



**HAL**  
open science

# Etude chimique des matériaux résineux : oliban, dammar et mastic : application à des prélèvements artistiques et archéologiques

Amra Aksamija

## ► To cite this version:

Amra Aksamija. Etude chimique des matériaux résineux : oliban, dammar et mastic : application à des prélèvements artistiques et archéologiques. Autre. Université d'Avignon, 2012. Français. NNT : 2012AVIG0245 . tel-00872166

**HAL Id: tel-00872166**

**<https://theses.hal.science/tel-00872166>**

Submitted on 11 Oct 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



ACADEMIE D'AIX-MARSEILLE  
UNIVERSITÉ D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE  
Ingénierie de la Restauration des Patrimoines Naturel et Culturel  
UMR IMBE, CNRS 7263-IRD 237



## THÈSE

Présentée à l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse pour  
obtenir le diplôme de DOCTORAT

**SPÉCIALITÉ : Chimie**

**ÉTUDE CHIMIQUE DES MATÉRIAUX RÉSINEUX : OLIBAN,  
DAMMAR ET MASTIC. APPLICATION À DES PRÉLÈVEMENTS  
ARTISTIQUES ET ARCHÉOLOGIQUES**

Présentée par

**Amra AKSAMIJA**

En vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences  
Soutenue le 21 décembre 2012

*Membres du jury :*

**MORERE Alain**

Président du jury, Rapporteur, Professeur à l'Université de Montpellier II

**CULIOLI Gérald**

Rapporteur, Maître de conférences HDR à l'Université de Toulon

**TOMAO Valérie**

Maître de conférences HDR à l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse

**VIEILLESCAZES Catherine**

Directrice de thèse, Professeur à l'Université d'Avignon et des pays de Vaucluse

**MATHE Carole**

Co-encadrante de thèse, Maître de conférences à l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse

## Remerciements

Il me sera très difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme.

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements les plus sincères à ma directrice de thèse, madame le professeur *Cathy Vieillescazes*, pour ses conseils avisés, sa patience et sa confiance. Je remercie également très chaleureusement ma co-cadrante de thèse, *Carole Mathe de Souza*, qui a enrichi ce travail avec ses conseils précieux, qui s'est toujours montré à l'écoute et disponible tout au long de la réalisation de cette thèse. Toutes les deux m'ont apporté leur soutien extraordinaire dans ces conditions particulières qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené à bien.

Mes remerciements s'étendent notamment aux membres du jury:

- Alain Morere*, professeur à l'Université de Montpellier II,
- Gérald Culioli*, maître de conférences, HDR à l'Université de Toulon,
- Valerie Tomao*, maître de conférences, HDR à l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse,

pour l'honneur qui me font en participant à ce jury de thèse et plus particulièrement à messieurs *Morere* et *Culioli* pour l'intérêt qu'ils ont porté à ma recherche en acceptant la charge de rapporteur.

Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai partagé mes années de thèse, les collègues de notre laboratoire, *Matthieu, Céline. J, Clara, Louis* et les collègues de la faculté des Sciences, *Tamara, Simon, Phuong, Audrey P., Kahina, Shiraz, Sabiha, Céline D., Loic, Ying.*

Je tiens à remercier également l'ensemble de l'UFR Sciences et plus particulièrement le département de biologie et de chimie où j'ai travaillé durant ma thèse.

Je remercie également l'Ambassade de France de Sarajevo et plus particulièrement le SCAC et monsieur *Gilles Kraemer*, qui m'ont soutenue et encouragée.

Je remercie notamment le personnel de l'école préparatoire DEP Art de Châteaurenard, *Thierry, Sophie, Simone, Flavie* et aussi mes étudiants pour leur soutien.

Une pensée bien particulière est destinée à *Céline et Tamara* mes amies très chères, et leurs familles. Je remercie chaleureusement ma soeur de coeur *Janis* et son fils *Ismaël*.

Je remercie madame *Lejla Osmanovic*, maître de conférences à la faculté des Lettres de Sarajevo, qui a contribué à ce travail bien avant, en étant mon professeur de français, qui m'a transmis une bonne base linguistique et partagé sa passion pour la langue française.

Mes remerciements vont aussi à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce projet, mes amis dont le soutien indéfectible m'a permis de continuer et de me sentir moins seule en pays étranger avec qui j'ai partagé plein de moments inoubliables durant ces trois ans *Elodie, Nadya, Dominique et Chayanne, Fanny, Verica, Ben, Mariem, Hélène, Isabelle M-C., Mishela, Claire D., Cécile...*

Enfin une pensée particulière pour mes parents qui ne m'ont pas vue souvent depuis le début de cette thèse, mon frère Faris et mes amis en Bosnie-Herzégovine, qui m'ont suivie de loin et soutenue par leur amour et sincère amitié.

J'en oublie certainement encore et je m'en excuse. Encore un grand merci à tous pour m'avoir conduit à ce jour mémorable.

*Je dédie cette thèse à mes parents et à mon frère.*

# Zahvalnica

Želim se zahvaliti prije svega cijenjenim gospođi *Emiri Kahrović*, profesorici anorganske hemije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Sarajevu i gospođi *Metki Kraigher-Hozo* profesorici u penziji na Akademiji Likovnih Umjetnosti u Sarajevu, koje su otvorile put za naučnu suradnju između Avignona i Sarajeva. Zahvaljujem im se na ukazanoj podršci i povjerenju. Hvala vam što ste me uveli u jednu, kod nas rijetku i malo poznatu oblast hemije, i na taj način omogućile moje profesionalno usavršavanje.

Zahvaljujem se gospodinu *Sanjinu Lugiću*, konzervatoru Nacionalne Galerije u Sarajevu, koji je odabrao likovna djela za uzorkovanje laka.

Veliko hvala *Dženanu Šehiću*, mom prijatelju i kolegi koji je bio ljubazan i velikodušan da mi dostavi uzorke iz Sarajeva u Avignon.

Zahvaljujem se svojim roditeljima *Seadu i Faizi* i bratu *Farisu*, koji su iako daleko ipak bili uz mene sve vrijeme i dali mi snagu i podršku da istrajem do kraja. Tople riječi zahvale upućujem svojoj majki *Subhiji* koja je brižno propratila moje školovanje. Veliko hvala *Kemalu* za svaki savjet koji mi je uputio i vrijeme koje mi je posvetio. Hvala *Muniri* za svu njenu ljubav i podršku.

Zahvalnost dugujem velikom broju izvanrednih osoba u mom životu koji su, svako na svoj način, dali smisao i podršku izradi ovog rada i pri tome ne bih željela nikoga izostaviti. Iskreno se izvinjavam onima čije sam ime zaboravila spomenuti.

Zahvaljujem se svojim dragim, iskrenim prijateljima, koji su propratili moje školovanje u Avignonu iz Sarajeva nebrojenim pozivima, porukama i pažnjom. *Senada, Dženita, Melita, Inga, Mirel, Ines, Aida H., Iris, Azra, Maja, Nejra, Esma, Igor Z., Dana, Gorana, Admir Vražić, Senka, Emin, Verica, Edad, Nedad, Nedžla, Sanja, tetka Suada...* veliko vam hvala za sve!

# Communications écrites et orales

## Publications dans des journaux internationaux à comité de lecture

1) «**Liquid chromatography of triterpenic resins after derivatization with dansyl chloride**». Aksamija A., Mathe C., Vieillescazes C. (2012), *Journal of liquid chromatography and related technologies*, 35 (9) p. 1222-1237.

## Communications orales

1) «**Analytical analysis of natural products used in cultural heritage**». Aksamija A., Mathe C., Vieillescazes C., Les Journées du Campus d'illkirch «Chimie et biologie au service de l'Art et l'Histoire», Conférence plénière, Strasbourg 2-3 avril 2012.

2) «**Study of resinous materials used in cultural heritage by chromatographic techniques**». Aksamija A., Mathe C., Vieillescazes C., Intensive School «Biomaterials in Cultural Heritage», UAPV, Avignon 26-29 juin 2012.

## Communications par affiche

1) «**Analyse de matériaux organiques employés dans le patrimoine culturel**». Aksamija A., Joliot C., Mathe C., Vieillescazes C., 22<sup>ème</sup> Journée de la Chimie SCF-PACA – Toulon, Palais des Congrès Neptune, 11 mars 2011.

2) «**A comparative chromatographic study of olibanum resins (*Boswellia sp. Burseraceae*)**», Aksamija A., Mathe C., Vieillescazes C., 9<sup>ème</sup> congrès francophone de AfSep sur les sciences séparatives et les couplages, Université Paul Sabatier, Toulouse, 23-25 mars 2011.

3) «**Etude fluorimétrique de «l'encens»: application à un échantillon d'Egypte ancienne**», Aksamija A., Mathe C., Vieillescazes C., Archéométrie 2011, Colloque de G.M.P.C.A. Université de Liège, Belgique, 10-15 avril 2011.

4) «**Etude de matériaux organique résineux d'intérêt archéologique**», Aksamija A., Mathe C., Vieillescazes C., Journée scientifique «Jeunes chercheurs» co-organisée par le GdR ChimARC et le réseau Archéométrie CAI-RN, Paris, 30 mai 2011.

5) «**A comparative chromatographic study of mastic resin – application to an archaeological sample**», Aksamija A., Mathe C., Vieillescazes C., 6th General Intensive School on Conservation Science, Evora, Portugal, 17-24 July 2012 (prix du meilleur poster).

# Table de matières

<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>5</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>13</b>
<b>ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>16</b>
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE ET PROBLÉMATIQUE .....</b>	<b>17</b>
<b>CHAPITRE 1 .....</b>	<b>21</b>
<b>PRÉSENTATION DES RÉSINES VÉGÉTALES .....</b>	<b>21</b>
<b>1. Définition et historique .....</b>	<b>22</b>
<b>2. Les métabolites secondaires .....</b>	<b>22</b>
a) Alcaloïdes .....	23
b) Produits phénoliques .....	24
c) Produits terpéniques .....	24
<b>3. Composition chimique des oléo-gommo-résines .....</b>	<b>28</b>
3.1. Les huiles essentielles .....	28
3.2. La partie polymérisable (gomme) .....	30
3.3. Les triterpènes .....	31
<b>4. L'oliban .....</b>	<b>34</b>
4.1 Etymologie du nom oliban .....	34
4.2. Origine botanique et distribution géographique de l'oliban .....	34
4.3. Production d'oliban .....	37
4.4. Historique .....	37
4.5. Utilisation et propriétés .....	38
4.6. Composition chimique de l'oliban .....	39
4.6.1. Les diterpènes de l'oliban .....	39
4.6.2. Les triterpènes de l'oliban .....	40
<b>5. La dammar .....</b>	<b>44</b>
5.1. Confusion dans la terminologie .....	44
5.2. Les différents produits des Dipterocarpaceae .....	46

5.3. Production et utilisations.....	49
5.3.1. Production et utilisation locale.....	50
5.3.2. Utilisation comme vernis artistique.....	51
5.4. Composition chimique de la dammar.....	52
<b>6. La mastic .....</b>	<b>56</b>
6.1. Origine botanique de la mastic.....	56
6.2. Récolte de la mastic .....	59
6.3. Historique.....	60
6.4. Le commerce de la mastic .....	61
6.5. Utilisations .....	62
6.6. La mastic comme vernis artistique .....	63
6.7. Composition chimique de la mastic .....	64
<b>CHAPITRE 2 : .....</b>	<b>69</b>
<b>ÉTUDE ANALYTIQUE DES RÉSINES VÉGÉTALES .....</b>	<b>69</b>
<b>A. ÉTUDE PAR SPECTROSCOPIE INFRA-ROUGE À TRANSFORMÉE DE FOURIER (IRTF)</b>	<b>70</b>
.....	70
<b>1. Étude des résines végétales par IRTF .....</b>	<b>72</b>
<b>2. Étude de cas par IRTF .....</b>	<b>75</b>
2.1. Étude des échantillons artistiques .....	75
2.2. Étude de l'échantillon archéologique .....	80
<b>B. LES TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES.....</b>	<b>83</b>
<b>1. La Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (CLHP) .....</b>	<b>84</b>
1.1. Étude des résines végétales par CLHP/UV/Fluorimétrie .....	86
a) L'oliban .....	88
b) La dammar .....	91
c) La mastic.....	92
d) Étude quantitative et étalonnage analytique .....	94
e) L'étude de cas – application sur un échantillon archéologique .....	96
f) Conclusion – Étude par CLHP/UV/Fluorimétrie .....	97
1.2. Étude des résines végétales par CLHP/UV .....	98
1.2.1. Choix de la colonne.....	98
1.2.2 Étude des résines végétales par CLHP/UV – colonne RP-18.....	99

a) L'oliban .....	100
b) La dammar et la mastic .....	104
1.2.3 Étude des résines végétales par CLHP/UV – colonne Kinetex .....	106
a) L'oliban .....	106
b) La dammar et la mastic .....	111
c) Conclusion .....	114
1.2.4 Étude des extraits par CLHP/UV .....	115
a) Extraction par reflux .....	116
b) Extraction par Soxhlet .....	116
c) Extraction par ultrasons.....	117
d) Solvants utilisés .....	118
e) Étude des rendements des extraits obtenus .....	120
f) Étude analytique des extraits d'oliban.....	121
g) Étude analytique des extraits de la dammar .....	127
h) Étude analytique des extraits de la mastic .....	131
i) Extraction en phase solide (SPE).....	136
<b>2. La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) .....</b>	<b>139</b>
2.1. Analyse par CPG-SM.....	142
a) Étude de l'oliban par CPG-SM .....	143
b) Étude de la dammar et de la mastic par CPG-SM .....	146
2.2. Étude des extraits par CPG-SM .....	149
a) Étude comparative des extraits de l'oliban.....	149
b) Étude comparative des extraits de la dammar .....	152
c) Étude comparative des extraits de la mastic .....	153
2.3. Étude des cas.....	155
a) Étude de l'échantillon artistique .....	155
b) Étude d'un échantillon archéologique .....	156
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>158</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>166</b>
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>188</b>
<b>Reactifs et solvants .....</b>	<b>189</b>

<b>1. Protocoles de préparation des échantillons .....</b>	<b>190</b>
<b>2. Techniques spectroscopiques .....</b>	<b>196</b>
2.1. Le spectromètre Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF).....	196
2.2. La spectrofluorimétrie : détermination du couple d'excitation et d'émission du chlorure de dansyle .....	196
<b>3. Techniques chromatographiques .....</b>	<b>197</b>
3.1. La Chromatographie Liquide à Haute performance couplée à une barrette de photodiodes et à un fluorimètre (CLHP/UV/Fluo) .....	197
3.1.1. Matériel.....	197
3.1.2. Gradient CLHP de l'oliban – colonnes Luna et Purospher : .....	197
3.1.3. Gradient CLHP de la dammar et la mastic - colonnes Luna et Purospher : .	198
3.1.4. Gradient CLHP de l'oliban – colonne Kinetex.....	198
3.1.5. Gradient CLHP de la dammar et la mastic – colonne Kinetex.....	198
3.2. La Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à un Spectromètre de Masse (CPG/SM) .....	199
3.2.1. Gradient CPG pour l'étude des résines .....	199
3.2.2. Gradient CPG pour l'étude de la partie triterpénique .....	199
<b>ANNEXES .....</b>	<b>200</b>
<b>Annexe 1 Spectres de masse des molécules identifiées .....</b>	<b>201</b>
<b>Annexe 2 .....</b>	<b>234</b>
<b>Annexe 3 Chromatogrammes de KBA et AKBA.....</b>	<b>235</b>
<b>Annexe 4 Les échantillons bosniens .....</b>	<b>238</b>
La Galerie nationale de Bosnie-Herzégovine et son historique.....	239
Quelques mots sur les peintres bosniens .....	240
Behaudin Selmanović .....	240
Csikos Sessia Bela .....	241
Aleksandar Kumrić.....	243
Špiro Bocarić.....	244
Ilija Kurilić.....	246
Portraits.....	247
<b>Annexe 5 Structures des molécules presentes dans les trois résines.....</b>	<b>248</b>

## Liste des figures

Figure 1 - Structure du 2,3-oxydosqualène.....	26
Figure 2 - Formation des structures triterpéniques à travers la cyclisation du 2,3 - oxydosqualène guidé par les enzymes correspondants LS- lanostérole cyclase, CS- cycloarténole cyclase, DS-dammarenediole synthase, LuS-lupéol synthase, $\alpha$ AS- $\alpha$ -amyrine synthase et $\beta$ AS- $\beta$ -amyrine synthase (d'après Haralampidis <i>et al</i> , 2002). .....	27
Figure 3- Montage à «l'ancienne» pour la distillation des huiles essentielles à la vapeur d'eau (d'après catoire-fantasque.be) .....	29
Figure 4 - Structure du polycadinène .....	30
Figure 5- Structure du <i>cis</i> -1,4-poly- $\beta$ -myrcène .....	31
Figure 6- Structure du $\beta$ -myrcène .....	31
Figure 7 - Les squelettes triterpéniques rencontrés dans les résines oliban, dammar et mastic ; I-ursane, II-oléanane, III-lupane, IV-tirucallane/euphane, V-dammarane, VI-hopane, VII-triterpène bicyclique et VIII-triterpène tricyclique .....	32
Figure 8- (a) <i>Boswellia sacra</i> (addme.net.au), (b) <i>Boswellia carteri</i> (stnikola.net).....	36
Figure 9 - Exemple de diterpènes isolés à partir d'oliban .....	40
Figure 10 - Structures des $\alpha$ - et $\beta$ -gurjunène .....	47
Figure 11- Spectre IRTF obtenu pour l'oliban commercial de Somalie (Sté Encens du monde).....	72
Figure 12 - Spectre IRTF obtenu pour la dammar commerciale (Sté Encens du monde)....	73
Figure 13 - Spectre IRTF obtenu pour la mastic commerciale (Sté Kremer) .....	74
Figure 14 - Spectres IRTF superposés de la mastic commerciale (Sté Kremer) et de la dammar commerciale (Sté Encens du Monde) .....	74

## Liste des Figures

Figure 15 - Les œuvres analysés de la Galerie Nationale de Bosnie-Herzégovine .....	76
Figure 16 - Spectres IRTF superposés d'échantillons prélevés en 2010 .....	77
Figure 17 - Spectres IRTF superposés d'échantillons prélevés en 2011 .....	77
Figure 18 - Spectre IRTF obtenu pour Ech. 2 (2010).....	78
Figure 19 - Superposition de spectres IRTF : gommes-résines dammar et mastic avec l'éch. No 2 (2010) .....	79
Figure 20 - Superposition de spectres IRTF : résines Primal et Plextol B360 avec l'éch. No 2 (2010) .....	79
Figure 21 - Spectre IRTF de l'échantillon Dahchour G12 .....	81
Figure 22 - Superposition de spectres IRTF: résines dammar et mastic avec l'éch. Dahchour G12 .....	81
Figure 23 - Schéma général d'un système CLHP.....	84
Figure 24 - Diagramme de Jablonski (d'après perrin33.com) .....	86
Figure 25 - Structure chimique du chlorure de dansyle (Dzl) .....	87
Figure 26 - Greffage du chlorure de dansyle (Dzl) sur le lupéol.....	87
Figure 27 - Chromatogrammes UV obtenus à 210 nm (a) et fluorimétrie (b) de <i>B. carteri</i> .....	88
Figure 28 - Chromatogrammes UV obtenus à 210 nm (a) et fluorimétrie (b) de <i>B. frereana</i> .....	90
Figure 29 - Chromatogrammes UV obtenus à 210 nm (a) et fluorimétrie (b) de la dammar .....	91
Figure 30 - Chromatogrammes UV obtenus à 210 nm (a) et fluorimétrie (b) de la mastic .....	93

Figure 31 – Chromatogrammes UV obtenus à 210 nm (a) et fluorimétrique (b) de l'échantillon archéologique .....	96
Figure 32 - Les sphères de silice Kinetex <sup>®</sup> (Phenomenex).....	98
Figure 33 - La photographie prise en MEB et MET de particules de silice : à droite Kinetex, à gauche Halo <sup>®</sup> colonnes (Sanchez et Farkas, 2012 - American Laboratory <sup>®</sup> ).....	99
Figure 34 - Chromatogrammes obtenus à 210 nm par CLHP/UV ; colonne RP-18, a) <i>Boswellia serrata</i> , b) <i>B. carterii</i> et c) <i>B. frereana</i> .....	101
Figure 35 - Chromatogramme obtenu à 210 nm par CLHP/UV pour l'oliban commercial, colonne RP-18 .....	102
Figure 36 - Chromatogramme obtenu à 250 nm par CLHP/UV pour l'oliban commercial, colonne RP-18 .....	102
Figure 37 - Chromatogramme obtenu à 210 nm par CLHP/UV pour la dammar commerciale, colonne RP-18 .....	104
Figure 38 - Chromatogramme obtenu à 210 nm par CLHP/UV pour la mastic commerciale, colonne RP-18.....	104
Figure 39 - Chromatogrammes obtenus à 210 nm par CLHP/UV pour <i>B. serrata</i> , a) avec la colonne RP-18 et b) avec la colonne Kinetex.....	107
Figure 40 - Chromatogrammes obtenus à 210 nm par CLHP/UV pour <i>B. carterii</i> , a) avec la colonne RP-18 et b) avec la colonne Kinetex.....	108
Figure 41 - Chromatogrammes obtenus à 210 nm par CLHP/UV pour <i>B. frereana</i> , a) avec la colonne RP-18 et b) avec la colonne Kinetex.....	109
Figure 42 - Chromatogrammes obtenus à 210 nm par CLHP/UV pour l'oliban, a) avec la colonne RP-18 et b) avec la colonne Kinetex.....	110
Figure 43 - Chromatogramme obtenu à 210 nm par CLHP/UV pour la dammar – a) avec la colonne RP-18, b) avec la colonne Kinetex .....	112

Figure 44 - Chromatogrammes obtenus à 210 nm par CLHP/UV pour la mastic, a) avec la colonne RP-18 et b) avec la colonne Kinetex ..... 114

Figure 45 - Schémas des techniques d'extraction utilisées: le montage à reflux, le Soxhlet et le pot à ultrasons ..... 116

Figure 46 - Chromatogrammes obtenus à 210 nm par CLHP/UV pour les extraits de l'oliban au reflux, a) avec le méthanol et b) avec le n-hexane ..... 122

Figure 47 - Chromatogrammes obtenus à 210 nm par CLHP/UV pour les extraits de l'oliban au Soxhlet, a) avec le méthanol et b) avec le n-hexane ..... 123

Figure 48 - Comparaison de l'aire moyenne des pics en fonction du procédé et du solvant d'extraction pour l'oliban (légende : abscisse – N° molécule (cf. tableau 32) ; ordonné : quantité extraite pour chaque molécule par trois procédés d'extractions et en deux solvants) ..... 124

Figure 49 - Chromatogrammes obtenus à 210 nm par CLHP/UV pour les extraits de la dammar au reflux, a) en méthanol et b) en n-hexane ..... 127

Figure 50 - Chromatogrammes obtenus à 210 nm par CLHP/UV pour les extraits de la dammar au Soxhlet, a) en méthanol et b) en n-hexane ..... 128

Figure 51 - Comparaison du l'aire moyenne des pics en fonction du procédé et du solvant d'extraction pour la dammar (légende : abscisse – N° molécule (cf. tableau 33) ; ordonné : quantité extraite pour chaque molécule par trois procédés d'extractions et avec deux solvants) ..... 129

Figure 52 - Chromatogrammes obtenus à 210 nm par CLHP/UV pour les extraits de la mastic au reflux, a) en méthanol et b) en n-hexane ..... 132

Figure 53 - Chromatogrammes obtenus à 210 nm par CLHP/UV pour les extraits de la mastic au Soxhlet, a) en méthanol et b) en n-hexane ..... 133

Figure 54 - Comparaison du l'aire moyenne des pics en fonction du procédé et du solvant d'extraction pour la mastic (légende : abscisse – N° molécule (cf. tableau 34) ; ordonné : quantité extraite pour chaque molécule par trois procédés d'extractions et avec deux solvants) ..... 134

Figure 55 - Schéma du principe de la SPE .....	136
Figure 56 - Chromatogramme obtenu à 210 nm par CLHP/UV pour la mastic après la SPE .....	137
Figure 57 - Chromatogrammes obtenus à 210 nm par CLHP/UV pour l'échantillon G12, a) avant la SPE et b) après la SPE .....	138
Figure 58 - Schéma type d'un appareillage de CPG (d'après atechimie.univ-lille1.fr) .....	140
Figure 59 - Schéma simplifié de fonctionnement d'un spectromètre de masse .....	141
Figure 60 - La réaction de dérivation à travers la formation des dérivés TMS .....	142
Figure 61 - Chromatogramme obtenu par CPG-SM pour l'oliban de Somalie-TMS .....	143
Figure 62 - Chromatogrammes obtenus par CPG-SM pour les résines la dammar-TMS et la mastic-TMS .....	146
Figure 63 - Chromatogrammes obtenus par CPG-SM, pour l'oliban-TMS et pour les extraits-TMS .....	150
Figure 64 - Chromatogrammes obtenus par CPG-SM, pour la dammar-TMS et pour les extraits-TMS (décalage d'échelle qu'on observe est dû à des pannes successives de l'appareil) .....	152
Figure 65 - Chromatogrammes obtenus par CPG-SM, pour la mastic-TMS et pour les extraits-TMS .....	154
Figure 66 - Chromatogramme obtenu par CPG-SM pour l'échantillon artistique No 2 (2010) .....	156
Figure 67 - Chromatogramme obtenu par CPG-SM pour l'échantillon archéologique G12 .....	157
Figure 68 - Schéma du montage à reflux.....	192
Figure 69 - Schéma d'extraction des résines par Soxhlet .....	193
Figure 70 - Prototype SOLEX 160 utilisé pour l'extraction des résines. ....	193

Figure 71 –Extraction des fractions acides et neutres.....	194
Figure 72 –Spectre de masse obtenu d'acide lupéolique-TMS.....	202
Figure 73 – Spectre de masse obtenu d'acide- $\alpha$ -boswellique-TMS .....	203
Figure 74 - Spectre de masse obtenu d'acide- $\beta$ -boswellique-TMS.....	204
Figure 75 - Spectre de masse obtenu d'acide 3-O-acétyl-lupéolique-TMS .....	205
Figure 76 - Spectre de masse obtenu d'acide 3-O-acétyl- $\alpha$ -boswellique-TMS .....	206
Figure 77 - Spectre de masse obtenu d'acide 3-O-acétyl- $\beta$ -boswellique-TMS .....	207
Figure 78 - Spectre de masse obtenu de 3- <i>épi</i> -lupéol-TMS .....	208
Figure 79 - Spectre de masse obtenu de lupéol-TMS .....	209
Figure 80 - Spectre de masse obtenu de $\beta$ -amyrénone.....	210
Figure 81 - Spectre de masse obtenu de $\alpha$ -amyrénone .....	211
Figure 82 - Spectre de masse obtenu de 3- <i>épi</i> - $\alpha$ -amyrine .....	212
Figure 83 - Spectre de masse obtenu de 3- <i>épi</i> - $\beta$ -amyrine .....	213
Figure 84 - Spectre de masse obtenu de $\beta$ -amyrine.....	214
Figure 85 - Spectre de masse obtenu de $\alpha$ -amyrine.....	215
Figure 86 - Spectre de masse obtenu de dammaradiénone .....	216
Figure 87 - Spectre de masse obtenu de dammaradiénole-TMS .....	217
Figure 88 – Spectre de masse obtenu de tirucallol-TMS .....	218
Figure 89 – Spectre de masse obtenu de nor $\alpha$ -amyrone .....	219
Figure 90 – Spectre de masse obtenu de nor $\beta$ -amyrone .....	220
Figure 91 – Spectre de masse obtenu de <i>Epi</i> - $\alpha$ -amyrine.....	221

Figure 92 – Spectre de masse obtenu de lupéol-TMS .....	222
Figure 93 – Spectre de masse obtenu de $\beta$ -amyrine-TMS .....	223
Figure 94 – Spectre de masse obtenu de hydroxydammarénone-TMS (I ou II) .....	224
Figure 95 – Spectre de masse obtenu de dammarénediole-TMS.....	225
Figure 96 – Spectre de masse obtenu d'acide moronique-TMS.....	226
Figure 97 – Spectre de masse obtenu d'acide oléanonique-TMS.....	227
Figure 98 – Spectre de masse obtenu d'acide dammarénolique-TMS .....	228
Figure 99 – Spectre de masse obtenu d'aldéhyde oléanonique .....	229
Figure 100 – Spectre de masse obtenu d'aldéhyde ursonique .....	230
Figure 101 – Spectre de masse obtenu d'acide ursonique-TMS .....	231
Figure 102 – Spectre de masse obtenu d'acide (iso)masticadiénonique-TMS .....	232
Figure 103 - Spectre de masse obtenu d'acide (iso)masticadiénonique-TMS.....	233
Figure 104 – Structure d'acide 11-céto- $\beta$ -boswellique (C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub> , 468 gmol <sup>-1</sup> ) .....	236
Figure 105 – Structure d'acide 3 $\alpha$ -acétyl-11-céto- $\beta$ -boswellique (C <sub>32</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub> , 490gmol <sup>-1</sup> ).....	236
Figure 106 – Chromatogramme de la fraction acide de l'oliban commercial de Somalie (Sté Encens du Monde), colonne classique RP-18 .....	237
Figure 107 – Chromatogramme de la fraction acide de l'oliban commercial de Somalie (Sté Encens du Monde), colonne Kinetex.....	237
Figure 108 – L'oeuvre «Jabuke», Behaudin Selmanović .....	241
Figure 109 – L'oeuvre «Na straži», Csikos Sessia Bela .....	242
Figure 110 – L'oeuvre «Maslina», Aleksandar Kumrić.....	243
Figure 111 – L'oeuvre «Portret popa Čukarila», Špiro Bocarić.....	245

Figure 112 – L’oeuvre «Crkva», Ilija Kurilić .....	246
Figure 113 – Le portrait 1, l’artiste inconnu .....	247
Figure 114 – Le portrait 2, l’artiste inconnu .....	247
Figure 115 – Les ursanes et oléananes présents dans l’oliban, la dammar et la mastic ....	251
Figure 116 - Les lupanes présents dans l’oliban, la dammar et la mastic .....	252
Figure 117 – Les tirucallanes presents dans l’oliban, la dammar et la mastic.....	253
Figure 118 – Les dammaranes presents dans l’oliban, la dammar et la mastic.....	254
Figure 119 – Les hopanes presents dans l’oliban, la dammar et la mastic.....	255
Figure 120 – Les tritérpènes bi- et tricycliques presents dans l’oliban, la dammar et la mastic .....	255

## Liste des tableaux

Tableau 1 - Les différentes classes de molécules terpéniques.....	26
Tableau 2- <i>Boswellia</i> spp. et leurs pays d'origine (Ouedraogo <i>et al</i> , 2006; Germplasm Resources Information Network – GRIN ; United States Department of Agriculture; 2006 IUCN Red List of Threatened Species ; Hassan <i>et al</i> , 2009; Yibekal Abebe Tessema, 2012; National Center for Biotechnology Information – NCBI ;).....	35
Tableau 3- Les molécules diterpéniques isolées de l'oliban.....	40
Tableau 4 - Les molécules ayant le squelette ursane isolées de l'oliban.....	41
Tableau 5 - Les molécules ayant le squelette oléanane isolées de l'oliban .....	42
Tableau 6 - Les molécules ayant le squelette lupane isolées de l'oliban .....	42
Tableau 7 - Les molécules ayant le squelette tirucallane isolées de l'oliban .....	43
Tableau 8 - Les molécules ayant le squelette dammarane isolées de l'oliban .....	43
Tableau 9- Classement phylogénétique de la famille des Dipterocarpaceae (Appanah <i>et al</i> , 1998).....	45
Tableau 10- Résines ayant l'appellation dammar dans le commerce et les noms d'espèces auxquelles elles appartiennent réellement (Lampert, 2003).....	46
Tableau 11 - Liste des espèces principales produisant de la résine dammar (Shiva et Jantan, 1998) .....	49
Tableau 12 - Les molécules ayant le squelette dammarane identifiées dans la dammar....	53
Tableau 13 - Les molécules ayant le squelette ursane ou oléanane identifiées dans la dammar .....	54
Tableau 14 - Les molécules ayant le squelette hopane identifiées dans la dammar.....	55
Tableau 15- Informations botaniques sur la famille des Anacardiaceae.....	57

Tableau 16 - Les molécules ayant le squelette dammarane identifiées dans la mastic.....	64
Tableau 17 - Les molécules ayant le squelette oléanène identifiées dans la mastic.....	66
Tableau 18 - Les molécules ayant le squelette tirucallane identifiées dans la mastic .....	67
Tableau 19 - Les molécules ayant le squelette lupane identifiées dans la mastic.....	68
Tableau 20 - Les molécules ayant le squelette bicyclique ou tricyclique identifiées dans la mastic .....	68
Tableau 21 - Coefficients de corrélation après l'analyse IRTF comparée avec la base de données .....	78
Tableau 22 - Liste des molécules d'oliban identifiées par chromatographie liquide .....	89
Tableau 23 - Liste des molécules de la dammar identifiées en chromatographie liquide ..	92
Tableau 24 - Liste des molécules de la mastic identifiées en chromatographie liquide .....	93
Tableau 25 - Les résultats quantitatifs obtenus pour quelques standards triterpéniques de l'oliban par CLHP.....	95
Tableau 26 - Précisions de la méthode analytique pour les composés standards avant et après dansylation.....	95
Tableau 27 - Liste des composés identifiés dans l'oliban commercial avec leur temps de rétention correspondant pour la colonne RP-18 .....	103
Tableau 28- Liste des composés identifiés dans les résines commerciales de la dammar et de la mastic avec leur temps de rétention correspondants.....	105
Tableau 29- Liste des composés identifiés dans l'oliban commercial avec leur temps de rétention correspondant pour les deux colonnes utilisées .....	111
Tableau 30 - Liste des composés identifiés dans les résines commerciales de dammar et la mastic avec leur temps de rétention correspondant pour les deux colonnes utilisées ....	113
Tableau 31 - Rendement d'extraction de trois résines par les trois techniques en faisant varier la nature du solvant d'extraction .....	120

Tableau 32 – Etude quantitative de l’oliban par CLHP : % d’aire relatif en fonction du procédé et du solvant d’extraction.....	126
Tableau 33 – Etude quantitative de la dammar par CLHP : % d’aire relatif en fonction du procédé et du solvant d’extraction.....	130
Tableau 34 – Etude quantitative de la mastic par CLHP : % d’aire relatif en fonction du procédé et du solvant d’extraction.....	135
Tableau 35 - Liste des composés identifiés dans l’oliban commercial brut avec leur temps de rétention correspondant en CPG-SM et les rapports $m/z$ relatives.....	145
Tableau 36 - Les composés identifiés dans les résines commerciales brutes dammar et mastic avec le temps de rétention correspondant en CPG-SM et les rapports $m/z$ relatives (rouge – dammar, vert – mastic, bleu – dammar et mastic). .....	147
Tableau 37 – Liste des composés pour lesquels la nature est supposée (oléanane ou/et ursane) dans l’oliban après l’extraction en d-limonène .....	151
Tableau 38 - Réactifs et solvants utilisés.....	189
Tableau 39 – Gradient optimal de l’oliban par CLHP .....	197
Tableau 40 – Gradient optimal de la dammar et la mastic par CLHP .....	198
Tableau 41 – Gradient optimal de l’oliban par CLHP .....	198
Tableau 42 – Gradient optimal de la dammar et la mastic par CLHP .....	198
Tableau 43 – Gradient optimal pour l’analyse globale des résines en CPG/SM.....	199
Tableau 44 – Gradient optimal pour l’analyse des di- et triterpènes en CPG/SM.....	199
Tableau 45 – Les $t_R$ correspondants pour les composés KBA et AKBA.....	237

## Abréviations

ATF : Acide trifluoroacétique

Dzl : Chlorure de dansyle

CLHP : Chromatographie liquide haute performance

CLHP-ICPA-SM(-SM) : Chromatographie en phase gazeuse avec ionisation chimique à pression atmosphérique couplée à un spectrométrie de masse

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

ÉTR : Écart-type relatif

IRTF : Spectroscopie Infra-Rouge à Transformé de Fourier

LD : Limite de détection

LQ : Limite de quantification

$\lambda_{em}$  : Longueur d'onde d'émission

$\lambda_{ex}$  : Longueur d'onde d'excitation

MEB : Microscopie électronique à balayage

MeCN : Acétonitrile

MeOH : Méthanol

MET : Microscopie électronique en transmission

SM : Spectrométrie de masse

SPE : Extraction sur phase solide

TMS : Triméthylsilyle

$t_R$ : temps de rétention

UV/Vis: domaine de rayonnement ultraviolet et visible

# **Introduction générale et problématique**

Depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2012, le laboratoire de chimie appliquée à l'Art et à l'Archéologie de l'Université d'Avignon et des pays de Vaucluse a intégré l'UMR IMBE (Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Écologie, CNRS 7263/IRD 237) au sein de l'équipe Ingénierie de la restauration des patrimoines naturel et culturel. Depuis de nombreuses années cette équipe est spécialisée dans l'étude des matériaux employés dans le patrimoine culturel, tels que les colorants naturels et les résines végétales. Ces substances se rencontrent notamment dans les œuvres d'art et leur identification présente un grand intérêt aussi bien pour l'historien que pour le restaurateur des objets du patrimoine. Un accord de partenariat a été établi avec l'Académie de Beaux-arts de Sarajevo en Bosnie – Herzégovine. L'étude des constituants chimiques employés dans la peinture traditionnelle bosnienne se révèle en effet primordiale pour les travaux de restauration des œuvres majeures des collections muséales. Les liens privilégiés entre la France et la Bosnie - Herzégovine se voient ainsi renforcés.

Les résines naturelles d'origine végétale ont toujours tenu une place importante à travers l'histoire et les civilisations. Depuis l'Antiquité, les anciennes routes commerciales ont permis entre autres, le transit de matières résineuses qui parfois, venaient de loin. Ces matériaux «mystiques» et très prisés, étaient réservés aux personnes riches et influentes. Leur utilisation dans les rituels religieux se retrouve dans l'Ancienne Egypte, où les résines se sont révélées des ingrédients indispensables. Elles ont également servi pour la préparation de différents médicaments, pommades, parfums et autres onguents. Certaines ont été utilisées comme épices au Moyen Age et le sont encore aujourd'hui. De par leur composition chimique, les résines sont des matériaux amorphes et malléables à la chaleur. Mélangées à chaud avec un solvant, les résines forment une couche protectrice en refroidissant, d'où leur emploi en tant que vernis picturaux. Elles représentent une source importante de molécules, certaines possédant une activité thérapeutique. Elles occupent ainsi une place notable dans le domaine de la recherche pharmaceutique.

Les résines naturelles végétales contiennent des métabolites secondaires exsudés par différentes familles d'arbres. Leur composition chimique est susceptible de varier avec l'origine géographique et l'espèce botanique. Leur utilisation à travers l'Histoire est maintes fois avérée.

Durant ce travail, trois résines ont été étudiées en parallèle:

- l'oliban, provenant des arbres du genre *Boswellia* (famille des Burseraceae),
- la dammar, produite notamment par les espèces *Shorea* ou *Hopea* (famille des Dipterocarpaceae),
- la résine mastic, exsudée par *Pistacia lentiscus* (famille des Anacardiaceae).

Vu la complexité chimique des résines naturelles, leur identification au sein d'un échantillon archéologique ou artistique, représente parfois un réel challenge. Les matériaux résineux s'oxydent, se dégradent, s'altèrent, naturellement avec le temps ou sous l'effet de facteurs anthropiques, comme la température. Les molécules dégradées jouent alors un rôle important dans l'identification et la détermination d'une espèce résineuse. Pour réaliser un tel travail, il est nécessaire d'employer différentes techniques analytiques, chacune apportant des éléments complémentaires.

La majorité des résines végétales peuvent être définies comme des oléo-gommo-résines. Le nom indique qu'il y a différents groupes de molécules, susceptibles d'être séparés dans trois fractions: les huiles essentielles (oléo), les polysaccharides (gommo) et les polyterpènes (résine). La fraction résineuse contient des molécules ayant un squelette di- ou triterpénique.

Pour ce travail, le choix s'est porté sur l'étude de la fraction triterpénique. Cette fraction contient des molécules biomarqueurs et des molécules hautement spécifiques comme les marqueurs de dégradation naturelle (vieillesement), grâce auxquelles il est possible d'identifier un matériau résineux.

Le premier pas vers la connaissance de la partie triterpénique de ces trois résines a été l'extraction de la fraction résineuse. La résine oliban a déjà été étudiée dans des travaux précédents au sein de notre laboratoire (Mathe C, 2003). Il a notamment été possible d'isoler certaines molécules triterpéniques d'oliban. Ces trois résines, prises séparément, ont d'ailleurs fait l'objet de publications par certaines équipes de recherche, mais c'est la première fois à notre connaissance que leur étude est menée en parallèle.

Le premier défi rencontré durant ce travail a été de rendre fluorescentes des molécules triterpéniques ne possédant pas initialement cette propriété. La solution proposée, qui

représente une approche originale, a été de greffer un marqueur de fluorescence, le chlorure de dansyle, sur les squelettes chimiques. Les échantillons ont été analysés par chromatographie liquide couplée à une double détection, UV/Vis et fluorimétrie. L'objectif visé était d'obtenir une empreinte caractéristique pour chaque espèce botanique. Il a ainsi été possible de détecter ces molécules triterpéniques par fluorimétrie et de diminuer ainsi leur seuil de détection. Les résultats de ce travail ont fait l'objet d'une publication en 2012 dans la revue *Journal of liquid chromatography and related technologies*.

L'extraction de la partie triterpénique de ces trois résines a été optimisée sur le point qualitatif et partiellement sur le point quantitatif. Plusieurs solvants et méthodes pour l'extraction ont été testés. Le R-(+)-limonène a été employé pour la première fois comme solvant d'extraction pour les résines. Trois méthodes différentes d'extraction ont été comparées en prenant en considération le coût énergétique et la quantité nécessaire de matière première et de solvants.

L'analyse des extraits obtenus a été réalisée par différentes techniques chromatographiques et spectroscopiques, où l'accent a été mis sur l'amélioration des conditions opératoires, telle la durée d'analyse, et celle des résultats obtenus. En testant de nouvelles colonnes analytiques, avec la technologie innovante de greffage de silice, des résultats encourageants ont été obtenus. Une colonne de nouvelle génération, comme core-shell Kinetex de Phenomenex, a ainsi été utilisée pour ce travail avec succès.

Les protocoles optimisés et validés par des essais effectués sur des échantillons de résines commerciales, ont été appliqués a des échantillons anciens en donnant de bons résultats. Les échantillons sont issus de régions et d'époques différentes, de l'ancienne Egypte, jusqu'à la Bosnie-Herzégovine du XX<sup>ème</sup> siècle. Les uns ont été prélevés lors de fouilles archéologiques, les autres sur des tableaux modernes.

Les échantillons archéologiques, au nombre de deux, proviennent de Dahchour et de Saqqara en Egypte. Ils font partie de la collection Victor Loret de l'université Lyon 2.

Huit échantillons bosniens de la Galerie Nationale de Bosnie-Herzégovine à Sarajevo, ont été prélevés sur six tableaux différents.

# **Chapitre 1 :**

## **Présentation des résines végétales**

## 1. Définition et historique

Une résine d'origine végétale peut être définie comme un mélange partiellement liposoluble de composés volatils et non-volatils. Ces molécules sont des métabolites secondaires, habituellement exsudés soit à l'intérieur de la plante soit à sa surface, et peuvent avoir une importance pour les interactions en écologie. Leur structure peut être terpénique ou phénolique donnant ainsi des résines terpéniques ou phénoliques. Il existe une autre catégorie de substances résineuses dites fossiles, comme l'ambre par exemple (Langenheim, 2003).

Les exsudats d'origine végétale sont nombreux et très répandus dans la nature, telles les gommes, les mucilages, les huiles, les cires et le latex (Hillis, 1987). Avant l'expansion des moyens techniques et analytiques, les résines naturelles n'ont pas pu être bien définies. L'évolution des outils analytiques a permis d'avoir une vue précise de ces produits et notamment en ce qui concerne leur structure chimique, leur exsudation et leur fonction dans les plantes. Dans le domaine de la chimie, les premiers travaux sur les résines ont été réalisés par Tschirch (Tschirch, 1906), mais c'est dans les années 1940 et 1950, avec l'évolution de différentes techniques spectroscopiques et chromatographiques, qu'une connaissance plus approfondie de la composition chimique des résines, mais également des autres exsudats d'origine végétale, a ainsi été possible. (Langenheim, 2003).

## 2. Les métabolites secondaires

La majorité des terpènes sont des métabolites secondaires produits par les plantes, mais il y en a qui sont des métabolites primaires (acide kaurénoïque-métabolite primaire, acide abiétique-métabolite secondaire). Toutes les plantes produisent des métabolites primaires comme les terpénoïdes, les lipides acylés, les nucléotides, les acides aminés, qui ont une fonction essentielle pour le métabolisme et la croissance des plantes (Croteau, Kutchan et Lewis, 2000). Les métabolites secondaires ne sont pas produits par toutes les espèces et ils n'entrent pas dans le développement des plantes. La première définition des métabolites

secondaires date de 1873 quand Julius Sachs a expliqué que «ce sont des sous-produits de métabolisme, mais qui n'interviennent pas pour la formation de nouvelles cellules ... toute l'importance de ces composés pour l'économie intérieure de la plante n'est pas encore connue». La vraie fonction de ces composés reste toujours vaguement expliquée (Hartmann, 2007). Certains auteurs sont d'avis que la fonction des métabolites secondaires est davantage de répondre aux différentes situations de stress, protéger la plante contre les différents herbivores et d'intervenir au cours des processus de reproduction du végétal (Croteau, Kutchan et Lewis, 2000).

La différence entre les métabolites «primaires» et «secondaires» a probablement été introduite pour la première fois par Albrecht Kossel en 1891 (Mothes, 1980). Le terme «métabolite secondaire» est synonyme de «produit naturel», mot utilisé plus couramment par les chimistes (Hartmann, 2007). Plus de 45 000 composés sont définis comme métabolites secondaires des plantes. Ces dérivés peuvent être répartis dans trois groupes, selon leur structure chimique (Croteau, Kutchan et Lewis, 2000) :

- a) les alcaloïdes (12 000 molécules définies)
- b) les phénylpropanoïdes et les composés phénoliques alliés (8 000 molécules définies)
- c) les terpènes (25 000 molécules définies)

### a) Alcaloïdes

Le nom d'alcaloïde a été présenté par un pharmacien allemand Carl Meissner en 1819. La racine de ce mot vient de la langue arabe *al-qali* qui signifie une plante marine d'où la soude a été isolée pour la première fois. A cette époque, les alcaloïdes sont définis comme des produits d'origine végétale, basiques, contenant de l'azote et pharmacologiquement actifs (Croteau, Kutchan et Lewis, 2000). Actuellement, cette définition n'est plus valable car un grand nombre d'alcaloïdes provient du monde animal. Plusieurs espèces sont capables de synthétiser des alcaloïdes, telles que les grenouilles *Bufo marinus* par exemple qui accumule une quantité importante de morphine dans la peau, différents organismes marins, des fourmis, des bactéries, des champignons, des araignées, des papillons, des insectes et même certaines espèces de mammifères. Ce sont des produits naturels connus depuis des siècles et utilisés comme médicament (l'atropine), mais aussi comme drogue (la morphine) ou comme poison (la ciguë, une plante qui contient plusieurs alcaloïdes).

Après plusieurs années de recherche, on a découvert qu'il existe un nombre important d'alcaloïdes sans aucune activité pharmacologique sur les mammifères. Certains alcaloïdes ont davantage un caractère neutre que basique, malgré la présence d'atome d'azote dans la molécule (Croteau, Kutchan et Lewis, 2000).

### **b) Produits phénoliques**

Les produits phénoliques des plantes sont caractérisés en général comme les métabolites aromatiques qui contiennent, ou ont contenu, un ou plusieurs groupements hydroxyles de caractère acide, attachés sur un noyau aromatique (phényle). Ils peuvent être classés en plusieurs groupes, tels les lignines, les lignanes et les flavonoïdes (Croteau, Kutchan et Lewis, 2000). La production de ces composés a contribué à l'évolution des premières plantes de l'environnement aquatique à l'environnement terrestre, puisque certains produits phénoliques sont responsables de la structure de la paroi cellulaire. Leurs rôles dans la plante sont nombreux, notamment la protection de la plante et l'apport du goût, de l'odeur et de la couleur. Les lignines dans les plantes renforcent les parois des cellules spécialisées. Les lignanes, étroitement liées avec les lignines, aident la plante à se défendre de différents pathogènes et ont une action antioxydante (Croteau, Kutchan et Lewis, 2000). Les couleurs naturelles d'origine végétale possèdent souvent une structure phénolique, par exemple les colorants rouges de la garance sont des dérivés anthraquinoniques.

### **c) Produits terpéniques**

Durant ce travail, l'intérêt principal est porté sur les molécules terpéniques. C'est probablement le groupe de produits naturels le plus varié au niveau des structures moléculaires (Croteau, Kutchan et Lewis, 2000). Les plantes possèdent des structures anatomiques très spécialisées pour la production, le stockage et la sécrétion des composés terpéniques. Le rôle primaire des composés terpéniques dans la plante est sa protection contre le stress et les différentes attaques. Les monoterpènes et les huiles essentielles émises par les fleurs encouragent la pollinisation par les insectes. Les monoterpènes et les diterpènes jouent aussi un rôle de protecteurs contre l'attaque des insectes et des pathogènes, par exemple chez *Pinus contorta* (Croteau, Kutchan et Lewis, 2000). Il existe des cas où les terpènes attirent les mites qui servent de nourriture aux insectes herbivores et de façon indirecte défendent la plante (Kappers *et al*, 2005).

Le nom «terpène» est dérivé d'un mot allemand pour turpentine, «terpentine» d'où les premiers composants terpéniques ont été isolés et caractérisés. (Croteau, 1998; Croteau, Kutchan et Lewis, 2000). La grande majorité des terpènes sont spécifiques au règne végétal. Cependant, on peut rencontrer certains terpènes dans le règne animal: phéromones et hormones juvéniles sesquiterpéniques des insectes, diterpènes des organismes marins (Cnidaires, Spongiaires).

D'après Otto Wallach, chaque composé terpénique peut être considéré comme un ensemble de plusieurs molécules d'isoprène issu de la condensation «tête-à-queue» ce qui donne «la règle d'isoprène» (Bruneton, 1999; Croteau, Kutchan et Lewis, 2000) de ce monomère et ces composés sont souvent appelés «isoprénoïdes». Néanmoins, il est connu que l'isoprène lui-même n'est pas le précurseur biologique de cette famille de métabolites (Croteau, Kutchan et Lewis, 2000).

Les terpènes peuvent être divisés en plusieurs familles moléculaires classées en fonction de leur nombre d'atomes de carbone. Malgré leurs différences structurales et fonctionnelles, la biosynthèse de tous les terpènes se déroule en quatre temps (Croteau, Kutchan et Lewis, 2000) :

1. la synthèse du précurseur fondamentale, isopentényle pyrophosphate (IPP) – deux voies de biosynthèse d'IPP dans les cellules des plantes: acétate/mévalonate (Goodwin, 1977, 1981; Spurgeon et Porter, 1981; Qureshi et Porter, 1981) et non-mévalonate, pyruvate/GAP (glyceraldéhyde 3-phosphate) (Flesch et Rohmer, 1988; Rohmer *et al*, 1993, 1996)
2. l'addition répétitive d'IPP pour former des séries homologues du prényle diphosphate, qui sont en effet les précurseurs directs pour les différentes classes de terpènes
3. le développement structural de ces prényle diphosphates allyliques par des synthèses terpéniques spécifiques pour produire des squelettes terpéniques
4. les modifications enzymatiques secondaires sur les squelettes (en général les réactions d'oxydation) pour donner finalement les propriétés fonctionnelles et la grande diversité chimique de cette famille de produits naturels

Les classes de composés terpéniques sont présentées dans le tableau suivant (tableau 1).

