le référentiel est un élément primordial pour toute étude comparative. Ces études ont été menées sur un certain nombre d'animaux, dont le régime alimentaire était contrôlé et à base de plantes en C₃. Le premier pôle d'animaux était constitué de ruminants (bovins et ovins) et de non ruminants (porcs) {Evershed *et al.* 1997a; Evershed *et al.* 2002; Mottram *et al.* 1999}.

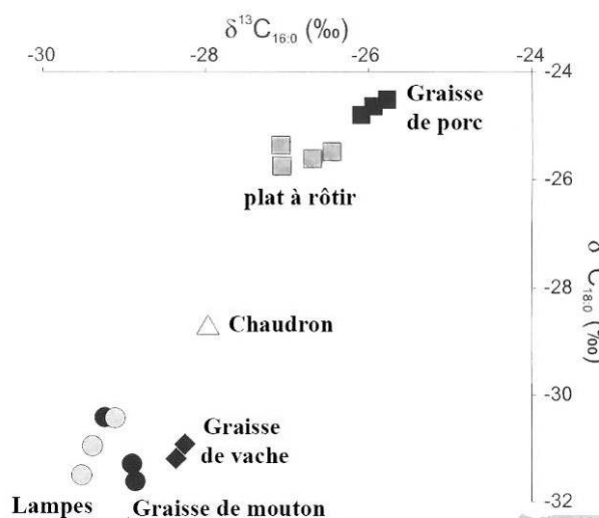


Figure 23 : Valeurs de δ¹³C pour les acides palmitique C_{16:0} et stéarique C_{18:0}, pour des extraits lipidiques archéologiques de tessons de lampes, de plats à rôtir et d'un chaudron, ainsi que pour des graisses sous-cutanées de référence (vache, mouton et porc) {Mottram *et al.* 1999}. [Plot showing the δ¹³C values of the 16:0 and 18:0 fatty acids from archaeological vessels (lamps, “dripping dishes” and cauldron) and from modern reference fats (cattle, sheep and pig)]

La différenciation des graisses de ruminants et de celles de non ruminants est très nette lorsque l'on trace le δ¹³C_{18:0} en fonction du δ¹³C_{16:0}, de part et d'autre d'une ligne : $\frac{\delta^{13}C_{16:0}}{\delta^{13}C_{18:0}} = 1$ (Tableau 5).

Graisses de ruminants	Graisses de non ruminants
$\delta^{13}\text{C}_{16:0} > \delta^{13}\text{C}_{18:0}$	$\delta^{13}\text{C}_{16:0} < \delta^{13}\text{C}_{18:0}$

Tableau 5 : Critères isotopiques de différenciation des graisses sous-cutanées. [Isotopic criteria for the discrimination of adipose fats]

C.2.3.2. Les produits laitiers

En ce qui concerne le lait, les différentes biosynthèses conduisant à l'acide palmitique et à l'acide stéarique leur donnent une signature isotopique caractéristique, qui permet de différencier les produits laitiers de graisses sous-cutanées de ruminants {Copley *et al.* 2003; Dudd & Evershed 1998; Dudd *et al.* 1999}. C'est là l'avancée majeure des analyses isotopiques de ces dernières années. Les produits laitiers sont en effet difficiles à identifier si on se base uniquement sur leurs biomarqueurs comme on l'a vu dans le paragraphe sur la chromatographie en phase gazeuse. Les triglycérides sont ubiquistes des graisses animales, et ces biomarqueurs, lorsqu'ils sont conservés, ne sont pas suffisamment bien caractérisés pour permettre l'identification sans équivoque des produits laitiers. Dans les glandes mammaires, l'acide palmitique est synthétisé *de novo* à partir d'acétate provenant des polysaccharides du régime alimentaire alors que l'acide stéarique provient pour une part majoritaire de la biohydrogénation des acides C_{18} polyinsaturés dans le rumen, et pour le reste des acides gras qui sont mobilisés dans les tissus adipeux. L'acide stéarique (-32 à -35 ‰) présent dans le lait est plus appauvri en ^{13}C que l'acide palmitique (-27 à -30 ‰). Dans les graisses sous-cutanées, les acides palmitique et stéarique sont aussi synthétisés de différentes manières, synthèse *de novo*, biohydrogénation et mobilisation des tissus adipeux. Mais l'acide stéarique est majoritairement synthétisé *de novo* à partir d'acétate, provenant des sucres du régime alimentaire. Le $\delta^{13}\text{C}_{18:0}$ est donc enrichi en ^{13}C pour les graisses de ruminant par rapport aux produits laitiers pour un régime en C_3 (Figure 24). Ceci a été corroboré par l'analyse d'environ 150 espèces de plantes participant au régime alimentaire des ruminants communément trouvés en Grande-Bretagne. Les déplacements isotopiques des principaux acides gras et sucres ont été mesurés, donnant une différence moyenne entre le $\text{C}_{18:3}$ et le glucose d'environ 8.1 ‰, ces deux composés étant considérés comme représentatifs de leur famille chimique. Les sucres sont donc enrichis en ^{13}C par rapport aux acides gras, ce qui est bien reflété par les différences de $\delta^{13}\text{C}$ des graisses sous-cutanées et des produits laitiers {Copley *et al.* 2003; Dudd & Evershed 1998; Spangenberg 2004}.

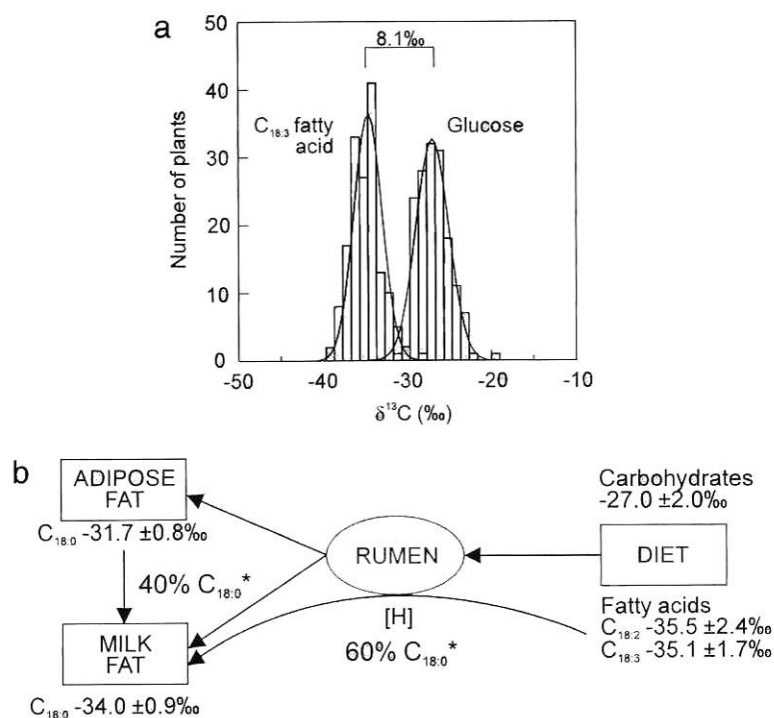


Figure 24 : Histogramme des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ du glucose et du $\text{C}_{18:3}$ extraits de plantes en C_3 (a) et schéma des chemins biosynthétiques des acides gras et des sucres depuis les aliments jusqu'aux graisses sous-cutanées ou aux produits laitiers, avec le fractionnement isotopique qui en découle, d'après {Copley et al. 2003}. [Histogram of the $\delta^{13}\text{C}$ values of $\text{C}_{18:3}$ fatty acids and glucose extracted from C_3 plants (a); diagram showing the routing of dietary fatty acids and carbohydrates in the rumen, adipose tissues and mammary gland of the ruminant animal (b)]

Un des points faibles de cette technique est qu'en fonction des méthodes utilisées (préparation des échantillons, standards utilisés etc.) certaines variations isotopiques peuvent avoir lieu, qui modifient le $\delta^{13}\text{C}$ mesuré. A chaque méthode d'analyse correspond donc son propre référentiel {Craig 2002; Dudd & Evershed 1998; Dudd *et al.* 1999; Evershed *et al.* 2002; Mottram *et al.* 1999; Spangenberg *et al.* 2006}.

Afin de travailler sur les produits laitiers, un nouveau référentiel plus large a été mis en place. En plus des graisses sous-cutanées de porcs et de ruminants (bovins et ovins), des produits laitiers de ruminants (lait de vache et lait de brebis) ainsi que de la graisse de poulet ont été analysés pour déterminer leurs valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ pour les acides palmitique et stéarique {Dudd & Evershed 1998}. Ce référentiel sera encore élargi avec l'ajout de graisse de cheval {Dudd *et al.* 1999}, puis de colostrum de vache (premier lait) {Evershed *et al.* 2002}. Dans les publications ultérieures, le graphe qui sert de référence ne tracera que les valeurs obtenues pour les graisses de ruminants, les graisses de non ruminants et les produits laitiers (Figure 25) comme celui présenté dans la publication de Copley et al. de 2003.

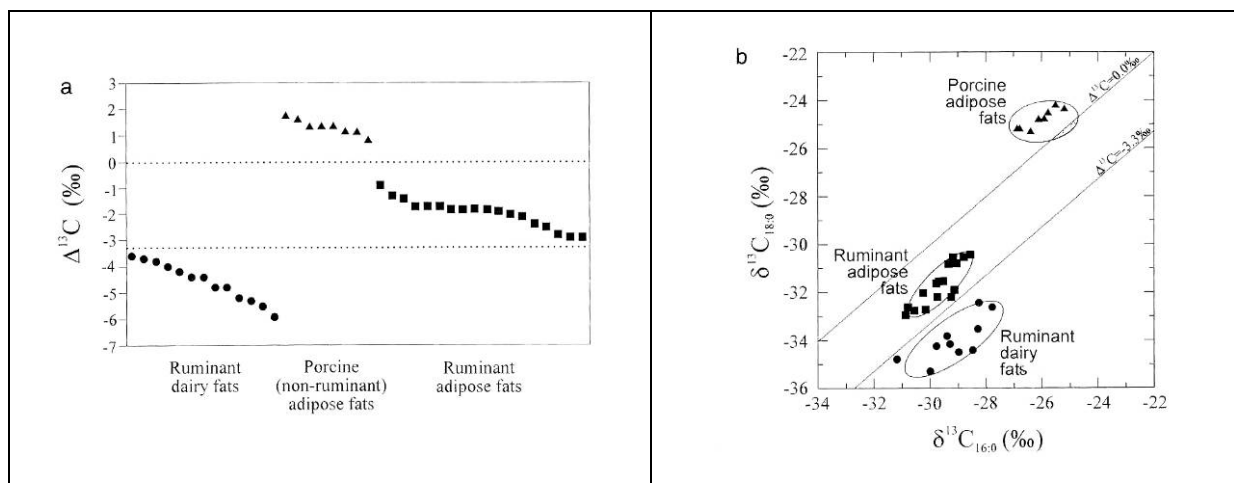


Figure 25 : Graphe traçant le $\Delta^{13}C = \delta^{13}C_{18:0} - \delta^{13}C_{16:0}$ (a) et graphe traçant $\delta^{13}C_{18:0}$ en fonction de $\delta^{13}C_{16:0}$, pour des graisses sous-cutanées de références de porcs, de ruminants et des produits laitiers de ruminants d'après Copley et al. 2003. [(a) Plot of the difference in the $\delta^{13}C$ values of the $C_{18:0}$ and $C_{16:0}$ fatty acids ($\Delta^{13}C$) obtained from the modern reference fats and (b) plot of the $\delta^{13}C$ values of the major fatty acid components of modern reference fats (domesticates known to comprise the major component of prehistoric economies in Britain, animals raised on C_3 diets)]

Afin de pallier d'éventuelles variations de $\delta^{13}C$ qui seraient dues à un changement de composition isotopique des plantes, ou à un changement du régime alimentaire, un nouveau paramètre $\Delta^{13}C$ a été calculé {Copley *et al.* 2003; Copley *et al.* 2005a}. Ainsi, même si un échantillon se trouve en dehors d'une des ellipses de référence, ce critère permet de discriminer les graisses de ruminants de graisses de non ruminants et des produits laitiers. Ce paramètre se calcule simplement:

$$\Delta^{13}C = \delta^{13}C_{18:0} - \delta^{13}C_{16:0}$$

Ainsi, si $\Delta^{13}C > 0$ ‰, il s'agit de graisses de non ruminants, si $\Delta^{13}C < -3.3$ ‰ alors il s'agit de produits laitiers, et entre ces deux valeurs il s'agit de graisses de ruminants (Figure 25).

C'est à partir de ces données qu'il a été possible de déterminer la présence de produits laitiers dès le Néolithique ancien en Grande-Bretagne (milieu du V^{ème} mill. av. J.-C.) {Copley *et al.* 2003; Copley *et al.* 2005a; Copley *et al.* 2005b; Copley *et al.* 2005c; Copley *et al.* 2005d}. Des études non encore publiées sur des échantillons provenant du Moyen-Orient sont également menées, afin de donner des éléments de réponse à la question de l'émergence des produits laitiers au Néolithique (R.P. Evershed, communication orale). Si on synthétise les données publiées dans ces 5 publications, sur 930 tessons prélevés sur des sites datant du Néolithique, de l'Age du Bronze et de l'Age du Fer, 22 à 33 % des tessons ont contenu des produits laitiers. La production et la consommation des produits laitiers est donc apparue en Grande-Bretagne avec l'arrivée du Néolithique vers le milieu du V^{ème} millénaire av. J.-C.

Une autre équipe traite de l'émergence des produits laitiers en Europe à partir de l'analyse des résidus organiques de céramiques. Des céramiques provenant de deux sites datant de 5950 à 5000 cal. av. J.-C. et de 5800 à 5700 cal. av. J.-C. dans la plaine du Danube en Europe centrale ont été prélevées pour être analysées en GC-C-IRMS, sur les acides palmitique et stéarique {Craig *et al.* 2005b}. Les deux types de critères $\delta^{13}\text{C}_{18:0}$ vs $\delta^{13}\text{C}_{16:0}$ et $\Delta^{13}\text{C}$ vs $\delta^{13}\text{C}_{18:0}$ (et non pas $\delta^{13}\text{C}_{16:0}$) ont été utilisés, avec un référentiel un peu différent de celui habituellement trouvé dans les publications sur les produits laitiers. Cela s'explique, comme on l'a dit plus haut, par le fait que les analyses isotopiques sont sensibles aux différentes étapes de préparation des échantillons et également parce que les céramiques utilisées proviennent de sites très différents de ceux des précédentes études, donc avec potentiellement des régimes alimentaires pour le bétail différents. En plus de graisses de non ruminants, porcs, chevaux et poissons, différents types de produits laitiers ont été analysés, provenant d'animaux ayant différents régimes alimentaires, en C₃ et en C₃ mélangé avec du C₄. Le référentiel a donc été élargi, et l'on voit bien que les animaux nourris avec une part de plantes en C₄ ont un $\delta^{13}\text{C}_{16:0}$ enrichi en ¹³C par rapport aux autres (Figure 26). Cependant, quel que soit le régime alimentaire, les graisses de produits laitiers se trouvent toujours sous une ligne:

$$\Delta^{13}\text{C} = \delta^{13}\text{C}_{18:0} - \delta^{13}\text{C}_{16:0} = -3.3\text{‰}$$

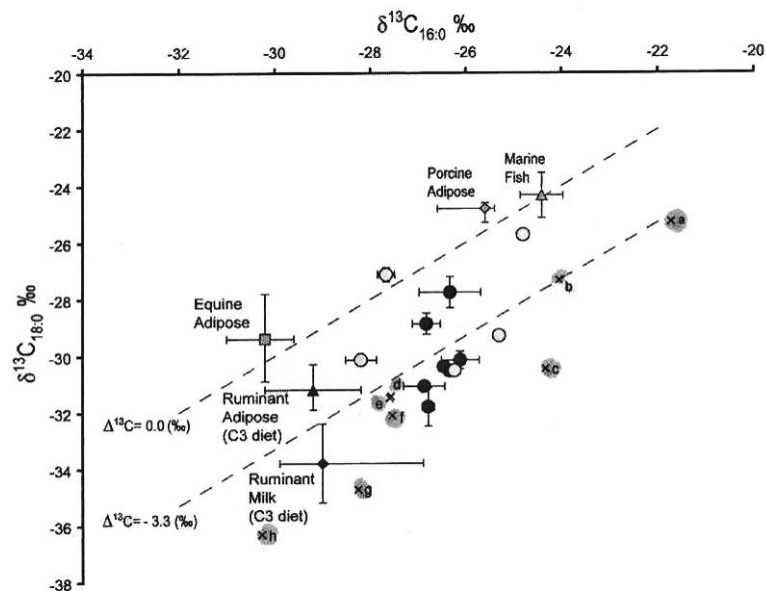


Figure 26 : Valeurs du $\delta^{13}\text{C}_{18:0}$ en fonction du $\delta^{13}\text{C}_{16:0}$ extrait de céramiques issues de différents sites du Néolithique Ancien, de tessons de contrôle et de graisses de référence (a- lait d'Inde, b,d- lait de brebis (b) et de chèvre (d) nourries avec un supplément en C₄, Angleterre, c- lait de vaches nourries avec 60% de maïs, Angleterre, e- lait bouilli de vaches avec un supplément en C₄, Angleterre, f- lait de vaches nourries avec 65% de riz et 35% de sorgho, Inde, g, h lait de vaches nourries en C₃, Angleterre (g) et Iles Shetland (h)) {Craig *et al.* 2005b}. [Plot of the $\delta^{13}\text{C}$ values of C_{18:0} and C_{16:0} fatty acids extracted from various Early Neolithic potsherds, control samples and reference milk fats]

La présence de produits laitiers a été détectée dans un certain nombre des céramiques étudiées. Ceci semble en faveur d'une exploitation des produits laitiers à une échelle domestique, sans spécialisation, au Néolithique. Il semblerait donc que l'émergence des produits laitiers ait eu lieu en parallèle de l'exploitation des autres produits de l'élevage, dès le début du Néolithique, encore que l'analyse de céramiques issues du Proche-Orient soit nécessaire pour corroborer cela. Cela pose d'autres problèmes d'ordre pratique car les céramiques ne sont pas apparues dès le début du Néolithique au Proche-Orient. Cette discussion sur l'exploitation des produits secondaires de l'élevage (force de traction, produits laitiers et laine) reste ouverte, mais il est probable que les animaux domestiques aient été exploités pour leurs produits laitiers, à une échelle domestique relativement tôt au Néolithique, avec une spécialisation plus tardive (exploitation à grande échelle, spécialisation des troupeaux etc.) {Balasse *et al.* 1997; Bogucki 1986; Craig 2002; Craig *et al.* 2003; Halstead 1998; Sherratt 1983; Thomas 2003; Tresset 2003}. Cette méthode d'identification des produits laitiers en contexte archéologique est extrêmement robuste, même si elle ne permet pas de déterminer l'espèce d'origine. C'est là un de ses points faibles, avec également le fait qu'elle reste très dépendante du référentiel choisi, et que ce dernier doit être actualisé en permanence en fonction des méthodes de préparation, de la localisation géographique des sites étudiés, etc.

Il n'en reste pas moins que l'absence de données sur les espèces sauvages, chassées ou pêchées est assez flagrante, même si cela s'explique par le manque de données archéozoologiques sur les sites décrits précédemment. Ceci est dû au faible nombre d'équipes compétentes et équipées ainsi que par la lourdeur, la complexité et le coût des techniques mises en œuvre.

C.2.3.3. Les autres graisses animales

La contribution aquatique au régime alimentaire des animaux ou des hommes sur les sites proches de la mer ou de rivières peut être déterminée grâce à la mesure des rapports isotopiques, comme on l'a vu dans le paragraphe 1.2. Si on trace le paramètre $\Delta^{13}C = \delta^{13}C_{18,0} - \delta^{13}C_{16,0}$ en fonction du déplacement isotopique de l'acide palmitique, $\Delta^{13}C$ vs $\delta^{13}C_{16,0}$, alors il est possible de déterminer la présence ou non d'une origine marine pour le régime alimentaire, en opposition à un régime à partir de plantes terrestres, qui se traduit par un enrichissement de l'acide palmitique en ^{13}C (Figure 27) {Copley *et al.* 2005b; Copley *et al.* 2005c; Copley *et al.* 2005d}.

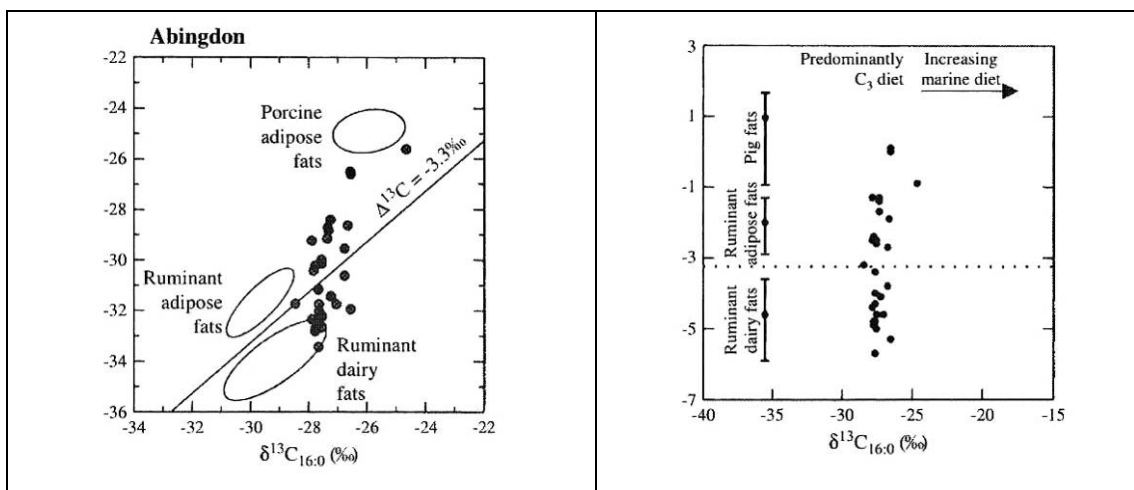


Figure 27 : Valeurs de $\delta^{13}\text{C}_{18:0}$ et $\delta^{13}\text{C}_{16:0}$ (graphe de gauche) et valeurs du $\Delta^{13}\text{C}$ par rapport au $\delta^{13}\text{C}_{16:0}$ (graphe de droite) pour les extraits lipides des céramiques du site néolithique d'Abingdon (Royaume-Uni) {Copley *et al.* 2005c}. [(Left) Plot of the $\delta^{13}\text{C}$ values of the FAMES of $\delta^{13}\text{C}_{16:0}$ and $\delta^{13}\text{C}_{18:0}$, prepared from lipid extracts from the pottery assemblage of the néolithique site of Abingdon. The ellipses indicate the $\delta^{13}\text{C}$ values of the reference animal fats, based on which the archaeological extracts are classified. (Right) $\Delta^{13}\text{C}$ values of the extracts plotted against their $\delta^{13}\text{C}_{16:0}$ values]

L'influence des produits marins sur la composition isotopique des résidus trouvés dans des céramiques n'est pas un sujet traité couramment, mais il est plus souvent traité dans le cas de l'étude isotopique du collagène des os ou des dents de bétail {Milner *et al.* 2004; Tresset 2002}.

Une étude sur des résidus organiques carbonisés prélevés sur des céramiques indiennes du Manitoba (Canada) {Sherriff *et al.* 1995} a la première, pris en compte les espèces sauvages potentiellement exploitables sur le site considéré. Ceci est facilité car dans ces régions la diversité des ressources alimentaires est faible. L'analyse en parallèle de résidus de référence obtenus par cuisson et de résidus archéologiques, par Résonance Magnétique Nucléaire du ^{13}C (RMN) et par mesure des rapports isotopiques $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ a montré l'utilisation des céramiques rondes pour la cuisson de poissons en ragoût probablement et des céramiques plates pour l'exploitation de graisses animales. Aucune trace de plantes en C_4 telle que le maïs n'a été détectée, ce qui est en accord avec les données obtenues sur les restes végétaux.

Dans une étude publiée plus récemment, la question des espèces chassées apparaît. Il s'agit d'une étude des résidus organiques carbonisés prélevés sur un site néolithique lacustre suisse, sur les bords du lac de Constance (Arbon Bleich 3, ~ 3370 av. J.-C.) {Spangenberg 2004; Spangenberg *et al.* 2006}. Le référentiel choisi est très intéressant, car beaucoup plus complet que les précédents décrits ci-dessus. Il y a bien sur dans ce référentiel les composés habituels, à savoir des graisses de ruminants (vache) et de non ruminants (porc), des produits laitiers (lait et fromage) des trois espèces habituelles (chèvre, vache et brebis) mais également des graisses sous-cutanées de jeunes animaux (veaux et agneaux), de chevreuil et de poissons du lac. C'est la première fois

que ce type de graisse est mentionné pour les jeunes animaux. Or il semble très important de prendre ce paramètre en compte car ce sont des animaux dont la nourriture principale est le lait, et qui ont donc un régime alimentaire très différent de celui de la même espèce adulte. Cette variabilité n'avait jusqu'alors jamais été prise en compte. Il est ainsi montré que le déplacement isotopique des graisses sous-cutanées de jeunes ruminants est très proche de celui de non ruminants. Ceci pose plus de questions que cela n'en résout, avec notamment la question de la validité des données publiées par d'autres équipes. De plus, l'auteur a tracé des graphes correspondant à $\delta^{13}\text{C}_{18:0}$ vs $\delta^{13}\text{C}_{16:0}$ mais aussi $\delta^{13}\text{C}_{18:0}$ vs $\delta^{13}\text{C}_{18:1}$. Sont également représentés sur le premier graphe l'ellipse correspondant aux valeurs obtenues pour les plantes en C_3 (Figure 28).

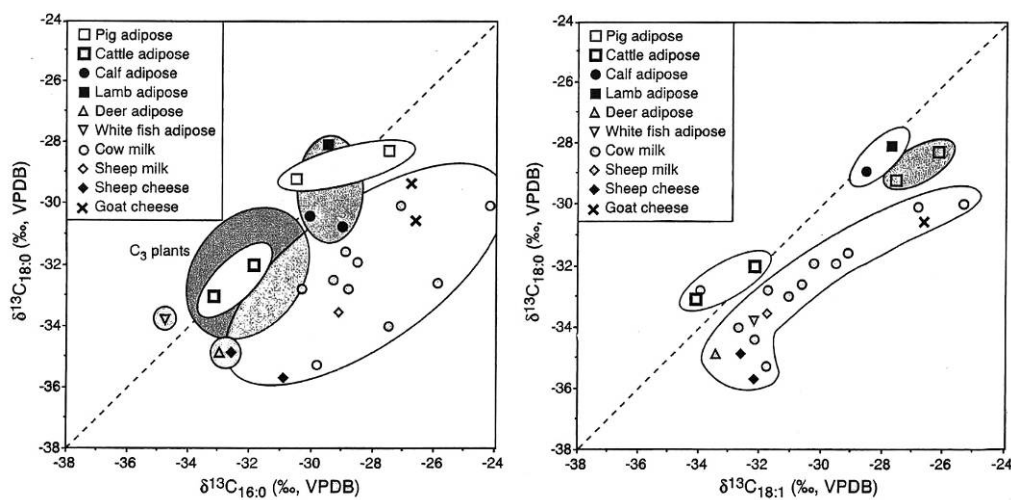


Figure 28 : Valeurs du $\delta^{13}\text{C}_{18:0}$ par rapport au $\delta^{13}\text{C}_{16:0}$ et au $\delta^{13}\text{C}_{18:1}$ pour des composés de référence (graisses animales, produits laitiers et plantes) {Spangenberg 2004}. [Carbon isotope composition of stearic ($\delta^{13}\text{C}_{18:0}$) versus palmitic ($\delta^{13}\text{C}_{16:0}$) and oleic ($\delta^{13}\text{C}_{18:1}$) acids of reference of modern animal and plant fats]

La conclusion globale des données publiées sur le site d'Arbon Bleiche est que les produits laitiers étaient exploités à cette époque sur ce site (Néolithique final), sans qu'il y ait une très forte spécialisation. Il semblerait qu'il s'agisse d'une économie mixte, basée sur les produits primaires et secondaires de l'élevage.

Les autres études isotopiques ont porté sur des problématiques différentes, à savoir l'exploitation de plantes en C_3 et C_4 dans deux contextes particuliers. Il s'agit des études menées sur le site de Qasr Ibrim en Egypte et de la problématique de l'exploitation du maïs en Amérique.

C.2.4. Le site de Qasr Ibrîm

L'étude du site de Qasr Ibrîm, situé dans le sud de l'Égypte, et occupé de 700 av. J.-C. à 1800 ap. J.-C. s'est révélée très riche en renseignements concernant les stratégies d'élevage et de culture sur une longue période ainsi que sur l'utilisation ou la consommation d'un certain nombre d'espèces végétales {Copley *et al.* 2004b}. L'étude de céramiques de ce site, datant de différentes périodes a permis de mettre en lumière leur contenu et de déterminer la présence de certains fruits et huiles {Copley *et al.* 2001}. Une première étude sur des céramiques datant de l'époque post-méroïtique (350-600 ap. J.-C.) a montré la présence de graisses animales mais aussi de distributions particulières en acides gras. Les acides gras C_{12:0} et C_{14:0} sont en effet majoritaires par rapport aux autres acides gras tels que l'acide palmitique et l'acide stéarique. La présence de C_{12:0} et C_{14:0} en quantité majoritaire se retrouve dans les dattes (fruits du palmier dattier, *Phoenix dactylifera*, famille des Arecaceae), et les analyses isotopiques du déplacement en ¹³C de ces composés a permis de montrer qu'il s'agissait bien de résidus de noyaux de dattes. De plus, l'analyse isotopiques des acides gras caractéristiques des graisses animales (C_{16:0} et C_{18:0}) a montré que les animaux avaient probablement un régime alimentaire en C₄ majoritairement (*Sorghum bicolor* pour le sorgho commun, de la famille des Poaceae, graminées). On voit bien l'intérêt de mener des analyses complémentaires sur les ossements et les résidus organiques retrouvés dans des céramiques, les unes et les autres apportant des informations complémentaires.

Enfin, la dernière étude que nous présenterons sur ce site concerne des céramiques ayant servi de lampes. Ces céramiques datent de la période chrétienne (600-1500 ap. J.-C.) {Copley *et al.* 2005e}. C'est une étude ayant mis en jeu un grand nombre d'analyses différentes, en chromatographie en phase gazeuse sur les extraits lipidiques et sur les acides gras, sur la fraction insoluble et également en chromatographie en phase gazeuse couplée à un analyseur isotopique pour les acides gras principaux C_{16:0} et C_{18:0} ainsi que pour les acides dicarboxyliques C₇ à C₁₀ qui sont les produits d'oxydation des acides gras insaturés (cf. paragraphe C.1.2). Les valeurs de δ¹³C obtenues pour les fractions solubles et insolubles sont similaires, ce qui montre leur origine commune. Ces valeurs sont caractéristiques de graisses animales de ruminants et de non ruminants, jamais de produits laitiers. Cependant, des biomarqueurs d'huiles végétales ont aussi été détectés (huile de ricin et huile de radis, avec une forte probabilité de présence d'huile de lin), en mélange ou non avec des acides palmitique et stéarique plutôt caractéristiques de graisses animales. Or aucune huile végétale n'a fait l'objet d'analyse isotopique, et elles ne sont jamais incluses dans le référentiel. Les conclusions tirées des données isotopiques ne sont-elles pas biaisées de ce point de vue ? Les huiles végétales contiennent elles aussi de l'acide palmitique et

de l'acide stéarique, et il n'est jamais précisé dans cette publication si d'autres marqueurs de graisses animales avaient été détectés (par exemple des stérols).

Quoi qu'il en soit, l'étude de ce site a donné lieu à une combinaison très intéressante en terme de complémentarité des études menées en analyses isotopiques, à la fois sur les restes animaux et sur les résidus organiques retrouvés dans des céramiques. La dernière partie de ce paragraphe sur l'analyse isotopique va concerner l'étude de résidus organiques de céramiques du nouveau monde.

C.2.5. Le cas du maïs en Amérique

Il existe une littérature très riche sur l'émergence du maïs (*Zea mays*, famille des Poaceae, graminées) dans les cultures de l'Amérique, latine ou du nord. La plupart se basent sur l'analyse isotopique des ossements retrouvés en contexte archéologique. Cependant on voit apparaître depuis quelque temps des analyses sur des résidus organiques retrouvés dans des céramiques. Il est hors de la portée de ce mémoire de décrire toutes les études se rapportant au maïs, nous n'en décrivons que les études les plus récentes appliquées aux résidus organiques.

Le maïs est une plante en C₄, la seule dans l'environnement C₃ de l'Amérique précolombienne. Un grain est composé à 70 % d'amidon, à 9-10 % de protéines et à seulement 4-5 % de lipides. Les lipides du maïs, fortement minoritaires, ne vont donc pas être aussi facilement détectables que dans le cas de plantes oléagineuses par exemple. Cela pose le problème de la détection de la part de maïs lorsque celui ci a été cuit ou stocké avec d'autres matières grasses, plus probablement en C₃, qui sont mieux absorbées et dont les biomarqueurs et les valeurs de déplacement isotopique masquent les signaux du maïs {Reber & Evershed 2004}. Un biomarqueur est cependant caractéristique du maïs, le *n*-dotriacontanol (n-C₃₂OH), avec un déplacement isotopique caractéristique {Reber *et al.* 2004}. L'avantage de travailler sur le δ¹³C d'un biomarqueur aussi spécifique est que l'on s'affranchit ainsi des éventuelles contributions de tout autre aliment/plante. Des tessons provenant de 16 sites situés dans la vallée du Mississipi, datant d'avant et après la mise en culture du maïs en Amérique du Nord (aux alentours de 1000 ap. J.-C.) ont été analysés, afin de déterminer la présence de maïs. Seuls 16 échantillons ont montré la présence de dotriacontanol, avec pour 10 d'entre eux un déplacement isotopique similaire à celui du maïs de référence (-19 à -21 ‰). Le fait que le maïs soit la seule plante en C₄ disponible à cette époque dans cette région rend la possibilité de faux positif extrêmement faible. Cependant, le dotriacontanol peut aussi provenir de cire épicuticulaire, et pour certains échantillons les valeurs de δ¹³C proches de -27 ‰ tend à montrer la présence de plantes en C₃, peut-être en mélange avec du maïs.

Une étude sur des céramiques indiennes provenant d'Ontario (Canada) a permis de mettre en lumière non seulement les apports de l'analyse isotopique de résidus carbonisés mais également ses limites {Morton & Schwarcz 2004}. Cinquante sites ont été étudiés, datant de 680 av. J.-C. à 1725 ap. J.-C., avec de un à cinq résidus prélevés par site. Le déplacement isotopique en ^{13}C a été mesuré pour 157 résidus, le déplacement isotopique en ^{15}N a été mesuré pour 64 échantillons, mais seuls 55 échantillons ont été analysés à la fois pour leurs $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$. Des différences peuvent être perçues entre les sites au nord du lac Ontario et ceux situés au sud du lac, particulièrement après l'introduction du maïs dans les cultures. En effet, les déplacements isotopiques en ^{13}C ne permettent pas de mettre en évidence son incorporation dans les préparations alimentaires. Pour les sites du sud de l'Ontario, la présence de maïs est plus perceptible dans les résidus organiques, particulièrement après 1100 ap. J.-C. Cependant, par rapport aux données obtenues sur les ossements, qui montrent une très forte proportion de plantes en C_4 dans le régime alimentaire et également par rapport aux relations de Jésuites dans cette région, cela ne semble pas correspondre à la part réelle de maïs assimilé par les autochtones. C'est là la faiblesse de ces analyses isotopiques de résidus carbonisés. Elles ne sont représentatives que de ce qui a été mis en œuvre dans les céramiques, ce qui ne correspond pas forcément à ce qui a été la base alimentaire des populations du passé. Le maïs a pu être consommé de bien des manières, en farine, rôti etc. qui ne nécessitent pas de céramique, ou qui ne permettent pas aux lipides caractéristiques de s'accumuler suffisamment pour être détectables. Morton et Schwarcz appellent cela la *paléocuisine*, par rapport à ce qui est couramment appelé en anglais *paleodiet*, c'est à dire le régime alimentaire tel qu'il peut être reconstruit à partir des données isotopiques des ossements archéologiques {Morton & Schwarcz 2004}.

Une étude expérimentale portant sur différents types de mélanges, évaluant la contribution des graisses et des sucres au carbone total et au déplacement isotopique global a permis de montrer que la contribution du maïs était bien sous-estimée dans la reconstruction des régimes alimentaires à partir des résidus organiques carbonisés {Hart *et al.* 2007}. La conclusion de cette étude, qui pourrait être la conclusion de cette partie sur les analyses isotopiques, est que ces analyses, pour précieuses que soient les informations qu'elles permettent d'obtenir, doivent être intégrées dans un ensemble d'études, en complément des analyses moléculaires. Il est également important, lorsque cela est possible, d'étudier les déplacements isotopiques des ossements humains pour la reconstruction des régimes alimentaires des populations anciennes, ou des ossements animaux dans le cas de l'étude de la gestion du cheptel.

Les matériaux organiques archéologiques ont principalement été étudiés en chromatographie en phase gazeuse et en analyse isotopique. Ce sont des techniques très puissantes, en ce qui concerne les matières grasses. Cependant deux autres axes ont été explorés, l'un sur l'étude des matières grasses par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, et l'autre sur l'analyse des résidus protéiques.

C.3. La chromatographie liquide et les analyses immunologiques

Les études que nous allons présenter maintenant concernent plus particulièrement les apports de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse pour l'analyse d'une part des lipides extraits d'échantillons archéologiques, et, d'autre part, pour celle des protéines. Dans ce deuxième axe, nous ferons également un point sur les analyses immunologiques, qui ont été appliquées récemment aux échantillons archéologiques.

C.3.1. les lipides

La chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse n'a pas été appliquée souvent à des échantillons archéologiques. Une publication de 1981 présente des résultats obtenus sur des échantillons archéologiques {Passi *et al.* 1981}, mais il faut attendre les années 2000 pour que de nouvelles données sur l'application de l'HPLC/MS (*High Performance Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry*) à des échantillons archéologiques soient publiées {Kimpe *et al.* 2001, 2002}. Entre temps, un certain nombre d'études sur les triglycérides de graisses modernes ont été menées, qui vont permettre des avancées sur les échantillons archéologiques. Il n'est pas du ressort de ce rappel bibliographique de présenter toutes les études qui ont été publiées à ce jour sur l'étude des triglycérides par HPLC et HPLC/MS, mais il existe un certain nombre d'articles de synthèse qui donnent un bon aperçu de ce qui a été fait {Andrikopoulos 2002; Byrdwell 2001; Creamer & MacGibbon 1996; Dobson *et al.* 1995; Dugo *et al.* 2005; Holcapek *et al.* 2003; Jensen 2002; Ruiz-Gutiérrez & Barron 1995; Sandra *et al.* 2002}. Nous ne présenterons ici que les études qui ont permis de travailler sur les échantillons archéologiques, même si celles-ci ne sont pas directement en lien avec de tels échantillons.

La toute première étude en chromatographie liquide d'échantillons archéologiques a été réalisée sur des tessons d'amphores datant du 5^{ème} s. ap. J.-C. mises au jour à Rome {Passi *et al.* 1981}. Elle s'inspire des travaux publiés par Condamin *et al.* sur la détection de traces d'huile d'olive dans des tessons d'amphores, par chromatographie en phase gazeuse {Condamin *et al.* 1976}. Les tessons ont été séparés en 3 parties, la face externe, la face interne et le cœur, afin de

pouvoir comparer les gradients de concentration éventuels. L'extrait lipidique est d'abord séparé par chromatographie sur couche mince de silice (CCM ou TLC pour *Thin Layer Chromatography*), qui est une technique de préparation que l'on retrouvera souvent dans les études en chromatographie liquide. C'est une technique de séparation simple, qui dans ce cas permet de séparer les acides gras libres des composés estérifiés tels que les triglycérides. L'identification des fractions se fait par comparaison des rapports frontaux (R_f) avec ceux de composés de référence élués sur la même plaque. Après extraction des différentes fractions de la plaque de silice, la fraction triglycéride est saponifiée, puis les deux fractions obtenues (acides gras libres et acides gras dé-estérifiés) sont dérivées en esters *p*-bromophénacyl avant d'être séparées sur une colonne phase inverse C_{18} , avec une détection UV maximum pour ces esters à 255 nm. Ce qui est très intéressant dans cette étude, c'est le choix des échantillons et la réflexion archéologique à l'origine. L'analyse des acides gras par chromatographie liquide ne sera pas réemployée, en tous cas pour les échantillons archéologiques, car ceux-ci sont mieux séparés par CPG, alors que la HPLC permet de travailler sur la fraction estérifiée, sans la saponifier. Ces composés nécessitent d'être dérivés pour être détectés par fluorescence. Dans l'étude qui nous intéresse, les interprétations ne se basent que sur les compositions en acides gras et doivent donc être considérées avec prudence. Les fragments provenant d'une jarre anatolienne, d'une des amphores de Gaza et des deux amphores nord-africaines montrent des compositions en acides gras qui seraient caractéristiques de l'huile d'olive, alors que la présence en plus grande quantité de $C_{18:2}$ (acide linoléique) et $C_{20:0}$ (acide arachidique) dans un tessou de l'autre amphore de Gaza étudiée serait plutôt caractéristique de l'huile de sésame. Le référentiel a été réalisé en fonction des données connues sur le contenu des amphores à cette époque, à savoir huile d'olive ou de sésame, garum ou vin, ce qui implique un certain biais dans l'interprétation des résultats. Il n'en reste pas moins qu'il s'agit d'une étude très complète, depuis le choix des échantillons jusqu'à la vérification de la linéarité de réponse du détecteur en passant par le calcul du rendement de recouvrement de la CCM. Jusque dans les années 2000, aucune autre étude ne sera menée en HPLC sur des échantillons archéologiques de ce type, même si d'autres matériaux du patrimoine vont être étudiés ainsi.

C.3.1.1. La mise au point de l'HPLC pour l'analyse des triglycérides

Une série d'études sur les triglycérides a été menée par H. R. Mottram, sans application directe sur des échantillons archéologiques, mais qu'il nous paraît intéressant de présenter ici {Mottram & Evershed 1996; Mottram *et al.* 1997; Mottram *et al.* 2001; Mottram & Evershed 2001}. C'est plus ou moins sur ces bases que vont se développer les recherches sur des

échantillons archéologiques. L'analyse des triglycérides par HPLC/ MS se base sur les travaux menés par Byrdwell *et al.* sur l'analyse des lipides par spectrométrie de masse {Byrdwell & Emken 1995; Byrdwell 2001} et sur les travaux menés en HPLC par quelques équipes dans les années 90 {Spanos *et al.* 1995}.

Tout d'abord, le potentiel de la spectrométrie de masse à ionisation chimique pour l'analyse régiospécifique des triglycérides a été évalué {Mottram & Evershed 1996}. La spectrométrie de masse à ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI, *Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*) présente un grand nombre d'avantages, particulièrement par rapport à l'impact électronique ou à l'ionisation chimique sous vide. C'est une technique qui peut être facilement couplée à la chromatographie liquide, avec une interface à pression atmosphérique. C'est une technique d'ionisation qui est plus douce que l'impact électronique, et qui permet donc d'avoir moins de fragmentation dans la source. Les spectres de masse obtenus pour des mélanges complexes, comme cela va être le cas avec les graisses animales, seront donc simplifiés. Cela permet un traitement efficace des données. Les fragmentations qui ont lieu avec cette ionisation font l'objet de quelques publications, et permettent d'obtenir un certain nombre de données non seulement sur les acides gras liés au glycérol mais également sur leur position sur le glycérol (Figure 29) {Byrdwell & Emken 1995; Byrdwell 2001; Mottram & Evershed 1996; Mu *et al.* 2000}.

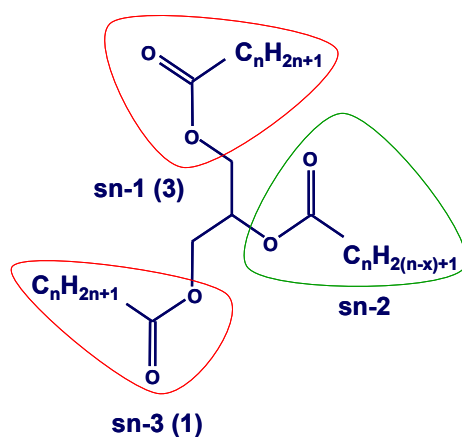


Figure 29 : Formule semi-développée d'un triglycéride avec les positions des acides gras indiquées. [General structure of a triacylglycerol, with the position of the fatty acids on the glycerol backbone indicated]

La perte de l'acide gras en position *sn-2* est moins favorisée que celle des acides gras en position *sn-1* ou *sn-3*, en tout cas avec les énergies d'ionisation relativement faibles rencontrées en APCI MS (Figure 30). Les intensités relative des pics $[M - RCO_2]^+$ sont caractéristiques de la position des acides gras dans le triglycéride concerné (Figure 30).

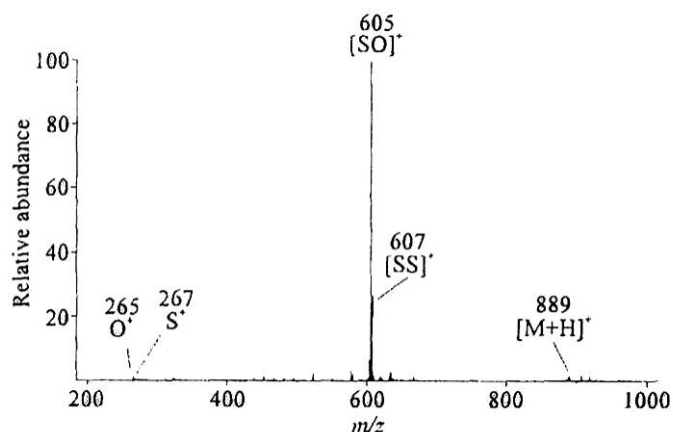


Figure 30 : Spectre de masse APCI du triglycéride 1,3-distéarine-2-oléine (SOS) {Mottram & Evershed 1996}. [The APCI mass spectrum of 1,3-distearoyl-2-oleoyl glycerol (SOS)]

Le moins abondant des pics $[M - RCO_2]^+$ correspond à la perte de l'acide gras en position *sn*-2, pour un triglycéride de type ABC. Pour des triglycérides de type AAB et ABA, c'est le rapport $[AA]^+/[AB]^+$ qui permet de rendre compte de l'acide gras en position *sn*-2 (Tableau 6).

AAB	$[AA]^+/[AB]^+$	ABA	$[AA]^+/[AB]^+$
A en <i>sn</i> -2	~ 1	B en <i>sn</i> -2	~ 0.25

Tableau 6 : Rapport des intensités de pics correspondant à la perte des acides gras, en spectrométrie de masse à ionisation APCI pour des triglycérides de type AAB et ABA {Mottram & Evershed 1996}. [Relative abundances of $[AA]^+$ and $[AB]^+$ ions in ABA and AAB type triacylglycerols, using APCI MS]

Après avoir montré l'intérêt de la spectrométrie de masse APCI pour l'analyse régio-spécifique de triglycérides de référence, cette même équipe a travaillé sur des échantillons de plus en plus complexes, tout d'abord des huiles végétales, puis des graisses animales et enfin des produits laitiers. La complexité des matériaux considérés a nécessité de mettre en place des protocoles de préparation différents pour chaque type d'échantillons.

Comme nous l'avons indiqué plus haut, dans le paragraphe concernant les biomarqueurs des matières grasses, les graisses animales qu'elles soient de type graisses sous-cutanées ou produits laitiers sont, à l'état natif, essentiellement composées de triglycérides. Le but des études présentées ci-dessous a été d'identifier le plus finement possible les biomarqueurs des différents types de graisse. Aucune publication ne traite de l'application de ces résultats à des échantillons archéologiques.

Dans la publication traitant des graisses animales sous-cutanées {Mottram *et al.* 2001}, l'étude en parallèle des acides gras méthylés issus de l'hydrolyse des triglycérides en CPG, des acides gras en position *sn*-2 obtenus par action d'une lipase spécifique et analyse en CPG et celle des triglycérides non hydrolysés par HPLC couplée à l'APCI MS a été menée (Tableau 7).

Acides gras	Bœuf	Poulet	Agneau	Porc
C _{14:0}	8.4		7.4	
C _{14:1}	1.4			
C _{15:0}				
C _{16:0}	11.6	9.4	20.8	54.8
C _{16:1}	4.8	1.9	2.8	2.0
C _{17:0}	6.0		7.7	
C _{17:1}	7.5			
C _{18:0}	21.4	14.3	19.8	7.2
C _{18:1}	35.8	40.5	38.4	15.3
C _{18:2}	1.0	29.8	0.2	19.1
C _{18:3}	1.9	4.1	2.9	1.7

Tableau 7 : Distributions des acides gras en position *sn*-2 (pourcentage par rapport à la somme des acides gras à cette position) pour 4 échantillons de graisses sous-cutanées de référence {Mottram et al. 2001}. [Distribution of fatty acids in the *sn*-2-position, determined by quantification of the TAG species present in the HPLC-APCI MS profiles]

L'analyse régio-spécifique a permis de déterminer quantitativement la distribution en acides gras présents en position *sn*-2, ce qui pourrait être utilisé dans la discrimination des graisses animales archéologiques, car présentant une certaine spécificité. Enfin, la comparaison des résultats HPLC-APCI MS avec les données obtenues à partir de l'hydrolyse des triglycérides par une lipase spécifique des positions *sn*-1 et *sn*-3, a montré une bonne corrélation avec les données HPLC-APCI MS pour la graisse d'agneau et la graisse de porc, et une nettement moins bonne corrélation pour les graisses de bœuf et de poulet. Ceci pourrait être dû à une certaine spécificité de la lipase pour certains acides gras {Mottram *et al.* 2001}.

Après l'identification des triglycérides présents dans des échantillons de graisses sous-cutanées, cette même équipe s'est attaquée à la caractérisation de la composition du lait de vache. La composition en triglycérides du lait de vache est parmi les plus complexes existantes {Alonso *et al.* 1999; Creamer & MacGibbon 1996; Gresti *et al.* 1993; Jensen 2002; Ruiz-Sala *et al.* 1996}. L'analyse directe d'un échantillon d'une telle complexité par HPLC-APCI MS ne permet pas d'obtenir sa composition exacte. L'analyse sans fractionnement du lait de vache donne 55 pics peu ou pas résolus, auxquels il est très difficile d'attribuer des composés (Figure 31) {Mottram & Evershed 2001}.

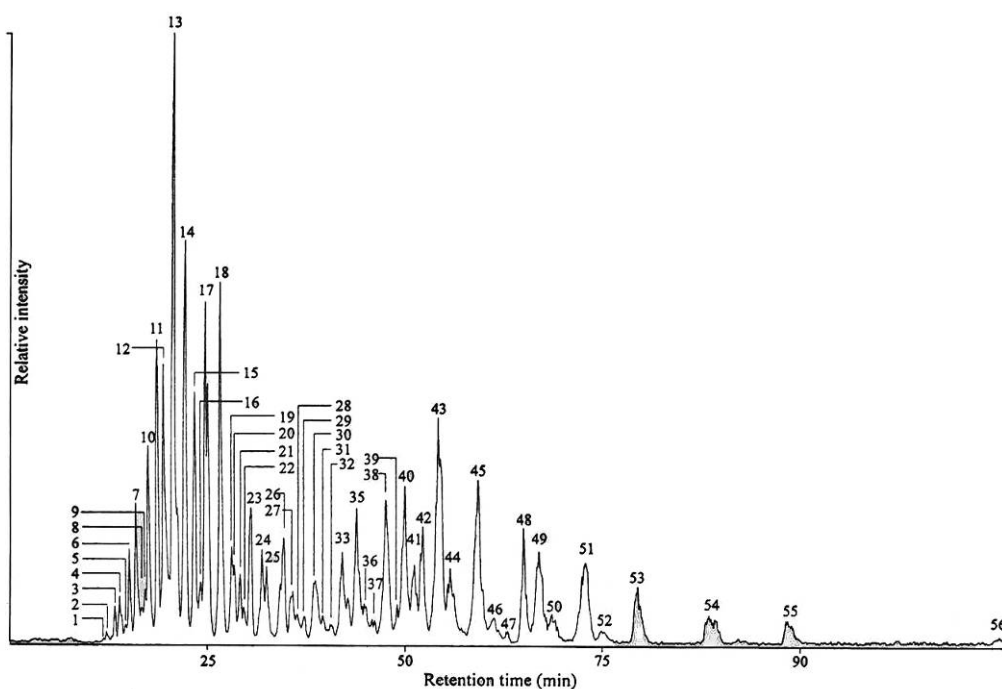


Figure 31 : Chromatogramme obtenue en HPLC/APCI MS de lait de vache entier {Mottram & Evershed 2001}. [The HPLC–APCI-MS profile of whole milk fat]

En effet, l'absence de pic moléculaire en spectrométrie de masse rend difficile la connaissance du nombre d'atomes de carbone (CN) de l'ensemble des triglycérides présents, et ceci d'autant plus que la séparation en HPLC est basée sur le nombre d'atomes de carbone équivalent (ECN). Ce dernier correspond au CN moins deux fois le nombre de doubles liaisons (n):

$$ECN = CN - 2n$$

Afin de simplifier les données obtenues (Figure 31), une première séparation par CCM sur couche de silice a été effectuée, permettant de récupérer 2 fractions. Celle de plus grand R_f correspondant aux triglycérides les plus lourds est toujours trop complexe pour être correctement séparée et ses composés identifiés en HPLC/MS. La fraction la plus basse, de plus petit R_f , est, quant à elle, totalement résolue en HPLC/MS, et contient des espèces ayant une entité butyrate ($C_{4:0}$), majoritairement en position *sn*-1 ou *sn*-3. Une autre technique de séparation a alors été testée afin de séparer le lait en un plus grand nombre de fractions. Il s'agit de la chromatographie par perméation de gel, ou chromatographie d'exclusion stérique sur gel polystyrène/divinylbenzène (Encadré i). Ce type de chromatographie est basé sur la taille des molécules à séparer, les plus grosses étant plus retenues que les plus petites qui passent plus facilement dans les mailles du gel. Il s'agit d'une technique couramment utilisée pour l'analyse de la polydispersité des polymères.

i. Pré-fractionnement des extraits lipidiques par GPC (Gel Permeation Chromatography)

Colonne 60 cm × 10 mm ID.

Particule de diamètre 10 µm, taille des pores 50 Å, polystyrène/divinylbenzène.

Phase mobile: dichlorométhane/méthanol 2:1 v/v; 3 mL/min.

Ici, le solvant utilisé est un mélange binaire dichlorométhane/méthanol (2:1; v/v), et les mécanismes de migration semblent être régis par la polarité et non pas par l'exclusion stérique. Les auteurs ne se sont pas appesantis sur cette question. Seize fractions sont collectées. Les 12 premières sont analysées en parallèle en HPLC/MS et CPG/SM, afin de combiner les données obtenues sur le CN en CPG et celles obtenues sur l'ECN et la structure des triglycérides en HPLC/MS. Les 4 dernières fractions, contenant les triglycérides de plus grand ECN ne sont analysées qu'en HPLC/MS car elles sont très bien résolues avec cette technique seule (Encadré j).

j. Protocole HPLC

Deux colonnes en série LC-18 (25 cm x 10 mm ID).

Phase liée octadécyle, particules de diamètre 5 µm, taille des pores 100 Å.

Phase mobile: propionitrile, 0.8 mL/min.

Injection: échantillons dissous dans le propionitrile (5 % v/v), 20 µL injecté.

Conditions APCI MS

Température de vaporisation 450°C.

Température du capillaire 280°C.

Courant corona 5 µA.

Gaz: hydrogène, 60 p.s.i. 20 mL/min.

Gamme de masse m/z 200-1000, durée de scan 2 s.

Nous avons dit plus haut que la séparation en HPLC en phase inverse était basée sur l'ECN. Il existe quelques règles d'élution qui aident à l'identification des triglycérides coélusés {Andrikopoulos 2002; Mottram & Evershed 2001; Mu *et al.* 2000; Spanos *et al.* 1995}. A même ECN, en phase inverse, les triglycérides portant des acides gras insaturés sont élués avant les triglycérides portant des acides gras saturés. Il peut cependant y avoir des inversions d'élution par rapport aux ECN. Ainsi, quand le triglycéride possède des chaînes très courtes ou des chaînes fortement insaturées, son temps de rétention diminue, et inversement, dans le cas de très longues chaînes ou de chaînes saturés, le temps de rétention augmente. Les auteurs observent une inversion d'élution pour les triglycérides avec un ECN = 44 correspondant aux structures $C_{16:0}/C_{18:1}/C_{18:3}$ et $C_{12:0}/C_{18:1}/C_{18:1}$ qui éluent avant des triglycérides ayant un ECN = 42 avec les structures $C_{6:0}/C_{18:0}/C_{18:0}$ et $C_{8:0}/C_{16:0}/C_{18:0}$. La présence d'acides gras ramifiés à nombre impair

d'atomes de carbone peut aussi être à l'origine de changement dans l'ordre d'éluion, de la même manière que la géométrie des doubles liaisons joue un rôle. Les triglycérides avec des acides gras à doubles liaisons *cis* éluent avant les triglycérides correspondant avec une configuration *trans*. La séparation des triglycérides en HT CPG/SM sur colonne polarisable est, quant à elle, basée sur le nombre d'atomes de carbone (pour le protocole voir la partie sur l'analyse des triglycérides en HT CPG/SM). L'ionisation par impact électronique, utilisée en CPG/SM est plus énergétique que l'ionisation par APCI, utilisée en HPLC/MS, et permet d'obtenir des pics d'ions acylium $[RCO]^+$ plus abondants, ce qui, combiné à la connaissance du nombre d'atomes de carbone du pic chromatographique, aide à l'identification des triglycérides (Figure 32).

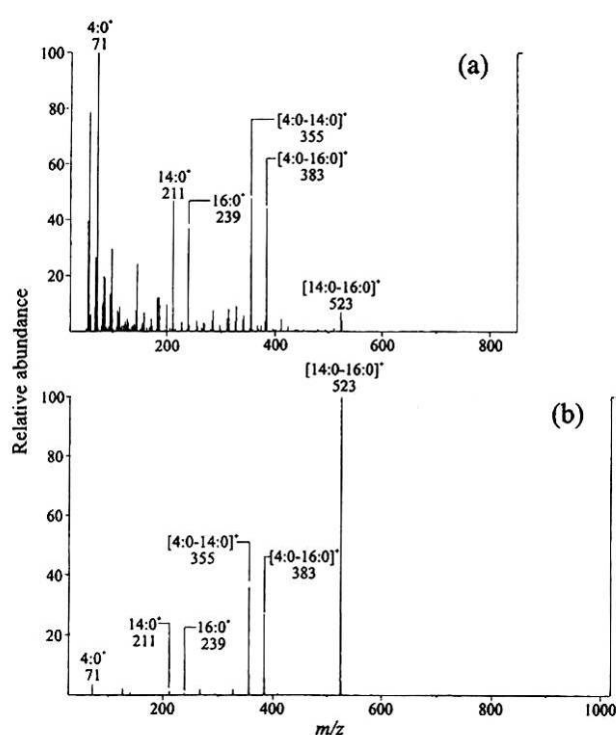


Figure 32 : Spectres de masse en impact électronique (a) et en APCI (b) du triglycéride $C_{4:0}-C_{14:0}-C_{16:0}$ {Mottram & Evershed 2001}. [The mass spectra of butyrylmyristoylpalmitoyl glycerol (4:0-14:0-16:0) resulting from (a) electron ionisation and (b) atmospheric pressure chemical ionisation]

La combinaison de ces deux techniques, HPLC/APCI MS et HT CPG/SM a permis d'identifier 120 triglycérides, depuis le $T_{28:0}$ jusqu'au $T_{54:5}$. Nous ne décrivons pas ici toutes les espèces identifiées, ceci étant peu en rapport avec l'objet de ce travail bibliographique.

C.3.1.2. L'analyse de résidus organiques archéologiques

Nous en venons maintenant aux études d'échantillons archéologiques. Il n'en existe que deux à notre connaissance, traitant spécifiquement des résidus organiques retrouvés dans des céramiques archéologiques. Il y a bien eu d'autres études en HPLC et HPLC/MS sur des matériaux organiques archéologiques, mais qui sortent du but de cette présentation (colorants dans les textiles, résines etc.). Ces deux études montrent, pour la première, la présence d'huile végétale dans des tessons provenant de lampes du site de Sagalassos (Turquie, 6^{ème} – 7^{ème} s. ap. J.-C.) {Kimpe *et al.* 2001} et pour la deuxième, la présence de graisse animale mélangée à de la cire d'abeille dans des céramiques de cuisine de la même époque, toujours sur le site de Sagalassos {Kimpe *et al.* 2002}. Une troisième publication reprend tous les résultats sur l'étude de tessons provenant de ce site {Kimpe *et al.* 2004}. Dans le cas des extraits lipidiques de lampes, l'étude préliminaire en HT CPG/SM n'a pas fourni beaucoup d'informations, mis à part la présence de stérols végétaux et l'absence de stérols animaux, ce qui permet d'en déduire l'absence de matière grasse animale, ou alors que celle-ci n'était présente qu'à une très faible proportion {Kimpe *et al.* 2001}. Cependant, l'utilisation d'une colonne de 30 m avec une phase stationnaire CP SIL 8-CB (5% Phenyl 95% dimethylpolysiloxane) ne permet pas d'éluer les composés de haut poids moléculaire comme les triglycérides. La comparaison avec les données obtenues en HPLC/MS n'est donc pas possible. La quantité d'acides gras a été calculée à partir de l'analyse des FAMES obtenus par saponification et dérivation de l'extrait lipidique total. L'acide palmitique C_{16:0} est majoritaire dans les 8 échantillons étudiés, ce qui ne semble pas en accord avec les données HPLC/MS. En effet, la distribution en triglycérides obtenue est caractérisée par une majorité de composés avec des acides gras C₁₈, soit l'acide oléique C_{18:1} soit l'acide linoléique C_{18:2} (Figure 33).

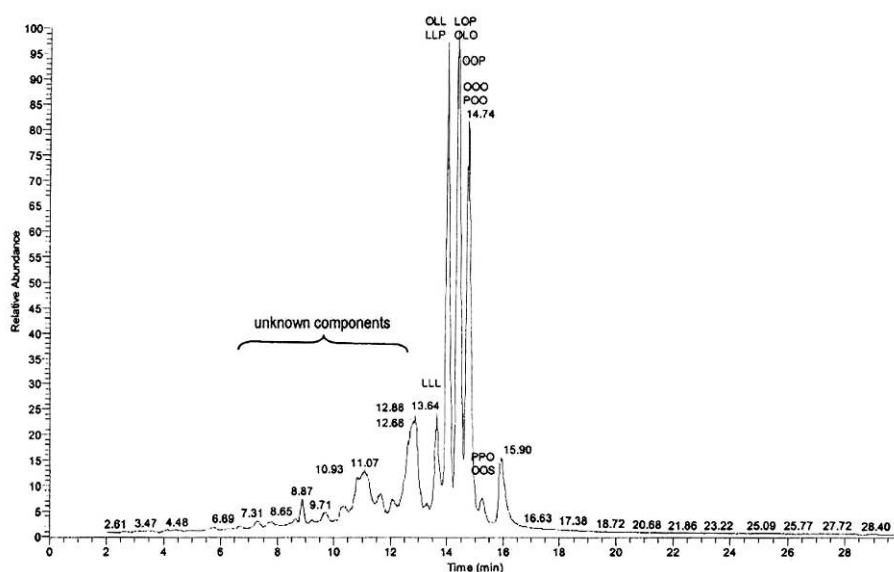


Figure 33 : Chromatogramme obtenu en HPLC/APCI MS d'un extrait lipidique d'une lampe antique (P- acide palmitique C_{16:0}, S- acide stéarique C_{18:0}, O- acide oléique C_{18:1}, L- acide linoléique C_{18:2}) {Kimpe et al. 2001}. [Ion chromatogram of triacylglycerols of the lipid extract of an antique oil lamp analysed with LC-APCI-MS]

Là encore la séparation se fait en fonction de l'ECN, de 42 à 50. Une dizaine de triglycérides sont détectés, présents dans 5 pics chromatographiques. Il n'y a pas d'inversion d'élution, sauf pour le triglycérides T_{50:1} (ECN 48) qui élue en même temps que le triglycéride T_{54:2} (ECN 50), après les autres triglycérides avec un ECN 48. Le chromatogramme présenté n'est malheureusement pas attribué à un échantillon particulier, mais dans une figure suivante on peut voir que six des échantillons ont la trioléine comme triglycéride majoritaire, ce qui est caractéristique de l'huile d'olive.

Pour deux échantillons cependant, deux autres triglycérides sont majoritaires, OOP (dioléate-palmitate glycérol, T_{52:2}) dans un cas et OSS (oléate-distéarate glycérol, T_{54:1}) dans l'autre. Les auteurs concluent à la présence de traces d'autres huiles, sans aller plus loin, alors qu'il peut également s'agir de produits de dégradation de triglycérides insaturés. Comme dans le cas des tessons d'amphores présenté plus haut, les auteurs s'appuient sur les données archéologiques pour limiter le référentiel étudié. Il est dommage qu'aucune étude sur un référentiel élargi d'huiles n'ait été menée. La contextualisation des échantillons est très importante mais, comme on l'a vu dans le cas des échantillons de lampes du site crétois de Mochlos, elle peut conduire à des postulats fondés sur le bon sens, qui s'avèrent faux. Dans ce cas, les archéologues s'attendaient à trouver l'huile d'olive comme composant pour l'éclairage alors que les analyses chimiques ont permis de montrer qu'en réalité c'était de la cire d'abeille qui avait été utilisée (Evershed 1997-b). Dans l'étude concernant des tessons de céramiques de cuisson du site de Sagalassos (Kimpe 2002), identifiées comme telles à cause des traces de suie sur la surface externe, de la cire d'abeille est

identifiée par HPLC/MS à partir de la présence d'esters et diesters palmitiques. Cependant, lors de l'analyse par HT CPG/SM, la détection d'alcools pairs à longue chaîne et de β -sitostérol a conduit les auteurs à conclure en la présence de plantes. Or il est connu que les produits de dégradation de la cire d'abeille sont notamment les alcools à longue chaîne, provenant de l'hydrolyse des esters palmitiques {Heron *et al.* 1994; Regert *et al.* 2001a}. La présence d'esters de triterpènes est, elle, bien caractéristique de composés végétaux. Ces derniers auraient donc été associés à la cire d'abeille. Les auteurs dans leur description des données obtenues par HT CPG ne font jamais référence aux esters palmitiques ni aux triglycérides, ce qui paraît étrange au vu du protocole d'analyse. En effet, contrairement à l'étude précédente, les échantillons sont analysés sur une colonne apolaire de 15 m, ce qui devrait permettre de détecter à la fois les triglycérides et les esters. Les données HT CPG et HPLC/MS ne sont jamais comparées dans cette étude, ce qui paraît regrettable (Encadré k).

k. Extraction soxhlet

Broyage du tesson, 5 g, ajout d'un standard interne.

Chloroforme/méthanol 2:1 (v/v) 30 mL, 4h.

Aliquot 1 de l'extrait : préparation des acides gras méthylés FAMES

KOH méthanolique (100 μ L, 5 %).

Ajout d'eau bidistillée (200 μ L) et extraction des FAMES au cyclohexane (1 mL).

Analyse des FAMES sur colonne BPX70 (60 m \times 0.32 mm I.D., 0.25 μ m).

Aliquot 2 de l'extrait : triméthylsilylation de l'extrait lipidique total

Ajout de BSTFA, N-méthyl-N(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (50 μ L, 60°C, 1h).

Analyse des dérivés silylés sur colonne CP SIL-8 (15 m \times 0.32 mm I.D., 0.25 μ m).

Aliquot 2 ou 3 : analyse sans préparation en HPLC/MS

Colonne phase inverse LC-18 (25 cm \times 4.6 mm).

Gradient de méthanol et isopropanol (pas de précision), 0.8 mL/min.

Interface et spectromètre de masse à ionisation APCI.

Température de vaporisation 500°C.

Température du capillaire 225°C.

Courant corona 5 μ A.

Gamme de masse m/z 200-1200 scannée en 0.2 s.

Dans les échantillons archéologiques analysés par HPLC/MS, la cire d'abeille semble être mélangée à de la graisse animale, caractérisée par la présence de triglycérides en grande quantité. L'identification de ces triglycérides s'est faite de la même manière que précédemment {Kimpe *et al.* 2001; Mottram *et al.* 2001}. Afin d'identifier les matières grasses animales, les auteurs se basent non seulement sur la distribution en triglycérides détectée par HPLC/MS mais aussi sur le

rapport P/S (acide palmitique/acide stéarique), la présence de l'acide *trans*-vaccénique (*trans*- Δ^{11} -C_{18:1}) et également sur le fait que certains triglycérides saturés sont présents en grande proportion {Kimpe *et al.* 2001, 2002; Kimpe *et al.* 2004}. Ils en déduisent qu'il ne peut pas s'agir de graisse de porc car l'acide *trans*-vaccénique est synthétisé majoritairement par les ruminants. Ils déduisent de la présence de tristéarine (SSS, T_{54:0}) et de disréarate-palmitate glycerol (SSP, T_{52:0}) qu'il s'agit probablement de graisse de mouton, ce qui leur semble confirmé par le ratio P/S, plus proche de celui du suif de mouton que de l'huile d'olive. A aucun moment dans leurs interprétations ils ne semblent réellement prendre en considération la dégradation des triglycérides. De la même manière, lorsqu'ils étudient la distribution en acides gras méthylés, ils ne prennent en compte que deux critères alors qu'Evershed et coll. ont montré qu'il était possible de discriminer les graisses de ruminant des graisses de non ruminants de manière simple à partir de ce type de données mais en se basant sur un ensemble de critères {Evershed *et al.* 2002}. Enfin, malgré la mise en garde qu'ils font eux même sur le rapport P/S, qui peut être sujet à de très fortes variations lors du vieillissement des graisses et des huiles, ils ne s'en servent qu'en comparaison avec le suif de mouton et l'huile d'olive. On retrouve là le problème du référentiel biaisé. Quant à la cire d'abeille, si elle est identifiée sur des critères valables, l'interprétation qu'ils font semble trop réduite. Elle peut en effet être caractéristique de la préparation de la cire en mélange avec des graisses animales pour un éventuel produit utilisé pour l'éclairage. Cependant, comme les auteurs le remarquent eux-mêmes, pour les lampes étudiées du même site aucune trace de cire d'abeille n'a été trouvée. La cire, particulièrement lorsqu'elle est retrouvée en mélange avec des graisses animales, peu recouvrir deux fonctions. Soit elle a servi d'imperméabilisant pour la céramique, soit elle peut être résiduelle de l'utilisation de miel dans des recettes culinaires ou médicinales {Regert *et al.* 2001a; Regert *et al.* 2003a}. Le miel est composé de sucres, qui sont très sensibles à l'hydrolyse et à la lixiviation par l'eau du sédiment. Il est donc très difficile d'en trouver des traces, et l'un des moyens peut justement être l'identification de la cire résiduelle. Si ces études montrent un certain nombre de points faibles, il n'en reste pas moins que l'application de la chromatographie liquide à des échantillons organiques archéologiques semble être prometteuse, particulièrement pour l'analyse des triglycérides qui sont difficilement caractérisés par chromatographie en phase gazeuse {Kimpe *et al.* 2001, 2002}.

Par ailleurs, la chromatographie liquide peut être tout à fait intéressante pour étudier un autre type de biomarqueurs, les protéines.

C.3.2. les protéines

La véritable difficulté dans l'analyse des protéines conservées en contexte archéologique, que ce soit dans la paroi des céramiques ou sur des artefacts lithiques par exemple, réside dans leur extraction {Craig & Collins 2002}. Cette fraction protéique est extrêmement mal caractérisée de nos jours à cause de cela. Elle recèle pourtant un certain potentiel informatif, bien qu'il soit encore difficile de le cerner. Les extractions de protéines les plus courantes sont celles impliquant une rupture de la chaîne peptidique, que ce soit par hydrolyse chimique ou par dégradation thermique {Carbini *et al.* 1996; Evershed & Tuross 1996; Oudemans & Boon 1991; Oudemans *et al.* 2007; Regert *et al.* 2001b; Regert *et al.* 2003a}. Nous avons vu dans le paragraphe consacré à l'analyse de la fraction insoluble par pyrolyse couplée à la CPG et à la CPG/SM qu'il était possible de déterminer la présence de molécules dérivant des acides aminés conservés sous forme libre ou liés dans des échantillons archéologiques {Oudemans & Boon 1991; Ratcliff *et al.* 1974; Regert *et al.* 2001b; Shedrinsky *et al.* 1989}. Mais ces molécules, si elles permettent de montrer la présence de protéines ou de peptides, ne sont pas suffisamment caractéristiques pour identifier le type de protéines présentes. Différentes méthodes ont été employées pour essayer de caractériser les protéines conservées dans une matrice céramique, et surtout pour évaluer leur potentiel informatif. L'étude des protéines avec des méthodes d'extraction variées, depuis l'extraction des acides aminés libres ou libérés par hydrolyse jusqu'à l'extraction des protéines entières, a été suivie de l'analyse des extraits par HPLC {Evershed & Tuross 1996}. Un autre axe a été l'application des méthodes de détection immunologique à ce type de résidus organiques, avec tout un travail sur l'extraction et sa validation {Craig *et al.* 2000; Craig & Collins 2000, 2002}. Le développement récent de la protéomique, avec sa sensibilité accrue et sa grande spécificité, ouvre de nouvelles voies pour la caractérisation des protéines conservées dans le patrimoine culturel {Burgaud 2003; Tokarski *et al.* 2006}.

C.3.2.1. La chromatographie liquide

Les protéines sont des biopolymères d'acides aminés liés entre eux par des liaisons amides (aussi appelées liaisons peptidiques). Tout comme les lipides, ce sont des biomarqueurs très abondants de la plupart des matières naturelles, mais ils sont beaucoup plus informatifs. Cependant, ce sont également des biomarqueurs qui résistent moins que les lipides aux réactions de dégradation comme l'hydrolyse, la lixiviation par le sol, l'oxydation, etc. {Eglinton & Logan 1991; Philp & Oung 1988}. L'étude que nous présentons a été réalisée sur un corpus d'échantillons archéologiques et de référence dont le potentiel lipidique avait déjà été exploité

{Evershed & Tuross 1996}. Il s'agissait de tester la quantité de protéines et/ou de peptides qui pouvait être extraite des échantillons archéologiques et de valider leur potentiel informatif. Les échantillons proviennent du projet archéologique *Raunds Area Project* (Northamptonshire, Royaume-Uni). Les résultats obtenus sur la fraction lipidique de ces échantillons ont été présentés plus haut {Evershed *et al.* 1991; Evershed 1993b; Evershed *et al.* 1994; Evershed *et al.* 1995b; Heron *et al.* 1991; Mottram *et al.* 1999} de même que les résultats sur les céramiques expérimentales {Charters *et al.* 1993b; Charters *et al.* 1997; Evershed *et al.* 1995a}. Des graisses animales principalement et des cires végétales ont été identifiées dans les céramiques mises au jour sur ce site. Cette étude s'est déroulée en plusieurs étapes, tout d'abord l'extraction des acides aminés libres puis l'hydrolyse des protéines en acides aminés et leur analyse en HPLC suivies de l'extraction des protéines ou peptides résiduels et de leur séparation par électrophorèse sur gel. La comparaison avec les extraits protéiques du sédiment environnant a été réalisée afin de déterminer le risque de pollution, comme cela avait déjà été fait pour les lipides {Heron *et al.* 1991}. Nous ne décrivons pas les protocoles mis en place, ceux-ci n'ayant plus été utilisés par la suite. Les céramiques expérimentales, ayant servi à cuire du chou ou de l'agneau n'ont montré aucune trace d'acides aminés libres. L'hydrolyse suivie de l'extraction des acides aminés provenant de peptides/protéines a quant à elle révélé des compositions distinctes. La glycine, acide aminé principal du collagène, est majoritaire dans les extraits de tessons ayant servi à cuire de l'agneau. Dans le cas des tessons de céramiques ayant servi à cuire du chou, c'est l'acide glutamique qui est majoritaire. Malheureusement ces résultats ne semblent pas suffisamment caractéristiques, et c'est ce qu'ont conclu les auteurs. Afin de déterminer le potentiel d'extraction de protéines entières, de l'albumine de sérum bovin a été ajoutée à un tesson broyé, ne présentant pas de traces d'acides aminés (libres ou liés). L'extraction à l'urée puis l'électrophorèse de cet extrait sur gel d'acrylamide SDS (sodiumdodécylsulfate) a montré que l'extraction de protéine jusqu'à une concentration de quelques nanogrammes était possible. Cette extraction n'a pas été appliquée aux céramiques de cuisson expérimentales. L'extraction et l'analyse des acides aminés libres et hydrolysés des paires tessons archéologiques/sédiment a montré que leurs profils étaient très différents, avec une plus grande concentration d'acides aminés hydrolysés dans le sol. Ces profils, tout comme ceux observés pour les céramiques expérimentales n'étaient pas caractéristiques. L'extraction de protéines entières des tessons archéologiques, et leur séparation en électrophorèse a montré qu'aucune protéine intacte n'était détectée. En conclusion de leur étude, les auteurs insistent sur le fait que si les protéines sont absorbées dans la céramique, bien qu'en quantité moindre que les lipides, les conditions généralement acides de l'argile ne sont pas une bonne condition de préservation. Seule la gélatine, produit de dégradation du collagène a été mise en évidence dans des échantillons archéologiques. L'intérêt de ce protocole semble donc très

relatif. Il s'agit là de la seule étude en HPLC concernant les résidus protéiques contenus dans des céramiques qui ait fait l'objet d'une publication. Les études suivantes sont plutôt basées sur les méthodes immunologiques, avant que les premiers essais en protéomique n'aient lieu.

C.3.2.2. Les analyses immunologiques

Les analyses immunologiques sont basées sur la reconnaissance des protéines par des anticorps spécifiques. Il existe différentes méthodologies, que nous ne décrivons pas ici, qui ont été appliquées majoritairement à la détection de protéines anciennes sur des objets lithiques, notamment sur des traces supposées de sang {Shanks *et al.* 2001}. Elles font encore souvent l'objet de polémiques, notamment à cause de l'absence de blanc permettant de tester les faux positifs {Craig & Collins 2002} et à cause de l'absence de contrôle du rendement d'extraction. Les études menées sur des résidus organiques imprégnés dans des céramiques ne sont pas très nombreuses {Craig *et al.* 2000; Craig *et al.* 2005a; Craig & Collins 2000, 2002; Craig *et al.* 2003}. La problématique de l'adsorption des protéines sur une surface argileuse a été étudiée par différentes équipes en géochimie notamment. Le Tableau 8 résume l'état de la question sur les mécanismes identifiés {Craig & Collins 2002}.

Name	Cation exchange	Anion exchange	Water bridge and ion-dipole	Van der Waal bonds	Hydrophobic interactions
Type of interaction Description	Electrostatic Cationic regions of protein replace metal ions bound to the negatively charged mineral surface	Electrostatic Negatively charged regions of protein bind to the positively charged regions of the mineral surface	Short range Exchangeable cations on the surface of clay minerals interact via ion-dipole and water bridges with organic molecules	Short range In close proximity, weak van der Waals interactions between mineral and protein occur. Especially relevant for large polymers as overall sorption will be favoured as each segment bonds	Short range Proteins form hydrophobic interactions with surface bound organics. Participating surfaces: any organic rich mineral surface
Participating surfaces	All clay minerals	Crystal edges of clay minerals: particularly significant for kaolinite	All clay minerals	Any mineral surface	Any organic rich mineral surface
Participating proteins/ structures	Positively charged amino groups	Negatively carboxyl groups	A diverse range of functional groups (e.g. -OH, C-H groups)	A diverse range of functional groups (e.g. -OH, C-H groups) but particularly relevant to large molecules	Hydrophobic regions
References	Theng, 1974; Mortland, 1970; Hedges & Hare, 1987	Huang, 1990; Hedges & Hare, 1987	Greenland, Laby & Quirk, 1964	Lyklema, 1986	Boyd & Mortland, 1990

Tableau 8 : Résumé des procédés géochimiques impliqués dans les interactions minéral/protéines {Craig & Collins 2002}. [Summary of geochemical processes involved in protein mineral interactions]

L'essai en parallèle de différentes méthodes d'extraction déjà appliquées à l'extraction de protéines d'objets lithiques a été mené afin de déterminer la meilleure technique d'extraction pour la reconnaissance immunologique de protéines anciennes {Craig & Collins 2002}. Pour cela, de

l'albumine de sérum bovin (BSA) a été mélangée en quantité connue à de la céramique finement broyée, et chauffée afin de simuler la dégradation. Sept réactifs d'extraction ont été testés, avec le complexe protéine/céramique, de la céramique neutre et une solution de BSA. Différents temps d'incubation ont également été testés. Après dialyse des échantillons, une partie a été analysée par spectrophotométrie, à 280 nm qui est la longueur d'onde à laquelle la BSA absorbe linéairement. Les résultats montrent que tous les échantillons se trouvent sous le seuil d'absorbance à 280 nm, ce qui veut dire que moins de 250 µg de protéine ont été extraites. Ce qui correspond à environ 3 % du total de BSA initial. Le test immunologique par ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay), avec un anticorps spécifique de la BSA a été tout d'abord fait sur de la BSA chauffée non adsorbée, qui a montré la même réactivité que la BSA fraîche. Des tests sur de la caséine dégradée et sur du lait en poudre dégradé ont également été réalisés afin de déterminer d'éventuels faux positifs. L'anticorps choisi est spécifique de la BSA par rapport aux protéines du lait en tous cas. Des contrôles positifs (BSA extraite) et négatifs (céramiques sans BSA extraites) ont été testés en même temps que les extraits dialysés des complexes BSA/céramique extraits. Seuls 3 extraits BSA/céramique donnent une réponse en ELISA, avec un bruit de fond acceptable (contrôles négatifs) mais beaucoup plus faible que la réponse des contrôles positifs. Ceci est donc en accord avec les résultats obtenus en spectrophotométrie. Il semble donc que pour les céramiques de cuisson, le chauffage prolongé entraîne une dénaturation des protéines et des changements de conformation qui semblent renforcer les liaisons protéines-céramique, ce qui pose visiblement problème lors de l'extraction des protéines. La réponse en ELISA des contrôles positifs montre que le chauffage et l'extraction ne dénaturent pas les épitopes de reconnaissance des anticorps. A partir de ces conclusions, les auteurs ont développé une nouvelle méthodologie d'extraction suivie du test immunologique sans dialyse {Craig & Collins 2000}. Ils l'ont appelée DACIA, pour *Digestion And Capture ImmunoAssay*. Plusieurs types d'échantillons ont été analysés. L'extraction a été testée sur un complexe céramique/BSA comme décrit plus haut. Puis des tests sur des céramiques expérimentales ayant servi à cuire du lait et enfouies pendant un an et sur des céramiques ethnographiques ayant contenu du lait, dont le parcours était connu, ont été mis en œuvre. Enfin des contrôles négatifs et positifs ont été analysés, ainsi que des tests sur d'autres protéines pour déterminer d'éventuelles réactions croisées. L'échantillon est incubé à basse température avec de l'acide fluorhydrique (HF) dans un tube spécial à paroi hautement adsorbante. La matrice minérale est "digérée" et les protéines libérées s'adsorbent sur la paroi, ce qui les stabilise et diminue l'hydrolyse acide. Une fois les restes de HF neutralisés, la réaction immunologique est lancée directement dans le tube. Le principe de la réaction immunologique est schématisé en Figure 34.

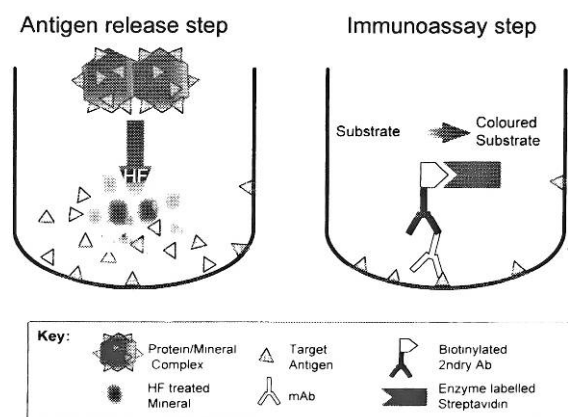


Figure 34 : Schéma du protocole DACIA (*Digestion and Capture ImmunoAssay*) en deux étapes, la phase de digestion et la phase de détection {Craig & Collins 2000}. [A schematic diagram of the Digestion and Capture Immunoassay (DACIA) shown in two steps: the initial digestion phase and the immunological detection of any released antigen after neutralisation]

Les analyses sur le complexe céramique/BSA ont permis de tester un certain nombre de paramètres. L'extraction a été testée avec l'acide fluorhydrique, l'urée et également le solvant utilisé durant toutes les manipulations. L'extraction au HF s'est révélée la meilleure, à basse température afin de limiter l'hydrolyse acide des protéines. Les épitopes de reconnaissance par un anticorps spécifique de la BSA ne sont pas endommagés, HF étant un acide extrêmement corrosif mais relativement faible en terme d'acidité. Les auteurs ont cherché à mettre au point un système binaire de présence/absence de protéines, sans quantification. Ils ont choisi en conséquence le substrat utilisé dans la reconnaissance des anticorps, pour son faible bruit de fond (contrôles négatifs), une limite de détection très basse (20 ng de BSA) et une bonne reproductibilité. Le temps optimal de digestion par HF a été déterminé sur les céramiques expérimentales, avec un anticorps de l' α -caséine, protéine caractéristique du lait. Les résultats sont positifs, de même que pour les céramiques ethnographiques. Une fois ces données obtenues, cette équipe a analysé des échantillons archéologiques, provenant d'un site de l'âge du fer, dans les Hébrides (Milieu du 1^{er} millénaire av. J.-C.; Royaume-Uni) {Craig *et al.* 2000; Craig *et al.* 2005a}. Neuf tessons provenant de céramiques de cuisson ont été analysés en DACIA, avec un anticorps monoclonal spécifique de l' α -caséine bovine, chauffée et déphosphorylée. Sept tessons ont réagi positivement, tandis que les sédiments associés n'ont jamais donné de réponse positive. Ceci a permis de s'assurer que les tessons n'étaient pas pollués par le sédiment environnant, comme cela a été montré pour les lipides {Heron *et al.* 1991}. Les auteurs concluent à la forte présence du lait et de ses dérivés dans l'économie locale, en s'appuyant également sur les restes osseux. En effet, 42 % des individus sont de très jeunes veaux, ce qui indique un abattage préférentiel de cette tranche d'âge, qui est compatible avec l'hypothèse d'une économie basée sur l'exploitation des produits laitiers {Halstead 1998}. Cependant, les analyses n'ont été mises en oeuvre que sur 9 céramiques,

sans que soit donné le total de céramiques retrouvées sur ce site. Il ne s'agit donc pas du tout d'une étude statistique, ce qui serait nécessaire pour tirer des conclusions quant à une éventuelle spécialisation économique. Les auteurs de ces études se sont ensuite penchés sur l'analyse de différents sites archéologiques européens, dans une optique de détermination de l'échelle d'exploitation des produits laitiers au Néolithique {Bogucki 1984, 1986; Copley *et al.* 2005a; Craig 2002; Craig *et al.* 2003; Craig *et al.* 2005b; Sherratt 1983}. La question qui se pose autour des produits laitiers n'est en effet pas tellement de savoir si ces derniers étaient consommés au Néolithique, ce qui semble très probable, mais plus de savoir quelle était l'importance de cette activité dans les économies préhistoriques et à partir de quand elle a y pris une place importante.

C.3.2.3. La protéomique

La dernière méthodologie que nous allons décrire dans ce paragraphe concerne les essais en protéomique réalisés afin de déterminer la présence de protéines ou de peptides caractéristiques des produits laitiers. Ceci n'a pas fait l'objet de publications, car hormis les résultats obtenus sur des céramiques expérimentales, aucun résultat n'a été obtenu sur des céramiques archéologiques. Cependant, une méthodologie protéomique a été développée sur des échantillons de liants de peinture, et semble très prometteuse quant à l'application de la protéomique à des échantillons fortement dégradés {Tokarski *et al.* 2006}. A la lumière des études réalisées en immunologie, le manque de résultats sur des échantillons archéologiques avec la sensibilité pourtant très grande de la protéomique semble dû à l'extraction des protéines {Burgaud 2003}. La méthodologie développée s'est basée sur les méthodes couramment utilisées en protéomique, avec l'analyse des protéines après digestion par une enzyme spécifique, la trypsine. Avec la digestion tryptique, il est possible d'obtenir un ensemble de peptides caractéristiques de la protéine étudiée. La trypsine est en effet une endopeptidase à spécificité étroite, qui coupe les protéines du côté C-terminal de résidu lysine (Lys) ou arginine (Arg), sauf dans le cas d'une proline liée à ces acides aminés. Les premiers tests ont été faits sur des échantillons de lait, avec la mise au point de l'extraction des protéines. Différentes étapes préliminaires sont nécessaires pour faciliter la digestion. Tout d'abord la protéine est dénaturée, afin de rompre les liaisons non-covalentes responsables de la conformation de la protéine, ceci permettant d'augmenter les interactions solvant/protéines. Puis les ponts disulfures sont réduits et alkylés, afin de libérer les dernières liaisons covalentes responsables des conformations de la protéine. La digestion peut ensuite avoir lieu, et le mélange de peptides obtenus est analysé par MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*).

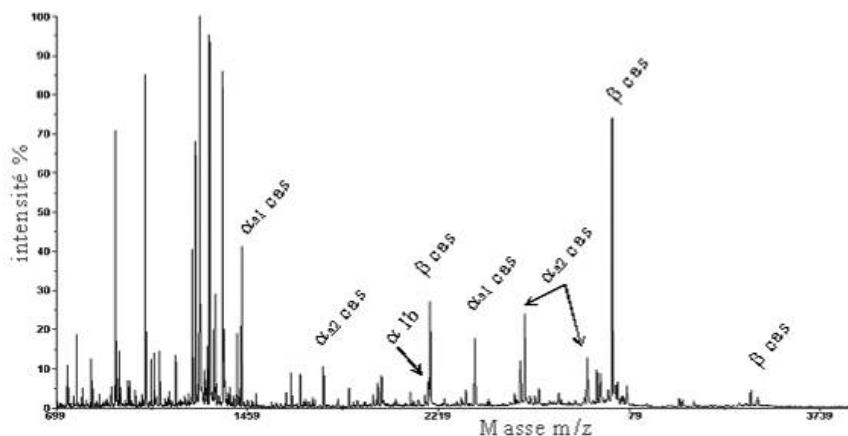


Figure 35 : Spectre MALDI de lait de chèvre uht ½ écrémé, digéré directement et dessalé par colonne Zip-Tip. Les pics identifiés sont indiqués (Cas signifie caséine et lb pour lactalbumine) d'après Burgaud 2003. [MALDI mass spectrum of semi-skimmed UTH goat milk, digested without prior extraction and desalted on a Zip Tip column]

Une fois les spectres de masse obtenus (Figure 35), la liste de pics est comparée aux données présentes dans les bases de données protéomiques disponibles sur Internet. Cela permet d'identifier les peptides présents et par conséquent les protéines. En relevant le nombre d'acides aminés présents dans les peptides identifiés et en comparant leur nombre au nombre total d'acides aminés de la protéine, il est possible de calculer un taux de recouvrement, qui va permettre de comparer les résultats des différentes méthodes d'extraction testées. Trois techniques d'extraction des protéines du lait ont été testées, par centrifugation, par dialyse et par solvant (chloroforme), en parallèle de l'analyse directe des échantillons. C'est cette dernière méthode qui a donnée les meilleurs taux de recouvrement, avec l'identification des 6 protéines majoritaires du lait, l' α_{s1} -caséine, l' α_{s2} -caséine, la β -caséine, la κ -caséine, l' α -lactalbumine et la β -lactoglobuline. Le problème de la présence de sels dans les échantillons, qui sont ionisés préférentiellement aux peptides, a été résolu en dessalant soit par dialyse soit par utilisation de cône zip-tip. L'identification des protéines présentes dans un échantillon présente deux intérêts. Tout d'abord, cela permet de déterminer la présence ou l'absence de lait. Mais surtout, et c'est là que réside le potentiel de la protéomique, cela devrait permettre de discriminer les espèces mises en jeu. Les protéines du lait sont très similaires d'une espèce à une autre. Cependant il existe des séquences peptidiques qui sont caractéristiques de telle ou telle espèce (Tableau 9).

<i>Protéine</i>	<i>Peptide</i>	<i>Masse correspondant pour la vache</i>	<i>Masse correspondant pour la chèvre</i>
α s1-caséine	38-49	1384,7299	1435,8096
	95-105	1337,6808	1363,6852
α s2-caséine	189-196	979,5611	1052,5563
	213-220	975,5985	933,5152
β -caséine	185-198	1591,9318	1331,8157
	115-122	927,4716	985,5135
	113-120	873,4862	931,5281
	192-198	830,4519	inexistant
κ -caséine	90-107	1980,0912	1978,0756
	38-45	955,5247	983,5196

Tableau 9 : Peptides caractéristiques du lait de vache et du lait de chèvre respectivement, pour les caséines du lait {Burgaud 2003}. [Characteristic peptides of cow and goat milks respectively, for the milk caseins]

La différenciation des espèces peut donc se faire sans ambiguïté, en tous cas sur du lait, puisqu'elle s'effectue par l'étude de la séquence des protéines via celle de l'empreinte peptidique obtenue en MALDI-TOF MS. Une fois ces bases posées, des céramiques expérimentales, imprégnées de lait de vache et de chèvre ont été étudiées. A la différence des études réalisées en immunologie, les céramiques expérimentales testées n'ont pas subi de chauffage. Ce qui pourrait avoir comme conséquence une moins grande adsorption des protéines sur la paroi argileuse, et donc une extraction plus facile. Quatre solvants d'extraction ont été testés, avec différents temps d'imprégnation des tessons. C'est l'eau acidifiée au TFA (acide trifluoroacétique) qui s'est révélée le meilleur solvant, et l'interrogation des banques de données a permis de mettre en évidence, dans la majorité des échantillons, 4 des 6 protéines majoritaires du lait, les trois caséines et la lactalbumine (Figure 36).

Il a également été possible de remonter à l'espèce d'origine grâce aux séquences peptidiques caractéristiques présentées dans le Tableau 9. Les auteurs ne décrivent aucune application de leur méthodologie à des échantillons archéologiques.

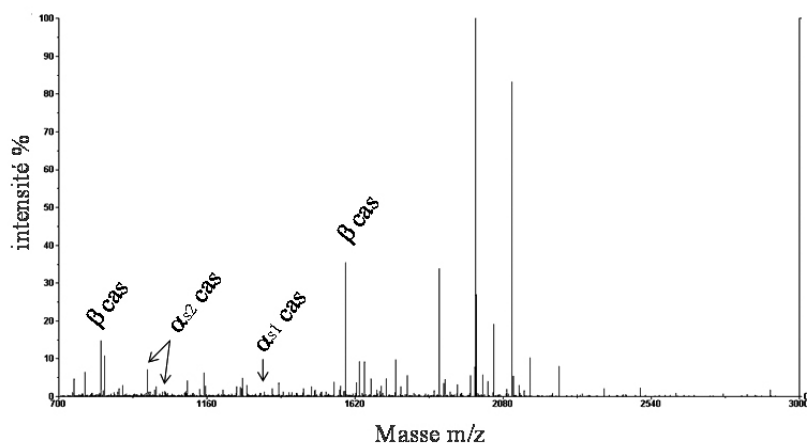


Figure 36 : Spectre MALDI d'un tessou imprégné pendant 2 fois 15 minutes de lait de vache pasteurisé. De l'eau acidifiée a servi comme solvant d'extraction. Les cinq pics indexés correspondent à des peptides caractéristiques ($m/z = 830.45 ; 975.60 ; 979.56 ; 1337.68 ; 1591.93$) d'après Burgaud 2003. [MALDI mass spectrum of the protein extract (acidified water) of a model potsherd impregnated with cow milk]

Pour conclure cette partie sur les protéines, on a vu qu'il est difficile d'extraire ces dernières d'une matrice argileuse, particulièrement dans le cas de chauffage, à cause des liaisons très fortes qui sont créées. Si la plupart des études n'a pas permis d'obtenir de résultats probants, c'est certainement à cause de ce problème d'extraction, comme Craig et coll. le montrent pour les essais réalisés en immunologie {Craig & Collins 2002}. Le principal défaut des techniques immunologiques est qu'il est nécessaire d'avoir des anticorps très spécifiques. Lors d'une étude croisée entre différents laboratoires sur un résidu de lait de chameau dont avait été imprégnée une céramique, l'équipe ayant mené des tests immunologiques avec toute une batterie d'anticorps n'a pas été à même de déterminer de quelle espèce il s'agissait, le lait de chameau ne figurant pas dans les anticorps testés. L'extraction à l'acide fluorhydrique est extrêmement performante. Mais il faudrait tester cette technique d'extraction associée à la protéomique, et vérifier que les séquences peptidiques ne sont pas endommagées. Cela permettrait de se libérer des conditions pré-requises en immunologie (choix de l'anticorps), en profitant de la capacité d'identification des banques de données internationales.

Il existe d'autres matériaux retrouvés dans des céramiques, qui sont les matériaux de type résineux, adhésifs ou enduits de céramiques. Nous ferons également un point sur les autres types d'adhésifs identifiés à l'heure actuelle, dans d'autres contextes que les céramiques. Nous verrons également les techniques qui ont été mises au point pour l'analyse des résidus de boissons fermentées, et également pour l'analyse de cosmétiques anciens.

D. Les matériaux résineux et bitumineux

Les matériaux dits "résineux" que l'on rencontre en Préhistoire comprennent principalement des résines et des brais ou goudrons, obtenus par chauffage de la résine, du bois résineux ou de l'écorce d'arbres. Ils sont caractérisés par la présence de composés terpéniques. Ils ont servi, depuis le Paléolithique, d'adhésifs, et ce à diverses fins, adhésifs d'emmanchement et adhésifs de réparation (Néolithique ancien en Europe tempérée). Ils ont également servi d'enduits imperméabilisant pour les céramiques, et ont parfois été brûlés, sans que l'on sache dans quel but. Après avoir présenté rapidement les composés terpéniques, nous verrons quels sont les différents protocoles qui ont été mis au point pour leur analyse dans le cadre de résidus archéologiques, retrouvés ou non sur des céramiques. Nous verrons ensuite les différents biomarqueurs des brais et des résines les plus couramment retrouvés en archéologie, ainsi que leurs fonctions, avant de faire le point sur les autres types d'adhésifs identifiés comme les bitumes et les composés animaux.

D.1. Prérequis sur les résines, les brais et les goudrons

D.1.1. Vocabulaire

Lorsque l'on parle de résine, de brai, de goudron ou de bitume, il est nécessaire de faire un point sur les notions que ces mots recouvrent. Une résine est un exsudat de plante, insoluble dans l'eau. Elle permet la protection des végétaux supérieurs contre la perte d'eau et l'intrusion de micro-organismes en cas de blessure {Beck *et al.* 1989; Pollard & Heron 1996}. On appelle brai, *tar* en anglais, le pyrolysate de l'écorce d'arbre, ou de la résine. Et on appelle goudron ou poix, *pitch* en anglais, le produit du chauffage du brai (*wood tar pitch*) {Hayek *et al.* 1990; Hayek *et al.* 1991}. Cependant ces définitions sont assez fluctuantes et la concordance anglais-français diffère d'un article à un autre. En pratique, on parle de brai de bouleau {Aveling & Heron 1998; Binder *et al.* 1990; Charters *et al.* 1993a; Dudd & Evershed 1999; Lucquin *et al.* 2007}- *birch bark tar* - pour identifier la substance obtenue par chauffage de l'écorce de bouleau (*Betula*) même si certains auteurs parlent parfois de *birch bark pitch* pour identifier le brai de bouleau {Koller *et al.* 2001; Reunanen *et al.* 1993}. Le mot *pitch* semble recouvrir à peu près tous les types de chauffage de résines ou de bois résineux, issus d'arbres de la famille des *Pinaceae* {Beck *et al.* 1989; Colombini *et al.* 2005a; Robinson *et al.* 1987}, mais il est parfois considéré comme synonyme de *tar*. Nous parlerons dans ce cas là de résines chauffées car les modes d'obtention de

ces composés, par chauffage de résine ou de bois résineux est encore mal expliqué dans la littérature.

D.1.2. Les terpènes

Quel que soit le nom que l'on donne à ces matériaux, résine, brai, goudron ou poix, ils sont très largement composés de mélange de terpènes. Ces molécules sont faites à partir de l'isoprène, le 2-méthylbuta-1,3-diène (Figure 37). Les terpènes sont classés en fonction du nombre d'unités isoprènes qu'ils contiennent.

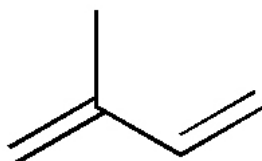


Figure 37 : Structure de la molécule d'isoprène, à la base des composés terpéniques. [Molecular structure of isoprene]

Les monoterpènes contiennent deux unités isoprènes (C_{10}), ils sont volatils et sont présents par exemple dans l'ambre, qui est une résine fossile. Les sesquiterpènes sont composés de 3 unités isoprènes (C_{15}) et sont également volatils. On trouve des sesquiterpènes dans la plupart des résines et des brais, mais ils ne sont généralement pas détectés en contexte archéologique à cause de leur volatilité {Pollard & Heron 1996; Regert *et al.* 2006}.

Les diterpènes sont composés de 4 unités isoprènes (C_{20}) et on les retrouve dans les résines de conifères (familles des Pinaceae, Cupressaceae et Araucariaceae) et les résines de plantes légumineuses (famille des Fabaceae). Une revue des différents diterpènes et de la littérature correspondante est publiée tous les ans dans le journal *Natural Product Reports*, éditée par la *Royal Society of Chemistry*, disponible sur le site www.rsc.org, pour les exemplaires datant d'avant 2005, {Hanson 2000, 2001, 2002, 2003, 2004a, 2004b}. Les principaux terpènes présents dans les résines de conifères (Famille des Pinaceae, genre *Pinus*, *Abies* ou *Picea* dans les régions tempérées d'Europe) sont des molécules avec des squelettes carbonés de type abiétane, pimarane et labdane {Hanson 2001; Pollard & Heron 1996}. Les labdanes sont des composés bicycliques, alors que les abiétanes et les pimaranes sont des molécules tricycliques (Figure 38).

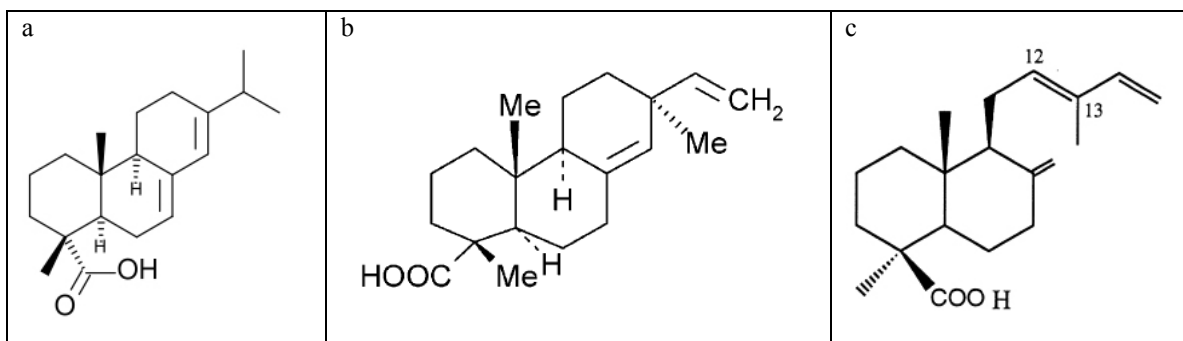


Figure 38 : Structures de l'acide abiétique (a, squelette abiétane), de l'acide pimarique (b, squelette pimarane) et de l'acide *trans*-communiqué (c, squelette labdane). [Molecular structure of abietic, pimaric and transcommunic acids]

Les triterpènes sont composés de 6 unités isoprènes (C_{30}) et peuvent être tétracycliques ou pentacycliques. Ce sont les plus ubiquistes des terpènes. On les retrouve dans l'écorce de bouleau (famille des Betulaceae), les résines de pistachier (*Pistacia atlantica*) et le mastic (*Pistacia lentiscus*, Pistachier de Chios) (famille des Anacardiaceae), les résines dammar (famille des Dipterocarpaceae) ou encore dans l'olibanum (encens) et la myrrhe (famille des Burseraceae). Les diterpènes et les triterpènes sont très rarement retrouvés dans les mêmes résines. Pour exemple, les principaux triterpènes retrouvés dans l'écorce de bouleau sont présentés en Figure 39.

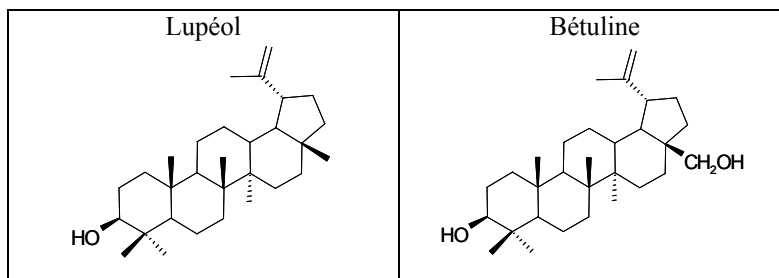


Figure 39 : Structures de triterpènes retrouvés dans l'écorce de bouleau (*Betula*), le lupéol et la bétuline. [Molecular structure of the main triterpenoids of birch bark, lupeol and betuline]

Les triterpènes ont une très grande variété de structures, nous n'en présentons que quelques unes en Figure 40 {Connolly & Hill 2002, 2003; Mathe *et al.* 2004; Mills & White 1989; Scalarone *et al.* 2003; Stern *et al.* 2003; van der Doelen 1999}.

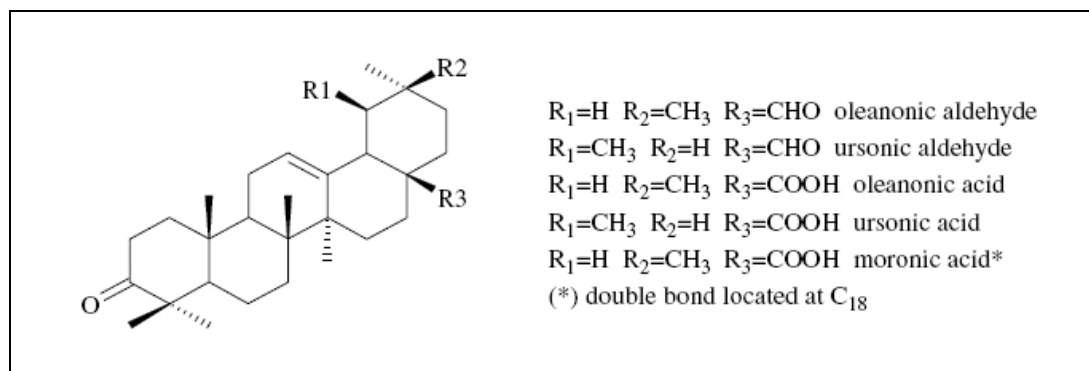


Figure 40 : Structure de quelques triterpènes couramment retrouvés dans les résines utilisées pour les beaux-arts {Scalarone *et al.* 2003}. [Molecular structure of some triterpenoids found in resins used in art]

Ce très bref aperçu des différentes classes de terpènes, particulièrement les diterpènes et les triterpènes n'est pas exhaustif. Nous allons décrire plus amplement ceux qui ont été retrouvés en contexte archéologiques, qu'ils soient biomarqueurs de résine ou de brai ou encore marqueurs de dégradation anthropique (chauffage intentionnel par l'homme) ou naturel (diagenèse dans le sédiment).

D.1.3. Les échantillons

Il existe différents types d'échantillons de composés dits résineux retrouvés en contexte archéologique. Les quatre principales classes sont

- les adhésifs d'emmanchement, observés sur des outils ou des armes lithiques ou métalliques {Aveling & Heron 1998; Fox *et al.* 1995; Hayek *et al.* 1990; Hayek *et al.* 1991; Koller *et al.* 2001; Regert *et al.* 1998b; Regert *et al.* 2000; Regert & Rolando 2002; Regert 2004}
- les adhésifs de réparation de céramique, observés sur des cassures anciennes de poteries {Charters *et al.* 1993a; Dudd & Evershed 1999; Hayek *et al.* 1990; Masschelein-Kleiner 1989; Regert *et al.* 2000; Regert & Rolando 2002; Regert *et al.* 2003b; Regert 2004}
- les résidus retrouvés dans les céramiques ou dans le sédiment, qui peuvent être des résidus de préparation d'adhésifs, des stocks d'adhésifs non utilisés ou encore des composés résineux brûlés {Aveling & Heron 1998; Binder *et al.* 1990; Dudd & Evershed 1999; Eerkens 2002; Hayek *et al.* 1990; Lucquin *et al.* 2007; Regert *et al.* 2000; Regert 2004; Stern *et al.* 2003}
- les enduits internes de céramiques, en général des amphores {Beck *et al.* 1989; Colombini *et al.* 2005a; Hayek *et al.* 1990; Mills & White 1989; Reunanen *et al.* 1993; Stern *et al.* 2003}

Ces échantillons, après une première étape d'extraction suivie éventuellement d'une purification ou d'un fractionnement, sont dérivés pour être analysés en chromatographie en phase gazeuse.

D.2. Les protocoles analytiques

L'examen à l'œil et au microscope optique reste extrêmement important pour une première classification de ces matériaux, qui ont des caractéristiques assez particulières. En effet, les résines ont un aspect légèrement brillant, parfois coloré dans les tons orangés. Les brais sont, eux, de couleur brun clair à brun foncé, avec un aspect homogène et opaque {Regert *et al.* 2003a; Robinson *et al.* 1987}. Il arrive que les brais ou les résines soient calcinés et on peut alors les confondre avec des résidus carbonisés alimentaires. Dans ce cas, l'étape d'extraction est similaire à celle mise en œuvre pour les résidus alimentaires carbonisés et c'est avec l'analyse chromatographique qu'il est possible de les identifier.

La spectroscopie infrarouge est encore parfois utilisée comme technique de *screening*, permettant d'identifier la présence de composés terpéniques, grâce aux bandes d'absorption des acides carboxyliques et des composés aromatiques et aliphatiques. La comparaison avec les spectres de référence disponibles permet de réduire la gamme d'identification, mais sans que l'échantillon soit totalement caractérisé {Beck *et al.* 1989; Regert *et al.* 2003a; Robinson *et al.* 1987}.

Nous ne discuterons pas des toutes premières méthodologies analytiques mises au point pour identifier ces matériaux. C'est avec l'application de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse que de réels progrès ont été faits, pour leur caractérisation et leur identification. Ces composés, que ce soit des résines ou des brais et goudrons, sont des mélanges moléculaires complexes de diterpènes ou de triterpènes,

On peut classer les protocoles existants en différentes catégories:

- Extraction, suivie d'une dérivation avant analyse en chromatographie en phase gazeuse.
- Préparation mettant en jeu un préfractionnement des échantillons par chromatographie flash ou SPE – *Solid Phase Extraction* – ou encore par chromatographie sur couche mince (CCM), suivie de dérivations spécifiques à chaque fraction avant analyse en chromatographie en phase gazeuse.
- Analyse en spectrométrie de masse sans séparation chromatographique.
- Microextraction en phase solide (SPME) suivie de l'analyse des composés volatils en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Les protocoles ne sont pas standardisés et diffèrent en fonction des équipes.

D.2.1. Extraction/dérivation

La quantité d'échantillon nécessaire est très faible: de 1 à 10 mg suffisent. L'extraction se fait principalement au dichlorométhane, ou avec un mélange binaire chloroforme/méthanol (2:1 v/v) {Aveling & Heron 1998; Charters *et al.* 1993a; Dudd & Evershed 1999; Eerkens 2002; Fox *et al.* 1995; Regert *et al.* 1998b; Regert *et al.* 2003b; Regert 2004}. Il existe d'autres protocoles plus exotiques, qui font l'objet d'une ou deux publications à chaque fois, extraction au tétrahydrofurane {Hayek *et al.* 1990}, à l'éther {Beck *et al.* 1989; Mills & White 1989}, au toluène {Binder *et al.* 1990}, à divers solvants {Koller *et al.* 2001}. Les extractions au dichlorométhane ou au chloroforme/méthanol ne nécessitent pas de précautions particulières et sont conseillées par rapport aux autres. L'extraction mise au point par Koller *et al.* est néanmoins intéressante, car elle permet de faire une sorte de fractionnement des échantillons sans passer par une étape de chromatographie flash ou sur couche mince, tout en donnant une idée du type de résidu présent (Tableau 10).

Solvant	Groupe chimique ou matrice	Composés extraits
Isooctane (ou hexane)	Cire et plastifiants	- Composés aliphatiques - Phtalates - Phosphates - Acides gras
Méthanol	Résines naturelles Brais de bois tendres (conifères) Résines fossiles	- Monoterpènes - Sesquiterpènes - Diterpènes - Triterpènes
Acétone	Brais de bois durs (bouleau)	- Triterpènes - Triterpènes défonctionnalisés
Chloroforme	Goudrons fossiles (bitumes)	- Composés aliphatiques de très haut poids moléculaire - Triterpènes défonctionnalisés - Esters de la cire

Tableau 10 : Solvants utilisés lors des différentes étapes d'extraction des résines, brais et bitumes archéologiques, et composés extraits, d'après Koller *et al.* 2001. [Extraction solvents used for the extraction of resins, tars and bitumen]

Les extraits sont ensuite analysés en chromatographie en phase gazeuse, avec une étape de dérivation (Encadré 1). Les composés peuvent être méthylés, au diazométhane ou au trifluorure de bore méthanolique ou encore triméthylsilylés au BSTFA/TMCS.

I. Préparation des échantillons d'adhésifs et d'enduits

Extraction

Prélèvement de quelques mg d'échantillon.

Mise en solution dans le dichlorométhane ou dans le chloroforme/méthanol (2:1 v/v), à une concentration de 1 mg/mL.

Extraction/solubilisation aux ultra-sons.

Dérivation au BSTFA (1)

Prélèvement d'une portion de l'extrait (environ 100 µL).

Evaporation à sec.

Ajout de BSTFA/TMCS (20 à 50 µL).

Chauffage à 70-80°C pendant 20 à 30 min.

Evaporation à sec, reprise dans le cyclohexane ou le dichlorométhane.

Injection de 1 à 2 µL dans le chromatographe.

Dérivation au BSTFA (2)

Prélèvement d'une portion de l'extrait (environ 100 µL).

Evaporation à sec.

Ajout de 10 µL de dichlorométhane, 5 µL de pyridine et 40 µL de BSTFA/TMCS.

20 min à température ambiante.

Evaporation à sec, reprise dans le cyclohexane ou le dichlorométhane.

Injection de 1 à 2 µL dans le chromatographe.

L'avantage de la dérivation au BSTFA est qu'elle n'est pas spécifique aux acides, et que les alcools sont également dérivés. Or certains composés terpéniques sont des alcools, notamment le lupéol et la bétuline, qui seront difficilement détectables sans dérivation. Une amélioration à la dérivation au BSTFA consiste en l'ajout de pyridine dans du dichlorométhane. La dérivation est ainsi catalysée, plus rapide et se fait à température ambiante. Les triterpènes sont alors entièrement dérivés, et chaque composé n'élue qu'en un seul pic chromatographique.

Les autres protocoles de préparation des échantillons sont beaucoup plus complexes.

D.2.2. Préfractionnement

Certains auteurs, afin de simplifier les chromatogrammes obtenus, passent par une étape de séparation physique des constituants avant leur analyse en chromatographie en phase gazeuse. Cette étape peut être de la chromatographie flash sur colonne de silice ou d'alumine, artisanale ou manufacturée (colonne de SPE) ou de la chromatographie sur plaque de silice (CCM, chromatographie sur couche mince). Nous ne présenterons ici que les protocoles destinés à séparer différentes fractions pour les analyser en CPG, et non pas les protocoles de purification

par SPE {Hayek *et al.* 1990; Hayek *et al.* 1991} ou d'analyse par CCM {Beck *et al.* 1989}. En effet, la purification des échantillons sans séparation des constituants du mélange n'apporte pas de sensibilité supplémentaire à leur analyse en chromatographie en phase gazeuse. De même, la chromatographie sur couche mince est sensible mais elle ne permet pas d'identifier les composés séparés. Elle peut cependant être utilisée au même titre que la chromatographie flash pour la pré-séparation des échantillons en vue de l'analyse de toutes les fractions en CPG.

Un des premiers protocoles publiés concerne l'analyse de goudrons de résine ou de bois de pin, provenant pour un échantillon d'un goudron qui a coulé d'une amphore transportée sur un navire étrusque (600 av. J.-C.), et pour les autres de différents échantillons retrouvés sur l'épave du Mary Rose (1509-1545 ap. J.-C.) {Robinson *et al.* 1987}. L'échantillon étrusque, qui nous intéresse dans le cadre de cette bibliographie, a été fractionné sur colonne d'alumine, sans extraction préalable (il a été déposé en tête de colonne). Il a ensuite été séparé en chromatographie sur couche mince de silice en deux fractions, acide et neutre, mais il n'est pas indiqué dans la publication de quelle fraction obtenue sur alumine il s'agit. Les (ou la) fractions acides ont été analysées après méthylation (BF_3/MeOH ou diazométhane), et les (ou la) fractions neutres ont été analysées après triméthylsilylation au BSTFA. Ce protocole, complexe à mettre en œuvre, n'a pas fait l'objet de publications ultérieures, d'autant qu'il n'apporte pas d'informations complémentaires.

Les autres protocoles mettent en œuvre la CCM {Charters *et al.* 1993a} ou la chromatographie flash {Dudd & Evershed 1999; Lucquin *et al.* 2007}. Le but est de séparer les composés acides des composés neutres, et parfois de séparer les composés neutres entre eux. La résolution de la CCM est moindre que la résolution obtenues en chromatographie flash, mais cette dernière nécessite plus de temps de mise au point, afin de trouver les différents solvants qui vont permettre une bonne séparation. Dans les deux cas il semble que le taux de recouvrement des composés élués soit bon, mais les auteurs ne donnent pas de détails plus pertinents. Avec les développements publiés ces dernières années, cette pré-séparation des constituants ne semble plus nécessaire, les données obtenues par extraction/dérivation puis analyse en CPG/SM sont suffisamment précises pour permettre l'identification des composés terpéniques.

Une étude a cependant montré l'intérêt d'une pré-séparation par fractionnement flash, pour l'identification de composés trop peu volatils pour être correctement identifiés en CPG/SM {Dudd & Evershed 1999}. Par analyse de l'extrait total (chloroforme/méthanol) en HT CPG sur colonne apolaire de 15 m, les auteurs ont détecté des acides gras, des triterpènes caractéristiques du brai de bouleau et deux séries de composés, éluant entre 300 et 350°C, dont les spectres de masse en IE ne permettaient pas l'identification. L'extrait total a donc été fractionné, mais malheureusement les auteurs ne donnent pas le protocole de fractionnement. La fraction acide est analysée après méthylation au BF_3/MeOH et les deux fractions neutres sont saponifiées avant d'être

triméthylsilylées. Dans les deux fractions neutres des acides gras et des triterpènes ont été identifiés, de même que dans la fraction acide. Les composés les plus lourds ont donc pu être identifiés à des esters triterpéniques, provenant de la condensation des acides gras d'une graisse animale avec les triterpènes du brai de bouleau. Il s'agit vraisemblablement dans ce cas d'un mélange intentionnel de brai de bouleau et de graisses animales. Celles-ci ont pu être ajoutées pour servir de plastifiant à l'adhésif, ou encore pour diminuer la température de fusion de l'écorce de bouleau lors de la préparation du brai.

D.2.3. Conditions analytiques en chromatographie en phase gazeuse

Les conditions chromatographiques sont relativement classiques, avec l'utilisation de colonnes capillaires apolaires ou très peu polaires de type DB-5 (5% phényldiméthylpolysiloxane) ou DB-1 (100% diméthylpolysiloxane). Les colonnes sont plus ou moins longues, entre 12 et 30 m, souvent sans pré-colonne ajoutée. Le Tableau 11 résume les différents types de colonne utilisée et les conditions chromatographiques. La détection se fait soit avec un détecteur à ionisation de flamme, soit avec un spectromètre de masse, ce qui est plus courant car les chromatogrammes obtenus sont souvent très complexes et il est difficile d'identifier les composés uniquement par leur temps de rétention. Il n'existe de plus que peu de composés standards, et uniquement pour les terpènes les plus communs, pas pour leurs produits de décomposition. Sauf lorsque cela est indiqué, l'injection se fait en mode *split/splitless*, avec des températures de l'ordre de 280 à 320°C.

Colonne	Conditions chromatographiques	Détection	Référence
OV-1 (eq. DB-1) 25 m × 0.3 mm, 0.17 µm 50 m × 0.3 mm, 0.17 µm	- H ₂ (50 cm.s-1) - T: 80 – 300°C à 4-6°C/min	- FID	{Robinson <i>et al.</i> 1987}
SE-54 (eq.DB-5) 25 m × 0.3 mm, 0.25 µm	- He - T: 80 – 300°C à 4-6°C/min	- IE, 70 eV	
Diméthylpolysiloxane 25 m × 0.53 mm	- He (37 cm.s-1) - T: 130 – 290°C à 5°C/min	- FID - IE, 70 eV, T _{source} 275°C	{Mills & White 1989}
Méthylsilicone 12 m	- Isotherme à 200°C	- FID	{Beck <i>et al.</i> 1989}
RSL 150 (eq. DB-1) 15m	- T: 100 – 250°C à 5°C/min	- SM	
DB-5 30 m × 0.33 mm, 0.1 mm	- He (0.9 bar) - T: 45 – 260 à 50°C/min – 290°C à 1.5°C/min	- FID - IE, 70 eV, T _{source} 250°C	{Hayek <i>et al.</i> 1990; Hayek <i>et al.</i> 1991}
SE-52 (eq. DB-5) 50 m × 0.3 mm	- He (1 bar) - T: 150 – 300°C à 4°C/min	- FID - IE, 70 eV, T _{source} 170°C	{Binder <i>et al.</i> 1990}
HP 1 (eq. DB-1) 12 m × 0.20 mm	- T: 100 – 290°C à 8°C/min	- SM	{Reunanen <i>et al.</i> 1993}
BP-1 (eq. DB-1) 12 m × 0.22 mm, 0.1 µm P-C: 60 cm × 0.5 mm	- He (20 psi) - T: 50 (2 min) – 350°C (10 min) à 10°C/min	- FID - IE, 70 eV, T _{source} 300°C	{Charters <i>et al.</i> 1993a}
BP-1 (eq. DB-1) 12 m × 0.22 mm, 0.1 µm	- He (25 psi) - T: 50 (2 min) – 350°C à 10°C/min	- FID	{Fox <i>et al.</i> 1995}
OV-1 (eq. DB-1) 25 m × 0.32 mm, 0.1 µm	- T: 50 – 350°C à 10°C/min	- IE, 70 eV	
BP-1 (eq. DB-1) 12 m × 0.22 mm, 0.1 µm	- He (1 mL/min, 40 psi) - T: 50 (2 min) – 350°C (8 min) à 10°C/min	- FID	{Aveling & Heron 1998}
BP-1 (eq. DB-1) 12 m × 0.22 mm, 0.1 µm	- He (10 psi) - T: 50 – 340°C (10 min) à 10°C/min	- IE, 70 eV	
CP Sil 8CB (eq. DB-5) 25 m × 0.25 mm, 0.25 mm	- He (16 psi) - Injecteur de Ross, T = 300°C - 60°C (1 min) – 150°C à 20°C/min – 310°C (30 min) à 4°C/min	- IE, 70 eV, T _{source} 190°C	{Regert <i>et al.</i> 1998b}
DB-1 15 m × 0.32 mm, 0.1 µm	- H ₂ - T: 50 (2 min) – 350°C (10 min) à 10°C/min	- FID - IE, 70 eV, T _{source} 170°C	{Dudd & Evershed 1999}
DB-5 15 m × 0.32 mm, 0.1 µm	- 45 mL/min (quel gaz?) - T: 80 (2 min) – 360°C à 10°C/min	- FID	{Koller <i>et al.</i> 2001}
DB-5 30 m × 0.25 mm	- He - T: 100 – 325°C à 12°C/min	- SM	{Eerikens 2002}
DB-1 15 m × 0.32 mm, 0.1 µm	- He (1 psi, 1 mL/min à 50°C) - T: 50 (2 min) – 340°C (12 min) à 10°C/min	- IE, 70 eV	{Stern <i>et al.</i> 2003}
5-CB (eq. DB-1) 30 m × 0.32 mm, 0.25 µm P-C: 5 m × 0.25 mm	- He (16 psi) - T: 50 (2 min) – 150°C à 10°C/min – 320°C (20 min) à 4°C/min	- FID - IE, 70 eV, T _{source} 180°C	{Regert <i>et al.</i> 2003b; Regert 2004}
5-CB (eq. DB-1) 15 m × 0.32 mm, 0.1 µm P-C: 1 m × 0.25 mm Injection <i>on-column</i>	- He, 2 mL/min (17 min) – 4 mL/min (4 min) – 6 mL/min (16 min) à 1 mL/min ² - T: 50 (2 min) – 350°C (10 min) à 10°C/min	- FID	
HP-5 MS (eq. DB-5) 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm	- He (1.2 mL/min) - T: 80 (2 min) – 200°C à 10°C/min – 280°C (35 min) à 6°C/min	- IE, 70 eV, T _{source} 230°C	{Colombini <i>et al.</i> 2005a}
HP-5 (eq. DB-5) 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm	- He (1 mL/min) - T: 40 – 300°C (30 min) à 4°C/min	- FID - IE, 70 eV, T _{source} 250°C	{Lucquin <i>et al.</i> 2007}

Tableau 11 : Conditions analytiques en chromatographie en phase gazeuse couplée ou non à la spectrométrie de masse pour les résines et brais (P-C: pré-colonne; DB-1: 100% diméthylpolysiloxane; DB-5: 5% phényl-95% diméthylpolysiloxane; FID: détecteur à ionisation de flamme; IE: spectrométrie de masse à impact électronique). [Experimental conditions in gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of resins and tars]

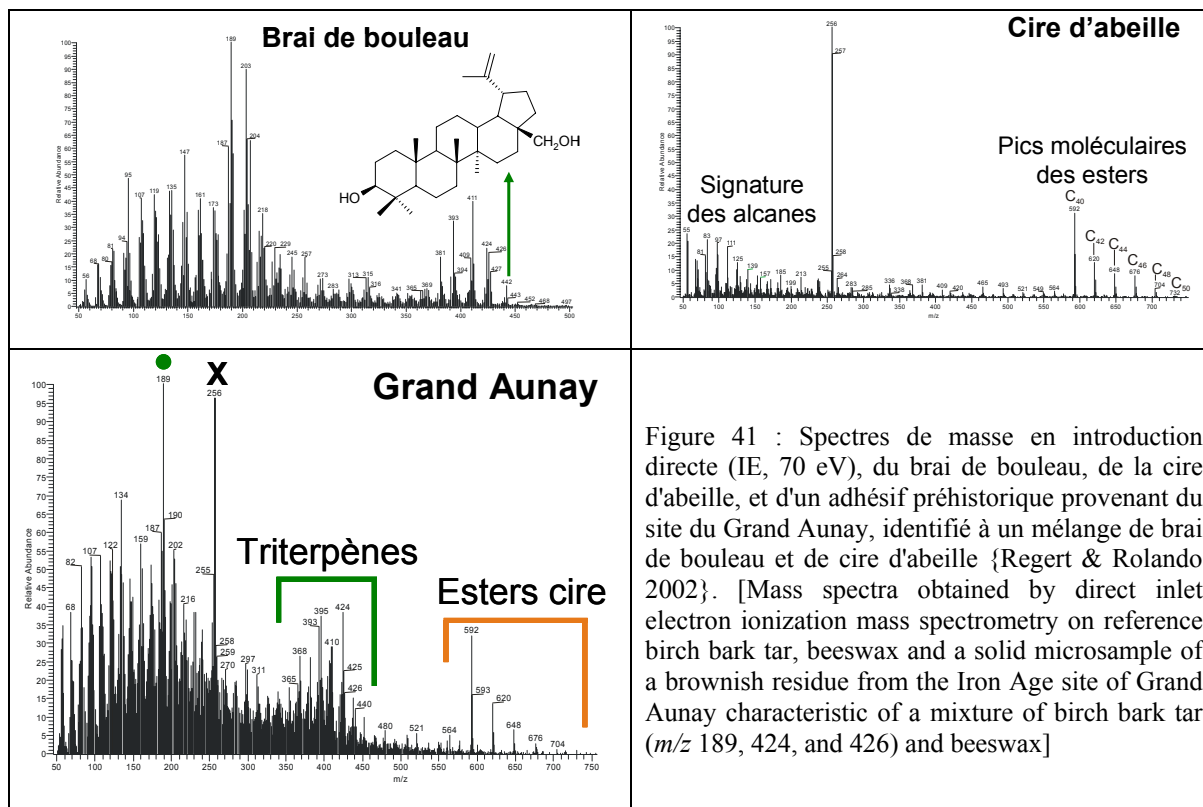
L'analyse sur colonne de 15 m permet d'identifier les biomarqueurs de la plupart des résines et des brais, mais la résolution est tout de même meilleure sur une colonne de 30 m. L'emploi de colonnes plus longues est déconseillé, car les triterpènes les plus lourds sont mal détectés.

Deux équipes ont également travaillé sur l'analyse en spectrométrie de masse à introduction directe.

D.2.4. Spectrométrie de masse à introduction directe

Afin de minimiser la taille du prélèvement à analyser, deux équipes ont développé une méthodologie basée uniquement sur la spectrométrie de masse à introduction directe, sans couplage à la chromatographie {Colombini *et al.* 2005a; Regert & Rolando 2002}. Certains échantillons sont en effet présents en très petite quantité, et la taille d'échantillon à prélever ne doit pas dépasser celle d'une tête d'épingle. C'est le cas notamment pour certains adhésifs d'emmanchement {Regert & Rolando 2002}.

La première équipe a travaillé sur un spectromètre de masse avec une canne de désorption, dans laquelle est introduit un creuset en pyrex contenant l'échantillon, dissout dans du dichlorométhane. La canne est programmée en température, 50°C pendant 30 s, suivi d'une montée en température jusqu'à 350°C en 2 min, et un palier de 120 s à 350°C. Les spectres sont obtenus en impact électronique à 70 eV ($T_{\text{source}} = 200^\circ\text{C}$, analyseur à trappe ionique). Après avoir analysé des composés de référence, résines de pin et de pistachier et huiles végétales (olive, lin et pavot) ainsi que de la cire d'abeille et du brai de bouleau, ils ont montré le potentiel discriminant de cette technique. En effet, bien que les spectres de masse obtenus soient complexes, les matériaux de référence sont caractérisés par des profils massiques distincts. Grâce à ces profils, il est possible d'identifier les matériaux dont sont composés les adhésifs anciens (Figure 41).



Cette technique présente le désavantage de ne pas caractériser tous les biomarqueurs et marqueurs de dégradation, ce qui empêche donc de déterminer avec précision l'état de dégradation de l'échantillon analysé. De plus, dans le cas de mélange, si un matériau est présent en plus grande quantité, son profil massique peut masquer le profil des autres composés. Cependant, cette technique est extrêmement utile pour discriminer en première étape les composés diterpéniques et triterpéniques, ou encore pour identifier des composés dits "lourds" comme la cire d'abeille. Ceci permet de mettre en place des méthodologies analytiques en chromatographie en phase gazeuse bien adaptées à l'ensemble des constituants du mélange.

C'est la conclusion à laquelle sont parvenus les auteurs de la deuxième publication, en comparant les données obtenues en spectrométrie de masse avec celles obtenues en couplage CPG/SM {Colombini *et al.* 2005a}. L'échantillon est déposé, après dissolution dans le dichlorométhane, sur un filament de rhénium, qui est introduit dans le spectromètre de masse. Ce filament est chauffé par application d'un courant, avec la programmation suivante: 20 s à 0 mA, de 0 à 1000 mA en 2 s, 60 s à 1000 mA (qui correspond à environ 1000°C).

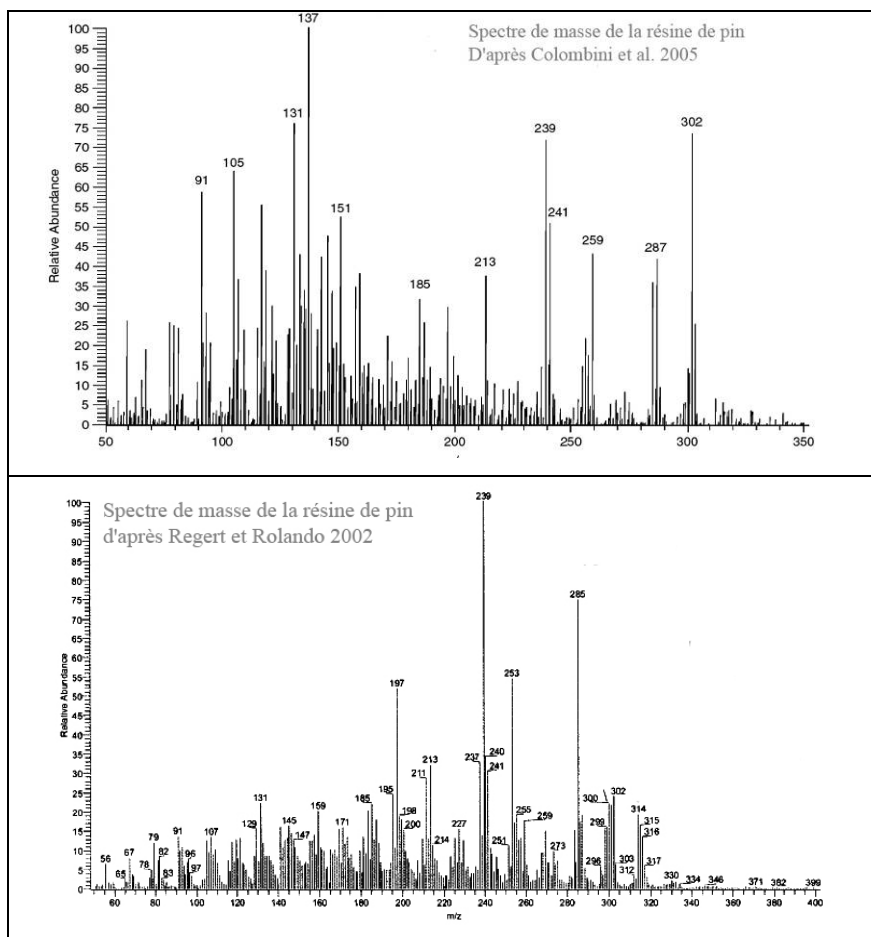


Figure 42 : Spectres de masse de la résine de pin, obtenus avec deux méthodes de désorption directe en spectrométrie de masse à impact électronique (70 eV, trappe ionique) d'après Colombini et al. 2005 et Regert et Rolando 2002. [Mass spectra of pine resin, obtained with different conditions in direct inlet electronic impact ionisation mass spectrometry (70 eV, ion trap)]

Les conditions d'ionisation et d'analyse sont les mêmes que dans la publication précédente: la source d'ions est maintenue à 230°C, le faisceau d'électrons est à 70 eV et l'analyseur est une trappe ionique. Les conditions de désorption sont beaucoup plus drastiques, et les spectres de masse obtenus sont moins informatifs que ceux obtenus dans l'étude précédemment décrite (Figure 42) {Regert & Rolando 2002}.

Seuls les principaux marqueurs des résines sont détectés par cette méthode de spectrométrie de masse. L'équipe de Colombini a donc analysé les échantillons dont elle disposait en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Tableau 11) ce qui leur a permis de différencier les résines et les brais de pin, en fonction de leur composition en marqueurs de dégradation qui ne sont pas détectés dans les spectres de masse à introduction directe.

D.2.5. La microextraction en phase solide couplée à la CPG et à la CPG/SM

L'équipe de Regert, en collaboration avec celle de Lattuati-Derieux, a mis au point une nouvelle méthodologie d'extraction, pour analyser les composés volatils du brai de bouleau {Regert *et al.* 2006}. Ce dernier dégage une odeur assez forte, même après plusieurs millénaires, ce qui est caractéristique de la présence de composés organiques volatils (COV). La SPME (*Solid-Phase MicroExtraction*) est une technique développée depuis une vingtaine d'année, qui permet de piéger les composés volatils sur une fibre recouverte d'un polymère. Suivant la polarité du polymère choisi, la fibre est adaptée à différents types de composé. La fibre est ensuite analysée en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Cette technique est très rapide, sans solvant et non destructive dans la plupart des cas d'études. Pour les échantillons archéologiques, afin de libérer les composés organiques volatils, il est cependant nécessaire de chauffer légèrement les prélèvements. Une seule autre étude sur des matériaux résineux archéologiques a été publiée {Hamm *et al.* 2005}. Après avoir déterminé la meilleure fibre pour l'extraction du plus grand nombre de COV, et les meilleures conditions de température, les auteurs ont appliqué la méthodologie mise au point sur des échantillons archéologiques, qui avaient été identifiés par chromatographie en phase gazeuse haute température de l'extrait lipidique. Les conditions d'extraction et d'analyse sont indiquées dans l'encadré m.

m. Conditions d'extraction en SPME

Fibre SPME: DVB/CAR/PDMS, 30/50 μm (divinylbenzène/carboxen/polydiméthylsiloxane, Supelco) .

Prélèvement de 5 mg d'échantillon.

Dépôt de l'échantillon dans un flacon de 20 mL, fermé hermétiquement par un septum PTFE/Silicone.

Introduction de la fibre dans le flacon à travers le septum et maintien à 1.5 cm au dessus de l'échantillon.

Chauffage du flacon avec la fibre, à 60°C pendant 30 min.

Introduction de la fibre dans l'injecteur du chromatographe.

Désorption des composés à 230°C pendant 10 min.

Conditions d'analyse en CPG/SM

Colonne CP Sil 8-CB (Varian), 60 m \times 0.25 mm I.D., 0.25 μm d'épaisseur de phase stationnaire.

Injecteur *split/splitless* à 230°C.

Programmation en température: 35°C (10 min) – 270°C (30 min) à 5°C/min.

Gaz vecteur: hélium, 1 mL/min

Interface GC/MS: T = 90°C

Source MS: T = 180°C, impact électronique, 70 eV, mode positif

Il a ainsi été possible de caractériser des composés, qui, bien que soupçonnés dans le brai de bouleau, n'avaient jamais été mis en évidence, des monoterpènes et des sesquiterpènes.

L'équipe du professeur Tchapla a également mis au point un protocole en SPME, pour l'identification des composés volatils de l'encens, dans le but d'identifier un échantillon archéologique retrouvé dans une amphore fermée {Hamm *et al.* 2005}. Après avoir mis au point les différentes étapes d'extraction SPME (choix de la fibre, conditions de température et temps d'extraction) sur des échantillons d'oliban de diverses provenances, ils ont pu identifier l'exacte origine botanique de l'échantillon archéologique, ce qui n'avait encore jamais été décrit auparavant.

D.3. Les marqueurs des composés terpéniques

L'identification des résines, goudrons et autres brais est basée sur le principe de la caractérisation des marqueurs moléculaires, biomarqueurs et marqueurs de dégradation. Il s'agit dans ce cas de terpènes, qui en sont les composants les plus caractéristiques. Les différents composés terpéniques qui ont été identifiés jusqu'à présent en Préhistoire et dans l'Antiquité dans l'ancien monde sont le brai de bouleau, les résines et les goudrons de pin et la résine de pistachier. Dans le nouveau monde, la résine de pin à une feuille (*Pinus monophylla*) été utilisée comme adhésif et enduit par les tribus indiennes {Eerkens 2002; Fox *et al.* 1995}.

D.3.1. Le brai de bouleau

Une des premières études discutant des biomarqueurs de l'écorce de bouleau blanc (*Betula pendula* ou *alba*, famille des Betulaceae) montre qu'il y a des différences en fonction de la localisation du prélèvement analysé. L'écorce interne contient peu de composés extraits, de la bétuline et des sucres. L'écorce externe contient elle beaucoup de composés extraits, principalement des triterpènes de la famille des lupanes {Ukkonen & Erä 1979}. La composition des brais est donc dépendante du type d'écorce qui va être chauffé. Les biomarqueurs terpéniques de l'écorce de bouleau se retrouvent dans le brai de bouleau, en plus des marqueurs de dégradation dérivant du chauffage des biomarqueurs ou de leur dégradation naturelle.

Les principaux biomarqueurs de l'écorce de bouleau, du brai de bouleau frais et du brai de bouleau archéologique sont présentés dans le Tableau 12.

	Ecorce de bouleau		Ecorce de bouleau archéologique	Brai de bouleau frais	Brai de bouleau archéologique	
	{Ukkonen & Erä 1979}	{Aveling & Heron 1998}	{Aveling & Heron 1998}	{Aveling & Heron 1998}	{Aveling & Heron 1998}	{Regert <i>et al.</i> 2003b}
Biomarqueurs						
Bétuline	X	X	X	X	X	X
Lupéol	X	X	X	X	X	X
Aldéhyde bétulinique	X		X	X	X	
Acide bétulinique	X	X	X		X	
Acide oléanolique	X					
Acide ursolique	X					
Lupénone	X		X	X	X	X
Bétulone		X	X	X	X	X
Marqueurs de dégradation						
Lupa-2,20(29)-dien-28-ol			X	X	X	X
C₃₀H₄₈ (lupa-2,20(29)diene)				X	X	X
Allobetulinol				X		X
Erythrodiol				X	X	
Allobetul-2-ene						X

Tableau 12 : Biomarqueurs et marqueurs de l'écorce de bouleau et du brai de bouleau (*Betula pendula*), {Aveling & Heron 1998; Regert *et al.* 2003b; Ukkonen & Erä 1979}. [Biomarkers and degradation markers of birch bark and birch bark tar]

Tous les biomarqueurs et les marqueurs de dégradation ne sont pas toujours détectés, suivant les publications. Les protocoles étant toujours très similaires, il s'agit certainement de différences dues à la dégradation plus ou moins avancée des échantillons, aux modes de fabrication ou d'utilisation des brais ou encore à des espèces de bouleau différentes. Les biomarqueurs et les marqueurs de dégradation qui leur sont associés sont présentés en Figure 43.

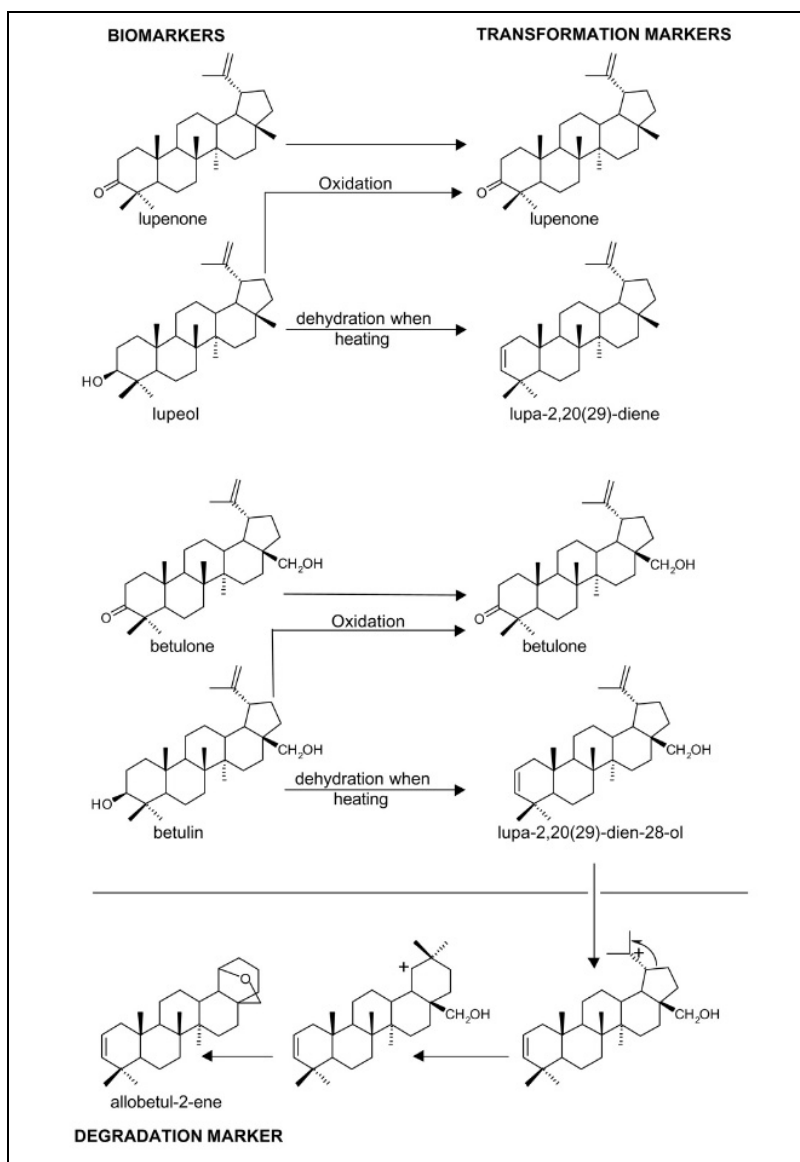


Figure 43 : Structures et mécanismes de transformation et mécanismes de transformation des biomarqueurs et marqueurs de dégradation du brai de bouleau {Regert 2004}. [Formula and putative transformation mechanisms of the main biomarkers identified in various samples containing birch bark tar]

Le brai de bouleau a été utilisé en tant qu'adhésif d'emmanchement, pour des armes ou des outils lithiques {Aveling & Heron 1998; Grünberg 2002; Hayek *et al.* 1991; Heron *et al.* 1989a; Koller *et al.* 2001; Regert *et al.* 1998b; Regert *et al.* 2000; Regert 2004}. Au Paléolithique, du brai de bouleau avec la marque d'un outil lithique a été identifié, mais aucune pièce lithique n'a pour le moment montré de traces d'adhésif. Dès le Néolithique ancien, en Europe tempérée, il est utilisé non seulement comme adhésif d'emmanchement mais aussi comme adhésif de réparation des céramiques {Binder *et al.* 1990; Charters *et al.* 1993a; Dudd & Evershed 1999; Heron *et al.* 1989a; Regert *et al.* 2003a; Regert *et al.* 2003b; Regert 2007}. Il est aussi parfois utilisé pour coller des décors. On ne le retrouve que rarement comme enduit {Regert *et al.* 2003b; Regert 2004}. La dernière utilisation du brai de bouleau semble être liée à son odeur, comme "parfum" brûlé sur des couples à socles au Néolithique

ancien (contexte chasséen), dans des sites funéraires {Lucquin *et al.* 2007}. On retrouve également des boulettes de brai de bouleau dans le sédiment, dont la fonction reste inconnue. Il peut s'agir d'adhésifs, préparés pour être transportés, ou bien de résidus de fabrication d'adhésifs {Aveling & Heron 1998; Binder *et al.* 1990; Regert *et al.* 2003b; Reunanen *et al.* 1993}. Des publications en archéométrie décrivent des boulettes, qui ressemblent à des brais, et qui portent des marques de dent {Heron *et al.* 1989a; Regert 1996}. Les propriétés antiseptiques et antifongiques de l'écorce de bouleau sont probablement à l'origine de cette utilisation comme chewing-gum.

D'autres résines et brais ont également été utilisés durant la Préhistoire et la Protohistoire, en fonction de la disponibilité des ressources naturelles.

D.3.2. Les dérivés du pin dans l'ancien monde

Le pin (*Pinus*) est un genre de la famille des conifères (Pinaceae) à laquelle appartiennent également les épicéas (*Picea*), les mélèzes (*Larix*) et les sapins (*Abies*). Ces arbres vivent dans les régions tempérées à froides. La résine qui en est extraite est composée principalement de diterpènes, avec des squelettes carbonés de type abiétane, pimarane et labdane.

Les biomarqueurs de la résine de pin sont des diterpènes de type abiétane et pimarane. Son principal biomarqueur est l'acide abiétique, dont les principaux marqueurs de dégradation sont l'acide déhydroabiétique produit par déshydrogénation et l'acide 7-oxodéhydroabiétique produit par autoxydation (Figure 44).

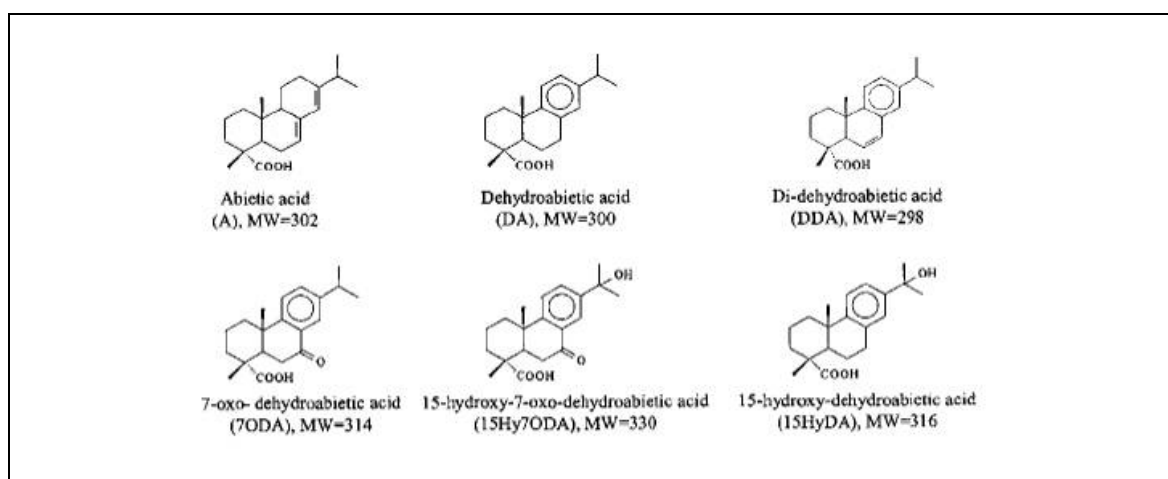


Figure 44 : Structures des biomarqueurs et marqueurs de dégradation de la résine et du goudron de résine de pin (*Pinus sylvestris*), de type abiétane, {Colombini *et al.* 2005a}. [Structure of the main biomarkers and degradation markers of pine resin and pine pitch, from the abietane chemical family]

Les acides pimarique et isopimarique sont également des biomarqueurs de la résine de pin, présents en moindre quantité que l'acide abiétique.

L'analyse par spectrométrie de masse à introduction directe peut être utilisée comme technique de *screening*. Elle permet en effet de détecter les principaux marqueurs de la résine de pin, et de déterminer son état d'oxydation grâce à la présence notamment de l'acide 7-oxodéhydroabiétique {Colombini *et al.* 2005a; Regert & Rolando 2002}. Pour discriminer la résine de pin par rapport à ses dérivés obtenus par chauffage (brai ou goudron), la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est nécessaire. L'identification de marqueurs de dégradation tels que le rétène, les norabiétatriènes, les norabiétatetraènes ou encore le déhydroabiétate de méthyle permet de déterminer que la résine n'a pas été utilisée telle quelle et qu'elle a été chauffée {Beck *et al.* 1989; Colombini *et al.* 2005a; Connan & Nissenbaum 2003; Egenberg *et al.* 2003; Masschelein-Kleiner 1989; Pollard & Heron 1996; Robinson *et al.* 1987}. Il reste tout de même un point à préciser dans toutes les études concernant les goudrons de pin, à savoir s'ils sont obtenus à partir du chauffage de la résine ou du chauffage du bois résineux {Beck *et al.* 1998}. La résine de pin et les goudrons (poix) de pin ont servi à différentes utilisations : calfatage de bateau, enduits de céramiques ou encore réparation de céramiques.

Des enduits de céramique à base de résine de pin ont été retrouvés depuis le Néolithique ancien en Allemagne {Pollard & Heron 1996}, jusque dans l'Antiquité dans des amphores retrouvées sur des lieux de naufrage {Beck *et al.* 1989; Colombini *et al.* 2005a; Garnier 2003; Robinson *et al.* 1987} ou sur des sites terrestres {Colombini *et al.* 2005a}. Des goudrons de pin ont été utilisés dans le calfatage des bateaux, depuis l'antiquité {Colombini *et al.* 2003; Connan & Nissenbaum 2003; Pollard & Heron 1996; Robinson *et al.* 1987}. De la résine de pin a également servi d'adhésif d'emmanchement sur des pointes de flèches datant du Néolithique final, à Chalain {Regert *et al.* 1998b; Regert *et al.* 2000; Regert & Rolando 2002}. Enfin, des résidus organiques observés dans des céramiques, qui ne sont pas des enduits mais plus probablement des résidus de réparation ou de production d'adhésifs ont été identifiés à de la résine de pin. Certains de ces échantillons semblent avoir été chauffés mais il est difficile de déterminer si ce chauffage est intentionnel ou non {Masschelein-Kleiner 1989; Regert *et al.* 2000; Regert & Rolando 2002; Regert 2004}. Une publication décrit un résidu retrouvé dans une amphore, ayant la forme d'une larme, et identifié à de la résine de pin. Ce résidu est probablement un reste de résine utilisée pour donner son goût spécial au vin résineux de l'antiquité {Beck *et al.* 1989; Robinson *et al.* 1987}.

Les dérivés du pin (résine et goudrons) ont été utilisés à diverses fins, particulièrement à partir des âges de métaux (environ 2000 av.J.-C.). Avant cela, il semblerait que le brai de bouleau ait été l'adhésif le plus couramment répandu en Europe tempérée.

D.3.3. Les dérivés du pin dans le nouveau monde

Dans le nouveau monde, de la résine de pin a également été utilisée pour la réparation de céramique, mais provenant d'une autre espèce, le pin à une feuille (*Pinus monophylla*) {Eerkens 2002; Fox *et al.* 1995}. Cette espèce est présente en Amérique du nord, dans une région qui recouvre le sud du Nevada et le sud-est de la Californie. Cette région a été habitée par des petits groupes de chasseurs-cueilleurs, jusqu'au XIX^{ème} siècle, mais il est très difficile d'en dater les débuts. Ces groupes ont en effet laissé peu de traces enfouies, et la plupart des sites retrouvés sont composés de débris en plein air, ce qui induit une mauvaise conservation des composés organiques. Les échantillons résineux ont été collectés sur un ensemble de sites, plus ou moins bien datés. Il s'agit d'adhésifs de réparation de céramiques, et d'enduits de calfatage pour des paniers en bois (écorce?) ou encore d'adhésifs d'emmanchement sur des outils ou des armes en pierre.

Cette résine est caractérisée par la présence d'acides pimarique et abiétique. La caractéristique de la résine de cette espèce de pin est que l'acide pimarique est présent en plus grande proportion que l'acide abiétique. Un autre diterpène est également spécifique au *Pinus monophylla*, l'acide Δ -8(9)-isopimarique.

Dans la première étude, les auteurs ont prélevé des résidus résineux, sur des céramiques mais également sur des paniers. Ces résidus n'étaient pas absorbés et ont donc été analysés après une extraction rapide, comme indiqué dans l'encadré I. Les auteurs ne trouvent pas de composés de dégradation défonctionnalisés, qui, comme on l'a vu plus haut, sont caractéristiques de la transformation de la résine en goudron. Il semble donc que la résine ait été utilisée telle quelle {Fox *et al.* 1995}.

Dans l'autre étude traitant de l'utilisation de la résine de pin dans la même région, celle-ci a été extraite d'un tesson. Il s'agit de l'unique tesson d'une série de 74 échantillons qui ait montré la présence de résine absorbée dans la matrice argileuse. Le tesson ne présentait en outre aucune trace de résidu visible. Il semblerait donc que cette céramique ait été utilisée pour cuire de la résine de pin, pour en faire du goudron {Eerkens 2002}.

Ces deux études sont complémentaires, car la première ne traite pas des résidus absorbés dans la paroi et la deuxième ne traite que de ces derniers, et pas des résidus externes. La résine de pin a donc été utilisée par les populations de cette région des Etats-Unis, depuis des temps archéologiques. Elle a peut-être été chauffée, mais les résidus visibles analysés n'ont pas montré de trace de chauffage, en l'état actuel des recherches.

D'autres résines étaient disponibles dans cette région, la résine de genévrier par exemple, mais elle n'a été détectée dans aucun échantillon, archéologique ou ethnographique {Fox *et al.* 1995}. Dans cette même étude, une résine animale a été détectée. Elle était présente comme enduit dans une céramique préhistorique et comme adhésif de réparation d'une céramique d'époque inconnue. Il s'agit de la résine sécrétée par des insectes à écailles (*Tachardiella larrae* Comstock, *creosote lac scale insect*). Les données ethnographiques rapportent son utilisation comme chewing-gum, agent de calfatage ou encore adhésif d'emmanchement, en plus d'autres résines animales dont celles sécrétées par les cochenilles. Les composés principaux de la résine de *Tachardiella larrae* sont l'acide myristique (C_{14:0}), l'acide palmitique (C_{16:0}) et l'acide 7-hydroxyhexadécanoïque. Ce dernier en est le principal composé. La fraction polymérisée de cette résine n'a pas été identifiée.

Il s'agit de la seule étude identifiant des résines d'insectes dans des céramiques archéologiques, même s'il est probable que ces dernières aient été utilisées dans d'autres parties du monde, particulièrement en Asie.

Les résines et les goudrons de pin ainsi que le brai de bouleau sont donc les composés terpéniques les plus souvent identifiés, depuis la préhistoire jusque dans l'antiquité, en Europe et autour de Méditerranée mais aussi en Amérique du Nord. D'autres résines ont été utilisées, notamment pour enduire les céramiques de transport durant l'Antiquité.

D.3.4. Les autres composés terpéniques

Nous ne présenterons dans ce paragraphe que les résines qui ont été utilisées pour enduire des amphores. D'autres résines ont été indentifiées dans l'Antiquité, telles que l'oliban, gomme-résine des arbres du genre *Boswellia*, qui a servi d'encens, ou encore l'ambre, qui est une résine de pin fossile, utilisée dans l'orfèvrerie ou dans les baumes de momies, etc. {Evershed *et al.* 1997b; Hamm *et al.* 2005; Islas *et al.* 2001; Lambert *et al.* 2000; Mathe *et al.* 2004; Van Bergen *et al.* 1997b}. Nous n'en parlerons pas dans ce mémoire car elles n'ont encore jamais été décrites comme enduit ou adhésif.

La dernière résine identifiée, à l'heure actuelle, pour l'enduction des céramique est la résine de pistachier. Le genre *Pistacia* fait partie de la famille des Anacardiaceae, et possède plus d'une dizaine d'espèces. Seules deux espèces produisent des résines qui ont été et sont toujours utilisées: le *Pistacia lentiscus*, qui ne pousse que sur l'île de Chios et qui produit le mastic et le *Pistacia atlantica*, qui produit la térébenthine. La classification et les noms des différentes espèces

du genre *Pistacia* a posé des problèmes par le passé. Il est désormais reconnu que le *Pistacia mutica* et le *Pistacia cabulica* sont les mêmes espèces que le *Pistacia atlantica*, appelé pistachier térébinthe. Cet arbre pousse au sud de la Méditerranée, du Proche- et Moyen-Orient jusqu'en Inde, ainsi que jusqu'en Arménie {Hairfield & Hairfield 1990; Mills & White 1989}.

Les résines de ces deux genres de pistachier sont composées de triterpènes, principalement l'acide moronique, l'acide oléanoïque, l'acide isomasticadienoïque et l'acide masticadienoïque. Une seule publication traite de la discrimination du mastic et de la térébinthe, mais cette discrimination reste sujette à caution {Hairfield & Hairfield 1990}. Le mastic a probablement été moins utilisé dans l'Antiquité car il est issu d'une espèce qui ne pousse que sur l'île de Chios, alors que le pistachier térébinthe est disponible à travers le Moyen- et le Proche-Orient. Le mastic est collecté sous forme de gouttes séchées, qui ne s'agglutinent pas, alors que la résine du pistachier térébinthe est un matériau récolté sous forme semi-fluide, visqueuse. Elle a donc pu être facilement utilisée pour l'enduction de céramique, et son transport dans des amphores, céramiques à col renfermé paraît plus probable {Mills & White 1989; Stern *et al.* 2003}. La première étude publiée porte sur l'analyse de résines trouvées dans des amphores (enduit et transport). Ces amphores ont été retrouvées sur le site d'Ulun Burun, au sud de la Turquie, qui correspond au naufrage d'un navire de l'Age du Bronze {Mills & White 1989}. Dans l'étude portant sur des amphores cananéites et des bols autochtones d'Armana (Egypte, 1364-1347 av. J.-C.), la résine est dans les deux cas de la résine de pistachier {Stern *et al.* 2003}. La présence de marqueurs de dégradation, associés au chauffage de la résine de pistachier, montre qu'elle a été chauffée dans les bols. Les auteurs concluent qu'ils s'agit de brûleurs à encens, et que les amphores ont été utilisées pour le transport commercial de la résine de Pistachier. Les structures des principaux biomarqueurs des résines de pistachier sont données en Figure 45.

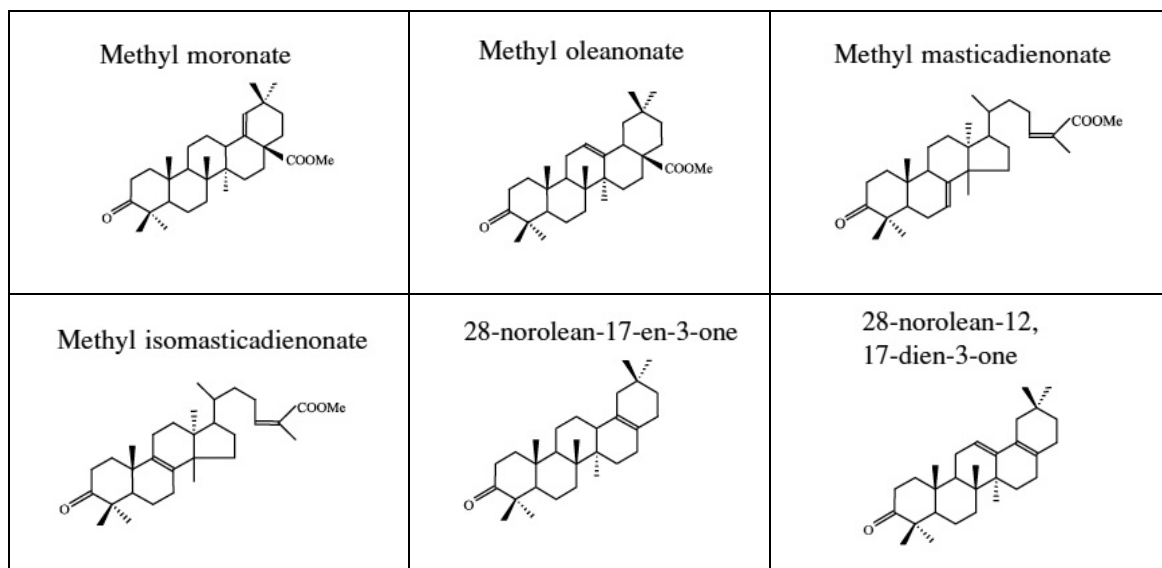


Figure 45 : Biomarqueurs et marqueurs de dégradation des résines de pistachier, d'après {Stern *et al.* 2003}. [Some biomarkers and degradation markers of pistacia resins]

Ce sont, à notre connaissance, les seules études portant sur des échantillons protohistoriques. Une étude, menée par l'équipe de M. Regert, porte sur la discrimination et le commerce des différentes résines trouvées sur le site portuaire de Sharma au Yémen, datant du 11^{ème} siècle de notre ère {Regert *et al.* Accepted july 2007}. Des résines ont en effet été mises au jour, libres dans le sédiment ou incrustées dans des céramiques. La majorité des résines a été identifiée comme du copal, et seuls deux échantillons d'oliban ont été identifiés.

L'autre type d'adhésifs préhistoriques identifiés sont les adhésifs à base de bitume, au Proche- et au Moyen-Orient.

D.4. Les adhésifs à base de bitume

Les plus anciens adhésifs à base de bitume, découverts et identifiés à l'heure actuelle, ont été trouvés sur des outils (un racloir et un éclat) datant des niveaux moustériens du site de Umm el Tlel en Syrie (Paléolithique moyen, environ 40 000 av. J.-C.) {Boëda *et al.* 1996}. Jusqu'à cette découverte, les adhésifs, à base de bitume, les plus anciens identifiés, avaient été mis au jour près de la mer Morte, sur un site néolithique datant de 8200 à 7500 av. J.-C. Plusieurs sites du Proche-Orient ont montré la présence de bitume, utilisé comme adhésif d'emmanchement, enduit, joint de pièces architecturales, décor de céramique ou encore adhésif de réparation {Connan 1988; Connan *et al.* 1992; Connan *et al.* 2004}. En Amérique Centrale, les Olmecs ont également utilisé du bitume, pour en faire des adhésifs mais aussi des décors, etc. entre 1200 et 500 av. J.-C. {Wendt & Lu 2006}. A notre connaissance, du bitume n'a été identifié comme adhésif que dans

un site en Europe tempérée {Regert *et al.* 1998b; Regert 2004}. Il existe peu de publications portant sur l'identification chimique de bitumes sur des sites archéologiques.

Le bitume est défini comme un produit aliphatique fossile, retrouvé dans des affleurements de surface. Le bitume peut être sous forme visqueuse, émulsionnée dans de l'eau (bitume de la mer morte par exemple), ou sous forme solide (filons). Non dégradé, ce produit est pratiquement entièrement soluble dans le chloroforme {Connan 1988}.

Nous ne rentrerons pas dans les détails de la composition des bitumes. Celle-ci varie non seulement en fonction de l'origine du bitume mais aussi en fonction de son état de dégradation. La chimie des bitumes est liée à la pétrochimie, et beaucoup des protocoles appliqués aux échantillons archéologiques sont issus des analyses pétrochimiques. Les composés des bitumes sont séparés en plusieurs fractions. Au minimum, les asphaltènes sont séparés par précipitation à l'hexane des composés et l'extrait obtenu est fractionné en composés aliphatiques, composés aromatiques et composés résineux. Les biomarqueurs qui permettent d'identifier un bitume sont les terpanes et les stéranes présents dans la fraction aliphatique. Un protocole plus complet est donné dans une des publications de Connan {Connan 1988}. Les terpanes sont caractérisés par un pic à m/z 191, en spectrométrie de masse à impact électronique (70 eV), et les stéranes par un pic à m/z 217.

La problématique qui se pose sur l'analyse des bitumes, à l'heure actuelle, n'est plus leur identification, qui se fait de manière rapide et fiable, mais leur provenance géographique. Tout comme les résines, il s'agit de composés avec de nombreuses qualités, qui en font un produit commercial de choix. La plupart des publications récentes traitent d'ailleurs de ces réseaux d'échanges, à partir des compositions des bitumes et des assemblages céramiques qui renseignent sur les échanges culturels entre groupes de population, depuis le Néolithique dans l'ancien monde, et depuis le 2^{ème} millénaire av. J.-C. dans le nouveau-monde {Connan 1988; Connan *et al.* 2004; Wendt & Lu 2006}.

Ce bref aperçu des différents types de matériaux résineux et bitumineux identifiés à l'heure actuelle sur des sites préhistorique et protohistorique montre que peu d'études se sont penchées sur la question. Le brai de bouleau semble avoir été l'adhésif le plus couramment utilisé du Paléolithique jusqu'au Néolithique, et il semble petit à petit remplacé par la résine et les goudrons de pin, en Europe tempérée, à partir des âges des métaux (hypothèse Regert). Mais le faible nombre d'études sur les adhésifs préhistoriques ne permet pas de délimiter clairement une quelconque frontière temporelle et/ou spatiale. Nous n'avons pas de données concernant l'identification d'adhésifs à base de résines au Proche-Orient, durant la préhistoire. Les études

portant sur les adhésifs, dans la zone géographique autour du Proche-Orient, ont montré qu'il s'agissait de bitume.

E. Les autres types de matériaux détectés dans les céramiques archéologiques

D'autres matériaux ont été identifiés dans des céramiques datant de la préhistoire et de la protohistoire. Il s'agit des boissons fermentées et des parfums et cosmétiques.

E.1. Les boissons fermentées

Il existe assez peu de littérature sur l'analyse chimique des résidus de boissons fermentées (vin, bière, hydromel, etc.) en archéologie. Jusqu'à récemment, la présence de boissons fermentées était déduite des dessins et des textes lorsqu'ils étaient conservés, notamment dans l'Égypte pharaonique, mais aussi de restes botaniques retrouvés sur des sites archéologiques (orge, pieds de vigne, pollens). Les amphores, utilisées pour le stockage et le transport des liquides, dont le vin, sont relativement bien documentées, notamment grâce aux annotations dont elles ont fait l'objet au cours de leur utilisation. Seules quatre équipes ont, à notre connaissance, travaillé sur les résidus organiques des boissons fermentées et leur analyse chimique. La toute première est l'équipe de Condamin, qui publiera ensuite sur l'huile d'olive {Condamin & Formenti 1978}. La seconde est l'équipe du Professeur McGovern, à Philadelphie, qui s'est focalisée sur l'identification de l'acide tartrique et de ses dérivés {McGovern *et al.* 1996; McGovern 1997; McGovern *et al.* 1999; McGovern *et al.* 2004; Michel *et al.* 1993}, la troisième est l'équipe de Regert qui a travaillé sur des amphores gréco-romaines en développant une méthodologie en pyrolyse couplée à la CPG/SM, pour l'étude des phénols {Garnier *et al.* 2003}, et enfin une équipe de l'Université de Barcelone, qui a développé une méthodologie en HPLC-ESI MS/MS pour l'identification des biomarqueurs du vin {Guash-Jané *et al.* 2004; Guash-Jané *et al.* 2006}.

E.1.1. Les premières études

Les premières études publiées à propos de boissons fermentées ont fait appel à la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, et à la spectroscopie de réflectance diffuse IRTF {Condamin & Formenti 1978; McGovern *et al.* 1996; McGovern 1997; McGovern *et al.* 1999}. L'identification du vin se fait sur la base des spectres IR, et de leur comparaison avec l'acide tartrique (Tableau 13). L'acide tartrique est naturellement présent en très grande quantité dans le raisin, bien que les auteurs ne fournissent pas de données plus précises. L'identification de l'acide tartrique à partir des seules données IR reste sujette à caution, et les auteurs corroborent cette identification par l'utilisation d'un test microchimique spécifique à l'acide tartrique. Il s'agit

d'un des tests de Feigl, au β - β' -dinaphtol et à l'acide sulfurique concentré. Le composé résultant fluoresce sous UV, ce qui permet, selon les auteurs, d'identifier précisément la présence d'acide tartrique. Ce dernier peut aussi être présent sous forme de sels de tartrate, qui ont des bandes caractéristiques en IR (Tableau 13).

	Acide tartrique	Sels de tartrate
Bandes IR	$\nu_{C=O(COOH)} = 1740 \text{ cm}^{-1}$, épaulement à 1720 cm^{-1} $\nu_{OH} = 3450 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ $\delta_{OH} = 1435 - 1445 \text{ cm}^{-1}$	$\nu_{C=O} = 1610 - 1560 \text{ cm}^{-1}$ Bandes à 1460 et 1390 cm^{-1}

Tableau 13 : Bandes caractéristiques en spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier de l'acide tartrique et des sels de tartrate {McGovern *et al.* 1996; McGovern 1997; McGovern *et al.* 1999; McGovern *et al.* 2004} [Characteristic absorption peaks of tartaric acid and tartrate salts by FTIR]

Les auteurs se servent des données archéologiques à leur disposition, forme de la céramique, caractéristique de la pâte argileuse, provenance, indications écrites sur la céramiques, etc. pour étayer leurs résultats physico-chimiques {McGovern 1997}. Ils ont aussi fait appel à la chromatographie liquide haute performance, avec une détection aux ultraviolets, lorsque d'autres composés, non identifiés en IRTF, étaient présents. Ils ont ainsi mis en évidence de la résine de pistachier, par comparaison avec des échantillons archéologiques de la même résine {Hairfield & Hairfield 1990; Mills & White 1989}, dans une céramique du Zagros (Iran actuel), datant de 5400 à 5000 av. J.-C. environ {McGovern *et al.* 1996}. Leur identification de la résine de pistachier, sur la base de l'HPLC-UV, reste délicate. La séparation chromatographique est mauvaise, et les spectres UV ne sont pas des plus caractéristiques. Dans les deux dernières publications de ce groupe, sur les boissons fermentées, les auteurs font appel à des techniques plus spécifiques, telles que l'HPLC couplée à la spectrométrie de masse ou encore la CPG couplée à la spectrométrie de masse {McGovern *et al.* 1999; McGovern *et al.* 2004}. Mis à part pour une des publications, les données expérimentales ne sont pas ou peu décrites, et les données publiées ne sont pas des plus pertinentes, ce qui limite l'intérêt de ces publications. Dans la publication traitant des boissons fermentées en Chine, les auteurs ont non seulement utilisé l'IRTF et le test de Feigl pour identifier l'acide tartrique et les sels de tartrate, mais aussi la CPG/SM, l'HPLC et les analyses isotopiques du ^{13}C , pour détecter la présence de cire d'abeille et de riz {McGovern *et al.* 2004}. Ils étayent leurs résultats avec la présence de grain de riz et d'aubépine sur le site, et parlent d'une boisson à base riz fermenté, de miel et de fruit riche en acide tartrique (raisin ou aubépine). Leurs interprétations nous semblent être poussées trop loin, car aucun biomarqueur du riz n'a été détecté. La cire d'abeille n'est identifiée que par la présence d'une série d'alcanes linéaires, à nombre pair et impair d'atomes de carbone, ce qui n'est pas du tout en accord avec les données publiées jusqu'à

ce jour sur la cire d'abeille par de nombreuses équipes {Charters *et al.* 1995; Garnier *et al.* 2002; Heron *et al.* 1994; Regert *et al.* 2001a}. L'équipe de McGovern a également travaillé sur la bière et les boissons fermentées à base de céréales. Leur identification est basée sur la présence d'oxalate de calcium, qui se forme par précipitation dans la bière {Coghlan 1992; McGovern 1997; McGovern *et al.* 2004}. Un point mal expliqué est la discrimination entre les sels d'oxalate et les sels de tartrate, et il semble que les auteurs s'appuient particulièrement sur les données botaniques à leur disposition pour faire la différence entre bière et vin. Une équipe de chercheurs égyptiens a également identifié de la bière, à partir de la présence de graines de céréales, de dates et de pépins de raisins, ainsi qu'avec la détermination des sucres et des acides aminés conservés, caractéristique de levures de fermentations {Maksoud *et al.* 1994}.

Si les interprétations données par l'équipe de McGovern sont parfois poussées trop loin, il n'en reste pas moins que l'identification d'acide tartrique et de sels de tartrates pour caractériser le vin archéologique semble être valable. D'autres équipes se sont penchées sur la caractérisation de nouveaux biomarqueurs des boissons fermentées archéologiques.

E.1.2. La caractérisation des polyphénols par py-CPG/SM

Une étude, publiée en 2003 et menée dans le cadre de la thèse de Nicolas Garnier au laboratoire du C2RMF, a porté sur la caractérisation des polyphénols des dérivés de la vigne, par analyse en pyrolyse couplée à la CPG/SM. Les acides phénoliques, dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique, et des flavonoïdes (monomères et polymères) sont caractéristiques des dérivés du raisin et d'autres fruits. On appelle ces composés les tannins (tannins condensés pour les polymères). Les auteurs ont étudié des amphores à vin, des pépins de raisin archéologiques, du vin et des pépins de raisin modernes ainsi que des standards. Après avoir déterminé les relations entre des composés monomères standards, flavan-3-ols, et leurs marqueurs pyrolytiques, ils ont étudié les fractions de polyphénols, obtenues par purification de vin, de pépin de raisin et de peau de grains de raisin, en py-CPG/SM (Figure 46), avec du TMAH (hydroxyde de tetraméthylammonium). Cette technique de thermochimie est aussi appelée THM-GC/MS (*thermally assisted hydrolysis-methylation gas chromatography/mass spectrometry*).

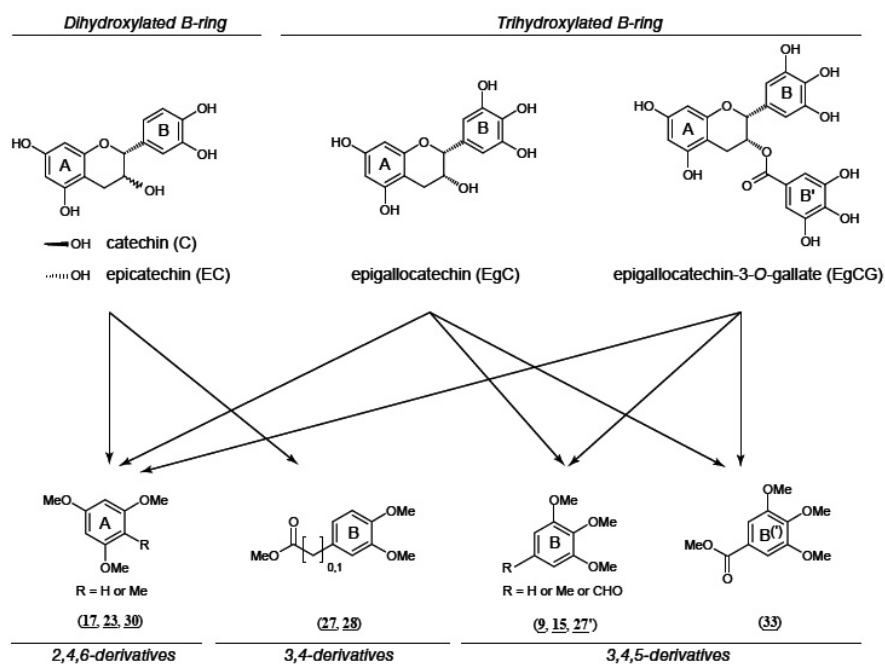


Figure 46 : Relations entre les marqueurs pyrolytiques et leurs précurseurs monomères, flavan-3-ols standards, par thermochemiolyse en présence de TMAH, py-CPG/SM {Garnier *et al.* 2003}. [Relationships between benzenoid pyrolytic products and their monomer precursors, standards flavan-3-ols, during thermochemolysis in the presence of TMAH]

Il est possible d'identifier un grand nombre de marqueurs pyrolytiques des phénols, qui renseignent sur leur origine: les polysaccharides sont caractérisés par des marqueurs 1,2,3-alkyl-benzènes, la lignine est caractérisée par la présence de phénols C3-C6 avec une chaîne latérale méthoxylée, etc. Les pyrogrammes obtenus pour deux échantillons archéologiques sont donnés dans la Figure 47. Il est très intéressant de noter que grâce à cette technique, il est possible de distinguer les composés phénoliques et les composés dérivés des résines. Avec une analyse en chromatographie en phase gazeuse classique, les composés terpéniques masqueraient le signal, relativement faible, des phénols. La grande volatilité de ces derniers, après pyrolyse, permet qu'ils soient détectés avant que les composés terpéniques ne soient élués. Les deux échantillons analysés sont ainsi caractérisés par la présence de vin, et celle de résines diterpéniques, qui ont servi à enduire la paroi interne des amphores.

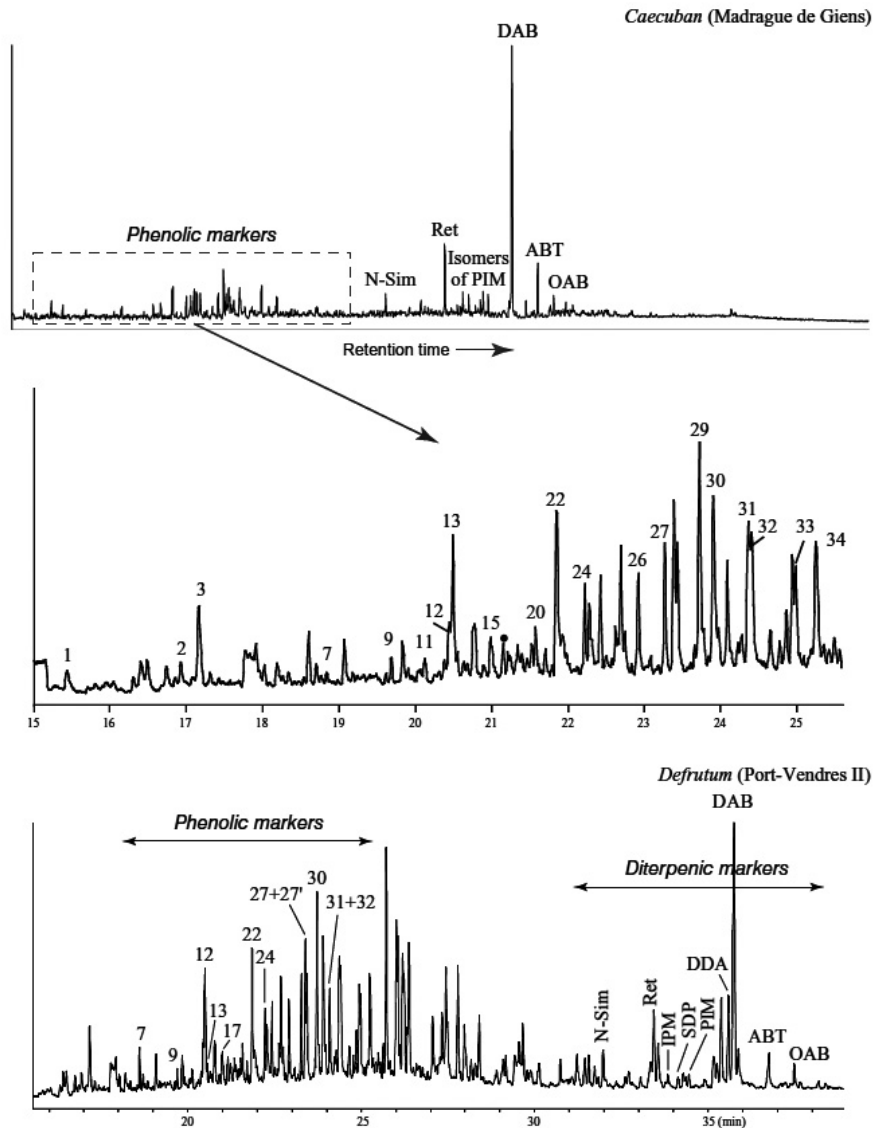


Figure 47 : Pyrogrammes partiels (THM-CPG/SM) d'un échantillon de vin romain *Caecuban* et d'un échantillon de vin béotien *Defrutum* {Garnier *et al.* 2003}. [Partial pyrograms (THM-GC/MS) from a Roman *Caecuban* wine and a Baetican boiled-down wine (*defrutum*)]

Il n'est vraisemblablement pas possible de discriminer les différents types de vins avec ces biomarqueurs, qui sont présents dans tous les échantillons, modernes ou archéologiques. On peut cependant remarquer qu'ils sont présents à des proportions différentes, ce qui reste une piste à creuser pour la discrimination des différents types de vin.

Enfin, la dernière piste explorée pour la caractérisation des résidus de boisson fermentée repose sur la chromatographie liquide haute performance (HPLC), avec une détection en spectrométrie de masse tandem

E.1.3. Analyse en HPLC-ESI-MS/MS

Les auteurs des deux publications traitant de l'analyse de résidus de boissons fermentées par HPLC couplée à la spectrométrie de masse tandem ont analysé des tessons provenant de jarres à vin, retrouvées dans différents contextes datant de diverses époques en Egypte {Guash-Jané *et al.* 2004; Guash-Jané *et al.* 2006}. Les biomarqueurs recherchés par les auteurs sont les acides tartrique et syringique. Le premier est, comme nous l'avons déjà indiqué plus haut, un composé naturel retrouvé principalement dans le raisin. Sa conservation est favorisée dans les céramiques grâce à une forte adsorption sur les silicates, par des liaisons hydrogènes {Michel *et al.* 1993}. La couleur du vin provient de la malvidine, colorant qui n'est présent dans aucune autre plante connue à cette époque dans cette région. Il s'agit d'une anthocyanine (la malvidine-3-glucoside). Au cours du vieillissement du vin, ce colorant est dégradé en dérivés des anthocyanines, ce qui explique le changement de couleur de rouge vers les bruns. Afin de déterminer la présence de ce colorant et de ses dérivés, les auteurs ont procédé à une hydrolyse alcaline qui libère l'acide syringique. On peut donc utiliser cet acide comme marqueur du vin. L'utilisation d'un spectromètre de masse ESI triple quadripôle permet de procéder à une analyse en MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), qui permet de détecter les éléments présents à l'état de trace. Afin de déterminer les conditions optimales en MRM, les auteurs ont tout d'abord analysé en ESI MS/MS les standards d'acides tartrique et syringique. Le mode SIM (*Single Ion Monitoring*) a également été utilisé.

Pour la recherche de l'acide tartrique, pour chaque échantillon archéologique, après une extraction acide, trois modes d'acquisition ont donc été utilisés : le mode *full scan*, permettant d'obtenir le chromatogramme complet, le mode SIM sur l'ion m/z 149 $[M - H]^-$ et le mode MRM sur la transition m/z 149 \rightarrow 87 (perte de COOH et OH). Seul un échantillon a été analysé pour la recherche de l'acide syringique, car il était constitué d'un résidu brunâtre, contenant donc potentiellement le colorant initial. L'analyse s'est faite en LC-MS/MS en mode MRM sur la transition m/z 197 \rightarrow 182. La même analyse a été faite sans hydrolyse alcaline, et aucun pic n'a été détecté pour la même transition, ce qui montre bien l'acide syringique provient de la dépolymérisation de la malvidine-3-glucoside.

La recherche d'acide tartrique par cette méthode semble donc très performante, et a permis d'identifier du vin dans 4 des 5 échantillons analysés. La jarre dans laquelle l'acide tartrique n'a pas été détecté ne correspond pas à une jarre à vin, typologiquement parlant, ce qui peut expliquer qu'aucun résidu de vin n'y ait été retrouvé. Il se peut également que la matière soit trop dégradée pour être détectée et identifiée.

La même équipe a appliqué cette méthodologie à un autre échantillon provenant de la tombe de Toutankhamon {Guash-Jané *et al.* 2006}. Il s'agit d'un résidu, prélevé dans une amphore identifiée comme contenant du *Shedeh*, boisson fermentée dont l'identification fait défaut. Les acides tartrique et syringique ont été identifiés, ce qui leur permet d'affirmer que cette boisson est à base de raisin rouge (*Vitis vinifera*). Le reste de la préparation du shedeh reste cependant inconnu.

E.2. Les cosmétiques

Les études portant sur les cosmétiques, et particulièrement leur fraction organique, sont assez très peu nombreuses, et ont porté sur des échantillons très particuliers. Il s'agit, pour une part, d'échantillon de petits vases corinthiens dits "plastiques", représentant des animaux et des figures humaines {Biers *et al.* 1994; Gerhardt *et al.* 1990} et, d'autre part, d'échantillons ponctuels. Dans ce dernier cas, seuls deux cas de cosmétiques dont la fraction organique a été conservée et analysée sont rapportés dans la littérature, le premier étant un récipient scellé trouvé dans la tombe de Toutankhamon {Chapman & Plenderleith 1926} et le deuxième, un pot en étain retrouvé lors de fouilles récentes dans le centre de Londres {Evershed *et al.* 2004}.

E.2.1. Les vases "plastiques" de Corinthe

Les vases de Corinthe ont été étudiés dans le cadre d'un projet de recherche mené par Gerhardt et Biers à l'Université du Missouri-Columbia. Ces vases sont connus aussi sous le nom de "*figure vase*". Il s'agit de vases zoomorphes ou anthropomorphes, datant des 7^{ème} et 6^{ème} siècles av. J.-C., qui sont supposés avoir été fabriqués à Corinthe (Grèce) {Biers *et al.* 1994; Gerhardt *et al.* 1990}. La monographie de 1994 montre bien l'intérêt de l'analyse chimique du contenu de ces vases, qui sont considérés, sans preuve scientifique à l'appui, être des récipients à parfums {Biers *et al.* 1994}, de même que les autres vases plastiques provenant de différents comptoirs grecs autour de la Méditerranée. Les vases ne contenaient aucun résidu visible. Ces vases sont de petite taille, avec une ouverture réduite sur le dessus. Ils ont de plus une grande valeur muséale, il n'était donc pas question pour les auteurs de prélever de tessons. Ceci a nécessité la mise en place d'un protocole d'analyse totalement non destructif. Pour cela, deux extractions successives, au dichlorométhane puis au méthanol sont réalisées, en versant simplement le solvant dans le vase puis en le récupérant. Les solvants sont ensuite réduits sous un courant d'azote (dans le premier protocole publié, les solvants sont réduits par évaporation rotative), avant d'être injectés dans le chromatographe, sans préparation préalable. Les auteurs, se basant sur les publications de

Condamin *et al.*, ont choisi d'utiliser la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, avec des colonnes capillaires de polarité différentes.

