

Spectrométrie de masse et archéologie moléculaire

Nicolas Garnier

SAS Laboratoire Nicolas Garnier, Vic le Conte, France

Les matériaux organiques sont particulièrement sensibles aux phénomènes de dégradation naturelle, causés par l'action du temps ou par les micro-organismes présents dans l'environnement. Cependant, une faible fraction organique est souvent piégée dans les parois poreuses des vases en céramique et permet, quelques milliers d'années après, de livrer sa nature. La grande variété morphologique des résidus préservés oblige à faire appel aux sciences naturalistes pour les artefacts dont la structure est conservée (palynologie, anthracologie, carpologie...) ou à l'analyse chimique organique pour les échantillons amorphes de nature ou qui ont perdu leur structure par action de l'homme ou du temps. La démarche est ensuite adaptée à l'échantillon : la méthode de prélèvement dépend autant du matériau constitutif (céramique, métal, verre, faïence...) et du type de conteneur (fioles, assiettes, amphores... souvent très fragmentées) que des matériaux recherchés. La méthodologie d'étude est une succession complexe d'analyses qui n'a cessé d'évoluer depuis les premières caractérisations physico-chimiques de matériaux anciens par d'illustres chimistes comme Chevreul (1848, tombe de Saint-Médard des Prés) ou Chapman (1926, tombe de Toutankhamon). Il fallut attendre les années 70 pour des caractérisations plus rigoureuses, notamment les analyses pionnières de F. Formenti par GC du contenu d'amphores vinaïres. Ainsi, la communauté scientifique a pris conscience de la conservation partielle de la matière organique même après 2000 ans passés sous la mer. Ce n'est que dans les années 90 que le couplage GC-MS a permis la caractérisation moléculaire de résidus anciens, donnant naissance à une nouvelle discipline, l'archéologie biomoléculaire.

L'analyse physico-chimique des échantillons archéologiques a pour objectif, via l'élucidation de la structure moléculaire de micro-prélèvements, d'identifier les sources biologiques (animales, végétales ou fossiles) et de définir leur état de conservation-dégradation. Des éléments caractéristiques de la chaîne opératoire qu'a subi le matériau, à savoir son processus d'élaboration (chauffage, mélange...), peuvent être déduits de modifications structurales ou de la conservation sélective de certaines sous-familles

chimiques d'un même matériau (ex. enflourage vs décoction). Les échantillons anciens imposent de relever quelques défis analytiques : les objets et leur contenu ont souvent subi plusieurs millénaires d'agressions chimiques et biologiques ; la quantité de matière conservée est infime et souvent les prélèvements se limitent à quelques μg , surtout pour les objets de musées.

L'identification des matériaux originels repose sur la meilleure connaissance possible de la structure chimique de leurs homologues modernes, faisant ainsi appel à la phytochimie, la pharmacognosie et l'agro-alimentaire. Pour les échantillons anciens, seule l'analyse qualitative ou tout au plus semi-quantitative à l'intérieur d'une même famille chimique, est envisagée. En effet, comme les biomarqueurs ont des propriétés hydrophobes, acido-basiques, oxydo-réductives ou encore nutritives très différentes, leur vitesse de disparation varie énormément d'une famille à une autre et dépend tout autant des caractéristiques du milieu d'enfouissement. Un nombre de facteurs incontrôlable qui rend toute analyse quantitative illusoire. Afin de caractériser au mieux les échantillons, la méthodologie d'étude doit permettre de détecter un maximum de marqueurs tout en optimisant la sensibilité de l'analyse. Plusieurs approches doivent être couplées : extraction simple ou hydrolytique, purification en phase solide (SPE) utilisant différentes phases (silice, diol, NH₂, C18, tC18), pyrolyse réactionnelle (thermal hydrolysis-methylation, THM), GC-MS, ou pour les molécules de plus haut poids moléculaire MALDI, nanoESI ou DESI-MS.

A l'issue de 10 années de recherche sur des échantillons provenant de tout le bassin Méditerranéen et pour la période antique, il ressort que la HRGC-MS est la technique la mieux adaptée pour l'identification des biomarqueurs préservés. Les spectrométries de masse en mode MALDI ou ESI sont destinées soit au screening de séries d'échantillons (détection de cire d'abeille ou d'huiles par MALDI-TOFMS), soit à l'étude détaillée de marqueurs non volatils (triglycérides et cérides). Nous avons pu mettre en évidence :

- des lipides (acides gras, stérols, mono-, sesqui-, di- et triterpènes, mono- et diglycérides, hydrocarbures

polyaromatiques par GC-MS ; cérides et triglycérides par MALDI-MS et nanoESI-MS), marqueurs les mieux conservés du fait de leur hydrophobicité,

- des sucres (mono- et disaccharides),
- des phénols et polyphénols,
- les polluants de notre environnement (plastiques, pesticides, fongicides, engrais...).