Nom	Précurseur	Exemple
<b>monoterpènes (C<sub>10</sub>)</b>	géranylpyrophosphate (GPP)	Limonène, menthol
<b>sesquiterpènes (C<sub>15</sub>)</b>	farnésylpyrophosphate (FPP)	Farnésol
<b>diterpènes (C<sub>20</sub>)</b>	géranylgéranylpyrophosphate (GGPP)	Acide abiétique
<b>triterpènes (C<sub>30</sub>)</b>	squalène	Lupéol
<b>caroténoïdes (C<sub>40</sub>)</b>	géranylgéraniol et géranyllinalool	β-carotène

Tableau 1 - Les différentes classes de molécules terpéniques

Dans le cas des triterpènes, un grand nombre de composés possédant un squelette dammarane, oléanane et lupane est synthétisé à partir de la cyclisation du 2,3-oxydosqualène (Figure 1).

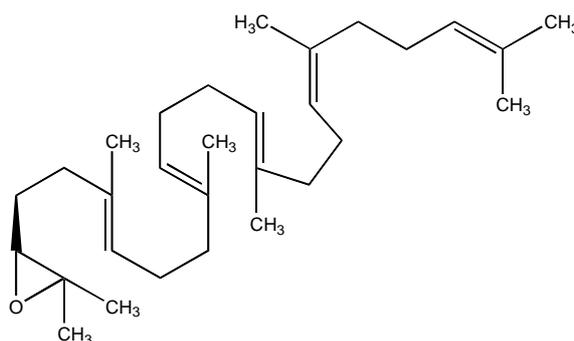


Figure 1 - Structure du 2,3-oxydosqualène

La réaction de cyclisation du 2,3-oxydosqualène en conformation «**chaise-bateau-chaise**» mène aux produits suivants : lanostérol et cycloarténol à travers le cation protostéryle. La réaction est aidée par les enzymes correspondants, lanostérol cyclase (LS) et cycloarténol cyclase (CS). Dans le cas où la cyclisation du 2,3-oxydosqualène est en conformation «**chaise-chaise-chaise**», les produits qui se forment sont de différents cations dammarenyle, baccharenyle, lupényle et oléanyle. En réaction aux enzymes appropriées, dammarenediol synthase (DS), lupéol synthase (LuS), α-amyrine synthase (αAS) et β-amyrine synthase (βAS), ces cations conduisent à la formation des triterpènes correspondants, comme présenté sur la figure suivante (Figure 2, Haralampidis *et al*, 2002).

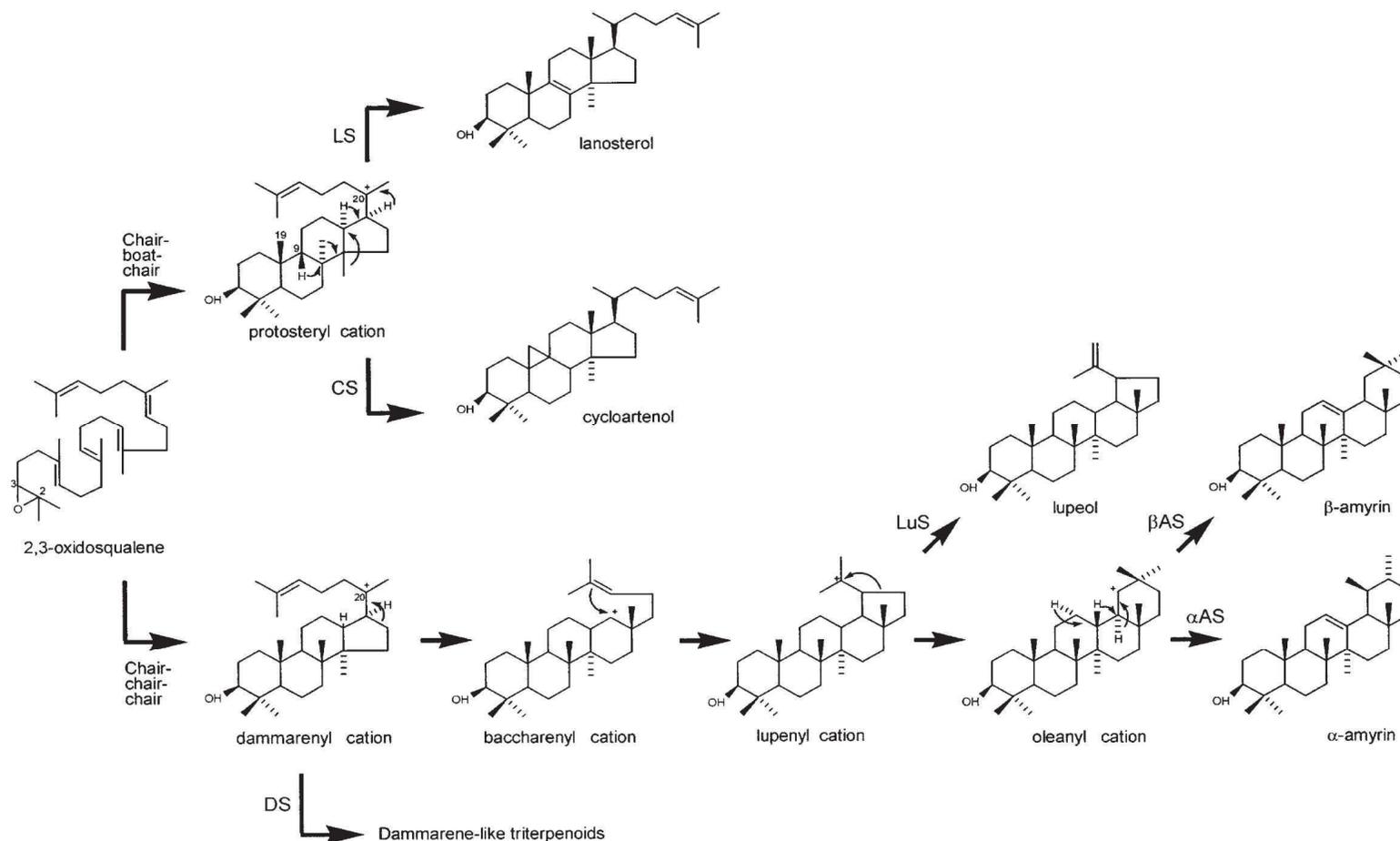


Figure 2 - Formation des structures triterpéniques à travers la cyclisation du 2,3 -oxydosqualène guidé par les enzymes correspondants LS-lanostérole cyclase, CS-cycloarténole cyclase, DS-dammarenediole synthase, LuS-lupéol synthase,  $\alpha$ AS- $\alpha$ -amyrine synthase et  $\beta$ AS- $\beta$ -amyrine synthase (d'après Haralampidis *et al*, 2002).

En général, les triterpènes sont des substances stables, non-polymérisables mais facilement oxydables. Ils sont solubles dans l'éther de pétrole et les alcools, en particulier ceux issus de la dammar et le mastic, et ils présentent un très faible jaunissement. C'est pour cela qu'ils sont depuis longtemps employés comme vernis dans le domaine pictural (Mills et White, 1987).

### **3. Composition chimique des oléo-gommo-résines**

Un certain nombre de résines naturelles végétales sont en effet des oléo-gommo-résines. Leur nom indique qu'elles contiennent des molécules qui peuvent être séparés en trois fractions: les monoterpènes et des huiles essentielles (oléo), les polysaccharides (gommo) et les diterpènes ou les triterpènes (résine).

#### **3.1. Les huiles essentielles**

Il existe plusieurs définitions des huiles essentielles, plus ou moins précises et plus ou moins complètes.

D'après Naves Y. T. (1974), les huiles essentielles sont des mélanges de divers produits issus d'une espèce végétale, ces mélanges passant avec une certaine proportion d'eau lors d'une distillation effectuée par un courant de vapeur d'eau (Garnero, 1996). Un montage pour la distillation à la vapeur d'eau (entraînement à la vapeur) est montré sur la figure 3.

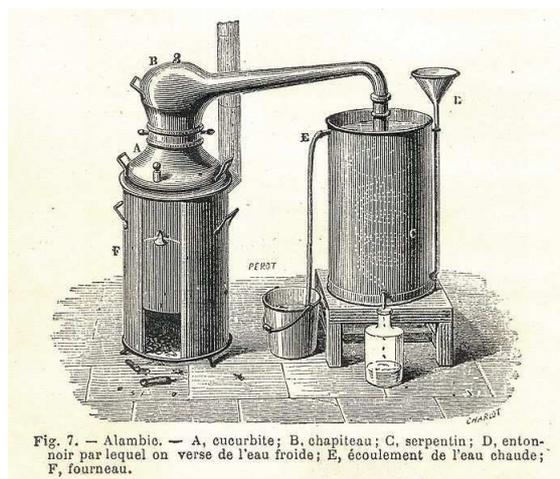


Figure 3- Montage à «l'ancienne» pour la distillation des huiles essentielles à la vapeur d'eau (d'après catoire-fantasque.be)

Une autre définition plus récente s'appuyant sur celle de Naves Y. T., est donnée par la norme AFNOR NF T 75-006 (février 1998): «produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des *Citrus*, soit par distillation sèche». L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques pour les deux premiers modes d'obtention; elle peut subir des traitements physiques n'entraînant pas de changement significatif de sa composition (par exemple la redistillation).

Les huiles essentielles sont composées en général de monoterpènes et de sesquiterpènes, mais aussi d'autres classes de composés comme des hydrocarbures, des alcools et des acides.

La résine oliban est riche en huiles essentielles, elle en contient en proportion 5% à 10%. La composition chimique de l'huile essentielle dépend de l'espèce productrice de la résine (Al-Harrasi et Al-Saidi, 2008). Les huiles essentielles de cette résine sont connues pour être utilisées dans la production de parfums comme par exemple «Shalimar» de Guerlain (1925) et «Nu» d'Yves Saint-Laurent (2001) (Haluk, 2005).

La dammar est une résine contenant de faibles quantités d'huiles essentielles qui s'évaporent assez rapidement après l'exsudation de la résine (Shiva et Jantan, 1998). Une petite quantité de sesquiterpènes est présente (de la Rie, 1988). La dammar ne contient pas de molécules de monoterpènes et c'est une caractéristique de cette résine asiatique (Diaz *et al*, 1966; Diaz et Ourisson, 1966; Bisset *et al*, 1966, 1967, 1971).

La mastic contient une petite quantité d'huile essentielle (environ 2%). Les molécules composantes de l'huile essentielle de mastic sont généralement monoterpéniques et l' $\alpha$ -pinène est le composé le plus abondant (Papageorgiou *et al*, 1981).

### 3.2. La partie polymérisable (gomme)

Les oléo-gommo-résines, à part la fraction résineuse et hydrophobe, contiennent aussi la partie hydrosoluble, ordinairement de type polysaccharidique.

Dans le cas de la résine oliban, cette partie représente environ 30% de l'extrait total (Denoel, 1958). La gomme de l'oliban contient plusieurs molécules de sucres, comme des monosaccharides (*D*-galactose), des aldopentoses (*L*-arabinose, un des composants principales de la pectine et de l'hémicellulose), des aldohexoses (du fucose) et du rhamnose, un 6-désoxy-hexose du type aldose, aussi rencontré en hémicellulose mais sous forme de polyosides (Jones et Nunn, 1955).

La partie non-résineuse de la dammar a été identifiée comme polymère du cadinène, dont la structure est présentée dans la figure 4 (Van Aarssen *et al*, 1990).

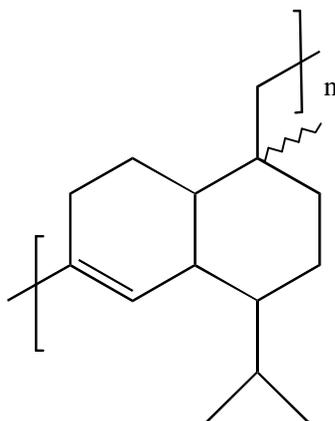


Figure 4 - Structure du polycadinène

Cette structure a été isolée à partir de la résine dammar contemporaine de genre Dipterocarpaceae mais aussi à partir de résines fossiles (Van Aarssen *et al*, 1990). Les dérivés de bicadinane et de bicadinène, avec un poids moléculaire important, sont caractéristiques pour la dammar exsudée par les Dipterocarpaceae (Anderson *et al*, 1992;

Stout, 1995). Autrefois, la partie non-résineuse de la dammar a été appelée  $\beta$ -résène (la partie résineuse, soluble dans l'alcool, a été appelée  $\alpha$ -résène) (de la Rie, 1988).

La résine mastic contient un polymère, qui est identifié comme étant le *cis*-1,4-poly- $\beta$ -myrcène (Van den Berg *et al*, 1998) présent sur la figure 5 :

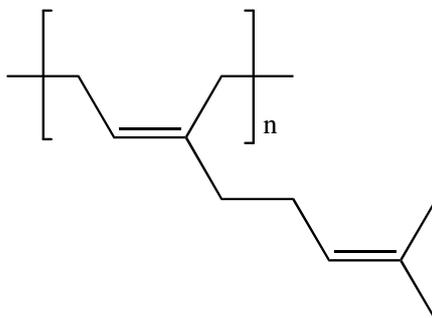


Figure 5- Structure du *cis*-1,4-poly- $\beta$ -myrcène

Environ 75% de la fraction non-résineuse de la mastic a la conformation *cis* (Z). Ce polymère est formé d'une unité à base de  $\beta$ -myrcène (figure 6), qui est un monoterpène avec des doubles liaisons conjuguées (Van den Berg *et al*, 1998).

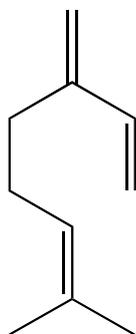


Figure 6- Structure du  $\beta$ -myrcène

### 3.3. Les triterpènes

La partie résineuse, terpénique est non-volatile et constituée d'acides triterpéniques en mélange avec certains alcools, aldéhydes et esters (Langenheim, 2003).

C'est une classe de composés très répandue dans la nature (Kulshreshtha *et al*, 1972; Pani et Rastogi, 1979), principalement dans le monde végétal. Ce sont des molécules possédant un squelette à trente atomes de carbone (C<sub>30</sub>). Les squelettes triterpéniques sont dans la majorité des cas tétracycliques ou pentacycliques. Sur la figure suivante, les structures triterpéniques rencontrées le plus souvent dans les résines végétales sont présentées (figure 7):

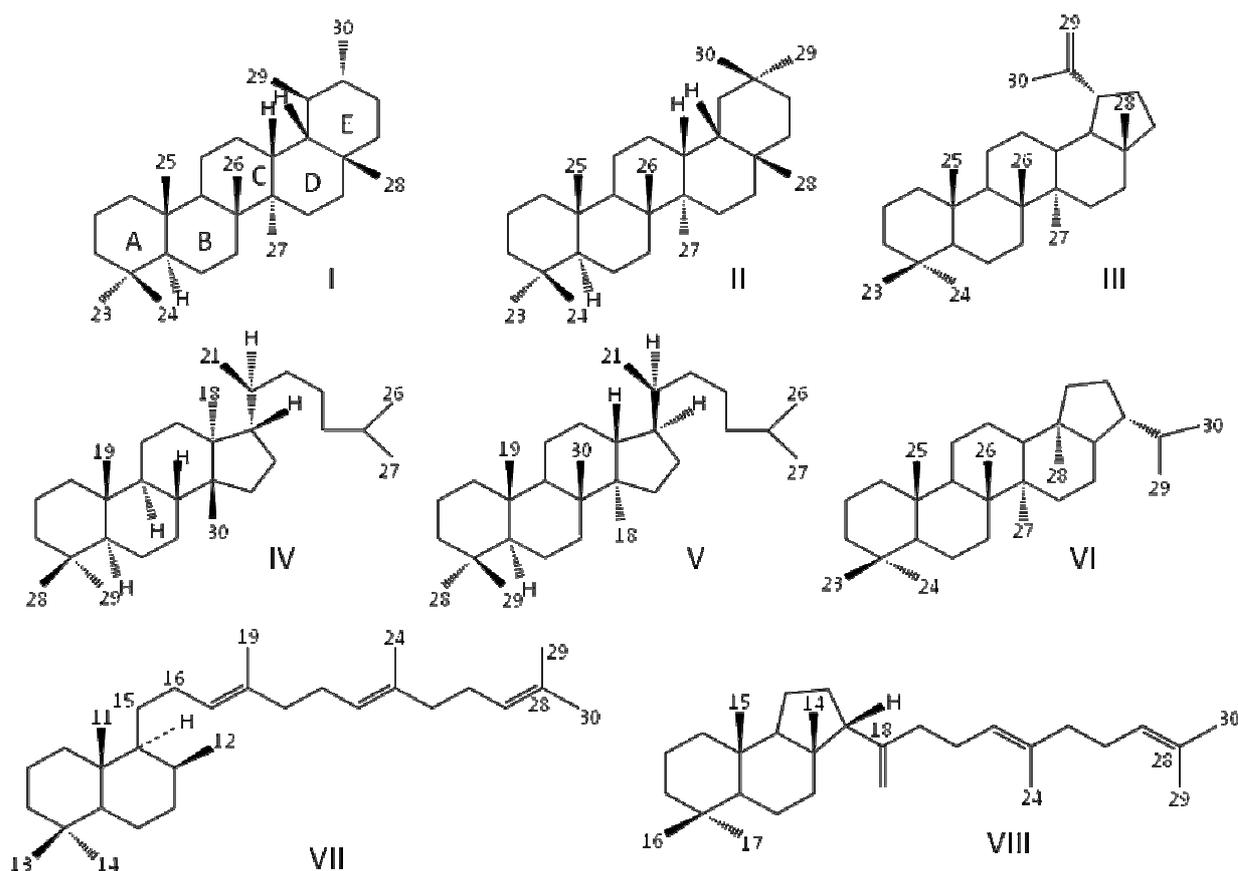


Figure 7 - Les squelettes triterpéniques rencontrés dans les résines oliban, dammar et mastic ; I-ursane, II-oléanane, III-lupane, IV-tirucallane/euphane, V-dammarane, VI-hopane, VII-triterpène bicyclique et VIII-triterpène tricyclique

La famille des ursanes (I) possède un squelette pentacyclique. La famille des oléananes (II) diffère de la famille des ursanes par la position d'un méthyle (C<sub>29</sub>) sur le cycle E. Les molécules ayant le squelette oléanane et celles ayant le squelette ursane, sont celles présentes en plus grand nombre dans la résine oliban. A ce jour, 32 triterpènes identifiés dans l'oliban possèdent l'un de ces deux squelettes.

Le squelette des lupanes (III) correspond à une structure pentacyclique, dont le cycle E est un cycle de 5 atomes de carbone.

La famille des tirucallanes (IV), comme celle des dammaranes (V), possède un squelette tétracyclique. Bien que les dammaranes soient familiers à un grand nombre d'espèces botaniques, comme le Ginseng (*Panax Ginseng*, famille d'Araliaceae) et les espèces similaires, ce n'est pas le cas des tirucallanes, que l'on rencontre plus rarement.

Les dammaranes possèdent un squelette tétracyclique, avec un cycle D à cinq atomes de carbone. Comme leur nom le suggère, ce sont des triterpènes présents principalement dans la résine dammar, généralement exsudées par les espèces *Shorea* et *Hopea*.

Les hopanes (VI) sont représentés par un squelette pentacyclique, dont le cinquième cycle E est à cinq atomes de carbone. Ce squelette a des ressemblances avec le squelette des lupanes, possédant un groupement isopropène en C 19 alors que les hopanes ont un groupement isopropyle sur le C 21.

## 4. L'oliban

### 4.1. Etymologie du nom oliban

Plusieurs sources différentes définissent le mot oliban. Le mot latin «*olibanum*» apparaît dans un texte du XI<sup>ème</sup> siècle et ce mot est d'origine grecque signifiant baume ou baumier (dictionnaire de Littré E.). Il se rattache également aux termes *leban* ou *al lûban* en arabe et *lebonah* en hébreux qui signifient «blanc de lait», en raison de la couleur blanche des larmes d'encens.

Le mot *encens* vient du latin *incensum* et signifie un objet allumé, brûlé. Aujourd'hui ce terme est souvent employé pour désigner toute résine parfumée dont l'odeur s'exhale surtout lors de la combustion et dont l'origine botanique est variée.

Le terme «encens» est réservé à une résine particulière qui est l'oliban, on parle alors d'encens «vrai» ou d'encens véritable (Le petit Larousse, 1993). Il s'agit plus exactement de la sécrétion issue de l'écorce de certains arbres de la famille des Burséracées et appartenant au genre *Boswellia*.

### 4.2. Origine botanique et distribution géographique de l'oliban

L'oliban est une oléo-gomme-résine exsudée par les espèces appartenant au genre *Boswellia*, famille des Burséracées. Cette famille comprend environ 700 espèces distribuées en 18 genres (Rüdiger *et al*, 2007). Actuellement, les principales espèces productrices sont *Boswellia serrata* (syn. *thurifera*) au Nord-Ouest de l'Inde, *B. sacra* en Arabie (Sud Yémen, Oman), *B. frereana* espèce endémique au Nord de la Somalie et *B. carteri* (considérée comme un synonyme de *B. sacra*) qui est communément présente dans la corne de l'Afrique: nord de la Somalie, Soudan, Erythrée et Ethiopie (Thulin et Warfa, 1987; Dupéron, 1993; Coppens, 1995). D'autre part, des qualités inférieures d'oliban proviennent d'une cinquième espèce, *B. papyrifera* rencontrée en Afrique de l'Est (tableau 2).

<b>Boswellia spp.</b>	<b>Pays d'origine</b>
<i>B. serrata</i> (syn. <i>thurifera</i> ) Roxb. ex. Colebr.	Inde
<i>B. ovalifoliolata</i> Bal.& Henry	Inde
<i>B. papyrifera</i> (Delile ex. Caill.) Hochst.	Niger, République Centrafricaine, Cameroun, Ethiopie, Soudan, Ouganda
<i>B. socotrana</i> Balf.f	Socotra (Yémen)
<i>B. carteri</i> Birdw.	Somalie du Nord, Ethiopie, Soudan, Erythrée
<i>B. bhau-dajiana</i> Birdw.	Somalie
<i>B. microphyllia</i> Chiovenda	Somalie
<i>B. multifoliata</i>	Somalie
<i>B. rivae</i> Engler	Somalie
<i>B. sacra</i> (syn. <i>carteri</i> ?) Flueck.	Yemen du Sud, Oman
<i>B. frereana</i> Birdw.	Nord de la Somalie
<i>B. odorata</i>	Nigeria, Niger, Cameroun
<i>B. popoviana</i> Hepper	Socotra (Yémen)
<i>B. nana</i> Hepper	Socotra (Yémen)
<i>B. pirottiae</i> Chiov.	Ethiopie
<i>B. ogadensis</i> Vollesen	Ethiopie
<i>B. neglecta</i> S. Moore	Ethiopie, Kenya, Tanzanie, Ouganda
<i>B. elongata</i> Balf.f	Socotra (Yémen)
<i>B. dioscorides</i> Thul. & Gifri	Socotra (Yémen)
<i>B. dalzielii</i> Hutch.	Afrique de l'Ouest
<i>B. bullata</i> Thul. & Gifri	Socotra (Yémen)
<i>B. ameero</i> Balf.f	Socotra (Yémen)

Tableau 2– *Boswellia* spp. et leurs pays d'origine (Ouedraogo *et al*, 2006; Germplasm Resources Information Network – GRIN ; United States Department of Agriculture; 2006 IUCN Red List of Threatened Species ; Hassan *et al*, 2009; Yibekal Abebe Tessema, 2012; National Center for Biotechnology Information – NCBI ;).

Tous les *Boswellia* et tous les Burséracées d'ailleurs, possèdent des canaux résinifères, mais les produits exsudés sont de qualité très variable. En Inde, plus précisément dans la région au nord de Madhya Bharat, se trouve *Boswellia serrata* appelé localement *Salai* ou l'oliban indien. Il existe une espèce endémique en Inde, *Boswellia ovalifoliolata* Bal.& Henry

(Rani & Pullaiah 2002; Reddy *et al*, 2002; Solomon Raju *et al*, 2012). Dans la péninsule arabique, est présent *Boswellia sacra*, dont le nom local est *Mogar*; il fournit un encens de très bonne qualité. Ce type de résine est appelé en commerce l'oliban du type Aden. C'est en Somalie que l'on trouve le plus grand nombre d'espèces, dont six endémiques: *Boswellia bhau-dajiana* Birdw., *B. frereana* Birdw., *B. microphyllia* Chiovenda, *B. multifoliata*, *B. neglecta*, *B. rivae* Engler. Les trois espèces productrices de l'oliban, ayant des rendements commercialement rentables, sont *Boswellia papyrifera* (Tadesse *et al*, 2007), *Boswellia carteri* et *Boswellia frereana*. Cette dernière exsude la résine oliban *Maïdi*, considérée comme l'oliban de meilleure qualité disponible sur le marché. *B. carteri* produit l'oliban appelé *Beeyo*. L'oliban provenant de la corne africaine est connu sous l'appellation d'oliban de type érythréen.

Il existe une confusion entre *B. sacra* (Arabie) et *B. carteri* (Somalie). En effet, parfois considérés comme étant de la même espèce et parfois non (figure 8). La différence botanique des deux plantes essentielles résiderait dans le port : type buisson chez *B. sacra* (ramification débutant dès le niveau du sol ou un peu au-dessus), type arbre avec un tronc véritable chez *B. carteri*. D'après Thulin et Warfa (1987), il n'existe probablement qu'une seule espèce, *Boswellia sacra* (syn. *carteri*) que l'on trouve à la fois en Arabie et en Afrique. Les adaptations aux environnements extrêmes devraient être responsables des différences observées par les botanistes entre ces espèces. L'appellation *Boswellia sacra* sera employée pour désigner l'espèce sud-arabique, tandis que pour l'espèce africaine, on parlera de *B. carteri*.



Figure 8– (a) *Boswellia sacra* (addme.net.au), (b) *Boswellia carteri* (stnikola.net)

Néanmoins, certaines études récentes de *B. sacra* montrent qu'il existe une différence de la composition chimique des huiles essentielles de ces deux espèces. La proportion des principaux composants des huiles essentielles chez *B. sacra* et *B. carteri* n'est pas la même (Al-Harrasi et Al-Saidi, 2008).

### 4.3. Production d'oliban

La Somalie exploite *Boswellia bhau-dajiana*, mais surtout *B. carteri* et *B. frereana*.

Il a souvent été question d'encens, avec une certaine confusion d'ailleurs et sans raison scientifique, de *Boswellia* mâles ou femelles, alors que les fleurs sont toutes hermaphrodites. Bien que toutes les parties de la plante renferment de l'oliban en plus ou moins grande quantité, on l'extrait essentiellement de l'écorce du tronc ou des branches (Dupéron, 1979). Les gouttes de résine tombées à terre sont recueillies séparément et sont considérées comme de qualité inférieure (Flückiger et Hanbury, 1878).

Les renseignements concernant le calendrier des collectes de l'encens, c'est-à-dire l'intervalle entre les collectes et la périodicité des saignées, sont plutôt imprécis selon les sources (Hepper, 1969; Barbier, 1982; Svoboda *et al*, 2001).

Aujourd'hui, la Somalie est le plus grand exportateur d'oliban. Le transport maritime en partance de Somalie dessert le Yémen, l'Inde, la Chine et le Brésil mais approvisionne également l'Europe vers la France, l'Allemagne et l'Italie (Dupéron, 1993).

### 4.4. Historique

L'oliban est parmi les résines les plus importantes, utilisées à travers l'Histoire. A présent, l'usage de la résine oliban est réduit. Considéré jadis comme un produit précieux, l'oliban est connu depuis la plus haute Antiquité, par des peintures et gravures, datés vers 1600 av. J.-C., découvertes dans le temple égyptien de Deir-el-Bahari qui décrivent le commerce entre les Egyptiens et les peuples voisins. Ce produit n'existait pas en Egypte, mais il a été importé. Pour le traducteur de hiéroglyphes J. Dümichen, ces produits arrivaient en

Egypte en provenance d'Arabie (Flückiger et Hanbury, 1878). D'autres auteurs, comme Hildebrandt (1878), pensent qu'une telle origine est peu probable, le nord de la Somalie semblant plus certain.

Le commerce de l'oliban s'est élargi grâce aux Phéniciens, grands navigateurs de l'Antiquité, qui l'ont d'abord fait connaître aux peuples sur lesquels ils exerçaient leur puissance, puis l'ont introduit dans les différents pays avec lesquels ils ont eu des accords commerciaux. Les Perses, Sumériens et Assyriens l'ont utilisé pour leurs rituels funéraires bien avant les civilisations grecque et romaine (Atchley et Cuthbert, 1909). Les Chinois l'ont découvert en même temps que d'autres résines ramenées par les Arabes, comme la myrrhe et le styrax. L'encens se nomme *Ju-siang* en chinois, c'est-à-dire «parfum de lait».

La valeur de l'encens était identique à celle de l'or et d'autres produits rares. Selon l'histoire biblique, les rois mages en ont fait présent à Jésus lors de leur venue à Bethléem. L'histoire garde plusieurs exemples où l'oliban était utilisé en guise d'offrande à une tribu ou aux plus grands souverains du monde de l'Antiquité. L'encens était un produit très réputé et précieux, un vrai cadeau de la nature.

### 4.5. Utilisation et propriétés

Les domaines d'utilisation de l'oliban sont variés. L'utilisation religieuse date de l'Antiquité. De façon générale, l'utilisation des résines naturelles a été très importante et répandue dans les rituels religieux, adoptées par les grecs, puis les romains. On les brûlait chez les Juifs lors de l'office. Plus tard, à partir du IV<sup>ème</sup> siècle, le christianisme accepta l'utilisation de résines, d'abord dans les cérémonies funéraires et leur emploi se répandit rapidement dans la liturgie, dans l'église orientale et occidentale.

Les premiers parfums portent la signature des anciens Egyptiens, parfums fabriqués à partir de cette résine, pour encenser les statues dans les temples.

Les pratiquants du bouddhisme utilisent l'encens plutôt sous la forme de bâtonnet, formé du délicat mélange de la gomme-résine et d'autres ingrédients, comme le bois de santal, le styrax, la myrrhe, le camphre et des plantes épicées comme la cannelle, l'aloès, le jasmin, les racines de vétiver, les graines d'ambrette, l'anis, le safran (Faure, 1987).

Aujourd'hui, l'oliban a toujours sa place dans certains domaines, comme la phytothérapie, l'aromathérapie, la médecine ayurvédique, la parfumerie et la cosmétique.

La recherche pharmaceutique s'intéresse également à l'oliban car certains de ces composés ont des propriétés thérapeutiques, principalement les acides  $\alpha$ - et  $\beta$ -boswelliques. Ils ont une action sur le processus d'inflammation de la peau (Safayhi et Sailer, 1997; Watkins, 2000; Dahmen *et al*, 2001; Ammon, 2002), interviennent dans l'inhibition d'enzymes (Sailer *et al*, 1996a; Sailer *et al*, 1996b) et possèdent également une action anti-tumorale et anti-cancéreuse (Huan *et al*, 2000). Leurs dérivés acétylés induisent l'apoptose des cellules leucocytes et autres (Jing *et al*, 1999; Liu *et al*, 2002; Zhao *et al*, 2003). Cette liste n'est pas exhaustive et d'autres activités ont été mises en évidence (Safayhi *et al*, 1997; Gupta *et al*, 1997; Safayhi *et al*, 2000; Park *et al*, 2002).

### 4.6. Composition chimique de l'oliban

L'oliban est une résine très riche en différents composés, mais durant ce travail l'accent sera mis sur la partie triterpénique.

#### 4.6.1. Les diterpènes de l'oliban

Une résine naturelle contient soit des diterpènes (résines diterpéniques) soit des triterpènes (résines triterpéniques). L'oliban représente l'exception de la règle puisqu'il contient à la fois les diterpènes et les triterpènes.

Les diterpènes présents dans l'oliban sont en fait des composés macrocycliques en  $C_{20}$ : les cembranes et les verticillanes. Ce ne sont pas des composés résineux, ils n'ont pas été étudiés profondément au cours de ce travail. Néanmoins, il est important de mentionner que les diterpènes cembranes et verticillanes sont une particularité chimique de l'oliban, malgré le fait qu'ils soient isolés de certains organismes d'origine animale (Hamm *et al*, 2003).

Des exemples de ces deux familles chimiques isolés de l'oliban, les structures des cembrènes A et C, d'isocembrène et de verticilla-4(20), 7,11-triène (Basar *et al*, 2001) sont présentées dans la figure 9.

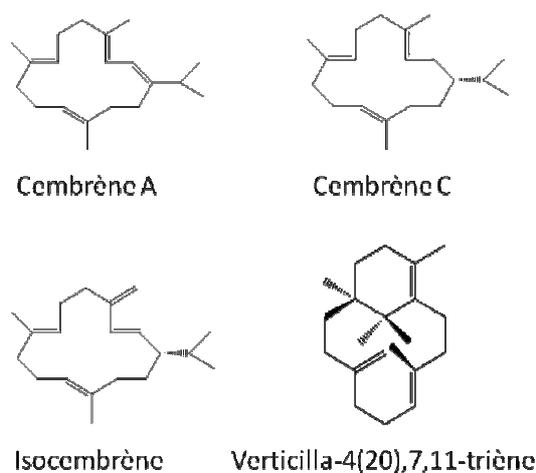


Figure 9 – Exemple de diterpènes isolés à partir d’oliban

Les molécules diterpéniques ont été isolées et caractérisées à partir de différents genres de *Boswellia*. Elles figurent dans le tableau ci-dessous (tableau 3):

Source botanique	Molécules isolées
<i>Boswellia carteri</i>	cembrène C (Basar <i>et al</i> , 2001) ; isocembrène (Abdel Wahad <i>et al</i> , 1987) ; verticilla-4(20), 7, 11-triène (Basar <i>et al</i> , 2001)
Oliban d’Erythrée	incensole (Corsano et Nicoletti, 1967 ; Klein et Obermann, 1978) (dont la structure a été révisée) et son dérivé acétylé (Obermann, 1977) ; oxyde d’incensole (Nicoletti et Forcellese, 1968), oxyde d’isoincensole (Forcellese <i>et al</i> , 1972(a); Forcellese <i>et al</i> , 1972(b)) ; cembrène A (Basar <i>et al</i> , 2001 ; Obermann, 1977); cembrénol (Obermann, 1977)
Oliban d’Aden	(S)-1-isopropyl-4, 8, 12-triméthylcyclotétradéca-3E, 7E, 11E-triène-1-ol (Klein et Obermann, 1978).

Tableau 3- Les molécules diterpéniques isolées de l’oliban.

#### 4.6.2. Les triterpènes de l’oliban

Les triterpènes rencontrés dans les genres *Boswellia* possèdent soit un squelette tétracyclique (tirucallane et dammarane) soit un squelette pentacyclique (ursane, oléanane et lupane).

**Les ursanes**

Vingt et un composés sont actuellement connus et identifiés comme appartenant à la famille des ursanes et ils sont cités dans le tableau 4. Parmi ces composés, la majorité sont des acides boswelliques et leurs dérivés. La majorité des composés ont été isolés à partir de deux espèces, *B. sacra* et *B. carteri*. Leurs structures sont données dans l'Annexe 5 de ce manuscrit.

Source botanique	Molécules isolées
<i>B. sacra</i>	acide 11-céto- $\beta$ -boswellique KBA (Savoir <i>et al</i> , 1967 ; Mahajan <i>et al</i> , 1995), et acétate correspondant AKBA (Mahajan <i>et al</i> , 1995); acide 3 $\alpha$ -hydroxy-urs-9,12-dièn-24-oïque et son acétate correspondant (Mahajan <i>et al</i> , 1995); acide 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihydroxy-urs-12-èn-24-oïque (Mahajan <i>et al</i> , 1995); $\alpha$ -amyrine (3 $\beta$ -hydroxy-urs-12-ène) (Mahajan <i>et al</i> , 1995); urs-12-èn-3 $\alpha$ ,24-diol (Mahajan <i>et al</i> , 1995)
<i>B. carteri</i>	acide 4(23)-dihydroroburiq (acide 3,4-seco-urs-12-èn-3-oïque) et son ester méthylique (Fattorusso <i>et al</i> , 1983)
<i>B. sacra</i> et <i>B. carteri</i>	acide $\beta$ -boswellique (acide 3 $\alpha$ -hydroxy-urs-12-èn-24-oïque) (Winterstein et Stein, 1932 ; Savoir <i>et al</i> , 1967 ; Mahajan <i>et al</i> , 1995) et son acétate (Winterstein et Stein, 1932 ; Fattorusso <i>et al</i> , 1983 ; Mahajan <i>et al</i> , 1995)
Oliban commercial	3-épi- $\alpha$ -amyrine (3 $\alpha$ -hydroxy-urs-12-ène) et son acétate correspondant (Snatzke et Vértesy, 1967); $\alpha$ -amyrénone (3-céto-urs-12-ène) (Snatzke et Vértesy, 1967)
Oliban (source botanique pas précisée)	ester méthylique de l'acétate et ester méthylique de l'acide $\beta$ -boswellique (Savoir <i>et al</i> , 1967, Fattorusso <i>et al</i> , 1983); ester méthylique de l'acétate (Snatzke et Vértesy, 1967 ; Savoir <i>et al</i> , 1967) et ester méthylique de l'acide 11-céto- $\beta$ -boswellique (Snatzke et Vértesy, 1967); ester méthylique de l'acide acétyl-11-hydroxy- $\beta$ -boswellique (Corsano et Iavarone, 1964); 11-céto- $\alpha$ -amyrénone (3,11-dicéto-urs-12-ène)

Tableau 4 – Les molécules ayant le squelette ursane isolées de l'oliban

Le 24-nor-urs-3,12-diène est supposé comme étant le résultat de la dégradation d'autres molécules (Van Bergen *et al*, 1997; Evershed *et al*, 1997).

**Les oléananes**

Onze dérivés possédant un squelette oléanane (pour les structures, cf. Annexe 5) ont été isolés à partir de la résine oliban et sont décrites dans la littérature. Ils sont cités dans le tableau suivant:

Source botanique	Molécules isolées
<i>B. sacra</i>	$\beta$ -amyrine (3 $\beta$ -hydroxy-oléan-12-ène) (Mahajan <i>et al</i> , 1995)
<i>B. carteri</i>	acide $\alpha$ -boswellique (acide 3 $\alpha$ -hydroxy-oléan-12-èn-24-oïque) (Fattorusso <i>et al</i> , 1983)
Oliban commercial	acétate d'acide $\alpha$ -boswellique (Winterstein et Stein, 1932); 3-épi- $\beta$ -amyrine (3 $\alpha$ -hydroxy-oléan-12-ène) et son dérivé acétylé correspondant (Snatzke et Vértesy, 1967) $\beta$ -amyrénone (3-céto-oléan-12-ène) (Snatzke et Vértesy, 1967)
Oliban (source botanique pas précisée)	acide 3 $\alpha$ -hydroxy-oléan-9,11-dièn-24-oïque et son dérivé acétylé correspondant; ester méthylique de l'acétate et l'ester méthylique de l'acide $\alpha$ -boswellique (Fattorusso <i>et al</i> , 1983)

Tableau 5 - Les molécules ayant le squelette oléanane isolées de l'oliban

Le 24-nor-oléan-3,12-diène est supposé comme étant très probablement le résultat de la dégradation d'autres molécules (Van Bergen *et al*, 1997; Evershed *et al*, 1997).

**Les lupanes**

Quatre composés possédant cette structure (cf. Annexe 5) ont été caractérisés et ils sont présentés dans le tableau suivant :

Source botanique	Molécules isolées
<i>B. frereana</i>	lupéol (3 $\beta$ -hydroxy-lup-20(29)-ène) 3-épi-lupéol (3 $\alpha$ -hydroxy-lup-20(29)-ène) (Proietti <i>et al</i> , 1981)
Oliban commercial	acide lupéolique (acide 3 $\alpha$ -hydroxy-lup-20(29)-èn-24-oïque) (Culioli <i>et al</i> , 2003) et son dérivé acétylé correspondant (Zhou et Cui, 2002)

Tableau 6 - Les molécules ayant le squelette lupane isolées de l'oliban

**Les tirucallanes**

Cinq acides du type tirucallane ont été caractérisés et isolés (Tableau 7). Les structures correspondantes sont données dans l'Annexe 5 de ce manuscrit.

Source botanique	Molécules isolées
<i>B. sacra</i>	acide 3 $\alpha$ -hydroxytirucall-8,24-dièn-21-oïque; acide 3 $\alpha$ -O-acétyl-tirucall-8,24-dièn-21-oïque; acide 3-céto-tirucall-8,24-dièn-21-oïque; acide 3 $\beta$ -hydroxytirucall-8,24-dièn-21-oïque (acide $\beta$ -élémolique); acide 3 $\alpha$ -hydroxytirucall-7,24-dièn-21-oïque (acide $\alpha$ -élémolique) (Pardhy et Bhattacharya, 1978)

Tableau 7 - Les molécules ayant le squelette tirucallane isolées de l'oliban

**Les dammaranes**

Trois composés ayant le squelette dammarane (cf. Annexe 5) ont été caractérisés et ils sont présentés dans le tableau 8 :

Source botanique	Molécules isolées
<i>B. frereana</i>	3 $\beta$ ,20(S)-dihydroxydammar-24-ène et son dérivé acétylé correspondant; 20(S)-protopanaxadiol; 3 $\beta$ -acetoxy-16(S),20(R)-dihydroxydammar-24-ène (Fattorusso <i>et al</i> , 1985)

Tableau 8 - Les molécules ayant le squelette dammarane isolées de l'oliban

## 5. La dammar

### 5.1. Confusion dans la terminologie

D'une manière générale, les arbres appartiennent à la grande famille des Dipterocarpaceae et sont une source importante de résines. Il existe deux catégories de résines produites par cette famille d'arbres: l'une est liquide, odorante et contient le matériel résineux et les huiles essentielles (oléorésine). L'autre est une résine dure, facilement cassante et contient de petites quantités d'huile essentielle qui s'évaporent assez vite après son exsudation, elle est appelée dammar (Shiva et Jantan, 1998).

Le nom de cette résine «dammar» ou «damar» est d'origine malaisienne et signifie d'abord une résine, puis des résines en général (Mantell, 1950). Dans la littérature ancienne, il existait une confusion car le même nom était assigné à toutes les résines asiatiques, indépendamment de leur origine botanique (Feller, 1964). Le terme dammar est adopté en langue anglaise après les premières visites à Malaysia. Les visiteurs, commerçants anglais, importent de la résine dammar en Grande-Bretagne (Howes, 1949). Le nom commun, actuel, de cette résine est «dammar», selon la version anglaise, mais le terme «damar» est aussi employé.

La confusion du nom dammar touche également le domaine médical. Une résine utilisée pour les adhésifs chirurgicaux a causé un eczéma allergique, il était alors important de déterminer précisément sa source botanique. D'après Jost et al. (1989), d'importantes confusions existent entre les deux résines, copals (genre *Agathis*, famille d'Araucariaceae) et dammars (famille de Dipterocarpaceae), reflétant aussi la complexité du monde des résines (Langenheim, 2003). La résine de genre *Agathis* est préalablement désignée comme les dammars, puisque c'est son nom local. En commerce, elle est connue sous les noms de copal et copal de Manille. Les arbres de genre *Agathis* (Araucariaceae) appartiennent à la catégorie des conifères, qui poussent dans la région est de l'archipel malais (Langenheim, 2003). Ce sont des forêts mixtes qui se rencontrent sur un terrain sec. Auparavant, identifié comme faisant partie du genre *Dammara*, terme très probablement inspiré par la production de résine qui porte ce nom, maintenant deux espèces sont reconnues comme appartenant au genre *Protium* (Burseraceae) et au genre *Shorea* (Dipterocarpaceae) (Whitmore, 1980a). Cette confusion terminologique du nom dammar se retrouve aussi en

Asie, ou le peuple local l'utilise pour les résines en général, mais plus particulièrement pour celles exsudées par des arbres appartenant aux genres Dipterocarpaceae et Burseraceae (Gianno, 1990).

Aujourd'hui la résine dammar est principalement attribuée aux arbres appartenant à la famille Dipterocarpaceae dont *Shorea* et *Hopea* qui exsudent la dammar de très bonne qualité. D'après Appanah *et al* (1998), le tableau 9 présente le classement phylogénétique de la famille Dipterocarpaceae.

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta (Angiospermes)
Classe	Magnoliopsida (Dicotylédones)
Sous-classe	Dilleniidae
Ordre	Theales (classification classique) Malvales (classification phylogénétique)
Famille	Dipterocarpaceae
Sous-familles	Dipterocarpaceae Monotoideae Pakaraimoideae
Genres	<i>Anisoptera</i> , <i>Cotylelobium</i> , <i>Dipterocarpus</i> , <i>Dryobalanops</i> , <i>Hopea</i> , <i>Marquesia</i> , <i>Monotes</i> , <i>Neobalanocarpus</i> , <i>Pakaraimaea</i> , <i>Parashorea</i> , <i>Pseudomonotes</i> , <i>Shorea</i> , <i>Stemonoporus</i> , <i>Upuna</i> , <i>Vateria</i> , <i>Vatica</i> , <i>Vateriopsis</i>
Espèces	plus de 500

Tableau 9- Classement phylogénétique de la famille des Dipterocarpaceae (Appanah *et al*, 1998).

Le tableau suivant (tableau 10) regroupe toutes les résines appelées dammar, avec leur nom commun et le nom des espèces auxquelles elles appartiennent réellement. Certaines parmi elles sont soulignées, car elles ne sont pas attribuées à la famille de Dipterocarpaceae.

Nom commun	Nom de l'espèce
Dammar Empenot	<i>Shorea albida</i> Sym.
Dammar Gaging	<i>Shorea leprosula</i> Miq.
Dammar Hiroe	<i>Vatica papuana</i> Dyer.
<u>Dammar Itam</u>	<u><i>Canarium legitinum</i> Miq.</u>
Dammar Kedemut	<i>Hopea fagifolia</i> Miq.
Dammar Klooppoop	<i>Shorea eximea</i> Scheffer.
Dammar Penak	<i>Balanocarpus heimii</i> King.
<u>Dammar Pine, blanc (white)</u>	<u><i>Agathis alba</i> Foxw.</u>
<u>Dammar Putih</u>	<u><i>Agatis labillardieri</i> Warb.</u>
Dammar Rasak	<i>Vatica rassack</i> Blume.
<u>Dammar Sengai</u>	<u><i>Canarium hirsutum</i> Willd.</u>
Dammar Tenang	<i>Shorea soordersii</i> Brandis.
Dammar blanc (white)	<i>Vateria indica</i> L.

Tableau 10- Résines ayant l'appellation dammar dans le commerce et les noms d'espèces auxquelles elles appartiennent réellement (Lampert, 2003).

## 5.2. Les différents produits des Dipterocarpaceae

Mise à part la résine dammar, les arbres de la famille des Dipterocarpaceae produisent de nombreux autres matériaux, dont certains sont employés localement et d'autres destinés à l'exportation. La majorité des informations concernant l'utilisation de ces produits vient de deux régions, le Sud de l'Asie et le Sud-est de l'Asie (Indonésie, Malaisie et Philippines). Ces produits peuvent être classés en trois groupes: oléorésine, camphre et beurre de noix de Dipterocarpaceae. Les feuilles et l'écorce sont aussi utilisées pour obtenir certains produits, comme le tanin. Certains Dipterocarpaceae, comme *Shorea Roxburghii* et *Shorea talura*, sont des hôtes pour les insectes producteurs de laque. Les méthodes d'exsudation provoquées par l'homme sont communes pour les deux régions mais les rendements varient d'une espèce à l'autre (Shiva et Jantan, 1998).

- **Oléorésine**

Il existe deux sortes de résines exsudées par les arbres de la famille Dipterocarpaceae. Le genre *Dipterocarpus* est la source principale d'oléorésine. Les autres genres producteurs d'oléorésine sont *Shorea*, *Vatica*, *Dryobalanops* et *Parashorea*. L'oléorésine porte les différents noms locaux, comme «l'huile gurjan» (Inde), «l'huile kanyin» (Burma) et «minyak keruing» (Malaisie d'ouest) (Shiva et Jantan, 1998). L'oléorésine de meilleure qualité est obtenue à partir de l'espèce *Dipterocarpus turbinatus*.

L'oléorésine est un fluide visqueux et très efflorescent. Il est transparent, de couleur rougeâtre marron-foncé s'il est observé à la lumière. L'huile essentielle est constituée de deux sesquiterpènes, l' $\alpha$ - et la  $\beta$ - gurjunène (figure 10):

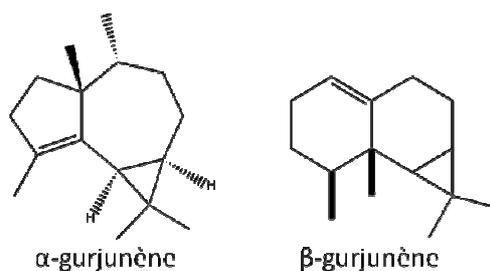


Figure 10 - Structures des  $\alpha$ - et  $\beta$ -gurjunène

L'huile gurjan contient un acide cristallin, l'acide gurjunique ( $C_{22}H_{34}O_4$ ), dénué d'acidité.

L'huile gurjan possède une remarquable propriété physique. En effet, en la chauffant à 130 °C, elle devient gélatineuse mais en refroidissant elle ne retrouve pas sa fluidité initiale (Shiva et Jantan, 1998).

L'utilisation de l'huile gurjan en médecine est ancienne, prouvée par des documents écrits, comme Pharmacopée d'Inde de 1868 où cette substance est officiellement décrite comme diurétique et comme stimulant des surfaces muqueuses, en particulier celle du système génito-urinaire (Watt 1899) et ses vertus sont toujours appréciées aujourd'hui (Kirtikar et Basu, 1935 ; Martindale, 1958). Si l'huile gurjan est appliquée extérieurement, elle réagit contre les infections, sur différentes sortes d'ulcères, contre la teigne et autres infections cutanées (Shiva et Jantan, 1998).

Elle est aussi utilisée pour la fabrication de vernis anticorrosifs dans les constructions en fer et d'encre lithographiques. Mélangée avec la dammar en poudre (*Shorea robusta* ou *Shorea siamensis*), elle forme une pâte brune foncée, employée pour calfater les bateaux et pour imperméabiliser les paniers de bambou destinés à la collecte de l'eau (Shiva et Jantan, 1998).

L'huile gurjan est un bon solvant pour le caoutchouc, car il s'applique sur les vêtements pour les rendre imperméables. Ce genre de vêtements est résistant aux piqûres d'insectes (Shiva et Jantan, 1998).

- **Camphre**

Le camphre, ou «bhimsaini-kapur» ou «barus kapur» comme il est appelé localement à Bornéo et à Sumatra, est une substance dont le commerce est connu depuis les temps anciens, notamment en Chine. Autrefois, le camphre était surtout produit par l'espèce *Dryobalanops aromatica* («kapur»), mais aussi par *Dryobalanops beccarii* avec un rendement moins important. Le camphre de Bornéo est utilisé en médecine, dans la fabrication de parfums et pour différentes synthèses organiques (Shiva et Jantan, 1998).

Aujourd'hui, *Dryobalanops aromatica* a perdu sa place dans la production de camphre, car le *Cinnamomum camphora* l'a remplacé dans l'industrie chimique et aussi parce que le camphre se synthétise facilement à partir de pinène (Shiva et Jantan, 1998).

- **Beurre de noix de Dipterocarpaceae**

Les espèces *Shorea* de type Pinanga (*S. macrophylla*, *S. stenoptera*, *S. mecistopteryx*, *S. aptera*) qui existent à Sarawak et à Kalimantan, sont productrices des noix d'illipé, appelées respectivement aussi «engkabang» et «tengkawang» en Malaisie et en Indonésie (Tantra, 1979).