Ils ont ainsi identifié des acides gras, du cholestérol dans certains vases et des alcanes linéaires. Ils ont également caractérisé des terpènes : mono-, sesqui- et di-terpènes. Il n'a pas été possible de remonter à l'identification des parfums contenus dans les vases, mais les auteurs ont tout de même pu tirer un certain nombre de conclusions très intéressantes quant à l'utilisation de ces vases. Une des questions autour de ces vases était de savoir si chaque forme ou groupe de forme était corrélable avec un type de contenu. Les auteurs ont donc étudié deux formes particulières, retrouvées en grande proportion dans les vases de Corinthe, les vases en biche (6 exemplaires) et les vases en bélier (4 exemplaires). Les données obtenues ne permettent pas d'affirmer que les vases aux formes similaires ont contenu des parfums (onguents) similaires. De la même manière, aucune corrélation entre le contenu et la localisation géographique n'a pu être obtenue. Il n'y a donc pas de preuves que la localisation joue un rôle dans le contenu. Le contenu de tous les vases est composé de terpènes, quel que soit l'endroit où ils ont été mis au jour. Il s'agit donc bien de ce que les vases ont contenu, et non pas de contaminants postérieurs (sauf pour quelques composés des plastiques qui sont également retrouvés dans tous les vases). Les terpènes sont présents dans les huiles essentielles et les résines des végétaux supérieurs, qui ont donc été probablement utilisées dans la fabrication des parfums anciens. Cependant, la caractérisation de terpènes avec des propriétés anti-moustiques et antibactériennes, avec une odeur forte et déplaisante, semble montrer que certains de ces vases ont pu être utilisés dans des rituels d'embaumement ou comme parfum "médicinal" dans les tombes, où certains de ces échantillons ont été mis au jour. L'identification de cholestérol suggère la présence de graisse animale, qui peut provenir du procédé d'extraction des parfums par enfleurage (connu chez les Egyptiens au Nouvel Empire).

Cette étude est remarquable par la qualité de l'échantillonnage, par la qualité du travail d'interprétation archéologique et également par le fait que les auteurs ne cherchent pas à surinterpréter les données chimiques à leur disposition. Cela reste le seul travail aussi complet sur des cosmétiques organiques.

E.2.2. Les pots à cosmétiques

Une étude, publiée en 1926, porte sur un récipient en calcite, retrouvé dans la tombe de Toutankhamon et confié par H. Carter aux scientifiques du *British Museum*, pour en identifier le contenu {Chapman & Plenderleith 1926}. Le mélange était hétérogène, composé de nodules jaunes et d'une substance marron, collante. Les auteurs, avec les moyens à leur disposition à

l'époque, ont conclu qu'il s'agissait d'un mélange à 90 % de graisses animales et à 10 % d'une résine. Ils ont procédé à des tests de solubilité, des tests microchimiques, des distillations et à l'identification des composés par leur point de fusion. Bien entendu, les analyses réalisées ont nécessité la destruction de la plus grande partie du composé original, pourtant présent en grande quantité (450 g). Il est très intéressant de noter la complémentarité des techniques utilisées, et l'usage que les scientifiques en ont fait, leur permettant de remonter aux matières grasses et aux composés terpéniques, malgré le manque de données structurales.

Une étude, récente, a porté sur un pot en étain, mis au jour lors de fouilles à Londres, sur un site romain datant du milieu du 2^{ème} siècle ap. J.-C. Il s'agit d'une découverte tout à fait exceptionnelle, à la fois pour le monde Romain et pour l'ensemble de l'Europe et du Proche-Orient. Les récipients ayant contenu des cosmétiques, ou supposés tels, ne contiennent en règle générale plus que les composés minéraux, alors que dans ce cas le pot contenait encore une crème blanche. L'équipe de R.P. Evershed a analysé ce contenu avec un ensemble de techniques, organiques et inorganiques, au niveau élémentaire, isotopique et moléculaire. L'analyse élémentaire organique a montré que l'échantillon ne contenait pas d'azote ni de soufre, ce qui indique l'absence de protéines. Des acides gras, C_{14:0} à C_{18:0}, en proportions caractéristiques de graisses sous-cutanées de ruminant ont été détectés et identifiés par analyse de l'extrait lipidique total en chromatographie en phase gazeuse haute température. L'analyse isotopique du $\delta^{13}\text{C}$ des deux principaux acides gras C_{16:0} et C_{18:0} est cohérent avec la présence de graisses sous-cutanées de ruminant (Figure 48).

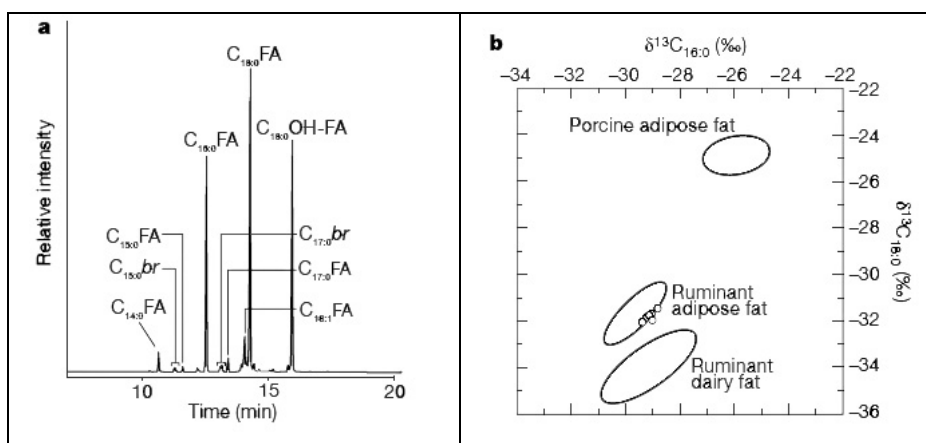


Figure 48 : Chromatogramme en phase gazeuse de l'extrait lipidique total de la crème, C_{14:0} à C_{18:0}: acides gras saturés linéaires, C_{15:0}br et C_{17:0}br: acides gras saturés ramifiés *iso*- et *anteiso*-, C_{18:0}OH; acide gras hydroxylé, C_{18:1}: acide gras mono-insaturé {Evershed et al. 2004}. [Partial gas chromatogram of extracted lipids, C_{14:0} to C_{18:0}, saturated straight-chain fatty acids, C_{15:0}br and C_{17:0}br, *iso*- and *anteiso*- branched-chain fatty acids, C_{18:0}OH, hydroxylated fatty acid, C_{18:1}, monounsaturated fatty acid]

La pyrolyse couplée à la CPG/SM du résidu insoluble ainsi que la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), ont permis d'identifier la présence de polysaccharides, et l'analyse en CPG/SM ainsi que des tests microchimiques à l'iode ont clairement caractérisé l'amidon. L'analyse en FTIR a permis de déterminer que les proportions amidon/acides gras sont proches de 1:1 en poids. L'analyse en gravimétrie a montré la présence d'un composé inorganique à hauteur d'environ 15%. De l'oxyde d'étain (SnO_2) a été identifié par diffraction des rayons X. Il a certainement servi de pigment blanc. Les auteurs ont ensuite reformulé ce cosmétique, en se basant sur les quantités déterminées, et ont obtenu une crème de couleur et de texture similaire à une crème cosmétique moderne (Figure 49).



Figure 49 : Photo de la crème (a) retrouvée dans le pot romain et (b) formulée sur la base des données analytiques (qualitatives et quantitatives) obtenues sur la crème ancienne, photo Evershed et coll. [Evershed *et al.* 2004] [Appearance of the cream (a), Roman canister containing the original cream. (b), A synthetic version prepared according to the formulation obtained after the analysis of the material shown in (a), image from Evershed *et al.* 2004]

Indépendamment des données obtenues, ces deux études sont très intéressantes car elles montrent bien la complémentarité des différentes techniques d'analyse organique, sans laquelle il n'est pas possible d'identifier des mélanges aussi complexes que des cosmétiques.

Conclusion

L'étape première de l'analyse des composés organiques retrouvés dans des céramiques archéologiques est la phase d'extraction. Les protocoles d'extraction se sont focalisés sur l'extraction des composés lipidiques, au vu de leur bonne conservation dans la plupart des contextes archéologiques, terrestre, marin, lacustre ou autre. Au fur et à mesure de l'avancée des recherches dans ce domaine, les protocoles se sont simplifiés pour n'être désormais plus que des variations du protocole mis au point par l'équipe d'Evershed à Bristol. Seuls les protocoles axés sur d'autres biomarqueurs diffèrent notablement. Nous avons vu que la grande majorité des protocoles publiés mettent en jeu une étape de séparation des mélanges moléculaires par chromatographie et une étape d'identification des composés par spectrométrie de masse. Le couplage de ces deux types de techniques est extrêmement puissant pour l'identification des composés organiques archéologiques, qui sont des matériaux hétérogènes, complexes, présents en faible quantité. Grâce à la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, il est désormais possible d'identifier un certain nombre de matières grasses telles que les graisses animales, les huiles végétales, les cires végétales et les cires animales. L'apport des analyses isotopiques a représenté, à la fin des années 90, un bond en avant dans la connaissance des résidus alimentaires présents dans les céramiques, particulièrement pour la distinction des graisses de ruminants et de non-ruminants et l'identification des produits laitiers. Depuis quelques années, on assiste à une envolée de développements méthodologiques, basés sur de nouvelles techniques analytiques. Les analyses immunologiques ont été appliquées avec succès à la caractérisation de résidus protéiques, avec l'identification des espèces mises en jeu. La protéomique, couplant la micro- ou la nano-chromatographie en phase liquide avec des techniques de spectrométrie de masse à ionisation douce (MALDI, ESI), a été elle-aussi développée, avec un succès mitigé, sans doute dû à la mauvaise conservation ou la mauvaise extraction des protéines. Enfin, la chromatographie liquide, couplée à la spectrométrie de masse a également fait l'objet de développements pour la caractérisation des graisses animales et végétales. Mais elle reste délicate à mettre en œuvre pour des échantillons dégradés.

Les matériaux organiques amorphes identifiés dans des contextes archéologiques peuvent être classés suivant qu'ils sont bruts ou transformés, d'origine animale ou végétale (Figure 50). La grande majorité des composés identifiés à l'heure actuelle dans les céramiques archéologiques sont, dans l'ordre, les graisses animales, les produits laitiers, la cire d'abeille, les matières grasses végétales, les cires végétales, les résines, les brais, les goudrons, les bitumes, les boissons fermentées et les colorants.

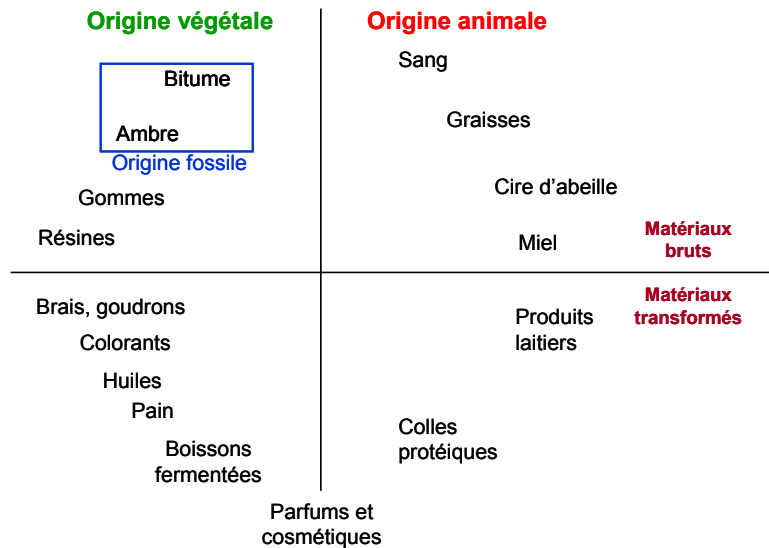


Figure 50 : Schéma de l'origine naturelle des matériaux organiques amorphes archéologiques {Regert 2006} [Natural origin of amorphous organic materials in archaeology]

Les études sur les matériaux organiques amorphes archéologiques ont porté sur les céramiques, datant du Néolithique ancien en Europe tempérée. Très peu d'études a été publiée à ce jour sur l'analyse de résidus organiques dans des céramiques du Proche-Orient, les plus anciennes connues dans notre espace chrono-culturel (Europe et monde méditerranéen). Les principales données obtenues sur le contenu de céramiques préhistoriques et protohistoriques sont résumées dans la Figure 51 pour les graisses animales, les produits laitiers et les matières grasses végétales, et dans la Figure 52 pour la cire d'abeille et les boissons fermentées.

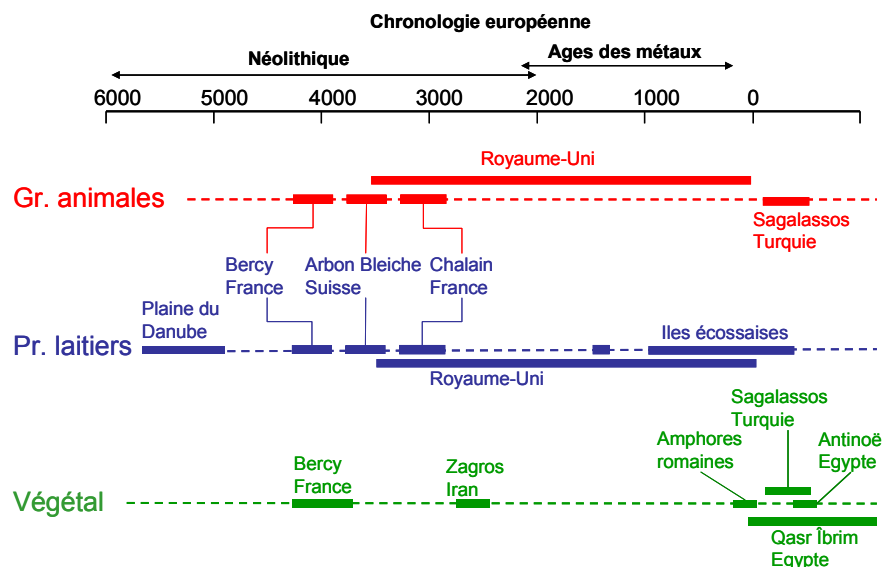


Figure 51 : Principaux sites et régions pour lesquels des graisses animales, des produits laitiers et des matières grasses végétales ont été identifiées dans des céramiques, adapté de Regert 2006. [Archaeological sites where animal fats, dairy products and vegetable fats were identified in ceramics]

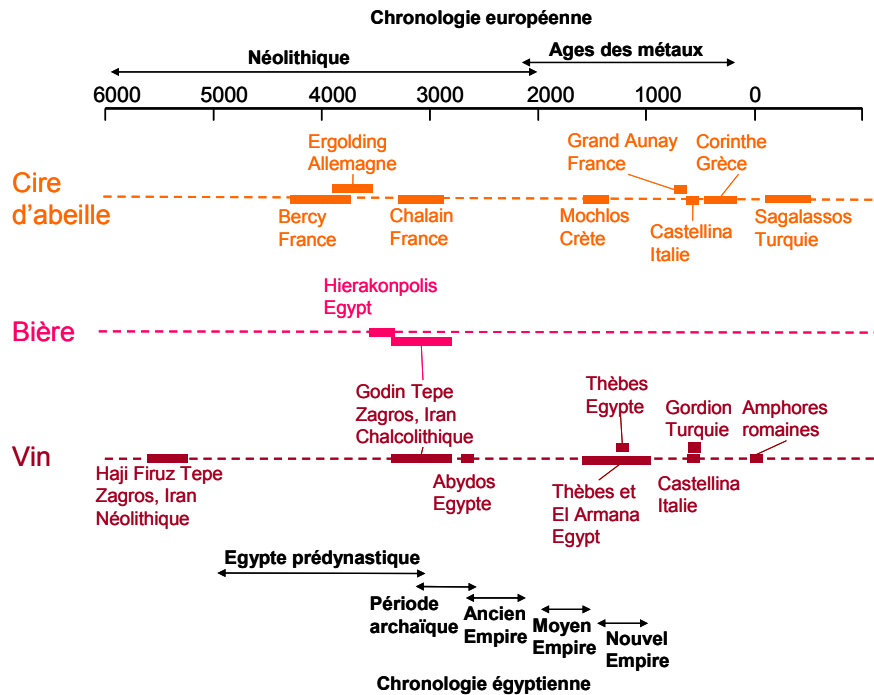


Figure 52 : Principaux sites et régions pour lesquels de la cire d'abeille et des boissons fermentées ont été identifiées dans des céramiques, adapté de Regert 2006. [Archaeological sites where beeswax, beer and wine were identified in ceramics]

Les adhésifs ont quant à eux été prélevés sur des sites datant du Paléolithique jusqu'aux âges des métaux. Il s'agit, en Europe tempérée, de brai de bouleau, dont le mode de fabrication reste en partie inconnu jusqu'au Néolithique. A partir du Néolithique, et particulièrement de l'Age du Fer, des céramiques ayant servi à la fabrication de cet adhésif ont été retrouvées, mais pour les sites antérieurs, aucune trace de fabrication n'a encore été retrouvée. Les résines de conifères et leurs dérivés ont également servi d'adhésif d'emmanchement, de réparation des céramiques, ainsi que d'enduit de céramique ou de calfatage de bateaux, mais n'ont été retrouvées qu'à partir du Néolithique final en Europe tempérée, en l'état actuel des recherches. On voit à partir des âges de métaux le commerce de ces matériaux qui se développe, avec des amphores retrouvées pleines de résines dans des bateaux. La résine de pistachier a aussi été exploitée à partir de ces époques, et commercialisées à l'échelle méditerranéenne. Au Proche- et Moyen-Orient, le bitume semble avoir été l'adhésif préférentiellement utilisé à partir du Paléolithique, mais peu d'études pour les périodes protohistoriques font état de son exploitation en tant qu'adhésif de réparation ou d'emmanchement ou même d'enduit (Figure 53).

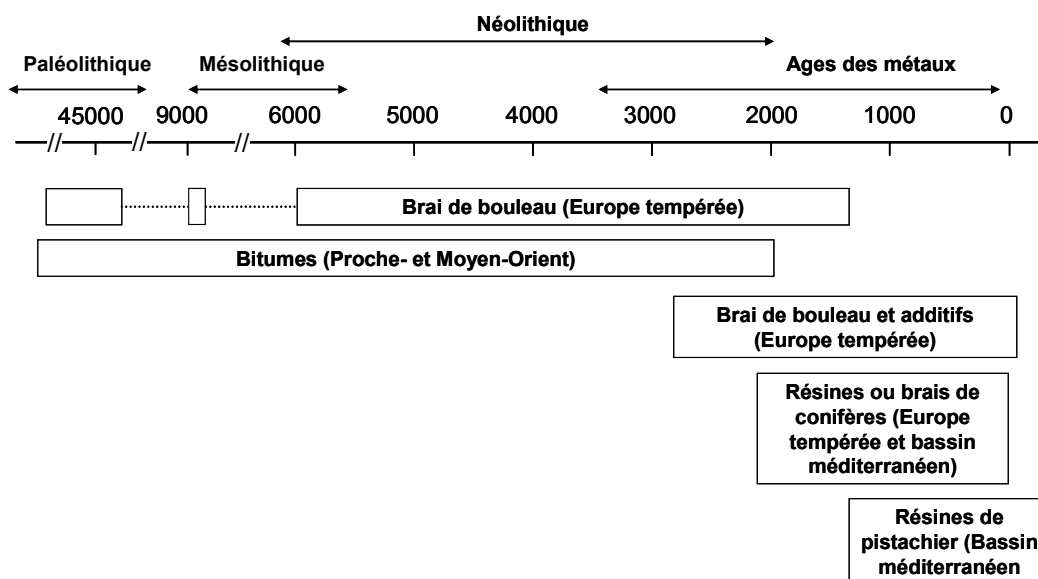


Figure 53 : Principaux adhésifs et enduits identifiés sur des sites datant du Paléolithique jusqu'aux âges des métaux, en fonction de leur localisation spatio-temporelle. [Main adhesives identified from Palaeolithic to Iron Age sites]

Dans ce contexte analytique, la chromatographie en phase gazeuse a montré sa robustesse pour l'analyse globale des extraits lipidiques. Parmi les autres techniques, la spectrométrie de masse isotopique est bien adaptée dans le cas d'échantillons dégradés, car elle s'applique surtout aux marqueurs de dégradation volatils. Pour l'analyse fine des biomarqueurs les plus lourds, esters des cires, triglycérides des graisses animales et végétales, c'est la spectrométrie de masse à infusion directe qui semble pouvoir répondre le mieux aux problèmes de caractérisation structurale.

Chapitre II

Développements méthodologiques réalisés pour l'analyse des matériaux organiques lipidiques

Introduction

Nous présentons dans cette partie la méthodologie que nous avons mise en place pour l'analyse des matériaux organiques amorphes préservés dans les céramiques archéologiques. L'approche en chromatographie en phase gazeuse haute température (HT CPG) couplée à la spectrométrie de masse (HT CPG/SM) est désormais classique, depuis les travaux d'Evershed et coll. au début des années 90 {Charters *et al.* 1993b; Charters *et al.* 1995; Evershed *et al.* 1990b; Evershed *et al.* 1992a; Evershed 1993b; Heron *et al.* 1989b; Heron *et al.* 1991; Heron & Evershed 1993}. Cette méthodologie – extraction, dérivation puis analyse – a permis, depuis 25 ans, d'identifier un certain nombre de matières naturelles conservées dans les céramiques mises au jour sur des sites archéologiques. Il est désormais possible d'identifier, grâce à la caractérisation de biomarqueurs et de marqueurs de dégradation lipidiques, les graisses animales, les produits laitiers, les cires végétales ou animales ou encore les résines et les brais végétaux, ainsi que certaines résines d'insectes {Aveling & Heron 1998; Charters *et al.* 1993a; Charters *et al.* 1995; Charters *et al.* 1997; Dudd & Evershed 1999; Evershed *et al.* 1991; Evershed *et al.* 1997a; Evershed *et al.* 2002; Heron *et al.* 1994; Mills & White 1989; Mottram *et al.* 1999; Pollard & Heron 1996; Regert 1996; Regert *et al.* 2001a; Regert *et al.* 2003a; Regert *et al.* 2003b}. Cependant, la chromatographie en phase gazeuse atteint ses limites quant il s'agit d'identifier et de caractériser finement les biomarqueurs les moins volatils des matières grasses, tels que les triglycérides pour les graisses animales et végétales ou les esters de certaines cires {Evershed *et al.* 1990c; Evershed 1996; Evershed *et al.* 1997a; Heron *et al.* 1994; Regert *et al.* 2001a}. Depuis quelques années, d'autres méthodologies ont donc été développées, basées soit sur les analyses moléculaires, soit sur les analyses isotopiques {Copley *et al.* 2003; Dudd & Evershed 1998; Dudd *et al.* 1999; Evershed *et al.* 1997a; Evershed *et al.* 2002; Mottram *et al.* 1999} ou encore sur les analyses biochimiques {Craig *et al.* 2000; Craig & Collins 2002}. Les analyses moléculaires ont principalement suivi deux axes: la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse et la spectrométrie de masse à infusion directe. Les biomarqueurs les moins volatils de la cire d'abeille, diesters, esters hydroxylés, etc. ont ainsi pu être caractérisés par spectrométrie de masse à ionisation électrospray, pour des échantillons archéologiques {Garnier *et al.* 2002; Garnier 2003}. La chromatographie liquide a montré un certain potentiel pour la caractérisation des graisses animales et des huiles végétales, mais les applications archéologiques sont encore peu nombreuses {Kimpe *et al.* 2001, 2002; Mottram *et al.* 1997; Mottram *et al.* 2001; Mottram & Evershed 2001}.

Nous avons choisi de nous focaliser sur l'étude des graisses animales, plus particulièrement sur la discrimination des graisses sous-cutanées et des produits laitiers ainsi que

sur l'identification de leur origine spécifique, par spectrométrie de masse à ionisation douce, sans couplage à la chromatographie liquide.

Notre étude s'est déroulée en plusieurs étapes. Tout d'abord le *screening* de la composition moléculaire des extraits lipidiques archéologiques en HT CPG et HT CPG/SM, suivi de la mise au point d'une méthode de fractionnement des extraits lipidiques pour la purification des triglycérides. Puis nous avons évalué le potentiel analytique et informatif de différentes techniques de spectrométrie de masse à ionisation douce, désorption laser et électrospray. Les techniques de désorption laser se sont révélées de très bonnes techniques de *screening* de composition en triglycérides des échantillons. Grâce aux techniques d'ionisation par électrospray, avec la possibilité d'analyse structurale des triglycérides par spectrométrie de masse tandem, nous avons mis au point des critères de discrimination des graisses animales et d'identification de leur origine spécifique. Ces critères sont basés sur la composition en triglycérides des graisses animales et leur composition en acides gras, triglycéride par triglycéride. La spectrométrie de masse à ionisation électrospray, la plus adaptée à l'analyse des graisses animales, a ensuite été appliquée à un ensemble d'échantillons archéologiques provenant du site de Clairvaux XIV, datant du Néolithique moyen (aux alentours de 3700 av. J.-C., Jura, France).

A. Méthodologie analytique élaborée : objectifs et choix réalisés

La méthodologie que nous avons développée tout au long de ces recherches se déroule en plusieurs étapes. La première étape consiste en l'analyse des lipides contenus dans les tessons et les résidus carbonisés de céramiques archéologiques, datant du Néolithique moyen, mises au jour sur le site de Clairvaux XIV (Jura, France), après extraction et dérivation, par chromatographie en phase gazeuse haute température (HT CPG) et HT CPG couplée à la spectrométrie de masse (HT CPG/SM). Cette étape permet d'identifier un certain nombre de matières grasses naturelles, depuis la cire d'abeille jusqu'aux graisses animales ainsi que les matières grasses végétales. Puis nous avons analysé les adhésifs de réparation et de décor observés et prélevés sur les céramiques de Clairvaux XIV, après extraction et dérivation, par HT CPG. Enfin, nous avons évalué le potentiel de différentes techniques de spectrométrie de masse pour la discrimination et l'identification de graisses animales de référence, afin de mettre au point une stratégie analytique novatrice pour l'identification des graisses animales archéologiques, par caractérisation structurale de leurs triglycérides.

A.1. Les lipides dans les céramiques

Comme nous l'avons décrit dans le premier chapitre, consacré à la littérature sur les résidus organiques, des biomarqueurs et des marqueurs de dégradation des matériaux naturels peuvent être conservés dans les céramiques archéologiques. Les parois des céramiques préhistoriques sont en effet poreuses, ce qui permet l'absorption des composés au cours de leur stockage/cuisson/utilisation dans les poteries. La matrice argileuse joue alors un rôle de protection de la matière organique contre les attaques du milieu extérieur. Le deuxième type de témoin des matières naturelles dans les céramiques sont les résidus carbonisés, que l'on retrouve adhérent à la paroi. Il a été montré depuis une vingtaine d'années que la conservation des matériaux organiques est telle qu'elle permet l'identification d'un certain nombre de biomarqueurs et de marqueurs des matières grasses naturelles d'origine {Condamin *et al.* 1976; Dudd *et al.* 1999; Evershed *et al.* 1990a; Evershed *et al.* 1990b, 1991; Evershed *et al.* 1992a; Evershed 1993b; Evershed *et al.* 1997a; Evershed *et al.* 1997c; Evershed *et al.* 1999; Evershed 2000; Evershed *et al.* 2002; Heron *et al.* 1989b; Heron & Evershed 1993; Kimpe *et al.* 2001, 2002; Mottram *et al.* 1999; Oudemans & Boon 1991; Passi *et al.* 1981; Regert 1996; Regert *et al.* 1998a; Regert *et al.* 2001a; Regert *et al.* 2001b; Regert *et al.* 2003a; Rottländer & Schlichtherle 1979; Rottländer & Hartke 1982; Rottländer 1983, 1986, 1990; Spangenberg 2004; Spangenberg *et al.* 2006}. Pour plus de détails le lecteur peut se reporter au chapitre I.

Les marqueurs lipidiques sont parmi les mieux conservés à l'échelle des temps archéologiques {Eglinton & Logan 1991; Evershed *et al.* 1999; Philp & Oung 1988; Regert 1996}. La conservation des résidus organiques en milieu humide, à l'abri de l'air et de la lumière, ce qui est le cas pour les sites lacustres, est particulièrement propice à la conservation des lipides, qui sont une classe de biomolécules caractérisées par leur hydrophobicité {Evershed *et al.* 1999; Regert *et al.* 1998a; Regert *et al.* 1998b; Regert *et al.* 1999; Regert *et al.* 2001b; Regert *et al.* 2003a; Spangenberg *et al.* 2006}. C'est pourquoi, afin d'identifier au mieux les matières naturelles qui ont été contenues dans les céramiques du site lacustre de Clairvaux XIV, nous avons choisi de suivre un protocole analytique spécifique aux biomarqueurs et marqueurs de dégradation lipidiques. Ce protocole a été développé en premier lieu par l'équipe du professeur R.P. Evershed, à l'Université de Bristol (Royaume-Uni) {Charters *et al.* 1993b; Charters *et al.* 1995; Charters *et al.* 1997; Evershed *et al.* 1992a; Evershed *et al.* 1995a; Heron *et al.* 1991; Heron & Evershed 1993}. Après l'avoir adapté, nous avons analysé les échantillons archéologiques provenant de Clairvaux XIV. Le protocole est schématisé sur la Figure 54.

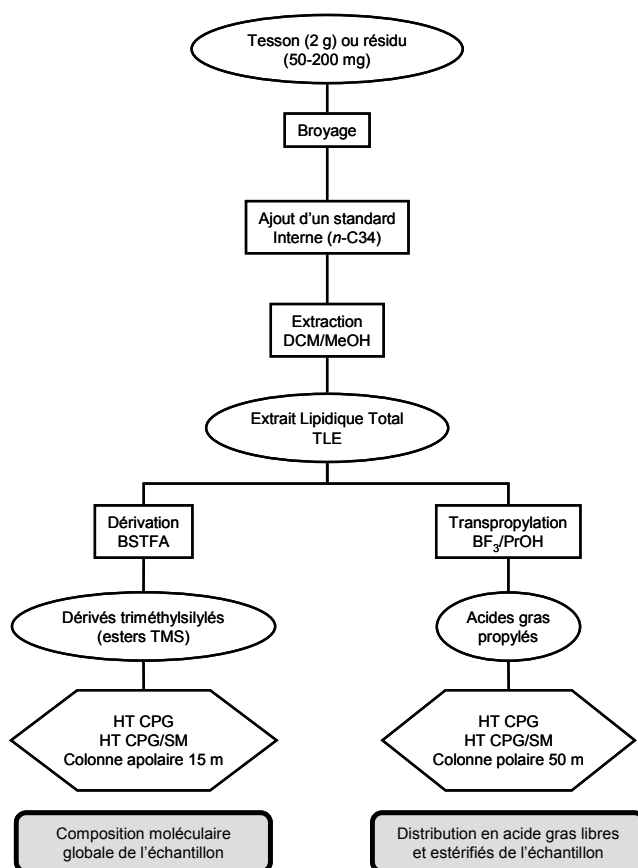


Figure 54 : Protocole d'analyse des échantillons archéologiques par chromatographie en phase gazeuse (DCM: dichlorométhane; MeOH: méthanol; BSTFA: *N,O*-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide; BF₃/PrOH: trifluorure de bore dans le propanol; HT CPG: chromatographie en phase gazeuse haute température; HT CPG/SM: HT CPG couplée à la spectrométrie de masse). [Scheme of the analytical protocol applied to archaeological samples by gas chromatography]

Après l'extraction des lipides, ces derniers sont dérivés, afin d'augmenter la volatilité des lipides les plus polaires. L'extrait lipidique total est ensuite analysé en chromatographie en phase gazeuse haute température, sur colonne apolaire. Ce protocole permet d'obtenir la composition moléculaire globale de l'extrait, depuis les acides gras jusqu'aux triglycérides des graisses animales, et depuis les alcanes jusqu'aux esters palmitiques de la cire d'abeille.

Pour les échantillons qui présentent des distributions très complexes en acides gras, mal résolues sur colonne apolaire, un autre protocole en CPG a été mis en place. Une partie de l'extrait lipidique est dérivé, spécifiquement pour les acides gras, qui sont ensuite analysés sur une colonne polaire. La distribution complexe en acides gras est alors résolue et il devient possible d'identifier les différents acides gras insaturés, permettant de mieux caractériser les matières grasses végétales.

Enfin, dans certaines des céramiques de Clairvaux XIV, des adhésifs de réparation ou de décor ont été observés. Ces composés sont, en Europe tempérée, à base de goudrons végétaux ou de résines, comme cela a été montré dans la littérature {Aveling & Heron 1998; Charters *et al.* 1993a; Hayek *et al.* 1991; Pollard & Heron 1996; Regert 1996; Regert & Rolando 2002; Regert *et al.* 2003b; Reunanen *et al.* 1993}. Ces matériaux sont analysés en HT CPG, afin de déterminer leur composition en biomarqueurs et marqueurs de dégradation terpéniques (Figure 55).

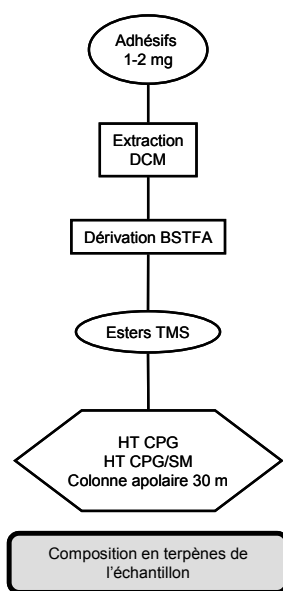


Figure 55 : Protocole d'analyse des résines et goudrons végétaux (DCM: dichlorométhane; BSTFA: *N,O*-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide; Esters TMS: esters triméthylsilylés; HT CPG: chromatographie en phase gazeuse haute température; HT CPG/SM: HT CPG couplée à la spectrométrie de masse). [Scheme of the analytical protocol developed for the analyse of vegetable resins and tars]

Cette méthodologie permet de caractériser la composition en diterpènes ou en triterpènes des échantillons d'adhésifs. Il est alors possible d'identifier le brai de bouleau, la résine de pin et ses dérivés, la résine de pistachier, etc.

La chromatographie en phase gazeuse haute température, appliquée à l'analyse des extraits lipidiques archéologiques permet d'avoir accès à un certain nombre d'informations, parmi lesquelles l'identification des matières grasses et des composés terpéniques. Les matières grasses identifiées sont des graisses animales, des produits laitiers, des cires végétales et animales et des matières grasses végétales. La CPG permet également de déterminer l'état de conservation des échantillons archéologiques. Il s'agit d'une étape de *screening*, rapide et facile à mettre en œuvre. Les échantillons peuvent ainsi être classés en différentes catégories. Il devient alors possible de mettre en place divers développements analytiques sur des familles de composés spécifiques, afin de les identifier plus finement.

A.2. Les développements en spectrométrie de masse pour l'analyse des triglycérides

La chromatographie en phase gazeuse haute température n'est pas adaptée à l'étude de certains biomarqueurs de haut poids moléculaire tels que les esters et diesters de la cire d'abeille {Garnier *et al.* 2002; Regert *et al.* 2003a} ou encore les triglycérides des graisses animales et végétales {Garnier 2003; Regert *et al.* 2003a}. La très bonne conservation des matières grasses animales, sur le site de Clairvaux XIV, déterminée à partir des données obtenues en HT CPG et HT CPG/SM, nous a orientés vers des développements focalisés sur les triglycérides, biomarqueurs des graisses animales. Il nous a semblé intéressant d'évaluer le potentiel informatif de différentes techniques de spectrométrie de masse à ionisation douce. Ces dernières ont en effet déjà été mise au point pour l'analyse des composés de hauts poids moléculaire de la cire d'abeille dans notre équipe {Garnier *et al.* 2002; Garnier 2003} mais également pour l'analyse de composés organiques présents dans les peintures dans d'autres équipes {Dietemmann *et al.* 2000; Keune & Boon 2004; van den Brink *et al.* 2001; Wyplosz 2003}.

Dans une première étape, nous avons mis au point une méthode de fractionnement des échantillons, afin d'isoler les triglycérides. Puis nous avons évalué le potentiel de différentes techniques de spectrométrie de masse à ionisation douce pour l'analyse de ces biomarqueurs, à savoir le MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight*) et le DIOS-TOF (*Desorption/Ionization on porous Silicon Time-of-Flight*) pour le *screening* des échantillons, et l'ESI-QqTOF (*ElectroSpray Ionization Quadrupole Time-of-Flight*) et l'ESI-FTICR (*ElectroSpray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*) pour la caractérisation structurale des triglycérides. Ceci a été fait par spectrométrie de masse tandem, en comparant deux techniques: la fragmentation induite par collision (CID, *Collision Induced Dissociation*) et la photodissociation par IRMPD (*InfraRed MultiPhoton Dissociation*). Cette méthodologie est présentée sur la Figure 56.

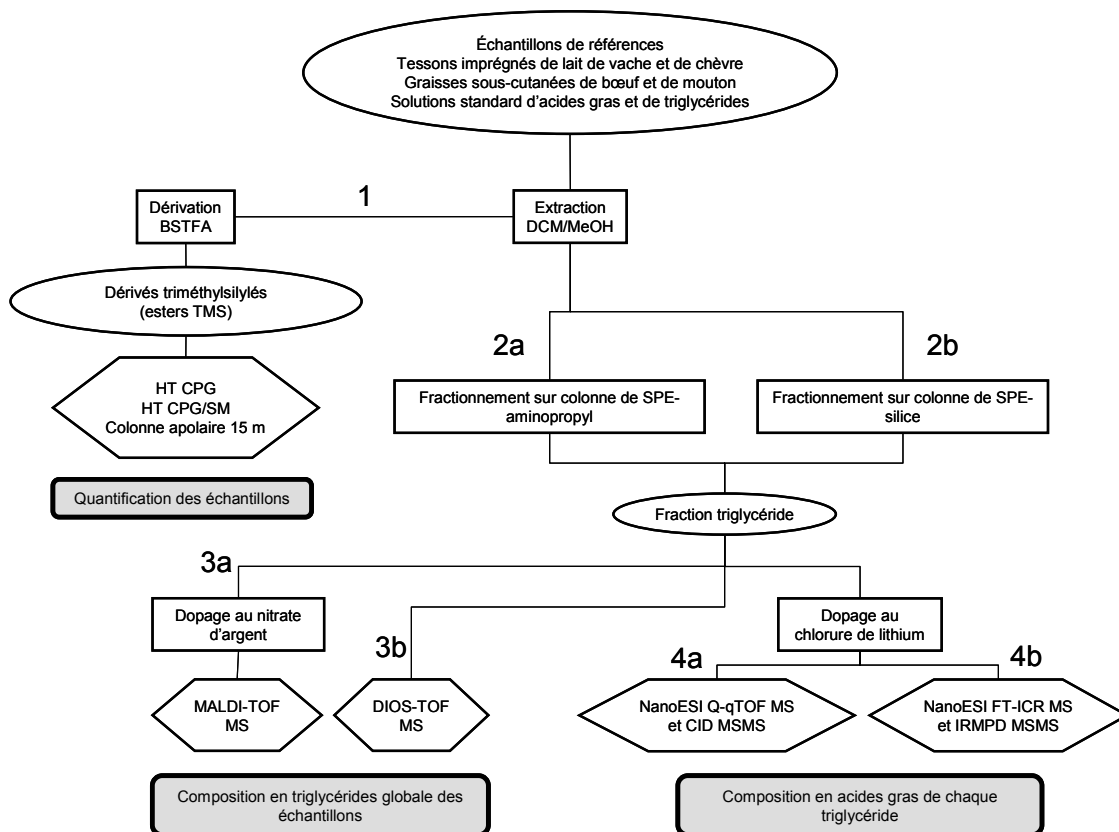


Figure 56 : Protocole d'analyse des échantillons de référence pour l'évaluation du potentiel de différentes techniques de spectrométrie de masse à ionisation douce, pour la caractérisation des triglycérides des graisses animales (SPE: *solid-phase extraction*; MALDI-TOF MS: *matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry*; DIOS-TOF MS: *desorption/ionisation on porous silicon time-of-flight mass spectrometry*; MS: *mass spectrometry*; MSMS: *tandem mass spectrometry*; nanoESI: *nanoelectrospray*; Q-q-TOF: *quadrupole time-of-flight*; CID: *collision induced dissociation*; FT-ICR: *Fourier transform ion cyclotron resonance*; IRMPD: *infrared multiphoton dissociation*). [Scheme of the analytical protocol developed on reference samples, evaluation of the analytical potential of different mass spectrometry techniques, for the characterisation of animal fats triacylglycerols]

A partir des données obtenues en spectrométrie de masse et en spectrométrie de masse tandem, nous avons déterminé des critères de discrimination des graisses animales (produits laitiers vs. graisses sous-cutanées) et des critères d'identification de leur espèce d'origine (boviné vs. capriné/oviné).

Le protocole le plus adapté – fractionnement et analyse en spectrométrie de masse nanoESI Q-q-TOF et spectrométrie de masse tandem CID – a ensuite été appliqué aux échantillons archéologiques, sélectionnés par HT CPG pour la conservation de leur distribution en triglycérides (Figure 57).

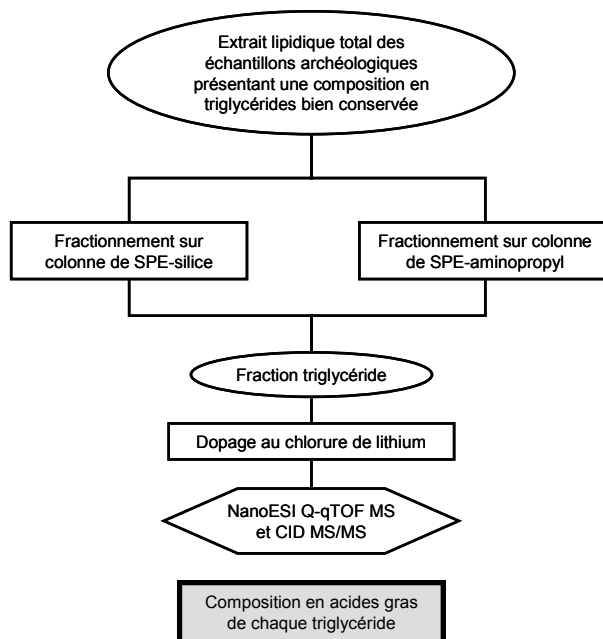


Figure 57 : Protocole analytique en spectrométrie de masse mis au point pour l'analyse de triglycérides archéologiques. [Scheme of the analytical protocol in mass spectrometry developed for the analysis of archaeological triacylglycerols]

La méthodologie mise au point est complexe, depuis les analyses de screening en HT CPG jusqu'à l'analyse structurale des triglycérides par spectrométrie de masse nanoESI Q-q-TOF CID MS/MS. Nous allons nous attacher dans les paragraphes qui suivent à décrire cette méthodologie, en commençant par la description des échantillons analysés, archéologiques et modèles. Puis nous verrons les différents modes de préparation de ces échantillons, en fonction de l'information qui est recherchée et de la technique analytique choisie. Enfin nous verrons les différents modes opératoires, en chromatographie en phase gazeuse et en spectrométrie de masse à ionisation par désorption laser et à ionisation électrospray.

B. Les échantillons considérés

B.1. Les échantillons archéologiques

Les échantillons archéologiques considérés sont des tessons et des résidus carbonisés prélevés sur des céramiques mises au jour sur le site de Clairvaux XIV (Néolithique moyen, vers 3700 av. J.-C., Clairvaux-les-Lacs, Jura, France, fouilles A.-M. et P. Pétrequin). Nous avons prélevé 57 tessons et 19 résidus carbonisés associés à des tessons, sur 57 céramiques, couvrant toute la séquence stratigraphique du site. Le nombre total de céramiques mises au jour est de 440. Nous avons également prélevé des adhésifs de réparation et de décor sur 29 poteries (23 individus analysés). Les détails de l'extraction, de la préparation et des différentes analyses des échantillons sont donnés dans les Tableau 14 (tessons et résidus) et Tableau 15 (adhésifs).

Les tessons sont prélevés à des endroits ne montrant pas de contamination par la colle de remontage ou par du vernis de marquage. Le sédiment restant après le nettoyage à l'eau, qui a lieu sur le site de fouille, est enlevé avec une lame de scalpel mono-usage, avant le broyage et l'extraction. Les résidus retrouvés encroûtés à la surface de la céramique sont prélevés et stockés dans des tubes en verre. Ils sont nettoyés au scalpel avant d'être extraits puis analysés, indépendamment du tesson associé. Les adhésifs sont prélevés au scalpel, avant d'être stockés dans des tubes en verre pour être extraits puis analysés.

Echantillon					HT CPG méthode MR1CER, GC2			CPG méthode FAME, GC1			Spectrométrie de masse		
Nom, Echantillon	Référence du vase	Description	MASSE après broyage (g)	Volume SI μL (<i>n</i> -C34, 1 mg/mL)	Volume prélevé (μL)	Chromatogramme	volume final cyclohexane (μL)	Volume prélevé (μL)	Chromatogramme	volume final cyclohexane (μL)	Fractionnement sur silice	fractionnement sur amniproyle	nanoESI
T1035A	12	tesson	3.960	20	100	T1035A1A	50						
T1035B		tesson B	2.808	0	50	T1035B1A	50					X	X
T1036A	30	tesson	2.505	20	100	T1036A1A	50						
MR1037T	36	tesson	4.000	20	100	MR1037TA	80						
MR1037R		résidu	0.135	20	100	MR1037RA	80	100	1037R2A	80			
T1038A	46	tesson	2.179	20	100	T1038A1A	80						
MR1039T *	48	tesson	2.646	20	100	MR1039TA	30						
T1039B		tesson B	0.841	0	50	T1039B1A	50						
MR1040R *		résidu	0.061	20	100	MR1040RA	100						
R1040B		résidu B	71.470	0	50	R1050B1A	50					X	X
T1041A	60	tesson	1.936	20	100	T1041A1A	50						
T1041B		tesson B	2.011	0	50	T1041B1A	50					X	X
MR1042T *	76	tesson	2.834	20	100	MR1042TA	30						
MR1043R *		résidu	0.084	20	100	MR1043RA	50						
MR1042A		tesson	2.256	20	100	MR1042AA	50						
T1044A	80	tesson	2.227	20	100	T1044A1A	50						
T1045A	81	tesson	1.677	20	100	T1045A1A	50						
T1046A	83	tesson	2.502	20	100	T1046A1A	50						
T1047A	87	tesson	1.730	20	100	T1047A1A	50						
T1047B		tesson B	1.814	0	50	T1047B1A	50					X	X
T1048A	91	tesson	2.760	20	100	T1048A1A	50						
MR1049T *	130	tesson	2.309	20	100	MR1049TA	50						
T1049B		tesson B	2.537	0	50	T1049B1A	50					X	X
T1050A	150	tesson	2.355	20	100	T1050A1A	30				X		X
T1051A	151	tesson	1.849	20	100	T1051A1A	30						
T1051B		tesson B	2.267	0	50	T1051B1A	50					X	X
T1052A	168	tesson	2.426	20	100	T1052A1A	30				X		X
MR1053T	183	tesson	3.070	20	100	MR1053TA	40						
MR1054R		résidu	0.130	20	100	MR1054RA	80						

T1055A	184	tesson	1.998	20	100	T1055A1A	100							
R1056A		résidu	0.039	20	100	R1056A1A	100							
T1057A	190	tesson	2.349	20	100	T1057A1A	100							
T1058A	195	tesson	3.688	20	100	T1058A1A	100							
T1058B		tesson B	1.520	0	50	T1058B1A	50					X	X	
T1059A	211	tesson	1.874	20	100	T1059A1A	20							
T1060A	213	tesson	2.061	20	100	T1060A1A	20							
MR1061T *	214	tesson	3.150	20	100	MR1061TA	100							
MR1061A *				20	100	MR1061TB	50							
T1061B				20	100	MR1061AA	50							
MR1062R *		résidu	0.192	0	50	T1061B1A	50					X	NON	
MR1062A *				20	100	MR1062RA	100							
R1062B				20	100	MR1062RC	50							
R1062B		résidu B	0.205	0	50	R1062B1A	50					X	X	
T1063A		215	tesson 1	2.855	20	100	T1063A1A	50						
T1063B	tesson 2		2.144	20	100	T1063B1A	50							
T1064A	216	tesson	1.636	20	100	T1064A1A	50							
R1065A		résidu	0.084	20	100	R1065A1A	100	100	R1065A1A	30				
T1066A	240	tesson	2.390	20	100	T1066A1A	100							
T1067A	251	tesson	1.615	20	100	T1067A1A	30							
T1068A	256	tesson	2.356	20	100	T1068A1A	30							
R1069A		résidu	0.045	0	100	R1069A1A	30							
T1070A	258	tesson	1.246	20	100	T1070A1A	30							
T1071A	259	tesson	2.878	20	100	T1071A1A	30							
T1071B		tesson B	4.055	0	50	T1071B1A	50					X	NON	
MR1072T	267	tesson	2.727	20	100	MR1072TA	50							
MR1073R		résidu	0.091	20	100	MR1073RA	80	100	1073R1A	30				
T1074A	278	tesson	2.813	20	100	T1074A1A	50							
T1075A	281	tesson	3.623	20	100	T1075A1A	30							
T1075B		tesson B	3.426	0	50	T1075B1A	50					X	NON	
T1076A	283	tesson	1.660	20	100	T1076A1A	30							
T1077A	291	tesson	1.935	20	100	T1077A1A	30							

T1078A	310	tesson	2.936	20	100	T1078A1A	80						
T1078B		tesson B	2.997	0	50	T1078B1A	50					X	X
MR1079T *	313	tesson 1	2.194	20	100	MR1079TB	30						
MR1079A		tesson 2	1.100	20	100	MR1079AA	50						
MR1080R *		résidu 1	0.180	20	100	MR1080RB	80				X		NON
MR1080A		résidu 2	0.040	20	100	MR1080AA	30						
T1081A	320	tesson	2.755	20	100	T1081A1A	30						
T1082A	321	tesson	2.303	20	100	T1082A1A	30						
T1082B		tesson B	2.097	0	50	T1082B1A	50					X	X
R1083A		résidu	0.050	20	100	R1083A1A	30						
T1084A	324	tesson	1.995	20	100	T1084A1A	50						
T1085A	326	tesson	2.444	20	100	T1085A1A	50						
R1085A		résidu	45.2 mg	20	100	R1085A1A	50						
MR1086T *	338	tesson 1	2.475	20	100	MR1086TA	100						
MR1086A *				20	100	MR1086AA	50						
MR1086C		tesson 2	4.238	20	100	MR1086CA	20						
T1086E		tesson 3	1.993	20	100	T1086E1A	30						
MR1086R *		résidu 1	0.210	20	100	MR1086RA	100						
MR1086B *				20	100	MR1086BA	50						
MR1086D		résidu 2	0.043	20	100	MR1086DA	20						
T1087A	346	tesson	1.364	20	100	T1087A1A	30						
T1087B		tesson B	1.664	0	50	T1087B1A	50						
T1088A	350	tesson	1.566	20	100	T1088A1A	50						
T1088B		tesson B	2.401	0								X	X
T1089A	357	tesson	4.003	20	100	T1089A1A	30						
T1090A	365	tesson	2.373	20	100	T1090A1A	100	100	T190A2B	100			
R1091A		résidu	0.050	20	100	R1091A1A	80						
T1092A	371	tesson	1.786	20	100	T1092A1A	100						
MR1093T *	379	tesson	2.656	20	100	MR1093TA	30						
MR1094R *		résidu	0.100	20	100	MR1094RA	80						
T1095A	381	tesson	2.340	20	100	T1095A1A	30						
T1096A	388	tesson	2.107	20	100	T1096A1A	30						
T1096B		tesson B	1.268	0	50	T1096B1A	50					X	X
MR1097T	400	tesson	1.794	20	100	MR1097TA	30						

MR1098T	404	tesson	1.384	20	100	MR1098TA	20							
MR1099R		résidu	0.151	20	100	MR1099RA	80	100	1099R1A	30				
T1100A	416	tesson	2.403	20	100	T1100A1A	80							
T1101A	421	tesson	3.151	20	100	T1101A1A	80					X	X	
T1102A	425	tesson	2.187	20	100	T1102A1A	50							
R1103A		résidu	0.067	20	100	R1103A1A	50	100	R1103A1A	30				
MR1104T *	432	tesson 1	3.833	20	100	MR1104TB	50							
MR1104A		tesson 2	1.686	20	100	MR1104AA	20							
MR1105R *		résidu 1	0.077	20	100	MR1105RB	50							
MR1105A		résidu 2	0.256	20	100	MR1105AA	20							
MR1106T *	440	tesson 1	1.556	20	100	MR1106TA	100							
MR1106A *				20	100	MR1106TB	30							
				20	100	MR1106AA	30							
MR1106B		tesson 2	3.012	20	100	MR1106BA	40							
MR1107R *		résidu 1	0.187	20	100	MR1107RA	100							
				20	100	MR1107RB	30							
MR1107A *				20	100	MR1107AA	30							
MR1107B	résidu 2	0.065	20	100	MR1107BA	80								

Tableau 14 : Liste des tessons et résidus archéologiques analysés en chromatographie en phase gazeuse et en spectrométrie de masse. [Archaeological potsherds and carbonized residues analysed by high temperature gas chromatography and mass spectrometry]

Les adhésifs prélevés sur les céramiques archéologiques sont présentés dans le Tableau

15.

N° MR	référence du vase	Description de l'échantillon	Concentration	HT CPG, méthode ADHESIF30M		
				V _{prélevé} (µL)	Chromatogramme	V _{final} (µL)
lupéol		référence	1 mg/mL	100	LUPI	100
Bétuline		référence	1 mg/mL	100	BETULINI	100
MR1108	17	adhésif de réparation avec bout d'écorce	1 mg/mL	100	MR1108C	20
MR1109	42	adhésif de réparation avec bout d'écorce	1 mg/mL	100	MR1109A	20
MR1110	60	décor à l'écorce de bouleau	1 mg/mL	200	MR1110A	20
MR1111	65	adhésif	1 mg/mL	100	MR1111A	20
MR1112	66	adhésif de réparation au bord, avec petits bouts d'écorce	1 mg/mL	100	MR1112A	20
MR1113	67	adhésif de réparation encore collé à la céramique, avec un bout libre caramélisé	1 mg/mL	100	MR1113A	20
MR1114	167	adhésif de réparation	1 mg/mL	100	MR1114A	20
MR1115	171	adhésif de réparation interne	1 mg/mL	100	MR1115A	20
MR1116		adhésif de réparation externe	1 mg/mL	100	MR1116A	20
MR1117	176	adhésif de réparation externe, encore collé au tesson	1 mg/mL	100	MR1117A	20
MR1118	213	adhésif de réparation externe, encore collé au tesson	1 mg/mL	100	MR1118A	20
MR1119	215	adhésif de réparation	1 mg/mL	100	MR1119A	20
MR1120	219	adhésif de réparation interne	1 mg/mL	100	MR1120A	20
			1 mg/mL	100	MR1120AI	20
		adhésif de réparation externe	1 mg/mL	100	MR1120AE	20
MR1122	222	adhésif de réparation interne	1 mg/mL	100	MR1122A	20
MR1123	223	adhésif de réparation externe	Non extrait			
MR1124	231	adhésif de réparation	1 mg/mL	100	MR1124A	20
MR1125	232	adhésif de réparation	1 mg/mL	100	MR1125C	20
MR1126	233	adhésif de réparation	1 mg/mL	100	MR1126A	20
MR1127	239	adhésif de réparation	1 mg/mL	100	MR1127A	20
MR1128	317	adhésif de réparation externe	1 mg/mL	100	MR1128A	20
MR1129	324	adhésif de réparation externe	1 mg/mL	100	MR1129A	20
MR1130	348	adhésif de réparation	1 mg/mL	100	MR1130A	20
MR1131	373	adhésif de réparation externe	1 mg/mL	100	MR1131A	20
MR1132	412	adhésif de réparation	Non extraits			
MR1133	423	adhésif de réparation interne				
MR1134		adhésif de réparation externe				
MR1135	427	adhésif de réparation entre écorce de bouleau				
MR1136	428	adhésif de réparation externe	1 mg/mL	100	MR1136A	20
MR1137	433	adhésif de réparation externe	1 mg/mL	100	MR1137A	20

Tableau 15 : Liste des échantillons d'adhésifs prélevés sur les céramiques de Clairvaux XIV et analysés en CPG, Les standards choisis sont le lupéol et la bétuline, principaux biomarqueurs du brai de bouleau, adhésif le plus couramment retrouvé sur les sites néolithiques en Europe. [Archaeological adhesives sampled on pottery from Clairvaux XIV and analysed by gas chromatography. Lupeol and betulin were chosen as standards as there are the main biomarkers of birch bark tar, the most widely used adhesives during the Neolithic period in Europe]

B.2. Les modèles naturels

B.2.1. Les graisses animales de référence

Afin de mettre au point la méthodologie en spectrométrie de masse, qui va nous permettre de déterminer les critères d'identification des graisses animales, nous avons travaillé sur des échantillons modèles. Il s'agit de tessons, fabriqués à la manière des néolithiques {Martineau 2003}, imprégnés de lait de vache entier et de lait de chèvre entier, achetés dans des magasins biologiques (Tableau 16). Les tessons sont mis à tremper dans le lait pendant 24 h, puis laissés à sécher jusqu'à atteindre un poids constant, à l'air libre. Ils sont ensuite préparés pour être analysés en spectrométrie de masse.

Type d'échantillon	Lait de vache entier bio	Lait de chèvre entier bio	Graisse sous-cutanée de bœuf bio	Graisse sous-cutanée de mouton bio
Extrait de tesson imprégné	1	1	0	0
Extrait	0	0	1	1

Tableau 16 : Caractéristiques des échantillons modèles préparés pour les développements en spectrométrie de masse. [Model samples prepared for the analytical developments in mass spectrometry]

Nous avons également travaillé sur des échantillons de graisses sous-cutanées. Ces dernières proviennent de gras de bœuf et de mouton, élevés en ferme biologique (Tableau 16). Ces échantillons ont été directement extraits avant d'être analysés en spectrométrie de masse.

Enfin, nous avons travaillé avec des tessons imprégnés de lait de différentes vaches, provenant d'un même troupeau de l'INRA. Les tessons ont été fabriqués au laboratoire, avec de l'argile industrielle mélangée à 20 ou 30% de dégraissant, de calibre comparable aux dégraissants archéologiques. Les 5 échantillons de lait nous ont été fournis par le Dr. Yves Chilliard, directeur de recherche à l'INRA (Centre de Recherche de Theix). Ces échantillons proviennent de 4 vaches, nourries exclusivement en prairie, sans complément alimentaire, et du tank contenant l'ensemble des laits du troupeau.

Nous avons imprégné un tesson par échantillon de lait, en l'immergeant pendant 24 h (Tableau 17).

	20% de dégraissant					30 % de dégraissant
Référence de la vache	vache 1055	vache 2002	vache 3040	tank	vierge	vache 1022
Référence du tesson	13	20	26	7	18	117

Tableau 17 : Références des tessons imprégnés de lait de vache du troupeau INRA, prélevés juste après leur imprégnation. [Potsherds impregnated with INRA cow milks, extracted just after the impregnation]

Les échantillons ont été laissés à sécher à l'air libre, jusqu'à poids constant. Ils ont ensuite été préparés pour être analysés, en chromatographie en phase gazeuse et en spectrométrie de masse.

B.2.2. Les huiles végétales de référence

Les échantillons d'huiles de référence proviennent de la collection de substances naturelles du laboratoire du C2RMF (www.c2rmf.com). Sur le site de Clairvaux XIV, des graines de pavot et de lin ainsi que des noisettes ont été retrouvées, c'est pourquoi leurs huiles ont été sélectionnées. Les autres huiles ont été sélectionnées car elles représentent un panel d'huiles comestibles, dont on sait qu'elles ont été utilisées et consommées dans l'Antiquité (Tableau 18).

Huile	Echantillon	Concentration	Vprélevé μL	Chromatogramme
Huile de lin clarifiée	H001	1 mg/mL	100	H001A
Huile de lin décolorée	H003	1 mg/mL	100	H003A
Huile de noix à l'olivier	H004	1 mg/mL	100	H004A
Huile de noix du Périgord	H005	1 mg/mL	100	H005A
Huile de noix; Lesieur	H006	1 mg/ml	100	H006A
Huile de noisette; Produits de France	H007	1 mg/mL	100	H007A
Huile d'œillette (pavot)	H008	1 mg/mL	100	H008A
Huile d'olive; Casino	H009	1 mg/mL	100	H009A
Huile d'olive; Lesieur	H010	1 mg/mL	100	H010A
Huile d'olive; Puget	H011	1 mg/mL	100	H011A
Huile de palme	H013	1 mg/mL	100	H013A
Huile de pistachier (fraction liquide)	H014	1 mg/mL	100	H014A
Huile de pistachier (fraction solide)	H015	1 mg/mL	100	H015A

Tableau 18 : Echantillons d'huiles de référence analysés en CPG sur colonne select FAME, après dérivation au BF₃/PrOH (transpropylation). [Reference oil samples analysed by GC on a select FAME column, after a propylation by BF₃/PrOH]

Il n'existe pas notre connaissance de littérature sur l'identification chimique d'huiles archéologiques au Néolithique, en Europe tempérée.

B.3. Les modèles vieillis

Nous avons également travaillé sur des échantillons vieillis, afin de modéliser la dégradation des triglycérides pour des produits laitiers absorbés dans des céramiques. Les échantillons de lait sont ceux fournis par le Dr. Yves Chilliard (INRA, Theix), provenant de 4 vaches d'un même troupeau et du tank de ce troupeau. Les tessons ont été fabriqués au laboratoire, comme indiqué précédemment. Les lait du tank et de 3 des vaches ont servi à imprégner des tessons à 20% de dégraissant, et le lait de la dernière vache a été utilisé pour imprégner des tessons à 30% de dégraissant. Ceci a été fait pour déterminer si la quantité de dégraissant a une influence déterminante sur l'imprégnation des tessons.

Nous avons imprégné 5 tessons par échantillon de lait, pendant 24 h, par immersion. Un tesson supplémentaire (20% de dégraissant, tesson 37, vache 1055) a été imprégné avec du lait d'une vache et vieilli sans sédiment, pour servir de témoin. Les tessons ont été laissés à sécher pendant 48 h. Ils ont ensuite été enfouis dans du sédiment provenant des couches stériles de Clairvaux XIV. Pour chaque étape de vieillissement, un tesson par échantillon de lait a été enfoui dans un cristallisateur. Chaque cristallisateur contenait donc 5 tessons, permettant de prélever les échantillons à 5 jours (V1), 10 jours (V2), 16 jours (V3), 25 jours (V4) et 16 semaines (V5). Le cristallisateur contenant les échantillons destinés à être prélevés à 10 jours contenait également 2 tessons vierges, un avec 20% de dégraissant et l'autre avec 30% de dégraissant. Le tesson témoin, imprégné de lait de la vache 1055 (tesson 37) a été mis dans l'enceinte de vieillissement, sans sédiment, pour être prélevé à 10 jours. L'enceinte de vieillissement est maintenue pendant toute la durée de l'expérimentation à 80% d'humidité et à 35°C. Les détails du vieillissement sont donnés dans le Tableau 19.

Etapas du vieillissement		Sédiment							Flacon vide
		20% de dégraissant					30 % de dégraissant		20%
		vache 1055	vache 2002	vache 3040	tank	vierge	vierge	vache 1022	vache 1055
V1	t = 5 j.	14	21	27	9	–	–	119	–
V2	t = 10 j.	15	22	28	32	35	111	120	37
V3	t = 15 j.	16	23	29	34	–	–	122	–
V4	t = 25 j.	17	24	31	38	–	–	123	–
V5	t = 16 s.	19	25	33	40	–	–	126	–

Tableau 19 : Références des tessons vieillis, avec les références des vaches dont le lait provient et les étapes du vieillissement auxquelles ils ont été prélevés. [Aged potsherds impregnated with INRA cow milks, with their stage of ageing and their reference numbers]

Une fois prélevés, ces échantillons sont lavés à l'eau distillée puis laissés à l'air libre pour sécher pendant 24 à 48 h. Ils sont ensuite préparés pour être analysés en chromatographie en phase gazeuse et en spectrométrie de masse. Les échantillons sont listés dans le Tableau 20.

Références tesson					HT CPG, colonne apolaire, méthode MRICER						Spectrométrie de masse		
Vache	Tesson	Quantité de dégraissant	Etape	masse tesson g	Echantillon CPG	V standard interne n-C ₂₇ (1mg/mL)	V total = V après extraction + V(SI) µL	V prélevé µL	Chromatogramme	V reprise µL	Echantillons ESI	F	Analyse en ESI
Tank du troupeau	7	20%	0	3.612	V0 007A	20	410	200	V0 007A1B	400	V0 007B		X
	9		I	3.602	V1 009A	50	490	200	V1 009A1B	200	V1 009B		
	32		II	2.908	V2 032A	20	510	200	V2032A1A	100	V2 032B		
	34		III	3.958	V3 034A	10	460	200	V3034A1A	50	V3034B		
	38		IV	3.054	V4038A	10	500	200	V4038A1A	100	V4038B		
	40		V	3.308	V5040A	10	460	200	V5040A1A	100	V5040B		
Vache 1055	13	20%	0	3.440	V0 013A	20	510	200	V0 013A1B	400	V0 013B		X
	14		I	3.864	V1 014A	20	510	200	V1 014A1A	200	V1 014B		
	15		II	3.569	V2015A	20	490	200	V2015A1A	100	V2015B		
	16		III	3.214	V3 016A	10	400	200	V3016A1A	100	V3016B		
	17		IV	3.258	V4017A	10	490	200	V4017A1A	100	V4017B		
	19		V	3.062	V5 019A	10	510	200	V5019A1A	100	V5019B		
Vache 1055	37	20%	II	2.143	V2 037A	20	500	200	V2 037A1A	100	V2 037A	X	X
Vache 2002	20	20%	0	3.094	V0 020A	20	490	200	V0 020A1B	400	V0 020B		X
	21		I	3.335	V1 021A	20	520	200	V1 021A1A	200	V1 021B		
	22		II	3.168	V2 022A	20	500	200	V2 022A1A	200	V2 022B		
	23		III	3.005	V3 023A	10	490	200	V3023A1A	100	V3023B		
	24		IV	2.263	V4024A	10	510	200	V4024A1A	50	V4024B		
	25		V	2.654	V5025A	10	510	200	V5025A1A	100	V5025B		
Vache 3040	26	20%	0	3.450	V0 026A	20	420	200	V0 026A1B	400	V0 026B		X
	27		I	3.529	V1 027A	20	510	200	V1 027A1A	200	V1 027B		
	28		II	3.439	V2 028A	20	490	200	V2028A1A	100	V2 028B		
	29		III	3.696	V3 029A	10	490	200	V3029A1A	100	V3029B		
	31		IV	3.220	V4031A	10	490	200	V4031A1A	100	V4031B		
	33		V	3.682	V5033A	10	510	200	V5033A1A	100	V5033B		
Vache 1022	117	30%	0	2.894	V0 117A	20	440	200	V0 117A1B	400	V0 117B		X
	119		I	2.824	V1 119A	20	500	200	V1 119A1A	200	V1 119B		
	120		II	2.893	V2 120A	20	510	200	V2 120A1A	100	V2 120B		
	122		III	3.058	V3 122A	10	460	200	V3122A1A	100	V3122B		
	123		IV	2.910	V4123A	10	510	200	V4123A1A	100	V4123B		
	126		V	2.573	V5126A	10	490	200	V5126A1A	100	V5126B		
Tessons vierges	18	20%	0	2.820	V0 018A	20	450	200	V0 018A1B	400	V0 018B		X
	35		II	2.971	V2 035A	20	490	200	V2 035A1A	100	V2 035B		
	111	30%	II	3.158	V2 111A	20	500	200	V1 111A1A	100	V2 111B		

Tableau 20 : Liste des tessons vieillis, avec les conditions d'extraction et les données d'analyse (F: fractionnement sur colonne aminopropyle). [Extraction and analytical conditions used for the analysis of the aged model samples, F: fractionation on aminopropyle cartridges]

C. Les modes de préparation des échantillons

Les différentes analyses auxquelles sont soumis les échantillons nécessitent diverses préparations de ces derniers. La première étape, pour tous les échantillons, qu'ils soient archéologiques ou modèles, est toujours l'extraction lipidique. L'analyse en chromatographie en phase gazeuse nécessite la dérivation des composés les plus polaires. Afin de purifier les triglycérides archéologiques et ceux des échantillons vieillis pour leur analyse en spectrométrie de masse, les extraits lipidiques sont fractionnés. Enfin, les triglycérides étant des composés peu polaires, difficilement ionisables, les solutions analysées en spectrométrie de masse à ionisation douce ont besoin d'être dopées avec des sels métalliques.

C.1. Extraction des lipides

C.1.1. Les tessons et les résidus carbonisés

Le protocole d'extraction lipidique a été mis au point par Evershed et coll. dans les années 90 {Charters *et al.* 1993b; Charters *et al.* 1995; Evershed *et al.* 1990b; Evershed *et al.* 1992a; Heron *et al.* 1991}. Il est toujours le mieux adapté pour l'extraction lipidique des échantillons archéologiques.

Les tessons, quelle que soit leur origine – archéologique ou moderne – sont broyés à l'aide d'un broyeur électrique (broyeur d'analyse, IKA) avant d'être mis en suspension dans un mélange de solvant dichlorométhane/méthanol, dans un tube mono-usage, afin d'éviter les contaminations croisées. Les résidus sont broyés dans un mortier en agathe dont la taille est adaptée à la quantité d'échantillon disponible. Un standard interne est ajouté afin de quantifier les lipides extraits. Les suspensions obtenues sont ensuite passées aux ultrasons pour favoriser l'extraction solide/liquide. Après centrifugation, le surnageant est transvasé dans un tube neuf avant d'être évaporé à sec sous un courant d'azote. L'extrait lipidique total est alors repris dans un volume donné, 500 μ L pour les échantillons archéologiques, entre 500 μ L et 1 mL pour les échantillons modèles (Encadré 1).

Les échantillons de graisses sous-cutanées sont traités de la même manière, mais ne sont pas broyés ni centrifugés.

1. Extraction lipidique des échantillons archéologiques et modèles

Broyage des tessons (2 g) dans un broyeur électrique / Broyage des résidus (50 à 200 mg) dans un mortier en agathe.

Pesée.

Ajout du standard interne, *n*-tétratriacontane (*n*-C₃₄, 20 µL à 1 mg/mL) ou *n*-heptacontane (*n*-C₂₇, 20 µL à 1 mg/mL).

Ajout du solvant dichlorométhane/méthanol (10 mL, DCM/MeOH, 2:1 v/v).

Ultrasons, 2 × 15 min, décantation partielle de la poudre.

Transvasement du surnageant dans des tubes à centrifugation.

Centrifugation, 30 min à 3000 rd/min.

Transvasement du surnageant dans des tubes en verre de 4 mL.

Evaporation à sec sous flux d'azote, 40°C.

Reprise dans un volume donnée (500 µL à 1 mL) de DCM/MeOH (2:1 v/v)

Au début de cette étude, l'extraction était réalisée avec du chloroforme/méthanol (2:1 v/v), comme ce qui était décrit dans la littérature {Charters *et al.* 1993b; Charters *et al.* 1995; Evershed *et al.* 1990b; Evershed 1993b; Evershed *et al.* 1995a}. Nous avons rencontré des problèmes avec le chloroforme, qui a entraîné une méthylation des acides gras pendant l'extraction aux ultra-sons, et une transméthylation des triglycérides présents. Ceci peut être expliqué par la combinaison du chloroforme, du méthanol et de l'argile des céramiques, jouant le rôle de catalyseur, ainsi que des ultra-sons, qui entraîne une méthylation des acides gras {Arpino & Ourisson 1971}. Les solutions extraites au chloroforme/méthanol ont été analysées quelques mois après l'extraction et une nette dégradation du taux de triglycérides tend à montrer qu'il s'agit bien d'une transméthylation. Ceci n'avait jamais été rapporté dans la littérature. Une fois ce problème identifié, nous avons choisi de travailler avec du dichlorométhane au lieu du chloroforme. Seuls les tessons présentant des chromatogrammes interprétables (avec présence de marqueurs identifiables) ont été ré-extraits au dichlorométhane/méthanol (Tableau 14, échantillons marqués d'une *).

Les échantillons qui présentaient une distribution en triglycérides bien conservée, caractéristique de graisses animales, ont été extraits une deuxième (ou troisième) fois, sans ajout de standard interne et sont notés tesson ou résidu B (Tableau 14).

C.1.2. Les adhésifs

Les échantillons d'adhésifs prélevés sur les céramiques ont été traités de manière plus simple. La quantité d'échantillon nécessaire est bien plus petite, car la matière organique n'est pas diluée dans une matrice minérale comme c'est le cas pour les tessons. Quelques milligrammes

d'adhésif sont prélevés, mis en solution dans du dichlorométhane et passés aux ultra-sons (Encadré 2).

2. Extraction des adhésifs

Prélèvement de quelques mg d'adhésifs.

Pesée.

Broyage dans un mortier en agathe.

Mise en solution dans le dichlorométhane à une concentration de 1 mg/mL.

Ultra-sons, 10 min.

Les échantillons sont ensuite prêts pour être dérivés afin d'être analysés en chromatographie en phase gazeuse.

C.2. Dérivation des lipides pour l'analyse en chromatographie en phase gazeuse

C.2.1. Triméthylsilylation

Tous les échantillons analysés en CPG (extraits de tessons, de résidus et d'adhésifs archéologiques, et extraits d'échantillons modèles) sont dérivés avec le même protocole. Les extraits qui sont analysés en chromatographie en phase gazeuse sont composés des principales classes de lipides que l'on trouve dans les matières grasses {Evershed *et al.* 1990a; Evershed 1993b; Evershed *et al.* 1999; Heron & Evershed 1993; Regert *et al.* 2003a}. Il s'agit de lipides de volatilité et de polarité assez variées depuis les acides gras jusqu'aux triglycérides, des alcanes jusqu'aux esters palmitiques, en passant par leurs produits d'hydrolyse, ainsi que les stérols. Il est donc nécessaire de dériver les lipides les plus polaires afin d'analyser l'ensemble des molécules présentes en une seule étape. Il existe en chromatographie en phase gazeuse un certain nombre de protocoles de dérivation adaptés à tout type de molécules {Arpino *et al.* 1995; Evershed 1993a, 1993c, 1993d; Niessen 2001}. Nous avons choisi la triméthylsilylation car elle présente plusieurs avantages. Elle permet de garder intacts les composés tels que les triglycérides et les autres esters, n'entraînant pas de transestérification. Elle n'est pas spécifique aux acides et s'applique à toutes les fonctions protiques. Ainsi les stérols et les alcools sont dérivés en même temps que les acides gras. Les sites protiques (OH) sont dérivés en esters de triméthylsilyl (esters TMS), par l'ajout de *N,O*-bis-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA). Ce réactif existe sous deux formes, soit pur, soit avec 1 % de triméthylchlorosilane (TMCS) qui catalyse la réaction. C'est un réactif assez instable, qui doit être conservé au frais et à l'abri de l'humidité. Le protocole est décrit dans l'encadré 3.

3. Dérivation au BSTFA

Prélèvement d'une portion de l'extrait lipidique total (100 µL en général).

Evaporation à sec sous flux d'azote, 40°C.

Ajout du réactif BSTFA (50 µL).

Chauffage à 80°C, 30 min.

Evaporation à sec du réactif en excès, sous flux d'azote, 40°C.

Reprise dans un volume donné de cyclohexane (10 à 100 µL pour les échantillons archéologiques).

C'est un protocole très simple à mettre en œuvre, ce qui est un avantage quand il s'agit de travailler sur de larges séries d'échantillons. Les solutions standard qui sont analysées sont elles aussi dérivées avec ce protocole. Une fois l'échantillon dérivé, il est prêt à être injecté dans le chromatographe.

C.2.2. Dérivation des acides gras

Afin d'identifier au mieux les matières grasses végétales, nous avons utilisé une méthode de dérivation spécifique aux acides gras. En effet, les matières grasses végétales sont composées principalement de triglycérides avec des acides gras fortement insaturés, mais avec un nombre d'atomes de carbone relativement restreint (C_{16} et C_{18} très majoritairement) {Condamin *et al.* 1976; Dudd *et al.* 1998; Holcapek *et al.* 2003; Jakab *et al.* 2002; O'Brian 1999; Sandra *et al.* 2002}. Il est donc nécessaire, pour déterminer la présence d'huile et éventuellement caractériser ces huiles, d'identifier précisément les acide gras présents, et de déterminer leurs insaturations avec la meilleure résolution chromatographique possible. Pour cela, leur dérivation doit être adaptée à l'analyse sur colonne polaire. Les échantillons archéologiques qui présentaient des distributions complexes en acides gras et les échantillons d'huiles de référence ont donc été méthylés.

Nous avons vu dans la partie bibliographique (Chapitre I) que la transestérification des triglycérides en acides gras alkylés pouvait se faire de différentes manières. Nous avons choisi d'adapter un protocole utilisant le complexe de trifluorure de bore dans un alcool, le propanol ($BF_3/PrOH$). Les composés obtenus de cette façon sont des esters propyloxy d'acides gras, moins volatils que les esters méthyloxy, ce qui permet, lors de l'étape d'évaporation sous courant d'azote, d'éviter leur perte (Encadré 4).

4. Dérivation des acides gras au BF₃/PrOH

Prélèvement d'une portion du TLE (100 µL).

Evaporation à sec sous flux d'azote, 40°C.

Ajout de 50 µL de BF₃/PrOH (BF₃ 14% w:v dans le propanol, Acros Organics).

Chauffage à 80°C pendant 4 h.

Neutralisation du réactif en excès avec quelques gouttes d'une solution saturée de Na₂CO₃.

Ajout de 250 µL d'eau ultrapure (MilliQ) et de 250 µL de dichlorométhane.

Extraction de la phase organique.

Séchage de la phase organique avec du Na₂SO₄.

Transvasement de la phase organique séchée dans un tube neuf.

Evaporation à sec sous flux d'azote, 40°C.

Reprise dans un volume donné de cyclohexane (10 à 100 µL)

La dérivation au BF₃/PrOH est spécifique des esters et des acides, c'est pourquoi les échantillons sont ensuite dérivés au BSTFA afin de triméthylsilyler les stérols qui peuvent être présents (Encadré 3). Une fois ces dérivations faites, les échantillons sont prêts à être analysés en chromatographie en phase gazeuse.

C.3. Fractionnement et purification des triglycérides

Les triglycérides sont des molécules peu polaires, difficilement ionisables en spectrométrie de masse à ionisation douce. Afin de les analyser dans les meilleures conditions possibles, il est préférable de les séparer des molécules qui sont susceptibles de mieux s'ioniser. C'est le cas par exemple des acides gras. De plus, l'ionisation par électrospray nécessite un courant ionique dans la solution infusée. La présence d'alcane peut induire une baisse de ce courant ionique, ce qui empêche une bonne ionisation des molécules. Lorsqu'ils sont présents dans les extraits lipidiques, notamment à cause du standard interne, il est donc nécessaire de s'en débarrasser. Nous avons mis au point deux fractionnements : l'un sur colonne de silice, permet de purifier les triglycérides des acides gras ainsi que des alcanes; l'autre, sur colonne aminopropyle, permet de séparer les triglycérides et les acides gras. Il est recommandé pour les échantillons qui ne contiennent pas d'alcane. Les échantillons modèles ne sont pas fractionnés, car ils ne contiennent que peu d'acides gras et pas d'alcane. Seul un échantillon vieilli (V2037), qui contient une certaine quantité d'acides gras, est fractionné sur colonne aminopropyle.

C.3.1. Le fractionnement sur silice

Ce premier fractionnement a été utilisé pour purifier des échantillons archéologiques, après avoir été mis au point sur des solutions standards contenant des acides gras, des stérols, des alcanes et des triglycérides. Les échantillons archéologiques fractionnés contenaient un alcane – le standard interne, *n*-C₃₄. Nous nous sommes basés sur le protocole mis au point par Garnier *et al.* pour le fractionnement de la cire d'abeille {Garnier *et al.* 2002; Garnier 2003}. Ce protocole met en jeu deux fractionnements, le premier acide/neutre sur colonne aminopropyle, suivi du fractionnement de la fraction neutre sur colonne de silice. Afin d'éviter l'utilisation de deux colonnes, qui peut induire une perte de matière et qui augmente les risques de pollution, nous avons choisi de ne garder que le fractionnement sur colonne de silice, en l'adaptant et en nous basant sur la littérature disponible en géochimie {Charrié-Duhaut *et al.* 2000}.

Les colonnes utilisées sont des colonnes de purification SPE (*Solid-Phase Extraction*) de silice, qui présentent l'avantage de donner des résultats reproductibles. Le fractionnement sur phase normale se fait avec des solvants de polarité croissante. Les composés les moins polaires, qui sont les moins bien retenus, sont donc élués au début. Le protocole est décrit dans l'encadré 5 ci-dessous. Nous ne décrivons pas tous les tests qui ont été effectués sur des solutions standards, afin de tester la capacité des colonnes, le meilleur ordre d'éluion ou encore la quantité minimale de solvant nécessaire à une bonne séparation mais nous présentons ici la procédure optimisée. Des colonnes provenant de différents fournisseurs ont été testées et ce sont les colonnes Alltech (500 mg, 3 mL) qui ont montré les meilleures qualités de séparation et de reproductibilité.

5. Fractionnement sur colonne de silice

Colonne SiO₂, Alltech.

Lavage de la colonne: 2 mL *n*-hexane.
2 mL dichlorométhane/méthanol (2:1 v/v).

Equilibrage de la colonne: 4 mL *n*-hexane.

Dépôt d'un aliquot d'extrait lipidique (100 µL pour les échantillons archéologiques).

Fraction A: 1 mL *n*-hexane. Fraction C: 1.5 mL dichlorométhane/méthanol (2:1 v/v).

Fraction B: 1 mL dichlorométhane. Fraction D: 3.5 mL dichlorométhane/méthanol (1:1 v/v).

Le protocole de dérivation au BSTFA des fractions analysées en chromatographie en phase gazeuse est donné dans l'encadré 3.

La Figure 58 présente les chromatogrammes obtenus pour les différentes fractions d'une solution standard S040 fractionnée sur colonne de silice. Les conditions chromatographiques sont présentées dans le paragraphe D. La fraction A contient l'alcane, la fraction B contient les

diglycérides et les triglycérides et la fraction C contient les stérols. La fraction D contient les acides gras, mais elle n'est pas présentée en Figure 58.

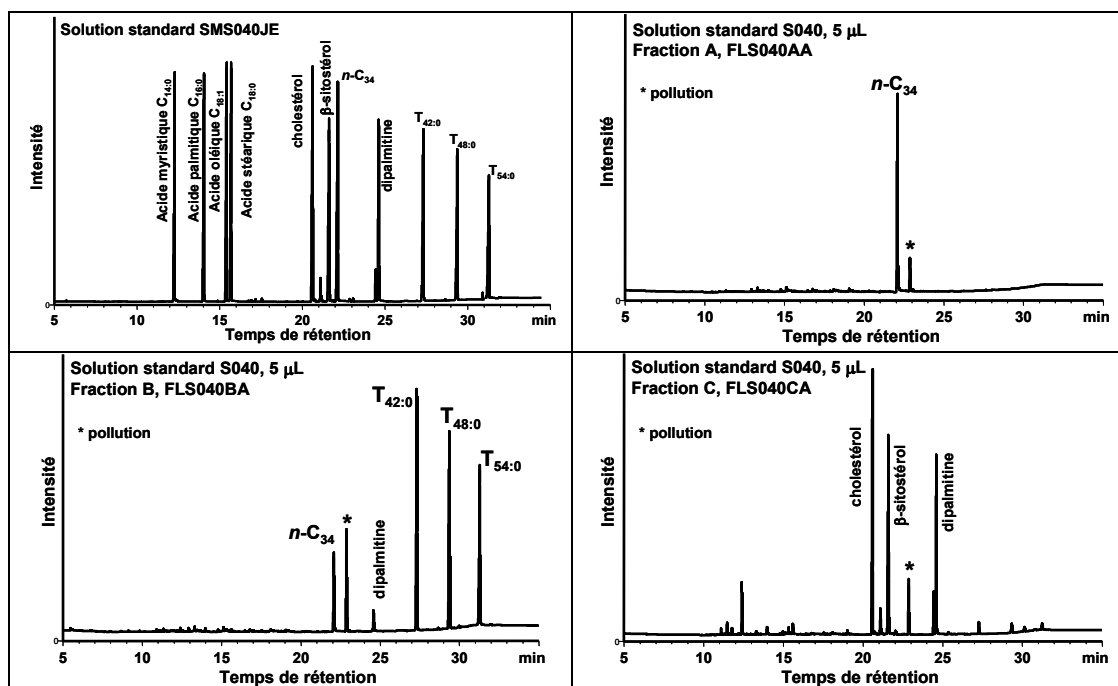


Figure 58 : Chromatogrammes de la solution standard S040 avant et après fractionnement sur colonne de silice (méthode MR1CER, encadrés 5, 3 et 9). [Gas chromatograms of the standard solution S040 before and after fractionation on a silica column]

Les échantillons archéologiques qui ont été fractionnés avec cette méthode sont présentés dans le Tableau 21. Nous n'avons analysé en CPG que les fractions A et B, afin de s'assurer de la séparation des composés non polaires et de vérifier l'absence d'alcane dans la fraction B (Figure 58).

Echantillon	V _{prélevé}	Quantité de matière	Fraction	Fichier CPG	V _{final}	Commentaires
T1101A	100	99 µg	FM1101A	FM1101AA	100	Standard interne
			FM1101B	FM1101BA	100	DAGs et TAGs
T1050A	100	85 µg	FM1050A	FM1050AA	100	Standard interne
			FM1050B	FM1050BA	100	DAGs et TAGs
T1052A	50	25 µg	FM1052A	FN1052AA	50	Standard interne
			FM1052B	FN1052BA	50	DAGs et TAGs

Tableau 21 : Echantillons archéologiques fractionnés sur colonne de silice et fichier CPG correspondants (DAGs: diglycérides, TAGs: triglycérides; méthode MR1CER, encadrés 5, 3 et 9). [Archaeological samples fractionated on silica columns and corresponding GC filename]

Les chromatogrammes obtenus pour l'échantillon T1050 sont présentés en Figure 59.

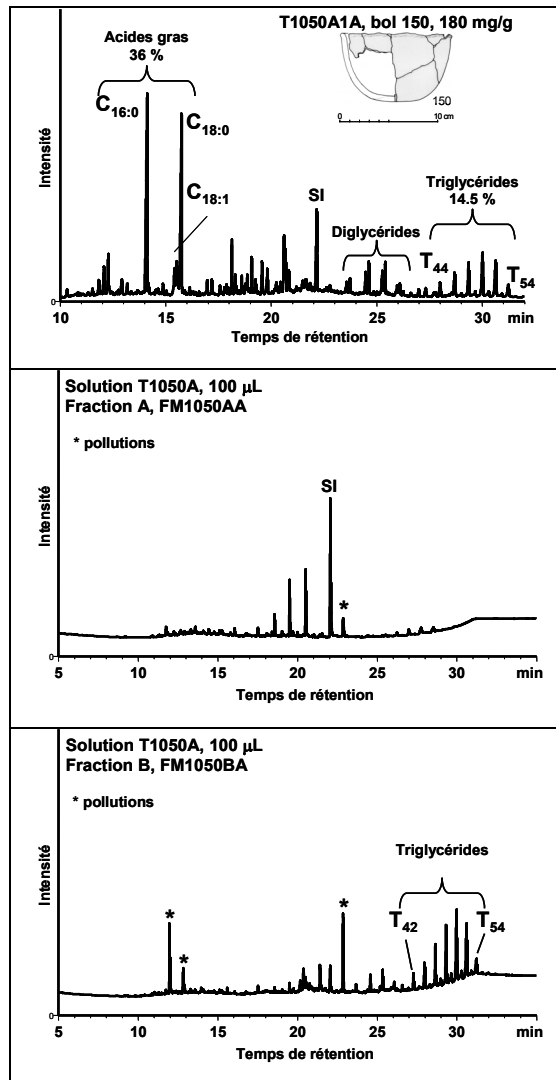


Figure 59 : Chromatogrammes de l'extrait lipidique total et des fractions A (alcane) et B (triglycérides) de l'échantillon T1050A après fractionnement sur colonne de silice (méthode MR1CER, encadrés 5, 3 et 9). [Gas chromatograms of the total lipid extract of sample T1050A and of fraction A, containing the alkane and fraction B, containing the triacylglycerols, obtained after silica fractionation]

La simplicité du protocole, alliée au bon taux de recouvrement des triglycérides pour un échantillon archéologique font de ce fractionnement un bon moyen d'obtenir une fraction triglycéride purifiée et prête à être analysée en spectrométrie de masse.

Mais, à cause de problèmes dans la reproductibilité de ce protocole de fractionnement, nous avons mis au point un autre mode opératoire. La silice est une phase stationnaire instable, ce qui peut engendrer un problème de reproductibilité lorsque les fractionnements sont effectués à quelques mois d'intervalles, comme cela a été le cas dans l'étude des échantillons archéologiques de Clairvaux XIV. Nous avons analysé les échantillons archéologiques fractionnés sur silice en spectrométrie de masse, afin de déterminer la validité du protocole mis en place pour l'analyse des

triglycérides archéologiques (paragraphe E). Au vu des très bons résultats obtenus, nous avons voulu appliquer le fractionnement sur silice à d'autres échantillons archéologiques présentant une bonne conservation des triglycérides. Les résultats obtenus n'étaient plus du tout probants: les fractions A et B n'étaient plus séparées. Nous avons donc mis au point un autre protocole de fractionnement, sans silice.

C.3.2. Le fractionnement acide/neutre

Lorsque la quantité d'échantillon le permettait, les tessons et résidus ayant montré une bonne conservation des triglycérides ont été extraits à nouveau (Encadré 1), et un autre protocole de fractionnement a été mis en place (15 échantillons, extraits B, tableaux 4 et 22). Lors de cette extraction B, nous n'avons pas ajouté de standard interne.

Il a donc été possible de procéder à un fractionnement acide/neutre, repris des travaux de Garnier et coll. sur la cire d'abeille {Garnier *et al.* 2002; Garnier 2003}. Nous avons modifié le protocole existant, en diminuant les quantités de solvant et en changeant certains solvants. Là encore, la reproductibilité a été testée sur une solution standard, de même que les quantités minimales de solvant nécessaires. Le protocole est décrit dans l'encadré 6.

6. Fractionnement acide/neutre

Colonne aminopropyle, Varian.

Lavage de la colonne: 4 mL n-hexane.

Equilibrage de la colonne: 6 mL dichlorométhane.

Dépôt de l'échantillon (200 µL, dans le DCM).

Fraction neutre: 4 mL de dichlorométhane.

Fraction acide: 4 mL d'acide formique à 5% dans le dichlorométhane.

Evaporation à sec sous flux d'azote, 40°C.

Reprise de la fraction neutre dans 200 µL de cyclohexane.

Reprise de la fraction acide dans 200 µL de dichlorométhane.

Le protocole de dérivation au BSTFA des fractions analysées en chromatographie en phase gazeuse est donné dans l'encadré 3.

Les chromatogrammes obtenus pour une solution standard sont présentés en Figure 60. La fraction neutre (FN) contient les di- et triglycérides (DAG et TAG), ainsi que les stérols. La fraction acide contient les acides gras (FA).

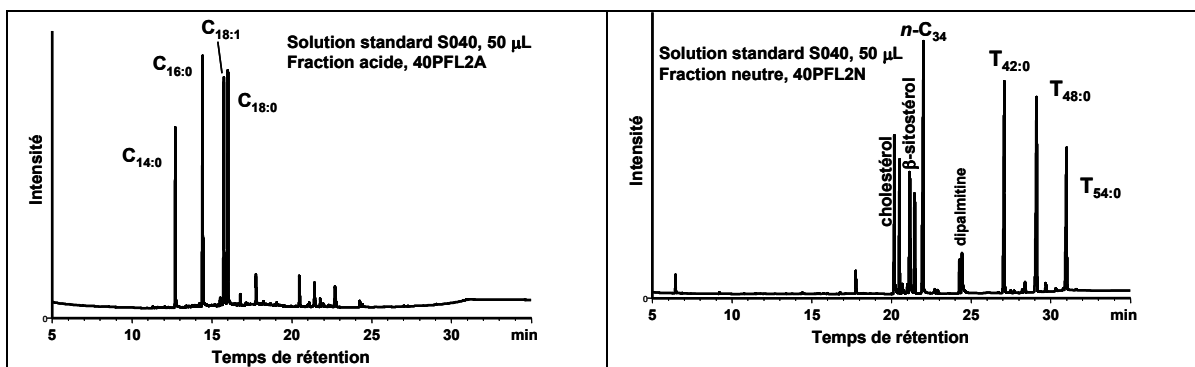


Figure 60 : Chromatogrammes des fractions acide et neutre d'une solution standard S040 (Cf. figure 5), après fractionnement sur colonne aminopropyle (méthode MR1CER, encadrés 6, 3 et 9). [Gas chromatograms of the acid and neutral fractions of the standard solution S040, obtained by aminopropyl fractionation]

Mis à part pour l'échantillon T1035B, qui nous a servi à vérifier la composition des différentes fractions, la fraction acide n'a pas été analysée en chromatographie en phase gazeuse. Les chromatogrammes correspondant à cet échantillon (avant et après fractionnement) sont présentés en Figure 61.

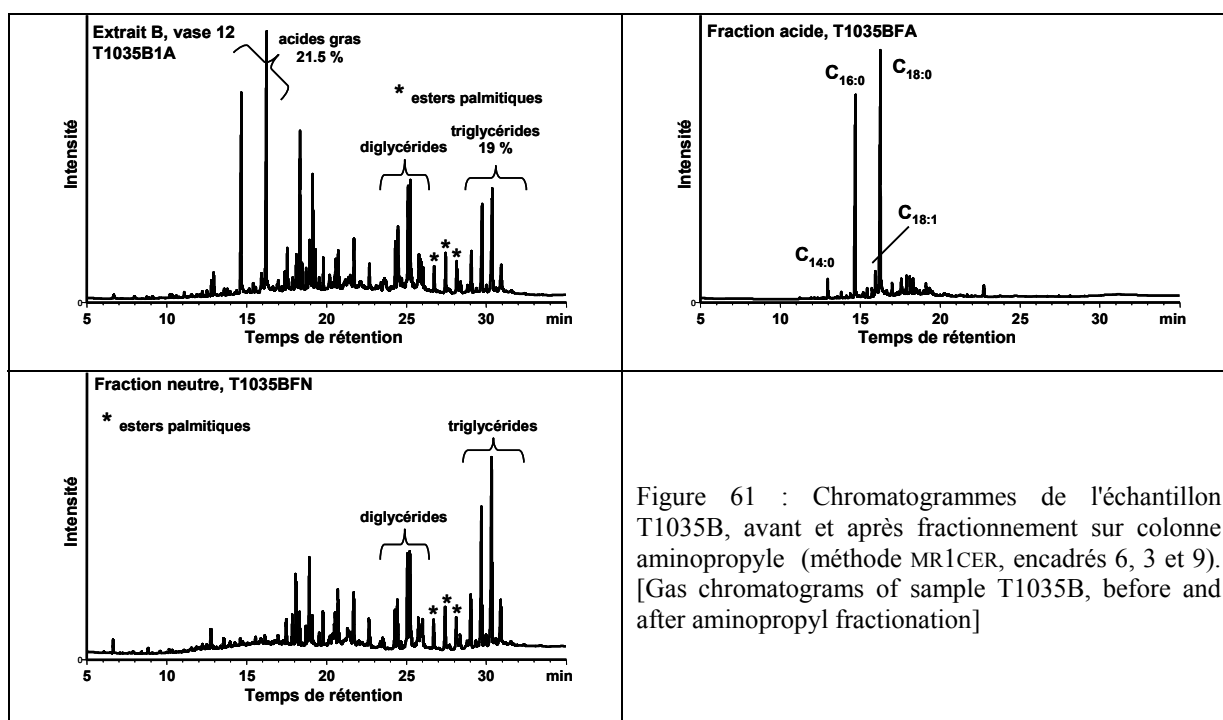


Figure 61 : Chromatogrammes de l'échantillon T1035B, avant et après fractionnement sur colonne aminopropyle (méthode MR1CER, encadrés 6, 3 et 9). [Gas chromatograms of sample T1035B, before and after aminopropyl fractionation]

Les échantillons archéologiques qui ont été extraits puis fractionnés sur colonne aminopropyle sont présentés dans le Tableau 22.

Echantillon	Fractionnement			Analyse CPG		
	V _{fractionné} (μ L)	Fraction	V _{reprise} (μ L)	V _{prélevé} (μ L)	Fichier CPG	V _{final} (μ L)
T1035B, vase 12	Avant le fractionnement			50	T1035B1A	50
	200	T1035BFN	200	10	T1035BFN	10
		T1035BFA	200	10	T1035BFA	10
R1040B, vase 48	Avant le fractionnement			50	R1040B1A	50
	200	R1040BFN	200	10	R1040BFN	10
		R1040BFA	200	Fraction non analysée		
T1041B, vase 60	Avant le fractionnement			50	T1041B1A	50
	200	T1041BFN	200	10	T1041BFN	10
		T1041BFA	200	Fraction non analysée		
T1047B, vase 87	Avant le fractionnement			50	T1047B1A	50
	200	T1047BFN	200	10	T1047BFN	10
		T1047BFA	200	Fraction non analysée		
T1049B, vase 130	Avant le fractionnement			50	T1049B1A	50
	200	T1049BFN	200	10	T1049BFN	10
		T1049BFA	200	Fraction non analysée		
T1051B, vase 151	Avant le fractionnement			50	T1051B1A	50
	200	T1051BFN	200	10	T1051BFN	10
		T1051BFA	200	Fraction non analysée		
T1058B, vase 195	Avant le fractionnement			50	T1058B1A	50
	200	T1058BFN	200	10	T1058BFN	10
		T1058BFA	200	Fraction non analysée		
T1061B, vase 214	Avant le fractionnement			50	T1061B1A	50
	200	T1061BFN	200	10	T1061BFN	10
		T1061BFA	200	Fraction non analysée		
R1062B, vase 214	Avant le fractionnement			50	R1062B1A	50
	200	R1062BFN	200	10	R1062BFN	10
		R1062BFA	200	Fraction non analysée		
T1071B, vase 259	Avant le fractionnement			50	T1071B1A	50
	200	T1071BFN	200	10	T1071BFN	10
		T1071BFA	200	Fraction non analysée		
T1075B, vase 281	Avant le fractionnement			50	T1075B1A	50
	200	T1075BFN	200	10	T1075BFN	10
		T1075BFA	200	Fraction non analysée		
T1078B, vase 310	Avant le fractionnement			50	T1078B1A	50
	200	T1078BFN	200	10	T1078BFN	10
		T1078BFA	200	Fraction non analysée		
T1082B, vase 321	Avant le fractionnement			50	T1082B1A	50
	200	T1082BFN	200	10	T1082BFN	10
		T1082BFA	200	Fraction non analysée		
T1088A, vase 350	Les extractions A (avec SI) et B (sans SI) ont été faites en même temps, l'extrait B n'a donc pas été analysé en HT CPG			100	T1088A1A	50
T1088B, vase 350	200	T1088BFN	200	10	T1088BFN	10
		T1088BFA	200	Fraction non analysée		
T1096B	Avant le fractionnement			50	T1096B1A	50
	200	T1096BFN	200	10	T1096BFN	10
		T1096BFA	200	Fraction non analysée		

Tableau 22 : Liste des échantillons fractionnés sur colonne aminopropyle et conditions d'analyse en chromatographie en phase gazeuse le cas échéant (méthode MR1CER, encadrés 6, 3 et 9). [Archaeological samples fractionated on aminopropyle cartridges and experimental conditions in GC]

Le rendement du fractionnement n'est pas toujours très bon pour les triglycérides, sans que cela soit bien expliqué. Une partie des triglycérides reste certainement adsorbée sur la phase stationnaire, ou bien est hydrolysée. Lors de l'extraction B de trois échantillons et lors du fractionnement de ces derniers, nous avons mis en évidence la présence de cire d'abeille en plus des graisses animales (T1035B, T1075B et T1078B). Lors de la première extraction la cire d'abeille n'avait pas été détectée. Pour ces échantillons, la fraction neutre contient également les

alcanes (biomarqueurs de la cire) et/ou les alcools (marqueurs de dégradation). Nous discuterons de ces échantillons plus loin.

Les fractions neutres de tous ces échantillons sont destinés à être analysés en spectrométrie de masse à ionisation douce (paragraphe E). Ce protocole a également été utilisé pour fractionner un échantillon vieilli, le V2037, afin de l'analyser en spectrométrie de masse.

Une fois que les fractions ne contenant que les triglycérides (fractionnement sur silice) ou majoritairement des triglycérides (fractionnement acide/neutre) ont été obtenues, nous les avons analysées en spectrométrie de masse à ionisation douce. Mais pour pouvoir ioniser des triglycérides, que ce soit en MALDI ou en ESI, il est nécessaire de doper les solutions avec des sels métalliques, qui vont former des adduits chargés.

C.4. Dopage des solutions de lipides pour les analyses en spectrométrie de masse

Les triglycérides sont des biomolécules peu polaires, qui ne possèdent pas de site protonisable (Figure 62).

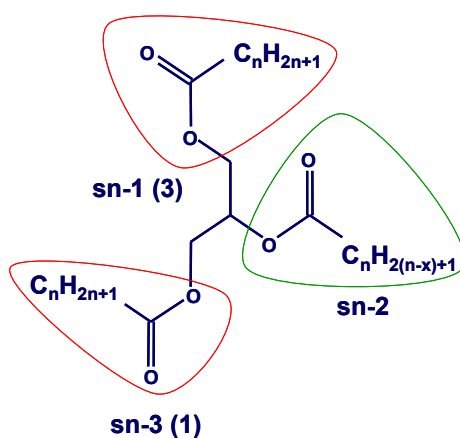


Figure 62 : Formule semi-développée d'un triglycéride avec en rouge, l'exemple d'acides gras saturés, et en vert l'exemple d'un acide gras insaturé. [General structure of a triacylglycerol, with the example of two saturated fatty acid moieties in red, and an unsaturated moiety in green]

Pour les ioniser en spectrométrie de masse à ionisation douce, il est nécessaire de les doper avec des sels métalliques.

C.4.1. Le dopage à l'argent pour l'analyse en MALDI

En MALDI, les sels d'argent sont les mieux adaptés, particulièrement pour les triglycérides possédant des insaturations. Il semblerait que l'argent se chélate préférentiellement sur les doubles liaisons. Cela est utilisé en HPLC pour la séparation et l'identification de lipides stéréoisomères, particulièrement les acides gras et les triglycérides {Dobson *et al.* 1995; Dugo *et al.* 2004; Février *et al.* 2001; Momchilova *et al.* 1998; Nikolova-Damyanova *et al.* 2000; Ruiz-Gutiérrez & Barron 1995; Sandra *et al.* 2002; Schuyl *et al.* 1998}. Le protocole de préparation des échantillons pour l'analyse en MALDI-TOF MS est donné dans l'encadré 7.

7. Préparation des échantillons pour l'analyse en MALDI-TOF MS

Dépôt sur la cible MALDI (Applied Biosystems) de nitrate d'argent AgNO₃ (1 µL, 5 mg/mL, méthanol).

Séchage à température ambiante.

Dépôt sur le même point de la matrice DHB (Acide 2,5-dihydroxybenzoïque, 1 µL, 10 mg/mL, méthanol/eau 1:1 v/v).

Séchage à température ambiante.

Dépôt sur le même point de l'échantillon (1 µL).

Séchage à température ambiante.

L'échantillon est déposé sur une surface conductrice (cible MALDI) avec la matrice et le dopant (Figure 63). Le dépôt peut se faire de plusieurs manières. Nous avons choisi le dépôt en goutte séchée, couche par couche qui permet de s'affranchir en partie des différences de solubilité de la matrice, du dopant et de l'échantillon.



Figure 63 : Photo d'une cible MALDI (Applied Biosystems) sur laquelle des échantillons sont déposés, photo Rolando. [MALDI target plate, on which samples are deposited prior to analysis]

Comme nous le verrons dans le chapitre 3, le dopage à l'argent présente un certain nombre d'inconvénients, notamment à cause de la distribution isotopique de l'argent. C'est pourquoi nous avons choisi d'évaluer une autre technique de désorption/ionisation par laser, le DIOS (*Desorption/Ionisation On porous Silicon*), qui ne nécessite pas d'ajout de matrice ni de dopant. L'échantillon est déposé directement sur la cible DIOS, qui est adaptée au spectromètre de masse

LDI-TOF (Figure 64). Il s'agit d'une plaque de silicium cristallin sur laquelle des points de silicium poreux ont été réalisés (Cf. chapitre III).



Figure 64 : Photo d'une plaque DIOS, avec, en noir, les points de silicium poreux sur une plaque de silicium cristallin. [DIOS target plate with the black dots corresponding to porous silicon, on a crystalline silicon plate]

Nous verrons dans le chapitre III les avantages et les inconvénients de chacune de ces techniques. D'autres techniques de spectrométrie de masse à ionisation douce ont également été évaluées. Il s'agit de techniques mettant en œuvre l'ionisation par électrospray (ESI).

C.4.2. Le dopage au lithium pour l'analyse en ESI

L'ionisation par électrospray nécessite que la solution infusée soit chargée. En électrospray, le mode d'ionisation préférentiel est la protonation, suivie par la cationisation par le sodium. Or dans le cas de solutions de triglycérides, non seulement le courant ionique total est faible quand la solution n'est pas dopée, mais en plus les triglycérides s'ionisent mal et ont tendance à se fragmenter dans la source. Il y a également co-existence entre les adduits sodium et les espèces protonées, ce qui rend l'interprétation des données d'autant plus délicate. C'est pourquoi nous avons dopé les solutions avec du chlorure de lithium {Han & Gross 2001; Hsu & Turk 1999}. Les ions lithium permettent d'obtenir un courant ionique total suffisamment élevé pour ioniser les triglycérides sous forme d'adduits lithium. Le protocole de préparation des échantillons est décrit dans l'encadré 8.

8. Préparation des échantillons pour l'analyse en nanoESI MS et MS/MS

2 μ L de chlorure de lithium (2% w/w, méthanol, HPLC grade).

5 μ L d'échantillon (fraction triglycérides des échantillons fractionnés, extrait lipidique des échantillons non fractionnés).

Les deux solutions sont mélangées et ramenées à 100 μ L avec du méthanol.

La solution obtenue est placée dans une aiguille en verre métallisée (Protona, Odense, Danemark).

Les adduits formés sont très largement majoritaires par rapport aux adduits qui pourraient se former à partir du sodium (présent naturellement dans l'échantillon). Aucune fragmentation dans la source n'est à noter, ce qui est un avantage pour identifier les triglycérides de bas poids

moléculaire. Dans le cas de l'analyse d'échantillons archéologiques, les proportions des différents composés peuvent varier.

D. Protocoles d'analyse en chromatographie en phase gazeuse

Les protocoles de préparation des échantillons sont donc variés, dépendant de l'analyse à laquelle ils vont être soumis. La première étape est l'analyse en chromatographie en phase gazeuse, avec une détection à ionisation de flamme ou par spectrométrie de masse. En fonction de ce que l'on recherche, composition moléculaire de l'extrait lipidique total, composition en acides gras de ce même extrait ou encore composition en terpènes des extraits d'adhésifs, les modes opératoires en CPG vont différer.

D.1. L'extrait lipidique total

D.1.1. Analyse en chromatographie en phase gazeuse haute température

Les colonnes utilisées pour l'analyse globale des extraits lipidiques sont des colonnes apolaires de type 5 CB (phase stationnaire greffée, 100 % diméthylpolysiloxane). Les échantillons sont triméthylsilylés afin d'analyser l'ensemble de l'extrait en une seule étape (encadré 3). Ce sont des colonnes dites *low bleed/MS*, ce qui permet de minimiser les pertes de phase stationnaire (*bleeding*), pour limiter l'augmentation de la ligne de base à haute température. Elles peuvent donc être utilisées jusqu'à 350°C en programmation. Afin de détecter les composés les moins volatils, tels que les triglycérides ou les esters palmitiques de la cire d'abeille, les colonnes sont courtes (15 m) avec une phase stationnaire de faible épaisseur (0.1 µm) {Evershed *et al.* 1990a; Evershed *et al.* 1990b; Evershed 1993b; Heron & Evershed 1993; Regert *et al.* 2003a}. Le chromatographe sur lequel ces analyses sont réalisées est un HP-6890 équipé d'un injecteur *on-column* et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Pour augmenter la durée de vie de la colonne, on la couple à une précolonne de 1 m, de même diamètre que la colonne, mais vide de toute phase stationnaire. Ainsi, en cas d'injection de particules solides, les échantillons n'étant pas filtrés, celles-ci sont retenues dans la précolonne et n'encrassent pas la colonne. L'ajout d'une précolonne permet également de concentrer l'échantillon en tête de colonne. En cas de baisse de la résolution chromatographique, il suffit de couper la précolonne ou bien de la changer. Les conditions chromatographiques sont données dans l'encadré 9. Grâce à la programmation du débit de gaz vecteur (He), on remédie à la perte en temps d'analyse occasionnée par l'utilisation de l'hélium à la place de l'hydrogène classiquement utilisé {Charters *et al.* 1995; Evershed 1993b}.

9. Conditions chromatographiques: méthode MR1CER

Colonne CP Sil 5CB *low bleed/MS* (CP 7814, Varian).

15 m × 0.32 mm I.D., phase stationnaire de 0.1 µm d'épaisseur.

Programmation en température: 50°C (1 min) – 350°C (10 min), à 10°C/min.

Programmation en débit de He: 2 mL/min (17 min) – 4 mL/min (5 min) – 6 mL/min (15 min), à 1 mL/min².

Injecteur: *on-column*, en mode *track-oven*.

Détecteur: FID, T = 350°C, débit H₂ = 35 mL/min, débit Air = 300 mL/min.

Les molécules qui peuvent être détectées avec ce protocole vont des acides gras aux triglycérides, en passant par les stérols, les mono- et diglycérides, mais également des alcanes et alcools à longue chaîne aux esters palmitiques. Le chromatogramme d'une solution standard contenant des acides gras (C_{14:0}, C_{16:0}, C_{18:1} et C_{18:0}), des monodiglycérides (monomyristine MC_{14:0}, monopalmitine MC_{16:0} et monostéarine MC_{18:0}), des stérols (cholestérol et stigmastérol), un alcane (*n*-tétratriacontane *n*-C₃₄) et des triglycérides (trimyristine T_{42:0}, tripalmitine T_{48:0} et tristéarine T_{54:0}) est présenté ci-dessous (Figure 65).

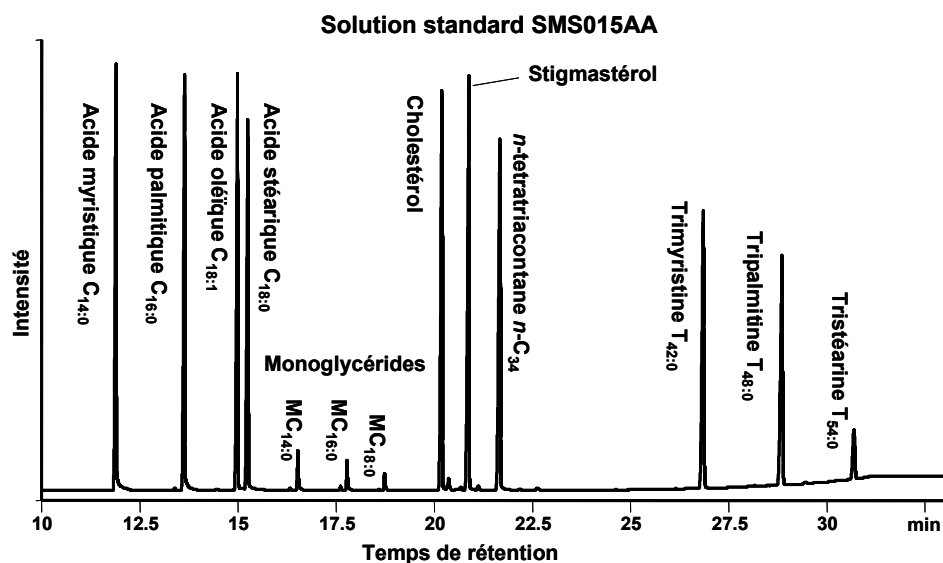


Figure 65 : Chromatogramme d'une solution standard (méthode MR1CER, encadrés 3 et 9). [Gas chromatogram of a standard solution]

Les facteurs de rétention des molécules sont dépendants de la phase stationnaire de la colonne ainsi que de ses dimensions. Le vieillissement de la colonne, le changement de sa longueur ou encore le changement de la colonne ou de la pré-colonne peuvent donc entraîner un décalage des facteurs de rétention qui se traduit par un décalage dans les temps de rétention des molécules. Afin de s'affranchir de ce décalage, une solution standard de ce type est analysée avant chaque série d'échantillons, dans les mêmes conditions opératoires.

Dans le cas où certains pics ne sont pas identifiés avec l'aide des références disponibles au laboratoire, les échantillons sont analysés en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

D.1.2. Analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse permet d'allier la capacité de séparation de mélanges complexes de la chromatographie à celle d'identification de la spectrométrie de masse {Evershed 1993c, 1993d; Niessen 2001}. De plus, la plus grande partie des bases de données disponibles en spectrométrie de masse répertorient des spectres obtenus en impact électronique à 70 eV (IE, 70 eV), ce qui en fait un outil de choix pour l'identification de composés inconnus.

Les conditions chromatographiques sont très similaires à celles utilisées en chromatographie seule. Mais certaines spécificités de l'appareil que nous utilisons ont nécessité de faire quelques modifications. Afin d'augmenter les débits effectifs sans pour autant risquer de dépasser la limite du vide nécessaire dans le spectromètre de masse, le diamètre de la colonne est réduit de 0.32 mm à 0.25 mm. Pour les mêmes raisons, il n'est pas possible d'augmenter le débit de gaz vecteur comme cela est le cas en chromatographie FID. C'est pourquoi, si le débit est tout de même adapté aux conditions de température, grâce à une programmation en pression, la valeur de 6 mL/min n'est jamais atteinte. Cela a pour conséquence de limiter la détection des composés de haut poids moléculaire qui sont élués en fin d'analyse, comme les triglycérides supérieurs à T₄₈. La CPG/SM reste, malgré la difficulté à détecter les composés de plus haut poids moléculaire, une technique d'identification très intéressante pour les composés plus légers, depuis les acides gras jusqu'aux triglycérides de taille moyenne. Les conditions opératoires sont données dans l'encadré 10.

10. Conditions opératoires en HT CPG/SM: méthode CERAM15M

Colonne CP Sil 5-CB *low bleed/MS* (CP 7810, Varian).

15 m × 0.25 mm I.D., phase stationnaire de 0.1 µm d'épaisseur.

Programmation en température: 50°C (1 min) – 350°C (10 min), à 10°C/min.

Programmation en pression du gaz vecteur (He): 5 p.s.i. (1 min) – 16.8 p.s.i. (10 min) à 0.39 p.s.i./min.

Injecteur: mode *splitless*, T = 300°C, purge à 2 min.

Interface GC/MS: T = 340°C.

Source d'ions: T = 200°C.

Mode d'ionisation: impact électronique, mode positif, + 70 eV.

Temps de piégeage des ions dans la trappe: 25 ms.

Gamme de masse: 50-950 u.m.a.

Le chromatographe utilisé est un HP-5890 et le spectromètre un GCQ de Finnigan (actuellement Thermo Corporation), équipé d'un analyseur à trappe d'ions. Cet analyseur présente un inconvénient, qui est la présence de réactions ions-molécules dans la trappe, avec l'eau résiduelle {Wood *et al.* 2001}. Cela a des conséquences non négligeables sur les spectres de masse de certains constituants moléculaires. Les spectres de masse des alcools et des acides gras sont différents de ceux obtenus avec d'autres d'analyseurs comme les quadripôles. Le spectre de masse d'un alcool obtenu avec une trappe ionique est présenté en Figure 66. Le pic de base n'est pas le pic de masse, il correspond à $[M + 3]^+$, qui correspond à une réaction ion/molécule avec l'eau. La perte de 92 est caractéristique des alcools triméthylsilylés dans une trappe, ainsi que l'absence de perte de 15 ($-CH_3$) qui n'a lieu que dans les autres analyseurs (secteur magnétique ou quadripôle). C'est également le cas pour les acides gras triméthylsilylés.

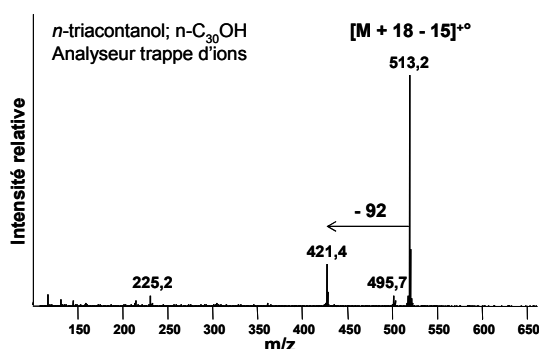


Figure 66 : Spectre de masse du *n*-triacontanol *n*-C₃₀OH en impact électronique +70eV, avec un analyseur à trappe d'ion (méthode CERAM15M, encadrés 3 et 10). [Mass spectrum of *n*-triacontanol *n*-C₃₀OH by electronic impact (+70eV) with an ion trap analyser]

Quelques spectres de masse de composés couramment retrouvés dans les céramiques archéologiques ayant contenu des graisses animales sont présentés en Figure 67. Le couplage HT CPG/SM permet d'identifier les composés présents en faible concentration tels que les stérols. Il est en effet très difficile d'identifier ces derniers uniquement par leurs temps de rétention en HT CPG. Dans le cas de mélanges très complexes, les spectres de masse permettent de s'assurer de l'attribution des pics chromatographiques. C'est le cas pour les chromatogrammes de cire d'abeille, dont les pics d'alcane, d'acides gras et d'alcools ont des temps de rétention très proches. Enfin, le couplage HT CPG/SM permet d'identifier les composés qui ne sont pas identifiés en HT CPG, comme les cétones de condensation des acides gras par exemple (Figure 67).

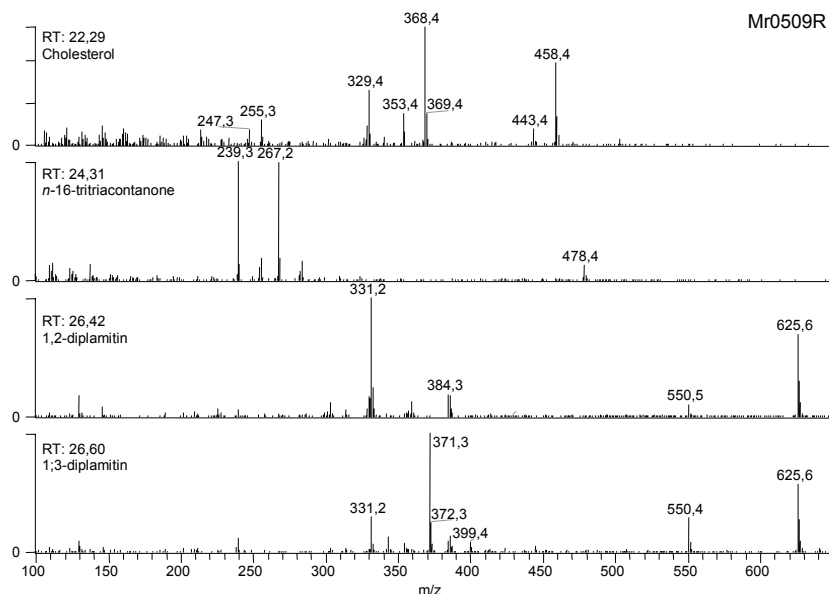


Figure 67 : Spectres de masse du cholestérol, de la *n*-16-tritriacontanone, de la 1,2-dipalmitine et de la 1,3-dipalmitine, obtenus en impact électronique à +70 eV (méthode CERAM15M, encadrés 3 et 10) pour un échantillon archéologique provenant du site de Chalain 4 {Mirabaud 2004}. [Mass spectra of cholesterol, *n*-16-tritriacontanone, 1,2-dipalmitin and 1,3-dipalmitin, by EI mass spectrometry, +70 eV, from an archaeological sample from the neolithic site of Chalain 4]

Grâce à la chromatographie en phase gazeuse, couplée ou non à la spectrométrie de masse, il est possible d'identifier la composition moléculaire globale de l'extrait lipidique total d'un échantillon archéologique ou modèle. Cela permet de mettre en place d'autres analyses, afin de mieux identifier certaines fractions, comme c'est le cas pour les acides gras.

D.2. Analyse des acides gras

Les échantillons pour lesquels la distribution en acides gras s'est révélée complexe, ainsi que les échantillons d'huiles de référence, sont analysés avec un protocole différent de l'extrait lipidique total. Les échantillons sont dérivés au BF_3/PrOH (Encadré 4). Les acides gras sont alors propylés et peuvent être analysés sur une colonne dont la phase stationnaire est optimisée pour la séparation d'acides gras alkylés. Les conditions d'analyse sont données dans l'encadré 11.

11. Conditions chromatographiques: méthode FAME

Colonne select FAME (CP 7419, Varian),

50 m × 0.25 mm I.D., phase stationnaire de 0.25 μm d'épaisseur.

Programmation en température: 50°C (2 min) – 250°C (10 min), à 10°C/min.

Débit de gaz vecteur (He) constant, 1.5 mL/min.

Injecteur *split/splitless*, mode *splitless*, T = 270°C, purge à 1.5 min.

Détecteur FID: T = 350°C, H₂ = 35 mL/min, Air = 120 mL/min.

Le chromatographe utilisé est un HP-6890, équipé d'un injecteur *split/splitless* avec un détecteur FID. La colonne utilisée est une colonne polaire (Select FAME), l'ordre de rétention des acides gras est inversé par rapport à celui obtenu sur une colonne apolaire de type CPSil 5-CB (méthode MR1CER) à cause de l'inversion de polarité des phases stationnaires. Ainsi, les temps de rétention augmentent avec le nombre d'insaturations. Un chromatogramme d'une huile de référence est présenté en Figure 68.

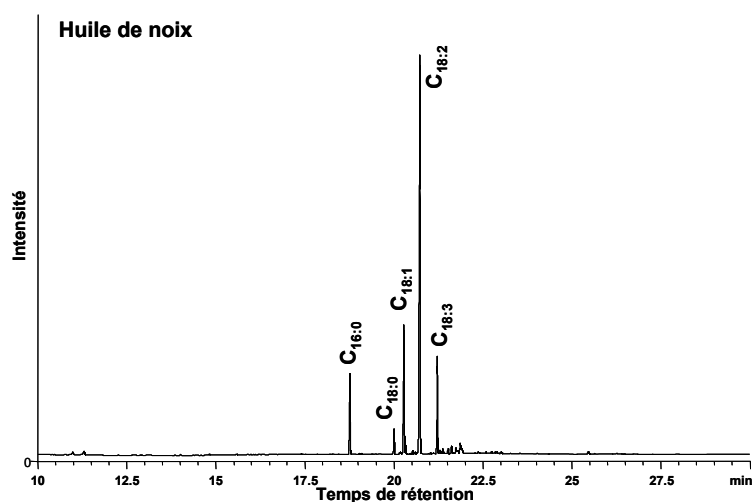


Figure 68 : Chromatogramme d'une huile de noix (H004) obtenu avec une colonne polaire de 50 m (méthode FAME, encadrés 4 et 11). [Gas chromatogram of a reference nut oil sample obtained with a 50 m polar column]

Une fois les conditions opératoires mises en place sur les échantillons de référence, des échantillons archéologiques ont été analysés. Ils ont été sélectionnés en fonction de leur distribution complexe en acides gras (Tableau 14). Les résultats et les apports de cette nouvelle méthodologie pour l'analyse des matières grasses végétales sont discutés dans le chapitre IV.

D.3. Analyse des composés terpéniques

Le protocole appliqué aux adhésifs archéologiques retrouvés sur les céramiques du site de Clairvaux XIV est adapté des publications de Regert *et al.* {Regert *et al.* 1998b; Regert *et al.* 2000; Regert *et al.* 2003b; Regert 2004}. Les échantillons sont triméthylsilylés, comme décrit dans l'encadré 3.

Il existe deux types de conditions opératoires pour analyser les échantillons terpéniques. L'analyse sur colonne apolaire de 15 m, qui permet de détecter les composés de haut poids moléculaire, mais avec une résolution des diterpènes et des triterpènes relativement mauvaise, et l'analyse sur colonne apolaire de 30 m. Cette dernière ne permet pas d'éluer les composés de plus

haut poids moléculaire, mais la résolution des mélanges de diterpènes ou de triterpènes est bien meilleure.

Nous avons donc analysé un échantillon (MR1108, Tableau 15) avec les deux modes opératoires, dont les conditions sont données dans les encadrés 12 et 13.

12. Conditions opératoires en HT CPG pour l'analyse des composés terpéniques: méthode ADHESIF15M

Colonne CP Sil 5CB *low bleed/MS* (CP 7814, Varian).

15 m × 0.32 mm I.D., phase stationnaire de 0.1 µm d'épaisseur.

Programmation en température: 50°C (2 min) – 350°C (10 min), à 10°C/min.

Programmation en débit de He: 2 mL/min (17 min) – 4 mL/min (4 min) – 6 mL/min (16 min), à 1 mL/min².

Injecteur: *on-column*, en mode *track-oven*.

Détecteur: FID, T = 350°C, débit H₂ = 35 mL/min, débit Air = 300 mL/min.

Le chromatogramme de l'échantillon MR1108 obtenu sur colonne apolaire de 15 m est mal résolu, et ne permet pas une identification rapide des composés présents. Cet échantillon ne contenait pas de composés lourds éluant après 25 min, c'est pourquoi le choix s'est porté sur une colonne plus longue, de 30 m, apolaire, afin d'obtenir une meilleure résolution des pics chromatographiques. Les conditions chromatographiques sont données dans l'encadré 13.

13. Conditions opératoires en HT CPG pour l'analyse de composés terpéniques: méthode ADHESIF30M

Colonne CP Sil 5-CB *low bleed/MS* (Varian, CP7860).

30 m × 0.25 mm I.D., phase stationnaire de 0.25 µm d'épaisseur

Injecteur *split/splitless*, mode *splitless*, T = 280°C, purge à 1.5 min.

Programmation en température: 50°C (2 min) – 50°C à 20°C/min – 150°C à 4°C/min - 320 °C (20 min)

Débit de gaz vecteur constant, 1.5 mL/min, He.

Détecteur FID: T = 330°C, H₂ = 35 mL/min, Air = 120 mL/min.

Le temps d'analyse est sensiblement plus long (de l'ordre de 60 min) mais la résolution obtenue est bien meilleure qu'avec une colonne de 15 m. Le lupéol et la bétuline ont des temps de rétention distants d'une minute environ, aux alentours de 45 min, ce qui permet de les distinguer sans problème. Les autres marqueurs du brai de bouleau sont également bien résolus (Cf. chapitre IV). Les chromatogrammes obtenus pour un adhésif archéologique sur les deux types de colonne sont présentés en Figure 69.

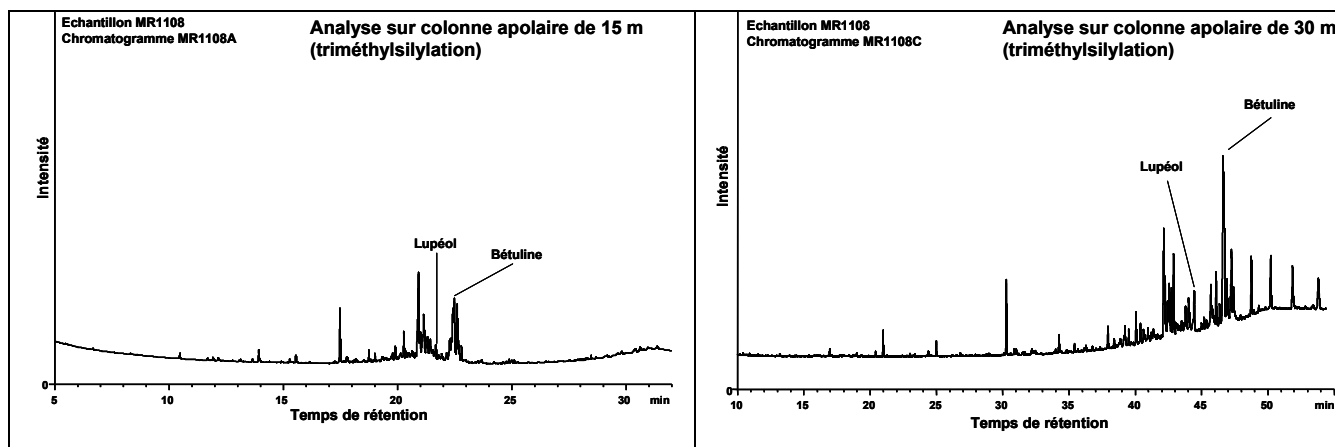


Figure 69: Chromatogrammes de l'échantillon MR1108, analysé après triméthylsilylation sur colonnes apolaires de 15m (méthode CERAM15M, encadrés 3 et 12) et 30 m (méthode ADHESIF30M, encadrés 3 et 13). [Gas chromatograms of an archaeological adhesive, MR1108, trimethylsilylated prior to analysis on 15 m and 30 m apolar columns]

Les analyses en chromatographie en phase gazeuse permettent donc la caractérisation de la composition moléculaire globale des extraits lipidiques d'échantillons archéologiques, qu'ils soient des tessons, des résidus carbonisés ou encore des adhésifs. La mise au point d'une méthode pour la caractérisation des distributions complexes d'acides gras nous a permis de mettre en place de nouveaux critères pour l'identification des matières grasses végétales. Tous ces résultats sont discutés dans le chapitre IV.

Les développements analytiques pour la caractérisation d'échantillons modèles de graisses animales, dans le but de déterminer des critères de discrimination et d'identification spécifique de ces dernières, sont, quant à eux, réalisés en spectrométrie de masse, à ionisation douce.

E. Protocoles d'analyse des graisses animales en spectrométrie de masse

Les biomarqueurs les plus caractéristiques des graisses animales sont les triglycérides. Comme nous l'avons présenté dans le paragraphe A, nous avons choisi de les caractériser par spectrométrie de masse, sans séparation préalable par HPLC. Nous avons pour cela évalué le potentiel de différentes techniques de spectrométrie de masse, à ionisation/désorption laser et à ionisation électrospray.

E.1. *Screening* par désorption laser

Les techniques d'ionisation par désorption laser (LDI) ne nécessitent pas le passage en phase gazeuse des échantillons, ce qui présente un avantage certain pour des composés faiblement volatils comme les triglycérides. Il existe différentes techniques LDI, dont la plus courante reste celle assistée par matrice (MALDI, *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation*). Cette dernière nécessite l'ajout d'une matrice organique absorbant dans l'ultraviolet (laser UV) ou l'infrarouge (laser IR). Cette technique est utilisée couplée avec un analyseur à temps de vol (TOF, *Time-of-Flight*) pour l'analyse de polymères et de biopolymères tels que les protéines, car elle présente l'avantage de ne pas être limitée en détection en masse. Il existe d'autres techniques de LDI, ne mettant pas en jeu de matrice organique. Nous avons ainsi évalué le potentiel d'une technique récente, appelée DIOS (*Desorption/Ionization On porous Silicon*), dans laquelle la matrice est remplacée par du silicium poreux.

E.1.1. Le MALDI

L'échantillon est ionisé indirectement, à travers la matrice qui absorbe l'énergie du laser, ce qui en fait une technique d'ionisation douce car n'induisant que peu de fragmentation dans la source. Mais les triglycérides sont des composés peu polaires qui s'ionisent mal sous forme $[M + H]^+$ ou $[M + Na]^+$, les plus courantes en ionisation MALDI. Grâce à l'ajout de sels métalliques adaptés, le rendement d'ionisation est fortement augmenté. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe C, ce sont des sels d'argent qui se sont révélés les meilleurs dopants {Garnier 2003; Kühn *et al.* 1996}. Grâce à l'ajout de ces sels métalliques, les triglycérides sont stabilisés et il n'y a pas de fragmentation dans la source, comme c'était le cas en impact électronique {Garnier 2003}. Les différents avantages et inconvénients du MALDI-TOF sont discutés dans le chapitre III. Les conditions opératoires sont données dans l'encadré 14.

14. Conditions opératoires en spectrométrie de masse MALDI TOF.

Spectromètre de masse Voyager-DE STR Time-Of-Flight (Applied Biosystems).

Laser N₂ (337 nm), pulse de 3 ns à 20 Hz.

Mode réflectron, ions positifs.

Délai d'extraction: 200 ns.

Low-mass gate: 450 u.m.a.

Spectres additionnés sur 25 tirs laser, 2 ou 3 fois pour obtenir le meilleur rapport signal/bruit.

L'ionisation/désorption laser assistée par matrice avec des sels d'argent, est une technique rapide, sensible, qui permet d'obtenir la composition en triglycérides, saturés et insaturés des échantillons (Figure 70).

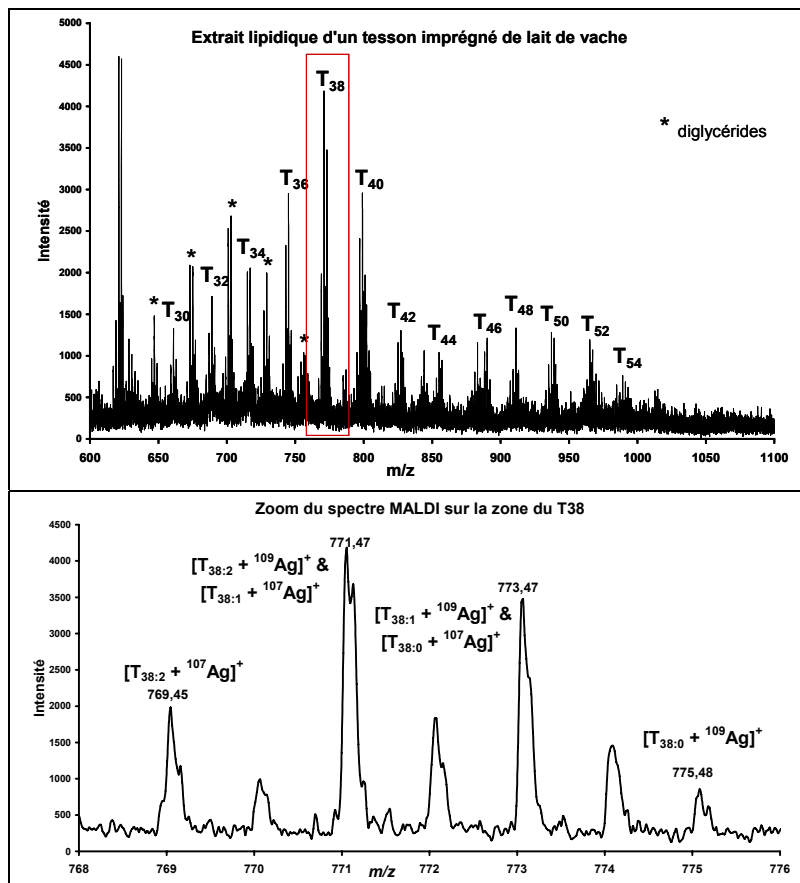


Figure 70: Spectre de masse MALDI d'un extrait lipidique non fractionné d'un tesson imprégné de lait de vache (cf. B) et détail de la zone correspondant aux triglycérides T₃₈. [MALDI mass spectrum of the total lipid extract of a model potsherd impregnated with cow milk and detail of the T₃₈ peak pattern]

Elle peut être considérée comme une technique de *screening*, plus sensible que la chromatographie en phase gazeuse, notamment pour la détection du nombre de doubles liaisons des triglycérides. La spectrométrie de masse MALDI-TOF pourrait donc être utilisée comme étape discriminante, servant à sélectionner les échantillons qui vont faire l'objet d'analyses supplémentaires en spectrométrie de masse nanoESI.

Le dopage des triglycérides par des ions argent présente un inconvénient majeur, qui est la distribution isotopique de l'argent. Celle-ci se couple avec la distribution en insaturations des triglycérides (Figure 70). Il ne nous a pas été possible de déconvoluer la contribution exacte des isotopes de l'argent, ce qui rend la caractérisation des distributions en insaturations pour chaque groupe de triglycérides malaisée. Afin de s'affranchir du dopage à l'argent, nous avons donc évalué le potentiel d'une autre technique d'ionisation/désorption laser.

E.1.2. Le DIOS

Nous avons testé la technique DIOS (*Desorption/Ionisation On porous Silicon*) afin de s'affranchir de la distribution isotopique de l'argent qui posait problème lors de l'analyse de mélanges complexes d'espèces tels que les triglycérides. Cette technique de désorption laser, relativement récente, utilise les propriétés du silicium poreux pour ioniser des molécules, sans ajout de matrice ni de dopant {Compton & Siuzdak 2003; Kraj *et al.* 2003; Lewis *et al.* 2003; Shen *et al.* 2001; Wei *et al.* 1999}. Les sels naturellement présents suffisent à cationiser les triglycérides sous forme d'adduits sodium, très largement majoritaires par rapport aux adduits potassium et aux espèces protonées. Cette technique permet également de s'affranchir de l'ajout de matrice, ce qui présente un avantage par rapport au MALDI. En effet, les triglycérides que nous analysons ont des masses moléculaires comprises entre 400 et 900. Or les composés de masses moléculaires inférieures à 500 sont difficilement analysables en MALDI car leurs pics sont masqués par les pics de la matrice et de ses agrégats.

L'avantage du DIOS est que seul l'échantillon est déposé, le mode de dépôt n'a donc aucune influence sur le spectre obtenu. Les solutions standards sur lesquelles cette technique a été mise au point ont été préparées dans un solvant pour lequel les triglycérides ont une très bonne affinité. Malheureusement, les plaques de DIOS que l'on trouve dans le commerce ne sont pas très stables mécaniquement et il n'a pas été possible, après les tests sur les références, d'aboutir à des résultats concluants pour les échantillons archéologiques.

Les échantillons sont déposés sur les points de silicium poreux présents à la surface de la cible en silicium cristallin (Figure 64). Cette dernière est découpée afin d'être collée à une cible MALDI classique adaptée au spectromètre de masse que nous utilisons. La cible est ensuite

introduite dans le spectromètre de masse. Les conditions opératoires sont présentées dans l'encadré 15.

15. Conditions opératoires en spectrométrie de masse DIOS-TOF.

Dépôt de 1 μ L de solution sur un *spot* de silicium poreux (cible Waters).

Spectromètre de masse Voyager-DE STR Time-Of-Flight (Applied Biosystems).

Laser N₂ (337 nm), pulse de 3 ns à 20 Hz.

Mode réflectron, ions positifs.

Délai d'extraction: 200 ns.

Low-mass gate: 450 Da.

Spectres additionnés sur 25 tirs laser, 2 ou 3 fois pour obtenir le meilleur rapport signal/bruit.

La grille électrostatique est réglée au cas par cas, afin d'ajuster la distance de focalisation du laser.

Les résultats obtenus sur des solutions standards laissent penser que cette technique est extrêmement appropriée pour l'analyse de composés peu polaires, de faible poids moléculaire, tels que les triglycérides (Figure 71).

La comparaison des spectres de masse MALDI-TOF et DIOS-TOF pour une solution de triglycérides de référence le montre bien (Figure 71). En effet, on peut noter d'une part que le rapport signal/bruit est bien meilleur en DIOS qu'en MALDI. De même, l'absence du doublet de pics dû aux isotopes de l'argent permet une interprétation beaucoup plus simple des spectres, sans besoin de déconvolution. La mise au point est plus simple en DIOS, car il n'y a ni choix de matrice ni choix de dopant à faire, et les échantillons peuvent être solubilisés dans le solvant qui leur convient le mieux. Les spectres sont obtenus tout aussi rapidement.

Le DIOS paraît donc être mieux adapté au *screening* de mélanges complexes de triglycérides que le MALDI, avec toutefois un problème de stabilité des plaques d'analyse auquel il faudra remédier avant de pouvoir analyser des séries d'échantillons archéologiques. Ces deux techniques d'ionisation laser, MALDI et DIOS, sont des méthodes de *screening*, simples à mettre en œuvre, rapides, qui permettent d'analyser de larges séries d'échantillons.

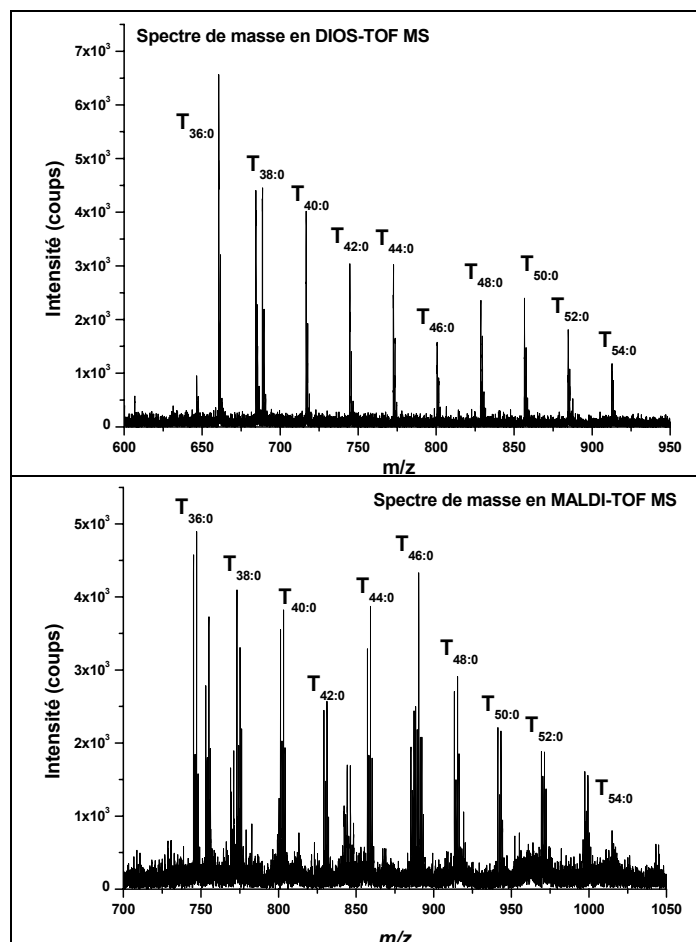


Figure 71 : Spectres de masse obtenu en DIOS et en MALDI pour une solution de triglycérides standards, de T_{36:0} à T_{54:0}, à une concentration de 10⁻² mg/mL dans le dichlorométhane/méthanol. [DIOS and MALDI mass spectra for a standard solution of triacylglycerols T_{36:0} to T_{54:0} at a concentration of 10⁻² mg/mL in DCM/MeOH]

Mais ces deux techniques ne permettent pas de faire de spectrométrie de masse tandem de manière simple. C'est pourquoi nous avons évalué le potentiel de différents spectromètres de masse à ionisation électrospray, pour la caractérisation structurale des triglycérides.

E.2. Analyses structurales en nanoélectrospray

Nous avons vu que ni la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ni la spectrométrie de masse LDI-TOF ne permettent d'obtenir d'informations structurales sur les triglycérides. Or, notre but est de discriminer les graisses animales entre elles, et de déterminer leur origine spécifique, en caractérisant non seulement leur composition en triglycérides mais surtout leurs acides gras constitutifs, sans passer par une étape d'hydrolyse. L'hydrolyse ne permet en effet d'identifier que la composition globale en acides gras, et non pas la composition en acides gras de chaque triglycéride.

Cette étude a débuté dans notre équipe par l'application de la spectrométrie de masse à ionisation nanospray pour des échantillons archéologiques de cire d'abeille, sans dopage {Garnier *et al.* 2002}. Des développements sur l'huile d'olive (non publiés) ont ensuite montré que l'ajout de sels de lithium, par rapport à une acidification de la solution à l'acide tétrafluoroacétique, permet d'obtenir un courant ionique élevé, et une très bonne ionisation des triglycérides sous forme d'adduits lithium {Garnier 2003}. Nous avons donc poursuivi dans ce sens, en analysant des échantillons avec des compositions en triglycérides toujours plus complexes.

Nous avons évalué deux techniques permettant d'analyser les triglycérides avec une bonne sensibilité, pour lesquelles il était possible de procéder à de la MS² ou spectrométrie de masse tandem.

E.2.1. NanoESI avec un analyseur hybride Q-q-TOF

La première technique dont le potentiel analytique et informatif a été évalué est la spectrométrie de masse à ionisation nanospray (électrospray en mode nano), avec un analyseur double quadripôle couplé à un temps de vol orthogonal Q-q-TOF. Les conditions opératoires sont décrites dans l'encadré 16.

16. Conditions opératoires en spectrométrie de masse nanoESI Q-q-TOF

Spectromètre de masse: Q-Star Pulsar (Applied Biosystems).

Source nanoélectrospray (Protona, Danemark).

Analyseur Q-q-TOF.

La solution est placée dans une aiguille en verre métallisé.

Source et interface:

Tension d'ionisation 800 à 1000 V,

1^{er} potentiel de décomplexation 50 V,

potentiel de focalisation 200 V,

2^{ème} potentiel de décomplexation 15 V.

Mode tandem, MS²

Conditions d'ionisation identiques à celle du mode MS.

Sélection des ions dans le premier quadripôle.

Accélération des ions jusqu'à une énergie de 20 à 50 eV.

Collision avec l'argon dans le second quadripôle.

Analyse des ions fragmentés dans le temps de vol.

L'acquisition des données et le traitement des spectres se fait avec le logiciel Analyst.

Les échantillons qui ont été analysés avec ce spectromètre de masse sont listés dans le Tableau 23. Il s'agit des échantillons de référence donnés dans le Tableau 16, qui sont des extraits de tessons imprégnés de lait de vache et de lait de chèvre et d'extraits de graisses sous-cutanées de bœuf et de mouton. Les échantillons archéologiques sélectionnés pour leur composition en triglycérides bien conservée ont également été analysés avec cette technique. Nous discutons de ce point dans le chapitre III et le chapitre IV.

Echantillons de référence			
	Préparation	Fichiers source	Sous-fichiers
Lait de vache, entier pasteurisé, tessons B	5 µL 2 µL LiCl 2% 93 µL MeOH	100105 recalibrated recalibrated.wiff 140105 vache recalibrated.wiff	MS: vache 1/10 ms MS ² : vache 1/10 msms
Lait de chèvre, entier pasteurisé, tessons B		100105 recalibrated.wiff	MS: goat 1/10 ms MS ² : goat 1/10 msms
Graisse sous-cutanée de bœuf		Cow adipose fat ms.wiff Cow adipose fat ms pm.wiff Cow adipose fat msms.wiff Cow adipose fat msms pm.wiff	MS: caf ms MS ² : caf msms
Graisse sous-cutanée de mouton		Sheep adipose fat ms pm.wiff Sheep adipose fat msms pm.wiff	MS: saf ms MS ² : saf msms
Echantillons archéologiques			
Fractionnement sur colonne SPE-silice (mars 2006)			
T1050A / FM1050B	5 µL 2 µL LiCl 2% 93 µL MeOH	140306_FM1050B (recalibrated).wiff	MS: FM1050B ms MS ² : FM1050B msms
T1052A / FM1052B		140306_FM1052B (recalibrated).wiff	MS: FM1052B ms MS ² : FM1052B msms
T1101A / FM1101B		140306_FM1101B (recalibrated).wiff	MS: FM1101B ms MS ² : FM1101B msms
Fractionnement sur colonne SPE-aminopropyle (Février 2007)			
T1035B / T1035BFN2	20 µL 5 µL LiCl 2% 85 µL MeOH	070205_archo_neutre (recalibrated).wiff	MS: T1035BFN2 MS ² : T1035BFN2 msms
R1040B / R1040BFN3	140 µL 20 µL LiCl (évaporés à sec) 100 µL MeOH	070207_R1040B_neutre (recalibrated).wiff	MS: R1040BFN3 MS ² : R1040BFN3 msms
T1051B / T1051BFN2	100 µL (évaporés à sec) 10 µL LiCl 90 µL MeOH	070206_T1051_neutre (recalibrated).wiff	MS: T1051BFN2 MS ² : T1051BFN2 msms
T1041B / T1041BFN1	150 µL (évaporés à sec) 10 µL LiCl 90 µL MeOH	070207_T1041B_neutre (recalibrated).wiff 070208_T1041B_neutre (recalibrated).wiff	MS: T1041BFN1 MS ² : T1041BFN1 msms MS: 070208_T1041BFN1 MS ² : 070208_T1041BFN1 msms
T1049B / T1049BFN1		070207_T1049B_neutre (recalibrated).wiff	MS: T1049BFN1 MS ² : T1049BFN1 msms
T1058B / T1058BFN1		070208_T1058B_neutre (recalibrated).wiff	MS: T1058BFN1 MS ² : T1058BFN1 msms
R1062B / R1062BFN1		070208_R1062B_neutre (recalibrated).wiff	MS: R1062BFN1 MS ² : R1062BFN1 msms
T1078B / T1078BFN1		070208_T1078B_neutre.wiff	MS: T1078BFN1 MS ² : T1078BFN1 msms
T1096B / T1096BFN1		070206_T1096B_neutre (recalibrated).wiff	MS: T1096BFN1 MS ² : T1096BFN1 msms
T1082B / T1082BFN1		150 µL (évaporés à sec) 20 µL LiCl 30 µL MeOH	070209_T1082B_neutre.wiff
T1047B / T1047BFN1	150 µL (évaporés à sec)	070209_T1047B_neutre (recalibrated).wiff	MS: T1047BFN1 MS ² : T1047BFN1 msms
T1088B / T1088BFN1	10 µL LiCl 40 µL MeOH	070208_T1088B_neutre (recalibrated).wiff	MS: T1088BFN1 MS ² : T1088BFN1 msms

Tableau 23 : Liste des échantillons modèles et archéologiques analysés en spectrométrie de masse nanospray sur le spectromètre de masse Q-q-TOF. [Model and archaeological samples analysed by nanoelectrospray mass spectrometry, with a Q-q-TOF analyser]

L'utilisation d'une source nanospray est très avantageuse dans le cas d'échantillons archéologiques, car elle permet de diminuer les quantités injectées tout en augmentant la sensibilité de détection par rapport à l'électrospray classique. Le dopage des solutions analysées par des sels de lithium s'est révélé le plus performant, à la fois pour le rendement d'ionisation mais aussi pour la stabilité des adduits formés {Han & Gross 2001; Hsu & Turk 1999}. Le spectre de la Figure 72, obtenu pour un échantillon de lait de vache modèle, montre qu'il n'y a pas de fragmentation dans la source, qui pourraient donner lieu à des pics à des m/z équivalents aux triglycérides de plus faibles masses.

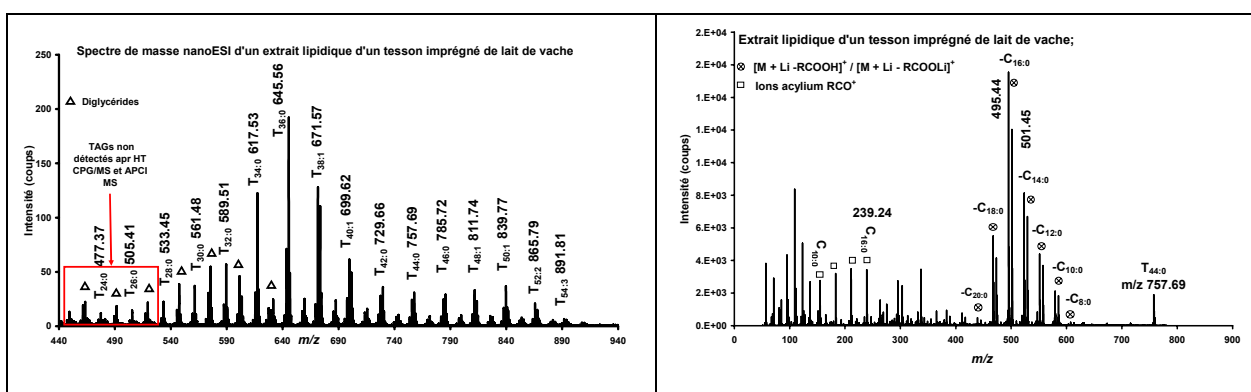


Figure 72 : Spectre de masse nanoESI d'un échantillon de lait de vache extrait d'un tesson modèle et spectre de fragmentation de l'ion m/z 757 correspondant à l'ensemble des triglycérides isobares T_{44:0}. [NanoESI Q-q-TOF mass spectrum of the total lipid extract of a model potsherd impregnated with cow milk and CID fragmentation spectrum of m/z 757, corresponding to T_{44:0} lithiated]

La formation d'adduits lithiés est également très utile en spectrométrie de masse tandem. Les fragmentations induites par collision (CID), bien que très complexes, ont été décrites par Hsu et Turk, dans le cas de l'électrospray classique et sont très informatives quant à la structure et la stéréochimie des triglycérides {Hsu & Turk 1999}. Les fragmentations induites par collision sont moins énergétiques que dans le cas de la publication de Hsu et Turk (source ESI classique, analyseur triple quadripôle), ce qui diminue le nombre de fragments. Ceci est très intéressant dans la mesure où les solutions que nous injectons sont des mélanges complexes d'isomères. Chaque pic fragmenté est un mélange d'isobares et, plus le spectre de fragmentation est simplifié, plus les données acquises sont facilement exploitables. Concrètement, les spectres de fragmentations obtenus sont dominés par la perte des acides gras sous forme neutre RCOH et lithiée RCOOLi. Sont également présents les ions acylium dérivant des acides gras RCO⁺ (Figure 72). Ainsi ces analyses nous permettent de déterminer pour chaque groupe de triglycérides isobares sa composition en acides gras.

Les analyses des échantillons archéologiques fractionnés, avec une ionisation nanospray et en spectrométrie de masse tandem se sont révélées très concluantes, permettant l'obtention de

données encore jamais acquises sur de tels échantillons vieux de plusieurs millénaires. Le gain en sensibilité par rapport à la chromatographie en phase gazeuse bien sûr mais également par rapport aux techniques de spectrométrie de masse décrites dans la littérature {Kimpe *et al.* 2001, 2002; Mottram *et al.* 2001; Mottram & Evershed 2001} est très bon, cela grâce à la combinaison de l'étape de purification des triglycérides qui permet de s'affranchir des composés mieux ionisés par électrospray comme les acides gras et de l'étape de dopage au lithium, qui accroît la sensibilité de détection et la stabilité des adduits tout en permettant une fragmentation contrôlée.

Nous avons également évalué le potentiel d'une autre technique de spectrométrie de masse à ionisation nanospray, avec un analyseur FT-ICR.

E.2.2. NanoESI avec un analyseur FT-ICR

La spectrométrie de masse FT-ICR est une technique de pointe, permettant d'obtenir une sensibilité et une résolution qui ne sont pas atteintes par d'autres techniques, dont la spectrométrie de masse Q-q-TOF. Elle est cependant plus délicate à mettre en œuvre, et nécessite un certain nombre de mises au point. Elle n'est donc pas encore adaptée à l'analyse d'échantillons archéologiques. Cependant, pour déterminer la variabilité des critères de discrimination des graisses animales que nous avons mis en place grâce à la spectrométrie de masse nanoESI Q-q-TOF, il nous a paru intéressant d'utiliser la technique la plus sensible et donc la mieux à même de mettre en lumière de légères variations. Nous discuterons plus en détail dans le chapitre III des avantages et des inconvénients de chacune de ces techniques. La variabilité des critères a donc été testée pour un ensemble de vaches d'un même troupeau (Cf. paragraphe B, Tableau 20). Seuls certains échantillons ont pu être analysés en spectrométrie de masse (Tableau 24).

Numéro de tesson	Vache	Extrait B, analyse FT-ICR MS et MS/MS			
		FT MS	V prélevé μL	V (LiCl) μL (concentration du LiCl)	V (MeOH) μL
7	tank	V0 007BA	20	30 (2 %)	950
13	1055	V0 013BA	20	30 (2 %)	950
20	2002	V0 020BA	20	30 (1 mg/mL)	950
26	3040	V0 026BA	20	30 (1 mg/mL)	950
117	1022	V0 117BA	20	30 (1 mg/mL)	950
37	1055	V2 037BFL2N	20	30 (2 %)	950

Tableau 24 : Liste des échantillons analysés par FT-ICR MS et MS/MS. [Model samples analysed by FT-ICR MS and MS/MS]

Le mode de fragmentation choisi pour la spectrométrie de masse tandem est l'IRMPD (*InfraRed MultiPhoton Dissociation*). Cette technique de fragmentation fournit des résultants

relativement proche de celle de CID classique (utilisé avec le spectromètre de masse Q-q-TOF) mais est beaucoup plus douce (pas d'introduction de gaz) et rapide. Le faisceau laser entre en interaction avec les ions directement dans la cellule ICR. Il y a alors un transfert d'énergie entre les photons et les ions. Dopés en énergie, les ions se fragmentent plus facilement. Les ions à fragmenter sont sélectionnés dans un hexapôle externe à la cellule ICR. Les conditions opératoires sont décrites dans l'encadré 17.

17. Conditions opératoires en spectrométrie de masse FT-ICR

Infusion directe.

Potentiel de l'aiguille: 1 à 1.2 kV (aiguilles métallisées, Protona, Danemark).

Accumulation des ions dans le premier hexapôle: 1 s.

Accumulation des ions dans le quadripôle de collision: 0.01 s pour la MS,

2 s pour la MS/MS.

Optique de transfert: 0.0016 s; Temps électronique: 0.01 s.

Paramètres de détection: large bande, 512 k; Durée de transition: 0.5243 s.

Résolution: 190 000 à m/z 400.

IRMPD: laser CO₂, $\lambda = 10.6 \mu\text{m}$; P = 25 W.

Le spectre de masse de l'échantillon V0117B est présenté en Figure 73. On peut tout de même remarquer que si la sensibilité de détection semble être la même que sur le QStar, le rapport S/N est bien meilleur. De même, la résolution semble meilleure. Ces observations sont à prendre en considération avec précaution bien entendu, car la comparaison est faite sur deux échantillons différents.

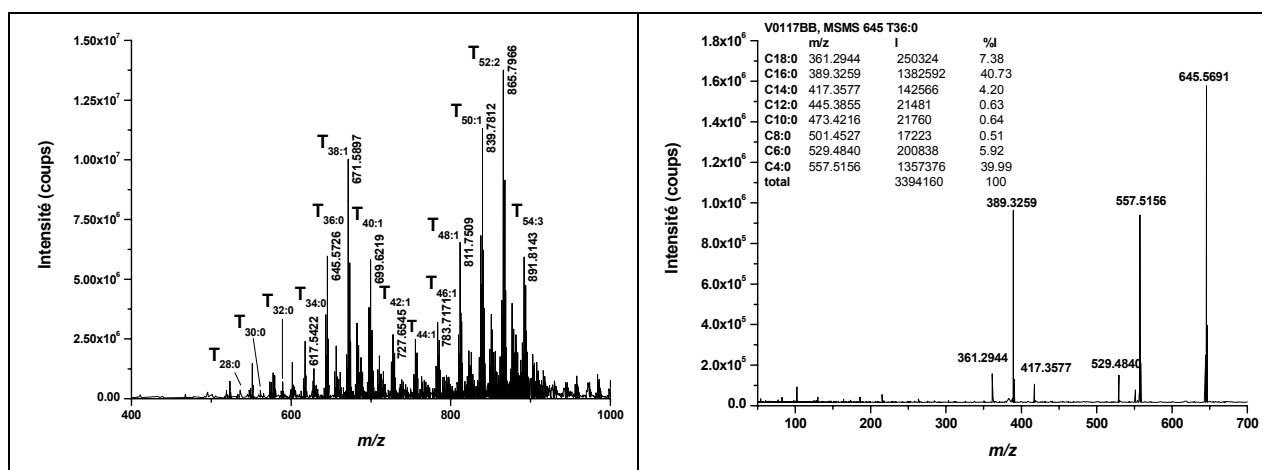


Figure 73 : Spectre de masse FT-ICR de l'échantillon V0117B et spectre de fragmentation obtenu par IRMPD MS/MS du pic m/z 645.5 ($T_{36:0}$). [FT-ICR mass spectrum of model sample V0117B and IRMPD fragmentation spectrum of peak at m/z 645.5 ($T_{36:0}$)]

Nous avons ensuite procédé à l'analyse en spectrométrie de masse tandem des échantillons de référence, avec le mode IRMPD. Les spectres obtenus sont extrêmement simplifiés par rapport à ceux obtenus par CID. Ils ne contiennent que les pics de perte des acides gras neutres. Les pertes des acides gras lithiés (RCOOLi) sont à peine visibles, et ce juste pour les pics les plus intenses. On a vu plus haut que la fragmentation par IRMPD est beaucoup plus douce que celle par CID, ce qui explique ce schéma de fragmentation légèrement différent. Il semble que la charge soit retenue par le lithium. Ces spectres sont obtenus très rapidement, sans besoin d'accumulation trop longue pour avoir un excellent rapport signal sur bruit (S/N). A titre d'exemple, le spectre de fragmentation du pic m/z 645.56 correspondant aux triglycérides $T_{36:0}$ est donné en Figure 73.

Les données obtenues par spectrométrie de masse FT-ICR IRMPD sont donc plus simples à interpréter, ce qui est un avantage pour le traitement de grandes séries d'échantillons. Il a ainsi été possible de déterminer la variation intraspécifique des critères de discrimination, pour un ensemble de laits de vaches avec la même alimentation, et également de mettre en lumière la très bonne stabilité de ces critères au cours du vieillissement, comme nous le présentons dans le chapitre suivant.

Conclusion

La méthodologie que nous avons présentée dans cette partie s'articule autour de trois axes: le *screening*, par chromatographie en phase gazeuse, de la composition moléculaire des extraits d'échantillons archéologiques, l'évaluation de différentes techniques de spectrométrie de masse à ionisation douce, LDI et ESI, pour la caractérisation structurale de triglycérides de graisses animales, et la mise au point de critères de discrimination des graisses animales par spectrométrie de masse pour la caractérisation d'échantillons archéologiques.

La chromatographie en phase gazeuse est une technique désormais classique dans l'analyse des résidus organiques archéologiques. Elle permet d'identifier de grandes classes de matériaux, les graisses animales et végétales, les cires animales et végétales ainsi que les goudrons et résines végétaux. Nous avons développé un protocole en chromatographie en phase gazeuse pour la caractérisation des matières grasses végétales, aspect peu étudié pour les échantillons archéologiques, par analyse de leur composition en acides gras.

La spectrométrie de masse, à ionisation douce, a rarement été utilisée dans le cadre de l'analyse d'échantillons archéologiques. Il existe deux techniques d'ionisation principale, dont nous avons évalué le potentiel analytique pour la caractérisation des triglycérides. Les techniques d'ionisation/désorption laser (LDI) que nous avons testées sont le MALDI et le DIOS, couplée avec un analyseur TOF. Ce sont des techniques qui sont rapides et faciles à mettre en œuvre, pour un *screening* de la composition en triglycérides d'échantillons complexes. Cependant, la nécessité de doper les solutions, avec des ions argent, en MALDI ne permet pas une identification simple des différents états d'insaturation des triglycérides, à cause de la distribution isotopique de l'argent. La mise au point de l'ionisation DIOS, avec laquelle ni la matrice ni le dopant ne sont nécessaires, a permis de s'affranchir de ce problème. La sensibilité de détection et le rapport signal sur bruit sont bien meilleurs qu'en MALDI, ce qui fait du DIOS, technique encore très récente, une ionisation de choix pour les mélanges complexes de triglycérides. Mais ces techniques LDI ne sont malheureusement pas compatibles avec l'analyse structurale des triglycérides, dans la configuration actuelle des spectromètres de masse au laboratoire, car il est extrêmement délicat de travailler en mode tandem sur un spectromètre simple TOF. C'est pourquoi nous avons mis au point la spectrométrie de masse à ionisation nanospray, pour laquelle le mode tandem MS/MS est disponible. Le dopage des solutions aux sels de lithium s'est révélé très avantageux : plus de fragmentation dans la source, bon taux d'ionisation et fragmentation contrôlée par la charge en MS/MS. Quel que soit l'analyseur utilisé, Q-q-TOF ou FT-ICR, le gain en sensibilité de détection, par rapport à la chromatographie en phase gazeuse et au MALDI est élevé. Ceci est également vrai par rapport aux autres techniques de spectrométrie de masse utilisées plus couramment dans

la littérature, l'APCI par exemple. Seul le DIOS-TOF permet d'atteindre une sensibilité aussi élevée. Le grand avantage de ces techniques est la possibilité de travailler en mode tandem. Chaque triglycéride détecté en MS est sélectionné puis fragmenté et analysé. Les principaux fragments en CID MS/MS sont les ions correspondant à la perte des acides gras sous forme neutre RCOOH et lithiée RCOOLi, ainsi que les ions acylium RCO⁺ associés. En IRMPD FT-ICR MS/MS, seule la perte du fragment acide gras neutre RCOOH est visible, simplifiant à l'extrême les spectres de fragmentation à interpréter. Il est alors possible d'obtenir, pour chaque triglycéride, sa composition en acides gras. A partir de ces spectres de fragmentation, nous avons vu qu'il est possible de tracer des courbes de distribution d'acides gras, pour chaque triglycéride, qui servent de critères de discrimination des graisses animales modèles. La spectrométrie de masse nanospray avec un analyseur FT-ICR, grâce à sa sensibilité et de sa résolution, a été utilisée pour déterminer la variabilité des critères de discrimination mis au point, pour des échantillons modèles.

Grâce à la chromatographie en phase gazeuse, il est possible de classer les échantillons de graisses animales en fonction de leur distribution en triglycérides, et ainsi d'obtenir des premières hypothèses sur l'origine naturelles des graisses. Les échantillons de graisses animales pour lesquels les triglycérides sont les mieux conservés sont ensuite sélectionnés, puis purifiés, par fractionnement sur colonne SPE, avant leur analyse en spectrométrie de masse. Les techniques d'ionisation LDI, notamment le DIOS, n'ont pas pu être utilisées pour le *screening* des échantillons archéologiques, car les cibles de silicium poreux se sont révélées peu stables. Nous avons donc analysé les échantillons en spectrométrie de masse à ionisation nanospray, avec un analyseur Q-q-TOF. Cette technique, bien que moins sensible que l'analyseur FT-ICR (précision de masse, rapport signal/bruit et résolution), a néanmoins l'avantage d'être simple à mettre en œuvre, ce qui est très important pour l'analyse de larges séries d'échantillons aussi complexes que les échantillons archéologiques à notre disposition. Par ailleurs, les résultats obtenus sur les échantillons modèles ont montré que la sensibilité de détection du spectromètre Q-q-TOF était suffisante pour discriminer les graisses animales et pour déterminer des critères d'identification de l'espèce d'origine. Nous verrons dans le chapitre IV les résultats obtenus pour les échantillons archéologiques. La méthodologie est résumée en Figure 74.

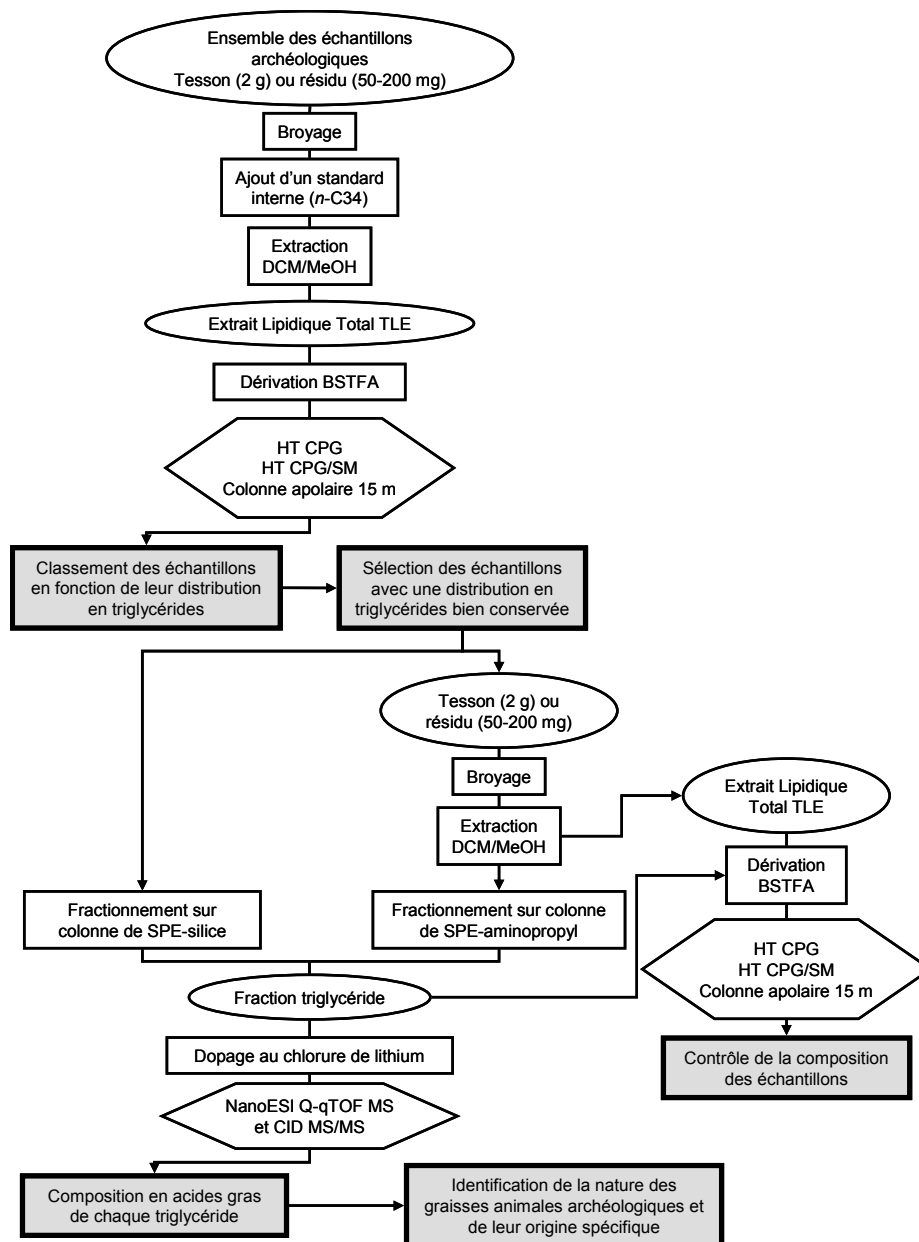


Figure 74 : Méthodologie novatrice développée pour la caractérisation des graisses animales archéologiques. [Scheme of the innovative methodology developed for the characterisation of archaeological animal fats]

Cette méthodologie met en œuvre des techniques de spectrométrie de masse qui n'ont que rarement été utilisées pour l'analyse d'échantillons archéologiques. Elle nous a permis, en combinant les données obtenues en CPG à celles obtenues en nanoESI MS/MS de développer nos connaissances sur les graisses animales archéologiques. La mise au point, sur des échantillons modèles, de la technique DIOS est très prometteuse pour le *screening* d'échantillons complexes, composés de biomolécules de tailles intermédiaires mal détectées en MALDI et de molécules peu polaires, mal ionisées en MALDI classique. Cette technique, une fois qu'elle pourra être couplée à des instruments à analyseur tandem, TOF-TOF ou FT-

ICR, deviendra certainement prééminente sur les techniques de nanospray, car elle présente la même sensibilité de détection, tout en étant plus facile à mettre en œuvre.

Chapitre III

**Résultats sur les substances naturelles de référence:
élaboration de nouveaux critères d'identification et de
discrimination des graisses animales**

Introduction

A l'heure actuelle, l'identification des graisses animales dans les céramiques archéologiques est principalement basée sur l'analyse par chromatographie en phase gazeuse et l'analyse isotopique des résidus organiques. La première de ces méthodes permet de discriminer les graisses animales des autres matières grasses comme les huiles végétales, les cires, les résines ou encore les brais. Dans certains cas, elle permet également de discriminer les graisses de ruminants des graisses de non ruminants, et d'identifier la présence de produits laitiers {Charters *et al.* 1995; Evershed 1993b; Evershed *et al.* 1997a; Evershed *et al.* 1999; Evershed *et al.* 2002; Heron & Evershed 1993; Regert *et al.* 2003a; Regert *et al.* 2003b}. Les analyses isotopiques du carbone, comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, permettent de différencier les graisses sous-cutanées par rapport aux produits laitiers, et de discriminer les graisses de ruminants de celles de non ruminants {Copley *et al.* 2003; Dudd & Evershed 1998; Dudd *et al.* 1999; Evershed *et al.* 1994; Evershed *et al.* 2002; Mottram *et al.* 1999}. Mais elles ne permettent pas toujours de remonter à l'espèce animale. Une autre technique développée est l'analyse des résidus protéiques, qui sont hautement caractéristiques de l'espèce, exception faite du collagène. La pyrolyse couplée à la chromatographie en phase gazeuse permet de détecter la présence de protéines, sans être spécifique {Oudemans & Boon 1991; Oudemans *et al.* 2007; Regert *et al.* 2001b}. Les tests immunologiques, quant à eux, semblent performants, mais ils sont encore peu appliqués dans le domaine de l'archéologie {Craig *et al.* 2000; Craig *et al.* 2005a; Craig & Collins 2002}. De la même manière, la protéomique a permis d'identifier des protéines dans des liants de peinture et son application à des échantillons archéologiques a donné quelques résultats très prometteurs {Burgaud 2003; Solazzo 2007; Tokarski *et al.* 2006}.

C'est pourquoi il nous a paru intéressant, au vu de la très bonne conservation des échantillons archéologiques à notre disposition, de travailler sur les triglycérides. Ce sont les biomarqueurs les plus caractéristiques des graisses animales, mais qui présentent l'inconvénient d'être ubiquistes à toutes les graisses, animales et végétales {Andrikopoulos 2002; Davenel *et al.* 1999; Dugo *et al.* 2005; Gresti *et al.* 1993; Jakab *et al.* 2002; Mottram *et al.* 1997; Ruiz-Sala *et al.* 1996; Sandra *et al.* 2002}. Des études datant du début des années 90 ont porté sur l'analyse des triglycérides par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse {Evershed *et al.* 1990c; Evershed 1996}. Cependant, les limites de détection de ces composés peu volatils, en chromatographie en phase gazeuse, n'ont pas permis une caractérisation structurale suffisante des triglycérides pour déterminer des critères de discrimination des graisses animales {Evershed *et al.* 1997a; Evershed *et al.* 2002}. La même équipe a ensuite travaillé sur l'analyse des triglycérides par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à ionisation

APCI, mais sans jamais appliquer cette technique à des échantillons archéologiques {Mottram & Evershed 1996; Mottram *et al.* 2001; Mottram & Evershed 2001}. Si la composition en triglycérides du lait de vache a été identifiée de manière exhaustive, elle n'a jamais été comparée à celle de graisses sous-cutanées ou à celles de produits laitiers d'autres espèces. Nous avons donc choisi de travailler sur les triglycérides des graisses animales, et plus particulièrement sur leur structure, afin de mettre en place des critères de discrimination des graisses sous-cutanées et des produits laitiers ainsi que des critères d'identification des espèces animales.

Nous avons, dans un premier temps, cherché à évaluer le potentiel d'un certain nombre de techniques de spectrométrie de masse, à ionisation douce. Nous avons ensuite élaboré des critères de discrimination et d'identification spécifique des graisses animales, sur des échantillons de référence. Nous avons enfin cherché à caractériser la variabilité intraspécifique de ces critères pour un ensemble de laits de vache, avant de suivre la dégradation de ces mêmes échantillons pour déterminer la stabilité des critères de discrimination dans le temps.

A. Evaluation du potentiel de différentes techniques de spectrométrie de masse: gain en sensibilité et en résolution

A.1. Les échantillons de référence

Nous avons travaillé sur plusieurs types d'échantillons de référence constitués d'extraits de graisses sous-cutanées et d'extraits de tessons de céramique imprégnés de lait. Le premier set de référence est composé de tessons imprégnés de lait de vache entier et de lait de chèvre entier provenant de l'agriculture biologique. Le deuxième set de référence est composé de tessons imprégnés de lait de plusieurs vaches d'un même troupeau, nourries à l'herbe, sans complément alimentaire, par l'INRA (Cf. chapitre II). Enfin le troisième set de référence est composé de graisses sous-cutanées de bœuf et de mouton élevés dans une ferme biologique. Ces différents échantillons sont extraits (Cf. chapitre II), afin d'isoler leur fraction lipidique, puis de l'analyser. Les différents protocoles qui ont été mis en place pour l'analyse de ces échantillons sont décrits dans le Tableau 25.

	Set 1		Set 2		Set 3
	Tesson imprégné de lait de chèvre entier bio	Tesson imprégné de lait de vache entier bio	Graisse sous-cutanée de bœuf bio	Graisse sous-cutanée de mouton bio	Tessons imprégnés de lait de vache INRA
HT CPG		X			X
MALDI-TOF MS	X	X	X	X	
DIOS-TOF MS					X
ESI Q-q-TOF MS et MS/MS	X	X	X	X	
ESI FT-ICR MS et MS/MS					X

Tableau 25 : Echantillons de référence et analyses dont ils ont fait l'objet. [Reference model samples and the analyses they have been subjected to]

Nous avons tout d'abord évalué la sensibilité de techniques classiques de spectrométrie de masse à ionisation douce, MALDI TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry*) et nanoESI Q-q-TOF MS (*nanoElectroSpray Ionisation Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry*), avant de regarder le potentiel de nouvelles techniques telles que le DIOS TOF MS (*Desorption/Ionisation on porous Silicon Time-of-Flight Mass Spectrometry*) et la spectrométrie de masse à transformée de Fourier nanoESI FT-ICR (*nanoElectroSpray Ionisation Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*).

A.2. Ionisation/désorption laser

La première technique d'ionisation que nous avons adaptée à l'analyse d'échantillons complexes de triglycérides est la désorption/ionisation par laser (LDI, *Laser Desorption/Ionisation*). Il existe différents types de sources, suivant le substrat sur lequel l'échantillon est déposé pour être irradié par le laser. La plus répandue est certainement la désorption/ionisation assistée par matrice, dont nous avons tout d'abord évalué le potentiel (MALDI). Afin d'améliorer les performances de la désorption/ionisation laser pour le cas particulier des lipides, nous avons ensuite cherché à les ioniser à l'aide de silicium poreux, technique récente de LDI, aussi appelée DIOS.

A.2.1. Le MALDI

A.2.1.1. Le principe de l'ionisation MALDI

La spectrométrie de masse MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*) est une technique relativement récente, dont la première application date de 1988 {Karas & Hillenkamp 1988}. Elle permet d'ioniser une large gamme de molécules de haut poids moléculaire avec une préparation rapide et une mise en œuvre simple. C'est une technique très sensible, qui semble adaptée à l'analyse de lipides {Cohen & Gusev 2002; Hlongwane *et al.* 2001; Schiller *et al.* 1999; Siciliano *et al.* 2000}.

La matrice est un acide organique absorbant dans l'UV. Le MALDI est plus sensible que les autres techniques d'ionisation par désorption laser. En effet, le nombre de molécules de matrice est très largement majoritaire par rapport au nombre de molécules à analyser. Ces dernières sont donc dispersées dans la matrice et isolées les unes des autres, ce qui empêche la formation d'agrégats qui pourraient nuire à la formation d'ions moléculaires. La présence de matrice permet également de minimiser les dommages causés par le laser en absorbant la majeure partie de l'énergie incidente, et permet également de transférer l'énergie aux molécules à ioniser (Figure 75). Les mécanismes d'ionisation sont encore mal connus, et peuvent engager la photoionisation en phase gazeuse, le transfert de proton, les réactions ion/molécule et la désorption d'ions préformés {de Hoffmann & Stroobant 2005; Glückmann *et al.* 2001; Hillenkamp & Karas 1990, 2000; Nguyen *et al.* 1995; Stults 1995; Zaluzec *et al.* 1995}.

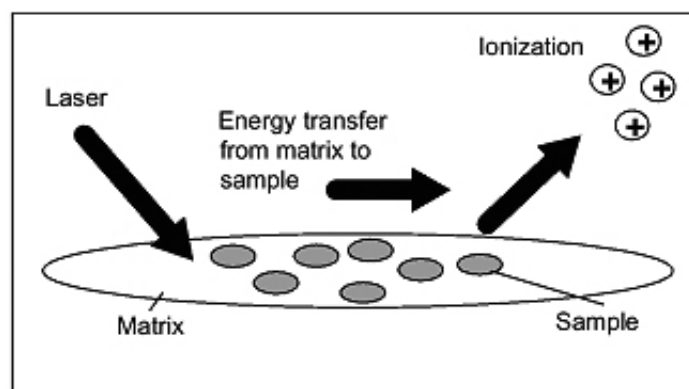


Figure 75: Schéma de principe de l'ionisation/désorption laser assistée par matrice. [Schematic view of the matrix assisted laser desorption/ionisation]

C'est une technique que l'on peut qualifier d'universelle, dans la mesure où la désorption et l'ionisation sont principalement contrôlées par la matrice, et non par le composé. Elle est donc indépendante des propriétés d'absorption et de taille des molécules. Elle est principalement utilisée pour l'analyse de molécules de très haute masse, telles que les protéines, les oligonucléotides ou encore les polymères synthétiques.

Cette technique est sensible, rapide et facile à mettre en œuvre. C'est pourquoi elle présente un intérêt particulier pour l'analyse de grandes séries d'échantillons complexes tels que nos échantillons de référence. Cependant, l'ionisation de composés aussi peu polaires que les triglycérides est relativement mauvaise, c'est pourquoi afin d'augmenter le rendement d'ionisation, les solutions ont été dopées avec des sels d'argent comme nous l'avons vu dans le chapitre II {Garnier 2003}.

A.2.1.2. Les résultats obtenus en MALDI-TOF MS

Les profils des spectres obtenus pour les échantillons de référence sont présentés en Figure 76. Ces profils sont très similaires à ceux obtenus en chromatographie en phase gazeuse, le gain en sensibilité n'est pas très élevé. Cependant, l'analyse en MALDI-TOF permet de déterminer le profil en insaturations (nombre de doubles liaisons), ce que ne permet pas de faire la CPG. Les distributions en triglycérides pour les échantillons de lait s'étendent de T_{32} à T_{54} . Le triglycéride le plus abondant est le $T_{38:1}$. Les distributions des échantillons de graisse sous-cutanée sont beaucoup plus restreintes, de $T_{46-T_{48}}$ à T_{54} , le $T_{52:2}$ étant le plus abondant.

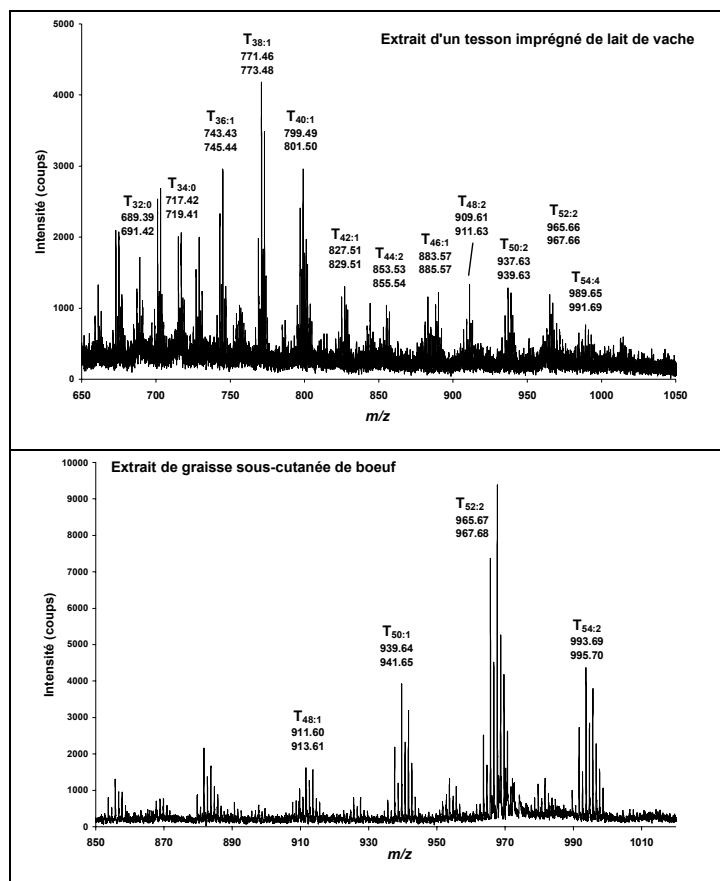


Figure 76 : Spectres de masse MALDI-TOF de deux échantillons de référence (extrait d'un tesson imprégné de lait de vache et extrait de graisse sous-cutanée de bœuf), matrice DHB, dopage au nitrate d'argent. [MALDI-TOF mass spectra of reference samples (total lipid extracts of a potsherd impregnated with cow milk and cow adipose fat), DHB matrix and silver salts doping]

Pour chaque groupe de triglycérides ayant un même nombre d'atomes de carbone (CN, *Carbon Number*), il est possible de déterminer la distribution en insaturation. Mais cette distribution est couplée avec la distribution isotopique de l'argent. En effet, l'argent est présent sous la forme de deux isotopes, ^{107}Ag et ^{109}Ag , avec un rapport $^{107}\text{Ag}/^{109}\text{Ag}$ proche de 1.07 (Figure 77). Ainsi, pour l'échantillon de graisse de vache, les triglycérides T_{50} sont composés de 4 espèces, $T_{50:0}$, $T_{50:1}$, $T_{50:2}$ et $T_{50:3}$. Sur les 5 pics qui correspondent à ces 4 espèces, les deux pics aux extrémités de la distribution sont des ions monoisotopiques [$T_{50:0} + ^{109}\text{Ag}$] $^{+}$ à m/z 943.65 et [$T_{50:3} + ^{107}\text{Ag}$] $^{+}$ à m/z 935.62. Les trois autres pics correspondent à deux espèces à chaque fois, complexées avec les différents isotopes de l'argent (Figure 77). Nous ne discuterons pas des distributions isotopiques liées au carbone (^{13}C et ^{12}C), qui ne se couplent pas avec les distributions en insaturations. Ce sont les pics observés à droite des pics principaux (m/z pair).

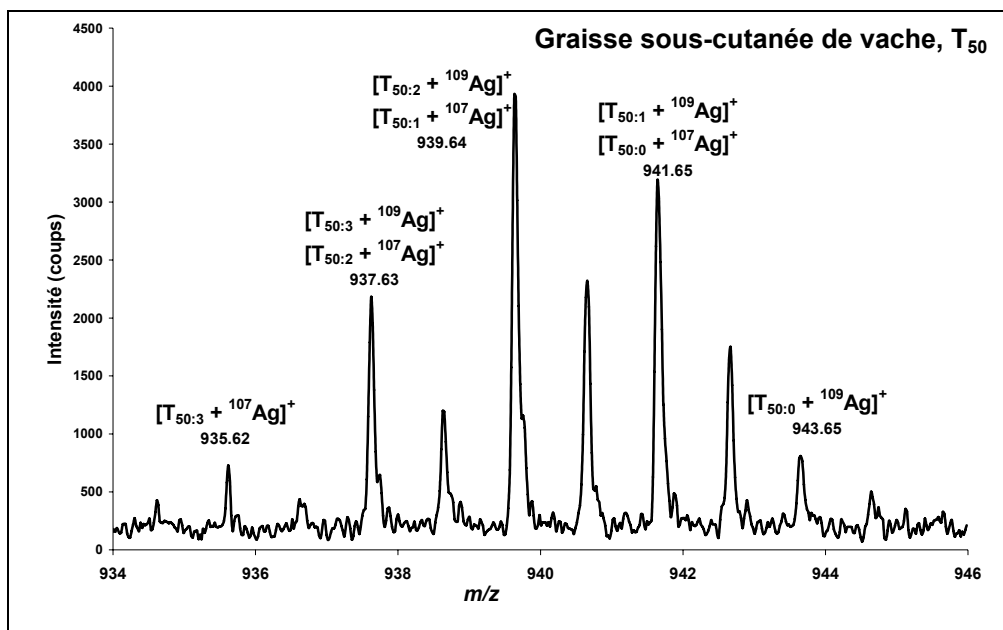


Figure 77 : Détail du spectre de masse MALDI-TOF de l'échantillon de graisse sous-cutanée de vache, autour du groupe de triglycéride T50. [Partial Ag⁺-MALDI mass spectrum of the total lipid extract of cow adipose fat, T50]

Nous n'avons pas réussi à déconvoluer les différentes contributions isotopiques, pour obtenir les compositions exactes pour chaque groupe de triglycérides à même CN. Si la spectrométrie de masse MALDI-TOF ne permet pas d'obtenir de données sur la structure des triglycérides, elle est tout de même bien adaptée pour obtenir rapidement et simplement la composition en triglycérides des échantillons. Afin de s'affranchir de la distribution isotopique de l'argent, nous avons testé une technique d'ionisation/désorption laser sur silicium poreux (DIOS).