Ils correspondent à des matériaux divers : vin, oléorésines et gomme-oléorésines, poix et goudrons, bitumes, encens, graisses animales, produits laitiers, garum et conserves de poissons, huiles végétales, cire d'abeille, cires épicuticulaires, etc.

Au fur et à mesure du développement de l'interaction fondamentale entre la chimie analytique, la phytochimie et l'archéobotanique, la pertinence de certains marqueurs a dû être remise en question. Notamment pour l'huile d'olive, qui était transportée en amphores dans toute la Méditerranée antique, l'identification reposait sur la seule présence d'acide oléique il y a 30 ans ; argument jugé insuffisant aujourd'hui. Afin de mieux étayer les caractérisations, nous avons défini quel était le potentiel des différents marqueurs des huiles susceptibles d'être conservés en contexte archéologique : triterpènes (GC-MS) mais aussi triglycérides. C'est par cette démarche qu'ont pu être rigoureusement identifiées, et par de seuls arguments chimiques, l'olive (amphores romaines Dressel 20 à huile, épave du port d'Arles ; amphores vinaires de Pisa San Rossore, 1er s. av. J.-C.), de sésame (lampes à huile nabatéennes, Pétra, 1er s. ap. J.-C.), de ben (*Moringa oleifera*, lampes à huile d'Egypte romaine) ou de la graisse de bœuf (lampes romaines d'Olbia, Ukraine). Dans ces cas, des traces de triglycérides étaient conservées (<1µg). L'analyse par infusion en nanoESI-MS et nanoESI-MS/MS des extraits dopés au lithium Li⁺ a permis de définir (i) les profils des triglycérides, (ii) la structure moléculaire et la distribution en acides gras pour chaque groupe de composés isobares. La comparaison de des échantillons modernes a montré tout le potentiel de la méthode, qui permet aussi de s'abstraire des vitesses différentes de dégradation des composés suivant leur longueur de chaîne. Plus récemment, l'analyse directe par DESI-MS a été directement conduite sur la céramique ou sur un extrait, et donnait accès à une plus large gamme de composés. Ainsi, non seulement les triglycérides natifs sont facilement détectés et identifiés par HRMS, mais aussi leurs dimères dus au couplage oxydant de triglycérides insaturés, phénomène responsable du séchage des peintures à base d'huiles siccatives.

Enfin, dans le cadre du programme interdisciplinaire de recherche Perhamo (ANR), nous proposons une approche innovante des parfums, produit qui a joué un rôle décisif dans la construction des échanges à longue

distance et dans l'émergence des élites au Proche-Orient et en Méditerranée, du IIIe au Ier millénaire av. J.-C. Les petits contenants en pierre, en céramique, en verre, ou en faïence, permettent d'identifier les ateliers de production comme les lieux de destination du parfum. Les contextes de découverte (habitat, sanctuaires, tombes) nous informent sur l'usage du parfum et sur son statut. Jusqu'alors, il manquait aux historiens le sujet même de leur étude, qui s'est évaporé depuis des milliers d'années. Mais les parois des vases céramiques et des fioles en verre ont livré des traces infimes de composés très divers. C'est ainsi que l'usage des produits laitiers comme base du parfum dépassait probablement l'utilisation de l'huile, notamment d'olive. Les substances odoriférantes se limitent aux oléorésines de conifères (Pinacées ou Cupressacées), à des exsudats plus exotiques (styrax, liquidambar). Deux vases sardes ont révélé des méthoxyflavonones, marqueurs caractéristiques des *Citrus* sp. Si les archéologues admettent l'introduction des agrumes en Méditerranée occidentale par les Arabes au Xe s. ap. J.-C., la présence de tels composés remet en cause les hypothèses reçues, tout en venant conforter des trouvailles ponctuelles de pépins d'agrumes (Chypre, île de Samos, port de Cumes, IVe s. av. J.-C.) qui jusque là n'étaient pas reconnues par la communauté.

Enfin, lors de l'étude du matériel d'une tombe phénicienne (Sardaigne, VIIe s. av.), de nouveaux matériaux jusqu'alors méconnus comme le pain d'abeille ont été identifiés et leur fonction symbolique déterminée par le contexte et la typologie de leur contenants. Aussi, la forme des dépôts observés, la comparaison des types céramiques et surtout de leur contenu, ont permis de reconstruire partiellement la cérémonie de mise au tombeau et de libations pour le mort, 2700 ans avant l'évènement. De là le besoin de faire évoluer la discipline vers les démarches de police scientifique.