Le peuple originaire de Bornéo utilise ces noix depuis des générations et en extrait l'huile de noix pour cuisiner (Anderson, 1975). Les noyaux sont exportés vers l'Europe, le Japon et l'est de la Malaisie. Le beurre d'illipé extrait des noyaux est utilisé dans l'industrie de la confiserie, plus particulièrement pour la production de chocolat mais aussi dans la cosmétologie (Anon. 1985b).

### 5.3. Production et utilisations

C'est une résine dure et solide, mais facile à casser, après son durcissement car la petite quantité d'huiles essentielles s'évapore assez vite (Shiva et Jantan, 1998).

Parmi toutes les espèces de la famille Dipterocarpaceae produisant la dammar, seules quelques sources ont une importance commerciale. Dans le tableau suivant (tableau 11) sont citées les espèces ayant une place importante dans la production et la commercialisation de la dammar.

Dipterocarpaceae spp.	Nom de la résine	Pays d'origine
<i>Neobalanocarpus</i> , <i>Hopea</i> et <i>Shorea</i>	dammar	Asie de Sud-est (Shiva et Jantan, 1998)
<i>Hopea micrantha</i>	«damar mata Kuching»	Malaisie, (Blair et Byron, 1926)
<i>Neobalanocarpus heimii</i>	«damar penak»	Malaisie, (Blair et Byron, 1926)
<i>Shorea crassifolia</i>	«damar temak»	Malaisie, (Blair et Byron, 1926)
<i>Shorea robusta</i>	sal dammar	Inde (Shiva et Jantan, 1998)
<i>Vateria indica</i>	dammar blanc	Inde Shiva et Jantan, 1998)
<i>Hopea odorata</i>	«dammar roche»	Bangladesh, Burma et Inde Shiva et Jantan, 1998)
<i>Shorea wiesneri</i>	variété commerciale extraordinaire, dammar batavienne	Java et Sumatra (Burkill, 1935)

Tableau 11 - Liste des espèces principales produisant de la résine dammar (Shiva et Jantan, 1998)

Les dammars sont aussi produites par différentes espèces de la famille Dipterocarpaceae à Bornéo, Java, Sumatra, en Thaïlande et au Vietnam.

La majorité de la dammar exportée provient d'Indonésie. Les espèces comme *Shorea javanica*, *S. lamellata*, *S. virescens*, *S. retinodes*, *S. assamica* ssp. *globifera*, *Hopea dryobalanoides*, *H. celebica*, *H. beccariana* et *Vatica rassak* produisent de la résine de très bonne qualité (Jafarsidik, 1987). La résine est exportée vers le Japon, Taiwan, Singapour, l'Allemagne et la Malaisie.

### 5.3.1. Production et utilisation locale

La résine dammar est exsudée naturellement par les arbres. Elle est facilement retrouvée sur le sol, sous les arbres en morceaux grossiers, à côté des troncs et même cachée sous la terre. Cette dammar est souvent collectée par les aborigènes. L'exsudation naturelle est aussi rencontrée chez les arbres malades ou endommagés.

A Sumatra, la dammar est produite en jardins, qui font partie du système agroforestier. Après le déclin des zones forestières, les agriculteurs ont développé les plantations d'arbres résineux. A Lampung, à Sumatra, les jardins de Diptérocarpacées, créés par l'homme, existent depuis le 19<sup>ème</sup> siècle (Rappard, 1937). *Shorea javanica* est une espèce originaire de Sumatra et elle pousse en système agro forestier avec d'autres espèces similaires, comme *Hopea dryobalanoides* (Torquebiau, 1984). Les habitants des villages gemment les arbres en creusant des trous d'environ 10 cm de largeur et 15 cm de profondeur, favorisant ainsi l'écoulement de la résine. La résine est périodiquement collectée et les trous s'intensifient avec le temps. Lorsqu'il atteint le centre du tronc, c'est le moment de faire de nouveaux orifices. En général, le gemmage commence quand l'arbre a environ 20 ans et continue jusqu'à ses 30 ans environ, car au-delà la production de la résine s'amointrit. Un arbre producteur de résine peut produire environ 50 kg de résine par an et un jardin de dammar peut livrer environ 4.8 tonnes de résine chaque année (Torquebiau, 1984). La dammar apparaît comme des morceaux rudes et fragiles, de grosseur allant de 16 et 24 cm. La couleur de ces morceaux est en général jaune pâle, presque opaque avec une odeur résineuse légèrement balsamique. La production commerciale de cette variété de la dammar est possible par le gemmage des arbres (Shiva et Jantan, 1998).

Les domaines d'utilisation de cette résine sont variés. Traditionnellement, la dammar est utilisée dans la fabrication des bougies, pour l'isolation des bateaux et dans l'artisanat.

La dammar est largement utilisée comme encens lors de cérémonies religieuses mais aussi comme fumigène désinfectant. De grandes quantités de dammar sont utilisées comme ingrédient dans le «Samagri», mélange employé lors d'incinérations. La dammar est également employée pour le durcissement de cires molles pour la production de cirages de chaussures et pour la fabrication de papier carbone. Elle a aussi été utilisée comme matériel à enduit des murs et des toits, comme ciment pour contre-plaqués,

amiantes, planches, etc. En Inde la population tribale utilise le mélange de dammar avec de la cire d'abeille et de l'ocre rouge afin de fixer les lances et les têtes de flèches (Shiva et Jantan, 1998).

Dans la médecine indigène, la dammar sert d'agent astringent et détergent dans le cas de maladies comme la diarrhée et la dysenterie. C'est aussi un ingrédient des pommades contre différentes maladies de la peau. La dammar a des propriétés thérapeutiques contre les maux d'oreilles et de dents, les irritations des yeux, contre les ulcères et différentes blessures (Anon. 1985a). Les triterpènes isolés de la dammar montrent l'activité antivirale *in vitro* contre le virus de *Herpes simplex*, de type I et II (Poehland *et al*, 1987).

Plus récemment, les dammars ont été employées dans plusieurs préparations techniques, telles que la fabrication de vernis, de cires d'imperméabilisation, d'encre d'imprimerie, de peinture, de linoléum et dans la cosmétologie.

### 5.3.2. Utilisation comme vernis artistique

Différentes résines naturelles ont été utilisées à travers l'Histoire dans le domaine de l'Art et plus précisément, pour la fabrication de vernis. Le vernis constitue une protection pour le tableau, contre la lumière, la poussière et les dommages mécaniques mais aussi il offre une brillance aux couleurs et il améliore en général les qualités optiques (van der Doelen, 1999; de la Rie, 2003).

L'utilisation de résines dans la fabrication de vernis remonte au 9<sup>ème</sup> siècle, et les premières recettes ont été décrites par Teophilus (11<sup>ème</sup> siècle) et par Cennini (15<sup>ème</sup> siècle), où la procédure de préparation de vernis se faisait à chaud avec des huiles siccatives, comme l'huile de lin ou de noix (vernis à l'huile). Les vernis à base de solvants volatils, comme la térébenthine, ne sont présents qu'à partir du 16<sup>ème</sup> siècle, car ils séchaient rapidement. D'autres résines ont servi à la préparation des vernis comme le copal de Manille (famille Araucariaceae), l'élémi (famille Burseraceae), la sandaraque (famille Cupressaceae), la colophane (résidu solide obtenu après distillation de résine de pin) et la mastic (famille Anacardiaceae) (Lampert, 2003; Echard *et al*, 2007).

Les sources écrites décrivant l'utilisation de la dammar comme vernis ne sont pas nombreuses. Une des raisons est peut être la confusion liée au nom de la résine. Il est connu que la dammar n'est introduite en Europe qu'au 19<sup>ème</sup> siècle. La première date de

son utilisation en tant que vernis est fixée à l'année 1827 et apparemment il a été apprécié chez les peintres allemands (Mayer et Myers, 2002). Les nouvelles informations concernant l'utilisation de la dammar proviennent de textes non-publiés d'artistes américains (Mayer et Myers, 2002). A cette époque, la Grande-Bretagne et les Etats Unis ont fortement échangé des informations et des techniques nouvelles concernant le matériel artistique. En sachant que la mastic a été recommandée pour la fabrication des vernis en Grande-Bretagne, la dammar est restée obsolète durant le 19<sup>ème</sup> siècle. Mais deux sources d'après-1845 parlent de la dammar. La première source est Thomas Sully (1778-1860) dans son œuvre «Hints to Young Painters», écrite en 1851, révisée en 1871 et publiée en 1873. Sully décrit la procédure de préparation de vernis à base de mélange de «gomme de mar», térébenthine et magnésium calciné. En Allemagne ce vernis est presque universellement utilisé, mais aussi très utilisé aux Etats Unis. Ce vernis préserve l'éclat et la transparence, il ne moisit pas, il est facilement retiré de la peinture et il peut être appliqué sur la peinture fraîche sans risque (Mayer et Myers, 2002). La deuxième source qui parle de l'utilisation de la dammar au 19<sup>ème</sup> siècle aux Etats Unis, est l'œuvre de Rembrandt Peale «Notes of the Painting Room», jamais publié. D'après Mayer et Myers (2002), son œuvre n'a pas été complétée avant 1852. Peale épèle le nom «damar» et pas «de mar» comme Sully. Il parle aussi des qualités de ce vernis, sa clarté et son éclat et même de sa supériorité par rapport au vernis à base de mastic (Mayer et Myers, 2002).

Les vernis à base de dammar ont une faible tendance à jaunir et à se craqueler au cours de temps. Aujourd'hui, la dammar présente toujours un matériau employé pour la fabrication de vernis artistiques (van der Doelen, 1999; Lampert, 2003).

### **5.4. Composition chimique de la dammar**

La partie résineuse de la dammar a été profondément étudiée mais cette résine possède une composition chimie fondamentalement complexe qui augmente dans le cas de dammar vieillie. Il est considéré que l'image de la dammar au niveau composition chimique est toujours incomplète (Vahur *et al*, 2012). La présence de nombreux isomères rend l'identification des composés plus difficile. Il faut noter que les triterpènes présents dans la dammar ont été trouvés dans des résines exsudées par d'autres familles botaniques, comme la mastic (Lavie *et al*, 1984; Fattorusso *et al*, 1985; Bianchini *et al*, 1988).

Les squelettes triterpéniques principalement rencontrés dans la dammar sont: le dammarane, l'ursane, l'oléanane, le hopane et l'euphane/tirucallane. Chez la dammar certaines molécules possèdent la structure d'un triterpène bicyclique ou d'un triterpène tricyclique.

Dans la littérature il existe différentes observations sur la présence d'isomères dans la dammar, comme le dammarenediol-II et l'hydroxydammarénone-I (Poehland *et al*, 1987), mais aussi les dammarenediol I et II et hydroxydammarénone I et II (Mills *et al*, 1956).

Plusieurs composés acides présents dans la dammar sont caractérisés dans la littérature. L'acide principal qui est présent en quantité importante dans la résine fraîche de dammar est l'acide dammarénoïque. Les deux autres acides présents en quantités importantes sont l'acide oléanonique et l'acide ursonique. Ils sont présents dans d'autres résines, comme la mastic.

### Les dammaranes

Les dammaranes sont caractérisés par leur structure triterpénique tétracyclique. Sept composés présents dans la dammar ont la structure dammarénoïque (cf. Annexe 5) et ils sont cités dans le tableau suivant:

Source botanique	Molécules identifiées
<i>Shorea</i> Roxb	acide dammarénoïque (Mills et Werner, 1955; Bisset <i>et al</i> , 1971; Poehland <i>et al</i> , 1987; de la Rie, 1988); acide shoréïque (Bisset <i>et al</i> , 1971; Poehland <i>et al</i> , 1987) – spécificité de genre <i>Shorea</i> acide eichlérianique (Poehland <i>et al</i> , 1987); dammaradiénole (Mills et Werner, 1955; Mills, 1956; Poehland <i>et al</i> , 1987; de la Rie, 1988);
Dammar (source botanique pas précisée)	dammaradiénone (Mills et Werner, 1955; Mills, 1956; de la Rie, 1988); hydroxydammarénone (Mills et Werner, 1955; Poehland <i>et al</i> , 1987; de la Rie, 1988); dammarénediolo (Mills et Werner, 1955; Mills, 1956; Poehland <i>et al</i> , 1987; de la Rie, 1988)

Tableau 12 - Les molécules ayant le squelette dammarane identifiées dans la dammar

L'acide dammarénolique est considéré comme le marqueur chimique analytique pour l'identification de la résine dammar, ensemble avec l'hydroxydammarénone I et II. Ce ne sont pas des biomarqueurs au sens propre, car ces composés sont retrouvés dans d'autres espèces botaniques, par exemple l'acide dammarénolique est isolé à partir de *Aglaia* spp. (famille Meliaceae) (Esimone et al. 2010) et l'hydroxydammarénone II a été isolée à partir de *Gardenia aubryi* (famille des Rubiacées) (Grougnet et al, 2011). Néanmoins, ces composés sont surtout caractéristiques de la famille de Dipterocarpaceae et s'ils sont retrouvés dans des échantillons résineux artistiques ou archéologiques, ils représentent un moyen précis pour l'identification de dammar.

### Ursanes et oléananes

Les molécules triterpéniques présentes dans la dammar et possédant ces structures similaires, sont en majorité des acides, oléanonique, oléanolique, ursonique et ursolique, avec leurs aldéhydes correspondants. En tout, dix molécules ayant la structure d'ursane ou d'oléanane peuvent être retrouvées dans la résine dammar et elles sont citées dans le tableau 13. Leurs structures correspondantes sont données dans l'Annexe 5 de ce manuscrit.

Source botanique	Molécules identifiées
Dammar (source botanique pas précisée)	acide oléanolique (de la Rie, 1988); acide oléanonique (de la Rie, 1988); aldéhyde oléanonique (de la Rie, 1988); acide ursolique (de la Rie, 1988); acide ursonique (Mills et Werner, 1955; Poehland et al, 1987; de la Rie, 1988); aldéhyde ursonique (de la Rie, 1988); acide asiatique (2 $\alpha$ , 3 $\beta$ , 23-trihydroxy-ursa-12-ène-28-oïque) (Mladenovic et Barkovic, 1940; Brewis et Halsall, 1961; Boiteau et Chanez, 1964) ; acide 23-hydroxy-2,3-sécours-12-ène-2, 3,28-trioïque (2 $\rightarrow$ 23)-lactone (Brewis et al, 1970; Harrison et al, 1971) lactone hydroxyoléanonique (Poehland et al, 1987); nor-amyrone (nor-oléanane/ursane) (de la Rie, 1988)

Tableau 13 - Les molécules ayant le squelette ursane ou oléanane identifiées dans la dammar

Il faut noter que pour le nor-oléanane/ursane (l'autre nom de cette molécule est nor-amyrone), la structure n'est pas déterminée avec certitude, à savoir si c'est un oléanane ou un ursane (Mills et Werner, 1955; Poehland *et al*, 1987; de la Rie, 1988).

L'acide asiatique, appelé d'abord l'acide dammarolique, a été caractérisé par Mladenovic et Barkovic (1940) qui l'ont isolé pour la première fois à partir de la résine dammar (Brewis et Halsall, 1961). Sa structure a été établie par Brewis et Halsall (1961) comme l'acide 2 $\alpha$ , 3 $\beta$ , 23-trihydroxy-ursa-12-ène-28-oïque (Boiteau et Chanez, 1964). L'acide 23-hydroxy-2,3-sécours-12-ène-2, 3,28-trioïque (2 $\rightarrow$ 23)-lactone est probablement un produit formé biogénétiquement par l'oxydation d'acide asiatique (Brewis *et al*, 1970; Harrison *et al*, 1971).

### Les hopanes

Les deux composés triterpéniques présents dans la résine dammar appartiennent aux hopanes. Ces composés sont cités dans le tableau 14 et leurs structures sont présentées dans l'Annexe 5 de ce manuscrit :

Source botanique	Molécules identifiées
Dammar (source botanique pas précisée)	hydroxyhopanone (Mills et Werner, 1955; Poehland <i>et al</i> , 1987; de la Rie, 1988); 3-acétoxy-22-hydroxyhopanone (Cerny <i>et al</i> , 1963)

Tableau 14 - Les molécules ayant le squelette hopane identifiées dans la dammar

## 6. La mastic

Au début de ce manuscrit, en présentant les résines naturelles, il a été mentionné qu'il s'agit d'un monde riche et très complexe de produits végétaux naturels. Les confusions et malentendus ont été présents depuis les temps anciens car ces produits sont en utilisation courante depuis des siècles. Différentes civilisations les ont utilisés pour des objectifs multiples. Si on ajoute la richesse du monde végétal et le fait que des plantes et des arbres peuvent s'adapter à diverses conditions climatiques et à différentes qualités de sols, notre recherche demande beaucoup plus de précisions. L'identification de ces résines est encore plus difficile quand on prend en considération que, par exemple, au 19<sup>ème</sup> siècle la communication était loin d'être facile et accessible comme aujourd'hui, les informations voyageaient plus lentement et les imprécisions sur les noms de certains produits sont tout à fait compréhensibles. Après, il ne faut pas oublier que chaque ancien peuple n'a pas laissé de traces précises écrites sur son utilisation des produits résineux et que certains noms viennent de langues locales, ce que rend nécessaire d'aborder la précision botanique pour chaque résine étudiée durant ce travail.

### 6.1. Origine botanique de la mastic

La résine mastic est exsudée par les arbres appartenant à la famille des plantes dicotylédones d'Anacardiaceae, qui compte selon Watson et Dallwitz, 70 genres répartis en 600 espèces. Les informations botaniques sur la famille des Anacardiaceae sont présentées dans le tableau 15.

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta (Angiospermes)
Classe	Magnoliopsida (Dicotylédones vraies)
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Sapindales
Famille	Anacardiaceae
Genres	70 ; parmi lesquels Pistacia, Anacardium, Magnifera, Rhus,...
Espèces	600

Tableau 15- Informations botaniques sur la famille des Anacardiaceae

Le nom du genre *Pistacia* vient de la langue perse, *pistah* signifiant l'arbre aux pistaches (*Pistacia vera*) (Langenheim, 2003).

Le genre *Pistacia* compte entre dix et vingt espèces dont les plus répandues sont:

- *P. atlantica* Desf.
- *P. chinensis* Bunge
- *P. lentiscus* L.
- *P. palaestina*
- *P. terebinthus* L. – produisant l'oléorésine la térébenthine
- *P. vera* L.

Ce sont des arbustes dioïques, ce qui signifie que les fleurs mâles et femelles poussent sur des arbustes différents. Ils poussent dans les régions de la côte méditerranéenne, au Portugal et en Espagne, Grèce, Syrie et Israël, mais aussi en Afrique de Nord, au Maroc et en Tunisie (Langenheim, 2003), jusqu'en Amérique et en Inde.

Toutes les espèces de *Pistacia* produisent de la résine, mais uniquement *Pistacia lentiscus* L. est utilisée pour commercialisation de la résine mastic, plus précisément la variété *Chia* de l'île Chios en Grèce. C'est la raison pour laquelle cette espèce est appelée aussi l'arbre à

mastic. Le nom *lentiscus* se réfère aux tissus en forme de lentilles où la résine est sécrétée (Langenheim, 2003).

L'industrie de la production de mastic est située dans le Sud-est de Chios, l'île cultivant cette espèce depuis l'Antiquité. Il est possible de trouver *Pistacia lentiscus* var. *Chia* sur les îles voisines, comme Chypre et la Sicile, mais un commerce régulier n'a jamais été établi. Une des raisons est peut être que le rendement et la qualité de la résine ne convenaient pas pour être considérée comme «vraie mastic», la mastic de la meilleure qualité. Il faut noter que seulement les arbustes mâles sont cultivés pour la production de la résine, car les arbustes femelles ne produisent pas la résine de qualité demandée (Davidson, 1948).

Les autres espèces du genre *Pistacia* produisent aussi de la résine, mais ce n'est pas la mastic. *P. aethiopica* Kokwaro est une espèce poussant en Ethiopie et elle est considérée comme une variété de *P. lentiscus* (*P. lentiscus* var. *emarginata* Engl.) mais elle pourrait être également considérée comme une variété de *P. atlantica* Desf. selon Parfitt et Badenes (1997)(de Vartavan, 2007). *Pistacia atlantica* Desf. produit de la résine qui a été parfois considérée comme de la térébenthine, commercialisée sous les noms différents, comme Chios, Chio, térébenthine Chian, ou baume de Chypre (Mills et White, 1987 ; Papageorgiou et al, 1997). D'après certains auteurs, cette fausse appellation est le résultat de malentendus dans les sources de la littérature botanique, autrement dit le nom mastic a été employé pour désigner les matériaux dont la source botanique n'a pas été précisée (Barton et Seoane, 1956 ; Papageorgiou et al, 1997 ; de Vartavan, 2007). L'espèce *Pistacia atlantica* Desf. pousse en Afrique du Nord et la résine exsudée par ces arbres n'est pas la térébenthine, mais une résine jaunâtre et similaire à la mastic. La vraie source de la térébenthine est *Pistacia terebinthus* L. (de Vartavan, 2007) qui s'appelle aussi l'arbre à térébenthine. La résine nommée mastic de Bombay d'Inde provient des espèces *Pistacia khinjuk* Stocks et *Pistacia cabulica* Stock (Koller et al, 1997). *P. chinensis*, qui est répandue d'Afghanistan, en Chine et aux Philippines, est localement utilisée pour la production de vernis, comme *P. mexicana*, qui pousse au Mexique (Langenheim, 2003). *P. eurycarpa* Yalt. se trouve au nord de la Syrie, Sud-Est de Turquie, en Iran et possiblement en Arménie (de Vartavan, 2007). *P. falcata* Becc ex. Martelli (Loret, 1949) est une espèce qui pousse en Ethiopie, Erythrée, Somalie et en Arabie Saoudite. *P. saportae* Burnat est considérée comme un hybride entre *P. lentiscus* et *P. terebinthus* (Werner et al, 2001) qu'on trouve sur le territoire d'Israël (de Vartavan, 2007).

## 6.2. Récolte de la mastic

Dans l'arbre, la résine est placée d'abord dans les tissus sécrétoires d'écorces, des tiges et des branches, mais elle peut être retrouvée dans l'arbre même, dans les rayons vasculaires, conséquence du traumatisme de l'arbre (Grundwag et Werker, 1976). Les arbres à mastic sont des arbustes à feuilles persistantes, de hauteur de 2 à 3 mètres. Ils ont une durée de vie d'environ 100 ans et ils commencent à produire de la résine à partir de leur cinquième année (L'ambassade grecque; Union des Producteurs de Mastic). La production maximale de la résine est rencontrée chez les arbustes en pleine maturité, vers 50 ou 60 ans. La collecte de mastic à Chios est contrôlée et limitée par la loi à une période de trois mois, de 15 juillet au 15 octobre, pour éviter l'acquisition de mastic d'hiver, qui est appelée localement *kokkolyi*, de qualité inférieure (Davidson, 1948).

Avant de commencer l'exsudation, le sol autour des arbres est préalablement préparé et nettoyé, les pierres et l'herbe doivent être remplacés et la poudre de calcaire est utilisée pour niveler le sol (Dietemann *et al*, 2003). La sécrétion de la résine est facilitée à l'aide d'entailles qui sont faites avec des outils pointus, sur le tronc et les branches. Ce processus est appelé **broderie** (L'ambassade grecque; Union des Producteurs de Mastic). La résine, au départ parfaitement liquide, coule en formant les larmes (L'ambassade grecque; Union des Producteurs de Mastic). La résine sèche à l'aire libre pendant 10 à 20 jours, ceci dépend du temps et de la température, puis nettoyée à la main, lavée avec de l'eau et parfois avec du «savon vert» qui est un produit naturel (Dietemann *et al*, 2003). Certains auteurs se méfient du lavage avec le «savon vert», par rapport à la qualité de la résine, car elle devient opaque et jaunâtre (Koller *et al*, 1997). Parallèlement à ces exsudations provoquées, il existe également des exsudations spontanées (Langenheim, 2003).

L'Union des producteurs de mastic de Chios a introduit récemment une nouvelle technique de récolte (Assimopoulou et Papageorgiou, 2004). Il s'agit de collecter la résine à l'état liquide. Un agent stimulant est ajouté après avoir fait la perforation sur l'arbre. Par cette technique, la résine reste liquide et préserve une odeur caractéristique. L'agent stimulant (ethrel) est là pour aider l'exsudation de la résine en quantité plus importante (Assimopoulou et Papageorgiou, 2004). Le principe actif d'ethrel est l'acide 2-chloroéthylphosphonique (CEPA), générateur de l'éthylène et il a été utilisé déjà pour étudier le mécanisme de coagulation du latex (Hanower *et al*, 1976). Comparée à la

méthode traditionnelle de récolte, la résine obtenue n'a pas tout à fait la même composition chimique et les quantités de l'acide masticadiénonique et de 28-noroléane-17-ène-3-one ont augmenté (Assimopoulou et Papageorgiou, 2004).

### 6.3. Historique

Il s'agit d'une résine connue depuis des siècles, surtout dans le bassin méditerranéen. La mastic a été utilisée au Moyen Orient, durant les périodes de l'Age de pierre et de bronze (Mabberley, 1997). Dans le Bible, la plante est appelée l'arbre à mastic (Apocrypha, Sus. 1.54). Son nom «mastic» provient de l'utilisation de cette résine comme un masticatoire (Langenheim, 2003) et cette résine est considérée comme le premier chewing-gum connu.

Les plus anciens documents écrits viennent de Théophraste 400 ans avant J-C (Langenheim, 2003). Les médecins helléniques, comme Hippocrate, Galien et Dioscouridis ont découvert les propriétés thérapeutiques de cette résine et ils l'ont employée pour traiter plusieurs maladies, surtout les infections avec la bactérie *H. pylori* et contre les maux de dents. Les historiens d'époque, Hérodote, Diodoros Sicéliotes et Pline ont laissé de nombreux textes sur l'utilisation et l'importance de la mastic, à Carthage, en Ancienne Egypte et en Arabie (L'ambassade grecque, Union des Producteurs de Mastic).

Sous les Romains, la mastic continue de séduire le peuple mais aussi les empereurs, comme Iliogavalos 1<sup>er</sup>, qui mélangeait l'essence de la mastic avec du vin en faisant «le vin de mastic», *masticatum*. Les femmes de Rome et de Constantinople ont eu l'habitude d'utiliser le bois de *Pistacia lentiscus*, pour mâcher et se faire des cure-dents et pour le blanchissement des dents. Cette coutume était répandue jusqu'au Moyen Age en France, Pays Bas, Angleterre et Espagne (L'ambassade grecque, Union des Producteurs de Mastic).

Durant l'époque byzantine, la mastic, comme les autres résines de cette période, fut très appréciée et chère, elle était uniquement accessible aux gens riches et influents (L'ambassade grecque, Union des Producteurs de Mastic).

Les villages grecs cultivant la mastic devinrent célèbres et connus pendant la période de domination Ottomane. Ils fournissent la mastic de meilleure qualité directement pour le sultan, mais aussi pour ses femmes dans les harems à Constantinople.

Les domaines d'utilisation de la mastic sont nombreux, comme en médecine, pharmacie, cosmétologie et en cuisine, ainsi qu'en art et dans l'industrie. Cette résine est restée très importante et régulièrement employée jusqu'à nos jours.

### **6.4. Le commerce de la mastic**

La mastic fut connue au travers des voyageurs et visiteurs de l'île, qui ont commencé à venir à partir du 10<sup>ème</sup> siècle après J-C. L'île de Chios est située en mer Egée, proche de la Turquie. Elle se trouve au milieu des routes maritimes entre l'Asie et l'Europe et l'Egypte et le Pont-Euxin (nom de la mer Noire dans l'Antiquité grecque-déf. Dictionnaire Le Robert, 2011) et sa position privilégiée a joué un rôle important pour le développement économique de l'île. L'île, à travers l'histoire, a été très intéressante pour de nombreux conquérants de l'Antiquité, surtout à cause de son large port (L'ambassade grecque, Union des Producteurs de Mastic).

Le vrai développement commercial de la mastic fut au 14<sup>ème</sup> siècle, grâce aux Génois, qui ont formé Maona, une société commerciale, pendant qu'ils gouverneraient sur l'île. C'était une sorte d'entreprise d'actionnaires, qui avait le monopole mais aussi qui a organisé pour la première fois le commerce de mastic. Le personnel employé à Maona a été formé pour ce travail et également pour le contrôle d'éventuel trafic de mastic. Maona a gardé un contrôle complet sur la production et le commerce de mastic (L'ambassade grecque, Union des Producteurs de Mastic).

L'île de Chios est devenue territoire sous contrôle des Ottomans au 16<sup>ème</sup> siècle. La mastic continue de fasciner, alors les Turcs l'exportent en Orient où elle fut consommée dans les harems. L'attrance des Turcs pour la mastic les conduit à identifier l'île à cette résine et à lui donner le nom «sakiz», ce qui signifie mastic en turc et ce nom est toujours utilisé de nos jours (L'ambassade grecque, Union des Producteurs de Mastic).

En 1912, Chios redevient libre et le commerce de la mastic n'est plus comme avant, peu de marchands l'exploitent et le prix baisse. L'apparition du docteur Georgios Stagkoulis (1901-1978), change la situation. Il a été le premier président de l'Union des producteurs

de mastic de Chios, nommé sur cette fonction en 1938. Il a consacré de nombreuses années à la protection des producteurs de mastic.

Aujourd'hui, l'Union des producteurs de mastic de Chios a l'exclusivité de l'exploitation de la mastic. C'est une organisation qui développe son commerce et protège le produit comme les producteurs (L'ambassade grecque, Union des Producteurs de Mastic).

### 6.5. Utilisations

Les domaines d'utilisation de la mastic sont nombreux. Comme cela a été déjà mentionné dans ce manuscrit; les peuples anciens ont découvert leurs diverses propriétés et ils l'ont employée largement. C'est la matière première pour la fabrication des boissons alcoolisées, comme l'apéritif «mastiha» et la liqueur de mastic. La mastic est employée comme épice à partir du Moyen Age et elle rentre toujours dans certaines recettes de desserts (L'ambassade grecque, Union des Producteurs de Mastic).

Les anciens égyptiens l'ont employée pour mélanger avec d'autres résines, comme l'oliban et la myrrhe, qui ont servi pour les processus de momification (Duke, 1985). C'est une des raisons pour laquelle la mastic est souvent retrouvée dans des échantillons archéologiques (de Vartavan, 2007).

La mastic a été utilisée en médecine dentaire, pour le durcissement des gommes, pour soulager les maux de dents et pour remplir les cavités. Elle est utilisée pour la production des fils chirurgicaux, avec la colophane, qui sont auto-résorbés par l'organisme (Jost *et al*, 1989). Grâce à son odeur agréable, cette résine est aussi employée en cosmétologie et parfumerie. En addition à son odeur, la mastic possède aussi des propriétés bénéfiques pour la peau (Lesesne, 1992). Les propriétés antimicrobiennes de la mastic ont fait partie de nombreuses études qui montrent que l'addition de la mastic aux cultures de certaines bactéries, comme *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* et *Pseudomonas spp.* empêche leur développement. Cette réaction d'inhibition s'est montrée plus performante sur les bactéries gram-positives que sur les bactéries gram-négatives (Shelef *et al*, 1980). Ces propriétés peuvent être utilisées aussi pour fabriquer les agents de conservation alimentaire à base des produits naturels (Langenheim, 2003). Il a été aussi rapporté que la

mastic possède des propriétés anticancérigènes (Hartwell, 1967 ; Duke, 1983), antioxydantes (Assimopoulou, 2005), elle possède une action pour tuer la bactérie *Helicobacter pylori* (Huwez *et al*, 1998 ; Bona *et al*, 2001) et elle a aussi des activités gastrique et duodénale antiulcéreuse (Al Said *et al*, 1986).

### 6.6. La mastic comme vernis artistique

Avec la dammar, la mastic est une résine très importante pour la fabrication des vernis artistiques. La mastic est introduite dans le monde de l'art bien avant la dammar. A partir du 9<sup>ème</sup> siècle, la mastic a servi pour préparer les vernis, d'abord avec de l'huile de lin en mélange avec la colophane et la sandaraque (Gettens et Stout, 1966). Les références faites par John Singleton Copley prouvent que la mastic a été mélangée avec l'huile de térébenthine au 18<sup>ème</sup> siècle (Copley, 1914). Dans son livre, Copley donne 1775 recettes pour fabriquer le vernis. Il écrit que dans les années 1770, le vernis à base de mastic a été le plus recommandé en Grande Bretagne. En même temps, à Paris, la mastic s'est vendue assez chère, presque cinq fois plus chère que la sandaraque (Watin, 1774), ce qui prouve que cette résine a été bien connue, appréciée et valorisée. Carlyle a étudié les recettes traditionnelles en Grande-Bretagne du 19<sup>ème</sup> siècle et il mentionne que la mastic a été très souvent utilisée pour la préparation des vernis (Carlyle, 1991). Les artistes du 19<sup>ème</sup> siècle, y compris les peintres des Balkans et des territoires sous les Austro-hongrois, ont aussi utilisé les vernis à base de ces deux résines.

La tendance à jaunir en vieillissant plus fortement que la dammar a fait que la mastic a peu à peu perdu sa popularité parmi les artistes et elle fut remplacée par les vernis à base de dammar (Feller *et al*, 1985). Les deux résines sont sensibles aux craquelures. De nouvelles études montrent que les vernis à base de mastic jaunissent fortement (Carlyle *et al*, 1998). Aujourd'hui, la dammar est toujours employée pour la fabrication de vernis; la mastic beaucoup moins (Wenders, 1998).

## 6.7. Composition chimique de la mastic

La partie triterpénique de la mastic a été déjà profondément étudiée et une grande majorité des composés triterpéniques sont identifiés (Barton *et al*, 1956; Seoane, 1956; Boar *et al*, 1984; Marner *et al*, 1991; Papageorgiou *et al*, 1997; Koller *et al*, 1997).

Les triterpènes de la mastic, comme ceux de la dammar, ont des squelettes tétracycliques, de type tirucallane et dammarane et des squelettes pentacycliques comme ceux d'oléanane et lupane. Contrairement à dammar, la mastic ne contient pas de molécules à squelette ursane (Mills et White, 1987). Comme chez la dammar, la mastic contient les molécules triterpéniques bicycliques et tricycliques (Boar *et al*, 1984 ; Marner *et al*, 1991), mais aussi des composés très oxydés ont été découverts dans les deux résines fraîches (Zumbühl *et al*, 1998).

Généralement, dans les résines provenant des espèces *Pistacia*, il est observé que certaines structures sont rencontrées plus souvent, comme les oléananes insaturés (12-oléanène, 18-oléanène, 28-nor-17-oléanène), les tirucallanes insaturés (7-tirucallène, 24,25-dehydro-7-tirucallène, 8-tirucallène, 24,25-dehydro-8-tirucallène), les dammaranes et les lupanes, saturés et insaturés (lupène et 12-lupène) (Assimopoulou et Papageorgiou, 2005).

### Les dammaranes

Les molécules possédant cette structure sont en général communes aux résines dammar et mastic. Il s'agit de composés présents dans la fraction neutre de la résine (Tableau 16) et leurs structures sont donnés dans l'Annexe 5 de ce manuscrit.

Source botanique	Molécules identifiées
Mastic ( <i>P. lentiscus</i> )	dammaradiénone (Marner <i>et al</i> , 1991); hydroxydammarénone (Marner <i>et al</i> , 1991); 3-acétoxy-hydroxydammarénone (Marner <i>et al</i> , 1991)
<i>P. lentiscus</i> var. <i>Chia</i>	(20S)-3 $\beta$ -acétoxy-20-hydroxydammar-24-ène (Assimopoulou et Papageorgiou, 2005) 20,24-l'époxy-25-hydroxy-dammaren-3-one (Assimopoulou et Papageorgiou, 2005)

Tableau 16 - Les molécules ayant le squelette dammarane identifiées dans la mastic

Récemment, deux molécules de type dammarane ont été identifiées dans la résine mastic (*P. lentiscus* var. *Chia*), dérivé 3 $\beta$ -hydroxy-dammarane et dérivé 3 $\beta$ -hydroxy-epoxy-dammarane, qui ont la structure du dammarane oxydé avec un anneau de furane. Ils possèdent les substituents dont la nature n'est pas encore établie (Assimopoulou et Papageorgiou, 2005).

### Les oléananes

De nombreuses molécules identifiées dans la résine mastic possèdent un squelette oléanane, saturé et insaturé. Parmi elles, un certain nombre de molécules peut être caractérisé comme étant des dérivés: 12-oléanène, 18-oléanène et 28-nor-17-oléanène.

Jusqu'au nos jours, trente molécules ont été identifiées d'avoir une structure oléanène (cf. Annexe 5) et elles sont cités dans le tableau 17.

L'acide moronique est un composé présent dans la mastic fraîche mais il est aussi retrouvé dans des échantillons de mastic vieillie car c'est une molécule très stable (van der Doelen *et al*, 1998; Stern *et al*, 2003). Ce composé sert comme marqueur chimique pour l'identification de la résine mastic dans les échantillons archéologiques (Stern *et al*, 2003).

Deux molécules (28-noroléan-12-ène-3-ol et 3 $\beta$ -acétoxy-12-oléanène) sont des composés trouvés dans la résine mastic obtenue par nouvelle méthode de récolte (et justement, absentes dans les résines récoltées traditionnellement), avec un agent stimulant (cf. le paragraphe 6.2.) ((Assimopoulou et Papageorgiou, 2005).

Source botanique	Molécules identifiées
Mastic ( <i>P. lentiscus</i> )	<p> <math>\beta</math>-amyrine (3<math>\beta</math>-Oléan-12-ène-3-ol) (Marner <i>et al</i>, 1991);  <math>\beta</math>-amyrone (Oléan-12-ène-3-one) (Marner <i>et al</i>, 1991);  nor- <math>\beta</math>-amyrine (Marner <i>et al</i>, 1991);  nor- <math>\beta</math>-amyrone (Marner <i>et al</i>, 1991);  nor-oléan-17èn-3-one (Koller <i>et al</i>, 1997);  28-hydroxy- <math>\beta</math>-amyrone (Marner <i>et al</i>, 1991);  acide oléanolique (Papageorgiou <i>et al</i>, 1997);  acide oléanonique (Seoane, 1956; Papageorgiou <i>et al</i>, 1997);  aldéhyde oléanonique (Marner <i>et al</i>, 1991);  acide 18<math>\alpha</math>H-oléanonique (Papageorgiou <i>et al</i>, 1997);  germanicol (Marner <i>et al</i>, 1991);  acide moronique (Papageorgiou <i>et al</i>, 1997) </p>
<i>P. lentiscus</i> var. <i>Chia</i>	<p> 3-oxy-28-noroléan-12-ène;  acétate de 11-oxo-<math>\beta</math>-amyrine;  acide 3<math>\beta</math>-acétoxy-6<math>\beta</math>-hydroxy-oléan-18-ène-28-olique;  oléan-18-ène-3-one;  oléan-18-ène-3-ol;  acide 11-oxo-3<math>\beta</math>-hydroxy-28-noroléan-17-ène-6-oïque;  3<math>\beta</math>-hydroxy-6<math>\beta</math>-hydroxyméthyl-28-noroléan-17-ène;  3<math>\beta</math>-hydroxy-28-noroléan-17-ène-6-al;  28-noroléan-12,17-diène-3-one;  6-méthyl-28-noroléan-17-ène-3-one;  3-métoxy-28-noroléan-17-ène;  3<math>\beta</math>-acétoxy-28-noroléan-17-ène;  3-oxo-28-noroléan-17-ène-6-al;  3<math>\beta</math>-hydroxy-6-méthyl-28-noroléan-17-ène;  28-nor-17-oléanen-3-ol;  acide oléan-12,18-diène-3-olique  (Assimopoulou et Papageorgiou, 2005) </p>

Tableau 17 - Les molécules ayant le squelette oléanène identifiées dans la mastic

**Les tirucallanes**

Treize composés ayant un squelette tirucallane (cf. Annexe 5) ont été mis en évidence dans la résine mastic (Barton et Seoane, 1956; Seoane, 1956; Marner *et al*, 1991; Papageorgiou *et al*, 1997; Assimopoulou et Papageorgiou, 2005) et elles sont citées dans le tableau 18.

Source botanique	Molécules isolées
Mastic ( <i>P. lentiscus</i> )	acide masticadiénonique (7-tirucallène) (Barton et Seoane, 1956; Papageorgiou <i>et al</i> , 1997);
	acide isomasticadiénonique (8-tirucallène) (Seoane, 1956; Papageorgiou <i>et al</i> , 1997);
	acide masticadiénolique (Papageorgiou <i>et al</i> , 1997);
	acide 3-épi-isomasticadiénolique (Papageorgiou <i>et al</i> , 1997);
	acide 3-O-acétyle-2-épi-masticadiénolique (Papageorgiou <i>et al</i> , 1997);
	acide 3-O-acétyle-2-épi-isomasticadiénolique (Papageorgiou <i>et al</i> , 1997);
<i>P. lentiscus</i> var. <i>Chia</i>	tirucallol (Barton et Seoane, 1956; Marner <i>et al</i> , 1991)
	acide 3 $\beta$ -acétoxy-6 $\beta$ -hydroxy-dihydro-isomasticadiénolique (dans la résine récoltée de façon traditionnelle);
	aldéhyde isomasticadiénolique (dans la résine récoltée de façon traditionnelle);
	acide 11-oxo-masticadiénonique (dans la résine récoltée avec un agent stimulant);
	acide 3-acétoxy-3-épi-masticadiénolique (dans la résine récoltée avec un agent stimulant);
	acide 3-acétoxy-3-épi-isomasticadiénolique (dans la résine récoltée avec un agent stimulant);
	l'acide isomastica-8, 11(12)-dienolique (dans la résine récoltée avec un agent stimulant);
l'aldéhyde 3 $\beta$ -acétoxy-isomasticadiénolique (dans la résine récoltée avec un agent stimulant); (Assimopoulou et Papageorgiou, 2005)	

Tableau 18 – Les molécules ayant le squelette tirucallane identifiées dans la mastic

Les marqueurs chimiques pour l'identification de la résine fraîche possèdent cette structure de tirucallanes. Il s'agit des acides masticadiénonique et isomasticadiénonique et leurs dérivés (Assimopoulou et Papageorgiou, 2005). Avant dans la littérature ces molécules ont été caractérisées à tort avec la structure de lanostane (Papageorgiou *et al*, 1997; Regert et Rolando, 2002), qui ont aussi un squelette triterpénique tétracyclique, qui ressemble aux tirucallanes (Assimopoulou et Papageorgiou, 2005).

### Les lupanes

Parmi les molécules présentes dans la mastic ayant le squelette lupane, on rencontre quatre molécules identifiées jusqu'au nos jours. Elles sont citées dans le tableau 19 et leurs structures sont données dans l'Annexe 5 de ce manuscrit.

Source botanique	Molécules isolées
Mastic ( <i>P. lentiscus</i> )	lupéol (Marner <i>et al</i> , 1991); nor-lupéone (Marner <i>et al</i> , 1991); lupénone (Assimopoulou et Papageorgiou, 2005);
<i>P. lentiscus</i> var. <i>Chia</i>	acide 3 $\beta$ -acétoxy-20,30-déhydro-12-lupène-28-olique; (Assimopoulou et Papageorgiou, 2005)

Tableau 19 - Les molécules ayant le squelette lupane identifiées dans la mastic

### Triterpènes bi- et tricycliques

La mastic possède aussi des molécules avec la structure bicyclique et tricyclique (cf. Annexe 5) qui sont citées dans le tableau 20.

Source botanique	Molécules isolées
Mastic ( <i>P. lentiscus</i> )	(3L, 8R)-3,8-dihydroxypolypoda-13E, 17E, 21-triène; (8R)-3-oxo-8-hydroxypolypoda-13E, 17E, 21-triène; 3-hydroxy-malabarica-14(26), 17E, 21-triène; 3-oxo-malabarica-14(26), 17E, 21-triène; (Boar <i>et al</i> , 1984 ; Marner <i>et al</i> , 1991)

Tableau 20 - Les molécules ayant le squelette bicyclique ou tricyclique identifiées dans la mastic

# **Chapitre 2 :**

## **Étude analytique des résines végétales**

\*~\*

Ce chapitre regroupe les résultats obtenus sur les résines triterpéniques selon divers protocoles d'extraction et avec différentes techniques analytiques telles que la spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IRTF), la Chromatographie Liquide à Haute Performance couplée à une double détection associant en série un détecteur à barrette de photodiodes et un fluorimètre (CLHP/UV/Fluorimétrie) ainsi que la Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à un spectromètre de Masse (CPG/SM).

L'objectif de cette étude est d'élaborer des protocoles d'extraction performants afin d'étudier ces matériaux organiques complexes et d'appliquer les résultats obtenus à la caractérisation d'échantillons de nature artistique ou archéologique.

## **A. Etude par Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IRTF)**

L'Infra-Rouge à transformée de Fourier (IRTF) est une technique spectroscopique indispensable pour l'analyse de tout type d'échantillons commerciaux, archéologiques, organiques ou inorganiques. C'est un moyen de diagnostic permettant de déterminer la nature des liaisons chimiques présentes dans une molécule (Brügel, 1962; Colthup, Daly et Wiberley, 1975; Diem, 1994; Banwell et MCCash, 1994; Brown, 1998). Dans notre laboratoire, c'est la première technique d'analyse qui est employée pour approcher la nature de l'échantillon et ainsi obtenir des informations de base concernant le matériel analysé.

Le rayonnement infrarouge fut découvert en 1800 par William Herschel, qui a étudié ses effets thermiques (©2012, Encyclopædia Universalis France). La technique elle-même est basée sur l'absorption des rayonnements infrarouge. Le rayonnement infrarouge fait partie du rayonnement électromagnétique de la lumière, il occupe le domaine de nombres d'onde entre  $4000\text{ cm}^{-1}$  et  $400\text{ cm}^{-1}$ . La méthode d'analyse par infrarouge est appliquée aux molécules possédant un moment dipolaire pouvant interagir avec le rayonnement infrarouge. Quand le rayonnement infrarouge est envoyé sur un

échantillon, sa fréquence et son énergie vont exciter les électrons présents. Ses liaisons chimiques vont vibrer avec une fréquence précise et au final, l'échantillon va absorber l'énergie de l'onde excitatrice correspondante. Plus précisément, les vibrations de l'échantillon qui produisent une variation du moment dipolaire absorbent la fréquence infrarouge correspondante. Le spectre en fréquence obtenu représente l'empreinte digitale de l'échantillon. L'expérience montre que certaines fréquences de vibration sont propres à certains groupes de molécules et elles confirment la présence de ce groupement chimique dans la molécule ou dans l'échantillon étudié (Herzberg, 1945; Wojtkowiak et Chabanel, 1977; Haken et Wolf, 1995; Carter, 1998; McHale, 1999). Il existe un grand nombre de vibrations moléculaires qui peuvent être très complexes. Les vibrations simples sont partagées en deux groupes: les vibrations de déformation («bending») et les vibrations d'élongation («stretching») qui se déclinent en fonction de leur symétrie (Smith, 1979).

Concernant de la région de l'infrarouge, on peut observer différents phénomènes:

- Le proche infrarouge – vibrations harmoniques et combinaisons
- Le moyen infrarouge – bandes fondamentales
- Le lointain infrarouge – bandes fondamentales et rotations pures

La spectroscopie infrarouge permet d'analyser divers types d'échantillons, quel que soit leur état: liquide, solide ou gazeux. De plus, elle peut être couplée avec d'autres techniques analytiques, comme les outils chromatographiques (CPG/IR et CLHP/IR). L'analyse par infrarouge peut se faire par transmission et absorption (IRTF) et par réflexion (ATR, RD et réflexion spéculaire).

Dans le cadre de ce travail, l'analyse par IRTF a été utilisée pour étudier les échantillons picturaux supposés contenir des vernis à base de résine naturelle. Toutes les analyses ont été faites en mode transmission, avec la préparation d'une pastille de KBr (PO-1).

## 1. Etude des résines végétales par IRTF

En général, les résines naturelles triterpéniques sont caractérisées par les bandes suivantes qui apparaissent sur le spectre IRTF:

- bande d'élongation vers  $3500\text{ cm}^{-1}$ , présence de groupement  $\text{-OH}$
- forte bande d'absorption entre  $1715\text{-}1695\text{ cm}^{-1}$ , par le groupement  $\text{C=O}$
- faible bande d'absorption vers  $1240\text{ cm}^{-1}$ , par le groupement  $\text{C-O}$
- bande d'élongation pointue, forte absorption entre  $2960\text{-}2930\text{ cm}^{-1}$  et  $2875\text{-}2865\text{ cm}^{-1}$ , par les groupements méthyliques ( $\text{-CH}_3$ ) et ( $\text{-CH}_2\text{-}$ )
- bande de déformation entre  $1467\text{-}1448\text{ cm}^{-1}$  et  $1387\text{-}1382\text{ cm}^{-1}$ , par les liaisons  $\text{C-H}$  (Derrick, 1989)
- bandes apparaissant dans la zone entre  $1200$  et  $500\text{ cm}^{-1}$  et représentant des bandes d'empreintes digitales; elles sont caractéristiques pour chaque substance.

Les trois résines étudiées ont donné des spectres IRTF similaires.

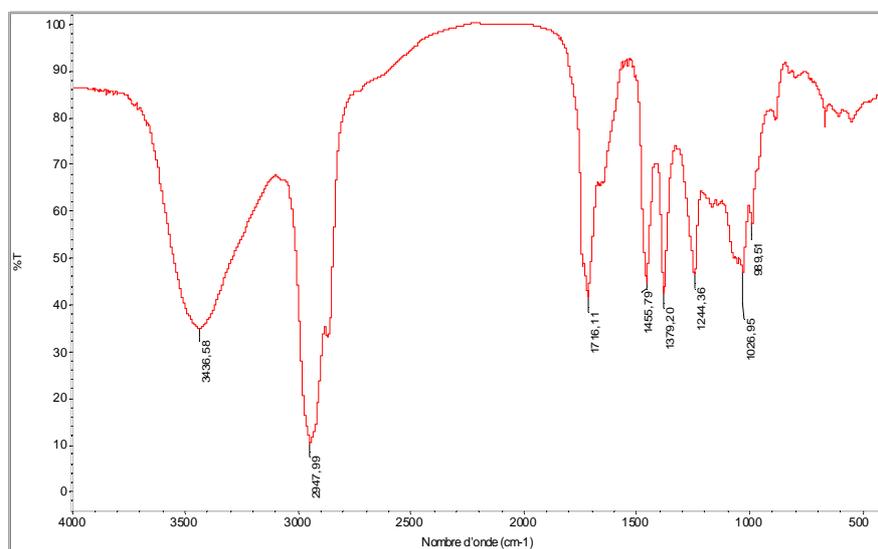


Figure 11- Spectre IRTF obtenu pour l'oliban commercial de Somalie (Sté Encens du monde)

Sur la figure 11 on observe une forte bande d'élongation à  $2947\text{ cm}^{-1}$ , qui correspond à l'absorption des groupements  $-\text{CH}_3$ , suivi d'une bande moins prononcée vers  $2850\text{ cm}^{-1}$  qui confirme la présence des groupements  $-\text{CH}_2-$  qui absorbent dans ce domaine. Sur les spectres des résines de dammar et de mastic (Figures 12 et 13) on retrouve des bandes similaires, à  $2953$  et  $2868\text{ cm}^{-1}$  pour la dammar et à  $2948$  et  $2873\text{ cm}^{-1}$  pour la mastic.

La bande d'élongation produite par l'absorption du groupement  $-\text{OH}$  (liaison O-H libre) est située à  $3436\text{ cm}^{-1}$ , elle est pointue et étroite sur le spectre d'oliban (Figure 11). Elle figure sur les spectres de la dammar et de la mastic à  $3435\text{ cm}^{-1}$ . Sur les spectres des trois résines (Figures 11, 12 et 13), elle est d'une intensité plus faible que les deux bandes correspondant à l'absorption des groupements  $-\text{CH}_3$  et  $=\text{CH}_2$ .