A.2.2. *le DIOS*

A.2.2.1. Le principe de l'ionisation DIOS

Le DIOS (*Desorption/Ionisation On porous Silicon*) est une technique d'ionisation par laser (LDI). A la place de la cible MALDI et de la matrice, on utilise une cible de silicium cristallin (type *n* ou type *p*) sur laquelle des points de silicium poreux ont été obtenus par différents procédés (Figure 78) - gravure galvanostatique, gravure électrochimique etc. {Kruse *et al.* 2001; Lewis *et al.* 2003; Li & Bohn 2000; Shen *et al.* 2001; Thomas *et al.* 2001; Tuomikoski *et al.* 2002; Wei *et al.* 1999}.



Figure 78: Photo d'une plaque DIOS. [DIOS target plate]

Le silicium poreux piège les molécules à ioniser et absorbe l'énergie du laser UV grâce à sa haute absorbance dans l'UV. L'épaisseur, la morphologie, la porosité et la résistivité du silicium poreux sont modulables suivant les paramètres de la gravure, et jouent un rôle non négligeable dans l'ionisation des composés. La surface du silicium poreux est hydrophobe, très stable chimiquement mais assez peu stable mécaniquement. Elle peut être stabilisée et/ou fonctionnalisée par greffage. Les propriétés de surface joueront alors un rôle dans l'ionisation des composés. Ceci est du domaine de la microfluidique, avec un ensemble de possibilité de réactions, séparations, etc. sur une surface qui peut être directement analysée (*Lab-on-a-Chip*) {Kruse *et al.* 2001; Lewis *et al.* 2003; Meng *et al.* 2004; Okuno *et al.* 2004; Okuno *et al.* 2005; Shen *et al.* 2001; Thomas *et al.* 2001; Trauger *et al.* 2004; Tuomikoski *et al.* 2002; Wei *et al.* 1999}.

Le principal avantage de l'ionisation sur silicium poreux tient dans l'analyse de molécules de petite taille qui, en MALDI, sont masqués par les pics de la matrice {Arakawa *et al.* 2004; Kraj *et al.* 2003; Lewis *et al.* 2003; Shen *et al.* 2001; Wall *et al.* 2004}. Bien que n'étant pas à proprement parler des molécules de petites tailles (MW 400-900), les triglycérides sont tout de même partiellement masqués par les pics de matrice. L'autre avantage du silicium poreux, en particulier pour des molécules aussi peu polaires que les triglycérides, est que le dopage à l'argent ou à tout autre sel n'est plus nécessaire. Les triglycérides s'ionisent sous forme d'adduits sodium $[M - H + Na]^+$.

A.2.2.2. Les résultats obtenus en DIOS-TOF MS

Les échantillons analysés en DIOS sont le deuxième set de référence, à savoir les extraits de tessons imprégnés de lait de vaches du troupeau INRA. Ces extraits ont été séparés en deux fractions: la première notée A contenant un standard interne et analysée en HT CPG pour la quantification des échantillons; la deuxième, notée B, ne contenant pas de standard interne et utilisée pour l'analyse en spectrométrie de masse. Le spectre de masse DIOS obtenu pour la fraction B de l'échantillon V0117 (tesson 117, extraction à $t = 0$) et le chromatogramme obtenu pour la fraction A sont donnés en Figure 79. On peut remarquer que la sensibilité de détection est bien plus grande en DIOS MS (T_{22} à T_{54}) qu'en HT CPG (T_{32} à T_{54}), contrairement à ce qui a été

observé avec le MALDI. La distribution en triglycérides de cet échantillon s'étend de T_{22:0} à T_{54:0}, avec un rapport signal sur bruit bien meilleur qu'en MALDI (Figure 79 & Figure 76).

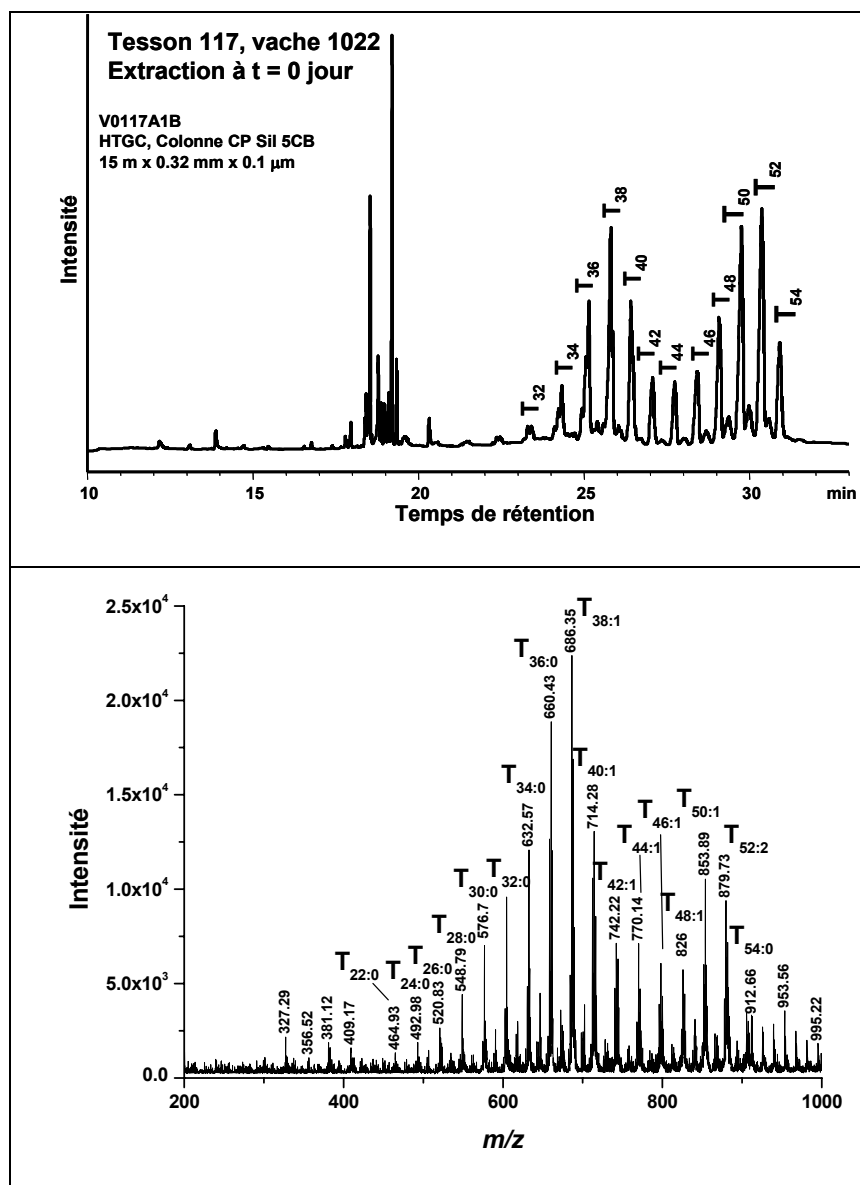


Figure 79 : Chromatogramme de la fraction A de l'extrait lipidique du tesson V0117 et spectre de masse DIOS de la fraction B de l'extrait lipidique du tesson V0117. [Gas chromatogram of the total lipid extract of sample V0117A (with internal standard) and DIOS mass spectrum of the total lipid extract of sample V0117B (without internal standard)]

La résolution obtenue en spectrométrie de masse DIOS est bien meilleure que celle obtenue chromatographie. Il en est de même pour la sensibilité de détection des triglycérides de faible poids moléculaire. Cette technique paraît beaucoup plus appropriée que la spectrométrie de masse MALDI pour l'analyse rapide de ce type d'échantillons. La mise au point est plus simple qu'en MALDI, car il n'y a plus de choix de matrice ou de dopant à faire. Le seul point négatif est la faible stabilité mécanique du silicium poreux. Il est difficile après plusieurs utilisations

d'obtenir des spectres avec un bon rapport signal/bruit. Bien qu'il reste encore des mises au point à faire, telles que la détermination du mode d'ionisation des triglycérides, la stabilisation du silicium poreux et la quantification des lipides, qui permettraient de s'affranchir de l'étape préalable de chromatographie, cette technique semble très adaptée au *screening* d'échantillons complexes tels que les graisses animales.

Les techniques d'ionisation par désorption laser ont montré leur efficacité pour l'analyse rapide et simple d'échantillons complexes. Cependant, aucune donnée structurale n'a pu être obtenue ainsi, car nous n'avons pas à notre disposition de spectromètre avec un analyseur à double temps de vol (TOF/TOF). C'est pourquoi nous avons cherché à évaluer le potentiel de techniques de spectrométrie de masse, pouvant être utilisées en mode tandem.

A.3. Ionisation par électrospray

A.3.1. Le principe de l'électrospray

L'ionisation par électrospray (ESI) est une technique datant de 1984, mise au point par J. B. Fenn (prix Nobel de Chimie en 2002) {Yamashita & Fenn 1984}. Elle permet d'analyser des échantillons en solution. Les ions formés sont stables, et peuvent être activés par collision à l'interface de la source ou dans une cellule de collision post-source. Cette technique permet d'ioniser les molécules polaires, y compris celles de haute masse grâce à la multiprotonation. Les premiers spectres ESI ont été présentés au congrès de l'*American Society for Mass Spectrometry* en 1988 et publiés en 1989 {Fenn *et al.* 1989}.

L'ESI est basé sur le passage de molécules en phase liquide à des ions en phase gazeuse. Si le principe des premières étapes du processus est globalement accepté, il existe 2 théories principales pour en expliquer la dernière étape {Cech & Enke 2001; Charles *et al.* 2001; de Juan & de la Mora 1997; De la Mora 2000; de la Mora *et al.* 2000; Fenn 1993; Gamero-Castaño & De la Mora 2000; Kebarle & Peschke 2000; Konn *et al.* 2005; Rohner *et al.* 2004; Smyth 1999}. L'électrospray peut se décomposer en 3 étapes :

1. la production de gouttelettes chargées à l'extrémité du capillaire de transfert,
2. la diminution de la taille des gouttelettes chargées, par évaporation du solvant et par explosions coulombiennes répétées,
3. le passage des ions en phase gazeuse.

La première étape suit un mécanisme électrophorétique, avec, en mode positif, le capillaire de transfert qui joue le rôle de cathode et la plaque (ou les cônes) d'entrée du spectromètre de masse qui joue le rôle d'anode (Figure 80). Les ions positifs (qui nous

intéressent) se déplacent vers l'extérieur du capillaire et vers la surface du liquide alors que les ions négatifs se déplacent en sens inverse. Lorsque la répulsion entre tous les ions positifs à la surface de la solution devient plus importante que la tension de surface, il se forme un cône en sortie du capillaire appelé cône de Taylor. Au bout de ce cône se forme un jet, qui produit de fines gouttelettes chargées {de la Mora *et al.* 2000; Rohner *et al.* 2004; Smyth 1999}. En électrospray classique, ce phénomène est assisté mécaniquement par l'apport d'un courant gazeux en sortie du capillaire, qui n'est plus nécessaire en nanospray {de Hoffmann & Stroobant 2005}, technique que nous utilisons. Le courant appliqué entre le capillaire et l'entrée du spectromètre de masse est de l'ordre de 2 à 4 kV en ESI et de 800 à 1200 V en nanoESI.

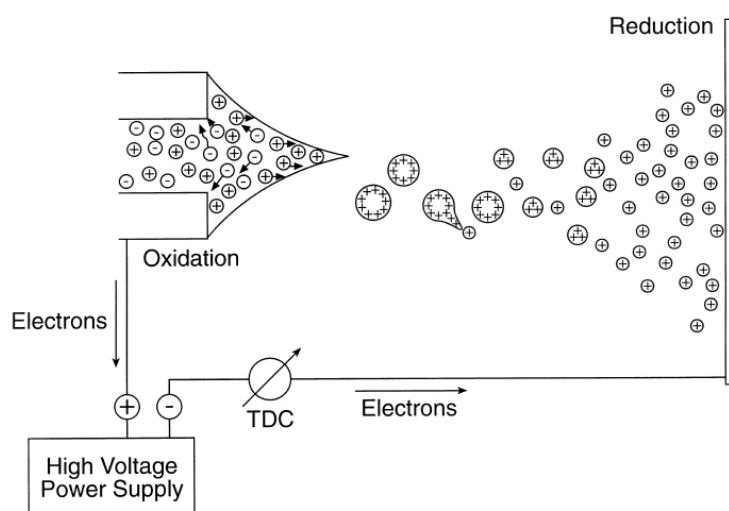


Figure 80 : Mécanisme schématisé de l'ionisation électrospray {Kearle & Peschke 2000; Smyth 1999}. [Scheme of the electrospray ionisation mechanism]

La deuxième étape repose sur la diminution de la taille des gouttelettes : l'évaporation du solvant entraîne une augmentation de la densité de charge à la surface de la gouttelette, jusqu'à atteindre la limite de Rayleigh. Une fois cette limite atteinte, la gouttelette explose en plus petites gouttes : on appelle cela l'explosion coulombienne {de Hoffmann & Stroobant 2005; Fenn 1993; Smyth 1999}. Ce processus se répète jusqu'au passage des ions en phase gazeuse.

C'est cette dernière étape qui reste la plus problématique. Deux théories sont avancées à l'heure actuelle : la théorie proposée par Dole *et al.* appelée modèle du résidu chargé (CRM, *Charged Residue Model*), publiée en 1968 et la théorie de l'évaporation des ions (IEM, *Ion Evaporation Model*) publiée par Iribarne et Thomson en 1976 et 1979 {Cech & Enke 2001; de Juan & de la Mora 1997; De la Mora 2000; Fenn 1993; Gamero-Castaño & De la Mora 2000; Kearle & Peschke 2000; Konn *et al.* 2005; Rohner *et al.* 2004; Smyth 1999}. La première de ces deux théories, la CRM, postule qu'à la fin de la séquence d'explosions coulombiennes on obtient

une gouttelette ultime, qui ne contient plus que l'analyte chargé. L'analyte devient un ion en phase gazeuse en retenant certaines des charges de la gouttelette quand les dernières molécules de solvant s'évaporent. La deuxième de ces théories, l'IEM, postule qu'avant d'atteindre la gouttelette ultime décrite dans le modèle précédent, le champ à la surface de la gouttelette devient plus fort que les liaisons de solvation et permet la désorption de l'ion, de l'intérieur de la goutte vers la phase gazeuse. Certains auteurs estiment qu'aucun de ces deux modèles ne permet d'expliquer tous les phénomènes observés en électrospray. Ils postulent que les deux doivent être considérés et utilisés à bon escient pour expliquer les différents aspects de l'électrospray {Gamero-Castaño & De la Mora 2000}. Il semblerait que l'ionisation des petites molécules soit mieux expliquée par la théorie IEM, alors que la théorie RCM serait plus appropriée pour expliquer la formation d'adduits multichargés et d'ions multichargés {De la Mora 2000; Gamero-Castaño & De la Mora 2000; Kebarle & Peschke 2000}. Dans les deux théories, le courant ionique total ne dépend que de la concentration et du potentiel appliqué, et non du débit de la solution.

Nous avons utilisé une variante de l'électrospray, le nanospray, dans lequel le débit de solution est beaucoup plus faible (de l'ordre de la dizaine à la centaine de nmol/min). Là encore, le signal ne dépend que de la concentration et du potentiel, ce dernier étant plus faible qu'en électrospray classique (800 à 1200 V), et non pas de la vitesse du flux. La sensibilité d'ionisation du nanospray est plus grande que celle de l'électrospray. Comme on l'a noté plus haut, l'électrospray et le nanospray sont très adaptés à l'étude de molécules polaires, qui se protonent facilement. Dans le cas de molécules non polaires, l'ajout de sels métalliques est un moyen de cationiser les composés en formant des adduits chargés {Afonso *et al.* 2005; Han & Gross 2001; Hsu & Turk 1999; McAnoy *et al.* 2005}. Pour l'étude de triglycérides, il a été nécessaire de trouver un dopant permettant de les ioniser, mais également de les stabiliser dans la source pour éviter des fragmentations non souhaitées. Le lithium s'est révélé le meilleur dopant, à la fois en terme de sensibilité d'ionisation, de stabilité des adduits formés et de non compétitivité avec d'autres adduits tels que les adduits sodium ou potassium {Han & Gross 2001; Hsu & Turk 1999}.

Nous verrons qu'il existe différents types d'analyseurs qui peuvent être utilisés avec une source nanospray, ce qui nous a permis d'évaluer différentes techniques de spectrométrie de masse tandem pour l'analyse structurale de triglycérides.

A.3.2. NanoESI MS

A.3.2.1. Spectrométrie de masse avec un analyseur hybride Q-q-TOF

A.3.2.1.1. Le principe de l'analyseur Q-q-TOF

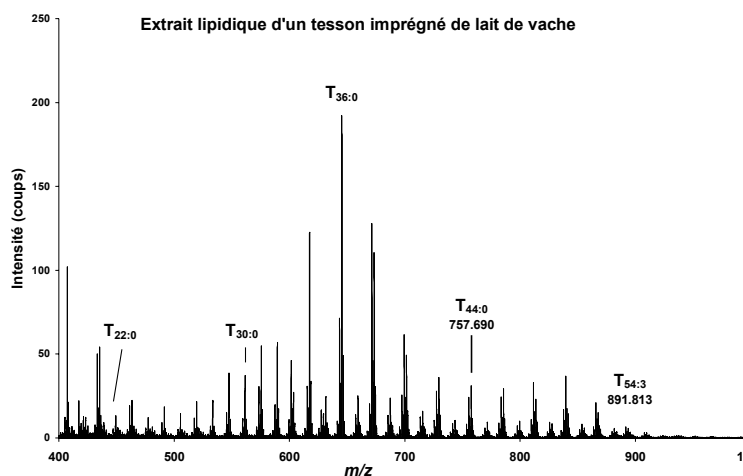
L'analyseur hybride Q-q-TOF peut être décrit comme l'addition d'un quadripôle Q1 et d'une cellule de collision q2 à un temps de vol orthogonal TOF. Ce type d'instrument a rencontré beaucoup de succès grâce à la combinaison de la simplicité d'un quadripôle avec les très bonnes performances du temps de vol. En effet, dans un appareil à triple quadripôle, le fait de scanner les ions fils dans le troisième quadripôle réduit considérablement la sensibilité et la résolution. En le remplaçant par un TOF, l'ensemble des ions fils sont analysés en parallèle {Standing 2000}. La sensibilité peut atteindre l'attomole (10^{-18} mol), la résolution peut atteindre 10 000, le domaine de masse est étendu jusqu'à 20 000 et la précision en masse est de l'ordre de 5 à 10 ppm en calibration externe {de Hoffmann & Stroobant 2005}. En mode MS simple, Q1 est utilisé en mode *RF only*, qui agit comme un guide d'ions, focalisant le faisceau et le TOF sert d'analyseur. Les qualités des spectres obtenus dépendent donc des spécifications du TOF. Dans la cellule de collision q2, la présence d'un gaz permet de refroidir en énergie cinétique les ions (refroidissement collisionnel), ce qui permet de refocaliser le faisceau d'ions autour de l'axe central, tout en diminuant le diamètre du faisceau et en homogénéisant la distribution en énergie cinétique. A l'arrivée dans l'accélérateur orthogonal, le faisceau est donc reconditionné de manière à obtenir une meilleure sensibilité et une meilleure résolution du temps de vol. L'utilisation d'un TOF orthogonal permet de coupler un TOF à une source continue d'ions {Standing 2000}.

A.3.2.1.2. Les résultats obtenus en nanoESI Q-q-TOF MS

Les échantillons analysés avec le spectromètre de masse hybride sont les extraits de tessons imprégnés de laits de vache et de chèvre biologique (set 1) et les extraits de graisses sous-cutanées de bœuf et de mouton (set 3) (Tableau 25).

Les distributions observées s'étendent de T_{24} à T_{54} pour les deux échantillons de produits laitiers (Figure 81), alors qu'elles n'étaient que de T_{28} à T_{54} en HT CPG, et de T_{32} à T_{54} en MALDI-TOF (Figure 76). Cette technique paraît plus sensible également que les autres techniques de spectrométrie de masse telles que l'APCI, qui ne permet pas de détecter les triglycérides de plus faible masse que le T_{28} {Jensen 2002; Mottram & Evershed 2001}. L'ionisation par APCI est une technique moins douce que l'ESI, dans laquelle l'ionisation se fait

par application d'une décharge électrique. Les fragmentations dans la source sont beaucoup plus nombreuses, ce qui peut expliquer la perte de sensibilité par rapport à l'ESI. La précision en masse est de l'ordre de la dizaine de ppm.



Extrait de tesson imprégné de lait de vache, nanoESI QqTOF MS, uniquement pour les pics fragmentés en MS/MS

TAG	m/z	% I	Précision ppm
T24:0	477.3728	6.32	8.23
T26:0	505.4129	7.56	9.66
T28:1	531.4444	3.71	40.68
T28:0	533.4506	11.69	21.15
T30:1	559.4714	6.09	30.96
T30:0	561.4829	19.34	21.87
T32:1	587.5051	10.33	33.57
T32:0	589.5078	29.62	9.97
T34:1	615.5257	16.10	14.65
T34:0	617.5314	63.73	2.95
T36:1	643.5526	37.09	5.80
T36:0	645.5596	100.00	7.62
T38:1	671.5745	66.51	8.43
T38:0	673.5916	57.49	6.25
T40:2	697.6057	13.31	14.18
T40:1	699.6162	31.98	6.78
T40:0	701.6295	25.71	3.41
T42:2	725.6321	5.50	6.88
T42:1	727.6468	14.57	5.55
T42:0	729.6581	18.76	0.42
T44:2	753.6618	4.26	4.50
T44:1	755.6809	12.61	9.05
T44:0	757.6905	16.14	1.04
T46:1	783.7122	12.78	8.73
T46:0	785.7252	15.19	5.33
T48:1	811.7398	17.18	3.87
T48:0	813.7598	12.01	9.20
T50:1	839.7711	19.16	3.74
T50:0	841.7876	7.52	4.75
T52:2	865.7918	10.94	9.47
T52:1	867.8030	7.81	4.32
T54:3	891.8126	3.45	14.97
T54:2	893.8211	3.02	6.94
T54:1	895.8076	1.78	25.62

Figure 81 : Spectre de masse Li^+ -nanoESI Q-q-TOF de l'extrait lipidique d'un tesson imprégné de lait de vache, et pics identifiés. [Li^+ -nanoESI Q-q-TOF mass spectrum of the total lipid extract of a potsherd impregnated with cow milk, and list of the TAG peaks identified]

Les distributions en triglycérides obtenues pour les échantillons de graisse sous-cutanée sont beaucoup plus réduites, de T_{44} à T_{54} , ce qui encore une fois montre bien le gain en sensibilité par rapport au MALDI (Figure 82 & Figure 76), technique avec laquelle le plus petit triglycéride détecté est le $T_{48:1}$.

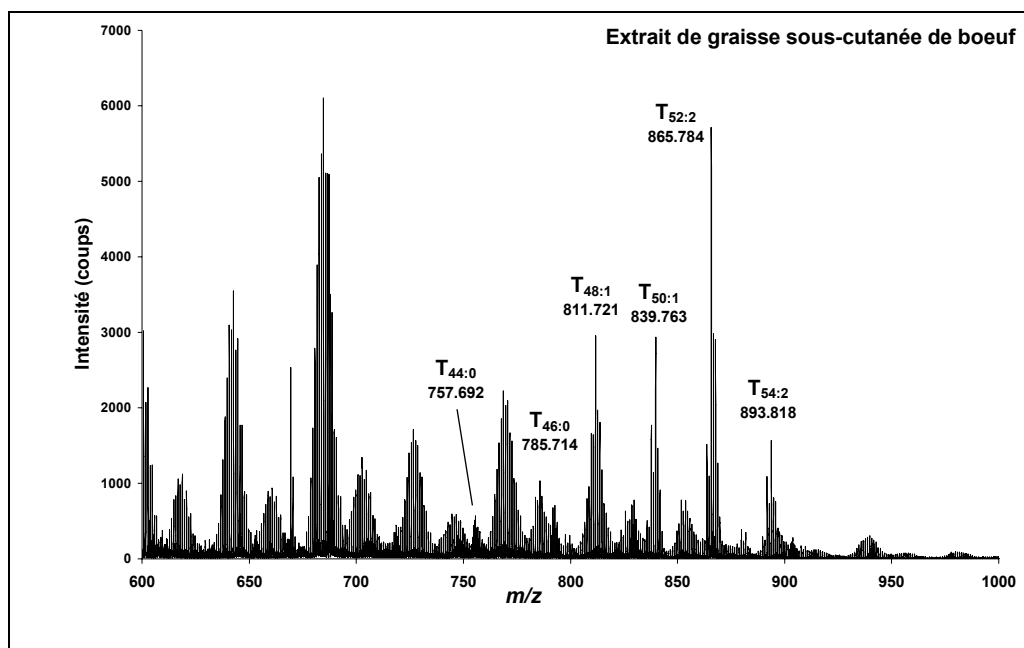


Figure 82 : Spectre de masse nanoESI Q-q-TOF de l'extrait de graisse sous-cutanée de boeuf. [Li^+ -nanoESI Q-q-TOF mass spectrum of the total lipid extract of the cow adipose fat reference sample]

L'utilisation de sels de lithium pour ioniser les triglycérides présente plusieurs avantages. La stabilité des adduits $[\text{M} + \text{Li}]^+$ ainsi formés est telle que les fragmentations dans la source sont évitées, ce qui est un gain par rapport à l'ionisation par impact électronique utilisé lors du couplage CPG/SM {Han & Gross 2001; Hsu & Turk 1999} et également par rapport à l'ionisation APCI utilisée lors du couplage HPLC/MS {Byrdwell & Emken 1995; Mottram & Evershed 2001}. L'absence de fragments permet donc l'identification des diglycérides et des triglycérides de bas m/z .

Nous avons voulu comparer la sensibilité de détection de cet analyseur avec celle d'un analyseur FT-ICR, présentant une meilleure résolution en masse que l'analyseur Q-q-TOF.

A.3.2.2. Spectrométrie de masse avec un analyseur FT-ICR

A.3.2.2.1. Le principe de l'analyseur FT-ICR

La spectrométrie de masse FT-ICR (aussi appelée FT MS) a été décrite pour la première fois en 1974, bien que le principe de la résonance cyclotronique des ions (défini ci-après) sur lequel cette technique repose ait été décrit à la fin des années 40 {Comisarow & Marshall 1974a, 1974b}. L'analyseur FT-ICR est composé d'une cellule, située à l'intérieur d'un champ magnétique homogène et élevé (à l'heure actuelle entre 7 et 9.4 T, champ commercial jusqu'à 15 T au

maximum). Cette cellule, aussi appelée piège de Penning, peut avoir différentes configurations géométriques, mais elle est toujours composée de deux électrodes de piégeage dans la direction du champ magnétique, de deux électrodes opposées (perpendiculairement au champ magnétique) d'excitation et de deux électrodes opposées de détection (perpendiculairement au champ magnétique). Une des plus importantes propriétés de l'analyseur FT ICR est sa capacité à piéger les ions sur de longues durées, notamment grâce au vide poussé qui règne dans la cellule (10^{-10} mBar). Les ions injectés dans la cellule à partir d'une source externe (nanoESI dans notre cas) sont piégés sur une trajectoire circulaire dans le champ magnétique : ce mouvement est appelé mouvement cyclotronique. La fréquence de rotation et la vitesse angulaire ne dépendent que du champ magnétique et du rapport masse sur charge m/z , et sont indépendantes de la vitesse de l'ion. Pour mesurer la fréquence des ions (et donc déterminer leur rapport m/z), ceux-ci sont excités par application d'un champ électrique oscillant entre les électrodes d'excitation. Ce champ balaye la gamme de fréquences d'intérêt, pendant un laps de temps défini, engendrant l'entrée en résonance simultanée de tous les ions contenus dans la cellule. Le rayon de l'orbite du paquet d'ions augmente, indépendamment de leur rapport m/z et tous les ions se retrouvent en phase. Cette rotation crée un courant induit entre les deux plaques de détection, et ce courant est mesuré et digitalisé en un interférogramme. La transformée de Fourier permet de transformer l'interférogramme en un spectre de fréquence qui est lui-même transformé en un spectre de masse, grâce à la relation entre le rapport m/z et la fréquence cyclotronique {Comisarow & Marshall 1974a, 1974b; Marshall 2000}. Il est très important que le vide de la cellule soit le plus poussé possible, afin de limiter les collisions entre les ions et des molécules de gaz résiduel. Sinon il peut se produire une perte de la cohérence du paquet d'ions, qui finit par ne plus induire de courant. Cela correspond à un élargissement des pics, donc une diminution de la résolution du signal. Par ailleurs, le déphasage des ions réduit le temps d'acquisition du signal. Or, plus ce dernier est long, plus le nombre d'accumulations (n) peut être grand et plus l'intensité du signal sera grande (S croît en n avec $n =$ nombre de spectres accumulés et le bruit croît en \sqrt{n}). La qualité du vide est donc un point crucial. Nous ne décrivons pas davantage cette technique complexe, mais le lecteur peut se reporter à la bibliographie pour plus de détails {de Hoffmann & Stroobant 2005; Green *et al.* 1998; Heeren *et al.* 2004; Marshall 2000; Page *et al.* 2004; Sannes-Lowery *et al.* 2004; Smith 2000}.

Les caractéristiques d'un spectromètre de masse FT MS sont les suivantes :

- résolution : Elle est indépendante en fonction du mode d'acquisition. En mode "broad band", elle dépend de la masse de départ qui fixe la fréquence d'acquisition (inversement proportionnelle à la masse) et du nombre de points qui fixe la durée d'acquisition. Elle peut

atteindre 1 million à m/z 1000. En mode hétérodyne, seul compte le nombre de points (la durée d'acquisition).

- précision en masse : elle dépend de la résolution et de la qualité de la calibration. Lorsque la calibration est externe, la précision en masse est dépendante de la charge d'espace dans la cellule, c'est-à-dire du nombre d'ions piégés (<5ppm pour m/z 500-1500). Lorsque la calibration est interne, la charge d'espace joue un rôle moins important car l'étalon est présent dans la cellule (<1 ppm pour m/z 500-1500).

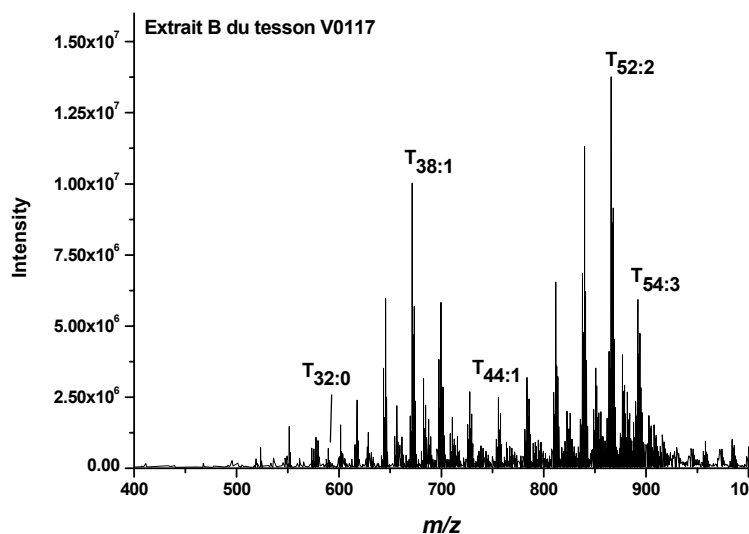
- sensibilité : elle dépend du composé analysé. A l'heure actuelle, sur un spectromètre FT-ICR 9.4 T, elle est de 100 attomoles pour du cytochrome C en couplage nanoLC.

- gamme dynamique : il est admis qu'il est difficile de mesurer avec précision la masse d'un ion présent en une teneur inférieure à 1% en nombre de l'ion le plus abondant. En quantitatif, elle ne dépasse pas 10^4 .

- gamme de masse : elle est limitée par les spécificités électroniques (digitaliseur) et électromagnétiques (inhomogénéité du champ électrique, durée d'acquisition limitante pour les signaux à basse fréquence) de l'appareil. Avec un spectromètre à 9.4 T, elle est de l'ordre de 100 kDa.

A.3.2.2.2. Les résultats obtenues en FT MS

Les échantillons analysés en FT MS sont les extraits des tessons imprégnés de lait provenant des vaches du troupeau INRA (set 2, Tableau 25). Il s'agit des extractions à $t = 0$, avant que le processus de vieillissement ne soit lancé. Le tesson V0117 contient 30 % de dégraissant (il est plus poreux), les autres tessons V0007, V0013, V0020 et V0026 n'en contiennent que 20 %. Les distributions en triglycérides s'étendent de T_{24} à T_{54} , ce qui montre une sensibilité de détection équivalente à la spectrométrie de masse DIOS (Figure 83). Néanmoins, il est délicat de détecter les pics dont l'intensité relative est inférieure à 5 % du pic le plus intense ($T_{38:1}$ dans tous les échantillons), ce qui pose un problème pour la détection des triglycérides plus petits que le $T_{32:0}$. Il est difficile de comparer ces données avec celles obtenues sur le Q-q-TOF, car ce ne sont pas les mêmes échantillons de référence qui ont été analysés. Nous avons également dopé les échantillons avec des sels de lithium, avec donc une très bonne stabilité des adduits formés, et pas de fragmentation dans la source. La précision en masse est très élevée, en moyenne égale à 2 ppm, meilleure qu'en nanoESI Q-q-TOF (plus d'une dizaine de ppm).



V0117B, nanoESI FT-ICR MS, que les pics fragmentés en MS/MS			
TAG	m/z	% I	Précision ppm
T28:0	533.4386	3.09	1.41
T30:0	561.4705	4.69	0.23
T32:1	587.4860	5.28	1.09
T32:0	589.5023	8.41	0.59
T34:1	615.5175	10.53	1.32
T34:0	617.5336	24.15	0.60
T36:2	641.5338	5.15	0.89
T36:1	643.5489	33.02	0.08
T36:0	645.5641	45.40	0.64
T38:2	669.5648	20.29	0.42
T38:1	671.5804	100.00	0.37
T38:0	673.5949	50.80	1.31
T40:3	695.5794	8.27	1.08
T40:2	697.5956	39.00	0.30
T40:1	699.6114	50.93	0.13
T40:0	701.6262	20.90	1.27
T42:2	725.6273	12.70	0.32
T42:1	727.6434	17.94	0.93
T42:0	729.6616	9.28	4.40
T44:2	753.6585	6.16	0.17
T44:1	755.6736	13.02	0.61
T44:0	757.6907	7.99	1.35
T46:1	783.7047	13.15	0.87
T46:0	785.7211	8.42	0.10
T48:2	809.7227	10.68	2.06
T48:1	811.7361	23.29	0.74
T48:0	813.7509	9.60	1.72
T50:3	835.7380	7.87	1.56
T50:2	837.7502	24.39	2.58
T50:1	839.7650	36.45	3.56
T50:0	841.7828	10.20	1.00
T52:4	861.7474	11.64	5.15
T52:3	863.7685	15.87	0.65
T52:2	865.7797	48.49	4.53
T52:1	867.7965	29.24	3.13
T52:0	869.8134	5.28	1.74
T54:5	887.7640	10.80	3.86
T54:4	889.7802	13.08	3.83
T54:3	891.7961	21.81	3.57
T54:2	893.8135	15.32	1.59
T54:1	895.8375	5.22	7.77
T54:0	897.8689	0.96	25.89

Figure 83 : Spectre de masse de l'extrait B (sans standard interne) du tesson V0117, en spectrométrie de masse nanospray FT-ICR et pics attribués. [Li^+ -nanoESI FT-ICR mass spectrum of the total lipid extract B of reference sample V0117, and list of the TAG peaks identified]

Afin de comparer les deux analyseurs, Q-q-TOF et FT-ICR, nous avons analysé un échantillon archéologique sur les deux appareils à notre disposition.

A.3.2.3. Comparaison Q-q-TOF vs FT-ICR

Il a été possible d'analyser en parallèle un échantillon archéologique sur les deux spectromètres de masse. Il s'agit de l'échantillon T1050, fractionné. Les spectres de masse de cet échantillon sont donnés en Figure 84, accompagnés d'histogrammes comparant les distributions de triglycérides détectés. On a déjà vu que la précision en masse est meilleure avec un analyseur FT-ICR. Si on compare leur sensibilité de détection, ce qu'il n'avait pas été possible de faire avec les échantillons de référence, on remarque que l'analyseur FT-ICR est beaucoup plus sensible, avec un meilleur rapport signal sur bruit. Une grande différence entre les deux spectromètres est leur source, et le mode d'injection des ions dans le spectromètre. Sur le spectromètre FT-ICR, l'injection des ions se fait par un capillaire, alors que pour le spectromètre Q-q-TOF, l'injection est directe à simple trou. Les énergies internes des ions sont donc différentes.

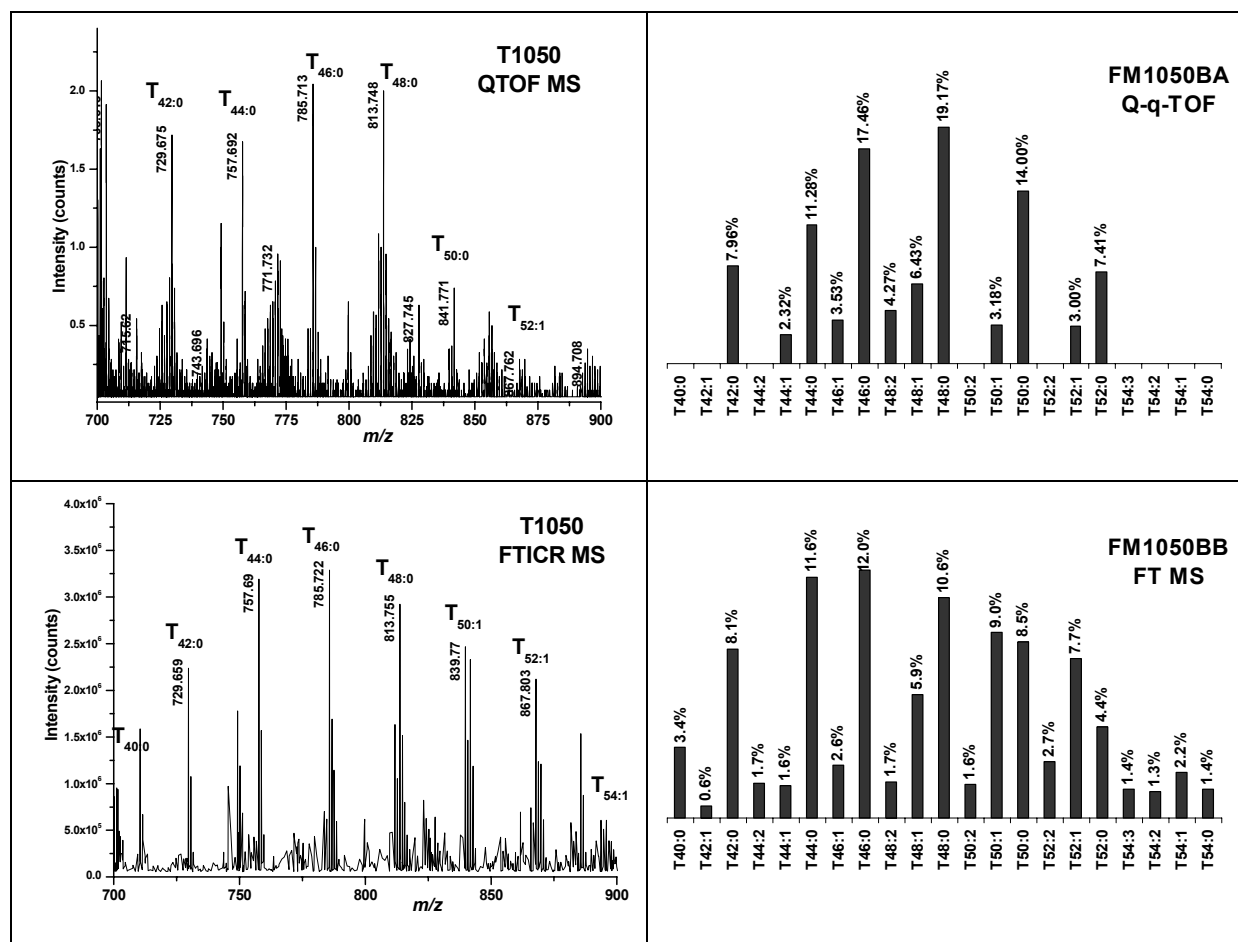


Figure 84 : Spectres de masse de l'échantillon T1050 fractionné, avec un spectromètre de masse Q-q-TOF (QStar Pulsar, Applied Biosystems) et un spectromètre de masse FT-ICR (Apex 9.4T, Bruker Daltonics) et histogrammes représentant leur composition en triglycérides. [Li⁺-nanoESI mass spectra of the fractionated archaeological sample T1050, with Q-q-TOF and FT-ICR analysers, and histograms of their TAG composition]

Après avoir déterminé la composition globale en triglycérides des échantillons de référence, nous avons procédé à l'analyse structurale de ces derniers, tout en comparant deux techniques de fragmentation, chacune relative à un des analyseurs.

A.3.3. Spectrométrie de masse tandem

La spectrométrie de masse en mode tandem, aussi appelée MS/MS est une technique mettant en œuvre deux analyses en spectrométrie de masse, avec une étape de fragmentation des ions {de Hoffmann & Stroobant 2005; Dunbar 2000; Futrell 2000; Gross 2000; Jennings 2000}.

Nous avons choisi d'évaluer le potentiel de deux techniques : la dissociation induite par collision (CID, *Collision Induced Dissociation*), mise en œuvre avec l'analyseur Q-q-TOF et la photodissociation induite par laser (IRMPD, *InfraRed MultiPhoton Dissociation*), mise en œuvre avec l'analyseur FT-ICR.

A.3.3.1. La dissociation induite par collision (CID)

Le spectromètre utilisé est pourvu d'un analyseur hybride Q-q-TOF. Après avoir été sélectionnés dans le premier quadripôle – Q1, les ions sont fragmentés par collision avec l'argon dans une cellule de collision, le deuxième quadripôle q2. Les ions fragments sont analysés dans le temps de vol – TOF {Futrell 2000; Jennings 2000}. Grâce à la présence de Li^+ , les fragmentations sont induites par la charge {Gross 2000; Han & Gross 2001; Hsu & Turk 1999}. Les notations utilisées sont tirées de l'article de Hsu et Turk, qui sont les premiers à avoir décrit les mécanismes de fragmentations en ESI MS/MS de triglycérides lithiés {Hsu & Turk 1999}. Leurs conditions d'ionisation et de fragmentation sont différentes de celles que nous avons utilisées, ce qui explique l'absence de fragmentations secondaires dans les spectres acquis au laboratoire. Nous avons en effet travaillé en nanospray et non en électrospray, et nous avons travaillé avec des énergies de collision comprises entre 20 et 50 eV, relativement plus faibles que celles utilisées par Hsu et Turk. Les spectres de fragmentation peuvent être décrits par les pertes des acides gras liés au squelette glycérol, sous forme neutre RCOOH , $[\text{M} + \text{Li} - \text{RCOOH}]^+$ et sous forme lithiée RCOOLi , $[\text{M} + \text{Li} - \text{RCOOLi}]^+$ et par la formation des ions acylium correspondants RCO^+ .

La complexité des spectres obtenus pour chaque ion parent $[\text{M} + \text{Li}]^+$ est due à la complexité initiale des mélanges de triglycérides. En effet, ces derniers sont présents sous forme d'une multitude d'isomères isobares, qui se différencient par leur composition en acides gras et leurs positions sur le glycérol. Ce dernier point n'a pas été étudié, contrairement à ce qui a été décrit dans l'article de Hsu et Turk. Il est possible de déterminer la position sur le squelette de

glycérol des acides gras, à condition d'une part de ne pas avoir de mélanges trop complexes d'isomères, et d'autre part d'avoir accès aux fragmentations secondaires, ce qui n'est pas le cas dans notre étude. Si on prend pour exemple le triglycéride $T_{40:0}$ de l'extrait de lait de vache, les acides gras $C_{4:0}$, $C_{6:0}$, $C_{8:0}$, $C_{10:0}$, $C_{12:0}$, $C_{14:0}$, $C_{16:0}$, $C_{18:0}$ et $C_{20:0}$ sont liés au glycérol (Figure 85). Ce qui signifie que plus de 10 structures sont possibles pour ce triglycéride.

Il en est de même pour le groupe de triglycérides $T_{52:2}$, qui est caractérisé par la perte des acides gras insaturés $C_{18:1}$, $C_{18:2}$ et $C_{16:1}$ en plus de celle des acides gras saturés $C_{18:0}$ et $C_{16:0}$. Mais dans ce cas, seules trois structures sont possibles, $C_{18:2}/C_{16:0}/C_{16:0}$, $C_{18:1}/C_{18:0}/C_{16:1}$ et $C_{18:1}/C_{18:1}/C_{16:0}$ (Figure 85). La première structure est certainement la majoritaire, au vu des intensités relatives des pics {Hsu & Turk 1999}.

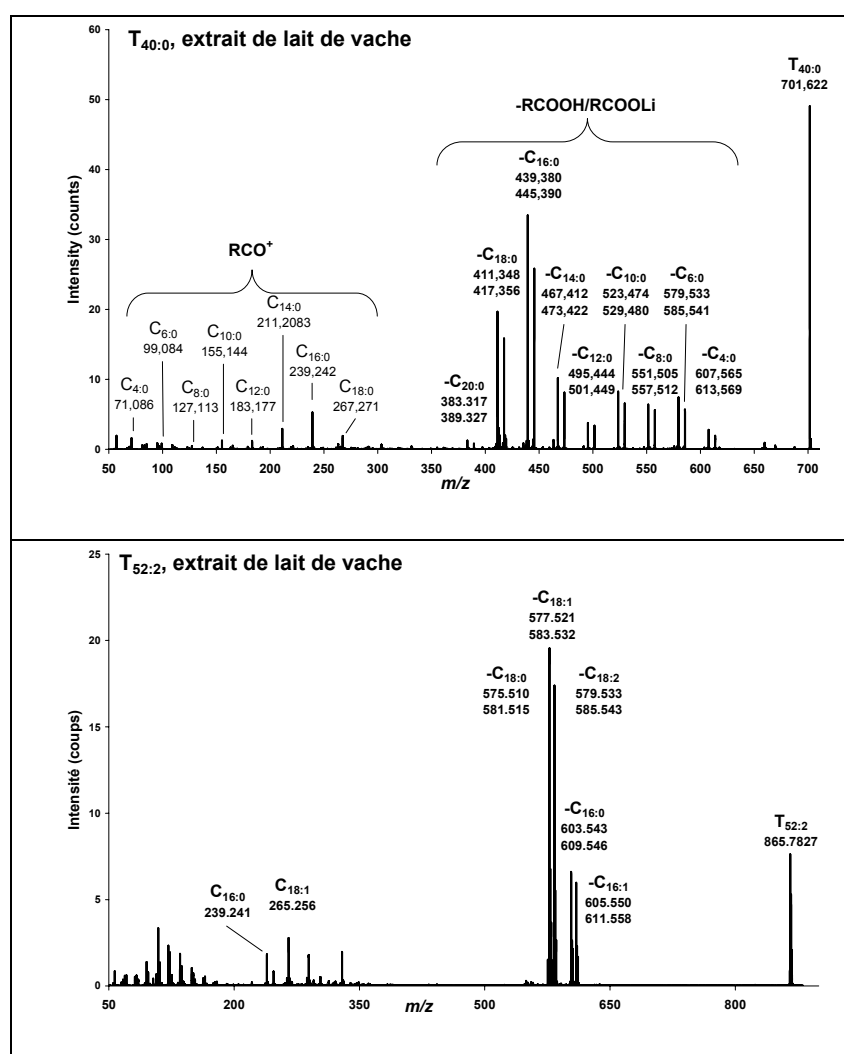


Figure 85 : Spectres de fragmentation des triglycérides $T_{40:0}$ et $T_{52:2}$ de l'extrait de lait de vache, par CID MS/MS avec un analyseur Q-q-TOF. [Li⁺-nanoESI fragmentation mass spectra of $T_{40:0}$ and $T_{52:2}$ from the total lipid extract of a potsherd impregnated with cow milk, using CID MS/MS with a Q-q-TOF analyser]

Il existe un certain nombre de techniques permettant de déterminer la composition en triglycérides des produits laitiers ou des graisses sous-cutanées. La chromatographie liquide est très souvent mise en œuvre couplée à la spectrométrie de masse à ionisation APCI {Byrdwell & Emken 1995; Dugo *et al.* 2004; Dugo *et al.* 2005; Jakab *et al.* 2002; Momchilova *et al.* 2004; Mondello *et al.* 2005; Mottram *et al.* 1997; Mottram *et al.* 2001; Mottram & Evershed 2001; Sandra *et al.* 2002; Segall *et al.* 2004; Stübiger *et al.* 2003}.

D'autres techniques peuvent être utilisées, la chromatographie liquide avec des détections autres que l'APCI MS ou encore la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse à ionisation chimique {Andrikopoulos 2002; Creamer & MacGibbon 1996; Dobson *et al.* 1995; Dudd *et al.* 1998; Evershed 1996; Février *et al.* 2001; Hlongwane *et al.* 2001; Jham *et al.* 2005; Kalo *et al.* 2003; Momchilova *et al.* 2004; Perona & Ruiz-Gutierrez 2004; Ruiz-Gutiérrez & Barron 1995; Ruiz-Sala *et al.* 1996; Schuyl *et al.* 1998; Spanos *et al.* 1995}.

L'autre méthode très couramment utilisée est l'analyse après hydrolyse (spécifique ou non) des acides gras constitutifs {Alonso *et al.* 1999; Chilliard *et al.* 2003; Chouinard *et al.* 2001; Ferlay *et al.* 2005; Hlongwane *et al.* 2001; Loor *et al.* 2005}.

Nous avons choisi de comparer nos données avec celles de Mottram *et al.*, c'est-à-dire de comparer une technique mettant en jeu une séparation préalable en HPLC suivie d'une analyse en spectrométrie de masse en mode simple APCI MS, et une technique qui ne met pas en jeu de séparation préalable en HPLC mais où l'analyse se fait par spectrométrie de masse en mode tandem nanoESI MS/MS {Mottram *et al.* 2001; Mottram & Evershed 2001}. En effet, seuls Mottram *et al.* ont étudié, avec les mêmes techniques, les produits laitiers et les graisses sous-cutanées de différentes espèces, analogues à celles qui nous intéressent. Pour plus de simplicité, nous avons choisi de comparer nos données à celles obtenues sur de la graisse sous-cutanée de bœuf dont la composition en triglycérides est beaucoup moins complexe que celle des produits laitiers. De plus, dans la présente étude, la préparation des produits laitiers n'a pas été effectuée de la même manière que dans l'étude de Mottram *et al.*, ce qui risque d'engendrer des différences de résultats non significatives entre les deux techniques. Cette équipe a en effet travaillé sur des extraits de lait, alors que nous avons travaillé sur des extraits de tessons imprégnés de lait, l'imprégnation pouvant induire une certaine dégradation de la composition en triglycérides. Ce problème ne se pose pas pour les graisses sous-cutanées, qui ont été préparées de manière analogue dans les deux études.

Si l'on compare les triglycérides détectés en HPLC APCI MS et en nanoESI MS/MS (Tableau 26), on remarque que la spectrométrie de masse tandem est beaucoup plus sensible, malgré l'absence de séparation préalable en HPLC {Mottram *et al.* 2001}. Le nombre d'espèces potentielles par groupe de triglycérides de même m/z détectées par nanoESI MS/MS est bien plus

élevé, de même que le nombre de triglycérides. Il subsiste quelques différences, certains triglycérides détectés par HPLC APCI MS ne sont pas détectés en nanoESI MS/MS, sans que cela soit expliqué. Nous avons comparé uniquement les données obtenues pour les triglycérides dits pairs, c'est-à-dire dont la somme des atomes de carbone des acides gras est paire (Tableau 26).

Graisse sous-cutanée de bœuf, extraction au chloroforme/méthanol (2:1 v/v)								
HPLC APCI MS			nanoESI MS/MS					
		T _{44:1}	MyMyPo					
		T _{44:0}	MyMyP					
		T _{46:2}	MyPoPo	MxPoP	MxMyO			
	MyPoP	T _{46:1}	MyPoP	MxPP	12PO	12PoS		
		T _{46:0}	MyPP	12PS				
	PoMyO	T _{48:3}						
	PMxO	T _{48:2}	PMxO	LPMY	PoPoP	OPoMy		
PMoS	MyOP	T _{48:1}	MyOP	SPoMy	PPPo			
PMyS	PPP	T _{48:0}	PPP	PMyS				
		T _{50:3}	PoPoO	LPoP	OLMy	OOMx	SLMx	
	PPoO	T _{50:2}	PPoO	PoPoS	PPL	MyOO	MxOS	MySL
PPoS	POP	T _{50:1}	POP	PPoS	OSMy			
	PPS	T _{50:0}	PPS	SSMy				
	PLLn	T _{52:5}						
	PLnO	T _{52:4}						
OPL	OOPo	T _{52:3}	OOPo	OPL	LSPo			
	OPO	T _{52:2}	OPO					
MoSS	POS	T _{52:1}	POS					
	SPS	T _{52:0}	SPS					
LLS	OLO	T _{54:4}	LLS	OLO				
	OOO	T _{54:3}	OOO	LOS				
	OSO	T _{54:2}	OSO					
POA	SOS	T _{54:1}	SOS					
SPA	SSS	T _{54:0}	SSS					
	Total	Espèces en commun	Total					
	27	20	49					

Tableau 26 : Comparaison entre les espèces de triglycérides détectées par HPLC APCI MS {Mottram *et al.* 2001} et celles détectées par nanoESI MS/MS (les positions sur le squelette de glycérol ne sont pas indiquées). Les abréviations correspondent aux acides gras: My acide myristique C_{14:0}; Mx acide myristoléique C_{14:1}, P acide palmitique C_{16:0}, Po acide palmitoléique C_{16:0}, S acide stéarique C_{18:0}, O acide oléique C_{18:1}, L acide linoléique C_{18:2}, Ln acide linoléique C_{18:3}, A acide arachidique C_{20:0}. [Comparison of the triacylglycerol species detected in cow adipose fat, by HPLC APCI MS and nanoESI MS/MS (the position on the fatty acids on the glycerol backbone are not indicated)]

Cet article présente certaines incohérences dans les tableaux rapportant la structure des triglycérides détectés et la quantité relative de ces derniers {Mottram *et al.* 2001}. Le triglycéride T_{54:1} de formule POA (C_{16:0}/C_{18:1}/C_{20:0}) est détecté pour la graisse de bœuf dans le tableau qualitatif mais ne l'est pas dans le tableau quantitatif. De plus, certaines de leurs abréviations ne

sont pas expliquées. Ainsi, à plusieurs reprises l'acide gras Mo apparaît dans les formules, or il n'existe que des Po (C_{16:1}), My (C_{14:0}), Mx (C_{14:1}) et éventuellement Ma (C_{17:0}). Les formules brutes des triglycérides n'étant pas indiquées, il est difficile de remonter à la structure exacte. Nous indiquons dans le Tableau 26 ci-après ces triglycérides en gras, sur la même ligne que les triglycérides auxquels ils semblent correspondre.

L'HPLC APCI MS permet d'identifier les structures des triglycérides et particulièrement la position des acides gras sur le glycérol, ce qui n'est pas possible avec la nanoESI MS/MS dans notre cas particulier d'étude. Mais dans un but de discrimination des graisses sous-cutanées et des produits laitiers, ainsi que d'identification de l'espèce d'origine, on verra qu'un tel degré de connaissance de la structure des triglycérides n'est pas nécessaire. Un autre avantage de l'HPLC APCI MS est qu'elle permet de quantifier les triglycérides détectés, ce que ne permet pas de faire la nanoESI MS/MS. En effet, les phénomènes d'ionisation par électrospray peuvent être très discriminants suivant les molécules ionisées. Cependant, dans le cadre de notre étude, tous les échantillons sont analysés en chromatographie en phase gazeuse avec ajout d'un standard interne ce qui permet de quantifier les lipides extraits de manière rapide. En effet, le détecteur à ionisation de flamme (FID, *Flame Ionisation Detector*), le plus couramment utilisé, est universel et sa réponse est linéaire, proportionnelle à la quantité de composé détecté.

L'analyse en spectrométrie de masse tandem par CID permet donc d'obtenir un certain nombre de données structurales, sans pour autant remonter à la structure exacte de chaque triglycéride. Mais pour ce qui est de discriminer les graisses animales entre elles et de déterminer leur espèce d'origine, le trop grand nombre de données qu'engendrerait la connaissance de la structure de chaque triglycéride n'apporterait pas forcément d'indices supplémentaires, tout en noyant les informations utiles. Nous avons tout de même cherché à comparer cette technique avec la photodissociation induite par laser.

A.3.3.2. La photodissociation induite par laser (IRMPD)

Dans le mode de dissociation par IRMP, le gaz de collision est remplacé par un faisceau de protons, provenant d'un laser infrarouge (Figure 86) {Dunbar 2000; Futrell 2000}.

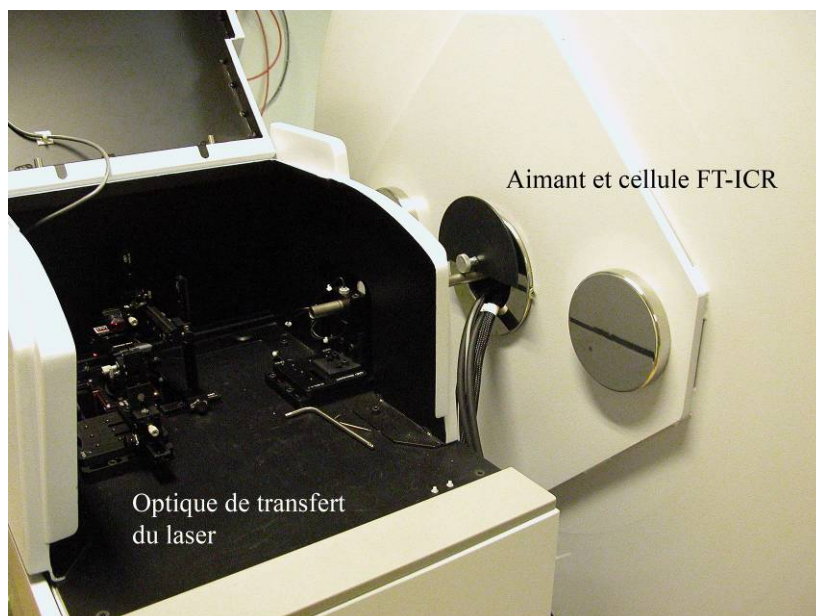


Figure 86 : Photo de l'optique de transfert du laser à l'intérieur de la cellule ICR pour la fragmentation par IRMPD. [Transfer line between the infrared laser and the ICR cell, for the IRMPD MS/MS mode]

Les fragmentations induites par IRMPD (*Infra-Red MultiPhoton Dissociation*, associée à l'analyseur FT-ICR) sont beaucoup plus douces que celles obtenues en CID (*Collision Induced Dissociation*, associée à l'analyseur Q-q-TOF), et seuls les pics correspondant à la perte des acides gras neutres sont visibles (Figure 87).

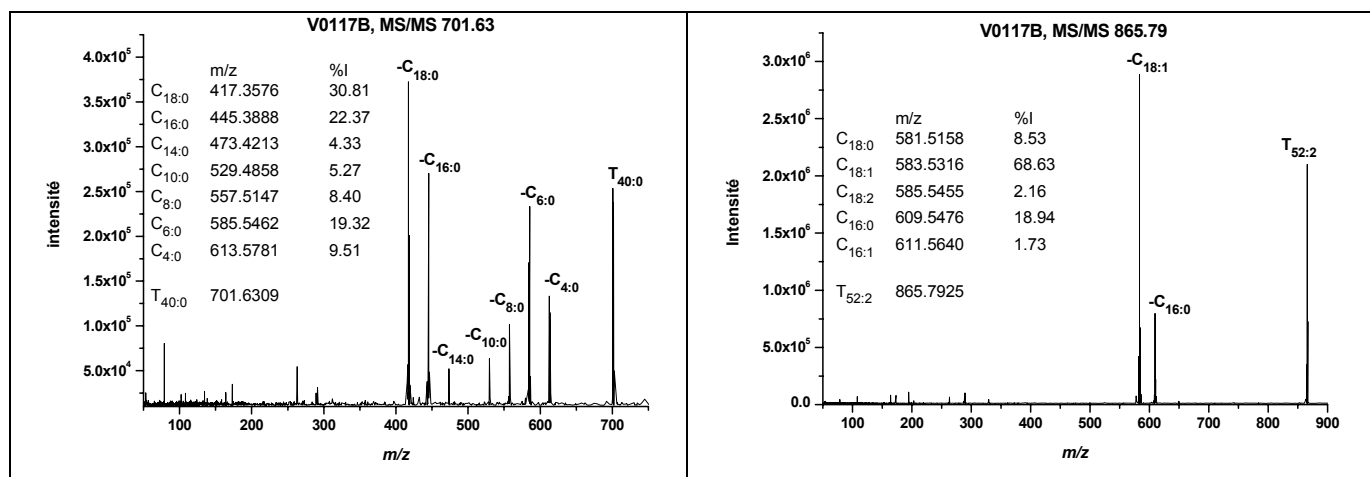


Figure 87 : Spectres de fragmentation des ions m/z 701.63 ($T_{40:0}$) et m/z 865.79 ($T_{52:2}$) de l'extrait du tesson V0117B, en nanoESI IRMPD FT-ICR MS/MS. [Li^+ -nanoESI IRMPD FT-ICR fragmentation mass spectra of ions at m/z 701.63 ($T_{40:0}$) and m/z 865.79 ($T_{52:2}$) of the total lipid extract B of reference sample V0117]

La composition des triglycérides est toujours aussi complexe, avec pour le triglycéride saturé $T_{40:0}$, 8 acides gras constitutifs, et pour le triglycéride insaturé $T_{52:2}$, 5 acides gras constitutifs. Si on compare ces spectres de fragmentation avec ceux obtenus par CID, on note le

gain en simplicité évident pour l'IRMPD. Toutefois, si les spectres sont ainsi plus faciles à interpréter, ils sont également moins informatifs.

S'il est évident que l'analyseur FT-ICR est plus performant que l'analyseur Q-q-TOF, il reste néanmoins plus complexe d'utilisation et les paramètres à régler sont encore trop nombreux pour permettre une utilisation en routine sur des échantillons aussi complexes et dégradés que les échantillons archéologiques. Nous avons donc choisi de mettre au point les critères de discrimination des graisses animales avec l'analyseur Q-q-TOF, en utilisant la spectrométrie tandem par CID et d'analyser ainsi les échantillons archéologiques. Pour caractériser la variabilité de ces critères, nous avons néanmoins préféré utiliser l'analyseur le plus sensible et le mieux résolu, afin de déterminer le plus finement possible les éventuelles dispersions. La simplicité des spectres de fragmentation est aussi un point positif pour l'interprétation d'un grand nombre de données.

B. Critères de discrimination des graisses animales

A l'heure actuelle, la caractérisation des produits laitiers se fait en partie par identification de leur composition globale en acides gras {Agabriel *et al.* 2004; Alonso *et al.* 1999; Creamer & MacGibbon 1996; Ferlay *et al.* 2005; Gresti *et al.* 1993; Jensen 2002; O'Brian 1999; Palmquist *et al.* 1993}. Une autre approche est la caractérisation de la composition en triglycérides par chromatographie liquide, couplée ou non à la spectrométrie de masse {Gresti *et al.* 1993; Jensen 2002; Mottram & Evershed 2001; O'Brian 1999; Ruiz-Sala *et al.* 1996; Siciliano *et al.* 2000; Spanos *et al.* 1995}. Cependant, la première de ces méthodes n'est pas suffisamment spécifique pour identifier les graisses animales dégradées et la seconde est complexe à mettre en œuvre pour ce type d'échantillons. Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, l'analyse en spectrométrie de masse tandem, sans couplage à la chromatographie liquide est très prometteuse pour la caractérisation structurale des triglycérides. Nous avons donc cherché à déterminer des critères basés à la fois sur la composition en triglycérides et sur leur structure déterminée par spectrométrie de masse et spectrométrie de masse tandem. La technique analytique choisie, nanoESI Q-q-TOF MS et MS/MS est relativement simple à mettre en œuvre et montre un très grand potentiel pour l'obtention de données structurales pertinentes.

Nous nous sommes basés sur les distributions en acides gras obtenues pour chaque triglycéride, à partir des spectres de fragmentation CID. Nous avons tracé des courbes représentant l'intensité relative des pics $[M + Li - RCOOLi]^+$ en fonction de l'acide gras perdu, pour chaque groupe de triglycérides isobares, afin de les comparer entre elles. L'intensité des pics est en effet liée à la fois à la structure des triglycérides et à la quantité de l'isomère en question bien que la part de chaque contribution ne soit pas quantifiable {Hsu & Turk 1999}. Les courbes obtenues pour le triglycéride $T_{40:0}$ des échantillons de lait de vache et de lait de chèvre sont présentées en Figure 88, en parallèle des courbes obtenues pour le triglycéride $T_{52:2}$ des quatre échantillons de référence.

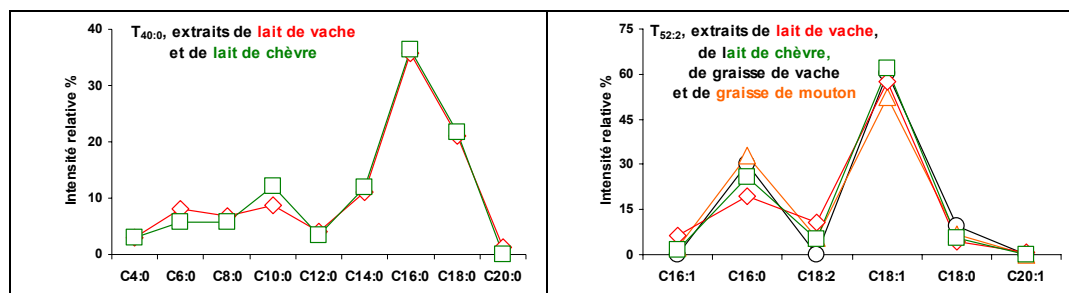


Figure 88: Courbes traçant les intensités relatives des pics de perte des acides gras lithiés pour les triglycérides $T_{40:0}$ et $T_{52:2}$ des échantillons de référence, en nanoESI CID MS/MS. [Graph of the relative intensities of the $[M + Li - RCOOLi]^+$ peaks vs RCOOLi, for TAGS $T_{40:0}$ and $T_{52:0}$ from the total lipid extracts of reference samples, by nanoESI CID MS/MS]

Nous avons répété le même raisonnement avec tous les triglycérides, afin de comparer entre eux les différents échantillons de référence. Nous avons ainsi pu obtenir des critères de discrimination pour les graisses de bovinés (graisse sous-cutanée et produits laitiers), pour les produits laitiers de différentes espèces (vache et chèvre) et pour les graisses sous-cutanées de différentes espèces (bœuf et mouton).

B.1. Lait vs graisse sous-cutanée de bovidé

Nous avons tout d'abord comparé les résultats obtenus pour les triglycérides saturés des extraits de lait et de graisse sous-cutanée de vache. Comme nous l'avons vu précédemment, la distribution en triglycérides est beaucoup plus étroite dans la graisse sous-cutanée, T_{44} à T_{54} que dans le lait, T_{22} à T_{54} . Si on compare leurs triglycérides communs, de $T_{44:0}$ à $T_{50:0}$, seules les distributions en acides gras des $T_{44:0}$ et $T_{46:0}$ sont discriminantes (Figure 89).

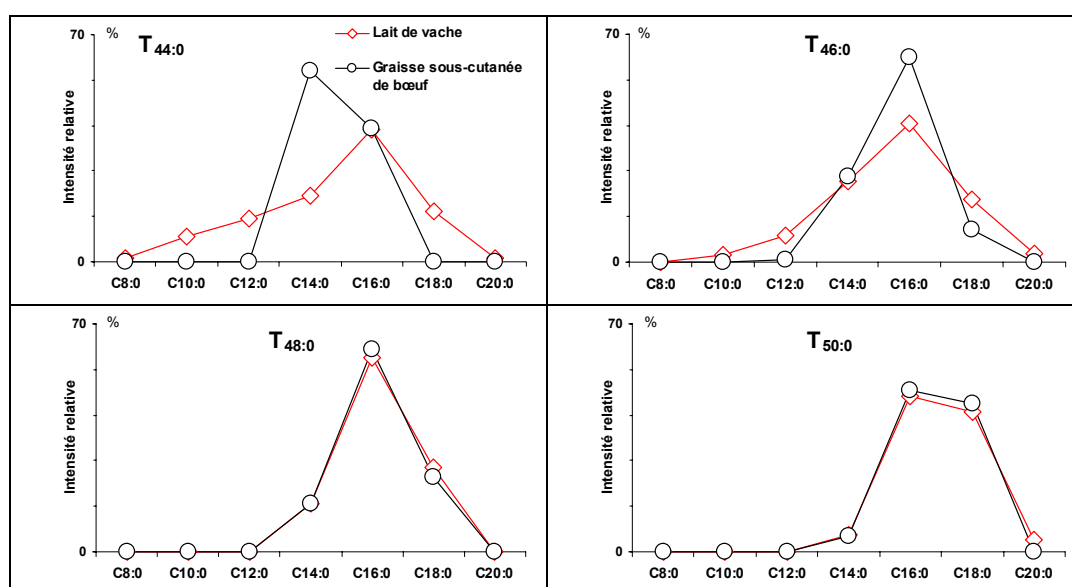


Figure 89 : Courbes de distributions des acides gras pour les triglycérides saturés des extraits de lait de vache et de graisse sous-cutanée de bœuf, données obtenues en Li^+ -nanoESI CID MS/MS. [Fatty acid distribution curves of saturated TAGs from the total lipid extracts of cow adipose fat and the potsherd impregnated with cow milk, data obtained by Li^+ -nanoESI CID MS/MS]

En effet, le $T_{44:0}$ de la graisse sous-cutanée ne contient que les acides $C_{14:0}$ et $C_{16:0}$ (une seule formule $C_{14:0}/C_{14:0}/C_{16:0}$) alors que les $T_{44:0}$ du lait de vache contiennent tous les acides gras pairs de $C_{8:0}$ à $C_{20:0}$. De la même manière, les $T_{46:0}$ de la graisse sous-cutanée de vache sont composés de 4 acides gras, $C_{12:0}$, $C_{14:0}$, $C_{16:0}$ et $C_{18:0}$ alors que l'extrait de lait contient tous les acides gras pairs de $C_{10:0}$ à $C_{20:0}$ (Figure 89). Les autres triglycéride, $T_{48:0}$ et $T_{50:0}$ sont beaucoup moins discriminants, les distributions en acides gras sont les mêmes et les intensités relatives sont également similaires Figure 89. Ils ne peuvent donc pas être utilisés pour différencier ces deux

types de graisses. Les triglycérides $T_{52:0}$ n'ont pas été détectés dans le lait de vache. Les $T_{54:0}$ n'ont, quant à eux, été détectés dans aucune des deux références, mais ils ne sont généralement constitués que de 2 acides gras, $C_{16:0}$ et $C_{18:0}$, avec parfois du $C_{20:0}$, ce qui limite le nombre de structures possibles et donc le nombre de points de comparaison.

La composition en triglycérides insaturés est beaucoup plus complexe pour l'extrait de lait. Si on compare les triglycérides en commun, certains sont très discriminants, comme le $T_{44:1}$, le $T_{46:1}$ et le $T_{48:1}$, alors que d'autres ne le sont pas, $T_{50:1}$, $T_{52:1}$ et $T_{54:1}$ (Figure 90). Les triglycérides poly-insaturés en commun ($T_{52:2}$, $T_{54:2}$ et $T_{54:3}$) ne sont pas du tout discriminants. Cela s'explique aussi par le peu de structures possibles pour ces composés.

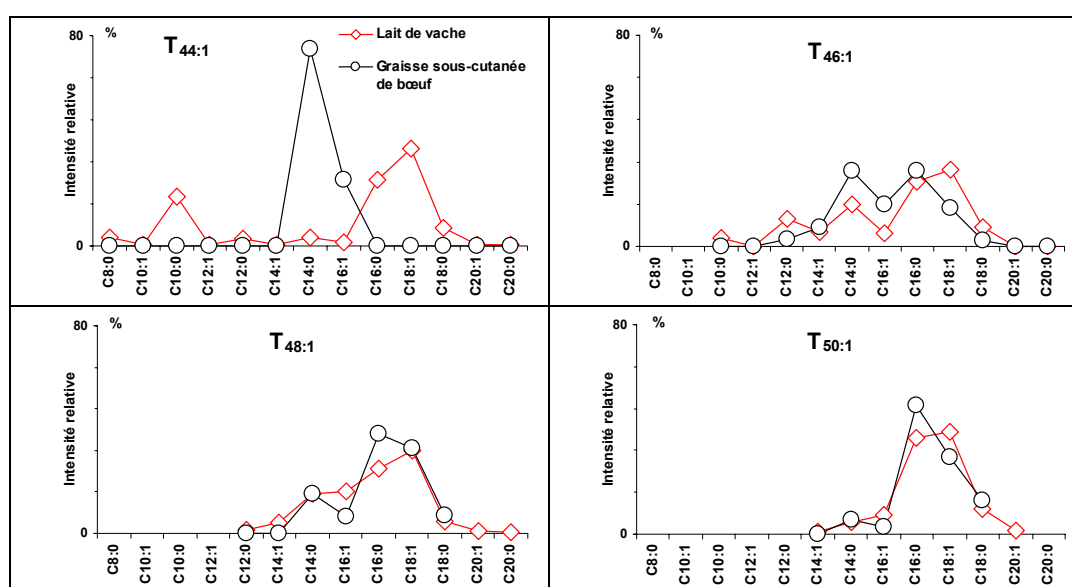


Figure 90 : Courbes de distribution des acides gras des triglycérides insaturés des extraits de lait et de graisse sous-cutanée de bovidé, données obtenues en Li^+ -nanoESI CID MS/MS. [Fatty acid distribution curves of unsaturated TAGs from the total lipid extracts of cow adipose fat and the potsherd impregnated with cow milk, data obtained by Li^+ -nanoESI CID MS/MS]

Les données obtenues sur les triglycérides insaturés, si elles permettent de discriminer les graisses sous-cutanées des produits laitiers, ne seront probablement pas exploitables dans le cas des graisses dégradées, car ce sont des composés très sensibles à la dégradation, qui sont donc susceptibles d'avoir disparu.

B.2. Différenciation des espèces

Nous avons suivi le même cheminement pour comparer les espèces entre elles, tout d'abord les produits laitiers de vache et de chèvre, puis les graisses sous-cutanées de vache et de mouton. Nous ne décrivons que les triglycérides ayant des distributions en acides gras suffisamment discriminantes.

B.2.1. Les extraits de tessons imprégnés de lait

Pour les produits laitiers, tous les triglycérides saturés ont la même composition en acides gras, seules les intensités relatives changent. Il est intéressant de noter que l'intensité de l'acide caprique C_{10:0} est toujours supérieure pour les produits laitiers de chèvre par rapport aux produits laitiers de vache (Figure 91). Ceci est en accord avec les données de la littérature {Creamer & MacGibbon 1996; Gresti et al. 1993; Jensen 2002; Ruiz-Sala et al. 1996} et permet de confirmer un lien entre les intensités des pics et la quantité d'isomère (donc d'acide gras) présent dans le mélange. Les deux acides C_{12:0} et C_{14:0} ont, quant à eux, des intensités plus faibles pour les triglycérides du lait de chèvre. Certains triglycérides ont des compositions différentes en fonction de l'espèce, ce qui est le cas des T_{24:0}, T_{26:0}, T_{28:0}, T_{32:0}, T_{34:0}, T_{44:0}, T_{46:0} et T_{48:0} (Figure 91).

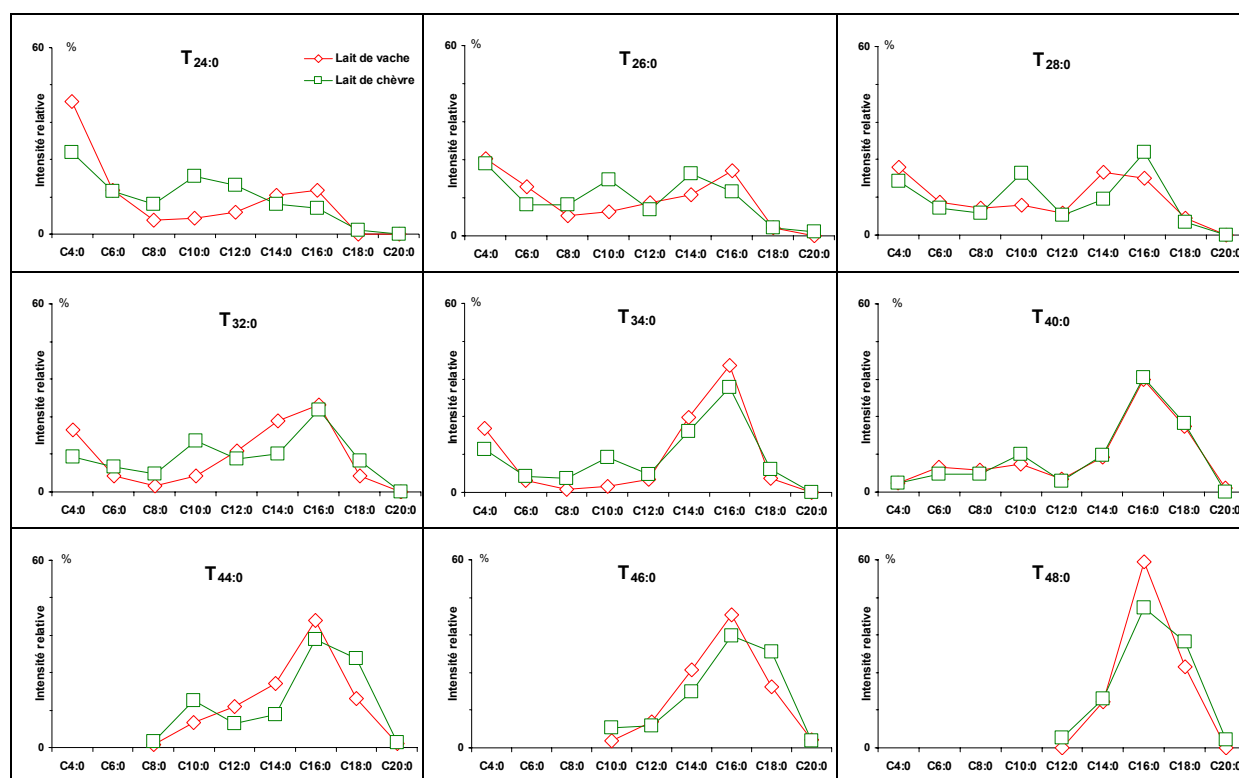


Figure 91 : Courbes de distribution des acides gras pour des triglycérides saturés extraits de tessons imprégnés de lait de vache et de lait de chèvre à partir des données nanoESI CID MS/SM. [Fatty acid distribution curves of saturated TAGs from the total lipid extracts of potsherds impregnated with cow and goat milks reference samples, data obtained by Li⁺-nanoESI CID MS/MS]

Les courbes de distributions en acides gras des autres triglycérides détectés, T_{30:0}, T_{36:0}, T_{38:0}, T_{40:0}, T_{42:0} et T_{50:0} ne sont pas discriminantes, comme on peut le voir en Figure 91 pour le T_{40:0}. Il reste à déterminer la variabilité intraspécifique, pour un ensemble de laits provenant d'une même espèce et d'une même race, des courbes de distribution en acides gras.

La majorité des triglycérides mono-insaturés ne présentent pas de différences majeures de composition (Figure 92).

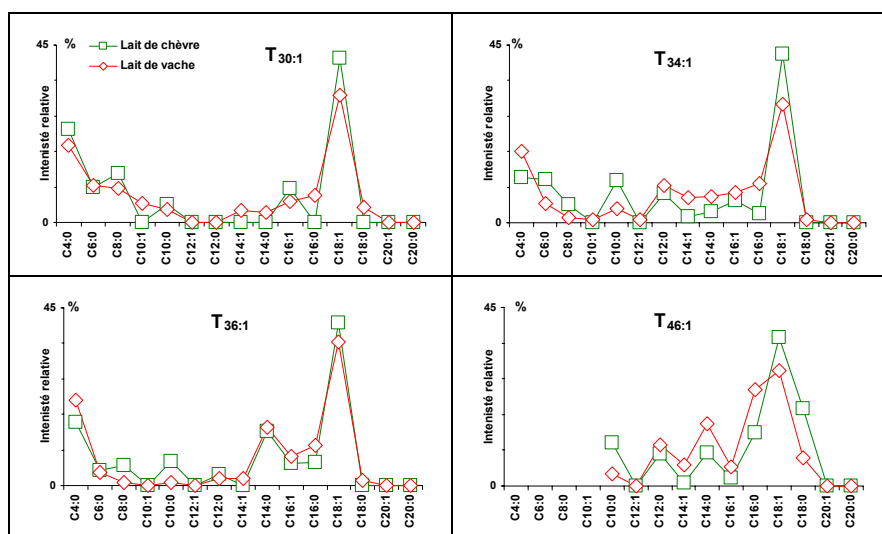


Figure 92 : Courbes de distributions des acides gras pour des triglycérides insaturés des extraits de tessons imprégnés de lait de vache et de lait de chèvre obtenues à partir des données Li^+ -nanoESI CID MS/MS. [Fatty acids distribution curves of some unsaturated TAGs from the total lipid extracts of potsherds impregnated with cow and goat milks reference samples, data obtained by Li^+ -nanoESI CID MS/MS]

On peut tout de même noter que l'intensité des pics de $\text{C}_{10:0}$ est plus élevée pour le lait de chèvre que pour le lait de vache. Les triglycérides discriminants sont le $\text{T}_{34:1}$ et le $\text{T}_{46:1}$, les différences observées sur les autres triglycérides, $\text{T}_{30:1}$ à $\text{T}_{32:1}$, $\text{T}_{36:1}$ à $\text{T}_{44:1}$ et $\text{T}_{48:1}$ à $\text{T}_{54:1}$, ne semblent pas suffisamment importantes pour être utilisées (Figure 92). Les triglycérides di et tri-insaturés ne sont, quant à eux pas, du tout discriminants.

B.2.2. Les extraits de graisses sous-cutanées

En dernier lieu, nous avons comparé les graisses sous-cutanées de deux espèces, boeuf et mouton. Les distributions en triglycérides sont relativement étroites, de T_{44} à T_{54} , ce qui limite les possibilités de comparaison. Les extraits des graisses sous-cutanées de ces deux espèces sont composés des mêmes triglycérides, $\text{T}_{44:0}$ à $\text{T}_{52:0}$ pour les composés saturés, $\text{T}_{44:1}$ à $\text{T}_{54:1}$ pour les composés mono-insaturés, $\text{T}_{46:2}$ à $\text{T}_{54:2}$ pour les di-insaturés et enfin, $\text{T}_{50:3}$ à $\text{T}_{54:3}$ et $\text{T}_{54:4}$ pour les poly-insaturés. Proportionnellement au nombre de composés, peu de triglycérides sont discriminants. Seuls deux triglycérides saturés, $\text{T}_{44:0}$ et $\text{T}_{46:0}$, deux mono-insaturés, $\text{T}_{44:1}$ et $\text{T}_{46:1}$ et deux di-insaturés, $\text{T}_{46:2}$ et $\text{T}_{48:2}$ sont discriminants (Figure 93). Les compositions en acides gras des triglycérides extraits de graisse sous-cutanée de bœuf sont moins complexes que celles des acides gras des triglycérides extraits de la graisse de mouton. Ceci peut s'expliquer de différentes manières. Tout d'abord par leur alimentation respective, celle-ci jouant un certain rôle dans la

biosynthèse des acides gras. Cependant, ce rôle n'est pas aussi important que dans le cas des produits laitiers. Les mécanismes de digestion peuvent aussi être à l'origine de ces différences, mais là encore, sans que cela ne joue de rôle prépondérant car ce sont deux espèces de ruminants.

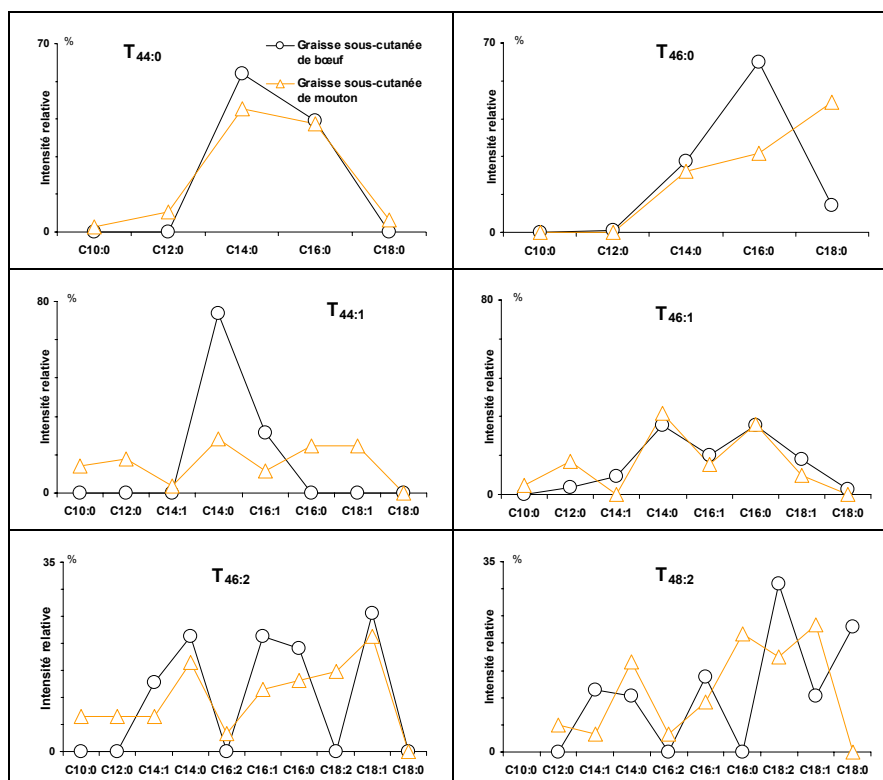


Figure 93 : Courbes de distribution des acides gras pour les triglycérides discriminants des extraits de graisses sous-cutanées de bœuf et de mouton, obtenues à partir des données Li⁺-nanoESI CID MS/MS. [Fatty acids distribution curves of discriminating TAGs from the total lipid extracts of cow and sheep adipose fats, data obtained by Li⁺-nanoESI CID MS/MS]

Les comparaisons des courbes de distribution en acides gras des différents triglycérides extraits de laits et de graisses sous-cutanées de différentes espèces montrent qu'il existe bien des différences discriminantes. Ces différences peuvent être utilisées pour la discrimination des graisses animales (graisses sous-cutanées vs. produits laitiers) et l'identification de leur espèce (boviné vs. capriné/oviné), à partir de leur distribution en triglycérides et de la composition en acides gras de chaque groupe de triglycérides (Tableau 27).

Triglycérides	Lait vs. Graisse sous-cutanée de bovidé	Lait de vache vs. Lait de chèvre	Graisse sous-cutanée de bœuf vs. Graisse sous-cutanée de mouton
Saturés	T _{44:0} T _{46:0}	T _{24:0} T _{26:0} T _{28:0} T _{32:0} T _{34:0} T _{44:0} T _{46:0} T _{48:0}	T _{44:0} T _{46:0}
Mono-insaturés	T _{44:1} T _{46:1} T _{48:1}	T _{34:1} T _{46:1}	T _{44:1} T _{46:1}
Poly-insaturés			T _{46:2} T _{48:2}

Tableau 27 : Liste des triglycérides discriminants des graisses animales. [Animal fats discriminating TAG species]

On peut remarquer que certains triglycérides sont discriminants, à la fois du type de graisse et de l'espèce. Il s'agit des triglycérides saturés T_{44:0} et T_{46:0} et du triglycéride insaturé T_{46:1}. Ces données ont été publiées dans *Analytical Chemistry*, et la copie de l'article est donné en annexe {Mirabaud *et al.* 2007}.

Nous nous sommes ensuite attachés à tester la variabilité des courbes de distribution des acides gras des triglycérides extraits de tessons imprégnés de lait de vache, avant de suivre les conséquences du vieillissement sur ces courbes.

C. Stabilité des critères de discrimination en fonction de l'espèce

Nous avons montré dans le paragraphe précédent qu'il était possible de différencier les graisses sous-cutanées des produits laitiers et de déterminer l'origine spécifique de ces graisses à partir de la distribution en acides gras de leurs triglycérides constitutifs. Nous avons voulu tester la variabilité de la composition en triglycérides et en acides gras constitutifs au sein d'un troupeau de vache, de la même race, nourries à l'herbe sans complément alimentaire (set 2, Tableau 25). Pour cela nous avons analysé des extraits de tessons imprégnés du lait de 4 vaches élevées dans un troupeau de l'INRA, ainsi que le lait du tank (ensemble des laits du troupeau). Les échantillons de référence correspondent au temps $t = 0$ du processus de vieillissement, extraits des tessons juste après l'imprégnation. Il s'agit des extraits B, ne contenant pas de standard interne. Les échantillons n'ont pas été fractionnés, car ils ne contiennent pas de standard interne et sont majoritairement composés de triglycérides, comme nous avons pu le noter en chromatographie en phase gazeuse haute température. Comme nous l'avons indiqué à la fin du paragraphe A, nous avons choisi d'analyser ces échantillons par nanoESI MS et MS/MS, avec un analyseur FT-ICR, car cette technique, bien que plus délicate à mettre en œuvre que la spectrométrie de masse nanoESI Q-q-TOF, est plus sensible. En réalité, le spectromètre de masse Q-q-TOF est plus sensible en terme de quantité de matière minimale, mais l'analyseur FT-ICR permet d'accumuler des données sur de longues période et donc d'obtenir un meilleur signal. La spectrométrie de masse tandem a été faite par IRMPD, ce qui nous a permis d'obtenir des spectres de fragmentation simplifiés, plus simples à interpréter. Si les résultats obtenus ne sont pas directement comparables avec ceux obtenus en nanoESI Q-q-TOF CID MS/MS, les conclusions quant à la variabilité des critères de discrimination établis précédemment restent valables.

Nous avons donc tracé les distributions en acides gras pour chaque groupe de triglycérides à un m/z donné, pour chacun des 5 échantillons, afin de les comparer entre eux. Nous avons choisi les pics correspondant à la perte des acides gras sous forme neutre, qui sont les seuls visibles avec ce mode de fragmentation (Figure 94).

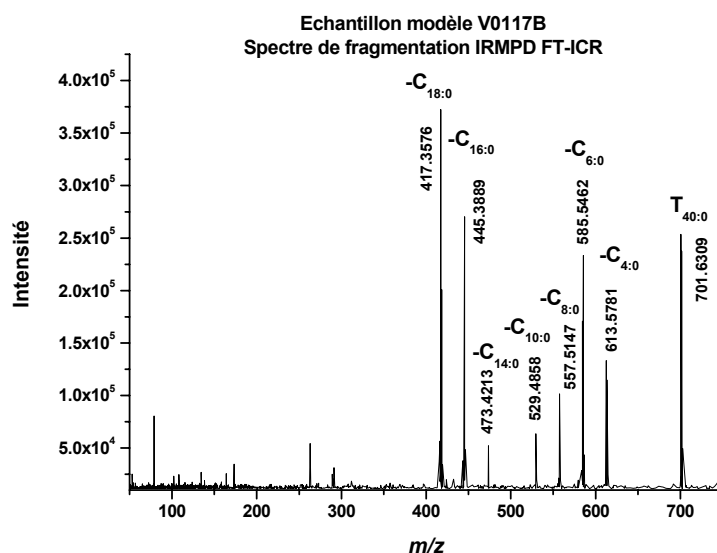


Figure 94 : Spectre de fragmentation obtenue en Li^+ -nanoESI FT-ICR IRMPD MS/MS du pic m/z 701.63, $T_{40:0}$, de l'échantillon V0117B. [Li^+ -nanoESI IRMPD FT-ICR fragmentation spectrum of peak at m/z 701.63, $T_{40:0}$, sample V0117B]

Nous avons comparé les courbes obtenues avec une courbe calculée à partir des moyennes des données de ces 5 échantillons. Pour les triglycérides saturés, les plus petits triglycérides fragmentés $T_{26:0}$ et $T_{28:0}$ présentent des distributions qui varient d'un échantillon à un autre, en particulier pour les acides gras $C_{8:0}$, $C_{10:0}$, $C_{12:0}$, $C_{14:0}$ et $C_{18:0}$ (Figure 95). Les échantillons que nous analysons sont extraits de tessons imprégnés, il est donc probable que l'hydrolyse ait déjà commencé. Or les triglycérides qui s'hydrolysent le plus facilement et le plus rapidement sont justement les triglycérides de faible poids moléculaire, et les acides gras libérés par cette hydrolyse sont ceux présentant le moins d'encombrement stérique, c'est-à-dire ceux à plus courte chaîne. Cela explique donc que les plus petits triglycérides détectés présentent des différences de composition, le taux d'hydrolyse pouvant être différent pour chaque échantillon. Pour tous les autres triglycérides, de $T_{30:0}$ à $T_{54:0}$, les distributions sont très similaires entre elles, sauf pour quelques cas particuliers non expliqués comme l'échantillon V0013 du $T_{32:0}$ et du $T_{36:0}$, l'échantillon V0020 du $T_{48:0}$ et l'échantillon V0117 du $T_{50:0}$ et du $T_{52:0}$. Les courbes obtenues sont données sur la Figure 95. Les écarts à la moyenne sont globalement compris entre 0.5 % et 2.6 %, ce qui est considéré comme négligeable. Seuls 4 triglycérides présentent des écarts à la moyenne supérieurs à cela, entre 3 et 8 %, les deux plus légers $T_{26:0}$ et $T_{28:0}$ et les deux plus lourds, $T_{52:0}$ et $T_{54:0}$. Les différences de distribution d'acides gras pour des triglycérides saturés, de différents types de graisses ou de différentes espèces, peuvent donc être considérées comme significatives.

Il reste à comparer la variabilité des courbes de distribution en acides gras des différentes races de vaches ainsi que la variabilité des autres espèces (chèvre et brebis). Les compositions en acides gras des triglycérides sont dépendantes de l'alimentation {Agabriel *et al.* 2004; Chilliard *et*

al. 2003; Chouinard *et al.* 2001; Dhiman *et al.* 1999; Palmquist *et al.* 1993}, mais on peut supposer que, sur la période relativement restreinte d'occupation du site archéologique dont proviennent les céramiques étudiées (cf. chapitre IV), l'alimentation du bétail n'a pas évolué de manière significative. Il est donc vraisemblable que ce paramètre ne joue pas un rôle significatif pour la comparaison des données archéologiques entre elles. Un autre problème peut provenir des différences entre les races présentes au Néolithique et les races actuelles, ou des différences d'alimentation de ces races à chacune de ces époques.

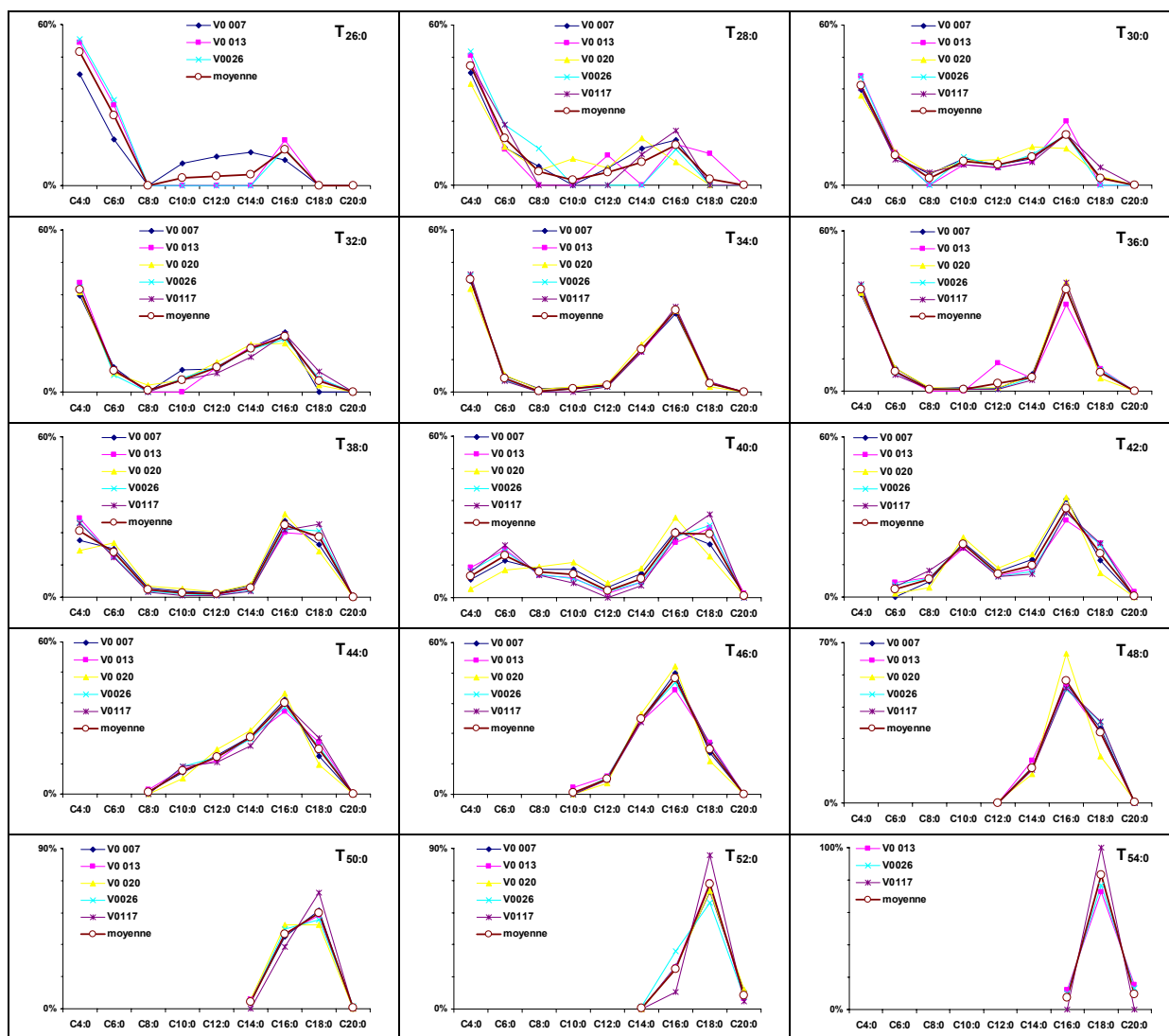


Figure 95 : Courbes de distribution d'acides gras des triglycérides saturés, extraits de tessons imprégnés de lait de vaches d'un même troupeau, obtenues par spectrométrie de masse tandem nanospray IRMPD FT-ICR. [Fatty acids distribution curves of saturated TAGs from the total lipid extracts of potsherds impregnated with the INRA cow milks, data obtained by Li⁺-nanoESI IRMPD FT-ICR MS/MS]

Nous avons regardé la variabilité des distributions en acides gras des triglycérides mono-insaturés et di-insaturés. Il est en effet très rare de détecter, dans des échantillons archéologiques, des triglycérides présentant plus d'insaturations. Ces triglycérides polyinsaturés sont en effet plus

sensibles à la dégradation, par hydrolyse ou oxydation. Les courbes obtenues pour les triglycérides mono-insaturés sont présentées en Figure 96.

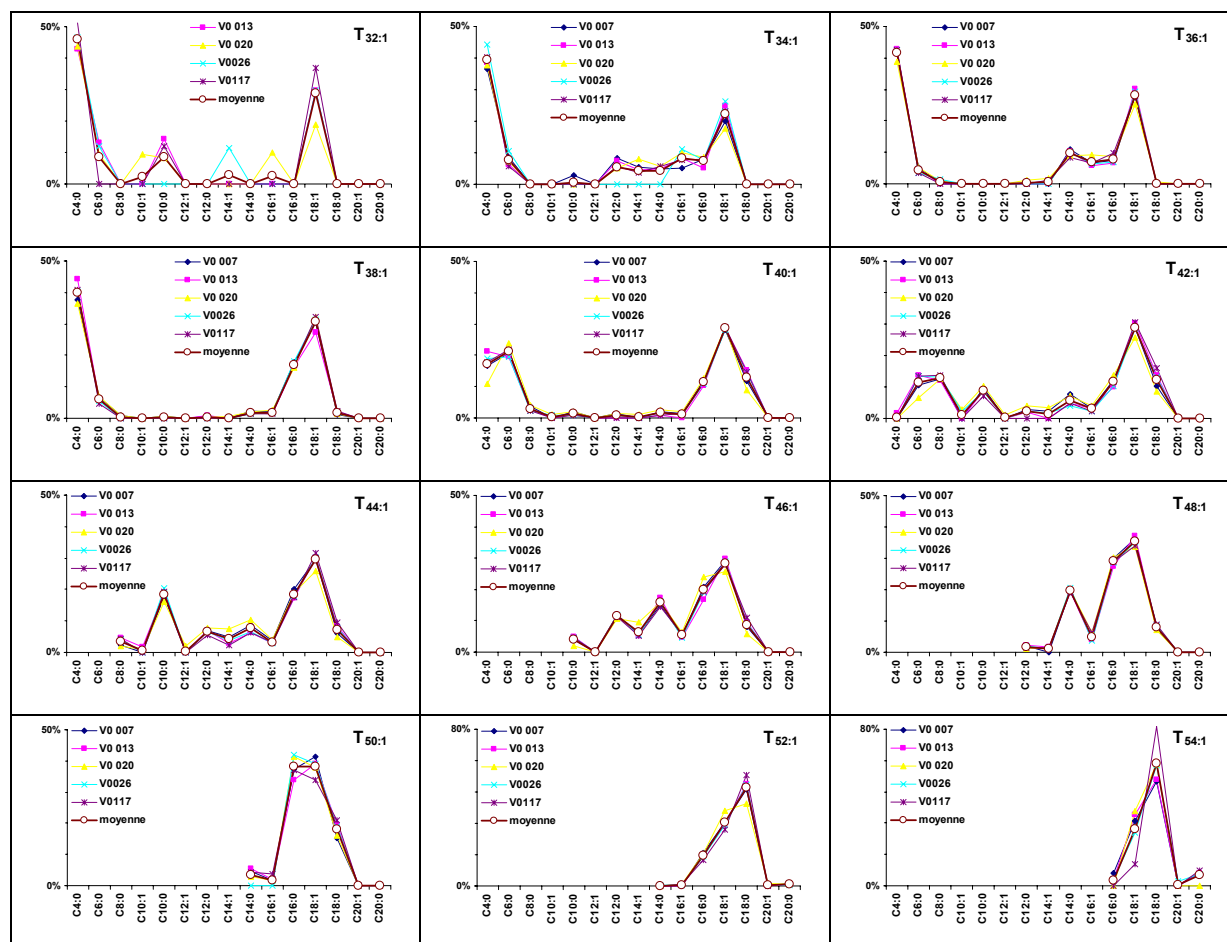


Figure 96 : Courbes de distribution d'acides gras des triglycérides mono-insaturés, extraits de tessons imprégnés de lait de vaches d'un même troupeau, obtenues par spectrométrie de masse tandem nanospray IRMPD FT-ICR. [Fatty acids distribution curves of mono-unsaturated TAGs from the total lipid extracts of potsherds impregnated with the INRA cow milks, data obtained by Li^+ -nanoESI IRMPD FT-ICR MS/MS]

La composition en triglycérides mono-insaturés s'étend du $T_{32:1}$ au $T_{54:1}$ et les distributions en acides gras de ces triglycérides semblent très similaires entre elles, particulièrement entre le $T_{36:1}$ et le $T_{52:1}$. Un échantillon, le V0026, présentait deux triglycérides non détectés dans les autres échantillons : le $T_{28:1}$ et le $T_{30:1}$. Nous ne les avons donc pas inclus dans le comparatif. Les triglycérides $T_{36:1}$ à $T_{48:1}$ ont des écarts à la moyenne inférieurs à 1% et la majorité des autres triglycérides ont des écarts à la moyenne entre 1 et 1.5 %. Seul le triglycéride $T_{54:1}$ a un écart à la moyenne de 4 %. Les courbes de distribution d'acides gras, pour les triglycérides mono-insaturés, ne présentent donc pas de variabilité significative.

Enfin, nous avons comparé les données obtenues pour les triglycérides di-insaturés. Les courbes sont présentées en Figure 97 ci-dessous. La composition en triglycérides s'étend de $T_{36:2}$ à $T_{54:2}$, à deux exceptions près. Le triglycéride $T_{36:2}$ n'a pas été détecté dans l'échantillon V0013, et

le triglycéride T_{46:2} n'a pas été détecté dans l'échantillon V0117. L'absence du T_{36:2} peut s'expliquer par une dégradation préférentielle des triglycérides de plus faible masse, mais celle du T_{46:2} semble plutôt être due à une anomalie lors de la détection des triglycérides. Seul le triglycéride T_{54:2} présente des écarts significatifs (courbes non présentées).

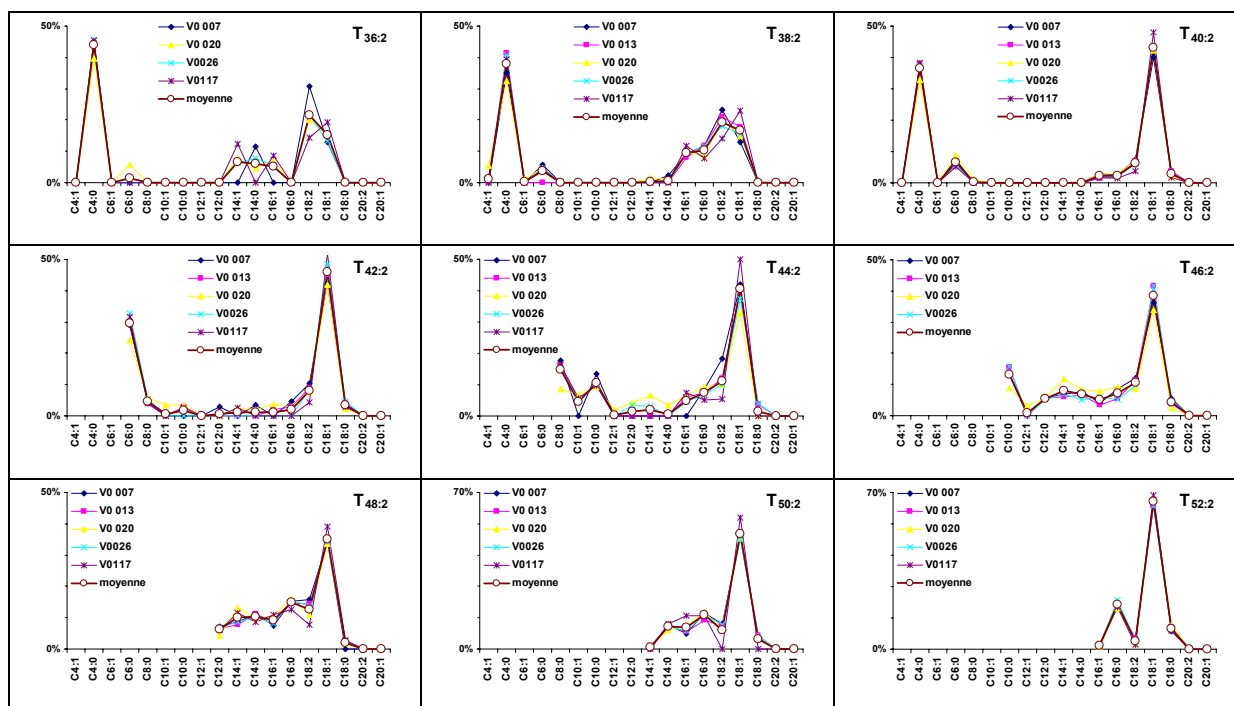


Figure 97 : Courbes de distribution d'acides gras des triglycérides di-insaturés (sauf le T_{54:2}), extraits de tessons imprégnés de lait de vaches d'un même troupeau, obtenues par spectrométrie de masse tandem nanospray IRMPD FT-ICR. [Fatty acids distribution curves of di-unsaturated TAGs from the total lipid extracts of potsherds impregnated with the INRA cow milks, data obtained by Li⁺-nanoESI IRMPD FT-ICR MS/MS]

Les résultats que nous avons obtenus pour l'ensemble des triglycérides extraits de laits de vaches – même race avec une même alimentation – montrent bien l'excellente similarité intraspécifique de la composition du lait de vache. Les critères de discrimination que nous avons mis au point sont basés sur les différences entre les courbes de distribution d'acides gras des triglycérides extraits de différentes graisses animales, et de différentes espèces. La variabilité intraspécifique est inférieure à la variabilité interspécifique et à la variabilité entre les différents types de graisses. Il semble donc que la méthode qui consiste à utiliser les courbes issues des spectres de fragmentation des triglycérides pour caractériser les graisses animales et donc les discriminer entre elles soit valide. Nous avons également étudié l'impact du vieillissement sur ces courbes, afin de déterminer si elles étaient stables dans le temps.

D. Stabilité des critères de discrimination en fonction de la dégradation

Nous avons mis en place un protocole de vieillissement de tessons imprégnés de lait de vache afin de d'étudier la dégradation des produits laitiers. Les tessons ont été préparés et cuits au laboratoire, avec des compositions proches de celles des tessons mis au jour à Clairvaux XIV (20 à 30 % de dégraissant). Cependant, les tessons expérimentaux présentent l'inconvénient de ne pas avoir été utilisés, et sont donc plus acides que les tessons archéologiques. Afin de pallier ce problème d'acidité, qui accélère l'hydrolyse des triglycérides, il faudrait, après la cuisson, mettre à tremper les tessons expérimentaux dans des solutions de compositions similaires aux denrées alimentaires, mais sans lipides (solution d'albumine par exemple).

Les laits provenaient du troupeau de vaches INRA dont nous avons déjà parlé plus haut (Cf. Chapitre II D et chapitre III C). Après imprégnation, les tessons ont été laissés à sécher à l'air libre pendant 48 h puis. Les tessons appelés V0 ont été extraits à ce moment là ($t = 0$). Les autres tessons ont été enfouis dans du sédiment provenant de couches stériles de Clairvaux XIV (un cristalliseur contenant un échantillon de chaque type de lait pour chacune des étapes du vieillissement) et mis à vieillir dans un étuve à température et hygrométrie contrôlées (35°C et 80 % respectivement). Il y avait cinq tessons par échantillon de lait (5 laits: 4 vaches et le tank du troupeau). Le vieillissement a été mené sur une durée de 16 semaines, avec des prélèvements à $t = 5$ jours (V1), $t = 10$ jours (V2), $t = 16$ jours (V3), $t = 25$ jours (V4) et $t = 16$ semaines (V5). Deux tessons vierges (un à 20 % et l'autre à 30 % de dégraissant) ont été enfouis dans le cristalliseur V2 en tant que témoin (Tableau 28). Un tesson, imprégné du lait d'une des vache (tesson 37, vache 1055), a été mis à vieillir dans un cristalliseur sans sédiment, et a été prélevé à $t = 10$ jours (V2). A chaque étape du vieillissement, les tessons ont été retirés du sédiment et nettoyés à l'eau distillée avant d'être séchés à l'air libre. Ils ont ensuite été extraits suivant le protocole décrit dans le chapitre II D.

L'extrait lipidique total a été séparé en deux fractions, la fraction A à laquelle a été ajouté un standard interne (l'alcane $n\text{-C}_{27}$) pour l'analyse en HT CPG et la fraction B, sans standard interne, pour l'analyse en spectrométrie de masse.

D.1. Suivi de la dégradation de tessons modèles par HT CPG

Pour la fraction A, grâce à l'ajout du standard interne, il a été possible de quantifier les lipides extraits, par chromatographie en phase gazeuse. Les résultats détaillés sont donnés dans le Tableau 28. La quantification des lipides est donnée en annexe. Nous n'avons indiqué que les données obtenues pour les lipides qui nous intéressent dans notre étude, c'est-à-dire les

triglycérides et les acides gras. Les autres lipides, stérols, mono- et diglycérides, etc. ne sont pas pris en compte car ils ne sont pas diagnostiques de la dégradation.

Tesson (% dégraissant)	Vache	HT CPG	C (lipides, TLE) mg/mL	C (lipides, tesson) µg/g	% TAG	% Acides Gras
Temps t = 0 jour; V0						
7 (20 %)	Tank	V0007A1B	5.41	1259.63	81.13	2.63
13 (20 %)	Vache 1055	V0013A1B	1.91	722.55	60.62	0.33
18 (20 %)	Tesson vierge	V0018A1B	0.00	0.00	0.00	0.00
20 (20 %)	Vache 2002	V0020A1B	2.52	976.73	83.49	1.24
26 (20 %)	Vache 3040	V0026A1B	0.96	245.45	54.74	0.99
117 (30 %)	Vache 1022	V0117A1B	2.99	1000.83	61.37	0.46
Temps t = 5 jours; V1						
14 (20 %)	Vache 1055	V1014A1A	0.00	0.00	0.00	0.00
9 (20 %)	Tank	V1009A1B	0.18	60.42	4.96	22.86
21 (20 %)	Vache 2002	V1021A1A	0.12	46.71	28.91	17.44
27 (20 %)	Vache 3040	V1027A1A	0.32	116.24	57.50	13.77
119 (30 %)	Vache 1022	V1119A1A	0.21	86.37	26.84	37.05
Temps t = 10 jours; V2						
15 (20 %)	Vache 1055	V2015A1A	0.20	65.90	2.10	16.55
22 (20 %)	Vache 2002	V2022A1A	0.15	61.13	12.72	36.03
28 (20 %)	Vache 3040	V2028A1A	0.21	72.77	14.05	65.03
32 (20 %)	Tank	V2032A1A	0.21	95.48	4.86	55.64
35 (20 %)	Tesson vierge	V2035A1A	0.03	12.88	0.00	10.49
37 (20 %)	Vache 1055	V2037A1A	2.22	1292.33	32.93	6.57
111 (30 %)	Tesson vierge	V2111A1A	0	0	0	0
120 (30 %)	Vache 1022	V2120A1A	0.05	22.96	4.79	31.11
Temps t = 16 jours; V3						
16 (20 %)	Vache 1055	V3016A1A	0.03	7.91	14.30	38.59
23 (20 %)	Vache 2002	V3023A1A	0.03	11.88	3.36	38.41
29 (20 %)	Vache 3040	V3029A1A	0.01	4.36	0.00	28.80
34 (20 %)	Tank	V3034A1A	0.12	31.94	1.23	68.91
122 (30 %)	Vache 1022	V3122A1A	0.13	45.15	5.85	72.79
Temps t = 25 jours; V4						
17 (20 %)	Vache 1055	V4017A1A	0.10	35.95	9.48	73.63
24 (20 %)	Vache 2002	V4024A1A	0.09	51.83	2.69	76.96
31 (20 %)	Vache 3040	V4031A1A	0.03	11.65	3.99	66.09
38 (20 %)	Tank	V4038A1A	0.35	142.63	3.29	82.51
123 (30 %)	Vache 1022	V4123A1A	0.18	78.77	9.89	76.92
Temps t = 12 semaines; V5						
19 (20 %)	Vache 1055	V5019A1A	0.12	10.23	1.63	82.48
25 (20 %)	Vache 2002	V5025A1A	0.02	10.65	1.29	72.56
33 (20 %)	Vache 3040	V5033A1A	0.05	17.42	2.02	85.77
40 (20 %)	Tank	V5040A1A	0.06	19.76	0.46	85.03
126 (30 %)	Vache 1022	V5126A1A	0.08	35.45	3.44	84.05

Tableau 28 : Données obtenues en chromatographie en phase gazeuse pour les fractions A des extraits lipidiques des tessons imprégnés de lait de vache vieillis, % TAG (ou acides gras): pourcentage de triglycérides (ou acides gras) détectés par rapport à la totalité des lipides extraits. [Data obtained by HT GC of the total lipid extracts A of aged potsherds impregnated with the INRA cow milks, % TAG (ou acides gras): triacylglycerol percentage of total lipids detected (or fatty acids)]

Comme il est décrit dans la littérature {Dudd *et al.* 1998; Hita *et al.* 1996}, la dégradation des triglycérides est très rapide. On peut voir en Figure 98 les histogrammes des moyennes de concentration en lipides dans les tessons, qui montrent une perte d'environ 95 % de la quantité de lipides détectée, dès 5 jours.

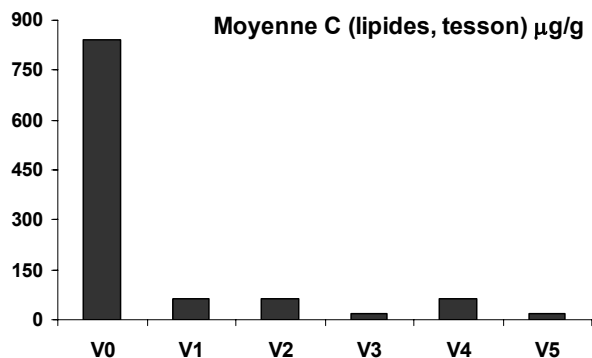


Figure 98 : Histogrammes des moyennes des concentrations en lipides dans les tessons imprégnés de lait de vache vieillis, à différents stades de vieillissement. [Histograms of the mean lipid concentration of aged samples (potsherds with INRA cow milks) at different aging steps]

Les proportions de triglycérides détectés subissent elles aussi une grande diminution, de l'ordre de 60 % (Figure 99). Les triglycérides deviennent minoritaires entre 5 et 10 jours, et ne représentent plus que 1.7 % de l'extrait lipidique total au bout de 16 semaines. Pour les acides gras, qui proviennent de l'hydrolyse des triglycérides, le phénomène inverse est observé. Ils représentent environ 1 % de l'extrait lipidique total à t = 0 jour, et 80 % à t = 16 semaines.

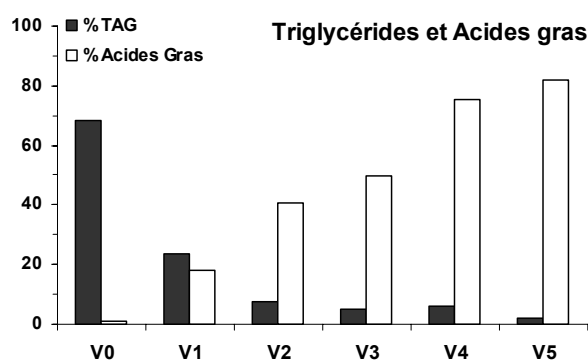


Figure 99: Histogrammes des proportions moyennes de triglycérides et d'acides gras à différents stades du vieillissement. [Histograms of the TAG and fatty acid mean proportions at different aging steps]

Afin de modéliser la dégradation des triglycérides, nous avons défini un facteur de dispersion (FD) autour du nombre moyen (M) d'atomes de carbone des triglycérides. On entend par facteur de dispersion d'un échantillon la caractérisation statistique de la distribution du nombre d'atomes de carbone des triglycérides de cet échantillon autour de la moyenne du nombre des atomes de carbone des triglycérides.

Cette moyenne M est calculée suivant la relation

$$M = \frac{\sum (P_i C_i)}{\sum P_i}$$

Avec P_i le pourcentage de chaque triglycéride et C_i le nombre d'atomes de carbone du triglycéride i . Les atomes du glycérol ne sont pas comptés dans le C_i . $\sum P_i$ est égale à 100 car la somme des aires des pics de triglycérides pour un échantillon a été ramenée à 100. Le facteur de dispersion FD est calculé à partir de la formule

$$FD = \frac{\sqrt{\sum [(C_i - M)^2 \times C_i P_i]}}{\sum P_i}$$

Grâce à ce traitement statistique simple, il est possible de modéliser la dégradation des échantillons uniquement à partir de leur composition en triglycérides. Nous avons tracé le graphe rapportant le facteur de dispersion en fonction de la moyenne du nombre d'atomes de carbone (Figure 100).

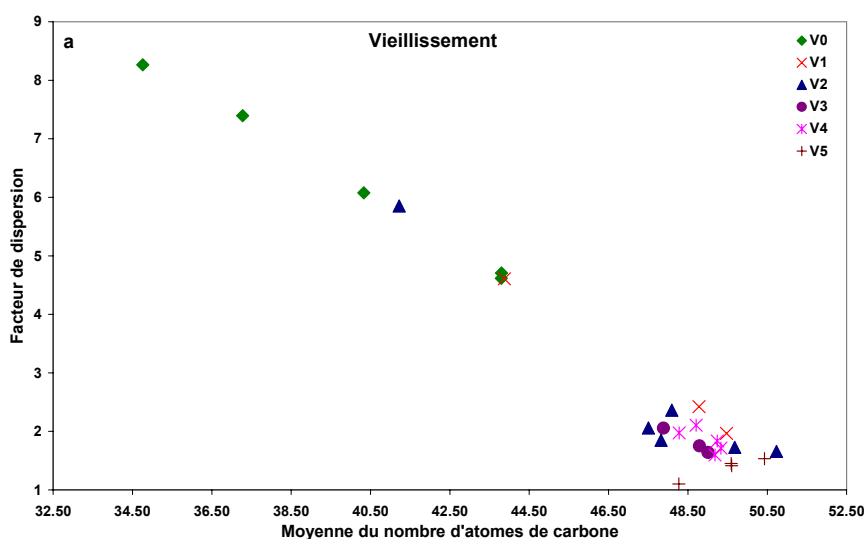


Figure 100 : Facteur de dispersion en fonction de la moyenne d'atomes de carbone, en fonction du temps de vieillissement, données obtenues en HT CPG (méthode MR1CER); V0../.V5: étapes du vieillissement. [Dispersion factor vs. the average number of carbon atoms for all the aged samples, data obtained by HT GC; V0../.V5 corresponds to the aging stages]

Il semble que dans les premiers temps de vieillissement V0 et V1 ($t < 10$ jours), la dégradation se fasse de manière assez aléatoire, bien que toujours à partir des triglycérides avec des acides gras à chaîne courte (Figure 100). A partir de V2 ($t = 10$ jours), le vieillissement semble se stabiliser, avec un nuage de points regroupés autour d'une moyenne de nombre d'atomes de carbone de 47.5 et d'un facteur de dispersion de 2.

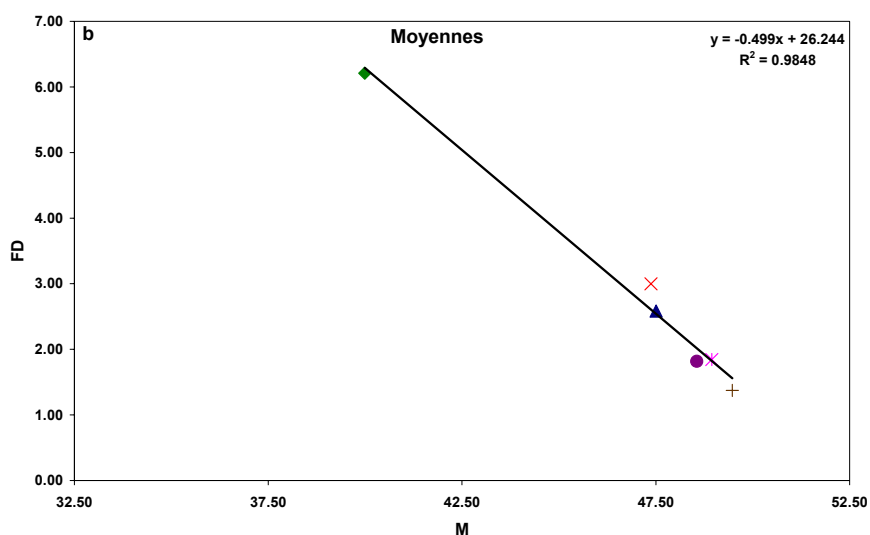


Figure 101 : Droite de corrélation du facteur de dispersion vs. la moyenne du nombre d'atome de carbone, pour les valeurs moyennes du vieillissement. [Straight correlation between the dispersion factor and the average number of carbon atoms. Each dot corresponds to the average value of each aging stage]

Si l'on reporte sur le même graphe les points correspondant aux moyennes pour chaque étape de vieillissement, on peut tracer une droite de corrélation dont le coefficient R^2 est de 0.9848 (Figure 101). Le vieillissement semble donc se dérouler de manière linéaire au cours du temps, et se caractérise par une augmentation du nombre moyen d'atomes de carbone des chaînes acides proportionnel à une diminution du facteur de dispersion. Ces résultats illustrent ce qui a déjà été décrit dans la littérature, à savoir que la dégradation des triglycérides commence par ceux à plus courte chaîne et se poursuit de manière plus ou moins linéaire {Dudd *et al.* 1998}. Afin de suivre de manière plus fine ce mécanisme de dégradation, il aurait fallu travailler sur les distributions en acides gras des triglycérides extraits des différentes étapes du vieillissement. Malheureusement cela n'a pas été possible à cause de la dégradation après extraction des extraits B – extrait lipidique total des tessons sans ajout de standard interne – malgré leur conservation au réfrigérateur.

Les extraits B ont tout de même été analysés en chromatographie en phase gazeuse, afin de déterminer leur degré de dégradation, ce qui nous a permis de nous rendre compte que celle-ci était déjà trop avancée pour permettre l'analyse en spectrométrie de masse.

Nous avons tracé le facteur de dispersion en fonction de la moyenne du nombre d'atomes de carbone, pour déterminer si la corrélation que nous avons déterminée pour les fractions A était toujours visible pour les fractions B (Figure 102 a). Aucune corrélation ne semble être appropriée. On peut tout de même remarquer que le nuage de points se situe dans la partie correspondant aux échantillons les plus dégradés des fractions A (Figure 102 b), ce qui laisse penser que l'hydrolyse se poursuit dans le même sens, avec une augmentation de la moyenne du nombre d'atomes de carbone des triglycérides et une diminution du facteur de dispersion.

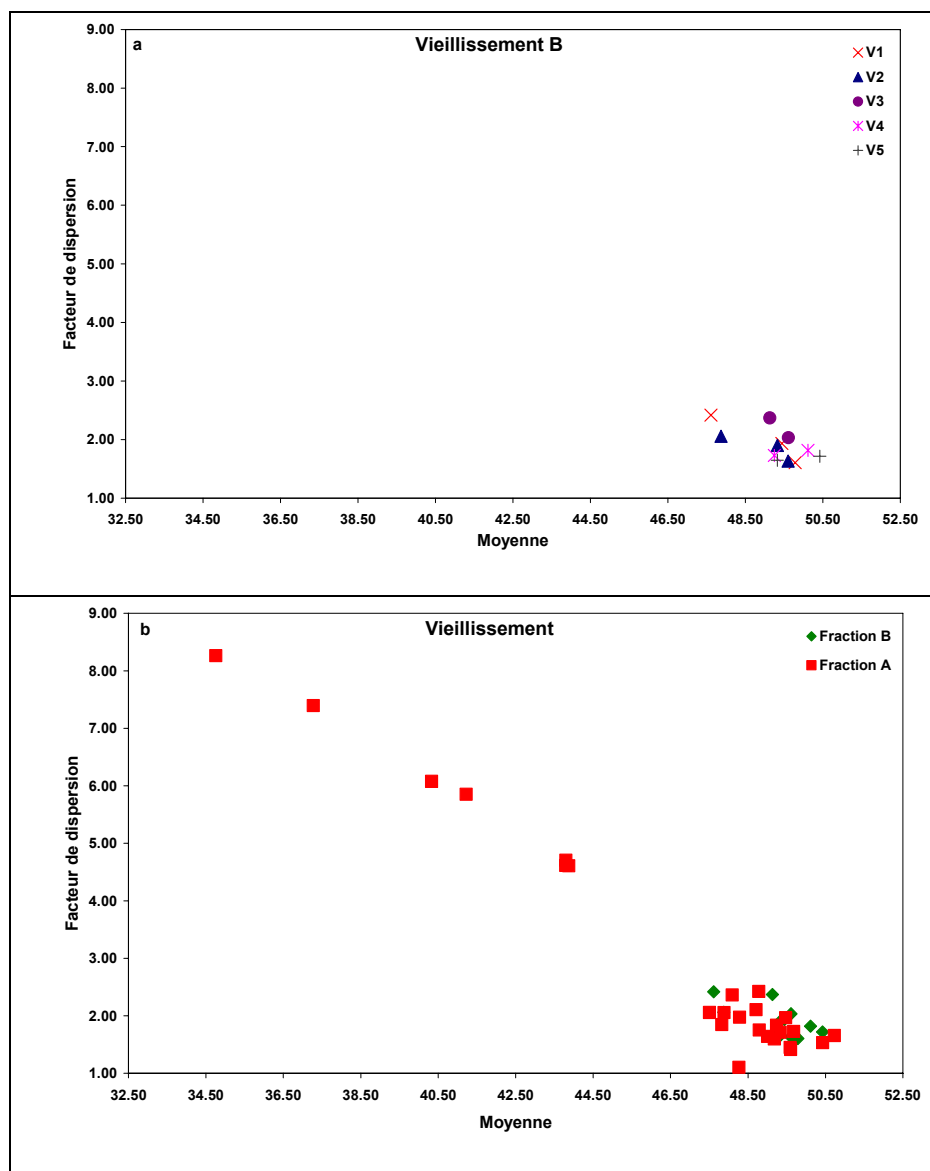


Figure 102 : Facteur de dispersion en fonction de la moyenne du nombre d'atomes de carbone (a) pour les extraits B et (b) comparaison entre les valeurs obtenues pour les extraits A et les extraits B des tessons vieillis. [Dispersion factor vs. average number of carbon atoms for (a) the total lipid extracts B of aged potsherds impregnated with cow milks and (b) both the total lipid extracts A and B of the aged samples]

Le traitement des données obtenues sur les extraits de tessons vieillis nous a permis de modéliser la dégradation des triglycérides de produits laitiers. Il n'a pas été possible de suivre cette dégradation par spectrométrie de masse pour l'ensemble des tessons – ce qui aurait permis de déterminer plus finement l'impact de l'hydrolyse sur les compositions en acides gras des différents triglycérides. Un échantillon vieilli, le tesson 37 (vieilli 10 jours, sans sédiment) a tout de même pu être analysé en spectrométrie de masse.

D.2. Variabilité après vieillissement

Nous avons donc testé la variabilité des courbes de distributions en acides gras des triglycérides extraits d'un tesson vieilli. Il s'agit du tesson V2037, imprégné du lait de la vache 1055, comme le tesson V0013. Il a été mis à vieillir dans l'enceinte à température et hygrométrie contrôlées (cf. chapitre II), sans être enfoui dans le sédiment. Il a été prélevé et extrait à $t = 10$ jours. Sa concentration en lipides est de 1292 $\mu\text{g/g}$ de tesson, et il contient 33 % de triglycérides (analyse de l'extrait A). Le tesson V0013 (vache 1055, $t = 0$) a une concentration de 700 mg/g de tesson avec une proportion de triglycérides de 60 %. Il semblerait que l'imprégnation soit relativement aléatoire.

L'échantillon V2037 (extrait B) a été fractionné sur colonne aminopropyle pour séparer les triglycérides des acides gras présents (7 %) (cf. chapitre 2). Seule la fraction triglycéride a été analysée en spectrométrie de masse nanoESI FT-ICR. Nous avons comparé les courbes de distribution en acides gras de l'échantillon V2037 avec celles de l'échantillon V0013 (qui provient d'un tesson imprégné du lait de la même vache). Nous avons également calculé la moyenne, pour chaque triglycéride, des courbes de distribution en acides gras de l'ensemble des échantillons extraits à $t = 0$ (V0007, V0013, V0020, V0026 et V0117), que nous avons comparé aux courbes de l'échantillon V2037 (Figure 103).

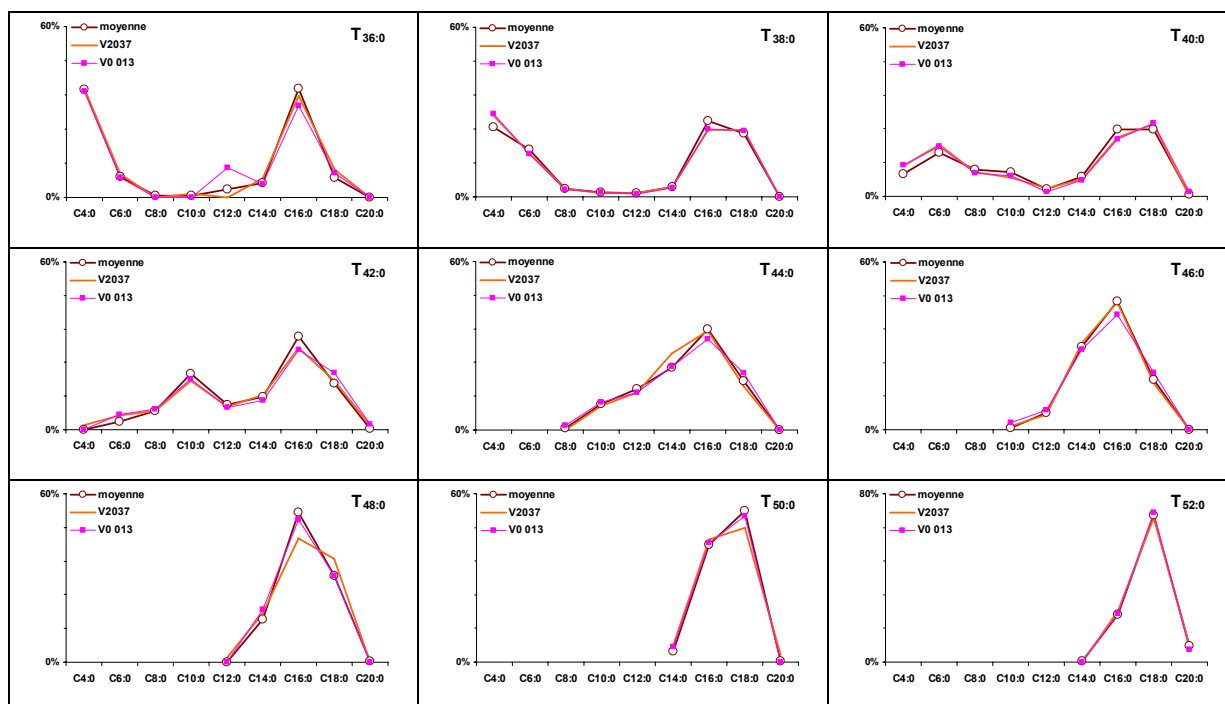


Figure 103 : Courbes de distribution d'acides gras des triglycérides saturés (sauf le $T_{54:0}$), des extraits des tessons V0013 et V2037 et de la moyenne des courbes des tessons extraits à $t=0$ (tessons V0), obtenues par spectrométrie de masse tandem nanoESI IRMPD FT-ICR. [Fatty acids distribution curves of saturated TAGs (except for $T_{54:0}$), of samples V0013 (extracted at $t = 0$ jour), V2037 (extracted at $t = 10$ jours) and the curves corresponding to the average of all the V0 samples (extracted at $t = 0$ jour, V0007, V0013, V0020, V0026 et V0117), data obtained by Li^+ -nanoESI IRMPD FT-ICR MS/MS]

La distribution en triglycérides saturés s'étend de $T_{36:0}$ à $T_{54:0}$, ce qui est en accord avec les données de la littérature sur l'hydrolyse des triglycérides, avec la disparition des composés de plus faible masse {Dudd *et al.* 1998}. Comme on peut le voir sur la Figure 103, les courbes sont très similaires. La dégradation des triglycérides, pour significative qu'elle soit, ne change pas les distributions relatives en acides gras des triglycérides saturés non hydrolysés. Il existe cependant certains triglycérides pour lesquels la variabilité de composition est plus grande. C'est le cas pour le triglycéride $T_{36:0}$, ce qui peut s'expliquer par l'hydrolyse en cours. Le triglycéride $T_{48:0}$ et, dans une moindre mesure, les triglycérides $T_{44:0}$ et $T_{50:0}$ sont eux aussi marqués par une certaine variabilité. Même s'il est délicat de comparer les données obtenues sur les deux spectromètres de masse, ces variations semblent très mineures par rapport à celles déterminées entre les espèces ou les différents types de graisses.

La distribution en triglycérides mono-insaturés observée pour l'échantillon vieilli V2037 s'étend de T_{36:1} à T_{54:1} (Figure 104).

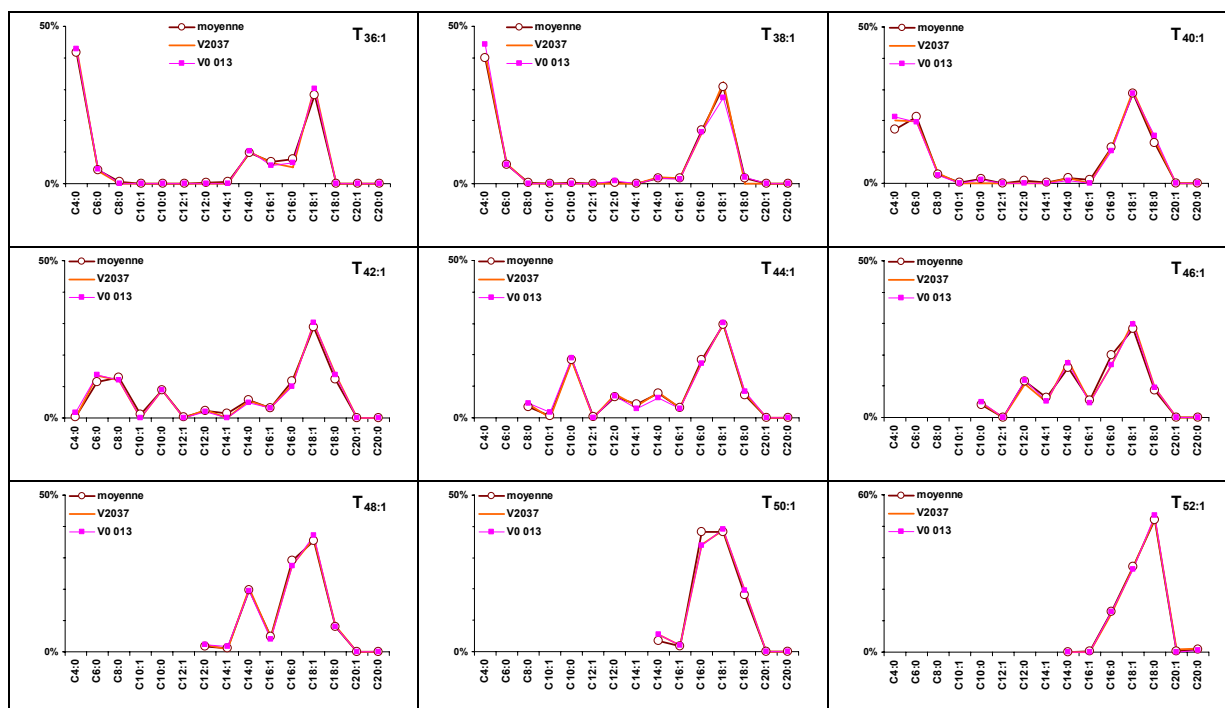


Figure 104 : Courbes de distribution d'acides gras des triglycérides mono-insaturés (sauf le T_{54:1}), des extraits des tessons V0013 et V2037 ainsi que de la moyenne des courbes des tessons extraits à t = 0 (tessons V0), obtenues par spectrométrie de masse tandem nanoESI IRMPD FT-ICR. [Fatty acids distribution curves of mono-unsaturated TAGs (except for T_{54:0}), of samples V0013 (extracted at t = 0 jour), V2037 (extracted at t = 10 jours) and the curves corresponding to the average of all the V0 samples (extracted at t = 0 jour, V0007, V0013, V0020, V0026 et V0117), data obtained by Li⁺-nanoESI IRMPD FT-ICR MS/MS]

Les courbes correspondant à la moyenne des courbes des tessons V0, les courbes du tesson V2037 et celles du tesson V0013 sont extrêmement proches, ce qui va nous permettre d'utiliser les triglycérides mono-insaturés pour la discrimination des graisses animales, comme nous l'avions postulé pour les extraits à t = 0 jour (Figure 104 & Figure 96). Les deux échantillon V0013 et V2037 diffèrent, pour le triglycéride T_{50:1}, de la moyenne des tessons V0.

Enfin la distribution en triglycérides di-insaturés s'étend de T_{38:2} à T_{54:2} pour le tesson vieilli V2037. La comparaison des courbes d'acides gras entre le tesson vieilli V2037, le tesson V0013 et la moyenne des courbes des tessons V0 permet là encore de se rendre compte de l'extrême concordance des données (Figure 105). Il semble que même pour les triglycérides di-insaturés, qui sont pourtant plus sensibles à la dégradation que les saturés ou les mono-insaturés, le vieillissement n'altère pas de manière significative les distributions en acides gras. Seuls deux triglycérides, le T_{44:2} et le T_{46:2} présentent des distributions qui diffèrent, mais les différences sont minimales.



Figure 105 : Courbes de distribution d'acides gras des triglycérides di-insaturés, des extraits des tessons V0013 et V2037 ainsi que de la moyenne des courbes des tessons extraits à $t=0$ (tessons V0), obtenues par spectrométrie de masse tandem nanoESI IRMPD FT-ICR. [Fatty acids distribution curves of di-unsaturated TAGs (except for $T_{54:0}$), of samples V0013 (extracted at $t = 0$ jour), V2037 (extracted at $t = 10$ jours) and the curves corresponding to the average of all the V0 samples (extracted at $t = 0$ jour, V0007, V0013, V0020, V0026 et V0117), data obtained by Li^+ -nanoESI IRMPD FT-ICR MS/MS]

Après avoir montré qu'il était possible, par le biais de l'étude et de la comparaison des compositions en acides gras des triglycérides extraits de tessons imprégnés de lait de vache et de chèvre et de graisses sous-cutanées de bœuf et de mouton, de discriminer les différents type de graisses et d'identifier leur origine spécifique, nous nous sommes attachés à montrer la stabilité de ces courbes de distribution d'acides gras. Nous avons ainsi montré sur un ensemble de tessons imprégnés de lait de différentes vaches d'un même troupeau avec une alimentation de prairie, extraits juste après avoir été imprégnés, que les distributions en acides gras des triglycérides saturés, mono- et di-insaturés étaient extrêmement stables au sein d'une même race de vache, avec la même alimentation. Nous avons ensuite étudié l'effet du vieillissement, en comparant les données obtenues précédemment avec celles obtenues d'un tesson vieilli, en montrant là encore la très bonne stabilité des courbes. La dégradation des triglycérides ne semblent pas avoir d'influence majeure sur l'allure des courbes d'acides gras, ni sur l'intensité relative des pics $[M + Li - RCOOH]^+$.

Conclusion

Les développements méthodologiques sur l'identification des espèces animales et la nature des graisses animales ont porté sur 4 points: l'évaluation de la spectrométrie de masse LDI-TOF pour la caractérisation de la distribution en triglycérides d'échantillons de graisses animales, l'évaluation de la spectrométrie de masse nanoESI avec des analyseurs tandem, pour la caractérisation structurale des triglycérides de graisses animales, l'élaboration de critères de discrimination des graisses animales à partir de la composition en acides gras de leurs triglycérides et enfin la détermination de la stabilité de ces critères, au sein d'une race de vache puis en fonction du temps.

Tout d'abord l'évaluation de la spectrométrie de masse LDI a permis de montrer le très grand potentiel de cette technique pour l'analyse des triglycérides. Plus particulièrement, le DIOS, désorption sur silicium poreux semble avoir toutes les qualités requises pour l'analyse rapide, avec une mise en œuvre simple, une très bonne résolution et une excellente sensibilité pour l'analyse de composés aussi peu polaires et labiles que les triglycérides. Malheureusement, nous n'avons pas pu travailler en analyse structurale avec des techniques LDI, c'est pour nous avons également mis au point l'ionisation par électrospray.

La spectrométrie de masse à ionisation nanospray s'est révélée la plus sensible des techniques d'ionisation, avec la possibilité d'effectuer de l'analyse tandem. Elle a permis de caractériser structurellement les triglycérides. A partir des données obtenues en spectrométrie de masse tandem (nanoESI Q-q-TOF MS/MS), il a été possible de déterminer des critères de discrimination des graisses animales (produits laitiers vs. graisses sous-cutanées) et des critères probables d'identification de leur espèce d'origine. Concrètement, l'analyse en infusion directe de ces échantillons composés d'une multitude d'isomères de triglycérides, sans étape de séparation par chromatographie liquide préalable, ne permet pas d'avoir accès aux différents isomères. Cependant, grâce à la spectrométrie de masse tandem, chaque pic correspondant à un adduit $[\text{TAG} + \text{Li}]^+$ a été fragmenté par CID. Les pics principaux correspondent aux pertes des acides gras RCOOH et RCOOLi . Les critères sont donc fondés sur la comparaison, pour chaque groupe de triglycérides isobares (même formule brute, mais structure différente), des courbes des intensités relatives des pics de perte des acides gras $[\text{M} + \text{Li} - \text{RCOOLi}]^+$. Afin de vérifier la stabilité de ces critères, tout d'abord au sein d'une même espèce puis après vieillissement, l'étude d'un ensemble de 5 échantillons provenant d'un troupeau de vaches élevées en prairie sans autre apport alimentaire a été menée. Ces échantillons ont ensuite été analysés en spectrométrie de masse à ionisation nanoélectrospray, avec un dopage aux sels de lithium. Le spectromètre utilisé est un spectromètre FT-ICR, avec pour mode de fragmentation l'IRMPD. La sensibilité de

détection des triglycérides lithiés est meilleure avec ce spectromètre de masse. Le mode de fragmentation choisi est plus doux que la fragmentation par CID utilisée avec le spectromètre Q-q-TOF, et ce qui induit une plus grande simplicité des spectres obtenus. Les ions fils correspondent à la perte des entités acides gras RCOOH. Nous avons comparé entre elles les courbes obtenues pour les triglycérides saturés, mono et di-insaturés pour les 5 échantillons de référence. Nous avons ensuite comparé la moyenne obtenue pour les 5 échantillons avec les courbes d'un échantillon vieilli et celles d'un échantillon non vieilli imprégné avec le lait de la même vache. Là encore la stabilité des compositions en acides gras est excellente. Ces résultats nous permettent d'avancer que les critères tels que la comparaison des compositions en acides gras des triglycérides extraits d'échantillons de graisses animales sous-cutanées et de produits laitiers, sont adaptés à la discrimination des graisses animales et à l'identification de l'espèce d'origine. Le couplage de la spectrométrie de masse à ionisation nanospray avec la nanochromatographie liquide (nanoLC) est une voie qui reste à approfondir. Cela permettrait de séparer les triglycérides isobares et de les analyser un à un. Leur caractérisation structurale serait d'autant plus fine. Cependant, la nanoLC est une méthode qui est délicate et très longue à mettre en place, particulièrement pour les triglycérides.

Dans le chapitre suivant nous présenterons les données obtenues par chromatographie en phase gazeuse haute température sur des extraits lipidiques de tessons provenant du site archéologique de Clairvaux XIV (Clairvaux-les-Lacs, Jura, France) avant d'appliquer ces critères à l'identification des graisses animales.

Chapitre IV

Le contenu des céramiques du site néolithique de Clairvaux XIV

Introduction

Les matières naturelles organiques provenant du contenu et de l'utilisation des céramiques archéologiques sont conservées sous forme de résidus carbonisés adhérant à la paroi (interne majoritairement mais aussi parfois externe), ou bien absorbées dans la paroi argileuse poreuse. Il n'est pas possible d'identifier ces matériaux organiques amorphes par examen visuel tant à l'échelle macroscopique que microscopique, à cause de l'absence de morphologie caractéristique, liée à la nature même de la matière d'origine et/ou à sa préparation (cuisson, etc.). C'est pour cette raison qu'il est nécessaire de passer par l'analyse chimique, qui permet d'identifier les composés moléculaires présents, pour pouvoir caractériser la matière organique. Il est alors possible d'identifier un certain nombre de produits naturels, tels que les graisses animales, les huiles végétales, les cires végétales ou animales, les brais d'écorce, les bitumes, les résines et les gommes, les colorants naturels ou encore les boissons fermentées {Andreotti *et al.* 2004; Beck *et al.* 1989; Boëda *et al.* 1996; Charrié-Duhaut *et al.* 2007; Charters *et al.* 1993a; Charters *et al.* 1995; Charters *et al.* 1997; Colombini *et al.* 2004b; Colombini *et al.* 2005a; Colombini *et al.* 2005b; Copley *et al.* 2001; Copley *et al.* 2004a; Copley *et al.* 2005a; Copley *et al.* 2005e; Craig *et al.* 2000; Craig *et al.* 2005a; Dudd & Evershed 1998, 1999; Dudd *et al.* 1999; Edwards *et al.* 1997; Evershed *et al.* 1991; Evershed 1993b; Evershed *et al.* 1994; Evershed *et al.* 1995b; Evershed & Tuross 1996; Evershed *et al.* 1997c; Evershed *et al.* 1999; Evershed 2000; Evershed *et al.* 2002; Evershed *et al.* 2003; Garnier *et al.* 2002; Garnier *et al.* 2003; Guash-Jané *et al.* 2006; Hansel *et al.* 2004; Heron *et al.* 1989a; Heron & Evershed 1993; Heron *et al.* 1994; Kimpe *et al.* 2001, 2002; Lucquin *et al.* 2007; Maksoud *et al.* 1994; McGovern *et al.* 1996; McGovern *et al.* 1999; McGovern *et al.* 2004; Mottram *et al.* 1999; Oudemans & Boon 1991; Pollard & Heron 1996; Raven *et al.* 1997; Reber *et al.* 2004; Regert *et al.* 1998a; Regert *et al.* 2001a; Regert & Rolando 2002; Regert *et al.* 2003b; Regert 2004; Regert *et al.* 2006; Regert 2007; Spangenberg *et al.* 2006; Stern *et al.* 2003; Stott *et al.* 1999; Stott *et al.* 2003}.

Cette liste bibliographique est loin d'être exhaustive, pour plus de détails le lecteur peut se reporter au Chapitre I. Les matériaux organiques amorphes sont des échantillons complexes, dégradés, souvent présents en faible quantité dans une matrice complexe (soit l'argile de la céramique, soit la matière carbonisée des résidus) dont il faut les extraire. Les biomolécules les mieux conservées à l'échelle des temps archéologiques sont les lipides, comme nous l'avons montré dans le chapitre de synthèse de la bibliographie (Chapitre I). C'est pourquoi la grande majorité des études publiées à ce jour est axée autour de leur extraction, leur séparation et leur identification, ainsi que de leurs mécanismes de dégradation.

Cette thèse s'est focalisée sur l'étude des résidus organiques amorphes du site de Clairvaux XIV (Néolithique Moyen Bourguignon, 38^e-37^e siècles av. J.-C. ; Clairvaux-les-Lacs, Jura, France, Carte 1). La caractérisation de résidus organiques conservés dans les céramiques de ce groupe culturel du Néolithique Moyen Bourguignon (NMB, IV^{ème} millénaire av. J.-C.) n'avait encore jamais été menée. Des études sur les sites lacustres voisins du lac de Chalain (Néolithique final) et sur le site fluvial de Bercy (Paris, Néolithique moyen) ont donné des résultats très intéressants, notamment en terme de conservation de la matière organique {Mirabaud 2004; Pétrequin 1986, 1989, 1997; Regert *et al.* 1999; Regert *et al.* 2001b}. Ce sont en effet des sites où les échantillons ont été préservés pendant des millénaires à l'abri de l'air et de la lumière, en milieu humide. Toutes ces conditions réunies permettent une très bonne conservation de la matière organique, car les processus de dégradation par l'air, la lumière ou encore les bactéries sont fortement ralentis {Pétrequin 1997; Regert *et al.* 1999; Regert *et al.* 2001b; Regert *et al.* 2003a}. La conservation en milieu humide est très favorable aux lipides, qui sont des biomolécules fortement hydrophobes. Ceci n'est pas le cas des protéines et des sucres, que nous n'avons donc pas cherché à identifier dans ces échantillons. L'identification des contenus des céramiques permet d'appréhender, à partir de témoins directs, la fonction ou la fonctionnalité des céramiques, la gestion des différents types de céramiques, en complément des études typologiques et ethnoarchéologiques {Regert 2007}. D'autre part, cela ouvre la voie à une meilleure compréhension de la gestion de certaines ressources naturelles, comme les produits de la ruche, les huiles ou encore les produits laitiers, dont l'utilisation ou la consommation ne laissent que peu de traces directement interprétables en contexte archéologique.

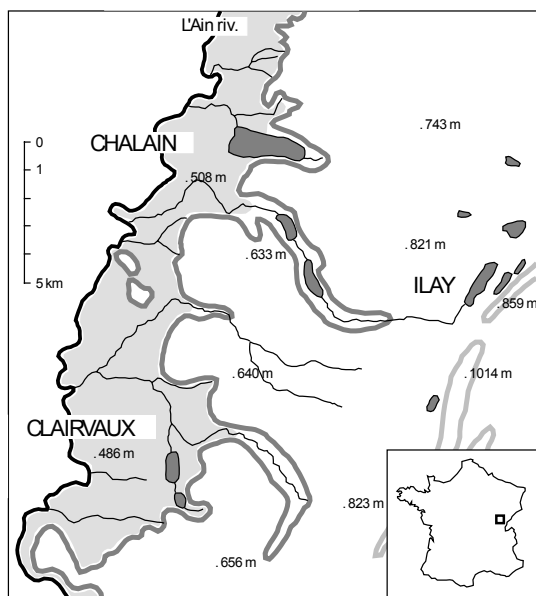
Nous avons choisi de développer une méthodologie en trois étapes, depuis la fouille archéologique jusqu'aux analyses en laboratoire. Il s'est agi tout d'abord de mettre en place une stratégie d'échantillonnage, au sortir de la fouille, après le remontage des céramiques (choix des vases, localisation des prélèvements et nombre de prélèvements). Différents types d'échantillons ont été prélevés, des tessons, des résidus carbonisés en association avec certains tessons, et des adhésifs. Nous avons ensuite analysé la majorité de ces échantillons prélevés sur le site de Clairvaux XIV en chromatographie en phase gazeuse couplée ou non à la spectrométrie de masse, afin de déterminer leur composition moléculaire lipidique globale. Nous avons ainsi pu identifier des huiles végétales, de la cire d'abeille, différents types de graisses animales et du brai de bouleau. La chromatographie en phase gazeuse permet également de rendre compte de l'état de dégradation de ces matériaux. Dans la troisième étape, nous nous sommes focalisés sur l'identification des graisses animales, qui sont les composés retrouvés majoritairement dans les céramiques néolithiques et pour lesquelles l'analyse en chromatographie en phase gazeuse n'est pas suffisante. Après une préparation spécifique des échantillons qui présentaient une grande

quantité de triglycérides, biomarqueurs les plus caractéristiques des graisses animales, les triglycérides ont été analysés en spectrométrie de masse à ionisation douce. Le gain en sensibilité de détection de ces biomarqueurs et la caractérisation de leur structure a permis d'identifier plus précisément les graisses animales (graisses sous-cutanées et produits laitiers) et dans certains cas d'identifier leur origine spécifique (caprinés ou bovinés).

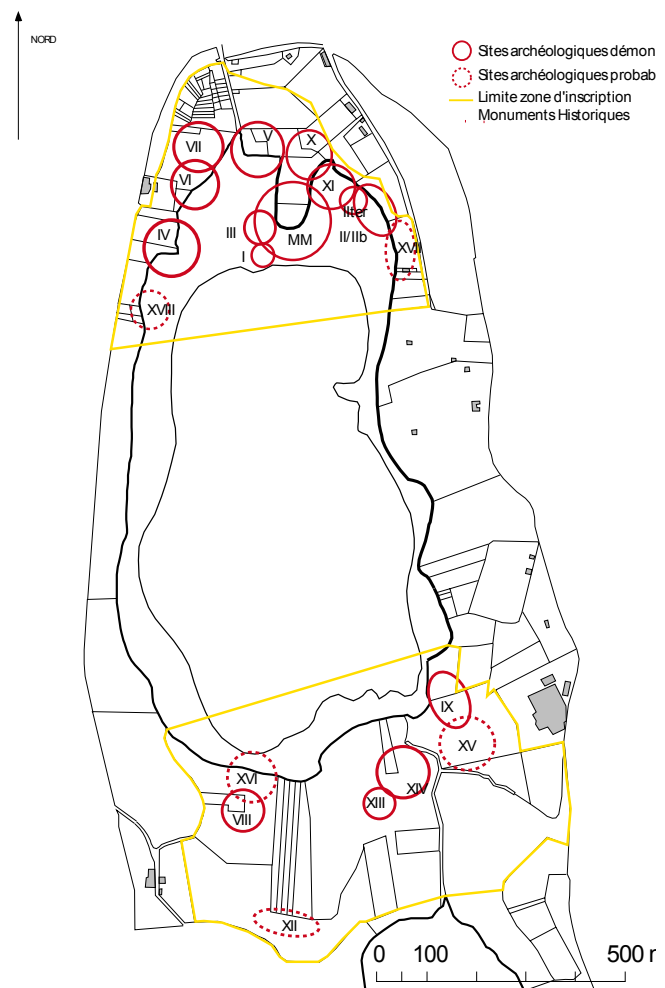
A. Mise en contexte

A.1. Le site de Clairvaux XIV

Le site de Clairvaux XIV est un site d'habitat lacustre, situé sur la rive du lac de Clairvaux, dans la commune de Clairvaux-les-Lacs (Jura, France). Il est situé à l'extrême sud du grand lac, entre ce dernier et le petit lac (Carte 1 & Carte 2). Sa datation par dendrochronologie et par date radiocarbone n'est pas encore assurée. Les courbes dendrochronologiques obtenues sur les bois d'œuvre ne couvrent pas suffisamment d'années pour pouvoir être corrélées de manière fiable avec les courbes de référence. Cependant, grâce à l'étude du corpus céramique, il semble que l'ensemble appartienne à la phase moyenne du Néolithique Moyen Bourguignon, période que les corrélations avec les sites suisses permettent de dater aux 38^e-37^e siècles av. J.-C. {Pétrequin & Pétrequin 2004}.



Carte 1 : Situation géographique des lacs de Chalain et Clairvaux (© P. Pétrequin). [Map of the geographical localisation of lakes Chalain and Clairvaux]



Carte 2 : Localisation des différents sites archéologiques situés autour du lac de Clairvaux (© P. Pétrequin). [The archaeological sites located around lake Clairvaux]

Repéré à l'occasion d'une campagne de sondages systématiques à la tarière en 2001, autour des lacs de Clairvaux et de Chalain (Jura, France), la fouille de ce site a été retenue en raison de la grande dilatation de la séquence stratigraphique (près d'un mètre de dépôts anthropiques) et de l'abondance du matériel céramique.

Le village de Clairvaux XIV a fait l'objet de deux campagnes de fouilles, lors de l'été 2003 et de l'été 2004, chacune sur une surface de 15 m², choisie pour la première à l'avant d'une lignée de maisons et à l'emplacement des dépotoirs domestiques et pour la deuxième au sud de la précédente, pour contrôler la succession stratigraphique et augmenter le nombre de profils céramiques à étudier. Ce site s'insère dans la culture du Néolithique Moyen Bourguignon, culture dont l'étude a été peu développée depuis 1984 {Pétrequin & Gallay 1983; Pétrequin 1989; Pétrequin & Pétrequin 2004}. L'extension du NMB s'inscrit dans un large espace géographique, qui va de la trouée de Belfort jusqu'au sud du massif jurassien et des plateaux bourguignons jusqu'au lac de Neuchâtel. Les habitats littoraux du grand lac de Clairvaux peuvent donc s'inscrire directement au centre de cette problématique d'étude d'un complexe culturel original en France de l'Est, issu à la fois de l'évolution tardive du Chasséen et de celle des groupes Tardi-Rössen et Michelsberg. La campagne de sondage à la tarière de 2001 autour du grand lac de Clairvaux a montré un grand nombre de villages de cette culture, CLVI, CLVII, CLVIII, CLXIV et la Motte-aux-Magnins V (CL MMV). Le site de CL MMV a déjà été fouillé, et le village de CLVII est en cours de fouille (2005-2008, fouilles P. et A.-M. Pétrequin), ce qui devrait permettre d'affiner la chronologie du NMB, et de tenter de proposer une nouvelle sériation interne de cette culture.

Au terme de la fouille, la séquence stratigraphique a été divisée en 6 phases typo-chronologiques, représentant - d'après le nombre de reconstructions de maisons - au moins 70 à 100 années, et probablement davantage, en se fondant sur la dendrochronologie relative des bois d'œuvre (Cf. annexes). La phase la plus ancienne, P1 est suivie d'une couche d'incendie précédant une couche de craie assimilable à un abandon. Suivent ensuite 5 couches (fumier et fumier/habitat) avant la dernière phase d'abandon (Figure 106). La surface de fouille de 30 m² ne permet pas de se faire une idée très précise des structures bâties en bois. Mais le grand nombre de poteaux conservés (N = 138) tend à confirmer une occupation longue et des reconstructions successives sur le même site (la durée de vie d'une maison est de 8 à 12 années).

CL XIV synthèse

Puisard R 45	Fouille 2003	Description	Fouille 2004	PHASES					
<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20%; text-align: center;">C</td> <td style="width: 20%;"></td> <td style="width: 40%; text-align: center;">craie, abandon</td> <td style="width: 20%; text-align: center;">C</td> <td style="width: 10%;"></td> </tr> </table>					C		craie, abandon	C	
C		craie, abandon	C						
	D 1	flottage, abandon							
D 1	D 2	fumier, habitat	D 1	6					
	D 3/	lentille argile, reconstruction							
D 2	D 3//	fumier sur lentille argile	D 2	5					
	D 4/								
D 3	D 4//	fumier, habitat	D 3	4					
	D 4///								
	D 5/	fumier sur lentille argile	D 4	3					
D 4	D 5//	fumier sur lentille argile	D 5	2					
<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20%; text-align: center;">E</td> <td style="width: 20%;"></td> <td style="width: 40%; text-align: center;">craie, abandon</td> <td style="width: 20%; text-align: center;">E</td> <td style="width: 10%;"></td> </tr> </table>					E		craie, abandon	E	
E		craie, abandon	E						
F	F/	charbons, incendie	F	1					
	F//	fumier, habitat							

Figure 106 : Synthèse de la séquence stratigraphique de Clairvaux XIV, après les deux campagnes de fouille et corrélation avec les décapages (© P. Pétrequin). [Stratigraphy of the neolithic site Clairvaux XIV, following a 2-year excavation]

L'étude de quelques pièces architecturales effondrées sur place et les modalités de mise en place des sédiments anthropiques prouvent qu'il s'agissait de constructions à plancher rehaussé, au-dessus d'un sol toujours humide et fréquemment inondé.

A.2. L'échantillonnage

A.2.1. L'ensemble céramique

Les céramiques mises au jour sur la fouille de Clairvaux XIV lors des campagnes de 2003 et 2004 ont montré une très grande diversité de formes, ce qui n'est pas le cas pour les sites datant du Néolithique final du lac de Chalain voisin {Pétrequin 1997}. Au total, 440 individus ont été enregistrés (Figure 107). Il s'agit soit de profils archéologiquement complets c'est-à-dire de tessons ou ensemble de tessons permettant de remonter à la forme/typologie de la céramique, soit de profils non complets c'est-à-dire de tessons présentant un caractère particulier comme la présence d'un adhésif ou d'un résidu carbonisé particulièrement abondant, ou la présence d'un élément de décoration comme un téton. Ces échantillons n'ont pas été pris en compte pour le classement typologique (63 individus). L'étude des pâtes a permis de montrer qu'une série de céramiques a été importée, et qu'elle n'a été réalisée ni dans le village de CL XIV ni en contexte

de sédiment calcaire. Il a été décidé de ne pas les prendre en compte dans le classement typologique, même si leur intérêt paraît très évident pour une analyse culturelle de portée plus générale (7 individus).

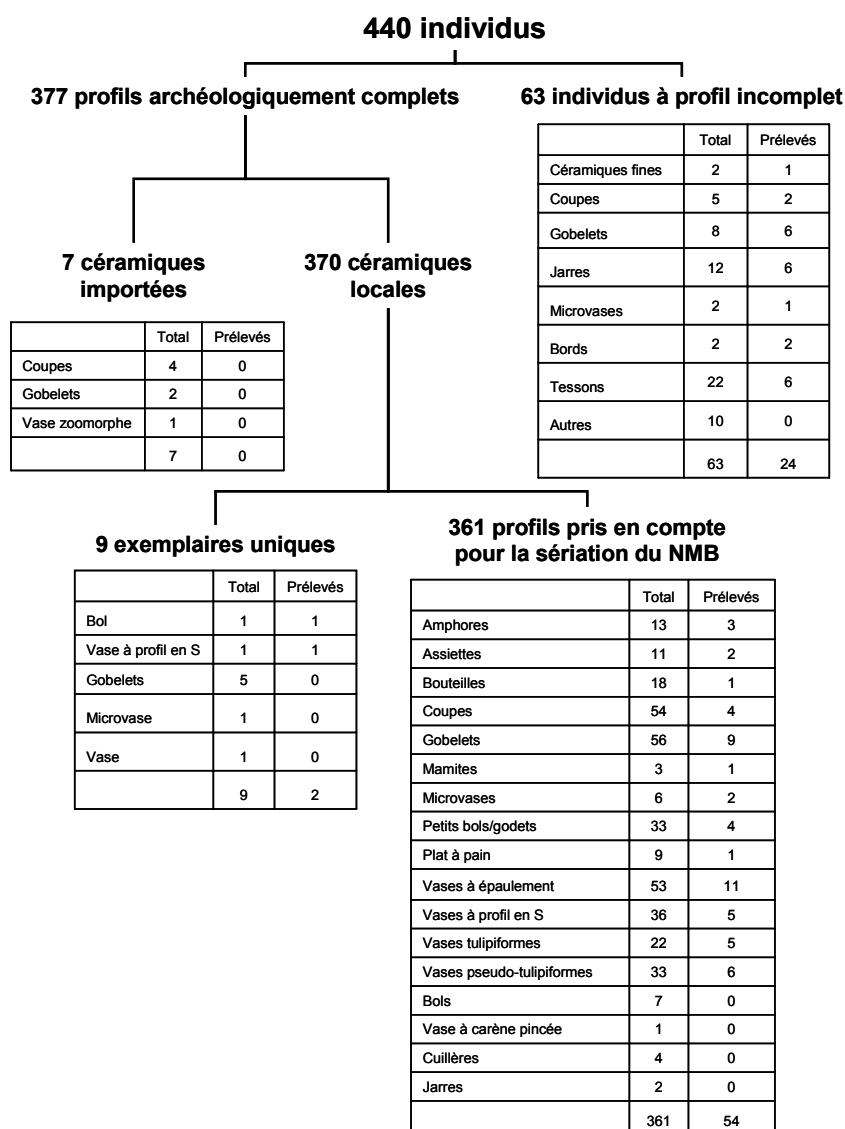


Figure 107 : Ensemble des céramiques mis au jour à Clairvaux XIV, réparties suivant leur profil, leur provenance et leur unicité, avec le nombre total de chaque groupe et le nombre de céramiques prélevées par groupe indiqués. [Pottery assemblage excavated from Clairvaux XIV, divided into groups according to the state of preservation of their shape, their origin and their uniqueness, with the total and sampled numbers of ceramics in each group indicated for each shape]

Enfin, neuf récipients sont des exemplaires uniques, c'est-à-dire qu'ils n'ont aucun répondant dans le reste de l'inventaire. Ils ont également été écartés de l'approche typologique. Au total, 361 profils ont servi de base au classement typologique des céramiques de Clairvaux XIV, sur la base de critères mis au point par A.-M. et P. Pétrequin, en fonction des données connues sur les céramiques du Néolithique Moyen Bourguignon. La comparaison avec les données provenant des sites NMB voisins (Concise phase 4, vers 3600 av. J.-C. ; CL MM V, vers 3700 av. J.-C. ; Concise phases 1 à 3, vers 3700 av. J.-C. ; Lavans-les-Dole Moulin rouge, vers

4100-4000 av. J.-C. et Clairvaux VII en cours de fouille) a montré une très bonne sériation des profils céramiques choisis (vases tulipiformes, pseudo-tulipiformes, à épaulement, à profil en S et à carène pincée) (Figure 108).

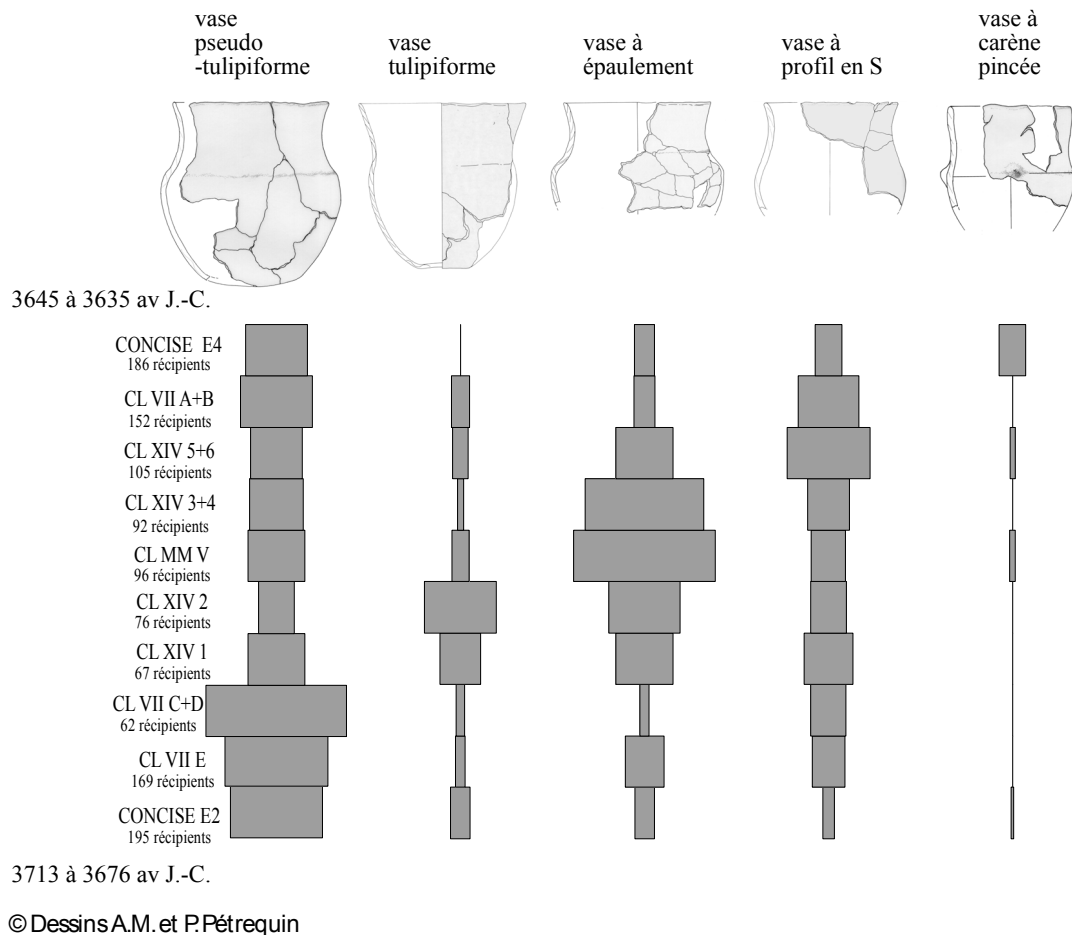


Figure 108 : Sériation des céramiques du Néolithique Moyen Bourguignon, sites de Concise, CL XIV, CL VII et CL MM V (© P. Pétrequin). [Pottery seriation of some well-dated middle neolithic sites close to CL XIV]

Le site de Clairvaux XIV peut être daté de 3730 à 3640 environ, malgré le manque de repères dendrochronologiques.

A.2.2. Les prélèvements

Lors du choix des céramiques à prélever, nous avons pris en compte les 440 individus enregistrés, qu'ils aient été ou non pris en compte dans le classement typologique. Ce choix s'est fait lors de la post-fouille, avec Pierre et Anne-Marie Pétrequin, afin de déterminer les vases les plus intéressants typologiquement, qui présentaient des caractères particuliers ou qui au contraire s'inscrivaient dans la sériation NMB. Nous avons prélevé des échantillons (tessons, résidus carbonisés et adhésifs) sur 80 individus. Il s'agit principalement de vases (à épaulement,

tulipiforme, pseudo-tulipiforme et à profil en S) et de gobelets (à carène moyenne ou basse), mais aussi de coupes (carénées, hémisphériques, à profil en S), d'assiettes, d'un bol, d'une marmite, de petits bols/godets, de microvases, de jarres, d'amphores, d'une bouteille et d'un "plat à pain".

A partir des données obtenues sur les céramiques qui avaient déjà été étudiées au laboratoire, provenant des sites de Chalain 3 et 4 et du site de Bercy, ainsi que des données de la littérature, nous avons choisi de prélever au niveau de la panse des récipients plutôt que sur le fond ou sur le bord. Les échantillons provenant du bord des récipients sont en général les plus concentrés mais aussi les plus dégradés, et les échantillons provenant du fond des récipients sont en général les moins concentrés {Charters *et al.* 1993b; Charters *et al.* 1997; Evershed *et al.* 1995a; Mirabaud 2004; Regert *et al.* 1999; Regert *et al.* 2001b}. Ceci est probablement dû à l'hydrophobicité des lipides, qui dans le cas de ragoût ou de bouillie ont tendance à se reconcentrer à la surface. Les mouvements de convection des denrées qui ont lieu pendant leur cuisson ne sont pas étrangers à cette distribution {Duplaix-Rata 1997; Pétrequin 1997}. Les échantillons prélevés au niveau de la panse sont donc le meilleur compromis entre état de conservation et concentration des lipides. Ce mode de prélèvement a été relativement simple à mettre en place pour les récipients de type vase et gobelet, pour lesquels la panse est bien définie. Dans le cas des coupes, assiettes, godets ou microvases, nous avons fait en sorte de ne pas prélever sur le fond des céramiques, mais dans la hauteur des parois. Quant aux résidus carbonisés, lorsqu'ils étaient présents en suffisamment grande quantité, ils ont été prélevés à part pour être stockés dans des tubes en verre. Enfin, des adhésifs ont eux aussi été prélevés à part pour les vases dont la morphologie était complète. Dans les autres cas, l'ensemble tesson + adhésif a été prélevé, mais seul l'adhésif a fait l'objet d'une analyse. Nous avons prélevé sur le plus de formes possibles, en prenant en considération la présence des résidus carbonisés ainsi que celle d'adhésifs. Nous avons prélevé des tessons, des résidus carbonisés associés à des tessons et des adhésifs sur 80 profils. Sur les 28 résidus carbonisés observés sur 57 tessons, seuls 19 ont pu être prélevés et analysés à part. Il n'a pas été possible de prélever les 9 autres résidus carbonisés, qui ne sont présents que sous forme de couche extrêmement fine, qui ne peut pas être séparée du tesson. Sur les 32 adhésifs observés sur 29 individus, seuls 23 ont été prélevés et analysés (Tableau 29). Enfin, un tesson et un adhésif ont été observés/prélevés en parallèle sur 6 individus.

Les résidus carbonisés sont de couleur noire ou brune très foncée ; ils sont caractérisés par une faible adhérence à la paroi de la céramique et une grande friabilité. Ils sont présents sur la paroi interne des céramiques, en couche irrégulière, plus ou moins fine avec une distribution non homogène.

Les résidus que nous appelons adhésifs sont caractérisés par une couleur brune, un aspect de texture très homogène et une bonne adhérence à la paroi des céramiques. Retrouvés sur les bords de cassures anciennes, aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur des céramiques, il s'agit

d'adhésifs de réparation. Retrouvés avec des décors à l'écorce, ils contribuent à la fixation du décor ou au décor même du récipient (adhésifs de décoration).

Les tessons sont plus amplement décrits dans les tableaux qui suivent. Suivant le type de récipients, leur porosité varie. Le choix des tessons à prélever s'est fait suivant deux critères. Tout d'abord, des tessons ont été prélevés sur la majorité des céramiques présentant des traces de résidus carbonisés sur la surface interne, que ces derniers soient prélevables ou non. Ensuite, pour que les interprétations soient élargies à l'ensemble des céramiques, nous avons essayé de prélever sur une grande diversité de formes, et de prélever proportionnellement au nombre d'individus de chaque forme.

Classes de récipients (suivant leur typologie)	Nombre total d'individus	Tessons prélevés et analysés	Résidus carbonisés observés	Résidus carbonisés analysés	Adhésifs observés	Adhésifs analysés	adhésif + tesson
Coupes + assiettes	8	7	2	1	2	1	1
Petits bols/godets + microvase + plat à pain	8	7	0	0	2 (1 profil)	2	0
Gobelets + bol + marmite	17	10	1	1	12 (11 profils)	8	4
Vases à épaulement	11	11	8	6	0	0	0
Vases tulipiformes	5	5	2	1	0	0	0
Vases à profil en S	6	6	5	3	0	0	0
Vases pseudo-tulipiformes	6	6	5	3	1	0	1
Jarres	6	3	3	3	3	2	0
Amphores + bouteilles	4	2	2	1	2	2	0
Sans forme définie	9	0	0	0	10 (9 profils)	8	0
Nombre total d'échantillons	80	57	28	19	32 (29 profils)	23	6

Tableau 29 : Profils des récipients et types d'échantillons prélevés. [Shapes of the pottery sampled, and kind of sample taken]

Les vases à épaulement sont très représentés, avec 11 profils prélevés. Sur ces profils, 8 ont montré la présence de résidus carbonisés, dont 6 ont été prélevés et analysés indépendamment du tesson. Aucun des vases à épaulement du site ne montrait de réparation par un adhésif (Tableau 31, planches 1 et 2). Sur les 6 vases à profil en S prélevés, 3 résidus ont été prélevés et analysés sur les 5 observés et là encore aucun adhésif n'a été trouvé sur l'ensemble de cette catégorie (Tableau 31, planche 3). Des résidus carbonisés ont été observés sur 2 des 5 vases tulipiformes prélevés, mais un seul a pu être prélevé et analysé. Aucun de ces vases ne montrait de réparation ou de décor à l'adhésif (Tableau 32, planche 4). Les 6 vases pseudo-tulipiformes prélevés ont, pour 3 d'entre eux, des résidus carbonisés qui ont pu être prélevés et analysés, sur 5 profils avec des traces de résidus carbonisés. Le dernier vase sans résidu carbonisé était caractérisé par une réparation avec un adhésif qui n'a pas pu être analysé (vase 215) (Tableau 32, planche 5). Pour l'ensemble des jarres, 3 tessons et 3 résidus associés ont été prélevés sur 3 profils, et 3 adhésifs ont

été observés sur 3 autres formes et 2 ont été analysés (Tableau 33, planche 6). Enfin en ce qui concerne les 3 amphores, un tesson et le résidu associé ont été prélevés, tandis que seul un tesson a été prélevé sur la bouteille, avec une très fine couche de résidu non prélevable. Deux adhésifs ont également été prélevés sur les 2 autres profils d'amphores (Tableau 33, planche 6). Dans les données sur la fabrication des vases, les numéros correspondent à un classement pour l'état de surface et le niveau de savoir faire (Tableau 30).

ETAT DE SURFACE	NIVEAU DE SAVOIR-FAIRE	COULEUR
1- lissé au doigt, sans outil, dégraissant apparent	1- faible	clair (gris, beige)
2- dégraissant légèrement apparent, lustrage sommaire au brunissoir	2- moyen	moyen (brun)
3- lustrage total au brunissoir, plus de traces de montage	3- bon	foncé (brun foncé, noir)
4- lustré, brunissoir, uni, lisse	4- très élevé	

Tableau 30 : Indications sur l'état de surface, le niveau de savoir-faire et la couleur des céramiques prélevées, déterminées par A.-M. et P. Pétrequin. [Surface treatment, level of expertise and colour of the sampled pottery]

Pour l'ensemble des 15 gobelets, 8 tessons et 1 résidu ont été prélevés. Douze adhésifs ont été observés sur 11 profils, et 8 ont été analysés. Pour 3 des gobelets (324, 213 et 60), un tesson et un adhésif ont été prélevés et analysés, et pour un gobelet (416), bien qu'un adhésif ait été observé, seul le tesson a été analysé (Tableau 34, planche 7). Le bol et la marmite n'ont montré aucune trace de résidu carbonisé ni d'adhésif. Seul un tesson a été prélevé et analysé pour chacun (Tableau 34, planche 7). Pour les coupes et les assiettes, 7 tessons et 1 résidu carbonisé ont été prélevés et analysés. Un des profils avait des traces de résidu carbonisé qui n'a pas pu être prélevé car il était présent en trop fine couche sur la paroi (coupe 310). Un adhésif a été observé sur un des profils dont un tesson a été prélevé, mais n'a pas été analysé (assiette 211). Seul un adhésif a été prélevé et analysé sur le dernier profil (coupe 222) (Tableau 35, planche 8). Pour l'ensemble petits bols/godets et microvases, aucune trace de résidu carbonisé n'a été observée. Pour les 8 profils prélevés, 7 tessons ont été analysés, et deux adhésifs provenant d'un même profil ont également été analysés (Tableau 35, planche 9). Enfin, sur les 9 tessons sans profil identifié, 10 adhésifs ont été observés et 8 ont été analysés (Tableau 36).

Catégorie de récipients	Références	Résidu		Adhésif		Numéro de référence			Nombre d'échantillons analysés			Localisation du prélèvement			Données stratigraphiques		Données morphologiques		Autres données					Dessin
	Année et N° de vase	Présence de résidu	Description	Présence d'adhésif	Description	T	R	A	T	R	A	T	R	A	Phase	M ^o	Dimensions (H cm x D cm)	Proportions	ES	NSF	C	D	Abondance	
vase à épaulement	2003- 36	1	résidu dense, brillant à l'intérieur, à analyser séparément.	0		MR1037	MR1037		1	1	0	bas de la panse (cf. dessin)	gratté sur les tessons prélevés		6	R46	? x 35	rectangle vertical	2	3	moyen	calcaire	moyen	oui
	2003- 46	0		0		MR1038			1	0	0	bas de la panse/haut du fond (cf. dessin)			6	P48 Q47	? x 15	carré	3	4	moyen	calcaire (+ calcite ?)	peu	oui
	2003- 48	1	Résidu craquelé	0		MR1039	MR1040		1	1	0	milieu de la panse (cf. dessin)	en dessous du tesson, en haut du fond (Cf. dessin)		6	Q46	22 x 20	rectangle vertical	3	3	moyen	calcaire + calcite	moyen	oui
	2003- 76	1	résidu craquelé, très pollué par des végétaux	0		MR1042	MR1043		1	1	0	panse sous épaulement (Cf. dessin)	panse sous le tesson (Cf. dessin)		4	P48	? x 30	rectangle vertical	2	3	moyen	calcaire	moyen	oui
	2003- 83	1	résidu en dépôt très fin, non prélevable	0		MR1046			1	0	0	milieu de la panse (cf. dessin)			4	Q47 R46	? x 20	rectangle vertical	2	3	moyen	calcaire	moyen	oui
	2003- 91	0		0		MR1048			1	0	0	sur la panse au niveau de l'épaulement (Cf. dessin)			3	P49	31 x 24	rectangle vertical	2	4	moyen	calcaire	moyen	oui
	2003- 151	1	traces de résidu, non prélevable	0		MR1051			1	0	0	Haut de la panse, juste sous l'épaulement (Cf. dessin)			2	P48 Q48	? x 16	rectangle vertical	2	3	moyen	calcaire	peu	oui
	2003- 184	1	traces de résidu	0		MR1055	MR1056		1	1	0	milieu de la panse (cf. dessin)	bas de la panse (Cf. dessin)		2	Q45	? x 34	rectangle vertical	3	3	moyen	calcaire	moyen	oui
	2003- 195	0		0		MR1058			1	0	0	au niveau de l'épaulement (Cf. dessin)			1	P48	? x 12		4	3	moyen	calcite	peu	oui
	2004-267	1	traces de résidu	0		MR1072	MR1073		1	1	0				1	M45 M46	? x 22		3	4	foncé	calcite	beaucoup	oui
2004-326	1	un peu de résidu interne	0		MR1085	MR1085		1	1	0				4	N46	? x plus de 19	rectangle verticale	3	3	foncé	calcaire	peu	oui	
	11	8		0					11	6	0													
vase à profil en S	2003- 183	1	résidu facilement détachable	0		MR1053	MR1054		1	1	0	panse sous épaulement	idem		2	Q45	? x 36	rectangle vertical	3	3	moyen	calcite	moyen	oui
	2003- 214	1	résidu type IV, brunâtre, traces de sédiment	0		MR1061	MR1062		1	1	0	Panse sous épaulement à tétons	juste sous un tesson, à droite du tesson		1	Q46 R46 R47	21 x 20	rectangle vertical	2	3	moyen	calcite	peu	oui
	Puisard- 240	1	résidu en dépôt très fin, non prélevable	0		MR1066			1	0	0	panse au niveau de l'épaulement			2 et 3	R45	plus de 26 x 21	rectangle vertical	2	3	moyen	calcaire	peu	oui
	2004-283	1	couche très fine de résidu, non prélevable	0		MR1076			1	0	0				6	P47 P48	? x 19		2	4	foncé	calcaire	moyen	oui
	2004-291	0		0		MR1077			1	0	0				5	Q49 N48	? x 14		2	2	moyen	calcite	moyen	oui
	2004-313	1	couche 1mm d'épaisseur, craquelé forme octogonale	0		MR1079	MR1080		1	1	0				5	O45	? x 23		3	3	moyen	calcaire	moyen	oui
	6	5		0					6	3	0													

Tableau 31 : Vases à épaulement et vases à profil en S sur lesquels des tessons et des résidus carbonisés ont été prélevés, correspondant aux planches 1, 2 et 3; T: tesson (potsherd), R: résidu (residue), A: adhésif (adhesive), ES: état de surface (surface treatment), NSF: niveau de savoir-faire (level of expertise), C: couleur (colour), D: dégraissant (temper), abondance: abondance de dégraissant (temper abundance). [Shouldered vessels and S-shaped vessels, on which potsherds and carbonised residues were sampled, their drawings are shown in the appendix, boards 1, 2 and 3]

Catégorie de récipients	Références		Résidu		Adhésif		Numéro de référence			Nombre d'échantillons analysés			Localisation du prélèvement			Données stratigraphiques		Données morphologiques		Autres données					Dessin
	Année et N° de vase	Présence de résidu	Description	Présence d'adhésif	Description	T	R	A	T	R	A	T	R	A	Phase	M°	Dimensions (H cm x D cm)	Proportions	ES	NSF	C	D	Abondance		
vase tulipiforme	2003- 130	1	résidu peu abondant, non prélevable	0		MR1049			1	0	0	panse, au niveau de l'épaulement			2	Q48 P48	13 x 12	rectangle vertical	2	3	moyen	calcite	peu	oui	
	2003- 190	0		0		MR1057			1	0	0	milieu de la panse			2	Q47	? x 38	rectangle vertical	3	3	moyen	calcite	peu	oui	
	2004-251	0		0		MR1067			1	0	0				6	N45	? x 10	rectangle vertical	corrodé	2	moyen	calcaire	moyen	oui	
	2004-371	0		0		MR1092			1	0	0				2	O48 O49	33 x 32	carré	4	4	foncé	calcite	peu	oui	
	2004-425	1	résidu interne en couche très fine	0		MR1102	MR1103		1	1	0				1	N47	22 x 22	carré	4	4	moyen	calcaire	beaucoup	oui	
5		2		0		5			1			0													

Catégorie de récipients	Références		Résidu		Adhésif		Numéro de référence			Nombre d'échantillons analysés			Localisation du prélèvement			Données stratigraphiques		Données morphologiques		Autres données					Dessin
	Année et N° de vase	Présence de résidu	Description	Présence d'adhésif	Description	T	R	A	T	R	A	T	R	A	Phase	M°	Dimensions (H cm x D cm)	Proportions	ES	NSF	C	D	Abondance		
vase pseudo-tulipiforme	2003- 80	1	résidu en dépôt très fin, non prélevable	0		MR1044			1	0	0	panse, sous l'épaulement			4	Q49	? x 16	rectangle vertical	2	2	moyen	calcaire	peu	oui	
	2003- 215	0		1	réparation d'une fissure verticale à la bétuline à l'intérieur et à l'extérieur	MR1063		MR1119	1	0	0	milieu-bas de la panse		bord	1	P49	? x 37		4	4	moyen	calcaire	peu	oui	
	2003- 216	1	résidu assez épais, bas de la panse	0		MR1064	MR1065		1	1	0	bas de la panse	sous le tesson		1	P49	? x 26.5	rectangle vertical	3	3	moyen	calcite	peu	oui	
	2004-256	1	traces de végétaux	0		MR1068	MR1069		1	1	0				5	N46	? x 22		2	3	foncé	calcaire	moyen	oui	
	2004-381	1	dépôt très fin de résidu non prélevable	0		MR1095			1	0	0				1	N47	17 x 16	rectangle vertical	4	3	clair	calcaire	peu	oui	
	2004-404	1	résidu abondant	0		MR1098	MR1099		1	1	0				5	O48	? x 24		3	3	foncé	calcaire	beaucoup	oui	
6		5		1		6			3			0													

Tableau 32 : Vases tulipiformes et pseudo-tulipiformes sur lesquels des tessons, des résidus carbonisés et des adhésifs ont été prélevés, correspondant aux planches 4 et 5; T: tesson (potsherd), R: résidu (residue), A: adhésif (adhesive), ES: état de surface (surface treatment), NSF: niveau de savoir-faire (level of expertise), C: couleur (colour), D: dégraissant (temper), abondance: abondance de dégraissant (temper abundance). [Tulipiform vessels and pseudo-tulipiforme vessels, on which potsherds, carbonised residues and adhesives were sampled, their drawings are shown in the appendix, boards 4 and 5]

Catégorie de récipients	Références	Résidu		Adhésif		Numéro de référence			Nombre d'échantillons analysés			Localisation du prélèvement			Données stratigraphiques		Données morphologiques		Autres données					Dessin	
	Année et N° de vase	Présence de résidu	Description	Présence d'adhésif	Description	T	R	A	T	R	A	T	R	A	Phase	M ^o	Dimensions (H cm x D cm)	Proportions	E S	N S F	C	D	Abondance		
Jarre (ou fragment de jarre)	2003-17	0		1	bord avec adhésif et bout d'écorce			MR1108	0	0	1			bord	6	R46								non	
	2004-338	1	2 grosses boules de résidu, à observer sous loupe pour voir si reste de morphologie. À séparer ensuite du tessou pour une analyse à part	0		MR1086	MR1086		1	1	0				3	O49								non	
	2004-373	0		1	adhésif externe			MR1131	0	0	1				1	N46					foncé	calcite	moyen	non	
	2004-379	1	résidu en couche 1mm, craquelé, traces sédiment et végétaux.	0		MR1093	MR1094		1	1	0				2	Q48 P46			2	3	moyen	calcaire	peu	oui	
	2004-412	0		1	réparation adhésif et écorce de bouleau			MR1132	0	0	0				1	N47									non
	2004-440	1	résidu abondant, noir brillant sur surface interne	0				MR1106	MR1107	1	1	0					S6/2			3	3	clair	calcite	peu	non
	6	3		3					3	3	2														
Catégorie de récipients	Références	Résidu		Adhésif		Numéro de référence			Nombre d'échantillons analysés			Localisation du prélèvement			Données stratigraphiques		Données morphologiques		Autres données					Dessin	
	Année et N° de vase	Présence de résidu	Description	Présence d'adhésif	Description	T	R	A	T	R	A	T	R	A	Phase	M ^o	Dimensions (H cm x D cm)	Proportions	E S	N S F	C	D	Abondance		
amphore	2003-65	0		1	mamelon perforé, probablement sur la base d'une grande jarre			MR1111	0	0	1				4	Q48			3	3	moyen	calcaire	moyen	oui	
	2004-432	1	traces de sédiment, épais (1,5mm)	0		MR1104	MR1105		1	1	0				1	N47	? x 32	rectangle vertical	3	4	foncé	calcaire	peu	oui	
	2004-317	0		1	adhésif externe			MR1128	0	0	1			col	5	O48	x 39		3	4	moyen	calcaire	peu	oui	
petite bouteille	2004-258	1	traces de végétaux, couche très fine, non prélevable	0		MR1070			1	0	0			sous l'épaulement du col	6	N46	? x 19	rectangle vertical	2	3	moyen	calcaire + calcite	moyen	oui	
	4	2		2					2	1	2														

Tableau 33 : Jarres, amphores et bouteilles sur lesquelles des tessons, des résidus carbonisés et des adhésifs ont été prélevés, correspondant à la planche 6; T: tesson (potsherd), R: résidu (residue), A: adhésif (adhesive), ES: état de surface (surface treatment), NSF: niveau de savoir-faire (level of expertise), C: couleur (colour), D: dégraissant (temper), abondance: abondance de dégraissant (temper abundance). [Jars, amphorae and bottle on which potsherds, carbonised residues and adhesives were sampled, their drawings are shown in the appendix, board 6]

Catégorie de récipients	Références		Résidu		Adhésif		Numéro de référence			Nombre d'échantillons analysés			Localisation du prélèvement			Données stratigraphiques		Données morphologiques		Autres données					Dessin		
	Année et N° de vase	Présence de résidu	Description	Présence d'adhésif	Description	T	R	A	T	R	A	T	R	A	Phase	M ^f	Dimensions (H cm x D cm)	Proportions	ES	NSF	C	D	Abondance				
Gobelet	carène basse	2003-42	0		1	adhésif avec bout d'écorce			MR1109	0	0	1				6	P45 Q45 Q46 R46 R47	8 x 16	rectangle horizontal	4	4	foncé	calcaire	peu	oui		
		2003-60	0		1	décor à l'écorce de boulot avec adhésif	MR1041		MR1110	1	0	1	juste au dessus de la carène		bord, externe	4	Q49	7 x 23	rectangle horizontal	4	3	moyen	calcite	peu	oui		
		2003-167	0		1	réparation adhésif et écorce de bouteau			MR1114	0	0	1			bande verticale sur hauteur du gobelet	2	Q48 N47 N49	x 22.5	rectangle horizontal	2	3	foncé	calcite	moyen	oui		
		2004-321	1	résidu? Ou simplement céramique abîmée?	0		MR1082	MR1083		1	1	0				3	M46 N45 O45	16.5 x 23	rectangle horizontal	3	3	moyen	calcaire	moyen	oui		
		2004-388	0		0		MR1096			1	0	0				1	N47 O48	6.9 x 10.5	rectangle horizontal	4	4	foncé	calcite	peu	oui		
	haut à carène moyenne	2003-213	0		1	adhésif de réparation externe, encore collé au tesson; décor vertical et probablement bandes horizontales à l'écorce de bouteau avec adhésif	MR1060		MR1118	1	0	1	juste au dessus de la carène		bord, externe	1	P48 P49	7 x 20	rectangle horizontal	4	4	moyen	calcite	peu	oui		
		2004-281	0		0		MR1075			1	0	0				5	M48	15.5 x 19	rectangle horizontal	3	3	foncé	calcaire	beaucoup	oui		
		2004-320	0		0		MR1081			1	0	0				5	M46	7.8 x 11	rectangle horizontal	2	2	foncé	calcaire	beaucoup	oui		
		2004-324	0		1	bande verticale adhésive de réparation	MR1084		MR1129	1	0	1			bande verticale sur hauteur du gobelet	4	N45	7.8 x 10.5	rectangle horizontal	3	3	foncé	calcaire	moyen	oui		
	fragment de gobelet	2004-348	0		1	réparation adhésif et écorce			MR1130	0	0	1				3	M46					foncé	calcite	peu	non		
		2004-416	0		1	présence d'une barette verticale; résidu ou adhésif? Petite quantité, à séparer éventuellement	MR1100			1	0	0				1	N47					2	2	foncé	calcaire	moyen	oui
		2004-423	0		1	réparation avec adhésif			MR1133	0	0	0			interne	1	O47									non	
					1	réparation avec adhésif			MR1134	0	0	0		externe													
		2004-427	0		1	adhésif entre écorce de boulot			MR1135	0	0	0				1	M49										non
		2004-428	0		1	adhésif de réparation			MR1136	0	0	1			externe	1	O47						3	3	foncé	indéterminé	peu
	2004-433	0		1	réparation adhésif et écorce de bouteau			MR1137	0	0	1				5	M47						4	4	foncé	calcaire	peu	non
	Bol	2003-30	0		0		MR1036			1	0	0	panse		6	R48		carré			2	2	moyen	calcite	moyen	oui	
marmite à carène moyenne	2004-350	0		0		MR1088			1	0	0			3	M46	8.3 x 14.5	rectangle horizontal			2	3	foncé	calcaire	moyen	oui		
		17	1		12				10	1	8																

Tableau 34 : Gobelets, bol et marmite pour lesquels des tessons, des résidus carbonisés et des adhésifs ont été prélevés, correspondant à la planche 7; T: tesson (potsherd), R: résidu (residue), A: adhésif (adhesive), ES: état de surface (surface treatment), NSF: niveau de savoir-faire (level of expertise), C: couleur (colour), D: dégraissant (temper), abondance: abondance de dégraissant (temper abundance). [Goblets, bowl and pot on which potsherds, carbonised residues and adhesives were sampled, their drawings are shown in the appendix, board 7]

Catégorie de récipients	Références		Résidu		Adhésif		Numéro de référence			Nombre d'échantillons analysés			Localisation du prélèvement			Données stratigraphiques		Données morphologiques		Autres données					Dessin					
	Année et N° de vase	Présence de résidu	Description	Présence d'adhésif	Description	T	R	A	T	R	A	T	R	A	Phase	M ^o	Dimensions (H cm x D cm)	Proportions	ES	NSF	C	D	Abondance							
Coupe	coupe large à carène basse	Puisard- 12	0		0				MR1035						juste au dessus du fond				6	R45	? x 16	rectangle horizontal	2	2	foncé	calcaire	beaucoup	oui		
		2004-310	1	résidu en fine couche sur l'intérieur, non prélevable	0					MR1078									5	O49	5 x 10.2	rectangle horizontal	2	2	clair	calcaire	moyen	oui		
		2004-421	0		0					MR1101									1	M45	? x 24	rectangle horizontal	4	4	foncé	calcaire	moyen	oui		
	coupe hémisphérique	2004-357	0		0					MR1089					tesson libre (1 tesson)				3	O49	? x 22	rectangle horizontal	2	3	foncé	calcaire	moyen	oui		
	coupe	2003-168	0		0					MR1052					panse				2	Q46				3	3	moyen	calcaire	moyen	oui	
		2003-222	0		1	fissure verticale réparée				MR1122	0	0	1		tesson libre (1 tesson)				1	R48									oui	
assiette	2004-365	1	résidu fin dépôt, prélèvement par grattage	0					MR1090	MR1091				1	1	0			2	N47 N46	6.5 x 36	rectangle horizontal	2	3	foncé	calcaire	beaucoup	oui		
	2003-211	0		1	fissure verticale réparée				MR1059					1	0	0			1	Q47 R45 R49 Q45 Q46 R47 R48	5.7 x 32	rectangle horizontal	3	4	moyen	calcaire	peu	oui		
		8	2		2																									
Catégorie de récipients	Références		Résidu		Adhésif		Numéro de référence			Nombre d'échantillons analysés			Localisation du prélèvement			Données stratigraphiques		Données morphologiques		Autres données					Dessin					
	Année et N° de vase	Présence de résidu	Description	Présence d'adhésif	Description	T	R	A	T	R	A	T	R	A	Phase	M ^o	Dimensions (H cm x D cm)	Proportions	ES	NSF	C	D	Abondance							
Microvase	2003-81	0		0					MR1045						tesson libre, sur hauteur du récipient				4	P48	? x 9.5			2	3	moyen	calcaire ?	peu	oui	
	2003-87	0		0					MR1047						tesson libre (1 seul tesson)				4	P48				2	2	moyen	calcaire	peu	non	
	2004-400	0		0					MR1097						tesson libre (1 seul tesson)				1	N49				2	3	foncé	calcaire	moyen	oui	
petit bol/godet	2003-150	0		0					MR1050						au niveau de la panse				2	P47	7 x 11	rectangle horizontal	1	1	moyen	calcaire	moyen	oui		
	2003-171			1	adhésif interne				MR1115	0	0	1				sur la cassure			2	P47	x 6.7	carré			2	2	moyen	calcaire ?	?	oui
					1	adhésif externe				MR1116	0	0	1				sur la cassure													
	2004-259	0		0					MR1071						tesson libre (1 seul tesson)				6	M45	2.7 x 8	rectangle horizontal	1	2	moyen	calcaire	peu	oui		
2004-346	0		0					MR1087						tesson libre (1 seul tesson)				3	M46	3 x 8.4	rectangle horizontal	2	2	moyen	calcaire	moyen	oui			
plat à pain	2004-278	0		0					MR1074						tesson libre (1 seul tesson)				3	O49				3	2	clair	calcaire	moyen	oui	
		8	0		2																									

Tableau 35 : Coupes et assiettes ainsi que les petits bols/godets, les microvases et le plat à pain sur lesquels des tessons, des résidus carbonisés et des adhésifs ont été prélevés, correspondant aux planches 8 et 9; T: tesson (potsherd), R: résidu (residue), A: adhésif (adhesive), ES: état de surface (surface treatment), NSF: niveau de savoir-faire (level of expertise), C: couleur (colour), D: dégraissant (temper), abondance: abondance de dégraissant (temper abundance). [Cups, plates, microvases, small bowls and a so-called "bread plate" on which potsherds, carbonised residues and adhesives were sampled, their drawings are shown in the appendix, boards 8 and 9]

Catégorie de récipients	Références	Résidu		Adhésif		Numéro de référence			Nombre d'échantillons analysés			Localisation du prélèvement			Données stratigraphiques		Autres données					Dessin	
	Année et N° de vase	Présence de résidu	Description	Présence d'adhésif	Description	T	R	A	T	R	A	T	R	A	Phase	M ^e	ES	NSF	C	D	Abondance		
tesson	2003- 66	0		1	rebord avec réparation; adhésif			MR1112			1			adhésif au bord, avec petits bouts d'écorce	4	Q49						non	
	2003- 67	0		1	bord avec réparation verticale; adhésif			MR1113			1			adhésif encore collé à la céramique, avec un bout libre caramélisé.	4	Q49						non	
	2003- 176	0		1	réparation avec adhésif			MR1117			1			adhésif externe, encore collé au tesson	2	Q48	3	3	moyen	calcite	peu	non	
	2003- 231	0		1	réparation avec un adhésif			MR1124			1				3	P49							non
	2003- 232	0		1	réparation d'une fissure verticale avec un adhésif			MR1125			1				6	Q47							non
	2003- 233	0		1	fissure verticale réparée avec un adhésif			MR1126			1				6	P46							
céramique fine	2003- 219	0		1	céramique fine réparée avec un adhésif			MR1120			1			adhésif interne	1	P49						non	
		0		1				MR1121			0			adhésif externe									
bord	2003- 223	0		1	bord réparé avec un adhésif			MR1123			0			adhésif externe, encore collé au tesson	1	Q47							non
	Puisard- 239	0		1	fissure verticale réparée avec un adhésif			MR1127			1				6	R45							non
		9	0		10																		

Tableau 36 : Tessons sans morphologie reconnue sur lesquels des adhésifs ont été prélevés; T: tesson (potsherd), R: résidu (residue), A: adhésif (adhesive), ES: état de surface (surface treatment), NSF: niveau de savoir-faire (level of expertise), C: couleur (colour), D: dégraissant (temper), abondance: abondance de dégraissant (temper abundance). [Potsherds, with an incomplete profile, on which adhesives were sampled]

A.3. Comparaison avec les corpus du Néolithique final de Chalain et Clairvaux

Si on compare ces données de prélèvement à ce que l'on connaît des sites voisins de Chalain 3 et 4, datant du Néolithique final, on peut remarquer plusieurs choses {Mirabaud 2004; Regert *et al.* 1999; Regert *et al.* 2001b}. Tout d'abord, la diversité typologique des vases mis au jour à Clairvaux XIV est beaucoup plus importante qu'au Néolithique final (communication orale P. Pétrequin). Au Néolithique moyen, la grande abondance de plats de service comme les gobelets et les coupes, et pas uniquement de vases à cuire, ainsi que la présence de nombreuses autres formes (microvases) supposent un usage qui n'est pas uniquement domestique. La céramique est lustrée, lissée, ce qui permet d'augmenter son étanchéité mais également d'augmenter sa valeur esthétique et sociale, ce qui n'est pas du tout le cas au Néolithique final. Au Néolithique final, la céramique n'a pas de valeur sociale, plus de 90% des poteries sont des vases à cuire, sans grande diversité de formes (communication personnelle P. Pétrequin). Les plats de service sont en bois, ce qui n'a encore jamais été trouvé au Néolithique Moyen Bourguignon, mais quelques exemplaires sont connus dans des cultures contemporaines, Cortaillod et Pfyn. Cette différence de statut de la céramique se remarque également avec les techniques de montage et de cuisson utilisées. Au Néolithique moyen, les parois sont minces au montage, et leur épaisseur est encore diminuée après le montage (Figure 109). Le niveau de savoir-faire des potiers est bien supérieur à celui du Néolithique final en ce qui concerne la cuisson, avec un véritable contrôle de la température et de l'atmosphère de cuisson, particulièrement à la descente en température. La modification de la couleur, qui n'est observée qu'au Néolithique moyen, montre une descente en température en milieu clos (four, fosse), réducteur, ce qui implique un apport de carbone, qui donne cette couleur uniforme noire à la céramique. La porosité de la pâte s'en trouve diminuée. La présence de calcite en tant que dégraissant montre également une très bonne maîtrise des températures de cuisson. En effet, si la température dans le four est trop élevée (aux alentours de 800 à 900°C), la réaction de transformation de la calcite en chaux démarre. La céramique est alors perdue.

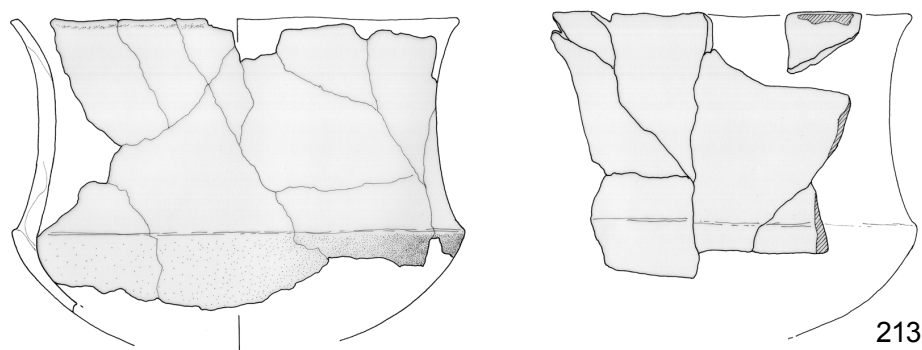


Figure 109 : Dessin d'un gobelet, n°213, avec la paroi du fond amincie après le montage. [Drawing of a goblet, n° 213, with a thinner bottom wall]

Au Néolithique final, à Chalain et Clairvaux, les pâtes sont épaisses, fortement dégraissées. Le montage est plus grossier, la céramique est plus rugueuse, plus poreuse aussi. La cuisson de la céramique ne pose pas de problème en ce qui concerne le temps et la température, il n'y a pas ce mode de descente en température en milieu clos qui permet d'uniformiser la couleur de la poterie. Il semble que des structures à l'air libre, avec le combustible disposé en forme conique soit suffisant.

Ensuite, l'abondance de résidus carbonisés est bien moindre à Clairvaux XIV, par rapport à ce que l'on trouve sur les sites voisins datant du Néolithique final. Cette situation peut s'expliquer par la différence de statut de la céramique. La plus faible proportion de vases à cuire à Clairvaux implique une plus faible proportion de résidus carbonisés.

A.4. Comment interpréter la fonction des céramiques

Les résidus organiques amorphes retrouvés dans les céramiques sont les témoins directs de leur contenu ou des matériaux utilisés pour leur finition (adhésifs, enduits). A partir de l'identification des matières qui sont à leur origine, il devient possible d'appréhender leur fonctionnalité et éventuellement leur fonction. Ce sont des questions extrêmement difficiles à aborder en contexte archéologique, et pour lesquelles les éléments de réponses sont souvent en partie fondés sur les données ethnographiques {Gallay & Huysecom 1989}. La majeure partie des classifications de céramiques se fait de manière assez globale, avec la détermination des vases à cuire, des vases de stockage et des céramiques de transport de commodités diverses {Regert 2007; Rice 1987}. Certains auteurs identifient également des céramiques à usage rituel {Perlès 1994}. Cette classification générale est basée sur les données morphologiques et physiques des céramiques ainsi que sur le contexte de mise au jour (navire pour les amphores de transport, édifice rituel pour les céramiques rituelles, principalement en Grèce et au Proche-Orient) et sur les exemples ethnographiques. S'il existe certainement une relation entre les diverses propriétés des céramiques (morphologiques telles que la forme, la taille, l'épaisseur des parois; physiques telles que la porosité, la capacité de résistance au feu, etc.) et leur fonction, il n'existe pas de corrélation univoque entre l'usage des céramiques et leurs propriétés, comme l'ont montré les données ethnoarchéologiques {Gallay & Huysecom 1989}. Nous aborderons ici principalement la question de l'usage des céramiques, ce qu'elles ont contenu et dans quel but. La question de la fonction sociale des céramiques (pourquoi une céramique est-elle fabriquée, mise en circulation, quel est son rôle au sein de la société, etc.) est beaucoup plus difficile à aborder. Nous essayerons d'y apporter des hypothèses, à partir de l'usage des céramiques.

L'usage des céramiques peut être approché par l'identification des différents types de résidus que l'on retrouve : les encroûtements carbonisés, les résidus absorbés dans les tessons, et les adhésifs, qui ont une place à part. Ils ne sont en effet pas directement liés à l'usage de la céramique contrairement aux deux autres types de résidus.

D'une manière générale, les encroûtements carbonisés, noirs, facilement détachables de la paroi, de texture rugueuse et non homogène, qui sont répartis principalement sur la paroi interne de la céramique mais aussi parfois sous forme de coulure externe, sont associés à la cuisson/préparation d'aliments, liquides ou visqueux. Ils sont caractéristiques des dernières utilisations des céramiques, encore que cela soit difficile à appréhender {Duplaix-Rata 1997; Pétrequin 1997; Regert *et al.* 1999; Regert *et al.* 2001b; Regert *et al.* 2003a; Regert 2007}. En effet, des traces de nettoyage des encroûtements carbonisés ont été observées sur les céramiques des sites de Chalain 3 et 4 (Néolithique final), et sont localisés au niveau de la panse et de la jonction de la panse et du fond. Mais les résidus carbonisés présents sous forme de coulure externe ou au bord de la céramique sont rarement nettoyés. Il n'y a donc que peu de probabilité pour que tous ces résidus carbonisés soient contemporains. Il est en revanche fort possible que les résidus présents sur la panse et à la jonction fond/panse soient bien caractéristiques des dernières utilisations/cuissons de la céramique, mais cela reste une question ouverte. Le fait que les résidus soient principalement situés à cet endroit sur la paroi interne des récipients a été interprété comme le résultat des mouvements de convection créés par le chauffage et le mélange de mixtures liquides ou visqueuses {Duplaix-Rata 1997; Pétrequin 1989, 1997}. Il existe d'autres types de résidus carbonisés, qui peuvent être les témoins de la préparation et du stockage d'adhésifs {Regert *et al.* 2003b; Regert 2007}, ou encore de l'enduction de matière grasse sur la surface interne ou externe. L'enduction à chaud au sortir de la cuisson des céramiques avec des matières grasses est un phénomène peu observé à Clairvaux XIV. Dans ces deux cas, les résidus sont répartis de manière homogène sur l'ensemble de la paroi de la céramique, et sont présents en fine et très fine couche respectivement, adhérant fortement à la paroi. En revanche, l'enduction des céramiques tièdes, avec de la cire ou bien des matières grasses animales (lard, lait, etc.), est plus difficile à identifier (Communication personnelle P. Pétrequin). Suivant la température de la céramique au moment de l'enduction, il est possible qu'il n'y ait pas de traces carbonisées comme ce que l'on peut voir avec l'enduction à chaud, mais seulement une absorption par la paroi poreuse de matière grasse. Cette technique mériterait de faire l'objet d'expérimentations, afin d'en déterminer les traces visibles ou non visibles.

Les résidus non visibles, piégés et conservés dans la matrice argileuse peuvent être caractéristiques d'un certain nombre d'usages. Les mécanismes d'absorption de la matière organique sont dépendants de nombreux facteurs, parmi lesquels la porosité de la céramique, la capacité du liquide à s'absorber, le chauffage, le temps de contact du mélange et de la paroi, la présence d'un enduit imperméabilisant, etc. Lorsqu'on observe sur une céramique des traces de chauffage (traces de

suie à l'extérieur par exemple) ou des traces de résidus carbonisés, les résidus organiques absorbés dans la céramique peuvent être associés à la cuisson des aliments ou au traitement thermique d'autres substances {Charters *et al.* 1993b; Charters *et al.* 1997; Evershed *et al.* 1990a; Evershed *et al.* 1992a; Evershed *et al.* 1995a; Evershed 2000; Regert *et al.* 2003a; Regert 2007}. Il peut aussi s'agir de résidus provenant des matières naturelles qui ont été stockées et conservées dans ces céramiques. Ces céramiques ne portent alors pas de trace de chauffage. L'absence de résidu carbonisé ne veut donc pas dire que la céramique n'a pas été utilisée. Enfin, comme nous l'avons discuté plus haut, les résidus organiques non visibles peuvent aussi provenir de matières grasses qui ont servi à enduire les céramiques, afin de diminuer leur porosité par exemple (paroi interne), ou de leur donner un état de surface particulier (paroi externe).

Le dernier type de résidus observé à Clairvaux XIV est constitué de matériaux bruns, opaques, homogènes, présents autour de fissures anciennes ou sous des décors à l'écorce. Il s'agit d'adhésifs, qui ont pu servir à réparer la céramique ou à coller les décors. Ils sont donc les témoins d'une activité technique, relative à la production et/ou à la réparation des céramiques. Cependant, ces résidus n'ont jamais été retrouvés en dépôts carbonisés ou non à l'intérieur des céramiques, en dehors de fissures bien repérées, ce qui montre que les céramiques n'ont pas servi à la production ou au stockage d'adhésif. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer le manque de données sur la fabrication des adhésifs sur ce site. Ces derniers ont pu être importés d'autres groupes, ou bien avoir été produits en dehors du village, sur un site plus ou moins spécialisé et non pas de manière domestique. Il se peut également que le brai de bouleau n'ait pas été préparé dans des céramiques, comme cela était le cas pour les adhésifs mésolithiques et paléolithiques déjà identifiés {Aveling & Heron 1998; Koller *et al.* 2001}.

A partir de l'identification de ces trois types de résidus, carbonisés, absorbés et adhésifs, il devient possible d'identifier le contenu des céramiques, dans le cas où ce contenu a laissé des traces. A partir de l'identification des matières naturelles, l'usage des céramiques est abordé de manière directe, de même que des questions relatives à la gestion des ressources naturelles, sauvages ou domestiques.

B. Les matières naturelles identifiées dans les céramiques de Clairvaux XIV

B.1. Bilan global

Sur les 440 individus déterminés par A.-M. et P. Pétrequin, nous en avons sélectionné 80 sur lesquels nous avons réalisé des prélèvements. Ainsi, 57 tessons, 19 résidus carbonisés associés à des tessons et 23 adhésifs ont été prélevés et analysés. La recherche de matière grasse a été effectuée sur les 57 tessons et les 19 résidus carbonisés associés, sur 57 profils archéologiques. La recherche de matière grasse en parallèle de la recherche de la composition d'adhésif de réparation porte sur 6 profils archéologiques (Tableau 29).

Les 23 échantillons d'adhésif ont tous été identifiés comme du brai de bouleau. Dans 15 profils archéologiques (7 vases, 1 jarre, 1 bouteille, 1 coupe, 1 assiette, 2 gobelets, 1 microvase, et 1 plat à pain) aucun lipide n'a été détecté, et dans 9 profils archéologiques (6 vases, 1 jarre, 1 bol et 1 microvase) seuls des acides gras qui ne sont caractéristiques d'aucune matière grasse particulière ont été détectés (Figure 110 & Tableau 37).

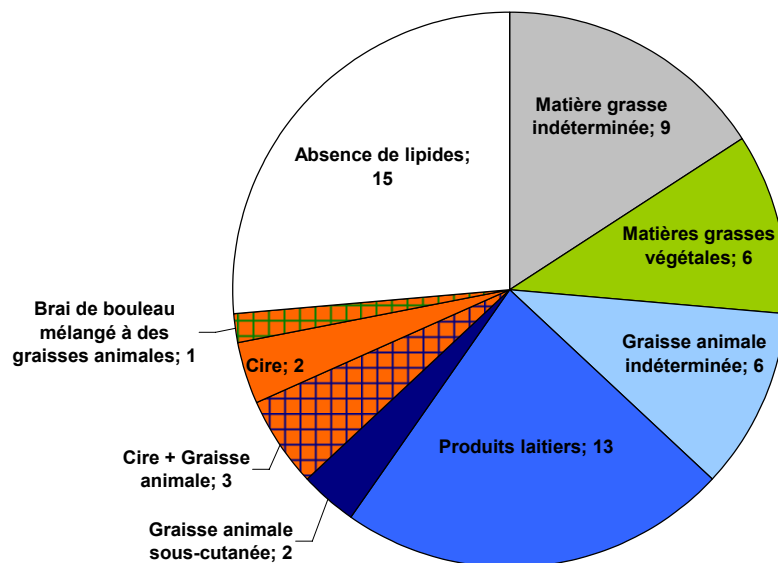


Figure 110 : Matériaux hors adhésifs identifiés dans les céramiques prélevées sur le site de Clairvaux XIV. [Organic materials, except for the adhesives, that were identified in the ceramics from Clairvaux XIV]

Références		Résidu		Adhésif		Numéro de référence			Nombre d'échantillons analysés			Localisation du prélèvement			identification GC
Catégorie de récipients	Année et N° de vase	Présence de résidu	Description	Présence d'adhésif	Description	Tesson	Résidu	Adhésif	Tesson	Résidu	Adhésif	Tesson	Résidu	Adhésif	
vase à épaulement	2003- 46	0		0		MR1038			1	0	0	bas de la panse/haut du fond			Matière grasse indéterminée
	2003- 76	1	résidu craquelé, très pollué par des végétaux	0		MR1042	MR1043		1	1	0	panse sous épaulement	panse sous le tétou		Rien
	2003- 83	1	résidu en dépôt très fin, non prélevable	0		MR1046			1	0	0	milieu de la panse			Rien
	2003- 91	0		0		MR1048			1	0	0	sur la panse au niveau de l'épaulement			Matière grasse indéterminée
	2004-326	1	un peu de résidu interne	0		MR1085	MR1085		1	1	0				Matière grasse indéterminée
vase à profil en S	2003- 183	1	résidu facilement détachable	0		MR1053	MR1054		1	1	0	panse sous l'épaulement	idem		Matière grasse indéterminée
	Puisard-240	1	résidu en dépôt très fin, non prélevable	0		MR1066			1	0	0	panse au niveau de l'épaulement			Rien
	2004-283	1	couche très fine de résidu, non prélevable	0		MR1076			1	0	0				Rien
vase tulipiforme	2004-251	0		0		MR1067			1	0	0				Rien
	2004-371	0		0		MR1092			1	0	0				Rien
vase pseudo-tulipiforme	2003- 80	1	résidu en dépôt très fin, non prélevable	0		MR1044			1	0	0	panse, sous l'épaulement			Matière grasse indéterminée
	2003- 215	0		1	réparation d'une fissure verticale à la bétuline à l'intérieur et à l'extérieur	MR1063		MR1119	1	0	0	milieu-bas de la panse		bord	Matière grasse indéterminée
	2004-381	1	dépôt très fin de résidu non prélevable	0		MR1095			1	0	0				Rien

Jarre (ou fragment de jarre)	2004-379	1	résidu en couche 1mm, craquelé, traces sédiment et végétaux.	0		MR1093	MR1094		1	1	0				Rien
	2004-440	1	résidu abondant, noir brillant sur surface interne	0		MR1106	MR1107		1	1	0				Matière grasse indéterminée
petite bouteille	2004-258	1	traces de végétaux, couche très fine, non prélevable	0		MR1070			1	0	0	sous l'épaulement du col			Rien
Gobelet haut à carène moyenne	2003- 213	0		1	adhésif de réparation externe, encore collé au tesson; décor vertical et probablement bandes horizontales à l'écorce de bouleau avec adhésif	MR1060		MR1118	1	0	1	juste au dessus de la carène		bord, externe	Rien
	2004-320	0		0		MR1081			1	0	0				Rien
Bol	2003- 30	0		0		MR1036			1	0	0	panse			Matière grasse indéterminée
coupe hémisphérique	2004-357	0		0		MR1089			1	0	0	tesson libre (1 tesson)			Rien
assiette	2003- 211	0		1	fissure verticale réparée	MR1059			1	0	0	au dessus du fond			Rien
Microvase	2003- 81	0		0		MR1045			1	0	0	tesson libre, sur hauteur du récipient			Rien
	2004-400	0		0		MR1097			1	0	0	tesson libre (1 seul tesson)			Matière grasse indéterminée
plat à pain	2004-278	0		0		MR1074			1	0	0	tesson libre (1 seul tesson)			Rien
		24	11	3					24	5	1				

Tableau 37 : Liste des céramiques de CLXIV dans lesquelles aucune trace de lipides ou seules des traces de matières grasses indéterminées ont été détectées (exception faite des adhésifs, cf. paragraphe B.4). [List of the pottery vessels that did not show any lipids left, or just traces of unidentified fatty matter]

Des matières grasses végétales ont été identifiées dans 6 profils (5 vases et 1 jarre), des graisses animales indéterminées dans 8 profils archéologiques (4 vases, 1 amphore, 1 gobelet, 1 coupe et 1 assiette). Parmi ceux-ci, le gobelet contenait un mélange de graisse animale indéterminée et de brai de bouleau, et la coupe contenait un mélange de cire d'abeille et de graisse indéterminée. Des produits laitiers ont été identifiés dans 14 profils (5 vases, 1 coupe, 3 gobelets, 1 marmite, 1 microvase et 3 petits bols/godets). Un des gobelets contenait de la cire d'abeille en plus des produits laitiers. Des graisses sous-cutanées ont été identifiées dans 1 vase et 1 coupe, et des graisses sous-cutanées mélangées à de la cire d'abeille ont été identifiées dans 1 coupe également. Enfin, de la cire d'abeille a été identifiée seule dans 1 vase et 1 gobelet (Figure 110). Ces résultats ont été obtenus grâce à l'analyse des échantillons non seulement en chromatographie en phase gazeuse mais également grâce à la mise en place d'analyses en spectrométrie de masse à ionisation douce.

B.2. Les matières grasses végétales

Des matières grasses végétales ont été identifiées dans 6 céramiques (13 tessons et résidus analysés). Pour les céramiques 36, 267 et 216, le tesson et le résidu carbonisé analysés ont montré la présence de composés caractéristiques d'huile végétale. Les résidus sont beaucoup plus concentrés que les tessons (entre 200 et 1700 µg/g et entre 11 et 21 µg/g respectivement). Pour les céramiques 404 et 425, seul le résidu carbonisé a montré la présence de marqueurs des huiles végétales, à une concentration comprise entre 350 et 750 µg/g. Enfin, pour la jarre 338, un tesson et le résidu n'ont montré aucune trace de lipides, mais un deuxième tesson a montré la présence de marqueurs des huiles végétales. Dans ce tesson, les matières grasses sont très peu concentrées (21 µg/g).

Nous verrons tout d'abord la méthodologie d'identification des huiles archéologiques avant d'interpréter les données obtenues dans le contexte de Clairvaux XIV.

B.2.1. Identification des huiles végétales par HT CPG

Les composants majoritaires des huiles végétales fraîches sont les triglycérides, mais dans les résidus organiques archéologiques, ceux-ci sont le plus souvent dégradés, et seuls les acides gras constitutifs sont détectés. Contrairement aux graisses animales, les acides gras composant des huiles végétales sont peu variés, et se distinguent surtout par leur degré d'insaturation (nombre de doubles liaisons), la position des doubles liaisons et leur stéréochimie (*cis* ou *trans*) {Holcapek *et al.* 2003; Jakab *et al.* 2002; Kalo & Kuuranne 2001; Kimpe *et al.* 2001; Mottram *et al.* 1997; O'Brian 1999; Sandra *et al.* 2002}. Il existe cependant un certain nombre de critères permettant d'identifier la présence d'huiles végétales dégradées (Tableau 38) {Colombini *et al.* 2005b; Condamin *et al.* 1976; Condamin & Formenti 1978; Copley *et al.* 2005e; Dudd *et al.* 1998}.

Huiles végétales	Stérols	$C_{16:0}/C_{18:0}$	$C_{18\text{insaturés}}/C_{18:0}$	$C_{12:0}, C_{14:0},$ $C_{15:0}, C_{17:0}$
	Stigmastérol et/ou β -sitostérol	$\gg 1$	$\gg 1$	Très minoritaires

Tableau 38 : Critères d'identification des huiles végétales en HT CPG et HT CPG/SM de l'extrait lipidique total après triméthylsilylation et analyse sur colonne apolaire, méthode MR1CER (encadrés 3 et 9) , pour le site de CL XIV. [Molecular markers of vegetable oil, identified by HT GC and HT GC/MS, after trimethylsilylation and analysis on an apolar column]

Dans les huiles fraîches, l'acide palmitique $C_{16:0}$ est majoritaire par rapport à l'acide stéarique $C_{18:0}$, et l'ensemble des acides C_{18} insaturés est présent en plus grande quantité que l'acide stéarique. Ce constat, valable pour les huiles fraîches, s'est aussi montré valable pour les échantillons de Clairvaux XIV. Les autres acides gras sont quasiment absents ou très fortement minoritaires ($C_{12:0}$, $C_{14:0}$, $C_{15:0}$ et $C_{17:0}$). De même, la présence de phytostérols tels que le stigmastérol et le β -sitostérol, est caractéristique de végétaux. Ces stérols sont cependant présents en très faible quantité et peuvent donc ne pas être détectés. Ces critères sont résumés dans le Tableau 38. La Figure 111 ci-dessous montre le chromatogramme type d'une huile végétale, identifiée dans le résidu carbonisé du vase 267.

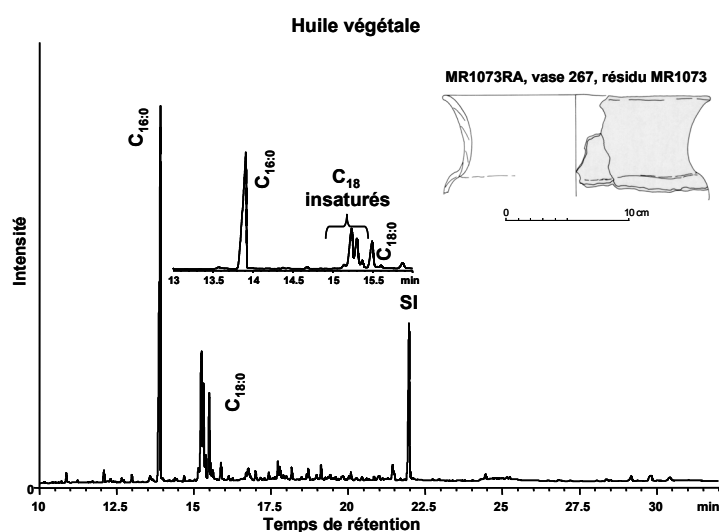


Figure 111 : Chromatogramme de l'échantillon MR1073RA (vase à épaulement 267), caractéristique d'une huile végétale (méthode MR1CER, encadrés 3 et 9). [Gas chromatogram of sample MR1073RA (shouldered vessel 267), characteristic of degraded vegetable oil]

Si ces chromatogrammes permettent de supposer la présence d'huile végétale, il n'est absolument pas possible d'avoir accès à la nature de la plante d'origine à partir des informations obtenues en HT CPG. Les céramiques dans lesquelles ce type de marqueurs a été identifié sont listées dans le Tableau 39, avec les résultats obtenus en chromatographie en phase gazeuse.

Références		Données chromatographiques, colonne apolaire CP Sil 5CB, méthode MR1CER				
Morphologie	Année et N° de vase	Numéro de l'échantillon	Type d'échantillon	Concentration en lipides (µg/g échantillon)	% AG	% TAGs
Vases à épaulement	2003- 36	MR1037T	tesson	11.96	38.82	0.00
		MR1037R	résidu	227.94	40.47	0.00
	2004-267	MR1072T	tesson	21.26	80.39	0.00
		MR1073R	résidu	1424.18	72.49	2.95
Vase tulipiforme	2004-425	T1102A	tesson	0.00	0.00	0.00
		R1103A	résidu	752.74	56.56	0.00
Vases pseudo tulipiformes	2003- 216	T1064A	tesson	12.03	18.46	0.00
		R1065A	résidu	1556.01	46.46	1.33
	2004-404	MR1098T	tesson	0.00	0.00	0.00
		MR1099R	résidu	355.52	50.98	4.40
Jarre	2004-338	MR1086C	tesson 2	0.00	0.00	0.00
		T1086E	tesson 3	21.08	37.40	0.00
		MR1086D	résidu 2	0.00	0.00	0.00

Tableau 39 : Résultats obtenus en HT CPG pour les céramiques dans lesquelles des marqueurs de graisses végétales ont été détectés (méthode MR1CER, encadrés 3 et 9). [Ceramics where vegetable oil markers were detected using HT GC on an apolar column]

C'est pourquoi une nouvelle méthodologie a été développée afin de mieux identifier les huiles végétales archéologiques.

B.2.2. Analyse chromatographique des huiles végétales sur colonne polaire

B.2.2.1. Analyse des huiles de référence

A partir de ces considérations, le développement d'une méthodologie axée sur les acides gras a été mené, avec des huiles provenant de la collection de substances naturelles conservée au laboratoire, comestibles et non comestibles. Le choix de ces huiles s'est fait par rapport aux différentes plantes oléagineuses connues à cette époque et déjà identifiées sur des sites archéologiques {Colombini *et al.* 2005b; Condamin *et al.* 1976; Copley *et al.* 2005e}. Il s'agit d'huile de lin (2 échantillon), d'huile de noix (3 échantillons), d'huile de noisette (1 échantillon), d'huile de pavot (huile d'œillette, 1 échantillon), d'huile d'olive (3 échantillons), d'huile de palme (1 échantillon) et d'huile de pistachier (2 échantillons). Sur le site de Clairvaux XIV, des graines de lin

(*Linum usitatissimum*), de pavot (*Papaver somniferum*) et des noisettes (fruit du *Corylus*) ont été trouvées, en plus de glands (fruit du *Quercus*) en très grande quantité. Leur utilisation pour la production d'huile n'est cependant pas attestée. Les huiles de noix et d'olive sont tardives (Age du Fer/époque romaine et Age du bronze respectivement). L'huile de palme et l'huile de pistachier proviennent de climats chauds et n'ont pas, à notre connaissance, été importées en Europe tempérée avant l'époque romaine.

La méthodologie est développée au chapitre II, nous ne la décrivons que brièvement. Les échantillons sont dérivés à l'aide du complexe de trifluorure de bore dans du propanol (BF_3/PrOH). Il s'agit d'une transestérification, qui va à la fois hydrolyser les triglycérides et méthyler les acides gras (libres ou dé-estérifiés). Une fois dérivés, les échantillons sont analysés en chromatographie en phase gazeuse sur une colonne adaptée à la séparation des acides gras (Tableau 40).

Huile	Echantillon	CPG	Principaux acides gras
Huile de lin clarifiée	H001	H001A	C _{18:3}
Huile de lin décolorée	H003	H003A	C _{18:3}
Huile de noix à l'olivier	H004	H004A	C _{18:2}
Huile de noix du Périgord	H005	H005A	C _{18:2}
Huile de noix Lesieur	H006	H006A	C _{18:2}
Huile de noisette Produits de France	H007	H007A	C _{18:1}
Huile d'oeillette (pavot)	H008	H008A	C _{18:2}
Huile d'olive Casino	H009	H009A	C _{18:1}
Huile d'olive Lesieur	H010	H010A	C _{18:1}
Huile d'olive Puget	H011	H011A	C _{18:1}
Huile de palme	H013	H013A	C _{16:0} et C _{18:1}
Huile de pistachier (fraction liquide)	H014	H014A	C _{16:0} , C _{18:1} et C _{18:3}
Huile de pistachier (fraction solide)	H015	H015A	C _{16:0} et C _{18:1}

Tableau 40 : Liste des échantillons d'huiles de références analysés sur colonne Select FAME (méthode FAME, encadrés 4 et 11). [Vegetable oil reference samples analysed by GC on a fatty-acid-specific column]

Les principaux acides gras des huiles de référence, détectés grâce à cette méthode, sont donnés dans le Tableau 40, et la Figure 112 présente quelques chromatogrammes obtenus, toujours avec cette méthode.

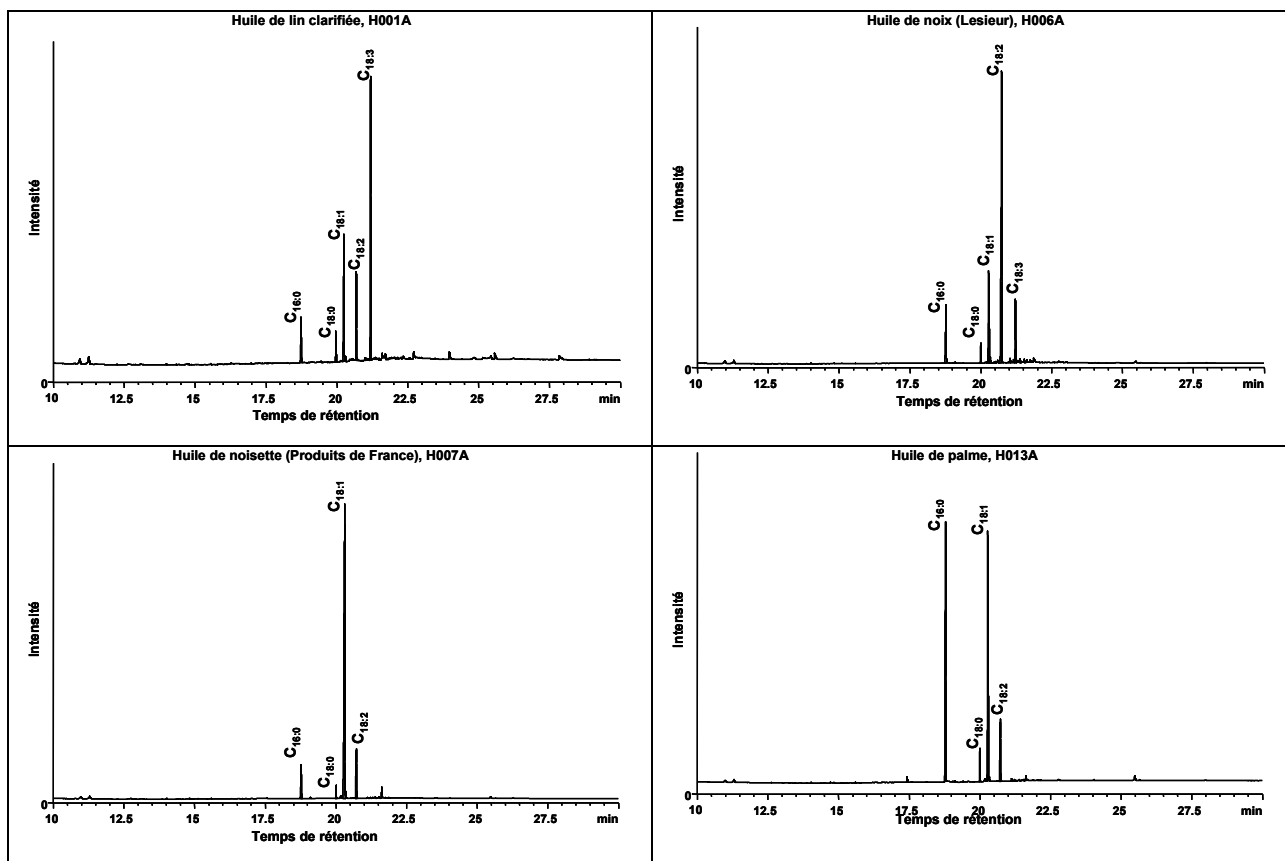


Figure 112 : Chromatogrammes des huiles de référence (huile de lin clarifiée, huile de noix, huile de noisette et huile de palme, méthode FAME, encadrés 4 et 11). [Gas chromatograms of some reference oils (linseed oil, walnut oil, hazelnut oil and palm oil), analysed using a fatty-acid specific column]

L'utilisation de ce type de colonne (Select FAME, Varian) permet de séparer avec une très bonne résolution les acides gras qui ont le même nombre d'atomes de carbone mais un nombre de doubles liaisons différent, tels que le $C_{18:0}$, le $C_{18:1}$, le $C_{18:2}$ et le $C_{18:3}$. Nous n'avons pas cherché à déterminer la position des doubles liaisons sur le squelette carboné, bien qu'il soit possible grâce à ce type de colonne de les séparer.

Nous avons tracé un histogramme des aires normalisées des acides gras détectés pour chacune des huiles de référence (Figure 113). Certaines huiles se différencient nettement des autres, notamment l'huile de palme composée à parts égales d'acide palmitique et d'acide oléique ainsi que les 2 fractions (solide et liquide) de l'huile de pistachier. L'huile d'oeillette et l'huile de noix ont des compositions très proches et se différencient par la présence d'acide $C_{18:3}$ dans l'huile de noix. Les huiles d'olive et l'huile de noisette ont également des compositions très proches, avec une majorité de $C_{18:1}$, mais avec des proportions inversées de $C_{16:0}$ et de $C_{18:2}$. Enfin, les huiles de lin se distinguent car elles sont principalement composées de $C_{18:3}$.

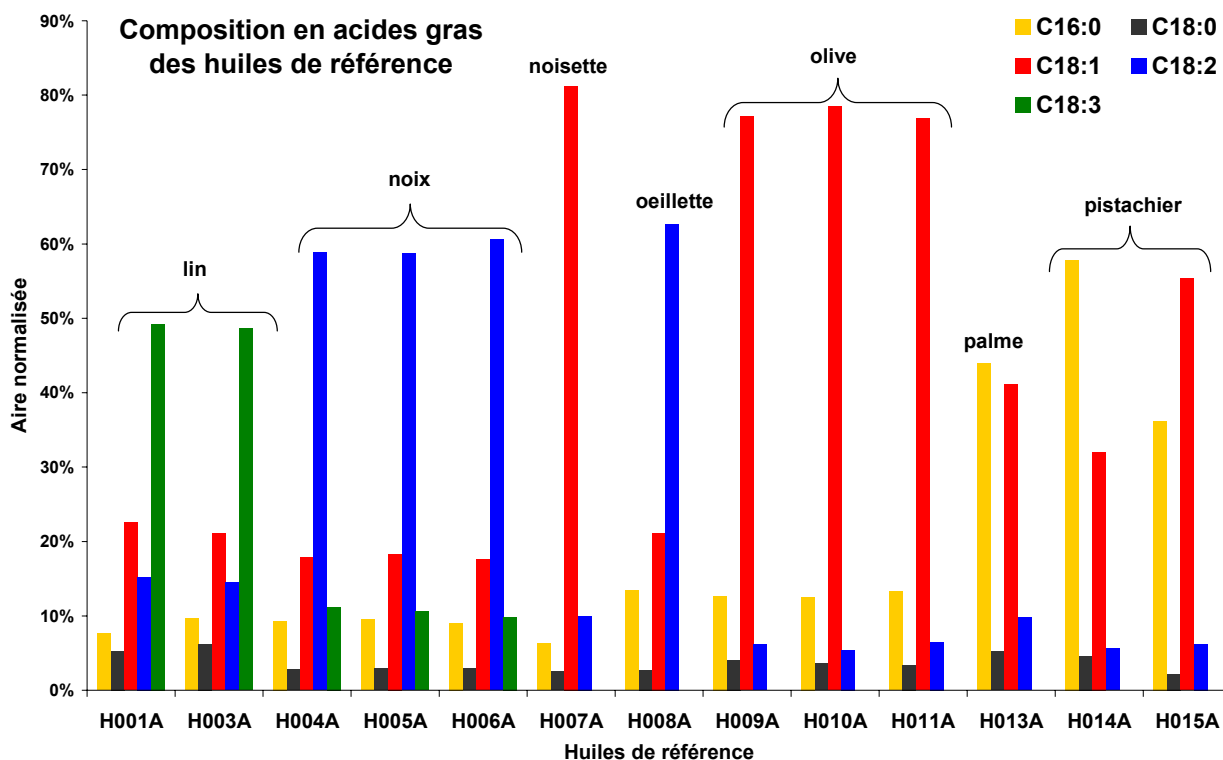


Figure 113 : Composition en acides gras (aires normalisées par rapport à la somme des aires) des huiles de référence, données obtenues en CPG sur colonne apolaire de 50 m (méthode FAME, encadrés 4 et 11). [Fatty acid composition of reference oils, obtained by GC on a fatty-acid specific column]

Afin de comparer les compositions en acides gras des huiles de référence, nous avons tracé sur un diagramme ternaire les aires normalisées des acides gras $C_{16:0}$, $C_{18:0}$ et $C_{18:1}$ (Figure 114). La normalisation a été faite en ne prenant en compte que les aires de ces trois acides.

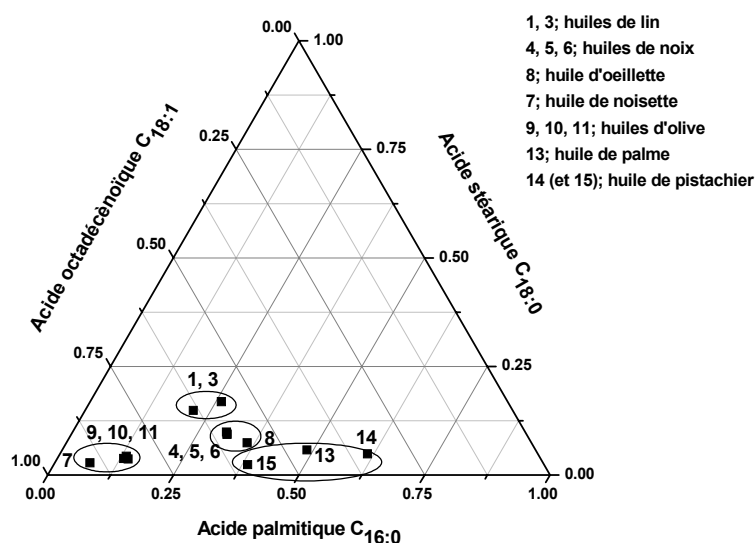


Figure 114 : Diagramme ternaire des aires normalisées des acides gras $C_{16:0}$, $C_{18:0}$ et $C_{18:1}$ pour les huiles de référence, données obtenues en CPG sur colonne polaire de 50 m (méthode FAME, encadrés 4 et 11). [Ternary diagram of the normalised areas of $C_{16:0}$, $C_{18:0}$ and $C_{18:1}$ from reference oils, data obtained by GC on a fatty-acid specific column]

Les mêmes groupes que sur l'histogramme présenté en Figure 113 se distinguent. Il s'agit des huiles de lin (points 1 et 3), du groupe des huiles de noix et de l'huile d'œillette (points 4, 5 et 6 et point 8) et du groupe des huiles d'olive et de l'huile de noisette (points 9, 10 et 11 et point 7). Les huiles de palme et de pistachier (point 13 et points 14 et 15) paraissent moins proches sur ce diagramme ternaire que sur l'histogramme.

Nous avons ensuite analysé avec ce protocole les échantillons archéologiques qui présentaient des compositions en acides gras susceptibles d'être caractéristiques de matières grasses végétales.

B.2.2.2. Analyse des échantillons archéologiques

Nous avons analysé avec cette méthode les échantillons qui ont montré la présence de marqueurs des huiles végétales en chromatographie en phase gazeuse sur colonne apolaire de 15m (Méthode MR1CER). Nous avons choisi les échantillons les plus concentrés, c'est-à-dire les résidus des vases 36 (MR1037R), 216 (R1065A), 267 (MR1073R), 404 (MR1099R) et 425 (R1103A) (Tableau 41). Le tesson de la jarre 338 qui a montré la présence de marqueurs végétaux est très peu concentré et n'a donc pas été analysé ainsi.

TLE	V _{prélevé} (μL)	Echantillon	V _{final} (μL)	CPG	Commentaires
MR1037R	100	1037R2	80	1037R2A	Diacides, C _{16:0} et C _{18:0} + traces de C ₁₈ insaturés
MR1073R	100	1073R1	30	1073R1A	Diacides, C _{16:0} , C _{18:0} et 2 isomères du C _{18:1}
MR1099R	100	1099R1	30	1099R1A	Diacides, C _{16:0} , C _{18:0} et 2 isomères du C _{18:1}
R1065A	100	R1065A1	30	R1065A1A	Diacides, C _{16:0} et C _{18:0} + traces de C ₁₈ insaturés
R1103A	100	R1103A1	30	R1103A1A	Diacides, C _{16:0} , C _{18:0} et 2 isomères du C _{18:1}

Tableau 41 : Echantillons archéologiques analysés après transpropylation sur colonne select FAME (méthode FAME, encadrés 4 et 11). [Archaeological samples analysed by GC with a fatty-acid specific column, after transpropylation]

Les résultats obtenus montrent une très mauvaise conservation des acides gras insaturés, même si la résolution des acides gras C₁₈ insaturés est meilleure qu'avec une analyse sur colonne apolaire (Figure 115).

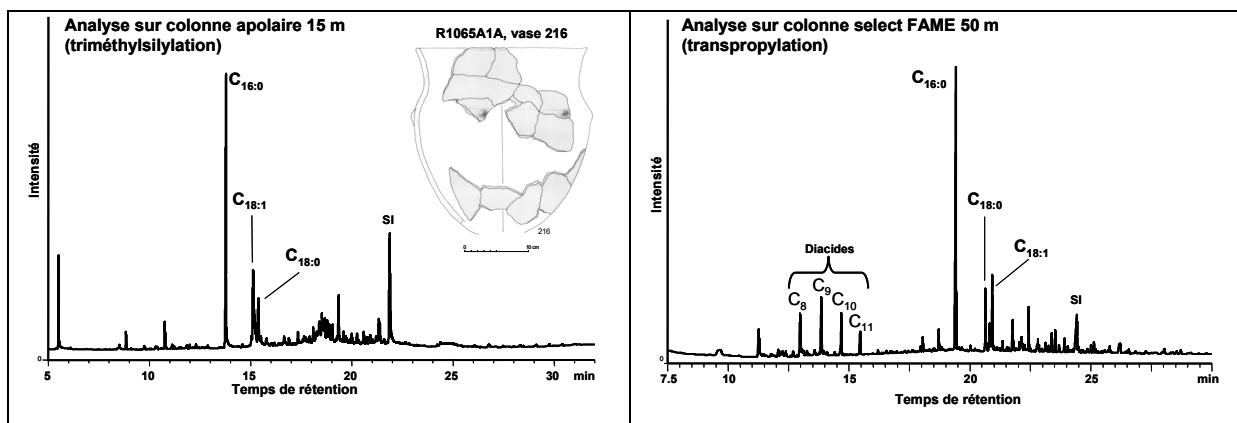


Figure 115 : Chromatogrammes de l'échantillon R1065A1, obtenus en CPG sur colonne apolaire de 15m (méthode MRICER, encadrés 3 et 9) et sur colonne polaire de 50 m (méthode FAME, encadrés 4 et 11). [Gas chromatograms of sample R1065A1 by HT HC on an apolar column and by GC on a fatty-acid specific column]

Afin de comparer les données obtenues sur les échantillons archéologiques à celles obtenues pour les huiles de référence, nous les avons ajoutées à l'histogramme puis au diagramme ternaire (Figure 116 & Figure 117).

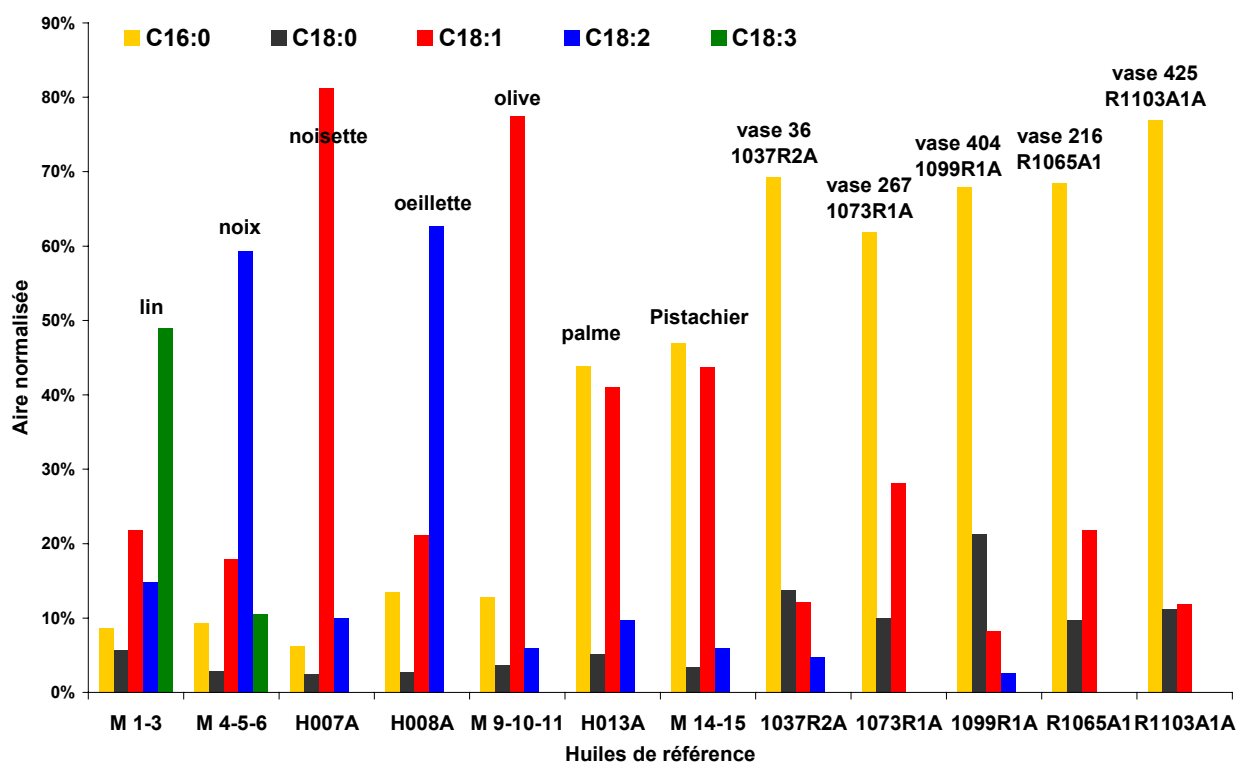


Figure 116 : Composition en acides gras (aires normalisées par rapport à la somme des aires) des huiles de référence et des échantillons archéologiques. Les échantillons d'huiles de lin, de noix, d'olive et de pistachier ont été moyennés pour plus de clarté, données obtenues en CPG sur colonne apolaire de 50 m (méthode FAME). [Fatty acid composition of the reference samples and the archaeological samples, data obtained by GC using a fatty-acid specific column]

Il n'est pas possible de déterminer l'origine spécifique des échantillons archéologiques à partir des données que nous avons obtenues, d'autant plus qu'il n'existe pas de biomarqueurs spécifiques de ces huiles. Il peut s'agir d'un problème de référentiel, mais plus probablement d'un problème dû à l'état de dégradation des échantillons archéologiques. Un vieillissement de tessons imprégnés d'huile permettrait de suivre la dégradation des acides gras insaturés et peut-être de trouver d'autres critères de différenciation, mais le temps imparti à cette étude n'a pas permis de mettre en œuvre ce protocole.

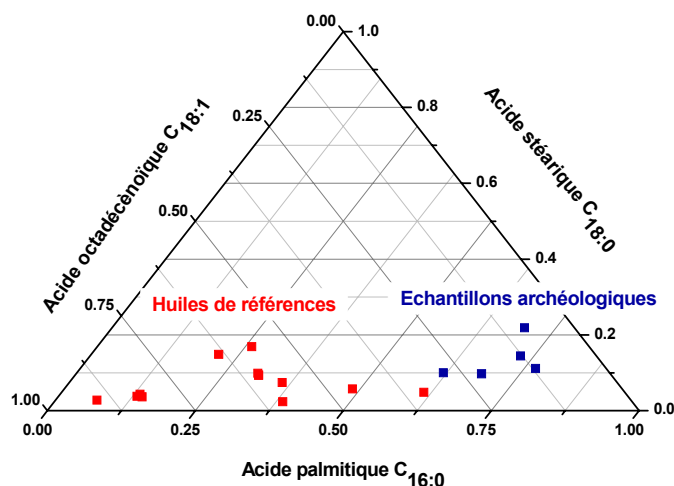


Figure 117 : Diagramme ternaire des aires des pics de $C_{16:0}$, $C_{18:0}$ et $C_{18:1}$, avec, en rouge, les huiles de référence et, en bleu, les échantillons archéologiques (méthode FAME). [Ternary diagram of the normalised areas of $C_{16:0}$, $C_{18:0}$ and $C_{18:1}$ of the reference oils (red) and the archaeological samples (blue)]

Néanmoins, l'analyse des échantillons archéologiques avec cette méthode a permis de mettre en évidence un point très intéressant. En effet, des diacides ont été détectés (Figure 115), qui n'avaient encore jamais été détectés dans la fraction soluble d'échantillons archéologiques provenant de sites lacustres ou fluviaux. La présence de diacides, libérés par hydrolyse lors de l'étape de transpropylation, tend à montrer que les acides insaturés ont été oxydés. Les diacides sont caractéristiques dans leur distribution de la position des doubles liaisons sur les acides gras insaturés. Ainsi l'acide azélaïque $C_9H_{16}O_4$ provient de l'oxydation d'une double liaison en position $\Delta 9$. Mais certains auteurs mentionnent la possibilité d'une migration de la double liaison pendant les processus d'oxydation conduisant aux diacides {Evershed *et al.* 1990a; Evershed 2000; Heron *et al.* 1989b}. Il paraît donc délicat de ne s'appuyer que sur ce critère pour remonter à la position des doubles liaisons sur les acides gras originels {Evershed *et al.* 1990a; Evershed *et al.* 2002}. La présence de diacides est néanmoins caractéristique de mélanges complexes d'acides gras insaturés qui ont été fortement oxydés. Leur présence peut donc être caractéristique de la présence d'huiles végétales, car celles-ci sont caractérisées par des mélanges complexes d'acides gras insaturés. Afin de valider cette hypothèse, nous avons analysé un échantillon archéologique dont la composition en acides gras était caractéristique de graisse animale. Il s'agit de l'extrait du tesson T1090A, provenant de l'assiette 365.

Le résidu carbonisé était trop peu concentré pour être quantifié, c'est pourquoi nous avons choisi de travailler sur le tesson dont la concentration est élevée (1300 µg/g). Après transpropylation de cet échantillon (T1090A2), la distribution en acides gras obtenue est bien plus complexe que dans le cas d'une huile végétale (Figure 118).

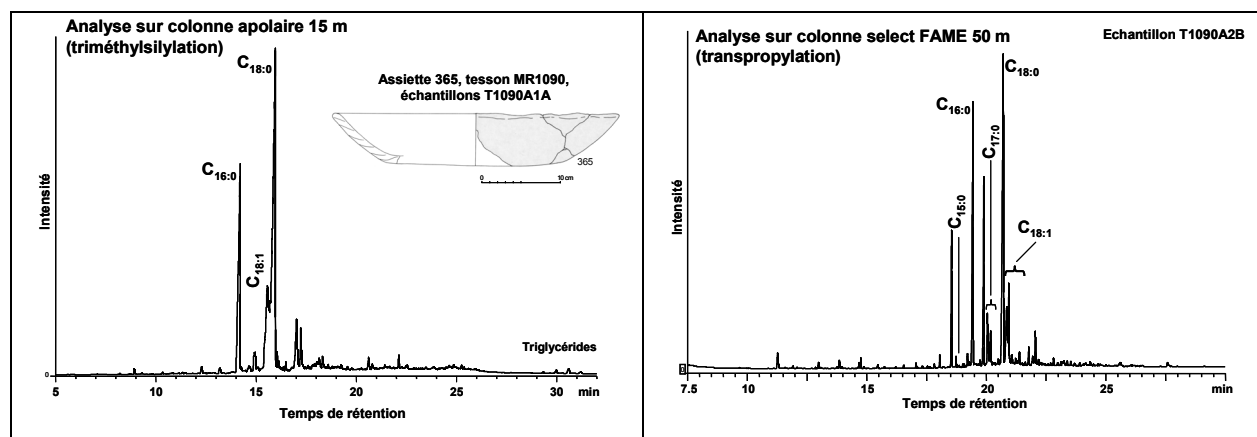


Figure 118 : Chromatogrammes de l'échantillon T1090A (assiette 365) sur colonne apolaire de 15m (méthode MR1CER, encadrés 3 et 9) et sur colonne select FAME de 50 m (méthode FAME, encadrés 4 et 11). [Gas chromatogram of sample T1090A, by HT GC on an apolar 15-m column and by GC on a fatty-acid specific 50-m column]

La présence des acides gras à nombre impair d'atomes de carbone $C_{15:0}$ et $C_{17:0}$, de $C_{18:0}$ en plus grande quantité que le $C_{16:0}$ et de deux isomères de $C_{18:1}$ est caractéristique d'une graisse de ruminant {Dudd *et al.* 1999; Evershed *et al.* 2002; Mottram *et al.* 1999; Regert *et al.* 2003a}. Or aucune trace de diacides n'est détectée dans cet échantillon. Il semble donc que la présence de diacides soit caractéristique de la présence de matière grasse végétale oxydée. Les phénomènes d'oxydation des acides gras ont lieu préférentiellement sur les acides di ou tri-insaturés, et très peu les mono-insaturés, ce qui explique cette différence entre les matières grasses végétales et animales. La détection des diacides uniquement après une hydrolyse (transpropylation) et non pas après une dérivation sans hydrolyse (triméthylsilylation) montre qu'ils sont présents sous forme liée, après l'extraction.

B.2.3. Discussion

A partir des résultats obtenus en chromatographie en phase gazeuse, il a été possible d'identifier des matières grasses végétales dans 5 vases et 1 jarre. Les résultats sont résumés dans le Tableau 42 (planche 10). Comme nous l'avons déjà brièvement dit dans l'introduction de cette partie, ce sont les résidus carbonisés qui ont montré la plus forte concentration de lipides caractéristiques d'huile végétale.

Références		Données stratigraphiques		Données morphologiques		Autres données					Présence de résidu	Présence d'adhésif	Numéro de référence		Résultats	
Morphologie	Année et N° de vase	Phase	M ²	Dimensions (H cm x D cm)	Proportions	E S	N S F	C	D	Abondance			Tesson	Résidu	Clipides (µg/g)	Identification
Vases à épaulement	2003- 36	6	R46	? x 35	rectangle vertical	2	3	moyen	calcaire	moyen	1	0	MR1037	MR1037	T 11.96 R 227.94	Plante oléagineuse, chauffée
	2004-267	1	M45 M46	? x 22		3	4	foncé	calcite	beaucoup	1	0	MR1072	MR1073	T 21.26 R 1424.18	Plante oléagineuse, chauffée
Vase tulipiforme	2004-425	1	N47	22 x 22	carré	4	4	moyen	calcaire	beaucoup	1	0	MR1102	MR1103	T 0.00 R 752.74	Plante oléagineuse, chauffée
Vases pseudo tulipiforme	2003- 216	1	P49	? x 26.5	rectangle vertical	3	3	moyen	calcite	peu	1	0	MR1064	MR1065	T 12.03 R 1556.01	Plante oléagineuse, chauffée
	2004-404	5	O48	? x 24		3	3	foncé	calcaire	beaucoup	1	0	MR1098	MR1099	T 0.00 R 355.52	Plante oléagineuse, chauffée
Jarre	2004-338	3	O49								1	0	MR1086	MR1086	T 21.08 R 0.00	Plante, chauffée

Tableau 42 : Liste des céramiques de CLXIV ayant contenu des matières grasses végétales, planche 10 (ES: état de surface (surface treatment), NSF: niveau de savoir-faire (level of expertise), C: couleur (colour), D: dégraissant (temper), Abondance: abondance de dégraissant, T: tesson (potsherd), R: résidu (residue)). [Ceramic vessels that show the presence of vegetable fats, board 10]

Le fragment de jarre (338) n'a montré de marqueurs végétaux que dans le tesson, alors que le résidu carbonisé était présent en grande quantité. Ce résidu a une morphologie particulière. Deux grosses boules, creuses, sont visibles, mais ne contiennent que de la matière entièrement carbonisée, sans aucune trace de lipides. De plus, les lipides présents dans le tesson sont très peu concentrés (20 µg/g). Il peut s'agir de restes de cuisson de végétaux, qui ont laissé la marque de graines et dont un peu de lipides a pu s'absorber dans la paroi. Nous n'avons pas pu analyser cet échantillon avec la méthodologie huile, à cause de sa concentration très faible (colonne Select FAME 50 m, méthode FAME), nous ne savons donc pas si cet échantillon contient des diacides ou pas. Il s'agit plus vraisemblablement d'une plante non-oléagineuse, ce qui expliquerait le peu de lipides dans le résidu carbonisé. Il pourrait s'agir de restes de cuisson de glands, ce qui est cohérent avec la quantité de glands retrouvés à CL XIV et avec la forme du résidu. Il faudrait extraire les lipides des glands, afin de comparer leur composition avec celle retrouvée dans le tesson de cette céramique. Il peut aussi s'agir de végétaux qui ont été cuits jusqu'à carbonisation complète. Sur les quelques jarres qui ont été prélevées, il s'agit de l'unique cas contenant des traces de végétaux. Malheureusement sa morphologie n'a pas pu être identifiée au-delà de la dénomination jarre, et d'éventuelles traces de chauffage n'ont donc pas pu être identifiées à cause du faible nombre de tessons retrouvés.

Pour deux vases, le vase à épaulement 267 et le vase tulipiforme 425, les résidus carbonisés étaient présents en couche fine, sur la surface interne de la paroi. Pour les 3 autres vases (36, 216 et 404), les résidus carbonisés étaient présents en abondance. Au vu de la composition homogène de ces 5 résidus, il est peu probable que la présence d'un résidu carbonisé en fine couche soit caractéristique d'une enduction de la céramique. Dans ces cinq céramiques, la teneur en lipides du résidu carbonisé est beaucoup plus élevée que celle du tesson (entre 200 et 1500 µg/g pour les résidus et entre 0 et 20 µg/g pour les tessons). Il s'agit des vases à épaulement 26 et 267, du vase tulipiforme 425 et des vases pseudo-tulipiforme 216 et 404 (Tableau 42). Le fait que la différence de concentration en lipides entre les tessons et les résidus soit aussi élevée tend à montrer que ces cinq échantillons ont probablement subi les mêmes manipulations, ce qui est appuyé par le fait que tous ces vases ont des dimensions similaires, avec un diamètre compris entre 22 et 35 cm. Nous n'avons pas travaillé sur le volume de ces vases, les profils étant souvent insuffisants pour approcher ce type de données. Le niveau de savoir-faire de production de ces vases semble assez élevé (entre 3 et 4 dans la classification, Tableau 30) mais cela est vrai de l'ensemble de la production de poteries de CL XIV.

Tous ces récipients, mise à part la jarre 338, ont donc probablement été utilisés pour faire cuire des plantes oléagineuses, dont les lipides caractéristiques sont ceux des huiles tirées des mêmes plantes. Il existe une technique d'obtention des huiles, à partir de morceaux concassés de graines, mis à bouillir dans de l'eau. L'huile remonte à la surface et peut être récupérée. La présence sur le site de CL XIV de noisettes, de lin et de pavot est cohérente avec cette interprétation. De plus, pour obtenir des huiles à partir de ces graines, uniquement par broyage, il en faut une quantité très importante. La

technique de la chauffe des graines concassées est donc plus intéressante en terme de rapport quantité de graines/quantité d'huile obtenue, et elle est facilement mise en œuvre. Il n'est pas à l'heure actuelle possible de parler de consommation d'huiles végétales. Ces restes végétaux n'ont jamais été détectés en mélange avec d'autres matières grasses, comme de la cire ou des graisses animales, encore que ce dernier point soit difficile à mettre en évidence, les marqueurs des graisses animales pouvant partiellement ou totalement dissimuler les marqueurs végétaux. La mise en évidence, par l'analyse de l'extrait lipidique total, de préparations à base de végétaux oléagineux sur un site archéologique est très encourageante pour les recherches à venir. Jusqu'à présent, seules les traces d'huiles d'olive dans les amphores et d'huiles végétales dans des lampes ont été publiées {Colombini *et al.* 2005b; Condamin *et al.* 1976; Copley *et al.* 2005e; Regert 2007} sans qu'aucune étude biomoléculaire centrée sur les résidus végétaux dans les céramiques ne le soit. Il existe bien sur des études sur les macrorestes végétaux (morphologie végétale), sur les pollens (palynologie) et les graines (carpologie) ou encore en analyse isotopique {DeNiro & Hastorf 1985}, mais en l'état actuel des recherches, aucune n'a permis de mettre en évidence des restes végétaux en relation directe avec l'utilisation de céramiques alimentaires ou avec la consommation d'huiles végétales.

B.3. La cire d'abeille

De la cire d'abeille a été détectée dans 5 céramiques, soit seule, dans un vase tulipiforme (190) et dans un gobelet (324), soit mélangée avec des graisses animales dans un gobelet (281) et dans deux coupes (12 et 310). Elle n'a été identifiée que dans des tessons, jamais dans des résidus carbonisés ni dans des adhésifs. Une seule céramique présentait des traces de résidu très fin et uniforme sur sa surface interne, mais ce dernier n'a pas pu être prélevé pour être analysé à part car il était présent en trop faible quantité (coupe 310). La cire d'abeille détectée seule est relativement concentrée, de 225 à 430 $\mu\text{g/g}$, de même que lorsqu'elle est mélangée à des graisses animales, de 230 à 270 $\mu\text{g/g}$ (Tableau 43). Dans ce dernier cas néanmoins, il n'est pas possible de déterminer la quantité de chacun des matériaux présents, à savoir la cire d'abeille et la graisse animale.

Références		Numéro de référence		Résultats des analyses chromatographiques				
Morphologie	Année et N° de vase	Tesson	Adhésif	Echantillon	Lipides (mg/g échantillon)	% AG	% TAGs	% EP
Vase tulipiforme	2003- 190	MR1057		T1057A	225.60	30.18	0.00	38.17
Gobelet haut à carène moyenne	2004-281	MR1075		T1075A	266.84	33.77	11.24	0.00
				T1075B		X	5.72	27.37
	2004-324	MR1084	MR1129	T1084A	429.65	35.95	0.00	37.37
Coupe large à carène basse	Puisard- 12	MR1035		T1035A	234.17	28.28	24.44	0.00
				T1035B		21.52	19.03	4.52
	2004-310	MR1078		T1078A	257.87	31.23	15.74	12.80
				T1078B		20.19	6.56	17.14

Tableau 43 : Echantillons dans lesquels de la cire d'abeille a été identifiée en HT CPG, méthode MR1CER; AG: acides gras (fatty acids), TAGs: triglycérides, EP: esters palmitiques (palmitic esters). [Ceramic vessels where beeswax was identified using HT GC]

B.3.1. Les biomarqueurs de la cire d'abeille

Les biomarqueurs de la cire d'abeille ont donc été identifiés, seuls, dans les chromatogrammes de deux céramiques, le vase tulipiforme 190 (tesson MR1057, Figure 119) et le gobelet 324 (tesson MR1084). Il s'agit des esters palmitiques E₄₀ à E₅₀, des alcanes linéaires C₂₅ à C₃₃ et d'acides gras de C_{24:0} à C_{32:0} {Charters *et al.* 1995; Evershed *et al.* 1997c; Evershed *et al.* 2003; Garnier *et al.* 2002; Heron *et al.* 1994; Kimpe *et al.* 2002; Regert *et al.* 2001a; Regert *et al.* 2005}. La présence de ces biomarqueurs, dans les proportions trouvées et l'absence de marqueurs de dégradation tels que les alcools linéaires terminaux à longue chaîne ou encore l'acide palmitique, qui proviennent de l'hydrolyse des esters palmitiques, démontre un très bon état de conservation de la cire d'abeille (Figure 119). La perte des alcanes, dont la proportion par rapport aux acides gras est inverse de celle dans la cire d'abeille fraîche, suggère que la cire a probablement été chauffée, mais à température moyenne et peu de temps {Evershed *et al.* 1997c; Heron *et al.* 1994; Regert *et al.* 2001a}. Le chromatogramme de l'extrait lipidique du tesson T1057, provenant du vase 190, est montré à titre d'exemple en Figure 119. On peut distinguer, sans les identifier formellement, d'autres esters qui éluent juste après les esters palmitiques. En l'absence d'une identification par HT CPG/SM, il est impossible de déterminer s'il s'agit d'esters des acides palmitoléique (C_{16:1}), oléique (C_{18:1}) ou stéarique (C_{18:0}) ou encore d'hydroxyesters. Les biomarqueurs les plus lourds de la cire d'abeille, à savoir les diesters ne sont pas détectés en HT CPG {Garnier *et al.* 2002}.

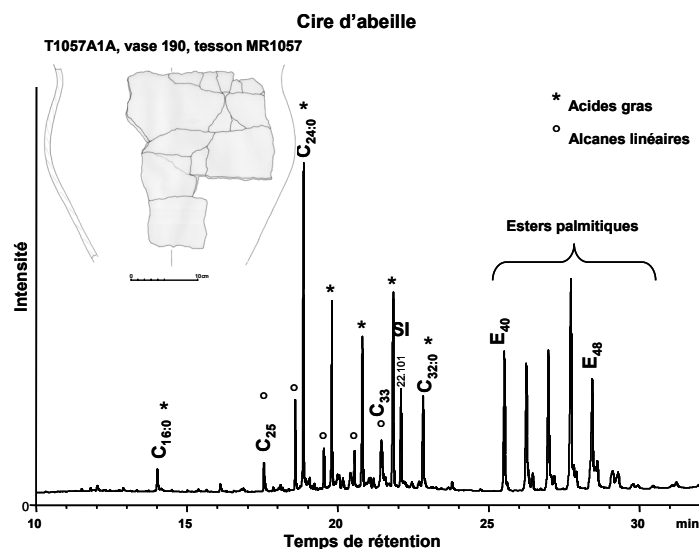


Figure 119: Chromatogramme de l'échantillon T1057A (vase 190) caractéristique de la cire d'abeille (méthode MR1CER, encadré 3 et 9). [Gas chromatogram of sample T1057A, vessel 190, characteristic of beeswax]

B.3.2. La cire d'abeille mélangée à des graisses animales

Les biomarqueurs de la cire d'abeille précédemment identifiés ont été détectés dans 3 tessons en parallèle des biomarqueurs et des marqueurs de dégradation des graisses animales (coupe 12, tesson MR1035; gobelet 281, tesson MR1075; coupe 310, tesson MR1078). Les marqueurs des graisses animales détectés sont les triglycérides éluant entre 28 et 32 min et leurs produits de dégradation, diglycérides éluant entre 24 et 26 min (uniquement pour l'échantillon T1035, tesson MR1035, coupe 12) et acides gras éluant entre 12 et 16 min (Figure 120). La distribution en acides gras est très caractéristique des graisses animales dans les trois échantillons, avec des acides gras pairs de C_{14:0} à C_{18:0}, des acides gras impairs C_{15:0} et C_{17:0} et des acides gras insaturés tels que le C_{18:1} de même que la distribution en triglycérides de T₄₆-T₄₈ à T₅₄. S'il est relativement simple de distinguer les triglycérides des esters palmitiques de la cire d'abeille, il est en revanche plus difficile de discriminer, dans la zone d'élution entre 16 et 27 min, les composés de la cire d'abeille (alcanes et acides gras à longue chaîne et esters palmitiques) des marqueurs des graisses animales (monoglycérides, stérols et diglycérides). Ces trois échantillons ont été extraits deux fois (tessons A et B) afin de déterminer plus précisément leur composition en marqueurs de graisses animales pour mieux les identifier (Cf. paragraphe C). Les extraits B ont ensuite été fractionnés, afin de séparer la fraction neutre (contenant les triglycérides, biomarqueurs des graisses animales) de la fraction acide. Les biomarqueurs de la cire d'abeille ont été détectés dans les extraits B et surtout dans la fraction neutre.

La Figure 120 montre les chromatogrammes de l'échantillon T1075 du gobelet 281 (tesson MR1075), obtenus pour les extraits A (T1075A) B (T1075B) ainsi que pour la fraction neutre de l'extrait B (T1075BFN). Le chromatogramme de l'extrait A, bien que mal résolu, permet d'identifier

de la graisse animale grâce à la présence des acides gras et des triglycérides. Cependant la présence de la cire d'abeille est difficile à déterminer à cause de la mauvaise résolution de la zone 24-27 min. Sur le chromatogramme de l'extrait B, il devient possible de bien distinguer les esters palmitiques de même que les diglycérides. Enfin, dans la fraction neutre de ce même extrait, on distingue très bien les triglycérides, les esters palmitiques et les diglycérides. A cause d'un problème technique de l'appareil de CPG/SM, il n'a malheureusement pas été possible d'identifier tous les pics éluant entre 17 et 23 min, qui sont très bien résolus sur ce chromatogramme. On peut tout de même remarquer plusieurs séries homologues. Il s'agit très probablement des alcanes linéaires impairs et des produits de dégradation des esters palmitiques, à savoir les alcools terminaux linéaires pairs, de même que les monoglycérides, produits d'hydrolyse des triglycérides.

Les trois échantillons ont des comportements à peu près similaires, c'est-à-dire que l'extrait A permet de déterminer la présence de graisse animale mélangée à un produit inconnu, l'extrait B permet d'identifier la cire d'abeille en plus de la graisse animale et la fraction neutre de l'extrait B permet de conforter cette identification. La non homogénéité des tessons, qui montrent des composition légèrement différentes suivant le tesson analysé, sera discutée dans le paragraphe suivant.

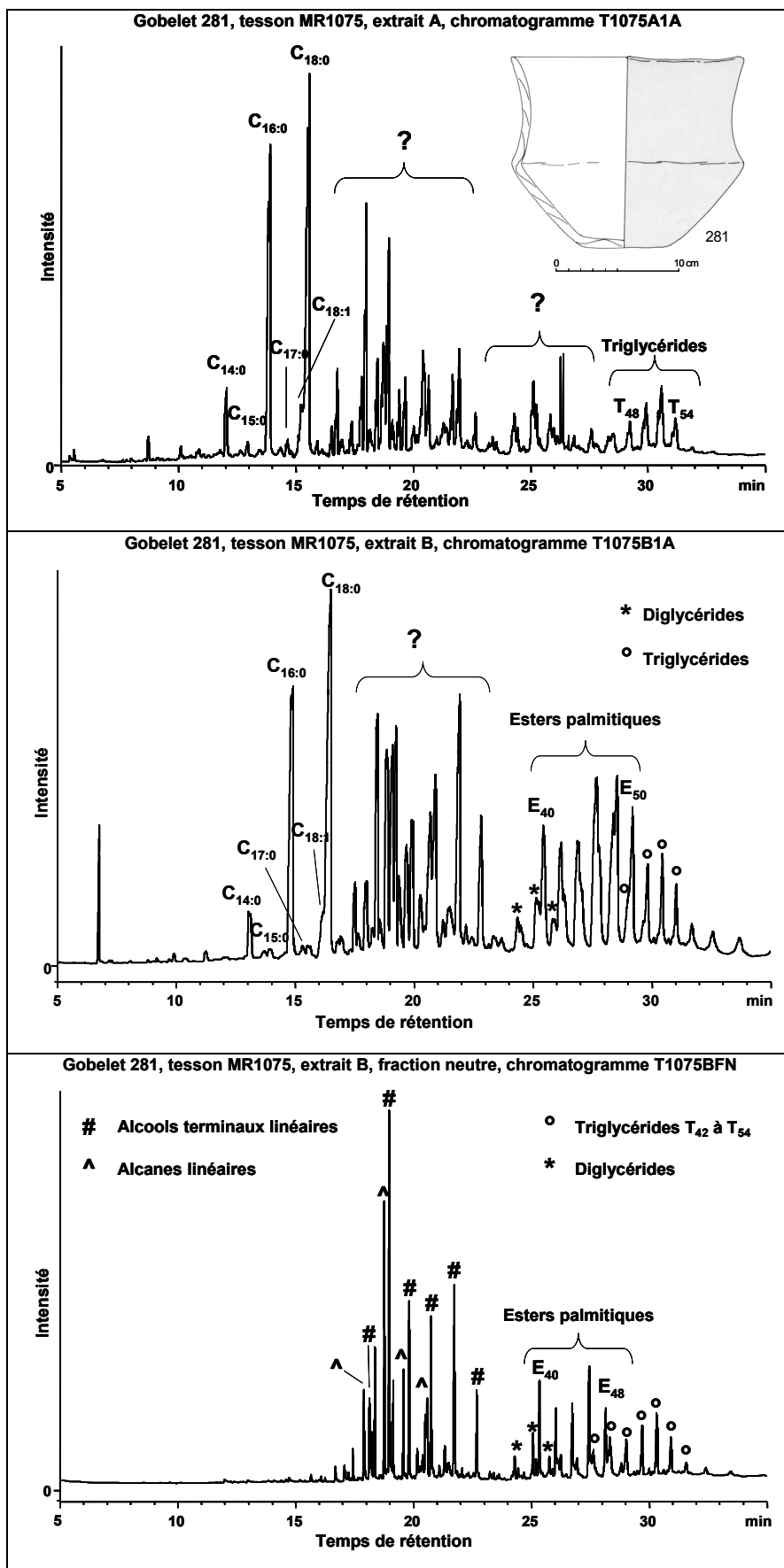


Figure 120: Chromatogrammes du tesson MR1075, gobelet 281, extrait A, extrait B et fraction neutre de l'extrait B, caractéristiques d'un mélange de cire d'abeille et de graisse animale (méthode MR1CER, encadrés 3, 6 et 9). [Gas chromatograms of sample MR1075, goblet 281, total lipid extract A, total lipid extract B and neutral fraction of extract B, characteristic of a mixture of animal fat and beeswax]

B.3.3. Discussion

A partir des résultats obtenus en chromatographie en phase gazeuse, il a été possible d'identifier de la cire d'abeille seule dans deux céramiques et mélangée à de la graisse animale dans 3 céramiques (Tableau 44).

Les céramiques pour lesquelles la cire d'abeille a été identifiée seule ne montrent aucune trace de résidu carbonisé, en tous cas dans les tessons qui ont pu leur être attribués. Avec la présence d'alcane, même en proportion moins élevée que pour la cire d'abeille fraîche, on peut déduire que ces céramiques n'ont pas été chauffées à trop haute température, ni pendant trop longtemps.

On peut faire des hypothèses sur la fonction de la cire ou bien sur l'usage de la céramique, mais en l'état actuel de nos connaissances, il est difficile de déterminer exactement sa fonction ou son usage. Ainsi, la cire a pu servir d'imperméabilisant, pour des céramiques qui contenaient des liquides non gras (eau par exemple). Il s'agit alors de la fonction de la cire d'abeille, dans un cadre technique et non pas alimentaire. Cette hypothèse est cohérente avec un chauffage léger de la cire, qui serait dû à une céramique tiède, sur laquelle est badigeonnée la cire d'abeille. Il peut également s'agir de céramiques qui ont servi à stocker du miel. Le miel est composé de sucres, or ces derniers sont hydrophiles et ont très probablement été lixiviés par l'eau présente dans le sédiment. Nous n'avons donc pas cherché à mettre en évidence ce produit dans les tessons. Même dans le cas de stockage de miel, il est possible que la cire ait servi à étanchéifier la paroi poreuse. La bonne conservation de la cire d'abeille dans ces deux céramiques est cohérente avec ces deux hypothèses. Le stockage de la cire d'abeille paraît peu probable, car sans chauffage, même léger, celle-ci se serait très mal absorbée dans la paroi.

Références		Données stratigraphiques		Données morphologiques		Autres données							Numéro de référence			Résultats			
Morphologie	Année et N° de vase	Phase	M²	Dimensions (H cm x D cm)	Proportions	ES	NSF	C	D	Abondance	Présence de résidu	Présence d'adhésif	T	R	A	Adhésif	HT CPG	SM	
Vase tulipiforme	2003-190	2	Q47	? x 38	rectangle vertical	3	3	moyen	calcite	peu	0	0	MR1057					Cire d'abeille	
Gobelet haut à carène moyenne	2004-281	5	M48	15.5 x 19	rectangle horizontal	3	3	foncé	calcaire	beaucoup	0	0	MR1075					Cire + produits laitiers; Distribution large de TAGs	
Gobelet haut à carène moyenne	2004-324	4	N45	7.8 x 10.5	rectangle horizontal	3	3	foncé	calcaire	moyen	0	1	MR1084		MR1129	Brai de bouleau		Cire d'abeille	
Coupe large à carène basse	Puisard-12	6	R45	? x 16	rectangle horizontal	2	2	foncé	calcite	beaucoup	0	0	MR1035					Cire + Graisse animale; distribution étroite en TAGs	Graisse sous-cutanée, boviné
Coupe large à carène basse	2004-310	5	O49	5 x 10.2	rectangle horizontal	2	2	clair	calcaire	moyen	1	0	MR1078					Cire + Graisse animale; distribution moyenne en TAGs	

Tableau 44 : Liste des céramiques de CLXIV ayant contenu de la cire d'abeille, planche 11 (ES: état de surface (surface treatment, NSF: niveau de savoir-faire (level of expertise), C: couleur (colour), D: dégraissant (temper), Abondance: abondance de dégraissant, T: tesson (potsherd), R: résidu (residue), A: adhésif (adhesive)). [Ceramic vessels where beeswax was detected, board 11]

La morphologie et les caractéristiques des céramiques peuvent s'accorder avec l'imperméabilisation des parois, que ce soit pour le gobelet ou pour le vase comme avec le stockage de miel. Cependant, le stockage du miel à long terme paraît plus probable dans le vase (diamètre 38 cm) que dans le gobelet (hauteur 8 cm × diamètre 10 cm), qui est de dimension beaucoup plus réduite. Cependant, un stockage à court terme mais récurrent, qui serait associé avec un gobelet est lui aussi cohérent avec l'identification de cire dans ce dernier. Le gobelet a été réparé, comme on peut le remarquer grâce à la présence d'une bande verticale de réparation à l'adhésif.

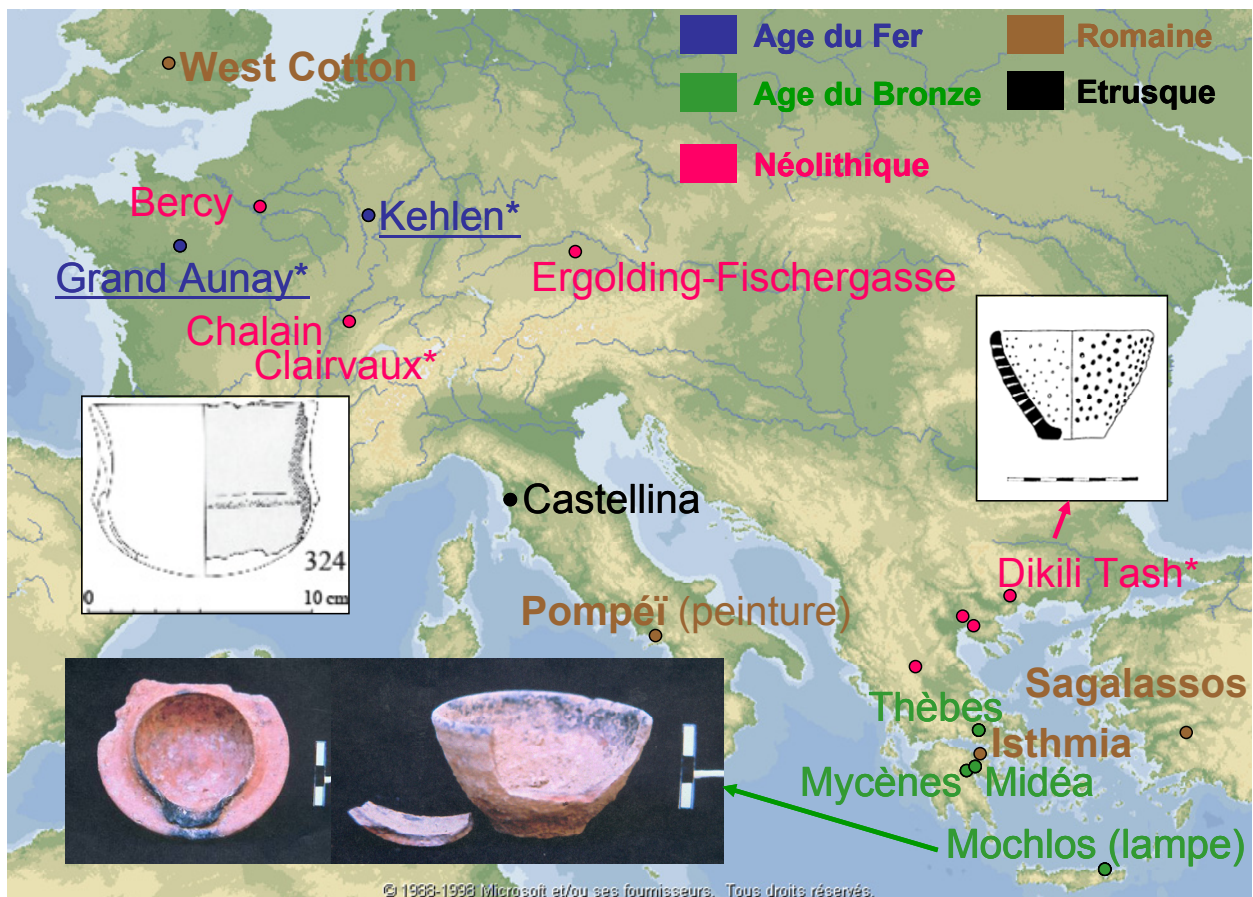
Pour les échantillons dans lesquels la cire d'abeille a été identifiée mélangée à des graisses animales, aucune des 3 céramiques ne montrait de trace de réparation. Seule la coupe 310 a, par ailleurs, montré la présence d'une très fine couche de résidu carbonisé, qu'il n'a pas été possible de prélever pour l'analyser à part (échantillon MR1078). Pour cette coupe, la graisse animale n'a pas pu être identifiée. La distribution en triglycérides obtenue en CPG n'est pas discriminante, et la présence de la cire n'a pas permis d'analyser cet échantillon en spectrométrie de masse, afin d'identifier la graisse animale d'origine (Cf. paragraphe C). Les traces de résidus carbonisés, en très fine couche, semblent cependant montrer qu'il s'agit d'une céramique enduite de cire, qui a été chauffée {Pétrequin 1997; Regert 2007}. Il est difficile de déterminer, sans une identification précise de la composition moléculaire du résidu carbonisé, s'il s'agit de la cire qui a été badigeonnée sur une céramique trop chaude, ou s'il s'agit d'un chauffage post-enduction, par exemple pour réchauffer la graisse animale. Dans la fraction neutre de l'extrait B de cette échantillon (T1078BFN), on peut remarquer que la cire semble bien conservée, avec toujours une distribution en alcane altérée par rapport à de la cire fraîche. Il semble donc que l'on puisse éliminer une cuisson à haute température, ce qui, de toutes les façons, semble peu probable au vu de la morphologie de cette coupe (hauteur 5 cm × diamètre 10.2 cm). Pour conclure, cette coupe, qui par sa morphologie a pu être un plat de service, a probablement été enduite de cire, avant d'être utilisée pour réchauffer des graisses animales.

En ce qui concerne la coupe 12 (tesson MR1035), la graisse animale est présente en plus grande proportion que la cire d'abeille. Il a donc été possible d'analyser la fraction neutre de l'extrait B en spectrométrie de masse, car cette dernière est majoritairement composée de triglycérides, afin d'identifier plus précisément la graisse d'origine. Il s'agit de graisse sous-cutanée de bœuf (Cf. paragraphe C). Aucune trace de résidu carbonisé n'a été observée sur cette céramique, et la graisse animale est dans un bon état de conservation. En effet, la proportion de triglycérides et la proportion d'acides gras sont similaires, ce qui montre un état d'avancement de l'hydrolyse relativement faible. Si la cire a servi à enduire la céramique, alors celle-ci n'a pas ou peu été chauffée après. Il se peut également que cette coupe ait servi de plat de service, pour des mets à base de viande de bœuf, avec

éventuellement du miel. Il s'agirait d'une recette culinaire, parmi les plus anciennes actuellement identifiées. Il est difficile de trancher entre ces deux hypothèses.

Pour le tesson MR1075, du gobelet 281, le chromatogramme de la fraction neutre de l'extrait B (Figure 120) permet d'identifier une distribution large en triglycérides, de T₄₂ à T₅₄. Ce type de distribution, comme nous le verrons dans le paragraphe C, est caractéristique de produits laitiers. Malheureusement, à cause de la présence de cire d'abeille dans de telles proportions, nous n'avons pas pu analyser cette fraction neutre en spectrométrie de masse pour mieux identifier la graisse animale et corroborer l'identification de produits laitiers. Cependant, le fait que la cire soit présente en plus grande quantité que les produits laitiers, sans qu'il n'y ait aucune trace de chauffage, est cohérent avec l'utilisation de la cire comme imperméabilisant, pour un gobelet ayant servi à contenir des produits laitiers. Ces derniers auraient alors été moins absorbés dans la paroi. La morphologie de la céramique et le niveau de savoir-faire de sa fabrication (élevé, lustrage au brunissoir, beaucoup de dégraissant) sont là encore cohérents avec cette interprétation.

La chronologie du site s'étendant sur une centaine d'années, il est difficile d'interpréter les données en fonction de la phase dans laquelle les différentes matières grasses ont été trouvées. De plus, le site n'a été fouillé que sur 30 m², la répartition spatiale n'est donc pas non plus représentative de l'ensemble du village. On ne connaît pas d'abeilles sauvages, à l'heure actuelle, en Franche-Comté et il serait intéressant de déterminer si ces dernières vivaient dans la forêt primaire qui entourait CL XIV aux 38^e-37^e siècles avant notre ère. Si on met en relation ces données avec celles publiées dans la littérature, sur l'identification de cire d'abeille dans des céramiques (Carte 3), Clairvaux XIV fait partie des sites les plus anciens en Europe tempérée dans lesquels l'exploitation des produits de la ruche est avérée (Bercy et Ergolding-Fischergasse, 4^{ème} millénaire av. J.-C.). Il existe un site plus ancien en Grèce, Dikili Tash, qui date du Néolithique final (environ 5000 av. J.-C) sur lequel de la cire d'abeille a été mise en évidence dans une céramique percée.



Carte 3 : Carte des sites archéologiques européens pour lesquels l'exploitation des produits de la ruche, en relation avec la céramique, a été montrée d'après Regert et al., communication orale, photo des lampes de Mochlos par Evershed et coll. {Charters *et al.* 1995; Evershed *et al.* 1997c; Evershed *et al.* 2003; Garnier *et al.* 2002; Heron *et al.* 1994; Kimpe *et al.* 2002; Regert *et al.* 1999; Regert *et al.* 2001a; Regert *et al.* 2003b; Regert 2007}. [Map of the prehistoric and protohistoric archaeological sites where beeswax was detected, images of the lamps from Mochlos by Evershed et coll.]

B.4. Les adhésifs

B.4.1. Les données chromatographiques

Sur les 32 adhésifs observés sur 29 profils ou tessons "volants", 23 ont été analysés en chromatographie en phase gazeuse. Le protocole d'analyse des adhésifs, légèrement différent de celui utilisé pour identifier les matières grasses contenues dans les tessons, est expliqué dans le chapitre II. Tous les adhésifs analysés ont été identifiés comme du brai de bouleau. En effet, dans la plupart des chromatogrammes ont été identifiés ses principaux biomarqueurs, à savoir la bétuline (7), le lupéol (5) et l'acide bétulinique (8) ainsi que la lupénone (4) et la bétulone (6), en parallèle de l'identification de leurs marqueurs de dégradation le lupan-2,20(29)-diène (1), le lupan-2,20(29)-diène-28-ol (2) et l'allobetul-2-ène (3) {Aveling & Heron 1998; Binder *et al.* 1990; Charters *et al.* 1993a; Dudd & Evershed 1999; Hayek *et al.* 1991; Heron *et al.* 1989a; Pollard & Heron 1996;

Regert *et al.* 1998b; Regert *et al.* 2000; Regert *et al.* 2003a; Regert *et al.* 2003b; Regert 2004; Ukkonen & Erä 1979} (Figure 121).

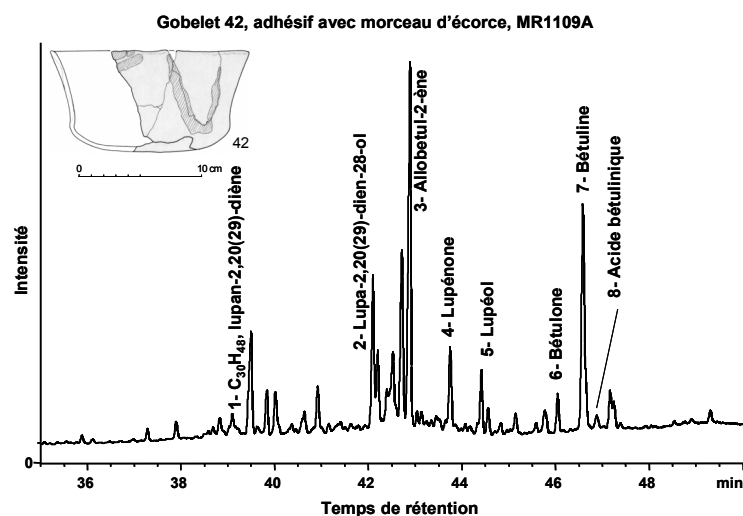


Figure 121: Chromatogramme de l'adhésif MR1109, gobelet 42, en CPG (méthode ADHESIF30M, encadrés 3 et 13). [Gas chromatogram of adhesive MR1109, goblet 42, by HT GC using a 30-m non polar column]

Le brai de bouleau est obtenu à partir de l'écorce de bouleau, dont les principaux biomarqueurs sont la lupénone, le lupéol, la bétulone, la bétuline et l'acide bétulinique. Les marqueurs de dégradation proviennent de la transformation (déshydratation principalement) de ces biomarqueurs lors de la préparation du brai par chauffage de l'écorce de bouleau. La lupénone et la bétulone peuvent aussi provenir de l'oxydation du lupéol et de la bétuline, et sont donc à la fois marqueurs de dégradation et biomarqueurs {Charters *et al.* 1993a; Regert *et al.* 1998b; Regert *et al.* 2000; Regert *et al.* 2003b; Regert 2004}. Certains échantillons sont caractérisés par la présence des biomarqueurs en quantité bien plus importante que les marqueurs de dégradation (Figure 122).

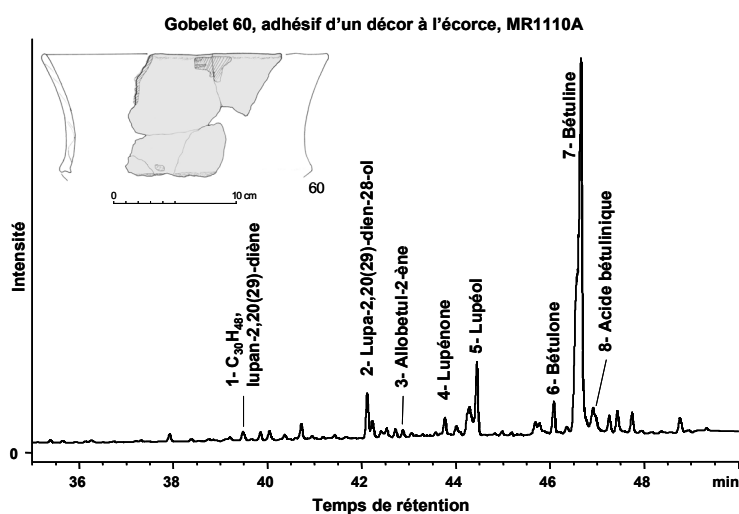


Figure 122 : Chromatogramme de l'adhésif MR1110, gobelet 60, en CPG (méthode ADHESIF30M, encadrés 3 et 13). [Gas chromatogram of adhesive MR1110, goblet 60, by HT GC using a 30-m non polar column]

En calculant le rapport marqueurs de dégradation (MD) sur biomarqueurs (bioM), il est possible de déterminer des classes d'adhésifs en fonction de leur composition en triterpènes. Il est probable que les adhésifs qui contiennent le moins de marqueurs de dégradation aient été préparés différemment des autres, peut-être en chauffant à moins haute température ou en chauffant moins longtemps {Regert et al. 2003b}. Ce rapport se calcule simplement, grâce aux proportions relatives des composés d'intérêt. Les marqueurs de dégradation choisis sont le lupan-2,20(20)-diène (1), le lupan-2,20(29)-dien-28-ol (2) et l'allobétul-2-ène (3). Les biomarqueurs sont le lupéol (5) et la bétuline (7). La lupénone et la bétulone ne sont pas prises en compte car elles sont à la fois biomarqueurs et marqueurs de dégradation {Regert et al. 2003b}. La formule peut donc se noter comme ci-dessous:

$$MD / BioM = \frac{\%(1 + 2 + 3)}{\%(5 + 7)}$$

Les numéros 1, 2, 3, etc. se réfèrent aux différents marqueurs (Figure 121 & Figure 122). Les résultats obtenus pour les 23 échantillons analysés sont présentés dans le Tableau 45.

Echantillon			1	2	3	4	5	6	7	8	MD/BioM
gobelet	60	MR1110A	1.19	4.83	1.00	2.51	8.42	3.82	71.56	6.67	0.09
tesson	66	MR1112A	1.17	6.09	0.00	1.29	8.95	4.94	69.66	7.90	0.09
gobelet	213	MR1118A	0.98	9.90	4.05	0.00	7.30	5.47	64.11	8.18	0.21
céramique fine	219	MR1120A	2.57	15.60	2.45	3.93	10.89	6.03	54.45	4.08	0.32
gobelet	167	MR1114A	2.44	7.44	11.94	4.73	8.65	2.95	56.43	5.42	0.34
gobelet	428	MR1136A	3.49	14.24	6.04	4.88	13.83	10.62	41.41	5.50	0.43
tesson	176	MR1117A	3.83	17.85	5.37	4.68	11.88	7.82	44.06	4.51	0.48
jarre	17	MR1108C	2.65	14.91	11.17	4.18	5.80	7.10	45.93	8.27	0.56
gobelet	433	MR1137A	7.33	15.54	11.41	4.71	8.89	5.55	43.37	3.21	0.66
tesson	232	MR1125B	10.54	4.20	6.48	5.68	5.01	36.45	24.23	7.41	0.73
coupe	222	MR1122A	3.79	17.01	11.86	8.29	6.10	10.67	36.16	6.11	0.77
gobelet	348	MR1130A	6.40	12.51	17.55	6.97	6.20	4.59	40.64	5.14	0.78
gobelet	324	MR1129A	7.44	12.70	17.93	8.23	7.67	3.94	37.61	4.49	0.84
tesson	233	MR1126A	7.77	19.40	11.93	6.99	9.14	6.90	33.67	4.20	0.91
amphore	65	MR1111A	8.21	11.82	21.71	8.37	9.55	5.03	30.38	4.94	1.05
tesson	231	MR1124A	4.71	23.90	7.37	4.34	3.63	14.22	30.74	11.09	1.05
tesson	67	MR1113A	8.61	19.84	9.90	10.25	9.87	8.25	24.04	9.24	1.13
amphore	317	MR1128A	6.20	22.07	14.99	7.32	6.54	8.30	27.20	7.36	1.28
petit bol/godet	171	MR1115A	23.80	16.61	9.00	7.54	12.68	5.00	20.25	5.12	1.50
petit bol/godet	171	MR1116A	20.70	17.92	9.82	10.42	9.77	5.30	20.20	5.87	1.62
jarre	373	MR1131A	18.07	11.34	21.82	10.71	6.41	3.04	24.69	3.91	1.65
gobelet	42	MR1109A	11.58	13.78	31.24	8.25	5.12	3.54	23.52	2.96	1.98
bord	239	MR1127A	18.97	13.19	27.27	8.03	5.43	4.42	22.69	0.00	2.11

Tableau 45 : Proportions relatives des triterpènes du brai de bouleau identifiés dans les échantillons d'adhésifs de Clairvaux XIV, par CPG (méthode ADHESIF30M, encadrés 3 et 13) et rapport marqueurs de dégradation / biomarqueurs. [Relative proportions of birch bark tar triterpenoid biomarkers and degradation markers, detected in adhesives sampled on ceramic vessels from CLXIV, and ratio of degradation markers / biomarkers]

On peut remarquer 3 classes d'adhésifs. Ceux dont le rapport MD/BioM est inférieur à 0.5, pour lesquels les biomarqueurs sont très peu altérés (7 échantillons), ceux pour lesquels il est compris entre 0.5 et 1, pour lesquels les proportions de biomarqueurs et de marqueurs de dégradation sont globalement similaires (12 échantillons), et enfin ceux dont le rapport est supérieur à 1.5. La proportion de marqueurs de dégradation est bien supérieure à celle des biomarqueurs dans ces échantillons (4 échantillons). Si on compare ces résultats avec ceux obtenus au Grand Aunay, ce rapport est globalement homogène, et les adhésifs sont assez peu dégradés {Regert *et al.* 2003b}.

B.4.2. Discussion

Les adhésifs utilisés à Clairvaux XIV, que ce soit pour la réparation des céramiques ou pour la fixation de décors à l'écorce de bouleau sont tous à base de brai de bouleau, sans additif (Tableau 46 et planches 12 et 13). Il ne semble pas qu'il y ait eu ajout de cire d'abeille en tant que plastifiant, comme cela a été observé sur un site moins ancien {Regert & Rolando 2002; Regert *et al.* 2003b; Regert 2004}. Il se peut que d'autres adhésifs, tels des résines ou des gommes ou encore des colles protéiniques, aient été utilisés mais dont la conservation aurait été moins bonne que pour le brai de bouleau, ce qui pourrait expliquer qu'on ne les retrouve pas.

Références		Données stratigraphiques		Données morphologiques		Autres données					Adhésif		Numéro de référence		Résultats	
Morphologie	Année et N° de vase	Phase	M ²	Dimensions (H cm x D cm)	Proportions	E S	N S F	C	D	Abondance	Présence d'adhésif	Description	Tesson	Adhésif	HT CPG (adhésif)	HT CPG (tesson) et SM
gobelets	2003- 42	6	P45 Q45 Q46 R46 R47	8 x 16	rectangle horizontal	4	4	foncé	calcaire	peu	1	adhésif avec bout d'écorce		MR1109	Brai de bouleau	
	2003- 60	4	Q49	? x 23	rectangle horizontal	4	3	moyen	calcite	peu	1	décor à l'écorce de boulot avec adhésif	MR1041	MR1110	Brai de bouleau	Produits laitiers, boviné
	2003- 167	2	Q48 N47 N49	x 22.5	rectangle horizontal	2	3	foncé	calcite	moyen	1	réparation adhésif et écorce de bouleau		MR1114	Brai de bouleau	
	2003- 213	1	P48 P49	? x 20	rectangle horizontal	4	4	moyen	calcite	peu	1	adhésif de réparation externe, encore collé au tesson; décor vertical et probablement bandes horizontales à l'écorce de bouleau avec adhésif	MR1060	MR1118	Brai de bouleau	rien
	2004-324	4	N45	7.8 x 10.5	rectangle horizontal	3	3	foncé	calcaire	moyen	1	bande verticale adhésive de réparation	MR1084	MR1129	Brai de bouleau	Cire
	2004-348	3	M46					foncé	calcite	peu	1	réparation adhésif et écorce		MR1130	Brai de bouleau	
	2004-416	1	N47				2	2	foncé	calcaire	moyen	1	présence d'une barette verticale; résidu ou adhésif? Petite quantité, à séparer éventuellement	MR1100		

	2004-423	1	O47			3	?	foncé	calcaire	moyen	1	réparation avec adhésif		MR1133		
											1	réparation avec adhésif		MR1134		
	2004-427	1	M49								1	adhésif entre écorce de boulot		MR1135		
	2004-428	1	O47			3	3	foncé	indéter miné	peu	1	adhésif de réparation		MR1136	Brai de bouleau	
	2004-433	5	M47			4	4	foncé	calcaire	peu	1	réparation adhésif et écorce de bouleau		MR1137	Brai de bouleau	
Vase pseudo-tulipiforme	2003- 215	1	P49	? x 37		4	4	moyen	calcaire	peu	1	réparation d'une fissure verticale à la bétuline à l'intérieur et à l'extérieur	MR1063	MR1119		Matière grasse indéterminée
Coupe	2003- 222	1	R48		rectangle horizontal						1	fissure verticale réparée		MR1122	Brai de bouleau	
assiette	2003- 211	1	Q47 R45 R49 Q45 Q46 R47 R48	5.7 x 32	rectangle horizontal	3	4	moyen	calcite	peu	1	fissure verticale réparée	MR1059			Rien
Jarre	2003- 17	6	R46								1	bord avec adhésif et bout d'écorce		MR1108	Brai de bouleau	
	2004-373	1	N46					foncé	calcite	moyen	1	adhésif externe		MR1131	Brai de bouleau	
	2004-412	1	N47								1	réparation adhésif et écorce de bouleau		MR1132		
Amphore	2003- 65	4	Q48			3	3	moyen	calcaire	moyen	1	mamelon perforé, probablement sur la base d'une grande jarre		MR1111	Brai de bouleau	

	2004-317	5	O48	x 39		3	4	moyen	calcaire	peu	1	adhésif externe		MR1128	Brai de bouleau	
Petit bol/godet	2003- 171	2	P47	x 6.7	Carré	2	2	moyen	calcite ?	?	1	adhésif de réparation		MR1115	Brai de bouleau	
											1	adhésif de réparation		MR1116	Brai de bouleau	
tesson	2003- 66	4	Q49								1	rebord avec réparation; adhésif		MR1112	Brai de bouleau	
	2003- 67	4	Q49								1	bord avec réparation verticale; adhésif		MR1113	Brai de bouleau	
	2003- 176	2	Q48			3	3	moyen	calcite	peu	1	réparation avec adhésif		MR1117	Brai de bouleau	
	2003- 231	3	P49								1	réparation avec un adhésif		MR1124	Brai de bouleau	
	2003- 232	6	Q47								1	réparation d'une fissure verticale avec un adhésif		MR1125	Brai de bouleau	
	2003- 233	6	P46									1	fissure verticale réparée avec un adhésif		MR1126	Brai de bouleau
céramique fine	2003- 219	1	P49								1	céramique fine réparée avec un adhésif		MR1120	Brai de bouleau	
											1			MR1121		
bord	2003- 223	1	Q47								1	bord réparé avec un adhésif		MR1123		
	Puisard-239	6	R45								1	fissure verticale réparée avec un adhésif		MR1127	Brai de bouleau	

Tableau 46 : Liste des céramiques de CLXIV sur lesquelles des adhésifs ont été observés et prélevés, planches 12 et 13 (ES: état de surface (surface treatment), NSF: niveau de savoir-faire (level of expertise), C: couleur (colour), D: dégraissant (temper), Abondance: abondance de dégraissant). [Ceramic vessels and potsherds with adhesives identified as birch bark tar, boards 12 and 13]

Au vu des diverses données publiées dans la littérature, tout du moins jusqu'au Néolithique moyen, il semble que le brai de bouleau soit l'adhésif le plus courant en Europe occidentale, ou en tout cas le mieux conservé {Aveling & Heron 1998; Charters *et al.* 1993a; Koller *et al.* 2001; Lucquin *et al.* 2007; Pollard & Heron 1996; Regert *et al.* 1998b; Regert *et al.* 1999; Regert *et al.* 2000; Regert & Rolando 2002; Regert *et al.* 2003b; Regert 2004; Reunanen *et al.* 1993}.

Quatre tessons ont été prélevés pour être analysés sur 4 gobelets (60, 213, 324 et 416) réparés, mais seuls 3 des adhésifs ont été analysés (60, 213 et 324). De la graisse animale a été identifiée en CPG dans le gobelet 60, et l'analyse en spectrométrie de masse (Cf. paragraphe C) a montré qu'il s'agissait de produits laitiers de bovidé. De la graisse animale non déterminée a également été identifiée dans le gobelet 416, mélangée avec du brai de bouleau. Il semblerait que le brai ayant servi à réparer cette céramique ait migré à l'intérieur des parois de la céramique, et que ce soit la raison pour laquelle on détecte ce mélange. Cela peut être dû au chauffage de la céramique réparée, qui entraîne la migration de certains composés dans la paroi de la céramique. Nous n'avons pas pu analyser l'adhésif seul, afin de vérifier si la graisse animale n'a pas été utilisée comme additif au brai (plastifiant), mais cela semble peu probable. De la cire d'abeille seule a été détectée dans le gobelet 324. Il se peut que la cire retrouvée soit un résidu de boisson à base de miel, comme l'hydromel ou qu'elle ait servi à l'enduction du gobelet destiné à contenir un liquide. Enfin, aucune trace de lipide n'a été détectée dans le gobelet 213, ce qui signifie probablement que ce dernier a servi à contenir un matériau avec peu voire pas de lipides. Deux autres tessons ont été prélevés sur des céramiques réparées, il s'agit du vase 215 dans lequel une graisse animale indéterminée a été identifiée, et de l'assiette 211, dans laquelle aucune trace de lipide n'a été détectée. Pour ces deux céramiques, les adhésifs n'ont pas été prélevés ni analysés, faute de temps. Cependant, ces adhésifs sont très similaires en texture, couleur et type de fixation à ceux qui ont pu être prélevés et analysés, il est donc vraisemblable qu'il s'agisse là encore de brai de bouleau. Les autres céramiques réparées sont un petit bol/godet, un vase, deux amphores, une assiette et une coupe. Le vase et les amphores sont réparées au niveau du col/bord.

Par rapport à l'état de dégradation des triterpènes présents dans les adhésifs, il n'a pas été possible de faire de corrélation entre cet état et un type de récipient ou l'utilisation de l'adhésif (décor ou réparation). Il semblerait que ce soit un phénomène dû à la fabrication même de l'adhésif, qui ne semble donc pas être très standardisée. Nous n'avons retrouvé aucun adhésif qui soit présent sous forme d'encroûtement à l'intérieur d'une céramique et qui pourrait provenir de la production de brai, il est donc très difficile de conclure quant à la chaîne opératoire. On peut alors se poser la question de l'acquisition du brai de bouleau. Est-ce un produit échangé avec d'autres groupes, ou est-il préparé en dehors du village, sur un site qui n'a pas été retrouvé? Le brai de bouleau a été identifié comme adhésif d'emmanchement sur des pointes de flèches et autres artefacts datant du Paléolithique et du Mésolithique, époques pour lesquelles la céramique n'est pas connue. Sa préparation, à cette époque,

s'est donc faite autrement que par chauffage dans une céramique. A l'heure actuelle, la plupart des équipes travaillant ou ayant travaillé sur le brai de bouleau au Néolithique, postule que ce dernier a été fabriqué dans des céramiques. Il est possible que le manque de données relatives à des céramiques de préparation soit dû au fait que le brai a pu être préparé autrement, comme cela a sans doute été le cas au Paléolithique et au Mésolithique. Ce ou ces modes de préparation ne laisseraient que peu de traces, difficilement interprétables de surcroît {Aveling & Heron 1998; Koller *et al.* 2001; Lucquin *et al.* 2007; Regert *et al.* 1998b; Regert *et al.* 2003b}.

La réparation des récipients, dans un milieu où le savoir-faire en matière de céramique semble élevé, peut être expliquée par des problèmes de cuisson, entraînant des fissures au niveau du col/bord sur les grands récipients (vases et amphores). Ces fissures verticales sont alors réparées, afin de ne pas avoir à recommencer une série de poteries. Au vu des techniques de montage de la céramique, et des pâtes et dégraissants utilisés, le séchage et la cuisson de ces poteries semblent demander des conditions climatiques bonnes, relativement sèches notamment, ce qui est rare dans cette région. Les céramiques auraient alors été préparées par séries, lorsque les conditions climatiques étaient réunies. Ce qui explique qu'en cas de fissures ou de cassures ne mettant pas en jeu l'intégrité des poteries, celles-ci aient été réparées. Le fait que les vases soient carénés peut aussi être un corollaire, car la carène arrête les fissures sous le bord, ce qui permet de garder l'intégrité du vase dans son volume (P. Pétrequin, communication personnelle).

Dans le corpus mis au jour, ce sont les gobelets qui sont le plus souvent réparés. Or il a été montré en ethnographie que les vases de stockage, qui ne sont pas destinés à être manipulés, sont ceux qui se cassent le moins. Les gobelets, qui sont des poteries facilement manipulables, sont à contrario plus sujets à la casse. Si on reprend le raisonnement sur les grandes séries de fabrication de la céramique, les gobelets sont alors les récipients qui sont le plus souvent réparés. Les accidents de cuisson sur des petits récipients comme les gobelets ou les godets sont peu probables, au vu du savoir-faire des populations de CL XIV. La coupe, l'assiette et le petit bol/godet rentrent aussi dans ce groupe de céramiques facilement manipulables, mais il n'y en a que peu de réparées. Le problème pour ce type de récipients est qu'une fissure devient très facilement dommageable pour l'intégrité de la céramique, dont la réparation ne présente alors pas d'intérêt.

Il n'est pas possible d'interpréter correctement la présence d'adhésif sur les tessons libres. Leur analyse permet tout de même de montrer l'omniprésence du brai de bouleau comme adhésif retrouvé à CL XIV.

B.5. Conclusion

Grâce à la chromatographie en phase gazeuse, il a été possible d'identifier un certain nombre de matières grasses dans les céramiques de Clairvaux XIV. Il s'agit de matière grasse végétale, provenant certainement de recettes à bases de plantes et de plantes oléagineuses, de cire d'abeille, seule ou mélangée à des graisses animales. Il peut s'agir soit de cire utilisée en tant que telle, soit de résidu de recettes à base de miel, qui aurait totalement disparu à cause des phénomènes de lixiviation par l'eau du sédiment. Il est en tous cas certain que les produits de la ruche étaient exploités à Clairvaux, et ce à diverses fins. Enfin, nous avons mis en évidence l'utilisation de brai de bouleau comme adhésif, de réparation ou de fixation de décors à l'écorce de bouleau, sur un certain nombre de céramiques, et plus particulièrement sur les gobelets. Le dernier groupe de matières identifiées, par chromatographie en phase gazeuse, est celui des graisses animales. A partir des développements méthodologiques présentés dans le chapitre III, nous avons appliqué les critères structuraux aux échantillons archéologiques, afin d'identifier le type de graisse présente et l'espèce animale originelle.

C. Le cas des graisses animales

L'identification des graisses animales est basée sur la détection, par chromatographie en phase gazeuse de biomarqueurs et de marqueurs de dégradation spécifiques à ces dernières. Les échantillons ont pu être classés en fonction de leur distribution en triglycérides, qui sont les biomarqueurs les plus caractéristiques des graisses animales. Les triglycérides sont ensuite purifiés afin de les analyser spécifiquement en spectrométrie de masse. Il a ainsi été possible d'appliquer les critères de discrimination des graisses animales mis en place sur les échantillons modèles (Cf. chapitre III), pour identifier plus précisément les graisses animales (graisses sous-cutanées ou graisses de produits laitiers) et leur espèce d'origine (boviné ou capriné/oviné) exploitées au Néolithique à Clairvaux XIV.

C.1. La chromatographie en phase gazeuse, extraction A

C.1.1. Résultats

Les graisses animales sont caractérisées par la présence d'acides gras, principalement $C_{14:0}$, $C_{16:0}$ et $C_{18:0}$ avec, dans des proportions plus ou moins importantes, $C_{15:0}$ et $C_{17:0}$ présents sous la forme d'un (linéaire) ou de 3 isomères (linéaire, iso et antéiso), de cholestérol et de son produit de dégradation le cholestanol, de mono- et diglycérides et, dans les cas où la matière est bien conservée, par la présence de triglycérides {Charters *et al.* 1995; Evershed *et al.* 1997a; Evershed *et al.* 2002; Mottram *et al.* 1999; Regert *et al.* 2003a}. Dans certains échantillons bien conservés, la présence de $C_{12:0}$ et de $C_{20:0}$ peut être observée. Les distributions en triglycérides varient de T_{40} à T_{54} . Tout ou partie de cet ensemble de marqueurs a été détecté dans 25 céramiques archéologiques (25 tessons et 8 résidus carbonisés analysés, sur les 11 résidus carbonisés observés).

Dans les extraits de certains échantillons, seuls des acides gras et des stérols ont été détectés, avec parfois des traces de triglycérides. Cette composition n'est caractéristique que de graisses animales dégradées, pour lesquelles il n'est pas possible de déterminer la nature et l'origine spécifique (Figure 123). Il s'agit du tesson MR1039 du vase 48, du tesson MR1055 et du résidu MR1056 du vase 184, du tesson MR1061 du vase 214, du tesson MR1077 du vase 291, du tesson MR1079 du vase 313, du tesson MR1068 du vase 256, du résidu MR1105 de l'amphore 432 et du tesson MR1090 et du résidu MR1091 de l'assiette 365 (11 échantillons, 8 poteries).

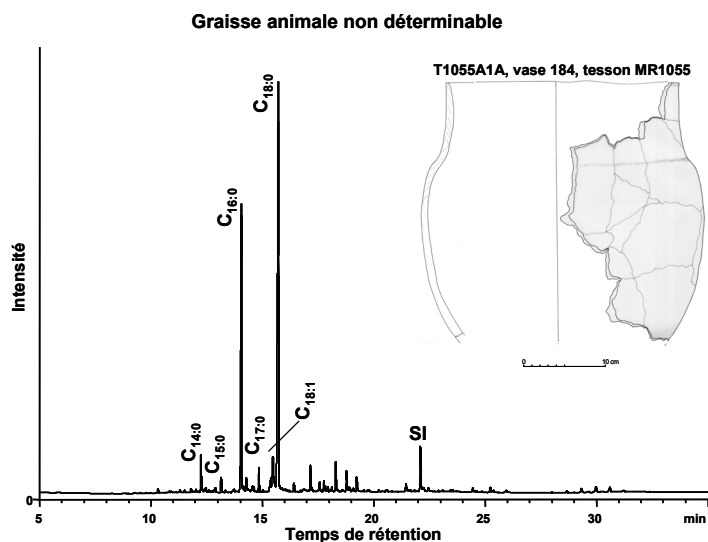


Figure 123 : Chromatogramme de l'échantillons T1055A (vase 184) en HT CPG (méthode MR1CER, encadrés 3 et 9), caractéristique d'une graisse animale indéterminée. [Gas chromatogram of sample T1055A, vessel 184, by HT GC, characteristic of an unknown animal fat]

Dans un échantillon, présentant des traces de réparation (gobelet 416, tesson MR1100), un mélange de brai de bouleau et de graisse animale indéterminée a été identifié.

Sur les autres chromatogrammes (20 échantillons, 20 céramiques), en plus de ces marqueurs, nous avons détecté des triglycérides en proportion non négligeable, jusqu'à 40 % du TLE pour l'échantillon T1096A (gobelet 388, Figure 124), ce qui va permettre de les classer en différentes catégories.

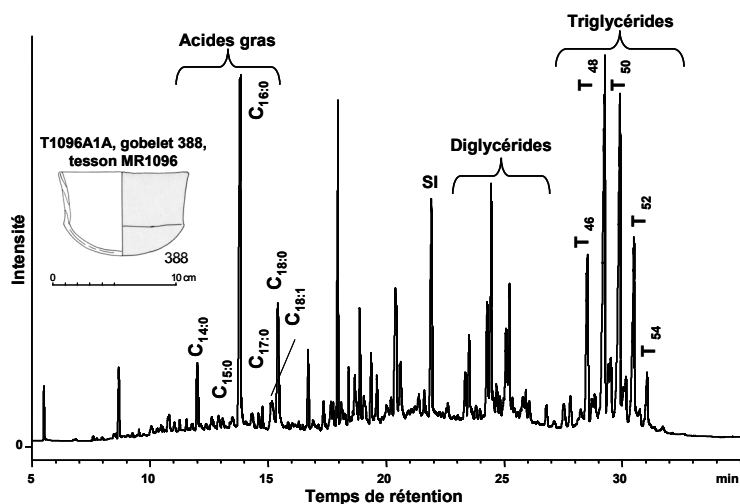


Figure 124 : Chromatogramme de l'échantillon T1096A (profil 388) obtenu en HT CPG (méthode MR1CER, encadrés 3 et 9). [Gas chromatogram of sample T1096A, bowl 388, by HT GC]

Pour les céramiques pour lesquelles le tesson et le résidu carbonisé ont été prélevés et analysés (8 poteries), on remarque plusieurs cas de figure (Tableau 47). Tout d'abord, deux échantillons (résidu MR1083, gobelet 321 et tesson MR1104, amphore 432) n'ont montré aucune trace de lipides alors que leur tesson/résidu associé est caractérisé par la présence de biomarqueurs et de marqueurs de dégradation des graisses animales. Le tesson MR1082, gobelet 321, est caractérisé par une distribution large en triglycérides, indicative de produits laitiers. Dans le résidu MR1105, amphore 432, des marqueurs de graisses animales dégradées, indéterminées, ont été détectés. Il est assez difficile d'expliquer ces différences. Dans le premier cas, il est possible que le résidu soit entièrement carbonisé, ce qui expliquerait qu'aucune trace de matière organique ne soit détectée. Dans le cas de l'amphore, celle-ci a probablement été utilisée pour contenir des liquides non gras, qui n'ont donc pas laissé de traces interprétables dans le tesson, et a probablement servi à cuire des aliments à base de graisse animale, comme en témoignent les traces de combustion sur la paroi extérieure. Il est possible qu'elle n'ait alors servi que peu de fois et qu'elle n'ait pas supporté le chauffage répétitif, ce qui expliquerait que la matière lipidique ne soit pas imprégnée en suffisamment grande quantité. Pour deux couples tesson/résidu, la composition moléculaire est similaire dans le tesson et dans le résidu, de même que la concentration en lipides (céramiques 184 et 365). Ces céramiques ont certainement contenu une seule et même denrée alimentaire, au cours de leur utilisation. Enfin, pour les quatre derniers couples, la composition du tesson (graisses animales indéterminées) est bien plus dégradée que celle du résidu (graisses animales déterminables), de même que les tessons sont beaucoup moins concentrés (18 à 200 $\mu\text{g/g}$) que les résidus (600 à 3000 $\mu\text{g/g}$). Il s'agit des vases 48, 214, 256 et 313 (Tableau 47). Il est possible dans ces quatre cas que les céramiques aient été utilisées à différentes fins, et qu'elles aient servi de céramique de stockage ou de cuisson de graisses animales à la fin de leur vie. Les graisses n'auraient donc pas eu le temps de s'imprégner beaucoup dans la paroi.

C.1.2. Classement des échantillons

Pour classer les échantillons, nous nous sommes basé sur leur composition en triglycérides, qui sont les biomarqueurs les plus caractéristiques des graisses animales. Nous n'avons donc pris en compte que ceux dont les triglycérides sont bien conservés (20 échantillons, 20 céramiques, Tableau 47). Nous n'avons donc pas pris en compte les échantillons de graisses animales indéterminées, ceux qui ne présentent pas de traces de lipides ni l'échantillon caractérisé par un mélange de brai de bouleau et de graisses animales.

Références				Résultats				Identification HT CPG	Classés
Catégorie de récipients	Année et N° de vase	Tesson	Résidu	Clipides (µg/g)	% AG	% TAGs	% EP		
vase à épaulement	2003- 48	MR1039		18.72	20.99	0.00	0.00	Graisse animale indéterminée	
			MR1040	1407.51	40.70	18.56	0.00	Produits laitiers; distribution large de TAGs	X
	2003- 151	MR1051A		416.71	80.02	3.64	0.00	Graisse animale; distribution étroite de TAGs	X
	2003- 184	MR1055		235.61	80.75	3.11	0.00	Graisse animale indéterminée	
			MR1056	479.19	56.12	0.00	0.00		
2003- 195	MR1058A		112.20	24.89	18.73	0.00	Produits laitiers; distribution large de TAGs	X	
vase tulipiforme	2003- 130	MR1049A		167.54	54.56	11.65	0.00	Produits laitiers; distribution large de TAGs	X
Vase à profil en S	2003- 214	MR1061A		233.24	72.52	0.29	0.00	Graisse animale indéterminée	
			MR1062A	3018.49	62.61	7.92	0.00	Produits laitiers; distribution large de TAGs	X
	2004-291	MR1077		18.13	12.34	11.75	0.00	Graisse animale indéterminée	
	2004-313	MR1079		29.73	55.12	0.00	0.00	Graisse animale indéterminée	
		MR1080	618.62	54.90	15.21	0.00	Graisse animale; distribution étroite de TAGs	X	
vase pseudo-tulipiforme	2004-256	MR1068		17.97	79.21	0.00	0.00	Graisse animale indéterminée	
			MR1069	X	52.40	36.08	0.00	Graisse animale; distribution moyenne en TAGs	X
amphore	2004-432	MR1104		0.00	0.00	0.00	0.00	Pas de lipide	
			MR1105	236.24	29.01	3.71	0.00	Graisse animale indéterminée	
gobelet carène basse	2003- 60	MR1041A		125.77	11.36	23.19	0.00	Produits laitiers; distribution large de TAGs	X
	2004-321	MR1082A		36.69	6.96	25.08	0.00	Produits laitiers; distribution large de TAGs	X
			MR1083	0.00	0.00	0.00	0.00	Pas de lipide	
2004-388	MR1096A		208.58	17.93	39.37	0.00	Graisse animale; distribution moyenne de TAGs	X	
gobelet haut à carène moyenne	2004-281	MR1075A		266.84	33.77	11.24	0.00	Cire + Graisse animale; distribution moyenne de TAGs	X
fragment de gobelet	2004-416	MR1100		188.61	20.91	?	0.00	Brai de bouleau + graisse animale indéterminée	
marmite à carène moyenne	2004-350	MR1088		302.35	31.18	11.09	0.00	Produits laitiers; distribution large de TAGs	X
coupe large à carène basse	Puisard- 12	MR1035A		234.17	28.28	24.26	2.80	Cire + Graisse animale; distribution étroite de TAGs	X
	2004-310	MR1078A		257.87	31.23	15.74	12.80	Cire + Graisse animale; distribution moyenne de TAGs	X
	2004-421	MR1101		156.71	50.81	12.62	0.00	Graisse animale; distribution moyenne de TAGs	X
coupe	2003- 168	MR1052		51.41	15.55	22.18	0.00	Graisse animale; distribution moyenne de TAGs	X
assiette	2004-365	MR1090		1370.84	83.20	1.01	0.00	Graisse animale indéterminée	
			MR1091	non intégré					
microvase	2003- 87	MR1047A		207.60	28.37	12.80	0.00	Graisse animale; Distribution moyenne de TAGs	X
petit bol/godet	2003- 150	MR1050		180.23	35.68	14.42	0.00	Produits laitiers; Distribution large de TAGs	X
	2004-259	MR1071A		21.91	9.89	16.62	0.00	Produits laitiers; Distribution large de TAGs	X
	2004-346	MR1087A		36.49	27.79	9.51	0.00	Produits laitiers; Distribution large de TAGs	X

Tableau 47 : Liste des échantillons dont les chromatogrammes sont caractéristiques de graisses animales (HT CPG, méthode MR1CER, encadrés 3 et 9). [Samples whose chromatograms are characteristic of animal fats]

Nous avons tout d'abord tenté de classer les échantillons en fonction de leur distribution en triglycérides (Tableau 48). Les échantillons présentant une distribution en triglycérides large, de T₄₀T₄₂ à T₅₄ sont identifiables à des produits laitiers dégradés (10 échantillons, Tableau 48). Les échantillons dont la distribution en triglycérides est étroite, de T₄₆ à T₅₄, avec une quantité de triglycérides proche de celle des acides gras, ce qui montre un faible taux d'hydrolyse, sont caractéristiques de graisses sous-cutanées {Dudd *et al.* 1998; Dudd *et al.* 1999; Evershed *et al.* 1997a; Evershed *et al.* 2002; Regert *et al.* 2001b; Regert *et al.* 2003a} (3 échantillons). Enfin, les échantillons présentant une distribution intermédiaire en triglycérides, T₄₄ à T₅₄, ne peuvent pas être correctement identifiés, ni en tant que graisses sous-cutanées ni en tant que produits laitiers (7 échantillons).

Produits laitiers : distribution large de TAGs, T ₄₀ -T ₄₂ → T ₅₄	Graisses animales : distribution moyenne de TAGs, T ₄₄ → T ₅₄	Graisses animales : distribution étroite de TAGs, T ₄₆ → T ₅₄
48, 60, 130, 150, 195, 214, 321, 259, 346, 350	87, 168, 256, 281, 310, 388, 421	12, 151, 313
<p>T1071A1A, vase 259</p>	<p>T1078A1A, vase 310</p>	<p>T1035A1A, vase 12</p>

Tableau 48 : Classement des échantillons en fonction de leur distribution en triglycérides, données obtenues en HT CPG, méthode MR1CER, encadrés 3 et 9. [Sample classification based on the TAG distribution, data obtained by HT GC]

Afin d'affiner cette classification, nous avons calculé un facteur de dispersion (FD) autour de la moyenne du nombre d'atomes de carbone (M), comme cela a été présenté dans le chapitre III pour les produits laitiers vieillis et dans l'article d'*Analytical Chemistry* en annexe {Mirabaud *et al.* 2007}. Il s'agit d'une modélisation de la largeur de la distribution en triglycérides autour du nombre moyen d'atomes de carbone, pour chaque échantillon. La formule pour calculer le facteur de dispersion est donnée ci-dessous, avec M la moyenne du nombre d'atomes de carbone de tous les triglycérides, pour chaque échantillon, C_i le nombre d'atomes de carbone pour un triglycéride i et P_i le pourcentage du triglycéride i.

$$FD = \frac{\sqrt{\sum [(C_i - M)^2 \times C_i P_i]}}{\sum P_i}$$

Le graphe obtenu est présenté en Figure 125 ci-dessous.

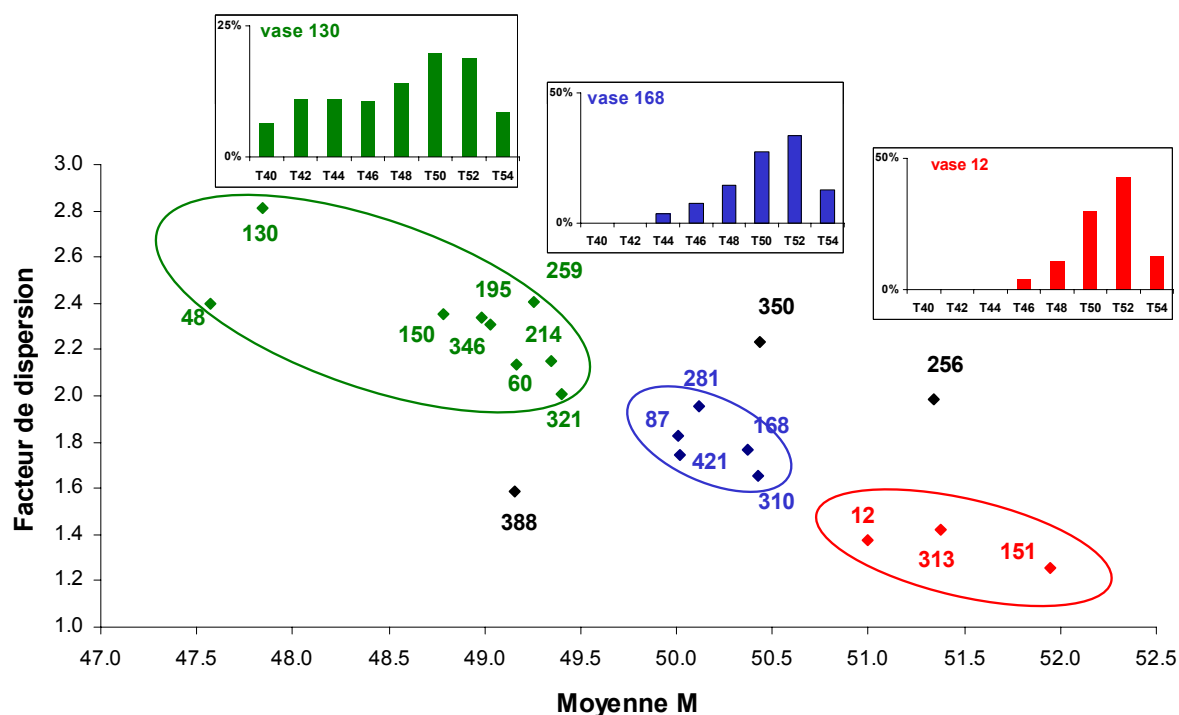


Figure 125 : Distribution des échantillons archéologiques en fonction de leur facteur de dispersion (FD) autour de la moyenne du nombre d'atomes de carbone (M), par HT CPG (méthode MR1CER, encadrés 3 et 9); Chaque point correspond à une céramique dont le numéro de référence est donné à côté, tableau 19). [Dispersion factor (FD) vs. average value of the number of carbon atoms (M) of the triglycerides for each archaeological sample, identified by the reference number of its vessel, by HT GC]

Un vase (350) dont la distribution en triglycérides pouvait être considérée comme large (Tableau 48) se distingue du groupe des produits laitiers (Figure 125, ellipse verte) par une moyenne M plus élevée, mais avec un facteur de dispersion équivalent. Deux échantillons (vases 256 et 388) qui étaient classés dans les échantillons ayant une distribution moyenne (Tableau 48) se distinguent également de leur groupe (Figure 125, ellipse bleue). L'un (388) a une moyenne M et un facteur de dispersion FD plus bas alors que l'autre (256) a une moyenne M et un facteur de dispersion FD plus hauts. Pour les autres échantillons, ce classement par le facteur de dispersion, simple à modéliser, est un moyen quantifiable de traiter les échantillons, de manière plus fiable que la seule distribution en triglycérides. On distingue donc 3 groupes, le premier (Figure 125, ellipse verte) correspond aux produits laitiers, le deuxième (Figure 125, ellipse bleue) correspond aux graisses animales à déterminer et le dernier (Figure 125, ellipse rouge) correspond à des graisses animales de type sous-cutané, ce qu'il faut confirmer.

Si on reporte sur le même graphe les données obtenues à partir du vieillissement des produits laitiers (Chapitre III), on peut voir qu'il n'est pas possible à partir de la seule distribution en triglycérides de discriminer les graisses sous-cutanées des produits laitiers dégradés (Figure 126). En effet, comme cela avait déjà été observé auparavant, la distribution en triglycérides de produits laitiers dégradés devient, au fur et à mesure de la dégradation, similaire à celle obtenue pour des

graisses sous-cutanées {Dudd & Evershed 1998; Dudd *et al.* 1998}. Il n'est donc pas possible d'identifier les échantillons dont la distribution est intermédiaire (ellipse bleue) et ceux qui ne rentrent dans aucune des ellipses. Ils peuvent être soit caractéristiques de graisses de produits laitiers très dégradés, soit caractéristiques de graisses sous-cutanées bien conservées.

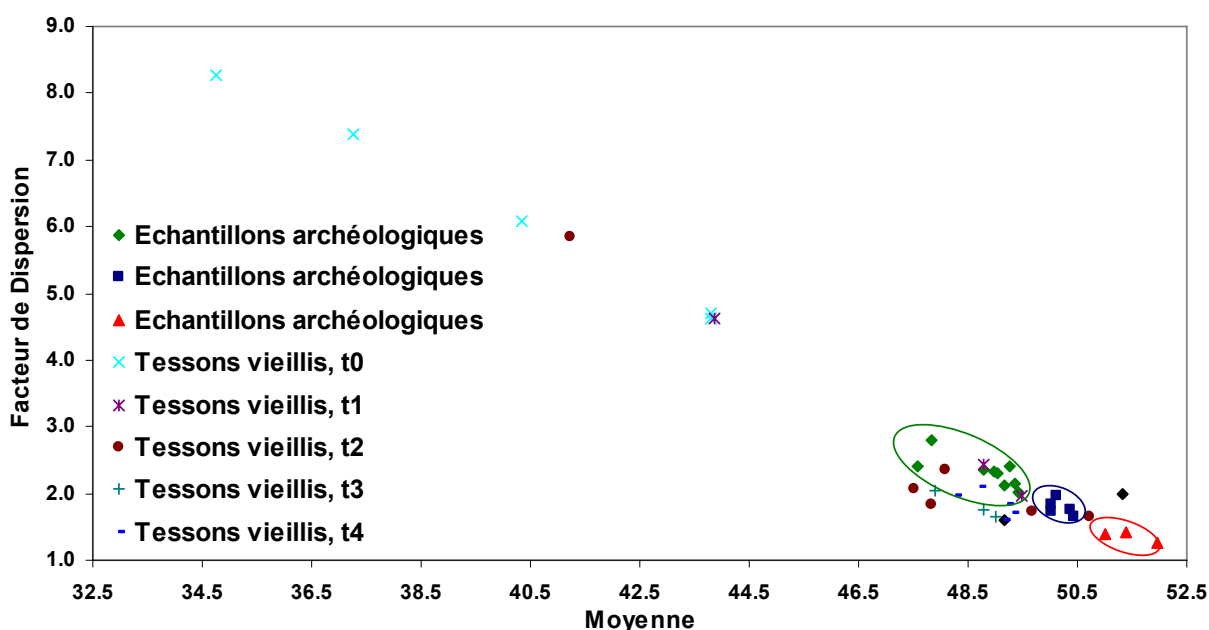


Figure 126 : Distribution des échantillons archéologiques et des échantillons de tessons imprégnés de lait vieillis, en fonction leur facteur de dispersion autour de la moyenne d'atomes de carbone, par HT CPG (méthode MR1CER, encadrés 3 et 9); les couleurs des échantillons archéologiques correspondent aux couleurs du graphe précédent, vert: produits laitiers dégradés, bleu: graisses animales, distribution moyenne en TAGs, rouge: graisses animales, distribution étroite en TAGs. [Dispersion factor vs. average number of carbon atoms for the triglycerides of the archaeological samples and of the aged samples (Cf. chapitre 3), by HT GC; for the archaeological samples, green: degraded dairy products, blue: animal fats, medium distribution of TAGs, red: narrow distribution of TAGs]

C'est pourquoi nous avons appliqué à ces échantillons une méthodologie novatrice, en spectrométrie de masse à ionisation nanospray, pour l'identification structurale des triglycérides archéologiques.

C.2. La spectrométrie de masse

Comme nous l'avons montré précédemment, la chromatographie en phase gazeuse atteint ses limites lorsqu'il s'agit de caractériser finement la distribution en triglycérides des échantillons archéologiques. Les deux problèmes majeurs sont d'une part la co-élution des composés à même nombre d'atomes de carbone, sans distinction du nombre de doubles liaisons et d'autre part le peu d'information qu'il est possible de retirer des spectres de masse obtenus en impact électronique. Nous avons vu, pour des graisses animales de référence, que la spectrométrie de masse à ionisation nanospray est tout à fait adaptée à la caractérisation des triglycérides. Grâce à la chromatographie en

phase gazeuse, il est possible de sélectionner les échantillons les mieux conservés, c'est-à-dire ceux dont les triglycérides sont susceptibles d'être analysés en spectrométrie de masse. Après une première étape de purification de la fraction triglycéride, nous avons caractérisé leur distribution avant de déterminer la composition en acides gras de chacun des triglycérides de chaque échantillon. Nous avons ensuite comparé ces données avec celles obtenues sur les échantillons de référence afin d'identifier les graisses animales présentes dans les céramiques archéologiques.

C.2.1. Préparation des échantillons

Les échantillons sont sélectionnés à partir de leur composition en triglycérides obtenue en chromatographie en phase gazeuse.

Nous avons tout d'abord testé la méthodologie sur 3 échantillons, le tesson MR1050 du bol 150, le tesson MR1101 de la coupe 421 et le tesson MR1052 de la coupe 168. Le premier échantillon (MR1050) a une distribution en triglycérides large, caractéristique de produits laitiers dégradés. Les deux autres échantillons sont caractérisés par une distribution moyenne en triglycérides (Figure 20, ellipse bleue). La préparation de ces échantillons a été faite par purification des triglycérides sur une colonne de silice de type SPE (*Solid-Phase Extraction*), afin de les séparer non seulement des acides gras et autres marqueurs des graisses animales mais aussi de l'alcane qui a été ajouté comme standard interne au moment de l'extraction (Cf. chapitre II). Une fois les fractions triglycérides obtenues, elles ont été analysées, après dopage aux sels de lithium, en spectrométrie de masse nanoESI Q-q-TOF.

Pour différentes raisons, explicitées dans le chapitre II, les échantillons suivants ont été ré-extraits lorsqu'il y avait suffisamment de tesson ou de résidu, sans ajout de standard interne (Tableau 49). Sans alcane, il est possible de purifier les triglycérides sur une colonne aminopropyle de type SPE. Il s'agit d'un fractionnement acide/neutre. Une fois les fractions triglycérides obtenues, elles ont été dopées avec des sels de lithium avant d'être analysées en spectrométrie de masse nanoESI Q-q-TOF. Sur les 17 échantillons provenant de 15 individus qui ont été extraits à nouveau (extraction B), seuls 15 ont été fractionnés. Au sein de ce groupe d'échantillons, seuls 12 échantillons ont été analysés en spectrométrie de masse (Tableau 49). La liste détaillée des échantillons et de leur mode de préparation est donnée dans le chapitre II, où les protocoles de séparation sont également décrits.

Poterie	Tesson/résidu	Extraction	Fractionnement	Analyse en SM
Coupe 12	MR1035	T1035B	Acide/neutre	Oui
Vase 48	MR1040	R1040B	Acide/neutre	Oui
Gobelet 60	MR1041	T1041B	Acide/neutre	Oui
Microvase 87	MR1047	T1047B	Acide/neutre	Oui
Vase 130	MR1049	T1049B	Acide/neutre	Oui
Bol 150	MR1050	T1050A	SiO ₂	Oui
Vase 151	MR1051	T1051B	Acide/neutre	Oui
Coupe 168	MR1052	T1052A	SiO ₂	Oui
Vase 195	MR1058	T1058B	Acide/neutre	Oui
Vase 214	MR1061	T1061B	Acide/neutre	Non
	MR1062	R1062B	Acide/neutre	Oui
Petit bol 259	MR1071	T1071B	Acide/neutre	Non
Gobelet 281	MR1075	T1075B	Acide/neutre	Non
Coupe 310	MR1078	T1078B	Acide/neutre	Oui
Gobelet 321	MR1082	T1082B	Acide/neutre	Oui
Marmite 350	MR1088	T1088B	Acide/neutre	Oui
Gobelet 388	MR1096	T1096B	Acide/neutre	Oui
Coupe 421	MR1101	T1101A	SiO ₂	Oui

Tableau 49 : Liste des échantillons archéologiques préparés et analysés en spectrométrie de masse nanoSpray Q-q-TOF.

C.2.2. Analyse en spectrométrie de masse

Nous avons utilisé le spectromètre de masse nanoESI Q-q-TOF, pour sa simplicité d'utilisation et les résultats obtenues en mode tandem (Cf. chapitre III). Les spectres de masse obtenus sont caractérisés par la présence des diglycérides en plus de triglycérides. Ils sont assez peu intenses, certainement à cause des impuretés résiduelles diminuant le courant ionique total. Les triglycérides sont des composés difficiles à ioniser par nanospray, car ils sont hydrophobes et apolaires. L'ajout de sels de lithium permet de pallier ce faible taux d'ionisation, mais celui-ci reste toujours bas.

Le spectre de masse de l'échantillon FM1050 (tesson T1050, extraction A, fractionnement SiO₂) est donné en Figure 127, en parallèle de son chromatogramme avant fractionnement. Pour cet échantillon, la sensibilité de détection est la même que la chromatographie en phase gazeuse, mais deux avantages sont à noter. Tout d'abord, grâce à la spectrométrie de masse il est possible de distinguer les composés insaturés des composés saturés.

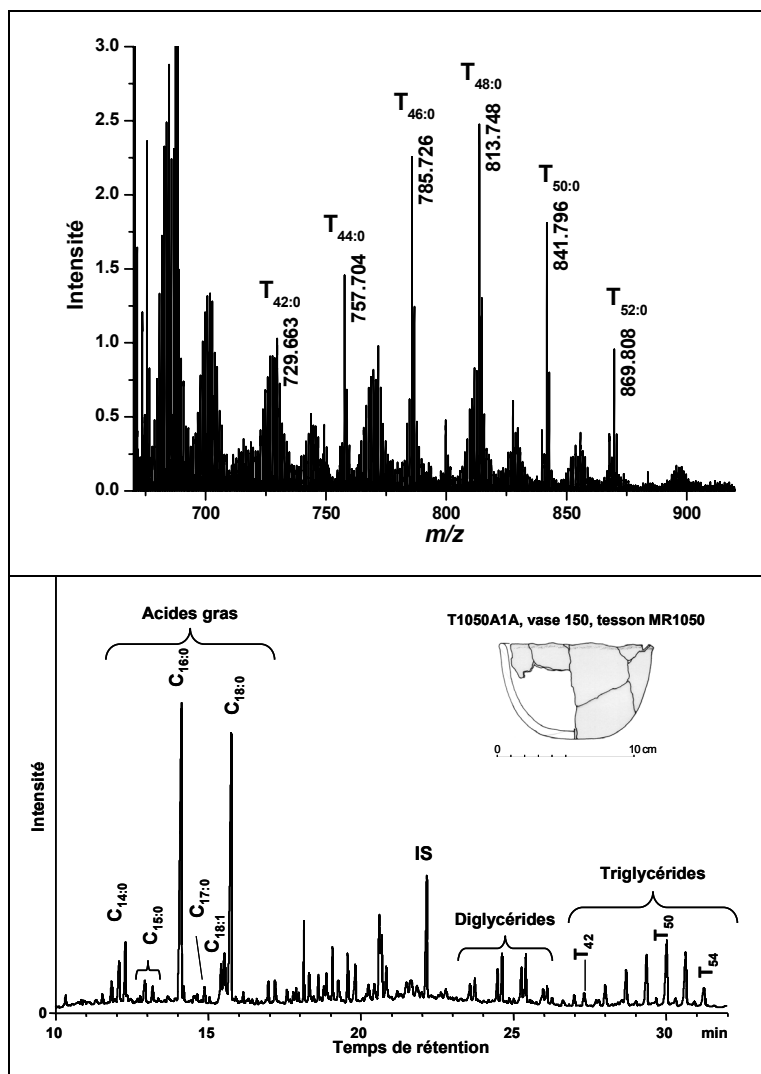


Figure 127 : Spectre de masse en nanoESI Q-q-TOF MS de la fraction triglycéride de l'échantillon T1050A (encadrés 15 et 16) et chromatogramme de l'échantillon T1050A non fractionné (méthode MRICER, , encadrés 3 et 9). [Mass spectrum of the TAG fraction of sample T1050A by Li⁺-nanoESI Q-q-TOF MS, and gas chromatogram of the silylated total lipid extract of the same sample]

D'autre part, la possibilité d'utiliser le mode tandem, ou spectrométrie de masse MS², permet de gagner en sensibilité de détection, tout en effectuant une analyse structurale triglycéride par triglycéride. Les spectres de fragmentation obtenus sont similaires à ceux obtenus pour les échantillons de référence, que nous avons décrits dans le chapitre III. Les principaux fragments sont les pertes des acides gras, sous formes neutre et lithiée, correspondant respectivement aux pics $[M + Li - RCOOH]^+$ et $[M + Li - RCOOLi]^+$. Les pics des ions acylium RCO^+ sont difficilement détectables sur ces spectres (Figure 128).

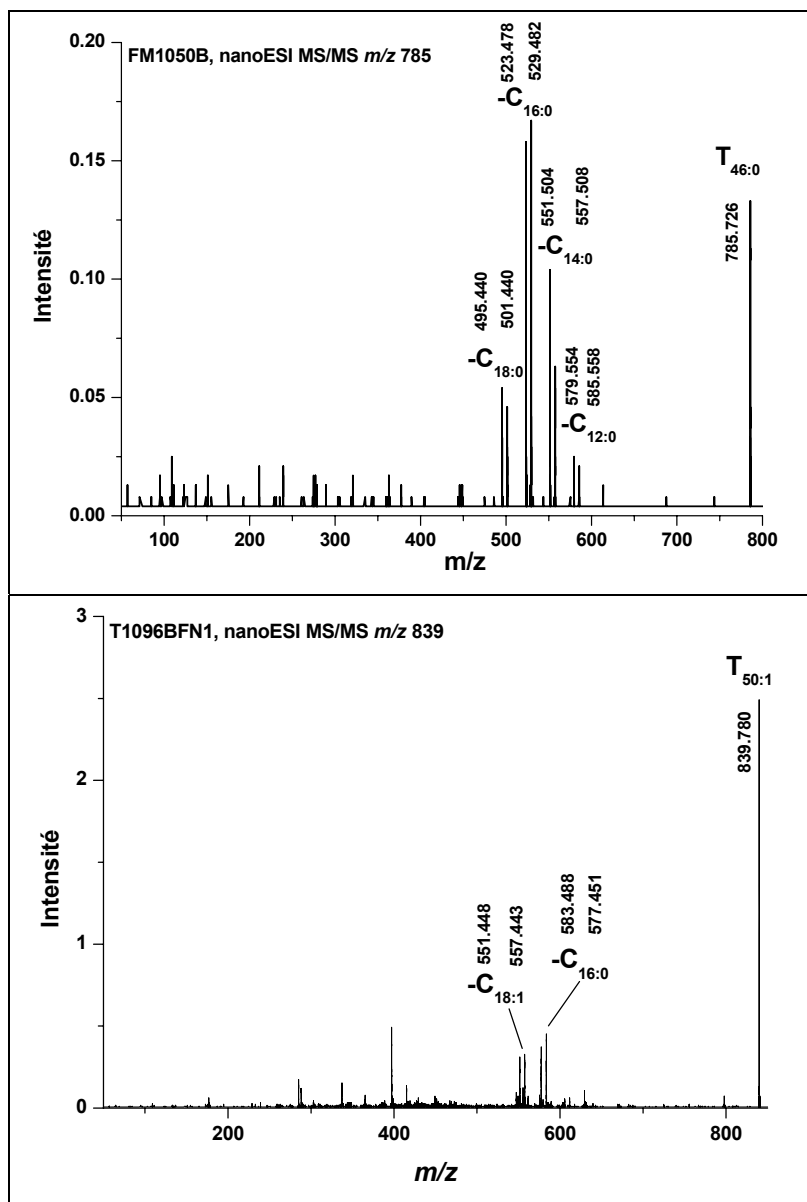


Figure 128 : Spectres de fragmentation obtenus en nanoESI MS/MS du pic m/z 785 ($T_{46:0}$) de l'échantillon FM1050B (encadré 5) et du pic m/z 839 ($T_{50:1}$) de l'échantillon T1096BFN (encadré 6). [Fragmentation mass spectra of peak m/z 785 ($T_{46:0}$) from TAG fraction FM1050B and peak m/z 839 ($T_{50:1}$) from TAG fraction T1096BFN, obtained by Li^+ -nanoESI MS/MS]

On peut remarquer que les compositions en acides gras ne sont pas très complexes. Ainsi le groupe de triglycérides $T_{46:0}$ de l'échantillon FM1050B est constitué de 4 acides gras, $C_{12:0}$, $C_{14:0}$, $C_{16:0}$ et $C_{18:0}$. Pour le groupe de triglycéride $T_{50:1}$ de l'échantillon T1096BFN, seuls les acides gras $C_{16:0}$ et $C_{18:1}$ sont détectés. Très peu de triglycérides de ces échantillons, même ceux qui a posteriori seront identifiés comme du lait, ont des compositions en acides gras complexes, comme on a pu le voir pour l'échantillon de Chalain 4 (Cf. article en annexe) {Mirabaud *et al.* 2007}. Ceci est certainement dû au fait que le site de Clairvaux XIV est plus vieux d'un millénaire, les échantillons sont donc certainement plus dégradés.

C.2.3. Identification des graisses animales

Nous avons appliqué la méthodologie développée au chapitre 3 pour la discrimination des graisses animales et l'identification de l'espèce d'origine. Nous avons donc tracé les courbes avec, en ordonnée, les intensités relatives des pics $[M + Li - RCOOLi]^+$ et, en abscisse, les acides gras correspondant. Les courbes obtenues pour les échantillons FM1050B, FM1052B et FM1101B viennent d'être publiées dans *Analytical Chemistry*, et la copie de l'article est donnée en annexe {Mirabaud *et al.* 2007}. Les courbes obtenues pour l'échantillon de la coupe 12 (aussi appelée vase 12) sont présentées à titre d'exemple en Figure 129. La composition en triglycérides de cet échantillon s'étend du $T_{46:0}$ au $T_{54:0}$ et du $T_{48:1}$ au $T_{54:1}$. Pour les triglycérides isobares $T_{46:0}$, la distribution obtenue est plus proche de la graisse de vache, que ce soit en comparaison avec le lait de vache ou la graisse de mouton. De la même manière, pour les triglycérides insaturés $T_{48:1}$ et $T_{50:1}$, les distributions obtenues sont similaires à celles obtenues pour la graisse de vache. On peut en déduire que cet échantillon est certainement de la graisse sous-cutanée, comme prédit par la CPG, et qu'il provient probablement d'un bovin.

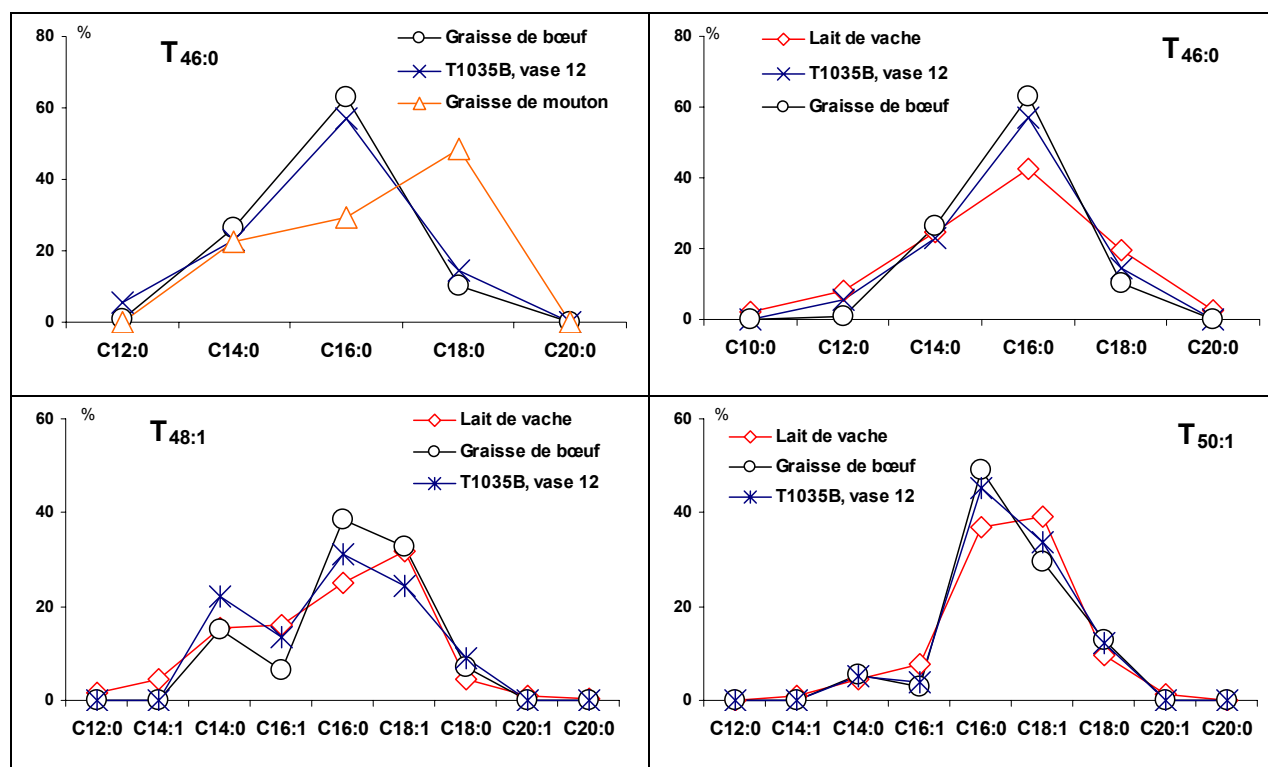


Figure 129 : Courbes de distribution des acides gras des triglycérides $T_{46:0}$, $T_{48:1}$ et $T_{50:1}$ obtenues par nanoESI MS/MS de l'échantillon T1035BFN, coupe 12. [Fatty acid distribution curves for TAGs $T_{46:0}$, $T_{48:1}$ et $T_{50:1}$, obtained by Li^+ -nanoESI MS/MS of the TAG fraction T1035BFN]

Les courbes obtenues pour l'échantillon T1058B (T1058BFN) sont présentées en Figure 130. La distribution en triglycérides de cet échantillon est bien conservée, de $T_{36:0}$ à $T_{52:0}$ pour les

triglycérides saturés et de $T_{46:1}$ à $T_{50:1}$ pour les insaturés. La présence des triglycérides $T_{36:0}$, $T_{38:0}$ et $T_{40:0}$ permet de conclure en la présence de produits laitiers. Nous avons donc comparé les courbes de distribution d'acides gras de cet échantillon archéologique avec celles obtenues pour le lait de vache et le lait de chèvre modèle.

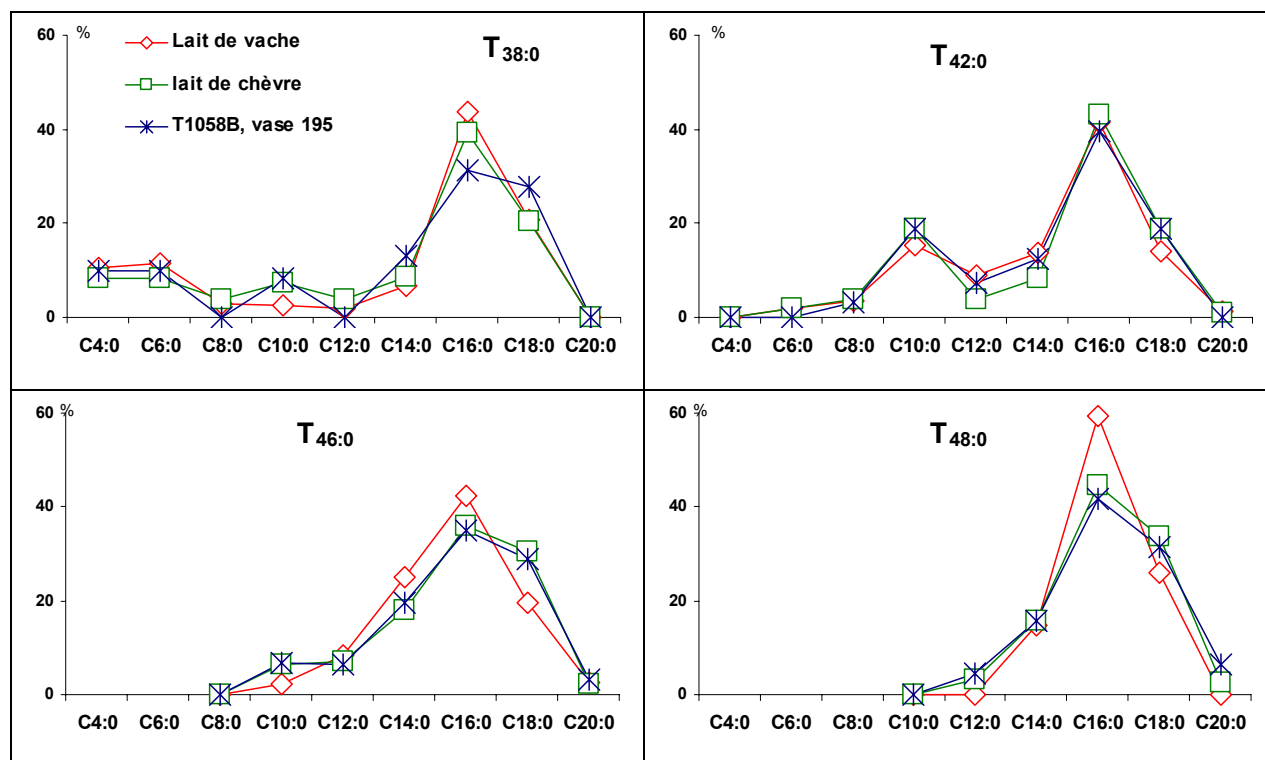


Figure 130: Courbes de distribution des acides gras des triglycérides $T_{38:0}$, $T_{42:0}$, $T_{46:0}$ et $T_{48:0}$, obtenues par nanoESI MS/MS de l'échantillon T1058BFN, vase 195. [Fatty acid distribution curves of TAGs $T_{38:0}$, $T_{42:0}$, $T_{46:0}$ and $T_{48:0}$ obtained by Li^+ -nanoESI MS/MS of the TAG fraction T1085BFN]

Les distributions en acides gras des triglycérides de taille moyenne ($T_{42:0}$, $T_{46:0}$ et $T_{48:0}$) de l'échantillon T1058BFN sont très proches de celles obtenues pour le lait de chèvre. C'est moins vrai pour les triglycérides de plus faible taille, de $T_{36:0}$ à $T_{40:0}$ (Les courbes du $T_{38:0}$ sont données en Figure 130). Comme nous l'avons déjà montré dans le chapitre précédent, ceci s'explique par le fait que l'hydrolyse commence par les triglycérides ayant des chaînes carbonées plus courtes. Pour le triglycéride $T_{50:0}$, les distributions en acides gras sont similaires entre les 3 échantillons, ce qui est dû au petit nombre de structures possibles. Les distributions obtenues pour les triglycérides insaturés ne sont caractéristiques d'aucun des laits de référence. On peut cependant conclure de ces courbes que cet échantillon est un produit laitier de chèvre.

Nous avons suivi le même raisonnement pour tous les autres échantillons archéologiques, en comparant leur composition en triglycérides et leurs distributions en acides gras avec celles des références que nous avons présentées dans le chapitre III (Tableau 50). Les courbes obtenues pour ces échantillons sont données en annexe. Il nous a ainsi été possible de discriminer les graisses

animales dans les cas où la chromatographie ne permettait pas de trancher, et d'identifier dans certains cas leur origine spécifique.

Vase	Typologie	HT CPG	Echantillon	nanoESI MS et MS/MS	
12	Coupe large	Cire + distribution étroite en TAGs	T1035B	$T_{46:0} - T_{54:0}$ $T_{48:1} - T_{54:1}$	Graisse sous-cutanée, boviné
48	Vase à épaulement	Produits laitiers	R1040B	$T_{40:0} - T_{50:0}$ $T_{46:1} - T_{52:1}$	Produits laitiers
60	Gobelet	Produits laitiers	T1041B	$T_{38:0} - T_{54:0}$ $T_{48:1} - T_{54:1}$	Produits laitiers, boviné
87	Microvase	Distribution moyenne en TAGs	T1047B	$T_{40:0}; T_{42:0}; T_{48:0};$ $T_{50:0}; T_{54:1}$	Produits laitiers
130	Vase tulipiforme	Produits laitiers	T1049B	$T_{44:0} - T_{54:0}$	Produits laitiers, capriné
150	Petit bol	Produits laitiers	T1050A	$T_{42:0} - T_{52:0}$ $T_{48:1} - T_{52:1}$	Produits laitiers, boviné
151	Vase à épaulement	Distribution étroite en TAGs	T1051B	$T_{46:0} - T_{52:0}$ $T_{50:1} - T_{54:1}$	Graisse sous-cutanée
168	coupe	Distribution moyenne en TAGs	T1052A	$T_{42:0} - T_{52:0}$ $T_{48:1} - T_{52:1}; T_{52:2}$	Produits laitiers
195	Vase à épaulement	Produits laitiers	T1058B	$T_{38:0} - T_{52:0}$ $T_{46:1} - T_{52:1}$	Produits laitiers, capriné
214	Vase à profil en S	Produits laitiers	R1062B	$T_{40:0} - T_{52:0}$ $T_{46:1}; T_{50:1}; T_{52:1}$	Produits laitiers, boviné
310	Coupe large à carène basse	Cire + distribution moyenne en TAGs	T1078B	Spectres nanoESI MS et MS/MS non exploitables	
321	Gobelet à carène basse	Produits laitiers	T1082B	Spectres nanoESI MS et MS/MS non exploitables	
350	Marmite	Produits laitiers	T1088B	$T_{40:0} - T_{44:0}$	Produits laitiers
388	Gobelet à carène basse	Distribution moyenne en TAGs	T1096B	$T_{42:0} - T_{54:0}$ $T_{48:1} - T_{50:1}$?
421	Coupe large	Distribution moyenne en TAGs	T1101A	$T_{44:0} - T_{52:0}$ $T_{52:1}$	Graisse sous-cutanée, oviné

Tableau 50 : Résultats et interprétation des données obtenues en nanoESI MS et MS/MS des échantillons fractionnés. [Analytical results and subsequent identification of the type of fat contained in the samples subjected to analysis by nanoESI MS and MS/MS]

Pour les échantillons qui, par HT CPG, ont été identifiés comme des graisses animales sous-cutanées (Figure 125, ellipse rouge), il a été possible d'affiner les résultats. Pour l'échantillon T1035B, prélevé sur la coupe 12 (tesson MR1035), il s'agit de graisse sous-cutanée de boviné, mélangée à de la cire d'abeille. Pour le deuxième échantillon analysé en spectrométrie de masse (tesson MR1051, vase 151), il n'a pas été possible de déterminer l'espèce d'origine, mais nous avons pu confirmer qu'il s'agissait de graisse sous-cutanée et non pas de produits laitiers dégradés. Enfin, le dernier échantillon n'a pas pu être analysé en spectrométrie de masse (résidu MR1080, vase 313). Cet échantillon fait partie des échantillons qui ont été méthylés à l'extraction, et son fractionnement n'a pas donné de résultats. Il n'a pas été possible de le réextraire, car il n'y avait plus assez de résidu.

Pour les échantillons dont les distributions en triglycérides obtenues en HT CPG sont caractéristiques de produits laitiers (9 échantillons, Figure 125, ellipse verte), deux n'ont pas été analysés en spectrométrie de masse (tesson MR1087, godet 346, ré-extrait mais pas fractionné; Tesson MR1071, godet 259, ré-extraits, fractionné, trop peu concentré), et un a donné des résultats

inexploitables en spectrométrie de masse (tesson MR1082, gobelet 321). Il n'a pas été possible de déterminer l'espèce d'origine pour un échantillon (résidu MR1040, vase 48). L'espèce d'origine des cinq autres échantillons a pu être déterminée. Il s'agit de produits laitiers d'origine bovine dans 3 cas (tesson MR1041, gobelet 60; tesson MR1050, petit bol 150; résidu MR1062, vase 214), et de produits laitiers d'origine caprine/ovine (tesson MR1049, vase 130; tesson MR1058, vase 195).

Enfin, pour les échantillons qui ont été classés par HT CPG en graisses animales indéterminées (8 échantillons, Figure 125, ellipse bleue et échantillons noirs), deux n'ont pas été analysés en spectrométrie de masse (Résidu MR1069, vase 256, ré-extrait, pas assez concentré pour être fractionné; Tesson MR1075, gobelet 281, ré-extrait, fractionné, trop d'esters palmitiques), et un a donné des spectres de masse non exploitables (Tesson MR1078, coupe 310). Pour les 5 échantillons restants, 3 se sont révélés être des produits laitiers, dont il n'a pas été possible de déterminer l'espèce d'origine à cause de leur dégradation (Tesson MR1047, microvase 87; Tesson MR1052, coupe 168; Tesson MR1088, marmite 350). Le dernier échantillon est quant à lui caractéristique de graisse sous-cutanée, probablement d'origine ovine/caprine (Tesson MR1101, coupe 421). Il ne nous est pas possible de distinguer les graisses animales de caprinés et d'ovinés, car nous n'avons pas pu analyser le même type de graisses pour les deux espèces. Les résultats obtenus pour le gobelet 388, tesson MR1096 sont difficiles à exploiter. Le profil en triglycérides obtenu en HT CPG est très caractéristique d'une graisse sous-cutanée. Mais la détection en spectrométrie de masse nanoESI du triglycérides T_{42:0} est plutôt en faveur de produits laitiers. Il s'agit peut être d'une graisse sous-cutanée d'une espèce que nous n'avons pas caractérisée, comme par exemple une espèce sauvage.

Nous avons montré, d'un point de vue analytique, quel intérêt il peut y avoir à combiner ces deux techniques, la chromatographie en phase gazeuse pour une identification globale des matières naturelles conservées dans les céramiques archéologiques, et la spectrométrie de masse nanospray pour identifier plus précisément les matières grasses animales, parfois jusqu'à leur espèce. Nous allons maintenant discuter des conséquences que cela peut avoir sur l'interprétation des données archéologiques.

C.3. Discussion

Nous avons identifié, pour le 57 céramiques pour lesquelles des matières grasses ont été recherchées, des graisses animales dans 25 d'entre elles. Il a été possible de discriminer les produits laitiers (Tableau 51) et les graisses sous-cutanées (Tableau 52) pour 16 céramiques, et d'identifier l'espèce animale dans 7 cas (2 produits laitiers de caprinés, 3 produits laitiers de bovinés, 1 graisse sous-cutanée d'ovinés, 1 graisse sous-cutanée de boviné). Pour 9 poteries, il n'a pas été possible d'identifier les graisses animales de manière précise (Tableau 52).

Catégorie de récipients	Année et N° de vase	Données stratigraphiques		Données morphologiques		Autres données					Résidu	Adhésif	Numéro de référence			Résultats
		Phase	M²	Dimensions (H cm x D cm)	Proportions	ES	NSF	C	D	Abondance			T	R	A	
Vase à épaulement	2003- 48	6	Q46	22 x 20	rectangle vertical	3	3	moyen	calcaire + calcite	moyen	1	0	MR1039	MR1040		Produits laitiers
	2003- 195	1	P48	? x 12		4	3	moyen	calcite	peu	0	0	MR1058			Produits laitiers, caprinés
Vase à profil en S	2003- 214	1	Q46 R46 R47	21 x 20	rectangle vertical	2	3	moyen	calcite	peu	1	0	MR1061	MR1062		Produits laitiers bovins
Vase tulipiforme	2003- 130	2	Q48 P48	13 x 12	rectangle vertical	2	3	moyen	calcite	peu	1	0	MR1049			Produits laitiers, caprinés
Gobelet à carène basse	2003- 60	4	Q49	? x 23	rectangle horizontal	4	3	moyen	calcite	peu	0	1	MR1041		MR1110	Produits laitiers, bovins
	2004-321	3	M46 N45 O45	16.5 x 23	rectangle horizontal	3	3	moyen	calcaire	moyen	1	0	MR1082	MR1083		Produits laitiers
Gobelet haut à carène moyenne	2004-281	5	M48	15.5 x 19	rectangle horizontal	3	3	foncé	calcaire	beaucoup	0	0	MR1075			Cire et produits laitiers
Marmite à carène moyenne	2004-350	3	M46	8.3 x 14.5	rectangle horizontal	2	3	foncé	calcaire	moyen	0	0	MR1088			Produits laitiers
Coupe	2003- 168	2	Q46			3	3	moyen	calcaire	moyen	0	0	MR1052			Produits laitiers
Microvase	2003- 87	4	P48			2	2	moyen	calcaire	peu	0	0	MR1047			Produits laitiers
Petit bol/godet	2003- 150	2	P47	7 x 11	rectangle horizontal	1	1	moyen	calcaire	moyen	0	0	MR1050			Produits laitiers, bovins
	2004-259	6	M45	2.7 x 8	rectangle horizontal	1	2	moyen	calcaire	peu	0	0	MR1071			Produits laitiers
	2004-346	3	M46	3 x 8.4	rectangle horizontal	2	2	moyen	calcaire	moyen	0	0	MR1087			Produits laitiers

Tableau 51 : Liste des céramiques de Clairvaux XIV ayant contenu des produits laitiers, planches 14 et 15 (ES: état de surface (surface treatment), NSF: niveau de savoir-faire (skill), C: couleur (colour), D: dégraissant (temper), Abondance: abondance de dégraissant, T: tesson (potsherd), R: résidu (residue), A: adhésif (adhesive)). [Ceramic vessels that contained dairy products, corresponding to boards 14 and 15]

Les produits laitiers sont les graisses animales les plus détectées dans les céramiques de Clairvaux XIV. Sur l'ensemble du corpus prélevé, 23% contiennent des produits laitiers. Si leur exploitation au Néolithique Moyen en Europe tempérée ne fait pas de doute, il est intéressant d'essayer d'appréhender le degré d'exploitation de ces produits. S'il est difficile de généraliser à l'ensemble des céramiques mises au jour, il est tout de même certain que les produits laitiers ont été exploités de manière conséquente à Clairvaux XIV. Les données archéozoologiques, fournies par Rose-Marie Arbogast, montrent bien l'exploitation d'espèces domestiques ayant un potentiel laitier pendant toute la durée d'occupation du site (bovinés et caprinés/ovinés). Mais on remarque une très forte prédominance des espèces chassées et du cochon domestique, contrairement à ce que l'on identifie dans les céramiques. Cela est cohérent avec une exploitation des animaux domestiques pour leurs produits secondaires, tels que les produits laitiers, et une exploitation des espèces chassées et du porc pour les produits primaires à savoir la viande (Figure 131).

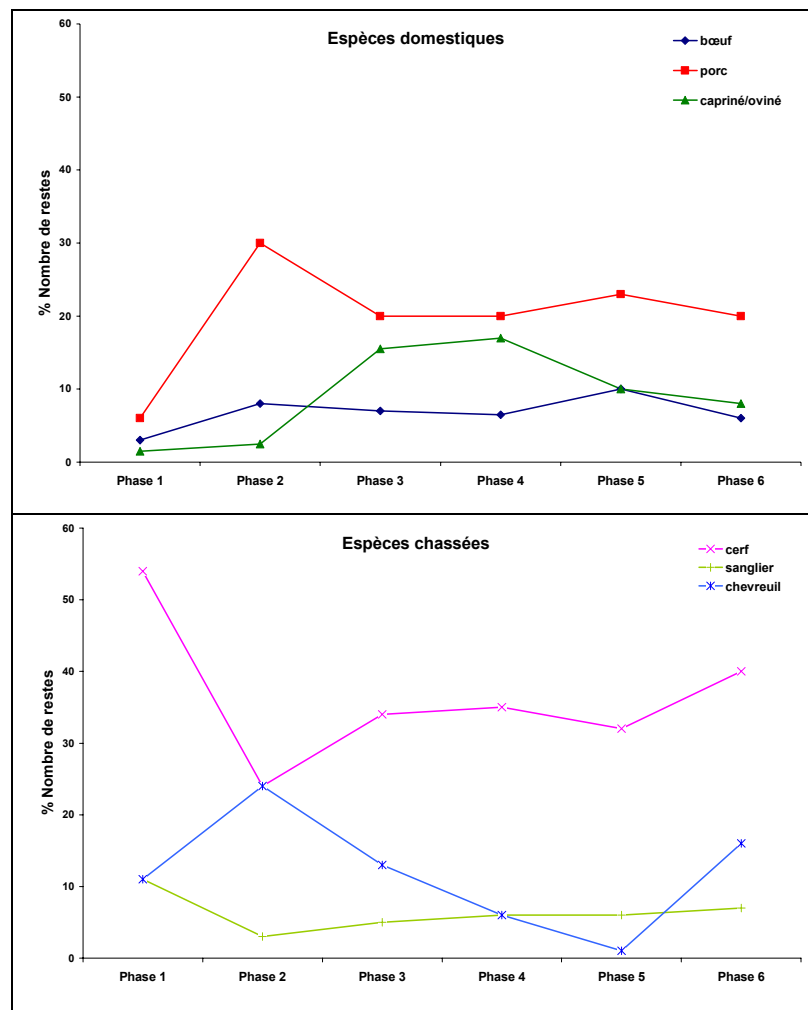


Figure 131 : Courbes de pourcentage du nombre de restes d'espèces domestiques et d'espèces chassées mis au jour à Clairvaux XIV, par phase d'occupation du site (Données R.-M. Arbogast). [Domestic and hunted animal remains, calculated by number of bones vs. the chronological phases]

Nous avons choisi de nous focaliser sur les produits laitiers, mais il serait intéressant à l'avenir d'ajouter à notre référentiel les graisses animales des espèces chassées ainsi que du porc, afin de déterminer parmi les graisses qui sont restées indéterminées celles qui pourraient provenir d'autres espèces. Les produits laitiers ont été identifiés dans un certain nombre de formes différentes, des vases mais aussi des gobelets, une coupe et des godets. Aucune bouteille ni amphore n'a montré de trace de produits laitiers, bien que des graisses animales indéterminées aient été identifiées dans une amphore. Il semble donc que ces produits n'aient pas été transportés. Les vases (48, 195, 130, 256 et 214) dans lesquels ils ont été identifiés portent tous des traces de chauffage, soit à l'extérieur (noir de fumée) soit à l'intérieur (résidus ou traces de résidus carbonisés). On peut voir sur la photo du vase 130 un résidu, localisé au milieu de la panse, horizontalement (Figure 132). Cela correspond vraisemblablement à une bouillie avec du lait, ou tout autre recette faisant bouillir du lait. Cette céramique montre également des traces de coulures sur la paroi externe.