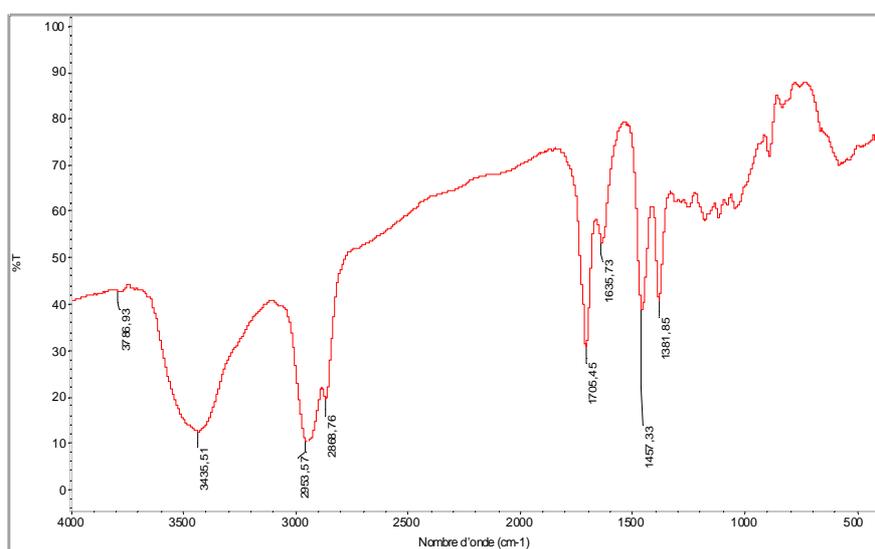


Figure 12 - Spectre IRTF obtenu pour la dammar commerciale (Sté Encens du monde)

Une bande de forte intensité, très pointue correspondant à l'absorption du groupement cétonique ( $\text{C}=\text{O}$ ) est située à  $1705\text{ cm}^{-1}$  sur les spectres de la dammar et de la mastic (Figures 12 et 13). Elle est épaulée par une autre bande à  $1635\text{ cm}^{-1}$  qu'on distingue sur la figure 12. L'intensité de cette bande est faible dans l'ensemble, mais sur les spectres de l'oliban et de la mastic (Figures 11 et 13) elle est encore moins prononcée. Les liaisons C-H présentes dans ces trois résines donnent deux bandes de déformation pointues et prononcées, situées à  $1455$  et à  $1379\text{ cm}^{-1}$  (figure 11), à  $1457$  et à  $1381\text{ cm}^{-1}$  (figure 12) et à  $1459$  et à  $1381\text{ cm}^{-1}$  (figure 13).

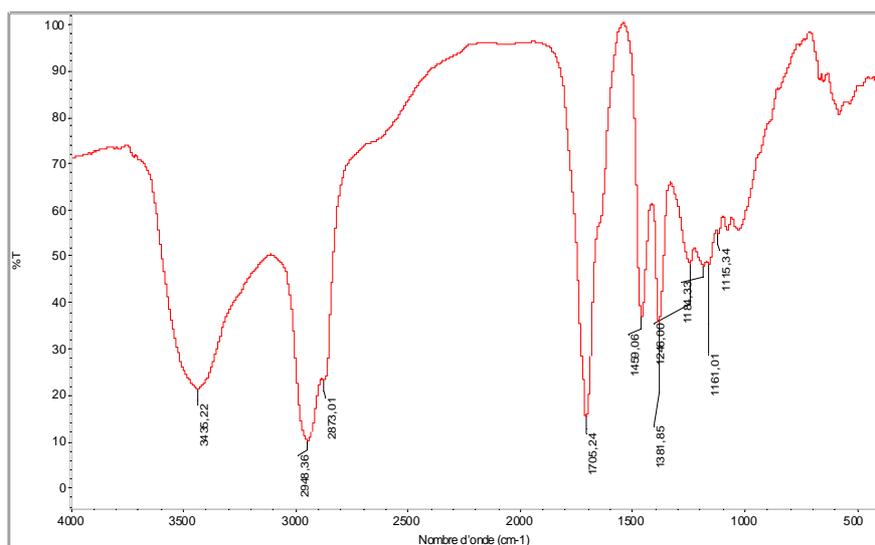


Figure 13 - Spectre IRTF obtenu pour la mastic commerciale (Sté Kremer)

Sur le spectre de l’oliban (figure 11) et de la mastic (figure 13), on observe respectivement la même bande à  $1244\text{ cm}^{-1}$  et à  $1240\text{ cm}^{-1}$ . Elle correspond à l’absorption du groupement C-O, présent dans les acides carboxyliques. Cette bande est absente sur le spectre de la dammar (Figure 12). Les bandes apparaissant au-dessous de  $1200\text{ cm}^{-1}$  appartiennent à la zone d’empreinte digitale caractéristique pour chaque substance étudiée.

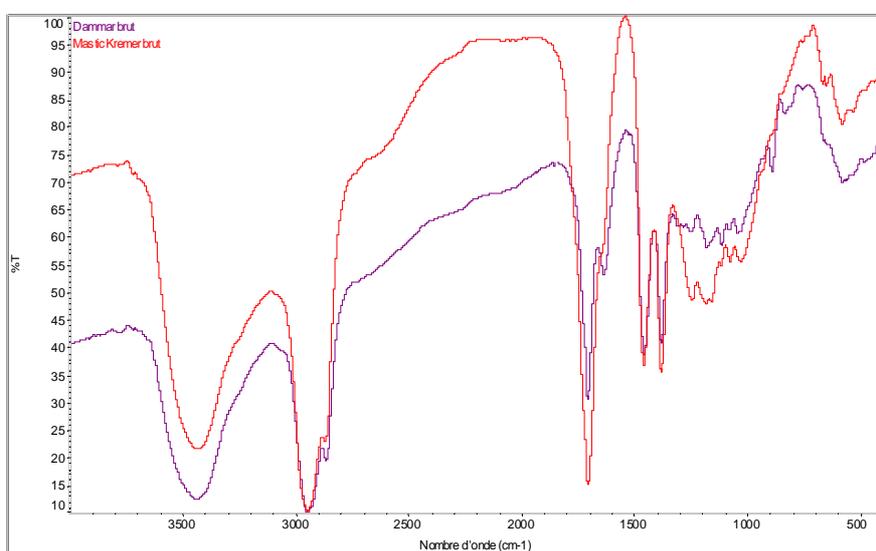


Figure 14 - Spectres IRTF superposés de la mastic commerciale (Sté Kremer) et de la dammar commerciale (Sté Encens du Monde)

Les résines dammar et mastic donnent un spectre très similaire, car elles contiennent un grand nombre de composés communs. On peut le voir sur la figure 14, représentant une

superposition de ces deux spectres. Ces deux résines ont été largement utilisées dans le domaine du patrimoine culturel et elles sont souvent étudiées ensemble. On peut conclure qu'il est très difficile de distinguer ces deux résines seulement à partir de leur spectre IRTF. Les résines végétales ont une composition chimique complexe, elles possèdent un grand nombre de molécules différentes. L'étude par IRTF offre de meilleurs résultats si la substance étudiée est pure, ce qui n'est pas le cas dans ce travail.

## **2. Etude de cas par IRTF**

### **2.1. Etude des échantillons artistiques**

Sept échantillons ont été prélevés sur six tableaux de la Galerie nationale de Bosnie-Herzégovine dans deux séries, en 2010 (No 2, No 3 et No 4) et en 2011 (No 1, No2, No3 et No4). Il s'agit d'œuvres datant de XX<sup>ème</sup> siècle, de peintres renommés des Balkans représentant la richesse culturelle en Bosnie-Herzégovine. Les informations supplémentaires sur les œuvres et les peintres sont regroupées dans l'annexe 4 de ce manuscrit et la figure suivante montre quelques œuvres analysées avec les endroits d'où les échantillons ont été prélevés (Figure 15).

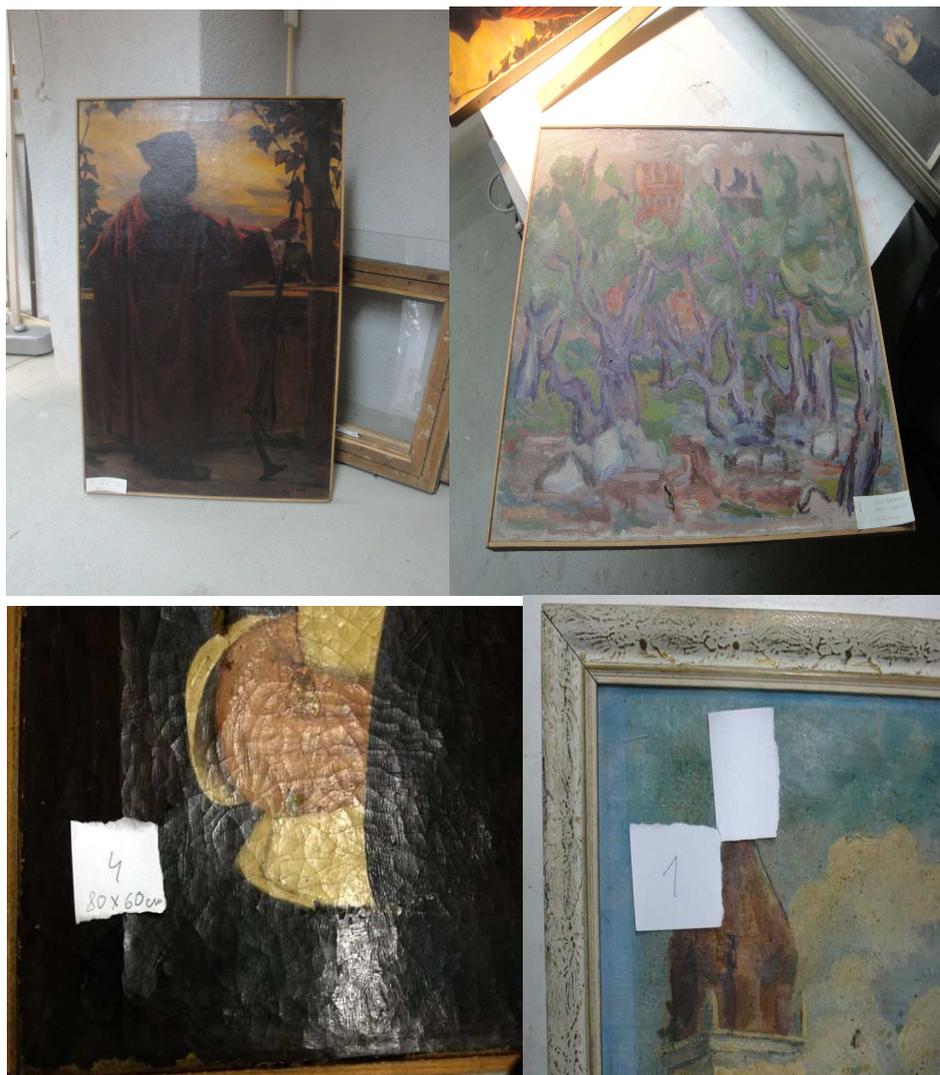


Figure 15 - Les œuvres analysés de la Galerie Nationale de Bosnie-Herzégovine

Il est supposé par le conservateur (Sanjin Lugić) que ces œuvres contiennent un vernis à base de résine naturelle. Les sept échantillons ont été analysés par IRTF et les spectres obtenus se ressemblent fortement, comme on peut observer sur les figures 16 et 17, correspondant aux deux séries de prélèvements qui regroupent les spectres superposés.

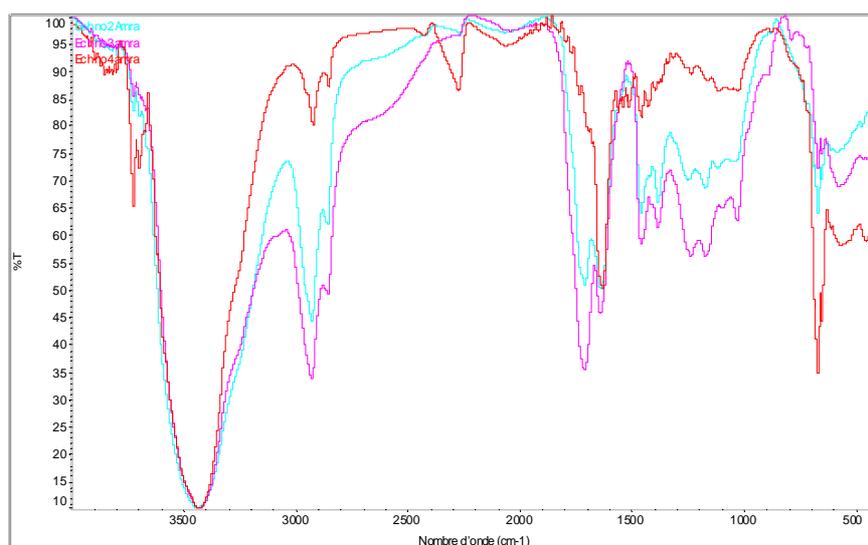


Figure 16 - Spectres IRTF superposés d'échantillons prélevés en 2010

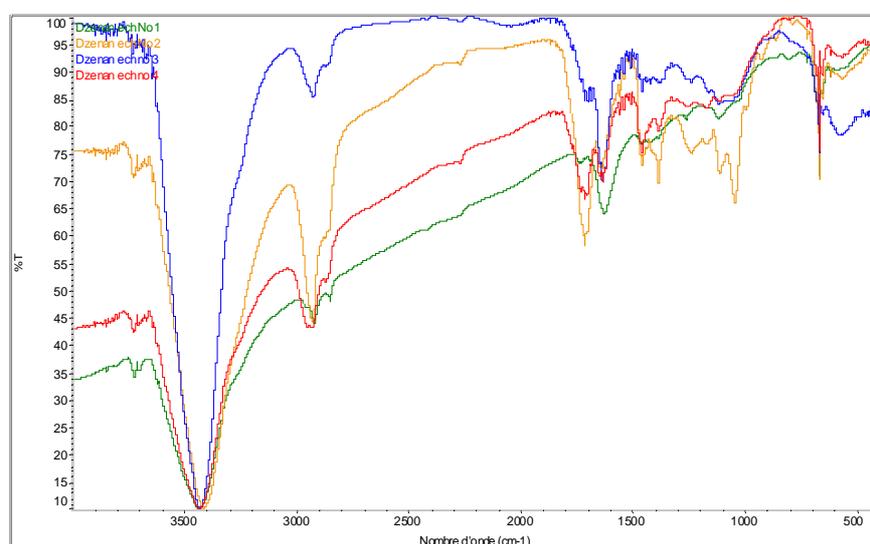


Figure 17 - Spectres IRTF superposés d'échantillons prélevés en 2011

Les spectres obtenus révèlent la présence de bandes à  $3430\text{ cm}^{-1}$  (-O-H) sur les figures 16 et 17. Les bandes entre  $2900$  et  $2800\text{ cm}^{-1}$  sont présentes sur la figure 16 chez deux échantillons (éch. 2 et éch. 3). Le troisième échantillon possède deux bandes très courtes et de faible intensité, comme l'ensemble des échantillons sur la figure 17. Les bandes correspondant à l'absorption des groupements C=O et C-O sont retrouvées sur la figure 16 (éch. 2 et éch. 3). Elles sont absentes sur la figure 17. Après avoir fait la recherche bibliographique pour voir la correspondance entre notre base de données et les échantillons étudiés, les meilleurs coefficients de corrélation ont été trouvés avec les résines acryliques commercialement disponibles sous les noms Plextol D360, Rohagit

SD15 et Primal. Ce sont des résines largement employées dans les processus de restauration et conservation des œuvres peintes (tableau 21).

Réf.	Plextol B360 (%)	Rohagit SD15 (%)	Primal (%)	Autre (%)
No 2 (2010)	76, 18	-	80, 31	69, 83 (gomme végétale)
No 3 (2010)	72, 08	73, 98	73, 89	-
No 4 (2010)	57, 44	-	78, 50	60, 72 (Plextol B500)
No 1 (2011)	55, 83	53, 30	50, 32	-
No 2 (2011)	58, 80	54, 93	56, 30	-
No 3 (2011)	70, 97	80, 08	59, 33	-
No 4 (2011)	59, 88	59, 90	56, 66	-

Tableau 21 - Coefficients de corrélation après l'analyse IRTF comparée avec la base de données

Le but de ce travail de thèse consistait à étudier les résines végétales naturelles. D'après ces premiers résultats obtenus, le choix s'est focalisé sur l'étude de l'échantillon No 2 (2010) pour lequel on a relevé un coefficient de corrélation non négligeable avec une substance naturelle (gomme végétale), son spectre IRTF est donné sur la figure 18.

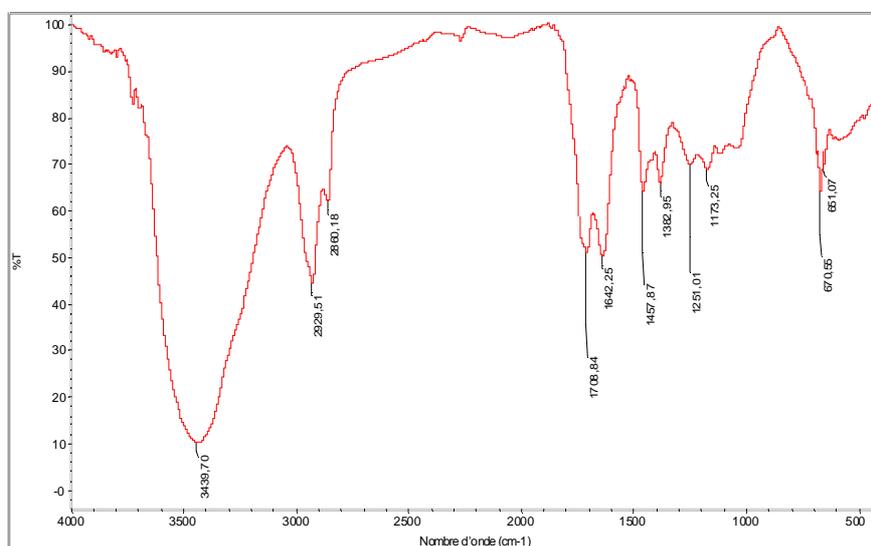


Figure 18 - Spectre IRTF obtenu pour Ech. 2 (2010)

D'une part, on observe la présence des bandes à 3439, 2929, 2860, 1708 et 1642  $\text{cm}^{-1}$ , communes avec les gommes-résines végétales dammar et mastic. Une comparaison entre ces deux résines et cet échantillon a été faite et la superposition de ces trois spectres est présentée sur la figure 19.

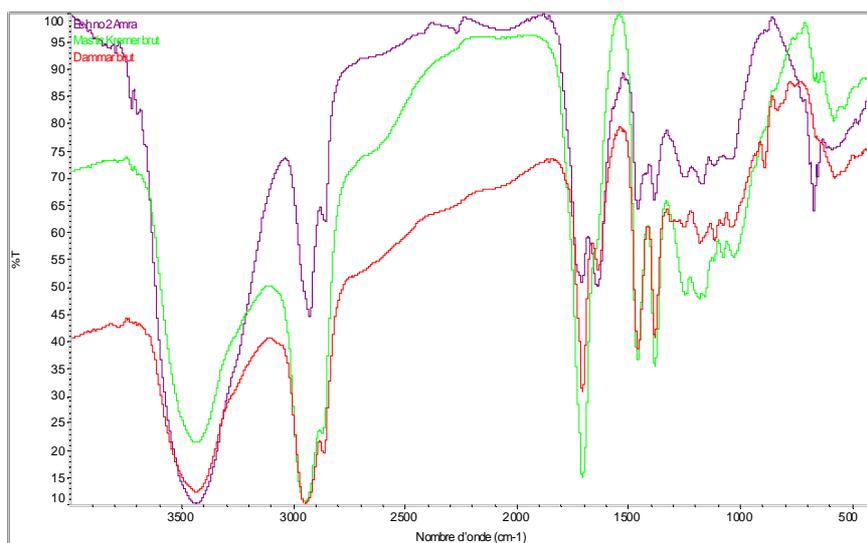


Figure 19 - Superposition de spectres IRTF : gommés-résines dammar et mastic avec l'éch. No 2 (2010)

Sur la figure 19 on peut observer les bandes similaires. Le spectre appartenant à l'éch. No 2 (2010) en violet se distingue bien des deux autres spectres appartenant aux résines végétales. D'autre part, les résultats fournis par la banque de données interne ont proposé une forte ressemblance avec des résines acryliques Plextol B360 et Primal et la figure suivante (Figure 20) présente la superposition des spectres de ces deux résines synthétiques et l'éch. No 2 (2010).

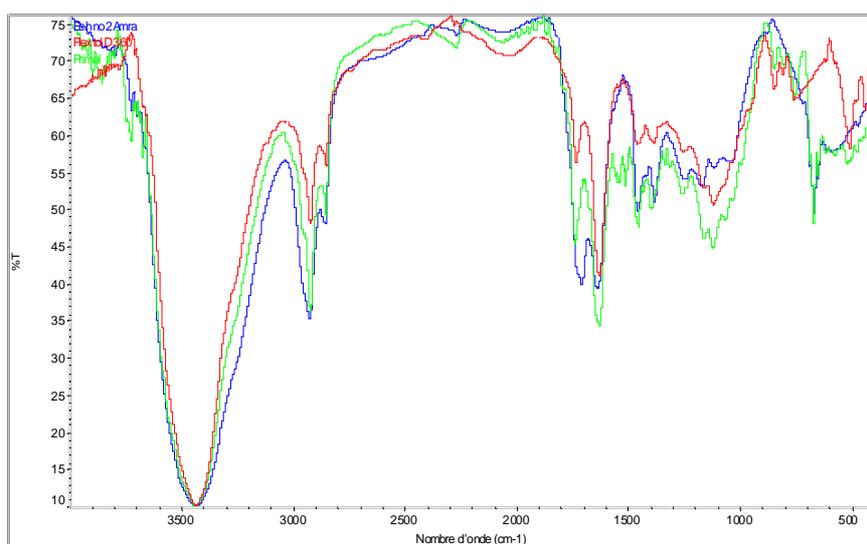


Figure 20 - Superposition de spectres IRTF : résines Primal et Plextol B360 avec l'éch. No 2 (2010)

La ressemblance entre ces trois spectres est remarquable. Les bandes présentes sur les trois spectres sont en accord, l'intensité est presque égale à  $3440\text{ cm}^{-1}$ . La double bande entre  $2900$  et  $2800\text{ cm}^{-1}$  correspond à l'élongation et l'absorption par les groupements  $\text{-CH}_3$  et  $\text{-CH}_2\text{-}$  qu'on retrouve aussi dans les résines synthétiques, mais elle est moins forte et moins prononcée que dans le cas des résines naturelles (Figures 11, 12 et 13). Les bandes entre  $1700$  et  $1600\text{ cm}^{-1}$  s'accordent aussi très bien entre ces trois spectres.

Pour conclure, après avoir étudié les résultats obtenus, on peut dire que la plupart des échantillons prélevés dans la Galerie Nationale à Sarajevo ne contiennent pas un vernis à base de résine naturelle. Cependant, un doute persiste pour l'échantillon référencé No 2 (2010); une analyse chromatographique (CPG-SM) va suivre pour confirmer ou non la présence d'une résine naturelle au sein du vernis.

### 2.2. Etude de l'échantillon archéologique

Dans ce travail, deux échantillon archéologiques ont été étudiés, référencés G12 et G14 (cf. partie 1.1.1.). Une première étude scientifique de la collection Victor Loret a été menée il y a déjà plusieurs années au laboratoire (Vieillescazes, 1992). Dans le cadre d'une collaboration avec le professeur J. Claude Goyon (Université Lyon 2) égyptologue, certains spécimens avaient été identifiés avec les moyens analytiques de l'époque. La célèbre exposition «L'Egypte Antique à travers la collection d'Égyptologue Victor Loret» au musée des Beaux Arts de Lyon en 2007 est venue mettre en lumière la richesse et l'intérêt de cette collection. Notre laboratoire a été contacté par parfaire cet inventaire scientifique. Il était donc important dès lors de confirmer par les nouvelles techniques analytiques du laboratoire les identifications de certains échantillons (G12 et G14) et d'optimiser ces protocoles expérimentaux. C'est ce que nous avons développé dans notre travail.

L'échantillon G12 provient de l'ancienne Egypte, de Dahchour XII<sup>ème</sup> dynastie du Moyen Empire, de la collection Victor Loret (Lyon, France). L'échantillon est une substance résineuse retrouvée dans le tombeau de la princesse Sat-mer-hout, la sœur de roi Amenemhat I, durant la mission de Jacques de Morgan (1894-1895).

Le spectre obtenu après l'analyse par IRTF est présenté sur la figure 21.

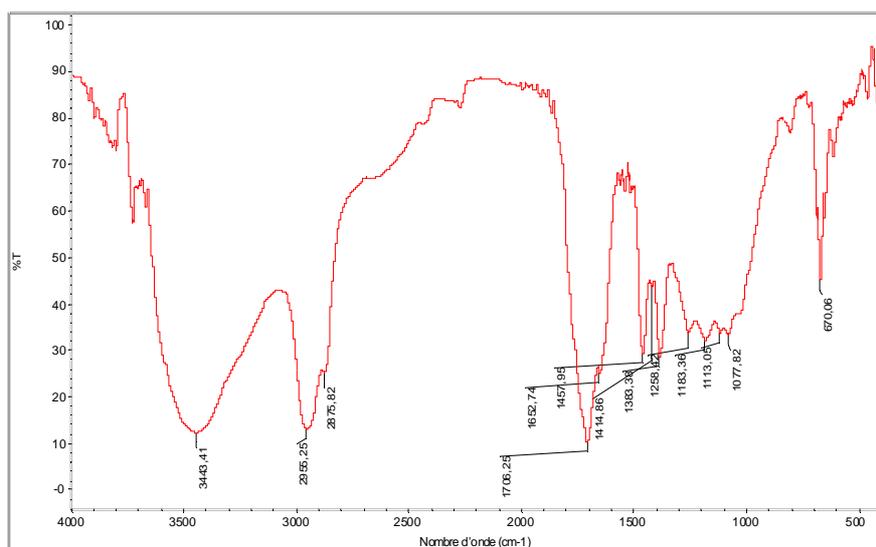


Figure 21 - Spectre IRTF de l'échantillon Dahchour G12

La bande d'élongation provoquée par l'absorption du groupement -OH, située à  $3443\text{ cm}^{-1}$  est fortement prononcée, mais n'est pas très large. Les absorptions de  $\text{-CH}_3$  à  $2955\text{ cm}^{-1}$  et de  $\text{-CH}_2\text{-}$  à  $2875\text{ cm}^{-1}$  ont une forte intensité. La bande d'absorption par le groupement cétonique  $\text{C=O}$  à  $1706\text{ cm}^{-1}$  épaulée par une petite bande de plus faible intensité à  $1652\text{ cm}^{-1}$  fait référence aux spectres obtenus après l'analyse par IRTF des résines dammar et mastic. Sur la figure suivante, les spectres en question sont superposés (Figure 22).

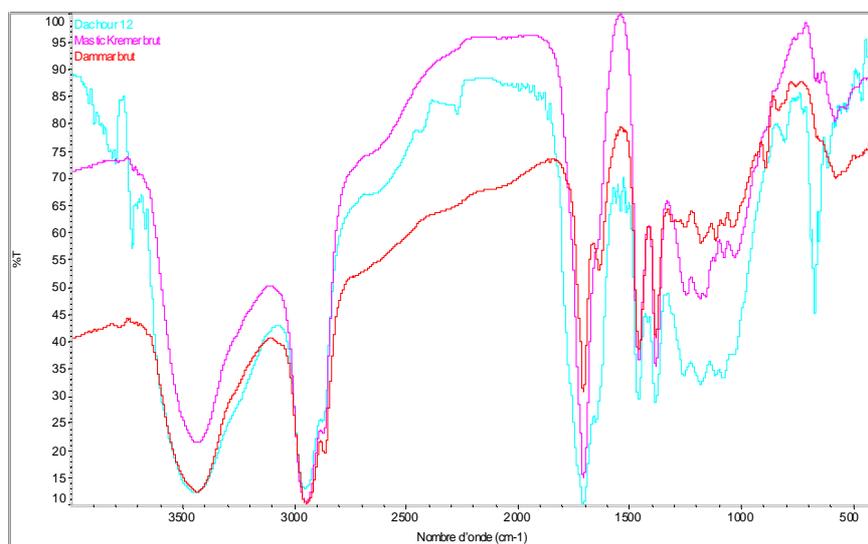


Figure 22 - Superposition de spectres IRTF: résines dammar et mastic avec l'éch. Dahchour G12

La ressemblance entre ces trois spectres est flagrante. Les deux fortes bandes à 1457 et à 1383  $\text{cm}^{-1}$  s'accordent parfaitement avec des bandes correspondantes sur les spectres de la dammar (à 1457 et à 1381  $\text{cm}^{-1}$ ) et de la mastic (à 1459 et à 1381  $\text{cm}^{-1}$ ).

Le contexte historique et géographique de l'échantillon Dahchour G12 (Vieillescazes, 1992) nous permet de supposer que cet échantillon provenant de l'ancienne Egypte pourrait contenir de la mastic, qui est une résine connue et utilisée depuis très longtemps, surtout dans le bassin méditerranéen. Par contre, la dammar est une résine asiatique, il n'existe pas de données écrites pour l'utilisation de cette résine en ancienne Egypte, alors on peut l'exclure de cette étude.

Pour conclure, l'analyse par IRTF de l'échantillon archéologique Dahchour G12 a ouvert la possibilité d'identifier une résine végétale qui contient, très probablement de la mastic, mais une étude chromatographique supplémentaire va permettre de révéler son identité avec précision.

## B. Les techniques chromatographiques

Les techniques chromatographiques sont des techniques séparatives employées pour étudier et analyser les mélanges moléculaires. Le but est de séparer les constituants et de déterminer précisément chaque molécule présente d'un mélange complexe. Aussi l'identification de toutes les molécules présentes est parfois rendue impossible, notamment à cause des interactions *in situ*.

La chromatographie est une méthode physique de séparation où les molécules de soluté se distribuent entre deux phases, la phase stationnaire et la phase mobile. La séparation des molécules est conditionnée par les différences des coefficients de distribution des molécules entre les deux phases (Poole, 2003). Le principe de la séparation des composés dans un mélange par chromatographie est de faire passer le soluté à travers un support ou une colonne. Les composés vont être retenus sur le support. Le mélange est porté par un fluide, liquide ou gaz. La nature du support et du fluide employé peut varier, il existe alors plusieurs techniques chromatographiques, comme la chromatographie liquide, chromatographie en phase gazeuse, etc.

Officiellement, la chromatographie fut présentée pour la première fois au début de 20<sup>ème</sup> siècle, le 21 mars 1903. Mikhail Semenovitch Tswett, un chercheur russe a décrit ses travaux concernant une nouvelle approche pour séparer les pigments végétaux à l'aide d'éther de pétrole sur une colonne remplie de carbonate de calcium. Ces travaux ont été poursuivis par Kuhn et Lederer en 1931 qui ont travaillé sur la séparation des caroténoïdes. En 1934 Zechmeister et Cholnoky sortent un livre qui vulgarise la chromatographie. A partir de 1938, la chromatographie a avancé à grands pas, Kuhn a obtenu le prix Nobel de chimie et la chromatographie sur couche mince s'est fait connaître grâce au livre de Izmailov et Schraiber. En 1941, Martin et Synge ont travaillé sur la chromatographie de partage et ont reçu le prix Nobel de chimie en 1952 pour leur découverte.

## 1. La Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (CLHP)

Il s'agit d'une technique analytique dont l'application est vaste. Elle est dérivée de la forme la plus ancienne de la chromatographie liquide sur colonne. Ses performances en termes de sélectivité et de résolution sont nettement améliorées par l'utilisation de phases stationnaires très élaborées et techniquement perfectionnées. Cette technique permet la possibilité de jouer très précisément sur la sélectivité entre les composés par le choix de la colonne et de la composition de la phase mobile (Rouessac et Rouessac, 2004).

L'échantillon à analyser doit être sous forme liquide, en général dissous dans un solvant organique, par exemple le méthanol. La phase mobile est choisie par rapport à la nature de la phase stationnaire et en fonction de la polarité des composés étudiés. Généralement, elle est constituée de plusieurs solvants. D'habitude, on utilise un mélange d'eau et de solvant organique, telle que le méthanol ou l'acétonitrile. A l'aide d'une pompe, la phase mobile est envoyée dans la colonne (phase stationnaire) à un débit constant. Le schéma suivant (Figure 23) représente un système CLHP.

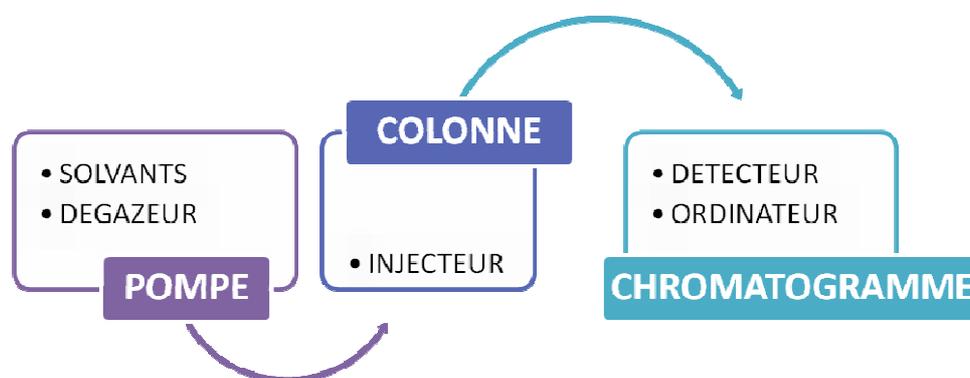


Figure 23 - Schéma général d'un système CLHP

Le détecteur «classique», le plus couramment utilisé est celui à barrette de photodiodes, domaine UV/visible, sa détection est basée sur la loi de Beer-Lambert ( $A = \epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c$ ). La phase mobile ne doit pas ou très peu absorber dans la longueur d'onde choisie pour l'analyse des

composés ciblés (Rouessac et Rouessac, 2004). La cellule de mesure est éclairée par une source polychromatique et la lumière transmise par l'échantillon est dispersée par un réseau à réflexion sur le détecteur constitué par une rangée de photodiodes. Normalement, un tel détecteur est capable de mesurer une gamme des longueurs d'onde (dans ce cas, de 190 à 800 nm) et chaque photodiode indique l'absorbance moyenne sur un intervalle très étroit de longueur d'onde. Ce détecteur est capable de fournir des renseignements spectraux qui peuvent aider à l'identification des composés séparés. C'est l'opérateur qui ajuste la gamme des longueurs d'onde pour lire son chromatogramme et pour faire l'identification des pics obtenus. L'identification des pics se fait sur la base des temps de rétention ( $t_R$ ) pour chaque composé. C'est le temps passé entre le moment de l'injection de l'échantillon et la sortie de pic correspondant sur le chromatogramme. Très souvent l'identification d'un composé à partir d'un chromatogramme est aléatoire et pour assurer l'identification il est conseillé d'associer d'autres techniques pour confirmation (Rouessac et Rouessac, 2004).

Les nouvelles tendances en termes de développement technologique ont touché le domaine de la CLHP, en améliorant ces points faibles, comme le temps d'analyse, qui est parfois très long. L'apparition de nouvelles phases stationnaires plus performantes a contribué à moderniser cette technique qui est indispensable dans les laboratoires. Le terme «UPLC», qui apparaît récemment est propre à Waters, un des fabricants leader des configurations CLHP, qui utilise cette abréviation pour ses nouveaux systèmes CLHP. En terme d'identification plus précise, le couplage CLHP/SM est devenu de plus en plus utilisé (Rouessac et Rouessac, 2004).

Un deuxième mode de détection va être présenté, celui obtenu par fluorimétrie, car il a été employé durant ces travaux de recherche. Certains atomes et molécules, après avoir été excités par l'absorption d'un rayonnement électromagnétique émettent de la lumière, ce que l'on appelle le processus de fluorescence. (Rouessac et Rouessac, 2004). L'état d'excitation est très court ( $\sim 10^{-15}$ s) et l'espèce excitée revient à son état fondamental en libérant l'excès d'énergie absorbée. Il existe plusieurs mécanismes pour qu'une espèce libère l'excès d'énergie comme la relaxation non-rayonnante (relaxation vibrationnelle) et la relaxation par fluorescence (Figure 24). Dans le cas de la relaxation par fluorescence, l'espèce excitée libère son excès d'énergie sous forme de photons. Le phénomène de fluorescence est propre à certaines espèces chimiques (certains atomes et molécules) et

dépend fortement de leur structure. La structure est parfois le facteur décisif et toutes les espèces absorbantes ne sont pas aussi fluorescentes, puisque le processus de la relaxation vibrationnelle est produit plus rapidement que la fluorescence (Skoog *et al*, 1997).

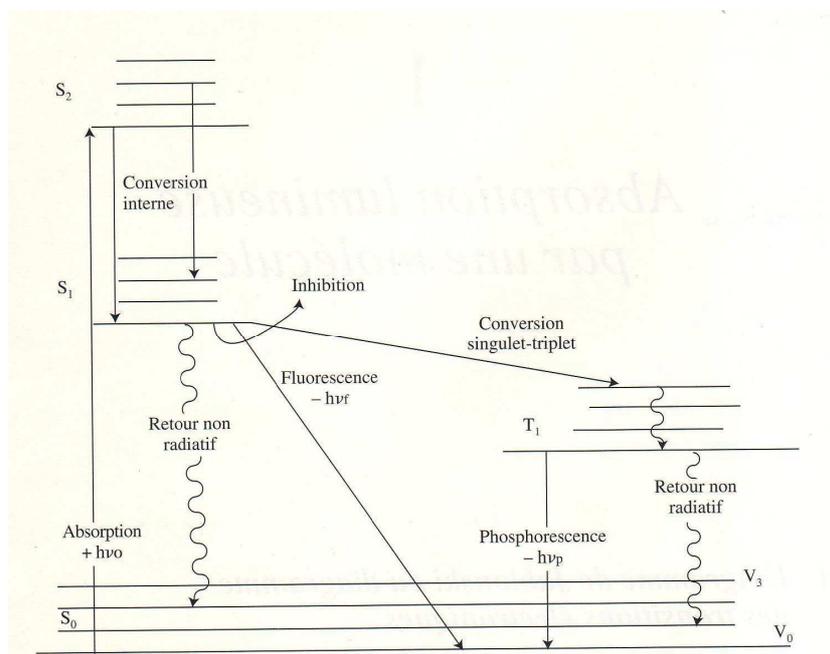


Figure 24 - Diagramme de Jablonski (d'après perrin33.com)

Ce phénomène est caractéristique des molécules organiques, avec une structure rigide cyclique et aromatique, qui possède les liaisons  $\pi$ . Si la molécule contient des groupes électrodonneurs la possibilité de diffuser la fluorescence est plus grande. Le pH de la solution et le solvant utilisé jouent aussi un rôle sur la diffusion de la fluorescence (Rouessac et Rouessac, 2004).

La fluorimétrie est une méthode d'analyse des phénomènes de fluorescence. Elle est très sensible et sélective ; l'intensité de fluorescence d'un composé est directement liée à sa concentration. Il est important de noter que la sensibilité de détection fluorimétrique est généralement 1000 fois supérieure à celle en UV/Visible.

### 1.1. Etude des résines végétales par CLHP/UV/Fluorimétrie

Comme dit précédemment certaines molécules ne diffusent pas la fluorescence, telles que les molécules triterpéniques. Néanmoins, il existe de petites molécules fortement fluorescentes susceptibles d'être greffées à d'autres molécules plus grosses et non-fluorescentes par une réaction chimique. Ces molécules sont appelées les marqueurs de

fluorescence. Pour cette étude, le chlorure de dansyle (Dzl) a été choisi comme marqueur de fluorescence des molécules triterpéniques (Figure 25) :

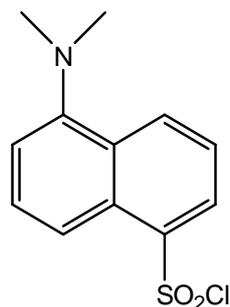


Figure 25 - Structure chimique du chlorure de dansyle (Dzl)

Un travail préalable par spectrofluorimétrie a été fait pour établir les longueurs d'onde d'excitation et d'émission du Dzl dans nos conditions de travail. Ainsi, le couple suivant a été fixé:

$$\lambda_{exc.} = 347 \text{ nm et } \lambda_{em.} = 530 \text{ nm}$$

Dans un second temps des essais de greffage du Dzl ont été effectués. Afin d'établir le protocole de greffage, les premiers essais ont été réalisés sur des molécules standards commerciales présentes dans les résines étudiées, dont le lupéol (Figure 26).

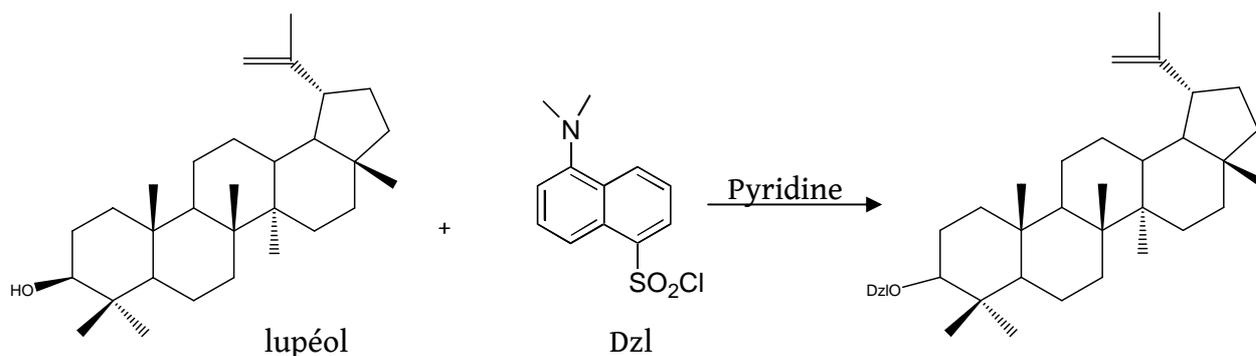


Figure 26 - Greffage du chlorure de dansyle (Dzl) sur le lupéol

Ces résultats étant encourageants, ils ont été appliqués avec succès au greffage du Dzl sur les trois résines (PO-2.2.).

Les analyses ont été faites en CLHP avec double détection, UV/Fluorimétrie. Tous les échantillons ont été préparés selon le protocole PO-3. Les conditions de travail sont

données dans la partie «Matériel et méthodes» (pour l'oliban gradient 3.1.2. et pour la dammar et la mastic gradient 3.1.3.).

### a) L'oliban

Dans le cas de la résine oliban, des échantillons certifiés de *B. carteri* et de *B. frereana* ont été étudiés avant et après le greffage du Dzl. Les chromatogrammes ci-dessous correspondent à l'échantillon de *B. carteri*.

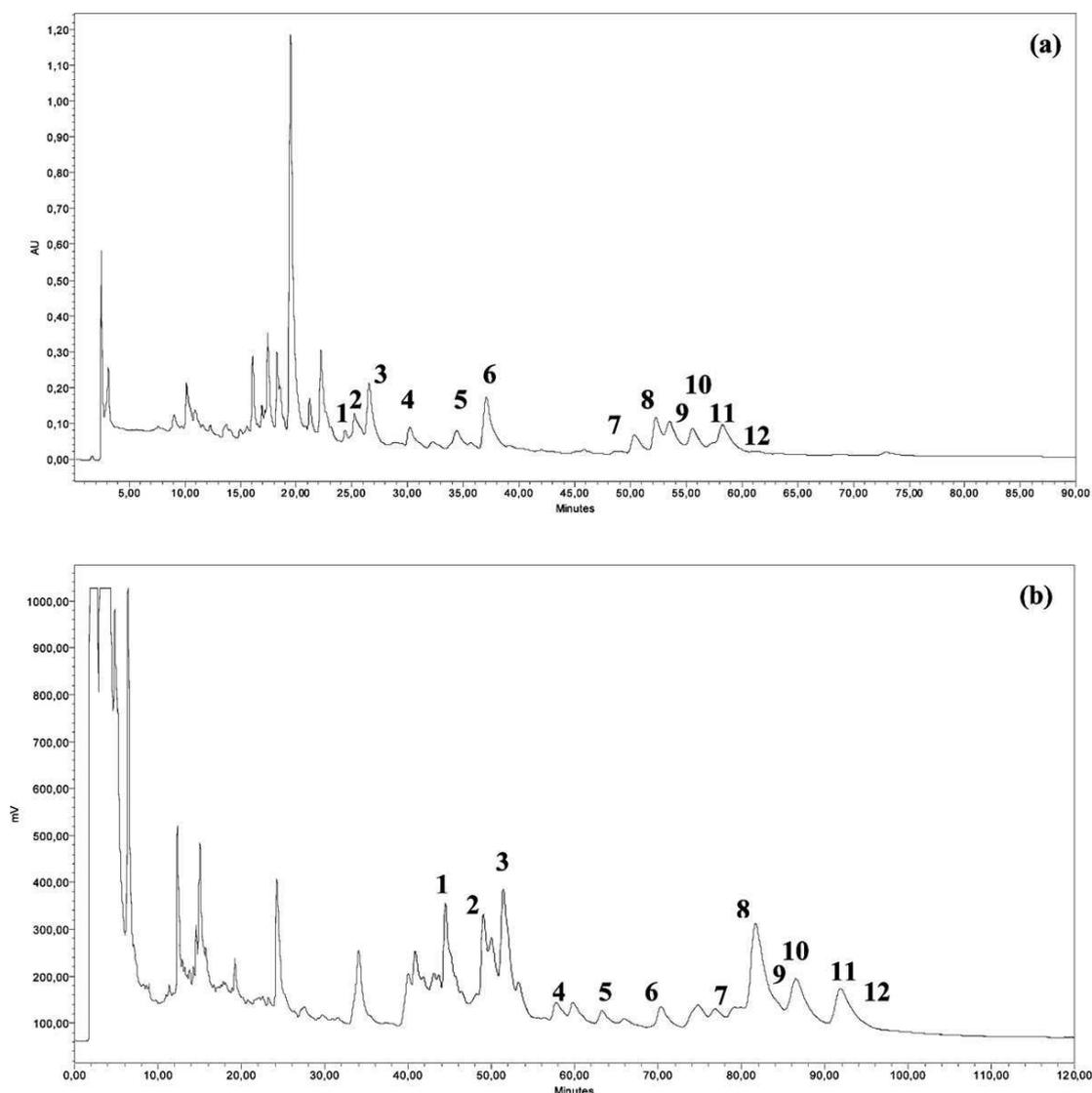


Figure 27 – Chromatogrammes UV obtenus à 210 nm (a) et fluorimétrique (b) de *B. carteri*

Les échantillons certifiés de *B. carteri* et de *B. frereana* ont été gracieusement fournis par le docteur Jacques Dupéron (Laboratoire de paléobotanique et paléoécologie, Université

Pierre et Marie Curie, Paris, France) et le professeur Mats Thulin (Département of Systematic Botany, Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Suède).

Les douze molécules ont été identifiées sur le chromatogramme (a) et leurs temps de rétention sont regroupés dans le tableau 22. L'identification des composés a été faite par rapport à leur temps de rétention ( $t_R$ ), leur structure chimique et en les comparant avec les standards préalablement isolés dans notre laboratoire (Mathe, 2003).

N°	Molécules	$t_R$ (min)
1	acide lupéolique	24, 4
2	acide $\alpha$ -boswellique	25, 2
3	acide $\beta$ -boswellique	26, 5
4	acide <i>O</i> -acétyl-lupéolique	30, 2
5	acide 3- <i>O</i> -acétyl- $\alpha$ -boswellique	34, 4
6	acide 3- <i>O</i> -acétyl- $\beta$ -boswellique	37, 1
7	3- <i>épi</i> -lupéol	50, 4
8	Lupéol	52, 3
9	3- <i>épi</i> - $\alpha$ -amyrine	53, 5
10	3- <i>épi</i> - $\beta$ -amyrine	55, 6
11	$\beta$ -amyrine	57, 3
12	$\alpha$ -amyrine	58, 3

Tableau 22 - Liste des molécules d'oliban identifiées par chromatographie liquide

Les composés **1 à 6** sont des composés assez polaires, acides et leurs dérivés acétylés, sont identifiés entre 24 et 40 minutes sur le chromatogramme. Les composés plus lipophiles (**7 à 12**) apparaissent entre 50 et 60 minutes. Le fractionnement acide/neutre (**PO-6.4.**) réalisé a pour but de repérer et de caractériser plus facilement les composés acides (1 à 6) et les composés neutres, apparus dans la fraction neutre (7 à 12).

On observe sur le chromatogramme (b) différents composés apparus après le greffage. Le Dzl se fixe sur le groupement alcool, permettant ainsi l'identification des composés sur le chromatogramme fluorimétrique. D'une manière générale, le greffage du chlorure de danzyle entraîne une modification des temps de rétention ( $t_R$ ) des composés suite à leur greffage. La colonne (C18e) utilisée étant en phase inverse et la sonde greffée engendre une augmentation du caractère lipophile des molécules, les  $t_R$  augmentent. Le décalage

entre les  $t_R$  ( $\Delta t_R$ ) des composés terpéniques avant et après greffage est de l'ordre de 30 min. Cette information est utile pour identifier les composés greffés sur les chromatogrammes fluorimétriques. L'ordre d'élution restant inchangé, l'identification des composés a pu être confirmée en comparant nos résultats avec ceux obtenus précédemment dans notre laboratoire (Mathe, 2003). Le chromatogramme enregistré après greffage en détection fluorimétrique relève une sensibilité nettement supérieure à celle en détection UV, vu l'intensité des pics apparus sur la figure 28 qui représente les chromatogrammes obtenus pour l'échantillon de *B. frereana*, avant et après greffage du Dzl.

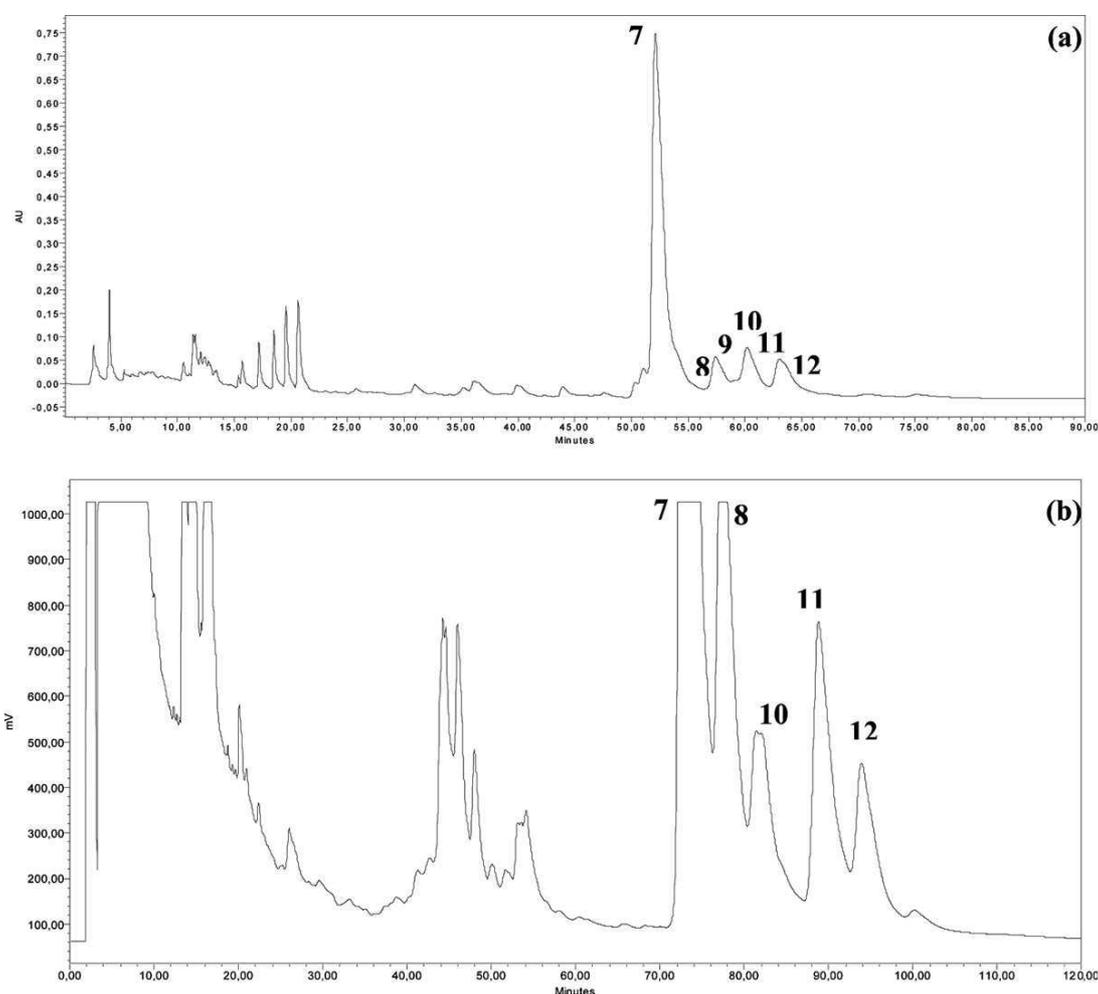


Figure 28 – Chromatogrammes UV obtenus à 210 nm (a) et fluorimétrique (b) de *B. frereana*

*B. frereana* est une espèce endémique du Nord de la Somalie. Une des caractéristiques de cette espèce est l'absence d'acides boswelliques et de leurs dérivés (1-6), comme on peut observer sur le chromatogramme (a) obtenu par détection UV. Les triterpènes apolaires

(7-12), parmi lesquels on distingue le 3-épi-lupéol (7) présent majoritairement, sont identifiés par comparaison avec les résultats préalablement obtenus dans notre laboratoire (Mathe, 2003) et en vérifiant leurs  $t_R$  et leur ordre d'élution. Après greffage du Dzl les composés 7 à 12 initialement présents dans *B. frereana*, ont pu être caractérisés. Il est intéressant de souligner l'importance des intensités des pics obtenus après greffage.