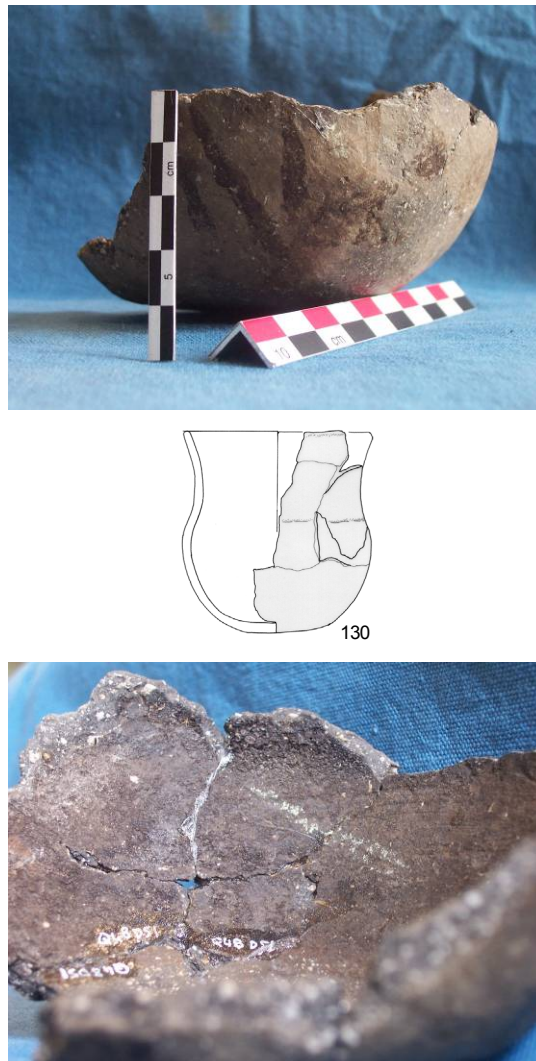


Figure 132 : Photos et dessin du vase 130, coulures extérieures en haut et résidu carbonisé en bas (dessin A.-M. Pétrequin, photo S. Mirabaud). [Images and drawing of vessel 130, with the exterior and interior residues]

Ces résidus carbonisés semblent montrer que les vases ont servi à la cuisson ou tout du moins au chauffage des produits laitiers, seuls ou en mélange. Ils sont tous de dimensions compatibles avec une cuisson sur pierre ou sur foyer (communication personnelle P. Pétrequin). Le vase 195 montre aussi des traces externes de chauffage, mais aucune trace interne. Il se peut que ces traces proviennent d'une autre utilisation de la céramique, antérieure au stockage des produits laitiers. Ceci n'est pas le cas des autres vases, car les produits laitiers ont été détectés dans les résidus comme dans les tessons.

Les autres poteries sont probablement des céramiques de service, avec des bords très ouverts, impropres au stockage et encore moins au transport de denrées liquides. Seul un gobelet montrait des traces de résidu carbonisé (321), compatible avec un chauffage des graisses. Pour les autres, aucune trace de chauffage, tant à l'extérieur qu'à l'intérieur, n'a été observée (60, 388, 281 et 350). Un gobelet a aussi contenu de la cire d'abeille. Il se peut que cette dernière ait servi à enduire et imperméabiliser la paroi, pour que des produits laitiers sous forme liquide puissent être contenus dans ce gobelet sans risque de perte. C'est la seule céramique qui montre cette configuration, cire + produit laitier. Cela implique-t-il que les autres gobelets ont contenu des produits laitiers sous une autre forme, non liquide? Seule une coupe a contenu des produits laitiers (coupe 168), sans qu'il soit possible d'en tirer une interprétation.

L'usage des godets et du microvase dans lesquels des produits laitiers ont été identifiés est plus sujet à question (150, 259, 246 et 87). En effet, ces céramiques sont de dimensions réduites (2 à 7 cm de hauteur et 8 à 11 cm de diamètre maximum), ce qui rend leur usage en tant que récipients de service peu probable. L'hypothèse de l'utilisation de ces godets comme céramiques de fermentation/mise en œuvre de fromage se pose, bien qu'il ne soit pas possible d'y apporter de preuves décisives. Ces godets ne portent pas de trace de chauffage, ni de résidus carbonisés, ce qui est cohérent avec cette hypothèse.

La viande était de toute évidence très exploitée à Clairvaux XIV, que ce soit à partir des espèces chassées ou domestiques. Cependant, la cuisson et la consommation de la viande ont certainement été menées sans l'utilisation de céramiques, ce qui expliquerait que l'on identifie aussi peu de graisses sous-cutanées (Tableau 52). C'est sans doute la raison pour laquelle on retrouve des graisses sous-cutanées dans aussi peu de céramiques. Il ne semble pas que les coupes contenant ces graisses sous-cutanées aient été chauffées (12 et 421). Il s'agirait donc de plats de service. Le vase montre des traces de résidu interne, ce qui concorde avec son utilisation comme vase à cuire (151). Il est possible bien entendu que les graisses animales indéterminées soient des graisses sous-cutanées, mais même en postulant que cela soit le cas, les produits laitiers restent majoritaires.

Catégorie de récipients	Année et N° de vase	Données stratigraphiques		Données morphologiques		Autres données					Résidu	Adhésif	Numéro de référence			Résultats
		Phase	M²	Dimensions (H cm x D cm)	Proportions	E S	NSF	C	D	Abondance			T	R	A	
vase à épaulement	2003- 151	2	P48 Q48	? x 16	rectangle vertical	2	3	moyen	calcaire	peu	1	0	MR1051			Graisse sous-cutanée
coupe large à carène basse	Puisard- 12	6	R45	? x 16	rectangle horizontal	2	2	foncé	calcite	beaucoup	0	0	MR1035			Cire et graisse sous-cutanée, bovins
	2004-421	1	M45	? x 24	rectangle horizontal	4	4	foncé	calcaire	moyen	0	0	MR1101			Graisse sous-cutanée, oviné/capriné
Gobelet à carène basse	2004-388	1	N47 O48	6.9 x 10.5	rectangle horizontal	4	4	foncé	calcite	peu	0	0	MR1096			Graisse animale, type sous-cutanée (espèce sauvage?)
vase à épaulement	2003- 184	2	Q45	? x 34	rectangle vertical	3	3	moyen	calcaire	moyen	1	0	MR1055	MR1056		Graisse animale indéterminée
vase à profil en S	2004-291	5	Q49 N48	? x 14		2	2	moyen	calcite	moyen	0	0	MR1077			Graisse animale indéterminée
	2004-313	5	O45	? x 23		3	3	moyen	calcaire	moyen	1	0	MR1079	MR1080		Graisse animale indéterminée
Vase pseudo-tulipiforme	2004-256	5	N46	? x 22		2	3	foncé	calcaire	moyen	1	0	MR1068	MR1069		Graisse animale indéterminée
amphore	2004-432	1	N47	? x 32	rectangle vertical	3	4	foncé	calcaire	peu	1	0	MR1104	MR1105		Graisse animale indéterminée
fragment de gobelet	2004-416	1	N47			2	2	foncé	calcaire	moyen	0	1	MR1100			Brai de bouleau et graisse animale indéterminée
coupe large à carène basse	2004-310	5	O49	5 x 10.2	rectangle horizontal	2	2	Clair	calcaire	moyen	1	0	MR1078			Cire et graisse animale indéterminée
assiette	2004-365	2	N47 N46	6.5 x 36	rectangle horizontal	2	3	foncé	calcaire	beaucoup	1	0	MR1090	MR1091		Graisse animale indéterminée

Tableau 52 : Liste des céramiques de Clairvaux XIV ayant contenu des graisses sous-cutanées et des graisses animales indéterminées, planches 16 et 17 (ES: état de surface (surface treatment), NSF: niveau de savoir-faire (skill), C: couleur (colour), D: dégraissant (temper), Abondance: abondance de dégraissant, T: tesson (potsherd), R: résidu (residue), A: adhésif (adhesive)). [Ceramic vessels that contained adipose fats and undetermined animal fats, corresponding to boards 16 and 17]

Quant aux graisses animales indéterminées, elles sont présentes dans des récipients de services (coupe 310 et assiette 365), dans un vase de dimension moyenne (13 cm de diamètre 291) et dans de grands récipients (3 vases 184, 256 et 313 et une amphore 432) ainsi que dans un gobelet réparé (416 ; Tableau 52).

Le cas du gobelet 416 a déjà été discuté dans le paragraphe concernant les adhésifs. Il s'agit probablement d'un mélange après la réparation du gobelet, qui peut être dû à un chauffage de la céramique ayant fait migrer l'adhésif dans le tesson. Le tesson ne montrait pas de trace de résidu carbonisé, il est possible que le chauffage de la céramique ait eu lieu entre la réparation et l'utilisation de cette dernière avec une graisse animale, produit laitier ou autre. Le vase 291 ne montrait pas non plus de résidu carbonisé, ce qui est cohérent avec le stockage de graisse animale, sans cuisson. Toutes les autres céramiques présentent des traces de chauffage, sous forme de résidus carbonisés. Pour la coupe et l'assiette, cela n'est pas en accord avec l'utilisation de ces dernières comme plats de service, mais plus comme plat de cuisson. Il peut aussi s'agir de plats ayant servi à récupérer les graisses tombant de viandes rôtissant sur le feu, comme cela a été montré sur un site médiéval anglais {Evershed *et al.* 1997a; Mottram *et al.* 1999}. Enfin, dans les 3 grands récipients restants, des résidus carbonisés ont été observés et prélevés pour être analysés. Il s'agit de graisses animales, mais dans un état trop dégradé pour être plus précisément identifiées. La taille de ces récipients les rend difficiles à manipuler, particulièrement sur un foyer. Malgré cela, il semble qu'il s'agisse bien de vases à cuire. La grande jarre est particulièrement sujette à question (jarre 432). En effet, la présence de mamelons perforés en bas de la panse et son col rentrant en font un récipient de transport idéal. Il pourrait dans ce cas s'agir d'une réutilisation de ce récipient. Nous avons observé à l'intérieur, sous la forme de résidu carbonisé, très abondant, des traces de végétaux et des empreintes de pommes (Figure 133). Il s'agirait alors d'un récipient ayant servi à préparer un ragoût mélangeant des graisses animales, viandes ou produits laitiers avec des végétaux comestibles, céréales, pommes, etc. Nous avons également observé des traces de desquamation de la céramique. Cela peut être dû à un mauvais séchage de la céramique, ce qui entraîne lors de sa cuisson l'éclatement des parois encore humides en profondeur. Dans ce cas-là, il est possible que la céramique ait été jugée trop fragile pour servir de récipient de transport, et ait été reconvertie en récipient de cuisson. Ces traces de desquamation peuvent aussi être la conséquence de la reconversion de cette céramique. Si elle a servi à transporter des liquides, alors il est possible qu'elle se soit imbibée et qu'à la première cuisson, cela ait fait éclater la paroi. On peut voir avec cet exemple combien il est délicat d'appréhender la fonction et l'usage des céramiques, et surtout combien les deux peuvent être différents. Les deux autres vases (vases 313 et 184) semblent aussi être des vases à cuire, et leur ouverture, plus large, est en accord avec cette fonction, pour la cuisson de bouillies/ragoûts qui peuvent nécessiter de les mélanger. Nous n'avons pas mis en évidence de restes végétaux comme dans l'amphore 432.

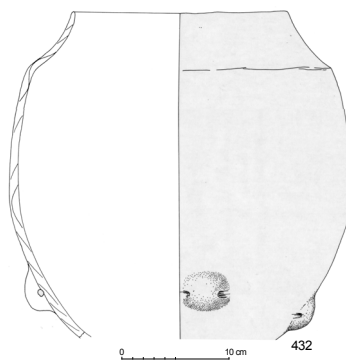


Figure 133 : Amphore 432, photo du bas de la panse, extérieur en haut et de la panse, intérieur, en bas (dessin A.-M. Pétrequin, photos S. Mirabaud).

Conclusion

La stratégie analytique adoptée pour l'analyse des résidus organiques, prélevés sur les céramiques de Clairvaux XIV, nous a permis d'identifier un certain nombre de matières naturelles exploitées au Néolithique sur ce site. Après un *screening* de la composition moléculaire des extraits de tessons et de résidus carbonisés, il nous a été possible de déterminer la présence, dans les céramiques, de cire d'abeille, de matières grasses végétales et de graisses animales.

Les développements en chromatographie en phase gazeuse, pour l'identification des matières grasses végétales, ont conduit à la mise en évidence de diacides, qui sont les produits d'oxydation des acides gras polyinsaturés caractéristiques des graisses végétales. Ces diacides ne sont pas détectés pour les échantillons de graisses animales, il semble donc qu'ils soient bien caractéristiques de graisses végétales. Leur présence, en quantité non négligeable dans les résidus carbonisés, alors que les tessons associés ne contiennent qu'une faible concentration en lipides, montre qu'il s'agit de graisses végétales cuites ou bouillies dans les céramiques. Il n'a cependant pas été possible d'identifier formellement l'utilisation d'huiles végétales. Les matières grasses végétales ont été détectées dans 6 récipients (Tableau 53).

La chromatographie en phase gazeuse a également permis d'identifier de la cire d'abeille, seule ou mélangée à des graisses animales, dans 5 récipients (Tableau 53). Nous n'avons pas cherché à mettre en évidence le miel, constitué de sucres de petite taille, sensibles à la lixiviation par l'eau présente dans le sédiment. La cire a probablement servi à enduire les céramiques pour diminuer leur porosité, mais à une température relativement basse comme en témoigne l'excellente conservation de ses biomarqueurs. Il se peut, dans le cas des mélanges de cire et de graisses animales, que la cire soit le témoin de l'utilisation du miel dans des recettes culinaires.

Enfin, la chromatographie en phase gazeuse haute température a permis de mettre en évidence la présence de graisses animales dans les céramiques. Afin de mieux identifier ces dernières, une méthodologie novatrice en spectrométrie de masse a été développée. Après la purification des triglycérides par fractionnement sur colonne de SPE, il a été possible d'analyser un certain nombre d'échantillons, afin de déterminer leur composition exacte en triglycérides et surtout de déterminer la composition en acides gras de chaque triglycéride. Nous avons pu identifier des produits laitiers dans 13 céramiques. Deux proviennent de bovins, et deux autres proviennent de caprinés/ovinés. Nous avons également identifié des graisses sous-cutanées de bovin et d'oviné dans deux céramiques ainsi que de la graisse sous-cutanée dont l'espèce n'a pas été déterminée, dans trois céramiques. Pour ce dernier cas, la composition en acide gras, déterminée en HT CPG, laisse penser qu'il s'agit d'une graisse de ruminant (365). Enfin, des graisses animales indéterminées ont été détectées dans huit céramiques. Il n'a pas été possible, à cause de leur état de dégradation, de

déterminer s'il s'agissait de graisses sous-cutanées ou de produits laitiers. L'exploitation des produits laitiers, au Néolithique moyen en Europe tempérée, ne fait pas de doute. Cependant, la question qui se pose, sur tous les sites archéologiques de cette époque, est l'extension de l'exploitation des produits secondaires de l'élevage. A Clairvaux XIV, la chasse reste majoritaire par rapport à l'élevage. Il semble donc que l'élevage d'espèces ruminantes (bovinés, caprinés et ovinés) soit exclusivement consacré à l'exploitation des produits secondaires, comme les produits laitiers. L'élevage de ces espèces présente un certain nombre de contraintes, contrairement à l'élevage du porc, qui est un animal omnivore, et à la chasse, qui permet d'avoir accès rapidement à la viande. L'exploitation des produits laitiers a donc certainement eu un rôle non négligeable pour ces populations.

Enfin, les adhésifs de réparation des céramiques ont été identifiés par HT CPG comme du brai de bouleau (Tableau 53). Cet adhésif est le plus couramment identifié sur les sites préhistoriques, depuis le Paléolithique. La diversification des adhésifs ne semble avoir lieu qu'à partir du Néolithique final voire des âges des métaux, en Europe tempérée. Il se peut néanmoins que le brai de bouleau soit le seul adhésif à être conservé, et que d'autres adhésifs aient été utilisés (colles de peau, résines, etc.) mais n'aient pas été conservés. La fabrication de cet adhésif pose problème. Pour les époques plus tardives, on retrouve des céramiques qui ont vraisemblablement servi à fabriquer le brai de bouleau, par chauffage de l'écorce de bouleau en milieu fermé. Mais à Clairvaux XIV, aucune céramique ne porte de trace de préparation d'adhésif. Il se peut que le brai de bouleau ait été obtenu par échange avec des populations voisines, ou bien qu'il ait été fabriqué dans des céramiques en dehors du village. Au Néolithique final, le niveau de savoir-faire des céramiques laisse à penser que les structures de combustion sont des foyers en pyramide, qui ne doivent probablement pas laisser de traces identifiables, mais au Néolithique moyen, les structures sont en fosse, afin de contrôler la température et l'atmosphère de cuisson. Ces structures là n'ont pas non plus été retrouvées dans les villages de cette époque, ce qui peut laisser à penser qu'ils étaient situés à l'extérieur des villages. Enfin, la troisième hypothèse est que la fabrication du brai de bouleau se fait sans céramique. Cela est cohérent avec le fait que l'on retrouve du brai de bouleau comme adhésif d'emmanchement sur des sites mésolithiques et paléolithiques. L'usage de l'argile pour la fabrication de récipients n'étant pas connue à ces époques, le brai de bouleau a donc nécessairement été fabriqué autrement.

	Vases				Grands récipients			Gobelets				Petits récipients			Plat à pain
	Epaulement	A profil en S	Tulipiformes	Pseudo-tulipiformes	Jarres	Amphores	Bouteille	Haut à carène moyenne	A carène basse	Marmite	Bol	Coupes et assiettes	Petits bols/godets	microvases	
Cire d'abeille			1 190					1 324							
Produits laitiers	2 48; 195	1 214	1 130	1 256					3 60; 321	1 350		1 168	3 150; 259; 346	1 87	
Cire + produits laitiers								1 281							
Graisses sous-cutanées	1 151											1 421			
Cire + Graisses sous-cutanées												1 12			
Graisse animale indéterminée	1 184	2 291; 313				1 432			388			1 365			
Cire + graisse animale indéterminée												1 310			
Matières grasses végétales	2 36; 267		1 425	2 216; 404	1 338										
Matières grasses indéterminées	3 46; 91; 326	1 183		2 80; 215	1 440						1 30			1 400	
Aucun lipide	2 76; 83	2 240; 283	2 251; 371	1 381	1 379		1 258	2 213; 320				2 357; 211		1 81	1 278
Graisse animale + brai de bouleau								1 416							
Brai de bouleau				1 215	3 17; 373; 412	2 65; 317		2 213; 324	3 42; 60; 167;			2 222; 211	1 171		
								6 348; 416; 423; 427; 428; 433							

Tableau 53 : Synthèse des matériaux organique identifiés dans les céramiques de Clairvaux XIV. [Organic materials identified in the ceramic vessels from Clairvaux XIV]

L'identification du contenu des céramiques de Clairvaux XIV nous permet de mieux comprendre les modes de gestion des ressources naturelles, qui ne peuvent que difficilement être appréhendées par les méthodes classiques de l'archéologie. L'élevage, bien que minoritaire par rapport à la chasse, a servi pour l'exploitation des produits laitiers. L'exploitation des produits de la ruche est ici attestée de manière certaine. Il s'agit d'un site parmi les plus anciens où de la cire d'abeille a été identifiée formellement. La question de l'exploitation des espèces végétales oléagineuses reste ouverte. S'agit-il de plantes sauvages exploitées pour leur huile ou leur intérêt nutritionnel ou de plantes domestiques? L'utilisation d'adhésifs à base de brai de bouleau, montre la capacité des populations de Clairvaux XIV à exploiter les ressources naturelles à leur disposition tout en les transformant ainsi que leur grande technicité. Il reste cependant à déterminer, si cela est possible, le mode de fabrication de ce produit.

La connaissance des matières organiques conservées dans les céramiques a également permis d'approcher des questions techniques concernant les céramiques. En effet, si l'enduction des céramiques est une technique bien connue dans certaines cultures, elle n'avait jamais été mise en évidence pour le Néolithique Moyen Bourguignon. Cette méthode d'imperméabilisation démontre le haut niveau de savoir-faire des populations de cette culture, comme en témoignait déjà le niveau de savoir-faire et la multiplicité des céramiques de Clairvaux XIV.

Conclusion Générale

Nous avons choisi de commencer ce mémoire par un large rappel bibliographique des recherches qui ont été menées dans le cadre de l'analyse des matériaux organiques amorphes archéologiques, retrouvés dans des céramiques. Les méthodologies développées au cours des vingt dernières années ont permis de caractériser et d'identifier un grand nombre de matériaux naturels, principalement les matières grasses telles que les graisses animales, les huiles végétales, la cire d'abeille et les cires végétales, les résines et leurs dérivés thermiques, goudrons et poix, ainsi que les brais végétaux. Ces méthodologies sont principalement basées sur l'analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse des extraits lipidiques et également sur l'analyse isotopique de ces extraits. Des études ont également permis d'identifier des boissons fermentées, toujours dans des céramiques, des cosmétiques à base de résines, de graisses et de polysaccharides. Enfin, de récentes avancées sur l'analyse des résidus protéiques ont ouvert de nouvelles voies d'étude pour la caractérisation des matériaux naturels, comme les graisses animales avec la possibilité d'accéder à l'espèce.

A partir de ces données, et des études réalisées sur des sites voisins, nous avons choisi d'étudier le site de Clairvaux XIV, datant des 37-36^{èmes} siècles av. J.-C., situé au bord du lac de Clairvaux dans le Jura (France). L'analyse, par chromatographie en phase gazeuse des résidus carbonisés ou non retrouvés adhérant à des céramiques et des résidus organiques absorbés dans la matrice argileuse des céramiques a révélé une très bonne conservation de la matière organique. Il a été possible d'identifier de la cire d'abeille, des matières grasses végétales, du brai de bouleau et des graisses animales. Ces données sont similaires à celles obtenues sur le site du Néolithique moyen de Bercy, seul site de la même époque pour lequel ce type d'étude a été mené. Il est également en accord avec les données obtenues par d'autres équipes sur des sites contemporains en Europe tempérée.

Le cas des matières grasses végétales est très intéressant. En effet, avec le site de Bercy, il s'agit des seuls sites sur lesquels des traces de matières grasses végétales ont été identifiées, grâce à leur composition en acides gras, saturés et insaturés. Ces matières grasses végétales ont été identifiées dans des résidus carbonisés, ce qui ne permet pas d'affirmer que des huiles végétales ont été exploitées en tant que telles, mais que des plantes oléagineuses ont été cuites/préparées dans des céramiques. Il peut s'agir d'un procédé d'obtention d'huile à partir de la cuisson de graines de plantes oléagineuses dans de l'eau bouillante. Si l'identification des espèces de plantes n'est pas encore possible, les avancées réalisées pour leur caractérisation sont néanmoins très prometteuses. Il reste à mettre en place un référentiel mieux adapté à ce type de climat, et à déterminer l'impact du vieillissement sur la composition en acides gras des huiles. L'obtention d'huile à partir de graines

concassées et bouillies est une méthode connue, notamment dans l'industrie oléicole, mais qui n'a jusqu'à présent jamais été identifiée dans un contexte archéologique. Il serait intéressant de mettre en place des expérimentations, en collaboration avec des archéologues, afin de déterminer la faisabilité de ce type de procédé et sa rentabilité en terme de quantité de graines utilisées par rapport à la quantité d'huile obtenue. Les seules autres études d'huiles végétales actuellement publiées font état d'huiles stockées dans des amphores à l'époque romaine et d'huiles utilisées dans des lampes, principalement en Egypte pour des époques plus récentes.

Les données obtenues sur les adhésifs ont confirmé que le brai de bouleau est l'adhésif le plus utilisé jusqu'au Néolithique final, tout du moins l'adhésif qui se conserve le mieux pour ces périodes reculées, depuis le Paléolithique.

La cire d'abeille, déjà identifiée dans des céramiques de sites contemporains, est un produit dont les utilisations ont pu être multiples. A Clairvaux XIV, elle a certainement servi à étanchéifier les parois poreuses des céramiques. Elle peut également être résiduelle de l'utilisation de miel, dans des recettes culinaires ou des boissons fermentées.

Enfin, le cœur de cette thèse a concerné les graisses animales, leur détection et la caractérisation fine de leurs biomarqueurs afin de déterminer les espèces animales mises en jeu. L'identification des graisses animales en archéologie peut être appréhendé de différentes manières. La caractérisation des macrorestes osseux, en archéozoologie, permet de déterminer les espèces présentes, la part d'espèces chassées et d'espèces domestiques. Les profils des animaux abattus, par âge et sexe, ainsi que certaines caractéristique morphologiques sont également des moyens d'obtenir des informations quant au type d'exploitation, lorsque celle-ci est spécialisée (exploitation de la viande, des produits laitiers ou de la force de traction). Les analyses isotopiques sur les ossements permettent de caractériser l'alimentation du bétail et la saisonnalité des abattages, ce qui peut également renseigner sur le type d'exploitation. Cependant, aucune de ces méthodes ne permet de remonter à l'exploitation des produits issus de l'élevage, ce ne sont que des témoins indirects. De plus, il est difficile de déterminer la part d'exploitation des différents produits de l'élevage dans le cas d'exploitations mixtes ou a petite échelle. C'est pourquoi un grand nombre d'études en chimie analytique se sont penchées sur le cas des graisses animales, par le biais de l'analyse des résidus organiques retrouvés dans les céramiques. Jusqu'à présent, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse isotopique a permis de discriminer les graisses de ruminants et les graisses de non ruminant, et de mettre en lumière la présence de produits laitiers, mal identifiés en chromatographie en phase gazeuse. Cependant, aucune indication sur les espèces animales ne peut être obtenue ainsi. C'est pourquoi une équipe s'est penchée sur la caractérisation des résidus protéiques, par analyse immunologique. Il est alors possible de déterminer les espèces animales dont proviennent les graisses. Mais cette technique n'a été que peu utilisée dans le cadre de l'étude des résidus organiques archéologiques. Nous avons choisi, au vu de la bonne conservation des

biomarqueurs des graisses animales dans les résidus organiques de Clairvaux XIV, de développer de nouvelles méthodologies en spectrométrie de masse pour déterminer des critères de discrimination des graisses animales et d'identification spécifique.

La spectrométrie de masse, avec des ionisations dites douces – LDI, *laser desorption/ionisation* et ESI, *electrospray ionisation* – est une technique adaptée à l'analyse de molécules peu volatiles, comme le sont les triglycérides. Ces derniers, de très faible polarité, nécessitent la mise en place de protocoles spéciaux pour être correctement détectés et identifiés en spectrométrie de masse. Nous avons donc évalué le potentiel de différentes techniques, le MALDI-TOF MS (*matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry*), le DIOS-TOF MS (*desorption/ionisation on porous silicon time-of-flight mass spectrometry*), le nanoESI Q-q-TOF MS et MS/MS (*nanoelectrospray double quadrupole time-of-flight mass spectrometry and tandem mass spectrometry*) et le nanoESI FT-ICR MS et MS/MS (*nanoelectrospray Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and tandem mass spectrometry*). Nous avons pour cela étudié un référentiel de graisses animales de ruminants, graisses sous-cutanées (bœuf et mouton), et tesson imprégnés de produits laitiers (vache et chèvre) ainsi que des tesson imprégnés de produits laitiers de vache, provenant d'un troupeau INRA. Ces derniers ont été vieillis afin de déterminer l'impact du vieillissement sur la composition en triglycérides des produits laitiers. La première conclusion de cette étude est que le DIOS-TOF MS est la technique de *screening* de la composition en triglycérides d'échantillons complexes la plus performante, avec une sensibilité de détection excellente et une grande facilité de mise en œuvre. Elle ne nécessite pas d'ajout de dopant pour ioniser les triglycérides, contrairement aux autres techniques d'ionisation évaluées. Des études sur la stabilité mécanique des plaques de silicium sont à développer, afin d'adapter cette technique aux échantillons archéologiques. Cette première étude sur des lipides peu polaires est très prometteuse. Malheureusement, dans l'état actuel de la configuration des appareils à notre disposition, il n'a pas été possible de procéder à des analyses structurales en spectrométrie de masse tandem avec cette technique d'ionisation. C'est pourquoi nous avons également développé la spectrométrie de masse nanoélectrospray, avec des analyseurs tandem. L'ionisation des triglycérides par nanoélectrospray nécessite l'ajout d'un dopant, le lithium. Mais ce dopant joue plusieurs rôles, extrêmement intéressants dans le cas de notre étude. En effet, en plus de permettre l'ionisation des triglycérides avec un bon rendement, il crée des adduits $[M + Li]^+$ très stables, éliminant ainsi toute fragmentation dans la source. Ces fragmentations dans la source sont la cause principale des problèmes d'identification des triglycérides avec d'autres techniques d'ionisation comme l'impact électronique ou l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). L'autre avantage des adduits lithium est qu'ils permettent des fragmentations contrôlées, bien décrites dans la littérature, en spectrométrie de masse tandem. Il a ainsi été possible de déterminer la composition en acides gras des triglycérides extraits des graisses animales de référence, et de mettre en place des critères de

discrimination de ces dernières. Ces critères sont des courbes qui reprennent les intensités des pertes d'acides gras pour chaque triglycéride, qui peuvent être comparées, triglycéride par triglycéride, entre les différents types de graisses animales (graisses sous-cutanée, produits laitiers) et entre les différentes espèces (bovine, ovine et caprine). Ils ont été déterminés par nanoESI Q-q-TOF MS/MS. Nous avons comparé les données obtenues avec cette technique de spectrométrie de masse et une autre technique, mettant en jeu un analyseur FT-ICR. Ce dernier permet d'avoir une meilleure sensibilité de détection et une très grande précision en masse. C'est pourquoi il a été choisi pour déterminer la variabilité des critères de discrimination, en fonction de l'espèce et en fonction du vieillissement. Ceci a été fait grâce à l'étude d'un ensemble de tessons imprégnés de lait de vache d'un troupeau INRA, nourries en prairie sans complément alimentaire, vieillies et non vieillies. La variabilité s'est révélée négligeable par rapport aux variations observées entre différentes espèces et différents types de graisse. C'est pourquoi nous avons choisi d'appliquer ces critères aux échantillons de Clairvaux XIV dont la composition en triglycérides révélée en chromatographie en phase gazeuse, était bien conservée. Ces échantillons étant tout de même dégradés, il a été nécessaire de mettre en place un protocole de purification des triglycérides, afin d'éliminer les molécules dont l'ionisation en nanoélectrospray est meilleure, et risquent donc de faire baisser le rendement d'ionisation des composés d'intérêt. Nous n'avons pas utilisé la spectrométrie de masse avec un analyseur FT-ICR, car cette technique nécessite des réglages et des mises au point qui sont difficilement compatibles avec l'analyse d'échantillons complexes, dégradés et en aussi faible quantité que les échantillons archéologiques. Les résultats obtenus sur les graisses de référence, en nanoESI Q-q-TOF s'étant révélés très intéressants et c'est cette technique qui a été choisie pour l'analyse des échantillons archéologiques. Nous avons ainsi pu confirmer la présence de produits laitiers, suspectés par chromatographie en phase gazeuse, dans 23% des céramiques étudiées, et déterminer l'origine spécifique de sept échantillons. Quatre des échantillons sont d'origine bovine – trois produits laitiers et une graisse sous-cutanée – et trois sont d'origine caprine/ovine – deux produits laitiers et une graisse sous-cutanée. Dans le cadre de l'étude de résidus archéologiques, les informations que nous avons obtenues sont particulièrement intéressantes du point de vue de l'exploitation des produits secondaires de l'élevage, à savoir les produits laitiers dans notre cas. En effet, si l'exploitation des produits laitiers ne fait désormais plus de doute, au Néolithique moyen en Europe tempérée, le degré d'exploitation de ces derniers reste sujet à question. Les plus anciens produits laitiers identifiés à l'heure actuelle l'ont été dans des céramiques datant de 5500 environ av. J.-C. Malheureusement cette identification n'a été faite que sur très peu de céramiques. Notre étude, de même que les études de l'équipe de R.P. Evershed couvrant l'ensemble du Néolithique britannique, est la seule à prendre en considération un ensemble conséquent de céramiques, sur un site bien défini chrono-culturellement parlant. C'est en étudiant des ensembles céramiques cohérent, sur des sites toujours plus proches du Proche-Orient et plus anciens que nous pourrions réellement comprendre le degré d'exploitation des

produits secondaires de l'élevage et la diffusion de cette technologie. A Clairvaux, vers 3700 av. J.-C., les produits laitiers étaient exploités, probablement sous différentes formes comme en témoigne leur identification dans des formes de vases très différentes. Les ruminants domestiques étaient certainement élevés pour leur produits secondaires, car la chasse reste dominante comme mode d'obtention de protéines animales.

Nous avons montré le potentiel informatif de ces techniques de spectrométrie de masse, DIOS-TOF MS et nanoESI MS et MS/MS, pour l'analyse de graisses animales archéologiques. Nous avons mis en évidence le potentiel de ces techniques pour l'analyse de composés comme les triglycérides, dont l'identification à l'heure actuelle reste délicate et longue à mettre en œuvre. Ceci est particulièrement vrai pour le DIOS, technique d'ionisation très prometteuse pour l'analyse de composés peu polaires et fragiles. La multiplication des appareils permettant de faire de la spectrométrie de masse tandem avec une ionisation laser (TOF/TOF ou FT-ICR) devrait, dans un avenir proche, faire de cette technique une des mieux adaptées pour l'analyse des graisses animales.

Bibliographie

- Afonso, C., Riu, A., Xu, Y., Fournier, F. & Tabet, J.-C. (2005). Structural characterization of fatty acids cationized with copper by electrospray ionization mass spectrometry under low-energy collision-induced dissociation. *Journal of Mass Spectrometry* 40(3): 342-349.
- Agabriel, C., Ferlay, A., Journal, C., Sibra, C., Teissier, D., Grolier, P., Bonnefoy, J. C., Rock, E., Chilliard, Y. & Martin, B. (2004). Composés d'intérêt nutritionnel de laits de grand mélange: teneurs en acides gras et vitamines selon l'altitude et la saison. Rencontres Recherches Ruminants, Paris.
- Alonso, L., Fontecha, J., Lozada, L., Fraga, M. J. & Juarez, M. (1999). Fatty acid composition of caprine milk: major, branched-chain, and trans fatty acids. *Journal of Dairy Science* 82: 878-884.
- Ambrose, S. H. & Krigbaum, J. (2003). Bone chemistry and bioarchaeology. *Journal of Anthropological Archaeology* 22: 193-199.
- Andreotti, A., Bonaduce, I., Colombini, M. P. & Ribechini, E. (2004). Characterisation of natural indigo and shellfish purple by mass spectrometric techniques. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18(11): 1213-1220.
- Andrikopoulos, N. K. (2002). Chromatographic and Spectroscopic Methods in the Analysis of Triacylglycerol Species and Regiospecific Isomers of Oils and Fats. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 42(5): 473-505.
- Arakawa, R., Shimomae, Y., Morikawa, H., Ohara, K. & Okuno, S. (2004). Mass spectrometric analysis of low molecular mass polyesters by laser desorption/ionization on porous silicon. *Journal of Mass Spectrometry* 39: 961-965.
- Arpino, P. & Ourisson, G. (1971). Esterification and Transesterification Induced in Sediments by Methanol and Ethanol. *Analytical Chemistry* 43(12): 1656-1657.
- Arpino, P., Prévôt, A., Serpinet, J., Tranchant, J., Vergnol, A. & Witier, P., Eds. (1995). Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Paris, Masson.
- Aveling, E. M. & Heron, C. (1998). Identification of birch bark tar at the mesolithic site of Star Carr. *Ancient Biomolecules* 2: 69-80.
- Balasse, M., Bocherens, H., Tresset, A., Mariotti, A. & Vigne, J.-D. (1997). Emergence of dairy production in the Neolithic? Contribution of isotopic analysis of cattle archaeological bones. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris, Earth & Planetary Sciences* 325: 1005-1010.
- Barnard, H., Ambrose, S. H., Beehr, D. E., Forster, M. D., Lanehart, R. E., Malainey, M. E., Parr, R. E., Rider, M., Solazzo, C. & Yohe II, R. M. (2007). Mixed results of seven methods for organic residue analysis applied to one vessel with the residue of a known foodstuff. *Journal of Archaeological Science* 34: 28-37.
- Beck, C. W., Smart, C. J. & Ossenkop, D. J. (1989). Residues and linings in ancient mediterranean transport amphoras. *Archaeological chemistry*. Allen, R. O. Washington D.C., American Chemical Society. 4: 369-380.
- Beck, C. W., Stout, E. C., Lee, K., Todtenhaupt, D. & Kurzweil, A. (1998). Ancient pine tar technology: correlations between manufacturing methods and composition. *Archaeometry* 98, Budapest, BAR International Series.
- Biek, L. (1963). *Archaeology and the microscope*. London, Praeger Press.
- Biers, W. R., Gerhardt, K. O. & Braniff, R. A. (1994). Lost scents. Investigations of Corinthian "plastic" vases by gas chromatography-mass spectrometry. *MASCA Research Papers in Science and Archaeology* 11: 1-57.
- Binder, D., Bourgeois, G., Benoist, F. & Vitry, C. (1990). Identification de brai de bouleau (*Betula*) dans le néolithique de Giribaldi (Nice, France) par la spectrométrie de masse. *Revue d'Archéométrie* 14: 37-42.
- Bocherens, H. (1997). Signatures isotopiques dans le collagène des os anciens. *Comptes Rendus de la Société de Biologie* 191: 493-510.
- Boëda, E., Connan, J., Dessort, D., Muhesen, S., Mercier, N., Valladas, H. & Tisnerat, N. (1996). Bitumen as a hafting material on Middle Palaeolithic artefacts. *Nature (London)* 380(6572): 336-338.
- Bogucki, P. I. (1984). Ceramic sieves of the linear pottery culture and their economic implications. *Oxford Journal of Archaeology* 3(1): 15-29.
- Bogucki, P. I. (1986). The antiquity of Dairying in temperate Europe. *Expedition* 28(2): 51-58.
- Bonaduce, I. & Colombini, M. P. (2004). Characterisation of beeswax in works of art by gas chromatography-mass spectrometry and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry procedures. *Journal of Chromatography, A* 1028(2): 297-306.
- Bourgeois, G. & Gouin, P. (1995). Résultats d'une analyse de traces organiques fossiles dans une faisselle harapéenne. *Paléorient* 21(1): 125-128.
- 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. *Analyst* 124: 443-452.
- Burgaud, C. (2003). Etudes de résidus organiques d'origine archéologique par spectrométrie de masse et chromatographie en phase gazeuse. Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille. Lille, Université des Sciences et Technologies de Lille. Master: 65.
- Burmester, A. (1983). Far eastern lacquers: Classification by pyrolysis mass spectrometry. *Archaeometry* 25(1): 45-58.
- Byrdwell, W. C. & Emken, E. A. (1995). Analysis of triglycerides using atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Lipids* 30(2): 173-175.
- Byrdwell, W. C. (2001). Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids. *Lipids* 36(4): 327-346.
- Cappitelli, F., Learner, T. & Chiantore, O. (2002). An initial assessment of thermally assisted hydrolysis and methylation-gas chromatography/mass spectrometry for the identification of oils from dried paint films. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 63(2): 339-348.
- Carbini, M., Stevanato, R., Rovea, M., Traldi, P. & Favretto, D. (1996). Curie-point pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry in the art field. 2-The characterization of proteinaceous binders. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 10: 1240-1242.
- Cech, N. B. & Enke, C. G. (2001). Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews* 20: 362-387.
- Chapman, A. C. & Plenderleith, H. J. (1926). Examination of an ancient Egyptian (Tut-ankh-Amen) cosmetic. 2614-2619.
- Charles, L., Pépin, D., Gonnet, F. & Tabet, J.-C. (2001). Effects of liquid phase composition on salt cluster formation in positive ion mode electrospray mass spectrometry: implications for clustering mechanism in electrospray. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 12: 1077-1084.
- Charrié-Duhaut, A., Lemoine, S., Adam, P., Connan, J. & Albrecht, P. (2000). Abiotic oxidation of petroleum bitumens under natural conditions. *Organic Geochemistry* 31: 977-1003.
- Charrié-Duhaut, A., Connan, J., Rouquette, N., Adam, P., Christophe, B., 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. W. (1993a). Identification of an adhesive used to repair a Roman jar. *Archaeometry* 35(1): 91-101.
- Charters, S., Evershed, R. P., Goad, L. J., Leyden, A., Blinkhorn, P. W. & Denham, V. (1993b). Quantification and distribution of lipid in archaeological ceramics: implications for sampling potsherds for organic residue analysis and the classification of vessel use. *Archaeometry* 35(2): 211-23.
- Charters, S., Evershed, R. P., Blinkhorn, P. W. & Denham, V. (1995). Evidence for the mixing of fats and waxes in archaeological ceramics. *Archaeometry* 37: 113-127.
- Charters, S., Evershed, R. P., Quye, A., Blinkhorn, P. W. & Reeves, V. (1997). Simulation experiments for determining the use of ancient pottery vessels: the behaviour of epicuticular leaf wax during boiling of a leafy vegetable. *Journal of Archaeological Science* 24(1): 1-7.
- Chiavari, G., Galletti, G. C., Lanterna, G. & Mazzeo, R. (1993). The potential of pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry in the recognition of ancient painting media. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 24: 227-242.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Rouel, J. & Lamberet, G. (2003). A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *Journal of Dairy Science* 86: 1751-1770.
- Chouinard, P. Y., Corneau, L., Butler, W. R., Chilliard, Y., Drackley, J. K. & Bauman, D. E. (2001). Effects of dietary lipid source on conjugated linoleic acid concentrations in milk fat. *Journal of Dairy Science* 84: 680-690.
- Coghlan, A. (1992). Pint pots designed to banish bitterness. *New Scientist* 1848: 8.
- Cohen, L. H. & Gusev, A. I. (2002). Small molecules analysis by MALDI mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373: 571-586.
- Colombini, M. P., Modugno, F., Giacomelli, M. & Francesconi, S. (1999). Characterisation of proteinaceous binders and drying oils in wall painting samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography, A* 846(1 + 2): 113-124.
- 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(4): 659-674.
- Colombini, M. P., Carmignani, A., Modugno, F., Frezzato, F., Olchini, A., Brecoulaki, H., Vassilopoulou, V. & Karkanis, P. (2004a). Integrated analytical techniques for the study of ancient Greek polychromy. *Talanta* 63(4): 839-848.
- Colombini, M. P., Giachi, G., Modugno, F. & Ribechini, E. (2004b). Characterization of organic residues in pottery vessels of the Roman age from Antinoe (Egypt). *Microchemical Journal?*

- 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(5): 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.
- Comisarow, M. B. & Marshall, A. G. (1974a). Frequency-Sweep Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Spectroscopy. *Chemical Physics Letters* 26(4): 489-490.
- Comisarow, M. B. & Marshall, A. G. (1974b). Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Spectroscopy. *Chemical Physics Letters* 25(2): 282-283.
- Compton, B. J. & Siuzdak, G. (2003). Mass spectrometry in nucleic acid, carbohydrate and steroid analysis. *Spectroscopy (Duluth, MN, United States)* 17: 699-713.
- Condamin, J., Formenti, F., Metais, M. O., Michel, M. & Blond, P. (1976). The application of gas chromatography to the tracing of oil in ancient amphorae. *Archaeometry* 18(2): 195-201.
- Condamin, J. & Formenti, F. (1978). Détection du contenu d'amphores antiques (huiles, vin), étude méthodologique. *Revue d'Archéométrie* 2: 43-58.
- Connan, J. (1988). Some secrets of archaeological bitumens from Mesopotamia revealed by petroleum organic geochemistry analyses. *Bulletin des Centres de Recherche, Exploration, Production Elf Aquitaine* 12(2): 759-787.
- Connan, J., Nissenbaum, A. & Dessort, D. (1992). Molecular archaeology: Export of Dead Sea asphalt to Canaan and Egypt in the Chalcolithic-Early Bronze age (4th-3rd millennium BC). *Geochimica et Cosmochimica Acta* 56(7): 2743-59.
- 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., Nieuwenhuys, O. P., Van As, A. & Jacobs, L. (2004). Bitumen in early ceramic art: bitumen-painted ceramics from Late Neolithic Tell Sabi Abyad (Syria). *Archaeometry* 46(1): 115-124.
- Connolly, J. D. & Hill, R. A. (2002). Triterpenoids. *Natural Product Reports* 19: 494-513.
- Connolly, J. D. & Hill, R. A. (2003). Triterpenoids. *Natural Product Reports* 20: 640-659.
- Copley, M. S., Rose, P. J., Clapham, A., Edwards, D. N., Horton, M. C. & Evershed, R. P. (2001). Processing palm fruits in the Nile valley. Biomolecular evidence from Qasr Ibrim. *Antiquity* 75: 538-42.
- Copley, M. S., Berstan, R., Dudd, S. N., Docherty, G., Mukherjee, A. J., Straker, V., Payne, S. & Evershed, R. P. (2003). Direct chemical evidence for widespread dairying in prehistoric Britain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(4): 1524-1529.
- Copley, M. S., Hansel, F. A., Sadr, K. & Evershed, R. P. (2004a). Organic residue evidence for the processing of marine animal products in pottery vessels from the pre-colonial archaeological site of Kasteelberg D east, South Africa. *South African Journal of Science* 100(5/6): 279-283.
- Copley, M. S., Jim, S., Jones, V., Rose, P. J., Clapham, A., Edwards, D. N., Horton, M. C., Rowley-Conwy, P. & Evershed, R. P. (2004b). Short- and long-term foraging and foddering strategies of domesticated animals from Qasr Ibrim, Egypt. *Journal of Archaeological Science* 31: 1273-1286.
- Copley, M. S., Berstan, R., Dudd, S. N., Aillaud, S., Mukherjee, A. J., Straker, V., Payne, S. & Evershed, R. P. (2005a). Processing of milk products in pottery vessels through British prehistory. *Antiquity* 79: 895-908.
- Copley, M. S., Berstan, R., Dudd, S. N., Straker, V., Payne, S. & Evershed, R. P. (2005b). Dairying in antiquity. I. Evidence from absorbed lipid residues dating to the British Iron Age. *Journal of Archaeological Science* 32: 485-503.
- Copley, M. S., Berstan, R., Mukherjee, A. J., Dudd, S. N., Straker, V., Payne, S. & Evershed, R. P. (2005c). Dairying in antiquity. III. Evidence from absorbed lipid residues dating to the British Neolithic. *Journal of Archaeological Science* 32: 523-546.
- Copley, M. S., Berstan, R., Straker, V., Payne, S. & Evershed, R. P. (2005d). Dairying in Antiquity. II. Evidence from absorbed lipid residues dating back to the British Bronze Age. *Journal of Archaeological Science* 32: 505-521.
- Copley, M. S., Bland, H. A., Rose, P., Horton, M. & Evershed, R. P. (2005e). Gas chromatographic, mass spectrometric and stable carbon isotopic investigations of organic residues of plant oils and animal fats employed as illuminants in archaeological lamps from Egypt. *The Analyst* 130(6): 860-871.
- Craig, O., Mulville, J., Pearson, M. P., Sokol, R., Gelsthorpe, K., Stacey, R. & Collins, M. (2000). Detecting milk proteins in ancient pots. *Nature (London)* 408: 312.
- Craig, O., Taylor, G., Mulville, J., Collins, M. & Parker Pearson, M. (2005a). The identification of prehistoric dairying activities in the Western Isles of Scotland: an integrated biomolecular. *Journal of Archaeological Science* 32: 91-103.
- Craig, O. E. & Collins, M. J. (2000). An improved method for the immunological detection of mineral bound protein using hydrofluoric acid and direct capture. *Journal of Immunological Methods* 236: 89-97.
- Craig, O. E. (2002). The development of dairying in Europe: potential evidence from food residues on ceramics. *Documenta Praehistorica*: 97-107.

- Craig, O. E. & Collins, M. J. (2002). The removal of proteins from mineral surfaces: implications for residue analysis of archaeological materials. *Journal of Archaeological Science* 29(10): 1077-1082.
- Craig, O. E., Chapman, J., Figler, A., Patay, P., Taylor, G. & Collins, M. J. (2003). "Milk jugs" and other myths of the copper age of central Europe. *European Journal of Archaeology* 6(3): 251-265.
- 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.
- Craig, O. E., Chapman, J., Heron, C., Willis, L. H., Bartosiewicz, L., Taylor, G., Whittle, A. & Collins, M. (2005b). Did the first farmers of central and eastern Europe produce dairy food? *Antiquity* 79: 882-894.
- Creamer, L. K. & MacGibbon, A. K. H. (1996). Some recent advances in the basic chemistry of milk proteins and lipids. *International Dairy Journal* 6: 539-568.
- Davenel, A., Riaublanc, A., Marchal, P. & Gandemer, G. (1999). Quality of pig adipose tissue: relationship between solid fat content and lipid composition. *Meat Science* 51: 73-79.
- de Hoffmann, E. & Stroobant, V. (2005). Spectrométrie de masse. Paris, Dunod.
- de Juan, L. & de la Mora, J. F. (1997). Charge and size distribution of electrospray drops. *Journal of Colloid and Interface Science* 186: 280-293.
- De la Mora, J. F. (2000). Electrospray ionization of large multiply charged species proceeds via Dole's charged residue mechanism. *Analytica Chimica Acta* 406: 93-104.
- de la Mora, J. F., Van Berkel, G. J., Enke, C. G., Cole, R. B., Martinez-Sanchez, M. & Fenn, J. B. (2000). Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 35: 939-952.
- DeNiro, M. J. & Epstein, S. (1978). Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 42: 495-506.
- DeNiro, M. J. & Hastorf, C. A. (1985). Alteration of $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios in plant matter during the initial stages of diagenesis: studies utilizing archaeological specimens from Peru. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 49: 97-115.
- Dhiman, T. R., Anand, G. R., Satter, L. D. & Pariza, M. W. (1999). Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *Journal of Dairy Science* 82: 2146-2156.
- Dietemann, P., Edelmann, M. J., Meisterhans, C., Pfeiffer, C., Zumbühl, S., Knochenmuss, R. & Zenobi, R. (2000). Artificial Photoaging of Triterpenes Studied by Graphite-Assisted Laser Desorption/ionization Mass spectrometry. *Helvetica Chimica Acta* 83: 1766.
- Dobson, G., Christie, W. W. & Nikolova-Damyanova, B. (1995). Silver-ion chromatography of lipids and fatty acids. *Journal of Chromatography, B* 671: 197-222.
- Dudd, S. N. & Evershed, R. P. (1998). Direct demonstration of milk as an element of archaeological economies. *Science* 282: 1478-1481.
- Dudd, S. N., Regert, M. & Evershed, R. P. (1998). Assessing microbial lipid contributions during laboratory degradations of fats and oils and pure triacylglycerols absorbed in ceramic potsherds. *Organic Geochemistry* 29(5-7): 1345-1354.
- Dudd, S. N. & Evershed, R. P. (1999). Unusual Triterpenoid Fatty Acyl Ester Components of Archaeological Birch Bark Tars. *Tetrahedron Letters* 40: 359-362.
- Dudd, S. N., Evershed, R. P. & Gibson, A. M. (1999). Evidence for varying patterns of exploitation of animal products in different prehistoric pottery traditions based on lipids preserved in surface and absorbed residues. *Journal of Archaeological Science* 26: 1473-1482.
- Dugo, P., Favoino, O., Taranchida, P. Q., Dugo, G. & Mondello, L. (2004). Off-line coupling of NARP and silver ion HPLC-MS for the characterization of rice oil triacylglycerol positional isomers. *Journal of Chromatography, A* 1041: 135-142.
- Dugo, P., Kumm, T., Crupi, M. L., Cotroneo, A. & Mondello, L. (2005). Comprehensive two-dimensional liquid chromatography combined with mass spectrometric detection in the analysis of triacylglycerols in natural lipidic matrixes. *Journal of Chromatography, A*.
- Dunbar, R. C. (2000). Photodissociation of trapped ions. *International Journal of Mass Spectrometry* 200: 571-589.
- Duplaix-Rata, A. (1997). Les dépôts alimentaires carbonisés. Les sites littoraux néolithiques de Clairvaux-les-Lacs et de Chalain (Jura) III. Chalain station 3, 3200-2900 av. J.-C. Pétrequin, P. Paris, Editions de la maison des sciences de l'homme. 2: 733-745.
- Edwards, H. G. M., Sibley, M. G. & Heron, C. (1997). FT-Raman spectroscopic study of organic residues from 2300-year-old Vietnamese burial jars. *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular Spectroscopy* 53: 2373-2382.
- Eerkens, J. W. (2002). The preservation and identification of piñon resins by GC-MS in pottery from the western Great Basin. *Archaeometry* 44(1): 95-105.
- Egenberg, I. M., Holtekjolen, A. K. & Lundanes, E. (2003). Characterisation of naturally and artificially weathered pine tar coatings by visual assessment and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Cultural Heritage* 4: 221-241.

- Eglinton, G. & Logan, G. A. (1991). Molecular preservation. Molecules through time: fossil molecules and biochemical systematics: proceedings of a Royal Society Discussion Meeting on biomolecular palaeontology, London, The Royal Society.
- Evershed, R. P., Heron, C., Charters, S. & Goad, L. J. (1990a). Chemical analysis of organic residues in ancient pottery: methodological guidelines and applications. Organic residues in archaeology: their identification and analysis, York, United Kingdom Institute for Conservation, Archaeology Section.
- Evershed, R. P., Heron, C. & Goad, L. J. (1990b). Analysis of organic residues of archaeological origin by high temperature gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Analyst* 115: 1339-1342.
- Evershed, R. P., Prescott, M. C. & Goad, L. J. (1990c). High-temperature gas chromatography/mass spectrometry of triacylglycerols with ammonia negative-ion chemical ionisation. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 4(9): 345-347.
- Evershed, R. P., Heron, C. & Goad, L. J. (1991). Epicuticular wax components preserved in potsherds as chemical indicators of leafy vegetables in ancient diets. *Antiquity* 65: 540-544.
- Evershed, R. P., Heron, C., Charters, S. & Goad, L. J. (1992a). The survival of food residues: new methods of analysis, interpretation and application. New developments in archaeological science, The British Academy.
- Evershed, R. P., Heron, C., Charters, S. & Goad, L. J. (1992b). Chemical analysis of organic residues in ancient pottery: methodological guidelines and applications. Organic residues in Archaeology: their identification and analysis, York, United Kingdom Institute for Conservation, Archaeology Section.
- Evershed, R. P. (1993a). Gas chromatography of lipids. Lipid analysis; A practical approach. Hamilton, R. J. and Hamilton, S. Oxford, IRL Press: 113-151.
- Evershed, R. P. (1993b). Archaeology and analysis: GC/MS studies of pottery fragments shed new light on the past. *Spectroscopy Europe* 5/4: 21-26.
- Evershed, R. P. (1993c). Mass spectrometry of lipids. Lipid analysis; A practical approach. Hamilton, R. J. and Hamilton, S. Oxford, IRL Press: 264-308.
- Evershed, R. P. (1993d). Combined gas chromatography-mass spectrometry. Gas Chromatography, A practical approach. Baugh, P. J., IRL Press: 359-391.
- Evershed, R. P., Arnot, K. I., Collister, J., Eglinton, G. & Charters, S. (1994). Application of isotope ratio monitoring gas chromatography-mass spectrometry to the analysis of organic residues of archaeological origin. *Analyst* 119: 909-914.
- Evershed, R. P., Charters, S. & Quye, A. (1995a). Interpreting lipid residues in archaeological ceramics: preliminary results from laboratory simulations of vessel use and burial. *Materials Research Society Symposia Proceedings* 352(Materials Issues in Art and Archaeology 4): 85-95.
- Evershed, R. P., Stott, A. W., Raven, A., Dudd, S. N., Charters, S. & Leyden, A. (1995b). Formation of long-chain ketones in ancient pottery vessels by pyrolysis of acyl lipids. *Tetrahedron Letters* 36(48): 8875-8878.
- Evershed, R. P. (1996). High-resolution triacylglycerol mixture analysis using high-temperature gas chromatography/mass spectrometry with a polarizable stationary phase, negative ion chemical ionization, and mass-resolved chromatography. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 7: 350-361.
- Evershed, R. P. & Tuross, N. (1996). Proteinaceous material from potsherds and associated soils. *Journal of Archaeological Science* 23: 429-436.
- Evershed, R. P., Mottram, H. R., Dudd, S. N., Charters, S., Stott, A. W. & Lawrence, G. J. (1997a). New criteria for the identification of animal fats preserved in archaeological pottery. *Naturwissenschaften* 84: 402-406.
- Evershed, R. P., Van Bergen, P. F., Peakman, T. M., Leigh-Firbank, E. C., Horton, M. C., Edwards, D., Biddle, M., Kjolbye-Biddle, B. & Rowley-Conwy, P. (1997b). Archaeological frankincense. *Nature (London)* 390: 667-668.
- Evershed, R. P., Vaughan, S. J., Dudd, S. N. & Soles, J. S. (1997c). Fuel for thought? Beeswax in lamps and conical cups from late minoan Crete. *Antiquity* 71: 979-985.
- Evershed, R. P., Dudd, S. N., Charters, S., Mottram, H. R., Stott, A. W., Raven, A., Van Bergen, P. F. & Bland, H. A. (1999). Lipids as carriers of anthropogenic signals from prehistory. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences* 354: 19-31.
- Evershed, R. P. (2000). Biomolecular analysis by organic mass spectrometry. Modern analytical methods in art and archaeology. Ciliberto, E. and Spoto, G., John Wiley & sons. 155.
- Evershed, R. P., Dudd, S. N., Copley, M. S., Berstan, R., Stott, A. W., Mottram, H. R., Buckley, S. A. & Crossman, Z. (2002). Chemistry of archaeological animal fats. *Accounts of Chemical Research* 35(8): 660-668.
- Evershed, R. P., Dudd, S. N., Anderson-Stojanovic, V. R. & Gebhard, E. R. (2003). New chemical evidence for the use of combed ware pottery vessels as beehives in ancient Greece. *Journal of Archaeological Science* 30: 1-12.
- 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 (London)* 432: 35-36.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. & Whitehouse, C. M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science (Washington, D. C., 1883-)* 246: 64-71.

- Fenn, J. B. (1993). Ion formation from charged droplets: roles of geometry, energy, and time. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 4: 524-535.
- Ferlay, A., Martin, B., Pradel, P., Coulon, J. B. & Chilliard, Y. (2005). Le lait de la vache Tarentaise est moins riche en acide palmitique que celui de la vache montbéliarde recevant les mêmes régimes. *Rencontres Recherches Ruminants*, Paris.
- Février, P., Binet, A., Dufossé, L., Grée, R. & Yvergnaux, F. (2001). Separation of glyceride positional isomers by silver ion chromatography. *Journal of Chromatography, A* 923: 53-57.
- Fox, A., Heron, C. & Sutton, M. Q. (1995). Characterization of natural products on native american archaeological and ethnographic materials from the great basin region, U.S.A.: a preliminary study. *Archaeometry* 37(2): 363-375.
- Futrell, J. H. (2000). Development of tandem mass spectrometry: one perspective. *International Journal of Mass Spectrometry* 200: 495-508.
- Gallay, A. & Huysecom, E. (1989). Ethnoarchéologie africaine: un programme d'étude de la céramique récente du Delta Intérieur du Niger (Mali, Afrique de l'Ouest). Genève, Université de Genève.
- Gamero-Castaño, M. & De la Mora, J. F. (2000). Mechanisms of electrospray ionization of singly and multiply charged salt clusters. *Analytica Chimica Acta* 406: 67-91.
- Garnier, N., Cren-Olive, C., Rolando, C. & Regert, M. (2002). Characterization of archaeological beeswax by electron ionization and electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 74: 4868-4877.
- Garnier, N. (2003). Structural analysis of organic materials preserved in ceramics from Antiquity: new developments in chromatography and mass spectrometry. Chemistry Department. Paris, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6. PhD: 420.
- Garnier, N., Richardin, P., Cheynier, V. & Regert, M. (2003). Characterization of thermally assisted hydrolysis and methylation products of polyphenols from modern and archaeological vine derivatives using gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 493: 137-157.
- Gerhardt, K. O., Searles, S. & Biers, W. R. (1990). Corinthian figure vases: non-destructive extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *MASCA Research Papers in Science and Archaeology* 7: 41-50.
- Glückmann, M., Pfenninger, A., Krüger, R., Thierolf, M., Karas, M., Horneffer, V., Hillenkamp, F. & Strupat, K. (2001). Mechanisms in Maldi analysis: surface interaction or incorporation of analytes? *International Journal of Mass Spectrometry* 210/211: 121-132.
- Green, M. K., Vestling, M. M., Johnston, M. V. & Larsen, B. S. (1998). Distinguishing Small Molecular Mass Differences of Proteins by Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry* 260: 204-211.
- Gresti, J., Bugaut, M., Maniongui, C. & Bezar, J. (1993). Composition of molecular species of triacylglycerols in bovine milk fat. *Journal of Dairy Science* 76: 1850-1869.
- Gross, M. L. (2000). Charge-remote fragmentation: an account of research on mechanisms and applications. *International Journal of Mass Spectrometry* 200: 611-624.
- Grünberg, J. M. (2002). Middle Palaeolithic birch-bark pitch. *Antiquity* 76(1): 15-16.
- Guash-Jané, M. R., Ibern-Gomez, M., Andrés-Lacueva, C., Jauregui, O. & Lamuela-Raventos, R. M. (2004). Liquid chromatography with mass spectrometry in tandem mode applied for the identification of wine markers in residues from ancient Egyptian vessels. *Analytical Chemistry* 76(6): 1672-1677.
- Guash-Jané, M. R., Andrés-Lacueva, C., Jauregui, O. & Lamuela-Raventos, R. M. (2006). The origin of the ancient Egyptian drink Shedeh revealed using LC/MS/MS. *Journal of Archaeological Science* 33: 98-101.
- Hairfield, H. H. & Hairfield, E. M. (1990). Identification of a late bronze age resin. *Analytical Chemistry* 62(1): 41-45.
- Halstead, P. (1998). Mortality models and milking: problems of uniformitarianism, optimality and equifinality reconsidered. *Anthropozoologica* 27: 3-20.
- Hamm, S., Bleton, J., Connan, J. & Tchaplá, A. (2005). A chemical investigation by headspace SPME and GC-MS of volatile and semi-volatile terpenes in various olibanum samples. *Phytochemistry* 66(12): 1499-1514.
- Han, X. & Gross, R. W. (2001). Quantitative analysis and molecular species fingerprinting of triacylglyceride molecular species directly from lipid extracts of biological samples by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 295(1): 88-100.
- Hansel, F. A., Copley, M. S., Madureira, L. A. S. & Evershed, R. P. (2004). Thermally produced ω -(*o*-alkylphenyl)alkanoic acids provide evidence for the processing of marine products in archaeological pottery vessels. *Tetrahedron Letters* 45: 2999-3002.
- Hanson, J. R. (2000). Diterpenoids. *Natural Product Reports* 17: 165-174.
- Hanson, J. R. (2001). Diterpenoids. *Natural Product Reports* 18: 88-94.
- Hanson, J. R. (2002). Diterpenoids. *Natural Product Reports* 19: 125-132.
- Hanson, J. R. (2003). Diterpenoids. *Natural Product Reports* 20: 70-78.
- Hanson, J. R. (2004a). Diterpenoids. *Natural Product Reports* 21(2): 312-320.
- Hanson, J. R. (2004b). Diterpenoids. *Natural Product Reports* 21: 785-793.
- Hart, J. P., Lovis, W. A., Schulenberg, J. K. & Urquhart, G. R. (2007). Paleodietary implications from stable carbon isotope analysis of experimental cooking residues. *Journal of Archaeological Science* 34: 804-813.

- Hastorf, C. A. & DeNiro, M. J. (1985). Reconstruction of prehistoric plant production and cooking practices by a new isotopic method. *Nature (London)* 315: 489-491.
- Hayek, 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 pattern recognition. *Analytical Chemistry* 62: 2038-2043.
- Hayek, W. H., Krenmayr, P., Lohninger, H., Jordis, U., Sauter, F. & Moche, W. (1991). GC/MS and chemometrics in archeometry. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 340: 153-156.
- Heeren, R. M. A., Kleinnijenhuis, A. J., McDonnell, L. A. & Mize, T. H. (2004). A mini-review of mass spectrometry using high-performance FTICR-MS methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 278(4): 1048-1058.
- Heron, C., Evershed, R. P., Chapman, B. & Pollard, A. M. (1989a). Glue, disinfectant and "chewing gum" in Prehistory. The application of scientific techniques to archaeology, Bradford, Oxbow monograph.
- Heron, C., Evershed, R. P., Goad, L. J. & Denham, V. (1989b). New approaches to the analysis of organic residues from archaeological remains. The application of scientific techniques to archaeology, Bradford, Oxbow Monograph.
- Heron, C., Evershed, R. P. & Goad, L. J. (1991). Effects of migration of soil lipids on organic residues associated with buried potsherds. *Journal of Archaeological Science* 18: 641-659.
- Heron, C. & Evershed, R. P. (1993). The Analysis of organic residues and the study of pottery use. *Archaeological Method and Theory* 5: 247-279.
- Heron, C., Nemcek, N., Bonfield, K. M., Dixon, D. & Ottaway, B. (1994). The chemistry of Neolithic beeswax. *Naturwissenschaften* 81: 266-269.
- Hillenkamp, F. & Karas, M. (1990). Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods in Enzymology* 193: 280-295.
- Hillenkamp, F. & Karas, M. (2000). Matrix-assisted laser desorption/ionisation, an experience. *International Journal of Mass Spectrometry* 200: 71-77.
- Hita, C., Parlanti, E., Jambu, P., Joffre, J. & Amblès, A. (1996). Triglyceride degradation in soil. *Organic Geochemistry* 25(1/2): 19-28.
- Hlongwane, C., Delves, I. G., Wan, L. W. & Ayorinde, F. O. (2001). Comparative quantitative fatty acid analysis of triacylglycerols using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and gas chromatography. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 15: 2027-2034.
- Holcapek, M., Jandera, P., Zderadicka, P. & Hrubá, L. (2003). Characterization of triacylglycerol and diacylglycerol composition of plant oils using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography, A* 1010: 195-215.
- Hsu, F.-F. & Turk, J. (1999). Structural characterization of triacylglycerols as lithiated adducts by electrospray ionization mass spectrometry using low-energy collisionally activated dissociation on a triple stage quadrupole instrument. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 10: 587-599.
- Islas, C. A., Selves, I., Carter, J. F., Herod, A. A. & Kandiyoti, R. (2001). Structural characterization of Baltic amber and its solvent extracts by several mass spectrometric methods. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 15(11): 845-856.
- Jakab, A., Héberger, K. & Forgacs, E. (2002). Comparative analysis of different plant oils by HPLC-APCI mass spectrometry. *Journal of Chromatography, A* 976: 255-263.
- Jennings, K. R. (2000). The changing impact of the collision-induced decomposition of ions on mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* 200: 479-493.
- Jensen, R. G. (2002). The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science* 85: 295-350.
- Jham, G. N., Velikova, R., Nikolova-Damyavova, B., Rabelo, S. C., Teixeira da Silva, J. C., de Paula Souza, K. A., Moreira Valente, V. M. & Cecon, P. R. (2005). Preparative silver ion TLC/RP-HPLC determination of coffee triacylglycerol molecular species. *Food Research International* 38(2): 121-126.
- Jim, S., Ambrose, S. H. & Evershed, R. P. (2004). Stable carbon isotopic evidence for differences in the dietary origin of bone cholesterol, collagen and apatite: implications for their use in palaeodietary reconstruction. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68(1): 61-72.
- Kalo, P. & Kuuranne, T. (2001). Analysis of free and esterified sterols in fats and oils by flash chromatography, gas chromatography, and electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography, A* 935: 237-248.
- Kalo, P., Kempainen, A., Ollilainen, V. & Kuksis, A. (2003). Analysis of regioisomers of short-chain triacylglycerols by normal phase chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* 229: 167-180.
- Karas, M. & Hillenkamp, F. (1988). Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses exceeding 10 000 Daltons. *Analytical Chemistry* 60(20): 2299 - 2301.
- Kebarle, P. & Peschke, M. (2000). On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions. *Analytica Chimica Acta* 406: 11-35.

- Keune, K. & Boon, J. J. (2004). Imaging secondary ion mass spectrometry of a paint cross section taken from an early netherlandish painting by rogiere van der Weyden. *Analytical Chemistry* 76: 1374-1385.
- 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 with traces of animal fat. *Journal of Chromatography, A* 937: 87-95.
- Kimpe, K., Jacobs, P. A. & Waelkens, M. (2002). Mass spectrometric methods prove the use of beeswax and ruminant fat in late Roman cooking pots. *Journal of Chromatography, A* 968: 151-160.
- Kimpe, K., BDrybooms, C., Schrevels, E., Jacobs, P. A., Degeest, R. & Waelkens, M. (2004). Assessing the relationship between form and use of different kinds of pottery from the archaeological site Sagalassos (southwest Turkey) with lipid analysis. *Journal of Archaeological Science* 31: 1503-1510.
- Koller, J., Baumer, U. & Mania, D. (2001). High-Tech in the middle Palaeolithic: Neanderthal-manufactured pitch identified. *European Journal of Archaeology* 4(3): 385-397.
- Konn, D. O., Murrell, J., Despeyroux, D. & Gaskell, S. J. (2005). Comparison of the effects of ionization mechanism, analyte concentration and ion "cool-times" on the internal energies of peptide ions produced by electrospray and atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption ionization. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 16: 743-751.
- Kraj, A., Dylag, T., Gorecka-Drzazga, A., Bargiel, S., Dziuban, J. & Silberring, J. (2003). Desorption/ionization on silicon for small molecules: a promising alternative to MALDI TOF. *Acta Biochimica Polonica* 50(3): 783-787.
- Kruse, R. A., Li, X., Bohn, P. W. & Sweedler, J. V. (2001). Experimental factors controlling analyte ion generation in laser desorption/ionization mass spectrometry on porous silicon. *Analytical Chemistry* 73: 3639-3645.
- Kühn, G., Weidner, S., Just, U. & Hohner, G. (1996). Characterization of technical waxes. Comparison of chromatographic techniques and matrix-assisted laser-desorption/ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography, A* 732: 111-117.
- Lambert, J. B., Shawl, C. E. & Stearns, J. A. (2000). Nuclear magnetic resonance in archaeology. *Chemical Society Reviews* 29: 175-182.
- Lattuati, A. (1998). Caractérisation par des méthodes chimiques et spectroscopiques des lipides de micro-organismes marins. Chimie. Paris, Pierre et Marie Curie, Paris VI. PhD: 243.
- Lee-Thorp, J. & Sponheimer, M. (2003). Three case studies used to reassess the reliability of fossil bone and enamel isotope signals for paleodietary studies. *Journal of Anthropological Archaeology* 22: 208-216.
- Lewis, W. G., Shen, Z., Finn, M. G. & Siuzdak, G. (2003). Desorption/ionization on silicon (DIOS) mass spectrometry: background and applications. *International Journal of Mass Spectrometry* 226: 107-116.
- Li, X. & Bohn, P. W. (2000). Metal-assisted chemical etching in HF/H₂O₂ produces porous silicon. *Applied Physics Letters* 77(16): 2572-2574.
- Loor, J. J., Ferlay, A., Ollier, A., Doreau, M. & Chilliard, Y. (2005). Relationship among trans and conjugated fatty acids and bovine milk fat yield due to dietary concentrate and linseed oil. *Journal of Dairy Science* 88: 726-740.
- Lucquin, A., March, R. J. & Cassen, S. (2007). Analysis of adhering organic residues of thwo "coupes-à-socles" from the neolithic funerary site "La Hougue Bie" in Jersey: evidence of birch bark tar utilisation. *Journal of Archaeological Science* 34: 704-710.
- Maier, M. S., de Faria, D. L. A., Boschín, M. T. & Pareraa, S. D. (2005). Characterization of reference lipids and their degradation products by Raman spectroscopy, nuclear magnetic resonance and gas chromatography-mass spectrometry. *ARKIVOC* 12: 311-318.
- Maksoud, S. A., N, E. H. M. & Marhous Amer, W. (1994). Beer from the early dynasties (3500-3400 cal B.C.) of Upper Egypt, detected by archaeochemical methods. *Vegetation History and Archaeobotany* 3(4): 219-224.
- Malainey, M. E., Przybylski, R. & Sherriff, B. L. (1999a). Identifying the Former Contents of Late Precontact Period Pottery Vessels from Western Canada using Gas Chromatography. *Journal of Archaeological Science* 26: 425-438.
- Malainey, M. E., Przybylski, R. & Sherriff, B. L. (1999b). The effects of thermal and oxidative degradation on the fatty acid composition of food plants and animals of western Canada: implications for the identification of archaeological vessel residues. *Journal of Archaeological Science* 26: 95-103.
- Malainey, M. E., Przybylski, R. & Sherriff, B. L. (1999c). The fatty acid composition of native food plants and animals of western Canada. *Journal of Archaeological Science* 26: 83-94.
- Marino, B. D. & DeNiro, M. J. (1987). Isotopic analysis of archaeobotanicals to reconstruct past climates: effects of activities associated with food preparation on carbon, hydrogen and oxygen isotope ratios of plant cellulose. *Journal of Archaeological Science* 14: 537-548.
- Marshall, A. G. (2000). Milestones in Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry technique development. *International Journal of Mass Spectrometry* 200: 331-356.
- Martineau, R. (2003). Pottery, techniques and societies: analytical and experimental studies in Chalain and Clairvaux (Jura, France), between 3200 and 2900 B. C. Archaeology and Prehistory Department. Besançon, Université de Franche-Comté. PhD.

- Masschelein-Kleiner, L. (1989). Les résines de réparation des céramiques du niveau V. Les sites littoraux néolithiques de Clairvaux-les-Lacs (Jura), II. Pétrequin, P. Paris, Maison des Sciences de l'Homme. 2.
- Mathe, C., Culioli, G., Archier, P. & Vieillescazes, C. (2004). Characterization of archaeological frankincense by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography, A* 1023(2): 277-285.
- McAnoy, A. M., Wu, C. C. & Murphy, R. C. (2005). Direct qualitative analysis of triacylglycerols by electrospray mass spectrometry using a linear ion trap. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 16: 1498-1509.
- McGovern, P., Glusker, D. L., Exner, L. J. & Voigt, M. (1996). Neolithic resinated wine. *Nature (London)* 381(6582): 480-481.
- McGovern, P. (1997). Wine of Egypt's golden age: an archaeological perspective. *Journal of Egyptian Archaeology* 83: 69-108.
- McGovern, P., Glusker, D. L., Moreau, R. A., Nuñez, A., Beck, C. W., Simpson, E., Butrym, E. D., Exner, L. J. & Stout, E. C. (1999). A funerary feast fit for King Midas. *Nature (London)* 402: 863-864.
- McGovern, P., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G. R., Moreau, R. A., Nuñez, A., Butrym, E. D., Richards, M. P., Wang, C.-S., Cheng, G., Zhao, Z. & Wang, C. (2004). Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(51): 17593-17598.
- Meier-Augenstein, W. (2002). Stable isotope analysis of fatty acids by gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 465: 63-79.
- Meng, J.-c., Siuzdak, G. & Finn, M. G. (2004). Affinity mass spectrometry from a tailored porous silicon surface. *Chemical Communications* 18: 2108-2109.
- Michel, R. H., McGovern, P. & Badler, V. R. (1993). The first wine and beer. Chemical detection of ancient fermented beverages. *Analytical Chemistry* 65(8): 408-413.
- Mills, J. S. & White, R. (1989). The identity of the resins from the late bronze age shipwreck at Ulu Burun (Kas). *Archaeometry* 31(1): 37-44.
- Mills, J. S. & White, R. (1994). The organic chemistry of museum objects. Oxford, Butterworth-Heinemann.
- Milner, N., Craig, O., Bailey, G. N., Pedersen, K. & Andersen, S. H. (2004). Something fishy in the Neolithic? A re-evaluation of stable isotope analysis of Mesolithic and Neolithic coastal populations. *Antiquity* 78(299): 9-22.
- Mirabaud, S. (2004). Elucidation de la composition moléculaire lipidique et protéique de résidus organiques amorphes conservés dans des poteries archéologiques par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse. UFR de Chimie. Paris, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6. DEA: 26.
- Mirabaud, S., Rolando, C. & Regert, M. (2007). Molecular criteria for discriminating adipose fat and milk from different species by nanoESI MS and MS/MS of their triacylglycerols: application to archaeological remains. *Analytical Chemistry* 79(16): 6182-6192.
- Momchilova, S., Nikolova-Damyanova, B. & Christie, W. W. (1998). Silver ion high-performance liquid chromatography of isomeric -cis and trans - octadecenoic acids. Effects of the ester moiety and mobile phase composition. *Journal of Chromatography, A* 793: 275-282.
- Momchilova, S., Tsuji, K., Itabashi, Y., Nikolova-Damyanova, B. & Kuksis, A. (2004). Resolution of triacylglycerol positional isomers by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science* 27(12): 1033-1036.
- Mondello, L., Tranchida, P. Q., Stanek, V., Jandera, P., Dugo, G. & Dugo, P. (2005). Silver-ion reversed-phase comprehensive two-dimensional liquid chromatography combined with mass spectrometric detection in lipidic food analysis. *Journal of Chromatography, A* 1086: 91-98.
- Morgan, E. D. & Conford, C. (1973). The transformation of fatty material buried in soil. *Science and Archaeology* 10: 9-10.
- Morton, J. D. & Schwarcz, H. P. (2004). Paleodietary implications from stable isotopic analysis of residues on prehistoric Ontario ceramics. *Journal of Archaeological Science* 31: 503-517.
- Mottram, H. R. & Evershed, R. P. (1996). Structure Analysis of Triacylglycerol Positional Isomers Using Atmospheric Pressure Chemical Ionisation Mass Spectrometry. *Tetrahedron Letters* 37(47): 8593-8596.
- Mottram, H. R., Woodbury, S. E. & Evershed, R. P. (1997). Identification of triacylglycerol positional isomers present in vegetable oils by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 11: 1240-1252.
- Mottram, H. R., Dudd, S. N., Lawrence, G. L., Stott, A. W. & Evershed, R. P. (1999). New chromatographic, mass spectrometric and stable isotope approaches to the classification of degraded animal fats preserved in archaeological pottery. *Journal of Chromatography, A* 833: 209-221.
- Mottram, H. R., Crossman, Z. & Evershed, R. P. (2001). Regiospecific characterisation of the TAG in animal fats using HPLC-APCI mass spectrometry. *The Analyst* 126: 1018-1024.
- Mottram, H. R. & Evershed, R. P. (2001). Elucidation of the composition of bovine milk fat triacylglycerols using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography, A* 926: 239-253.

- Mu, H., Sillen, H. & Hiy, C.-E. (2000). Identification of diacylglycerols and triacylglycerols in a structured lipid sample by atmospheric pressure chemical ionisation liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77(10): 1049-1060.
- Nguyen, D. N., Becker, G. W. & Riggan, R. M. (1995). Protein mass spectrometry: applications to analytical biotechnology. *Journal of Chromatography, A* 705: 21-45.
- Niessen, W. M. A. (2001). Current practice of gas chromatography-mass spectrometry. New-York, MarcelDekker, Inc.
- Niimura, N., Miyakoshi, T., Onodera, J. & Higuchi, T. (1999). Identification of ancient lacquer film using two-stage pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Archaeometry* 41(1): 137-149.
- Nikolova-Damyanova, B., Momchilova, S. & Christie, W. W. (2000). Silver ion high-performance liquid chromatographic separation of conjugated linoleic acid isomers, and other fatty acids, after conversion to p-methoxyphenacyl derivatives. *Journal of High Resolution Chromatography* 23(4): 348-352.
- O'Brian, R. D. (1999). Fats and Oils: Formulating and Processing for Applications. Lancaster, PEN, Technomic Publishing Company, Inc.
- O'Leary, M. H. (1981). Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry* 20(4): 553-567.
- Okuno, S., Nakano, M., Matsubayashi, G.-e., Arakawa, T. & Wada, Y. (2004). Reduction of organic dyes in matrix-assisted laser desorption/ionization on porous silicon. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18: 2811-2817.
- Okuno, S., Shimomae, Y., Wada, Y. & Arakawa, T. (2005). Laser/desorption mass spectrometry on porous silicon and its application to synthetic polymers. *Bunseki Kagaku* 54(6): 439-447.
- Oudemans, T. F. M. & Boon, J. J. (1991). Molecular archaeology: analysis of charred (food) remains from prehistoric pottery by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 20: 197-227.
- Oudemans, T. F. M., Eijkel, G. B. & Boon, J. J. (2007). Identifying biomolecular origins of solid organic residues preserved in Iron Age Pottery using DTMS and MVA. *Journal of Archaeological Science* 34: 173-103.
- Page, J. S., Masselon, C. D. & Smith, R. D. (2004). FTICR mass spectrometry for qualitative and quantitative bioanalyses. *Current Opinion in Biotechnology* 15: 3-11.
- Palmquist, D. L., Beaulieu, A. D. & Barbano, D. M. (1993). Feed and animal factors influencing milk fat composition. *Journal of Dairy Science* 76: 1753-1771.
- Passi, S., Rothschild-Boros, M. C., Fasella, P., Nazzaro-Porro, M. & Whitehouse, D. (1981). An application of high performance liquid chromatography to analysis of lipids in archaeological samples. *Journal of Lipid Research* 22: 778-784.
- Patrick, M., de Koning, A. J. & Smith, A. B. (1985). Gas liquid chromatographic analysis of fatty acids in food residues from ceramics found in the southwestern cape, South Africa. *Archaeometry* 27(2): 231-236.
- Perlès, C. (1994). Technologie et fonction des premières productions céramiques de Grèce. Terre cuite et société. La céramique, document technique, économique, culturel. Actes des XIVème Rencontres Internationales d'Archéologie et d'Histoire d'Antibes 1993. Binder, D. and Courtin, J. Juan les Pins, Editions APDCA: 225-242.
- Perona, J. S. & Ruiz-Gutierrez, V. (2004). Quantification of major lipid classes in human triacylglycerol-rich lipoproteins by high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection. *Journal of Separation Science* 27(9): 653-659.
- Pétrequin, P. & Gallay, A. (1983). Le Néolithique moyen bourguignon, actes du colloque de Beffia (Jura) 4-5 juin 1983. Le Néolithique Moyen Bourguignon, Beffia, Archives suisses d'anthropologie générale.
- Pétrequin, P., Ed. (1986). Les sites littoraux néolithiques de Clairvaux-les-Lacs (Jura). 1, Problématique générale: l'exemple de la station III. Archéologie et Culture Matérielle. Paris, Ed. de la Maison des Sciences de l'Homme.
- Pétrequin, P., Ed. (1989). Les sites littoraux néolithiques de Clairvaux-les-Lacs (Jura). 2, le Néolithique moyen. Archéologie et Cultures Matérielles. Paris, Ed. de la Maison des Sciences de l'Homme.
- Pétrequin, P., Ed. (1997). Les sites littoraux néolithiques de Clairvaux-les-Lacs et de Chalain (Jura). 3, Chalain station 3, 3200-2900 av.J.-C. Archéologie et Culture Matérielle. Paris, Ed. de la Maison des Sciences de l'Homme.
- Pétrequin, P. & Pétrequin, A.-M. (2004). Rapport de fouille, Clairvaux XIV, 2003-2004, CRAVA.
- Philp, R. P. & Oung, J.-N. (1988). Biomarkers. *Analytical Chemistry* 60(15): 887-896.
- Pollard, A. M. & Heron, C. (1996). The chemistry and uses of resinous substances. *Archaeological Chemistry*. Pollard, A. M. and Heron, C. Letchworth, Royal Society of Chemistry: 239-270.
- Raclot, T. (2003). Selective mobilization of fatty acids from adipose tissue triacylglycerols. *Progress in Lipid Research* 42: 257-288.
- Ratcliff, M. A., Medley, E. E. & Simmonds, P. G. (1974). Pyrolysis of amino acids. Mechanistic considerations. *Journal of Organic Chemistry* 39(11): 1481-1490.
- Raven, A. M., Van Bergen, P. F., Stott, A. W., Dudd, S. N. & Evershed, R. P. (1997). Formation of long-chain ketones in archaeological pottery vessels by pyrolysis of acyl lipids. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 40-41: 267-285.

- Reber, E. A., Dudd, S. N., Van der Merwe, N. & Evershed, R. P. (2004). Direct detection of maize in pottery residues via compound specific stable carbon isotope analysis. *Antiquity* 78(301): 682-691.
- Reber, E. A. & Evershed, R. P. (2004). Identification of maize in absorbed organic residues: a cautionary tale. *Journal of Archaeological Science* 31: 399-410.
- Regert, M. (1996). Les composés organiques en préhistoire: nouvelles approches analytiques. Archéologie. Paris, Université de Paris X. PhD: 361.
- Regert, M., Bland, H. A., Dudd, S. N., van Bergen, P. F. & Evershed, R. P. (1998a). Free and bound fatty acid oxidation products in archaeological ceramic vessels. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences* B(265): 2027-2032.
- Regert, M., Delacotte, J.-M., Menu, M., Pétrequin, P. & Rolando, C. (1998b). Identification of Neolithic hafting adhesives from two lake dwellings at Chalain (Jura, France). *Ancient Biomolecules* 2: 81-96.
- Regert, M., Dudd, S. N., Pétrequin, P. & Evershed, R. P. (1999). Fonction des céramiques et alimentation au Néolithique final sur les sites de Chalain. De nouvelles voies d'étude fondées sur l'analyse chimique des résidus organiques conservés dans les poteries. *Revue d'Archéométrie* 23: 91-99.
- Regert, M., Garnier, N., Binder, D. & Pétrequin, P. (2000). Les adhésifs néolithiques: quels matériaux utilisés, quelles techniques de production dans quel contexte social? L'exemple des adhésifs des sites de Giribaldi et de Chalain. Arts du feu et productions artisanales. XXe rencontres internationales d'archéologie et d'histoire d'Antibes. Pétrequin, P., Fluzin, P., Thiriot, J. and Benoit, P. Antibes, APDCA: 585-604.
- Regert, M., Colinart, S., Degrand, L. & Decavallas, O. (2001a). Chemical alteration and use of beeswax through time: accelerated ageing tests and analysis of archaeological samples from various environmental contexts. *Archaeometry* 43(4): 549-569.
- Regert, M., Dudd, S. N., van Bergen, P. F., Pétrequin, P. & Evershed, R. P. (2001b). Investigations of solvent extractable lipids and insoluble polymeric components: Organic residues in neolithic ceramic vessels from Chalain (Jura, France). *British Archaeological Reports* S939: 78-90.
- Regert, M. & Rolando, C. (2002). Identification of archaeological adhesives using direct inlet electron ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 74: 965-975.
- Regert, M., Garnier, N., Decavallas, O., Cren-Olive, C. & Rolando, C. (2003a). Structural characterization of lipid constituents from natural substances preserved in archaeological environments. *Measurement Science & Technology* 14: 1620-1630.
- Regert, M., Vacher, S., Moulherat, C. & Decavallas, O. (2003b). Adhesive production and pottery function during the iron age at the site of Grand Aunay (Sarthe, France). *Archaeometry* 45(1): 101-120.
- Regert, M. (2004). Investigating the history of prehistoric glues by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 27: 244-254.
- Regert, M., Langlois, J. & Colinart, S. (2005). Characterisation of wax works of art by gas chromatography procedures. *Journal of Chromatography, A* 1091: 124-136.
- Regert, M. (2006). Produits de la ruche, produits laitiers et matières végétales. Quels vestiges pour appréhender les substances naturelles exploitées par l'homme pendant la préhistoire? L'homme, le mangeur, l'animal. Qui nourrit l'autre? Paris.
- 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. (2007). Elucidating pottery function using a multi-step analytical methodology combining infrared spectroscopy; mass spectrometry and chromatographic procedures. Theory and Practice of Archaeological Residue Analysis. Barnard, H. and Eerkens, J. W. Oxford, Archaeopress. 1650: 61-76.
- Regert, M., Guerra, M.-F. & Reiche, I. (2007). Physico-Chimie des matériaux du patrimoine culturel. Partie 1. *Techniques de l'Ingénieur* P3 780: 1-21.
- Regert, M., Devière, T., Le Hô, A.-S. & Rougeulle, A. (Accepted July 2007). Reconstructing ancient Yemeni commercial routes during the Middle-Ages using structural characterisation of terpenoid resins. *Archaeometry*.
- Reunanen, M., Holmbom, B. & Edgren, T. (1993). Analysis of archaeological birch bark pitches. *Holzforschung* 47: 175-177.
- Rice, P. M. (1987). Pottery analysis. A sourcebook. Chicago-London, The University of Chicago Press.
- Rieley, G. (1994). Derivatization of organic compounds prior to gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometric analysis: identification of isotope fractionation processes. *Analyst* 119: 915-919.
- 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. *Analyst* 112(5): 637-644.
- Rohner, T. C., Lion, N. & Girault, H. H. (2004). Electrochemical and theoretical aspects of electrospray ionisation. *Physical Chemistry Chemical Physics* 6: 3056-3068.
- Rottländer, R. C. A. & Schlichtherle, H. (1979). Food identification of samples from archaeological sites. *Archaeo Physika* 10: 260-267.

- Rottländer, R. C. A. (1981). Scientific examination of urns of the type with the little cups attached. *Revue d'Archéométrie* 3: 251-254.
- Rottländer, R. C. A. & Hartke, I. (1982). New results of food identification by fat analysis. 22nd Symposium on Archaeometry, University of Bradford, Bradford, UK, Schools of Physics and Archaeological Sciences; University of Bradford.
- Rottländer, R. C. A. (1983). Investigations chimiques sur les graisses en archéologie. *Nouvelles de l'Archéologie* 11: 38-43.
- Rottländer, R. C. A. (1986). Chemical investigation of potsherds of the Heuneburg, Upper Danube. 24th International Archaeometry Symposium, Smithsonian Institution, Washington DC, Smithsonian Institution Press.
- Rottländer, R. C. A. (1990). Lipid analysis in the identification of vessel contents. *MASCA Research Papers in Science and Archaeology* 7: 37-40.
- Ruiz-Gutiérrez, V. & Barron, L. J. R. (1995). Methods for the analysis of triacylglycerols. *Journal of Chromatography, B* 671: 133-168.
- Ruiz-Sala, P., Hierro, M. T. G., Martínez-Castro, I. & Santa-Maria, G. (1996). Triglyceride composition of ewe, cow and goat milk fat. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73(3): 283-293.
- Sanchez, A., Cañabate, M. L. & Lizcano, R. (1998). Archaeological and chemical research on sediments and ceramics at Polideportivo (Spain): an integrated approach. *Archaeometry* 40(2): 341-350.
- Sandra, P., Medvedovici, A., Zhao, Y. & David, F. (2002). Characterization of TAGs in vegetable oils by silver-ion packed-column supercritical fluid chromatography coupled to mass spectroscopy with APCI and coordination ion spray. *Journal of Chromatography, A* 974: 231-241.
- Sannes-Lowery, K. A., Cummins, L. L., Chen, S., Drader, J. J. & Hofstadler, S. A. (2004). High throughput drug discovery with ESI-FTICR. *International Journal of Mass Spectrometry* 238: 197-206.
- Santrock, J., Studley, S. A. & Hayes, J. M. (1985). Isotopic analyses based on the mass spectrum of carbon dioxide. *Analytical Chemistry* 57: 1444-1448.
- Sauter, F., Puchingern, L., Graf, A. & Thumm, D. (2001). Studies in organic archaeometry II: Analysis of the ancient content of a flask excavated in Troia. *ARKIVOC* 2001(III): 22-25.
- Sauter, F., Puchingern, L. & Schoop, u.-D. (2003). Studies in organic archaeometry VI: Fat analysis sheds light on everyday life in prehistoric Anatolia: traces of lipids identified in chalcolithic potsherds excavated near Bogazkale, Central Turkey. *ARKIVOC* 2003(XV): 15-21.
- Scalarone, D., Van der Horst, J., Boon, J. J. & Chiantore, O. (2003). Direct-temperature mass spectrometric detection of volatile terpenoids and natural terpenoid polymers in fresh and artificially aged resins. *Journal of Mass Spectrometry* 38: 607-617.
- Schiller, J., Arnhold, J., Benard, S., Müller, M., Reichl, S. & Arnold, k. (1999). Lipid analysis by matrix-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry: a methodological approach. *Analytical Biochemistry* 267: 46-56.
- Schuyl, P. J. W., de Joode, T., Vasconcello, M. A. & Duchateau, G. S. M. J. E. (1998). Silver-phase HPLC-electrospray mass spectrometry of triacylglycerols. *Journal of Chromatography, A* 810: 53-61.
- Segall, S. D., Artz, W. E., Raslan, D. S., Ferraz, V. P. & Takahashi, J. A. (2004). Analysis of triacylglycerol isomers in Malaysian cocoa butter using HPLC-mass spectrometry. *Food Research International* 38(2): 167-174.
- Shanks, O. C., Bonninchsen, R., Vella, A. T. & Ream, W. (2001). Recovery of protein and DNA trapped in stone tool microcracks. *Journal of Archaeological Science* 28: 965-972.
- Sharma, R. K., Chan, W. G., Seeman, J. I. & Hajaligol, M. R. (2003). Formation of low molecular weight heterocycles and polycyclic aromatic compounds (PACs) in the pyrolysis of alpha-amino acids. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 66: 97-121.
- Sharma, R. K., Chan, G. W., Wang, J., Waymack, B. E., Wooten, J. B., Seeman, J. I. & Hajaligol, M. R. (2004). On the role of peptides in the pyrolysis of amino acids. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 72: 153-163.
- Shedrinsky, A. M., Wampler, T. P., Indictor, N. & Baer, N. S. (1989). Application of analytical pyrolysis to problems in art and archaeology: a review. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 15: 393-412.
- Shen, Z., Thomas, J. J., Averbuj, C., Broo, K. M., Engelhard, M., Crowell, J. E., Finn, M. G. & Siuzdak, G. (2001). Porous silicon as a versatile platform for laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 73: 612-619.
- Sherratt, A. (1983). The secondary exploitation of animals in the Old World. *World Archaeology* 15(1): 90-104.
- Sherriff, B. L., Tisdale, M. A., Sayer, B. G., Schwarcz, H. P. & Knyf, M. (1995). Nuclear magnetic resonance spectroscopic and isotopic analysis of carbonized residues from subarctic Canadian prehistoric pottery. *Archaeometry* 37(1): 95-111.
- Siciliano, R., Rega, B., Amoresano, A. & Pucci, P. (2000). Modern mass spectrometric methodologies in monitoring milk quality. *Analytical Chemistry* 72(2): 408-415.
- Smith, G. G., Reddy, G. S. & Boon, J. J. (1988). Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of the Curie-point pyrolysis products of some dipeptides and their diketopiperazine. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transaction II*: 203-211.

- Smith, R. D. (2000). Evolution of ESI-mass spectrometry and Fourier transform ion cyclotron resonance for proteomics and other biological applications. *International Journal of Mass Spectrometry* 200: 509-544.
- Smyth, W. F. (1999). The use of electrospray mass spectrometry in the detection and determination of molecules of biological significance. *Trends in Analytical Chemistry* 18(5): 335-346.
- Solazzo, C. (2007). Archéologie biomoléculaire: des lipides aux protéines, approche méthodologique et études de cas. La protéomique comme nouvelle méthode d'investigation des protéines archéologiques. Chimie. Lille, Université des Sciences et Technologies de Lille. PhD.
- Spangenberg, J. E. (2004). Food residues: chemistry. Die jungsteinzeitliche seeufersiedlung Arbon/Bleiche 3; Umwelt und Wirtschaft. Jacomet, S., Leuzinger, U. and Schibler, J.: 284-293.
- Spangenberg, J. E., Jacomet, S. & Schibler, J. (2006). Chemical analyses of organic residues in archaeological pottery from Arbon Bleiche 3, Switzerland - evidence for dairying in the late Neolithic. *Journal of Archaeological Science* 33: 1-13.
- Spanos, G. A., Schwartz, S. J., van Breemen, R. B. & Huang, C.-H. (1995). High-performance liquid chromatography with light-scattering detection and desorption chemical-ionization tandem mass spectrometry of milk fat triacylglycerols. *Lipids* 30(1): 85-90.
- Standing, K. G. (2000). Timing the flight of biomolecules: a personal perspective. *International Journal of Mass Spectrometry* 200: 597-610.
- 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(3): 457-469.
- Stott, A. W., Davies, E., Evershed, R. P. & Tuross, N. (1997a). Monitoring the routing of dietary and biosynthesised lipids through compound-specific stable isotope (d13C) measurements at natural abundance. *Naturwissenschaften* 84: 82-86.
- Stott, A. W., Evershed, R. P. & Tuross, N. (1997b). Compound-specific approach to the d13C analysis of cholesterol in fossil bones. *Organic Geochemistry* 26(1-2): 99-103.
- Stott, A. W., Evershed, R. P., Jim, S., Jones, V., Rogers, J. M., Tuross, N. & Ambrose, S. (1999). Cholesterol as a new source of palaeodietary information: experimental approaches and archaeological applications. *Journal of Archaeological Science* 26: 705-716.
- Stott, A. W., Berstan, R., Evershed, R. P., Bronk-Ramsey, C., Hegdes, R. E. M. & Humm, M. J. (2003). Direct dating of archaeological pottery by compound-specific ¹⁴C analysis of preserved lipids. *Analytical Chemistry* 75: 5037-5045.
- Stübiger, G., Pittenauer, E. & Allmaier, G. (2003). Characterization of castor oil by on-line and off-line NARP HPLC-MS (APCI and UV-MALDI). *Phytochemical analysis* 14: 337-346.
- Stults, J. T. (1995). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS). *Current Opinion in Biotechnology* 5: 691-698.
- Thomas, J. (2003). Thoughts on the repacked Neolithic revolution. *Antiquity* 77(295): 67-74.
- Thomas, J. J., Shen, Z., Crowell, J. E., Finn, M. G. & Siuzdak, G. (2001). Desorption/ionization on silicon (DIOS): a diverse mass spectrometry platform for protein characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(9): 4932-4937.
- Thornton, N. D., Morgan, E. D. & Celoria, F. S. C. (1970). The composition of bog butter. *Science and Archaeology* 2/3: 20-25.
- Tokarski, C., Cren-Olive, C., Martin, E. & Rolando, C. (2006). Identification of proteins in Renaissance paintings by proteomics. *Analytical Chemistry* in press.
- Trauger, S. A., Go, E. P., Shen, Z., Apon, J. V., Compton, B. J., Bouvier, E. S. P., Finn, M. G. & Siuzdak, G. (2004). High sensitivity and analyte capture with desorption/ionization mass spectrometry on silylated porous silicon. *Analytical Chemistry* 76: 4484-4489.
- Tresset, A. (2002). De la mer au bétail en domaine atlantique: unité et diversité des processus d'apparition de l'élevage à la marge nord-ouest de l'Europe. *Anthropozoologica* 36: 13-35.
- Tresset, A. (2003). Beginnings of farming in northwestern Europe. Ancient Europe 8000 B.C.-A.D. 1000. Encyclopedia of the Barbarian world. Bogucki, P. I. and Crabtree, P. New York, Charles Scribner's Sons: 273-281.
- Tuomikoski, S., Huikko, K., Grigoras, K., Östman, P., Kostiainen, R., Baumann, M., Abian, J., Kotiaho, T. & Franssila, S. (2002). Preparation of porous n-type silicon sample plates for desorption/ionization on silicon mass spectrometry (DIOS-MS). *Lab on a Chip* 2: 247-253.
- Ukkonen, F. K. & Erä, d. V. (1979). Birch bark extractives. *Kemia - Kemi* 5: 217-220.
- van Bergen, P. F., Bland, H. A., Horton, M. C. & Evershed, R. P. (1997a). Chemical and morphological changes in archaeological seeds and fruits during preservation by dessication. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 61(9): 1919-1930.
- Van Bergen, P. F., Peakman, T. M., Leigh-Firbank, E. C. & Evershed, R. P. (1997b). Chemical evidence for archaeological frankincense: boswellic acids and their derivatives in solvent soluble and insoluble fractions of resin-like materials. *Tetrahedron Letters* 38(48): 8409-8412.

- van den Brink, O. F., Boon, J. J., O'Connor, P. B., Duursma, M. C. & Hereen, R. M. A. (2001). MALDI Fourier transform mass spectrometric analysis of oxygenated triglycerides and phosphatidylcholines in egg tempera paint dosimeters used for environmental monitoring of museum display conditions. *Journal of Mass Spectrometry* 36: 479-492.
- van der Doelen, G. A. (1999). Molecular studies of fresh and aged triterpenoids varnishes. Amsterdam, University of Amsterdam: 178.
- Wall, D. B., Finch, J. W. & Cohen, S. A. (2004). Quantification of codeine by desorption/ionization in silicon time-of-flight mass spectrometry and comparisons with liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18: 1403-1406.
- Wei, J., Buriak, J. M. & Siuzdak, G. (1999). Desorption-ionization mass spectrometry on porous silicon. *Nature (London)* 399: 243-246.
- Wendt, C. J. & Lu, S.-T. (2006). Sourcing archaeological bitumen in the Olmec region. *Journal of Archaeological Science* 33: 89-97.
- Wood, K. V., Bonham, C. C. & Jenks, M. A. (2001). The effect of water on the ion trap analysis of trimethylsilyl derivatives of long-chain fatty acids and alcohols. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 15(11): 873-877.
- Woodbury, S. E., Evershed, R. P., Rossell, J. B., Griffith, R. E. & Farnell, P. (1995). Detection of vegetable oil adulteration using gas chromatography combustion/isotope ratio mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 67: 2685-2690.
- Wyplosz, N. (2003). Laser desorption mass spectrometric studies of artists' organic pigments. Wiskunde en Informatica. Amsterdam, Faculteit der Natuurwetenschappen. PhD: 212.
- Yamashita, M. & Fenn, J. B. (1984). Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *Journal of Physical Chemistry* 88: 4451-4459.
- Zaluzec, E. J., Gage, D. A. & Watson, J. T. (1995). Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: applications in peptide and protein characterization. *Protein Expression and Purification* 6: 109-123.

Annexes

Sommaire

Sommaire	377
Annexe 1	379
Mirabaud et al., Analytical Chemistry, 2007, 79, 6182-9192	
Annexe 2	393
Quantification en chromatographie en phase gazeuse	
Annexe 3	397
Stratigraphie du site de Clairvaux XIV	
Annexe 4	401
Dessins des céramiques de Clairvaux XIV prélevées	
Annexe 5	413
Dessins des céramiques de Clairvaux XIV et matériaux identifiés	
Annexe 6	423
Chromatogrammes des échantillons analysés; Quantification	

Annexe 1

Mirabaud et al., *Analytical Chemistry*, 2007, 79, 6182-6192

Molecular Criteria for Discriminating Adipose Fat and Milk from Different Species by NanoESI MS and MS/MS of Their Triacylglycerols: Application to Archaeological Remains

Sigrid Mirabaud,^{†,‡} Christian Rolando,[†] and Martine Regert^{*,‡}

Equipe Physico-Chimie pour l'Analyse et la Biologie, Chimie Organique et Macromoléculaire UMR CNRS 8009, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France, and Laboratoire du Centre de Recherche et de Restauration des Musées de France, UMR 171 CNRS–MCC, Palais du Louvre, 14 Quai François Mitterrand, 75001 Paris, France

A new multistep analytical methodology is described in this paper for the precise identification of triacylglycerols, which are biomarkers of dairy products and subcutaneous fats, that may be chemically identified in archaeological pottery. It consists of the analysis of the total lipid extract from different kinds of fats by high-temperature gas chromatography, performed in order to select the ceramic vessels in which animal fats are well preserved, followed by nanoelectrospray QqTOF mass spectrometry that allows for distinguishing the specific origins of the lipids detected (namely, cow, sheep, or goat). The analysis of model samples, cow and goat dairy products and cow and sheep adipose fats, was successfully achieved. The fatty acid composition of each triacylglycerol was identified, which allowed for the discrimination of subcutaneous fats and dairy fats and distinguishing between cow and goat milk. This methodology was then applied to archaeological samples, and the presence of goat milk, cow milk, and possibly sheep subcutaneous fat was assessed based on the discriminating criteria found on modern fats.

Among natural substances possibly preserved in archaeological ceramic vessels, animal fats, from either subcutaneous matter or dairy products, have been shown to be particularly well preserved in several pre- and protohistoric sites.^{1–7} Determining the specific

origin of such products but also distinguishing between subcutaneous fats and dairy derivatives are of particular importance in the field of archaeology in order to understand the evolution of neolithic economies.^{8,9}

Until the 90s, one way for detecting milking exploitations during prehistory was based on the study of specific ceramic pots, either holed or with particular shapes, systematically interpreted as milk strainers and milk jugs.^{8–10} However, the recent identification of beeswax in a so-called “strainer” from the neolithic site of Dikili-Tash (Greece, 6th millennium B.C.) gave evidence that holed pottery may have had other functions than the processing of dairy products, as that kind of pottery may also have been used as a honey or beeswax sieve.¹¹

The study of faunal remains is another way of identifying milking exploitations. Indeed, dairy specialization may be emphasized when an important neonatal calf cull indicates postlactation slaughtering.¹² Dairying is nevertheless difficult to assess by this method when animals are exploited for both their milk and meat.

A new way for investigating the question of milk exploitation during prehistory relies on the analysis of lipids extracted from pottery, either from potsherds or carbonized surface residues.^{1,13–16} These analyses are based on the detection and identification by high-temperature gas chromatography (HT GC) and HT GC coupled to mass spectrometry (HT GC/MS) of lipids, characteristic of the natural origin of the products processed in the vessels. Among others, waxes, resins, tars, and different kinds of fats can be readily distinguished.^{1,3,17–21} The distinction between animal

* Corresponding author. Phone: 331 40 20 68 57. Fax: 331 47 03 32 46. E-mail: martine.regert@culture.fr.

[†] Université des Sciences et Technologies de Lille.

[‡] Laboratoire du Centre de Recherche et de Restauration des Musées de France.

- (1) Evershed, R. P.; Mottram, H. R.; Dudd, S. N.; Charters, S.; Stott, A. W.; Lawrence, G. J. *Naturwissenschaften* **1997**, *84*, 402–406.
- (2) Craig, O.; Mulvillet, J.; Pearson, M. P.; Sokol, R.; Gelsthorpe, K.; Stacey, R.; Collins, M. *Nature (London, U.K.)* **2000**, *408*, 312.
- (3) Evershed, R. P.; Dudd, S. N.; Copley, M. S.; Berstan, R.; Stott, A. W.; Mottram, H. R.; Buckley, S. A.; Crossman, Z. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 660–668.
- (4) Copley, M. S.; Berstan, R.; Dudd, S. N.; Straker, V.; Payne, S.; Evershed, R. P. *J. Archaeol. Sci.* **2005**, *32*, 485–503.
- (5) Copley, M. S.; Berstan, R.; Straker, V.; Payne, S.; Evershed, R. P. *J. Archaeol. Sci.* **2005**, *32*, 505–521.
- (6) Copley, M. S.; Berstan, R.; Mukherjee, A. J.; Dudd, S. N.; Straker, V.; Payne, S.; Evershed, R. P. *J. Archaeol. Sci.* **2005**, *32*, 523–546.

- (7) Regert, M.; Garnier, N.; Decavallas, O.; Cren-Olive, C.; Rolando, C. *Meas. Sci. Technol.* **2003**, *14*, 1620–1630.
- (8) Sherratt, A. *World Archaeology* **1983**, *15*, 90–104.
- (9) Bogucki, P. I. *Expedition* **1986**, *28*, 51–58.
- (10) Bogucki, P. I. *Oxford J. Archaeology* **1984**, *3*, 15–29.
- (11) Regert, M.; Colinart, S.; Degrand, L.; Decavallas, O. *Archaeometry* **2001**, *43*, 549–569.
- (12) Balasse, M.; Bocherens, H.; Tresset, A.; Mariotti, A.; Vigne, J.-D. *C. R. Acad. Sci., Ser. IIa: Sci. Terre Planètes* **1997**, *325*, 1005–1010.
- (13) Dudd, S. N.; Evershed, R. P. *J. Archaeol. Sci.* **1999**, *26*, 1473–1482.
- (14) Regert, M.; Dudd, S. N.; van Bergen, P. F.; Pétrequin, P.; Evershed, R. P. *BAR* **2001**, *S939*, 78–90.
- (15) Evershed, R. P.; Heron, C.; Charters, S.; Goad, L. J. *Proc. Br. Acad.* **1992**, *77*, 187–208.
- (16) Heron, C.; Evershed, R. P. *Archaeol. MethodTheory* **1993**, *5*, 247–279.
- (17) Evershed, R. P.; Heron, C.; Goad, L. J. *Antiquity* **1991**, *65*, 540–544.

dairy and subcutaneous fats relies on a precise identification of the triacylglycerol (TAG) content, as they are the most characteristic biomarkers of animal fats. Although the triacylglycerol distribution of fresh milk is very characteristic, its degraded profile sometimes becomes indistinguishable from that of ruminant adipose fat through diagenetic degradation.^{22,23} A complementary method based on the analysis of stable carbon isotope ratio ¹³C/¹²C by GC/C-IRMS (gas chromatography/combustion-isotope ratio mass spectrometry) was also developed.^{1,3,13,22} It allows ascertaining more soundly the distinction between ruminant subcutaneous fats and dairy products. Nevertheless this approach does not always allow for distinguishing adipose fats from different species, and it does not provide any criteria for identifying the specific origin of dairy products (cow, goat, or sheep). Recently, there has been several interesting attempts to characterize contemporary dairy and subcutaneous fats by their TAG composition, using LC/APCI MS (liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry).^{24,25} Although the results obtained were very conclusive in terms of modern products, they were rarely applied to archaeological samples. Moreover, such analyses require many separation steps in order to assess the complete structure of milk TAGs; thus, they may be difficult to apply to archaeological samples. To our knowledge, there is a single example of the application of LC/APCI MS to an archaeological sample that showed a simple TAG distribution characteristic of adipose ruminant fat.²⁶ However, no comparison of adipose and dairy TAGs or of their specific provenance has ever been studied for that kind of degraded complex sample.

To precisely identify archaeological animal fats, from their nature to their origin, we developed a new methodology consisting of a general screening of the preserved lipids by HT GC and HT GC/MS followed by the analysis of selected samples by nanoESI MS/MS in order to more precisely assess the triacylglycerol distribution. Because ESI MS/MS had to be carried out on TAGs as pure as possible, the selected samples were fractionated to separate TAGs from well-ionized compounds. The analyzed solutions were also doped with lithium chloride in order to palliate the weak ionization yield of triacylglycerols.²⁷ Before analyzing precious archaeological lipid extracts, sample treatment and ESI MS analyses were developed on reference contemporary milk and adipose samples from different species. Besides a very sensitive detection of the TAGs, the distribution, the chain-length, and the degree of unsaturation of the fatty acid moieties involved in TAGs were elucidated. Eventually, these data provided new criteria for the discrimination of fatty products from different animal species, for both modern and archaeological samples. Particularly, the

differentiation of cow and goat milk fats and of cow and sheep adipose fats was assessed for a number of TAGs that were then used to identify archaeological samples from two neolithic sites, namely, Chalain 4 (CH 4) and Clairvaux XIV (CL XIV), located in the French Jura region.

EXPERIMENTAL SECTION

Solvents and Reagents. All organic solvents were analytical grade purchased from VWR (VWR-France, Fontenay-sous-Bois, France). Lithium chloride (>98%), silver nitrate, and *N,O*-bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) were purchased from Sigma (Lyon, France).

Commercial Standards. All commercial standards, *n*-tetra-triacontane (C₃₄H₇₀, C₃₄), myristic acid (C₁₄H₂₈O₂, C_{14:0}), palmitic acid (C₁₆H₃₂O₂, C_{16:0}), stearic acid (C₁₈H₃₆O₂, C_{18:0}), and oleic acid (C₁₈H₃₄O₂, C_{18:1}), dipalmitin (C₃₅H₆₈O₅, D_{32:0}) and distearin (C₃₆H₇₀O₅, D_{36:0}), trimyristin (C₄₅H₈₆O₆, T_{42:0}), triplamitin (C₅₁H₉₈O₆, T_{48:0}), and tristearin (C₅₇H₁₁₀O₆, T_{54:0}), cholesterol (C₂₇H₄₆O), *n*-1-docosanol (C₂₂H₄₆O, C₂₂OH), and *n*-1-octacosanol (C₂₈H₅₈O, C₂₈OH) were purchased from Sigma (Lyon, France).

Reference Samples. Modern potsherds were handmade, using the same techniques as those used at the archaeological settlements of Chalain during the neolithic period.²⁸ The potsherds were impregnated at the laboratory for 2 days with whole cow and goat milk purchased from organic food shops. They were then dried at room temperature until they reached a constant weight. Cow and sheep adipose fats were bought from organic food stores and prepared directly.

Archaeological Samples. Five vessels from the late neolithic site of Chalain 4 (CH 4, ~3000 B.C., Jura, France; 22 samples) and 17 from the middle neolithic site of Clairvaux XIV (CL XIV, ~4000 B.C., Jura, France; 22 samples) were analyzed by HT GC and HT GC/MS. Samples consisted of potsherds and the corresponding charred surface residues when present, in order to determine whether differences between their molecular compositions could be detected. Among these archaeological samples, four were chosen for ESI MS/MS depending on their high degree of preservation and their complex triacylglycerol distribution. Table 1 details the references and characteristics of the samples investigated in this research.

Lipid Extraction. Both archaeological and modern samples were treated following the same procedure. The protocol described below was adapted from Evershed and collaborators.²⁹ Potsherds (~2 g) and carbonized surface residues (~200 mg) were first cleaned using a sterile scalpel blade and then crushed with a glass mortar and pestle. Lipids were extracted with a solution of chloroform/methanol (CHCl₃/CH₃OH, 2:1 v/v, 10 mL) after addition of an internal standard (*n*-tetra-triacontane C₃₄; 20 μL, 1 mg/mL in *n*-hexane). After sonication (2 × 15 min), the samples were centrifuged (20 min, 3000 rpm) and the clear solution was evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen (40 °C). The total lipid extract was then dissolved in 500 μL of chloroform/methanol (2:1 v/v) and stored at 4 °C.

Derivatization of the Total Lipid Extract for HT GC and HT GC/MS Analysis. An aliquot of each total lipid extract (10–100 μL) was evaporated to dryness under a gentle stream of

(18) Heron, C.; Nemcek, N.; Bonfield, K. M.; Dixon, D.; Ottaway, B. *Naturwissenschaften* **1994**, *81*, 266–269.

(19) Regert, M. *J. Sep. Sci.* **2004**, *27*, 244–254.

(20) Regert, M.; Alexandre, V.; Thomas, N.; Lattuati-Derieux, A. *J. Chromatogr., A* **2006**, *1101*, 245–253.

(21) Mathe, C.; Culioli, G.; Archier, P.; Vieillescazes, C. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1023*, 277–285.

(22) Dudd, S. N.; Evershed, R. P. *Science* **1998**, *282*, 1478–1481.

(23) Dudd, S. N.; Regert, M.; Evershed, R. P. *Org. Geochem.* **1998**, *29*, 1345–1354.

(24) Mottram, H. R.; Crossman, Z.; Evershed, R. P. *The Analyst* **2001**, *126*, 1018–1024.

(25) Mottram, H. R.; Evershed, R. P. *J. Chromatogr., A* **2001**, *926*, 239–253.

(26) Kimpe, K.; Jacobs, P. A.; Waelkens, M. *J. Chromatogr., A* **2002**, *968*, 151–160.

(27) Hsu, F.-F.; Turk, J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, *10*, 587–599.

(28) Martineau, R., Université de Franche-Comté, Besançon, 2003.

(29) Charters, S.; Evershed, R. P.; Blinkhorn, P. W.; Denham, V. *Archaeometry* **1995**, *37*, 113–127.

Table 1. Reference and Data Obtained by GC, GC/MS, and ESI MS/MS for the Archaeological Samples Analyzed

	site	vessel reference	sample name	Figure 1 equiv number	type of sample	lipid concn ($\mu\text{g/g}$ of sample)	TAG %	HTGC interpretation	ESI MS/MS interpretation			
large distribution of TAGs (T40–T54)	CH 4	4069	MR0463T	8	potsherd, rim	110.3	1.3	dairy products				
			MR0463R	7	residue, rim	5225.8	14.0					
	CL XIV	48	MR0464T	none	potsherd, body	0.0	0.0	→	goat milk fat			
			MR0465R	9	residue, body	6649.7	21.0					
			MR0466R	10	residue, rim	4770.3	17.8					
			MR1039T	none	potsherd	18.7	0.0					
			MR1040R	1	residue	1407.5	18.6					
			T1041A	6	potsherd	125.8	23.2					
			130	MR1049T	2	potsherd 1	167.5			11.7		
			150	T1050A	3	potsherd	175.4			16.1	→	cow milk fat
			195	T1058A	4	potsherd	112.2			18.7		
			214	MR1061TB	none	potsherd	243.6			0.0		
				MR1062RC	5	residue	3018.5	7.9				
medium distribution of TAGs (T44–T54)	CL XIV	87	T1047A	11	potsherd	207.6	12.8	→	adipose fat or much degraded dairy fat			
			168	T1052A	12	potsherd	51.4			22.2	subcutaneous fat ?	
			388	T1096A	14	potsherd	208.6			33.4		
				421	T1101A	13	potsherd	156.7	11.4	→	subcutaneous fat; probably sheep	
	CH 4	4181	MR0519T	none	potsherd, bottom	33.7	0.4					
			MR0519R	none	residue, bottom	91.0	0.0					
			MR0520T	15	potsherd, rim	1273.9	20.9					
			MR0520R	16	residue, rim	4009.7	35.4					
			MR0521T	17	potsherd, body	107.4	10.4					
			MR0521R	18	residue, body	5138.5	17.6					
4018			MR0508T	19	potsherd, rim	118.0	3.3					
			MR0509R	21	residue, body	3822.7	13.5					
			MR0509T	20	potsherd, body	68.1	3.2					
			MR0510T	none	potsherd, bottom	8.6	0.0					
4014			MR0524T	29	potsherd, rim	209.3	0.6					
			MR0525T	30	potsherd, body	279.3	1.2					
			MR0526T	31	potsherd, bottom	290.7	0.8					
narrow distribution of TAGs (T46–T54)	CL XIV	12	T1035A	22	potsherd	234.2	24.4	adipose fat				
			151	T1051A	23	potsherd	416.7			3.6		
			313	MR1079A	none	potsherd	29.7			0.0		
				MR1080A	24	residue	618.6			14.3		
	CH 4	4171	MR0514R	26	outer residue, rim	1566.0	3.2					
			MR0514T	25	potsherd, rim	524.4	0.8					
			MR0515T	27	potsherd, body	28.2	10.0					
			MR0516T	28	potsherd, bottom	55.5	2.6					
non interpretable distribution of TAGs	CL XIV	184	T1055A	none	potsherd	235.6	3.1	undetermined animal fat				
			R1056A	none	residue	533.5	0.0					
			T1090A	none	potsherd	1370.8	1.0					
			416	T1100A	none	potsherd	188.6			0.0		
			432	MR1104A	none	potsherd	0.0			0.0		
				MR1105A	none	residue	236.2			3.7		

nitrogen (40 °C). Silylation was achieved by adding 40 μL of BSTFA. The sample was then heated for 30 min at 80 °C. It was then evaporated to dryness under nitrogen (40 °C) and recovered in 20–100 μL of cyclohexane. An amount of 1 μL of the sample was injected into the chromatograph.

Fractionation of Archaeological Samples. Because of the inherent state of degradation of the archaeological samples, triacylglycerols needed to be purified from their degradation products and from the internal standard, *n*-tetratriacontane C_{34} , in order to be analyzed by ESI MS/MS. The samples chosen were a carbonized surface residue MR0465R from CH 4 and three potsherds T1050A, T1052A, and T1101A from CL XIV. Modern samples did not need any purification as triacylglycerols account for 98% of the lipid fraction and were not degraded, and no internal standard had been added. An amount of 100 μL of each total lipid extract were fractionated on silica solid-phase extraction (SPE)

cartridges (500 mg, 3 mL, Alltech-France, Templemars, France). The SiO_2 cartridges were rinsed with 2 mL of *n*-hexane, 2 mL of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1 v/v), and then 4 mL of *n*-hexane. The sample was placed on top of the column. Fraction A containing the hydrocarbons was eluted with 1 mL of *n*-hexane, fraction B containing the di- and triacylglycerols was eluted with 1 mL of CH_2Cl_2 , fraction C containing the sterols and alcohols with 1.5 mL of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1 v/v), and fraction D containing the fatty acids was eluted with 4 mL of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1 v/v).

The different fractions were evaporated to dryness, derivatized, and analyzed by HT GC to confirm their content. Fraction B, that contained the di- and triacylglycerols, was then prepared and analyzed by infusion nanoESI MS and MS/MS, in order to determine and identify the exact triglyceride composition.

HT GC and HT GC/MS. Gas chromatographic analysis of the silylated total and fractionated lipid extracts were performed

on a HP 6890 high-temperature gas chromatograph equipped with a FID detector (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA). Samples were introduced by on-column injection into a 15 m × 0.32 mm fused-silica capillary column, coated with CP Sil 5CB stationary phase with a 0.1 μm film thickness (Varian, Palo Alto, CA) connected to a 1 m noncoated precolumn. Helium was used as the carrier gas with a programmed flow as follows: 2 mL min⁻¹ (17 min) to 4 mL min⁻¹ (4 min) at 1 mL min⁻²; then 4–6 mL min⁻¹ at 1 mL min⁻² and hold at 6 mL min⁻¹ for 16 min. The temperature program consisted of a 1 min isothermal hold at 50 °C followed by ramping from 50 to 350 °C at 10 °C min⁻¹. It was then kept at 350 °C for 10 min. The injector was used in the track-oven mode.

HT GC/MS analyses were performed on a Thermo Finnigan GCQ (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA) mass spectrometer device equipped with an ion-trap analyzer linked to a HP 5890 gas chromatograph. Injection was achieved through a splitless injector, held at 325 °C. The samples were separated using a column similar to that used in HT GC with an i.d. of 0.25 mm, with the same temperature program. Helium pressure was held at 16 psi, and the GC/MS interface temperature was maintained at 350 °C. Mass spectra were recorded in the electron ionization mode at 70 eV, the source being held at 180 °C. In full scan mode, the mass range was scanned from *m/z* 50 to 800 in 0.6 s.

NanoESI MS and MS/MS. As the lithium ion, Li⁺, has been shown to be the most efficient doping reagent, triacylglycerols were ionized as lithium adducts, [M + Li]⁺.²⁷ The lithium solution was composed of 2% lithium chloride in methanol. An amount of 5 μL of the archaeological TAG fraction or the model lipid extract and 2 μL of the lithium solution were mixed and diluted to 100 μL in methanol.

Infusion nanoESI MS and nanoESI MS/MS analyses were performed on a Q-Star Pulsar mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA) equipped with a Q-q-TOF analyzer fitted with a nanoelectrospray ion source (Protona, Odense, Denmark). Acquisition was controlled by Analyst software. The lithium-doped solution was placed in a metal-coated glass needle (Proxeon Biosystems, Odense, Denmark) and infused in the source by application of a high voltage (800 V). The electrospray interface was operating with a first declustering potential at 50 V, a focalizing potential at 200 V, and a second declustering potential at 15 V. For ESI MS/MS experiments, the lithiated molecular ions were selected in the first quadrupole, accelerated to an energy of 20–50 eV, collided with argon, and analyzed in the TOF analyzer.

RESULTS AND DISCUSSION

General Screening and Selection of the Samples by HT GC and HT GC/MS. The organic substances derived from the content and the use of ancient ceramic vessels are usually preserved as visible charred surface residues or as absorbed matter inside the porous clay matrix. They may correspond to a large variety of materials including animal fats, vegetable oils, and also beeswax, tars, and resins. However, it is impossible to gain any information on either their origin or their degree of preservation by macroscopic or microscopic observations because of their amorphous nature. It is therefore necessary to carry out rapid analyses, with a minimum sample preparation, a good separation capability (HT GC), and an universal detection (FID or MS), in order to get an overview of the main components preserved along

with an insight into their concentration and degree of preservation. Biomarkers-orientated analytical methodologies can then be developed, on selected samples.

HT GC with FID detection and HT GC/MS analyses were thus used as a rapid method of screening of the molecular composition of the preserved organic matter and the determination of the lipid concentration.^{29–31} The 22 vessels for which we detail the results in this paper are part of a larger series of 63 ceramics from CH 4 and CL XIV. Among all these vessels, vegetable oil, animal fats, beeswax, and birch bark tar were detected and identified by HT GC and HT GC/MS. We focused the present work on ceramic vessels that contained various animal fats (Table 1).

Biomarkers and degradation markers of animal fats (fatty acids, mono-, di-, and triacylglycerols, and cholesterol) were detected in 22 vessels (Figure 1). More precisely, they were detected in 42 samples coming from those 22 vessels and only 2 samples did not have any trace of lipids. In vessels 4014 and 4018 from CH 4, anthropogenic markers, such as long-chain ketones, were also detected and identified by their mass spectra. These compounds have already been described in archaeological ceramic vessels by other authors. They are formed by the condensation of two fatty acids during the heating of animal fats and are thus probably characteristic of the heating process usually involved in culinary activities.³²

All the samples from a single vessel showed the same chromatographic pattern, more or less degraded, which means that the vessels were systematically used with the same content.³³ In a single case (Table 1, CH 4, vessel 4018, sample MR0508T; Figure 2, number 19), the chromatographic pattern of one sample was quite different from the others of the same vessel, especially considering its TAG distribution (T₄₈–T₅₄ instead of T₄₄–T₅₄). This may be due to the preferential alteration of samples issued from the rim that were more exposed to atmosphere during the use of the vessel. In the case of four vessels from CL XIV (vessels 184, 365, 416, and 432, Table 1), only fatty acids with traces of triacylglycerols were detected. This did not allow drawing any hypothesis on the exact nature of the animal fats processed in these vessels. The total lipid extracts of the charred surface residues from the ceramic vessels from CH 4 were more concentrated than those from CL XIV (average lipid concentration of 3909 μg per g of residue for CH 4 versus 1163 μg per g of residue for CL XIV). As seen in Table 1, carbonized surface residues had a lipid concentration up to more than 1 mg per g of residue, whereas potsherds were less concentrated, from 20 to 500 μg per g of potsherd in most cases. Those concentrations are higher than the acceptable limit currently admitted for interpretation.^{16,31} Interestingly, in 20 samples, TAGs represented more than 10% of the total lipids, reaching 35% in one case (CH 4, vessel 4181, sample MR0520R, Table 1). As TAGs are known to be the most easily degraded lipids, one can notice that the samples were exceptionally well-preserved, after more than 5000 years underground. This is due to the highly favorable lacustrine archaeological context,

(30) Charters, S.; Evershed, R. P.; Goad, L. J.; Leyden, A.; Blinkhorn, P. W.; Denham, V. *Archaeometry* **1993**, *35*, 211–223.

(31) Heron, C.; Evershed, R. P.; Goad, L. J. *J. Archaeol. Sci.* **1991**, *18*, 641–659.

(32) Evershed, R. P.; Stott, A. W.; Raven, A.; Dudd, S. N.; Charters, S.; Leyden, A. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 8875–8878.

(33) Regert, M.; Dudd, S. N.; Pétrequin, P.; Evershed, R. P. *Rev. Archéométrie* **1999**, *23*, 91–99.

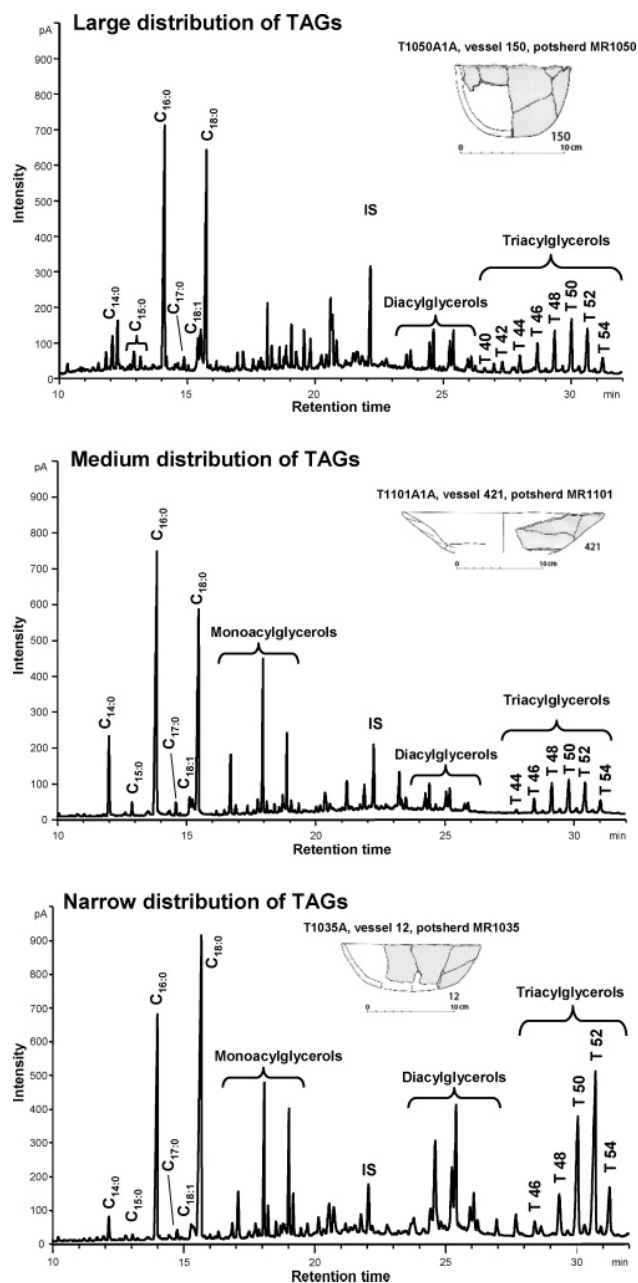


Figure 1. Gas chromatograms obtained from the total lipid extracts of three vessels from the archaeological site CL XIV.

which consists of a humid anaerobic sediment. It explains why the degradation processes due to bacteria and oxygen were greatly slowed.¹⁴

Depending on their TAG distribution, the samples were classified into three main categories. These categories were realized using a simple statistical treatment that allowed plotting the dispersion factor (DF) versus the average carbon number (M) contained in the fatty acid moieties of each TAG (Figure 2). This latter value was calculated as follows:

$$M = \frac{\sum (P_i C_i)}{\sum P_i}$$

where P_i corresponds to the relative percentage of each TAG and C_i to the number of atoms of fatty acid moieties in each TAG (CN). $\sum P_i$ corresponds to 100 since the sum of the area of each TAG has been brought back to 100%. The dispersion factor was obtained by the following formula:

$$DF = \frac{\sqrt{\sum [(C_i - M)^2 C_i P_i]}}{\sum P_i}$$

On the graph obtained, the lower is the average CN and the higher is the DF, the larger is the TAG distribution.

Figure 2 shows that, except three samples (8 corresponding to MR0463T, vessel 4069; 14 corresponding to T1096A, vessel 388; 29 corresponding to MR0524T, vessel 4014), all the samples could be attributed to one of the three different classes that appears on the graph. The first class, comprising seven vessels, one from CH 4 and six from CL XIV (Table 1), contains samples that present a large distribution of TAGs, from T_{40} to T_{54} (Figures 1 and 2, vessel 150). The second class, with seven vessels, is characterized by a medium distribution of TAGs, from T_{44} to T_{54} (Figure 1, vessel 421 and Figure 2, vessel 168), and the last class, with four vessels, comprises samples with a narrow distribution of TAGs, from T_{46} or T_{48} to T_{54} (Figure 1, vessel 12 and Figure 2, vessel 151). By comparing these data with those from literature, it is possible to attribute the largest and the narrowest TAG distribution to, respectively, degraded dairy products and subcutaneous animal fats.^{3,7,13,22,23} Indeed, dairy products are known to be characterized by a very large TAG distribution, from T_{28} to T_{54} , with many isomers not well-separated by HT GC, while subcutaneous ruminant fat is characterized by a narrow distribution, from T_{46} to T_{54} , with less-shouldered peaks. This is due to the far more simple composition of adipose TAGs compared to those from dairy fat.^{25,34–36} As asserted in the literature, triacylglycerols are highly sensitive to degradation, especially hydrolysis in the present archaeological context. Short-chain TAGs were proven to be preferentially hydrolyzed, thus making the profile of degraded milk fat resembling that of ruminant adipose fat.²³ Consequently, if the broad-TAG-distribution samples could be readily identified as degraded dairy products, the medium class is more subjected to questioning. Indeed, those samples could be either well preserved adipose fat or degraded dairy fat. And last, the third-class distribution is more probably characteristic of adipose degraded fat, especially when the amount of T_{50} and T_{52} is largely higher than the amount of the other TAGs and close to the amount of fatty acids (CL XIV, vessel 12, Figure 1). On the contrary, if the amount of T_{50} and T_{52} is close to that of the other TAGs, while fatty acids are in a larger amount, the distribution again is only characteristic of much degraded animal fat (CL XIV, vessel 151, Figure 2).

HT GC remains an interesting and necessary step of analysis, as it allows distinguishing animal fats from other commodities such as resins, beeswax, and so on. Among animal fats, it is efficient to discriminate different categories of TAG distribution

(34) Jensen, R. G. *J. Dairy Sci.* **2002**, *85*, 295–350.

(35) Ruiz-Sala, P.; Hierro, M. T. G.; Martínez-Castro, I.; Santa-Maria, G. *JAACS, J. Am. Oil Chem. Soc.* **1996**, *73*, 283–293.

(36) Gresti, J.; Bugaut, M.; Maniongui, C.; Bezaud, J. J. *Dairy Sci.* **1993**, *76*, 1850–1869.

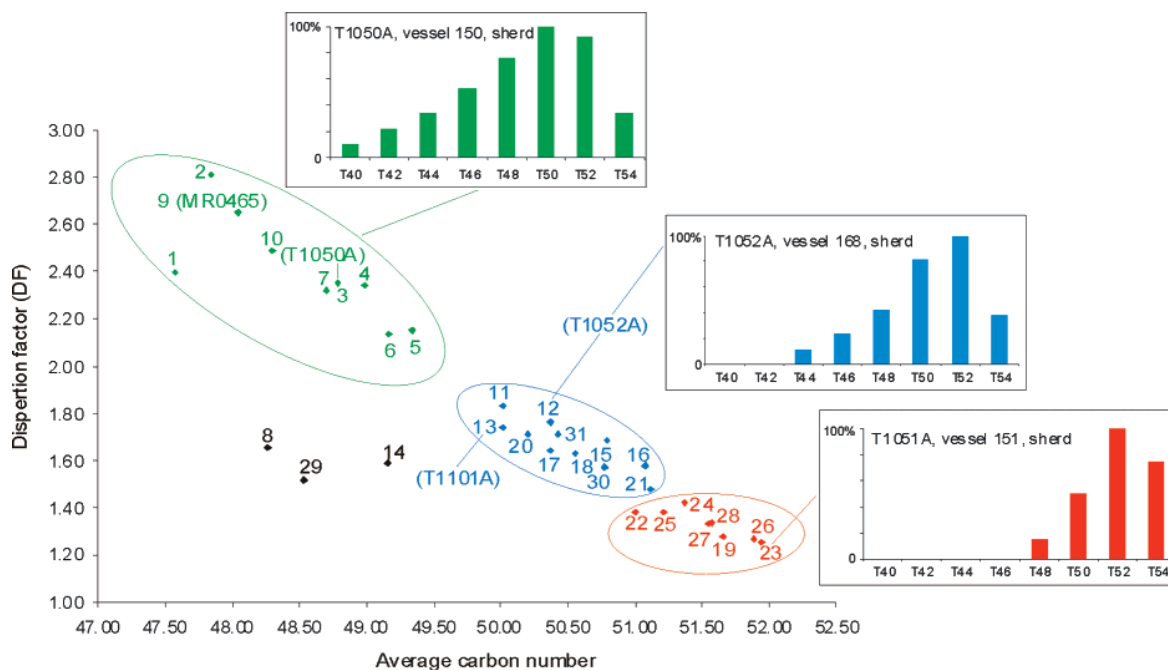


Figure 2. Distribution of the archaeological samples based on HT GC data of the TAGs distribution.

that may be related to various fatty materials from meat, subcutaneous animal fat, or milk and its derivatives, butter, yogurt, cheese, as already discussed by other authors.^{1,3,7,22,23} However, HT GC/MS did not permit the identification of TAG structure, because of the poorly informative spectra obtained by electron ionization mass spectrometry. The only fragmentation observed is due to the loss of acetate radical RCOO^\bullet , for the main fatty acid moieties. Furthermore, the specific origins of fats could not be assessed by HT GC or HT GC/MS.

Consequently, in order to focus on the structural characterization of TAGs, we proceeded to the analysis of model and archaeological samples by nanoESI MS and MS/MS.

NanoESI MS and MS/MS. Before application of nanoESI MS and nanoESI MS/MS to archaeological samples, it was necessary to assess their efficiency for the analysis of triacylglycerol constituents of contemporary reference samples. Moreover, by analyzing subcutaneous and dairy fats from different animals, cow, goat, and sheep, we wanted to know if we could find new criteria for the discrimination of these substances.

We began by the nanoESI MS analysis of cow and goat milks, impregnated on model potsherds, in parallel to the analysis of cow and sheep subcutaneous fats. The TAG distributions obtained for both milk samples ranged from T_{24} to T_{54} whereas for both subcutaneous fats it ranged from T_{44} to T_{54} . Figure 3a presents the distribution obtained for cow milk, with only the highest-peak isomer indicated for each CN. The comparison of the nanoESI MS TAG distribution with that from HT GC analysis (Figure 3b) clearly showed that nanoESI MS was much more sensitive, as it allowed the detection of TAG with a small CN (compounds T_{24} and T_{26}) that were never detected in any sample before to our knowledge.³⁴ NanoESI MS also appeared to be more sensitive than APCI MS (atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry), which does not seem to detect TAG under T_{28} .²⁵ Another advantage of HT GC and HT GC/MS was the possibility to distinguish for each series of TAG with the same CN those

containing saturated acids from those with unsaturated acids. The number of unsaturations in each series of TAG could then be determined as well as the “unsaturation” distribution.

The use of lithium salts, to enhance the ionization yield, led to a very high stability of the TAG–Li adducts, thus precluding any in-source random fragmentation.²⁷ Other ionization techniques, such as chemical ionization, electron impact, and APCI could not avoid those in-source fragmentations that preclude any identification of both small TAGs and diacylglycerols. Last, this technique required only a minute amount of sample, as the injection flow is about 200 nL/min, and the concentration required can be as low as 1 nmol/ μL .

The possibility of doing tandem mass spectrometry experiments with the nanoESI Q-q-TOF mass spectrometer was also exploited in order to gain insight into the structure of TAGs. Because of the presence of lithium adducts, the fragmentation was charge-remote. The notations used here were derived from Hsu and Turk,²⁷ who described the fragmentations obtained for lithium adducts by ESI MS/MS. One must note that with the mass spectrometer used for the experiments, the fragmentation energies used were gentler than those described by Hsu and Turk and thus did not lead to the same secondary fragmentations.

The spectra can be described by the losses of the fatty acid moieties, $[\text{M} + \text{Li} - \text{RCOOH}]^+$ and $[\text{M} + \text{Li} - \text{RCOOLi}]^+$ and by the formation of the corresponding acylium ions RCO^+ from a parent TAG. All the fatty acids linked to the glycerol backbone were thus identified, giving for each TAG an overview of its composition. The complexity of the spectra obtained was due to the initial complexity of the TAG mixture. Indeed, for a given molecular peak of lithiated TAGs, corresponding to a given CN and number of double bonds, one can note that several fatty acids may be lost depending on the initial complexity of those TAG isomers. For example, the group of saturated TAGs $T_{44:0}$ from cow milk lost all the even-numbered fatty acids from $\text{C}_{8:0}$ to $\text{C}_{20:0}$, which meant that more than eight possible structures could exist for

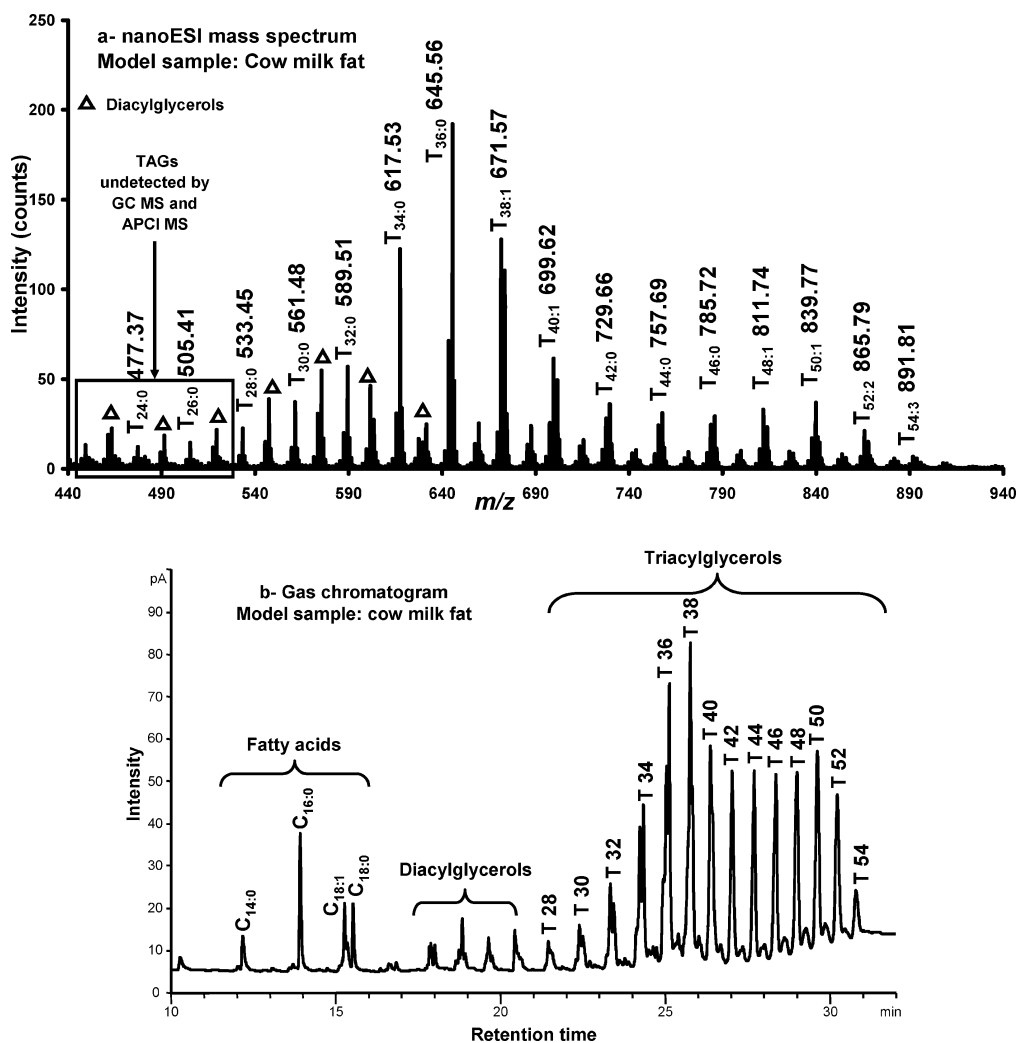


Figure 3. (a) NanoESI mass spectrum and (b) gas chromatogram of the total lipid extract from cow milk. For each group of TAGs with the same carbon number (CN), a single peak, the highest one, is assigned on the mass spectrum with the indication of the m/z and the name of the TAG.

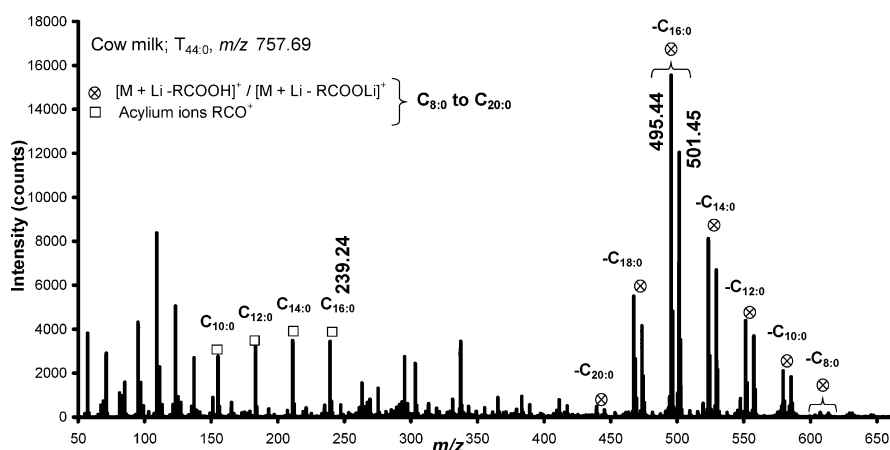


Figure 4. NanoESI MS/MS spectrum of the group of triacylglycerols $T_{44:0}$ from cow milk.

this group (Figure 4). To obtain a valuable way of discriminating cow and goat milk samples, dairy and subcutaneous samples, and cow and sheep subcutaneous fats, we studied in detail, for each group of TAGs defined by the same CN and number of unsaturation, the loss of lithiated fatty acid moieties (see Supporting Information 1).

Thus, we drew graphs that plot the relative intensity of the peak corresponding to the loss of a specific fatty acid ($[M + Li - RCOOLi]^+$) on the MS/MS spectrum against its number of carbon atoms for each series of TAGs with the same CN and unsaturation number (Figure 5: example of $T_{44:0}$ for the four model samples). Indeed, as demonstrated by Hsu and Turk, the intensities linked

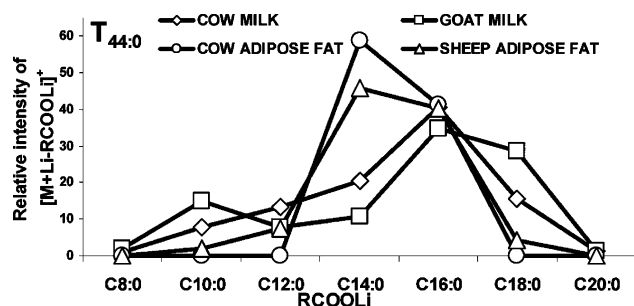


Figure 5. Graph plotting the relative intensity of the RCOOLi losses against the corresponding fatty acid for the group of TAGs $T_{44:0}$ (CN = 44, no unsaturation), for cow subcutaneous and milk fat, goat milk, and sheep subcutaneous fat.

with the loss of a fatty acid reported on the y-axis of graphs presented in Figure 5 are closely related to the structure of the isomers of TAGs.

First of all, we have compared the results obtained for the saturated TAGs extracted from cow substances from subcutaneous fats and milk (See Supporting Information 2). In subcutaneous fats, triacylglycerols were present in a narrow range, from T_{44} to T_{52} , whereas a larger distribution, from T_{24} to T_{52} , was observed

in cow milk, as already discussed.^{23,34,36} Concerning the saturated TAGs common to both substances, the distribution of fatty acids for TAGs with a carbon number of 48 was the same whatever the origin considered (adipose fat or milk) (See Supporting Information 2). However, the distribution of fatty acids involved in T_{44} and T_{46} was very different. Indeed, whereas T_{44} and T_{46} from adipose cow fat only contain two to four fatty acids ($C_{14:0}$ and $C_{16:0}$ for T_{44} and $C_{12:0}$, $C_{14:0}$, $C_{16:0}$ and $C_{18:0}$ for T_{46}), they contain fatty acids ranging from $C_{8:0}$ (T_{44}) or $C_{10:0}$ (T_{46}) to $C_{20:0}$ in cow milk. This is important to note with the perspective of identifying archaeological samples. Indeed, it has been shown that low molecular weight TAGs were more sensitive to degradation processes than the others. Consequently, the differences observed on the structure of medium to long-chain TAGs, which are usually well preserved, could be further exploited for a better discrimination of cow adipose fat and milk.

Concerning the results on adipose fats from different species (sheep and cow), they both contain TAGs ranging from T_{44} to T_{52} . The distribution of fatty acids for $T_{48:0}$, $T_{50:0}$, and $T_{52:0}$ perfectly fits (See Supporting Information 4, example of $T_{48:0}$ and $T_{50:0}$). Clear differences may be noted for $T_{44:0}$ and $T_{46:0}$ concerning the fatty acids involved in each series of TAGs ($C_{10:0}$ – $C_{18:0}$ for sheep versus

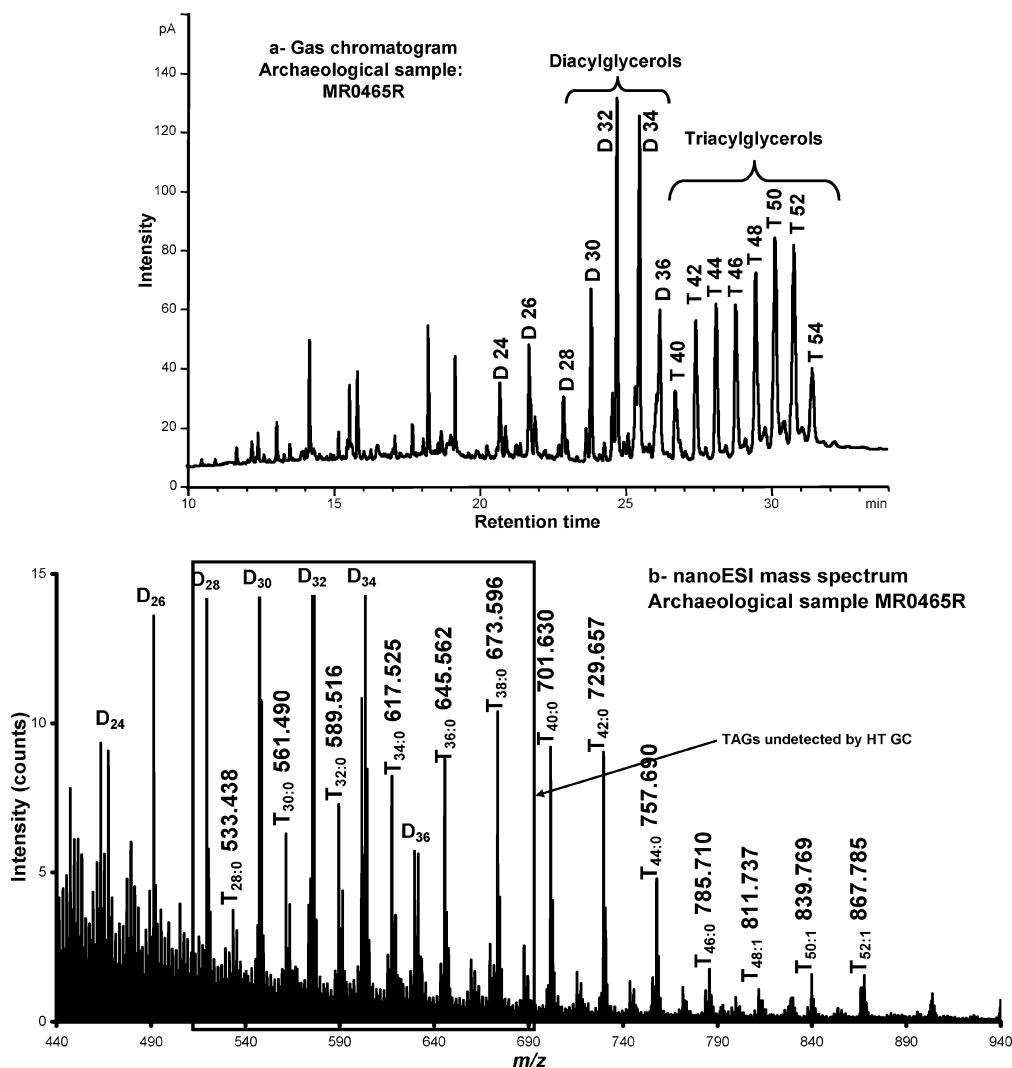


Figure 6. (a) Gas chromatogram and (b) nanoESI mass spectrum of the TAG fraction from the archaeological sample MR0465R.

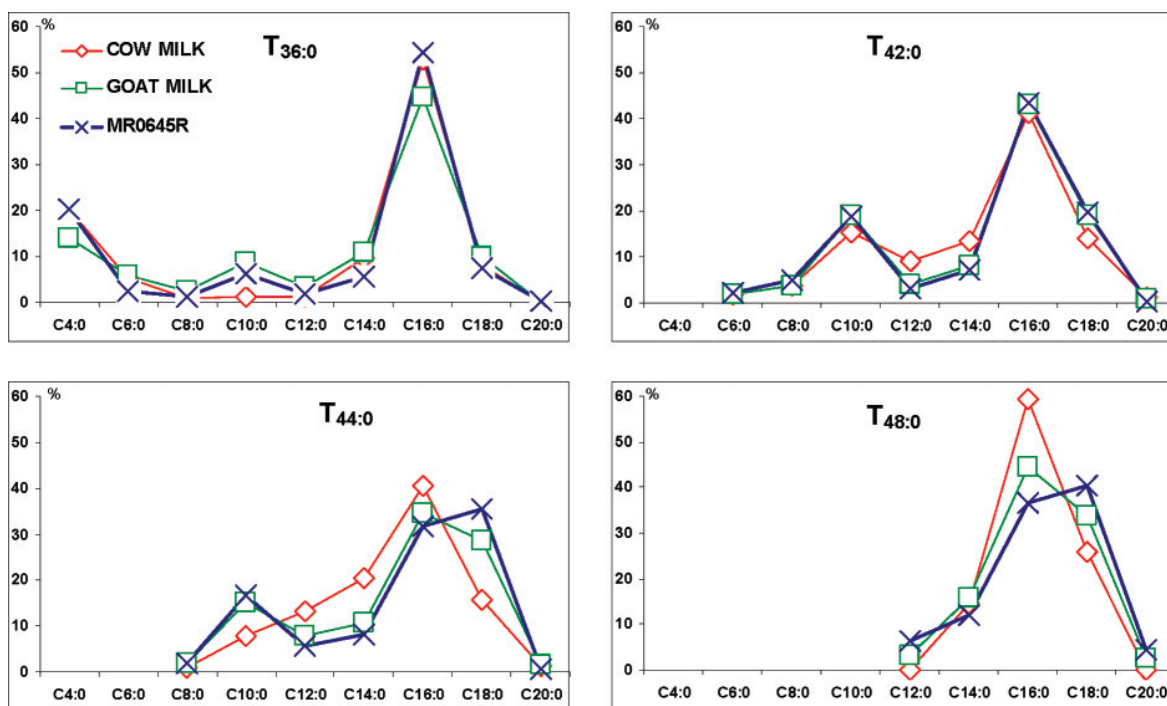


Figure 7. Graphs plotting the relative intensity of the fatty acid RCOOLi losses against their CN for $T_{36:0}$, $T_{42:0}$, $T_{44:0}$, and $T_{48:0}$ from the archaeological sample MR0465R (blue) compared with those from cow milk (red) and goat milk (green).

$C_{14:0}$ and $C_{16:0}$ for cow for $T_{44:0}$, for example), revealing some interesting differences in the fatty acid distributions for TAGs that could be used for distinguishing adipose fat from cow and sheep.

Last, in the case of comparison of milks from different species (cow and goat), the situation was much more complex due to the numerous fatty acids present in dairy products (See Supporting Information 3). Nevertheless some general information can be discussed. In most cases, the same fatty acids are involved in every series of TAGs with the same CN. This is true for $T_{28:0}$ – $T_{38:0}$, with fatty acids ranging from $C_{4:0}$ to $C_{18:0}$, but also for $T_{42:0}$, $T_{44:0}$, and $T_{46:0}$, with fatty acids, respectively, ranging from $C_{6:0}$, $C_{8:0}$, and $C_{10:0}$ to $C_{20:0}$, and for $T_{50:0}$ that presents a distribution of fatty acids from $C_{14:0}$ to $C_{20:0}$. For a few TAGs, one or two fatty acids are present in one type of milk whereas they are absent from the other ($C_{18:0}$ present in goat $T_{24:0}$ but not in cow, $C_{20:0}$ present in goat $T_{26:0}$ but not in cow, $C_{20:0}$ present in $T_{40:0}$ from cow but not from goat, and $C_{12:0}$ and $C_{20:0}$ present in $T_{48:0}$ from goat but not in cow, see Supporting Information for details). The amount of $C_{10:0}$ in TAGs from goat milk was noticed to be systematically higher than that from cow milk, this being coherent with the literature.^{34,35} The difference is particularly noticeable for $T_{24:0}$, $T_{26:0}$, $T_{28:0}$, $T_{30:0}$, $T_{32:0}$, and $T_{34:0}$. One must also note that the relative amount of $C_{12:0}$ and $C_{14:0}$ is lower in goat milk than in cow milk, particularly for $T_{44:0}$. To summarize the results obtained for milk samples, it appears that some noticeable differences exist in the composition of fatty acids for several TAGs, particularly $T_{24:0}$, $T_{26:0}$, $T_{28:0}$, $T_{30:0}$, $T_{32:0}$, $T_{34:0}$, $T_{40:0}$, $T_{44:0}$, and $T_{48:0}$. For all those samples, the differences noticed for unsaturated TAGs were not used as discriminative means, as they were not very characteristic. Moreover in archaeological degraded samples, unsaturated TAGs are barely preserved.

Thus, it appeared from all these results that the differentiation between subcutaneous and dairy fats, and between species, based on the identification of the fatty acid composition of each series

of triacylglycerols with the same CN was interestingly achieved by the use of nanoESI MS/MS. This methodology was then applied to archaeological samples.

Archaeological Samples. The analysis of archaeological samples and the transposition of the discrimination means already shown for model samples were successfully implemented. We chose four samples, one from Chalain 4, MR0465R, and three from Clairvaux XIV, namely, T1050A, T1052A, and T1101A. From the HT GC and HT GC/MS analyses, two samples (Figures 1 and 2 for T1050A and Figure 6a for MR0465R) were shown to have large TAG distributions from T_{40} to T_{54} , whereas the other two presented narrower distributions, from T_{44-46} to T_{54} (Figures 1 and 2 for T1101A). The identification of the original products was thus quite straightforward for MR0465R and T1050A as degraded dairy products, as seen in Figure 2. No undoubted identification was possible from the gas chromatograms for the others, as the distributions were exactly in the nonconclusive range (Figure 2, second class). They could be either much-degraded dairy products or well-preserved subcutaneous fats. The specific origin of all four samples could not be deduced from the data obtained. For each sample, the fraction containing the triacylglycerols was isolated and analyzed by nanoESI MS and MS/MS. The nanoESI MS spectrum of MR0465R is presented in Figure 6b in parallel to its gas chromatogram (Figure 6a), as an example of the gain in sensitivity with nanoESI MS. Indeed, TAGs down to $T_{28:0}$ were detected, whereas GC could not detect TAGs under T_{40} . It is the first time to our knowledge that such a small TAG is detected in an archaeological sample. The distributions obtained by nanoESI MS for the other samples were much closer to those observed in GC: T_{40} – T_{52} for T1050A instead of T_{40} – T_{54} ; T_{42} – T_{52} for T1052A instead of T_{44} – T_{54} , and T_{44} – T_{52} for T1101A instead of T_{44} – T_{54} . Only one ($T_{50:1}$ for T1101A and T1052A) to three ($T_{48:1}$, $T_{50:1}$, and $T_{52:1}$ for T1050A) unsaturated TAGs were detected for those

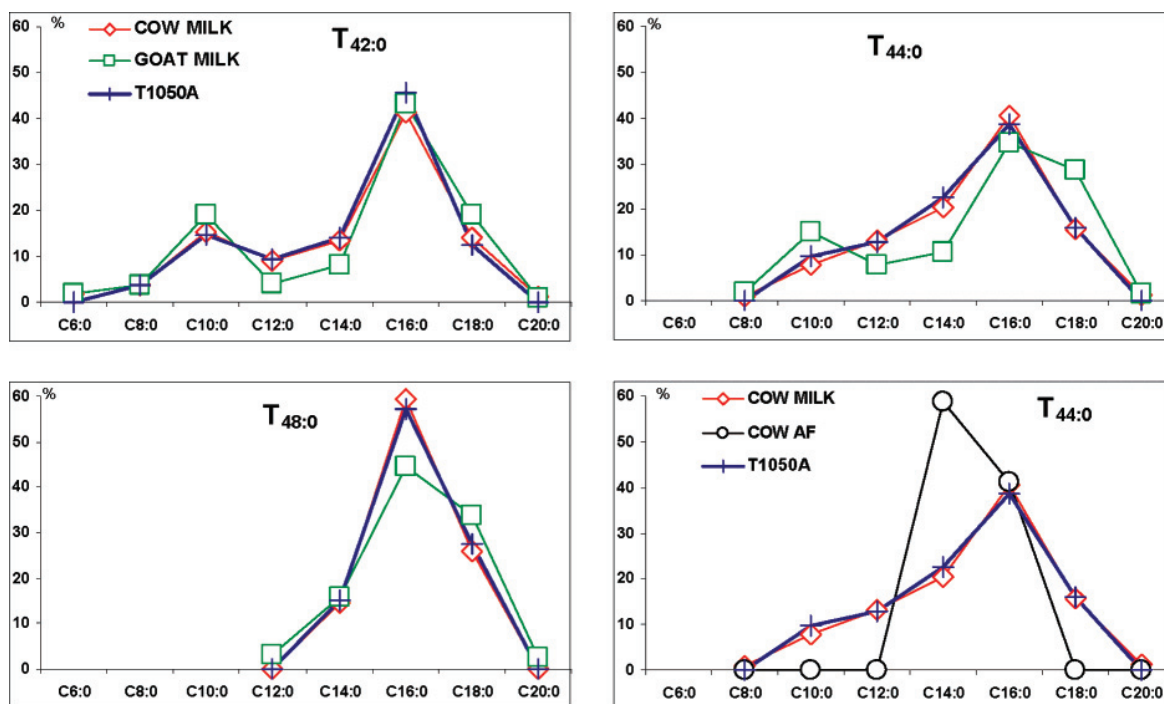


Figure 8. Graphs plotting the relative intensity of the fatty acid RCOOLi losses against their CN for the archaeological sample T1050A, compared with cow and goat dairy fat (T_{42:0}, T_{44:0}, and T_{48:0}) and cow subcutaneous and dairy fat (T_{44:0}).

samples. In none of the samples was T₅₄ detected by nanoESI MS, probably because of its presence in very low amount and its poor ionization yield.

For sample MR0465R, among the 16 TAG species detected and fragmented, 5 were unsaturated, with even 2 double bonds for T_{52:2}. The fatty acid distributions were rather large too. For example, T_{32:0} had even-numbered fatty acids from C_{4:0} to C_{20:0}, which is surprising for an archaeological sample, as short-chain TAGs are preferentially hydrolyzed, and short-chain fatty acids are lost. This demonstrated, if needed, the exceptional state of preservation of the organic matter on this archaeological site. Given its TAG distribution and the presence of small fatty acids such as C_{4:0} and C_{6:0}, this sample was readily identified as dairy product. The question of its specific origin was then raised. Comparison of each group of TAG and its fatty acid (FA) distribution with that of cow and goat milks, it appeared that it is most probably derived from goat. Indeed, four TAGs have FA distributions closer to that of goat milk than that of cow milk, namely, T_{36:0}, T_{42:0}, T_{44:0}, and T_{48:0} (Figure 7). The intensity of the C_{10:0} loss for T_{36:0} and T_{44:0} was also higher than that of cow milk, very close to that of goat milk. As described for the model samples, the data obtained for unsaturated TAGs were not conclusive and could not be used as discriminative criteria.

We could note some general trends for the Clairvaux XIV samples when monitoring the fragmentation experiments. The fatty acids distributions were small, from C_{8:0} (T1050A), C_{10:0} (TT1052A), and C_{12:0} (T1101A)–C_{18:0}. Those samples came from an archaeological site that is a millennium older than Chalain 4, and the conservation conditions must have been less favorable. The identification of those samples was not easy. For T1050A, two TAGs were characteristic of milk fat versus adipose fat, namely, T_{42:0} and T_{44:0}. Indeed, T_{42:0} does not exist in subcutaneous fats, and T_{44:0} had fatty acids from C_{10:0} to C_{18:0}, whereas

subcutaneous T_{44:0} has only C_{16:0} and C_{18:0} (Figure 8). Moreover, the comparison of TAGs T_{42:0}, T_{44:0}, and T_{48:0} with goat milk versus cow milk is in favor of a cow origin as their patterns closely matched those of cow milk (Figure 8). The last three saturated TAGs were more characteristic in their fatty acid composition of cow adipose fat. This was most probably a consequence of the aging of triacylglycerols. Among the five saturated TAGs detected and identified from sample T1101A, one was characteristic of sheep subcutaneous fat, namely, T_{44:0}. Two were characteristic of subcutaneous fat versus milk fat, namely, T_{46:0} and T_{48:0}. The last two TAGs T_{50:0} and T_{52:0} are not present in model milk samples and could thus not be used as discriminative means. They could be characteristic of subcutaneous fat or of degraded milk fat. Given the information obtained, it can be concluded that this sample is subcutaneous fat, probably from sheep. The last sample T1052A was not identified further than degraded animal fat. Indeed, the FA composition and distributions for its five saturated TAGs were very close to that of adipose fat but with no special feature that could allow a more precise determination.

CONCLUSION

The complexity, the state of degradation, and the low amount of preserved matter in archaeological samples usually necessitate the combination of several complementary analytical techniques for unravelling their molecular composition and then for determining their natural origin.^{7,37–40} In the case of organic compounds preserved in ceramic potsherds, most of the studies were based

(37) Regert, M.; Langlois, J.; Laval, E.; Le Hô, A.-S.; Pagès-Camagna, S. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *577*, 140–152.

(38) Regert, M.; Langlois, J.; Colinart, S. *J. Chromatogr., A* **2005**, *1091*, 124–136.

(39) Garnier, N.; Cren-Olive, C.; Rolando, C.; Regert, M. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 4868–4877.

(40) Regert, M. *BAR* **2007**, *S1650*, 61–76.

either on GC/EI-MS analysis or on the use of soft ionization modes such as APCI and ESI, but such techniques were rarely used together in the field of archaeology.³⁹

Combined preliminary analysis by HT GC and HT GC/MS on a large series of samples, in order to obtain information on their composition and their state of alteration, and ESI MS followed by ESI MS/MS, to obtain precise structural information on TAG biomarkers, was performed here for the first time. This methodology allowed detecting the presence of animal fats in a series of 22 vessels from 2 neolithic sites out of a total of 63 analyzed by HT GC. Among them, four samples were investigated by ESI MS and ESI MS/MS after purification of the TAG fraction and their lithiation. This technique was revealed to be very sensitive, which considerably enhanced the probability to detect molecular compounds present in low amount in archaeological samples. Particularly, TAGs with 28 and 30 carbon atoms, never mentioned until now in any archaeological sample, could be detected and identified. Furthermore, by comparing the results obtained on archaeological and model samples (cow milk and adipose fat, sheep adipose fat, goat milk), it was possible to draw new molecular criteria for distinguishing these substances. Indeed, by a detailed study of the ESI MS/MS data obtained, it was possible, for a number of series of TAGs (same CN, same number of unsaturations), to reveal some specific differences in their fatty acid distribution. By this way, goat milk was suspected in a vessel from the site of Chalain 4, cow milk in a vessel from Clairvaux XIV, and sheep adipose fat in another vessel from Clairvaux XIV.

The possibility to discriminate the specific origin of different animal fats with molecular criteria and the implementation of this methodology to archaeological samples are of prime importance to understand more precisely the ways of exploitation of domesticated animals over the neolithic period. Such results, that now have to be extended to other model samples, to artificially aged materials and to various archaeological potsherds, open new avenues for a better understanding of the structural characteristics of TAGs preserved through time. It should also allow gaining insight into the strategies of procurement and consumption of animal fats during prehistory. From a more general point of view, being able to fully characterize the structure of TAGs in fatty

substances may have further applications in the field of adulteration of dairy products and animal fats. This could also permit a better understanding of the quality and the composition of animal fats in relation with the diet and the species or subspecies of the animals from which they are issued.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) and the Nord-Pas-de-Calais Region for S.M.'s Ph.D. funding, the French Ministry of Culture and Communication for the PNRC program funding on the study of ancient lipids, the GdR 2114 ChimArt (CNRS, Ministry of Culture) and the ACI attributed to M.R. granted by the Ministry of Research for financial support. They express their gratitude to Dr. Cécile Cren-Olivé for her great help in using the mass spectrometry facilities and for interpreting the MS data. They also thank Dr. Pierre Pétrequin, from the laboratoire de Chrono-Ecologie, UMR CNRS 6565 at Besançon, France, and Dr. Anne-Marie Pétrequin, from the CRAVA, in charge of the archaeological sites of Chalain and Clairvaux, for providing the neolithic ceramic vessel samples and for the fruitful discussions on pottery function. They also thank Dr. Rémi Martineau, UMR CNRS 5594 Dijon, France, for the model potsherds he made himself. The mass spectrometry facilities used for this study are funded by the European Community (FEDER), the Région Nord-Pas de Calais (France), the Réseau National des Génopoles (RNG), the CNRS, and the Université des Sciences et Technologies de Lille. Lastly, Pierre-Alain Gillioz is sincerely thanked for his expertise on the statistical treatment of the GC data.

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Relative intensities of RCOOLi losses for each series of TAGs from the four model samples and plots of intensity of fatty acid RCOOLi losses vs CN. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Received for review March 26, 2007. Accepted May 30, 2007.

AC070594P

Annexe 2

Quantification en chromatographie en phase gazeuse

Les analyses en chromatographie en phase gazeuse ont principalement été effectuées sur un chromatographe avec un détecteur à ionisation de flamme (FID). La réponse du FID est linéaire pour la gamme de composés que nous analysons, acides gras jusqu'aux triglycérides pour les graisses et alcanes jusqu'aux esters palmitiques pour les cires. Même s'il s'agit d'un détecteur quasi-universel, l'idéal serait de quantifier chaque famille de lipides avec un standard de la même famille. Cela est trop difficile à mettre en œuvre dans le cas d'échantillons archéologiques dont la composition est inconnue au départ.

La quantification se fait par l'ajout d'un standard interne, l'alcane linéaire $n\text{-C}_{34}$ (échantillons archéologiques) ou l'alcane $n\text{-C}_{27}$ (échantillons de référence). Afin de tenir compte d'éventuelles pertes de matières lors des différentes étapes de préparation (extraction puis dérivation), ce standard est ajouté juste après le broyage des tessons et résidus.

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la quantité de lipides absorbés dans les tessons ou les résidus (en μg par g de tesson ou de résidu), ce qui permet une meilleure comparaison des échantillons entre eux. Nous avons travaillé avec un volume d'extrait lipidique total de $500\ \mu\text{L}$, en prélevant pour chaque analyse $100\ \mu\text{L}$ et en injectant après dérivation $1\ \mu\text{L}$ de solution. Le volume de cyclohexane de reprise après dérivation est noté V_{reprise} .