### b) La dammar

Pour la réalisation de cette étude, une résine commerciale de dammar d'Indonésie a été analysée (Sté Encens du monde). Les chromatogrammes obtenus, avant et après le greffage du Dzl sont donnés sur la figure 29.

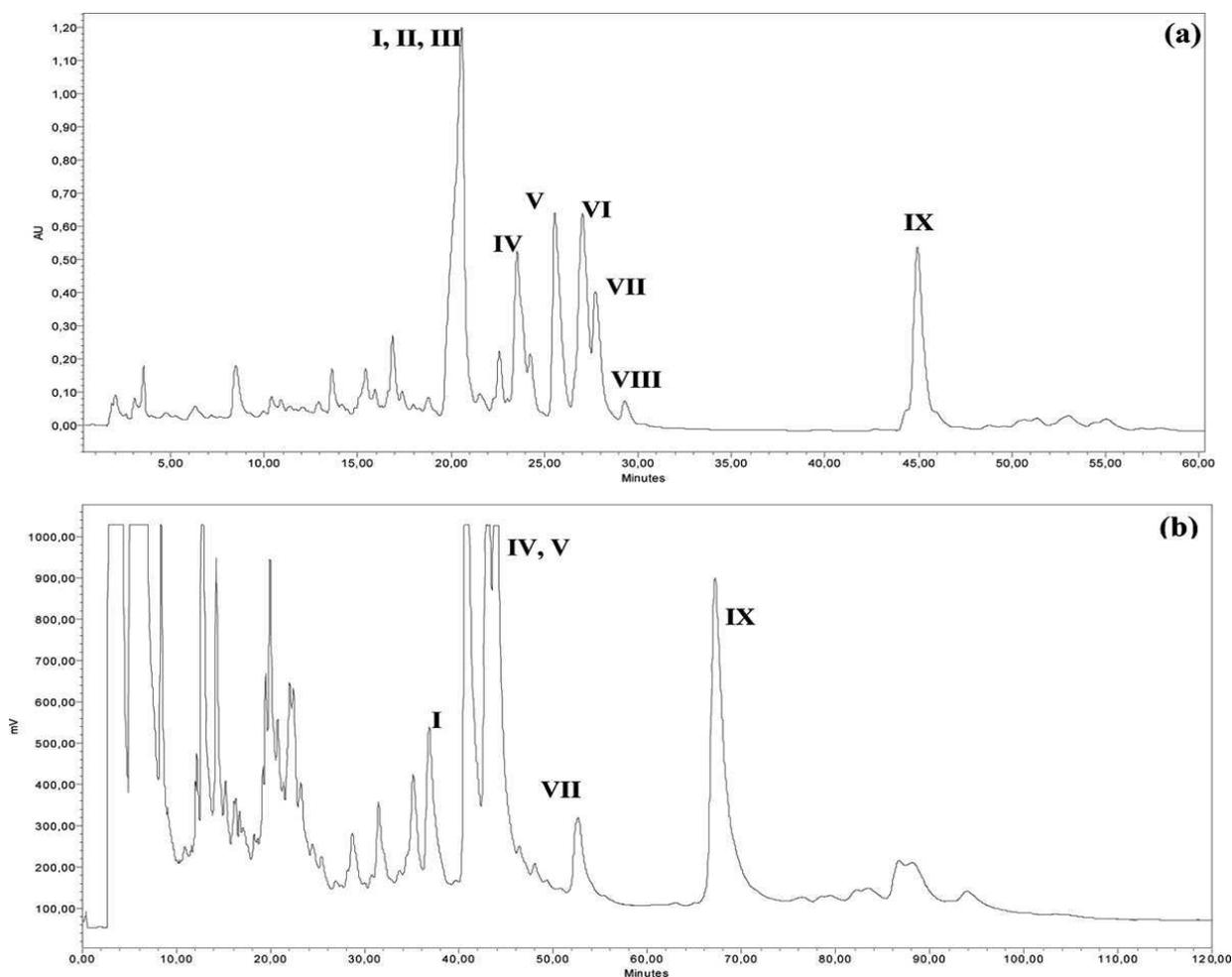


Figure 29 – Chromatogrammes UV obtenus à 210 nm (a) et fluorimétrique (b) de la dammar

D'après la littérature spécialisée, en corrélation avec leur spectre UV ainsi que leur  $t_R$  et l'ordre d'élution, certains composés ont été indexés sur le chromatogramme (a) (tableau 23) (van der Doelen et al., 1998). Le pic de plus haute intensité ( $t_R = 20\text{min}$ ) a été attribué aux acides dammarénolique, ursonique et oléanonique (I-III), présentant tous trois des temps de rétention très proches et donc difficilement séparables. Pour faciliter l'identification des composés et de leur structure, le fractionnement acide/neutre (PO-6.4.) et cétonique/non-cétonique (PO-6.6.) a été réalisé.

N°	Molécule	$t_R$ (min)
I	Acide dammarénolique	20, 6
II	Acide ursonique	20, 6
III	Acide oléanonique	20, 6
IV	Hydroxydammarénone I ou II	23, 7
V	Dammarènediol	25, 5
VI	Aldéhyde oléanonique	27, 1
VII	Dammaradiénol	27, 8
VIII	Aldéhyde ursonique	29, 3
IX	Hydroxyhopanone	45, 1

Tableau 23 - Liste des molécules de la dammar identifiées en chromatographie liquide

L'empreinte chromatographique obtenue par détection fluorimétrique (b) traduit notamment la présence des composés suivants: l'acide dammarénolique (I), le hydroxydammarénone I ou II (IV), le dammarènediol (V) et le hydroxyhopanone (IX). Les pics ainsi obtenus possèdent de fortes intensités de réponse en détection fluorimétrique. En revanche, par détection UV, il est difficile de distinguer les composés I à III, car ceux-ci possèdent des temps de rétention identiques. Cependant, seul l'acide dammarénolique (I) possède une fonction alcool capable de fixer le Dzl, ce qui explique sa réponse sélective en fluorimétrie.

### c) La mastic

Un échantillon de mastic commercial de Grèce (Sté Encens du monde) a été étudié. L'analyse en CLHP/UV/Fluorimétrie a donné les chromatogrammes rassemblés (Figure 30). Les composés qui ont été identifiés dans la mastic sur le chromatogramme (a) en

accord avec les données bibliographiques (van der Doelen et al., 1998), spectres UV et autres informations citées dans le tableau 24.

N°	Molécule	t <sub>R</sub> (min)
III	Acide oléanonique	14, 2
X	Acide moronique	15, 0
XI	(3L, 8R)-3, 8, -dihydroxypolypoda 13E, 17E, 21-triène	22, 1
XII	(8R)-3-oxo-8-hydroxypolypoda-13E, 17E, 21-triène	22, 6
XIII	Acide isomasticadiénonique	23, 3
XIV	Acide masticadiénonique	23, 9
IV	Hydroxydammarénone I ou II	23, 7

Tableau 24 - Liste des molécules de la mastic identifiées en chromatographie liquide

Une étude par fractionnement des composés acide/neutre (PO-6.4.) et cétonique/non-cétonique (PO-6.6.) a été réalisée afin de faciliter l'identification des composés et leur structure.

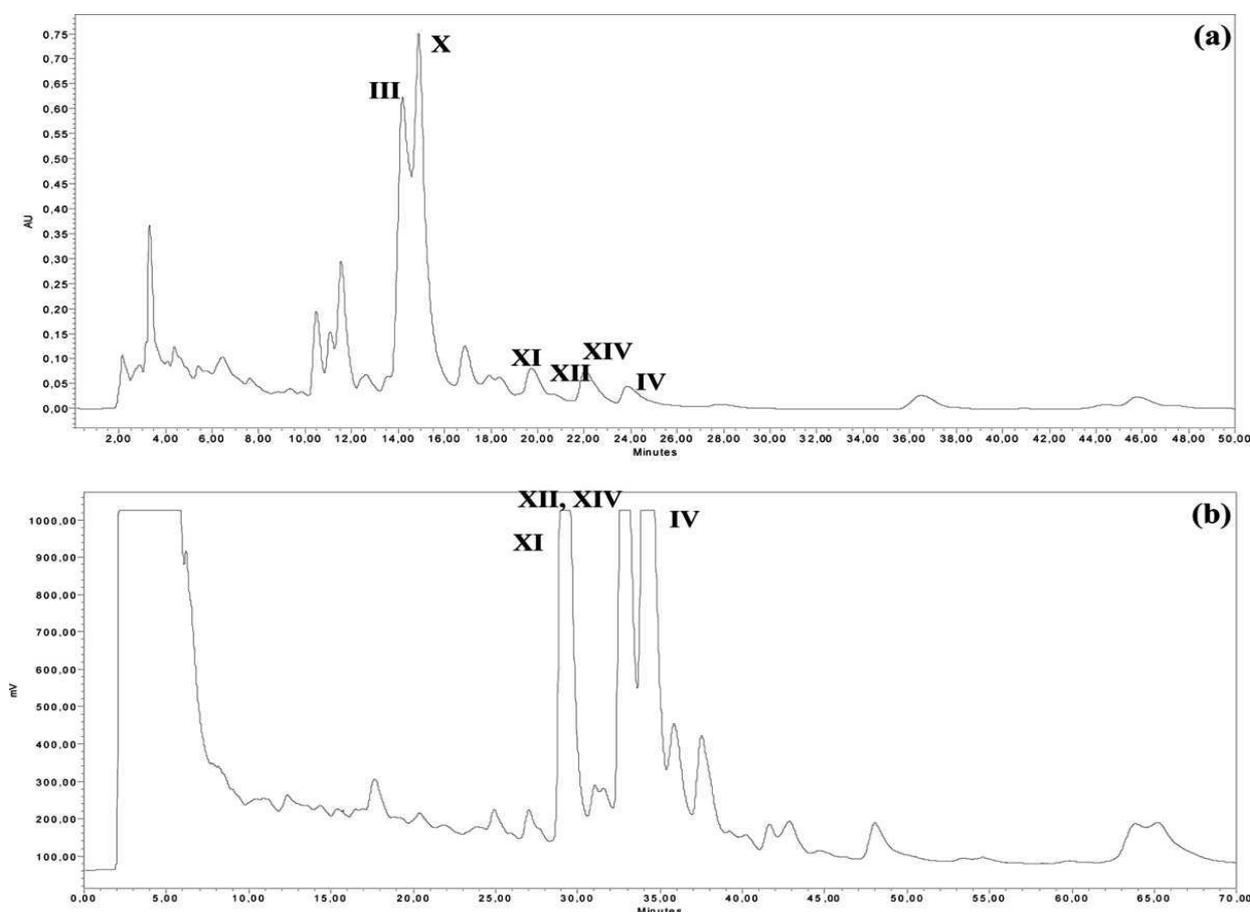


Figure 30 – Chromatogrammes UV obtenus à 210 nm (a) et fluorimétrique (b) de la mastic

Le chromatogramme (b) obtenu après le greffage du Dzl traduit la présence des composés hydroxydammarénone I ou II (IV), (3L, 8R)-3, 8, -dihydroxypolypoda 13E, 17E, 21-triène (XI), (8R)-3-oxo-8-hydroxypolypoda-13E, 17E, 21-triène (XII) et acide masticadiénonique (XIV) qui ont été identifiés à partir de leur structure chimique, de leur  $t_r$  ainsi que leur ordre d'éluion. Notons la forte intensité de réponse des composés greffés.

### d) Etude quantitative et étalonnage analytique

Cette étude analytique a été réalisée sur trois molécules standards,  $\alpha$ - et  $\beta$ -amyrines et lupéol, largement présents dans les résines végétales (familles Burseraceae, Dipterocarpaceae, Anacardiaceae), en particulier chez les espèces *Boswellia*. Pour chaque composé triterpénique, trois étalonnages différents ont été effectués. Une comparaison entre les composés standards et les dérivés dansylés a été réalisée. Une gamme d'étalonnage linéaire, des équations de régression et les limites de détection de ces composés standards ont été calculés. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 25. La linéarité a été testée dans une gamme de concentrations entre 0,1 et 2500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  procurant des coefficients de corrélation allant de 0,9969 à 0,9995. Les limites de détection (LD  $S/N=3/1$ ) et de quantification (LQ  $S/N=10/1$ ) ont été respectivement au-dessous de 2,42  $\text{ng}/\text{mL}$  et de 8,07  $\text{ng}/\text{mL}$  pour les molécules standards pures et au-dessous de 0,45  $\text{ng}/\text{mL}$  et de 1,52  $\text{ng}/\text{mL}$  pour leurs dérivés dansylés correspondants. Les limites de détection pour les dérivés dansylés ont été meilleures et elles ont montré une sensibilité supérieure à celles obtenues avec les molécules standards pures. La méthode fluorimétrique a ainsi montré son efficacité pour quantifier les dérivés dansylés triterpéniques.

Standard triterpénique	Gamme de Linéarité (µg/mL)	Equation d'étalonnage	LD (ng/mL)	LQ (ng/mL)	Coefficient de corrélation (r <sup>2</sup> )
<b>α-amyrine</b>	0, 6-1250	$Y=8, 10+6X + 124390$	2, 42	8, 07	0, 9969
<b>α-amyrine-Dzl</b>	1, 3-1300	$Y=4, 10+6X - 8572$	0, 40	1, 39	0, 9995
<b>β-amyrine</b>	0, 61-1250	$Y=6, 10+6X - 31860$	1, 63	5, 44	0, 9995
<b>β-amyrine-Dzl</b>	0, 12-1250	$Y=5, 10+7X - 5592$	0, 45	1, 52	0, 9994
<b>Lupéol</b>	0, 1-1600	$Y=5, 10+6X + 12048$	1, 35	4, 49	0, 9994
<b>Lupéol-Dzl</b>	0, 25-2500	$Y=4, 10+7X + 1,10+6$	0, 15	0, 49	0, 9990

Tableau 25 - Les résultats quantitatifs obtenus pour quelques standards triterpéniques de l'oliban par CLHP

Les variations intra- et inter-jour ont été choisies pour déterminer la précision de la méthode utilisée. Afin de définir la répétabilité intra-jour (intra-essai) de la méthode, les essais ont été effectués 3 fois. La variation intra-jour a été caractérisée en analysant la même solution de standard. La variation inter-jour (entre-jour) a été établie en faisant les analyses répétitives de même échantillon durant trois jours. Les rapports des valeurs d'écart-types pour des aires des pics obtenus sont cités dans le tableau 26.

Molécule standard	Intra-jour ÉTR (%)	Inter-jour ÉTR (%)
α-amyrine	2, 49	9, 39
α-amyrine-Dzl	2, 78	6, 62
β-amyrine	3, 02	9, 40
β-amyrine-Dzl	1, 51	4, 28
Lupéol	3, 44	7, 58
Lupéol-Dzl	2, 69	6, 80

Tableau 26 - Précisions de la méthode analytique pour les composés standards avant et après dansylation

Les valeurs intra-jour sont au-dessous de 3,5% et les valeurs inter-jour sont au-dessous de 9,5%. Ces dernières ont eu une valeur plus faible pour les dérivés dansylés correspondants que pour les molécules standards pures.

### e) L'étude de cas - application sur un échantillon archéologique

Si on dispose d'une petite quantité d'échantillon, comme c'est souvent le cas avec des échantillons archéologiques, le greffage avec Dzl peut être une bonne solution pour leur analyse. Un échantillon archéologique supposé contenir de l'oliban a été étudié dans ce but. L'échantillon référencé G14 (cf. partie IRTF 2. 2. ; Institut d'Égyptologie Victor Loret, Lyon, France) provient de la momie de Hekaemsaf (XXVI<sup>ème</sup> dynastie, 570-525 av. J.-C., période Saïte 664-526 av. J.-C.) qui a été découverte par Barsanti en 1903 à Saqqarah, dans la pyramide d'Ounas en Egypte. L'échantillon est une substance de couleur noire, amorphe et résineuse, prélevé directement sur le corps momifié.

Dans un premier temps, une quantité d'environ quelques milligrammes de cet échantillon a été analysé par CLHP/UV/Fluorimétrie générant un chromatogramme non-exploitable. En effet, aucun pic caractéristique n'a pu être détecté. Dans un second temps, l'échantillon archéologique a été préparé selon le protocole de dansylation. La solution est ainsi préparée à la même concentration que l'échantillon analysé avant la dansylation (Figure 31).

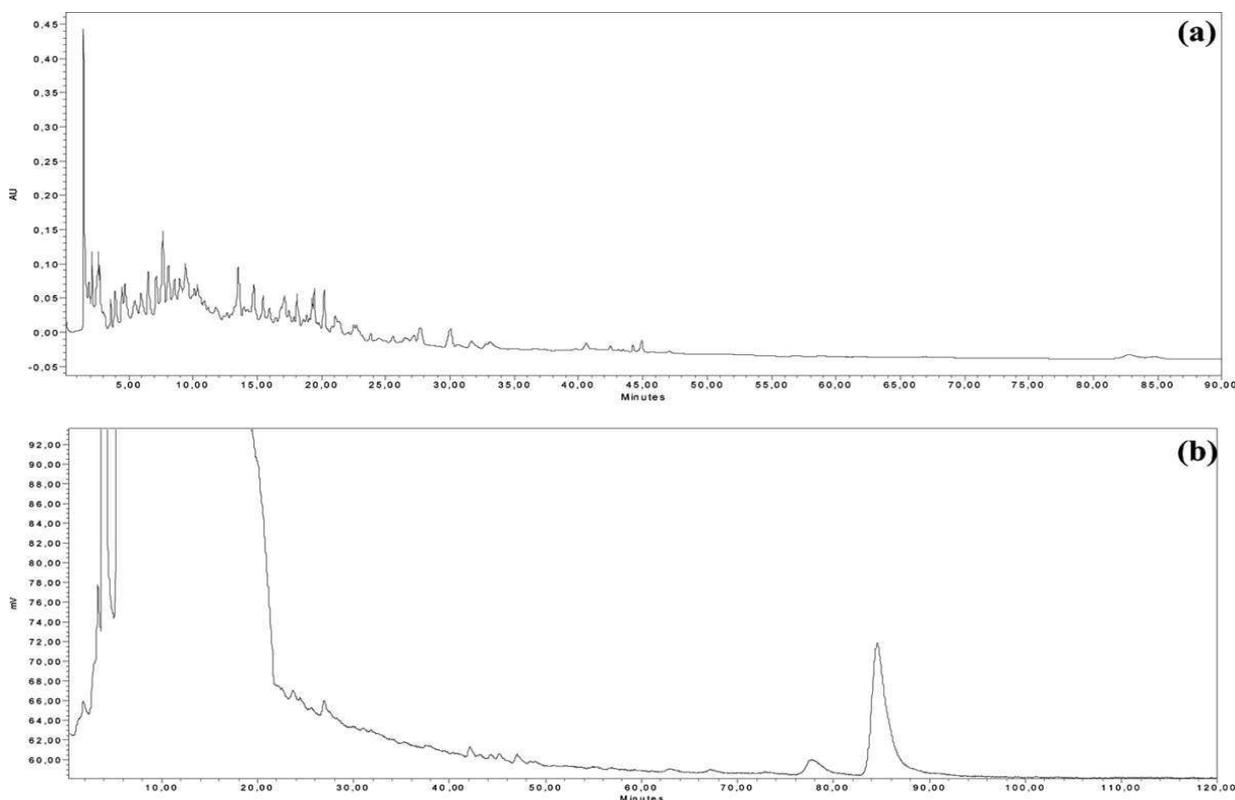


Figure 31 – Chromatogrammes UV obtenus à 210 nm (a) et fluorimétrique (b) de l'échantillon archéologique

Le chromatogramme obtenu par la détection UV a été identique à celui obtenu précédemment, c'est à dire sans aucun pic. Néanmoins, le chromatogramme obtenu par la détection fluorimétrique a relevé la présence d'un pic à 79 min qui correspond sans doute au 3-*epi*-lupéol (7). Cette molécule triterpénique est présente dans plusieurs résines végétales, celle-ci n'est pas spécifique au genre *Boswellia*. Mais sa présence en quantité considérable et l'absence d'autres molécules biomarqueurs présuppose qu'il s'agit de *Boswellia frereana*. En outre, la même concentration d'échantillon greffé avec le Dzl et analysé par CLHP avec la détection fluorimétrique a permis la caractérisation d'un échantillon archéologique, ou la détection UV n'avait donné aucun résultat convenable. Il est à noter que nos résultats obtenus ont été confirmés par analyse CPG-SM.

### f) Conclusion – Étude par CLHP/UV/Fluorimétrie

Pour conclure, en vue de caractériser les résines naturelles végétales par fluorimétrie, une procédure de formations de dérivés dansylés a été développée et réalisée, puis analysée par CLHP. La dansylation a permis tout d'abord de détecter les molécules triterpéniques par la fluorimétrie, puis de diminuer leur seuil de détection en les comparant avec les molécules triterpéniques standards. La dansylation du groupement alcool présent dans les molécules triterpéniques a permis d'obtenir l'empreinte digitale spécifique pour chaque matériau résineux étudié. Effectivement il est possible de distinguer clairement les trois résines employées couramment dans le patrimoine culturel (l'oliban, la dammar et la mastic).

L'application de ce protocole sur un échantillon archéologique prélevé sur la momie de Hekaemsaf a permis de détecter avec succès la présence de résine oliban. De plus, cette méthode a offert des informations importantes sur l'origine botanique de la résine employée et l'identification de l'espèce avec précision (*Boswellia frereana*). Les données accessibles sur l'emploi des résines naturelles en ancienne Egypte pour les processus de momification sont parfois imprécises et incomplètes. La caractérisation de la résine oliban est souvent difficile puisque celle-ci est souvent confondue avec d'autres résines aromatiques utilisées dans cette même période (à titre d'exemple la myrrhe). Ce mode de préparation d'échantillon évite de faire ce type de confusion, puisqu'il permet de distinguer précisément la source botanique de la résine utilisée par les anciens artisans. Pour conclure, cette méthode de dérivation constitue une nouvelle approche permettant

d'étudier les matériaux résineux employés dans le domaine du patrimoine culturel (Aksamija et al., 2012; Annexe 2).

## 1.2. Etude des résines végétales par CLHP/UV

### 1.2.1. Choix de la colonne

Dans ce travail de thèse, deux types de colonnes chromatographiques pour CLHP ont été employés :

- Colonnes RP-18 classiques (Phenomenex, Luna et Merck, Purospher STAR)
- Colonne « core-shell » (Phenomenex, Kinetex)

Bien que les premiers travaux sur les particules superficiellement poreuses datent de la fin des années 60 (Horváth *et al*, 1967; Kirkland, 1970), la grande production et l'expansion de ces colonnes a commencé en 2007. Les premières colonnes de ce type, commercialement disponibles ont été Halo<sup>®</sup> colonnes d'Advanced Material Technologies (Wilmington, DE) L'avantage de ces colonnes réside dans leur remplissage avec de la silice poreuse en surface où les sphères de silice sont de forme régulière et leur taille maximale est de 2,7  $\mu\text{m}$ .

Dans ce travail, une colonne « core-shell particule » a été testée. Il s'agit de la Kinetex C-18 (Figure 32) :



Figure 32 - Les sphères de silice Kinetex<sup>®</sup>(Phenomenex)

La dernière génération de ces colonnes core-shell est la Kinetex (Phenomenex), qui est apparue en 2009. Les sphères de silice sont proposées en deux tailles, 2,6 et 1,7  $\mu\text{m}$ . Les sphères de silice chez Kinetex sont plus lisses que dans une colonne classique et la forme est bien ronde, ce qu'on peut voir sur la figure suivante, à droite (Figure 33).

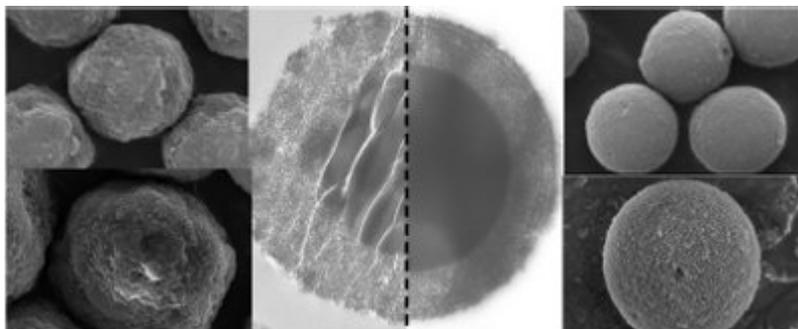


Figure 33 - La photographie prise en MEB et MET de particules de silice : à droite Kinetex, à gauche Halo® colonnes (Sanchez et Farkas, 2012 - American Laboratory®)

Le grand avantage de la colonne Kinetex contenant des particules core-shell réside tout d'abord dans son optimisation de la vitesse linéaire de la phase mobile, qui est supérieure à celle des colonnes avec des sphères complètement poreuses. La possibilité d'augmenter la vitesse linéaire chez les colonnes Kinetex est directement liée avec leur haute conductivité thermique, qui réduit l'impact négatif de chauffage par frottement. Ce dernier est lié avec la pression opérationnelle, qui est nécessaire pour les analyses rapides (Gritti *et al*, 2010; Gritti et Guiochon, 2010a; Gritti et Guiochon, 2010b).

Le temps d'analyse diminue considérablement avec ce type de colonnes, car il est possible de travailler avec un débit de phase mobile important et la séparation des pics est nettement améliorée (Gritti *et al*, 2010). L'objectif de ce travail de thèse est d'améliorer les conditions d'étude des dérivés triterpéniques par CLHP en réduisant notamment la durée d'analyse.

### 1.2.2 Etude des résines végétales par CLHP/UV - colonne RP-18

Cette partie regroupe les résultats obtenus lors de l'analyse par CLHP/UV des résines commerciales: l'oliban, la dammar et la mastic. Les échantillons des résines brutes ont été regroupés et finement broyés afin d'obtenir les échantillons moyens pour chacune des résines étudiées. Tous les échantillons ont été préalablement préparés selon le même

protocole (cf. PO-3, partie Matériel et méthodes) qui consiste en une extraction de 10 minutes à l'aide d'un prototype de bac à ultrasons et dans le même ordre de concentration (~ 0,035 g/mL pour l'oliban et ~0,015 pour la dammar et la mastic).

### a) L'oliban

Dans un premier temps, les deux espèces certifiées d'oliban *B. carterii* et *B. frerana* (fournis par Dupéron J. et Thulin M.) ont été étudiées par CLHP/UV (Figure 34). La troisième espèce, *B. serrata*, est commerciale (Sté Scents of Earth, Sun City, Californie, USA). L'identification des chromatogrammes obtenus avec la colonne RP-18 classique (Figure 34) est basée sur les résultats figurant dans la thèse de Carole Mathe (2003, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse). Bien évidemment, les résultats obtenus ont été validés notamment par la co-injection de molécules standards. Les molécules indexées sont citées dans le tableau 14. Le lupéol (**8**) est absent sur les chromatogrammes b) et c) car ces trois espèces *Boswellia* n'ont pas la même composition chimique, c'est un paramètre qui peut les distinguer. Sur le chromatogramme c) qui correspond à l'analyse de *B. frereana*, on remarque aussi l'absence des composés acides et leurs dérivés acétylés (de **1** à **6**). Le pic majoritaire est celui correspondant au 3-épi-lupéol (**7**), ce qui est une particularité chimique de cette espèce.

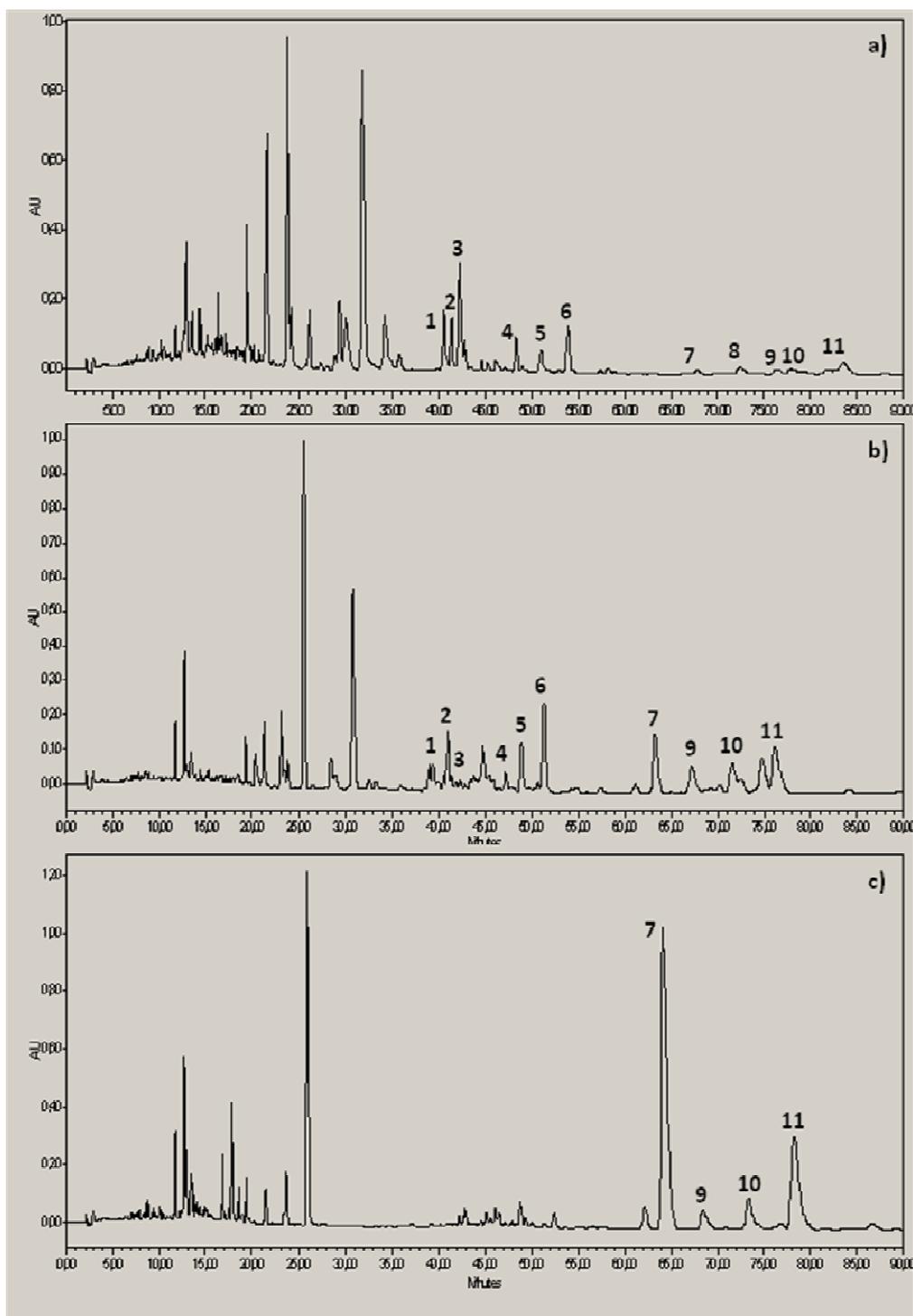


Figure 34 - Chromatogrammes obtenus à 210 nm par CLHP/UV ; colonne RP-18, a) *Boswellia serrata*, b) *B. carterii* et c) *B. frereana*

Dans un second temps, un échantillon de l'oliban commercial de Somalie (Sté Encens du Monde) a été analysé par CLHP/UV en donnant le chromatogramme suivant (Figure 35).

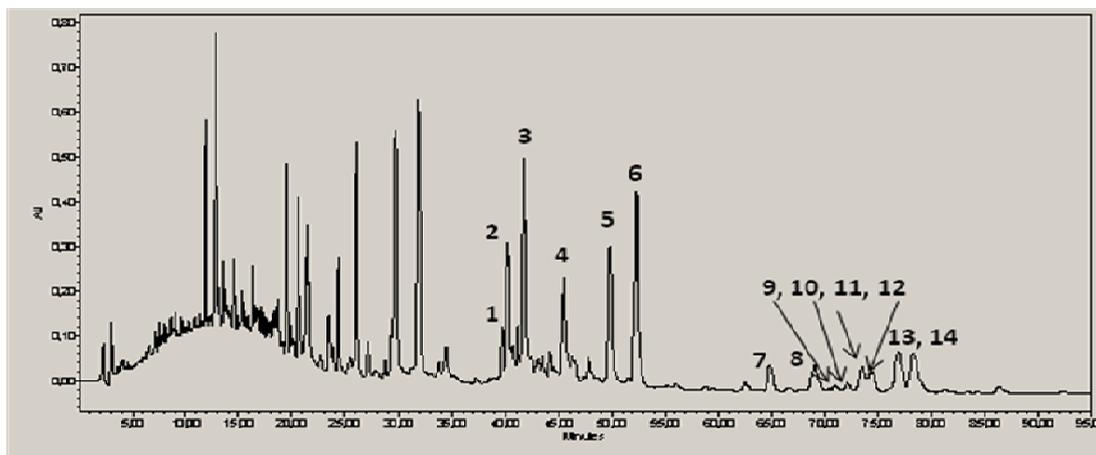


Figure 35 - Chromatogramme obtenu à 210 nm par CLHP/UV pour l'oliban commercial, colonne RP-18

Les 16 composés triterpéniques ont été caractérisés sur ce chromatogramme. Les acides 11-céto- $\beta$ -boswellique (KBA - 15) et 3-O-acétyl-11-céto- $\beta$ -boswellique (AKBA - 16) sont rapportés dans le tableau 27 mais ils ne figurent pas sur les chromatogrammes de l'oliban à 210 nm. Ces deux molécules ont été identifiées à 250 nm (figure 36), par rapport à leur temps de rétention et leurs spectres UV en accord avec la littérature spécialisée (Mathe, 2003).

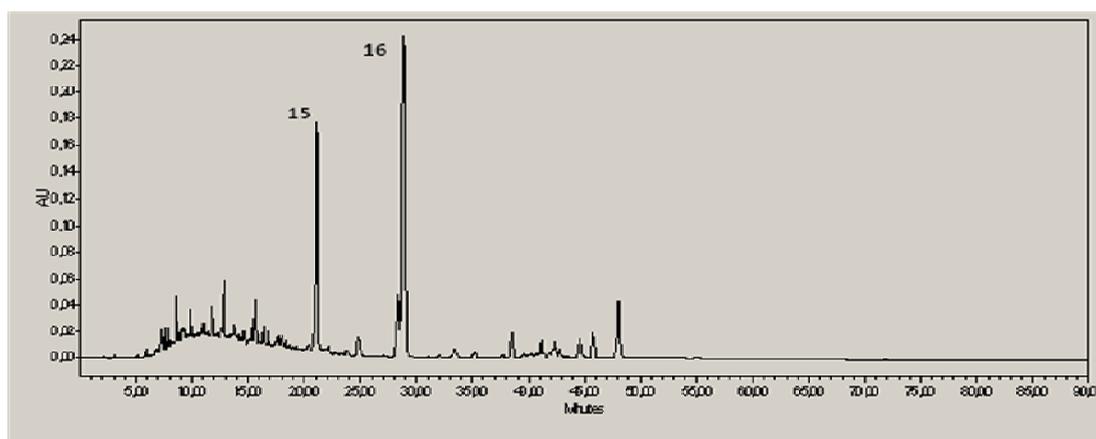


Figure 36 - Chromatogramme obtenu à 250 nm par CLHP/UV pour l'oliban commercial, colonne RP-18

Les composés polaires (de 1 à 6) sont des acides et leurs dérivés acétylés correspondants, forment un groupe de pics entre 37 et 55 minutes. Les triterpènes apolaires (de 7 à 14)

apparaissent entre 63 et 83 minutes. Les composés identifiés sont cités dans le tableau 27 et ils ont été caractérisés à partir de travaux précédents dans notre laboratoire (Mathe, 2003) en comparant le temps de rétention ( $t_R$ ) correspondant et l'ordre d'élution. L'ordre d'élution et la séparation des composés restent cohérents avec les résultats obtenus précédemment. Dans le travail de Mathe C. (2003), dix-neuf composés triterpéniques ont été caractérisés dans l'oliban commercial de Somalie par CLHP/UV avec analyse préalable des molécules standards correspondantes. Les molécules d'acides  $\alpha$ - et  $\beta$ -élémoliques et le lupénone n'ont pas été trouvés dans l'oliban commercial étudié dans ce travail. Le but de cette étude a été d'améliorer les conditions opératoires, surtout au niveau du temps d'analyse (90 minutes) en caractérisant le maximum des composés triterpéniques présents.

N°	Nom du composé	$t_R$ -RP-18(min)
1	Acide lupéolique	39,7
2	Acide $\alpha$ -boswellique	40,2
3	Acide $\beta$ -boswellique	41,8
4	Acide <i>O</i> -acétyl-lupéolique	45,5
5	Acide 3- <i>O</i> -acétyl- $\alpha$ -boswellique	49,8
6	Acide 3- <i>O</i> -acétyl- $\beta$ -boswellique	52,3
7	3- <i>épi</i> -lupéol	64,9
8	Lupéol	68,9
9	$\beta$ -amyrénone	71,0
10	$\alpha$ -amyrénone	72,1
11	3- <i>épi</i> - $\alpha$ -amyrine	73,5
12	3- <i>épi</i> - $\beta$ -amyrine	74,4
13	$\beta$ -amyrine	76,9
14	$\alpha$ -amyrine	78,2
15	Acide 11-céto- $\beta$ -boswellique (KBA)	21,3
16	Acide 3- <i>O</i> -acétyl-11-céto- $\beta$ -boswellique (AKBA)	29,0

Tableau 27 - Liste des composés identifiés dans l'oliban commercial avec leur temps de rétention correspondant pour la colonne RP-18

## b) La dammar et la mastic

Les résines commerciales de dammar (Sté Encens du Monde) et de mastic (Sté Kremer) après avoir été analysées en CLHP/UV sont représentées par les chromatogrammes suivants (Figures 37 et 38).

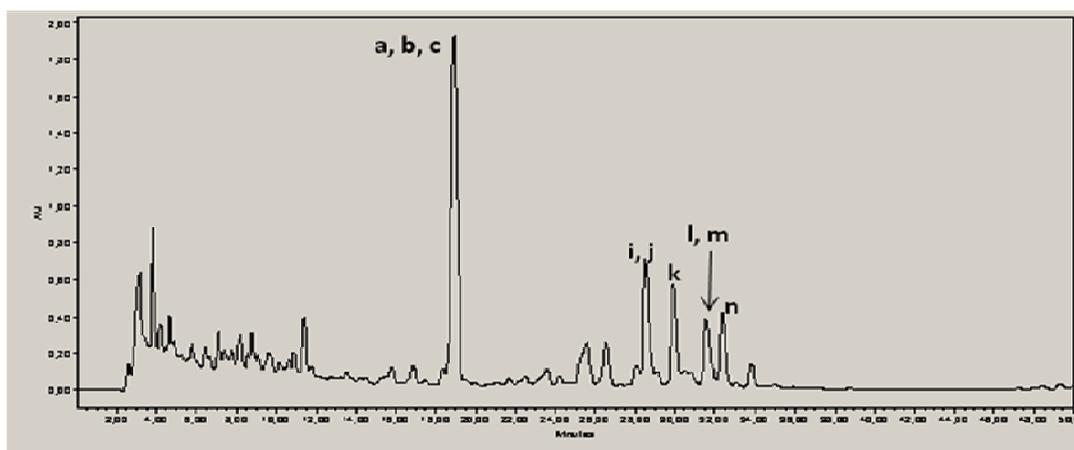


Figure 37 - Chromatogramme obtenu à 210 nm par CLHP/UV pour la dammar commerciale, colonne RP-18

Comme il est mentionné auparavant dans ce manuscrit, les résines de dammar et de mastic contiennent un grand nombre de composés communs. Ils sont indexés ensemble et cités dans le tableau 28. Neuf composés triterpéniques ont été caractérisés dans la résine dammar (Figure 37) à l'aide de la littérature spécialisée (van der Doelen *et al*, 1998), en comparant leurs  $t_R$  correspondants et l'ordre d'éluion. Le pic majoritaire correspond à trois acides dammarénolique, oléanonique et ursonique et il est représenté par **a, b, c**. Ces composés ne peuvent pas être séparés dans ces conditions.

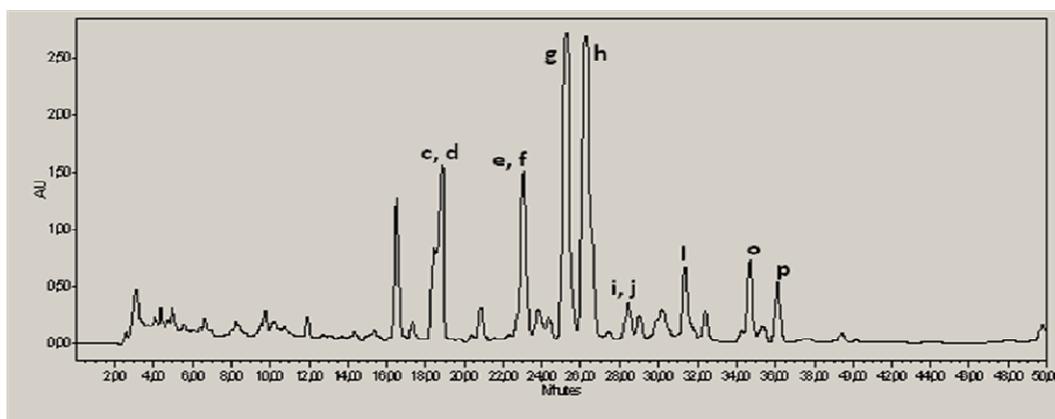


Figure 38 - Chromatogramme obtenu à 210 nm par CLHP/UV pour la mastic commerciale, colonne RP-18

Sur le chromatogramme obtenu après l'analyse de la résine mastic (Figure 38), onze composés triterpéniques ont été identifiés (tableau 28). On a procédé de la même façon comme dans le cas de la résine dammar, pour identifier ces composés, c'est-à-dire, en prenant en considération la littérature spécialisée (van der Doelen *et al*, 1998) et en comparant les  $t_R$  et l'ordre d'élution pour chaque composé. La résine mastic est riche en composés acides comme on peut le voir avec les pics majoritaires (Figure 38) les acides masticadiénolique et isomasticadiénolique (**g** et **h**) et les acides oléanonique et moronique (**c** et **d**). Les acides dammarénolique et ursonique (**a** et **b**), présents dans la résine dammar, sont absents dans la mastic. D'autres équipes travaillant sur la dammar et la mastic (van der Doelen *et al*, 1998) ont identifié les composés présents dans ces deux résines par CLHP, par CLHP-APCI-SM(-SM) et par CPG-SM. En tout, 26 composés ont soit été caractérisés, soit une structure a été supposée (van der Doelen *et al*, 1998). Pour ce travail, une partie des résultats de cette équipe a été comparable avec nos résultats.

N°	Nom du composé	$t_R$ -RP-18(min)
<b>a</b>	Acide dammarénolique	18, 5
<b>b</b>	Acide ursonique	18, 5
<b>c</b>	Acide oléanonique	18, 6
<b>d</b>	Acide moronique	18, 7
<b>e</b>	(3L,8R)-3,8,-Dihydroxypolypoda-13E,17E,21-triène	23, 1
<b>f</b>	(8R)-3-Oxo-8-hydroxypolypoda-13E,17E,21-triène	23, 1
<b>g</b>	Acide (Iso) masticadiénolique	25, 3
<b>h</b>	Acide (Iso) masticadiénolique	26, 3
<b>i</b>	Hydroxydammarénone I ou II	28, 5
<b>j</b>	Hydroxydammarénone I ou II	28, 5
<b>k</b>	Dammarènediols	29, 7
<b>l</b>	Aldéhyde oléanonique	31, 4
<b>m</b>	Dammaradiénol	31, 4
<b>n</b>	Aldéhyde ursonique	32, 2
<b>o</b>	Acide 3-O-acétyl-3-épi (iso) masticadiénolique	34, 8
<b>p</b>	Acide 3-O-acétyl-3-épi (iso) masticadiénolique	36, 3

Tableau 28- Liste des composés identifiés dans les résines commerciales de la dammar et de la mastic avec leur temps de rétention correspondants

Il faut noter que l'identité des composés identifiés dans ce mémoire par CLHP/UV a été confirmée par l'analyse CPG-SM.

### 1.2.3 Etude des résines végétales par CLHP/UV - colonne Kinetex

Comme dans la partie 1.2.2., tous les échantillons des résines commerciales ont été préparés selon le même protocole (PO-3).

#### a) L'oliban

L'oliban a fait l'objet d'une étude préalable au sein du laboratoire. Donc l'objectif de cette partie est de reprendre les résultats obtenus en vue de leur amélioration dans les parties suivantes.

Les trois espèces étudiées, deux botaniquement certifiées *B. carterii* et *B. frereana* (fournis par Dupéron J. et Thulin M.) et une commercialement disponible, *B. serrata* (Sté Scents of Earth, Sun City, Californie, USA), ont été analysées par CLHP/UV, cette fois avec la colonne Kinetex. Les résultats obtenus avec les deux colonnes sont regroupés ci-dessous.

Les chromatogrammes obtenus après l'analyse de l'échantillon de *B. serrata* sont présentés sur la figure suivante (Figure 39) :

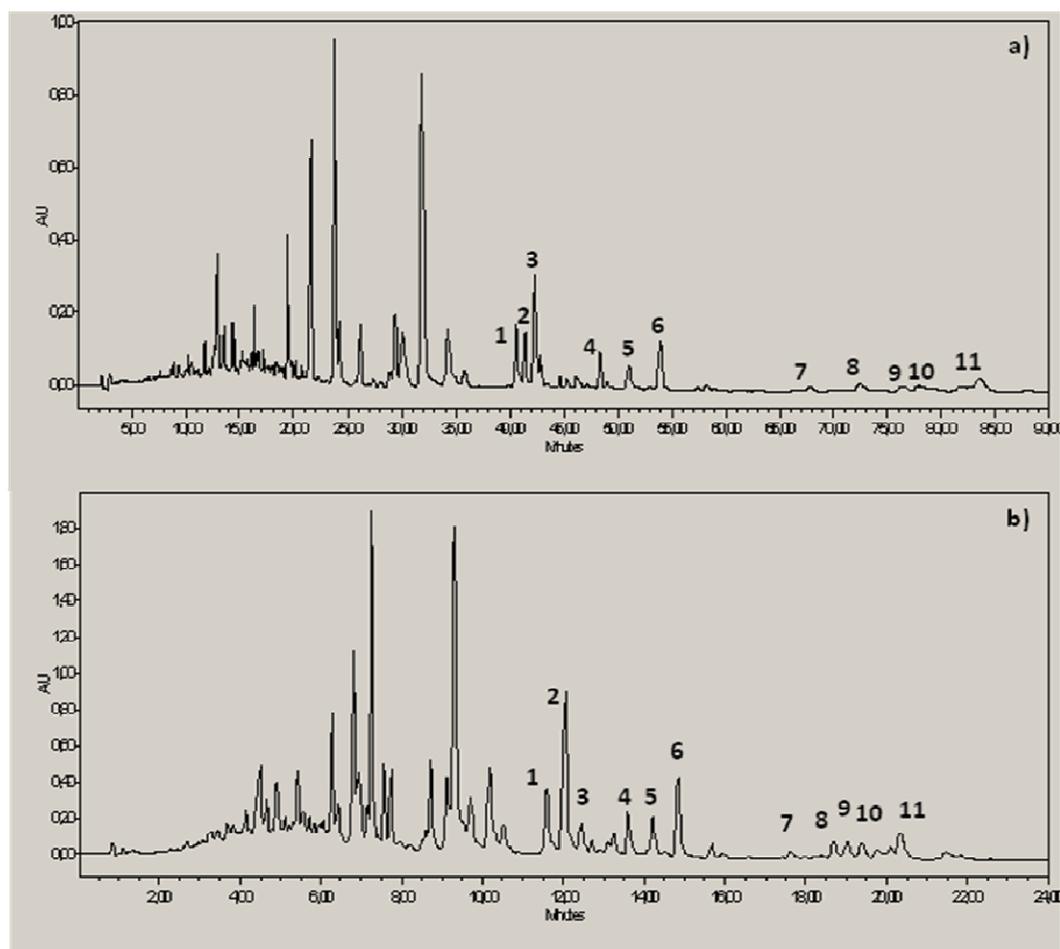


Figure 39 - Chromatogrammes obtenus à 210 nm par CLHP/UV pour *B. serrata*, a) avec la colonne RP-18 et b) avec la colonne Kinetex

Les chromatogrammes obtenus a) et b) sont quasi identiques. On remarque que l'ordre d'éluion et la séparation des pics ne changent pas avec la colonne Kinetex (Figure 39, b) et que les onze composés identifiés sur le chromatogramme a) sont retrouvés et identifiés aussi sur le chromatogramme b) obtenu avec la colonne Kinetex. Néanmoins, le temps d'analyse a significativement changé, de 90 minutes à 24 minutes, ce qui représente une diminution du temps d'analyse de 73,33%. Les temps de rétention pour les onze composés identifiés pour les deux colonnes employées sont donnés dans le tableau 29.