La concentration en lipides dans l'échantillon est donnée par la relation:

$$C_{\text{lipides}} (\mu\text{g/g}) = \frac{C_{\text{lipides injectés}} (\mu\text{g}/\mu\text{L})}{C_{\text{échantillon injecté}} (\text{g}/\mu\text{L})}$$

On a pour le standard interne (SI):

$$C_{\text{SI injecté}} (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = \frac{V_{\text{SI}} (\mu\text{L}) \times C_{\text{SI}} (\mu\text{g}/\mu\text{L})}{5 \times V_{\text{reprise}} (\mu\text{L})}$$

Or, la relation entre l'aire du pic de standard interne et la concentration en lipides injectés est :

$$C_{\text{lipides injectés}} (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = \frac{C_{\text{SI injecté}} (\mu\text{g}/\mu\text{L}) \times (A_{\text{totale}} - A_{\text{SI}})}{A_{\text{SI}}}$$

$$C_{\text{lipides injectés}} (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = \frac{V_{\text{SI}} \times C_{\text{SI}} (\mu\text{g}/\mu\text{L}) \times (A_{\text{totale}} - A_{\text{SI}})}{5 \times V_{\text{reprise}} (\mu\text{L}) \times A_{\text{SI}}}$$

On a pour l'échantillon:

$$C_{\text{échantillon injecté}} (\text{g}/\mu\text{L}) = \frac{m_{\text{échantillon broyé}} (\text{g})}{5 \times V_{\text{reprise}} (\mu\text{L})}$$

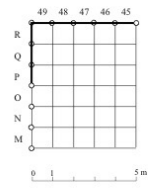
On obtient donc:

$$C_{\text{lipides}} (\mu\text{g}/\text{g}) = \frac{V_{\text{SI}} (\mu\text{L}) \times C_{\text{SI}} (\mu\text{g}/\mu\text{L}) \times (A_{\text{totale}} - A_{\text{SI}}) \times 5 \times V_{\text{reprise}} (\mu\text{L})}{5 \times V_{\text{reprise}} (\mu\text{L}) \times A_{\text{SI}} \times m_{\text{échantillon broyé}} (\text{g})}$$

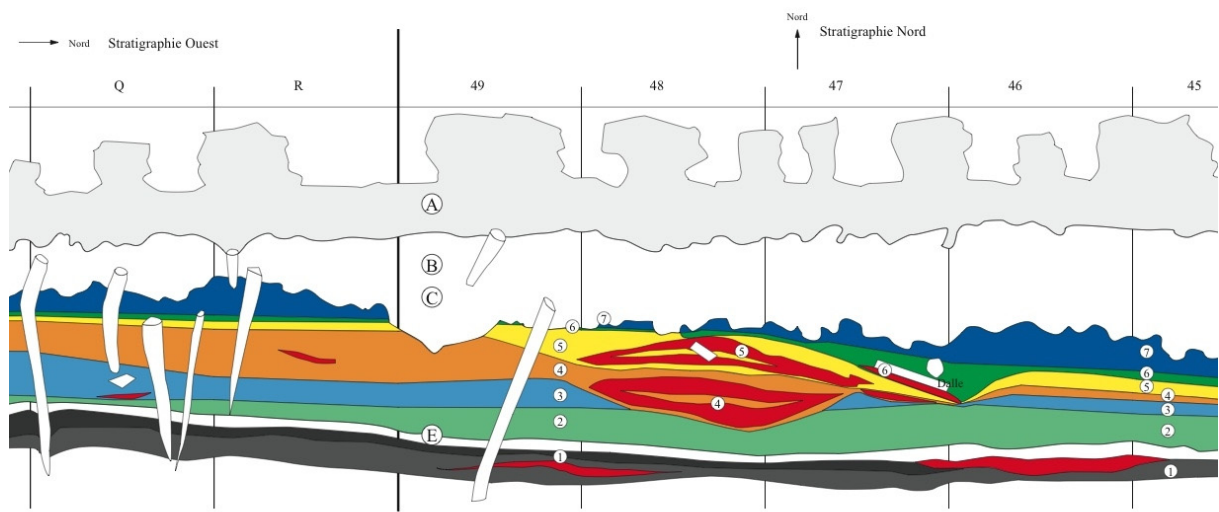
$C_{\text{lipides}} (\mu\text{g}/\text{g}) = \frac{V_{\text{SI}} (\mu\text{L}) \times C_{\text{SI}} (\mu\text{g}/\mu\text{L}) \times (A_{\text{totale}} - A_{\text{SI}})}{A_{\text{SI}} \times m_{\text{échantillon broyé}} (\text{g})}$
--

Annexe 3

Stratigraphie du site de Clairvaux XIV



XIV



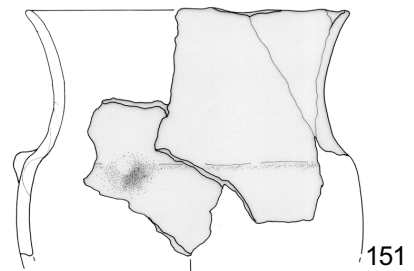
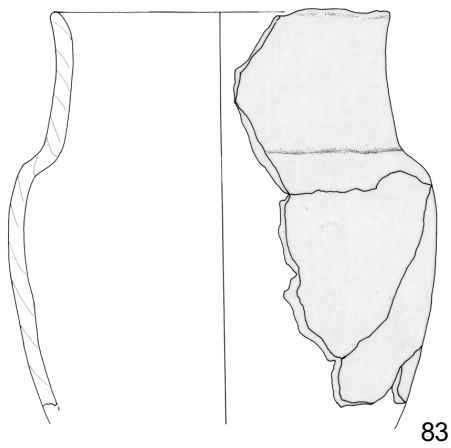
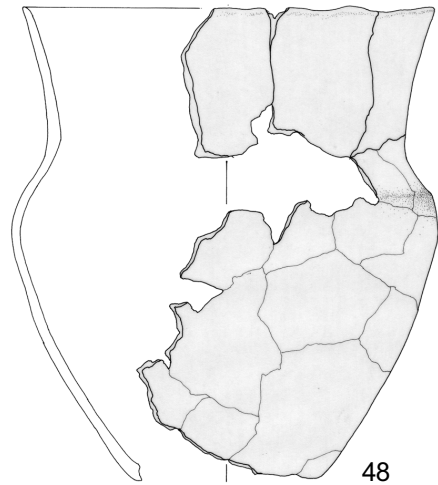
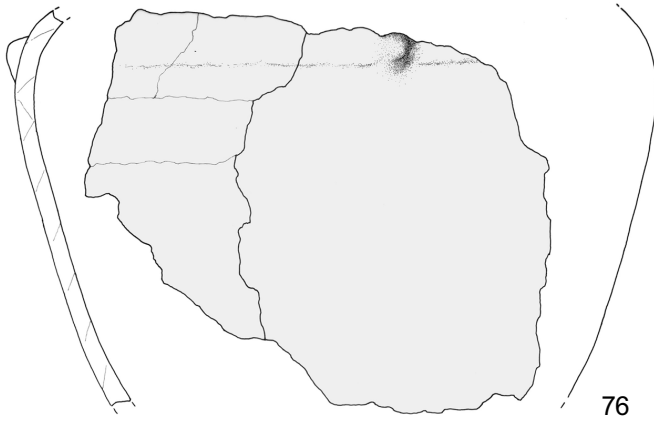
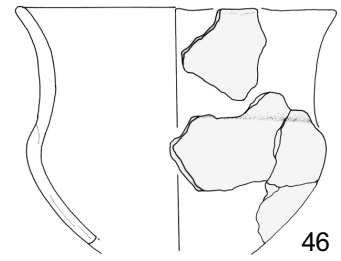
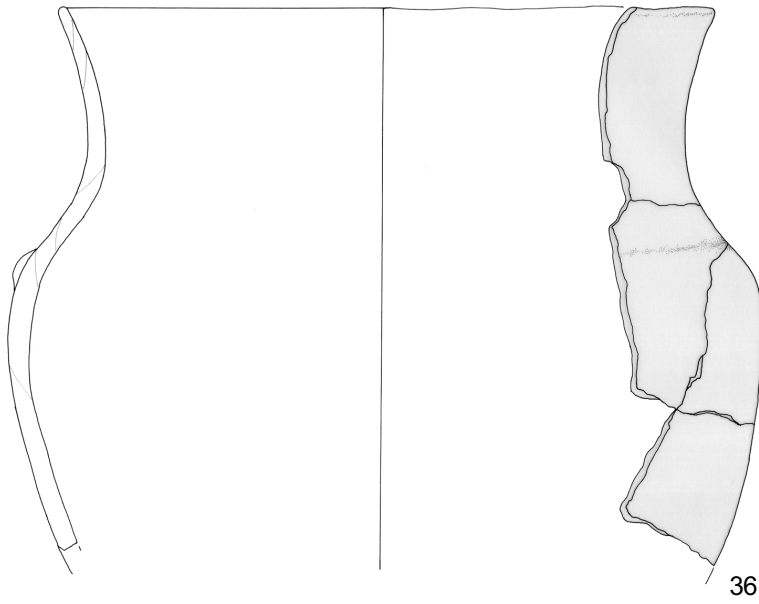
Annexe 4

Dessins des céramiques de Clairvaux XIV prélevées

Planche 1

Vases à épaulement

0
10 cm

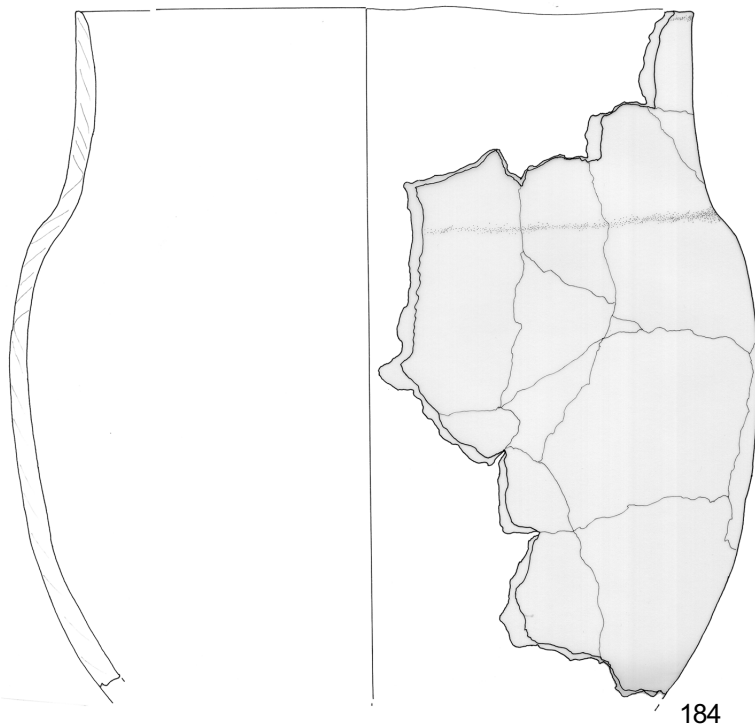


© Dessins A.M. et P. Pétrequin

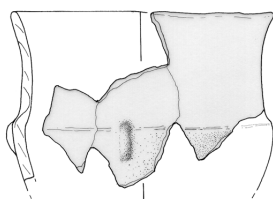
0 10 cm

Planche 2

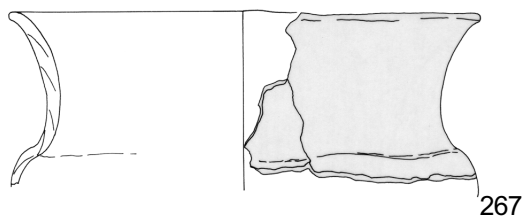
Vases à épaulement



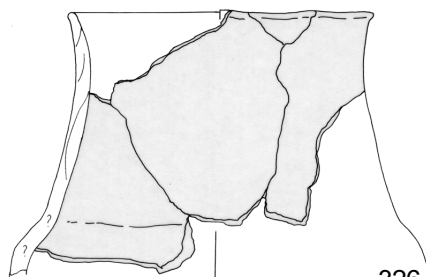
184



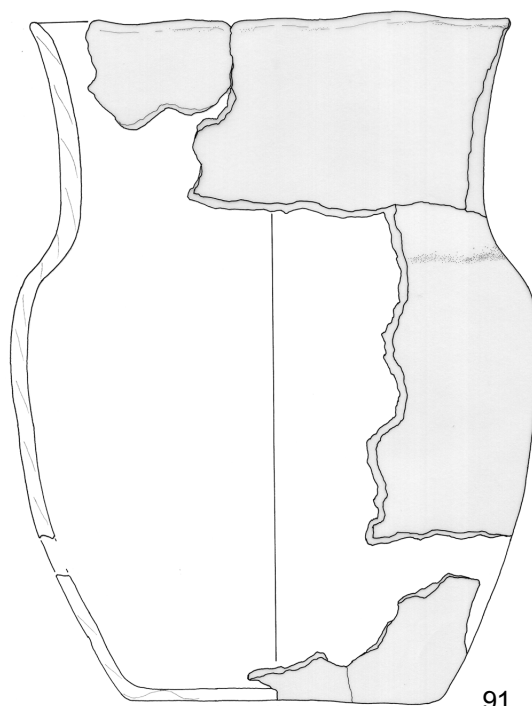
195



267



326



91

© Dessins A.M. et P.Pétrequin

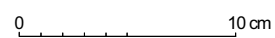
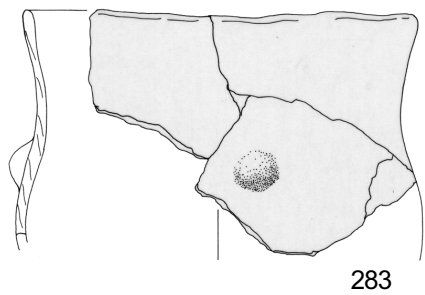
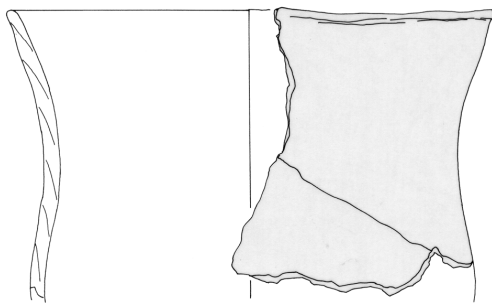
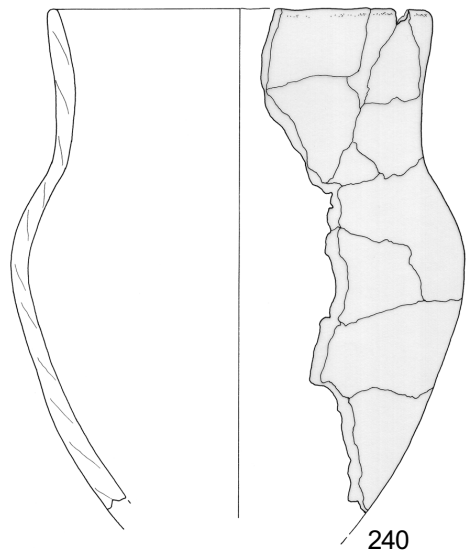
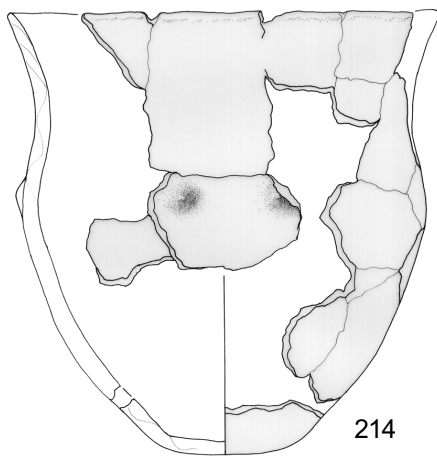
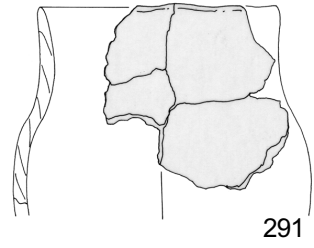
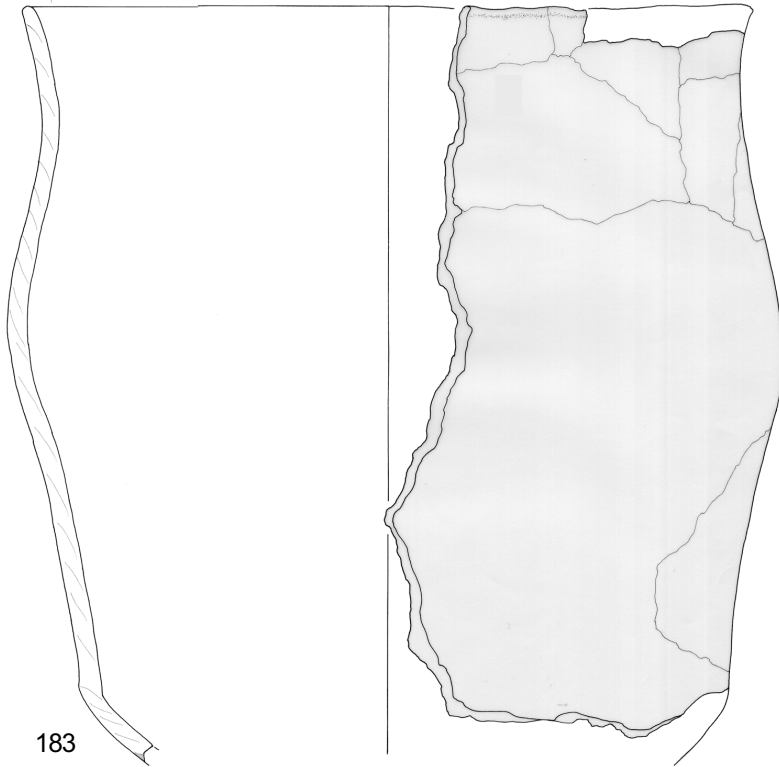


Planche 3

Vases à profil en S

0
10 cm

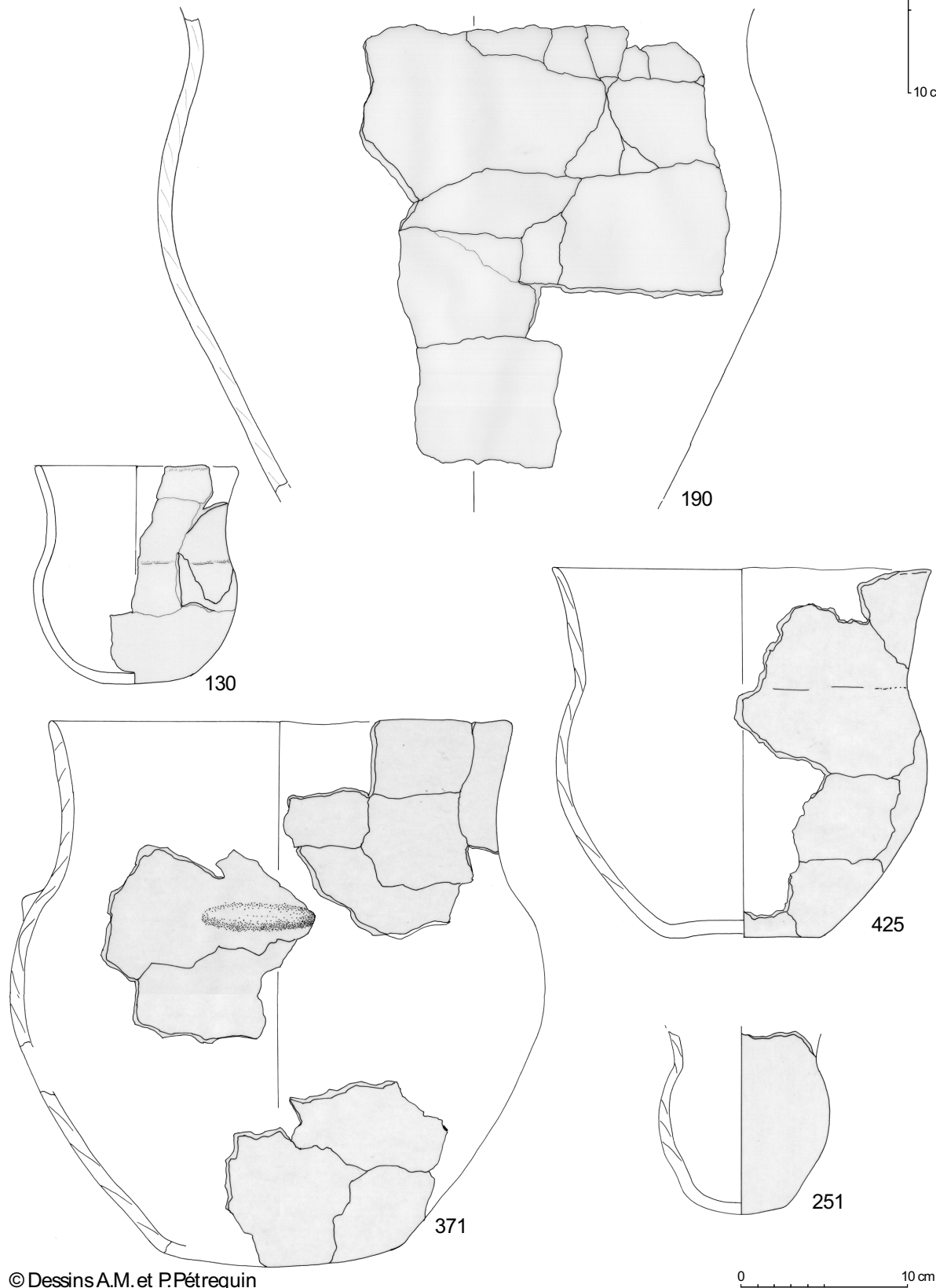
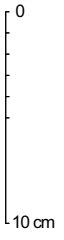


© Dessins A.M. et P. Pétrequin

0 10 cm

Planche 4

Vases tulipiformes



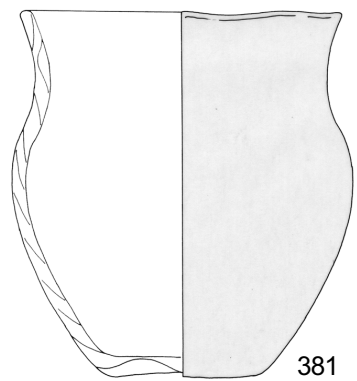
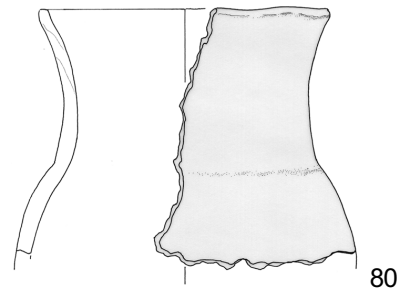
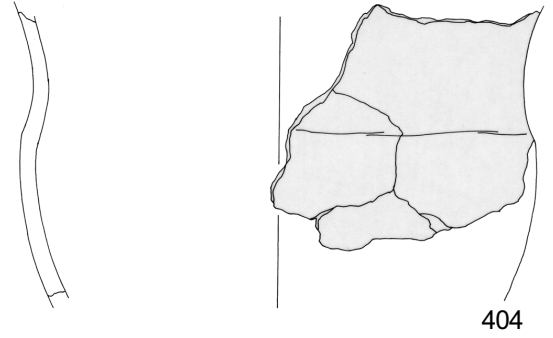
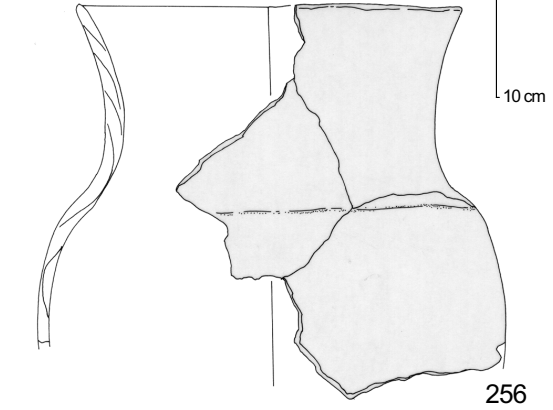
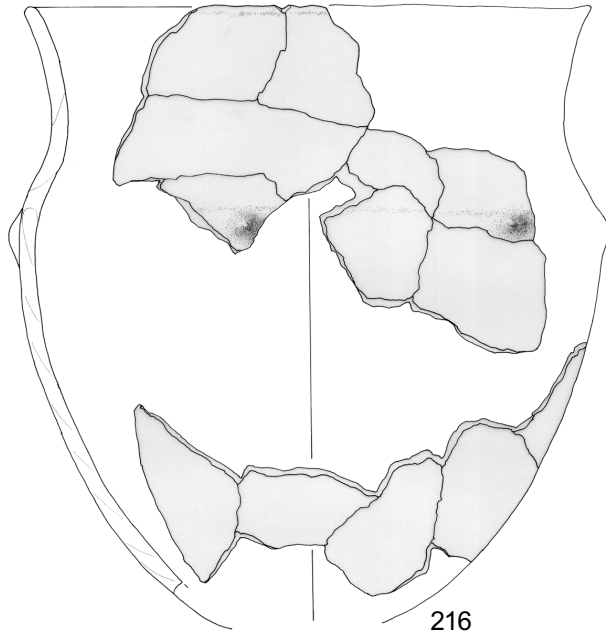
© Dessins A.M. et P.Pétrequin



Planche 5

Vases pseudo-tulipiformes

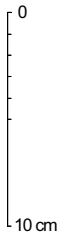
0
10 cm



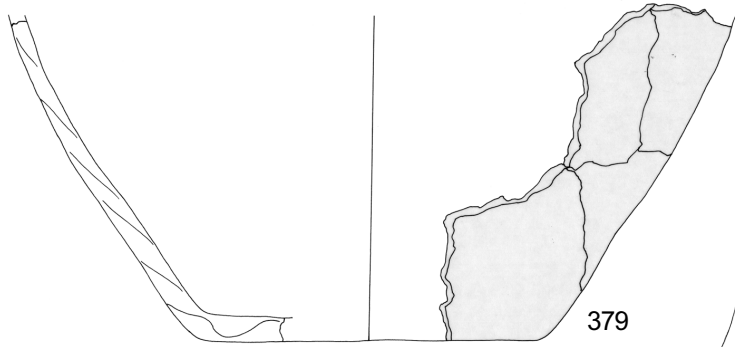
© Dessins A.M. et P. Pétrequin

0 10 cm

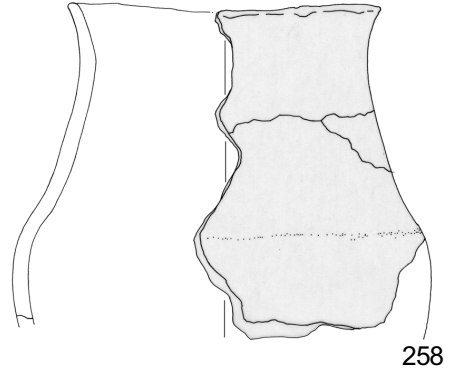
Planche 6



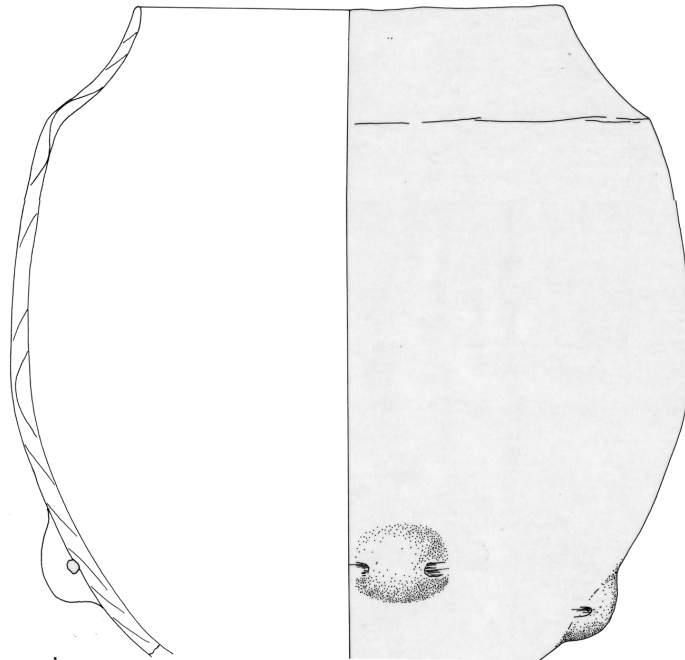
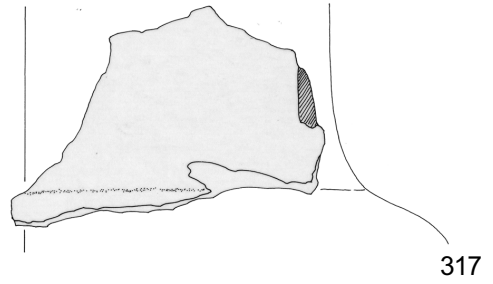
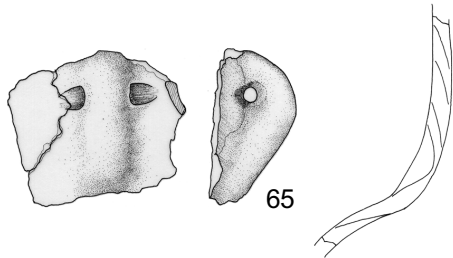
Jarre



Bouteille



Amphores



© Dessins A.M. et P.Pétrequin

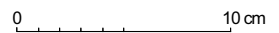
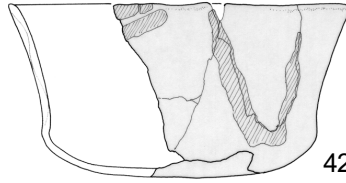


Planche 7

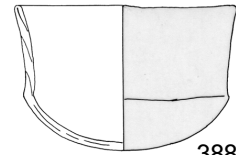
Gobelets



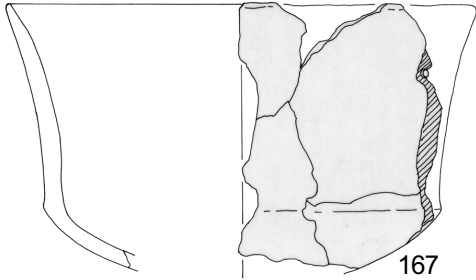
60



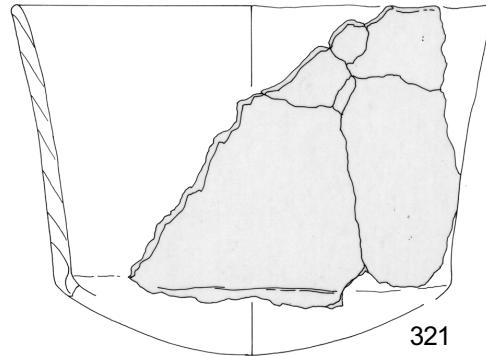
42



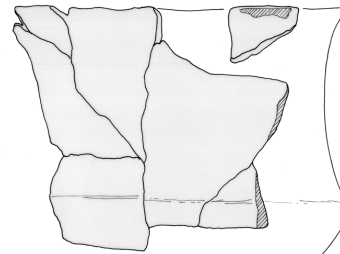
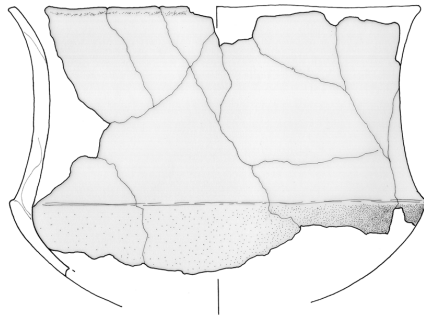
388



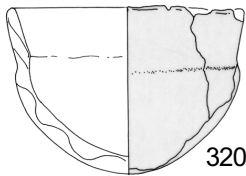
167



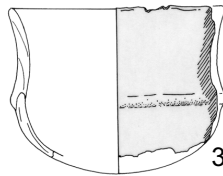
321



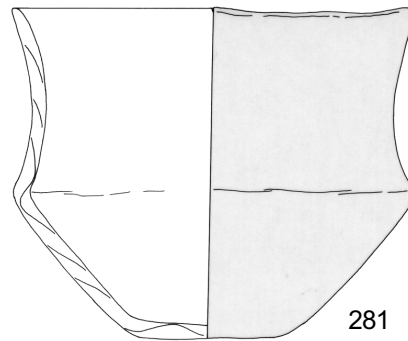
213



320



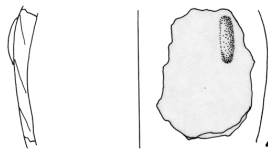
324



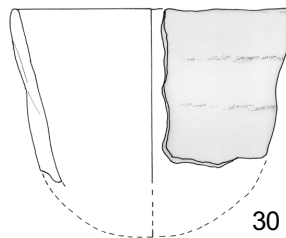
281

Bol

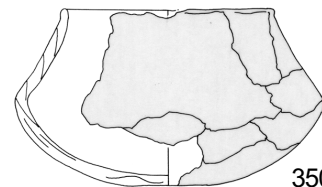
Marmite



416



30



350

© Dessins A.M. et P.Pétrequin

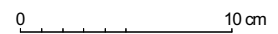
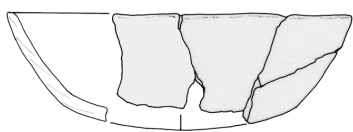
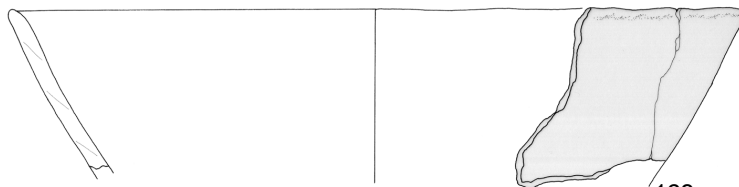


Planche 8

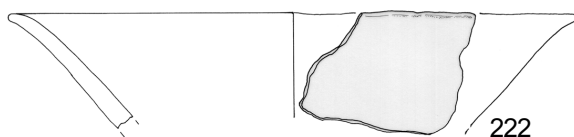
Coupes



12



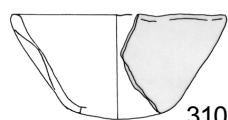
168



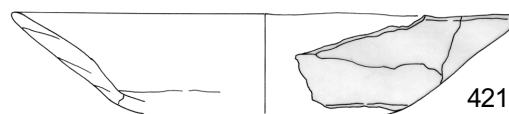
222



357



310

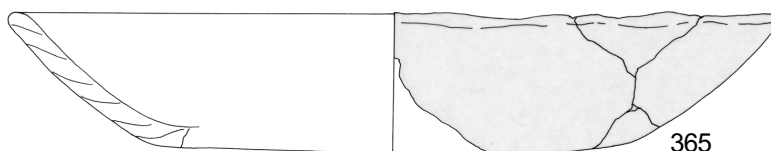


421

Assiettes



211

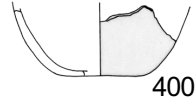


365

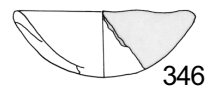
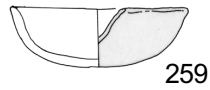
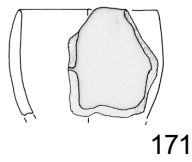
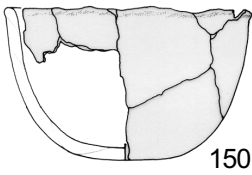


Planche 9

Microvases



Petits bols/ godets



“Plat à pain”



278



Annexe 5

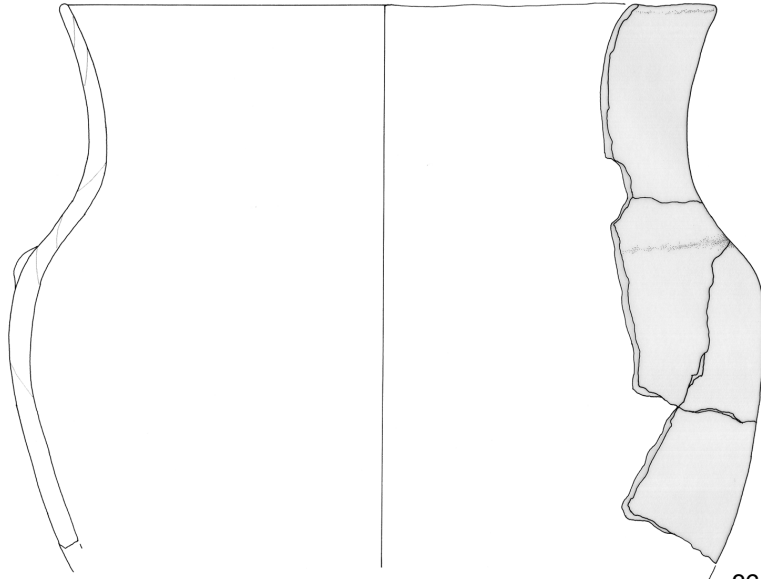
Dessin des céramiques de Clairvaux XIV et matériaux identifiés

Planche 10

Matières grasses végétales

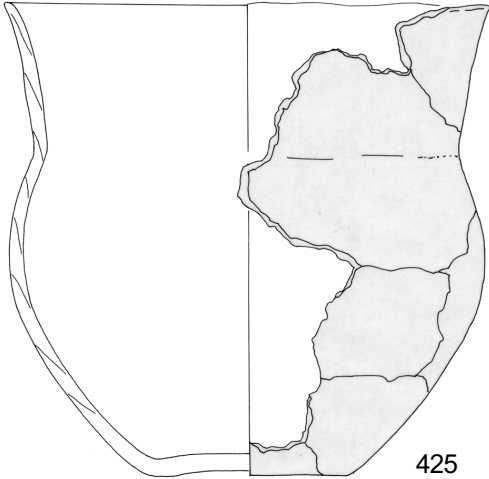


Vase à épaulement (T + R)



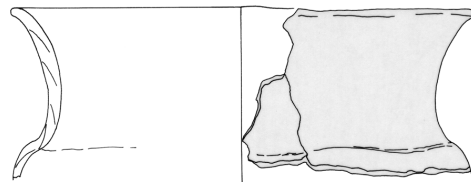
36

Vase tulipiforme (T + R)



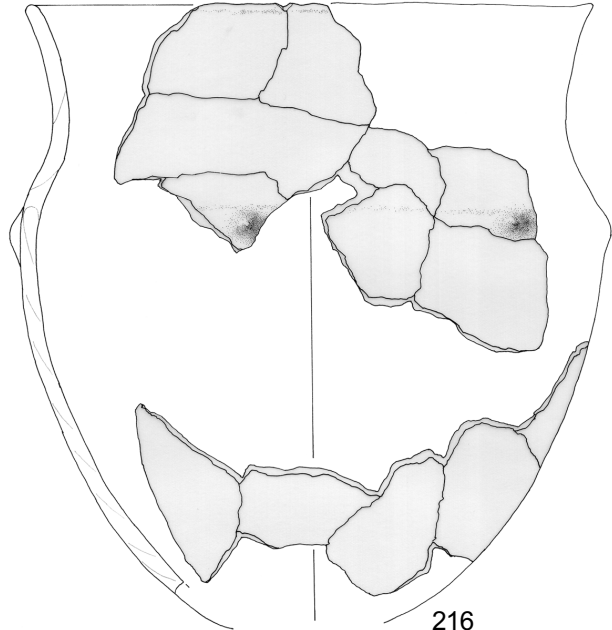
425

Vase à épaulement (T + R)



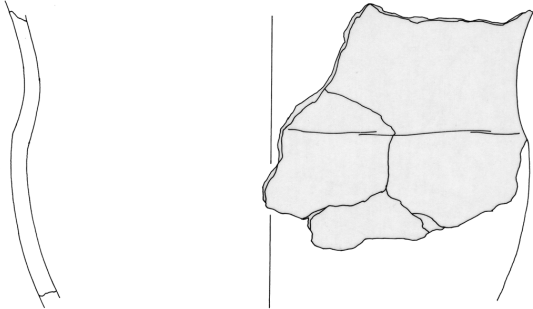
267

Vase pseudo-tulipiforme (T + R)



216

Vase pseudo-tulipiforme (T + R)



404

© Dessins A.M. et P. Pétrequin

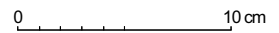
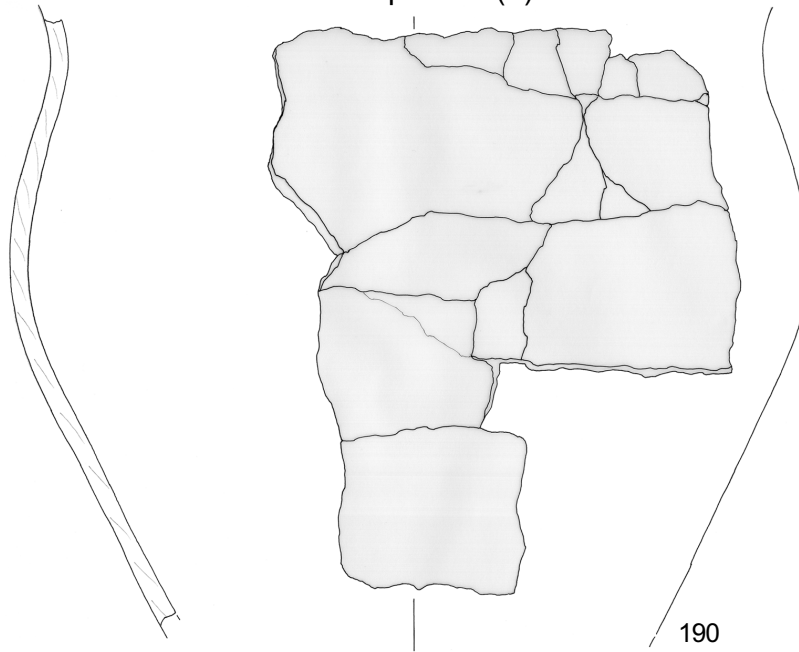


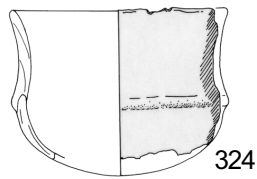
Planche 11 Cire d'abeille



Vase tulipiforme (T)

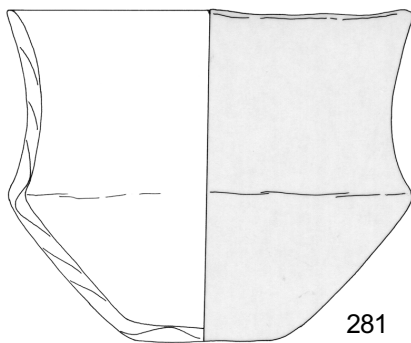


Gobelet réparé (T + A)



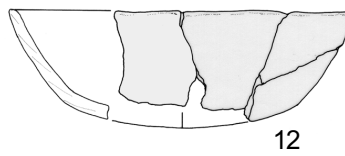
Cire d'abeille et graisse animale

Produits laitiers



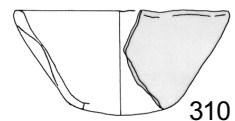
Gobelet (T)

Graisse sous cutanée de boeuf



Coupe (T)

Graisse indéterminée



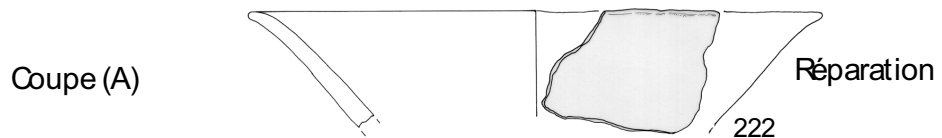
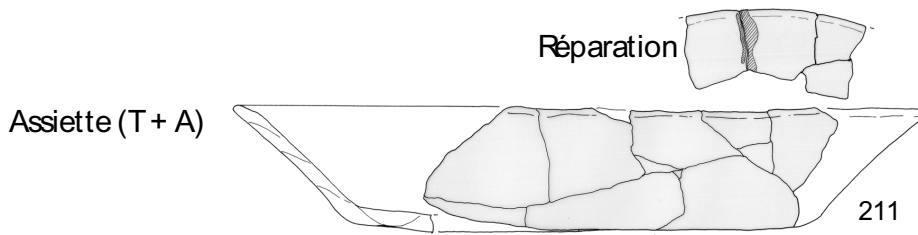
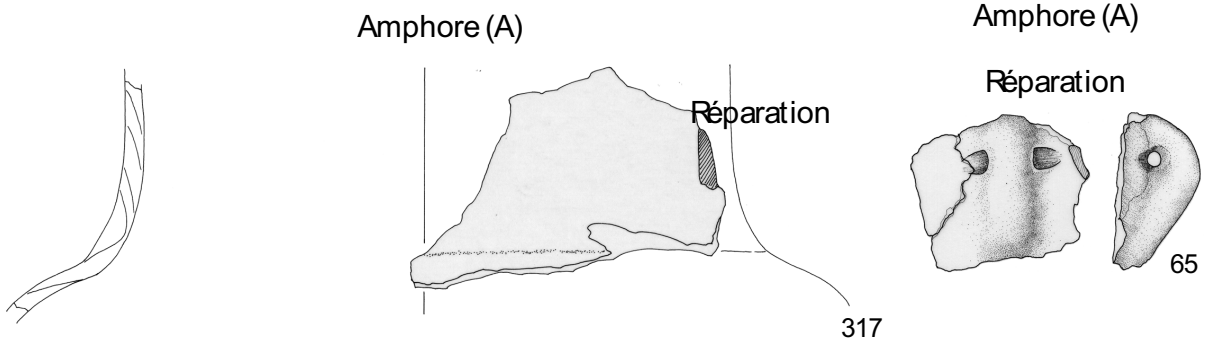
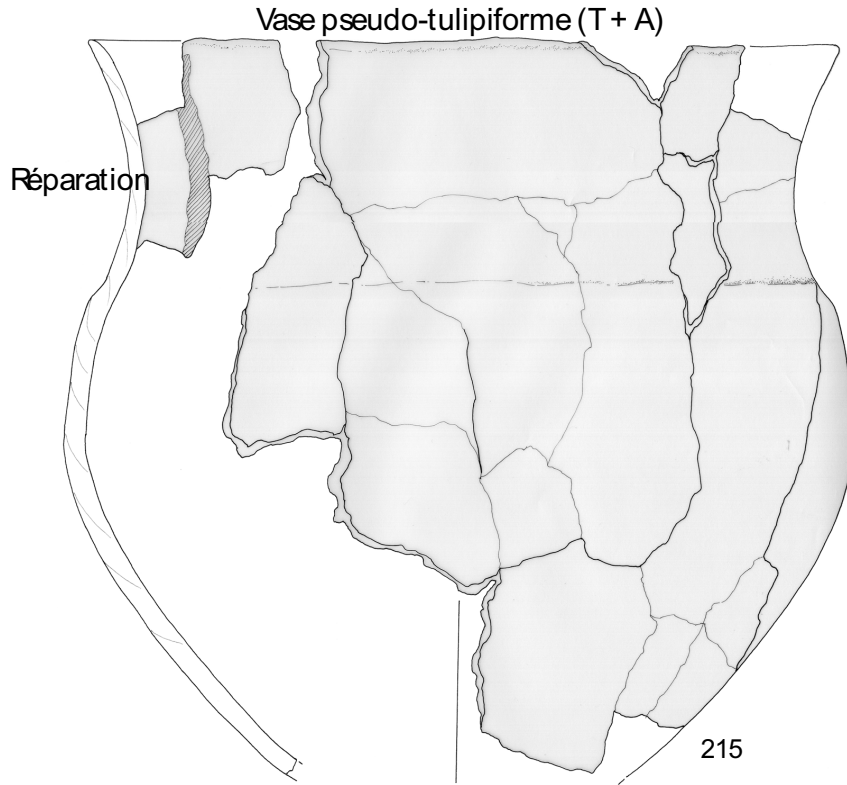
Coupe (T)

© Dessins A.M. et P. Pétrequin



Planche 12

Adhésifs



© Dessins A.M. et P. Pétrequin

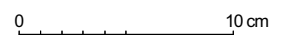
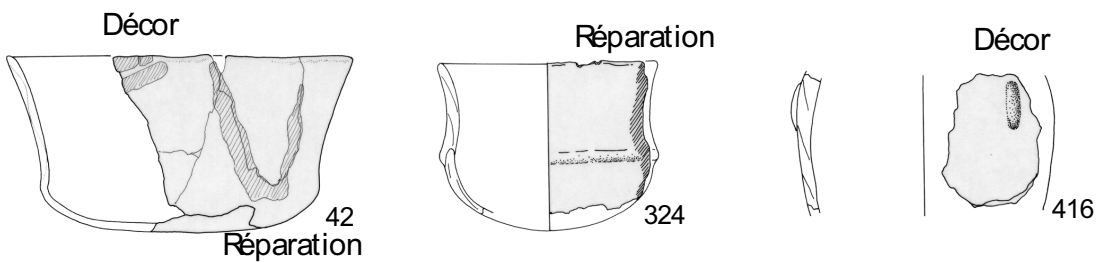
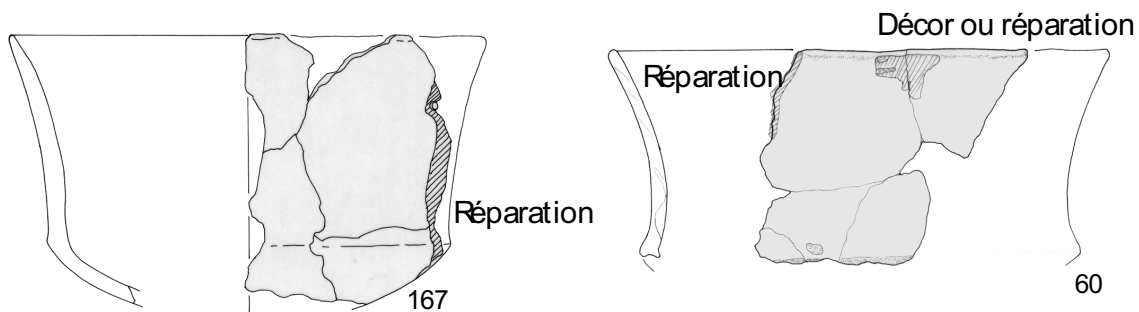
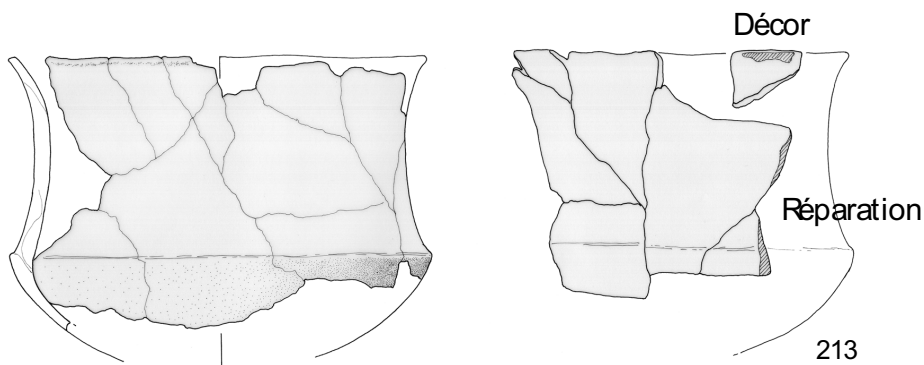


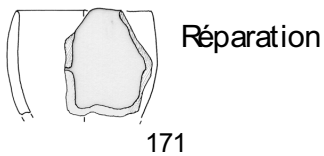
Planche 13 Adhésifs



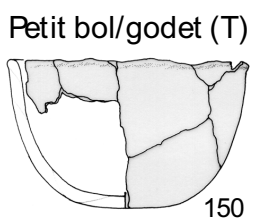
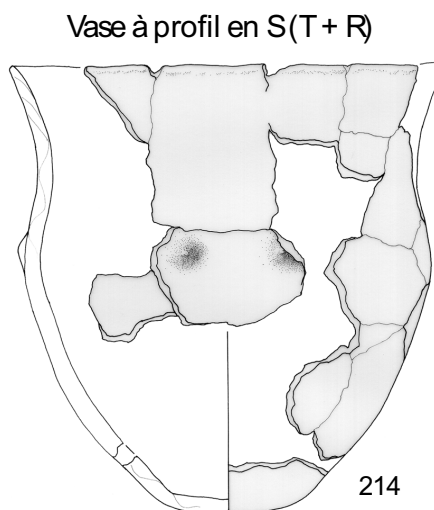
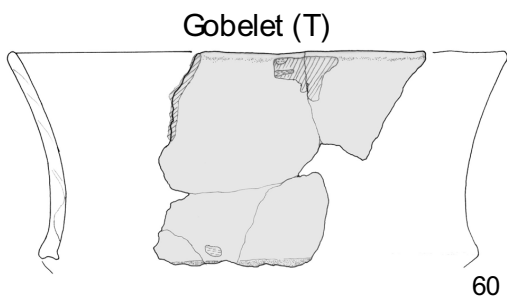
Gobelets



Petit bol / godet



Produits laitiers de bovins



Produits laitiers de caprinés

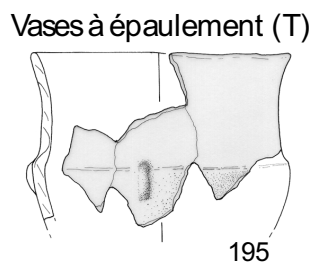
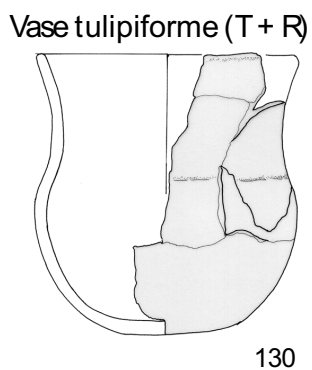
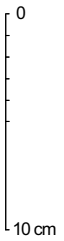
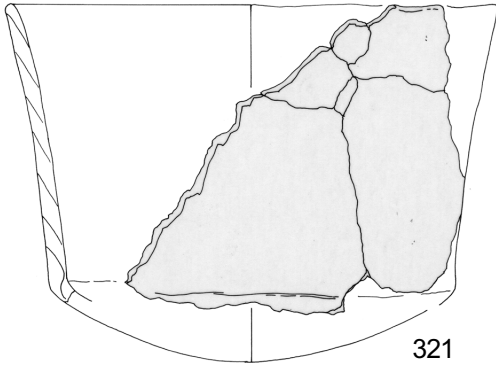


Planche 15
Produits laitiers
Espèce indéterminée

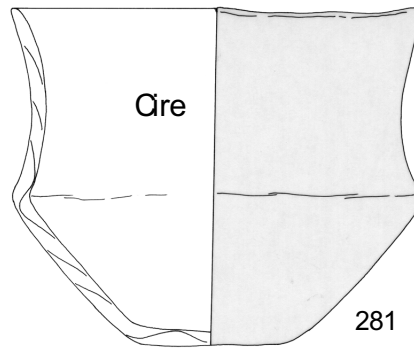


Gobelet (T + R)



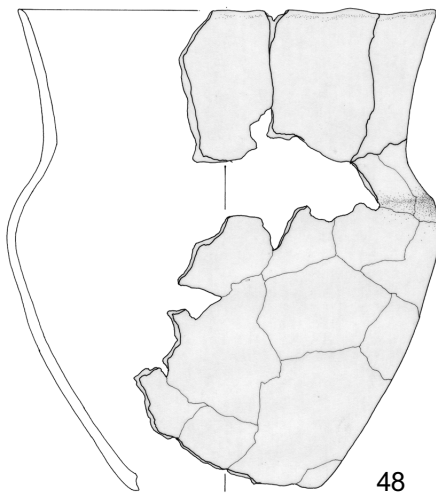
321

Gobelet (T)



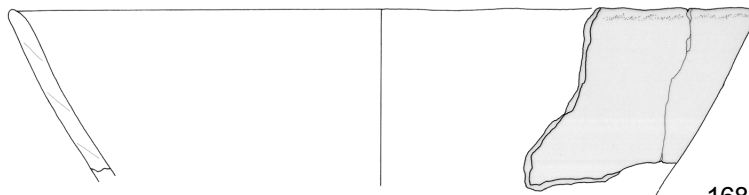
281

Vases à épaulement (T + R)



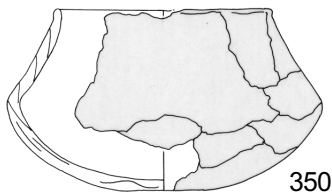
48

Coupe (T)



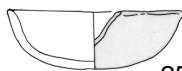
168

Marmite (T)



350

Petit bol/godet (T)



259

Petit bol/godet (T)



346

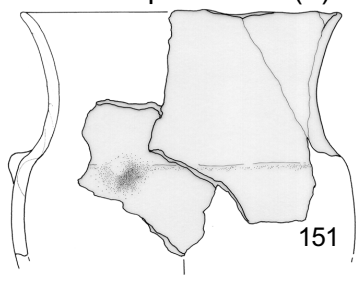


Planche 16

Graisse sous-cutanée

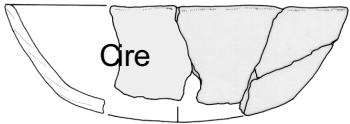


Vases à épaulement (T)



Boviné

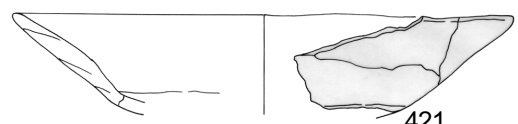
Coupe (T)



12

Oviné/capriné

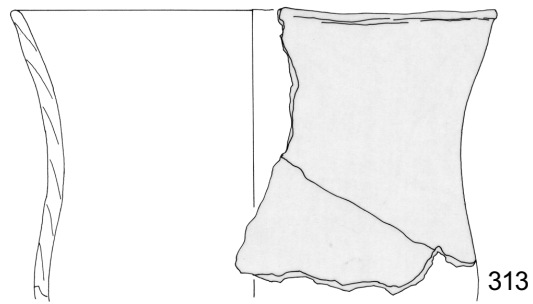
Coupe (T)



421

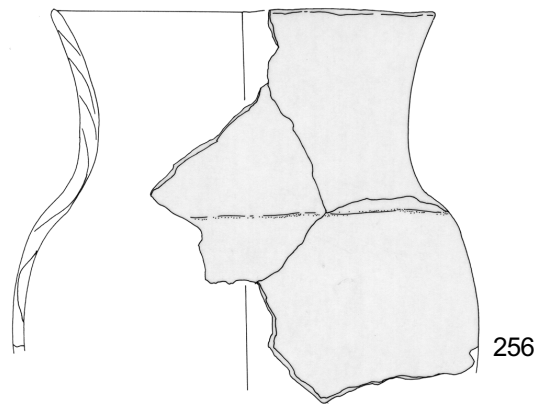
Graisse animale indéterminée

Vase à profil en S (T + R)



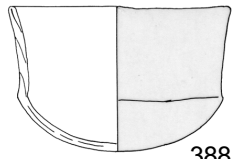
313

Vase pseudo-tulipiforme (T + R)

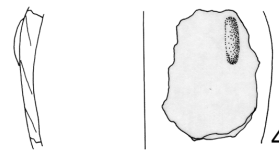


256

Gobelet (T)

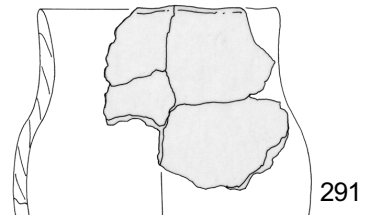


388



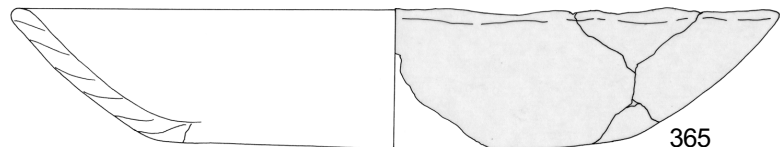
416

Vase à profil en S (T)



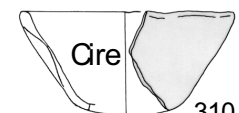
291

Assiette (T + R)



365

Coupe (T)



310

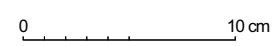
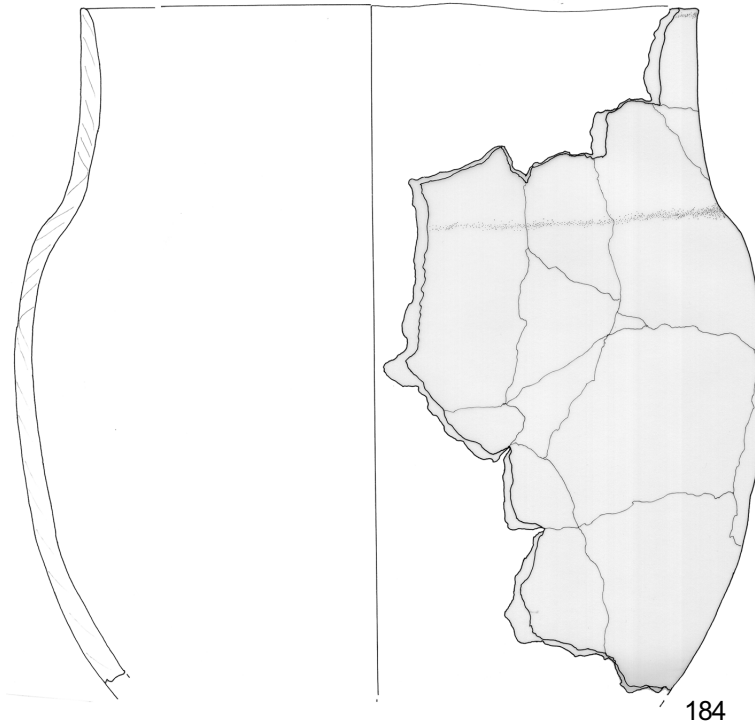


Planche 17

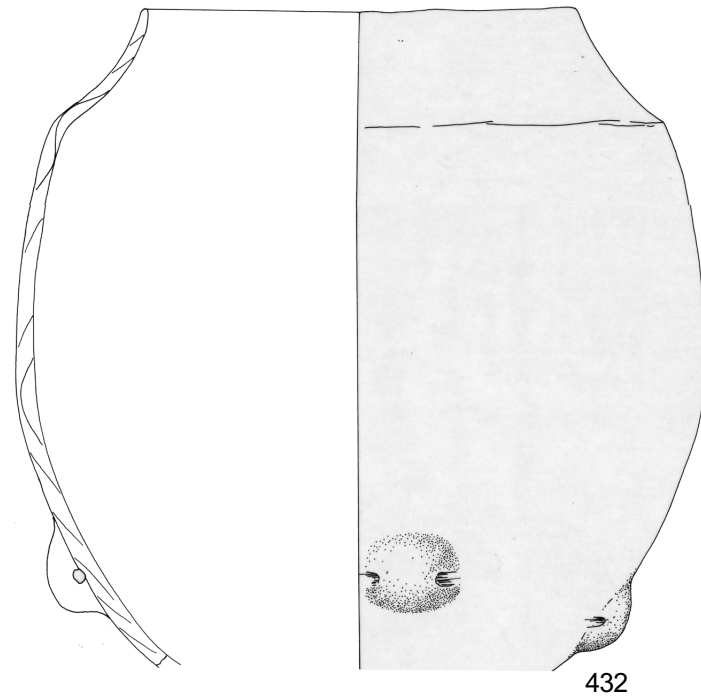
Graisse animale indéterminée



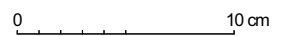
Vase à épaulement (T + R)



Amphore (T + R)



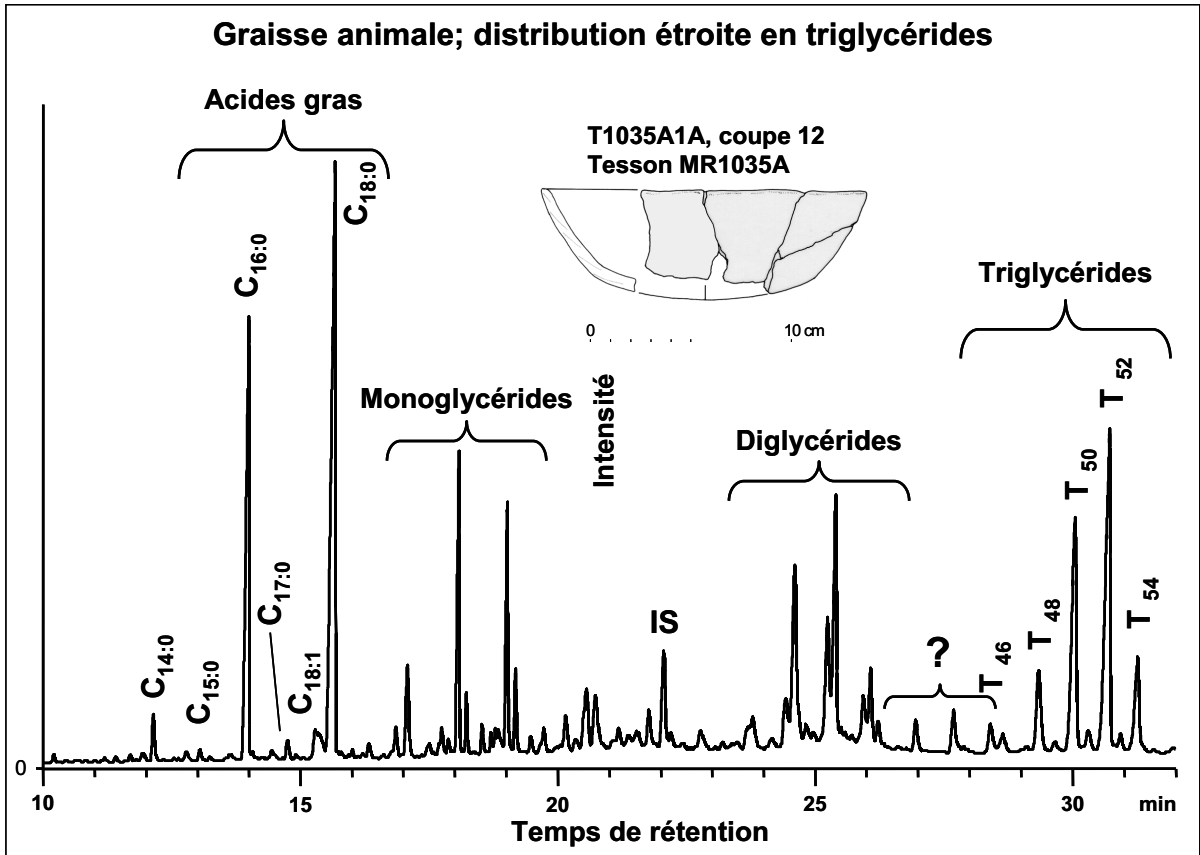
© Dessins A.M. et P. Pétrequin



Annexe 6

Chromatogrammes des échantillons analysés; Quantification

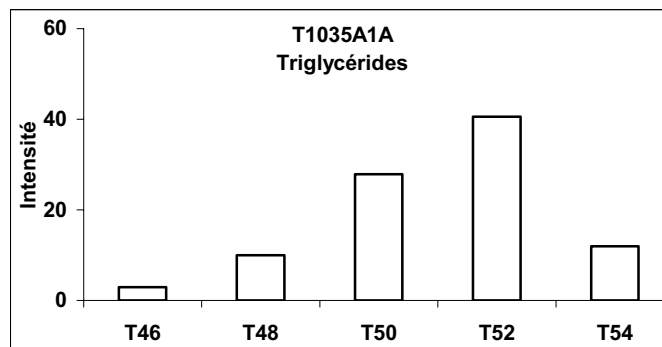
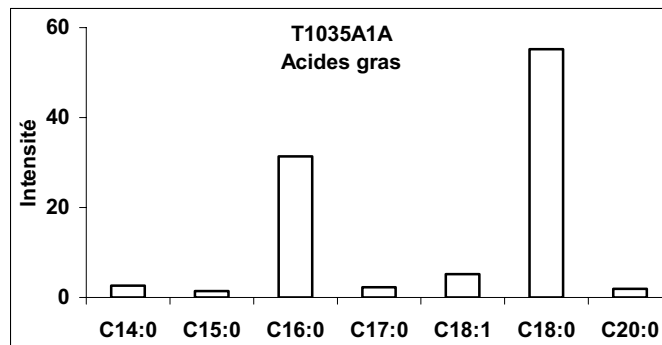
Coupe 12



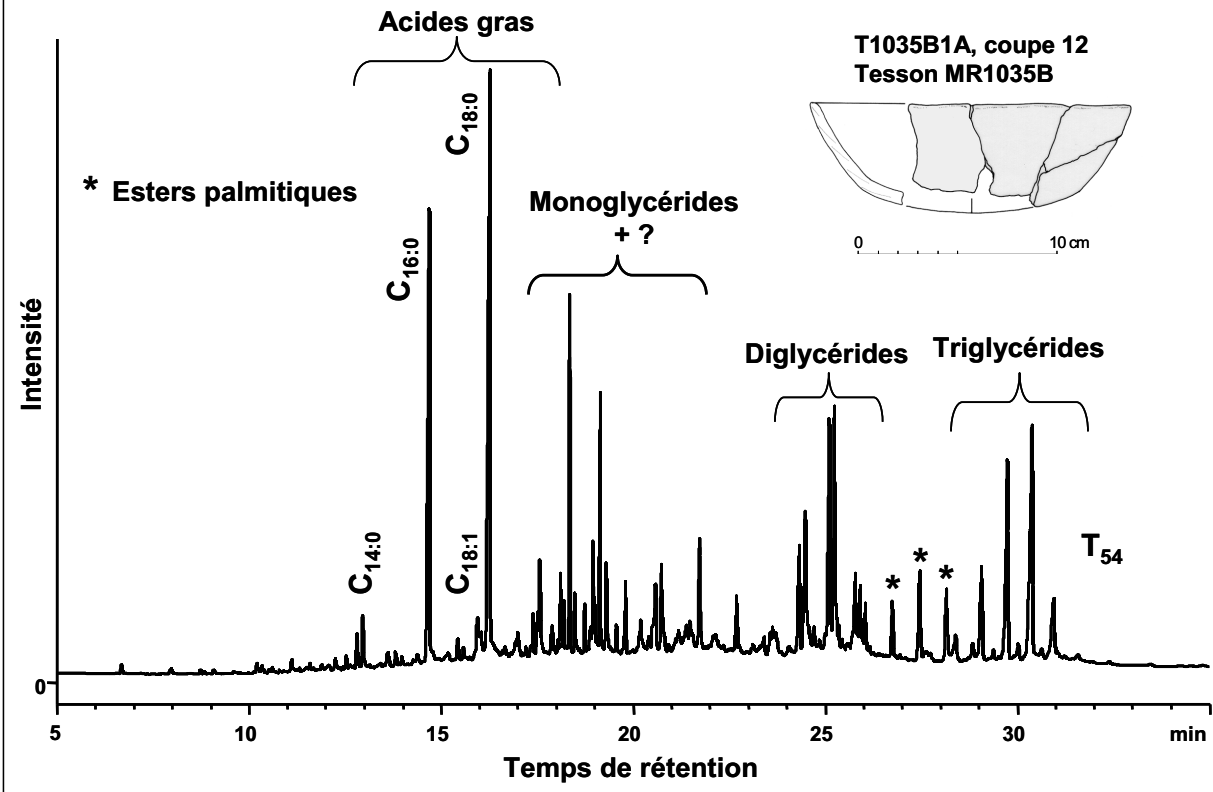
Coupe 12, tesson MR1035								
Chromatographie en phase gazeuse								
T1035A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm ID, 0.1 µm ep								
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
31941.026	688.856	3.9603	50.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

Composé	Aire	%
C14:0	236.385	2.62
C15:0	130.658	1.45
C16:0	2831.373	31.35
C17:0	206.132	2.28
C18:1	470.043	5.20
C18:0	4983.259	55.17
C20:0	174.718	1.93
total	9032.569	100.00
T46	230.2945	2.97
T48	776.381	10.02
T50	2161.343	27.89
T52	3143.797	40.56
T54	926.556	11.96
total	7750.277	93.39

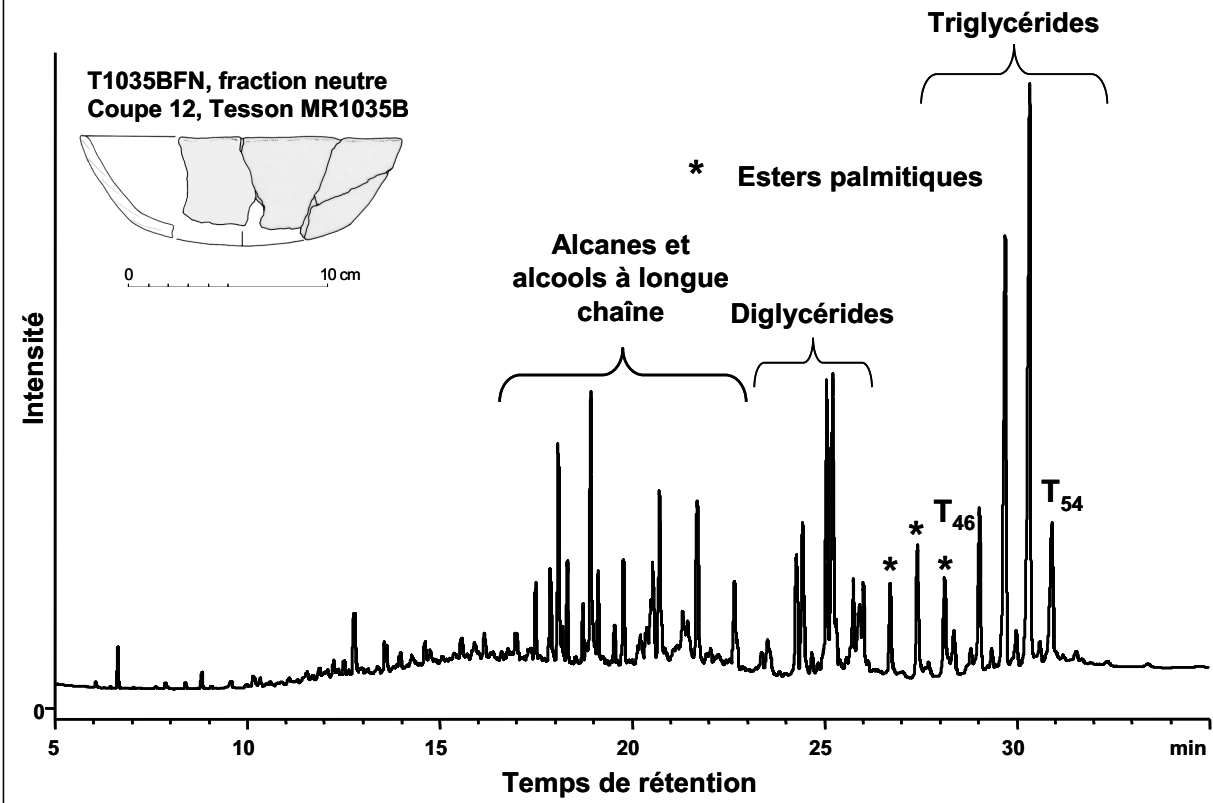
Concentration µg/g	234.17
C16/C18	0.57
% Acides gras	28.28
% Triglycérides	24.26
% Esters palmitiques	2.81



Graisse animale; distribution étroite en triglycérides et cire d'abeille



Graisse animale; distribution étroite en triglycérides et cire d'abeille



Spectrométrie de masse, nanoESI Q-q-TOF MS/MS
T1035BFN, fraction neutre
Graisse sous-cutanée de boviné

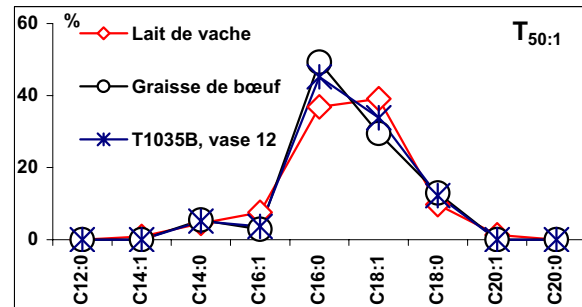
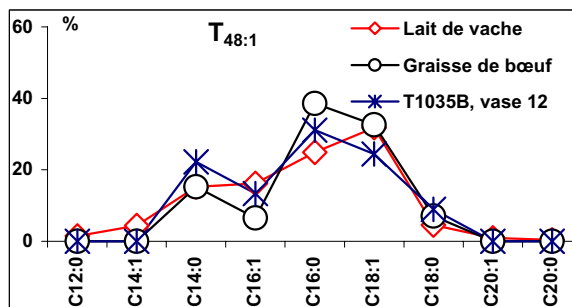
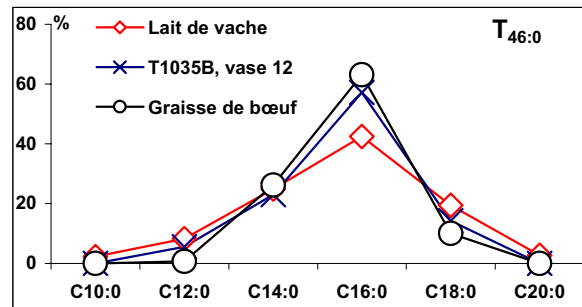
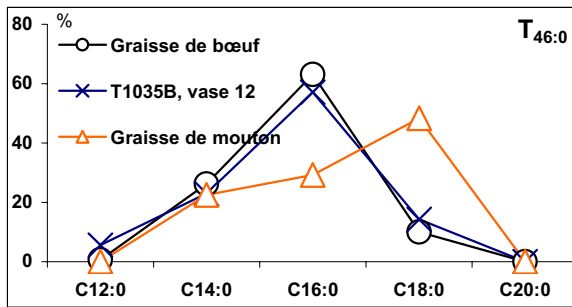
Triglycérides détectés

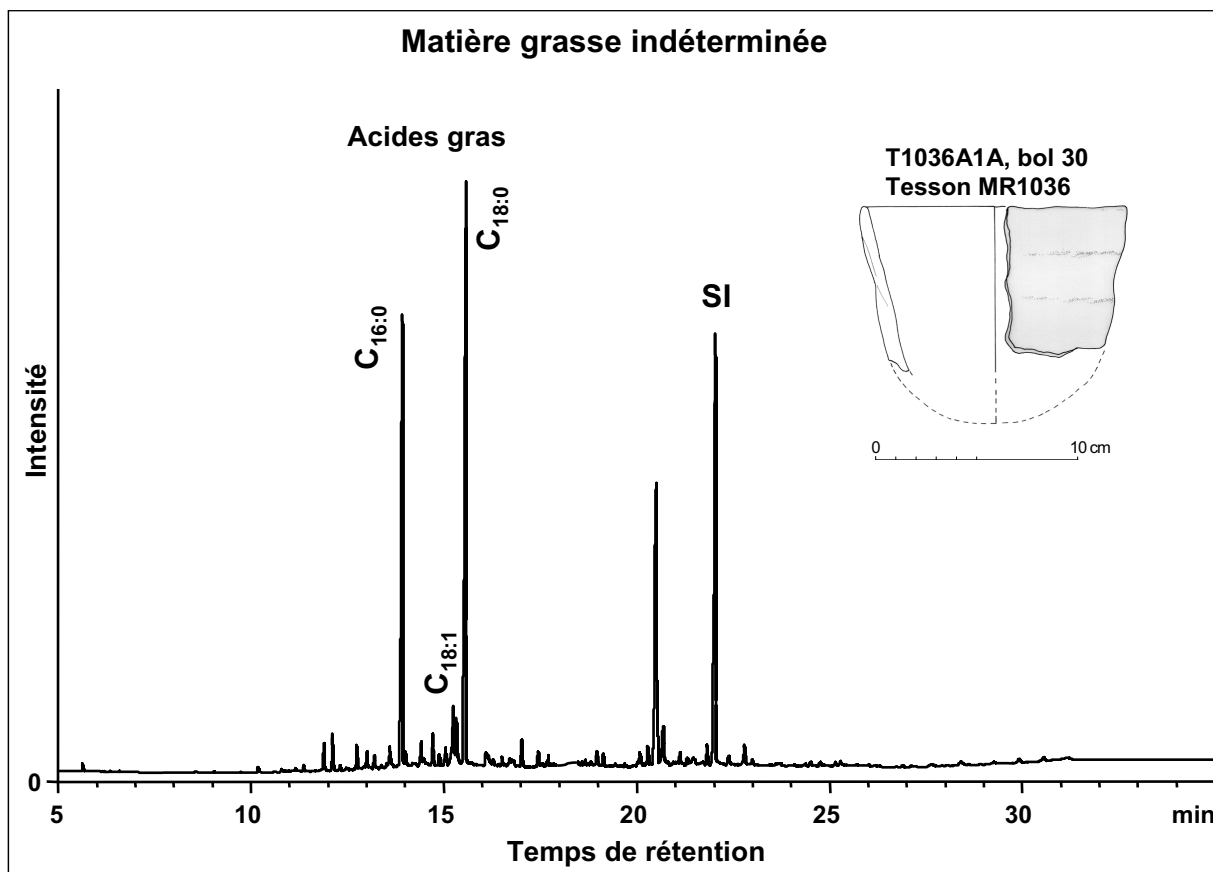
T_{48:1}-T_{54:1}

T_{46:0}-T_{54:0}

T1035B	C12:0Li	C14:0Li	C16:0Li	C18:0Li	C20:0Li
T46:0	5.56	23.01	57.14	14.29	0.00
T48:0	1.06	11.84	67.65	19.45	0.00
T50:0		2.86	53.66	43.48	0.00
T52:0			24.41	75.59	0.00
T54:0			6.06	82.83	11.11

T1035B	C14:0Li	C16:1Li	C16:0Li	C18:1Li	C18:0Li	C20:0Li
T48:1	22.19	13.34	31.11	24.44	8.92	0.00
T50:1	5.12	3.70	45.17	33.81	12.22	0.00
T52:1		1.24	25.10	34.65	39.00	0.00
T54:1			4.05	29.48	62.43	4.05



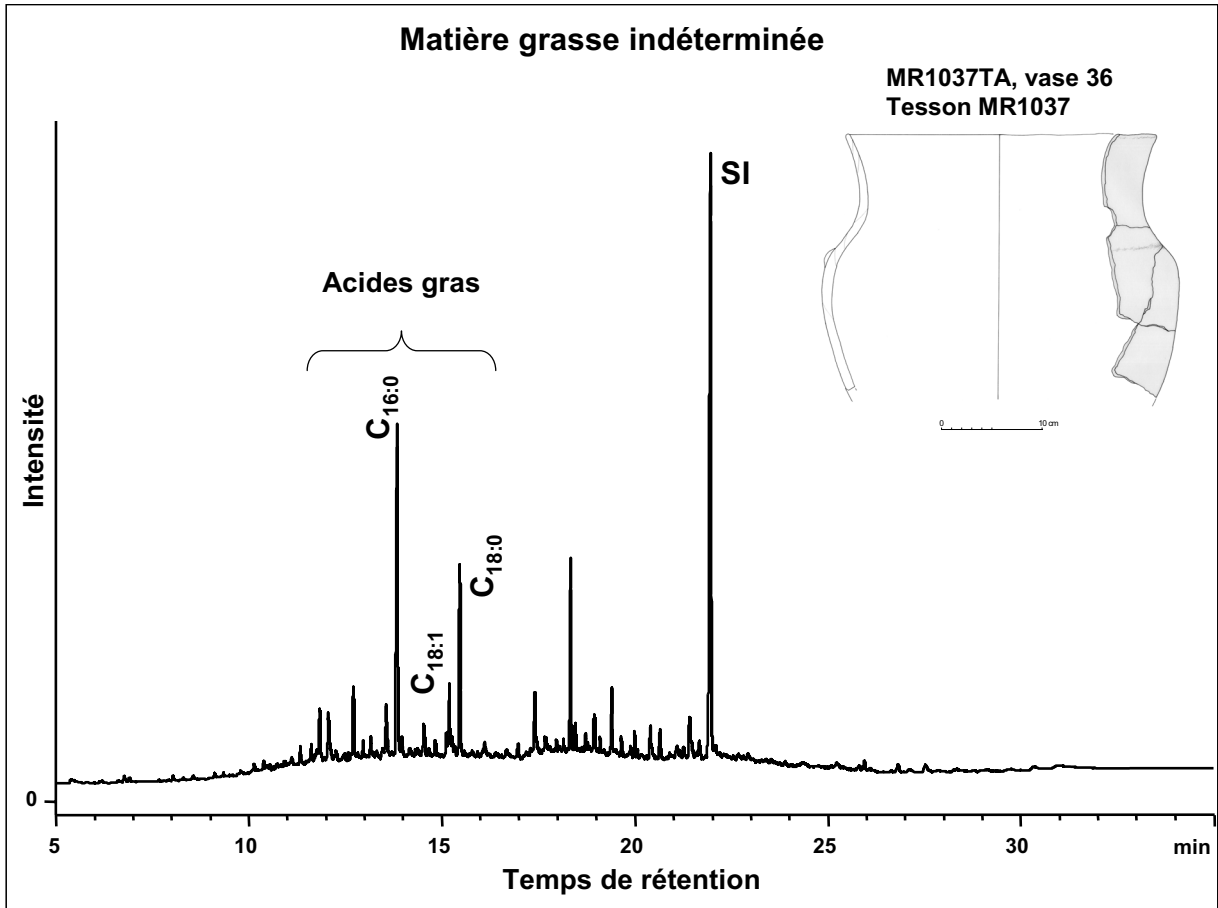


Bol 30, tesson MR1036								
Chromatographie en phase gazeuse								
T1036A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm ID, 0.1 µm ep								
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
4592.460	1026.005	2505.2	50.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

Composé	Aire	%
C16:0	842.157	36.35
C18:1	240.825	10.39
C18:0	1234.016	53.26
total	2316.997	100.000

Concentration µg/g	0.04
C16/C18	0.68
% Acides gras	50.45

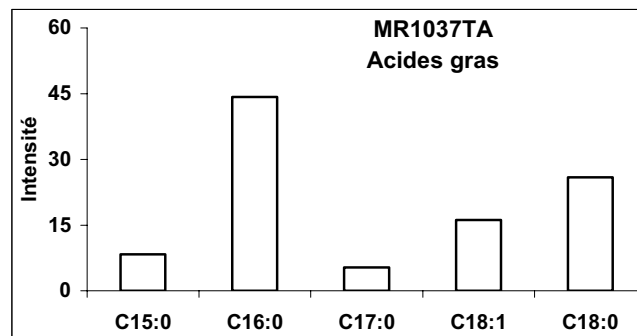
Vase 36



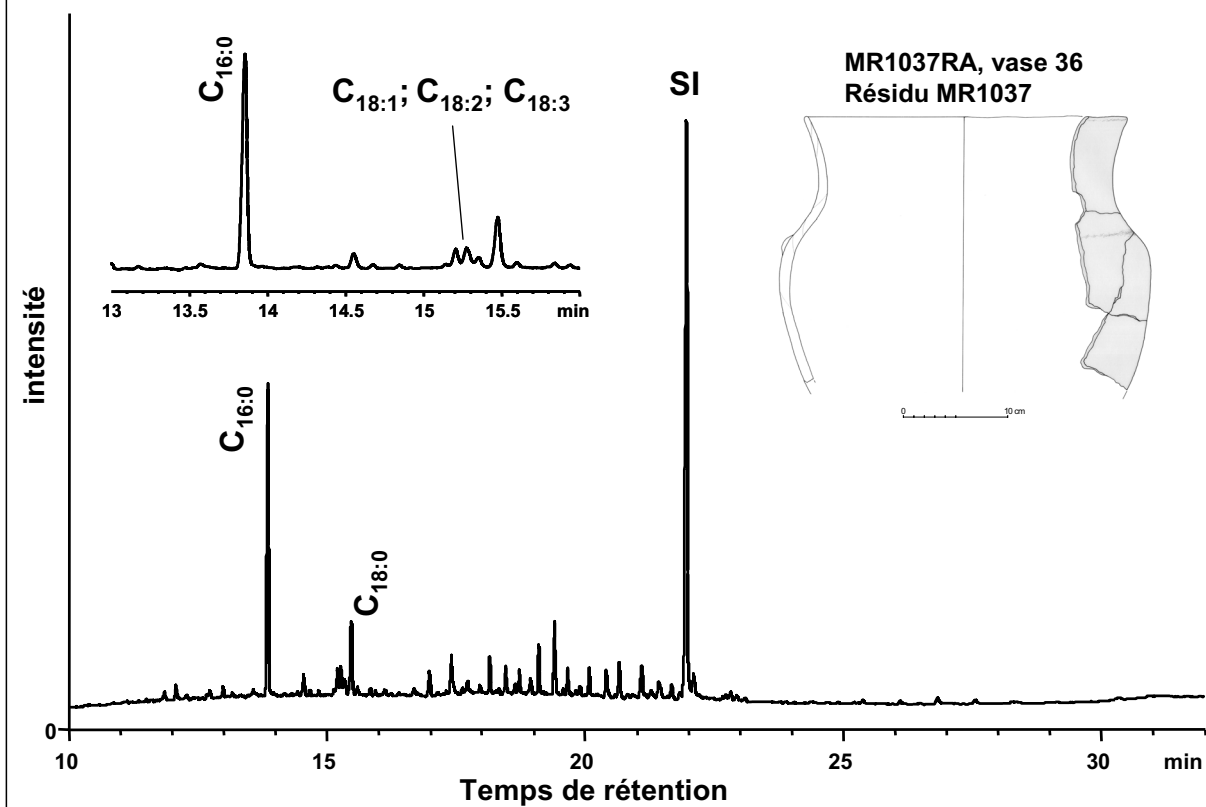
Vase à épaulement 36, tesson MR1037									
Chromatographie en phase gazeuse									
MR1037TA, CP Sil-5C, 15 m, 0.32 mm ID, 0.1 μm ep									
Aire totale	Aire standard	masse tesson g	volume final μL	Concentration SI mg/mL	volume SI μL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE μL	Vprél μl	
1183.466	494.746	4.0000	80.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00	

Composé	Aire	%
C15:0	38.265	8.33
C16:0	203.499	44.29
C17:0	24.379	5.31
C18:1	74.451	16.20
C18:0	118.870	25.87
total	459.464	100.000

Concentration μg/g	11.96
C16/C18	1.71
% Acides gras	38.82



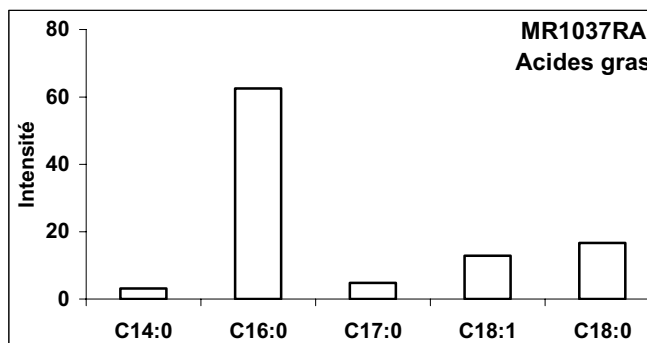
Matière grasse végétale



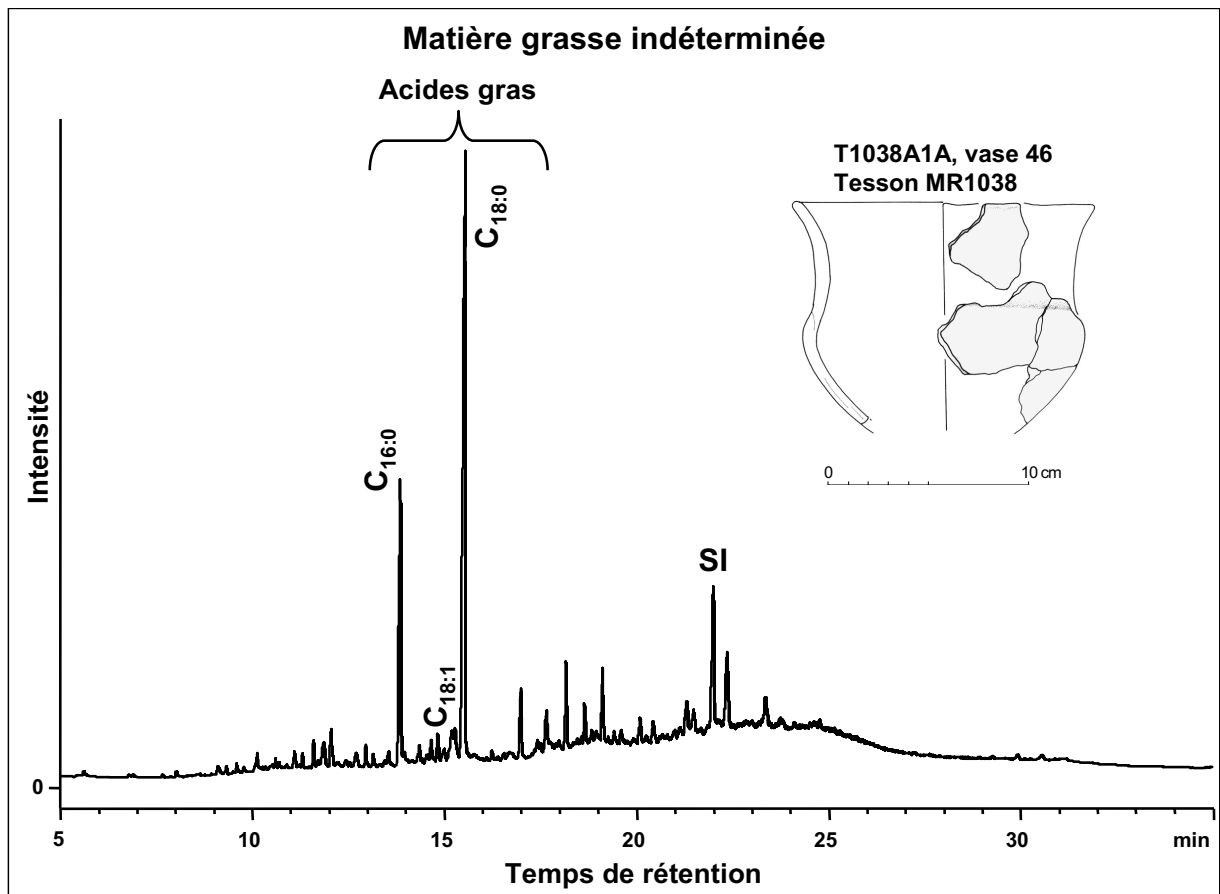
Vase à épaulement 36, résidu MR1037									
Chromatographie en phase gazeuse									
MR1037RA, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm ID, 0.1 µm ep									
Aire totale	Aire standard	masse résidu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mg	VTLE µL	Vprél µl	
774.261	502.843	0.1351	80.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00	

Composé	Aire	%
C14:0	9.804	3.13
C16:0	195.830	62.49
C17:0	15.233	4.86
C18:1	40.299	12.86
C18:0	52.202	16.66
total	313.368	100.000

Concentration µg/g	227.94
C16/C18	3.75
% Acides gras	40.47



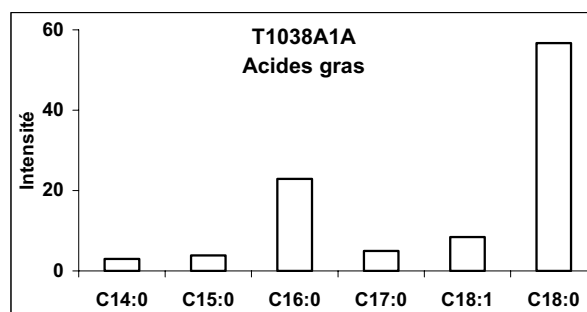
Vase 46



Vase à épaulement 46, tesson MR1038								
Chromatographie en phase gazeuse								
T1038A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm ID, 0.1 µm ep								
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
6025.256	502.618	2.1787	80.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

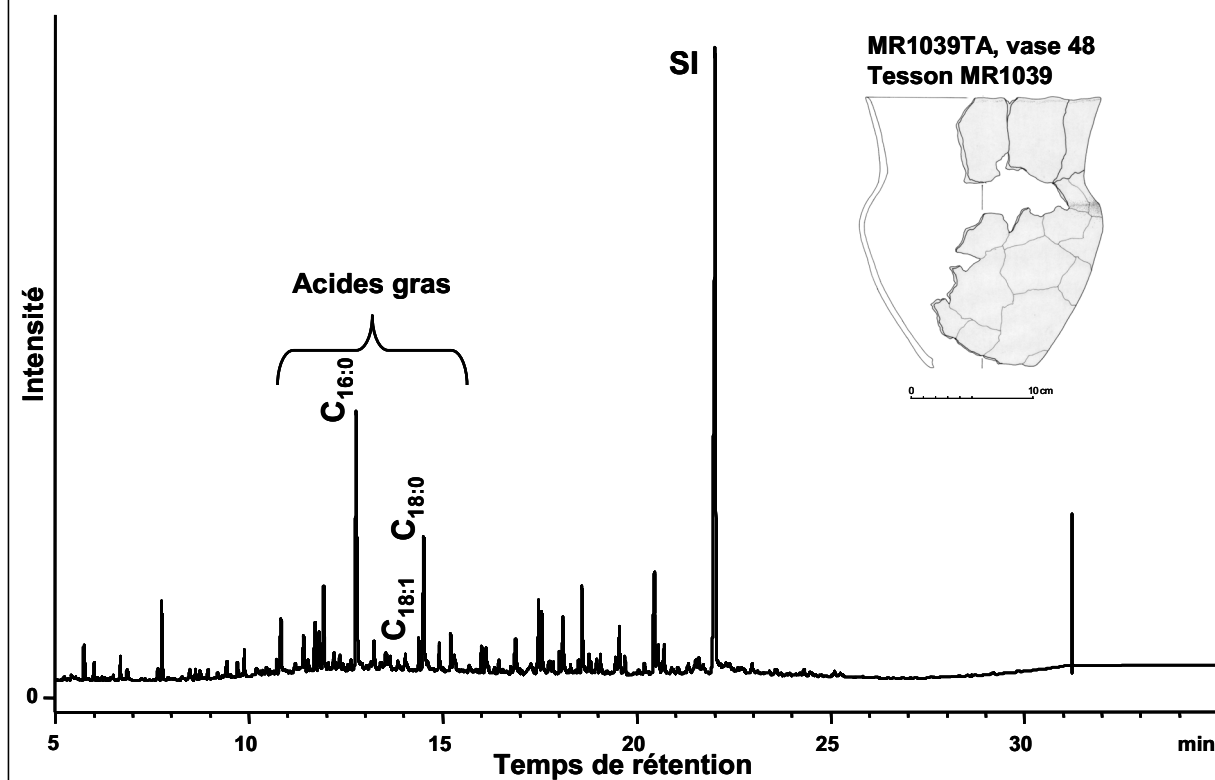
Composé	Aire	%
C14:0	110.164	3.03
C15:0	140.367	3.86
C16:0	835.667	22.96
C17:0	182.692	5.02
C18:1	306.038	8.41
C18:0	2064.532	56.73
total	3639.461	100.000

Concentration µg/g	110.04
C16/C18	0.40
% Acides gras	60.40



Vase 48

Graisse animale indéterminée

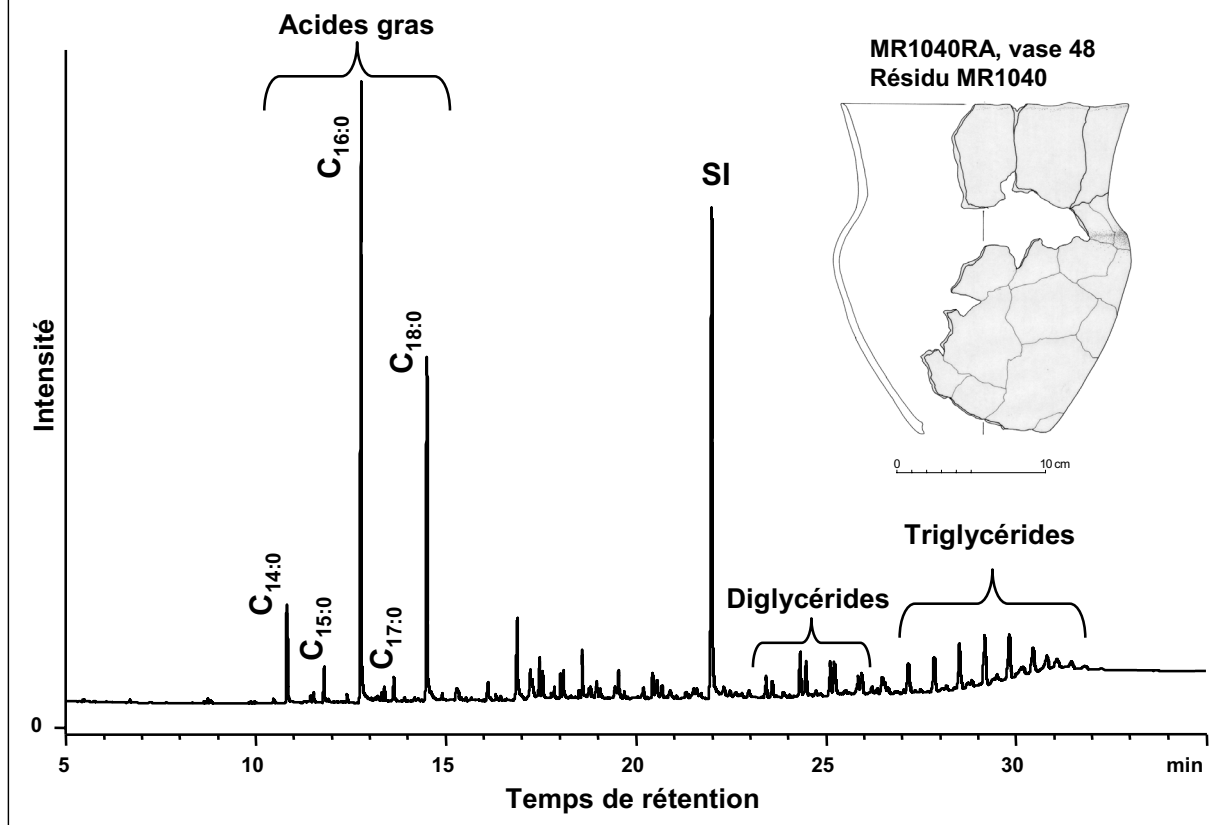


Vase à épaulement 48, tesson MR1039								
Chromatographie en phase gazeuse								
MR1039TA, CP SiI-5CB, 15 m, 0.32 mm ID, 0.1 µm ep								
Aire totale	Aire standard	masse tesson g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
2422.877	978.319	2.6456	30.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

Composé	Aire	%
C16:0	358.357	70.46
C18:0	150.243	29.54
total	508.600	100.000

Concentration µg/g	18.72
C16/C18	2.39
% Acides gras	20.99

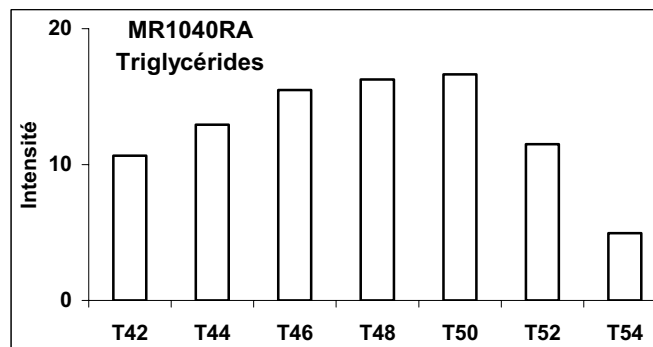
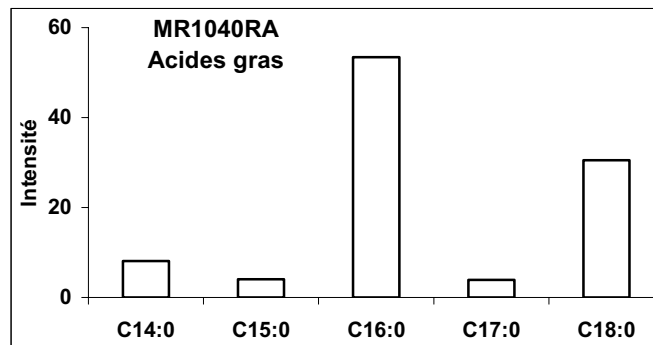
Produits laitiers; distribution large de triglycérides

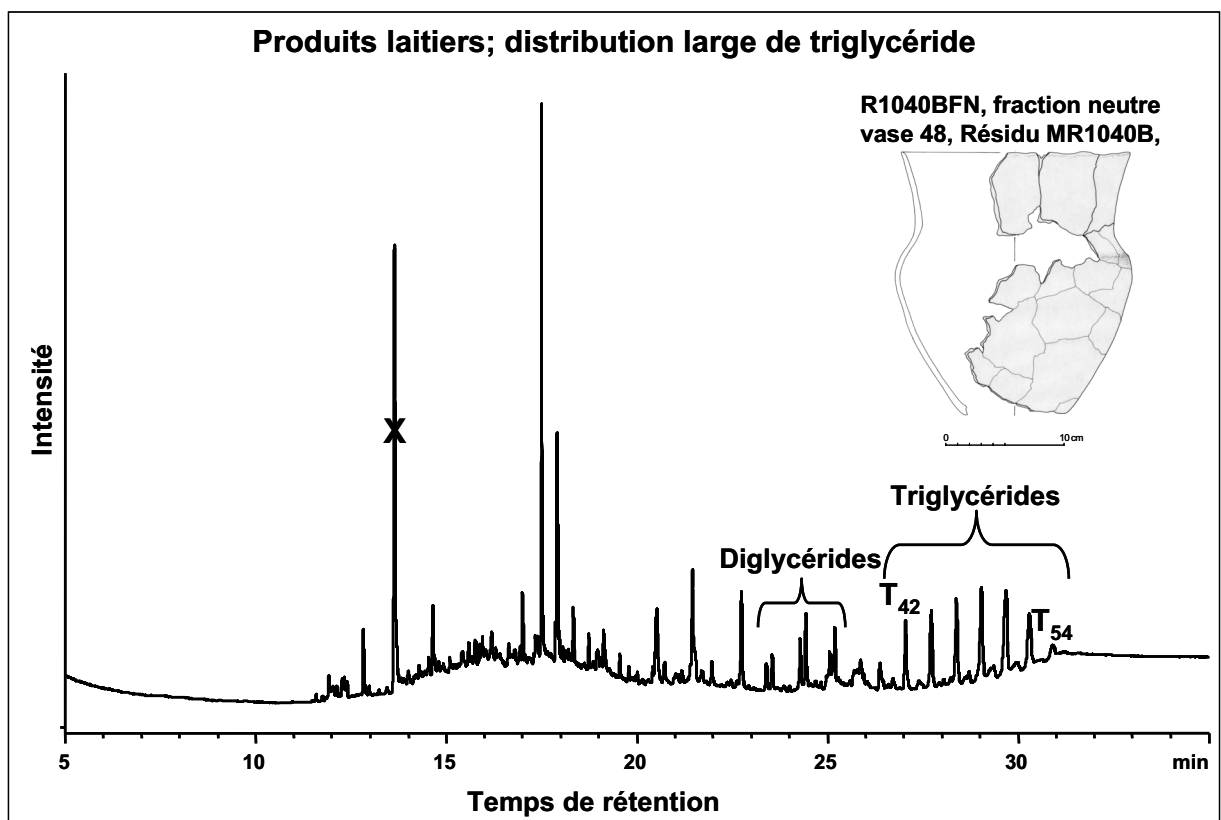
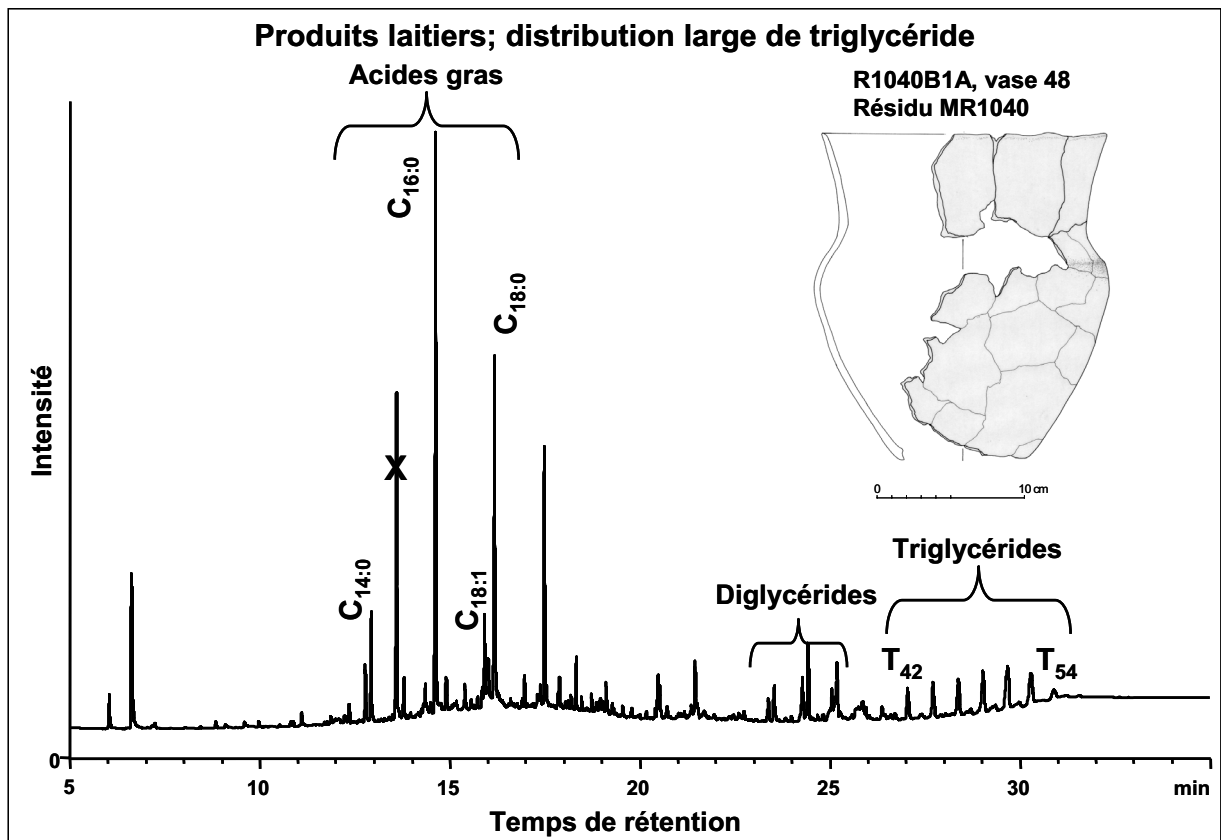


Vase à épaulement 48, résidu MR1040								
Chromatographie en phase gazeuse								
MR1040RA, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm ID, 0.1 µm ep								
Aire totale	Aire standard	masse résidu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
1611.113	374.069	0.0612	100.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

Composé	Aire	%
C14:0	53.221	8.12
C15:0	26.599	4.06
C16:0	349.993	53.37
C17:0	25.801	3.93
C18:0	200.174	30.52
total	655.788	100.000
T42	31.890	10.66
T44	38.690	12.94
T46	46.333	15.49
T48	48.659	16.27
T50	49.764	16.64
T52	34.402	11.50
T54	14.802	4.95
total	299.049	88.461

Concentration µg/g	1407.51
C16/C18	1.75
% Acides gras	40.70
% Triglycérides	18.56





Spectrométrie de masse, nanoESI Q-q-TOF MS/MS
R1040BFN, fraction neutre
Produits laitiers

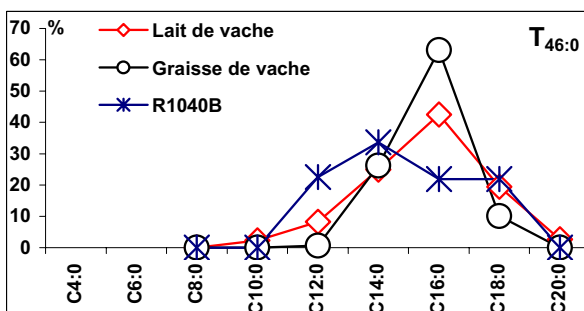
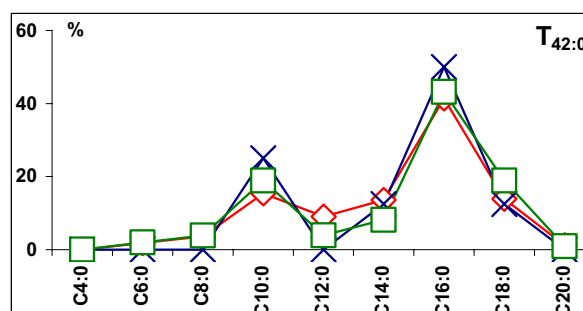
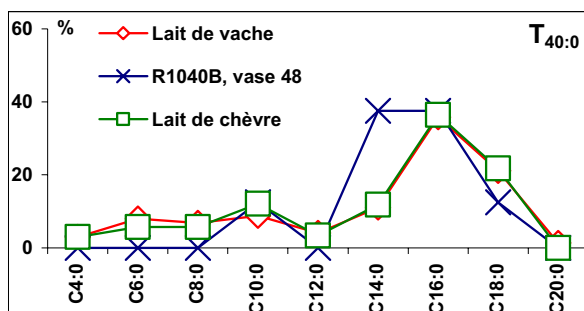
Triglycérides détectés

T_{40:0}-T_{50:0}

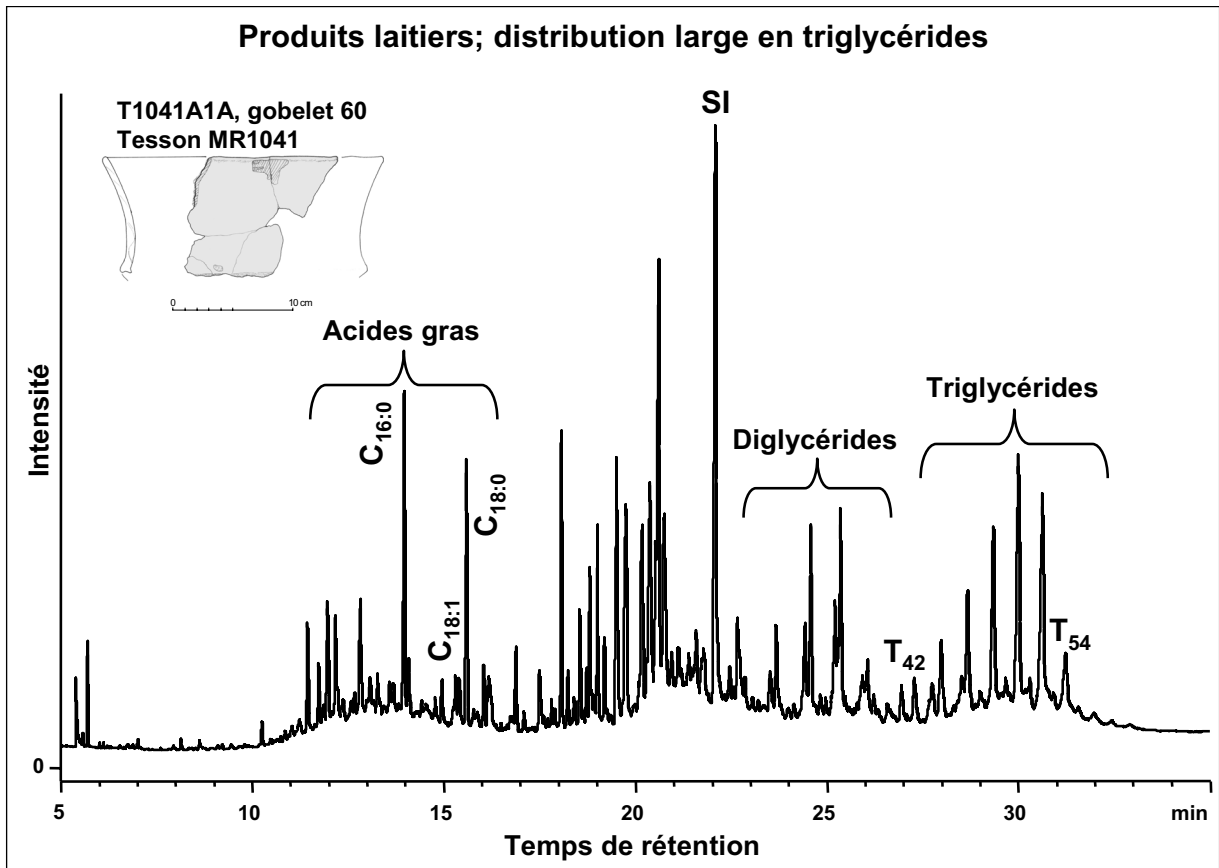
T_{46:1}-T_{52:1}

R1040BFN	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0
T40:0	12.47	0.00	37.53	37.53	12.47
T42:0	25.02	0.00	12.47	50.04	12.47
T44:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T46:0	0.00	22.51	33.67	21.91	21.91
T48:0	0.00	0.00	20.44	50.00	29.56
T50:0	0.00	0.00	8.87	55.64	35.49

R1040BFN	C10:0	C12:0	C14:1	C14:0	C16:1	C16:0	C18:1	C18:0
T46:1	5.82	11.05	2.32	19.77	6.39	19.18	26.16	9.30
T48:1	0.00	0.00	0.00	36.35	0.00	27.30	36.35	0.00
T50:1	0.00	0.00	0.00	10.51	0.00	36.85	34.21	18.43
T52:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	25.51	36.18	38.31



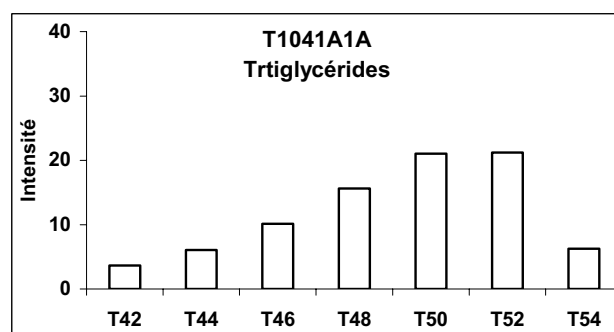
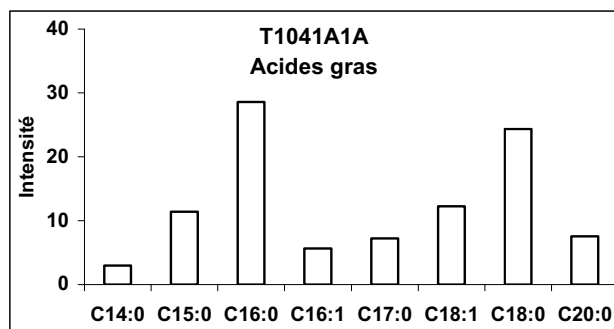
Gobelet 60



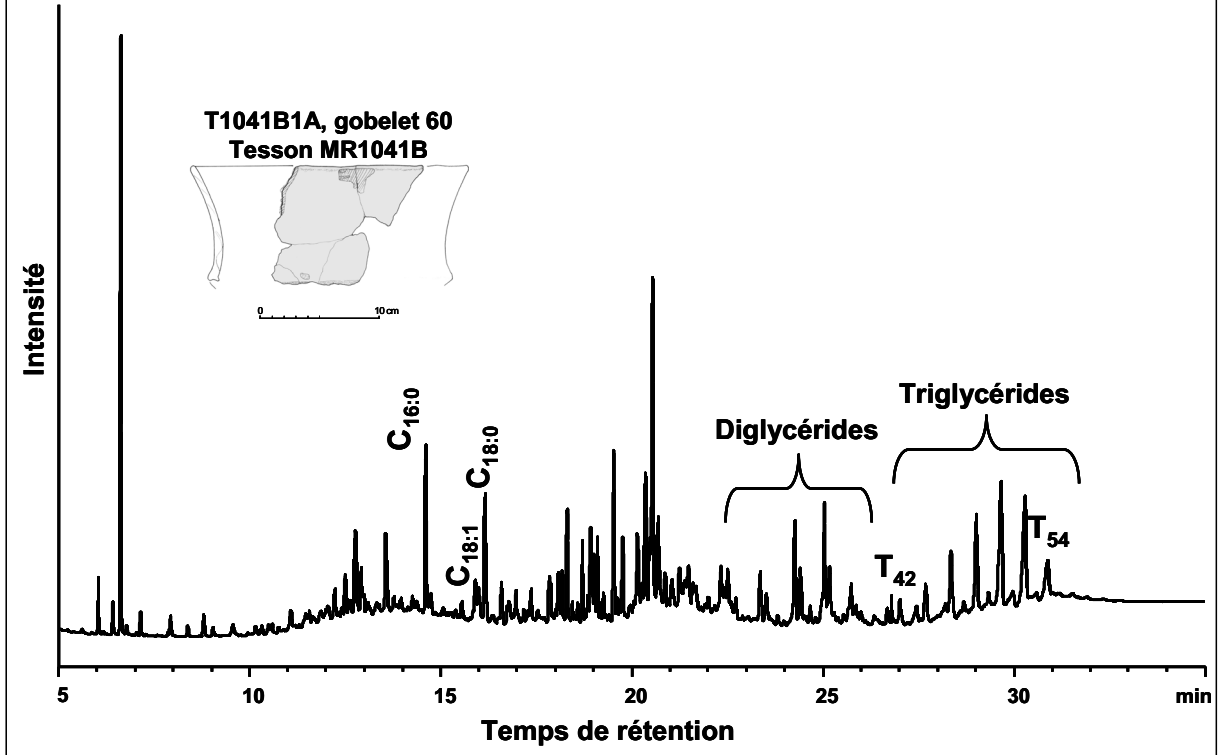
Gobelet 60, tesson MR1041								
Chromatographie en phase gazeuse								
T1041A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm ID, 0.1 µm ep								
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mg	VTLE µL	Vprél µl
12029.166	988.084	1.9359	50.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

Composé	Aire	%
C14:0	40.149	2.94
C15:0	156.074	11.43
C16:0	390.752	28.60
C16:1	76.683	5.61
C17:0	98.862	7.24
C18:1	167.451	12.26
C18:0	332.937	24.37
C20:0	103.128	7.55
total	1366.037	100.000
T42	101.818	3.65
T44	169.285	6.07
T46	281.956	10.11
T48	435.497	15.61
T50	586.812	21.04
T52	591.456	21.21
T54	174.384	6.25
total	2789.222	83.938

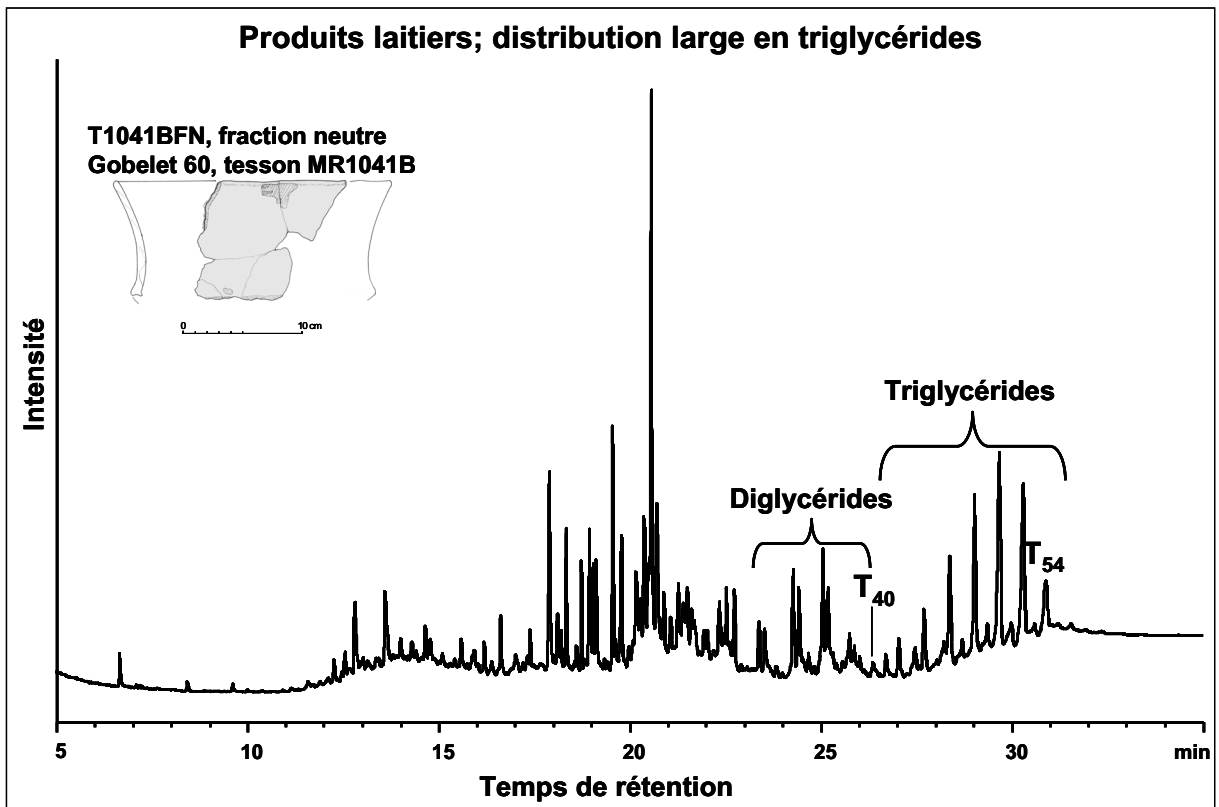
Concentration µg/g	125.77
C16/C18	1.17
% Acides gras	11.36
% Triglycérides	23.19



Produits laitiers; distribution large en triglycérides



Produits laitiers; distribution large en triglycérides



Spectrométrie de masse
T1041BFN, fraction neutre
Produits laitiers de bovins

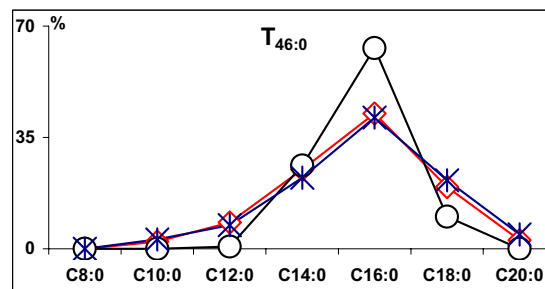
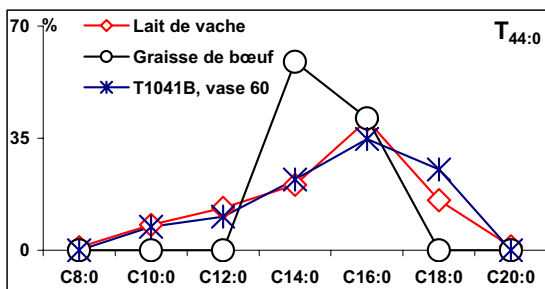
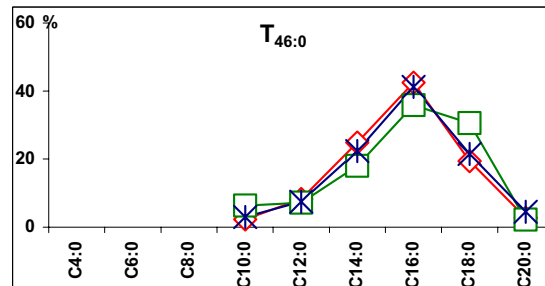
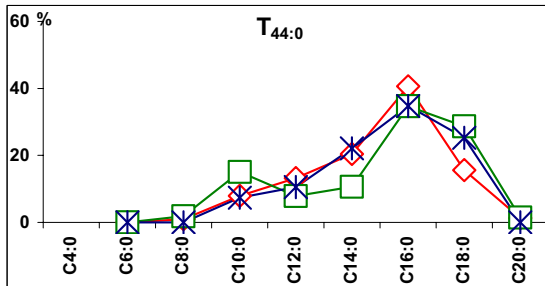
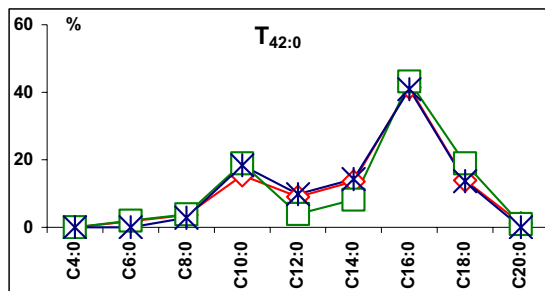
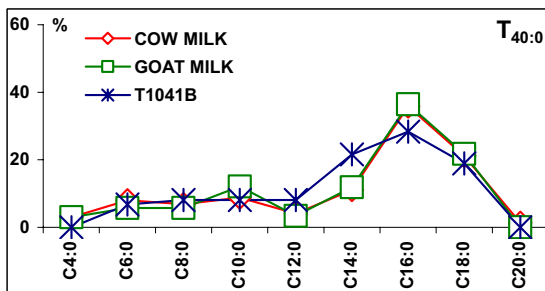
Triglycérides détectés

T_{38:0}-T_{54:0}

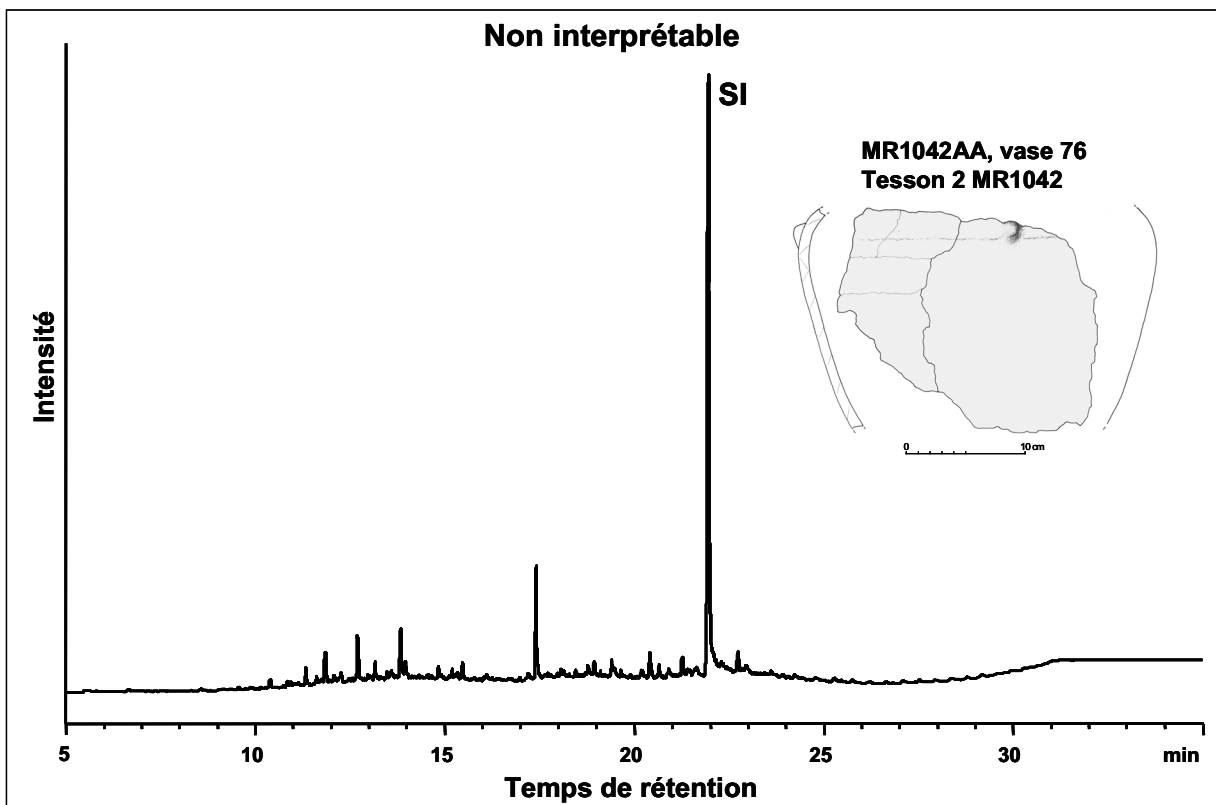
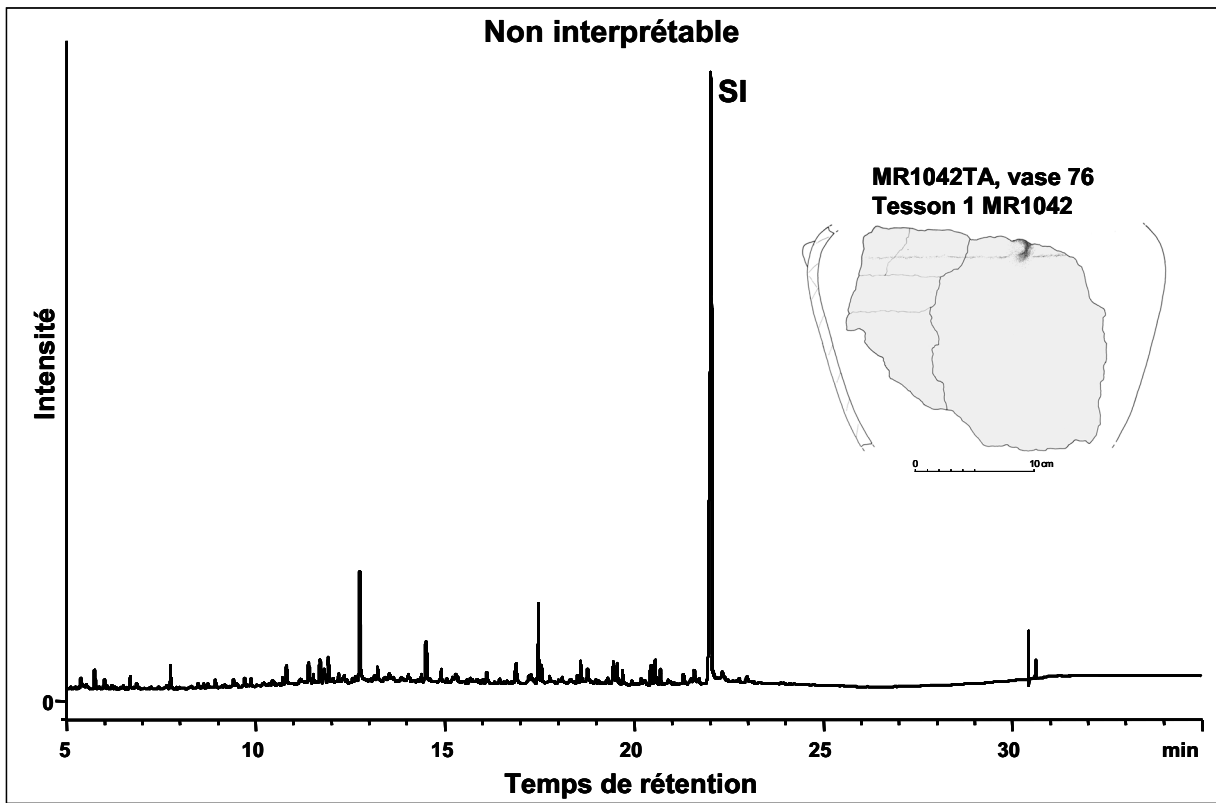
T_{48:1}-T_{54:1}

T1041B	C4:0Li	C6:0Li	C8:0Li	C10:0Li	C12:0Li	C14:0Li	C16:0Li	C18:0Li	C20:0Li
T38:0	10.51						15.81	47.35	26.33
T40:0		6.75	8.11	8.11	8.11	21.63	28.38	18.92	
T42:0			2.86	18.41	9.84	14.29	40.95	13.65	
T44:0				7.36	10.53	22.11	34.74	25.26	
T46:0				2.95	7.45	22.36	41.25	21.49	4.51
T48:0						20.67	44.82	34.51	
T50:0						9.38	43.75	40.63	6.25
T52:0							20.00	65.00	15.00
T54:0							11.56	53.84	34.60

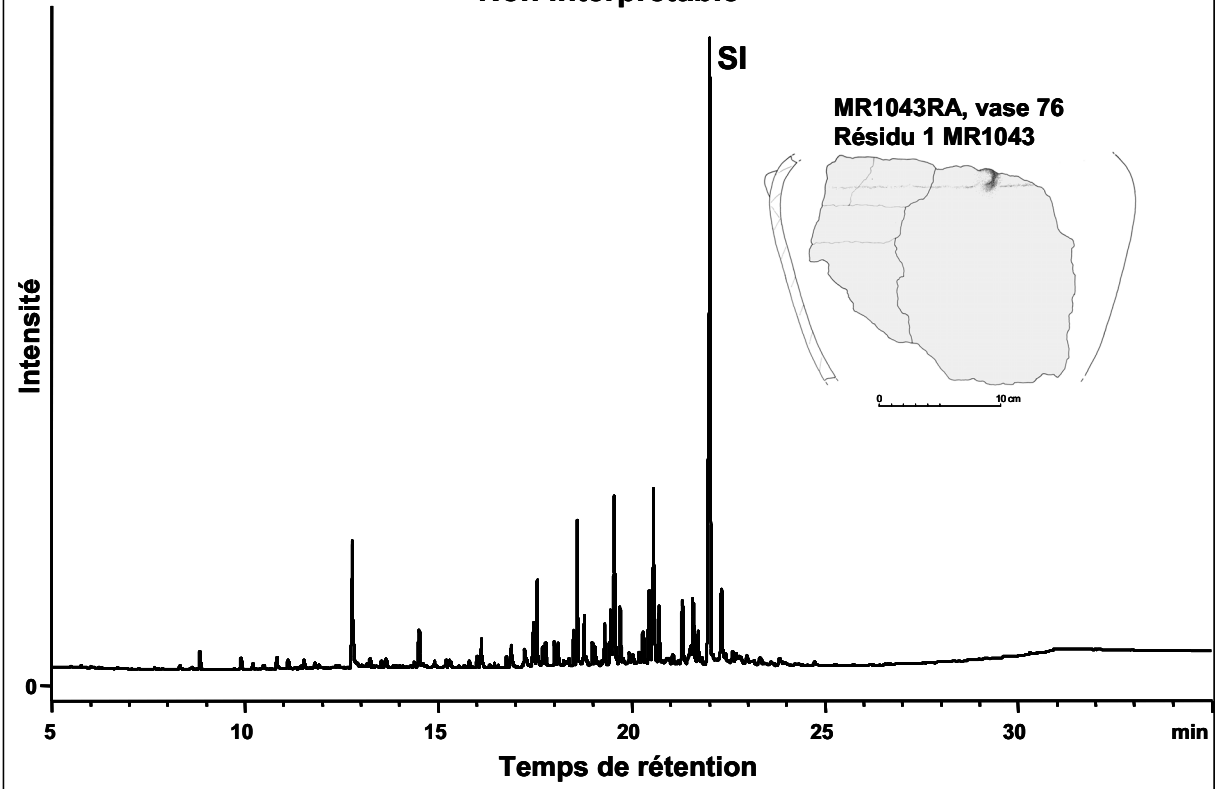
T1041B	C14:0Li	C15:0Li	C16:1Li	C16:0Li	C17:0Li	C18:1Li	C18:0Li
T48:1	21.75	0.00	0.00	34.74	0.00	43.51	0.00
T50:1	5.77	1.28	3.85	38.46	1.28	34.62	14.75
T52:1			0.00	24.98	0.00	40.02	35.00
T54:1					0.00	45.41	54.59



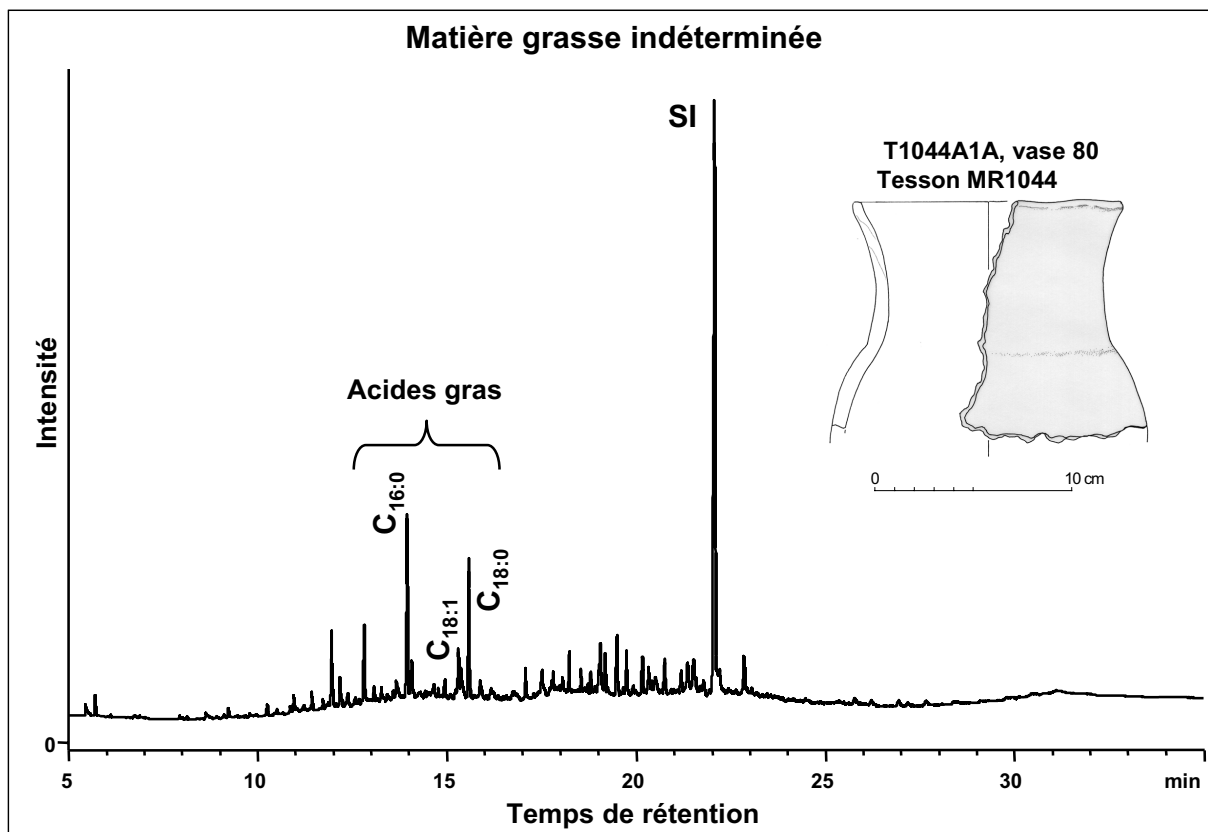
Vase 76



Non interprétable



Vase 80

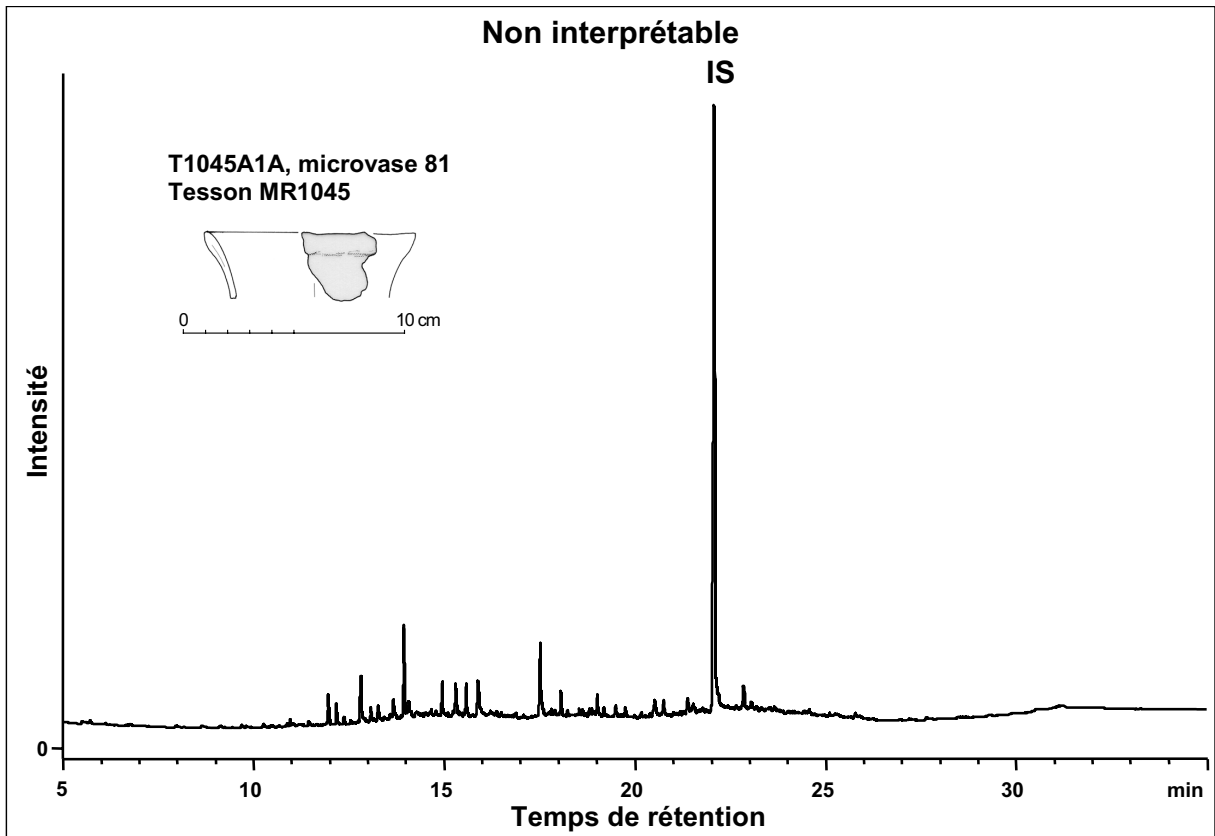


Vase pseudo-tulipiforme 80, tesson MR1044								
Chromatographie en phase gazeuse								
T1044A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm ID, 0.1 µm ep								
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
1177.903	631.461	2.2268	50.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

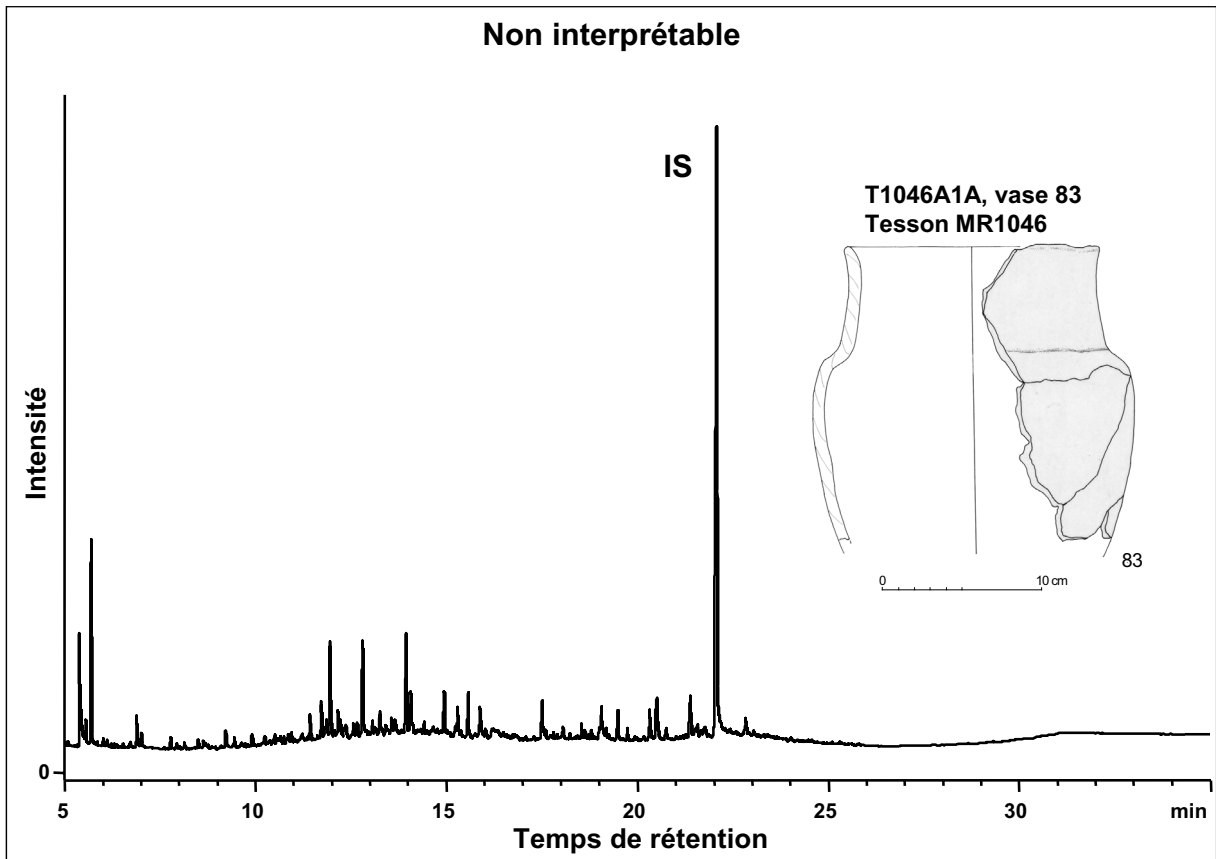
Composé	Aire	%
C16:0	131.756	57.99
C18:0	95.457	42.01
total	227.213	100.000

Concentration µg/g	41.88
C16/C18	1.38
% Acides gras	19.29

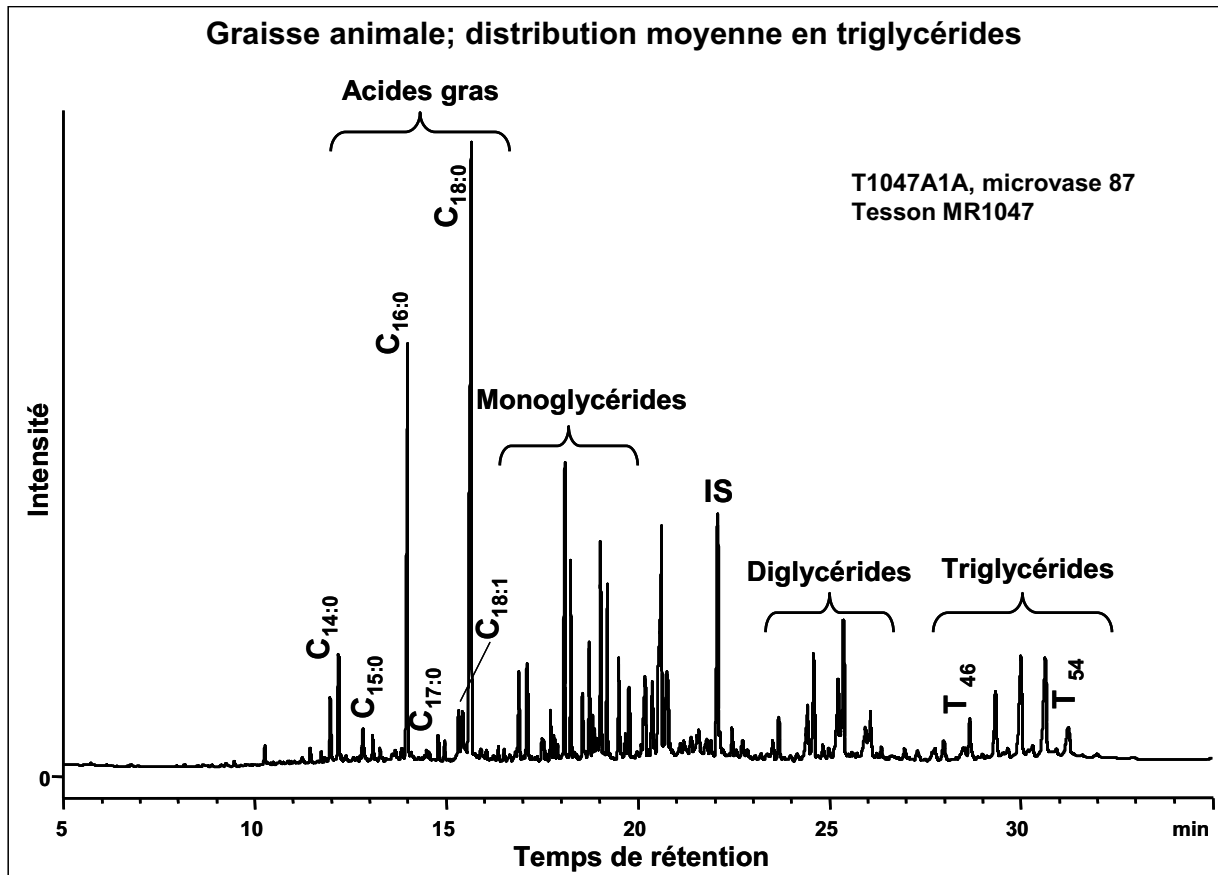
Microvase 81



Vase 83



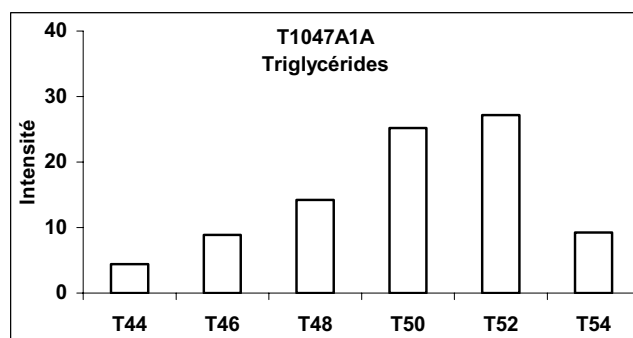
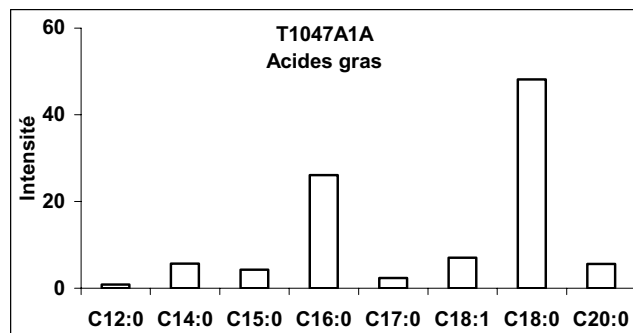
Microvase 87

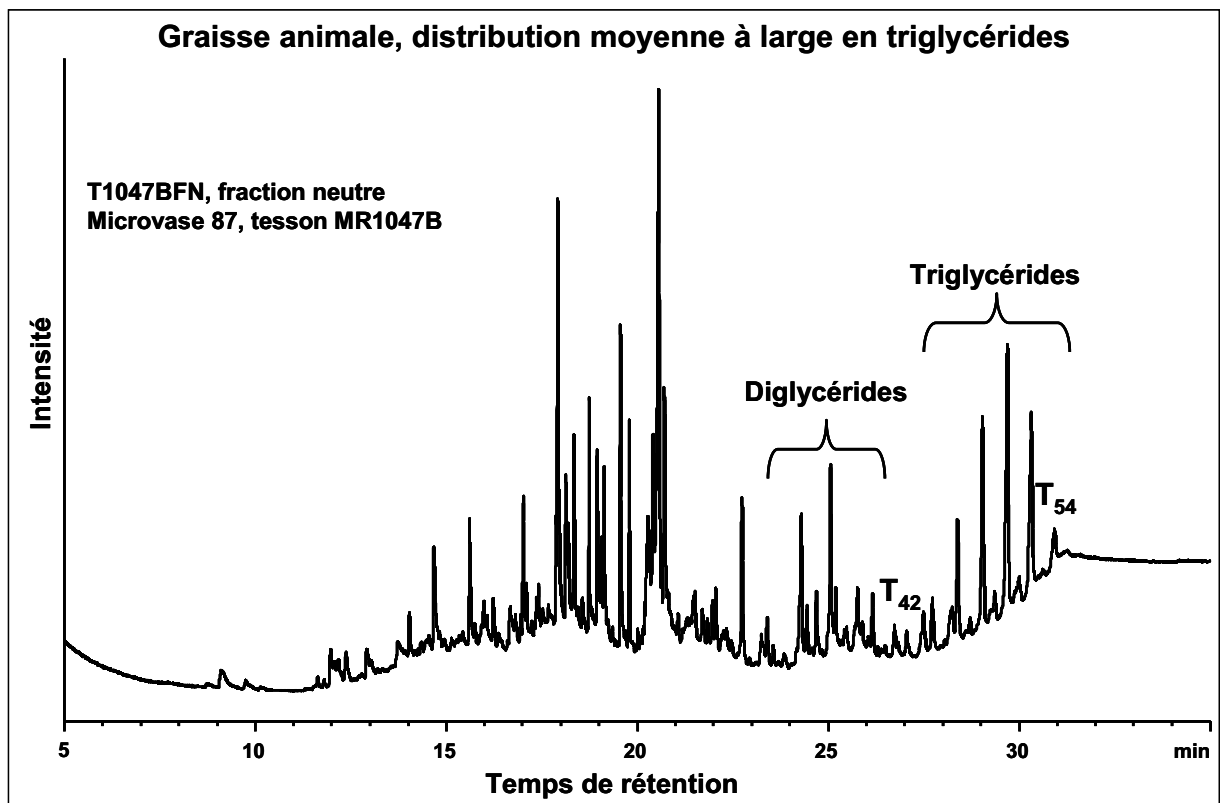
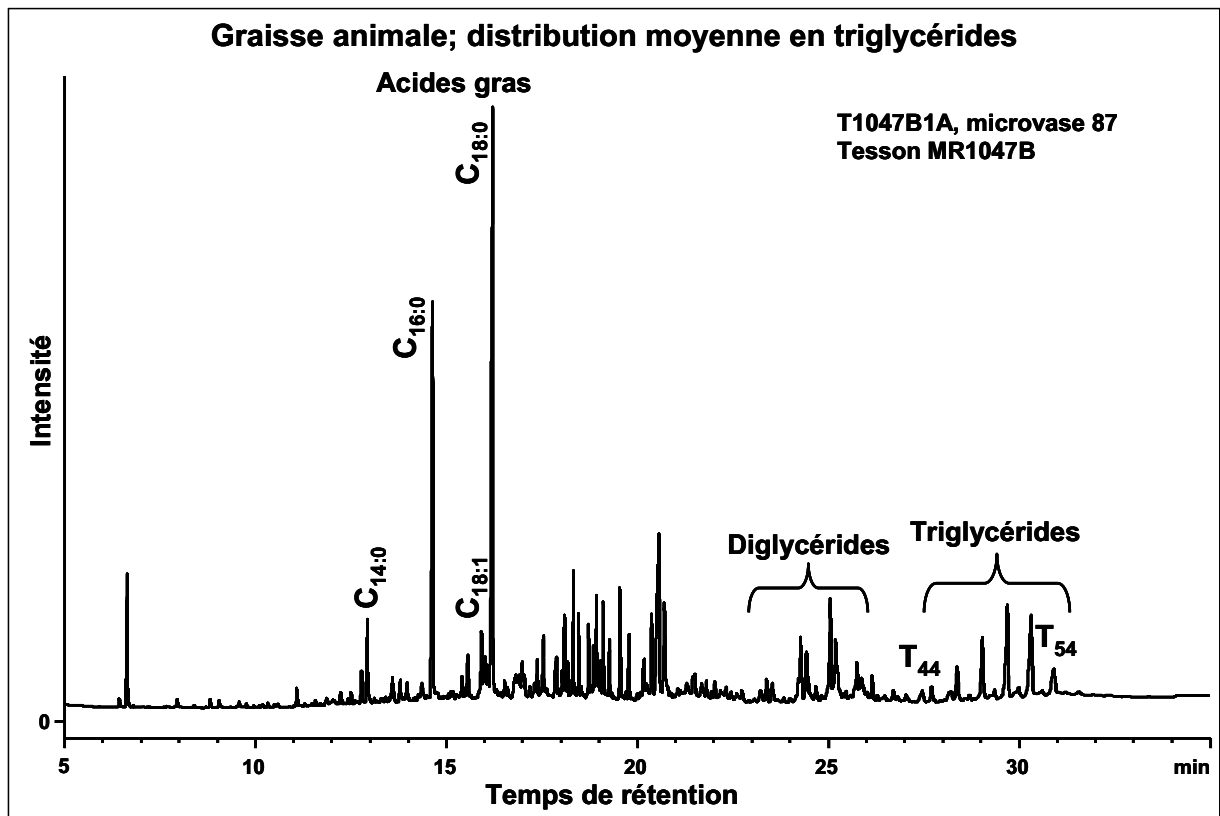


Microvase 87, tesson MR1047								
Chromatographie en phase gazeuse								
T1047A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm ID, 0.1 µm ep								
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
11235.168	625.755	1.7297	50.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

Composé	Aire	%
C12:0	27.940	0.87
C14:0	181.565	5.65
C15:0	136.296	4.24
C16:0	839.314	26.10
C17:0	76.323	2.37
C18:1	225.320	7.01
C18:0	1549.606	48.19
C20:0	179.217	5.57
total	3215.580	100.000
T44	63.143	4.39
T46	127.547	8.87
T48	204.437	14.22
T50	362.419	25.21
T52	390.936	27.19
T54	132.977	9.25
total	1437.649	89.136

Concentration µg/g	207.60
C16/C18	0.54
% Acides gras	28.37
% Triglycérides	12.80





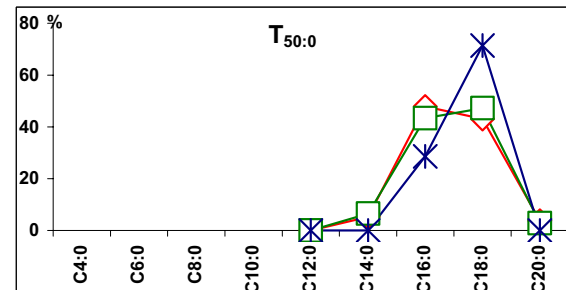
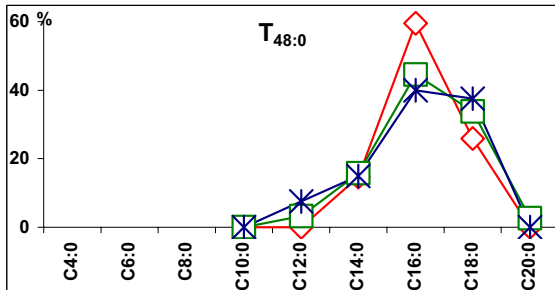
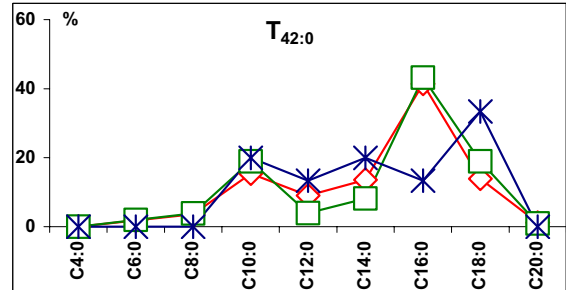
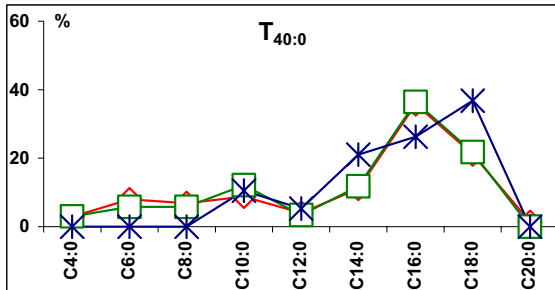
Spectrométrie de masse, nanoESI Q-q-TOF MS/MS
T1047BFN, fraction neutre
Produits laitiers

Triglycérides détectés

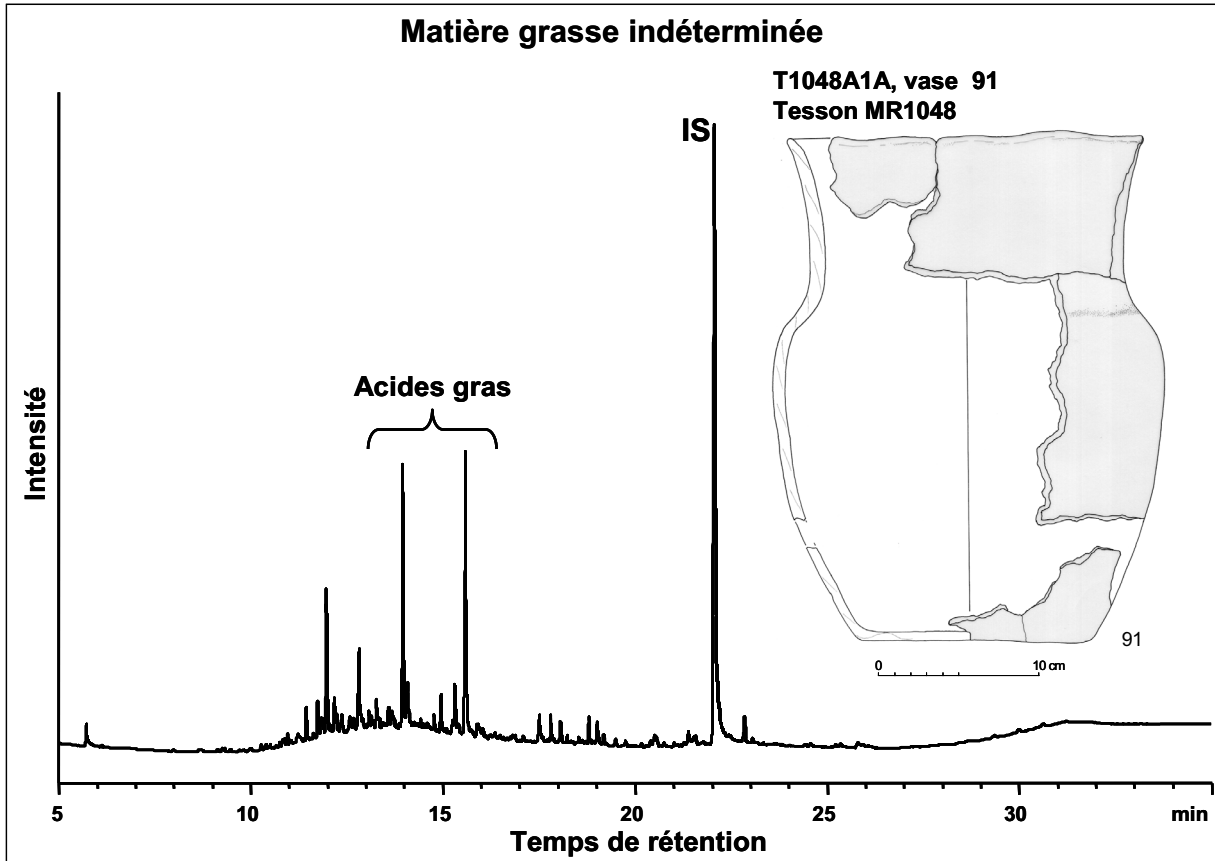
T_{40:0}-T_{50:0}

T_{54:1}

	C10:0Li	C12:0Li	C14:0Li	C16:0Li	C18:1Li	C18:0Li
T40:0	10.53	5.26	21.09	26.29	0.00	36.83
T42:0	19.97	13.36	19.97	13.36	0.00	33.35
T48:0		7.50	15.00	40.00	0.00	37.50
T50:0				28.60	0.00	71.40
T54:1					33.33	66.67



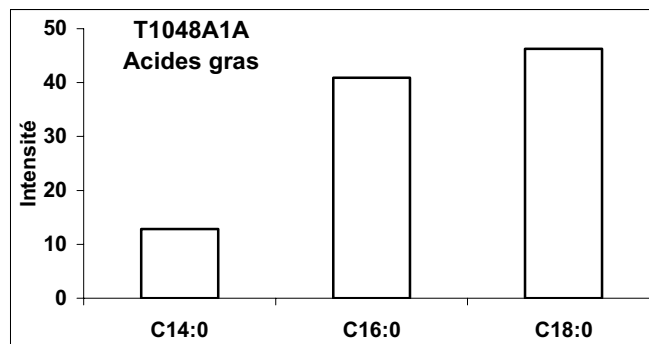
Vase 91



Vase à épaulement 91, tesson MR1048									
Chromatographie en phase gazeuse									
T1048A1A, CP SiI-5CB, 15 m, 0.32 mm ID, 0.1 µm ep									
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl	
623.974	484.542	2.7595	50.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00	

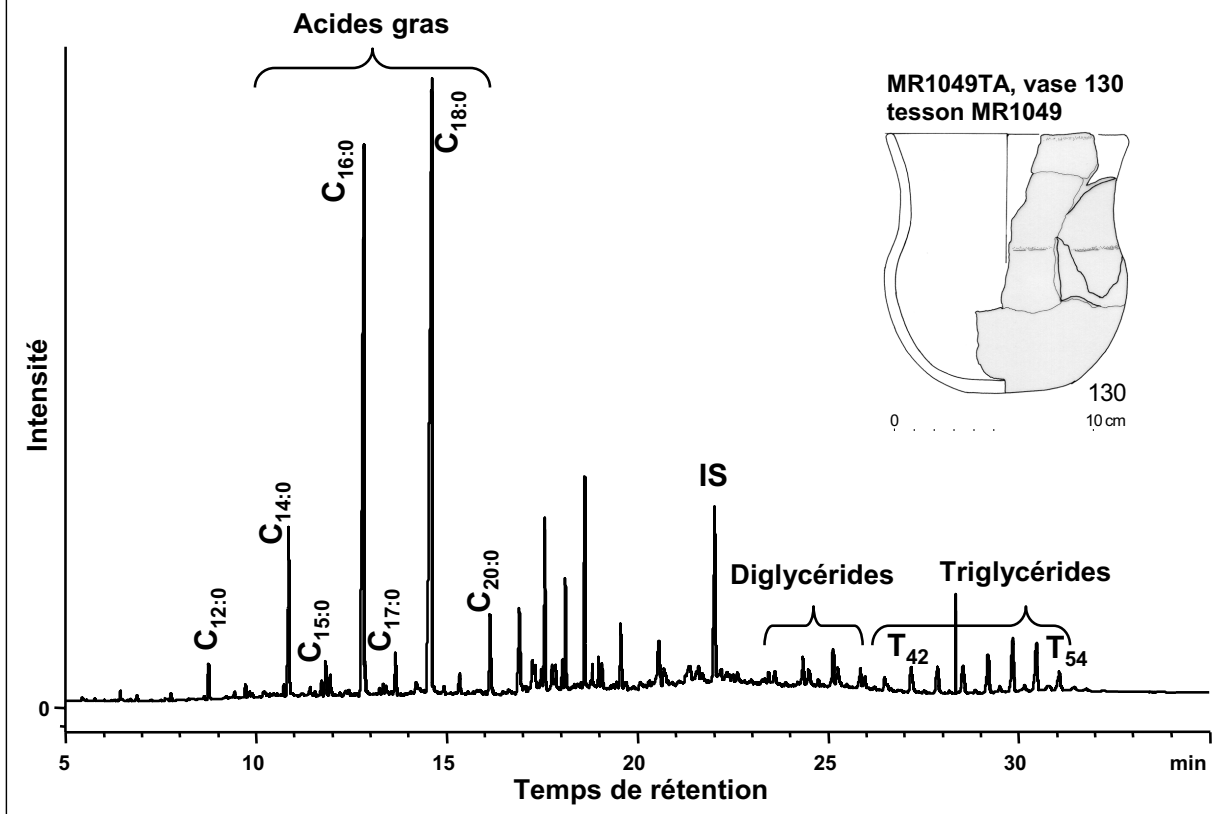
Composé	Aire	%
C14:0	34.585	12.80
C16:0	110.497	40.90
C18:0	125.053	46.29
total	270.135	100.000

Concentration µg/g	16.58
C16/C18	0.88
% Acides gras	43.29



Vase 130

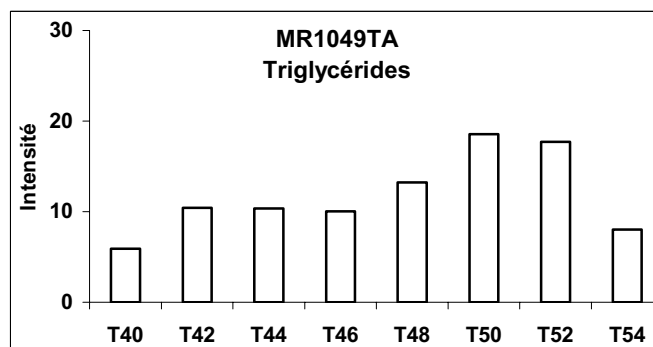
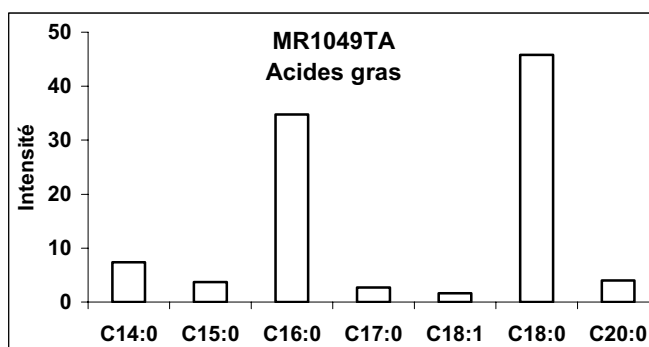
Produits laitiers; distribution large en triglycérides

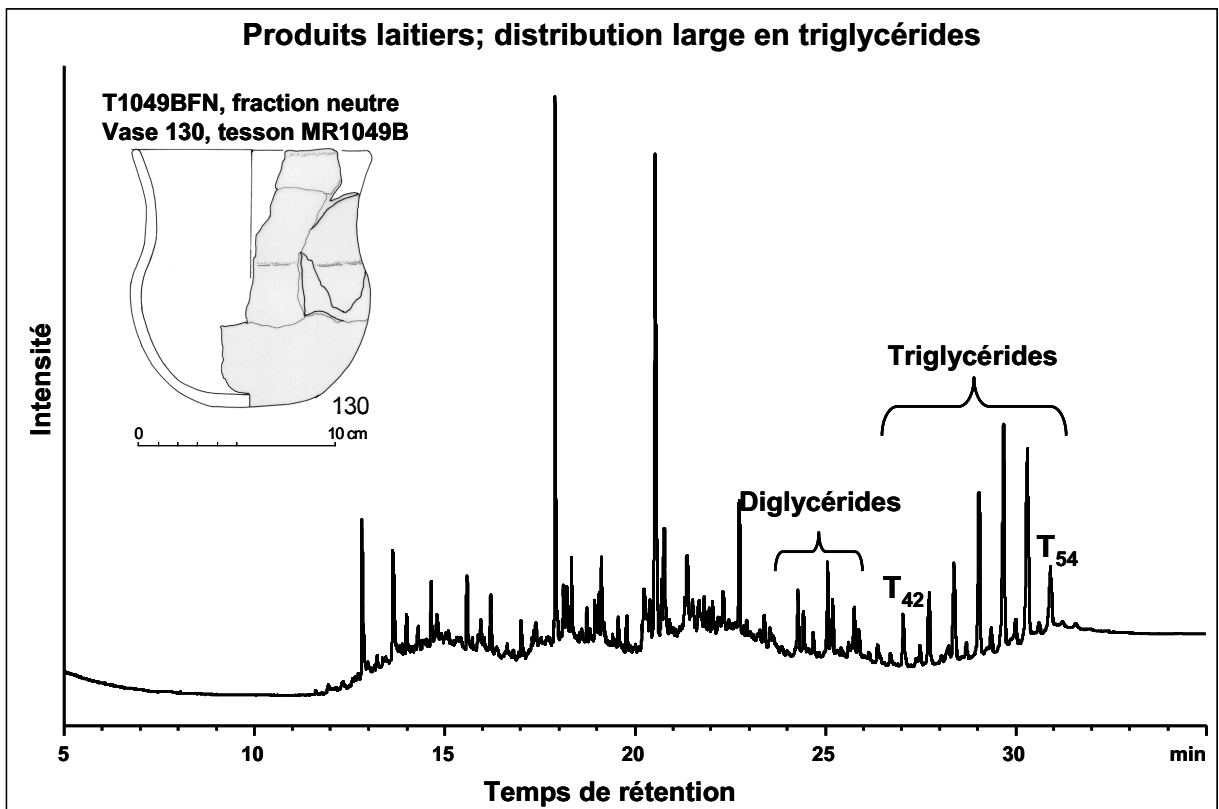
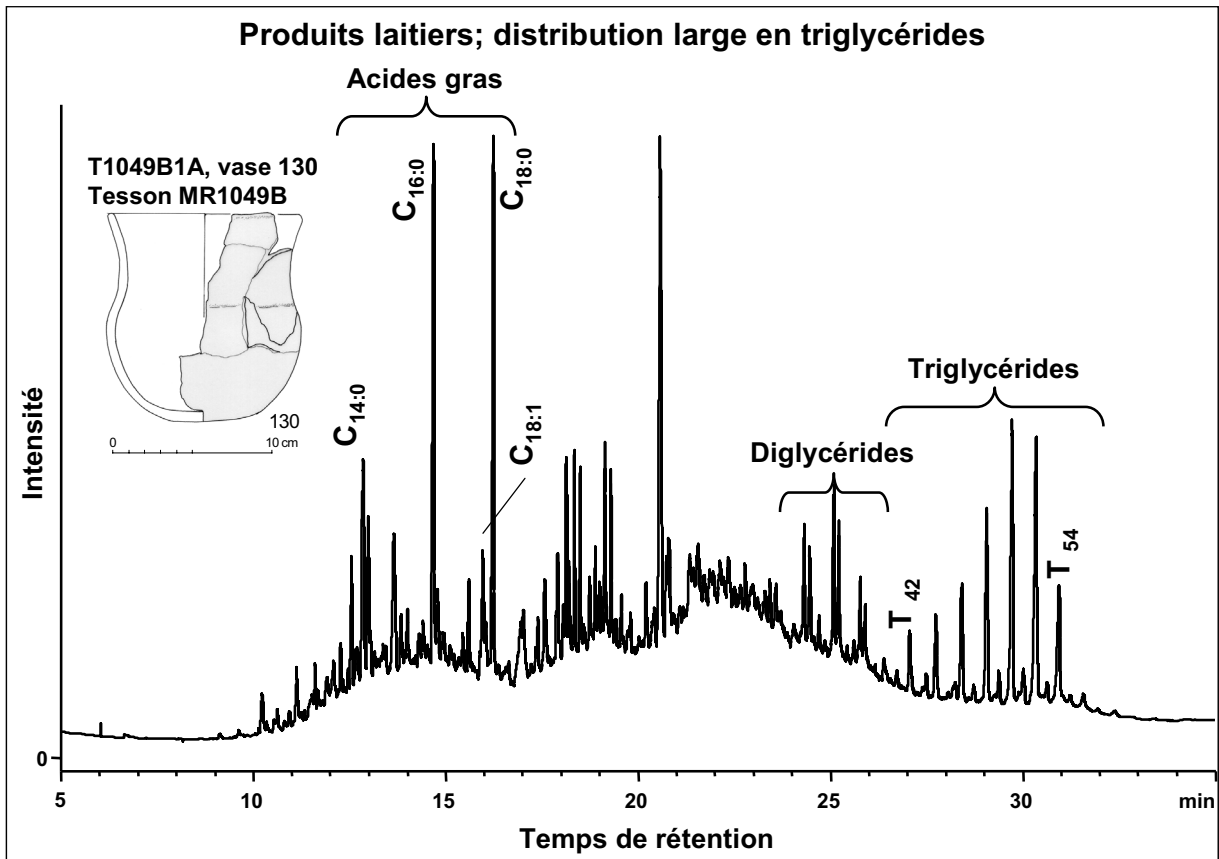


Vase tulipiforme 130, tesson MR1049								
Chromatographie en phase gazeuse								
MR1049TA, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm ID, 0.1 µm ep								
Aire totale	Aire standard	masse tesson g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
11303.391	584.420	2.3089	50.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

Composé	Aire	%
C14:0	455.329	7.38
C15:0	228.571	3.71
C16:0	2142.903	34.75
C17:0	167.664	2.72
C18:1	100.355	1.63
C18:0	2825.335	45.81
C20:0	246.855	4.00
total	6167.013	100.000
T40	77.835	5.91
T42	137.335	10.43
T44	136.261	10.35
T46	132.400	10.05
T48	174.266	13.23
T50	244.603	18.57
T52	233.422	17.72
T54	105.672	8.02
total	1317.060	94.285

Concentration µg/g	167.54
C16/C18	0.76
% Acides gras	54.56
% Triglycérides	11.65

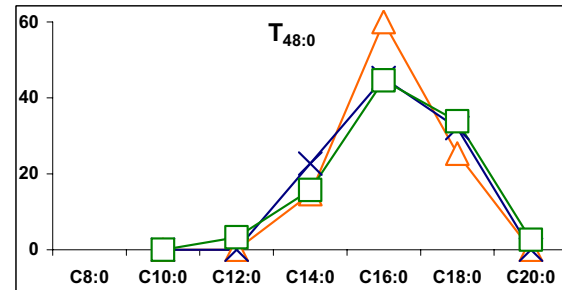
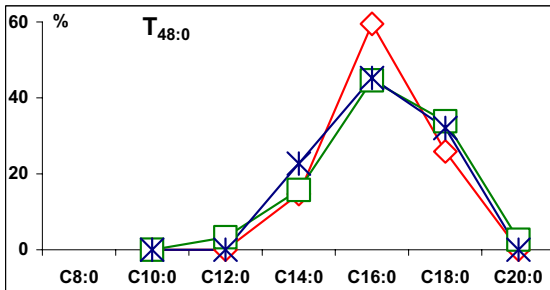
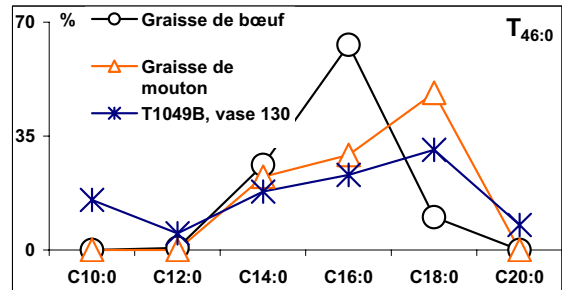
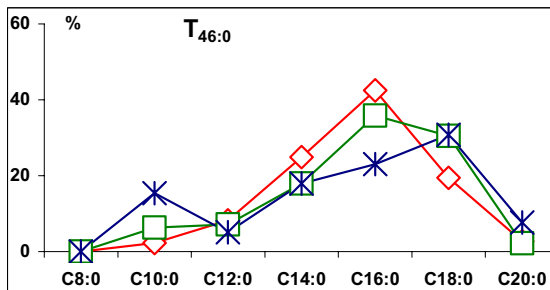
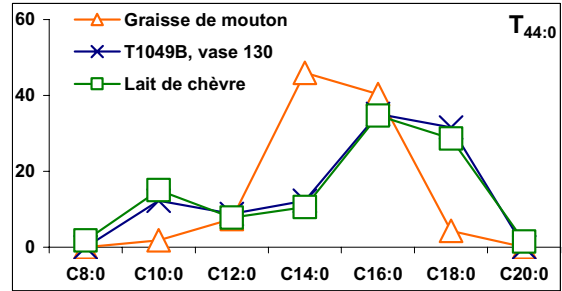
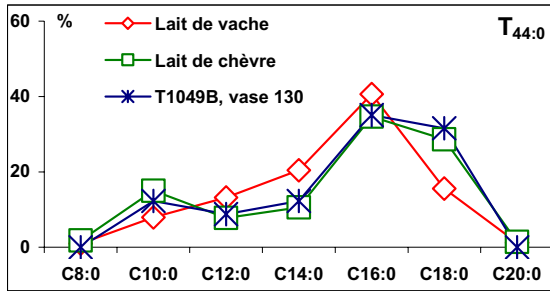


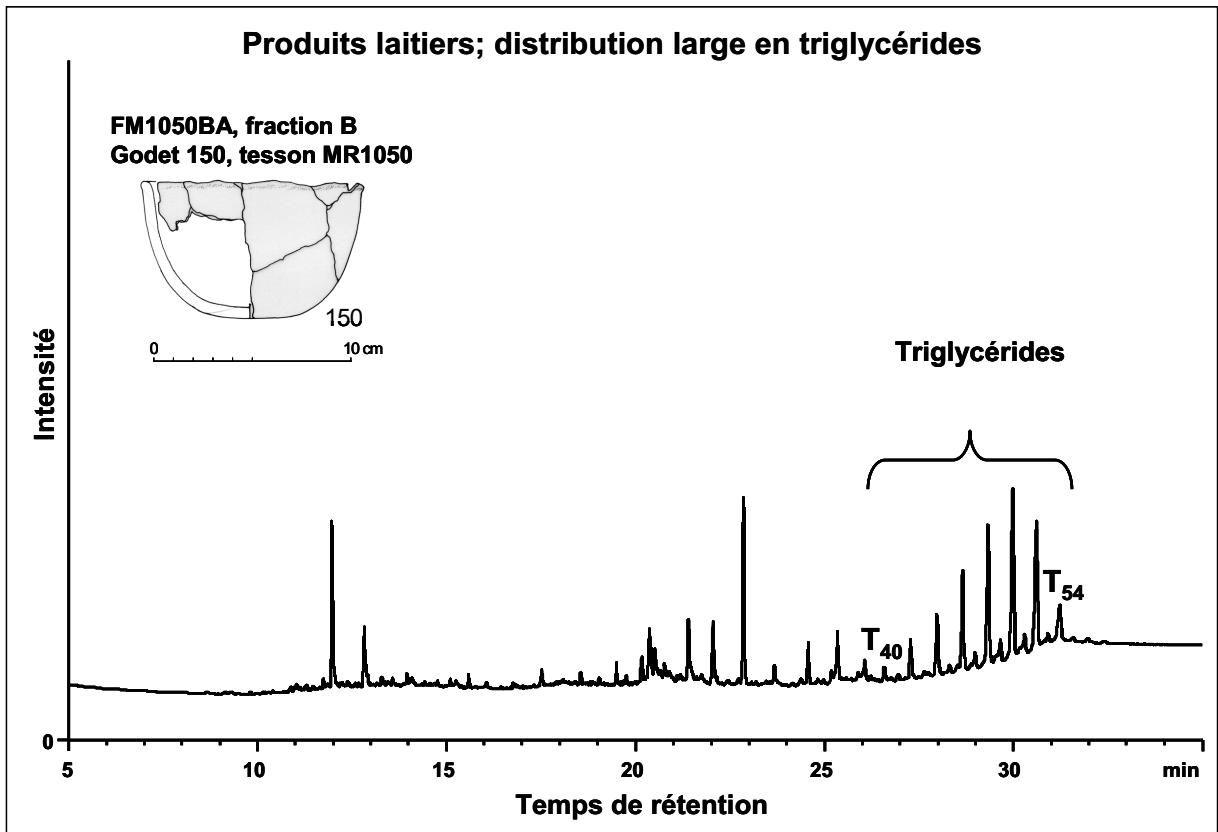
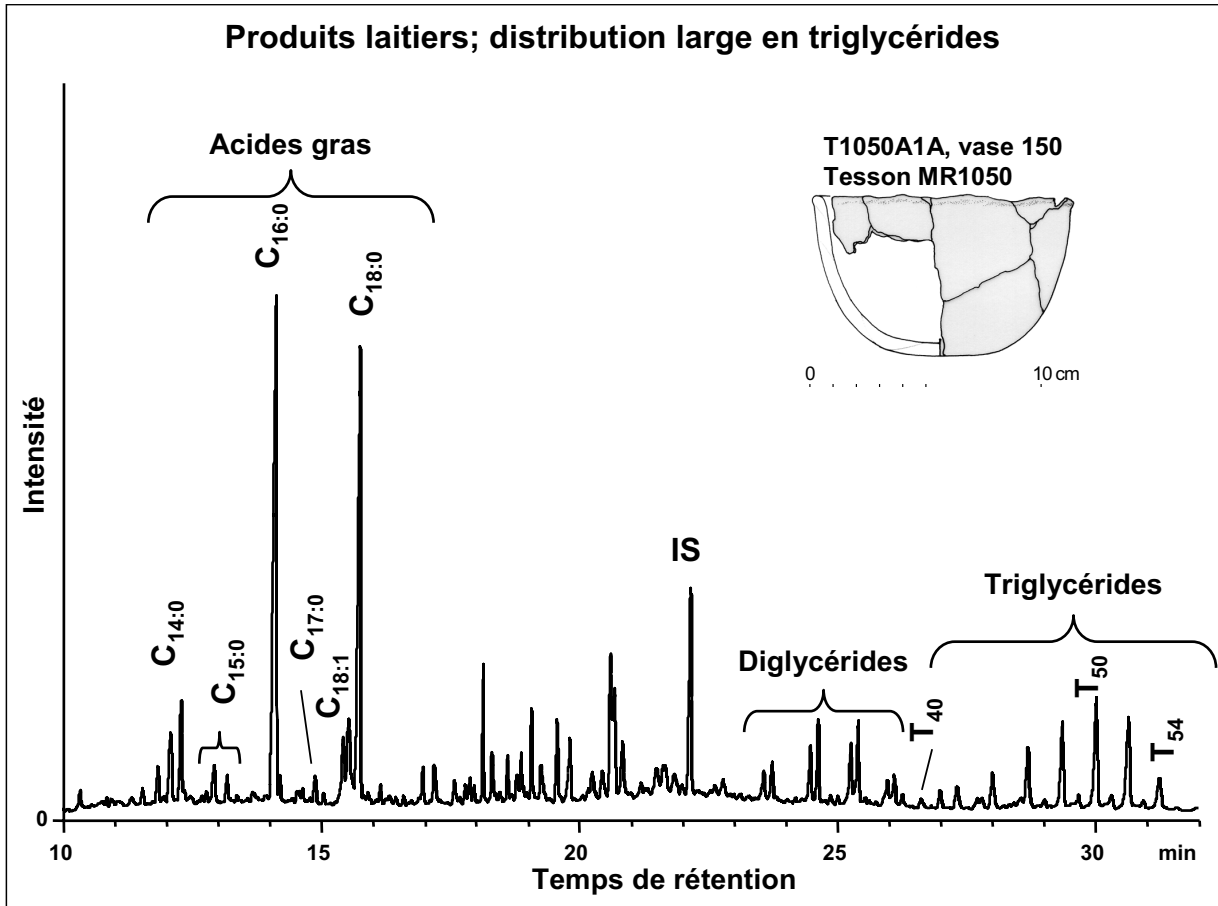


Spectrométrie de masse, nanoESI Q-q-TOF MS/MS
T1049BFN, fraction neutre
Produits laitiers, caprinés

Triglycérides détectés $T_{44:0}$ - $T_{54:0}$

T1049B	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C20:0
T44:0	12.28	8.76	12.28	35.10	31.58	
T46:0	15.42	5.13	17.95	23.08	30.75	7.67
T48:0			22.67	45.28	32.06	
T50:0			8.00	44.00	48.01	
T52:0			2.13	27.66	61.69	8.52
T54:0					100.00	

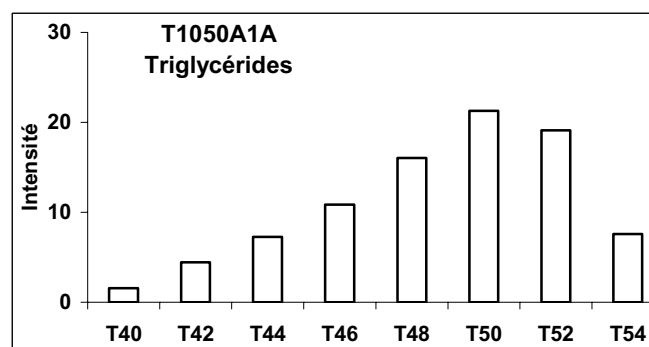
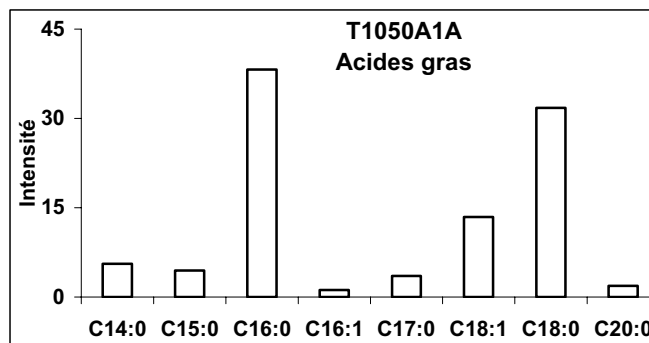




petit bol 150, tesson MR1050								
Chromatographie en phase gazeuse								
T1050A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm ID, 0.1 µm ep								
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
19348.688	936.776	2.3551	30.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

Composé	Aire	%
C14:0	410.385	5.56
C15:0	330.043	4.47
C16:0	2819.539	38.19
C16:1	88.033	1.19
C17:0	259.386	3.51
C18:1	991.745	13.43
C18:0	2343.995	31.75
C20:0	140.191	1.90
total	7383.316	100.000
T40	48.653	1.56
T42	138.046	4.43
T44	226.315	7.25
T46	338.416	10.85
T48	499.915	16.02
T50	664.102	21.29
T52	596.702	19.13
T54	236.989	7.60
total	3119.614	88.124

Concentration µg/g	175.40
C16/C18	1.20
% Acides gras	38.16
% Triglycérides	16.12

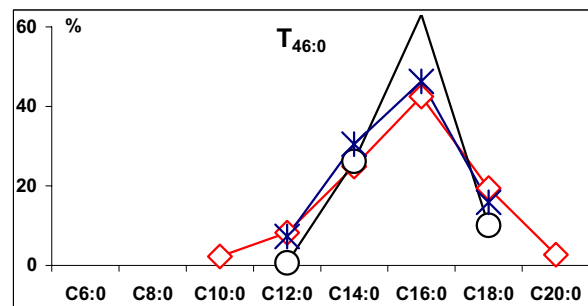
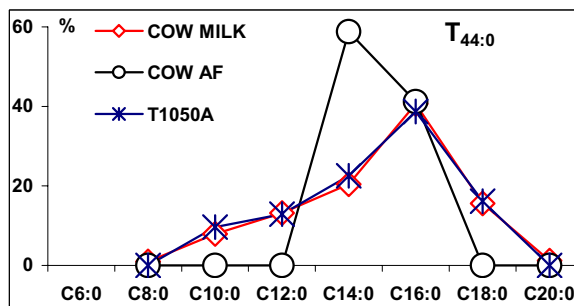
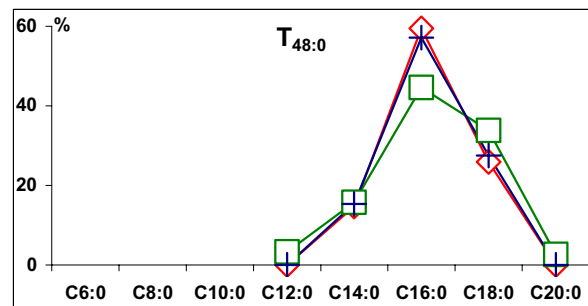
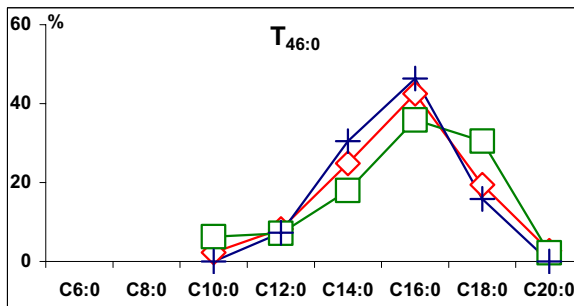
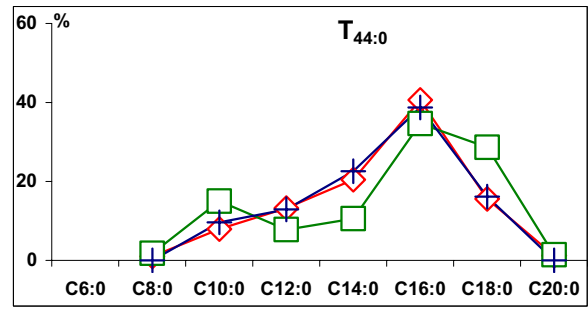
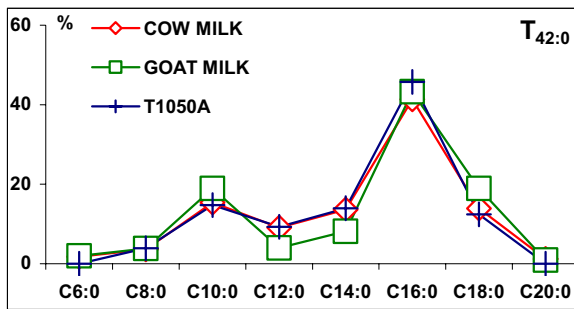


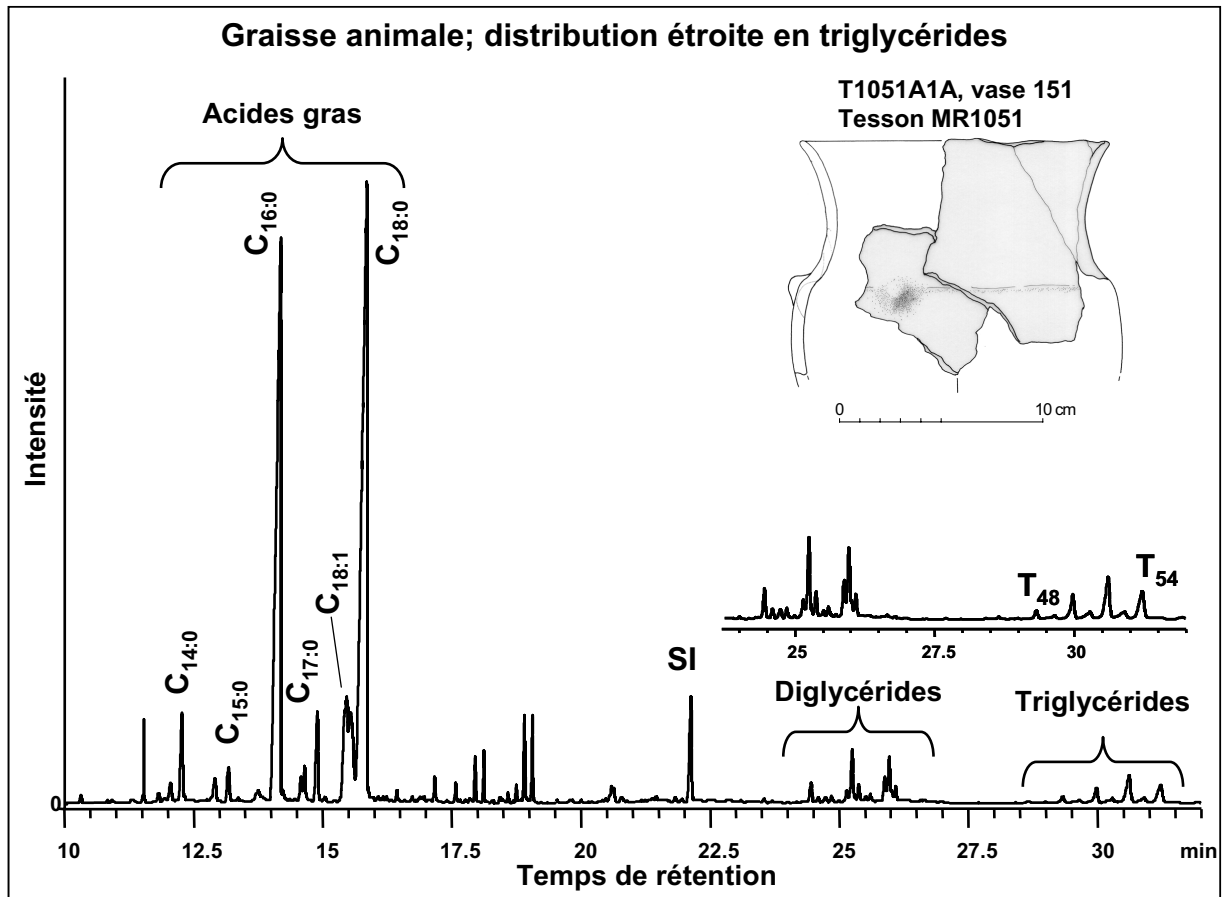
Spectrométrie de masse, nanoESI Q-q-TOF MS/MS
FM1050, fraction B
Produits laitiers de boviné

Triglycérides détectés $T_{42:0}-T_{52:0}$ $T_{48:1}-T_{52:1}$

FM1050	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0
T42:0	3.88	14.74	9.30	13.96	45.74	12.39
T44:0		9.67	12.90	22.57	38.71	16.14
T46:0			7.32	30.49	46.33	15.86
T48:0				15.31	57.18	27.51
T50:0				8.53	46.59	44.88
T52:0					39.29	60.71

FM1050	C14:0	C16:0	C18:1	C18:0
T48:1	21.05	31.58	47.37	
T50:1	11.76	47.05	31.39	9.80
T52:1		22.20	50.00	27.80

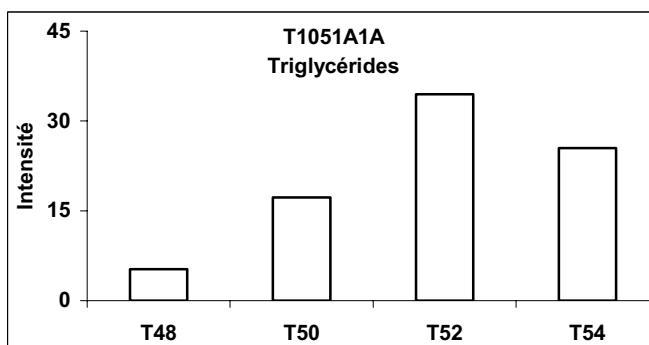
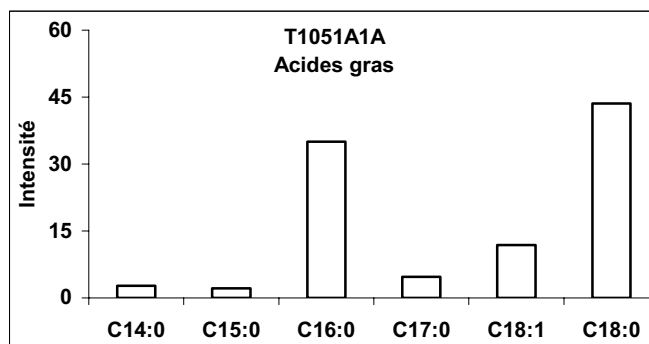


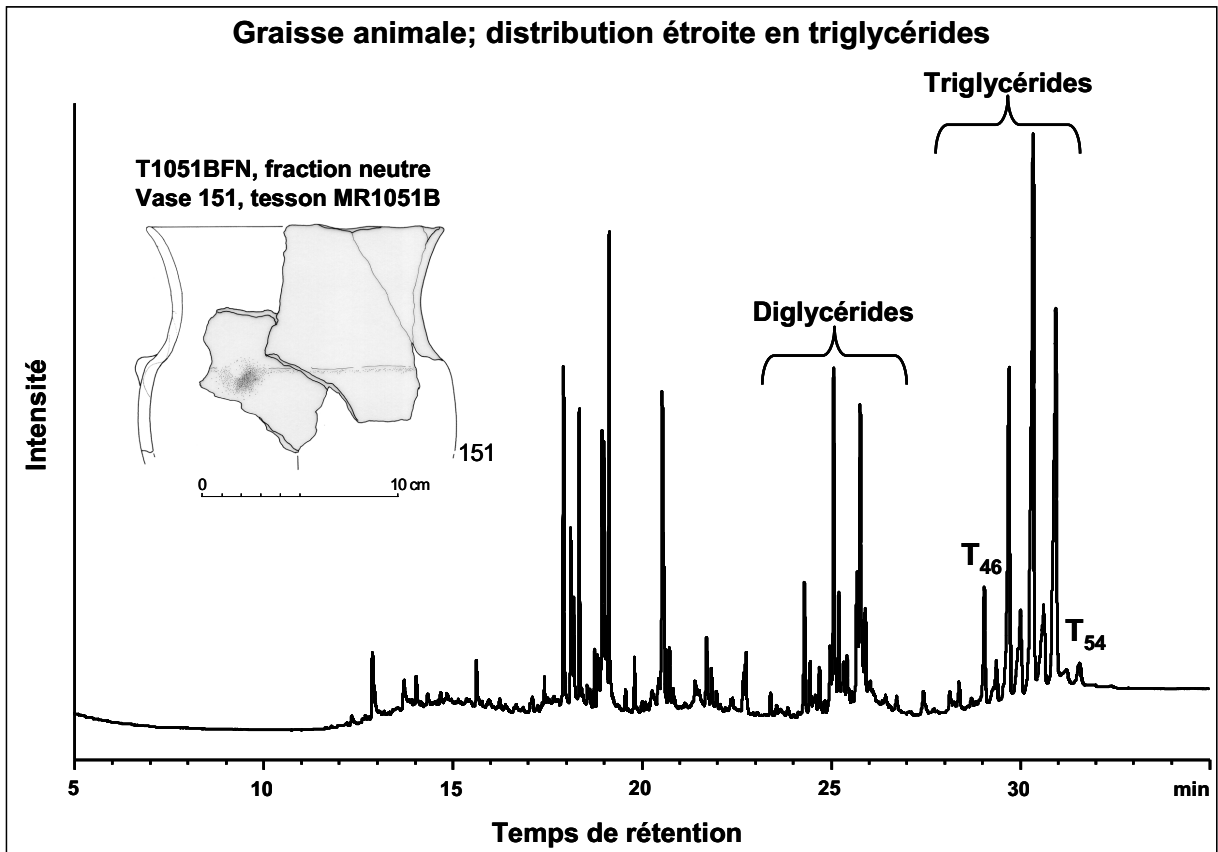
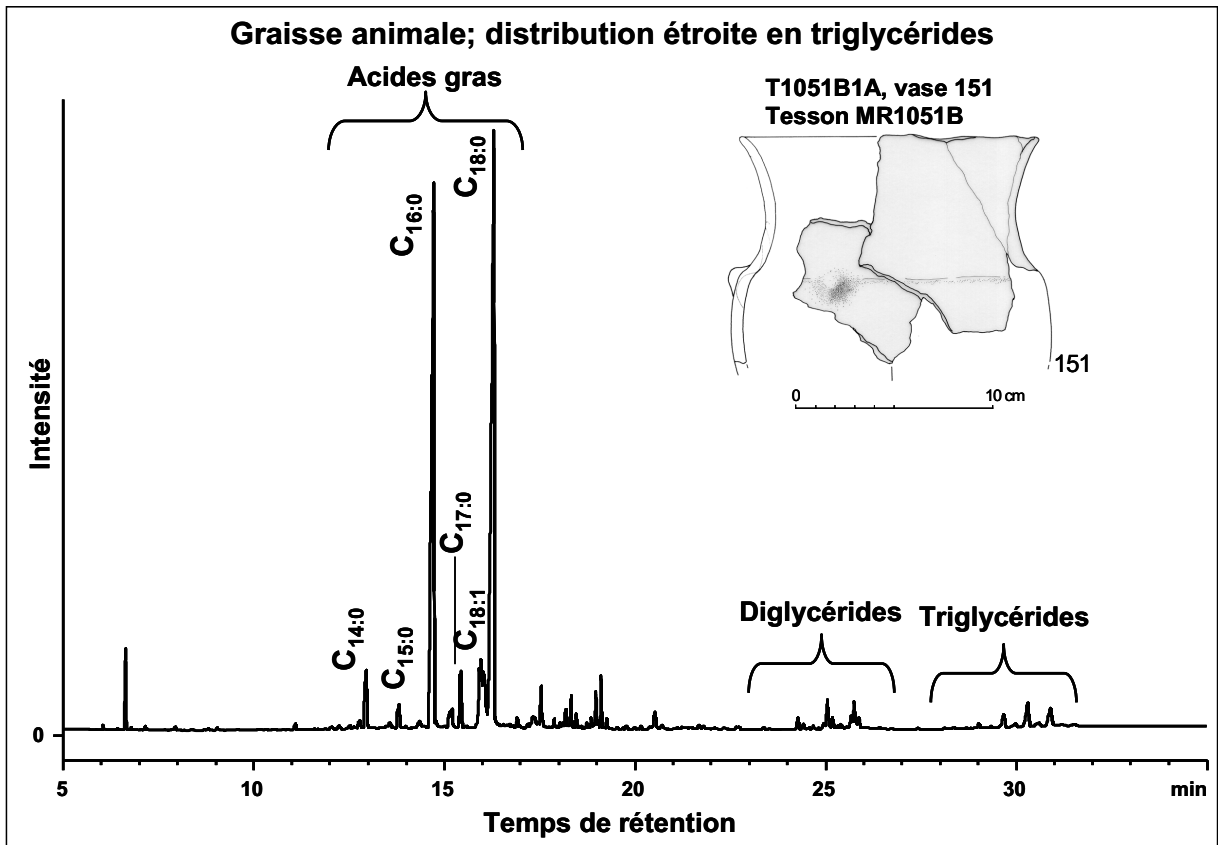


Vase à épaulement 151, tesson MR1051								
Chromatographie en phase gazeuse								
T1051A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm								
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
24715.960	641.592	1.8489	30.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

Composé	Aire	%
C14:0	530.380	2.68
C15:0	425.210	2.15
C16:0	6922.561	35.00
C17:0	937.915	4.74
C18:1	2339.950	11.83
C18:0	8621.782	43.59
total	19777.798	100.000
T48	47.263	5.26
T50	154.952	17.25
T52	309.507	34.45
T54	229.087	25.50
total	898.463	82.453

Concentration µg/g	416.71
C16/C18	0.80
% Acides gras	80.02
% Triglycérides	3.64





Spectrométrie de masse, nanoESI Q-q-TOF MS/MS
T1051BFN, fraction neutre
Graisse sous-cutanée

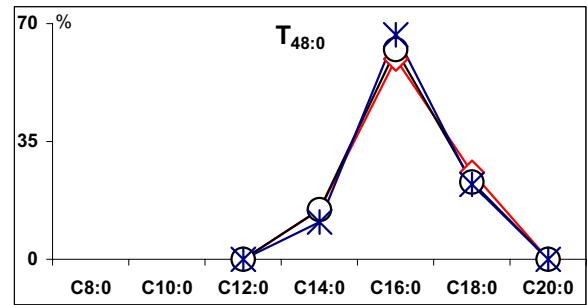
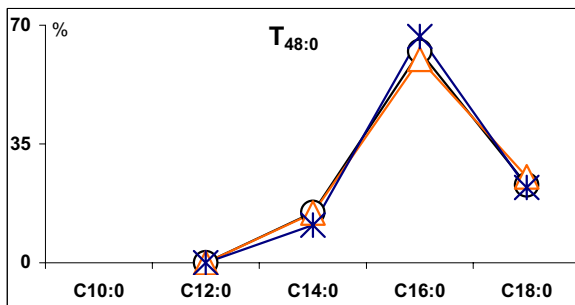
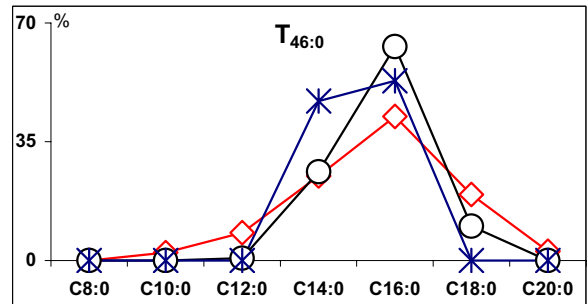
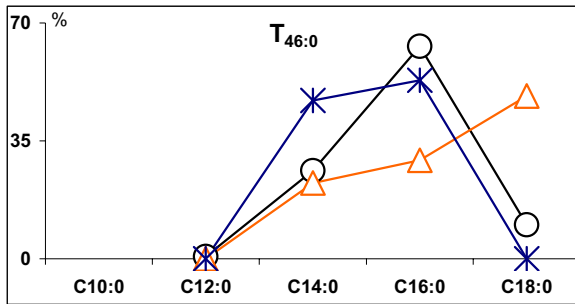
Triglycérides détectés

T_{46:0}-T_{52:0}

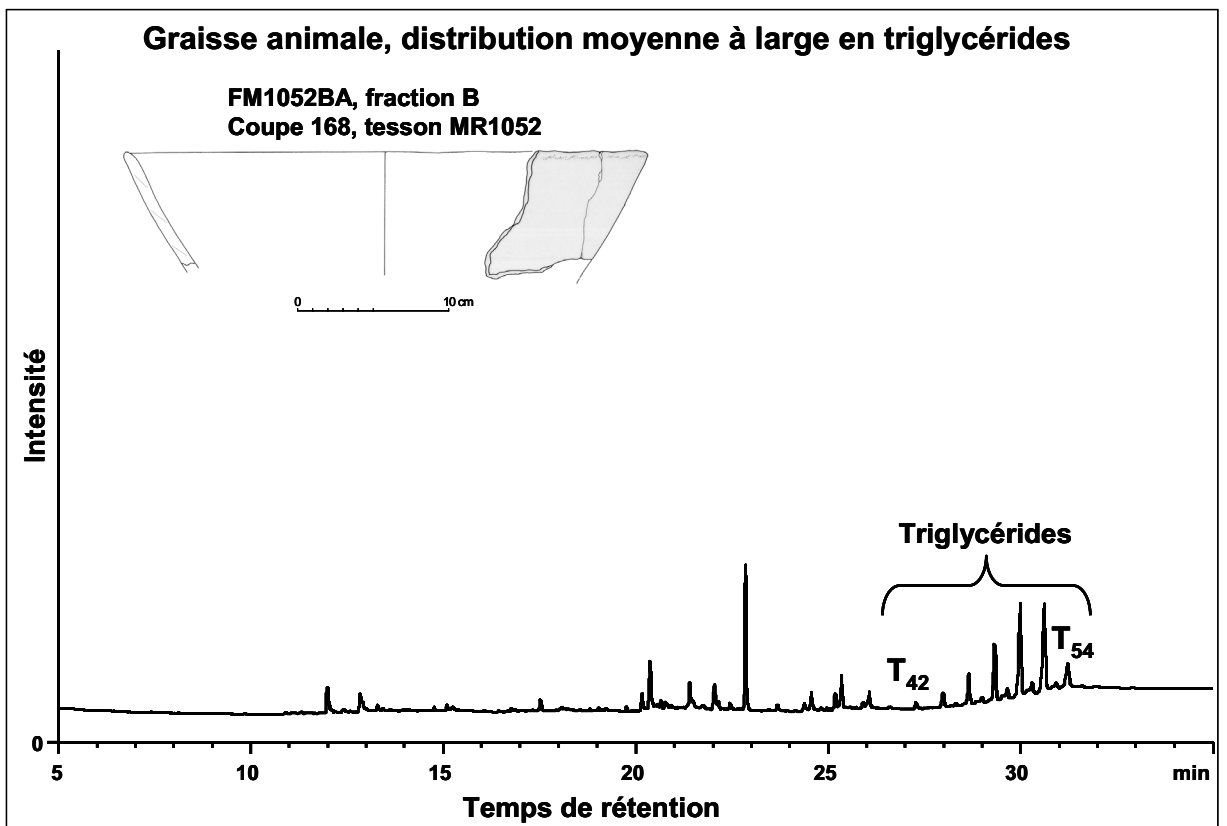
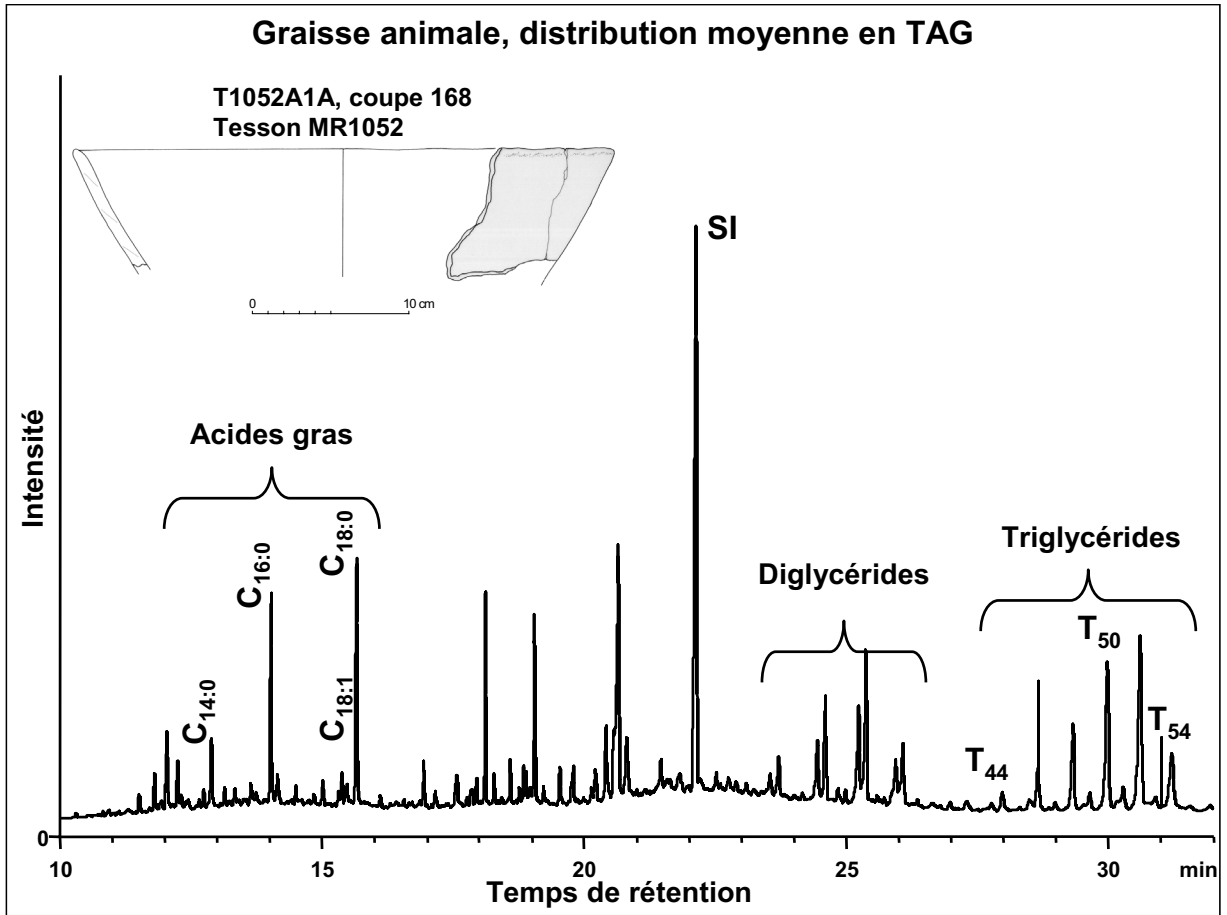
T_{50:1}-T_{54:1}

T1051B	C14:0	C16:0	C18:0
T46:0	47.03	52.97	
T48:0	11.12	66.67	22.21
T50:0		53.27	46.73
T50:0		60.73	39.27
T52:0		42.11	57.89

T1051B	C16:0	C18:1	C18:0
T50:1	45.48	40.89	13.63
T52:1	15.39	30.73	53.88
T54:1		36.35	63.65



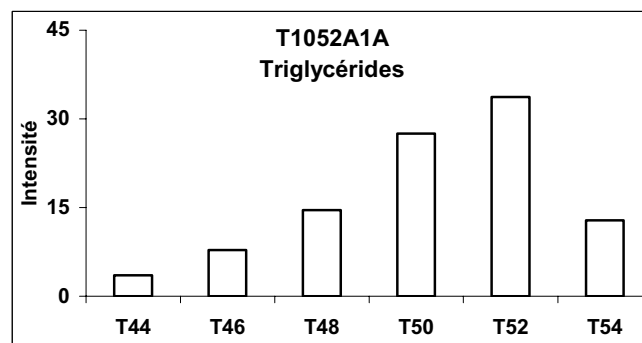
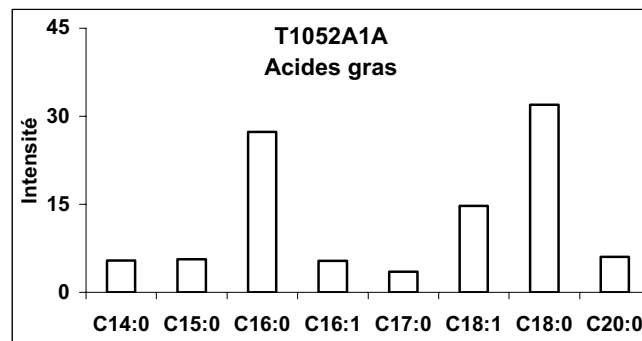
Coupe 168



Coupe 168, tesson MR1052								
Chromatographie en phase gazeuse								
T1052A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm								
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
4927.252	790.060	2.4263	30.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

Composé	Aire	% intra famille
C14:0	41.614	5.43
C15:0	43.046	5.62
C16:0	209.476	27.34
C16:1	41.064	5.36
C17:0	26.752	3.49
C18:1	112.956	14.74
C18:0	244.900	31.96
C20:0	46.383	6.05
total	766.192	100.000
T44	38.902	3.56
T46	85.430	7.82
T48	159.201	14.57
T50	300.828	27.52
T52	368.544	33.72
T54	140.023	12.81
total	1092.929	100.000

Concentration µg/g	51.41
C16/C18	0.86
% Acides gras	15.55
% Triglycérides	22.18

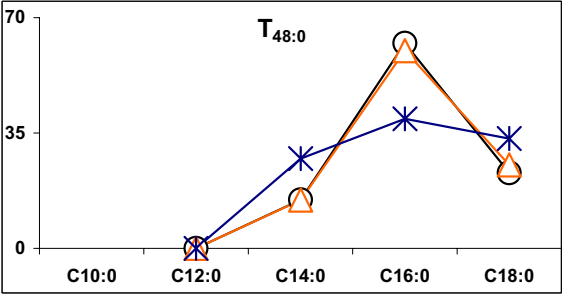
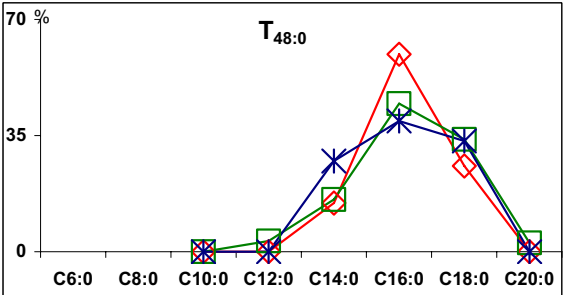
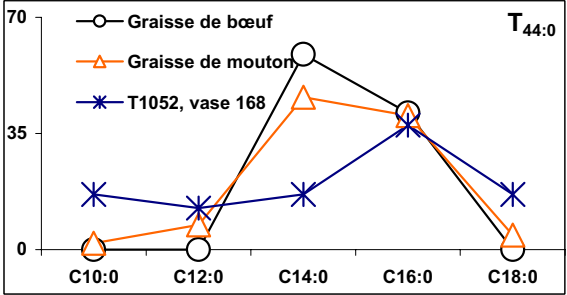
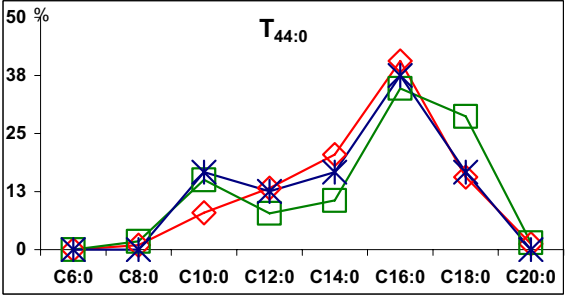
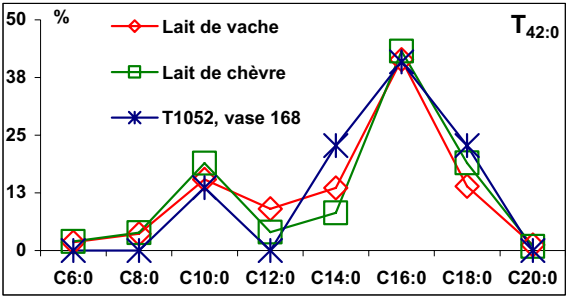


Spectrométrie de masse, nanoESI Q-q-TOF MS/MS
 FM1052, fraction B
 Produits laitiers

Triglycérides détectés

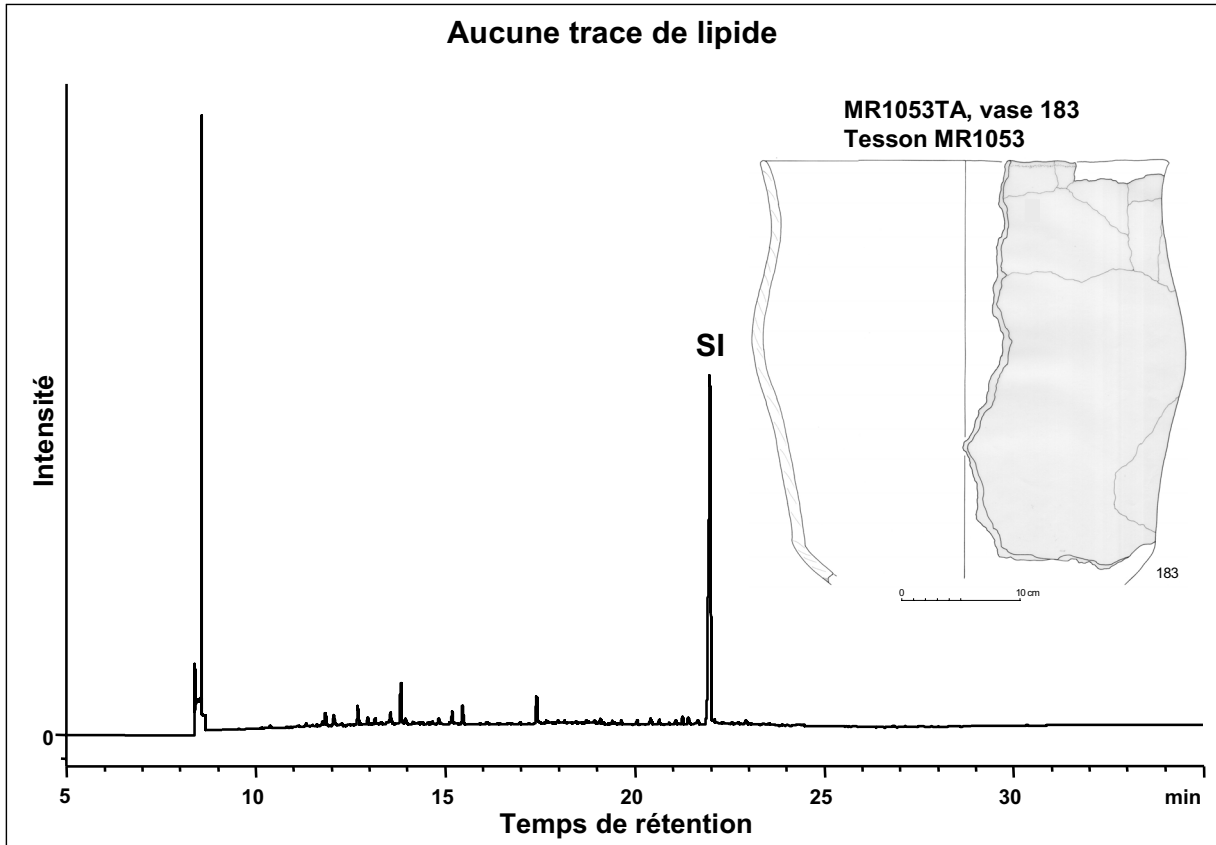
$T_{42:0}-T_{52:0}$

$T_{48:1}; T_{52:1}; T_{52:2}$

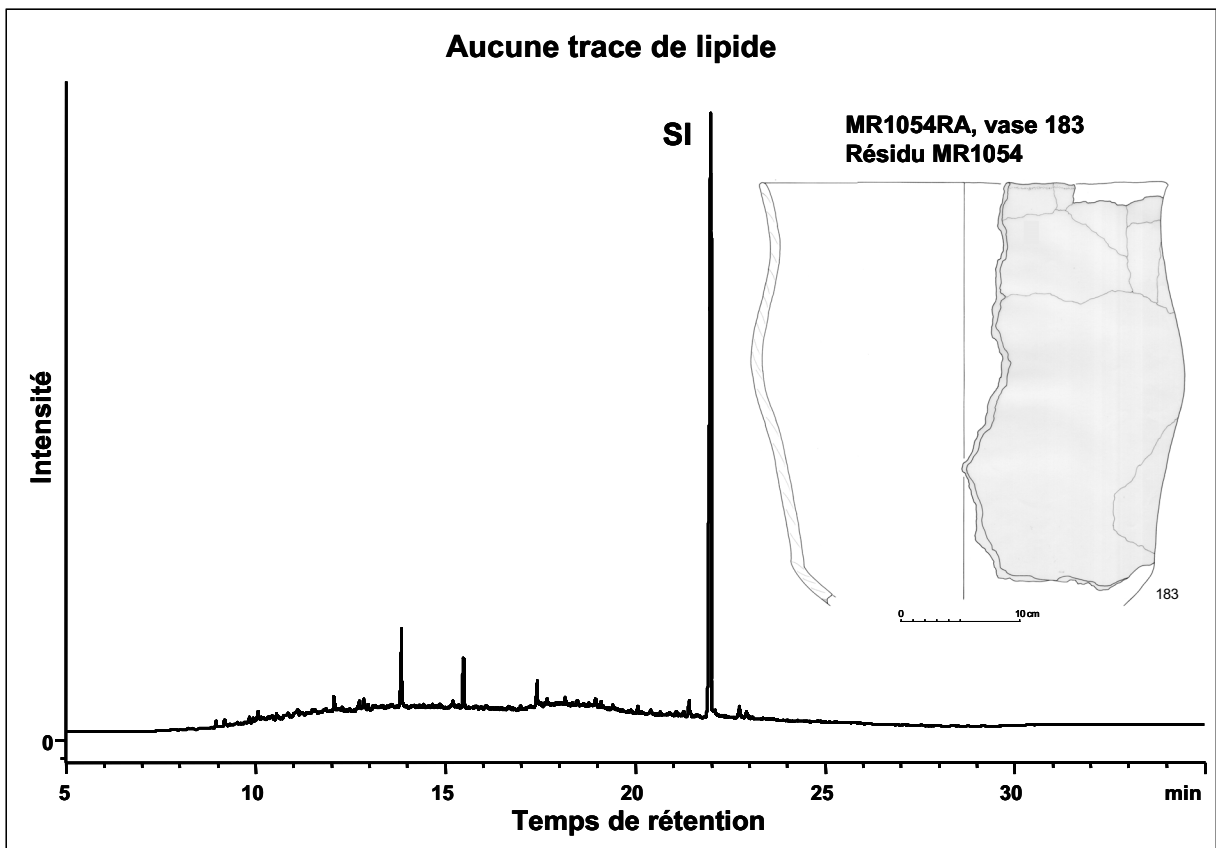


Vase 183

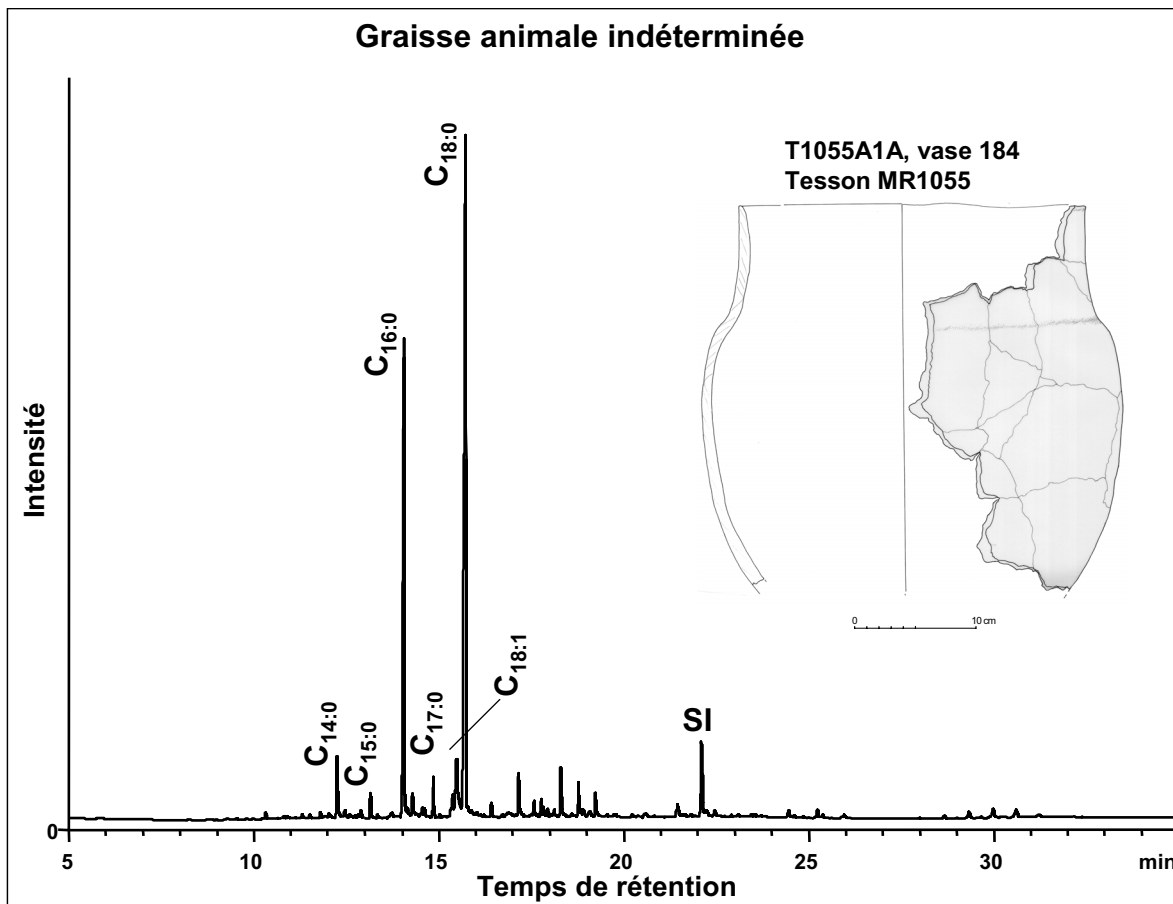
Aucune trace de lipide



Aucune trace de lipide



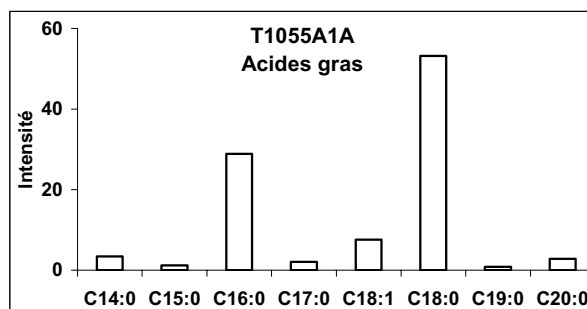
Vase 184

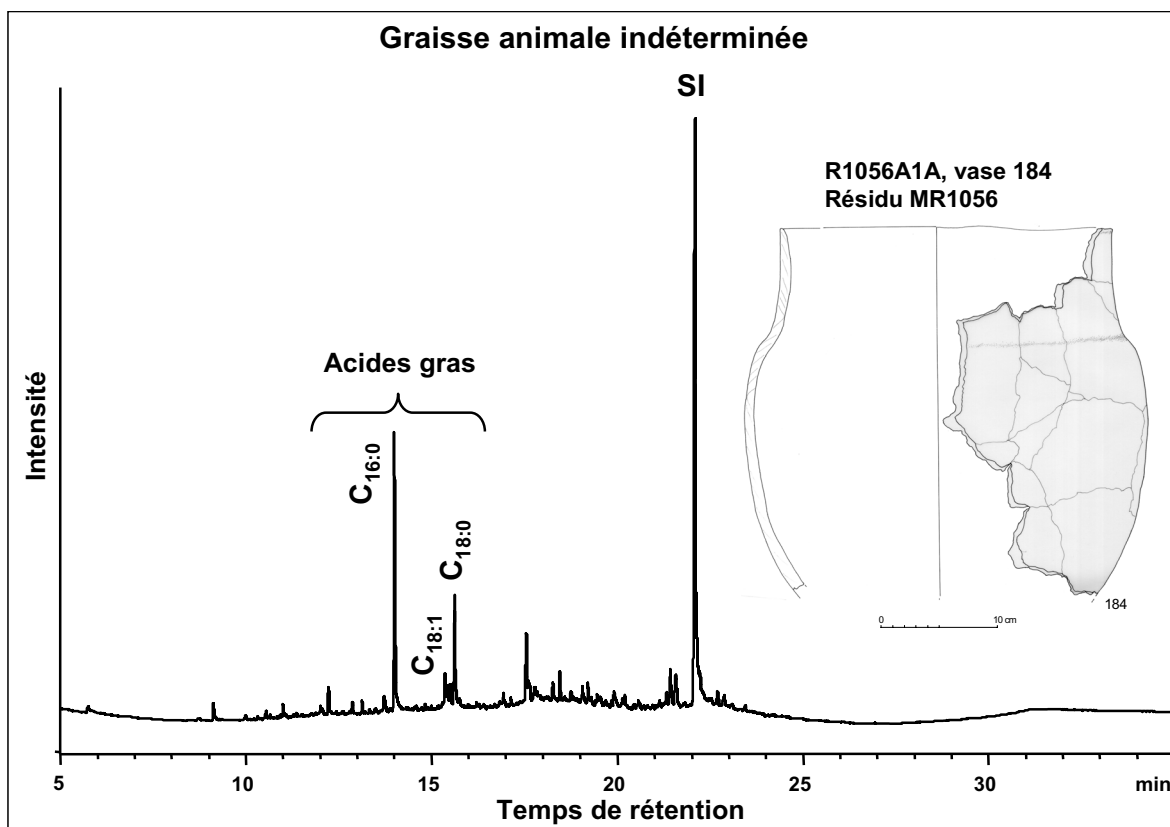


Chromatographie en phase gazeuse									
T1055A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm									
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl	
3828.354	162.631	1.9982	100	1.00	20	0.04	500	100	

Composé	Aire	%
C14:0	104.786	3.39
C15:0	37.801	1.22
C16:0	893.007	28.89
C17:0	64.387	2.08
C18:1	234.002	7.57
C18:0	1644.512	53.19
C19:0	25.358	0.82
C20:0	87.663	2.84
total	3091.516	100.000
total TAGs	119.108	

Concentration µg/g	235.61
C16/C18	0.54
% Acides gras	80.75
% Triglycérides	3.11





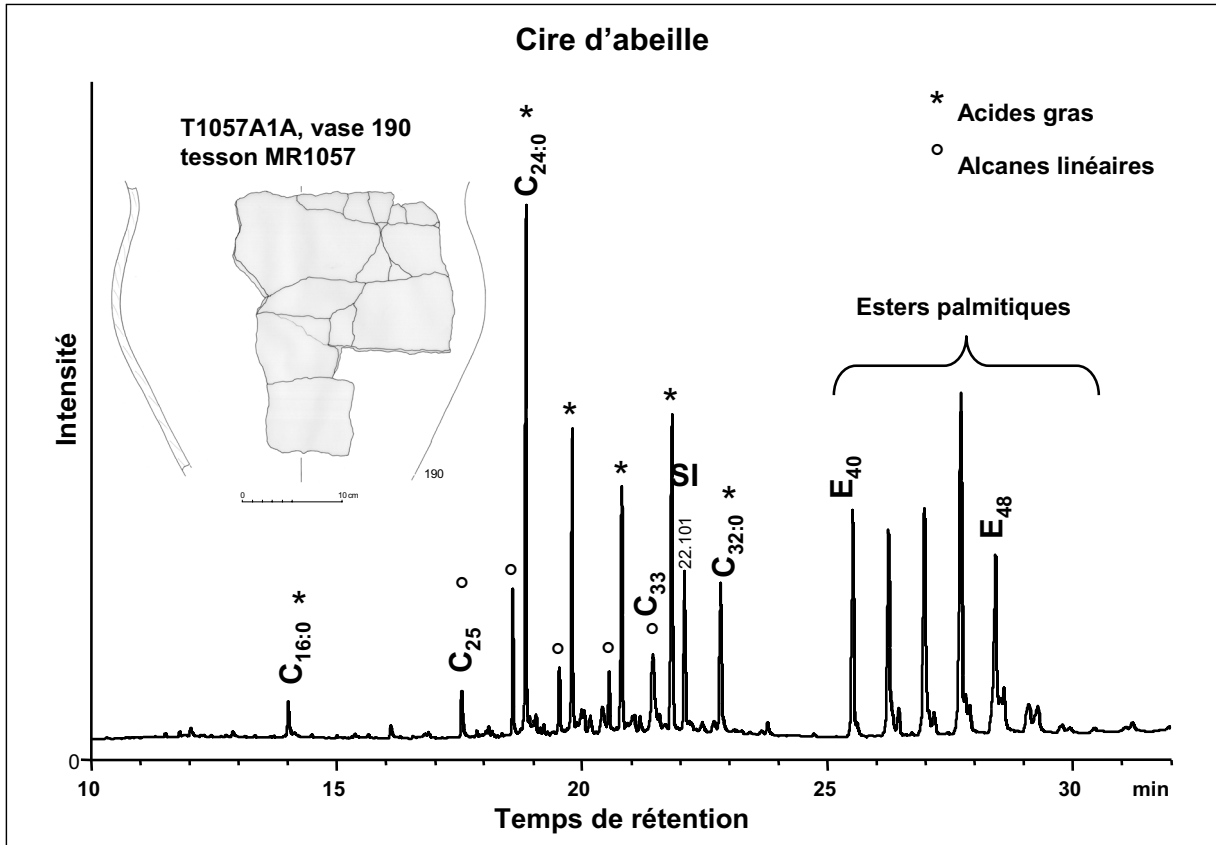
Vase à épaulement 184, résidu MR1056								
Chromatographie en phase gazeuse								
R1056A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm								
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
220.940	235.238	0.0392	100.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

Composé	Aire	%
C16:0	75.314	60.74
C18:1	18.718	15.10
C18:0	29.956	24.16
total	123.988	100.000

Concentration µg/g	479.19
C16/C18	2.51
% Acides gras	56.12

Vase 190

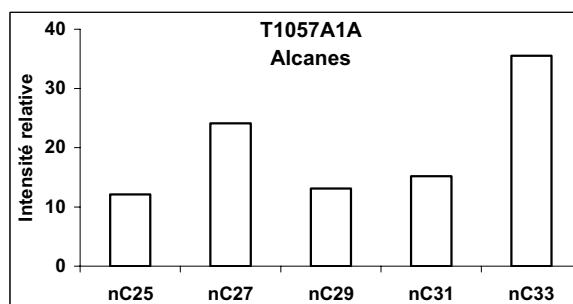
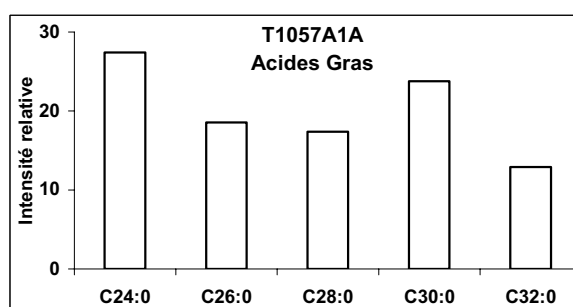
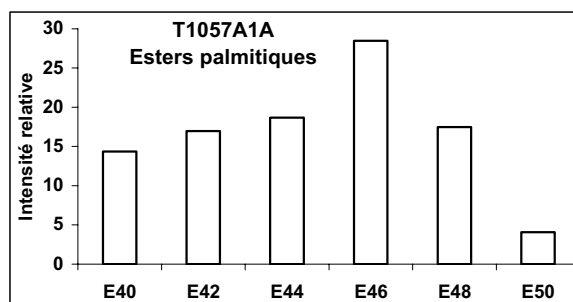
Cire d'abeille



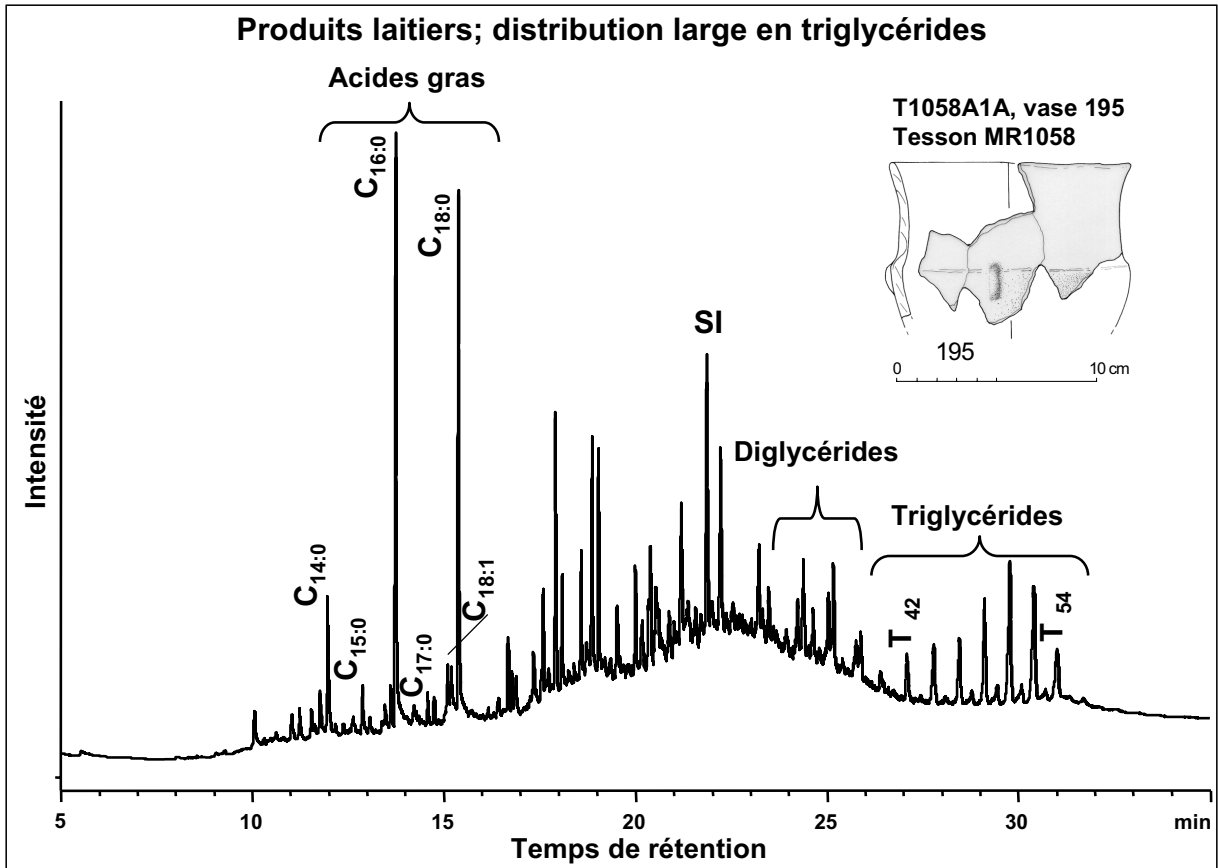
Vase tulipiforme 190, tesson MR1057								
Chromatographie en phase gazeuse								
T1057A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm								
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
4613.056	174.126	2.3486	100	1.00	20	0.04	500	100

Composé	Aire	%
C24:0	381.484	27.40
C26:0	258.457	18.56
C28:0	241.701	17.36
C30:0	331.025	23.77
C32:0	179.764	12.91
total	1392.432	100.000
E40	253.017	14.37
E42	298.831	16.97
E44	328.978	18.69
E46	500.894	28.45
E48	307.472	17.46
E50	71.389	4.05
total	1760.580	100.000
nC25	55.239	12.11
nC27	109.997	24.11
nC29	59.770	13.10
nC31	69.179	15.16
nC33	162.048	35.52
total	456.233	100.00

Concentration µg/g	225.60
% Acides gras	30.18
% Esters	38.17
% Alcanes	9.89



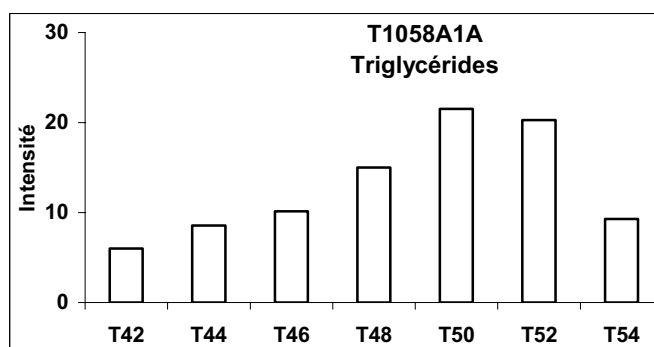
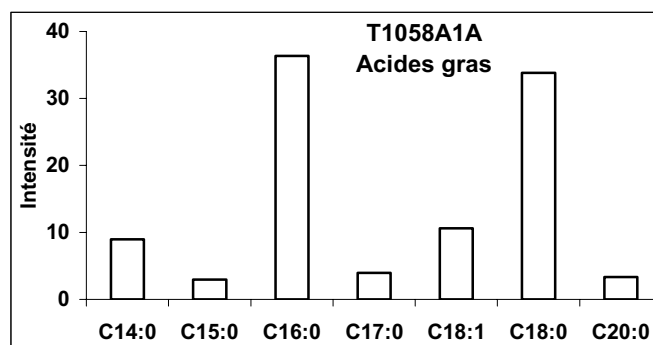
Vase 195

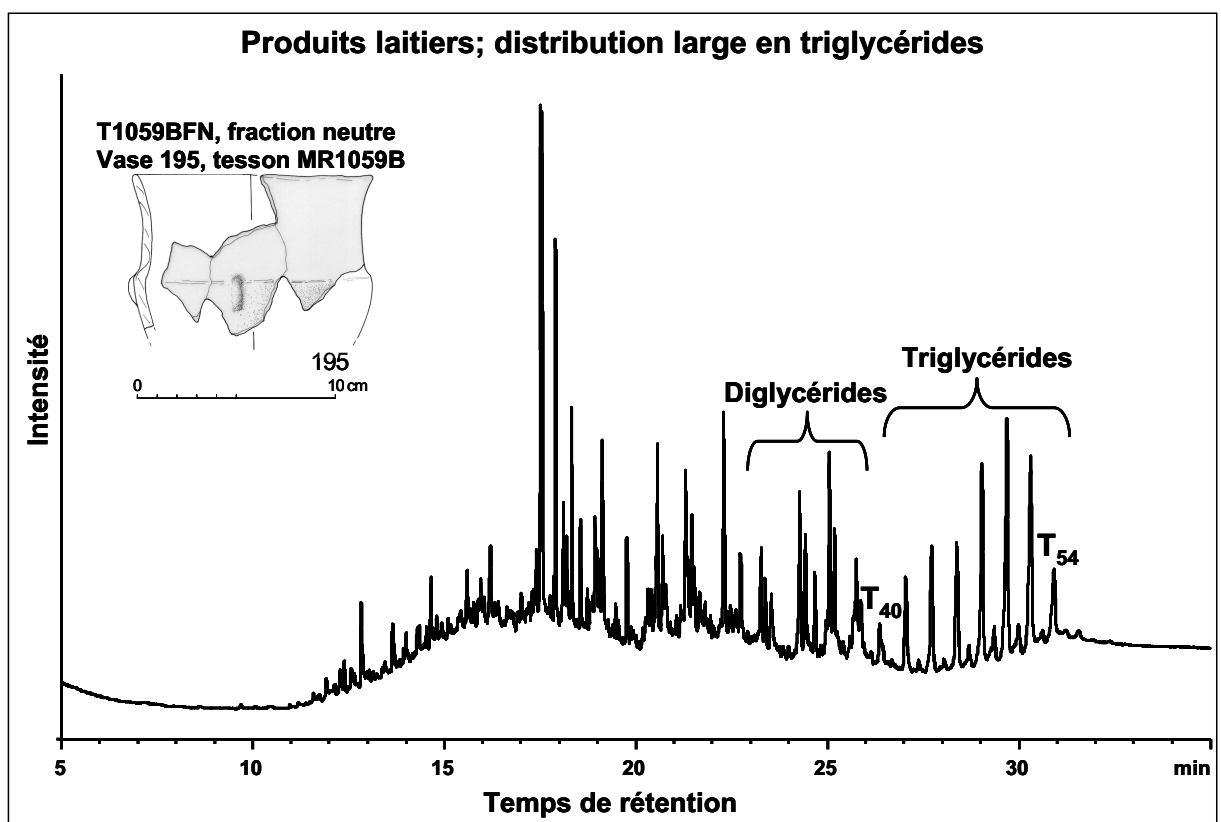
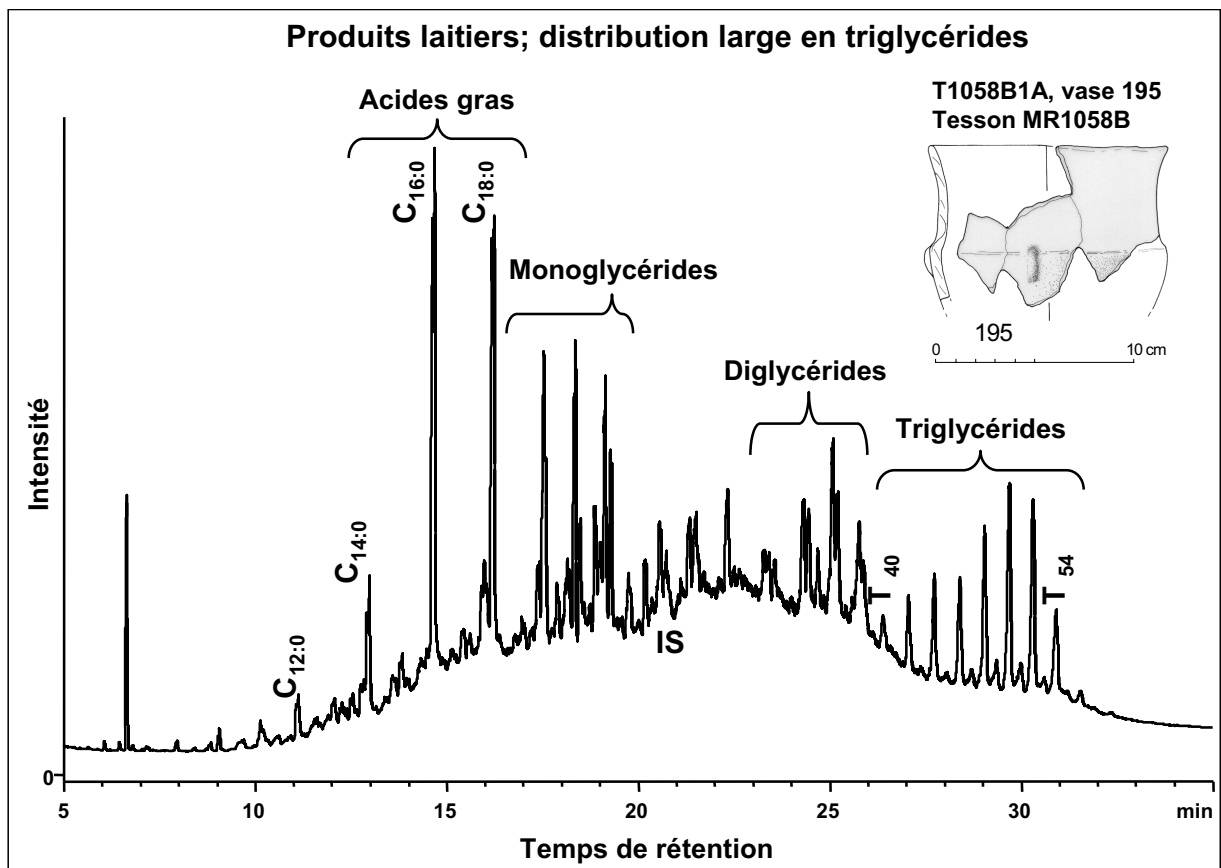


Vase à épaulement 195, tesson MR1058								
Chromatographie en phase gazeuse								
T1058A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm								
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
2570.851	124.264	3.6877	100.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

Composé	Aire	%
C14:0	57.401	8.97
C15:0	18.964	2.96
C16:0	232.501	36.33
C17:0	25.334	3.96
C18:1	68.007	10.63
C18:0	216.399	33.82
C20:0	21.286	3.33
total	639.892	100.000
T42	28.818	5.99
T44	41.108	8.54
T46	48.891	10.15
T48	72.253	15.01
T50	103.631	21.52
T52	97.617	20.27
T54	44.716	9.29
total	481.473	90.770

Concentration µg/g	112.20
C16/C18	1.07
% Acides gras	24.89
% Triglycérides	18.73



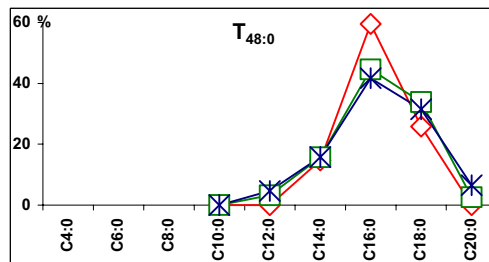
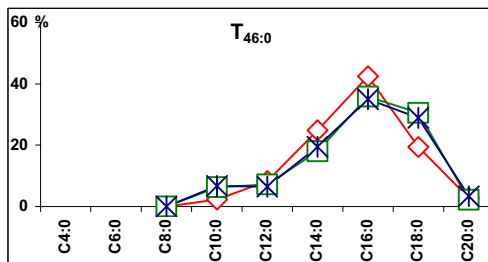
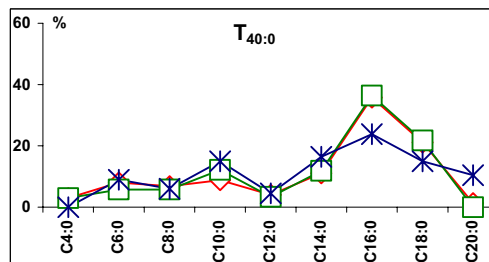
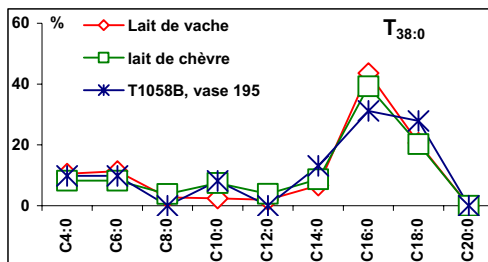


Spectrométrie de masse, nanoESI Q-q-TOF MS/MS
T1058BFN, fraction neutre
Produits laitiers de caprinés

Triglycérides détectés $T_{38:0:0}$ - $T_{52:0}$ $T_{46:1}$ - $T_{50:1}$

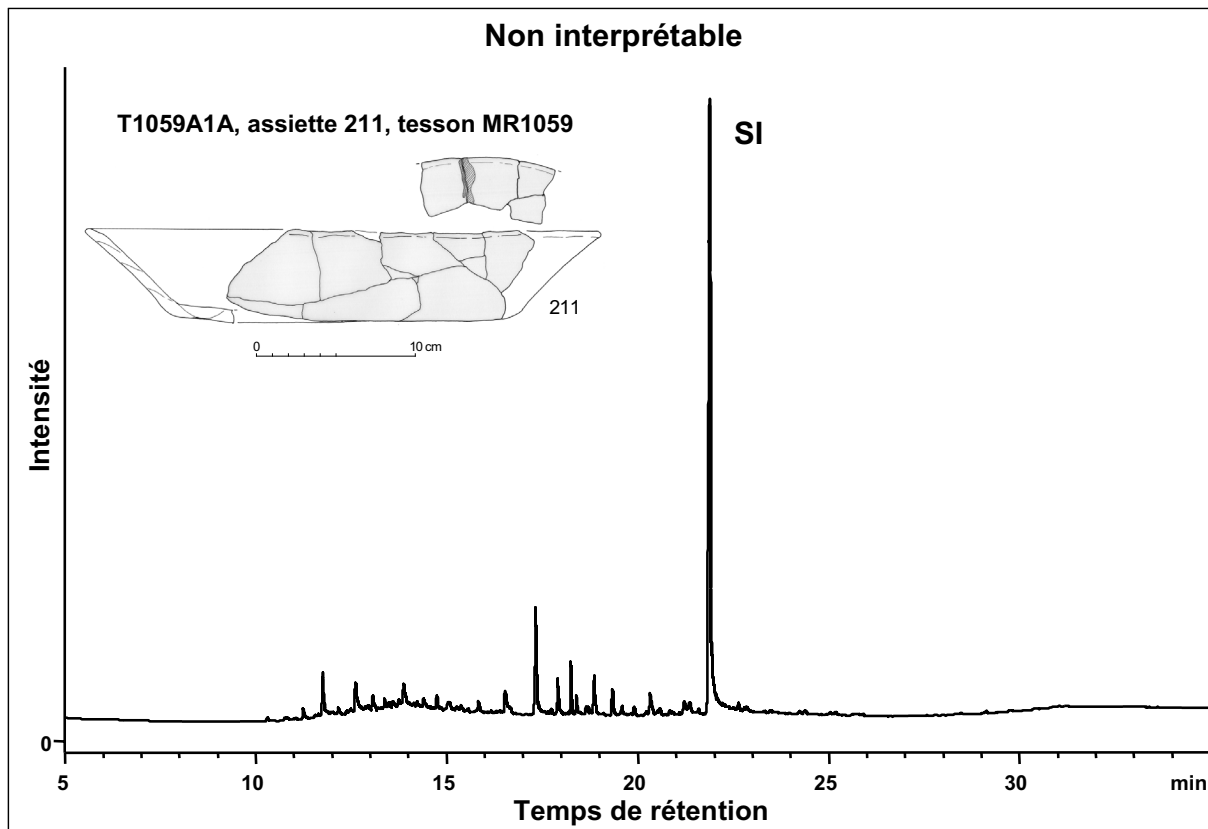
T1058BFN	C4:0	C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C17:0	C18:0	C19:0	C20:0
T38:0	9.83	9.83	0.00	8.19	0.00	13.12	31.14	0.00	27.88		
T40:0		8.95	5.98	14.93	4.49	16.41	23.88	0.00	14.93	0.00	10.44
T42:0			3.13	18.75	7.29	12.49	39.58	0.00	18.75		
T44:0			3.70	12.04	6.48	14.82	22.22	6.48	24.07	4.63	5.55
T46:0				6.73	6.50	19.50	34.98	0.00	28.93	0.00	3.37
T48:0					4.62	15.75	41.67	0.00	31.48	0.00	6.48
T50:0							48.49	3.03	42.43	0.00	6.05
T52:0							20.03	6.66	59.96	0.00	13.35

T1058BFN	C14:0	C16:1	C16:0	C18:1	C18:0	C20:1	C20:0
T46:1	14.97	30.03	24.98	20.02	10.01		
T48:1		7.40	40.73	0.00	29.60	11.13	11.13
T50:1			56.24	43.76			



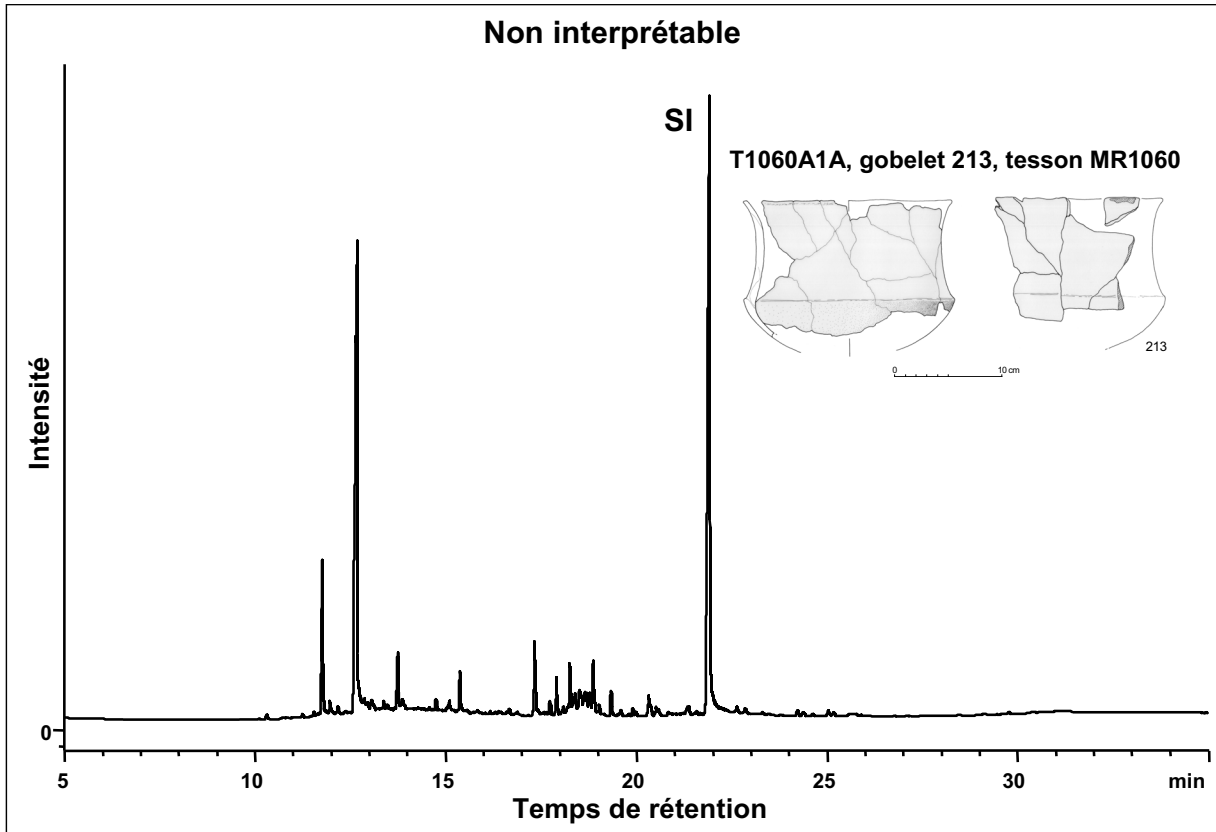
Assiette 211

Non interprétable

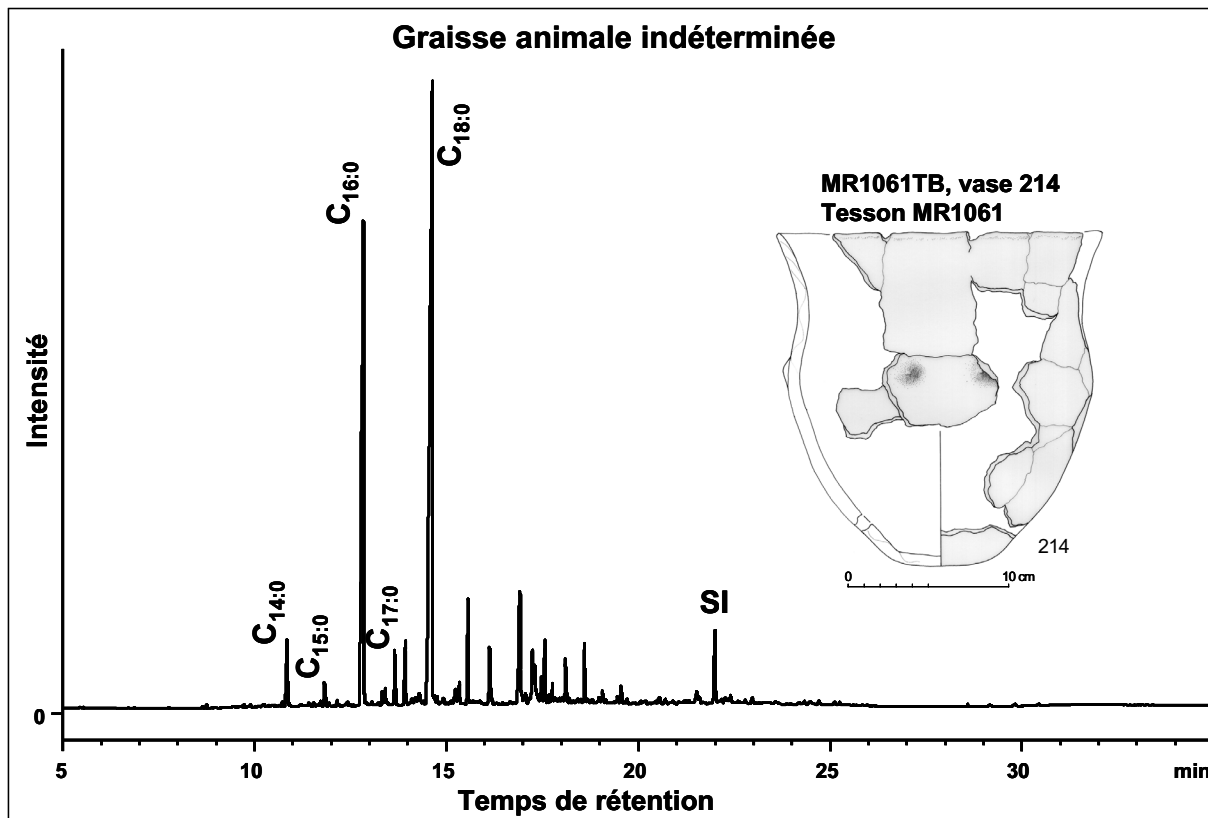


Gobelet 213

Non interprétable



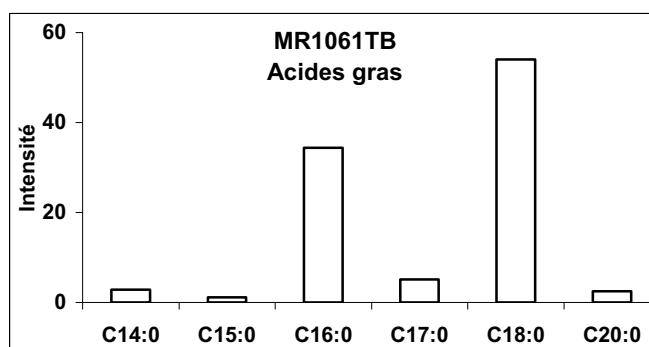
Vase 214

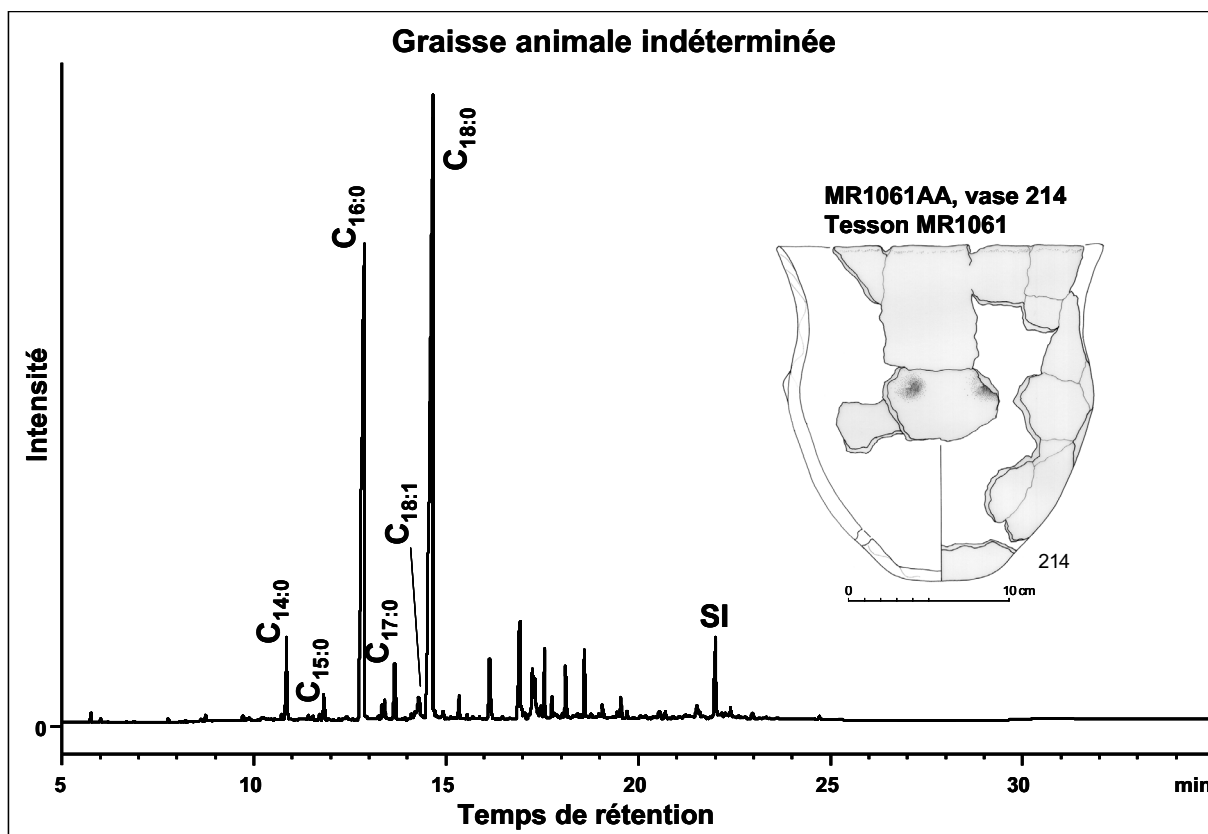


Vase à profil en S 214, tesson MR1061									
Chromatographie en phase gazeuse									
MR1061TB, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm									
Aire totale	Aire standard	masse tesson g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl	
10061.409	273.869	3.1503	50.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00	

Composé	Aire	%
C14:0	205.735	2.82
C15:0	80.263	1.10
C16:0	2507.957	34.37
C17:0	374.917	5.14
C18:0	3944.011	54.05
C20:0	183.649	2.52
total	7296.532	100.000
total TAGs	29.477	

Concentration µg/g	233.24
C16/C18	0.64
% Acides gras	72.52
% Triglycérides	0.29

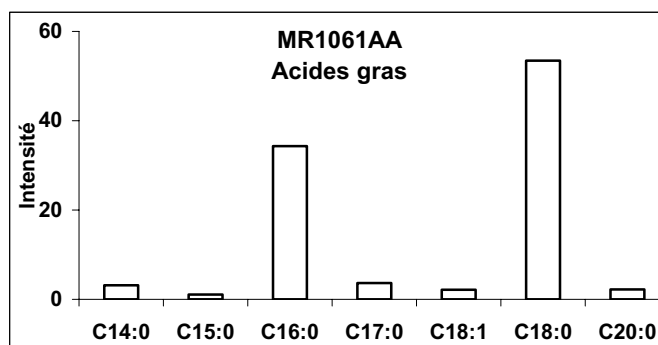


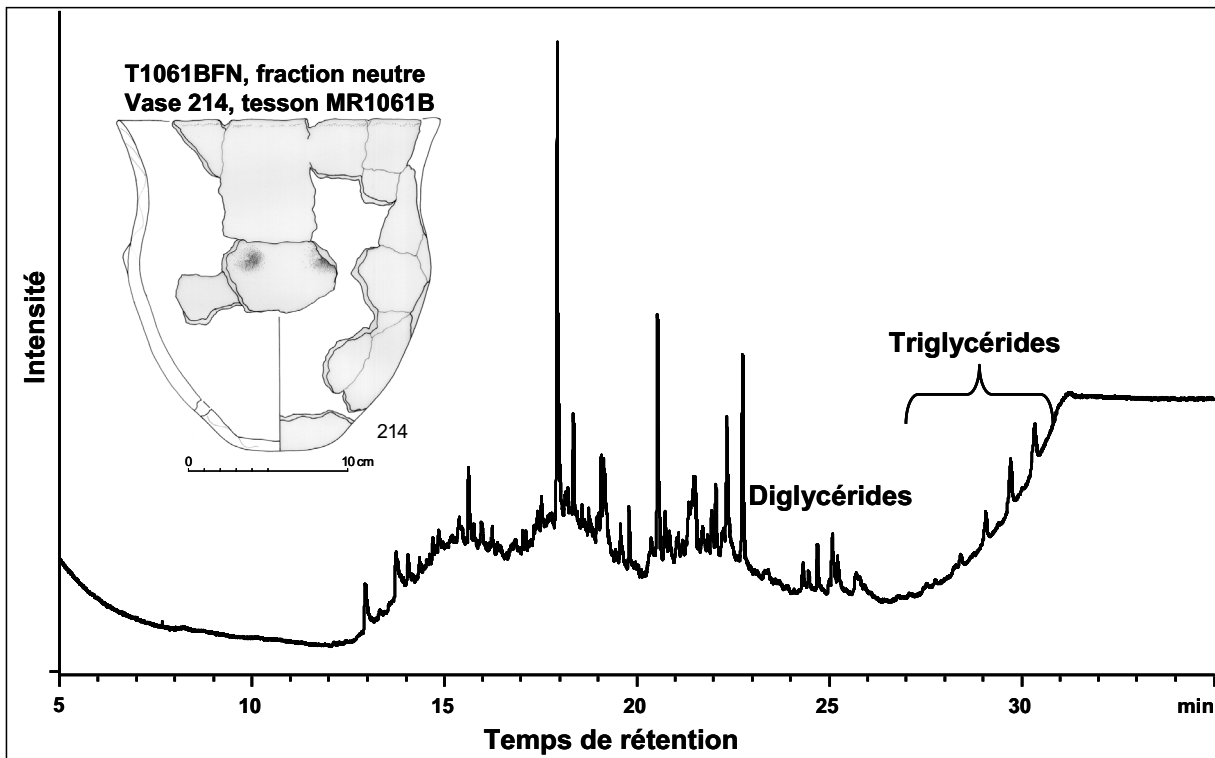
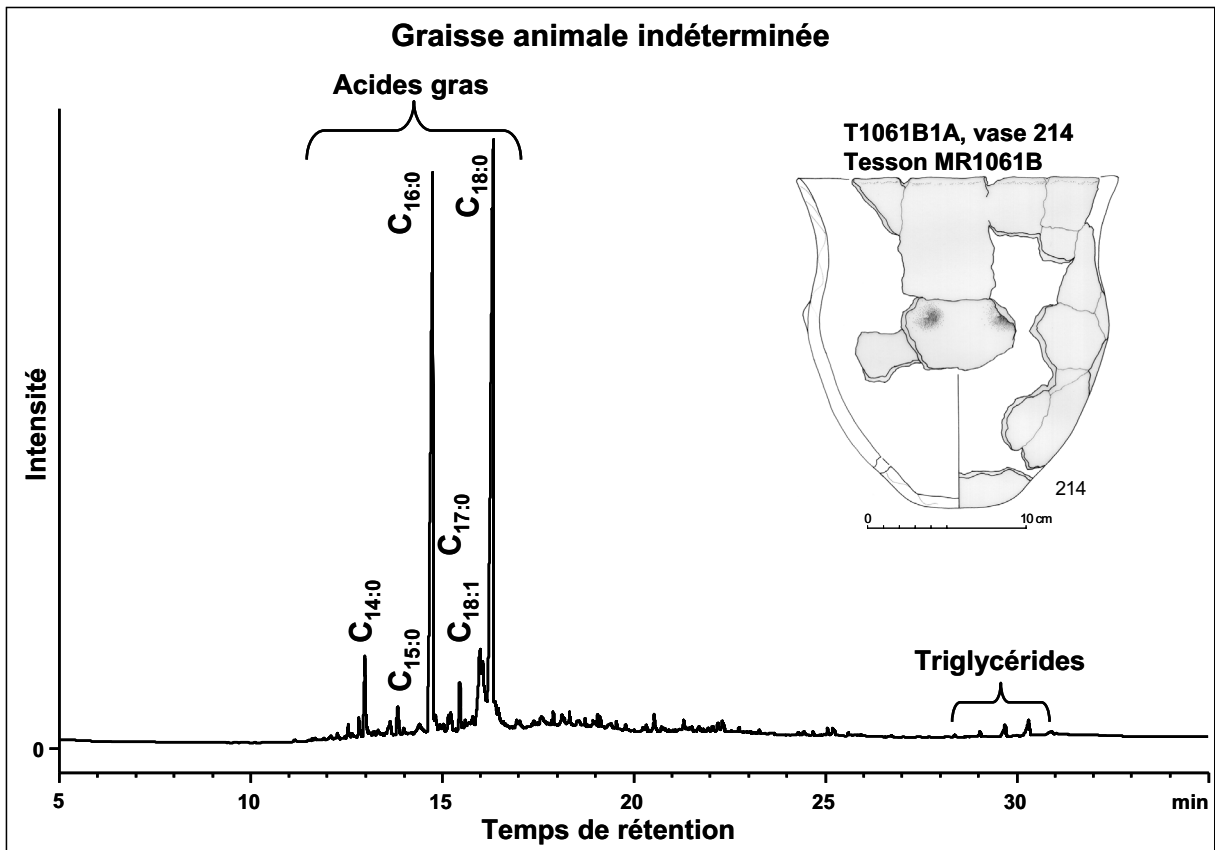


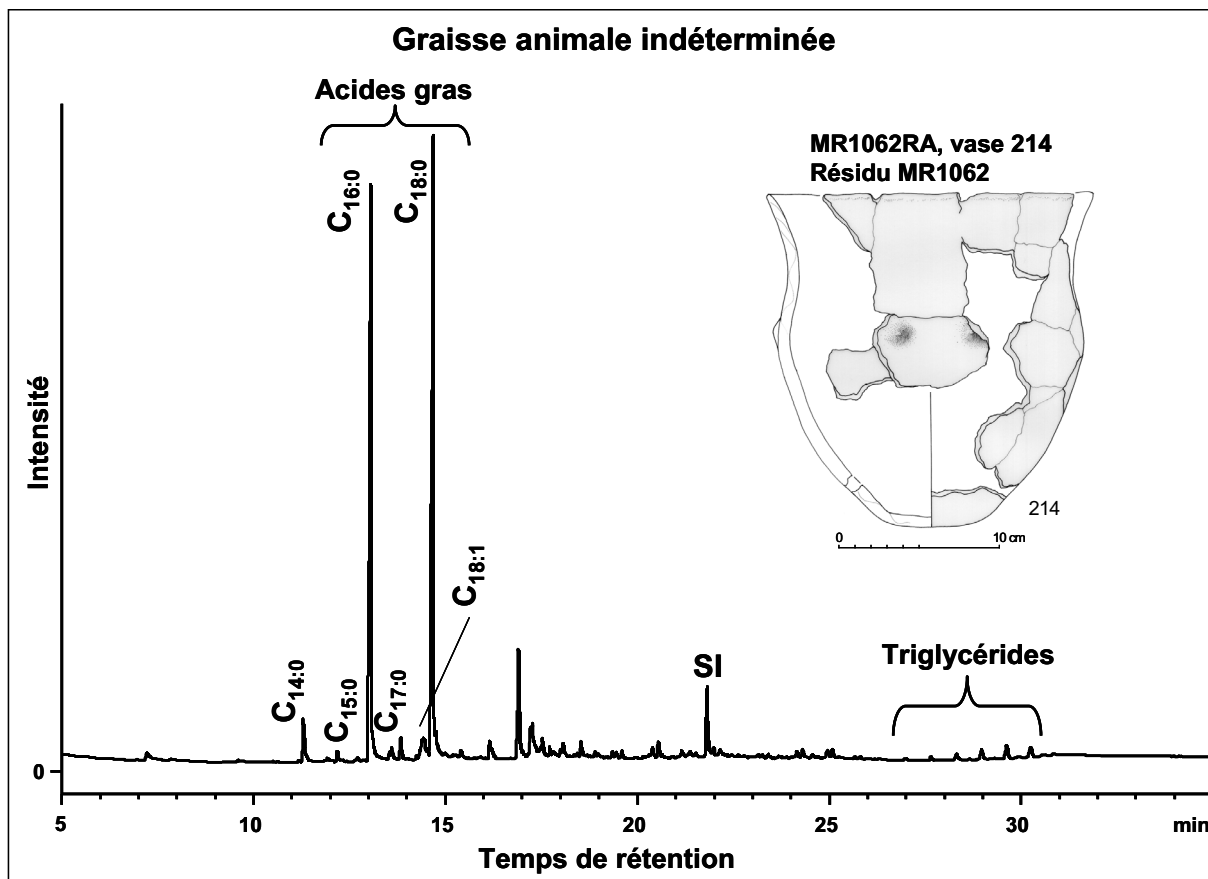
Vase à profil en S 214, tesson MR1061 (2eme aliquot)									
Chromatographie en phase gazeuse									
MR1061AA, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm									
Aire totale	Aire standard	masse tesson g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl	
13995.827	431.576	3.1503	50.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00	

Composé	Aire	%
C14:0	347.292	3.16
C15:0	114.325	1.04
C16:0	3763.936	34.30
C17:0	402.562	3.67
C18:1	233.718	2.13
C18:0	5866.515	53.46
C20:0	244.593	2.23
total	10972.941	100.000

Concentration µg/g	205.88
C16/C18	0.64
% Acides gras	78.40



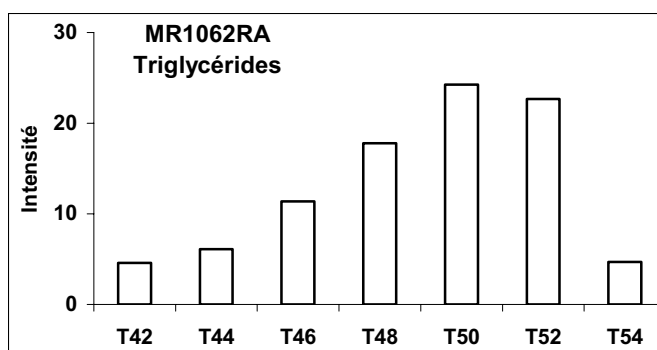
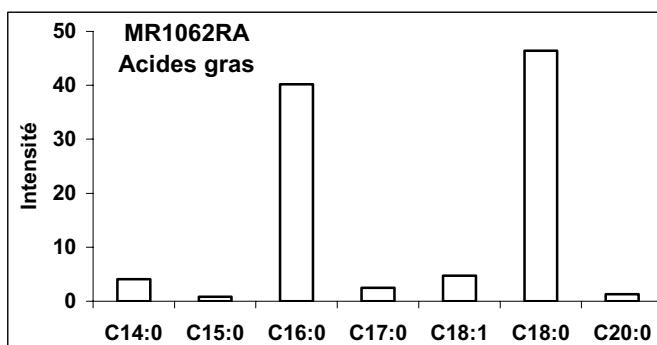


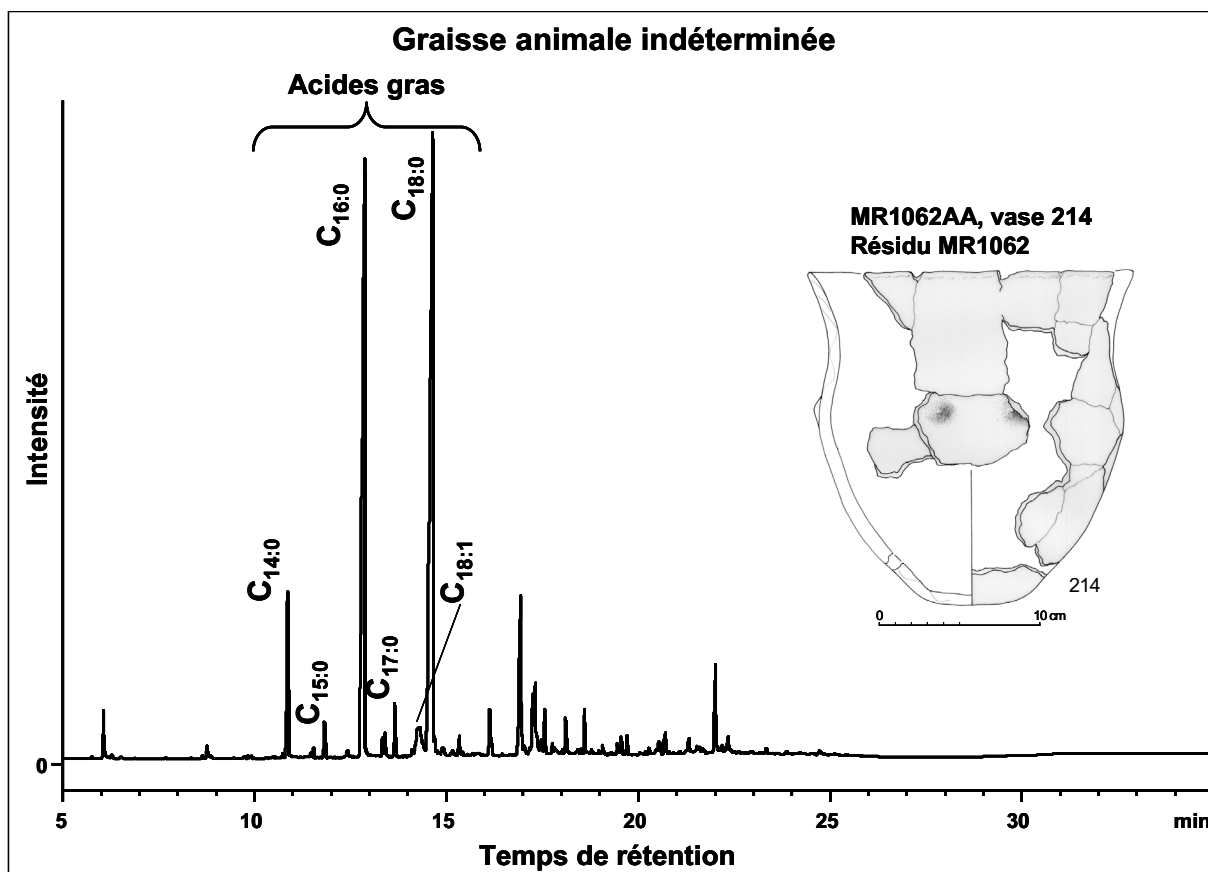


Vase à profil en S 214, résidu 1 MR1062								
Chromatographie en phase gazeuse								
MR1062RA, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm								
Aire totale	Aire standard	masse résidu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
4817.071	206.383	0.1924	100.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

Composé	Aire	%
C14:0	141.722	4.08
C15:0	29.071	0.84
C16:0	1397.121	40.21
C17:0	85.403	2.46
C18:1	164.006	4.72
C18:0	1611.979	46.40
C20:0	45.012	1.30
total	3474.315	100.000
T42	9.721	4.57
T44	12.969	6.10
T46	24.188	11.37
T48	37.839	17.78
T50	51.630	24.26
T52	48.231	22.67
T54	9.943	4.67
total	212.781	91.418

Concentration µg/g	2426.25
C16/C18	0.87
% Acides gras	72.13
% Triglycérides	4.42

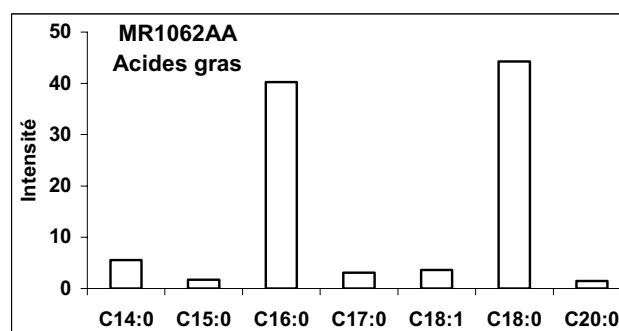


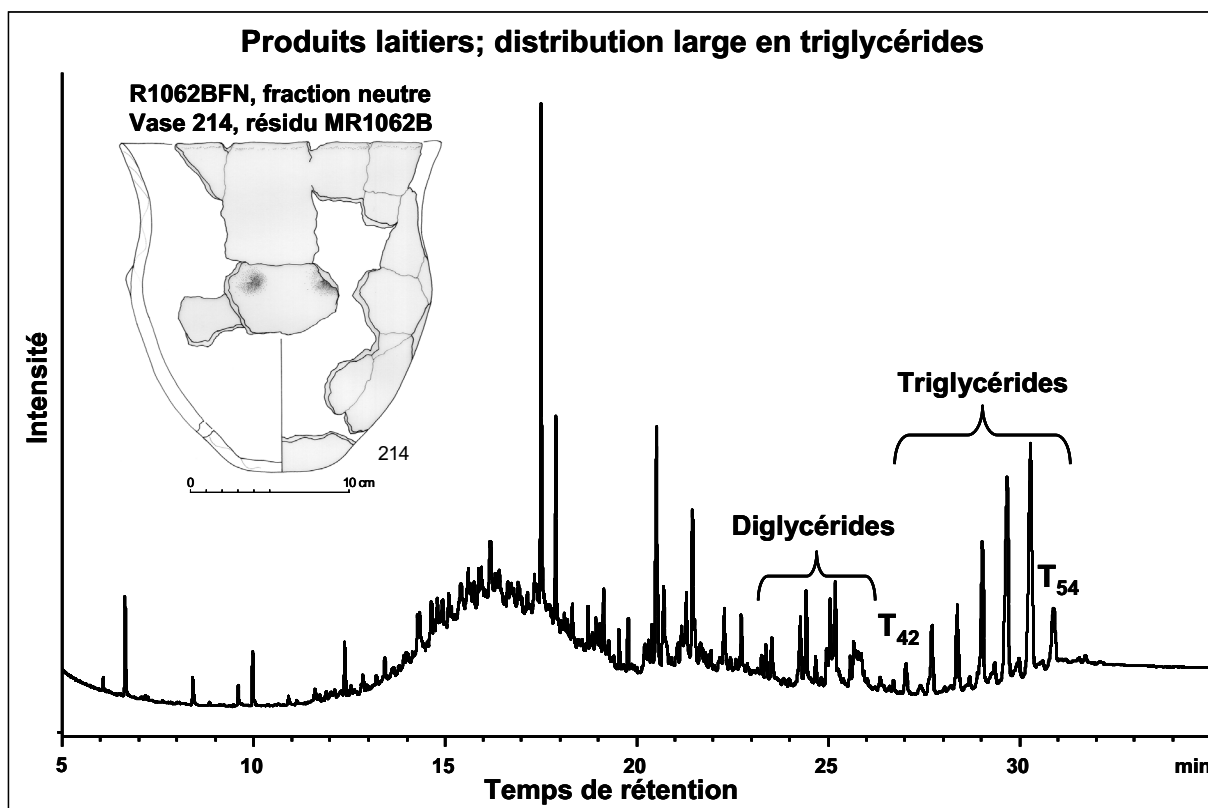
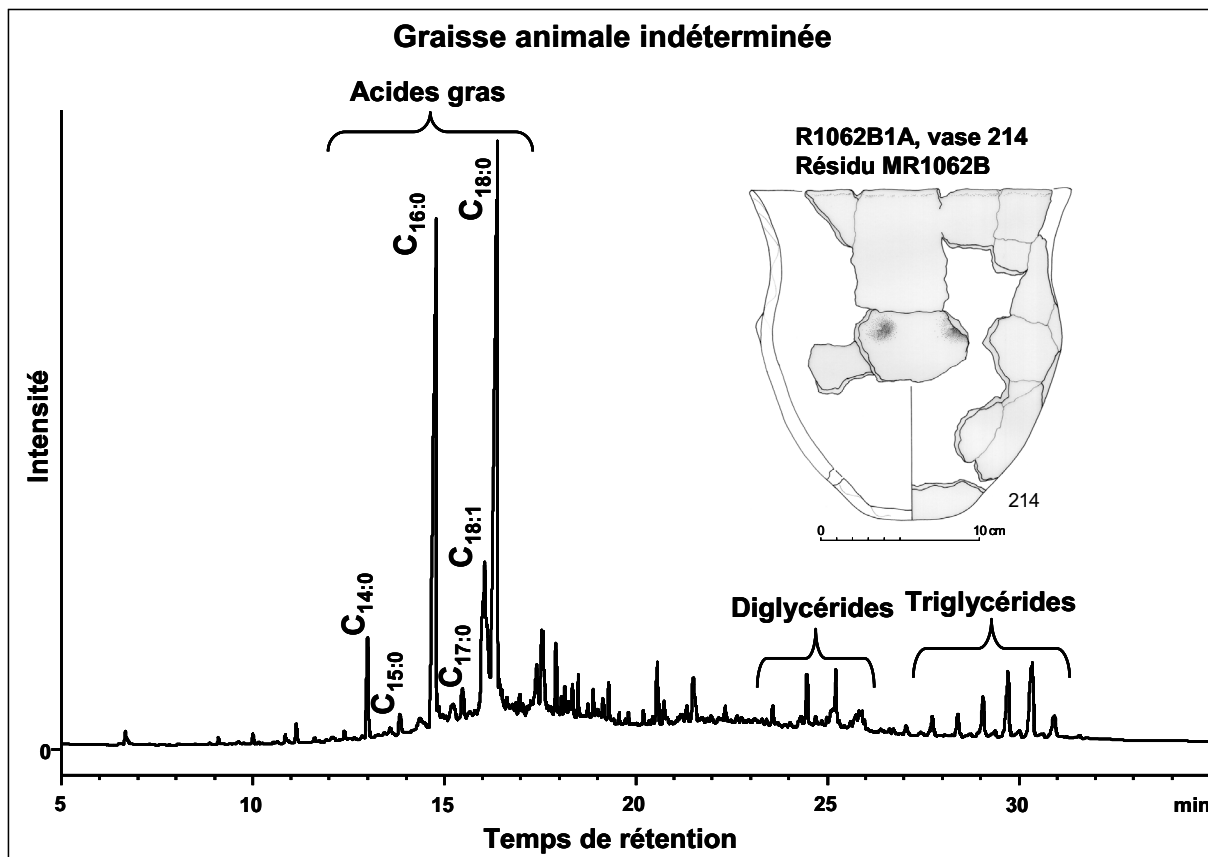


Vase à profil en S 214, résidu 1 MR1062								
Chromatographie en phase gazeuse								
MR1062AA, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm								
Aire totale	Aire standard	masse résidu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
13788.545	373.146	0.1924	50.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

Composé	Aire	%
C14:0	585.380	5.55
C15:0	179.658	1.70
C16:0	4250.652	40.27
C17:0	326.002	3.09
C18:1	382.800	3.63
C18:0	4673.072	44.27
C20:0	158.494	1.50
total	10556.059	100.000

Concentration µg/g	3841.18
C16/C18	0.91
% Acides gras	76.56



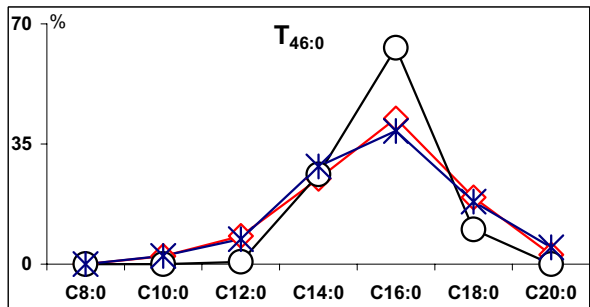
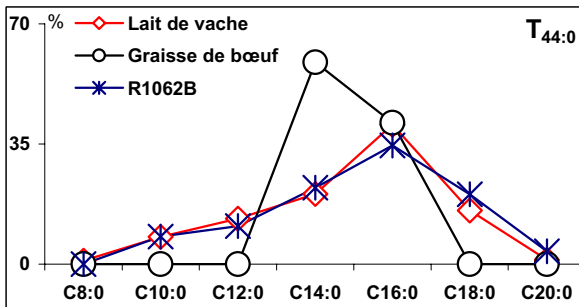
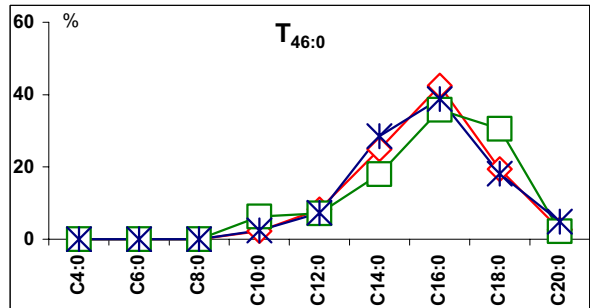
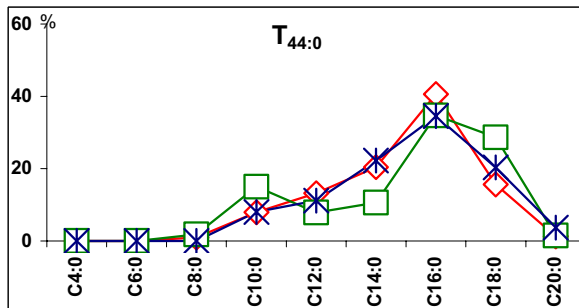
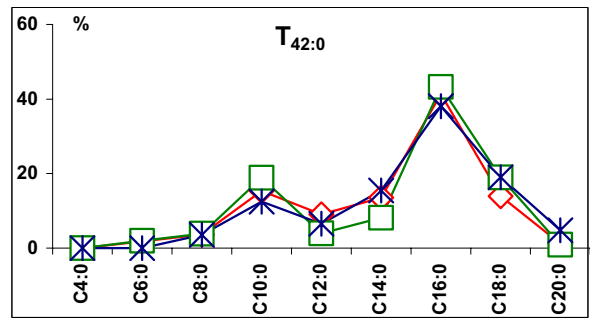
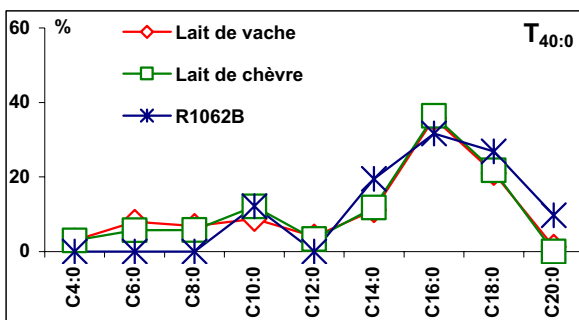


Spectrométrie de masse, nanoESI Q-q-TOF MS/MS
R1062BFN, fraction neutre
Produits laitiers de boviné

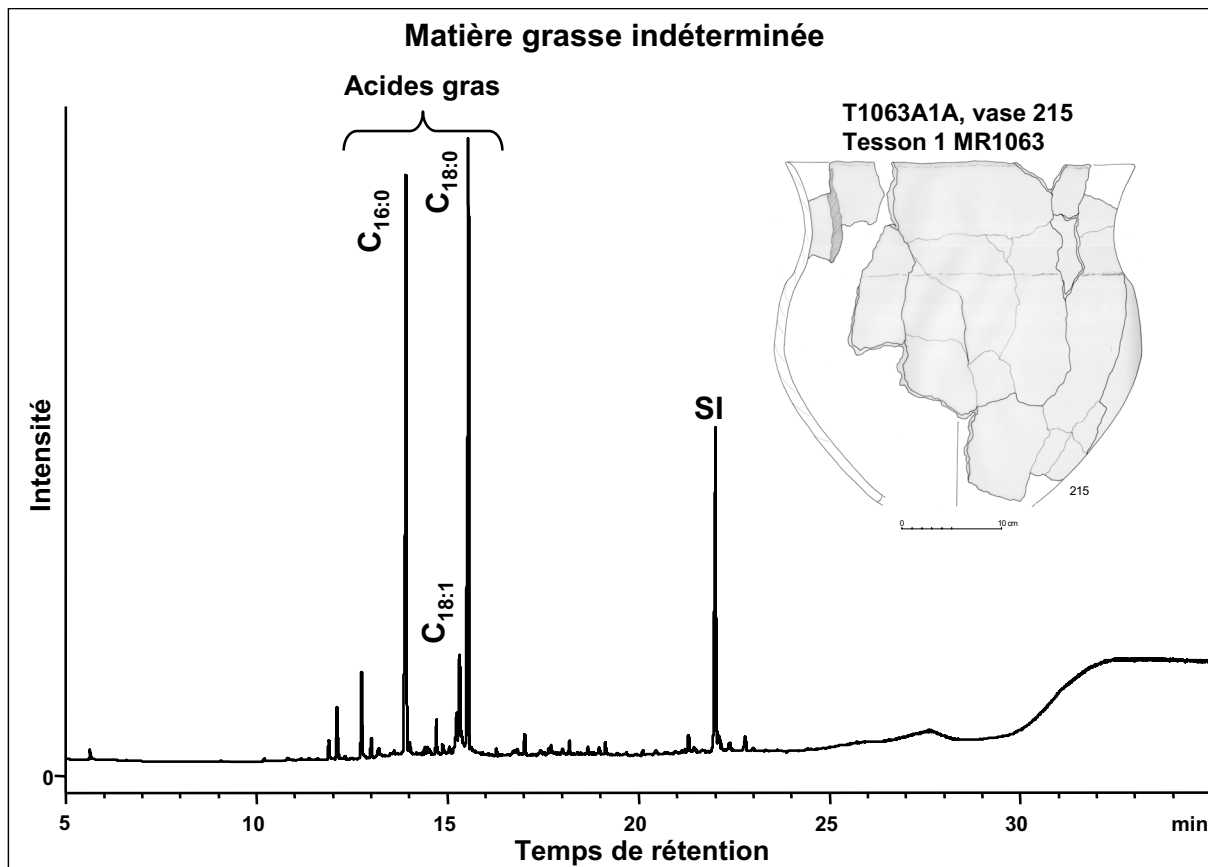
Triglycérides détectés $T_{40:0}-T_{52:0}$ $T_{46:1}; T_{50:1}-T_{52:1}$

R1062B	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C20:0
T40:0		12.20		19.49	31.70	26.86	9.75
T42:0	3.58	12.49	6.55	15.48	38.09	19.04	4.77
T44:0		8.02	11.11	22.23	34.57	20.37	3.70
T46:0		2.43	7.27	28.49	38.78	18.18	4.86
T48:0			4.08	18.37	46.93	26.54	4.08
T50:0				4.76	45.24	46.68	3.33
T52:0					24.40	68.26	7.33

R1062B	C12:0	C14:0	C16:1	C16:0	C18:1	C18:0	C20:0
T46:1	9.08	29.54	6.84	18.16	13.62	6.84	15.92
T50:1		7.89	3.29	37.50	34.88	13.16	3.29
T52:1				21.69	40.36	37.95	



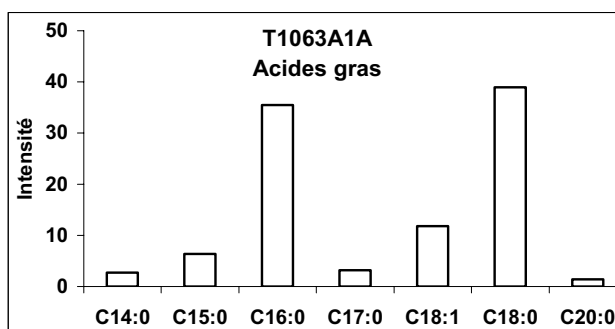
Vase 215

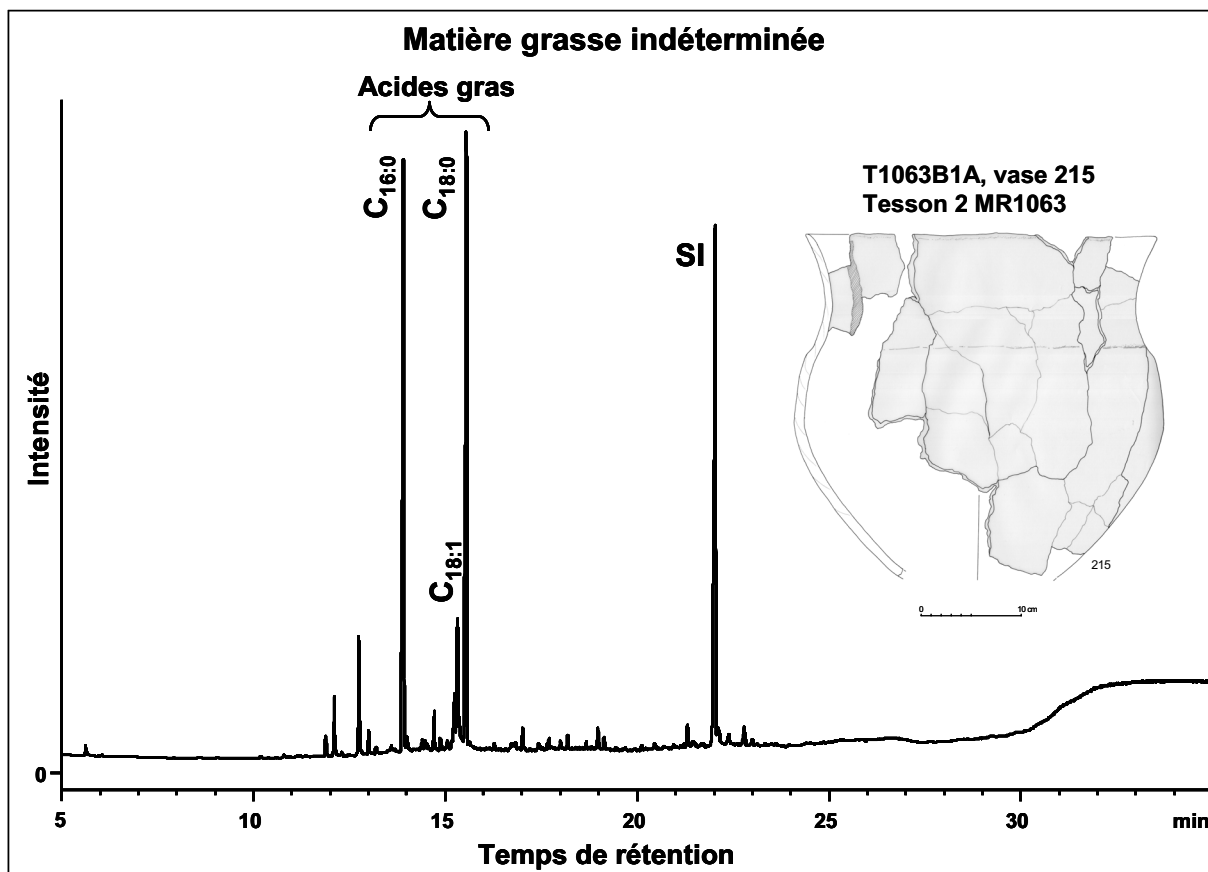


Vase pseudo-tulipiforme 215, tesson 1 MR1063									
Chromatographie en phase gazeuse									
T1063A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm									
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl	
1944.945	408.407	2.855	50.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00	

Composé	Aire	%
C14:0	45.346	2.71
C15:0	107.224	6.40
C16:0	593.994	35.44
C17:0	53.858	3.21
C18:1	198.302	11.83
C18:0	653.086	38.97
C20:0	24.215	1.44
total	1676.025	100.000

Concentration µg/g	33.36
C16/C18	0.91
% Acides gras	86.17

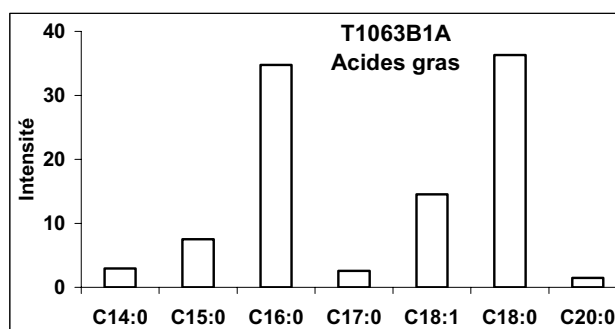




Vase pseudo-tulipiforme 215, tesson 2 MR1063									
Chromatographie en phase gazeuse									
T1063B1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm									
Aire totale	Aire standard	masse résidu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl	
2254.655	733.954	2.1438	50.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00	

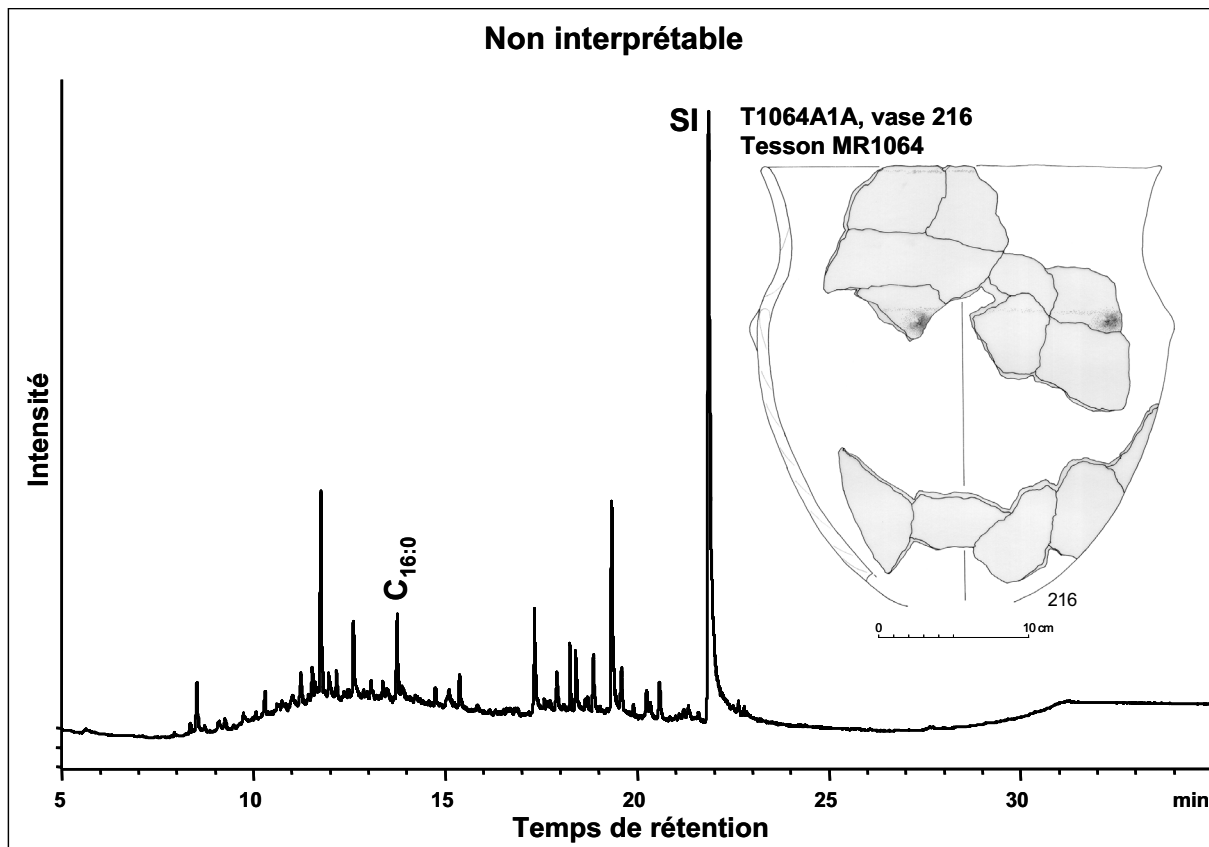
Composé	Aire	%
C14:0	54.516	2.9
C15:0	140.785	7.5
C16:0	651.406	34.7
C17:0	47.516	2.5
C18:1	272.498	14.5
C18:0	681.002	36.3
C20:0	27.084	1.4
total	1874.807	100.0

Concentration µg/g	28.66
C16/C18	0.96
% Acides gras	83.15

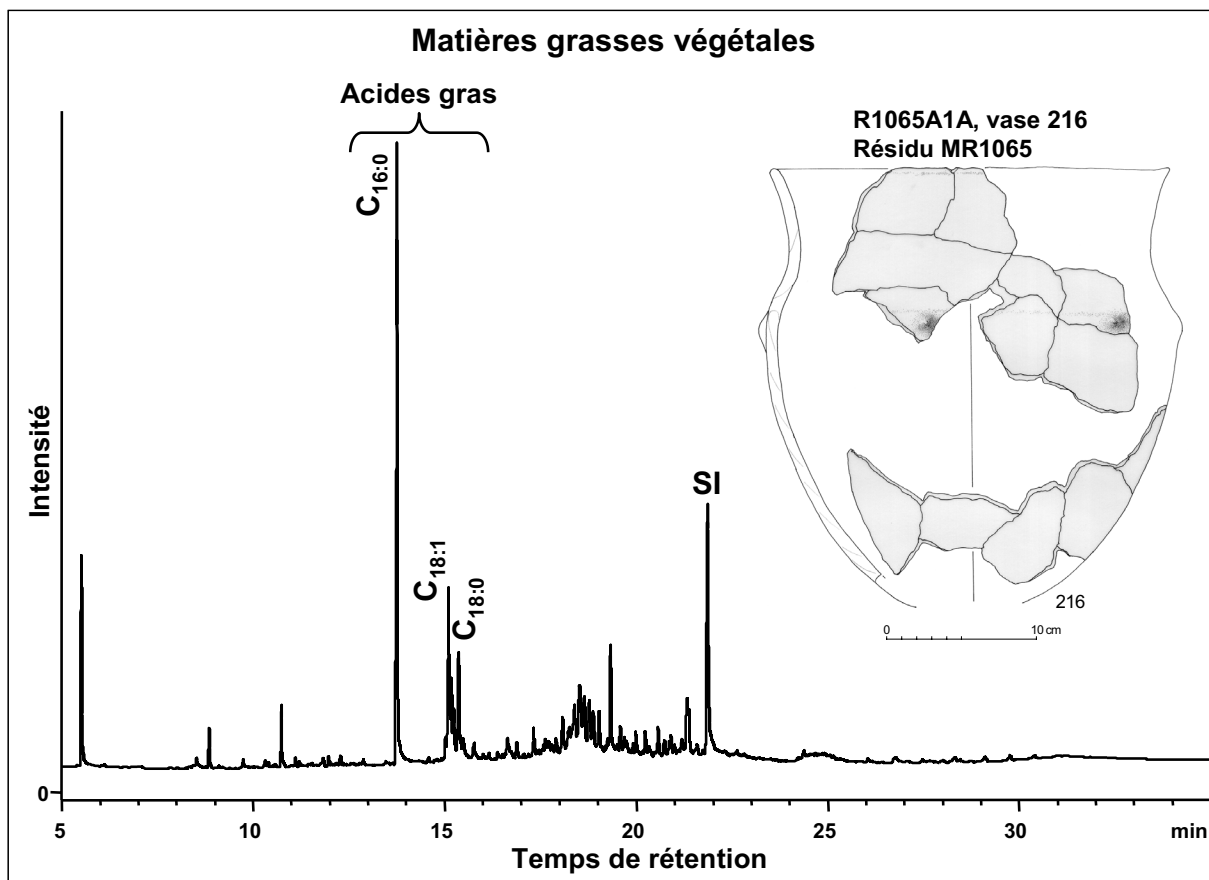


Vase 216

Non interprétable



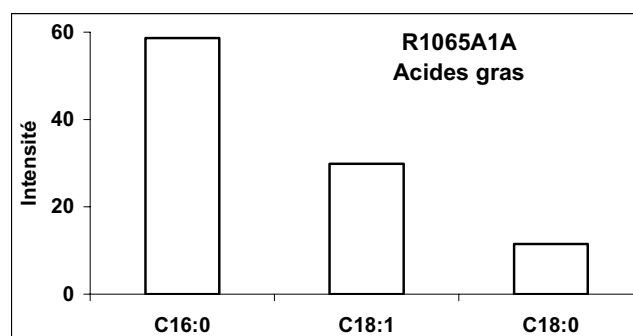
Matières grasses végétales

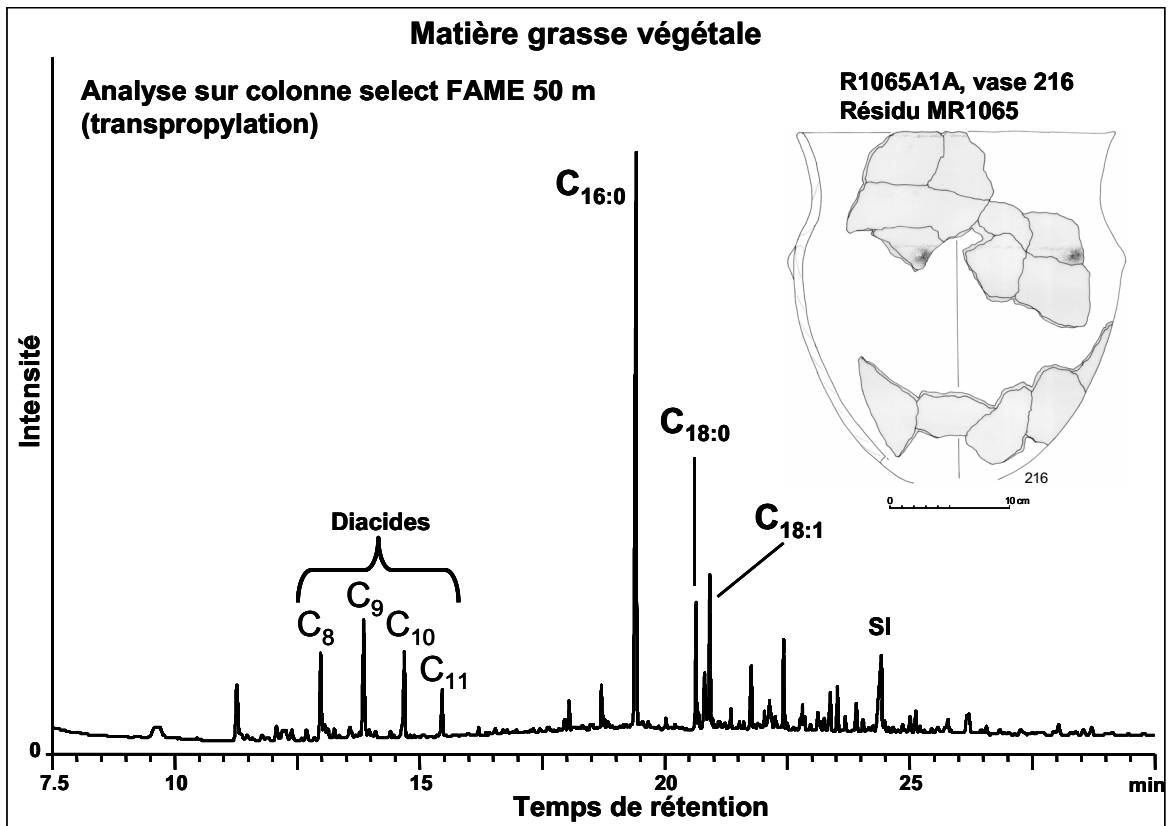


Vase pseudo-tulipiforme 216, résidu MR1065								
Chromatographie en phase gazeuse								
R1065A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm								
Aire totale	Aire standard	masse résidu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
1800.987	277.232	0.0835	100.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

Composé	Aire	%
C16:0	491.020	58.68
C18:1	249.669	29.84
C18:0	96.021	11.48
total	836.709	100.000
total TAGs	23.952	

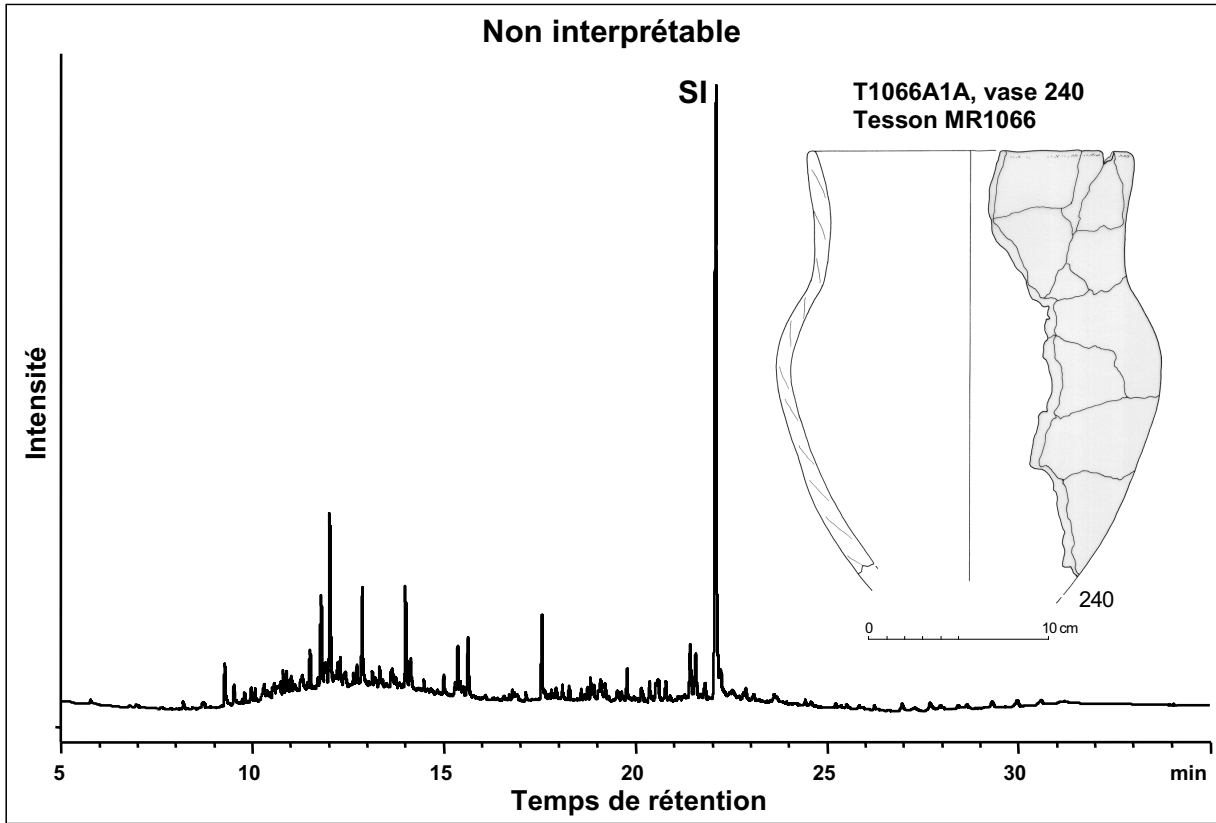
Concentration µg/g	1556.01
C16/C18	5.11
% Acides gras	46.46
% Triglycérides	1.33



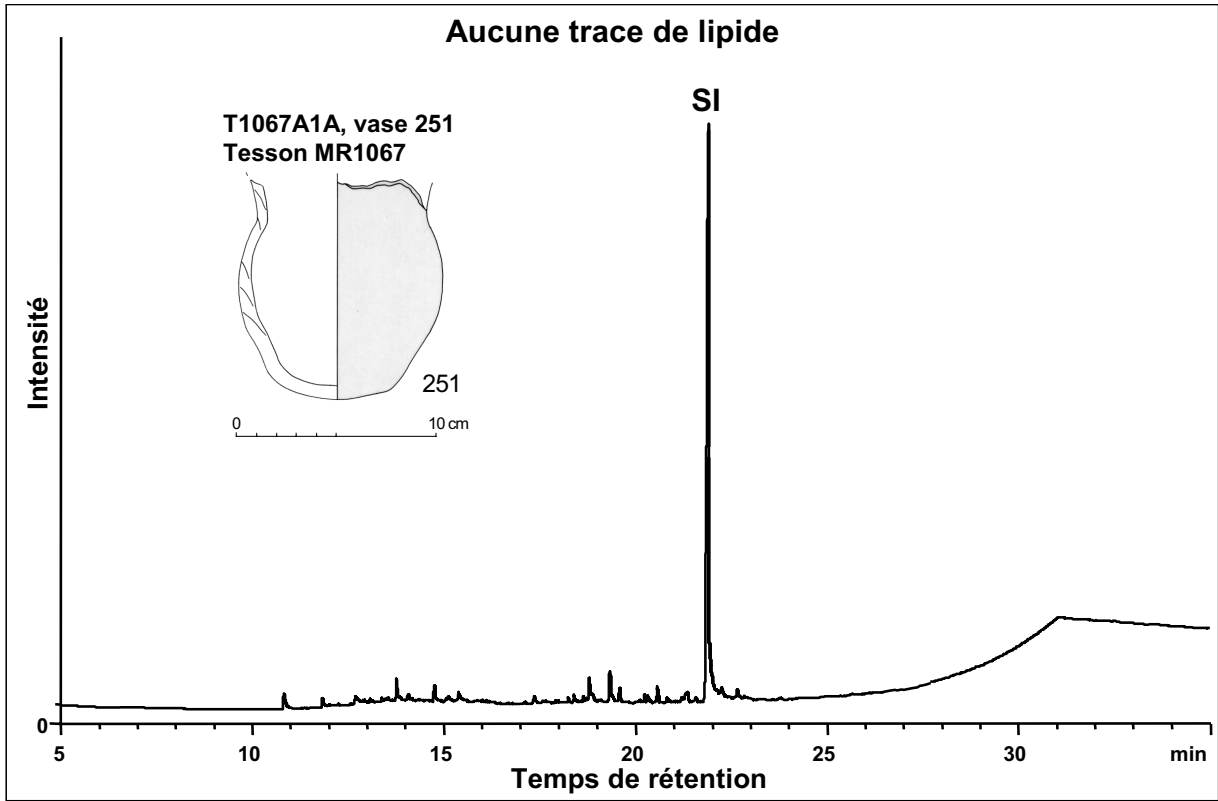


Vase 240

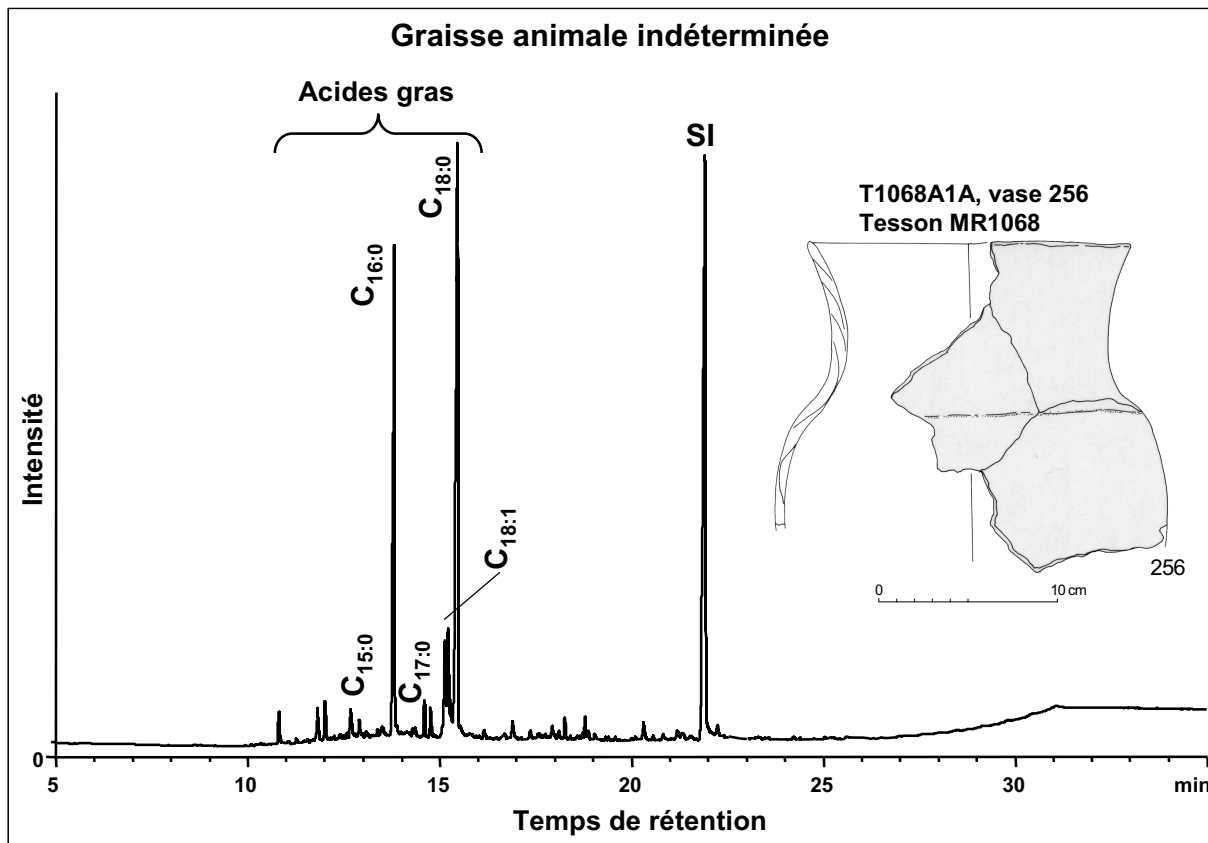
Non interprétable



Vase 251



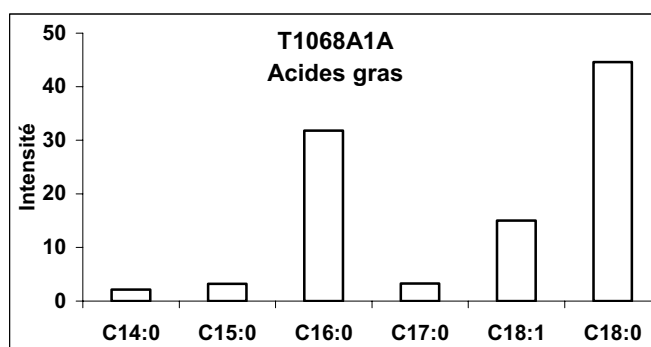
Vase 256

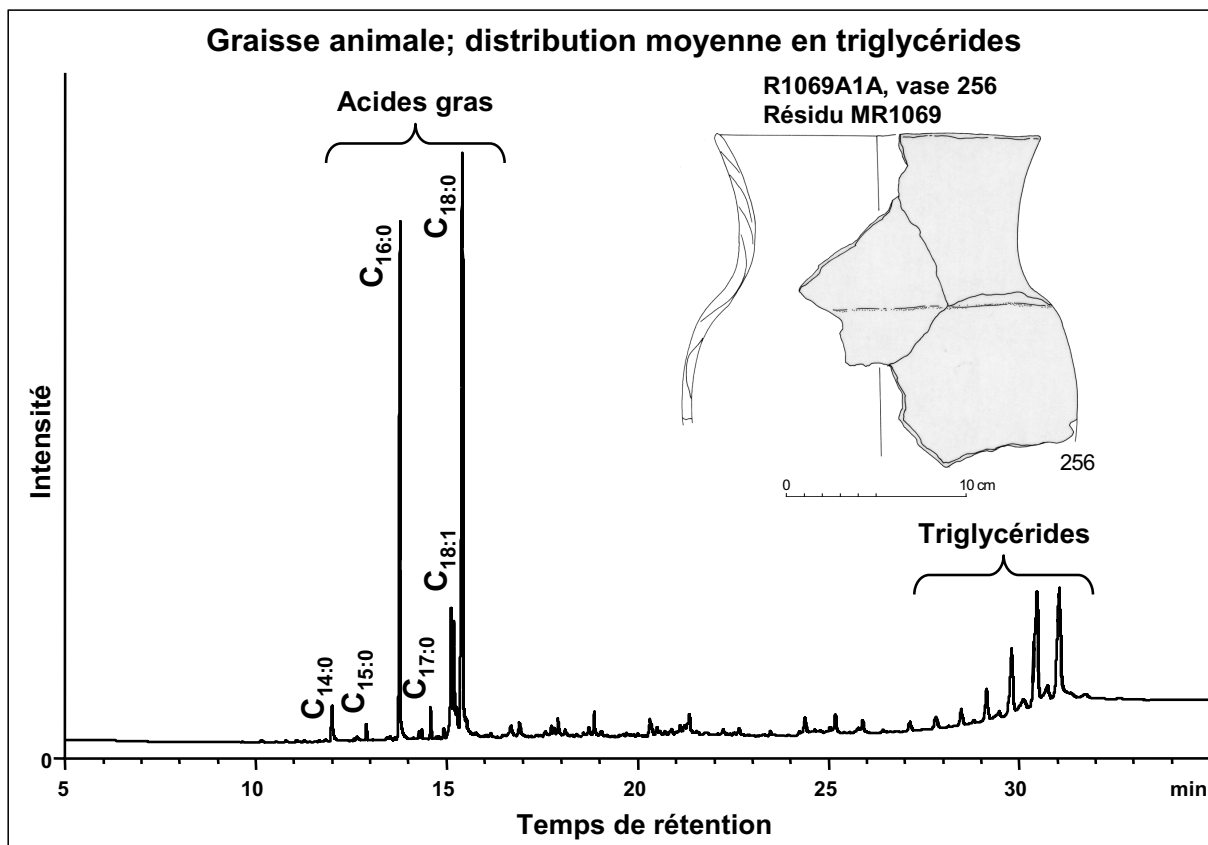


Vase pseudo-tulipiforme 256, tesson MR1068								
Chromatographie en phase gazeuse								
T1068A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm								
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
3717.552	1756.311	2.3558	30.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

Composé	Aire	%
C14:0	62.514	2.12
C15:0	94.470	3.21
C16:0	935.449	31.77
C17:0	96.958	3.29
C18:1	441.606	15.00
C18:0	1313.599	44.61
total	2944.596	100.000

Concentration µg/g	17.97
C16/C18	0.71
% Acides gras	79.21

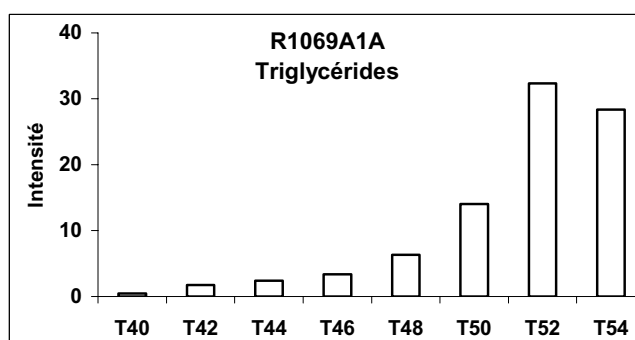
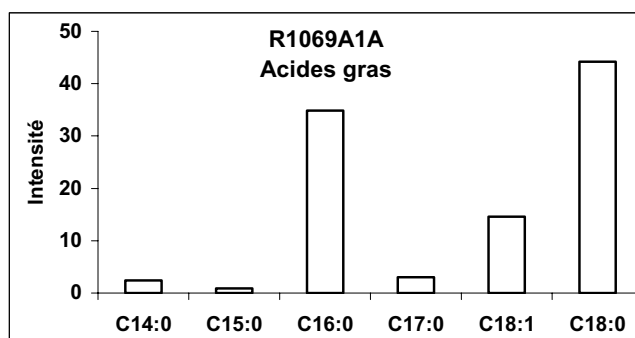




Vase pseudo-tulipiforme 256, résidu MR1069								
Chromatographie en phase gazeuse								
R1069A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm								
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
2967.035		0.0446	30.00	0.00	0.00	0.00	500.00	100.00

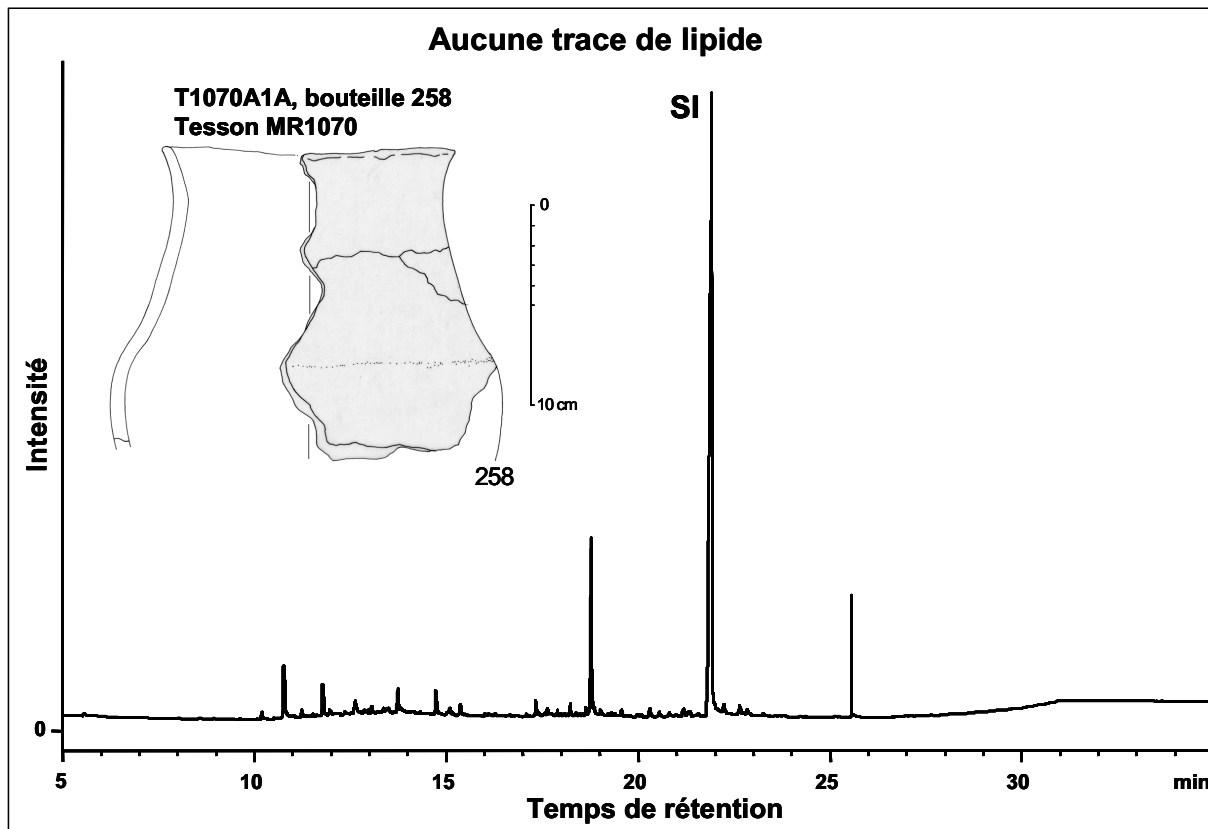
Composé	Aire	%
C14:0	37.567	2.42
C15:0	13.677	0.88
C16:0	542.342	34.89
C17:0	46.962	3.02
C18:1	227.076	14.61
C18:0	686.981	44.19
total	1554.605	100.000
T40	4.806	0.45
T42	18.539	1.73
T44	25.773	2.41
T46	35.976	3.36
T48	67.604	6.31
T50	150.315	14.04
T52	346.442	32.36
T54	303.485	28.35
total	1070.551	89.014

C16/C18	0.79
% Acides gras	52.40
% Triglycérides	36.08

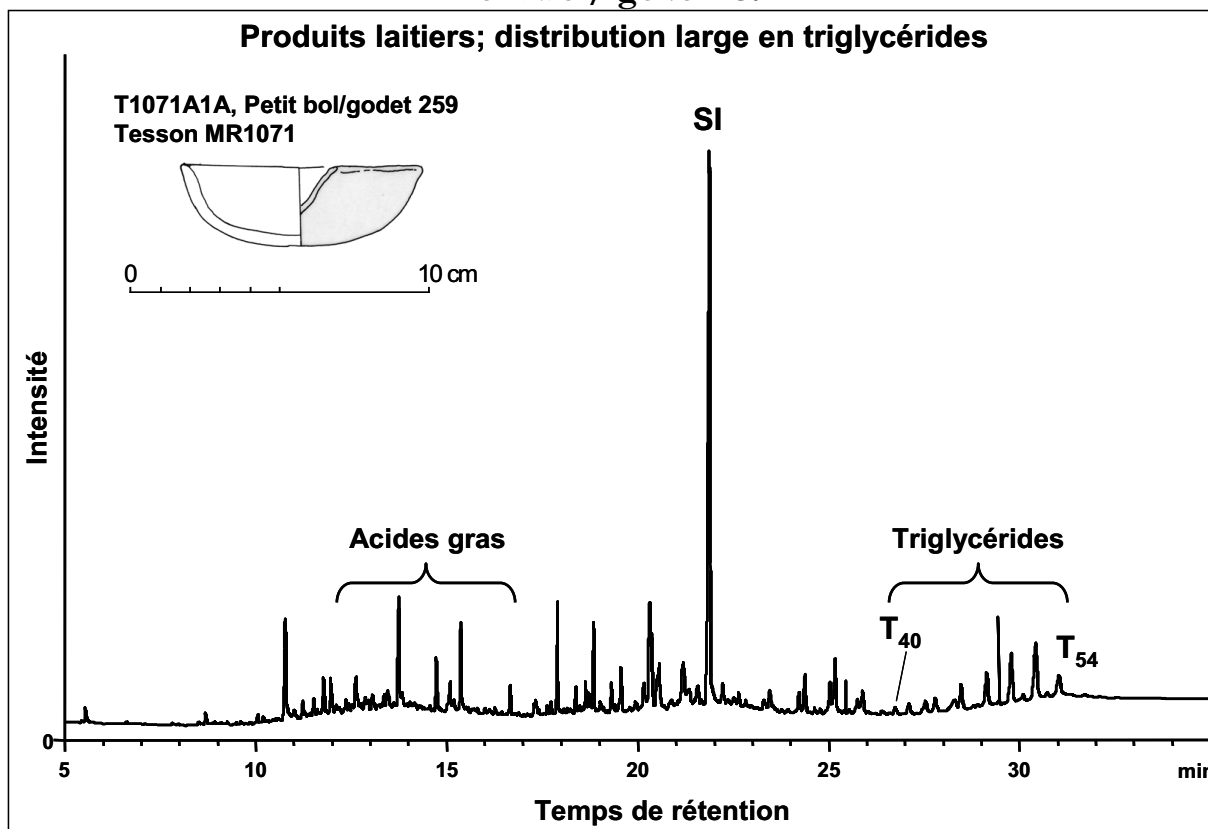


Bouteille 258

Aucune trace de lipide



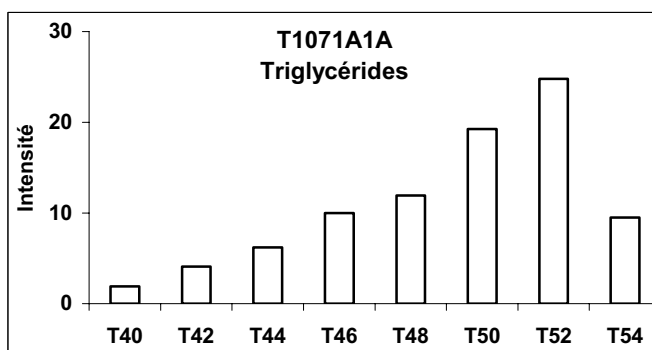
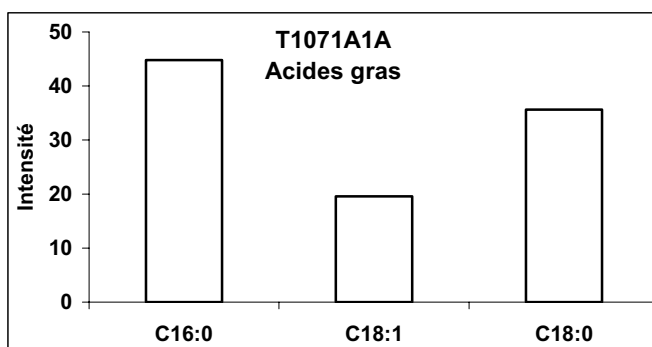
Petit bol/ godet 259

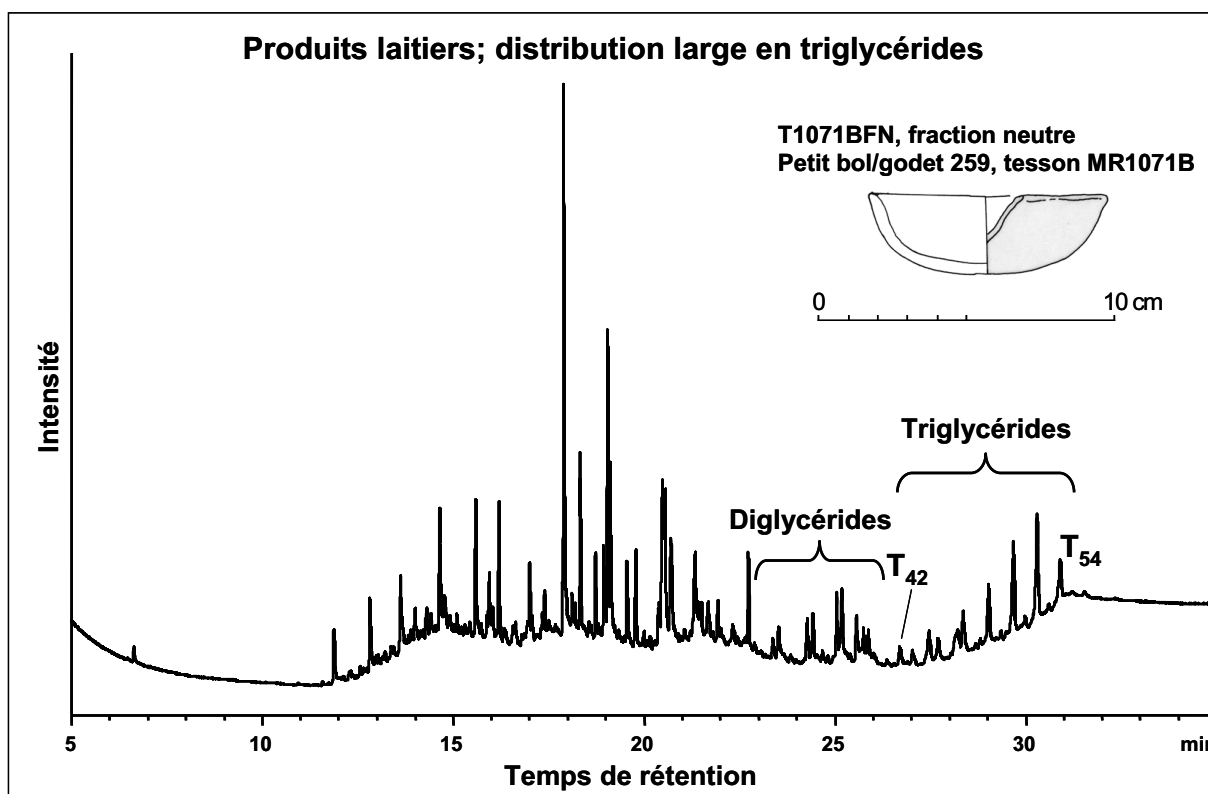
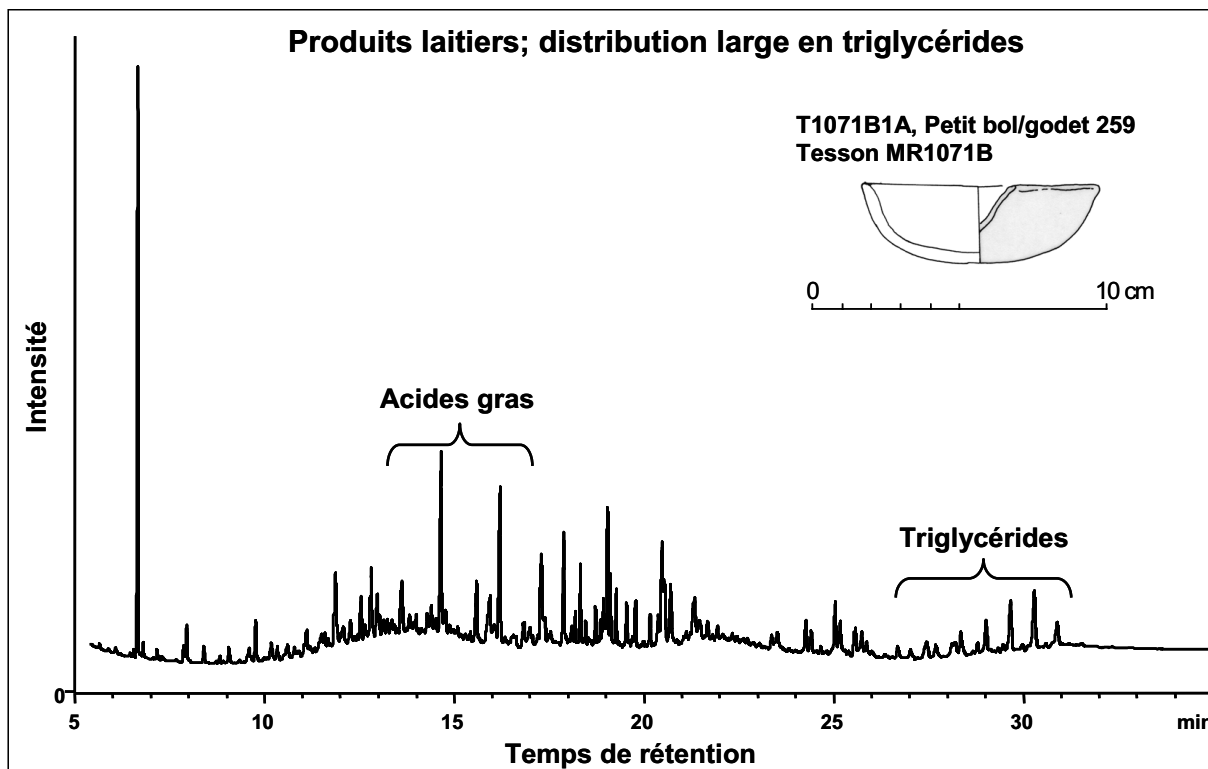


Petit bol 259, tesson MR1071								
Chromatographie en phase gazeuse								
T1071A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm								
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
3466.639	1099.675	2.8776	30.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

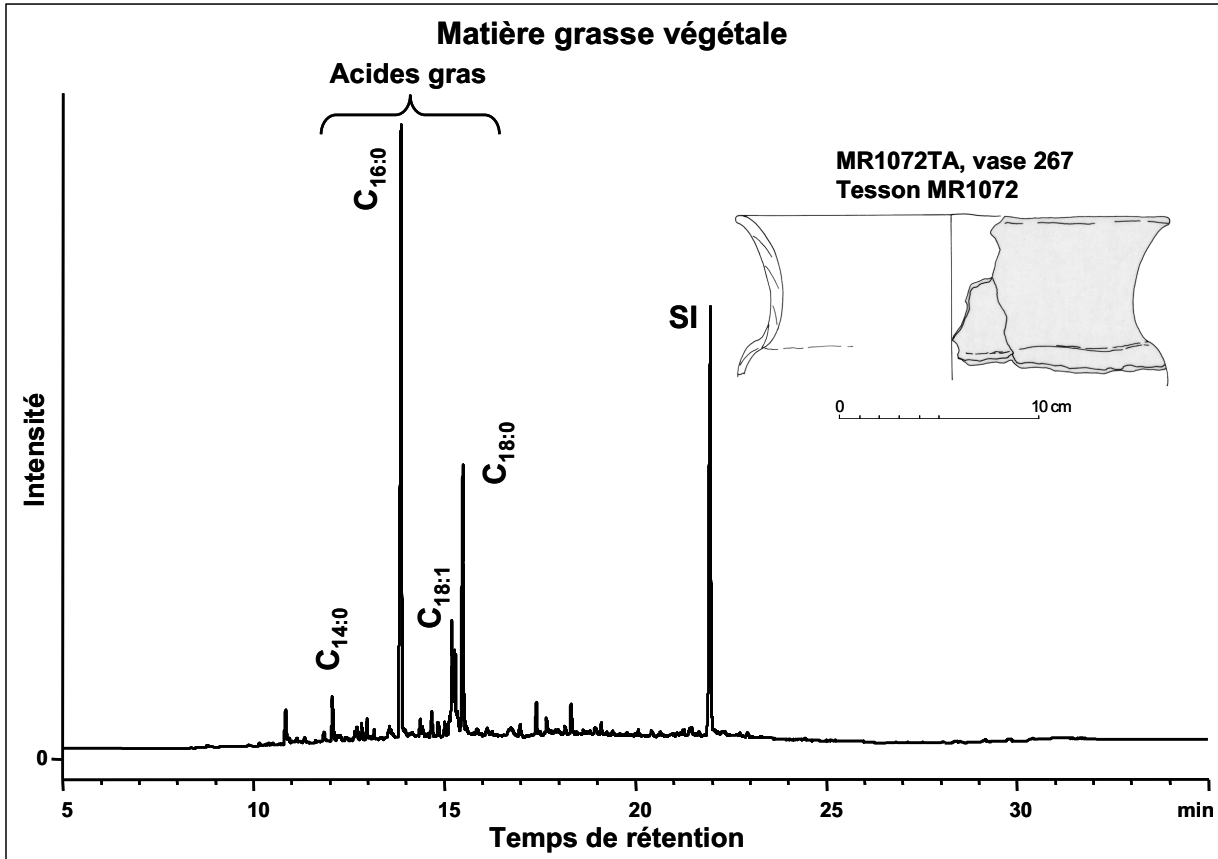
Composé	Aire	%
C16:0	153.145	44.82
C18:1	66.834	19.56
C18:0	121.710	35.62
total	341.689	100.000
T40	12.498	1.90
T42	26.940	4.10
T44	40.662	6.18
T46	65.768	10.00
T48	78.453	11.93
T50	126.648	19.26
T52	162.944	24.77
T54	62.425	9.49
total	657.724	87.626

Concentration µg/g	21.91
C16/C18	1.26
% Acides gras	9.86
% Triglycérides	16.63





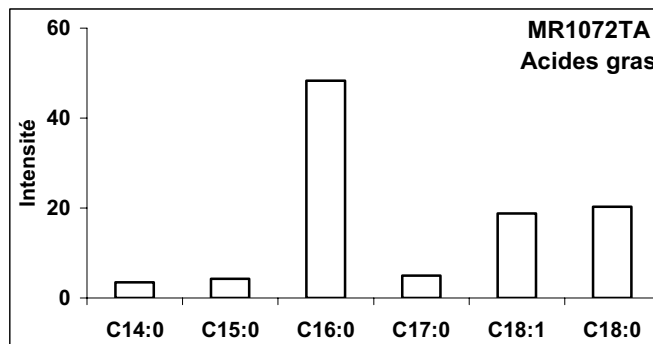
Vase 267

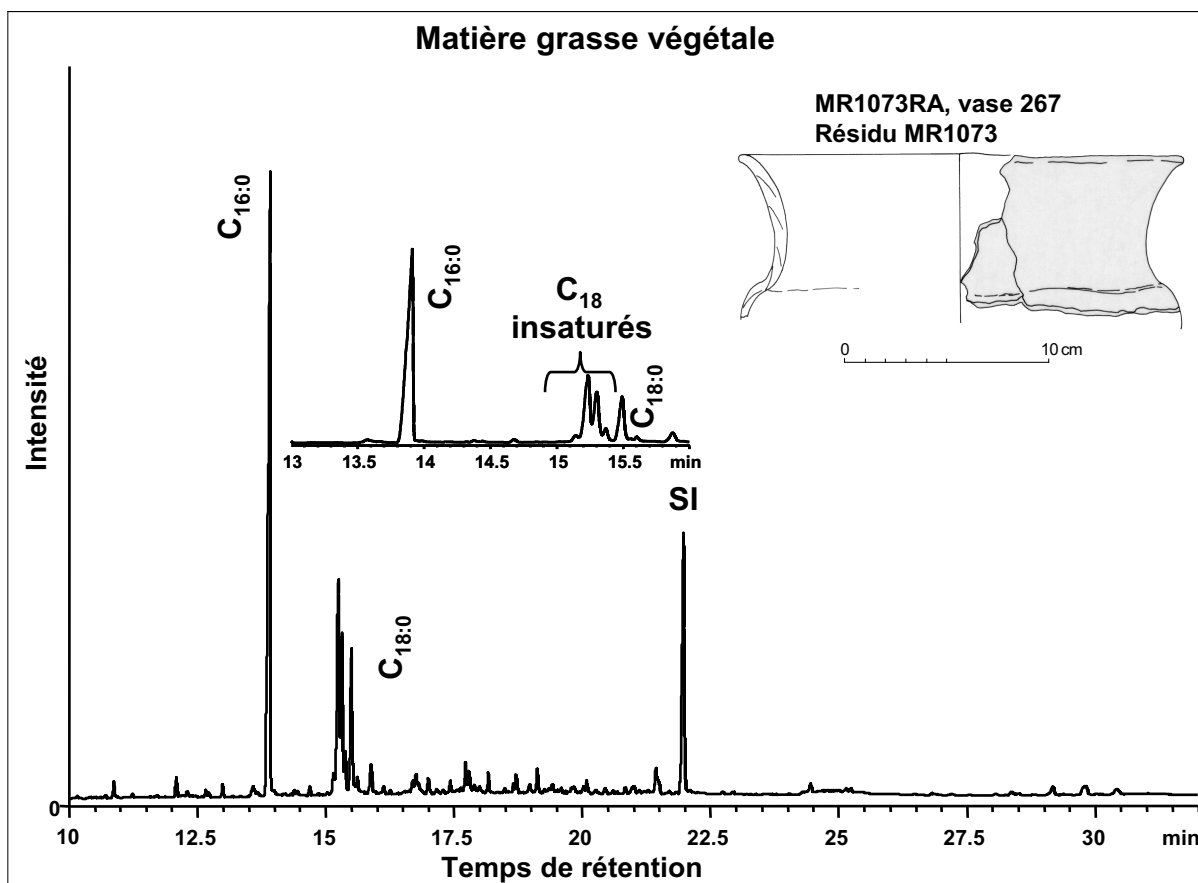


Vase à épaulement 267, tesson MR1072									
Chromatographie en phase gazeuse									
MR1072TA, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm									
Aire totale	Aire standard	masse tesson g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl	
1653.532	570.481	2.7265	50.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00	

Composé	Aire	%
C14:0	45.829	3.45
C15:0	56.356	4.24
C16:0	641.796	48.29
C17:0	66.101	4.97
C18:1	249.338	18.76
C18:0	269.644	20.29
total	1329.064	100.000

Concentration µg/g	21.26
C16/C18	2.38
% Acides gras	80.38

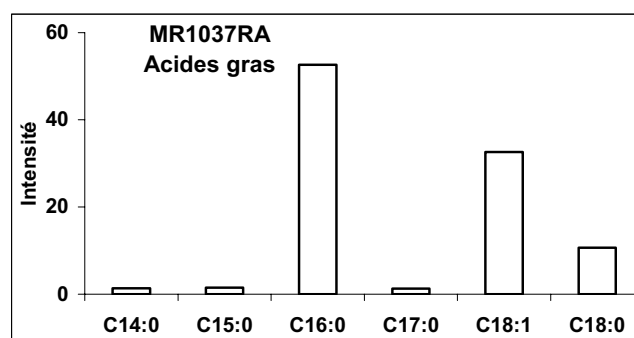




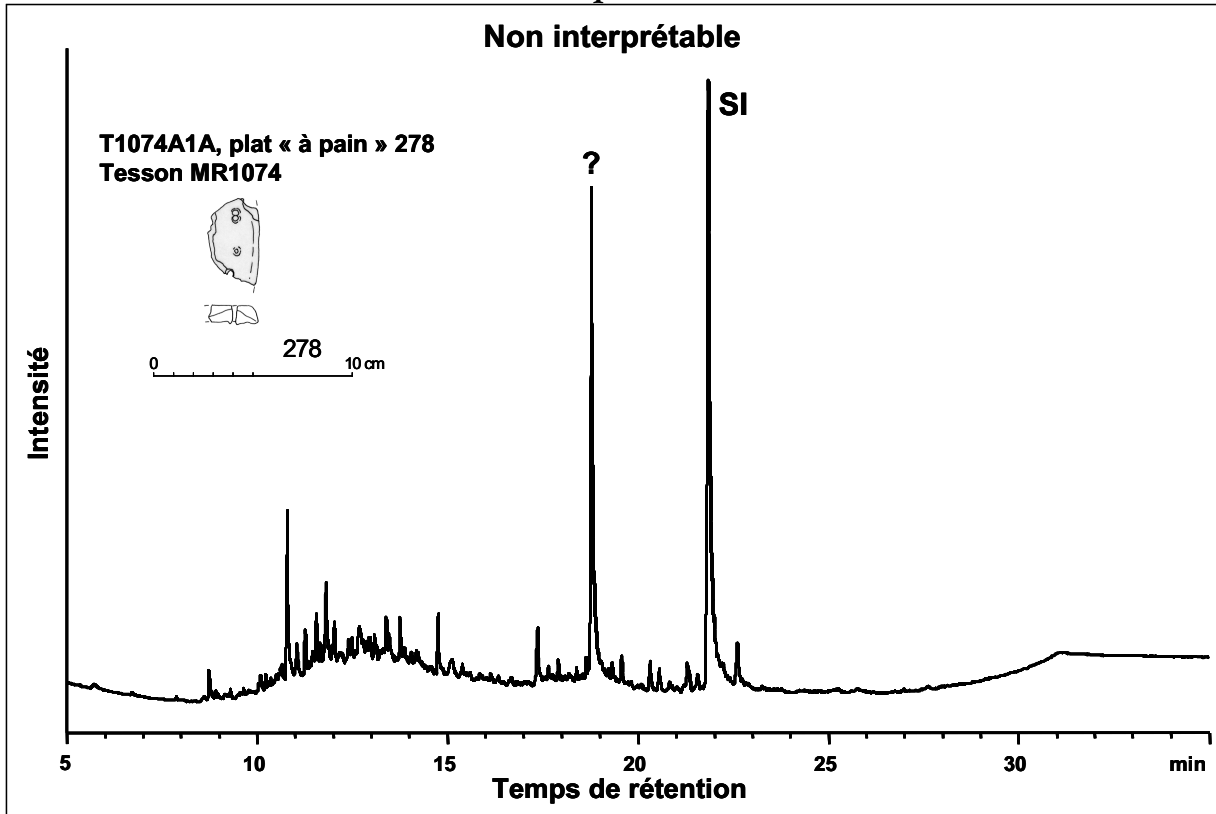
Vase à épaulement 267, résidu MR1073								
Chromatographie en phase gazeuse								
MR1073RA, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm								
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
4244.244	658.591	0.0905	80.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

Composé	Aire	%
C14:0	40.387	1.31
C15:0	46.133	1.50
C16:0	1619.520	52.64
C17:0	39.541	1.29
C18:1	1003.992	32.63
C18:0	326.870	10.62
total	3076.442	100.00
total TAGs	125.011	

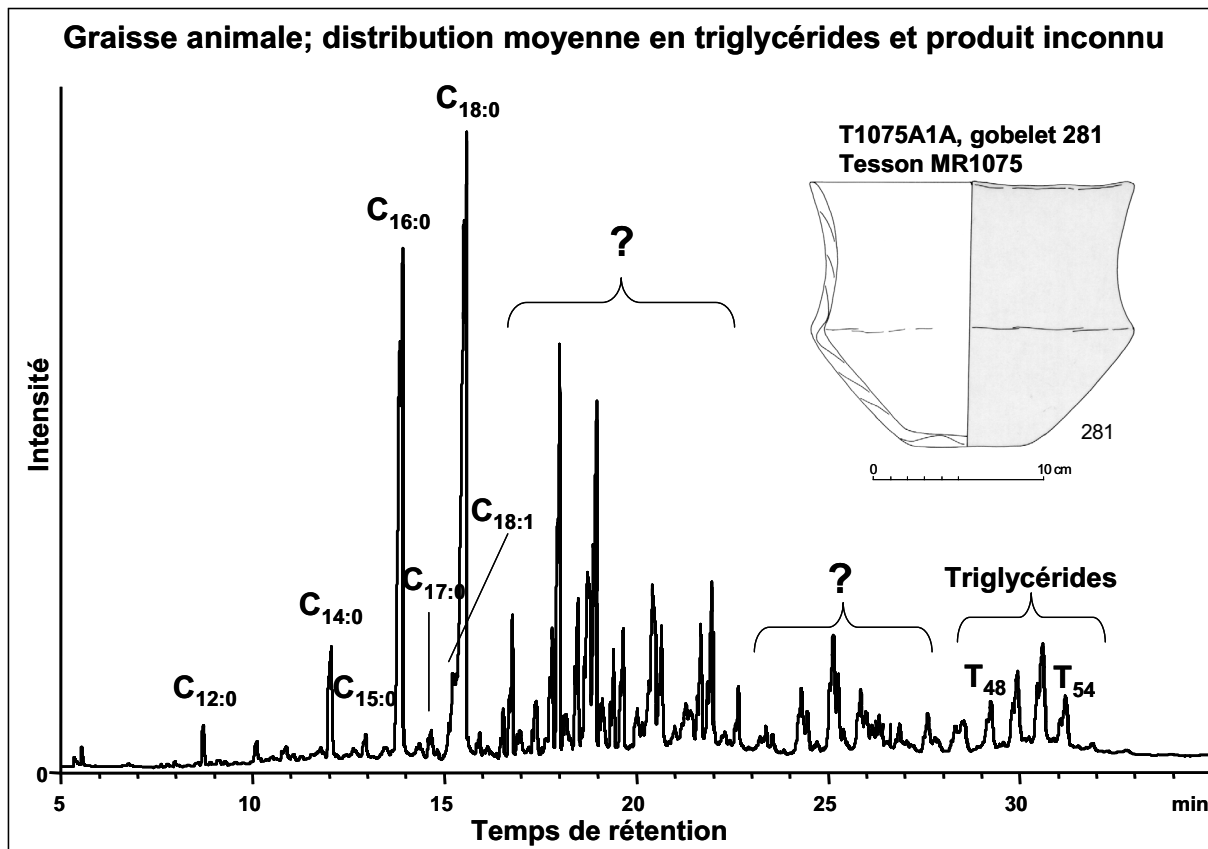
Concentration µg/g	1424.18
C16/C18	4.95
% Acides gras	72.49
% Triglycérides	2.95



Plat à pain 278



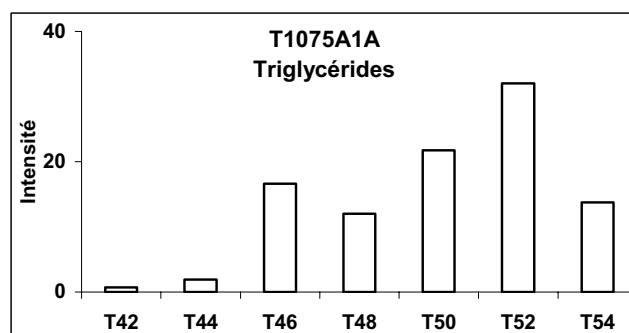
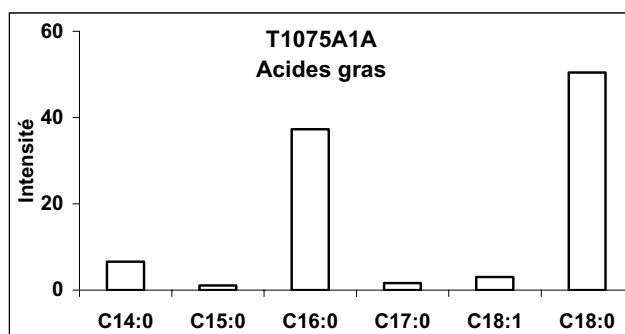
Gobelet 281

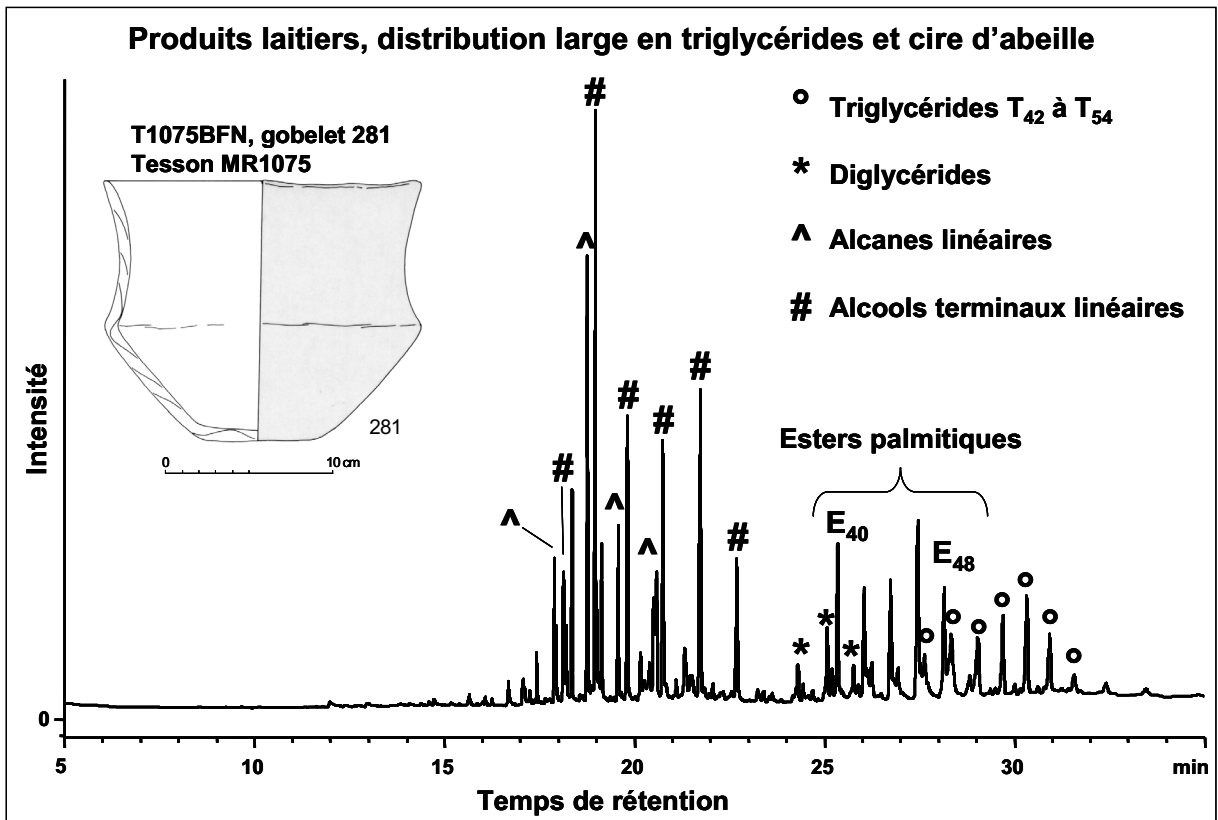
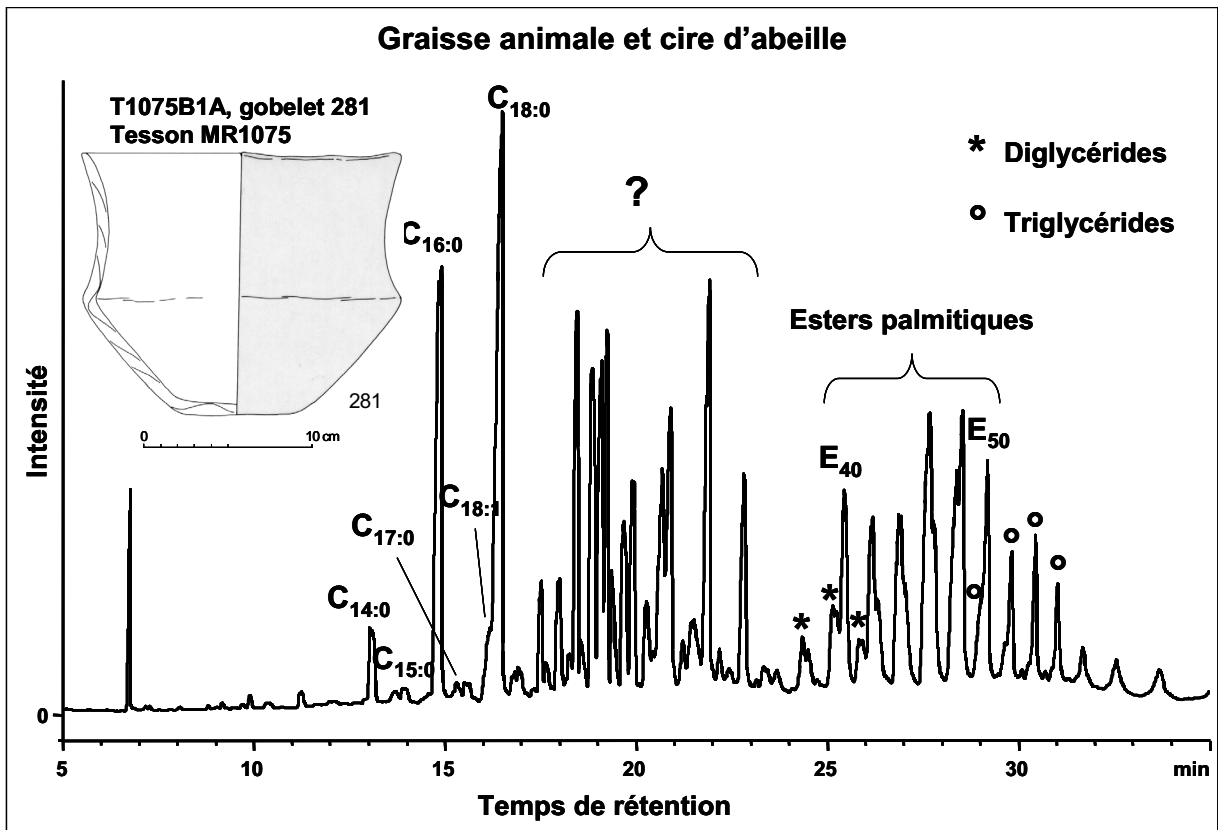


Gobelet 281, tesson MR1075								
Chromatographie en phase gazeuse								
T1075A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm								
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
43169.839	893.070	3.623	30.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

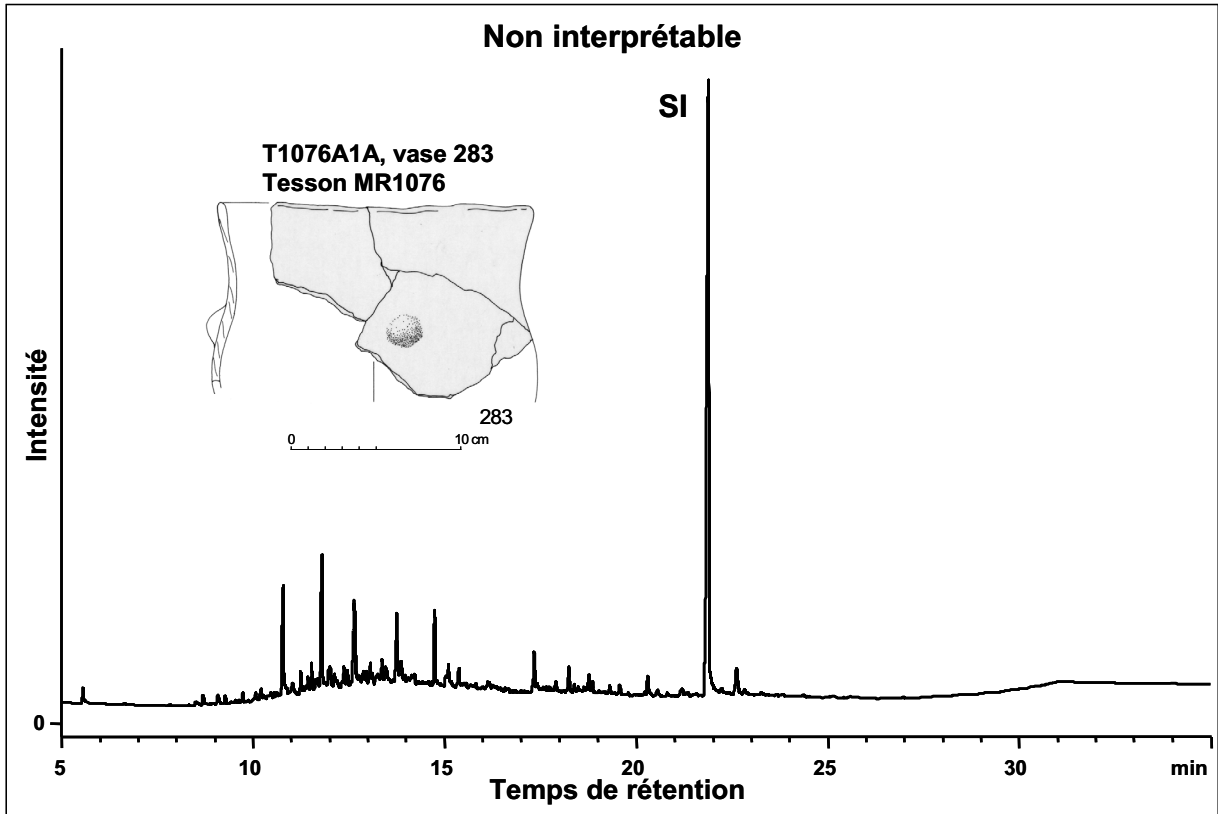
Composé	Aire	%
C14:0	964.747	6.62
C15:0	154.116	1.06
C16:0	5432.732	37.27
C17:0	238.278	1.63
C18:1	439.383	3.01
C18:0	7347.080	50.40
total	14576.337	100.000
T42	35.085	0.72
T44	92.546	1.91
T46	807.069	16.64
T48	582.698	12.01
T50	1055.543	21.76
T52	1552.483	32.00
T54	666.465	13.74
total	4851.407	98.773

Concentration µg/g	266.84
C16/C18	0.74
% Acides gras	33.77
% Triglycérides	11.24



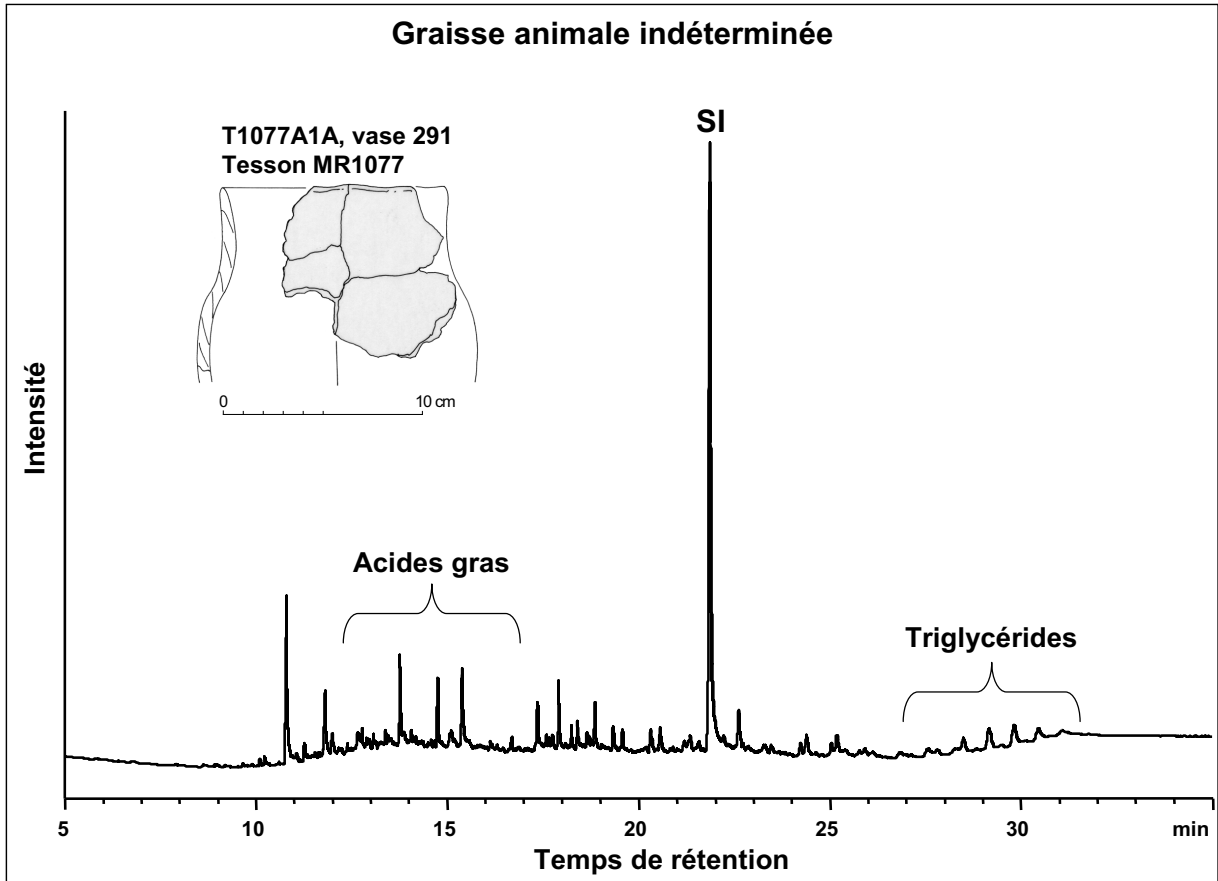


Vase 283



Vase 291

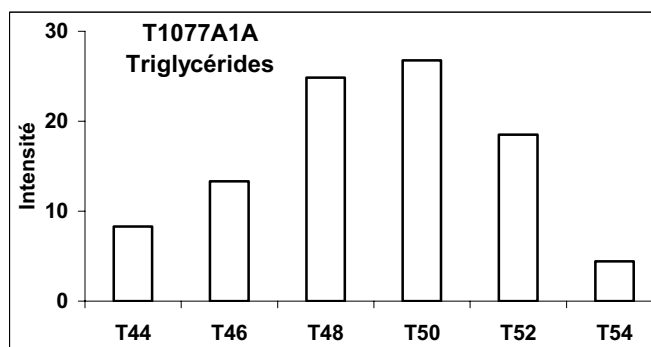
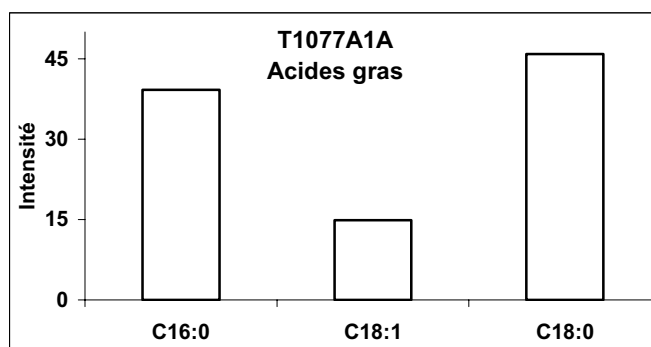
Graisse animale indéterminée



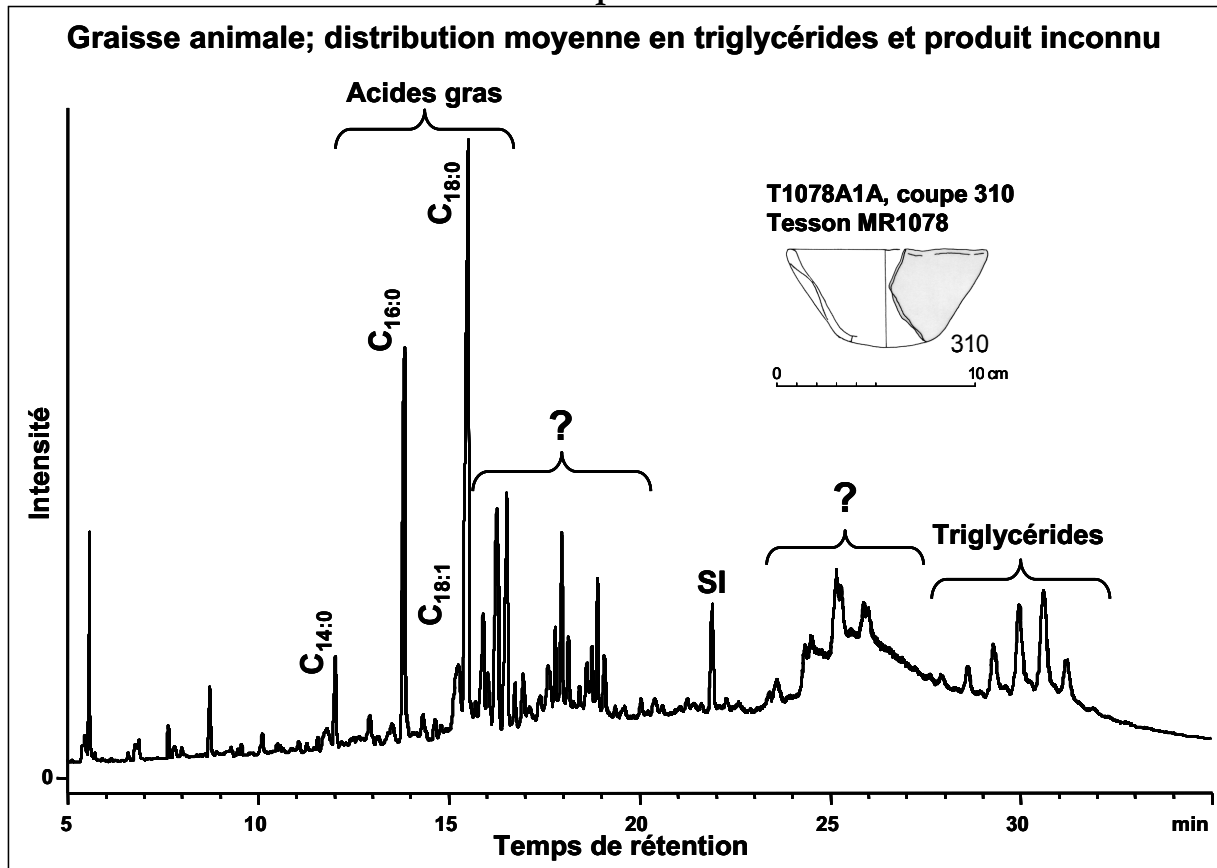
Vase à profil en S 291, tesson MR1077								
Chromatographie en phase gazeuse								
T1077A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm								
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
1211.592	690.412	1.9354	30.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

Composé	Aire	%
C16:0	58.644	39.22
C18:1	22.257	14.88
C18:0	68.641	45.90
total	149.542	100.000
T44	11.805	8.29
T46	19.001	13.34
T48	35.385	24.85
T50	38.129	26.78
T52	26.373	18.52
T54	6.327	4.44
total	142.392	96.227

Concentration µg/g	18.13
C16/C18	0.85
% Acides gras	12.34
% Triglycérides	11.75



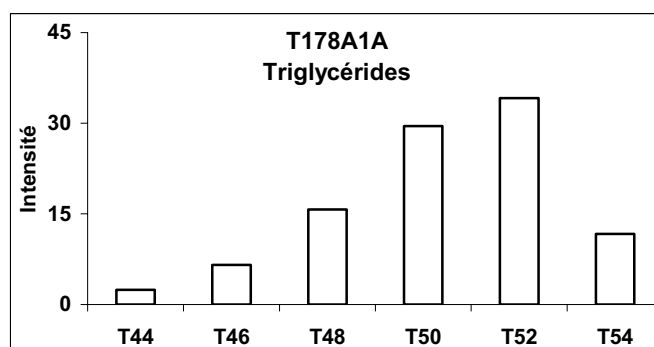
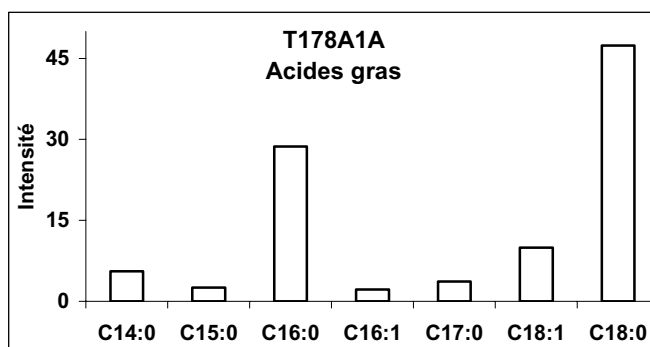
Coupe 310

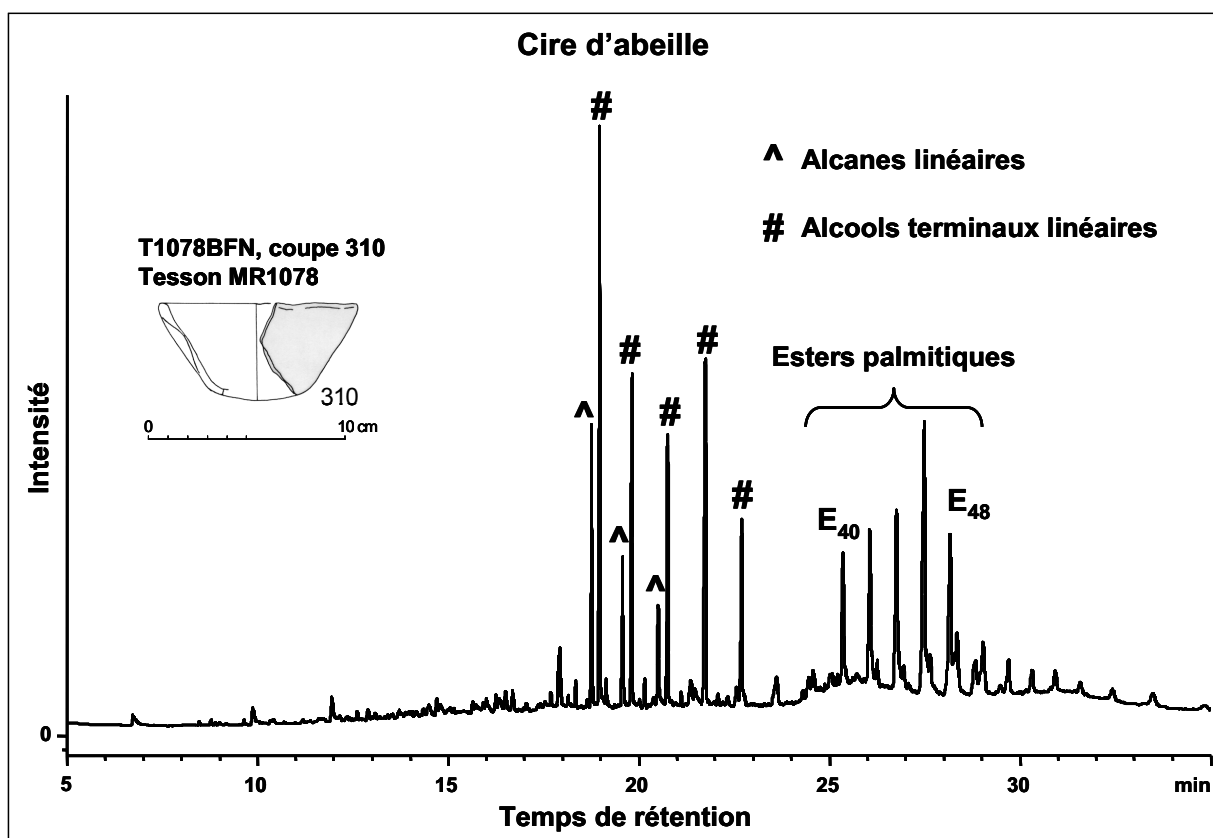
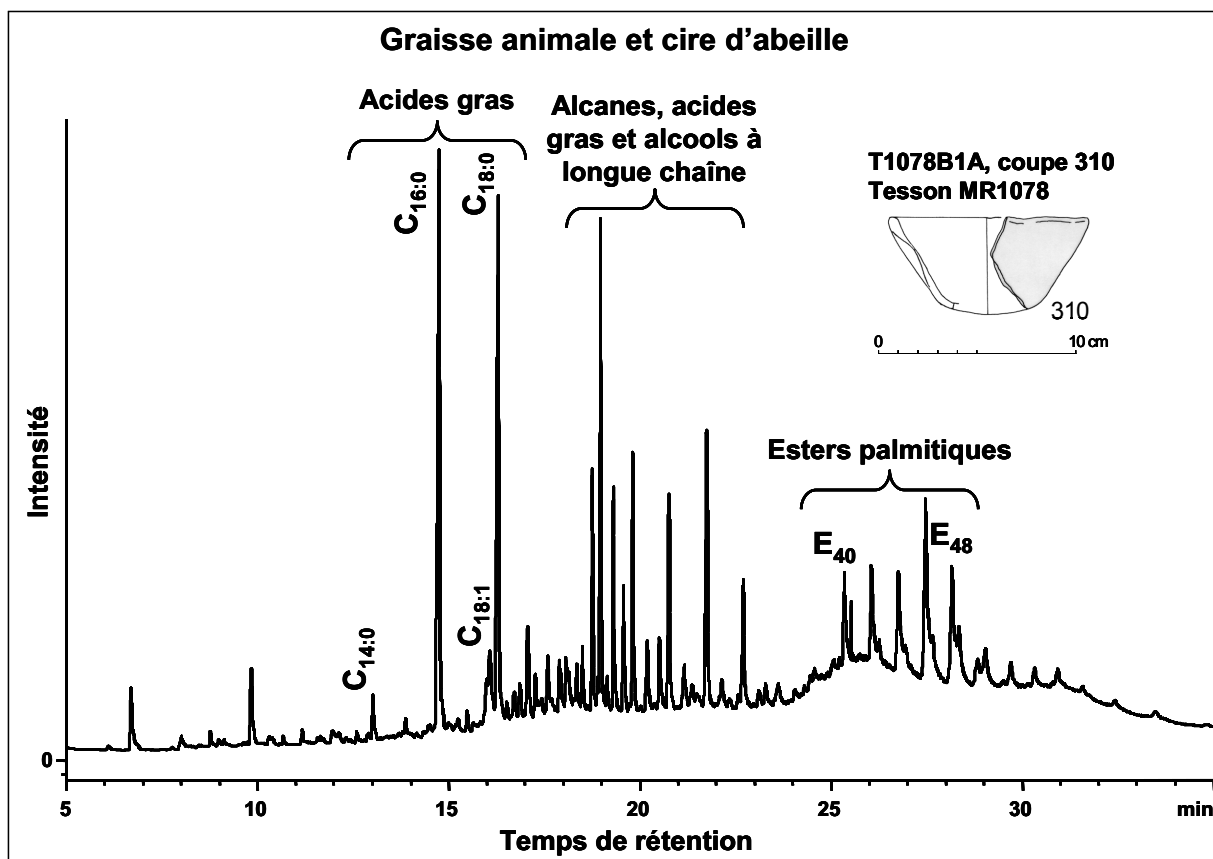