La figure suivante regroupe les chromatogrammes obtenus après l'analyse de *B. carterii* (Figure 40):

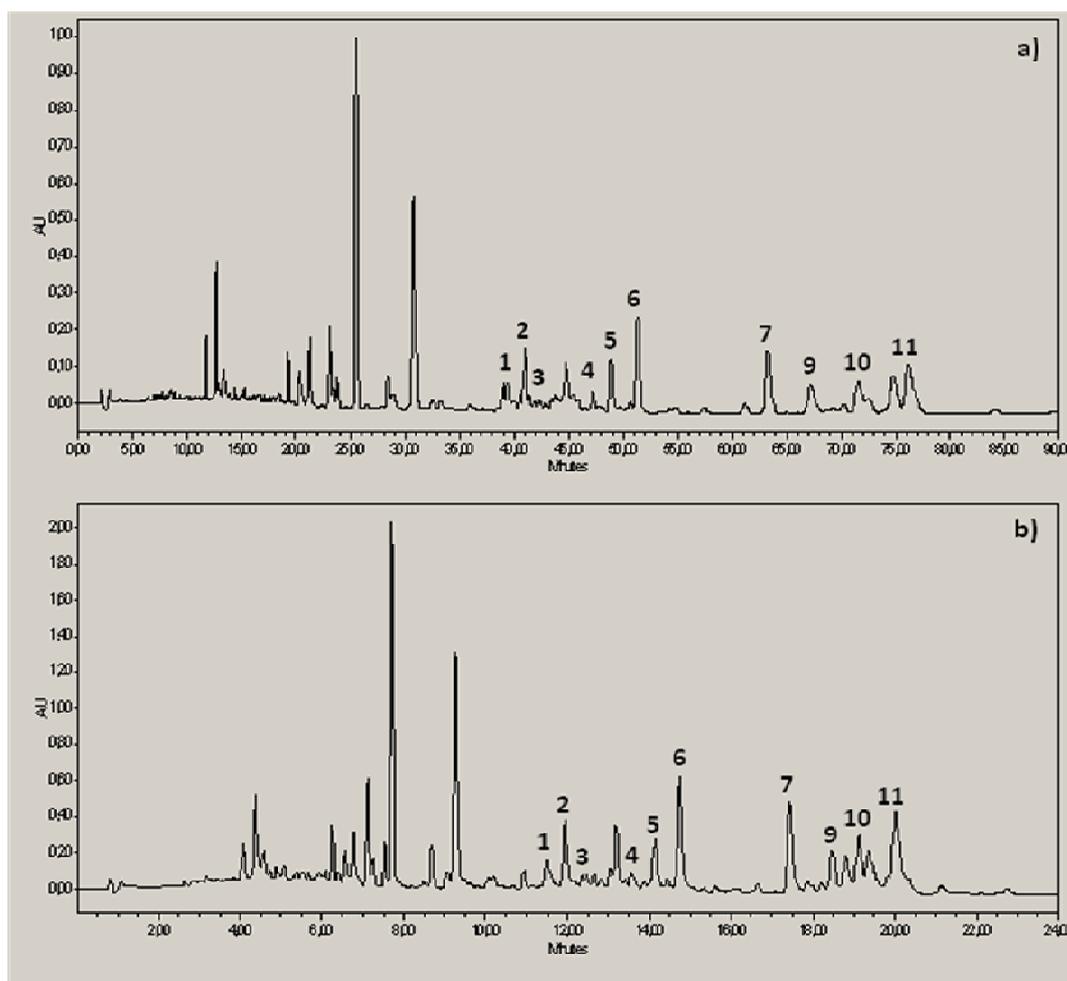


Figure 40 - Chromatogrammes obtenus à 210 nm par CLHP/UV pour *B. carterii*, a) avec la colonne RP-18 et b) avec la colonne Kinetex

En observant les chromatogrammes, on remarque que l'ordre d'élution et la répartition des pics ne changent pas, les chromatogrammes a) et b), sont quasi identiques ce qui est encourageant.

Dans le cas de *B. frereana* (Figure 41), on peut constater la même chose.

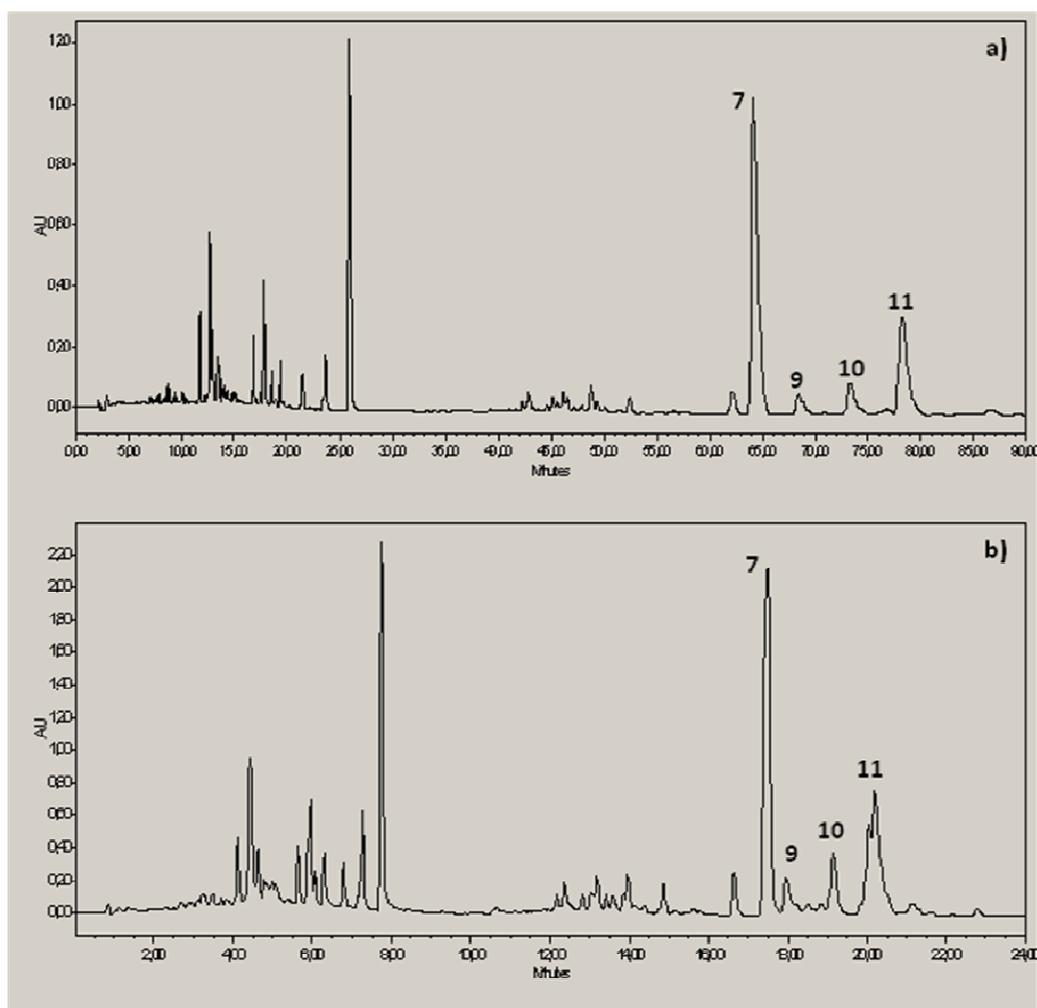


Figure 41 - Chromatogrammes obtenus à 210 nm par CLHP/UV pour *B. frereana*, a) avec la colonne RP-18 et b) avec la colonne Kinetex

Après ces résultats encourageants, un échantillon moyen d'oliban commercial de Somalie (Sté Encens du Monde) est analysé par CLHP/UV. Les chromatogrammes obtenus pour les échantillons préparés sont les suivants (Figure 42).

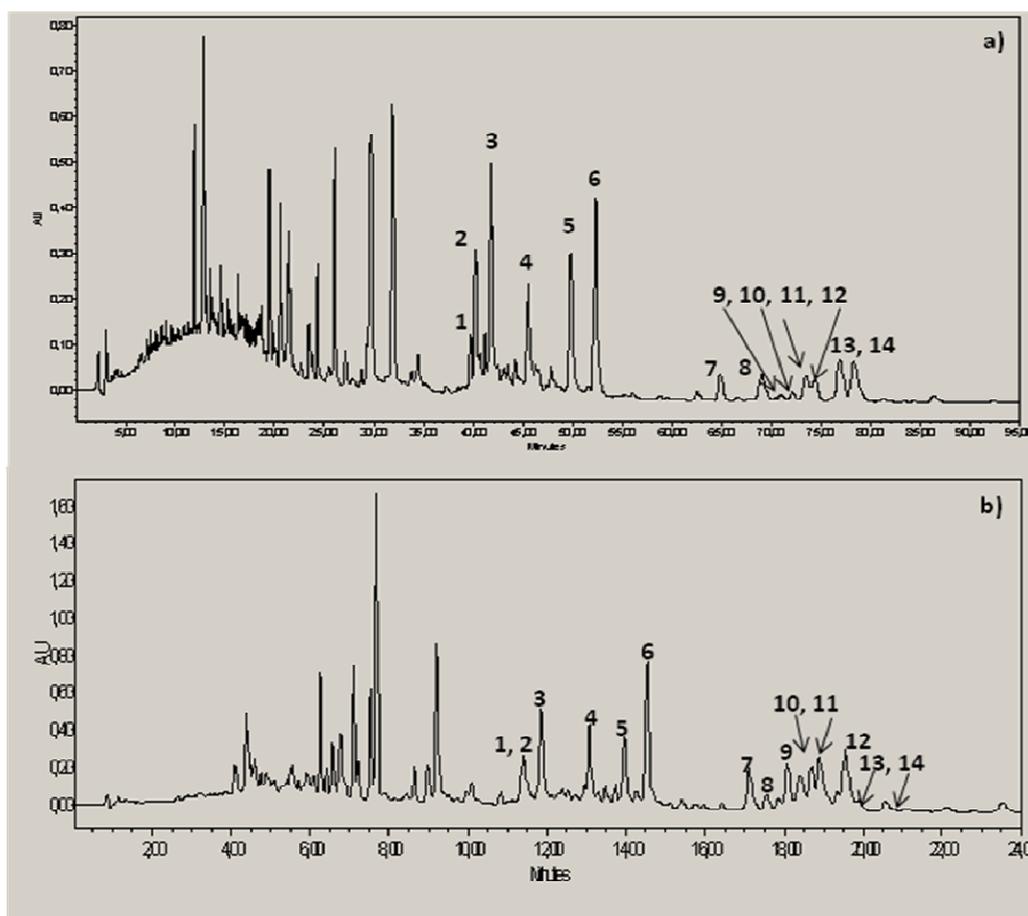


Figure 42 - Chromatogrammes obtenus à 210 nm par CLHP/UV pour l'oliban, a) avec la colonne RP-18 et b) avec la colonne Kinetex

Les composés identifiés dans l'oliban sont regroupés dans le tableau ci-dessous et les temps de rétention correspondants sont donnés pour les deux colonnes employées (tableau 29). Comme il a été précisé dans le chapitre 1 de ce manuscrit les six premiers composés identifiés sont des biomarqueurs de la résine oliban. Les 16 composés triterpéniques ont été caractérisés dans la résine commerciale d'oliban (Figure 42, a) en accord avec les travaux précédents de notre laboratoire et parmi eux les acides KBA (15) et AKBA (16), identifiés à 250 nm (Annexe 3) et donc ils ne figurent pas sur ce chromatogramme à 210 nm (Mathe, 2003). L'identification des composés sur le chromatogramme obtenu avec la colonne Kinetex (Figure 42, b) est basée sur le même principe. A noter que les 16 molécules identifiées dans les conditions initiales (colonne RP-18 classique) ont été également retrouvées sur le chromatogramme issu de l'analyse avec la Kinetex.

N°	Nom du composé	t <sub>R</sub> -RP-18 (min)	t <sub>R</sub> - Kinetex (min)
1	Acide lupéolique	39,7	11,3
2	Acide $\alpha$ -boswellique	40,2	11,3
3	Acide $\beta$ -boswellique	41,8	11,7
4	Acide O-acétyl-lupéolique	45,5	12,9
5	Acide 3-O-acétyl- $\alpha$ -boswellique	49,8	13,7
6	Acide 3-O-acétyl- $\beta$ -boswellique	52,3	14,3
7	3-épi-lupéol	64,9	16,8
8	Lupéol	68,9	17,2
9	$\beta$ -amyrénone	71,0	17,7
10	$\alpha$ -amyrénone	72,1	18,0
11	3-épi- $\alpha$ -amyrine	73,5	18,4
12	3-épi- $\beta$ -amyrine	74,4	19,0
13	$\beta$ -amyrine	76,9	19,4
14	$\alpha$ -amyrine	78,2	19,9
15	Acide 11-céto- $\beta$ -boswellique (KBA)	21,3	7,0
16	Acide 3-O-acétyl-11-céto- $\beta$ -boswellique (AKBA)	29,0	8,8

Tableau 29- Liste des composés identifiés dans l'oliban commercial avec leur temps de rétention correspondant pour les deux colonnes utilisées

Ce changement de colonne n'a donc eu aucune répercussion sur le nombre de composés identifiés. On constate qu'il n'y a pas de perte d'identification, ni de séparation et de résolution. Néanmoins, une réduction du temps d'analyse égale à 73,33% tout en gardant l'ordre d'éluion des pics et leur séparation et répartition sur les chromatogrammes obtenus avec la colonne Kinetex, représente un succès important pour l'analyse par CLHP des matériaux résineux.

### b) La dammar et la mastic

Les échantillons des résines commerciales de la dammar (Sté Encens du Monde) et de la mastic (Sté Kremer) ont été analysés en employant la colonne Kinetex. Les chromatogrammes ont été comparés avec ceux obtenus avec la colonne classique RP-18.

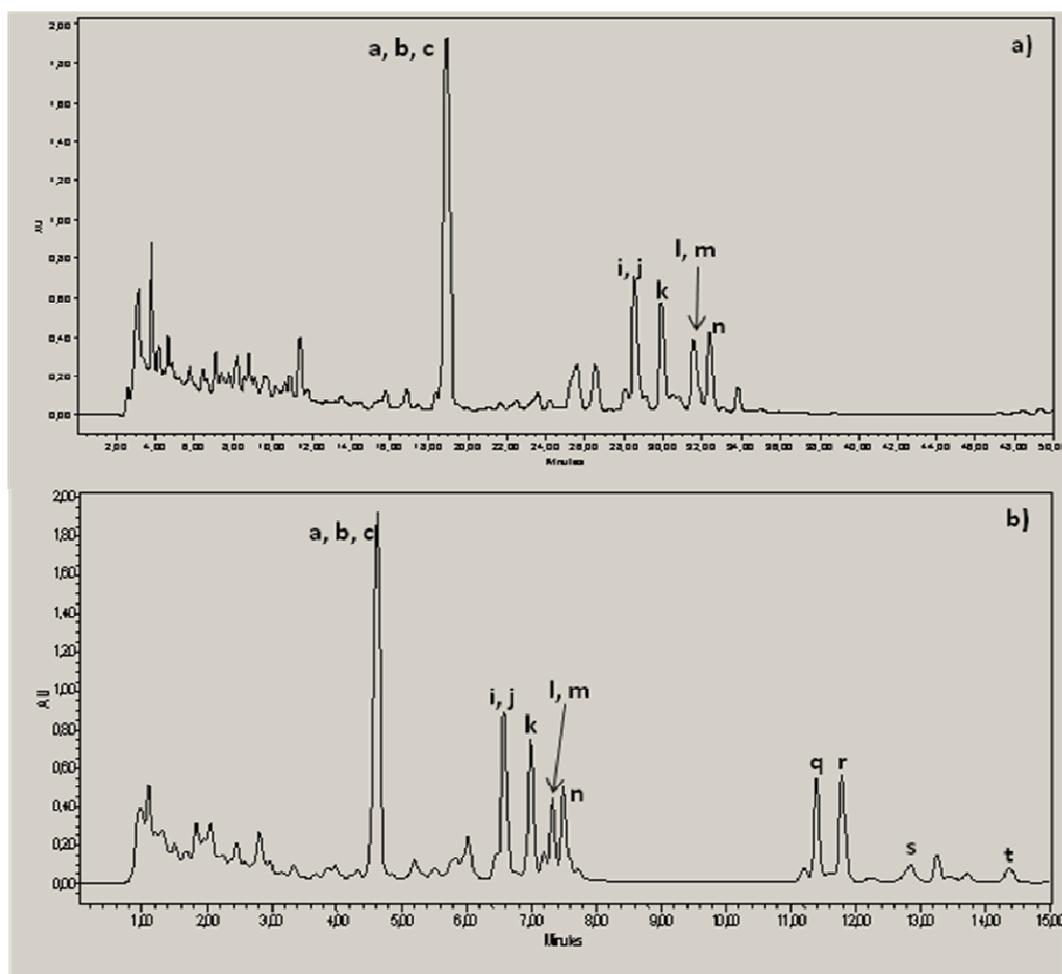


Figure 43 - Chromatogramme obtenu à 210 nm par CLHP/UV pour la dammar - a) avec la colonne RP-18, b) avec la colonne Kinetex

Sur la figure 43 le chromatogramme a) est le résultat obtenu après l'analyse avec la colonne RP-18 avec les 9 molécules identifiées, comme mentionné dans la partie 1.2.1. Le chromatogramme b) montre que la répartition des pics est conservée et aussi l'ordre d'éluion des composés, mais il montre la présence de quatre composés qui n'ont pas été mis en évidence après l'analyse avec la colonne RP-18. Il s'agit d'hydroxyhopanone (**q**), de dammaradiénone (**r**), de lupéol (**s**) et de  $\beta$ -amyrine (**t**), ce qui fait en tout 13 composés triterpéniques caractérisés dans la dammar dans ce travail. Il faut noter que les deux derniers composés ne figurent pas dans la littérature de van der Doelen *et al.* (1998). Ils ont été caractérisés par la co-injection de molécules standards. Le temps d'analyse est diminué de façon importante et dans ce cas précis la réduction de temps d'analyse est égale à 70%.

Les molécules identifiées sur les chromatogrammes correspondants aux analyses des résines dammar et mastic sont citées dans le tableau 30.

N°	Nom de composé	t <sub>R</sub> -RP-18 (min)	t <sub>R</sub> Kinetex (min)
a	Acide dammarénolique	18,5	4,5
b	Acide ursonique	18,5	4,5
c	Acide oléanonique	18,6	4,5
d	Acide moronique	18,7	4,5
e	(3 <i>L</i> ,8 <i>R</i> )-3,8,-Dihydroxypolypoda-13 <i>E</i> ,17 <i>E</i> ,21-triene	23,1	5,5
f	(8 <i>R</i> )-3-Oxo-8-hydroxypolypoda-13 <i>E</i> ,17 <i>E</i> ,21-triene	23,1	5,5
g	Acide (Iso) masticadiénolique	25,3	5,9
h	Acide (Iso) masticadiénolique	26,3	6,2
i	Hydroxydammarénone I ou II	28,5	6,5
j	Hydroxydammarénone I ou II	28,5	6,5
k	Dammarènediole	29,7	6,9
l	Aldéhyde oléanonique	31,4	7,3
m	Dammaradiénole	31,4	7,3
n	Aldéhyde ursonique	32,2	7,4
o	Acide 3- <i>O</i> -acétyl-3- <i>épi</i> (iso) masticadiénolique	34,8	8,3
p	Acide 3- <i>O</i> -acétyl-3- <i>épi</i> (iso) masticadiénolique	36,3	8,7
q	Hydroxyhopanone	-	11,3
r	Dammaradiénone	-	11,7
s	Lupéol	-	12,7
t	β-amyrine	-	14,4

Tableau 30 - Liste des composés identifiés dans les résines commerciales de dammar et la mastic avec leur temps de rétention correspondant pour les deux colonnes utilisées

La figure 44 représente les deux chromatogrammes obtenus après l'analyse de la résine mastic avec la colonne RP-18 et avec la colonne Kinetex.

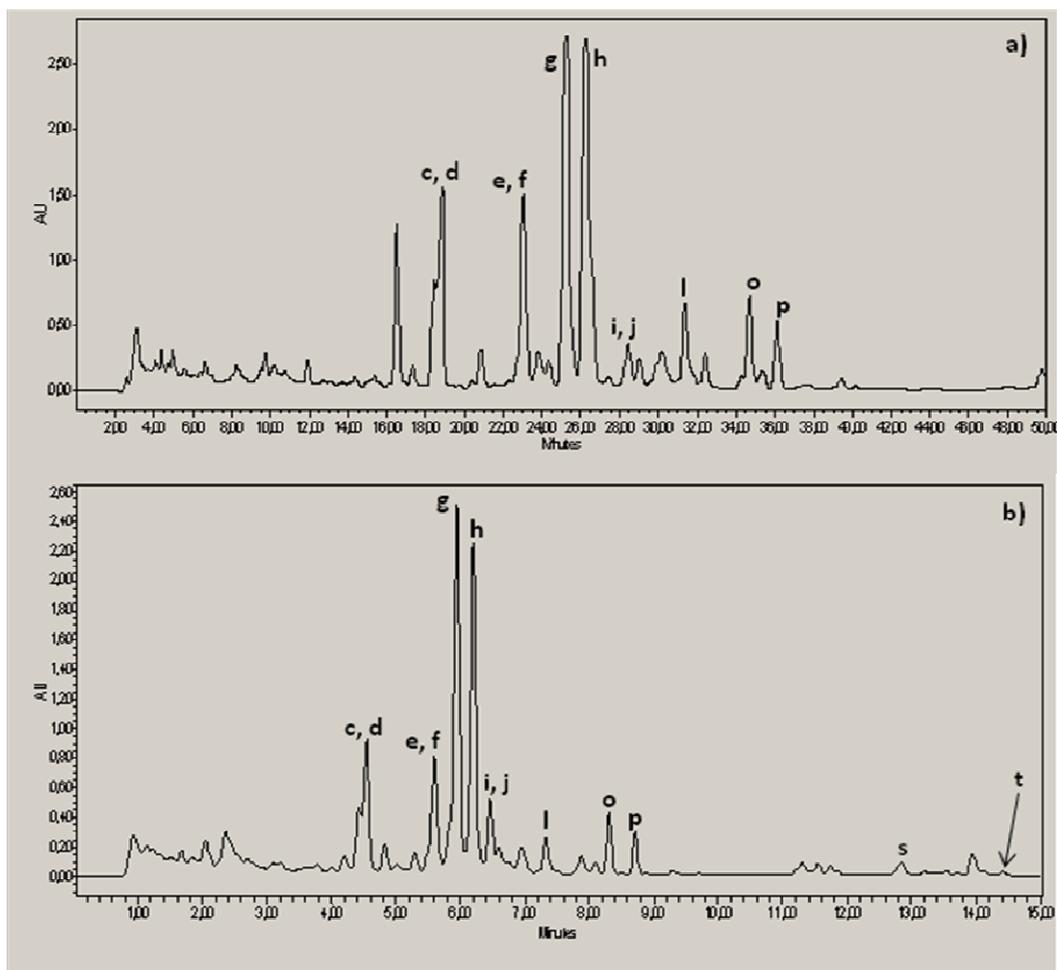


Figure 44 - Chromatogrammes obtenus à 210 nm par CLHP/UV pour la mastic, a) avec la colonne RP-18 et b) avec la colonne Kinetex

L'analyse de la mastic avec la colonne Kinetex (Figure 44, b) révèle la présence de deux composés qui n'ont pas été identifiés avec la colonne RP-18. Il s'agit de lupéol (s) et de  $\beta$ -amyrine (t), ce qui monte le nombre de composés caractérisés dans la mastic à treize. L'ordre d'élution, la séparation des pics et la résolution restent intacts. Cependant, la réduction de temps d'analyse de 70% présente un avantage certain.

### c) Conclusion - Étude par CLHP/UV - colonne Kinetex

Pour conclure, dans cette partie une colonne innovante a été testée, dont les résultats ont été comparés avec ceux obtenus précédemment à l'aide de la colonne classique. La colonne classique RP-18 est traditionnellement employée pour analyser les composés triterpéniques dans les résines d'oliban, de dammar et de mastic (van der Doelen *et al*, 1998; Mathe, 2003). Les résultats obtenus sont très satisfaisants, au niveau du nombre de

composés caractérisés et de leur séparation. Néanmoins, il faut noter que la durée d'analyse est un point à corriger, si possible. Dans le cas de la résine d'oliban, l'analyse dure 90 minutes, dans celui de la dammar et de la mastic 50 minutes. Dans ce travail, on a testé pour la première fois une colonne de nouvelle génération Kinetex supposée diminuer le temps d'analyse. Les résultats obtenus avec la colonne Kinetex sont très encourageants, car le temps d'analyse a été réduit avec succès dans le cas des trois résines étudiées. L'identification des composés a été possible, car l'ordre d'élution des composés et leur séparation et résolution sont restés quasi identiques. Après ces résultats, les analyses suivantes ont été faites en employant systématiquement une colonne, Kinetex.

### 1.2.4 Etude des extraits par CLHP/UV

Les résines végétales, souvent appelées «terpènes» constituent une famille chimique basée sur une unité commune, qui peut donner des structures plus ou moins complexes, selon le degré de polymérisation ou de condensation. Les molécules terpéniques et les molécules non-terpéniques présentes dans ces résines peuvent être séparées selon leur aptitude à se solubiliser dans différents solvants.

Le principal objectif est de repérer les molécules appartenant à la partie triterpénique, qui représente un ensemble de molécules ayant des structures très proches afin d'identifier la résine avec certitude. Dans le but d'obtenir le maximum d'informations au niveau de la composition chimique de la fraction triterpénique, chaque résine étudiée a été extraite selon divers processus d'extraction et dans différents solvants.

Le choix de la technique d'extraction est mené en fonction de la nature de la matière première à étudier. Pour ce travail, l'intérêt s'est porté sur l'extraction solide-liquide, vu que la matière première est un produit solide – la résine naturelle. L'extraction solide-liquide est une des techniques les plus anciennes pour la préparation des échantillons solides (Luque de Castro et Priego-Capote, 2010). Elle sert non seulement à séparer les composés d'intérêt de la fraction insoluble, mais aussi d'autres composés qui pourraient interférer avec les étapes ultérieures du processus analytique (Luque de Castro et Priego-Capote, 2010).

L'objectif de ce travail a été de tester plusieurs techniques d'extraction en modifiant divers paramètres, comme le temps d'extraction et le solvant afin de déterminer le procédé d'extraction ayant le meilleur rendement qualitatif et quantitatif en triterpènes (Figure 45).

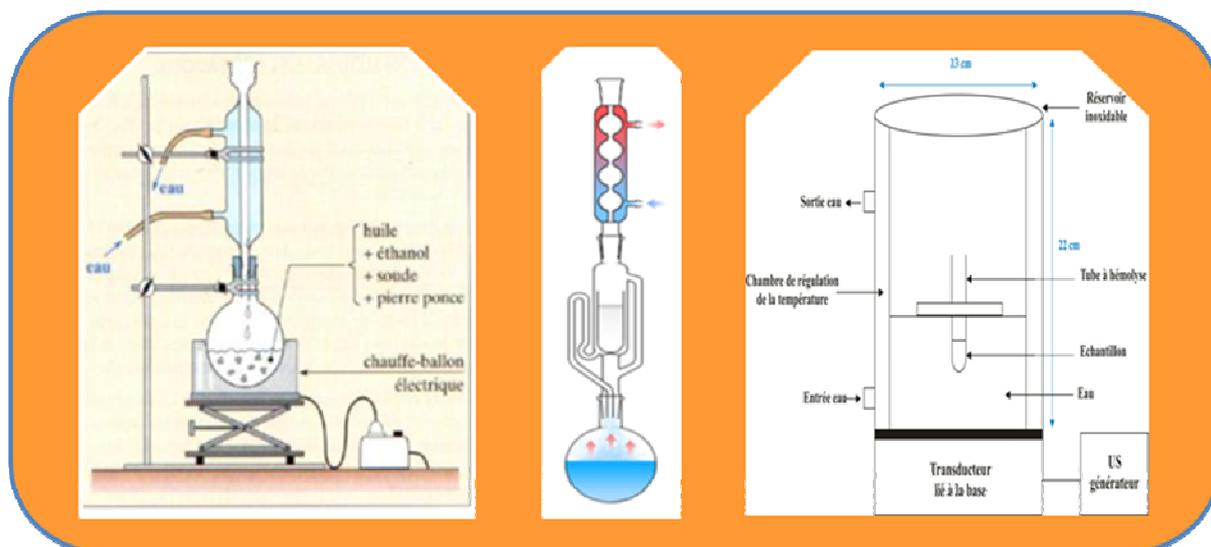


Figure 45 - Schémas des techniques d'extraction utilisées: le montage à reflux, le Soxhlet et le pot à ultrasons

### a) Extraction par reflux

L'extraction par reflux représente une technique classique de référence (Arias *et al*, 2009). Le procédé est employé depuis longtemps pour l'extraction des lipides, des produits naturels, aromatiques et médicinaux, mais aussi des métaux du sol et des sédiments, des additifs polyéthyléniques (Nieuwenhuize *et al*, 1991; Benthin *et al*, 1999; Pan *et al*, 2002; Chen *et al*, 2007; Arias *et al*, 2009).

La quantité de solvant et le temps d'extraction sont importants. Comme pour l'extraction par Soxhlet, cette technique n'est pas conseillée pour l'extraction des composés thermolabiles. Le protocole de préparation exact est donné dans la partie «Matériel et méthodes» (PO-6.1.).

### b) Extraction par Soxhlet

L'extraction à reflux et l'appareil à Soxhlet sont des techniques d'extraction classiques et conventionnelles (Arias *et al*, 2009). L'appareil à Soxhlet a été inventé par Franz von

Soxhlet en 1879 et au début, il a été utilisé pour l'extraction des lipides du lait (Soxhlet, 1879). Le Soxhlet a été la technique standard d'extraction durant plus d'un siècle, notamment pour les lipides et les plantes aromatiques et médicinales (Luque de Castro et García-Ayuso, 1998; Handa *et al*, 2008; Luque de Castro et Priego-Capote, 2010). Presque toutes les comparaisons avec les autres méthodes d'extraction ont été faites par rapport à cette technique qui a évolué au cours de temps. Les changements rapportés durant ces dernières décennies ont eu pour but de rapprocher cette méthode conventionnelle des nouvelles techniques avec une réduction du temps d'extraction, l'utilisation des énergies auxiliaires et l'automatisation de l'ensemble d'extraction (Priego-López *et al*, 2003 ; Viot *et al*, 2007 ; Luque de Castro et Priego-Capote, 2010).

Les avantages de cette technique résident dans le fait que la matière première est en contact permanent avec le solvant et une fois l'extraction finie, la filtration de l'extrait n'est pas nécessaire (Luque de Castro et Priego-Capote, 2010). Le protocole de préparation est donné dans la partie «Matériel et méthodes» de ce manuscrit (PO-6.2.).

Les inconvénients viennent surtout du temps d'extraction généralement long et de la quantité de solvant pour l'extraction importante et dépendante de la quantité de matière première. L'agitation n'est pas possible avec cette technique et elle n'est pas conseillée dans le cas de composés thermolabiles (Luque de Castro et García-Ayuso, 1998).

De nombreux auteurs ont utilisé cette technique pour l'extraction des matériaux résineux, avec divers solvants (Benthin *et al*, 1999; Pan *et al*, 2002; Priego-López *et al*, 2003; Viot *et al*, 2007; Hernández-Vázquez *et al*, 2010; Paul *et al*, 2011).

### c) Extraction par ultrasons

Les ultrasons sont des vibrations mécaniques (acoustiques) ayant une fréquence à partir de 15 000 Hz qui se propagent dans le milieu matériel (ils ne se propagent pas dans le vide) et ils sont inaudibles pour l'oreille humaine (Lefebvre *et al*, 2004). Ils sont largement employés dans les laboratoires, dans les domaines de la chimie et de la biologie, car ils ont le pouvoir de rompre les membranes cellulaires et les agrégats moléculaires. Ils furent découverts en 1883 par Francis Galton, un physiologiste anglais. L'influence positive des ultrasons dans l'extraction par rapport aux méthodes classiques a été découverte durant les années 70 (Chatot *et al*, 1971).

Dans notre travail, les ultrasons ont été utilisés pour optimiser l'extraction des triterpènes à partir des résines naturelles. Le protocole initial a été développé et utilisé pour l'extraction des résines d'origine végétale dans notre laboratoire (Culioli *et al*, 2003; Hovaneissian *et al*, 2006; Hovaneissian *et al*, 2007). L'avantage principal de l'extraction aidé par les ultrasons est surtout la durée de processus, qui diminue d'un facteur important par rapport aux deux méthodes décrites précédemment. Cette technique est employée aussi avec les composés thermolabiles, car il n'y a pas besoin de chauffer le mélange réactionnel durant l'extraction. La source à ultrasons employée est un prototype utilisé initialement dans notre laboratoire pour l'extraction des colorants naturels d'origine végétale (Cuoco, 2009). Le protocole de préparation exact est donné dans la partie «Matériel et méthodes» (PO-6.3.).

### d) Solvants utilisés

Concernant les composés organiques, la structure et la présence des groupements fonctionnels au sein d'une molécule déterminent son comportement dans les réactions chimiques et dans les processus physiques, comme son aptitude à se solubiliser ou non dans un solvant. La structure de la molécule et les liaisons chimiques présentes vont définir sa polarité par rapport à laquelle il faut établir le choix du solvant.

Le squelette triterpénique présente une structure rigide à caractère apolaire, très peu fonctionnalisée. Néanmoins, les groupements fonctionnels qui sont rencontrés dans ces molécules, sont très polaires, comme les groupements hydroxyle ou acide carboxylique. Les autres groupements fonctionnels fréquemment présents sont des cétones, des aldéhydes, des esters et des éthers oxydes.

L'accent de ce travail est mis sur les molécules triterpéniques et le premier défi a été d'essayer de les extraire et de les séparer du reste de la matrice, afin de pouvoir les analyser qualitativement. La partie extraction constitue donc une étape très importante pour la suite, la qualité de l'analyse et des résultats obtenus dépendent fortement du protocole d'extraction employé et du choix de solvant utilisé.

Trois solvants ont été employés pour l'extraction des molécules triterpéniques: le méthanol, le n-hexane et le d-limonène (énantiomère R-(+)). Les résultats obtenus avec les

deux premiers solvants cités vont être présentés dans cette partie. Les résultats obtenus après l'extraction de trois résines en d-limonène seront discutés dans la partie 2.

- **Le méthanol**

Le méthanol est employé couramment dans notre laboratoire pour extraire et dissoudre la partie terpénique des matériaux résineux (Culioli *et al*, 2003.; Hovaneissian *et al*, 2006.; Hovaneissian *et al*, 2007). C'est un solvant polaire (moment dipolaire:  $1,70 \pm 0,02$  D) c'est-à-dire que la fraction résineuse va se solubiliser dans le méthanol et la partie non-résineuse va rester sous forme de précipité. Il suffit de filtrer l'échantillon après dissolution et les molécules terpéniques sont prêtes à être analysées.

Les avantages du méthanol sont surtout son excellent pouvoir de dissolution des molécules terpéniques grâce à son caractère protique et coordinant, sa sélectivité mais aussi sa température d'ébullition ( $T^{\circ}\text{ébullition}$ :  $65^{\circ}\text{C}$ ; viscosité  $0,5513$  mPa·s à  $25^{\circ}\text{C}$ ), ce qui permet de l'éliminer assez facilement et rapidement après l'extraction.

Le méthanol est une substance très facilement inflammable. Son grand inconvénient est sa toxicité pour l'homme. Il peut provoquer, surtout par ingestion et inhalation, des troubles digestifs, métaboliques, neuropsychiques, oculaires et même la mort. Concernant l'environnement, le méthanol présent dans les eaux douces ou salées peut avoir des effets sérieux sur la vie aquatique. Cependant il est plus recommandé que les solvants provenant de processus de raffinage de pétrole.

- **Le n-hexane**

Un solvant apolaire comme le n-hexane est utilisé pour extraire la partie résineuse des sources végétales (Hernández-Vázquez L. *et al.*, 2010). Dans ce travail, le n-hexane a été choisi pour comparer son pouvoir d'extraction par rapport à celui du méthanol au niveau qualitatif et quantitatif, surtout pour la partie triterpénique peu fonctionnalisée et la moins polaire, comme les  $\alpha$ - et  $\beta$ -amyrines et d'autres molécules similaires. Ses propriétés physiques ( $T^{\circ}\text{ébullition}$ :  $68,73^{\circ}\text{C}$  ; viscosité  $0,309$  mPa·s à  $24,95^{\circ}\text{C}$ ) et chimiques (moment dipolaire :  $0,09$  D) le destinent comme un bon solvant apolaire, assez facile à éliminer après l'extraction.

Sa toxicité pour l'homme est reconnue, comme pour tous produits issus du raffinage du pétrole, par inhalation à long terme (atrophie des muscles squelettiques et échec du système nerveux périphérique). Il est aussi facilement inflammable et très toxique pour l'environnement.

### e) Etude des rendements des extraits obtenus

Une étude de rendement a été systématiquement menée pour l'extraction des trois résines selon les trois protocoles. Le principe du calcul est basé sur la différence entre la masse initiale de résine utilisée et le résidu sec obtenu après extraction. Les paramètres du temps et du solvant d'extraction ont été testés afin d'obtenir le meilleur rendement d'extraction.

La différence entre une durée de 4h et 12 h d'extraction n'étant pas significative au niveau du rendement obtenu, l'ensemble des expérimentations a donc été ciblée sur un temps d'extraction de 4h.

Les résultats obtenus pour les trois résines étudiées en faisant varier la nature du solvant (n-hexane et méthanol) sont présentés dans le tableau suivant (tableau 31) :

Rendement d'extraction (%)

Technique d'extraction	Solvant	Oliban	Dammar	Mastic
Reflux	méthanol	70,03	76,72	94,44
	n-hexane	55,77	67,05	37,73
Soxhlet	méthanol	71,01	84,64	94,31
	n-hexane	67,93	54,67	53,56
Ultrasons	méthanol	82,44	67,73	96,14
	n-hexane	42,12	36,61	24,46

Tableau 31 - Rendement d'extraction de trois résines par les trois techniques en faisant varier la nature du solvant d'extraction

Les trois techniques d'extraction préalablement citées ont été testées: le reflux, le Soxhlet et les ultrasons en faisant varier la nature du solvant d'extraction (méthanol ou n-hexane). Du point de vue quantitatif, on observe une différence entre les extraits au méthanol et les extraits au n-hexane. L'influence du solvant est évaluée par le calcul des différences de rendement entre le n-hexane et le méthanol.

Les résultats d'extraction par reflux montrent aussi une dissemblance entre ceux obtenus avec le méthanol et ceux obtenus avec le n-hexane. Les calculs d'influence du solvant sont les suivants: pour l'oliban l'écart est de 14,26%, pour la dammar 9,67% et pour la mastic 56,71%.

Dans le cas de l'extraction par Soxhlet, pour l'oliban l'influence des deux solvants est peu significative avec une différence de 3,08% entre les deux solvants. Par contre, l'écart se creuse grandement pour les deux autres matériaux résineux, il est de 29,97% et de 40,75% respectivement pour la dammar et la mastic.

Pour l'extraction par ultrasons, la différence des résultats obtenus est de 40,32% pour l'oliban, de 31,12% pour la dammar et de 71,68% pour la mastic.

### **f) Etude analytique des extraits d'oliban**

L'oliban commercial de Somalie (Sté Encens du Monde) a été extrait en reflux et en Soxhlet, avec deux solvants différents, en méthanol et en n-hexane. Les extraits ainsi obtenus ont été analysés par CLHP/UV en employant la colonne Kinetex comme phase stationnaire.

Il faut noter que la préparation d'échantillon avec l'extraction en ultrasons est un protocole couramment utilisé dans notre laboratoire et il ne sera pas présenté particulièrement dans cette partie. Les résultats présentés dans les parties 1.2.2. et 1.2.3. sont obtenus après la préparation des échantillons selon ce protocole (PO-3).

- Extraits au reflux

Les chromatogrammes obtenus après l'analyse des extraits sont regroupés sur la figure 46.

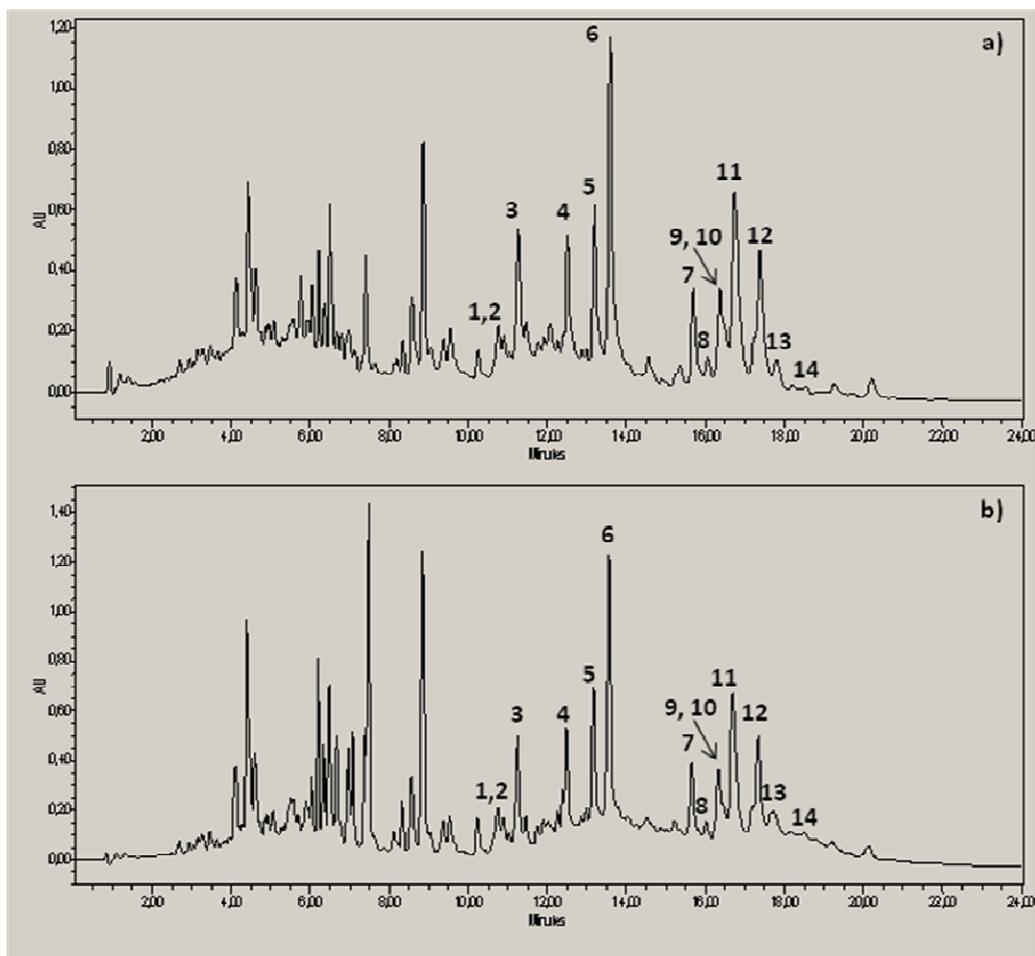


Figure 46 - Chromatogrammes obtenus à 210 nm par CLHP/UV pour les extraits de l'oliban au reflux, a) avec le méthanol et b) avec le n-hexane

En accord avec les résultats présentés dans la partie 1.2.3., sur les chromatogrammes a) et b) de la figure 46, les 16 composés triterpéniques ont été identifiés (tableau 29). Les deux solvants d'extraction employés, le méthanol et le n-hexane, extraient les molécules triterpéniques dans la mesure où elles peuvent être identifiées. Dans le cas de l'extraction au méthanol, (a) on peut constater qu'il extrait bien les composés acides et leurs dérivés (de 1 à 6) qui sont plus polaires, ce qui était attendu. Mais ce solvant se montre aussi approprié pour l'extraction des composés apolaires (7-14). En ce qui concerne l'extrait obtenu en n-hexane, on peut dire aussi qu'il extrait assez bien les composés plus polaires (1-6) et ceux qui sont apolaires (7-14). Ces deux solvants sont différents au niveau de leur polarité (le méthanol-polaire, le n-hexane-apolaire) et il était attendu qu'ils extraient mieux les composés en accord avec leur polarité. Sur les chromatogrammes obtenus un tel effet n'est pas flagrant.

- Extraits au Soxhlet

Les résultats obtenus après les analyses des extraits sont présentés sur la figure 47.

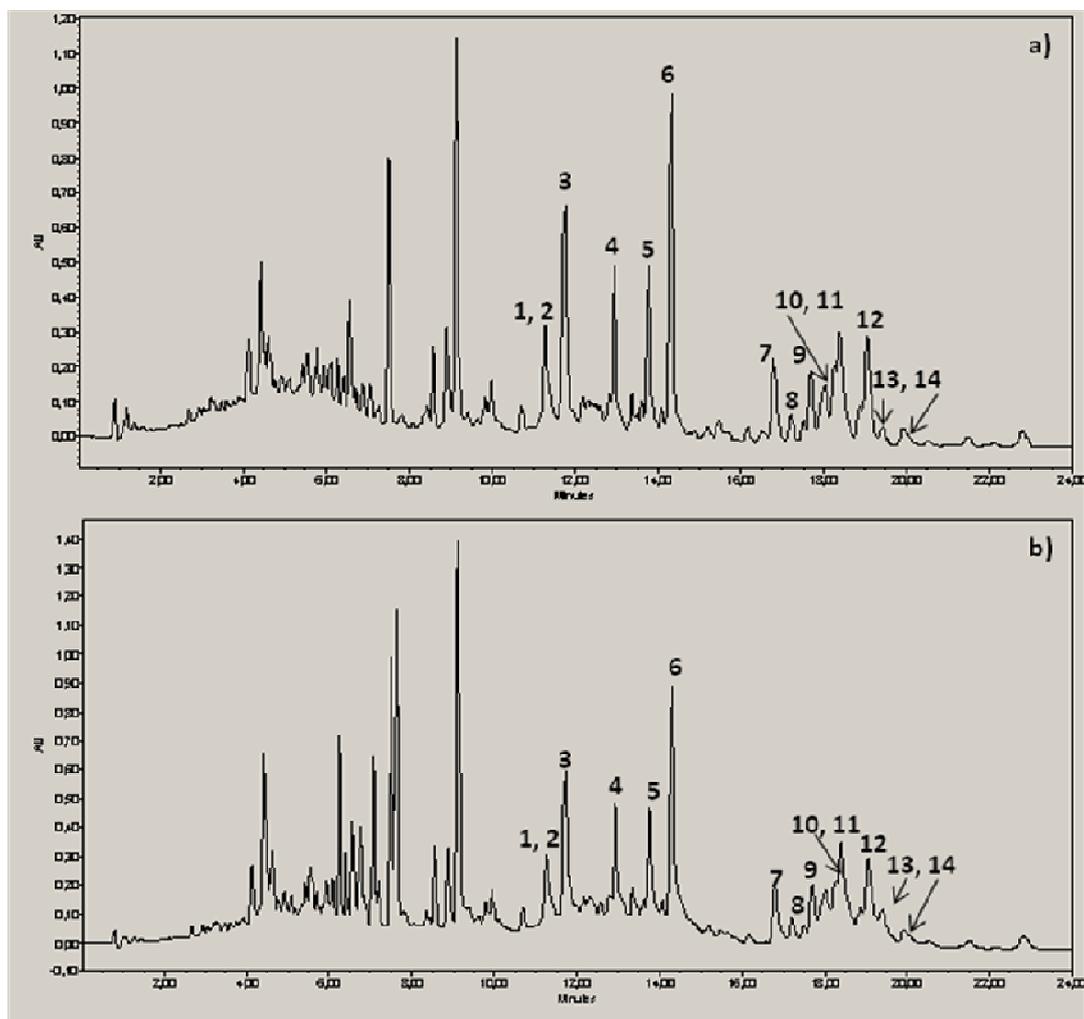


Figure 47 - Chromatogrammes obtenus à 210 nm par CLHP/UV pour les extraits de l'oliban au Soxhlet, a) avec le méthanol et b) avec le n-hexane

Comme dans le cas d'extraction au reflux, sur les chromatogrammes a) et b) (Figure 47) obtenus après l'analyse des extraits en Soxhlet, l'identification de seize molécules (tableau 29) triterpéniques a été faite en comparaison avec des résultats obtenus précédemment (Mathe, 2003; partie 1.2.3.). On peut constater que les deux chromatogrammes obtenus se ressemblent. Comme dans le cas de l'analyse des extraits obtenus en reflux, on ne peut pas observer l'effet de solvant utilisé sur l'extraction des molécules en accord avec sa polarité. L'extraction en méthanol (Figure 47, a) offre une meilleure séparation des composés apolaires (de 7 à 14) que l'extraction en n-hexane

(Figure 47, b). En comparant les résultats des extraits obtenus en reflux et ceux obtenus en Soxhlet, la séparation des pics sur les chromatogrammes a) et b) (Figure 47) est meilleure que dans le cas d'extraction en reflux (Figure 46).

Une étude quantitative *via* le pourcentage d'aire relatif des composés étudiés a été réalisée afin de faire une corrélation entre le solvant et le procédé d'extraction employés. Le tableau 32 représente l'aire moyenne du pic correspondant à chaque molécule triterpénique identifiée en fonction du procédé et du solvant d'extraction utilisés. Sur la figure 48 les mêmes résultats quantitatifs sont présentés sous la forme d'un diagramme, qui permet une comparaison directe entre les quantités totales extraites pour chaque molécule étudiée par rapport au procédé d'extraction utilisé. Les numéros sur la figure 48 correspondent aux molécules étudiées et ils sont en accord avec la liste des molécules identifiées du tableau 29.

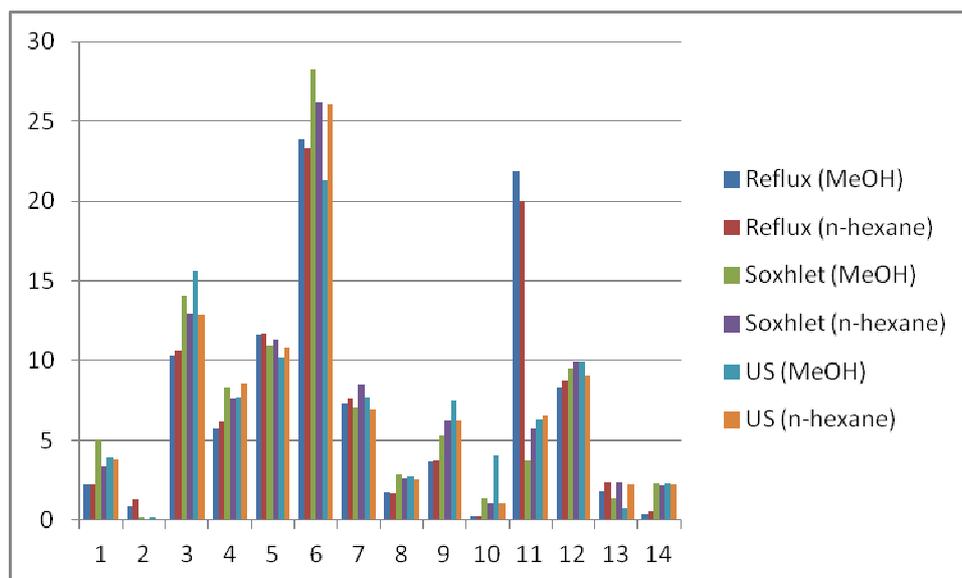


Figure 48 - Comparaison de l'aire moyenne des pics en fonction du procédé et du solvant d'extraction pour l'oliban (légende : abscisse - N° molécule (cf. tableau 32) ; ordonné : quantité extraite pour chaque molécule par trois procédés d'extractions et en deux solvants)

L'interprétation des données issues du tableau 32 traduisent que globalement ni la nature du solvant ni celle du procédé d'extraction employé semblent influencer significativement le pourcentage de l'aire relatif des composé étudiés. En effet, pour une même molécule, les différences observées sont faibles (inférieures à 2-5%). Cependant,

pour la 3-*épi*- $\alpha$ -amyrine (**11**) une nette augmentation de son % d'aire relatif est observé par extraction au reflux : +19% par rapport au Soxhlet et aux U.S et ce quel que soit le solvant utilisé. Le procédé d'extraction semble donc avoir une importance significative uniquement sur la quantité de 3-*épi*- $\alpha$ -amyrine (**11**) extraite.

Composé		% d'aire relatif en fonction du procédé d'extraction					
N°	Nom	Reflux		Soxhlet		Ultrasons	
		Méthanol	n-Hexane	Méthanol	n-Hexane	Méthanol	n-Hexane
1	Acide lupéolique	2,2	2,2	5,0	3,3	3,9	3,8
2	Acide $\alpha$ -boswellique	0,9	1,3	0,1	0,1	0,1	0,1
3	Acide $\beta$ -boswellique	10,4	10,6	14,1	12,9	15,6	12,9
4	Acide O-acétyl-lupéolique	5,8	6,2	8,3	7,6	7,7	8,5
5	Acide 3-O-acétyl- $\alpha$ -boswellique	11,6	11,7	11,0	11,3	10,2	10,8
6	Acide 3-O-acétyl- $\beta$ -boswellique	23,9	23,3	28,2	26,2	21,3	26,0
7	3-épi-lupéol	7,3	7,6	7,0	8,5	7,7	6,9
8	Lupéol	1,7	1,6	2,9	2,6	2,7	2,5
9	$\beta$ -amyrénone	3,7	3,7	5,3	6,2	7,5	6,2
10	$\alpha$ -amyrénone	0,2	0,2	1,3	1,1	4,1	1,0
11	3-épi- $\alpha$ -amyrine	21,9	20,0	3,7	5,7	6,3	6,5
12	3-épi- $\beta$ -amyrine	8,3	8,7	9,5	9,9	10,0	9,0
13	$\beta$ -amyrine	1,9	2,4	1,4	2,4	0,7	2,2
14	$\alpha$ -amyrine	0,4	0,6	2,3	2,1	2,3	2,2

Tableau 32 – Etude quantitative de l'oliban par CLHP : % d'aire relatif en fonction du procédé et du solvant d'extraction

### g) Etude analytique des extraits de la dammar

La résine commerciale de dammar (Sté Encens du Monde) a été extraite au reflux et en Soxhlet, dans deux solvants différents, en méthanol et en n-hexane. Les extraits ainsi obtenus ont été analysés par CLHP/UV en employant la colonne Kinetex.

Il faut noter que la préparation d'échantillon avec l'extraction aux ultrasons est un protocole couramment utilisé dans notre laboratoire et il ne sera pas présenté particulièrement dans cette partie. Les résultats rapportés dans les parties 1.2.2. et 1.2.3. sont obtenus avec la préparation des échantillons selon ce protocole (PO-3).

- Extraits au reflux

Les chromatogrammes obtenus avec l'extraction au reflux sont rassemblés sur la figure 49.

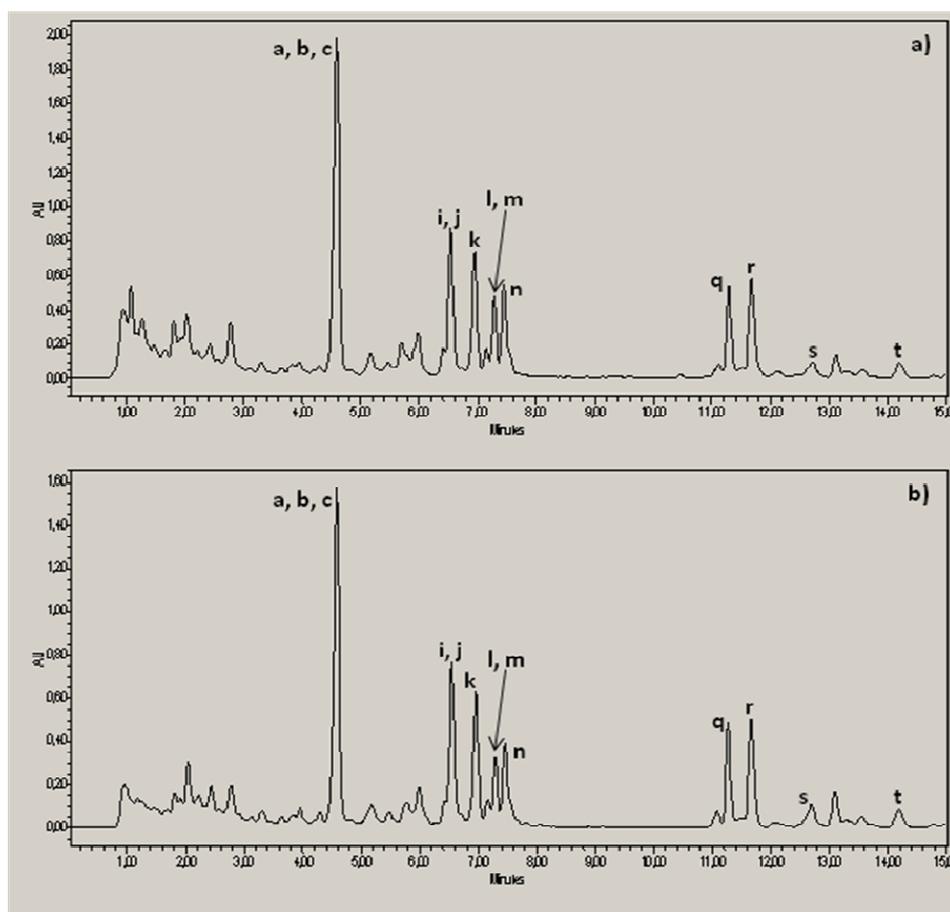


Figure 49 - Chromatogrammes obtenus à 210 nm par CLHP/UV pour les extraits de la dammar au reflux, a) en méthanol et b) en n-hexane

Les deux chromatogrammes a) et b) sur la figure 49 montrent une grande ressemblance. Les 13 composés triterpéniques ont été identifiés sur ces chromatogrammes à l'aide de la littérature spécialisée, en comparant les  $t_R$  correspondants (tableau 30) et la répartition des pics. La séparation des composés est convenable sur les deux chromatogrammes, ce qui signifie que les deux solvants utilisés sont satisfaisants pour l'extraction des composés triterpéniques. Néanmoins, l'aptitude des solvants utilisés à extraire les composés en accord avec leur polarité n'est pas évidente sur la figure 49.

- Extraits au Soxhlet

Les extraits obtenus ont été analysés par CLHP/UV et la figure 50 regroupe les chromatogrammes obtenus.

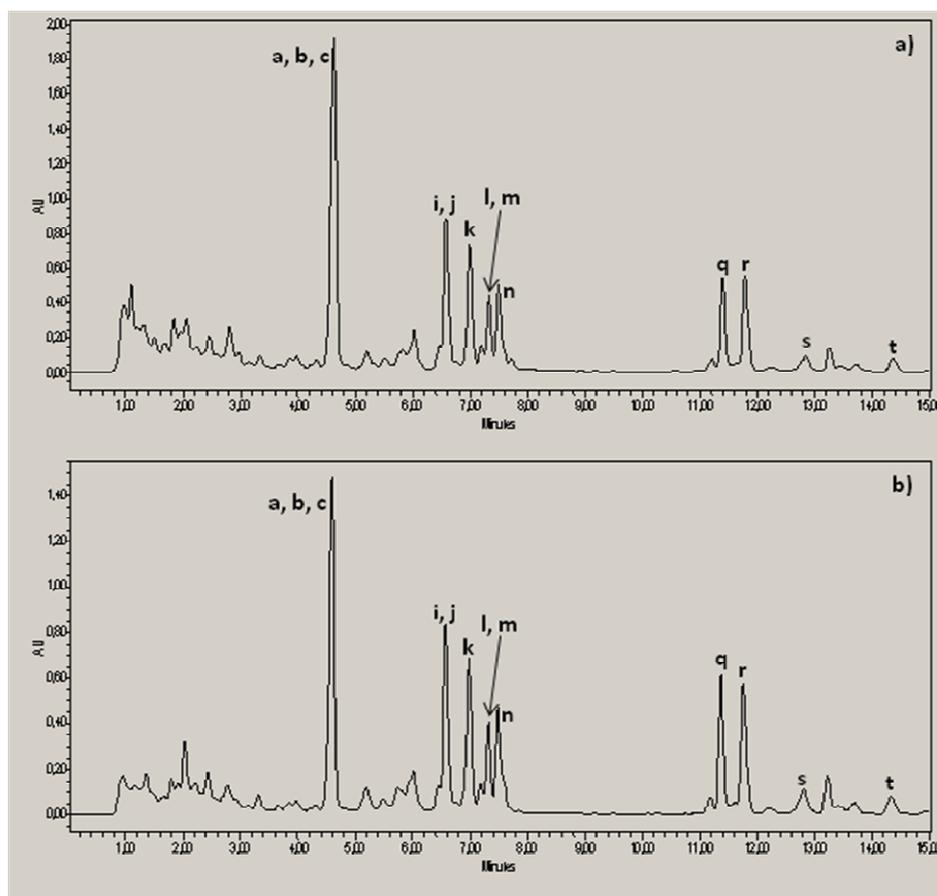


Figure 50 - Chromatogrammes obtenus à 210 nm par CLHP/UV pour les extraits de la dammar au Soxhlet, a) en méthanol et b) en n-hexane

Comme pour les extraits au reflux, ici sur les chromatogrammes a) et b) on a retrouvé et identifié les 13 molécules triterpéniques en accord avec la littérature spécialisée et en

comparant des données spécifiques ( $t_R$ , tableau 30)(Figure 50). La séparation des pics obtenus sur le chromatogramme a) avec le méthanol comme solvant d'extraction est correct et satisfaisant. La même chose s'applique au chromatogramme b) obtenu après l'extraction en n-hexane. On n'observe pas qu'un des solvants employés pour l'extraction de la partie triterpénique change l'ensemble des composés extraits, malgré le fait qu'ils ont des polarités différentes.

Comme dans le cas de la résine oliban, une étude quantitative a été réalisée en comparant l'aire moyenne du pic de chaque composé triterpénique identifié dans la dammar en fonction du procédé et du solvant d'extraction utilisé. Les résultats sont présentés dans le tableau 33 et une représentation graphique est donnée sur la figure 51.

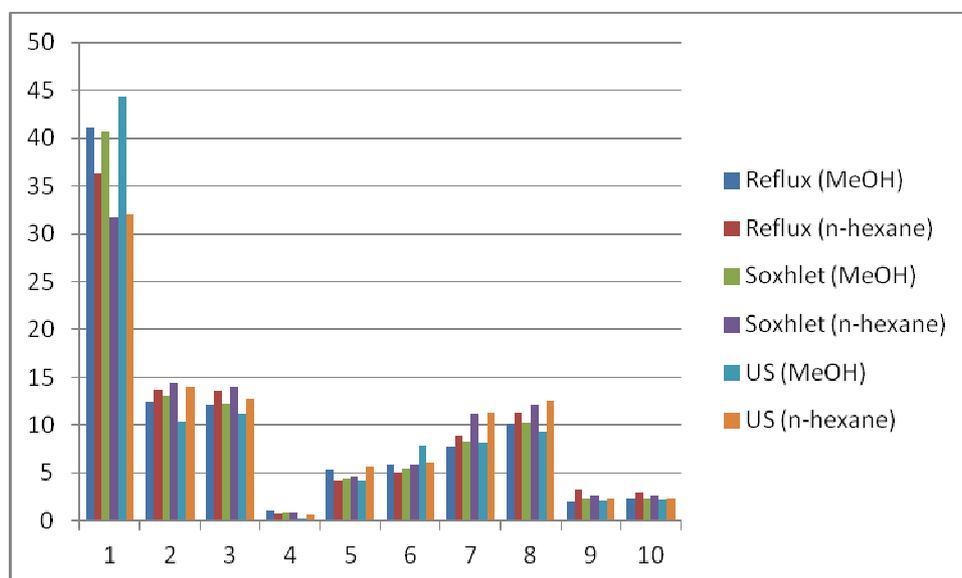


Figure 51 - Comparaison du l'aire moyenne des pics en fonction du procédé et du solvant d'extraction pour la dammar (légende : abscisse - N° molécule (cf. tableau 33) ; ordonné : quantité extraite pour chaque molécule par trois procédés d'extractions et avec deux solvants)

Il faut noter que les molécules des acides dammarénolique, ursonique et oléanonique (**a**, **b** et **c**) sont représentés par un même pic sur chaque chromatogramme ainsi que les molécules d'hydroxydammarénone I et II (**i** et **j**) et sur la figure 51 ils correspondent respectivement aux chiffres 1 et 2.

Composé		% d'aire relatif en fonction du procédé d'extraction					
N°	Nom	Reflux		Soxhlet		Ultrasons	
		Méthanol	n-Hexane	Méthanol	n-Hexane	Méthanol	n-Hexane
a-1	Acide dammarénolique	41,1	36,3	40,7	31,7	44,3	32,0
b-1	Acide ursonique	41,1	36,3	40,7	31,7	44,3	32,0
c-1	Acide oléanonique	41,1	36,3	40,7	31,7	44,3	32,0
i-2	Hydroxydammarénone I ou II	12,4	13,7	13,0	14,4	10,4	14,0
j-2	Hydroxydammarénone I ou II	12,4	13,7	13,0	14,4	10,4	14,0
k-3	Dammarènediole	12,1	13,5	12,3	13,9	11,2	12,8
l-4	Aldéhyde oléanonique	1,1	0,8	0,9	0,9	0,2	0,6
m-5	Dammaradiénole	5,3	4,2	4,4	4,6	4,3	5,7
n-6	Aldéhyde ursonique	5,9	5,1	5,5	5,8	7,9	6,1
q-7	Hydroxyhopanone	7,7	8,9	8,2	11,1	8,1	11,3
r-8	Dammaradienone	10,1	11,3	10,3	12,1	9,4	12,5
s-9	Lupéol	2,0	3,3	2,4	2,6	2,1	2,4
t-10	$\beta$ -amyrine	2,4	2,9	2,4	2,6	2,2	2,4

Tableau 33 – Etude quantitative de la dammar par CLHP : % d'aire relatif en fonction du procédé et du solvant d'extraction

Une différence significative de pourcentage de l'aire relatif (+12,6% pour les US en méthanol par rapport au Soxhlet extraction avec n-hexane) est à remarquer dans le cas d'extraction des trois acides, dammarénolique, ursonique et oléanonique. Néanmoins, ces trois composés sont représentés par un même pic et ils ne sont pas clairement séparés et c'est difficile d'en tirer des conclusions. Pour le reste des molécules identifiées, on ne peut pas observer une différence significative (<2-5%) en quantité extraite, quel que soit le procédé et le solvant utilisé.

### **h) Etude analytique des extraits de la mastic**

L'échantillon de la résine commerciale de mastic de Chios (Sté Kremer) a été extrait en reflux et en Soxhlet, dans deux solvants différents, méthanol et n-hexane. Les extraits ainsi obtenus ont été analysés par CLHP/UV en employant la colonne Kinetex comme phase stationnaire.

Il faut noter que la préparation d'échantillon avec l'extraction aux ultrasons est un protocole couramment utilisé dans notre laboratoire et il ne sera pas présenté particulièrement dans cette partie. Les résultats présentés dans les parties 1.2.2. et 1.2.3. sont obtenus après la préparation des échantillons selon ce protocole (**PO-3**).

- Extraits au reflux

La partie triterpénique extraite de la mastic a été analysée par CLHP/UV et les chromatogrammes obtenus sont présentés sur la figure 52.

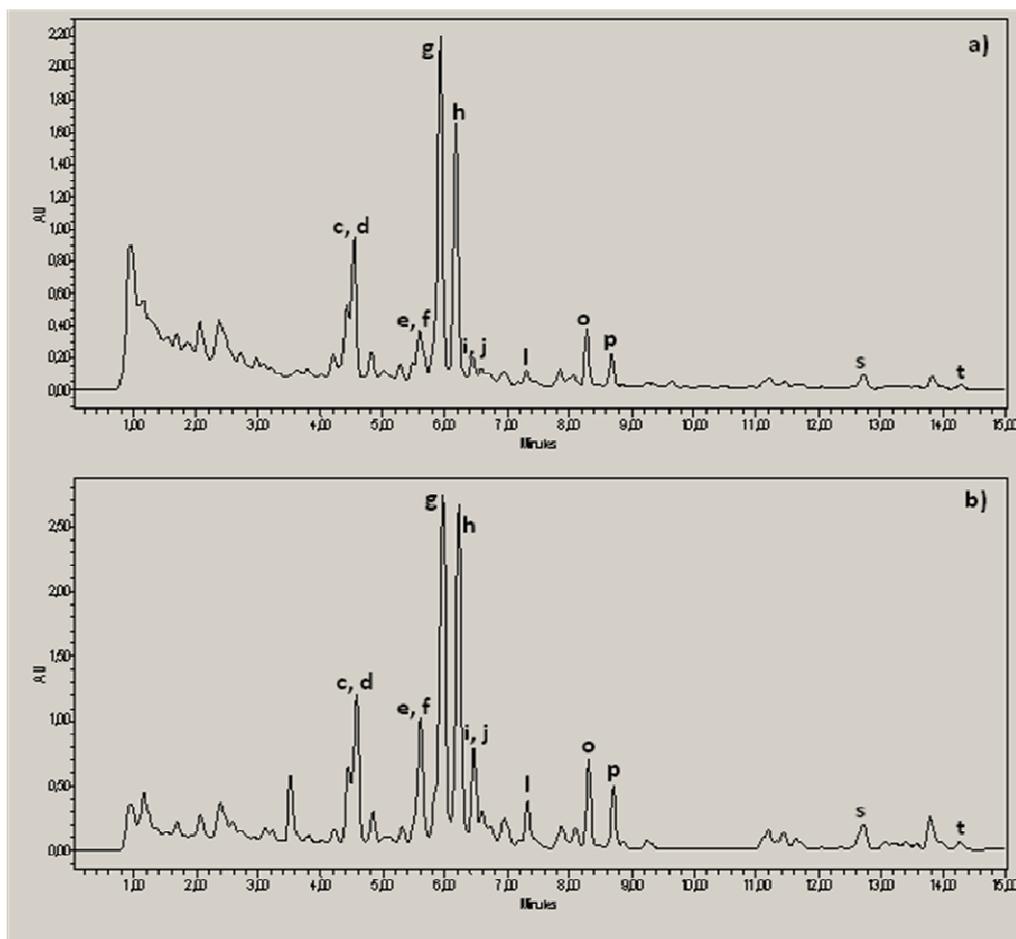


Figure 52 - Chromatogrammes obtenus à 210 nm par CLHP/UV pour les extraits de la mastic au reflux, a) en méthanol et b) en n-hexane

Les treize composés triterpéniques ont été identifiés sur ces deux chromatogrammes, à partir de la littérature spécialisée (cf. partie 1.2.3.) et en comparaison des données spécifiques ( $t_R$ , tableau 30). Sur le chromatogramme a), on observe que les hydroxydammarénone I et II (i et j) et l'aldéhyde oléanonique (l) ont donné une faible réponse après l'extraction au méthanol. Par contre, les mêmes composés paraissent mieux extraits avec le n-hexane (Figure 52, chromatogramme b), les pics correspondants sont bien répartis et séparés.

- Extraits au Soxhlet

Les extraits obtenus en Soxhlet ont été analysés par CLHP/UV et les résultats obtenus sont présentés sur la figure 53.

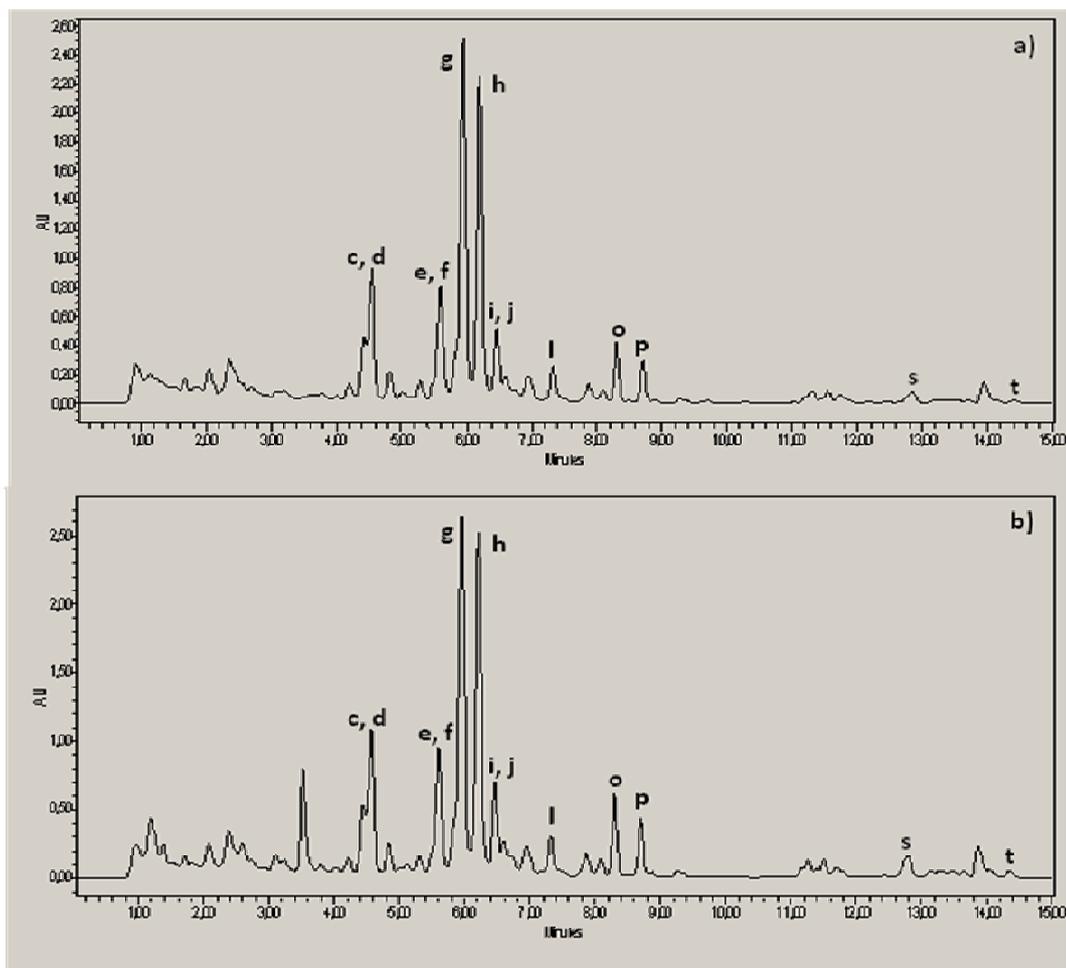


Figure 53 - Chromatogrammes obtenus à 210 nm par CLHP/UV pour les extraits de la mastic au Soxhlet, a) en méthanol et b) en n-hexane

Tout d'abord, ici on observe une grande similarité entre les chromatogrammes obtenus (Figure 53). Les 13 molécules triterpéniques ont été caractérisées sur les deux chromatogrammes, d'après la littérature spécialisée (cf. partie 1.2.3.). Une bonne séparation des pics est observée sur les chromatogrammes a) et b). Les deux solvants employés sont convenables pour l'extraction des composés triterpéniques. Contrairement aux extraits obtenus par l'extraction au reflux (Figure 52, b) où l'on a observé une meilleure séparation au niveau les hydroxydammarénone I et II (i et j) et l'aldéhyde oléanonique (l) avec le n-hexane, ici ce n'est pas le cas. Le chromatogramme b) (Figure 53) obtenu en extraction avec le n-hexane ne relève pas une différence importante au niveau de la séparation des composés i, j et l par rapport au chromatogramme a).

L'étude quantitative d'aire relative des pics apparus sur les chromatogrammes des extraits a été faite. La corrélation entre l'aire moyenne des pics et du procédé et du

solvant d'extraction employés a donné les résultats suivants, présentés dans le tableau 34 et sous forme d'un diagramme (figure 54).

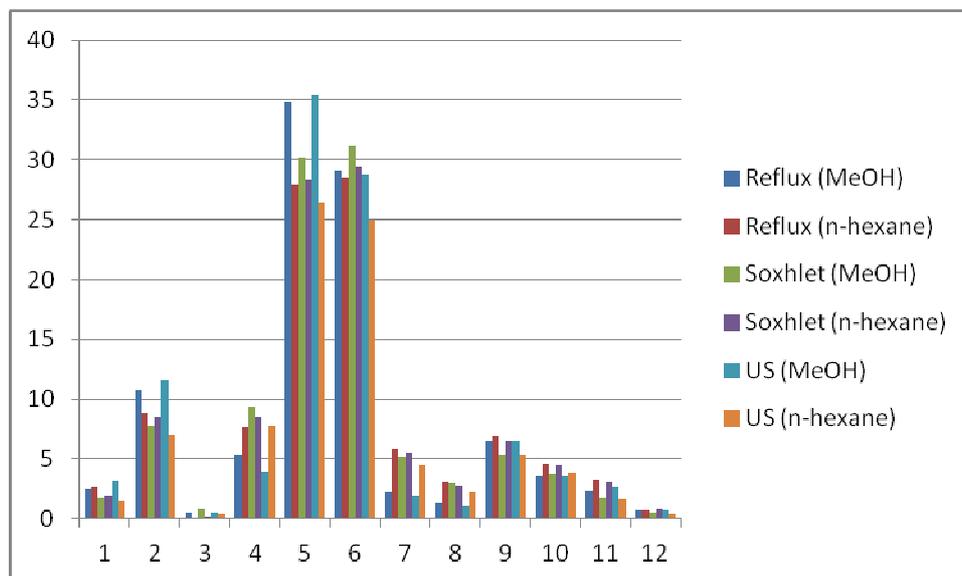


Figure 54 - Comparaison de l'aire moyenne des pics en fonction du procédé et du solvant d'extraction pour la mastic (légende : abscisse - N° molécule (cf. tableau 34) ; ordonné : quantité extraite pour chaque molécule par trois procédés d'extractions et avec deux solvants)

Il est à noter que les hydroxydammarénone I et II (**i** et **j**) sont présentés sous le même symbole, le chiffre 7, comme dans le cas de la dammar, puisque ces deux isomères apparaissent comme un même pic sur les chromatogrammes.

La différence de +9% (US en méthanol par rapport US n-hexane) est trouvée pour le composé g (acide (iso) masticadiénonique) et +6% (Soxhlet en méthanol par rapport US n-hexane) pour son composé isomère h (acide (iso) masticadiénonique). Les différences pour les autres composés triterpéniques identifiés dans la mastic semblent minimales. Ni le solvant ni le procédé d'extraction semble avoir des répercussions directes sur les molécules triterpéniques analysés. En effet, la différence des pourcentages des aires relatives ne sont pas significatives au sein de diverses conditions expérimentales testées.

Composé		% d'aire relatif en fonction du procédé d'extraction					
N°	Nom	Reflux		Soxhlet		Ultrasons	
		Méthanol	n-Hexane	Méthanol	n-Hexane	Méthanol	n-Hexane
c-1	Acide oléanonique	2,5	2,6	1,8	1,9	3,2	1,4
d-2	Acide moronique	10,8	8,9	7,8	8,5	11,6	7,0
e-3	(3L,8R)-3,8,-Dihydroxypolypoda-13E,17E,21-triene	0,6	0,1	0,8	0,2	0,5	0,3
f-4	(8R)-3-Oxo-8-hydroxypolypoda-13E,17E,21-triene	5,3	7,6	9,4	8,5	4,0	7,7
g-5	Acide (Iso)masticadiénonique	35,0	27,9	30,2	28,4	35,5	26,5
h-6	Acide (Iso)masticadiénonique	29,2	28,4	31,1	29,4	28,9	25,0
i-7	Hydroxydammarénone I ou II	2,2	5,8	5,2	5,5	1,9	4,5
j-7	Hydroxydammarénone I ou II	2,2	5,8	5,2	5,5	1,9	4,5
l-8	Aldéhyde oléanonique	1,4	3,1	3,0	2,7	1,1	2,2
o-9	Acide 3-O-acétyl-3épi (iso) masticadiénolique	6,5	6,8	5,3	6,5	6,5	5,3
p-10	Acide 3-O-acétyl-3épi (iso) masticadiénolique	3,7	4,5	3,7	4,4	3,7	3,7
s-11	Lupéol	2,4	3,2	1,8	3,0	2,6	1,7
t-12	$\beta$ -amyrine	0,7	0,7	0,5	0,8	0,7	0,5

Tableau 34 – Etude quantitative de la mastic par CLHP : % d'aire relatif en fonction du procédé et du solvant d'extraction

### i) Extraction en phase solide (SPE)

L'extraction en phase solide a été testée durant ce travail pour purifier et concentrer l'échantillon à analyser. Le mécanisme de SPE est montré sur la figure 55.

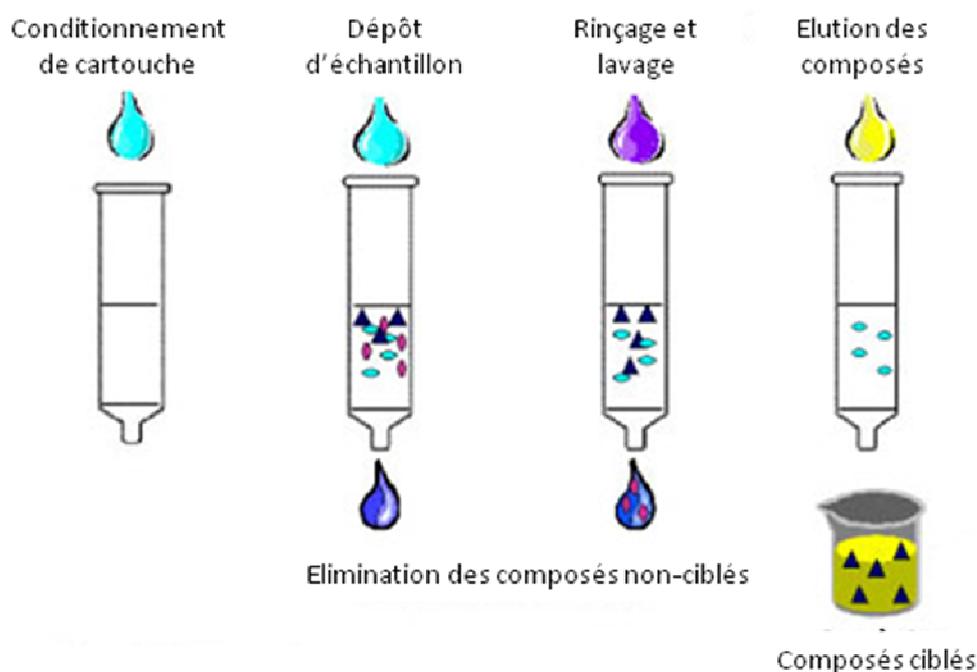


Figure 55 - Schéma du principe de la SPE

Le choix des cartouches SPE est proche de celui d'une colonne en chromatographie liquide. La préparation d'échantillon est effectuée selon le protocole donné dans la partie de «Matériel et méthodes» (PO-4.). Le conditionnement de la cartouche est effectué avec des solvants préalablement choisis en fonction de leur polarité et de celle de l'échantillon. Ils doivent être susceptibles de purifier l'échantillon (en éluant des composés qui ne sont pas la cible recherchée) et en même temps de garder et d'éluer en dernier les composés ciblés: gradient d'élution. L'échantillon ainsi préparé ne nécessite aucune filtration et il peut être directement analysé par CLHP.

D'après la littérature, cette méthode a été déjà utilisée pour l'extraction de composés triterpéniques (Theunis *et al*, 2007; Claude *et al*, 2008). Dans notre laboratoire, la méthode par SPE a déjà été employée pour séparer et purifier des échantillons de colorants d'origine végétale (Cuoco, 2009).

La SPE a été d'abord testée sur l'échantillon de la résine commerciale (mastic de Chios, Sté Kremer), puis appliquée à l'étude de l'échantillon archéologique G12, dans le but de le purifier et concentrer et surtout faciliter l'identification des composés présents. Les échantillons archéologiques sont souvent disponibles dans des quantités minimales et leur identification est difficile à cause de nombreux processus d'altération et de leurs complexités chimiques. La figure 56 présente le chromatogramme obtenu après la préparation de l'échantillon de la résine commerciale par SPE.

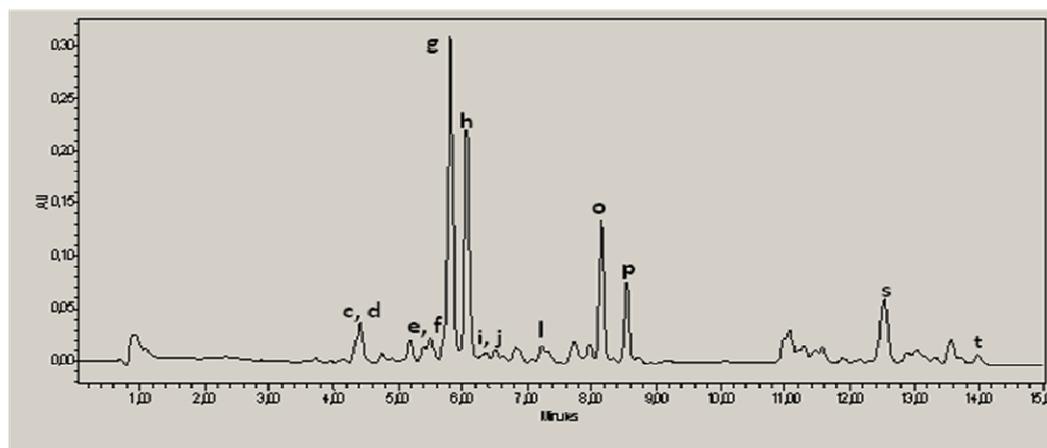


Figure 56 - Chromatogramme obtenu à 210 nm par CLHP/UV pour la mastic après la SPE

Le chromatogramme obtenu a relevé la présence de 13 composés triterpéniques préalablement identifiés selon la littérature spécialisée (cf. la partie 1.2.3,  $t_R$  correspondants, tableau 30). Néanmoins, on peut remarquer que la préparation selon le protocole par SPE n'est pas adaptée pour concentrer l'échantillon au niveau des composés triterpéniques, on observe une perte d'intensité relative (ici 0,3 contre 2,6 partie 1.2.3.). La séparation des pics apparus et leur répartition sont conservées. La faible concentration des acides moronique et oléanonique (c et d), qui sont utilisés comme marqueurs chimiques pour l'identification de la résine mastic est un désavantage. Les composés hydroxydammarénone I et II (i et j) et l'aldéhyde oléanonique (l) sont présents aussi avec les pics de faible intensité et avec une assez mauvaise séparation. Comme précédemment, les acides mastica- et isomasticadiénonique (g et h) sont apparus comme les pics majoritaires sur ce chromatogramme.

- Etude d'échantillon archéologique

Un échantillon archéologique supposé contenir la résine mastic (Dahchour G12, en provenance de l'ancienne Egypte, de Dahchour XII<sup>ème</sup> dynastie du Moyen Empire, de la collection Victor Loret) a été analysé par CLHP/UV, une fois préparé selon le protocole (PO-3) et après avoir subi une préparation préalable par SPE. La figure suivante (Figure 57) regroupe les résultats obtenus.

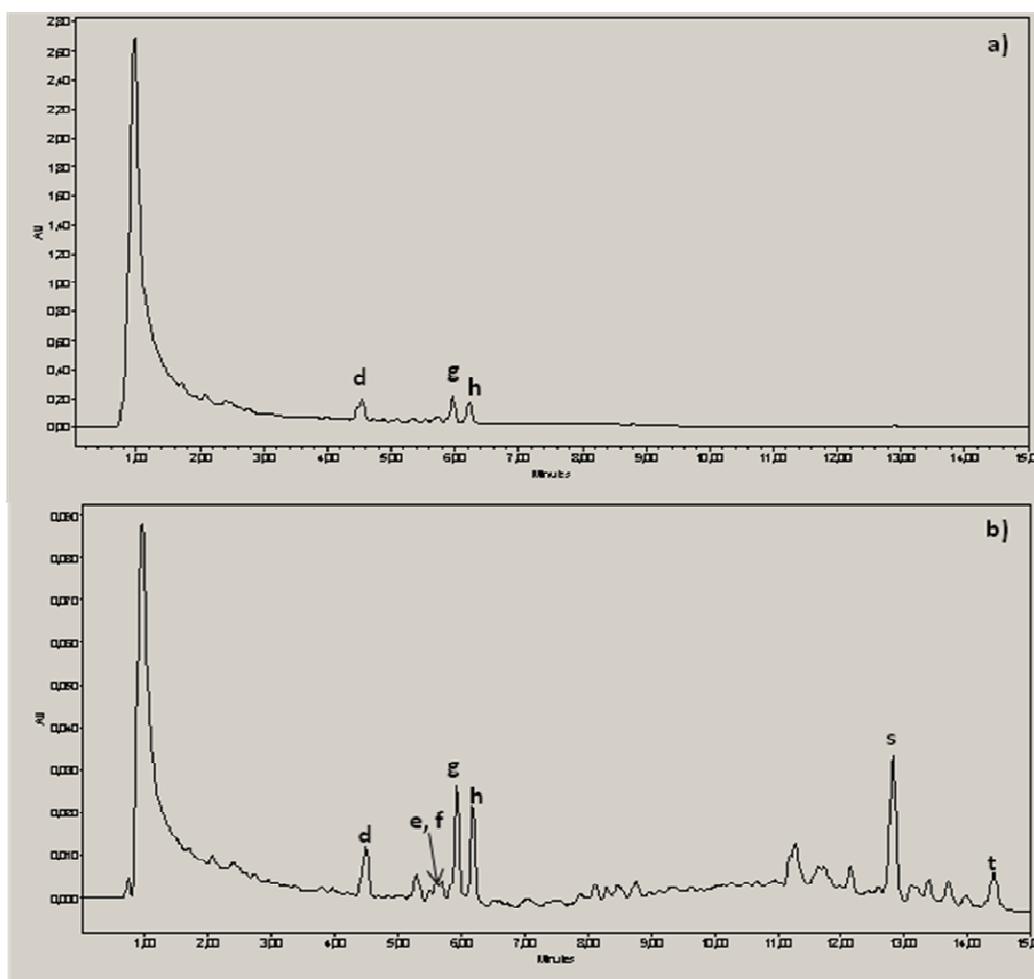


Figure 57 - Chromatogrammes obtenus à 210 nm par CLHP/UV pour l'échantillon G12, a) avant la SPE et b) après la SPE

Sur le chromatogramme a) on observe une faible réponse après l'analyse par CLHP/UV. L'identification de trois molécules, l'acide moronique (**d**) et les acides mastica- et isomasticadiénonique (**g** et **h**) a été faite en accord avec la littérature spécialisée en

comparant le  $t_R$  (cf. tableau 30). Après avoir appliqué la préparation d'échantillon par SPE, on a obtenu le chromatogramme b) (Figure 57), qui a révélé la présence des autres composés, de (3*L*,8*R*)-3,8,-Dihydroxypolypoda-13*E*,17*E*,21-triene et de (8*R*)-3-Oxo-8-hydroxypolypoda-13*E*,17*E*,21-triene (e et f), de lupéol (s) et de  $\beta$ -amyrine (t). Néanmoins, la concentration d'échantillon G12 après la SPE a significativement diminué comme observé précédemment, ce qui représente un désavantage. Le protocole SPE a permis de purifier l'échantillon et de mettre en évidence les composés présents dans l'échantillon, mais d'un autre côté, l'échantillon est dilué à la place d'être concentré. De prochaines optimisations de protocole SPE existant sont à faire pour pouvoir obtenir un meilleur résultat.

## 2. La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

L'une des autres techniques chromatographiques utilisées dans ce travail est la chromatographie en phase gazeuse. En 1952, A. J. P. Martin et A. T. James ont posé la base de la chromatographie en phase gazeuse, qui devient assez rapidement une des techniques indispensables pour réaliser l'analyse de routine des composés volatils dans de nombreux laboratoires (Poole, 2003). Son vrai succès apparait à partir de 1958 après l'invention des colonnes capillaires par Marcel J. E. Golay (Golay, USP 2.920.478), suivi des apparitions des différents modes de détection, comme le détecteur à ionisation à argon, le détecteur à ionisation de flamme (FID) et le détecteur à capture d'électrons. Très souvent, l'appareil de CPG est lié à un spectromètre de masse (couplage CPG-SM).

En CPG, la phase mobile est composée d'un gaz (gaz vecteur), qui balaie le système en permanence. En général, il y a quatre types de gaz utilisés comme gaz vecteurs: l'hélium, l'hydrogène et l'azote qui sont les plus utilisés, cependant l'argon peut aussi être employé. Le four est équipé d'une programmation permettant d'obtenir une gamme de température homogène de la température ambiante jusqu'à 450-500°C (Figure 58). Le mélange analysé sous forme liquide apte à se vaporiser assez facilement est injecté dans le système à travers un injecteur, préalablement chauffé à une température égale ou même supérieure à la température d'ébullition du mélange analysé. L'injection se fait à l'aide d'une seringue de volume maximal de 10  $\mu$ L.

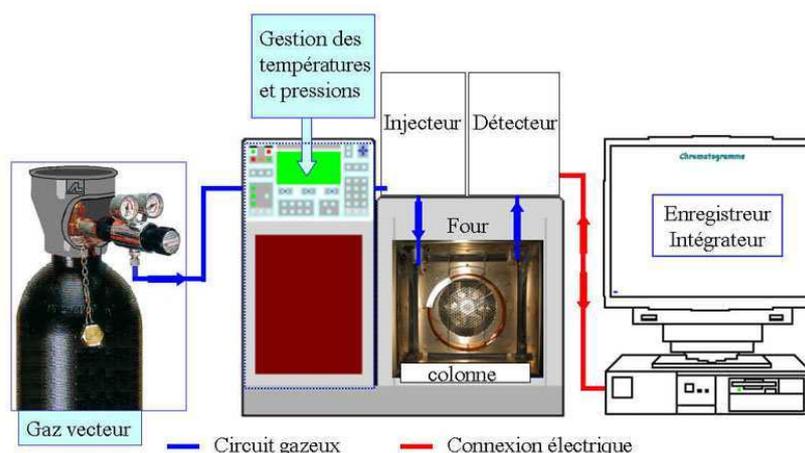


Figure 58 - Schéma type d'un appareillage de CPG (d'après atechimie.univ-lille1.fr)

La vanne split/splitless permet de contrôler la concentration et la quantité d'échantillon injecté. D'habitude, on travaille en split 50 (1/50 d'échantillon part dans la colonne), split 100 (1/100) ou split 200 (1/200). Une fois vaporisé, l'échantillon part dans la colonne, qui représente le cœur, la partie plus importante du système chromatographique. Pour la CPG, il existe deux types de colonnes: colonne remplie (à garnissage) et colonne capillaire. La dernière est beaucoup plus utilisée et plus performante que la colonne remplie. Les colonnes capillaires sont en silice fondue de grande pureté. Le diamètre interne de ces colonnes est de 100 à 530  $\mu\text{m}$  et leur longueur peut aller jusqu'au 100 m, avec une paroi externe d'environ 50  $\mu\text{m}$ . A l'intérieur, ces colonnes contiennent un revêtement brun, de nature polymérique thermiquement stable jusqu'à une température de 370°C, ce qui permet de rouler la colonne sur elle-même et de la positionner sur un support métallique. Il existe aussi des colonnes capillaires faites en métal de type aluminium, nickel ou acier, qui supportent des températures jusqu'à 450°C (Rouessac et Rouessac, 2004).

Le détecteur employé pour analyser les composés séparés par CPG dans ce travail est un spectromètre de masse. La spectrométrie de masse est une technique qui est en cours d'amélioration et de développement depuis sa découverte. Elle offre une vaste gamme d'applications analytiques en chimie organique et inorganique, en biologie, en géochimie, etc. Elle sert à toutes sortes d'analyses dont le but est de déterminer la nature, la composition et la structure d'un échantillon. La spectrométrie de masse elle-même est une méthode de caractérisation de la matière par la détermination des masses atomiques ou moléculaires des espèces individuelles présentes dans l'échantillon analysé (Rouessac et Rouessac, 2004). C'est une technique analytique pratiquement irremplaçable, car elle

possède une sensibilité particulière par rapport aux autres techniques (de l'ordre de la pico-, femto- et attomole) et aussi une grande sensibilité de détection, de l'ordre de zeptomole si elle est couplée avec d'autres techniques. Pour ce travail de thèse, le couplage CPG-SM a été utilisé pour analyser les composés triterpéniques.

Le principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse est présenté sur la figure 59.

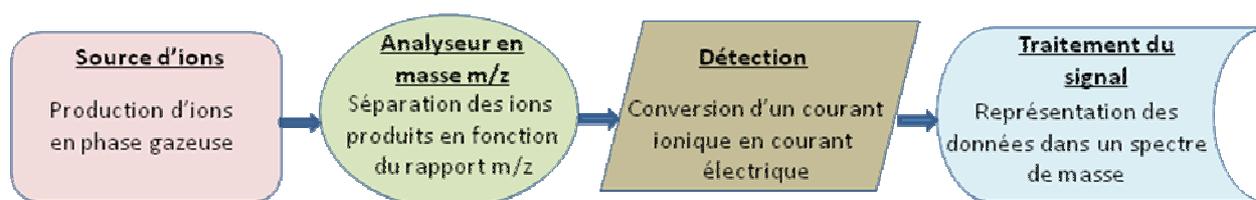


Figure 59 - Schéma simplifié de fonctionnement d'un spectromètre de masse

L'échantillon, pour être analysé, doit passer par plusieurs étapes successives :

- Ionisation – l'échantillon est sous forme de gaz et il s'ionise dans la source puis les ions formés sont focalisés et accélérés pour accroître leur énergie cinétique.
- Séparation – les ions formés sont séparés et filtrés par rapport à leur  $m/z$  par l'analyseur.
- Détection – une fois séparés, les ions finissent leur chemin en frappant le capteur d'un détecteur. Le signal détecté est proportionnel aux charges des ions détectés.
- Traitement du signal – tous les ions détectés sont enregistrés dans une forme graphique, on obtient un spectre de masse.

La première étape est la conversion d'échantillon en phase gazeuse, puis la formation des ions, dans le cadre de ce travail, par impact électronique. C'est un type de source d'ionisation «dure», ce qui signifie que le spectre de masse obtenu présente des fragments formés pour chaque ion moléculaire. Les sources d'ionisation «douces» produisent des ions, mais sans leur fragmentation. Ce mode d'ionisation dure convient très bien aux composés facilement volatils, apolaires et thermiquement stables, dans ce cas, l'évaporation se fera sans pyrolyse. Ce processus d'ionisation est bien adapté à un grand



Tous les échantillons ont été préparés selon le protocole **PO-5**. (cf. «Matériel et méthodes») via la réaction de formation des dérivés triméthylsilylés, puis analysés en CPG-SM.

### a) Etude de l'oliban par CPG-SM

Un échantillon d'oliban commercial de Somalie (Sté Encens du Monde) a été dérivatisé selon la réaction de triméthylsilylation, puis analysé directement par CPG-SM. Le résultat obtenu est présenté sur la figure 61.

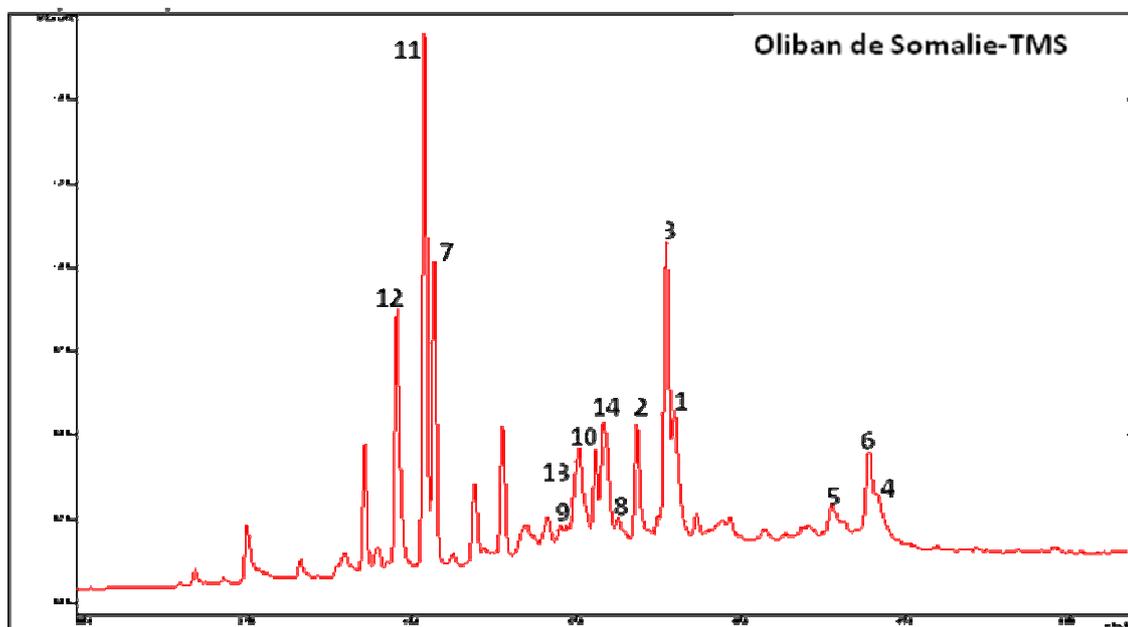


Figure 61 - Chromatogramme obtenu par CPG-SM pour l'oliban de Somalie-TMS

Le chromatogramme obtenu révèle la présence de 14 composés triterpéniques (tableau 35). Ils ont été identifiés à l'aide des travaux et résultats obtenus précédemment au sein de notre laboratoire (Mathe, 2003) en comparant le  $t_R$  et les spectres de masse correspondants des composés concernés (Annexe 1). On observe une séparation et répartition de pics correcte et en accord avec des résultats obtenus auparavant dans notre laboratoire.

Pour certaines molécules, qui ne sont pas indexées sur ce chromatogramme, on suppose qu'elles possèdent une structure tirucallane et d'autres une structure ursane par rapport aux spectres de masses obtenus. Ils ont été comparés avec la base de données en prenant en considération le mécanisme de fragmentation d'ion moléculaire et des  $m/z$  caractéristiques. Cette hypothèse n'a pas pu être confirmée, car les molécules standards ne sont pas commercialement disponibles.

Les composés identifiés sur le chromatogramme obtenu par CPG-SM d'oliban commercial de Somalie sont nommés dans le tableau suivant (tableau 35) :

N°	Nom de composé	$t_R$ (min)	$M_r/gmol^{-1}$	$m/z$ (%)
1	Acide lupéolique-TMS	44,02	600	73(100) ; 292(50) ; 472(40) ; 147(35) ; 423(28)
2	Acide $\alpha$ -boswellique-TMS	43,42	600	292(100) ; 203(70) ; 218(60) ; 73(40) ; 586(10)
3	Acide $\beta$ -boswellique-TMS	43,89	600	292(100) ; 218(40) ; 73(35) ; 203(20) ; 586(10)
4	Acide <i>O</i> -acétyl-lupéolique-TMS	47,07	572	292(100) ; 73(85) ; 218(80) ; 175(45) ; 496(20)
5	Acide 3- <i>O</i> -acétyl- $\alpha$ -boswellique-TMS	46,40	572	203(100) ; 218(90) ; 292(75) ; 73(73) ; 131(50)
6	Acide 3- <i>O</i> -acétyl- $\beta$ -boswellique-TMS	46,96	572	292(100) ; 218(85) ; 73(50) ; 203(33) ; 119(25)
7	3- <i>épi</i> -lupéol-TMS	40,36	498	189(100) ; 73(50) ; 203(42) ; 393(30) ; 409(24)
8	Lupéol-TMS	43,13	498	189(100) ; 107(60) ; 393(32) ; 292(60) ; 203(58)
9	$\beta$ -amyrone	42,35	424	203(100) ; 218(80) ; 189(30) ; 442(25) ; 394(22)
10	$\alpha$ -amyrone	42,80	424	218(100) ; 189(47) ; 73(42) ; 147(30) ; 203(32)
11	3- <i>épi</i> - $\alpha$ -amyrine-TMS	40,20	498	218(100) ; 189(55) ; 203(36) ; 73(25) ; 393(10)
12	3- <i>épi</i> - $\beta$ -amyrine-TMS	39,79	498	203(100) ; 218(75) ; 189(50) ; 73(25) ; 175(22)
13	$\beta$ -amyrine-TMS	42,54	498	203(100) ; 218(50) ; 189(32) ; 424(17) ; 572(13)
14	$\alpha$ -amyrine-TMS	42,92	498	218(100) ; 73(60) ; 189(48) ; 203(42) ; 393(40)

Tableau 35 - Liste des composés identifiés dans l'oliban commercial brut avec leur temps de rétention correspondant en CPG-SM et les rapports  $m/z$  relatives

### b) Etude de la dammar et de la mastic par CPG-SM

Deux échantillons de résines commerciales de dammar (Sté Encens du monde) et de mastic de Chios (Sté Kremer) ont été dérivatisés selon la réaction de triméthylsilylation, puis analysés directement par CPG-SM. Les chromatogrammes obtenus sont présentés sur la figure 62.