Coupe 310, tesson MR1078								
Chromatographie en phase gazeuse								
T1078A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm								
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
16963.077	448.132	2.9358	80.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

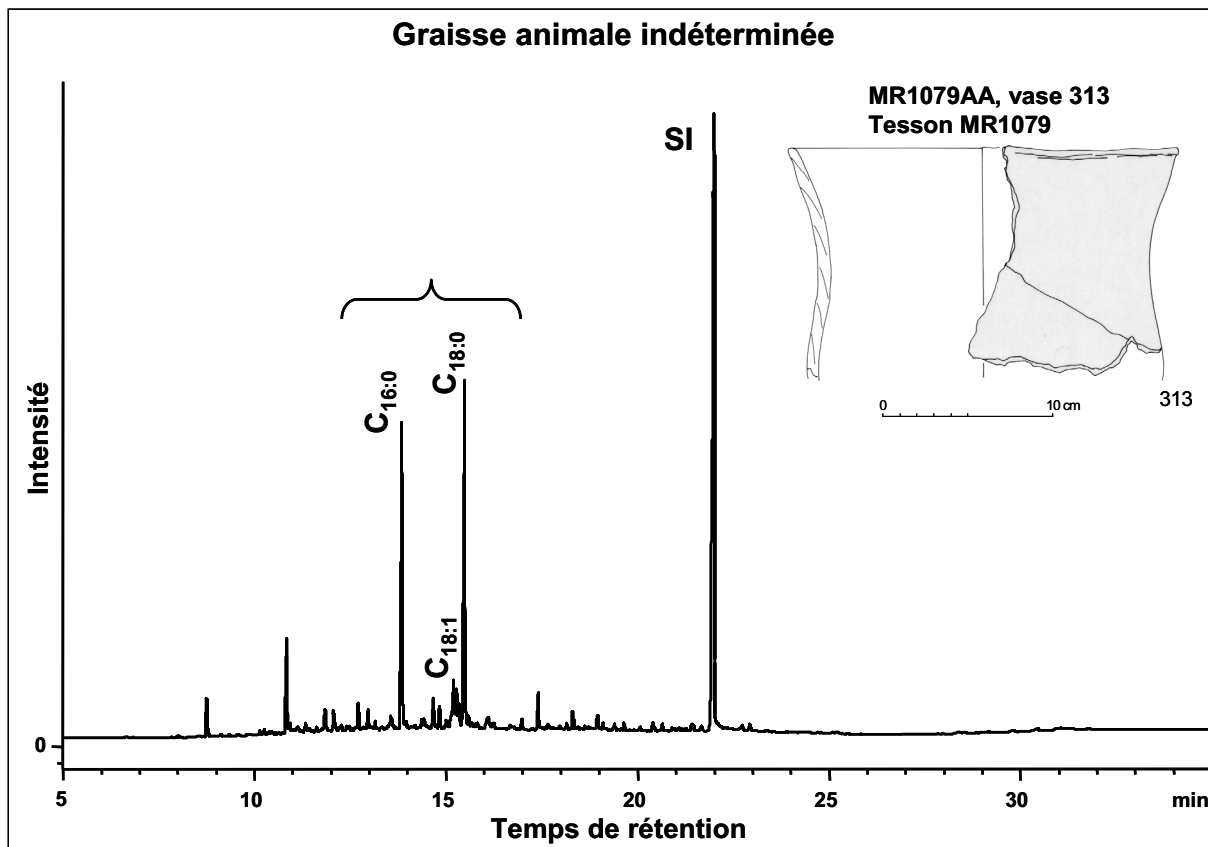
Composé	Aire	%
C14:0	294.256	5.55
C15:0	133.961	2.53
C16:0	1519.286	28.68
C16:1	116.728	2.20
C17:0	195.481	3.69
C18:1	527.434	9.96
C18:0	2510.506	47.39
total	5297.651	100.000
T44	64.914	2.43
T46	174.516	6.53
T48	419.766	15.72
T50	787.917	29.50
T52	912.008	34.15
T54	311.624	11.67
total	2670.745	100.000

Concentration µg/g	257.87
C16/C18	0.61
% Acides gras	31.23
% Triglycérides	15.74





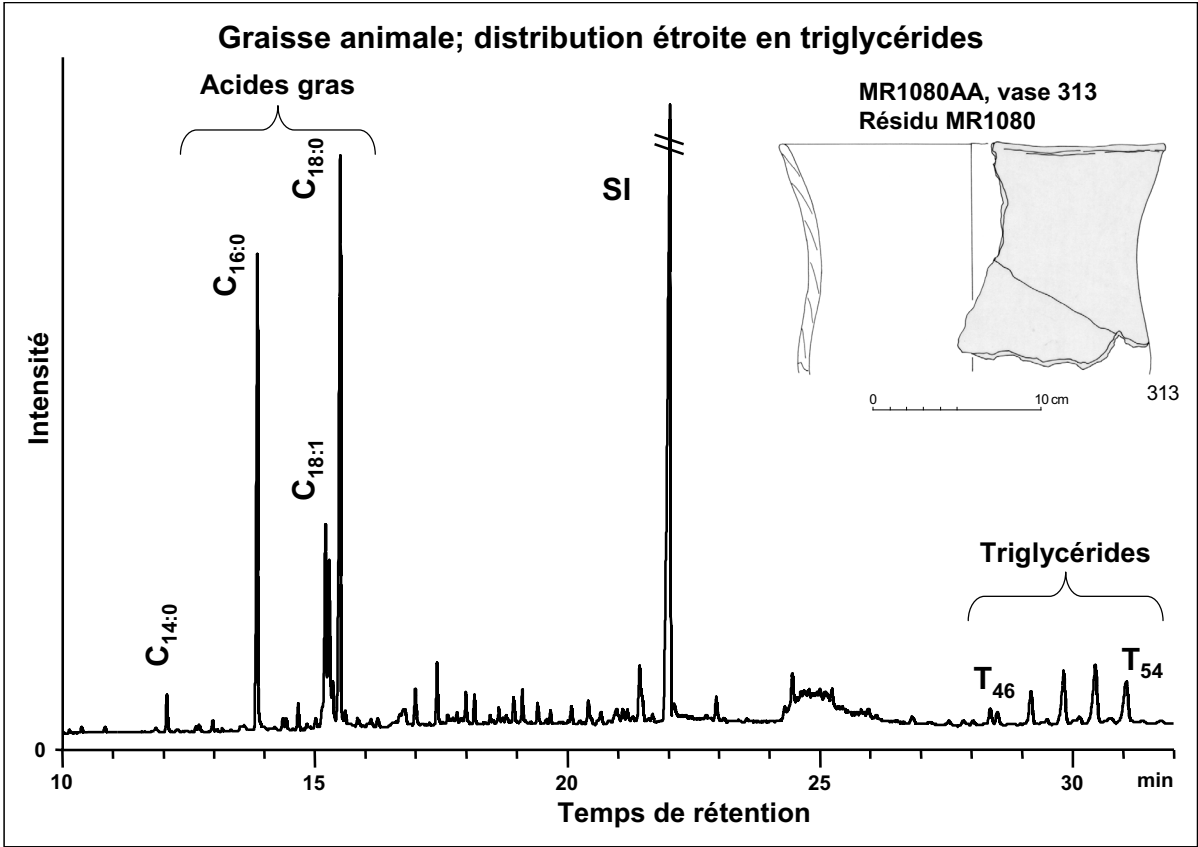
Vase 313



Vase à profil en S 313, tesson 2 MR1079									
Chromatographie en phase gazeuse									
MR1079AA, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm									
Aire totale	Aire standard	masse tesson g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µL	
2000.847	1224.318	1.0995	50.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00	

Composé	Aire	%
C16:0	435.173	39.46
C18:1	174.996	15.87
C18:0	492.717	44.68
total	1102.886	100.000

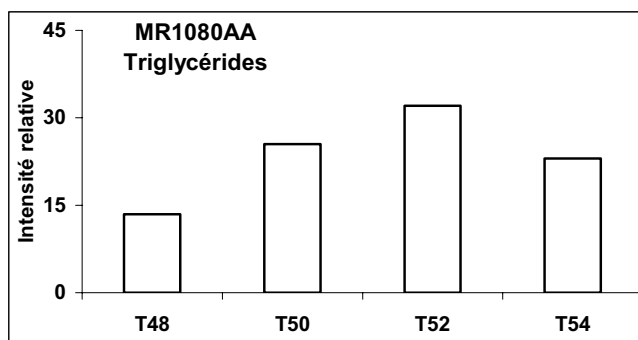
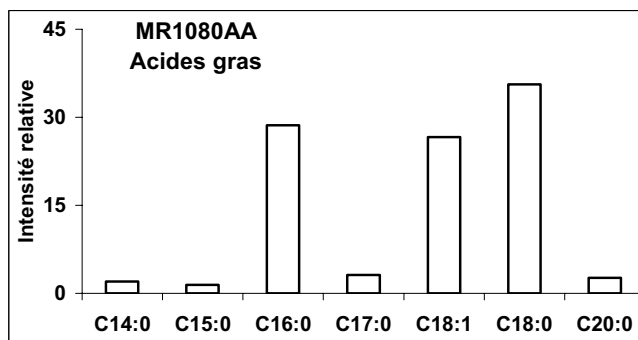
Concentration µg/g	29.73
C16/C18	0.88
% AG	55.12



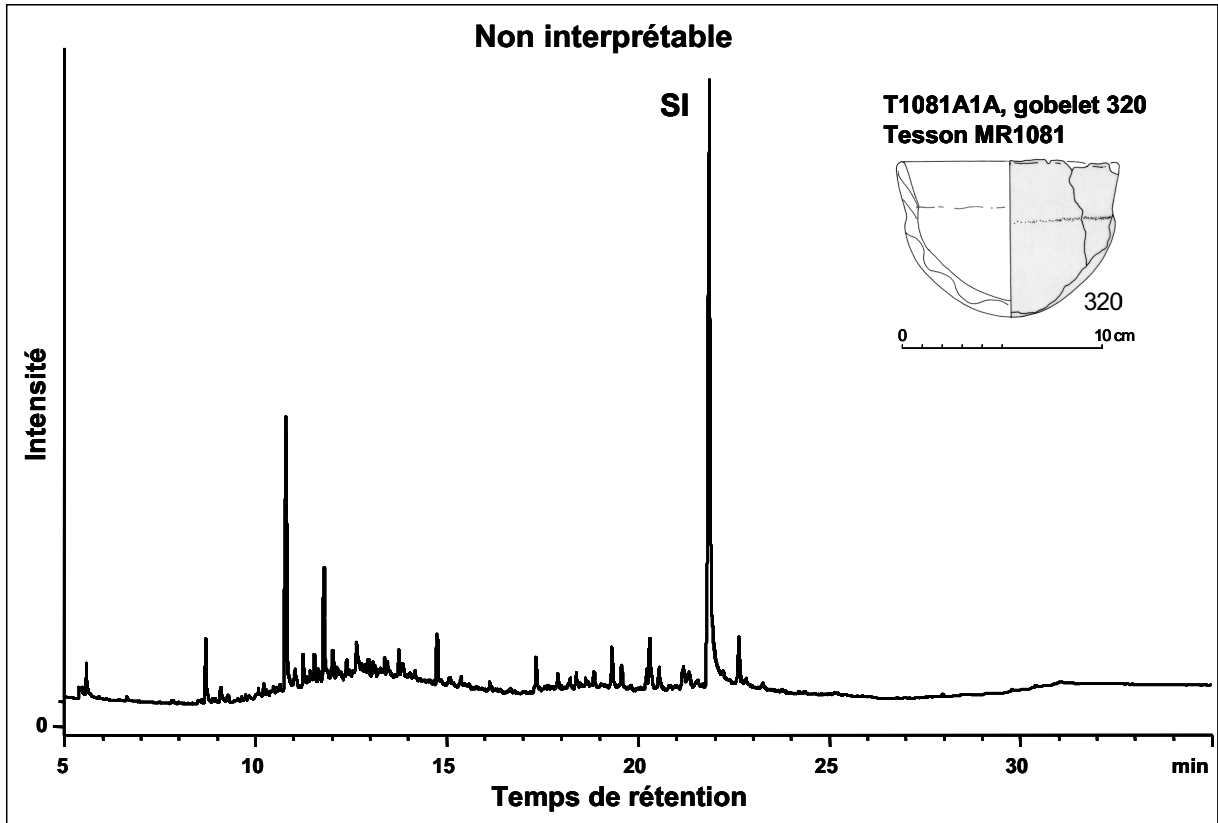
Vase à profil en S 313, résidu 2 MR1080								
Chromatographie en phase gazeuse								
MR1080AA, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm								
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
2619.629	2133.312	0.0397	30.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

Composé	Aire	%
C14:0	28.886	2.01
C15:0	20.231	1.41
C16:0	411.381	28.61
C17:0	44.475	3.09
C18:1	383.047	26.64
C18:0	511.871	35.59
C20:0	38.197	2.66
total	1438.087	100.00
T48	53.584	13.45
T50	101.599	25.50
T52	127.799	32.08
T54	91.669	23.01
total	398.393	94.040

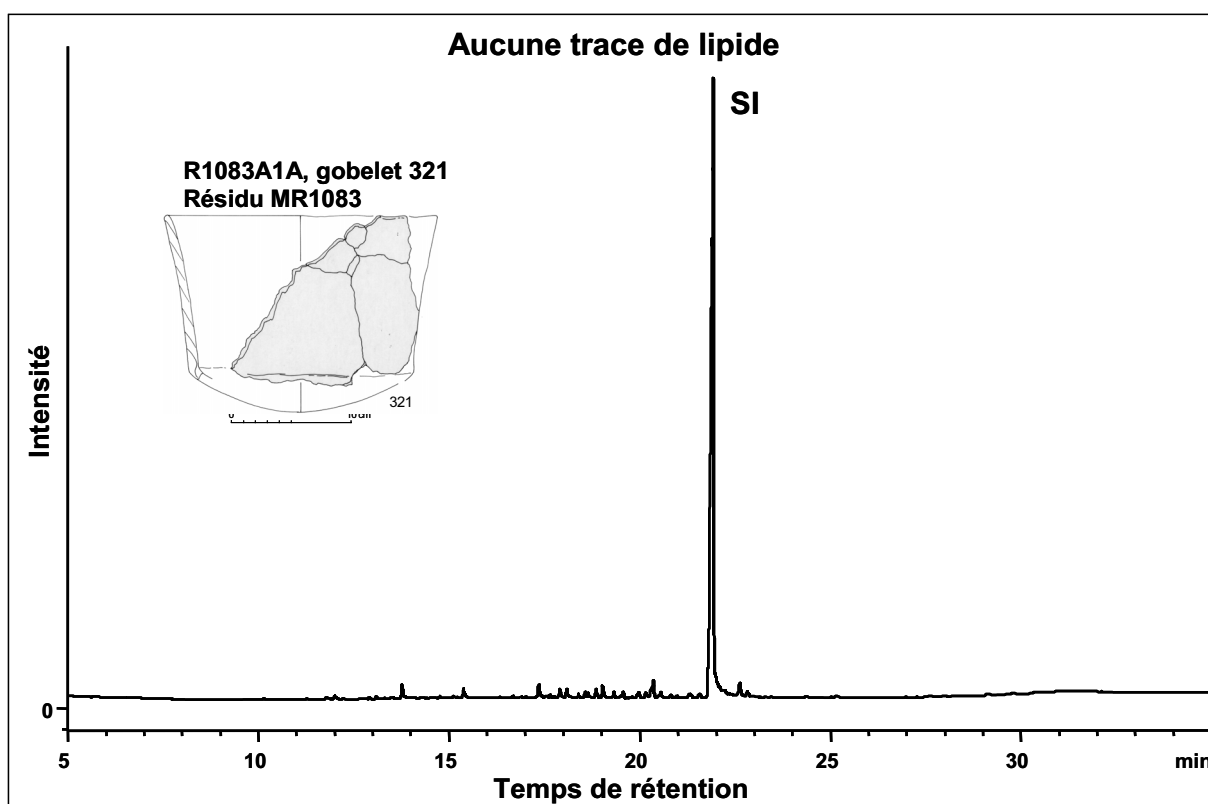
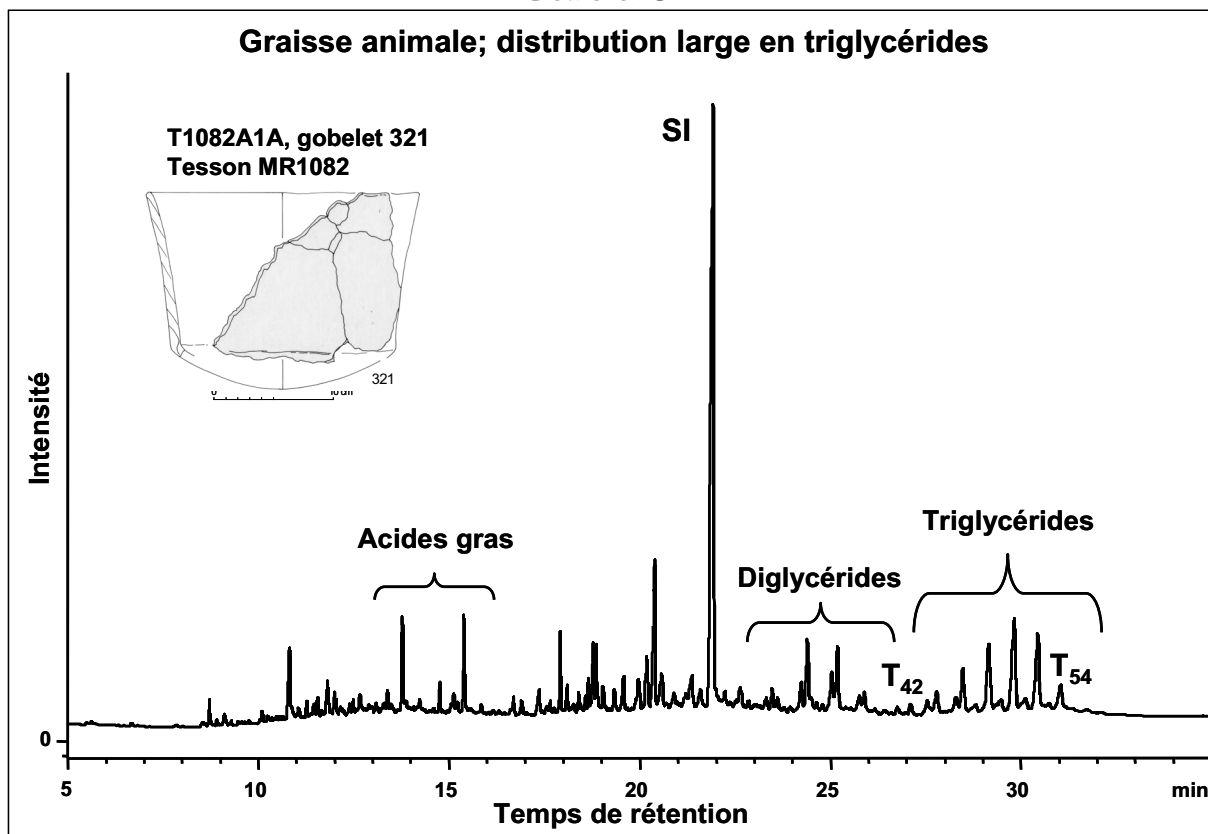
Concentration µg/g	618.62
C16/C18	0.80
% Acides gras	54.90
% Triglycérides	15.21



Gobelet 320



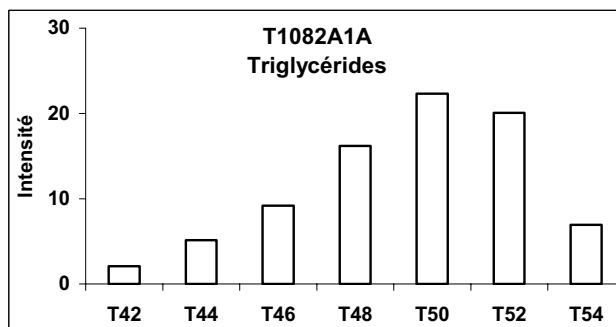
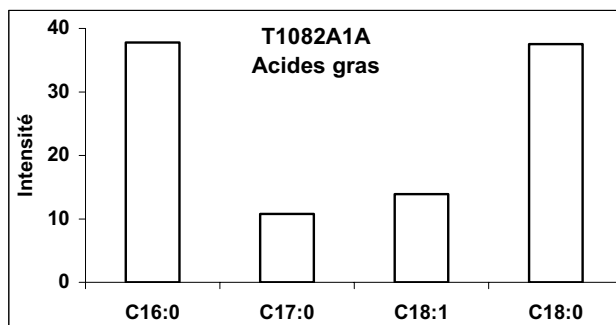
Gobelet 321

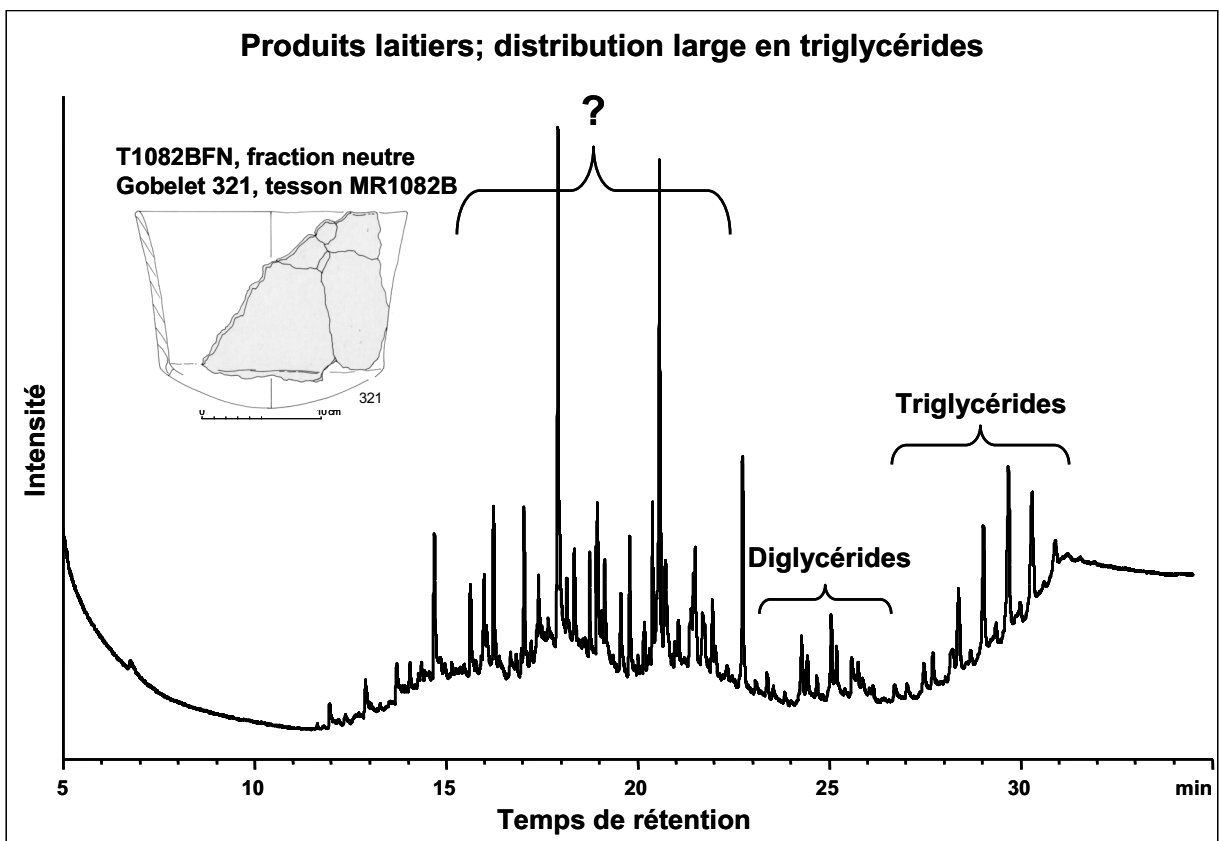
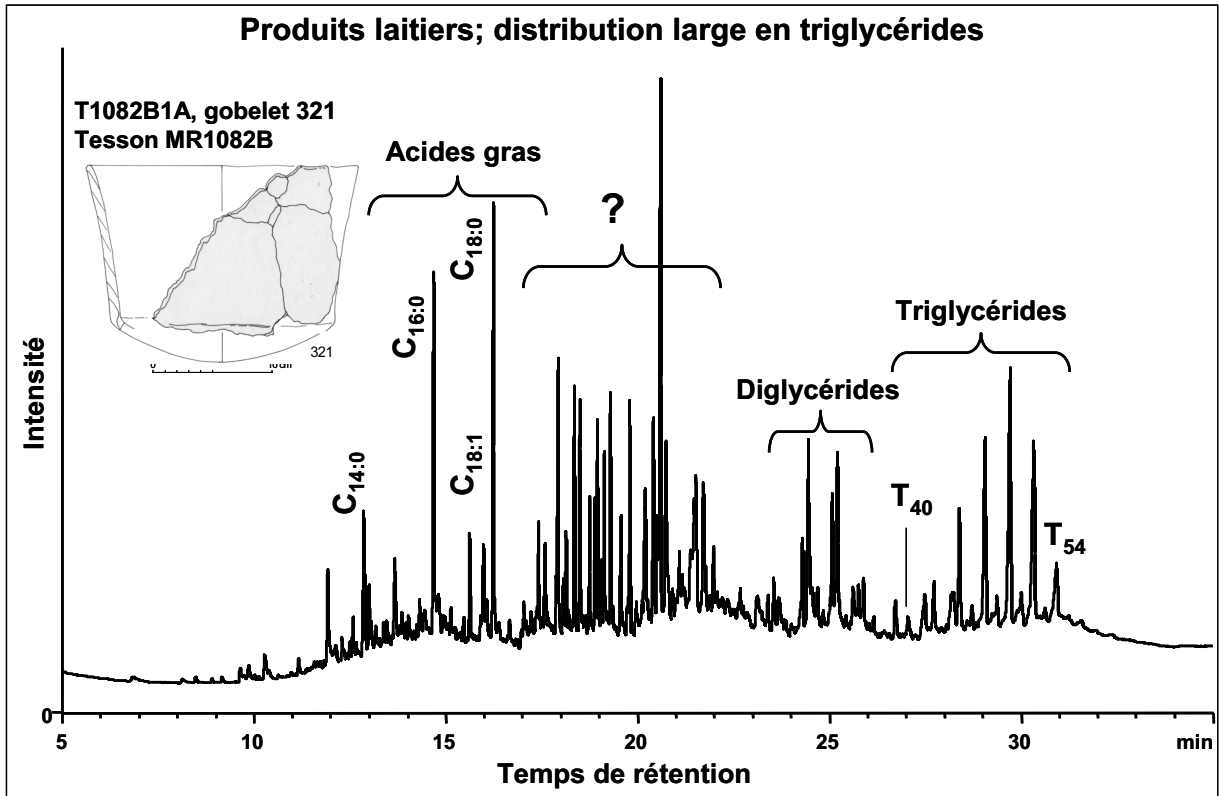


Gobelet 321, tesson MR1082								
Chromatographie en phase gazeuse								
T1082A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm								
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
7790.751	2400.087	2.3034	30.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

Composé	Aire	%
C16:0	204.806	37.77
C17:0	58.452	10.78
C18:1	75.472	13.92
C18:0	203.490	37.53
total	542.221	100.000
T42	40.325	2.06
T44	100.604	5.15
T46	179.861	9.21
T48	316.722	16.21
T50	435.910	22.31
T52	392.186	20.07
T54	135.525	6.94
total	1953.612	81.958

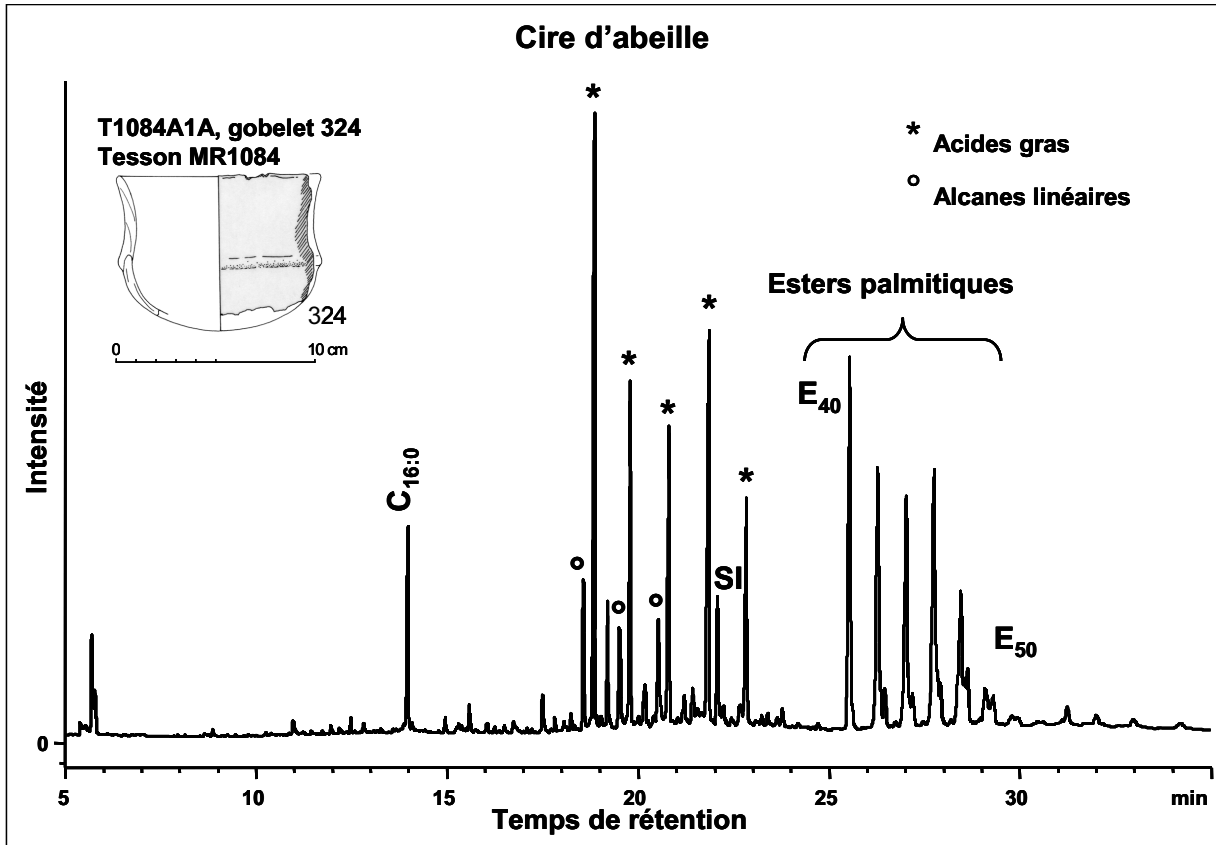
Concentration µg/g	36.69
C16/C18	1.01
% Acides gras	6.96
% Triglycérides	25.08





Gobelet 324

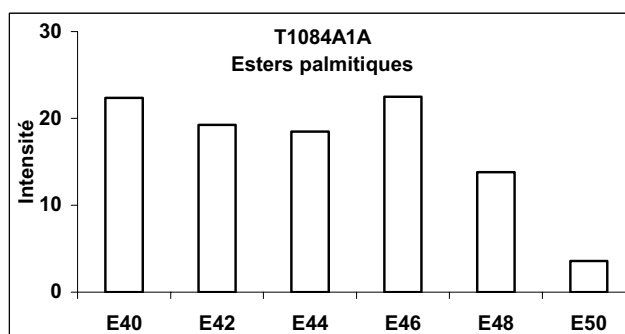
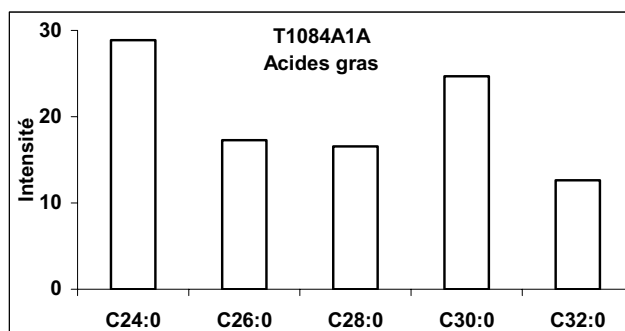
Cire d'abeille



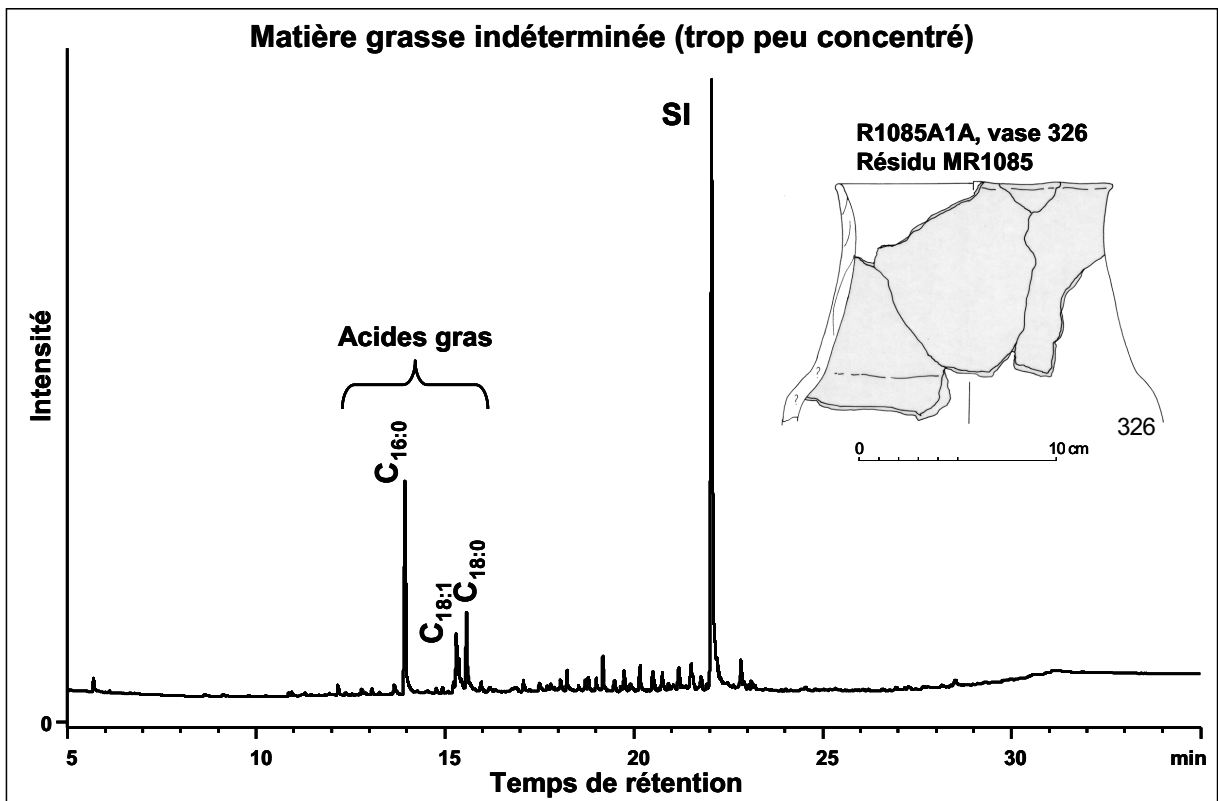
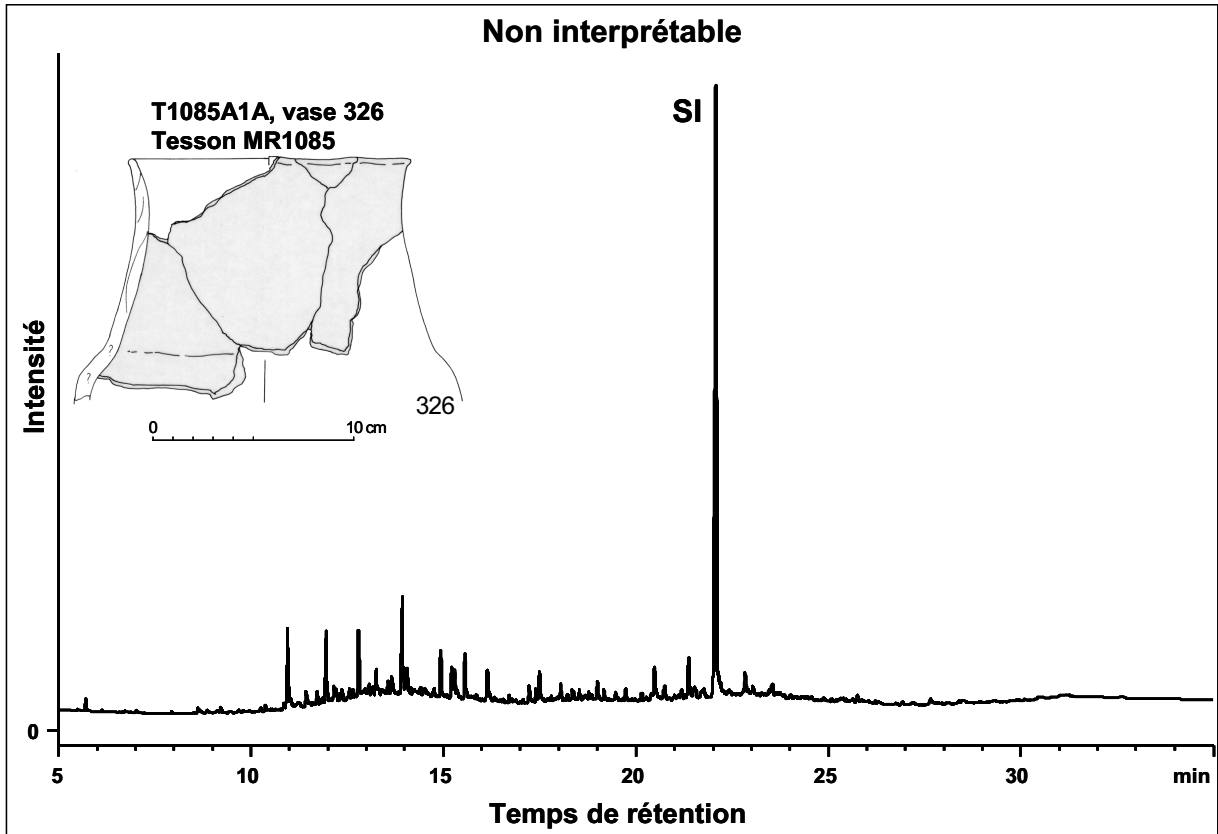
Gobelet 324, tesson MR1084								
Chromatographie en phase gazeuse								
T1084A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm								
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
18903.753	441.018	1.9953	50.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

Composé	Aire	%
C16:0	569.751	9.15
C24:0	1796.476	28.85
C26:0	1075.007	17.26
C28:0	1031.531	16.57
C30:0	1537.342	24.69
C32:0	786.453	12.63
total	6226.810	100.000
E40	1578.908	22.35
E42	1361.519	19.27
E44	1306.032	18.49
E46	1589.121	22.49
E48	974.336	13.79
E50	254.589	3.60
total	7064.505	100.00

Concentration µg/g	429.65
% Acides gras (sauf C _{16:0})	32.94
% Esters palmitiques	37.37



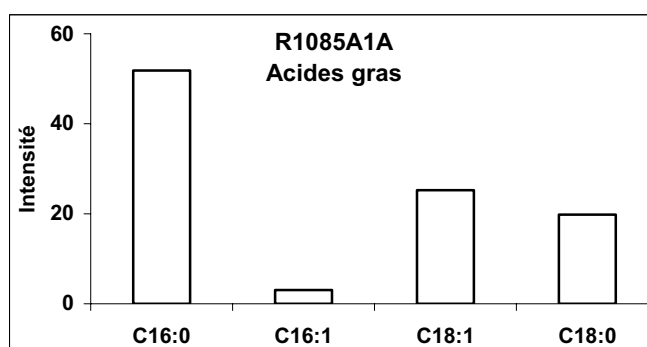
Vase 326



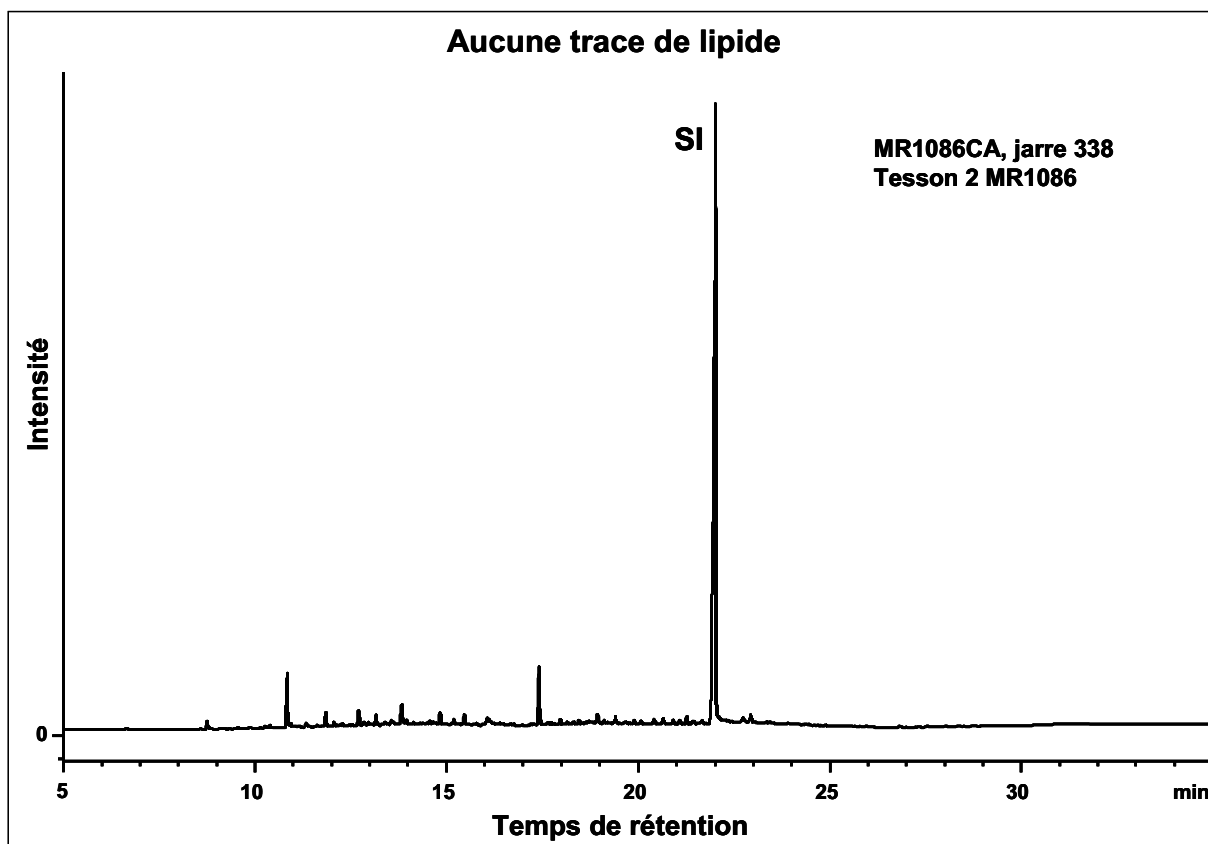
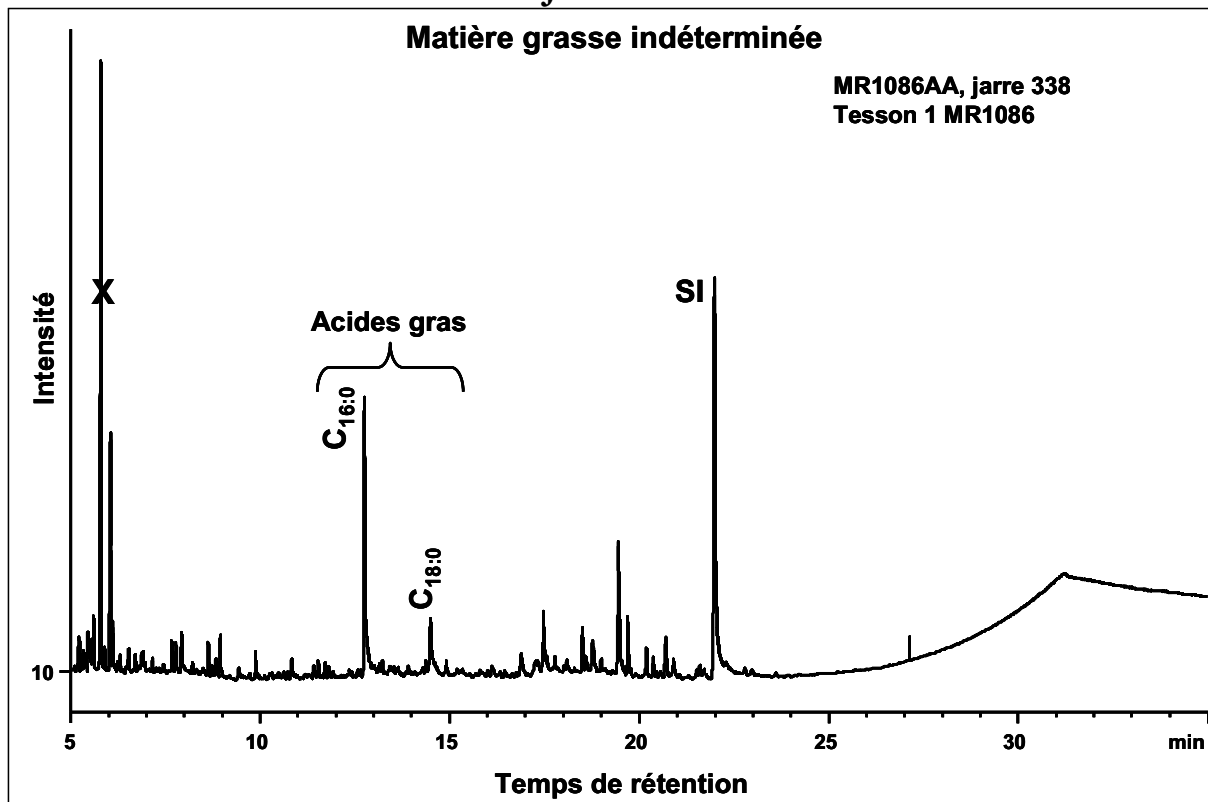
Vase à épaulement 326, résidu MR1085								
Chromatographie en phase gazeuse								
R1085A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm								
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
586.427	607.930	2.4435	50.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

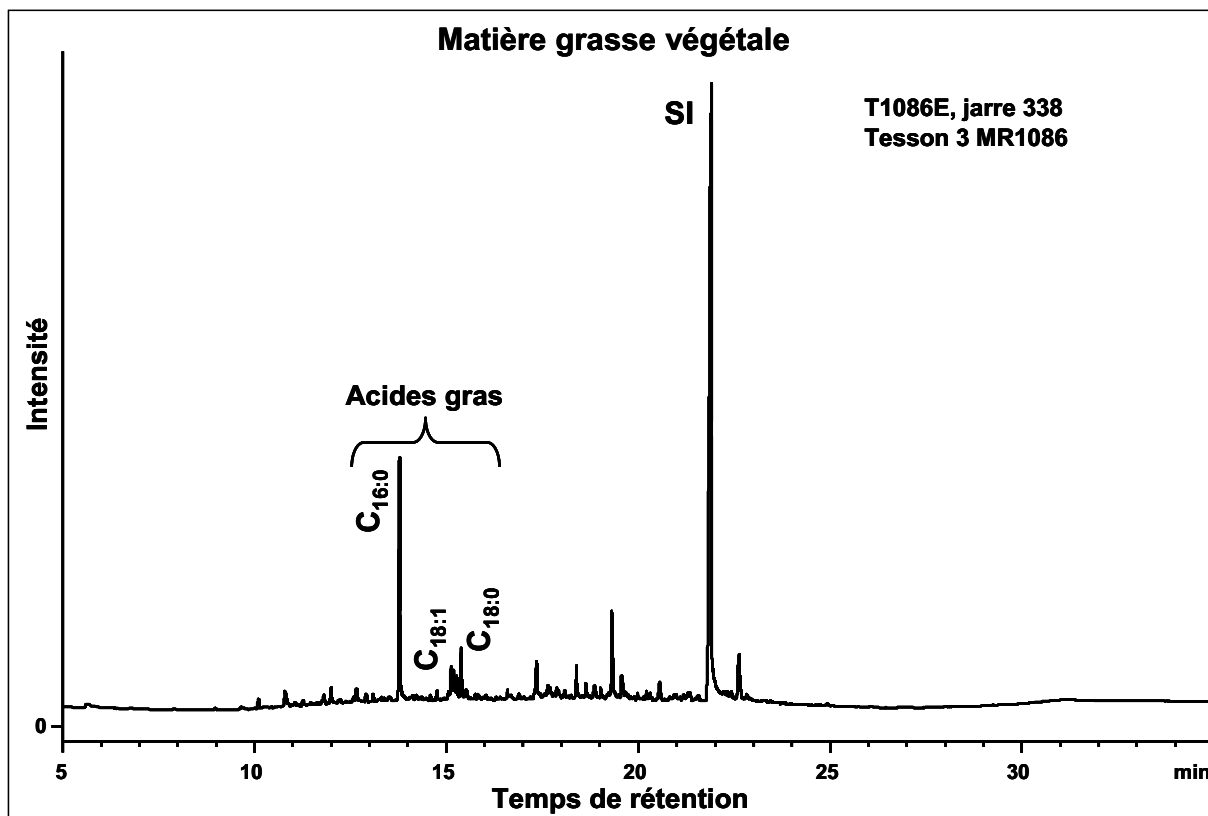
Composé	Aire	%
C16:0	155.191	51.86
C16:1	9.126	3.05
C18:1	75.629	25.27
C18:0	59.298	19.82
total	299.243	100.000

Concentration µg/g	7.90
C16/C18	2.62
% Acides gras	51.03



Jarre 338

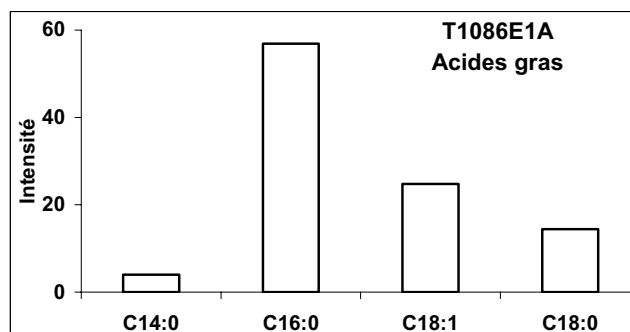


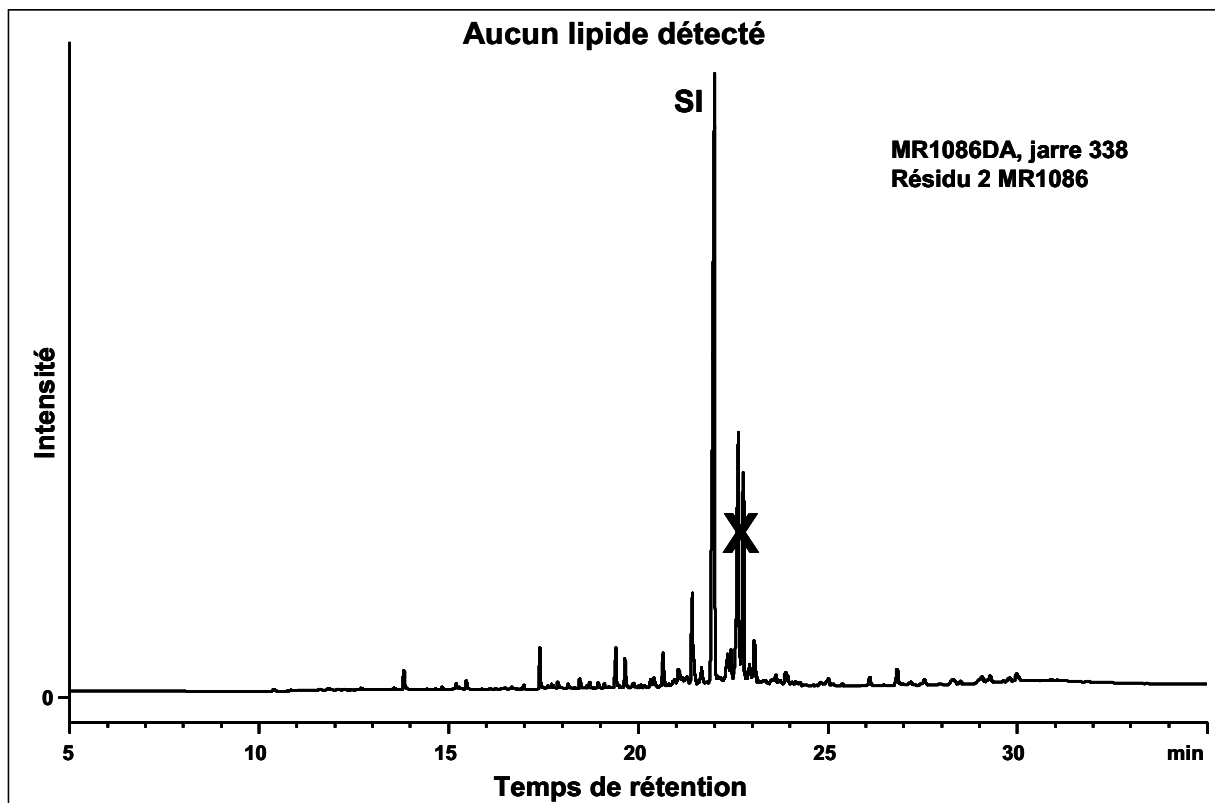
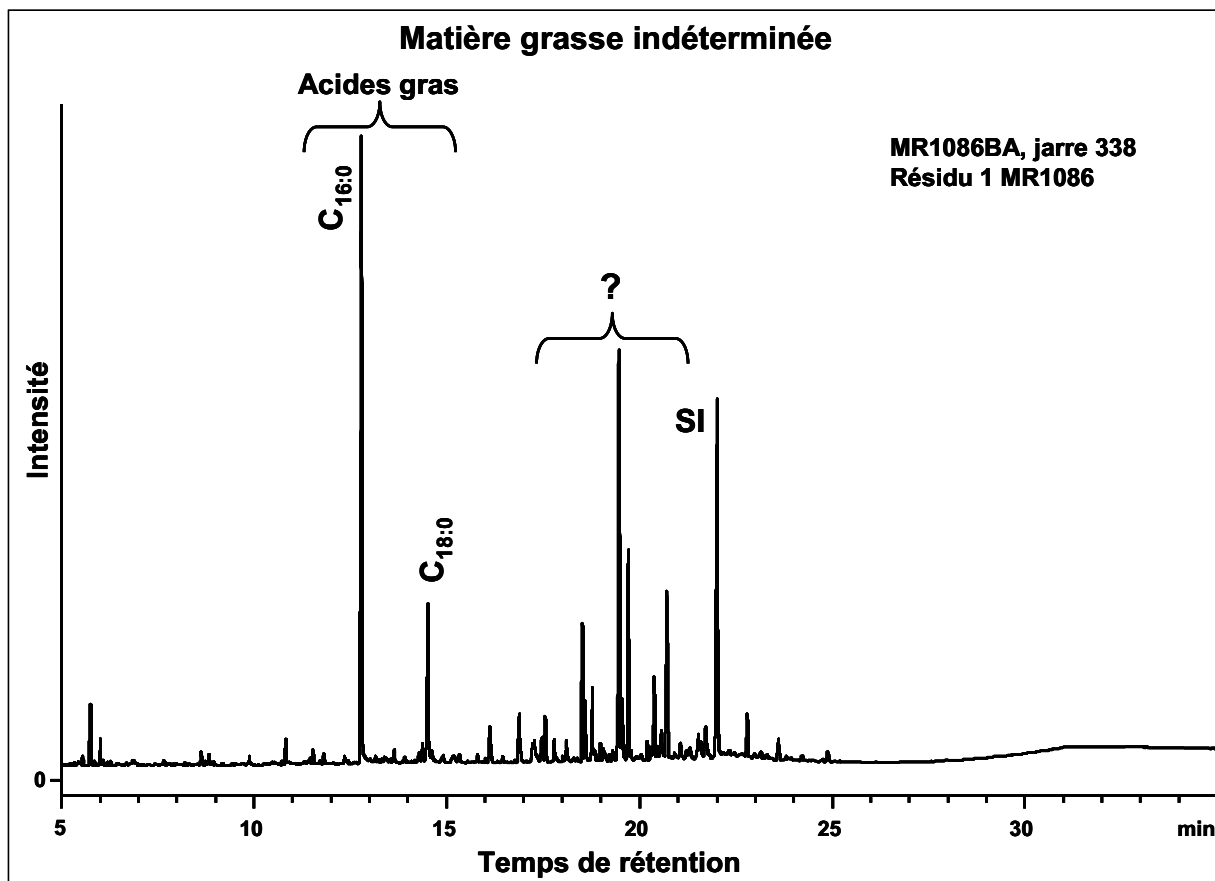


Jarre 338, tesson 3 MR1086									
Chromatographie en phase gazeuse									
T1086E1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm									
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl	
1826.095	1658.629	1.9931	30.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00	

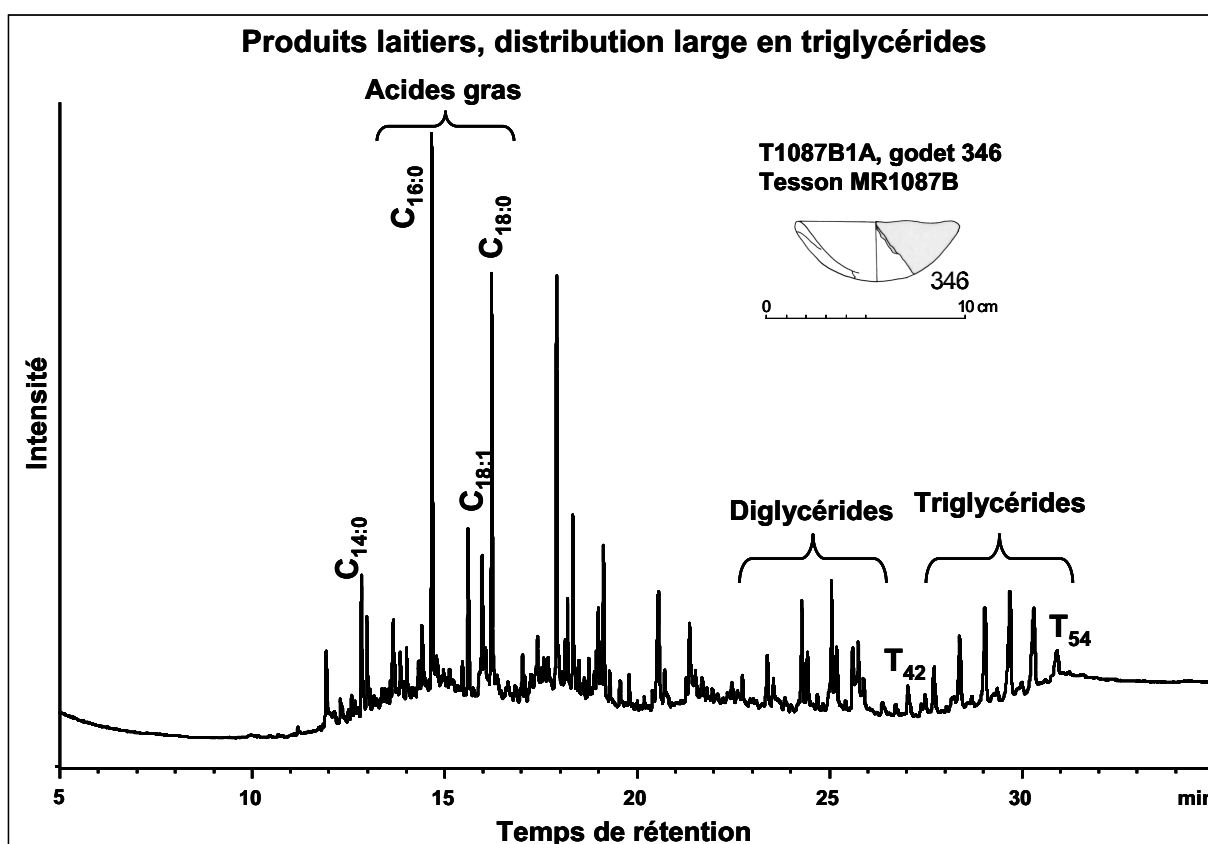
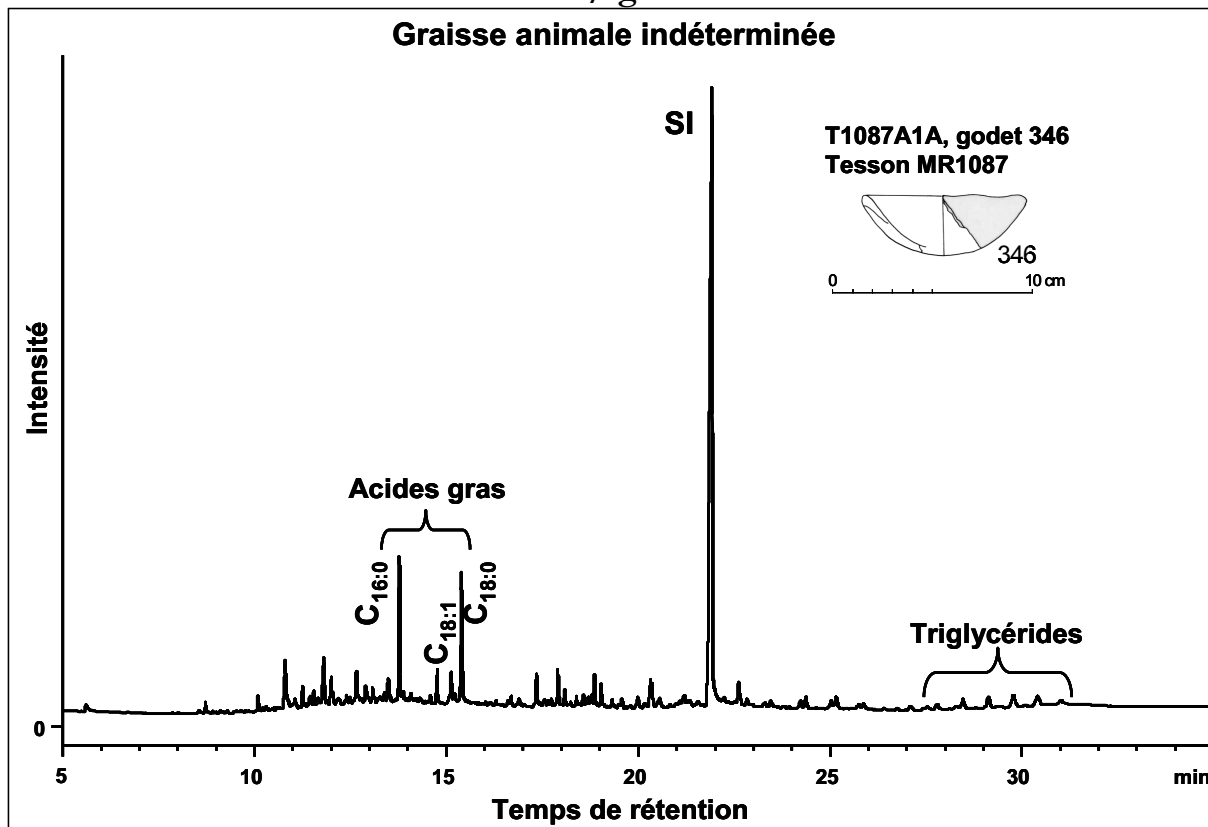
Composé	Aire	%
C14:0	27.079	3.97
C16:0	388.395	56.87
C18:1	169.080	24.76
C18:0	98.360	14.40
total	682.914	100.000

Concentration µg/g	21.08
C16/C18	3.95
% Acides gras	37.40





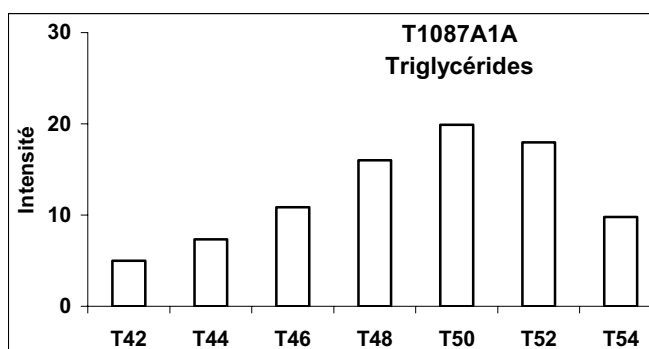
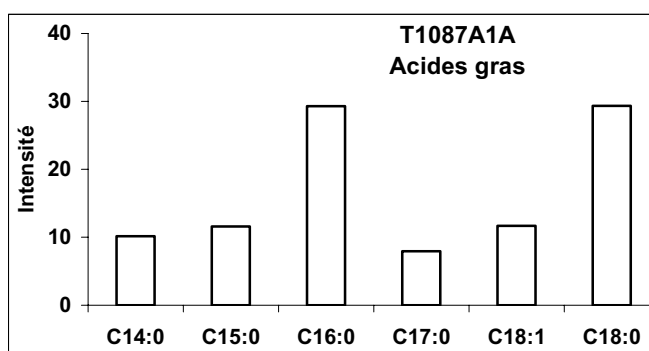
Petit bol/ godet 346



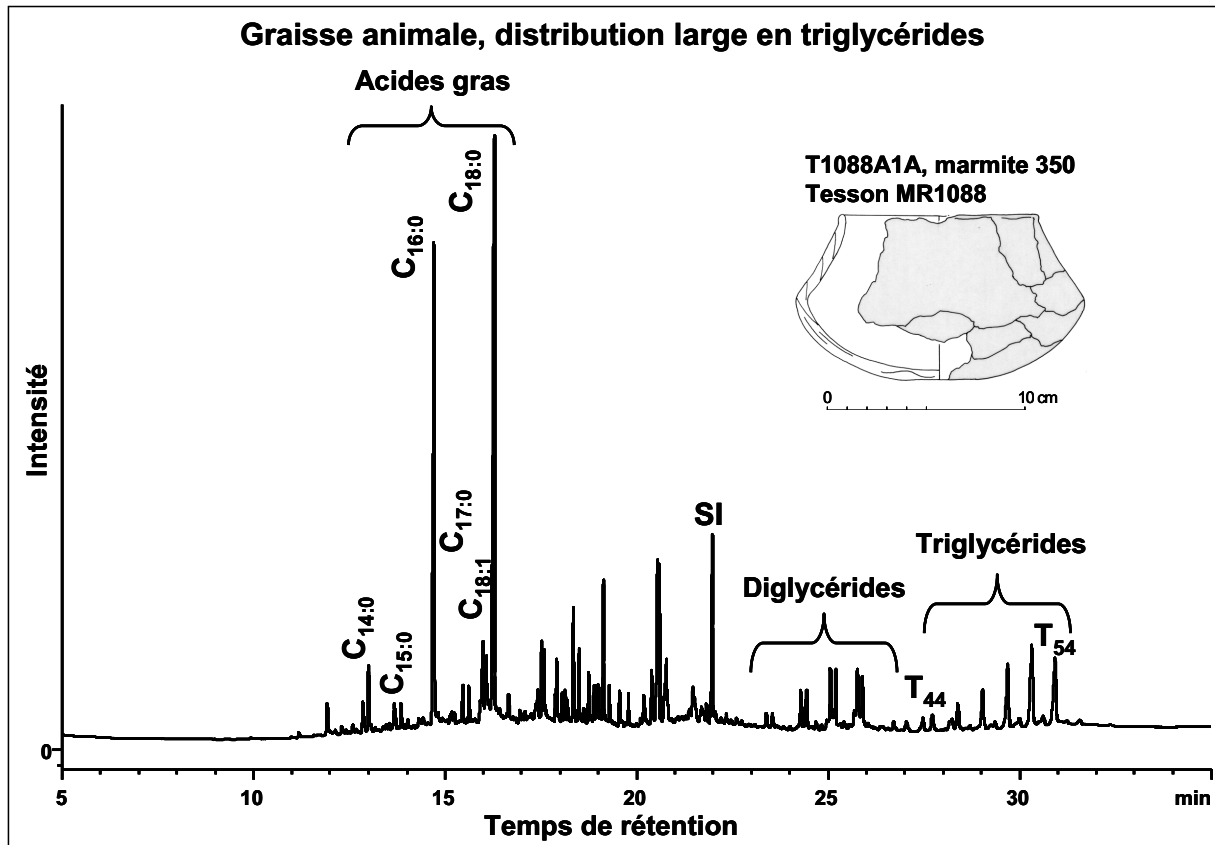
Godet 346, tesson MR1087								
Chromatographie en phase gazeuse								
T1087A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm								
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
3438.186	2295.466	1.3641	30.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

Composé	Aire	%
C14:0	96.951	10.15
C15:0	110.839	11.60
C16:0	279.895	29.29
C17:0	75.598	7.91
C18:1	111.701	11.69
C18:0	280.615	29.37
total	955.601	100.000
T42	16.351	5.00
T44	24.021	7.35
T46	35.567	10.88
T48	52.313	16.00
T50	65.023	19.89
T52	58.805	17.99
T54	31.953	9.77
total	326.933	86.878

Concentration µg/g	36.49
C16/C18	1.00
% Acides gras	27.79
% Triglycérides	9.51



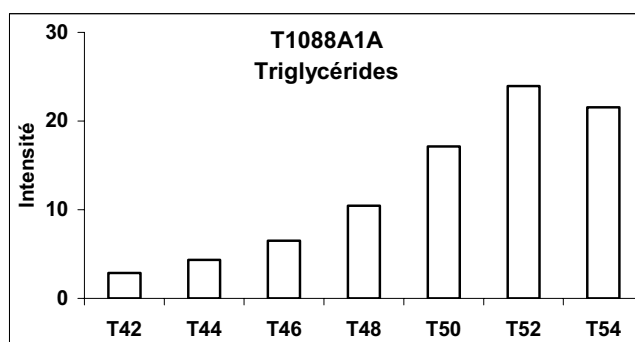
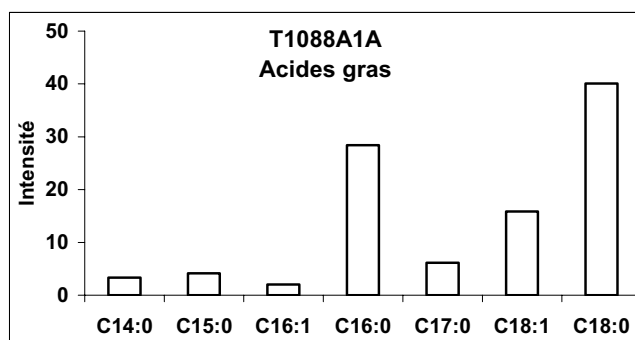
Marmite 350

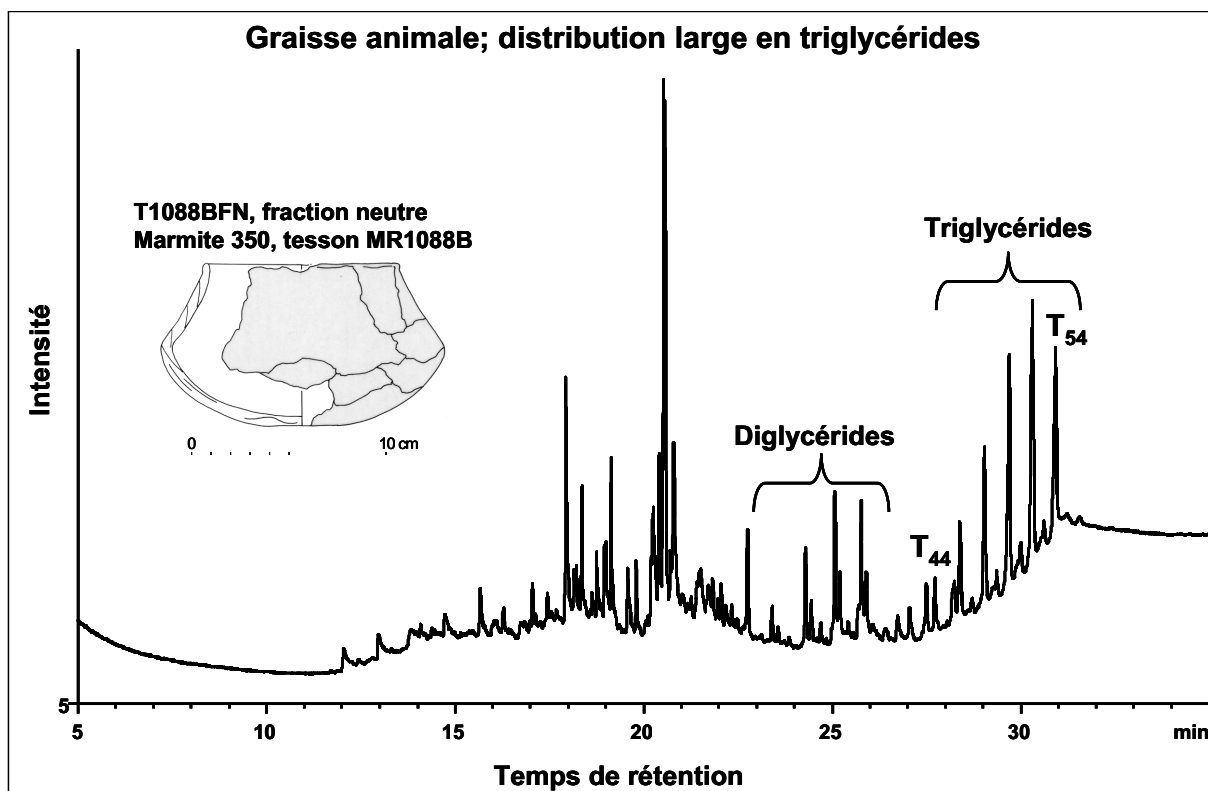


Marmite 350, tesson MR1088								
Chromatographie en phase gazeuse								
T1088A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm								
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
9557.511	335.212	1.5659	50.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

Composé	Aire	%
C14:0	99.676	3.34
C15:0	124.144	4.17
C16:1	61.200	2.05
C16:0	845.843	28.38
C17:0	183.788	6.17
C18:1	471.800	15.83
C18:0	1193.986	40.06
total	2980.437	100.000
T42	30.395	2.87
T44	46.035	4.34
T46	68.980	6.51
T48	110.976	10.47
T50	181.496	17.12
T52	253.869	23.95
T54	228.217	21.53
total	1059.973	86.792

Concentration µg/g	302.35
C16/C18	0.71
% AG	31.18
% TAG	11.09

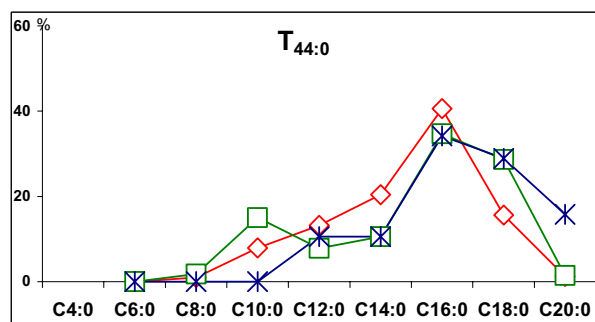
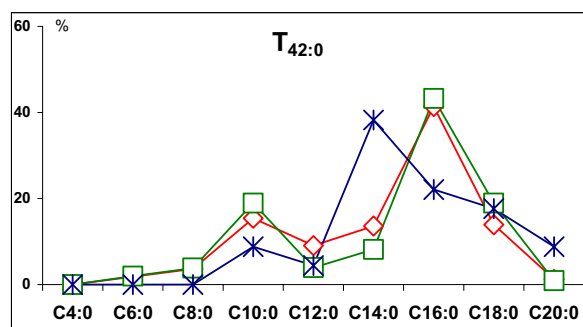
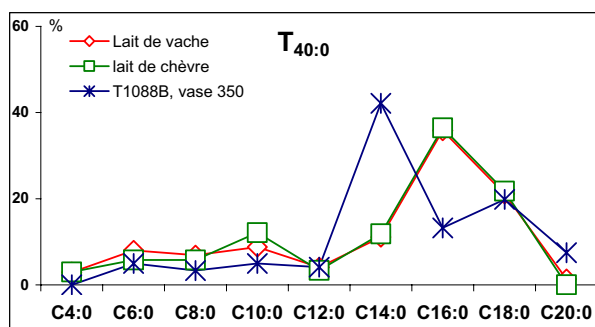




Spectrométrie de masse, nanoESI Q-q-TOF MS/MS
T1088BFN, fraction neutre
Produits laitiers

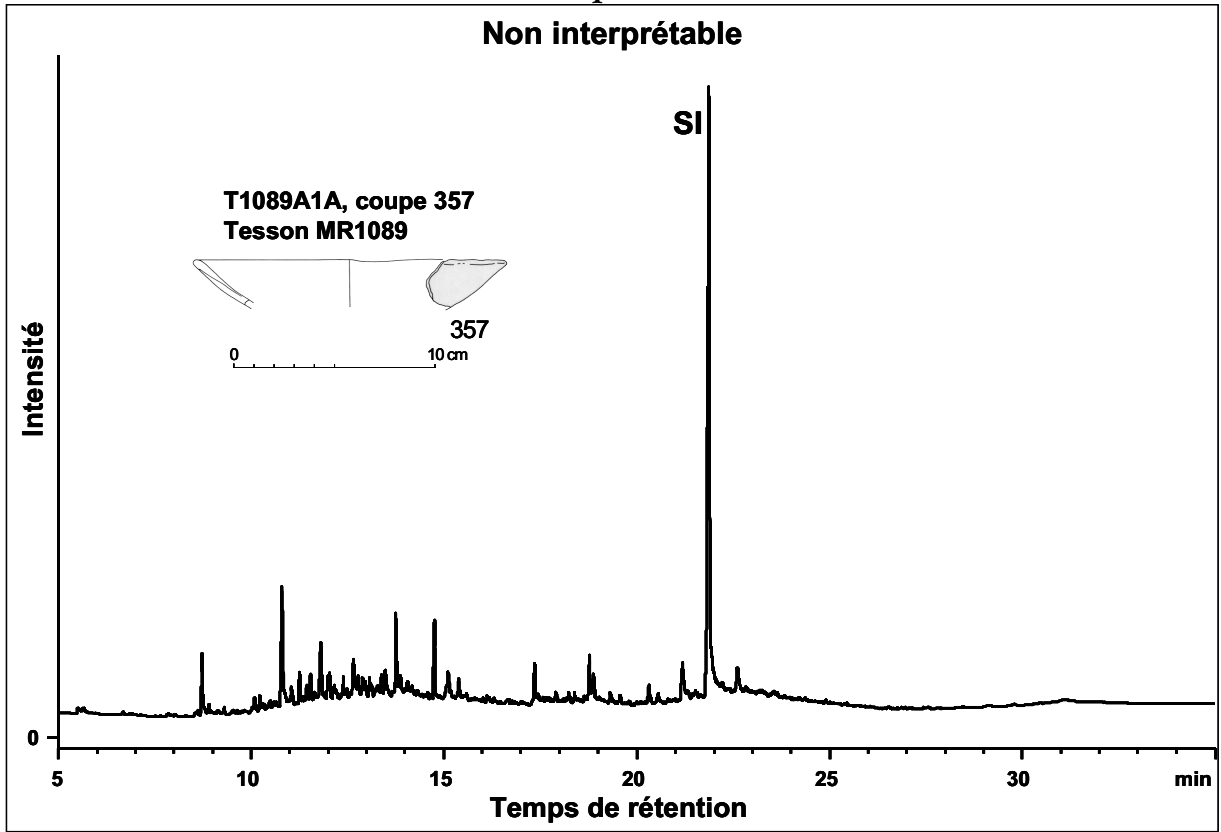
Triglycérides détectés $T_{40:0}$ - $T_{44:0}$

	C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C20:0
$T_{40:0}$	4.97	3.31	4.97	4.13	42.14	13.22	19.84	7.44
$T_{42:0}$			8.82	4.42	38.25	22.06	17.64	8.82
$T_{44:0}$				10.54	10.54	34.19	28.95	15.78

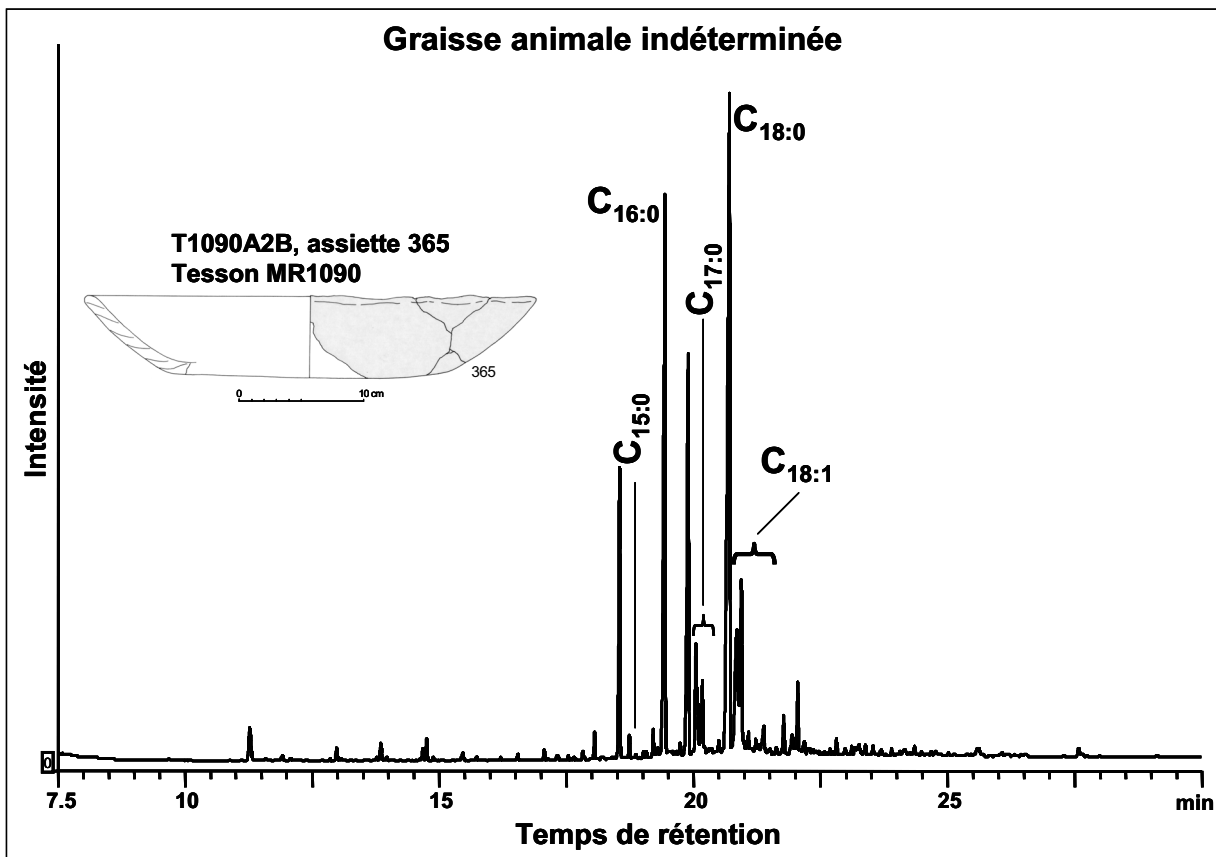
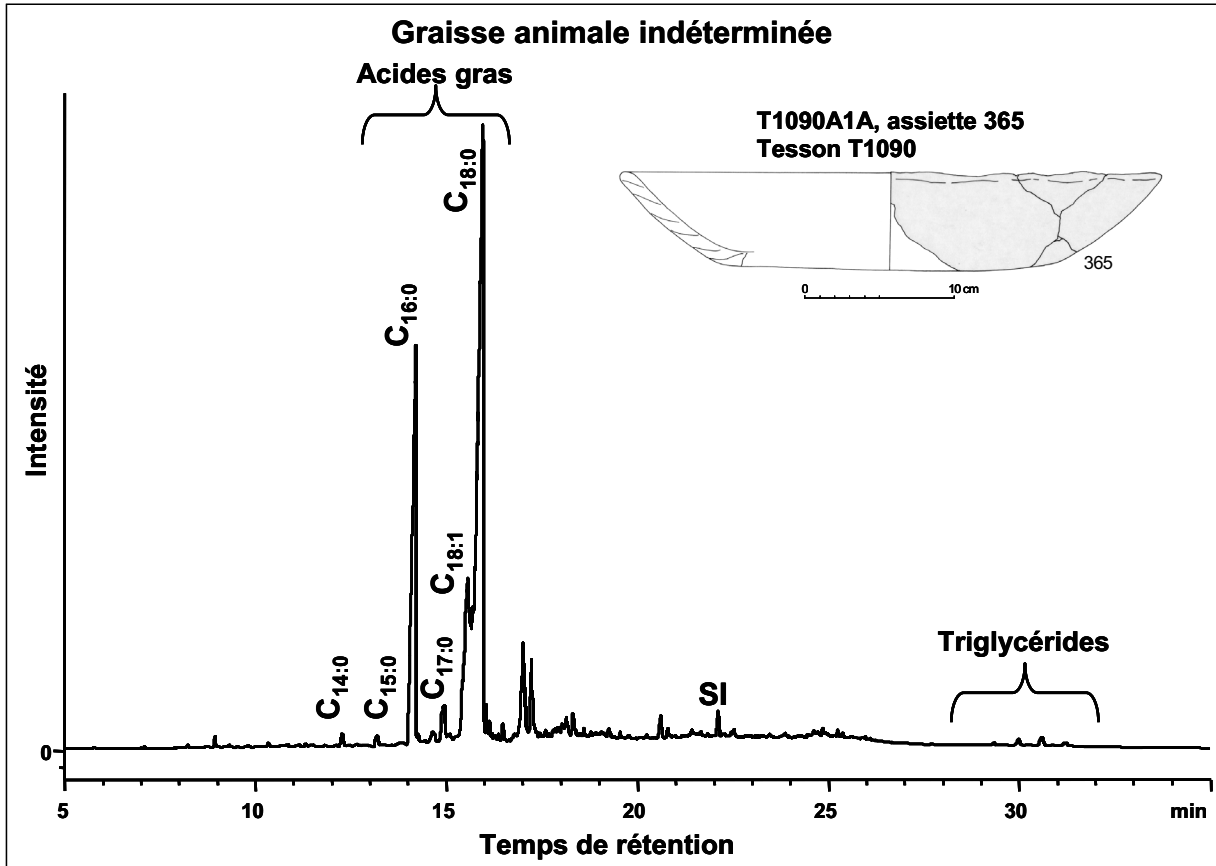


Coupe 357

Non interprétable



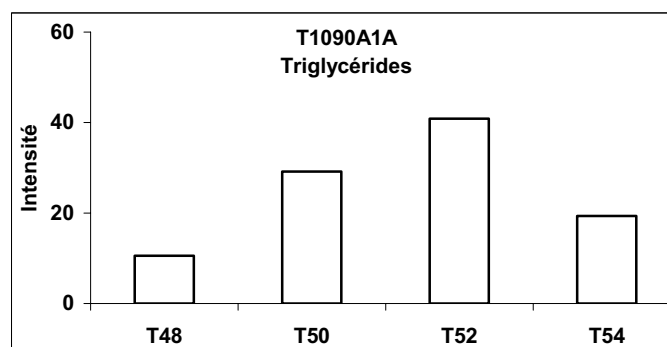
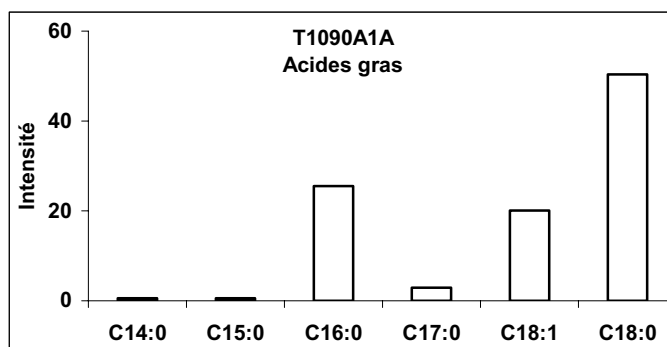
Assiette 365



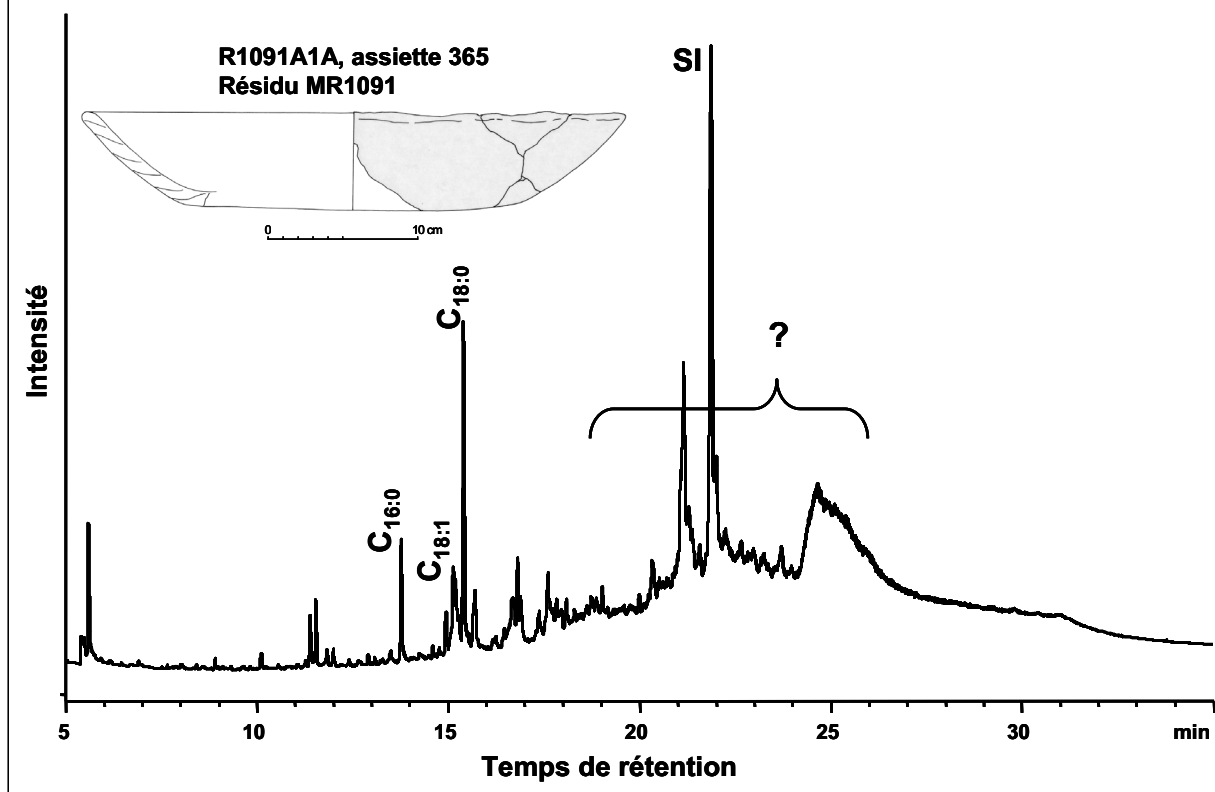
Assiette 365, tesson MR1090								
Chromatographie en phase gazeuse								
T1090A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm								
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
38787.065	238.500	2.3727	100.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

Composé	Aire	%
C14:0	191.806	0.59
C15:0	183.718	0.57
C16:0	8239.888	25.53
C17:0	938.655	2.91
C18:1	6467.001	20.04
C18:0	16248.008	50.35
total	32269.076	100.000
T48	41.473	10.59
T50	114.171	29.16
T52	159.877	40.84
T54	75.946	19.40
total	391.466	100.000

Concentration µg/g	1370.84
C16/C18	0.51
% Acides gras	83.20
% Triglycérides	1.01

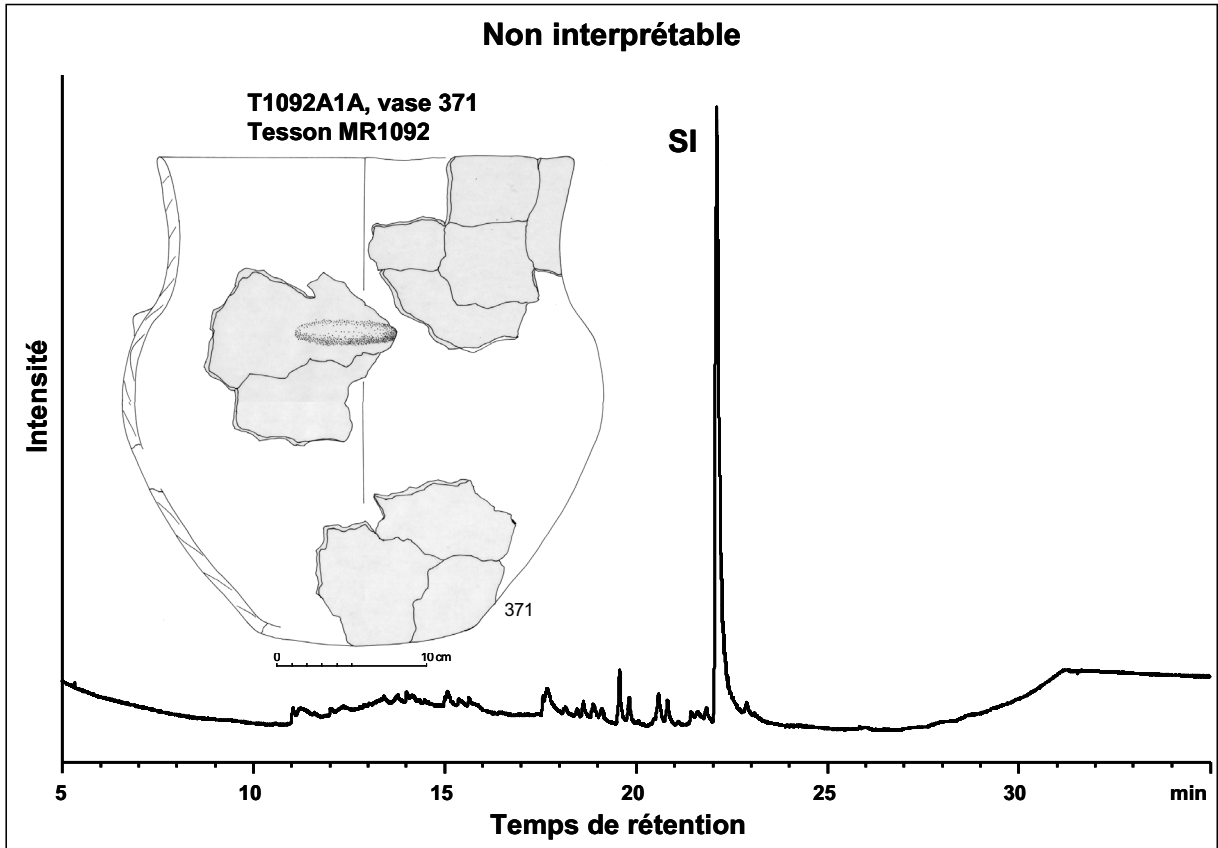


Matière grasse indéterminée

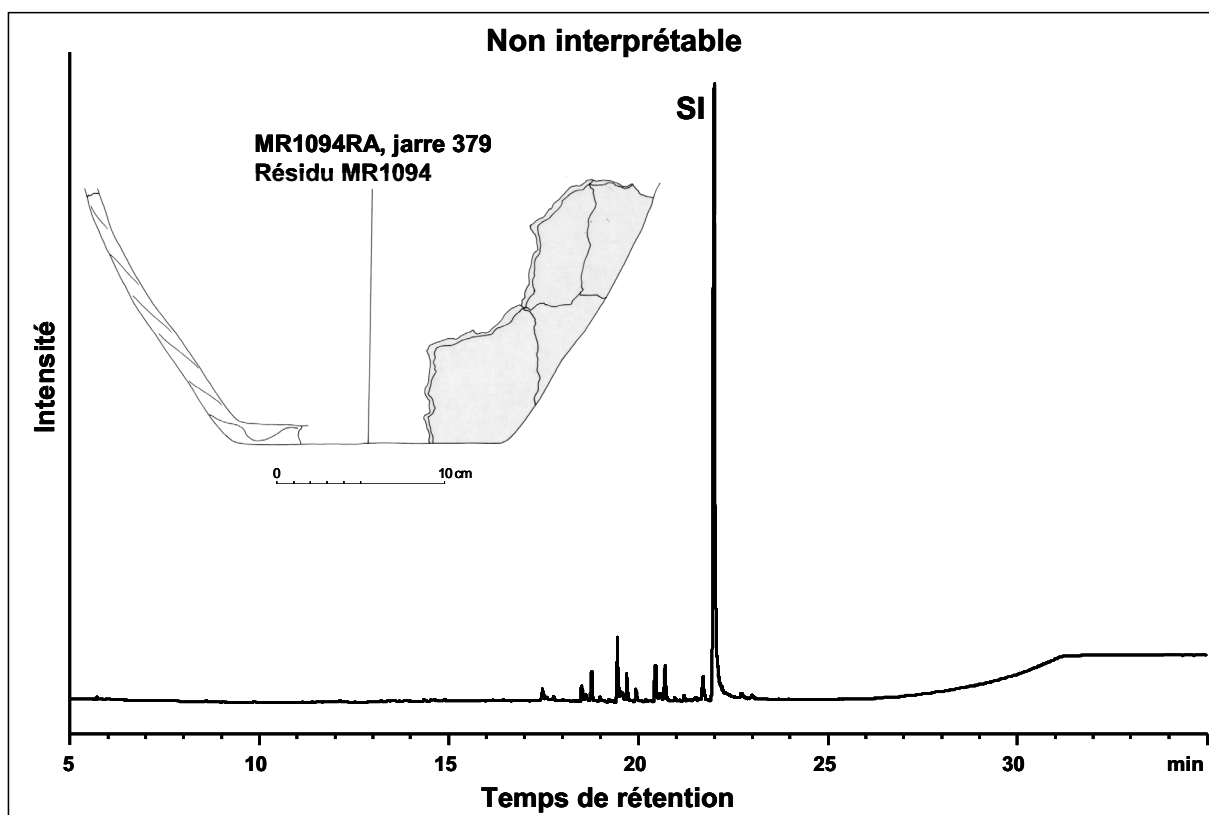
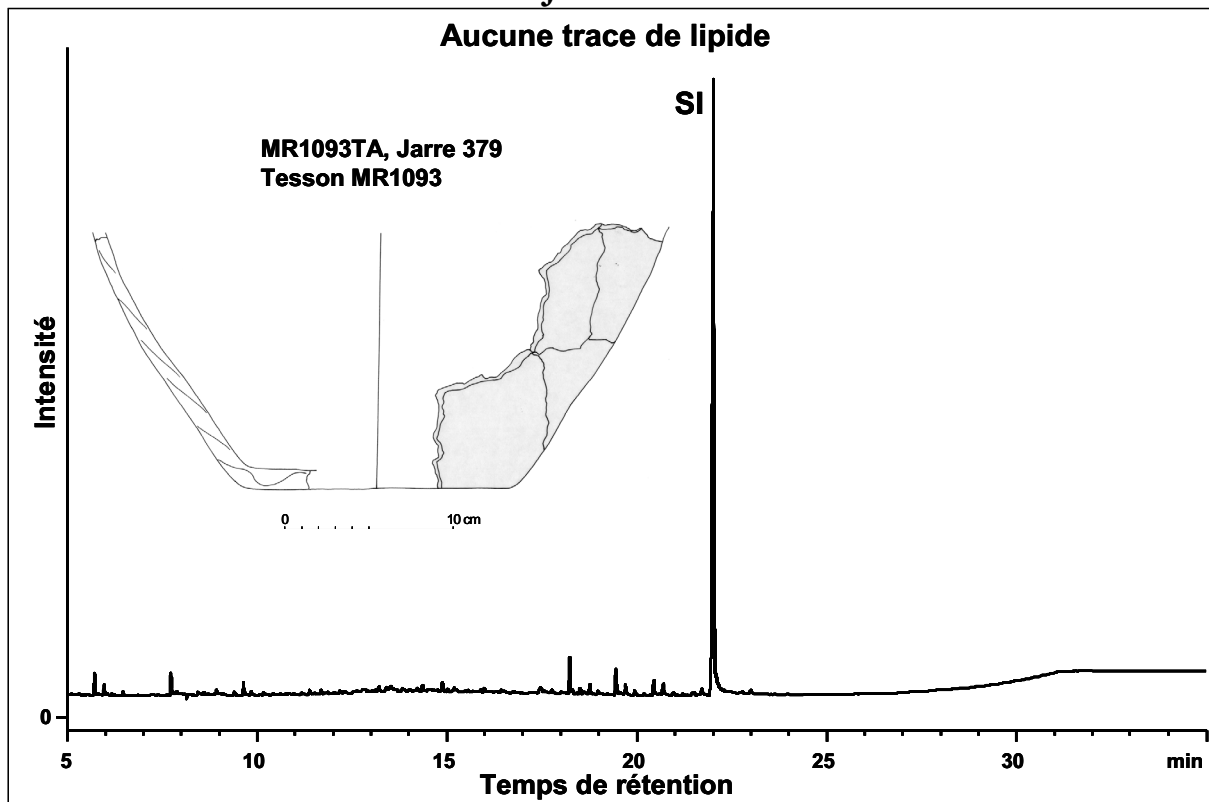


Vase 371

Non interprétable

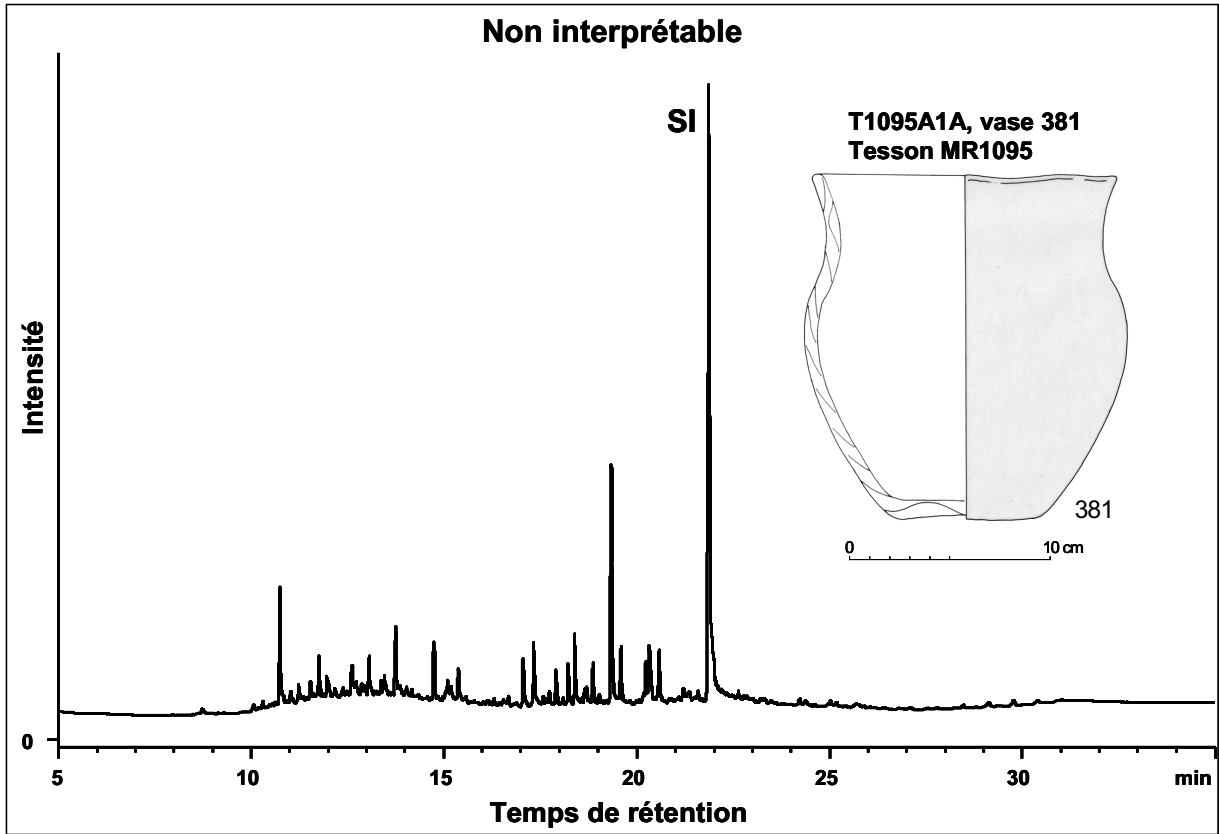


Jarre 379

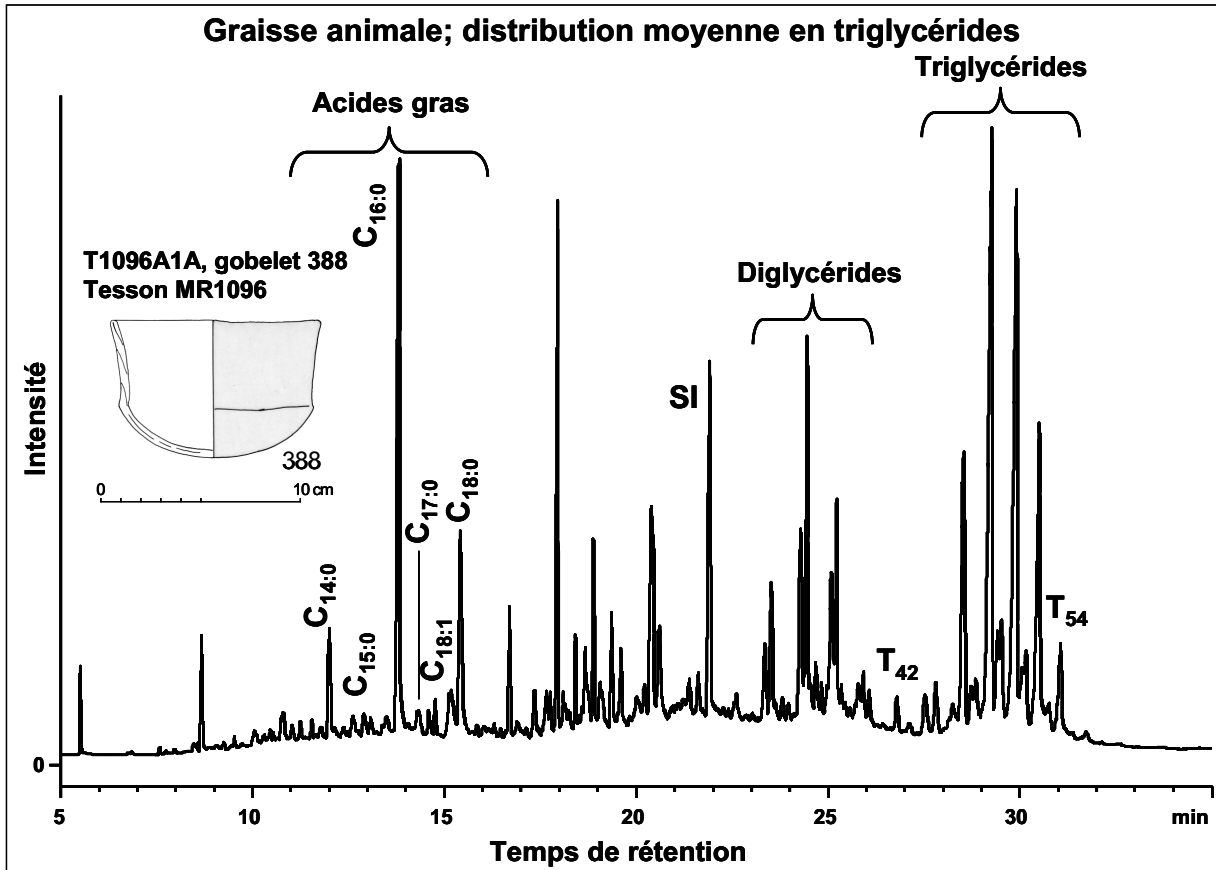


Vase 381

Non interprétable



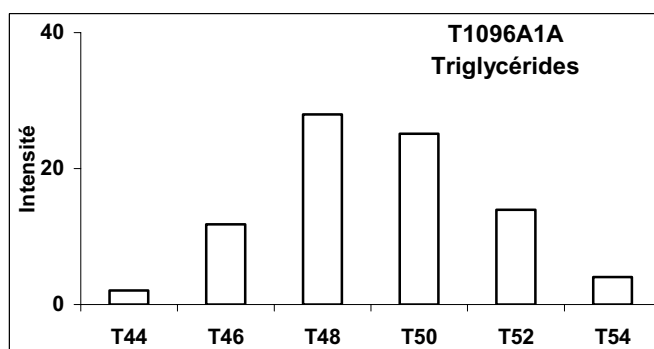
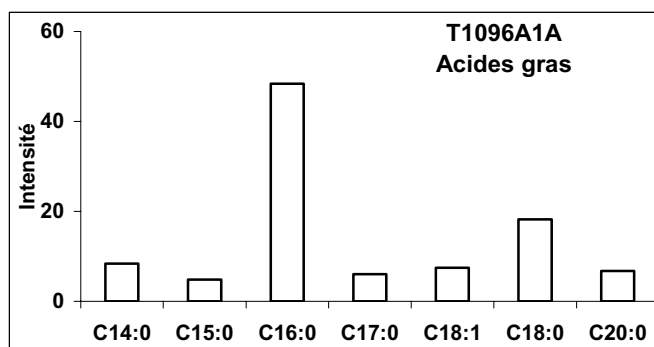
Gobelet 388

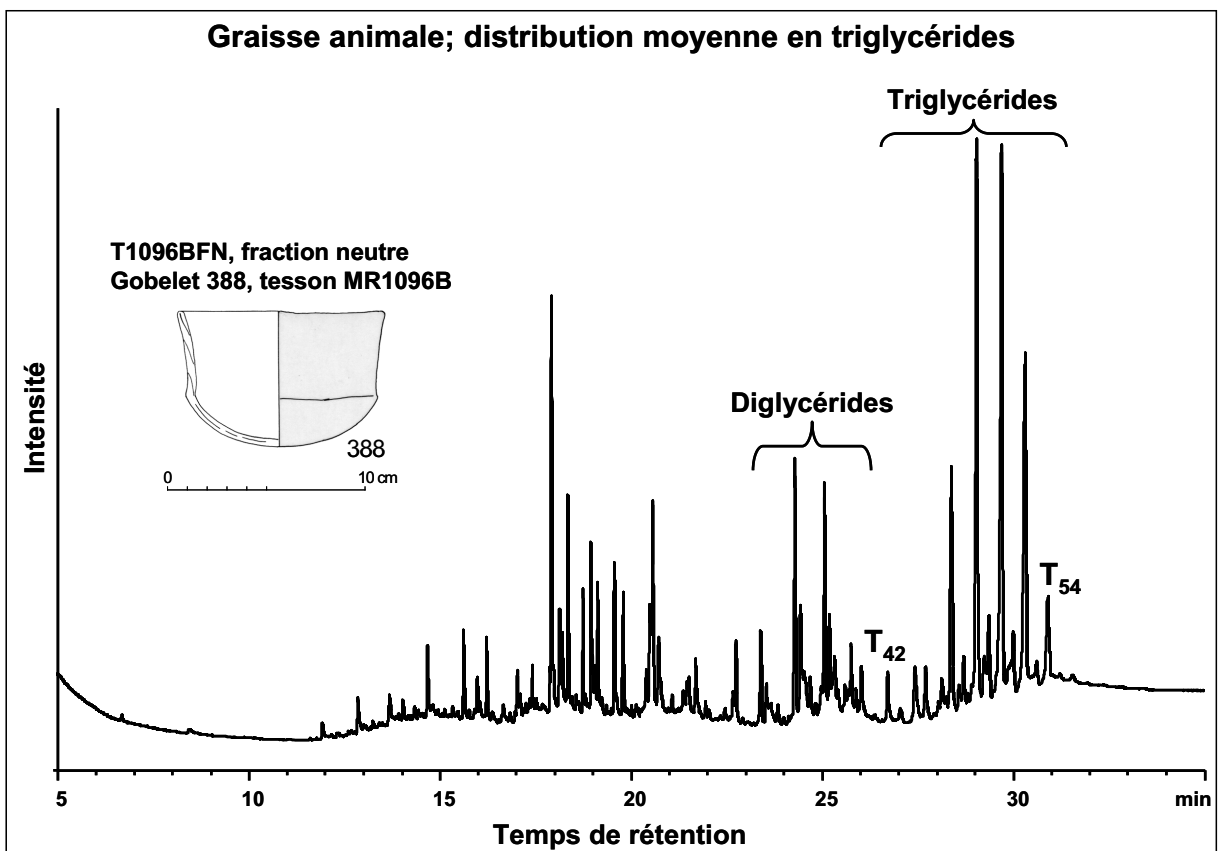
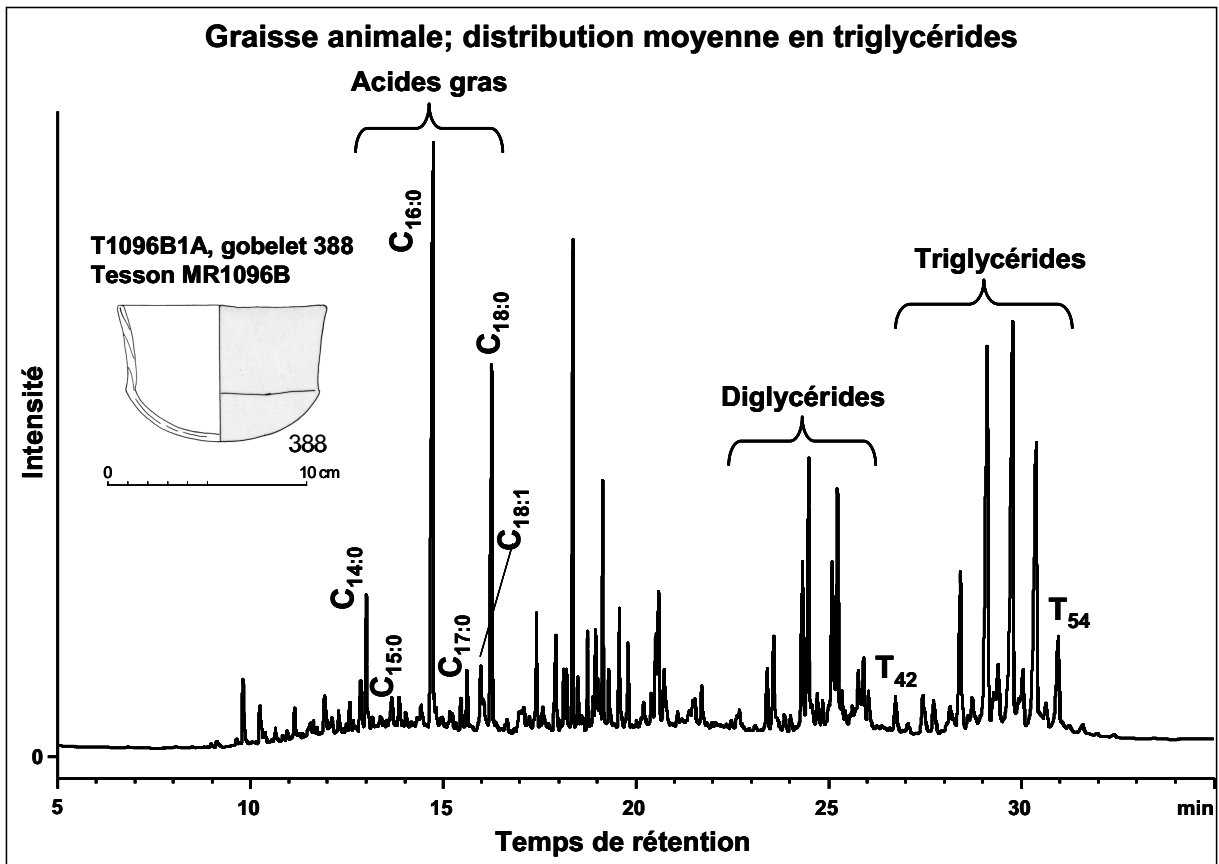


Gobelet 388, tesson MR1096								
Chromatographie en phase gazeuse								
T1096A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm								
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
28126.772	1279.823	2.1073	30.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

Composé	Aire	%
C14:0	421.598	8.36
C15:0	244.325	4.85
C16:0	2440.018	48.39
C17:0	303.731	6.02
C18:1	375.719	7.45
C18:0	917.547	18.20
C20:0	339.374	6.73
total	5042.312	100.000
T44	226.922	2.05
T46	1305.817	11.79
T48	3099.252	27.99
T50	2784.140	25.14
T52	1544.487	13.95
T54	444.910	4.02
total	11074.400	84.930

Concentration µg/g	208.58
C16/C18	2.66
% Acides gras	17.93
% Triglycérides	39.37





Spectrométrie de masse, nanoESI Q-q-TOF MS/MS
T1096BFN, fraction neutre
Graisse animale

Triglycérides détectés

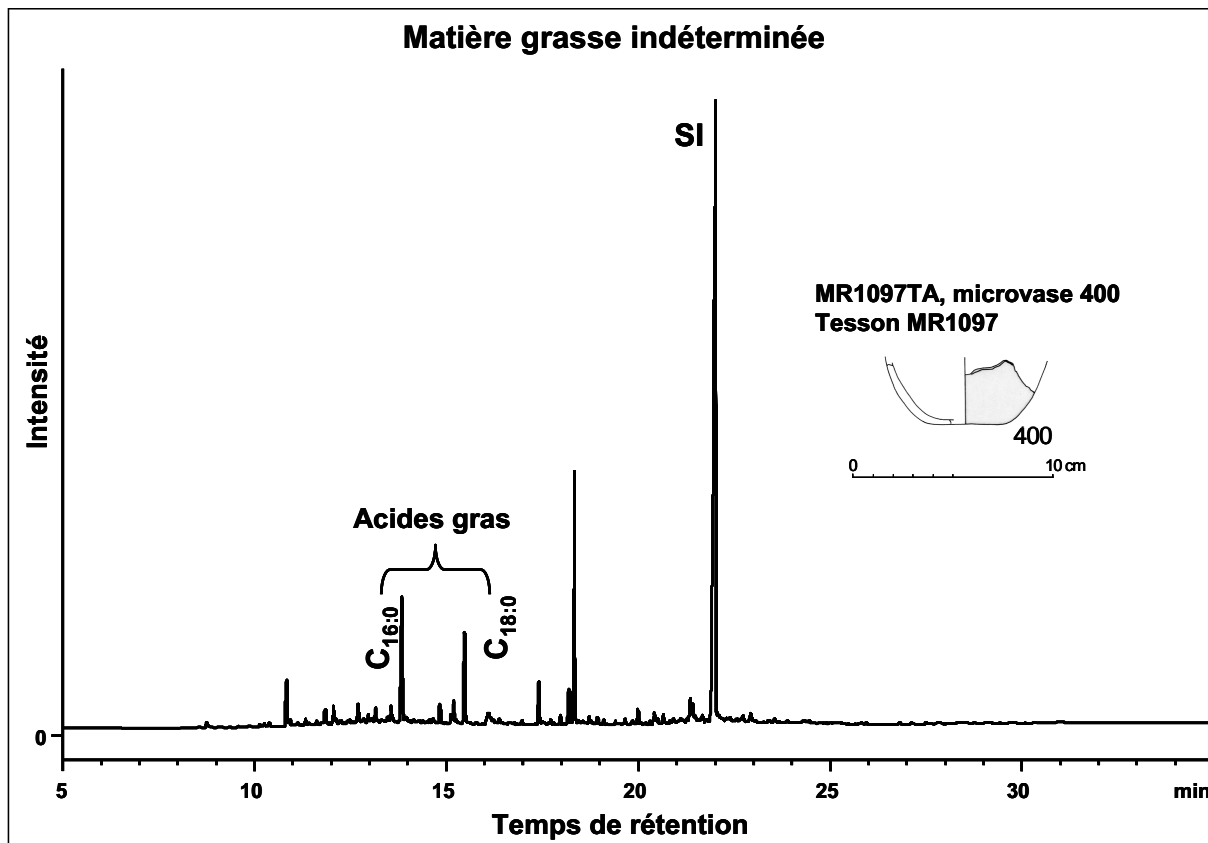
T_{42:0}-T_{54:0}

T_{48:1}-T_{50:1}

	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C20:0
T42:0	5.82	15.35	11.64	22.75	37.04	7.40	0.00
T44:0	0.00	0.00	0.00	40.01	59.99	0.00	0.00
T46:0	0.00	0.00	0.00	0.00	77.80	22.20	0.00
T50:0	0.00	0.00	0.00	0.00	36.32	63.68	0.00
T52:0	0.00	0.00	0.00	0.00	23.08	56.84	20.08
T54:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00

	C16:0	C18:1	C18:0
T48:1	58.35	41.65	0.00
T50:1	49.26	41.04	9.70

Microvase 400

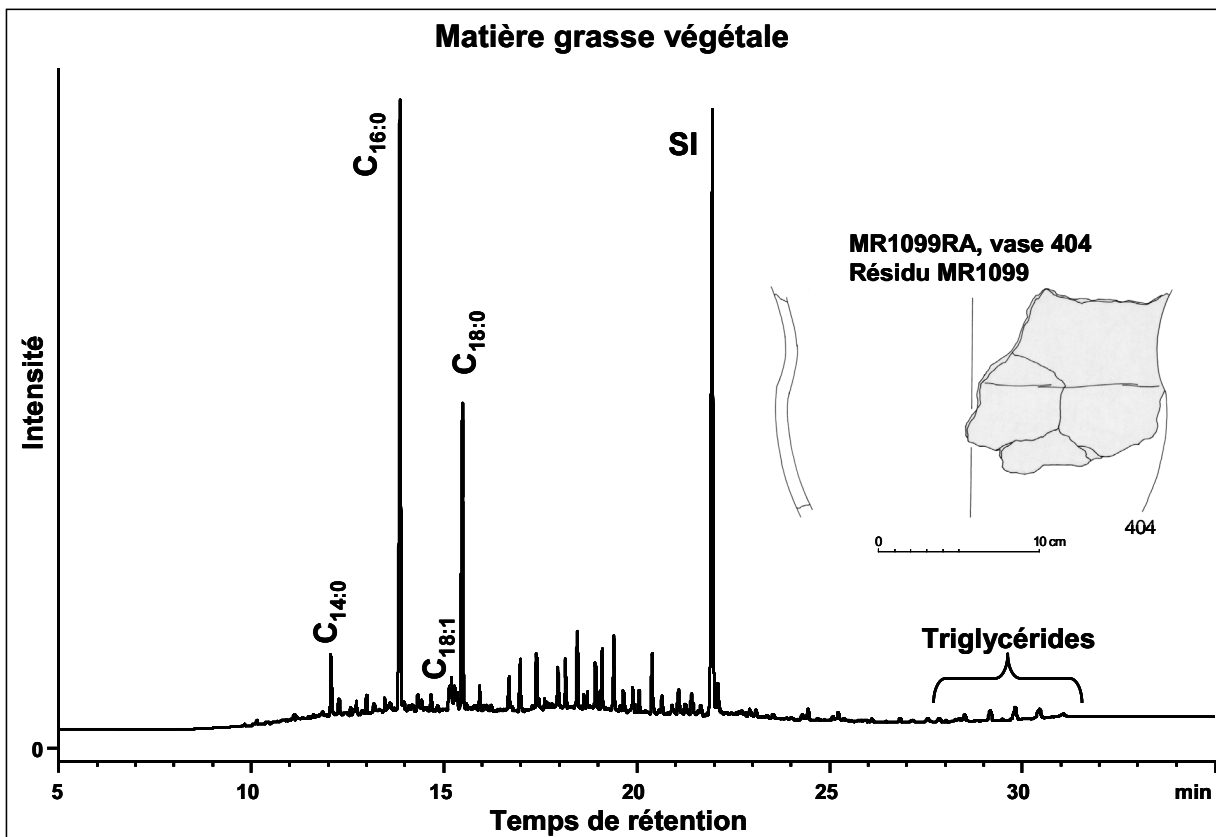
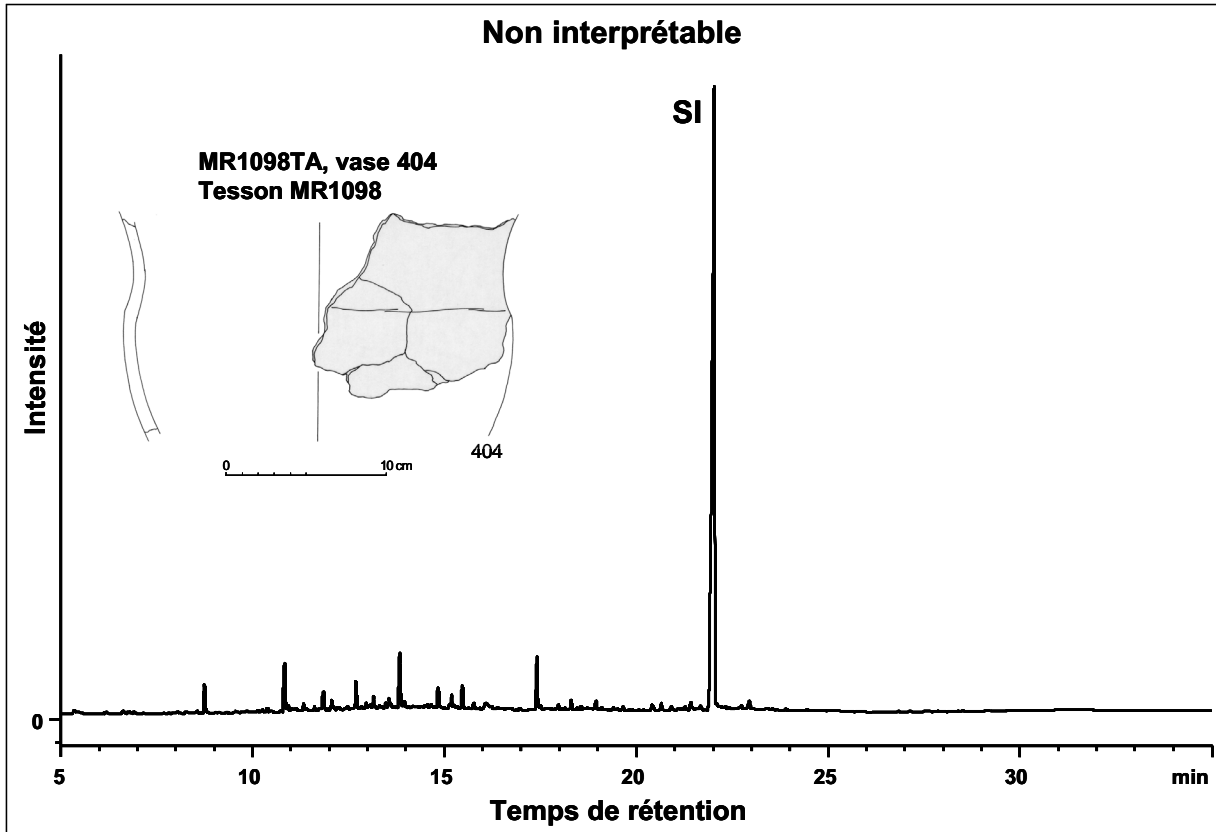


Microvase 400, tesson MR1097									
Chromatographie en phase gazeuse									
MR1097TA, CP Sil 5-CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 μ m									
Aire totale	Aire standard	masse tesson g	volume final μ L	Concentration SI mg/mL	volume SI μ L	$C_{SI(TLE)}$ mg/mL	VTLE μ L	Vprél μ l	
1884.865	2010.285	1.7941	30.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00	

Composé	Aire	%
C16:0	240.251	59.39
C18:0	164.256	40.61
total	404.507	100.000

Concentration μ g/g	10.45
C16/C18	1.46
% Acides gras	21.46

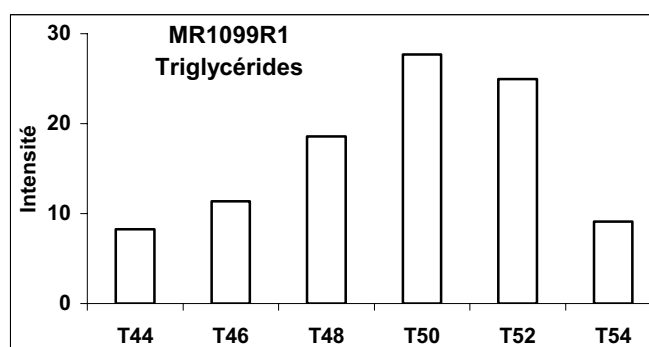
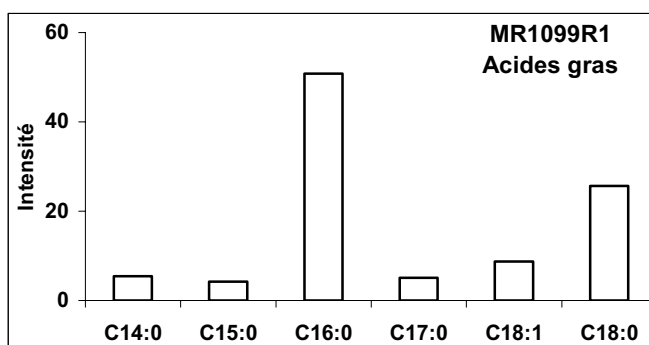
Vase 404



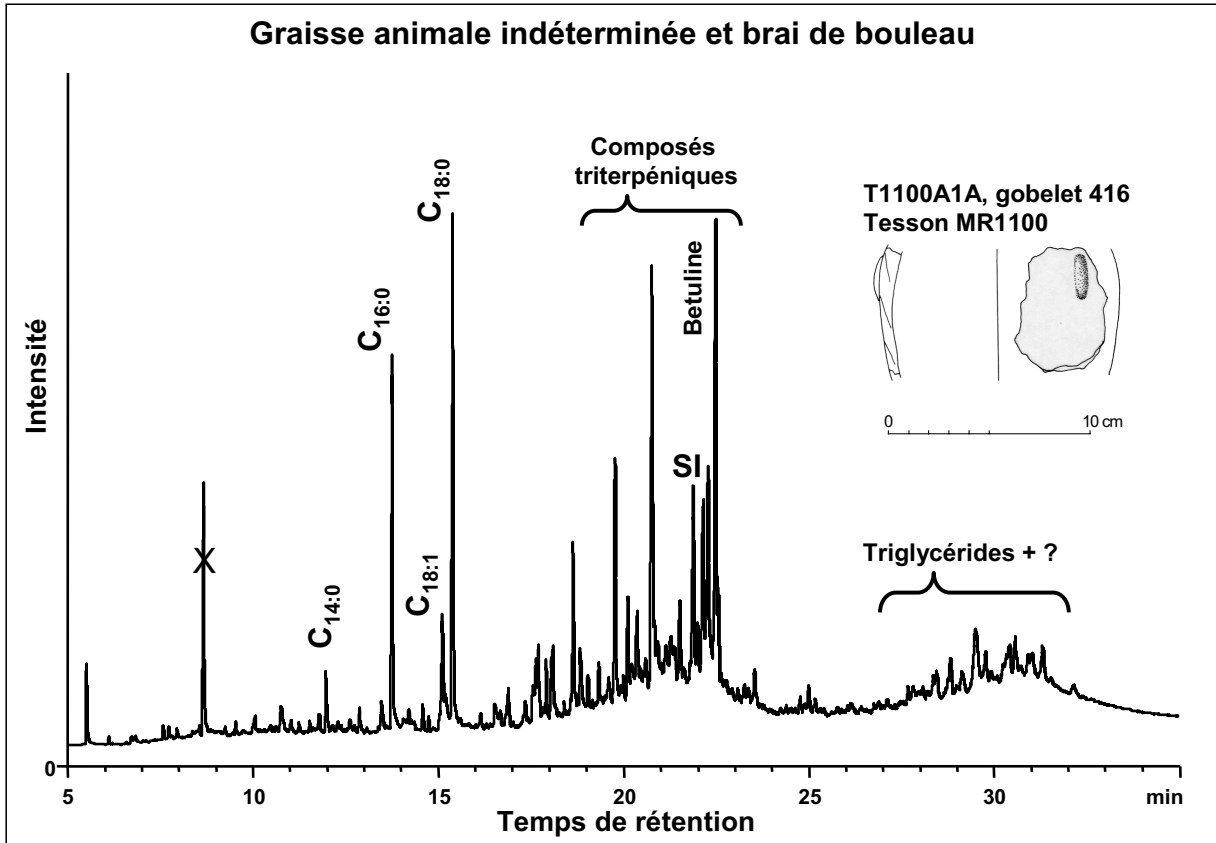
Vase pseudo-tulipiforme 404								
Chromatographie en phase gazeuse								
MR1099RA, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm								
Aire totale	Aire standard	masse résidu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
1582.320	590.665	0.1507	80.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

Composé	Aire	%
C14:0	43.958	5.45
C15:0	34.127	4.23
C16:0	409.970	50.82
C17:0	41.193	5.11
C18:1	70.584	8.75
C18:0	206.869	25.64
total	806.700	100.000
T44	5.757	8.26
T46	7.923	11.37
T48	12.937	18.57
T50	19.303	27.71
T52	17.396	24.97
T54	6.356	9.12
total	69.673	100.000

Concentration µg/g	355.52
C16/C18	1.98
% Acides gras	50.98
% Triglycérides	4.40



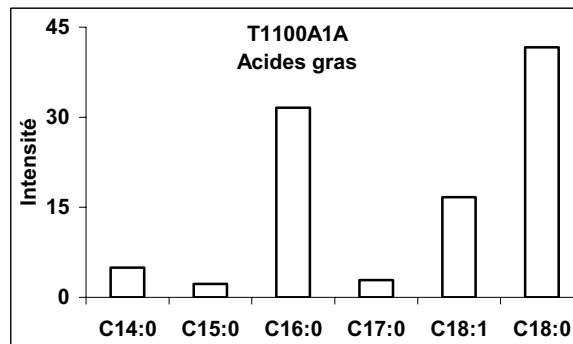
Gobelet 416



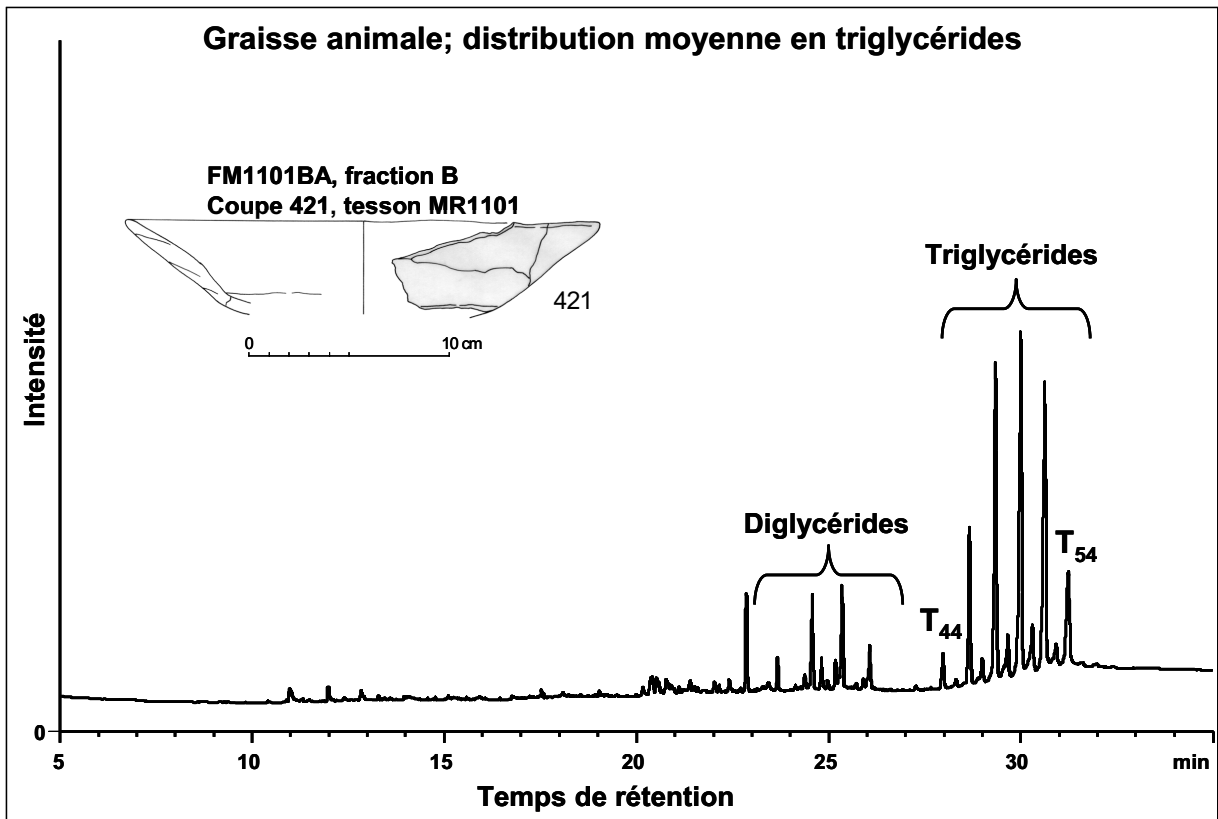
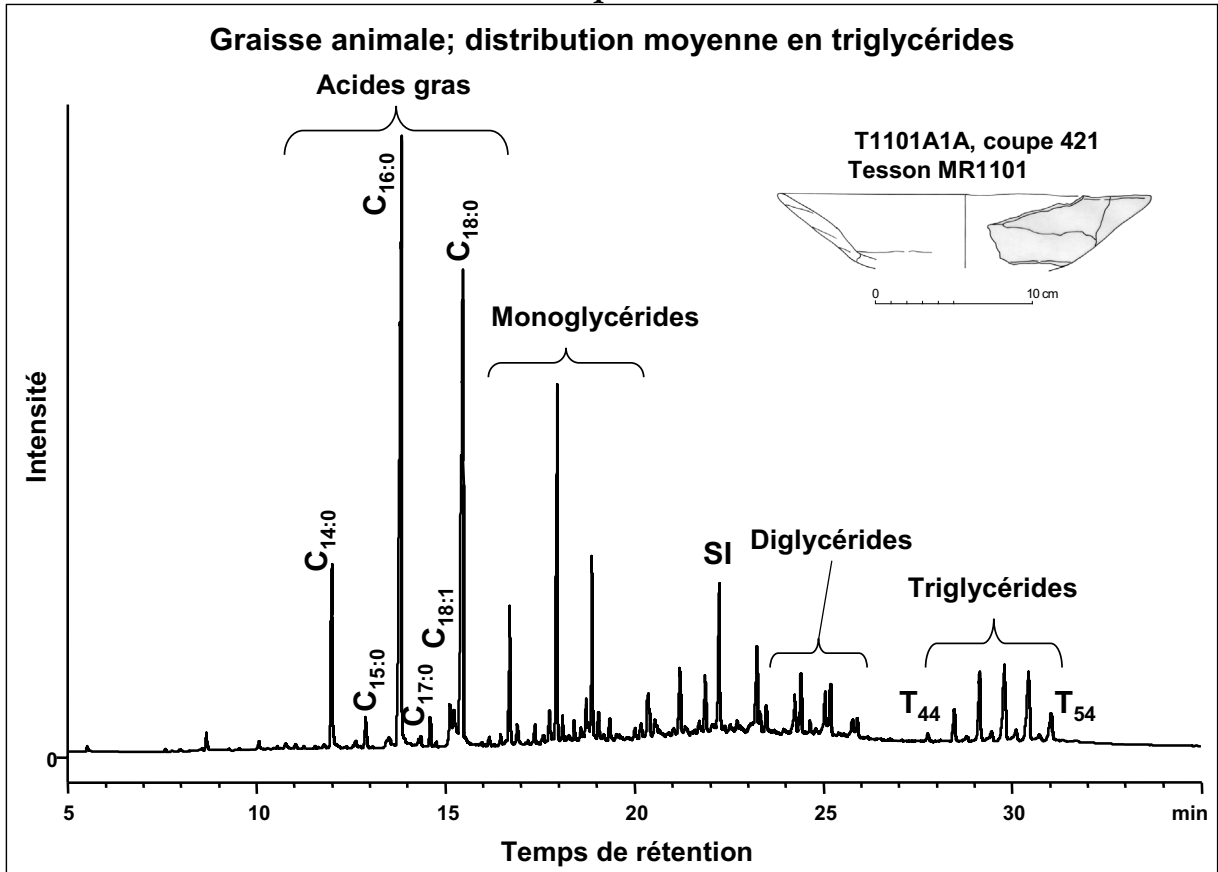
Gobelet 416, tesson MR1100									
Chromatographie en phase gazeuse									
T1100A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm									
Aire totale	Aire	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µL	
6470.911	285.599	2.40	80.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00	

Composé	Aire	%
C14:0	67.031	4.95
C15:0	30.189	2.23
C16:0	427.428	31.59
C17:0	38.982	2.88
C18:1	225.945	16.70
C18:0	563.322	41.64
total	1352.897	100.00

Concentration µg/g	188.61
C16/C18	0.76
% Acides gras	20.91



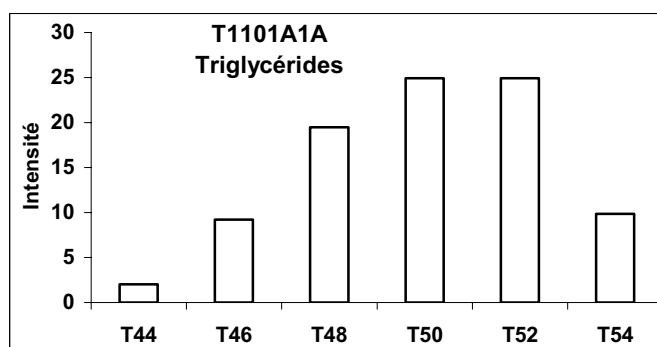
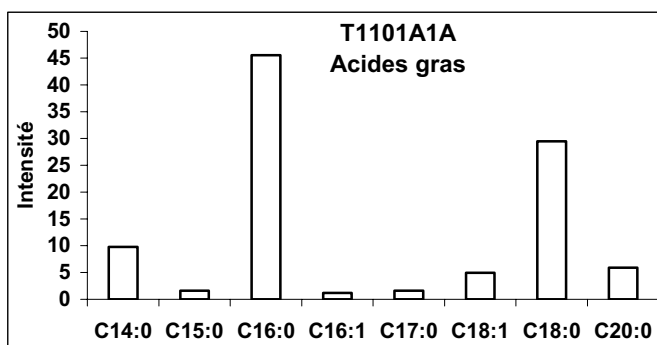
Coupe 421



Coupe 421, tesson MR1101								
Chromatographie en phase gazeuse								
T1101A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm								
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	V _{TLE} µL	V _{prél} µl
14276.655	578.176	3.1514	80.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

Composé	Aire	%
C14:0	708.110	9.76
C15:0	115.735	1.60
C16:0	3302.214	45.52
C16:1	85.575	1.18
C17:0	117.953	1.63
C18:1	358.807	4.95
C18:0	2138.701	29.48
C20:0	426.946	5.89
total	7254.041	100.000
T44	36.380	2.02
T46	165.972	9.21
T48	351.058	19.48
T50	449.255	24.93
T52	449.182	24.92
T54	177.845	9.87
total	1802.240	90.426

Concentration µg/g	156.71
C16/C18	1.54
% Acides gras	50.81
% Triglycérides	12.62



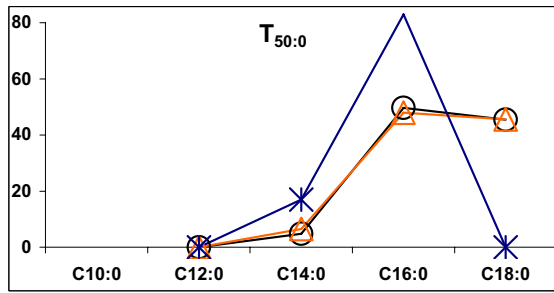
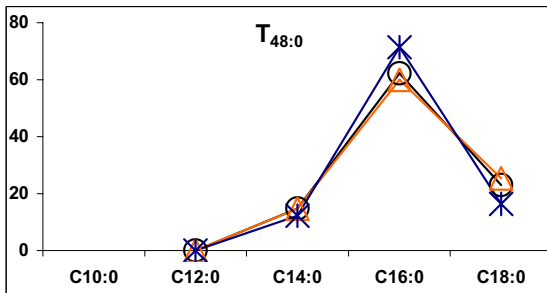
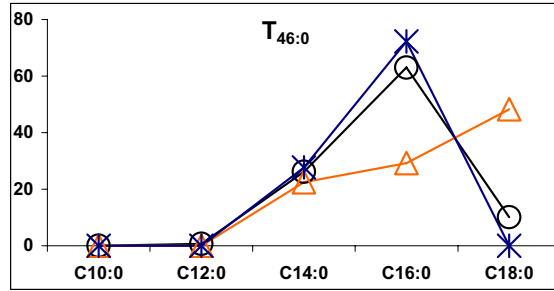
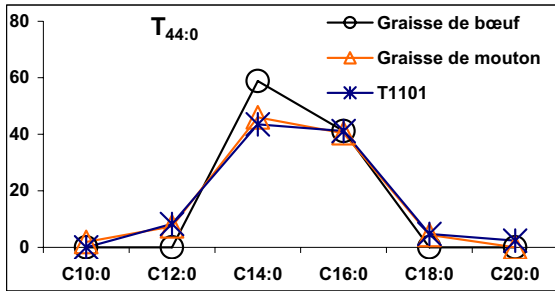
Spectrométrie de masse, nanoESI Q-q-TOF MS/MS
FM1101B, fraction B
Graisse sous-cutanée d'oviné/capriné ???

Triglycérides détectés

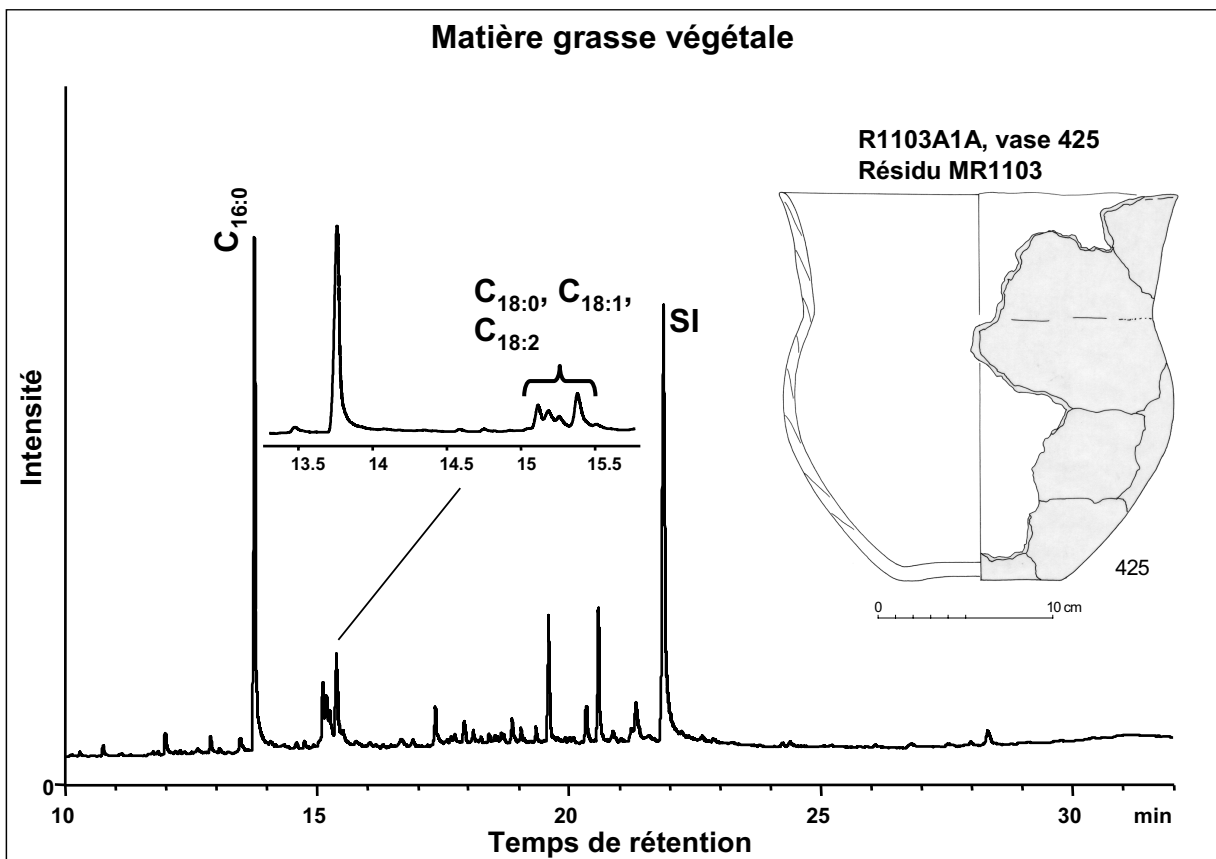
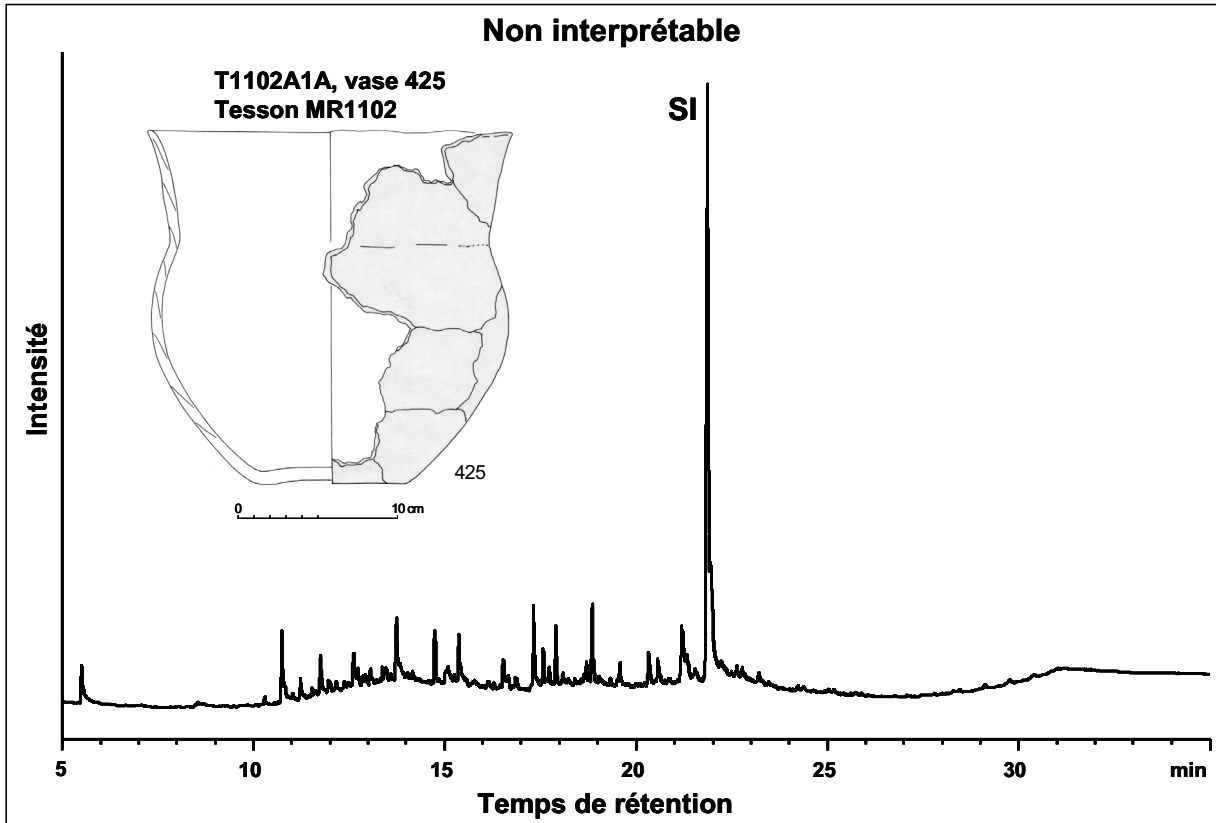
T_{44:0}-T_{52:0}

T_{52:1}

T1101	C12:0	C14:0	C16:0	C18:1	C18:0	C20:0
T44:0	8.25	43.53	41.16		4.72	2.35
T46:0		27.74	72.26			
T48:0		12.24	71.44		16.32	
T50:0		16.99	83.01			
T52:0			47.04		52.96	
T52:1			39.98	35.99	24.03	



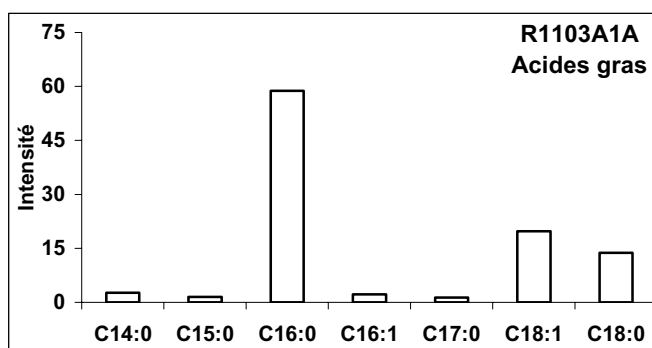
Vase 425



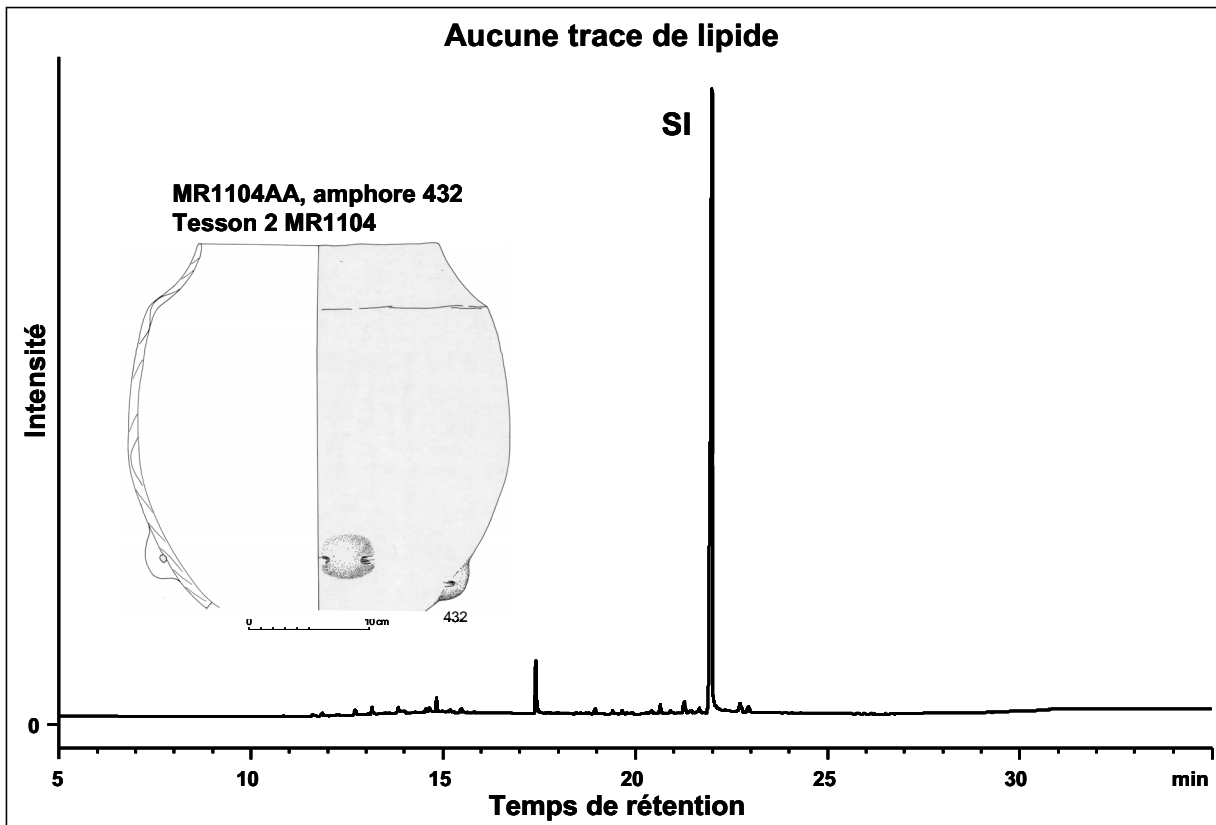
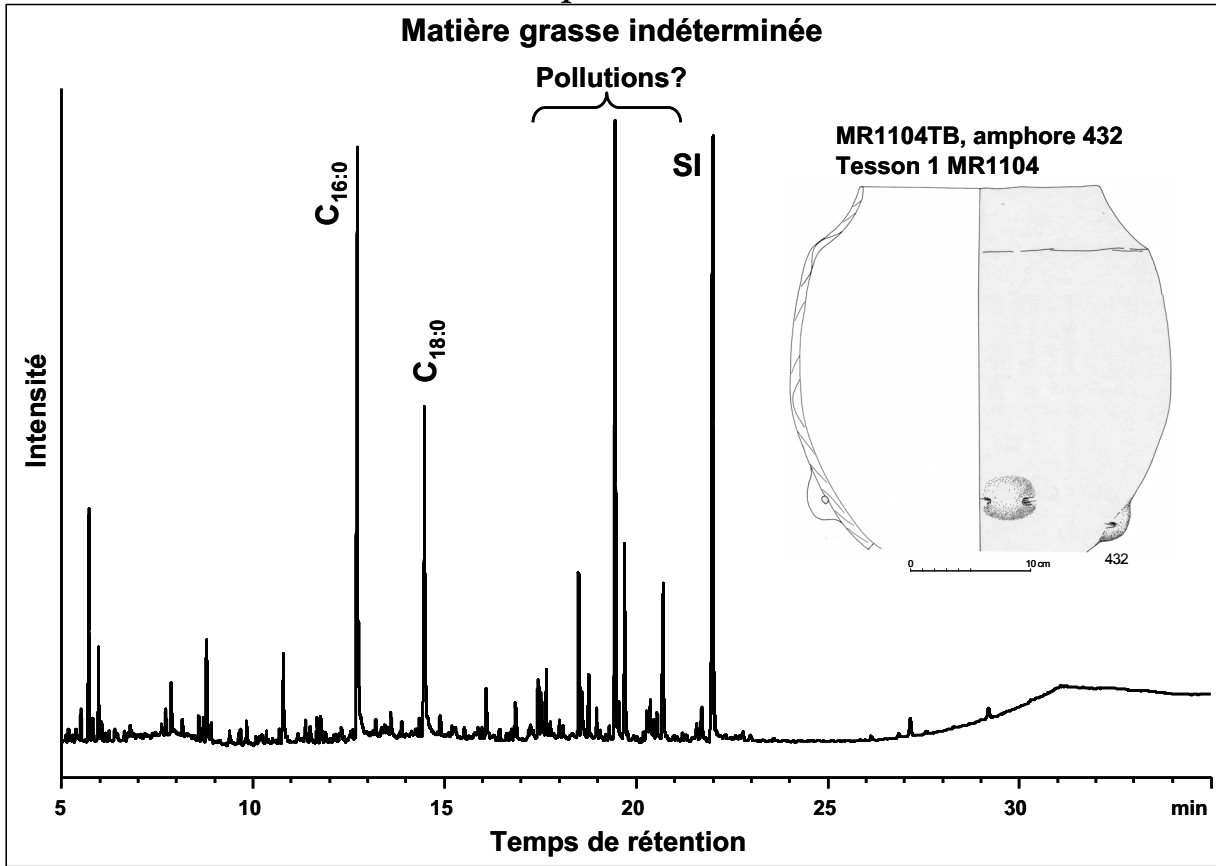
Vase tulipiforme 425, résidu MR1103								
Chromatographie en phase gazeuse								
R1103A1A, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm								
Aire totale	Aire	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
1108.803	441.685	0.0667	50.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

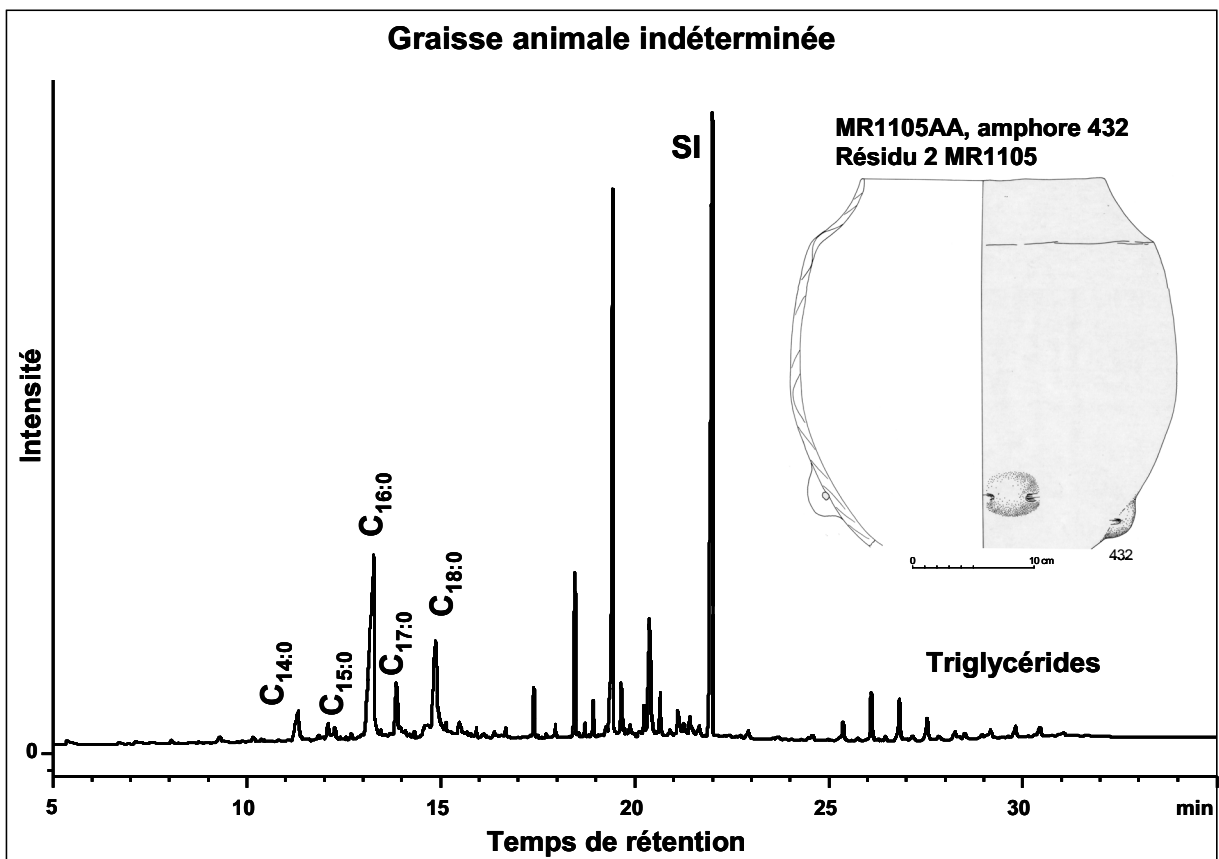
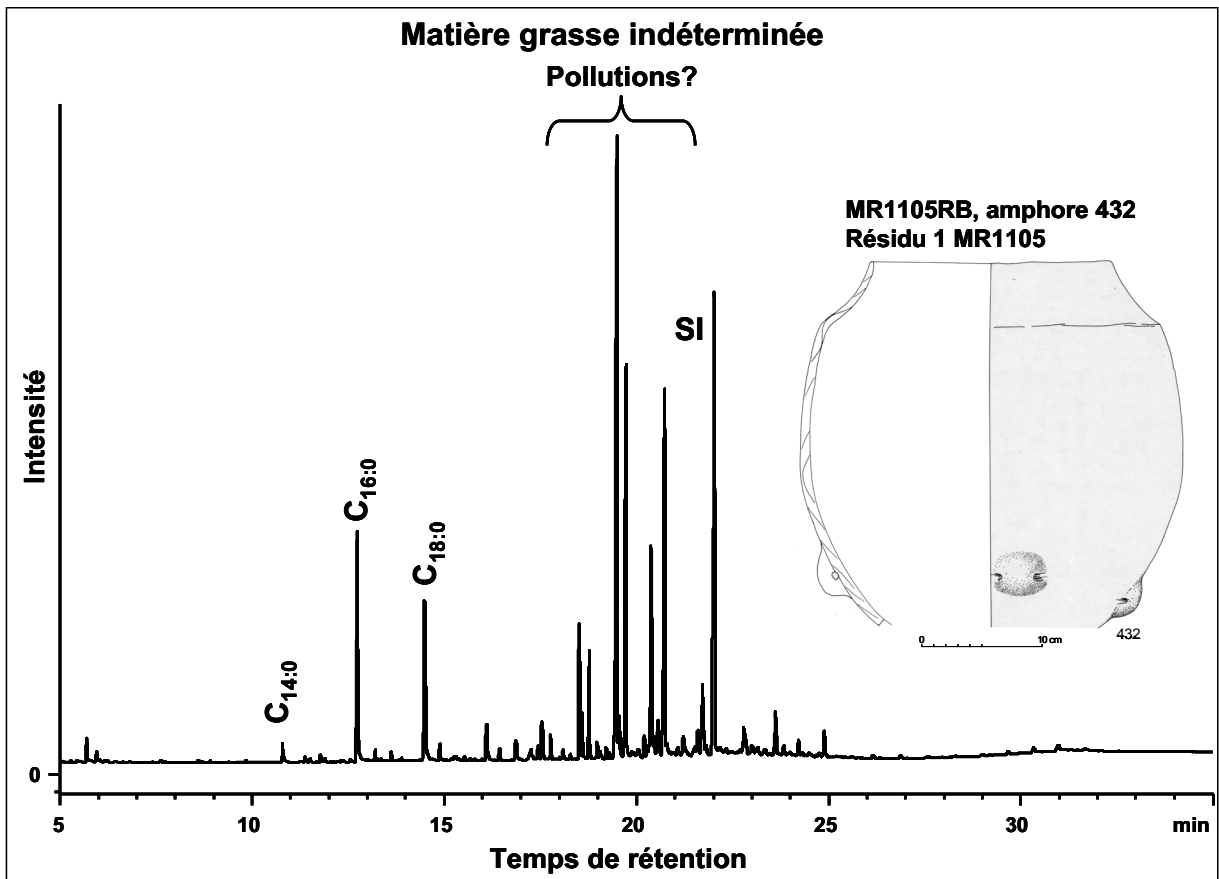
Composé	Aire	%
C14:0	16.417	2.62
C15:0	9.511	1.52
C16:0	368.591	58.77
C16:1	14.056	2.24
C17:0	8.403	1.34
C18:1	123.782	19.74
C18:0	86.376	13.77
total	627.137	100.000

Concentration µg/g	752.74
Concentration mg/mL	0.28
C16/C18	4.27
% Acides gras	56.56



Amphore 432



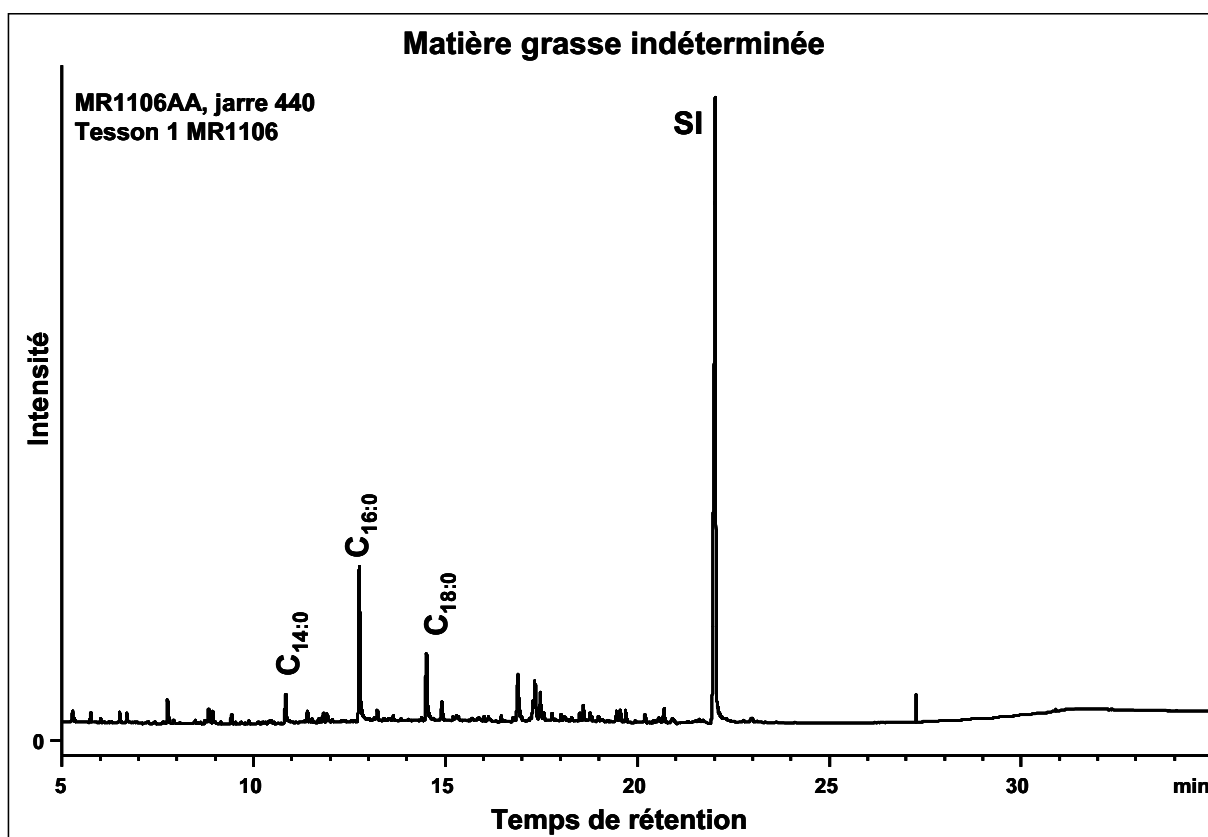
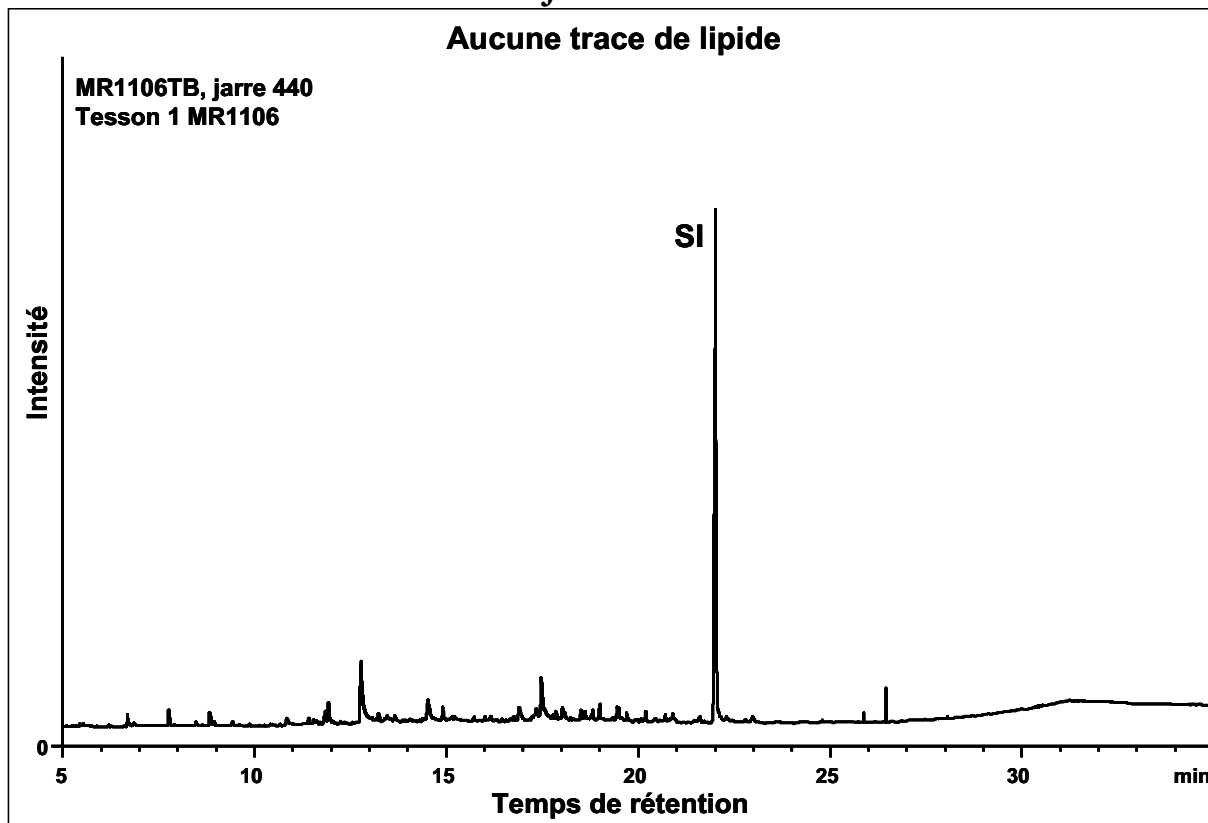


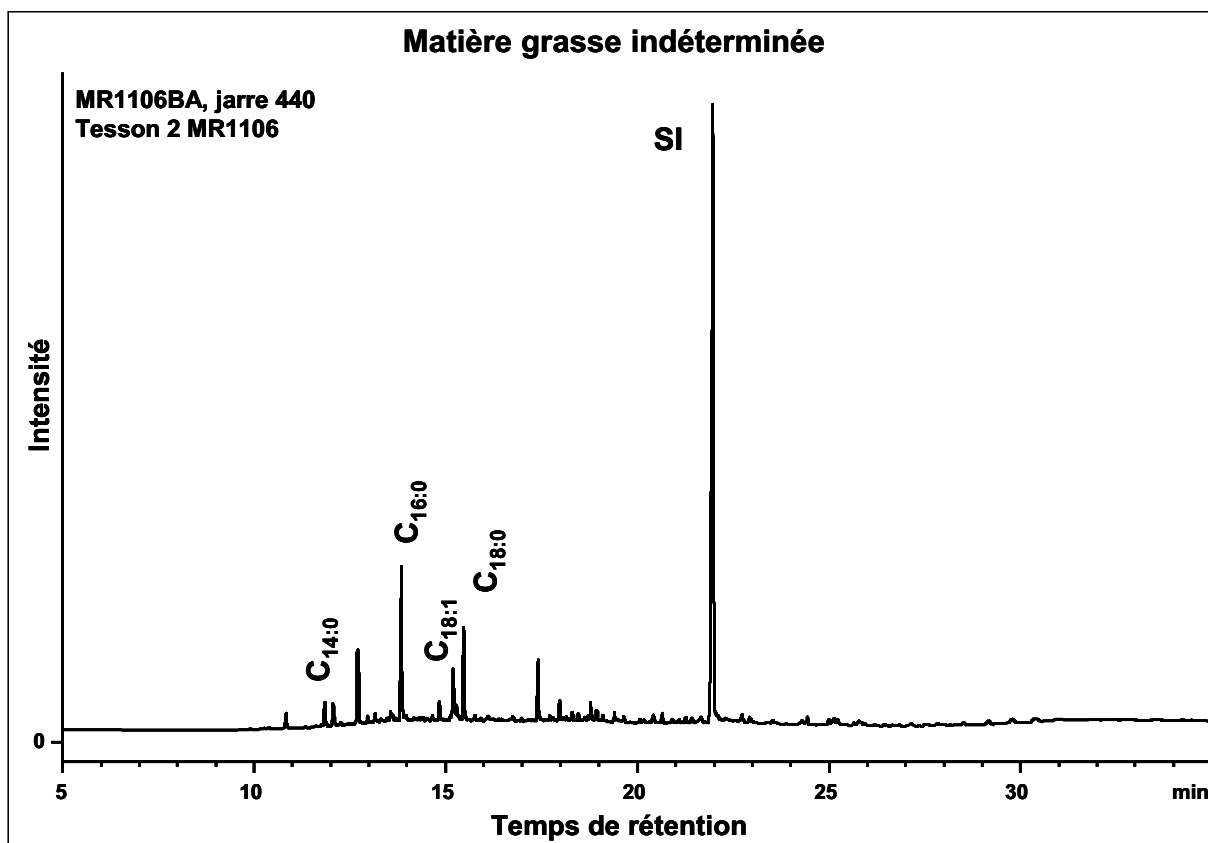
Amphore 432, résidu 2 MR1105								
Chromatographie en phase gazeuse								
MR1105AA, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm								
Aire totale	Aire	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
4280.030	1414.847	0.2561	20.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

Composé	Aire	%
C16:0	861.347	69.36
C18:0	380.473	30.64
total	1241.820	100.000
TAGs	158.905	

Concentration µg/g	236.24
C16/C18	2.26
% Acides gras	29.01
% Triglycérides	3.71

Jarre 440

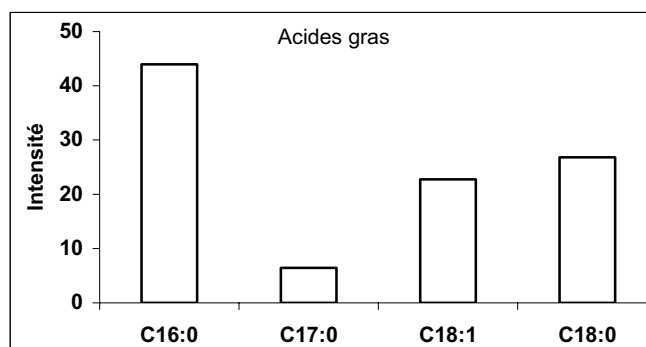


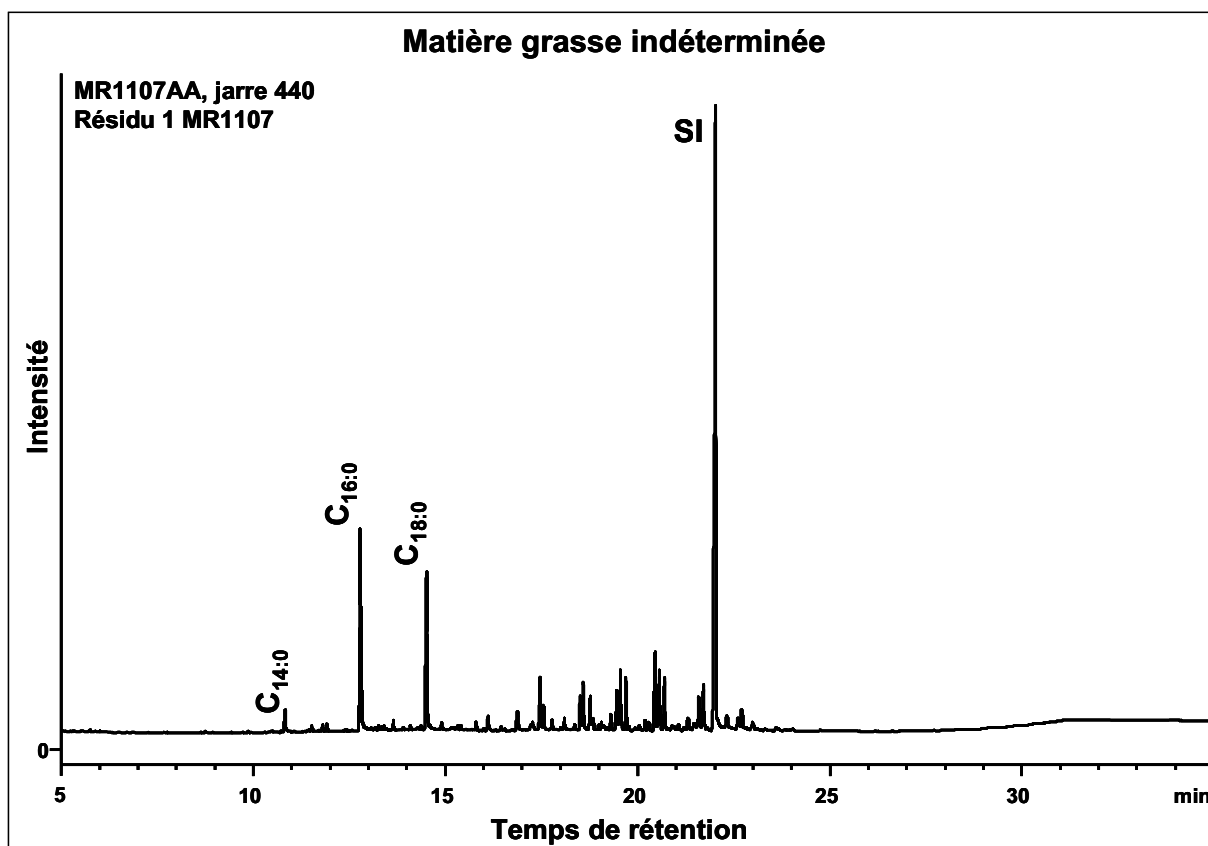
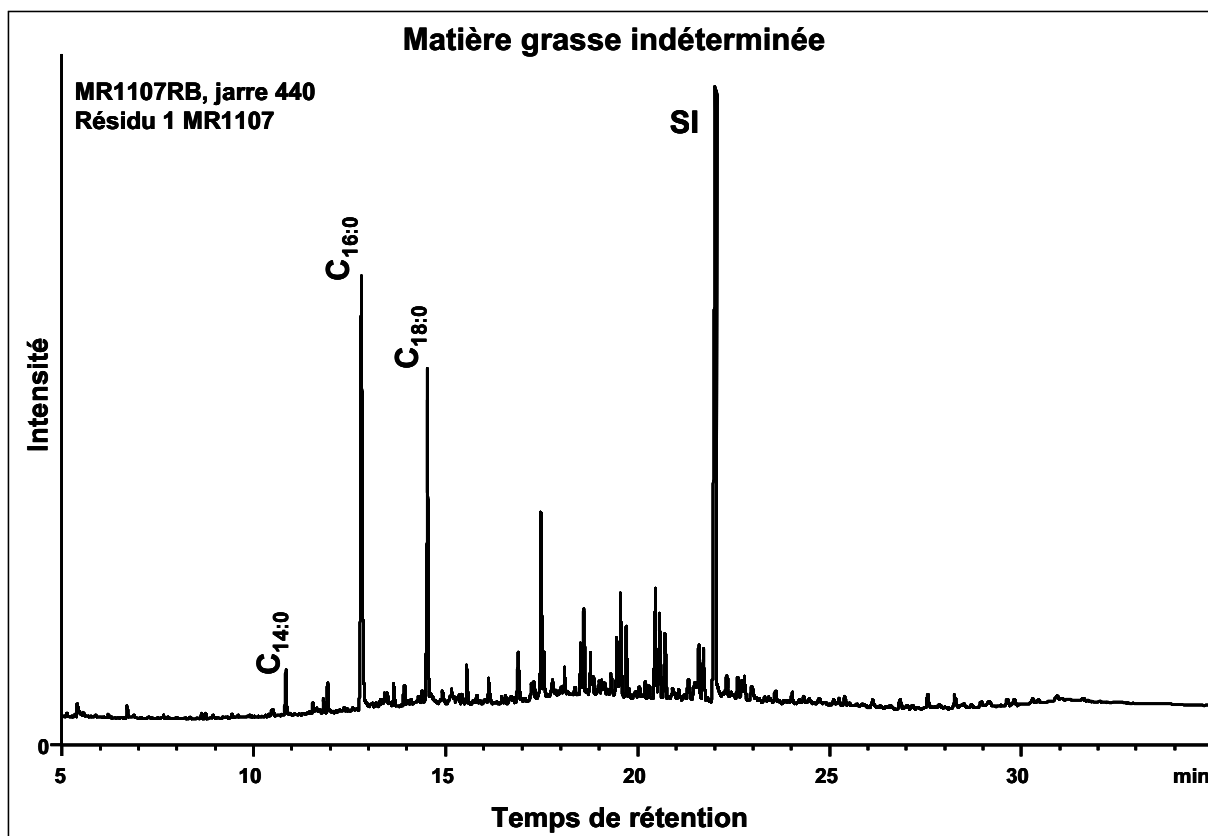


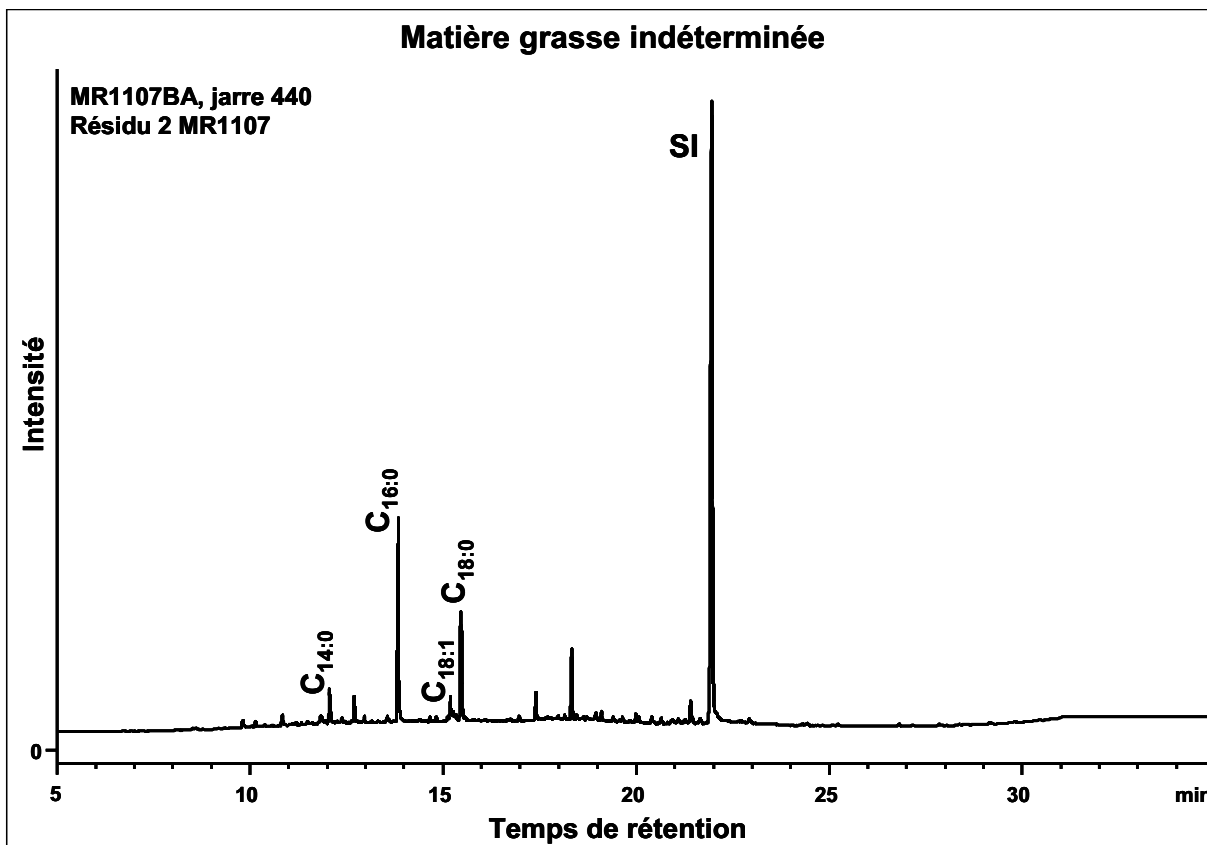
Jarre 440, tesson 2 MR1106									
Chromatographie en phase gazeuse									
MR1106BA, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm									
Aire totale	Aire standard	masse tesson g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl	
787.521	863.307	3.0117	40.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00	

Composé	Aire	%
C16:0	162.707	43.96
C17:0	23.900	6.46
C18:1	84.122	22.73
C18:0	99.396	26.85
total	370.124	100.000

Concentration µg/g	6.06
C16/C18	1.64
% Acides gras	47.00







Jarre 440, résidu 2 MR1107								
Chromatographie en phase gazeuse								
MR1107BA, CP Sil-5CB, 15 m, 0.32 mm, 0.1 µm								
Aire totale	Aire standard	masse residu g	volume final µL	Concentration SI mg/mL	volume SI µL	C _{SI(TLE)} mg/mL	VTLE µL	Vprél µl
334.130	552.780	0.0648	80.00	1.00	20.00	0.04	500.00	100.00

Composé	Aire	%
C14:0	23.877	9.40
C15:0	14.534	5.72
C16:0	128.424	50.55
C18:1	17.264	6.80
C18:0	69.935	27.53
total	254.034	100.000

Concentration µg/g	186.56
C16/C18	1.84
% Acides gras	76.03