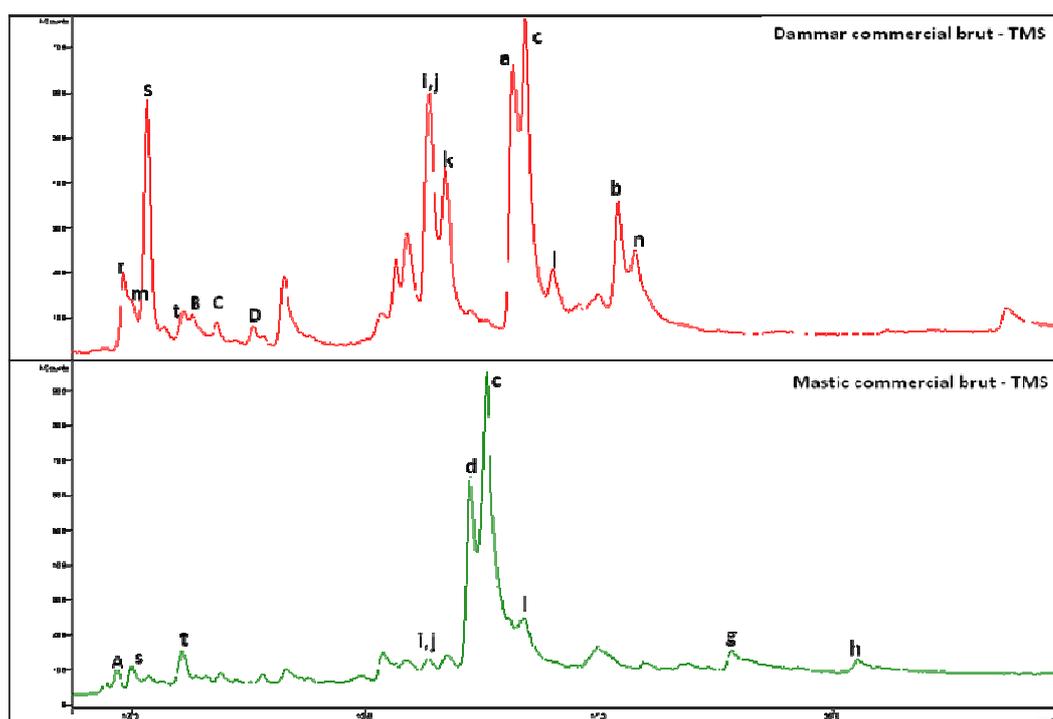


Figure 62 - Chromatogrammes obtenus par CPG-SM pour les résines la dammar-TMS et la mastic-TMS

Dans le cas de la résine dammar (Figure 62, en haut), les 15 molécules triterpéniques ont été identifiées. De même, sur le chromatogramme obtenu après l'analyse de la mastic, les 10 molécules triterpéniques ont été caractérisées (Figure 62, en bas). Les molécules identifiées sont citées dans le tableau 36. Les composés en rouge sont des composés propres à la dammar, les composés en vert sont des composés identifiés que dans la mastic et les composés en bleu sont des composés communs pour la dammar et pour la mastic. En noir sont des composés identifiés par CLHP/UV mais qui n'ont pas été caractérisés par CPG-SM et ils figurent dans le tableau pour garder la numérotation des composés.

N°	Nom de composé	t <sub>r</sub> .(min)	Mr/gmol	m/z(%)
<b>a</b>	Acide dammarénolique-TMS	46,59	530	109(100) ;205(75) ;313(30) ;424(25) ;73(7)
<b>b</b>	Acide ursonique-TMS	47,71	526	203(100) ;133(75) ;409(4) ;438(3) ;512(1)
<b>c</b>	Acide oléanonique-TMS	46,55	526	203(100) ;189(50) ;109(25) ;408(23) ;511(20)
<b>d</b>	Acide moronique-TMS	46,12	526	189(100) ;73(50) ;203(40) ;306(20) ;511(10)
<b>e</b>	(3L,8R)-3,8,-Dihydroxypolypoda-13E,17E,21-triene-TMS		590	pas trouvé
<b>f</b>	(8R)-3-Oxo-8-hydroxypolypoda-13E,17E,21-triene-TMS		516	pas trouvé
<b>g</b>	Acide (Iso)masticadienonique-TMS	48,92	526	421(100) ;73(45) ;393(40) ;403(20) ;511(48)
<b>h</b>	Acide (Iso)masticadienonique-TMS	50,27	526	421(100) ;73(35) ;393(40) ;403(23) ;511(52)
<b>i</b>	Hydroxydammarénone I ou II-TMS	45,69	516	199(100) ;69(30) ;109(25) ;431(22) ;298(13)
<b>j</b>	Hydroxydammarénone I ou II-TMS	45,69	516	199(100) ;69(30) ;109(25) ;431(22) ;298(13)
<b>k</b>	Dammarenediol-TMS	45,87	590	199(100) ;407(80) ;496 (78) ;73(25) ;431(2.5)
<b>l</b>	Aldéhyde oléanonique	47,01	438	203(100) ;133(25) ;189(50) ;232(10) ;408(20)
<b>m</b>	Dammaradiénol-TMS	42,49	498	189(100) ;205(70) ;175(45) ;425(30) ;313(25)
<b>n</b>	Aldéhyde ursonique	47,89	438	203(100) ;133(80) ;189(30) ;73(15) ;232(2.5)
<b>o</b>	Acide 3-O-acétyl-3épi (iso) masticadiénolique-TMS		570	pas trouvé
<b>p</b>	Acide 3-O-acétyl-3épi (iso) masticadiénolique-TMS		570	pas trouvé
<b>q</b>	Hydroxyhopanone-TMS		516	pas trouvé
<b>r</b>	Dammaradiénone	42,41	424	109(100) ;205(80) ;189(70) ;424(45) ;313(40) ;381(13)
<b>s</b>	Lupéol-TMS	42,66	498	189(100) ;109(40) ;73(35) ;297(13) ;410(8)
<b>t</b>	β-amyrine-TMS	43,05	498	203(100) ;218(60) ;189(40) ;408(25) ;73(20) ;393(10)
<b>A</b>	tirucallol-TMS	42,34	498	394(100) ; 241(15) ; 73(12) ;484(9.5) ;187(8)
<b>B</b>	Nor-α-amyrone	43,17	424	204(100) ; 189(50) ;134(42) ;408(30) ;395(10)
<b>C</b>	Nor-β-amyrone	43,42	424	204(100) ;189(56) ;134(50) ;73(35) ;409(18)
<b>D</b>	Epi-α-amyrine-TMS	43,81	498	218(100) ;189(75) ;203(50) ;73(40) ;147(38) ;498(8)

Tableau 36 - Les composés identifiés dans les résines commerciales brutes dammar et mastic avec le temps de rétention correspondant en CPG-SM et les rapports m/z relatives (rouge - dammar, vert - mastic, bleu - dammar et mastic).

Il faut noter que dans la littérature spécialisée pour ces deux résines, l'analyse en CPG-SM a été systématiquement menée via la formation des dérivés méthylés et non triméthylsilylés comme c'est le cas dans ce travail. Dans le cas d'une résine de mastic vieilli, la forme des dérivés TMS de certains composés (acides oléanonique, moronique, masticadiénonique et isomasticadiénonique; 20,24-epoxy-25-hydroxydammaran-3-one,  $\beta$ -amyrine et nor- $\beta$ -amyrone) présents dans cette résine a été rapportée dans la littérature de Daniels, Stacey et Middleton (Conservation Science and Analytical Chemistry Group Report «The blackening of egyptian blue», British Museum). L'identification des molécules sous forme de dérivés TMS a été faite à l'aide de la littérature spécialisée (van der Doelen *et al*, 1998; Assimopoulou *et al*, 2005), en étudiant la fragmentation des molécules triterpéniques et en consultant la base de données NIST. Les spectres de masse obtenus pour les molécules identifiées dans la dammar et la mastic sont regroupés dans l'annexe 3 de ce manuscrit.

Les composés (3*L*,8*R*)-3,8,-Dihydroxypolypoda-13*E*,17*E*,21-triene-TMS (**e**), le (8*R*)-3-Oxo-8-hydroxypolypoda-13*E*,17*E*,21-triene-TMS (**f**), acide 3-*O*-acétyl-3*épi* (iso) masticadiénolique-TMS (**o**), acide 3-*O*-acétyl-3*épi* (iso) masticadiénolique-TMS (**p**) présents dans la mastic et le hydroxyhopanone-TMS (**q**) présents dans la mastic et dans la dammar n'ont pas pu être caractérisés par CPG-SM, car les fragmentations spécifiques des dérivés TMS n'ont pas été reconnues. En revanche, le tirucallol-TMS (**A**) dans la résine mastic, le nor- $\alpha$ -amyrone (**B**), le nor- $\beta$ -amyrone (**C**) et le *epi*- $\alpha$ -amyrine-TMS (**D**) dans la résine dammar (Figure 62) ont été identifiés par CPG-SM. Ces 4 molécules n'ont pas été caractérisées par CLHP/UV, ce qui montre que les techniques CLHP et CPG sont complémentaires.

Pour certaines molécules, qui ne sont pas indexées sur ce chromatogramme, on suppose qu'elles possèdent une structure tirucallane ou lupane par rapport aux spectres de masses obtenus. Ils ont été comparés avec la base de données tout en prenant en considération le mécanisme de fragmentation d'ion moléculaire et des *m/z* caractéristiques. Cette hypothèse n'a pas pu être confirmée, car les molécules standards ne sont pas commercialement disponibles.

## 2.2. Etude des extraits par CPG-SM

Comme il est mentionné dans la partie précédente, les analyses des extraits des trois résines obtenus au reflux, au Soxhlet et aux ultrasons avec le d-limonène (R-(+)-limonène) vont être présentées dans cette partie.

- **Le D-limonène**

Est un solvant qui possède une structure monoterpénique. Il fait partie des huiles essentielles présentes naturellement dans différentes plantes, surtout dans la pelure d'agrumes (Bégin et Gérin, 1999). C'est un solvant moins toxique et dangereux pour l'environnement que les solvants produits durant le raffinage du pétrole et il est utilisé comme substitutif depuis des années. Il fait partie du groupe des «solvants verts». C'est un des sous-produits issus de la production de jus d'orange et de pamplemousse. Le limonène est une molécule chirale et il possède deux formes, D (dextrogyre, R) et L (lévogyre, S). Leur mélange racémique est appelé dipentène.

Il faut noter que le limonène n'a pas pu être inclus dans l'étude quantitative des extraits de résines. La problématique étant l'élimination du solvant après extraction, de ce fait le rendement n'a pas pu être déterminé. Son point d'ébullition est élevé (178°C) son évaporation est difficile. L'étude qualitative de l'extraction des résines avec le limonène sera présentée dans ce manuscrit dans la partie traitant de résultats par analyse CPG-SM. L'étude par CLHP/UV n'a pas pu être appliquée sur ces extraits à cause de la forte absorption de d-limonène dans le domaine de l'UV.

### a) Etude comparative des extraits de l'oliban

Les différents extraits de la résine d'oliban obtenus après l'extraction au d-limonène ont été analysés par CPG-SM. Ceux issus de l'extraction au reflux et au Soxhlet se ressemblent. Nous avons choisi de montrer les résultats issus de l'extraction au Soxhlet et de les comparer à ceux obtenus après l'extraction aux ultrasons. La figure suivante (Figure 62) regroupe ces résultats:

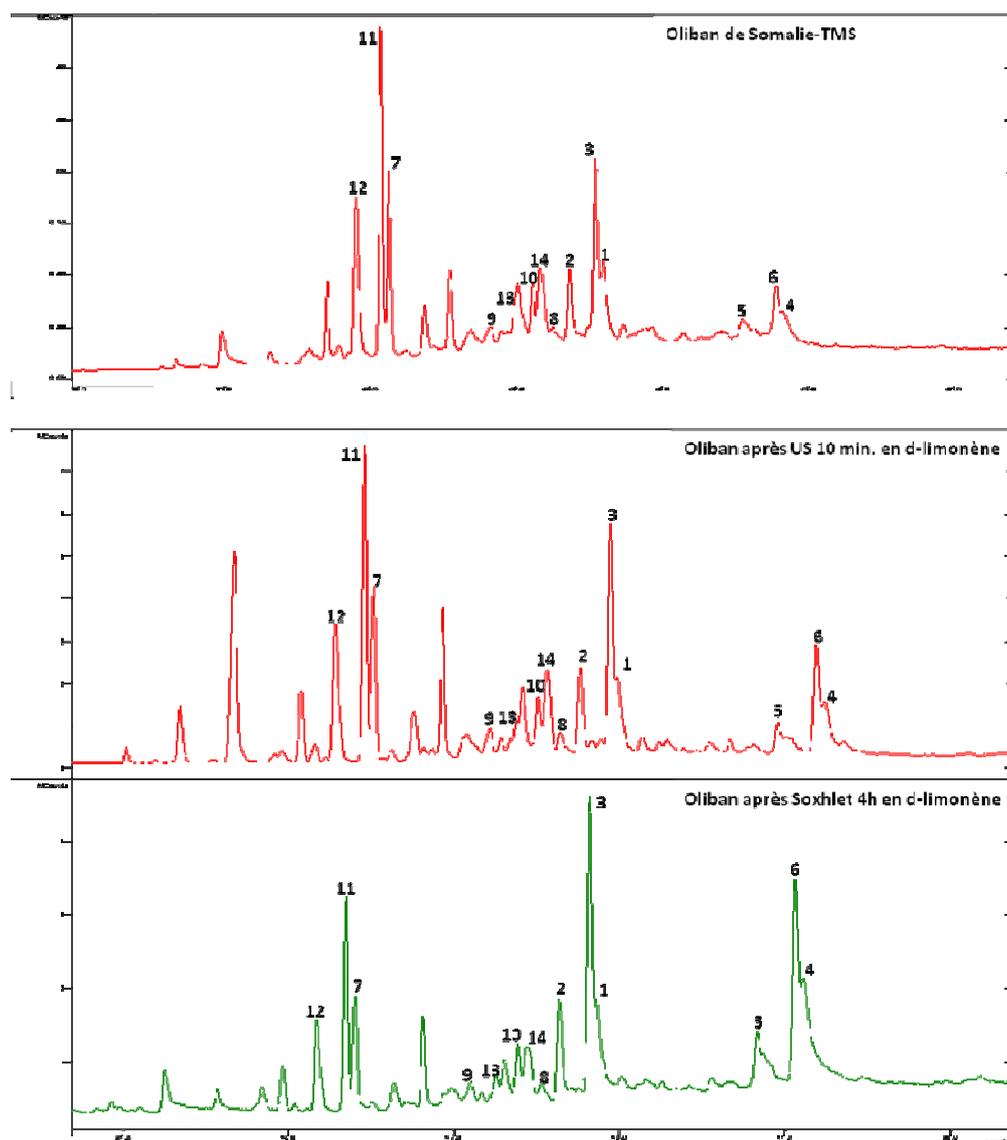


Figure 63 - Chromatogrammes obtenus par CPG-SM, pour l'oliban-TMS et pour les extraits-TMS

Tout d'abord, sur les trois chromatogrammes contenus sur la figure 63, on retrouve les 14 molécules triterpéniques, précédemment identifiées dans la résine oliban commerciale (cf. partie 2.1.) à l'aide de la littérature spécialisée et en comparaison avec les résultats obtenus auparavant dans notre laboratoire (Mathe, 2003). On observe une séparation très satisfaisante au niveau des composés présents (chromatogrammes au milieu et en bas). Les molécules d'acide *O*-acétyl-lupéolique-TMS (4), d'acide 3-*O*-acétyl- $\alpha$ -boswellique-TMS (5) et d'acide 3-*O*-acétyl- $\beta$ -boswellique-TMS (6) sont extraites en quantité significative avec le *d*-limonène, également comme les composés acides (de 1 à 3). On peut constater

aussi que la séparation des composés apolaires (de **7** à **14**) est optimale avec le d-limonène qui est employé ici comme solvant servant à la fois à solubiliser et à extraire la fraction résinique, mais il sert également de solvant d'injection pour l'analyse en CPG-SM. De plus, la formation des dérivés triméthylsilylés se fait directement dans ce solvant. Il s'agit donc d'un procédé innovant utilisant un seul solvant et évitant ainsi les étapes d'évaporation du solvant d'extraction (généralement le MeOH ou le n-hexane) et de l'utilisation habituelle d'éther diéthylique après l'étape de dérivation.

Concernant les processus d'extraction, le chromatogramme en bas (Figure 63) représentant les résultats d'analyse de l'extrait en Soxhlet, montre que ce processus est très satisfaisant pour extraire les composés polaires (de **1** à **6**), qui apparaissent comme les pics majoritaires sur ce chromatogramme. Sur les deux autres chromatogrammes de la même figure, ce n'est pas le cas. On suppose détecter plusieurs molécules (par rapport leurs *m/z* correspondants, tableau 37) qui pourront avoir une structure ursane ou/et oléanane entre les composés **1** et **4** et qui sont probablement des acides (figure 63, les deux chromatogrammes obtenus en d-limonène).

N°	Nom du composé	$t_r$ (min)	<i>m/z</i> (%)
I	molécule acide-TMS	44,72	73(100) ; 218(90) ; 147(60) ; 496(50) ; 292(25)
II	molécule acide-TMS	45,36	203(100) ; 73(75) ; 203(70) ; 392(55) ; 107(40)
III	molécule acide-TMS	46,02	73(100) ; 218(60) ; 107(47) ; 496(35) ; 292(33)
IV	molécule acide-TMS	47,26	203(100) ; 73(85) ; 218(75) ; 292(50) ; 147(40) ; 511(18)
V	molécule acide-TMS	48,39	218(100) ; 292(90) ; 73(85) ; 175(75) ; 147(40) ; 511(20)

Tableau 37 – Liste des composés pour lesquels la nature est supposée (oléanane ou/et ursane) dans l'oliban après l'extraction en d-limonène

Il est possible que parmi ces molécules on trouve des acides KBA et AKBA, mentionnés dans les parties précédentes (1.2.2. et 1.2.3.) mais cette hypothèse n'a pas pu être confirmée sans disposer les molécules standards, qui ne sont pas commercialisées.

### b) Etude comparative des extraits de la dammar

Une étude comparative des résultats d'analyse pour les extraits en limonène (au Soxhlet et aux ultrasons) obtenus avec la résine brute de dammar-TMS a été réalisée et présentée ici sur la figure suivante (Figure 64).

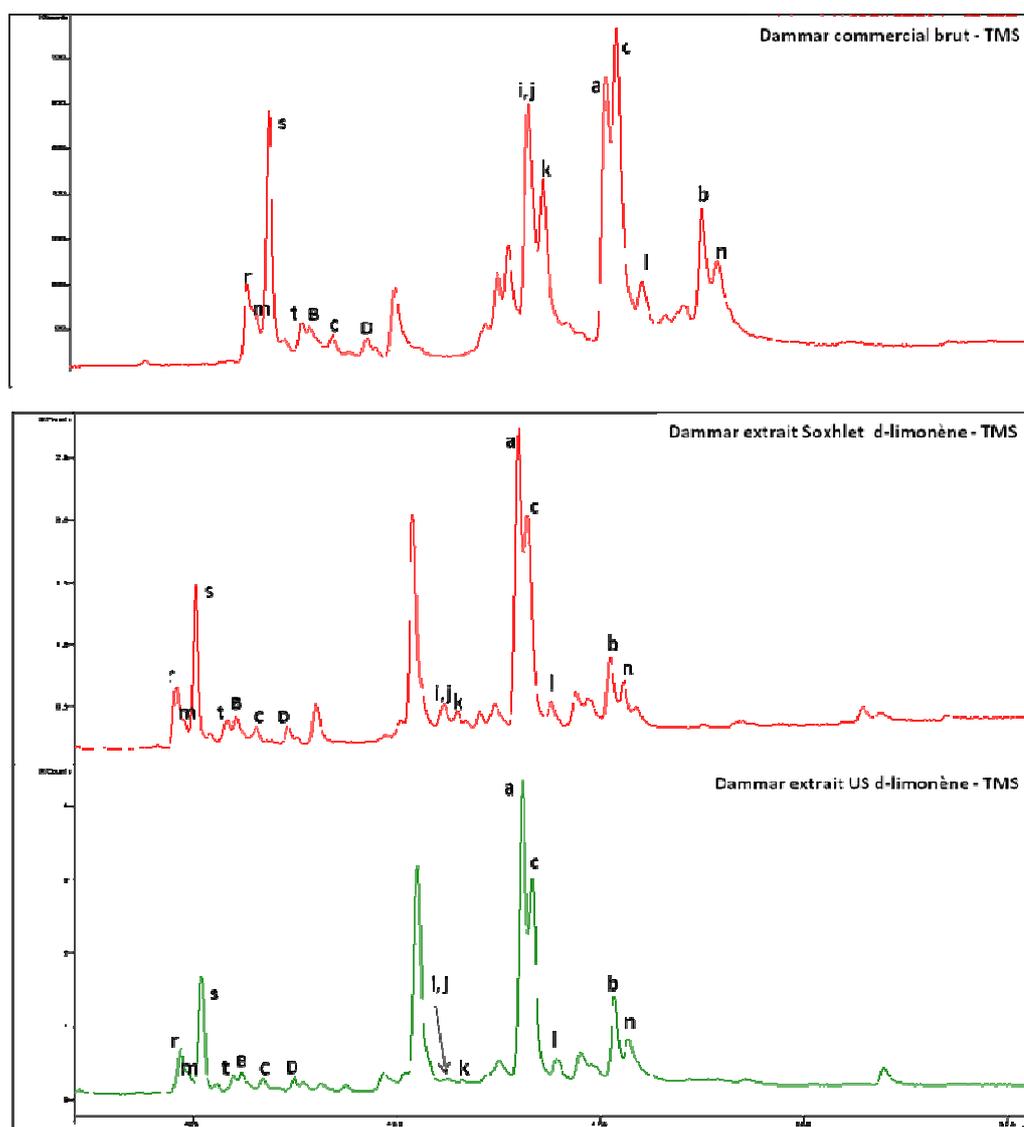


Figure 64 - Chromatogrammes obtenus par CPG-SM, pour la dammar-TMS et pour les extraits-TMS (décalage d'échelle qu'on observe est dû à des pannes successives de l'appareil)

D'après la littérature spécialisée, en comparant les spectres de masse obtenus avec ceux de la base de données NIST, en étudiant la fragmentation des ions moléculaires et prenant

en compte les  $t_r$  correspondants (cf. le tableau 36), les 15 composés identifiés sur le chromatogramme de la résine brute (Figure 64, chromatogramme en haut) sont également retrouvés sur les chromatogrammes obtenus après l'analyse des extraits en Soxhlet et en ultrasons (Figure 64, les chromatogrammes au milieu et en bas). Les chromatogrammes correspondants aux extraits analysés se ressemblent, ils révèlent une séparation et répartition des pics similaires à celle présente sur le chromatogramme correspondant à la résine brute analysée. Néanmoins, on peut observer sur les deux derniers chromatogrammes que le solvant utilisé influence l'extraction de certains composés, comme l'hydroxydammarénone I et II-TMS (**i** et **j**) et le dammarènediole-TMS (**k**). Ces deux isomères l'hydroxydammarénone I et II ne peuvent pas être séparés en CPG-SM. De plus, avec le d-limonène, ils sont extraits en quantité limitée. Les composés polaires, des acides et leurs aldéhydes correspondants (**a**, **b**, **c** et **l** et **n**) sont généralement extraits avec succès en d-limonène.

### c) Etude comparative des extraits de la mastic

Une étude comparative des extraits en limonène (au Soxhlet et aux ultrasons) avec le résultat d'analyse de la résine mastic brute-TMS a été réalisée et présentée sur la figure suivante (Figure 65).

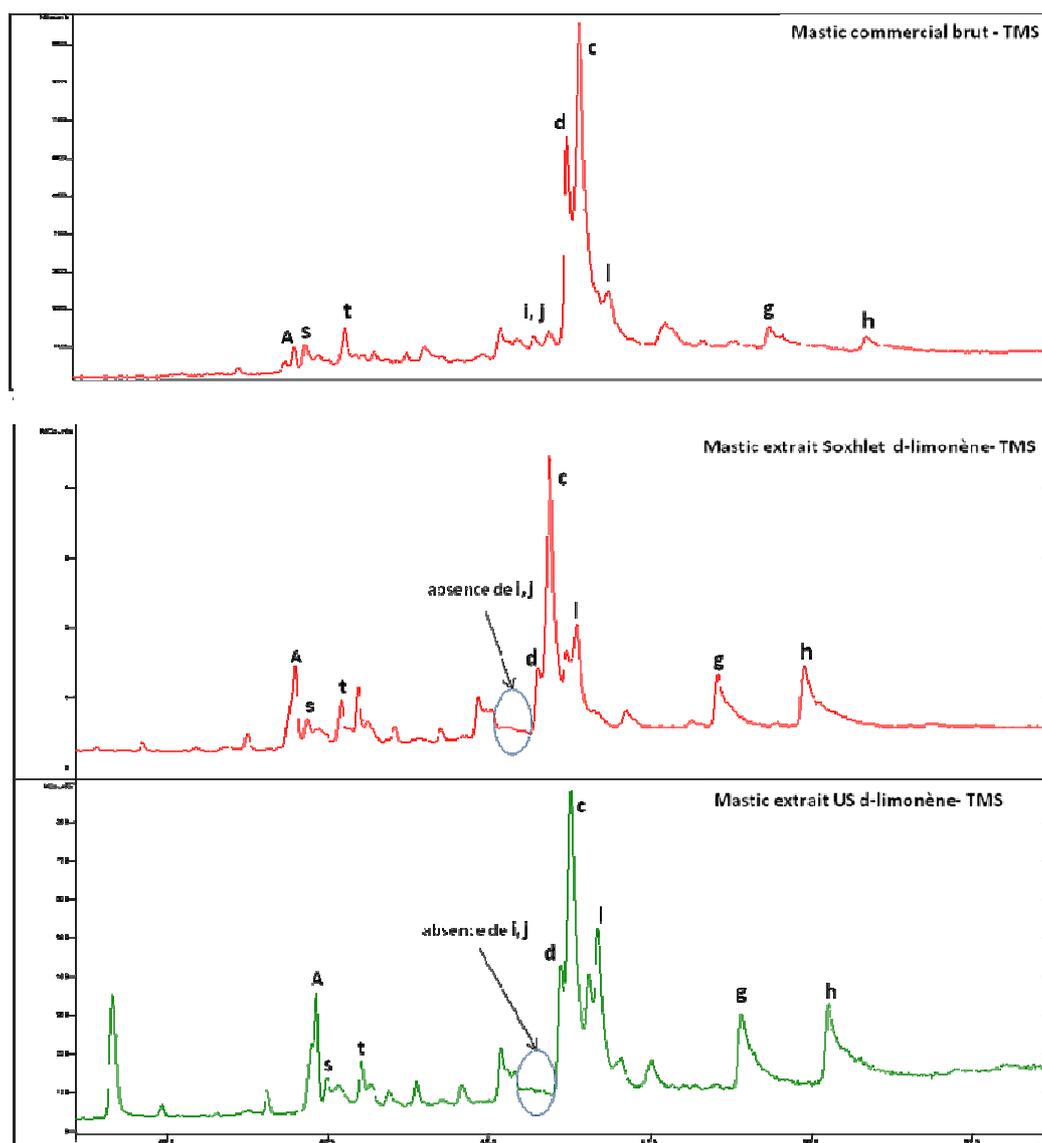


Figure 65 - Chromatogrammes obtenus par CPG-SM, pour la mastic-TMS et pour les extraits-TMS

Après avoir consulté la littérature spécialisée, en comparant les  $t_R$  correspondants et les spectres de masses obtenus avec ceux dans la base de données NIST, en étudiant la fragmentation des ions moléculaires, on n'a pu caractériser que huit molécules triterpéniques (cf. tableau 36) dans les extraits analysés de la mastic. Sur le premier chromatogramme (Figure 65) obtenu après l'analyse de la résine brute, on a identifié les dix composés. Néanmoins, sur les deux chromatogrammes suivants, au milieu et en bas (Figure 65), on peut constater l'absence de trois composés qui figurent sur le premier chromatogramme, il s'agit des composés des hydroxydammarénone I et II-TMS (**i** et **j**). On

peut supposer que cela vient du solvant utilisé, le d-limonène. Cependant, les composés acides mastica- et isomasticadiénonique, oléanonique et moronique (**c**, **d**, **g** et **h**) qui ont soit la structure tirucallène soit oléanène, semblent être extraites avec le d-limonène dans les quantités importantes (Figure 65, les derniers deux chromatogrammes). On peut supposer la présence d'un composé non-identifié entre l'aldéhyde oléanonique et l'acide oléanonique (**l** et **c**) (type de molécule oléanène, avec les  $m/z$  suivants : 203(100) ;189(80) ;109(70);408(38);482(8);511(12)) et aussi la présence des composés acides autour des acides mastica- et isomasticadiénonique (**g** et **h**) pour qui on peut supposer une structure similaire, avec des  $m/z$  suivants 392(100) ;73(80) ;482(60) ;241 ;95 ;408 ;161 et 421(100) ;511 ;393 ;257 ;169 ;73. Cette hypothèse pourra être discutée ultérieurement.

### 2.3. Etude des cas

#### a) Etude de l'échantillon artistique

Suite à l'analyse par IRTF, on a supposé qu'un des échantillons prélevés dans la Galerie Nationale de Sarajevo (Bosnie-Herzégovine, cf. partie 1) contient un vernis à base d'une résine naturelle. L'échantillon référencé No 2 (2010) a été préparé selon le protocole PO-5. et analysé par CPG-SM. Le résultat obtenu sous forme d'un chromatogramme est montré sur la figure 66.

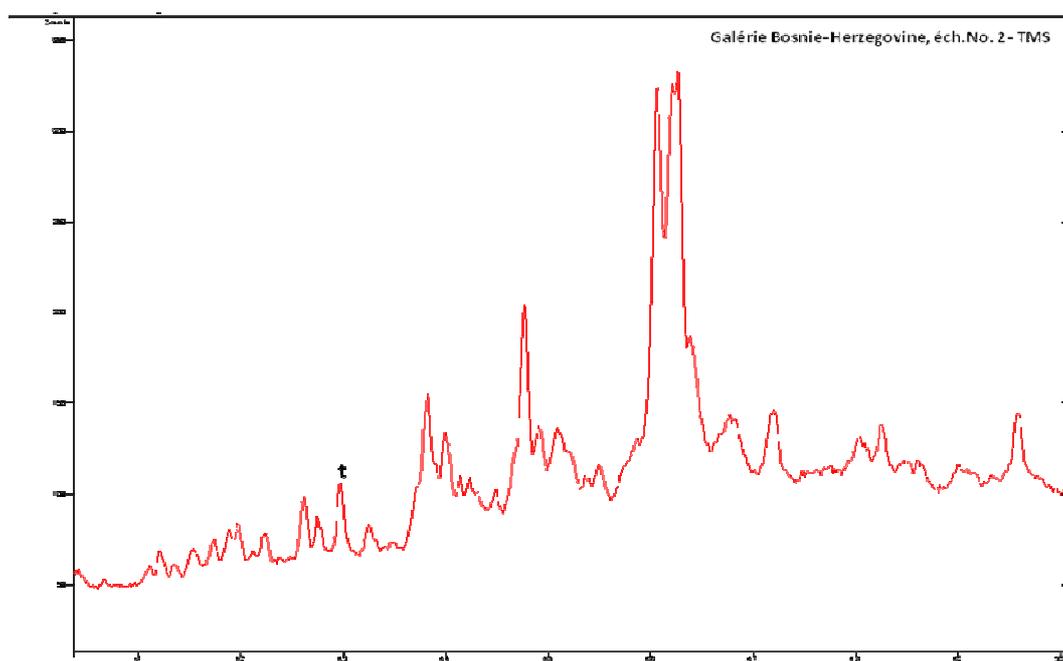


Figure 66 - Chromatogramme obtenu par CPG-SM pour l'échantillon artistique No 2 (2010)

Une très faible concentration d'échantillon est à remarquer sur ce chromatogramme. L'unique composé identifié correspond à la  $\beta$ -amyrine (**t**), qui est une molécule triterpénique présente dans un grand nombre de résines naturelles, ce n'est malheureusement pas un composé spécifique à la mastic ou à la dammar. Les autres pics apparus sur ce chromatogramme n'ont pas pu être caractérisés, car leurs spectres de masses n'ont pas pu être attribués aux composés identifiés dans ce travail. Le  $m/z$  majoritaire de ces pics est 131. On peut supposer que ce  $m/z$  correspond à un composé dégradé ou altéré, mais sans pouvoir donner sa structure ni l'attribuer à une des deux résines. En prenant en compte le contexte historique en Bosnie-Herzégovine, il semble plus probable que cet échantillon contienne un vernis à base de dammar. On peut supposer que le vernis a été enlevé, les traces restantes n'étant pas suffisantes pour obtenir un résultat d'analyse exploitable et convenable à nos besoins.

### b) Etude d'un échantillon archéologique

L'échantillon archéologique référencié G12 (cf. la partie 1) a été préparé selon le protocole PO-5. puis analysé par CPG-SM (figure 67).

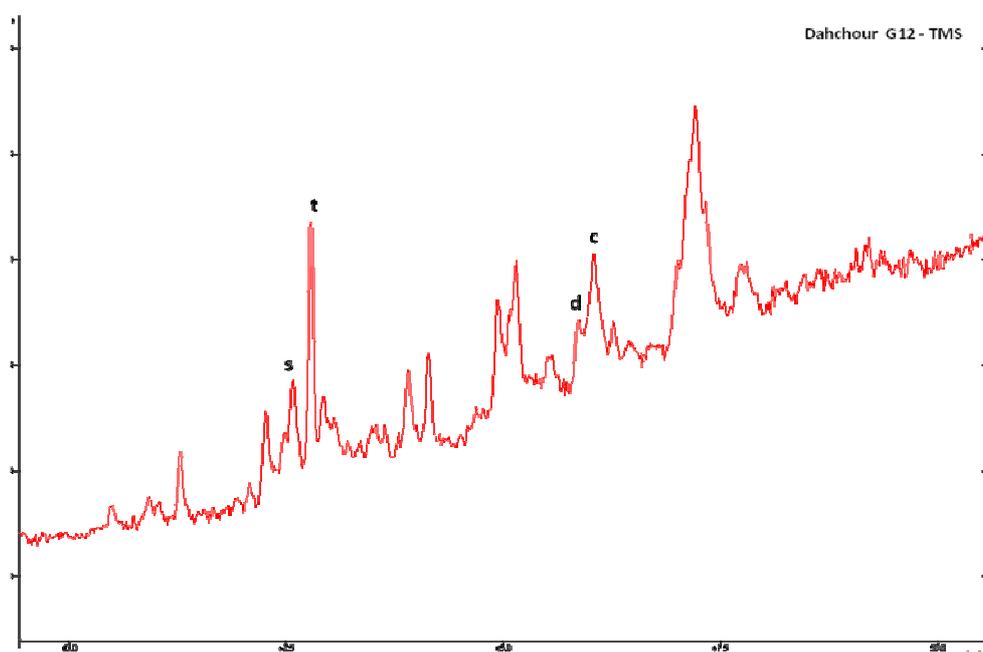


Figure 67 - Chromatogramme obtenu par CPG-SM pour l'échantillon archéologique G12

Les composés identifiés sont retrouvés en comparaison avec les résultats obtenus pour la résine mastic (cf. la partie 2.1.). Les spectres de masses ont été comparés avec le  $t_r$  des composés correspondants. En accord avec la littérature spécialisée (van der Doelen *et al*, 1998; Assimopoulou et Papageorgiou, 2005 ; Daniels *et al*, 2003), les acides oléanonique et moronique (**c** et **d**) servent de marqueurs chimiques pour identifier la résine mastic vieillie. A part ces deux molécules, on a identifié aussi les molécules du lupéol (**s**) et de la  $\beta$ -amyrine (**t**), mais ces dernières ne sont pas caractéristiques de la résine mastic.

# Conclusion générale et perspectives

\*~\*

Ce manuscrit représente un travail entièrement consacré à l'étude de trois résines naturelles, l'oliban, la dammar et la mastic et aux possibilités de leur identification. Du fait de leurs domaines d'utilisation nombreux et variés, il est utile de connaître précisément leur composition chimique. La caractérisation de ces matériaux résineux présents dans des échantillons artistiques et archéologiques contribue à une meilleure connaissance de l'Histoire des anciennes civilisations permettant ainsi de déterminer d'anciennes formulations funéraires, pharmaceutiques, cosmétiques et artistiques et finalement d'aider aux processus de restauration et de conservation dans le but de préserver et de protéger notre patrimoine culturel.

Pour la caractérisation des résines oliban, dammar et mastic, plusieurs techniques analytiques ont été utilisées dans ce travail. Un premier pas révélant la nature d'échantillon étudié est fait en effectuant des analyses par IRTF. Les spectres obtenus et les coefficients de corrélation correspondants ont mené la suite de ce travail vers les techniques chromatographiques, CLHP et CPG, en employant plusieurs modes de détection.

Les résines végétales étudiées dans ce travail sont des matériaux caractérisés par leur grande diversité naturelle en composés triterpéniques. Les triterpènes sont des molécules qui ne possèdent pas initialement les propriétés fluorescentes et pour les analyser en détection fluorimétrique, une procédure de formation des dérivés fluorescents *via* la réaction de greffage avec un marqueur fluorescent (chlorure de dansyle) a été mise en place. Les dérivés dansylés ont été ainsi réalisés puis analysés par CLHP/UV/Fluorimétrie. Le procédé de greffage du chlorure de dansyle sur les triterpènes a permis tout d'abord d'obtenir une réponse en détection fluorimétrique et de diminuer leur seuil de détection en les comparant avec les molécules triterpéniques standards. Après avoir appliqué ce protocole de dansylation du groupement alcool présent dans de nombreuses molécules triterpéniques, on a obtenu une empreinte digitale spécifique pour chaque résine étudiée, ce qui permet de distinguer clairement ces trois matériaux résineux. En conséquence, l'application de ce protocole sur un échantillon archéologique prélevé sur la momie de Hekaemsaf (collection Victor Loret, Lyon, France) a permis de détecter avec succès la présence de résine oliban. De plus, cette méthode a révélé des informations importantes

sur l'origine botanique de la résine employée et l'identification de l'espèce avec précision (*Boswellia frereana*). L'emploi des résines naturelles en ancienne Egypte est connu mais les données sont souvent incomplètes et parfois imprécises, ce qui peut mener à une confusion concernant l'origine botanique de diverses résines naturelles utilisées dans cette même période, comme l'oliban (famille Burseraceae, genre *Boswellia*) et la myrrhe (famille Burseraceae, genre *Commiphora*) par exemple. Ce mode de préparation d'échantillon *via* la réaction de greffage de Dzl évite de faire ce type de confusion, puisqu'il permet de distinguer précisément la source botanique de la résine utilisée par les anciens artisans. D'autre part, ce protocole de dérivation représente une nouvelle approche pour étudier les matériaux résineux employés dans le domaine du patrimoine culturel (Aksamija *et al*, 2012).

Les matériaux résineux ont été étudiés depuis de nombreuses années, notamment dans notre laboratoire (Vieillescazes, 1992; Mathe, 2003; Hovaneissian, 2005) par diverses techniques analytiques. Plusieurs protocoles de préparation et d'analyse d'échantillons artistiques et archéologiques ont été développés au sein de notre équipe (Culioli, 2003; Mathe, 2004; Hovaneissian, 2006). Dans ce travail, nous avons essayé d'améliorer les conditions d'analyse et d'optimiser les protocoles en appliquant de nouveaux outils techniques, comme la colonne Kinetex (Phenomenex). C'est une colonne RP-18 dite « core-shell » de nouvelle génération, avec un remplissage de silice innovant qui lui permet d'être utilisée dans des systèmes CLHP mais aussi dans des systèmes UPLC. Une colonne classique RP-18 a été utilisée avec succès pour analyser les résines naturelles (Vieillescazes, 1992 ; van der Doelen, 1999 ; Mathe, 2003, Hovaneissian, 2006) avec un grand nombre de composés caractérisés et une séparation satisfaisante et correcte. Néanmoins, la durée d'analyse était un point à corriger : 90 minutes pour les échantillons d'oliban et 50 minutes pour les résines dammar et mastic. Dans ce travail, on a testé pour la première fois une colonne de nouvelle génération et les résultats obtenus ont été très encourageants, le temps d'analyse a diminué de 73,33% pour la résine oliban (24 minutes nouveau temps d'analyse) et de 70% pour les résines dammar et mastic (15 minutes nouveau temps d'analyse). Les chromatogrammes résultants des analyses faites avec la colonne Kinetex ont relevé une répartition des pics quasi identique comme avec la colonne classique RP-18 et l'identification des composés apparus a été faite en accord avec la littérature spécialisée (van der Doelen, 1999; Mathe, 2003) et les  $t_r$  et les spectres UV correspondants. Les 16 composés triterpéniques identifiés dans l'oliban avec la

colonne classique RP-18 ont été retrouvés et identifiés avec la colonne Kinetex. Dans le cas des résines dammar et mastic, les 13 composés triterpéniques ont été identifiés avec la colonne Kinetex. Pour rappel, initialement avec la colonne classique RP-18, 9 et 11 composés triterpéniques ont été identifiés respectivement dans les résines dammar et mastic. Après ces résultats encourageants, la colonne Kinetex a été systématiquement employée pour analyser les échantillons résineux.

Une des questions de base purement physico-chimique, concerne l'extraction de mélanges chimiques complexes comme les résines. L'extraction de la partie résineuse est un pas inévitable mais aussi déterminant pour l'étude de ces substances. L'extraction par un procédé ou bien par un solvant donné peut être sélective, en visant un groupe précis de molécules. Dans ce travail, il a été étudié comment un processus d'extraction peut influencer sur la composition chimique d'une résine et quelles sont les molécules préférentiellement extraites en fonction du procédé et du solvant employé. Trois procédés d'extraction ont été testés dans ce travail: le reflux, le Soxhlet et les ultrasons. Concernant les solvants d'extraction, on a employé le méthanol et le n-hexane, comme les solvants classiquement utilisés pour l'extraction des matériaux résineux et un troisième, un solvant dit « vert », le d-limonène. Une étude quantitative de rendement selon les trois procédés d'extraction a été menée pour chaque résine étudiée. Il faut noter que l'étude de rendement d'extraction n'a pas pu être faite avec les extraits en d-limonène à cause de problème d'élimination de solvant après l'extraction.

Le calcul quantitatif est basé sur la différence entre la masse initiale de résine utilisée et le résidu sec obtenu après extraction. L'influence des solvants, du méthanol et du n-hexane, est évaluée par le calcul des différences de rendement entre le n-hexane et le méthanol. Après les résultats obtenus, on peut dire que les trois techniques sont bien adaptées pour l'extraction de la partie triterpénique. Les techniques classiques, comme le reflux et le Soxhlet, permettent d'extraire convenablement la partie résineuse, surtout dans le cas de la résine dammar (extraction en Soxhlet avec le méthanol). L'inconvénient de ces deux procédés est surtout le temps nécessaire pour l'extraction optimale, égal à 4h. Concernant les solvants employés, en général, le méthanol s'est montré légèrement supérieur pour extraire les molécules triterpéniques selon l'étude quantitative, pour les trois résines étudiées. Le procédé d'extraction par les ultrasons a donné des résultats encourageants, vu que la durée d'extraction optimale est de 10 minutes. Les résultats

quantitatifs montrent que le meilleur rendement de la partie triterpénique chez l'oliban (82,44%) et chez la mastic (96,14%) est obtenu avec ce procédé en employant le méthanol comme solvant.

Les extraits ont été ainsi analysés par CLHP/UV. Comme précédemment, les extraits obtenus en d-limonène n'ont pas pu être analysés avec cette technique à cause de l'absorption forte de d-limonène en UV. Les chromatogrammes obtenus ont relevé des profils similaires chez les trois résines étudiées. Les 16 composés triterpéniques identifiés dans l'oliban ont été caractérisés avec succès dans les extraits obtenus au reflux et au Soxhlet, en sachant que le protocole de préparation d'échantillon résineux pour l'analyse par CLHP/UV couramment utilisé dans notre laboratoire correspond à une extraction de 10 minutes en ultrasons. Concernant la dammar et la mastic, l'analyse des extraits au reflux et au Soxhlet a montré que les 13 composés triterpéniques identifiés précédemment sont aussi caractérisés dans ces extraits. L'influence attendue du solvant (méthanol-solvant polaire et n-hexane-solvant apolaire) n'a pas été observée. Pour appuyer cette hypothèse, une étude quantitative *via* le pourcentage d'aire relative des composés étudiés a été réalisée pour chaque résine étudiée ce qui a permis de faire une comparaison directe entre les quantités totales extraites pour chaque molécule par rapport au procédé d'extraction utilisé. L'interprétation des résultats quantitatifs traduit pour les trois résines, que généralement ni la nature du solvant ni celle du procédé d'extraction employé ne semblent influencer significativement le pourcentage de l'aire relative des composés triterpéniques. Les exceptions de cette conclusion sont la 3-*épi*- $\alpha$ -amyrine dans l'oliban (+19% au reflux en méthanol, par rapport au Soxhlet et aux ultrasons), les acides dammarénolique, ursonique et oléanonique dans la dammar (+12,6% aux ultrasons en méthanol, par rapport au Soxhlet et au reflux) et les deux acides isomères (iso)masticadiénolique (+9% aux ultrasons en méthanol par rapport aux ultrasons en n-hexane) et (iso)masticadiénolique (+6% au Soxhlet en méthanol par rapport aux ultrasons en n-hexane). Néanmoins, l'extraction aux ultrasons présente plusieurs avantages par rapport aux techniques classiques d'extraction (reflux et Soxhlet), comme:

- La réduction de temps d'extraction (10 minutes),
- l'économie de la matière première et du solvant nécessaire,

- la diminution de coût énergétique (l'extraction «à froid»),
- la simplicité (ne nécessite pas une verrerie spécialisée).

Un protocole d'extraction en phase solide (la SPE) a été mis en place durant ce travail. Il s'agit d'un procédé simple et rapide qui permet de purifier et de concentrer l'échantillon étudié avant l'analyse (dans le cas de ce travail, par CLHP/UV). Puisque on travaille souvent avec des échantillons archéologiques dans notre laboratoire, on rencontre le problème de la quantité limitée et minime, où la SPE pourra simplifier la tâche. De plus, la SPE a été déjà employée pour extraire les molécules triterpéniques (Theunis *et al*, 2007; Claude *et al*, 2008) et dans notre laboratoire la SPE a servi pour préparer des échantillons de colorants d'origine végétale (Cuoco, 2009). Le protocole SPE a été d'abord testé sur les échantillons des résines commerciales puis appliqué aux échantillons archéologiques. Les chromatogrammes obtenus ont montré que la SPE a permis de purifier l'échantillon et de mettre en évidence les composés présents. Néanmoins, la concentration de l'échantillon a significativement diminué (diminution de 14%), ce qui représente un désavantage important. Une nouvelle optimisation du protocole et un changement des cartouches utilisées pour la SPE représentent les possibilités à tester afin d'obtenir un meilleur résultat.

La dernière technique analytique employée dans ce travail pour étudier les trois résines naturelles est la chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CPG-SM). Tout d'abord, les analyses par CPG-SM ont été faites avec des résines commerciales, puis avec les extraits obtenus. L'identification des composés triterpéniques (les 16 composés dans l'oliban, les 15 composés dans la dammar et les 10 composés dans la mastic) a été effectuée en accord avec la littérature spécialisée et en comparant les résultats obtenus avec la base de données NIST et les spectres de masse des dérivés triméthylsilylés. Il faut noter qu'un travail préalable a été fait dans notre laboratoire avec la résine oliban, ce qui a aidé à l'identification des composés présentés dans ce manuscrit. Néanmoins, pour les résines dammar et mastic, le but a été de créer une base de données pour les dérivés triméthylsilylés, puisque dans la littérature spécialisée les dérivés méthylés sont les seuls rapportés pour ces deux résines (van der Doelen, 1999; Assimopoulou *et al*, 2005). L'extraction de la partie résineuse des trois résines étudiées a été testée avec le troisième solvant-le d-limonène (ce solvant absorbe fortement dans le

domaine UV, ce qui a rendu impossible l'analyse de ces extraits par CLHP/UV). Le fait qu'il soit très difficile d'éliminer le d-limonène après l'extraction, nous a amené à tester la préparation des dérivés triméthylsilylés directement dans l'extrait, en présence de solvant d'extraction. Les résultats obtenus ont été très encourageants et innovants. Le fait d'utiliser le d-limonène permet à la fois d'extraire la fraction résineuse de la substance à analyser mais il sert également de solvant permettant la dérivation des molécules triterpéniques. Il s'agit donc d'un solvant «3 en 1» évitant les étapes classiques d'élimination des solvants d'extraction et de dérivation et autorisant ainsi une injection directe en CPG-SM. Ce solvant «vert» ne présente donc que des avantages pour l'étude des résines triterpéniques en chromatographie en phase gazeuse:

- réemploi d'un solvant «déchet» issu de l'industrie,
- gain de temps,
- économie de solvant,
- économie d'énergie.

Il est à noter qu'à notre connaissance c'est la première fois qu'un solvant «vert» a été utilisé pour extraire et étudier ce type de matériaux. Après l'interprétation des chromatogrammes obtenus, dans les extraits de l'oliban on peut supposer la présence des 4 composés triterpéniques ayant une structure ursane ou oléanane ou tirucallane, qui n'ont pas pu être identifiés car les standards ne sont pas commercialement disponibles. Leur structure a pu être approchée en étudiant les spectres de masse correspondants. Dans les extraits de la mastic, on a observé les deux composés supposés avoir une structure tirucallène, mais comme dans le cas de l'oliban, leur identification n'a pas été faite à cause d'indisponibilité des standards commerciaux.

Etant donné ces résultats très encourageants, il serait utile de poursuivre cette étude en testant par exemple d'autres solvants «verts» comme le pinène, pour notamment essayer de palier à un des inconvénients de d-limonène à savoir son haut point d'ébullition.

Finalement, les échantillons artistiques et archéologiques ont été également analysés dans ce travail. Il s'agit de huit échantillons artistiques, prélevés dans la Galerie Nationale de Bosnie-Herzégovine supposés contenir un vernis à base de résine naturelle. Les

échantillons archéologiques proviennent de la collection Victor Loret, en provenance d'ancienne Egypte, supposés contenir une résine végétale triterpénique. L'ensemble des échantillons artistiques et archéologiques ont été analysés par plusieurs techniques analytiques (IRTF, CLHP/UV, CLHP/UV/Fluorimétrie, CPG-SM). De huit échantillons artistiques analysés par IRTF, seulement un, l'éch. No 2(2010), a relevé une possibilité de présence d'une gomme-résine végétale mais aussi une forte possibilité de contenir une résine synthétique, Primal ou Plextol B360, utilisées généralement dans les processus de restauration et de conservation des œuvres peintes. L'analyse est poursuivie en CPG-SM, qui a donné un chromatogramme de très faible concentration en résine végétale. Néanmoins, les spectres de masses des composés triterpéniques apparus sur le chromatogramme restent inconnus. L'échantillon provient d'un tableau de début de XX<sup>ème</sup> siècle (période austro-hongroise), donc il est fortement possible qu'il ait contenu un vernis à base d'une résine naturelle, mais qu'il ait été nettoyé. Les traces restantes de ce vernis pourraient donner ce chromatogramme peu exploitable et ambigu.

L'échantillon archéologique G12 a été analysé par CLHP/UV avec la préparation par SPE et en CPG-SM. La présence des marqueurs chimiques de la résine mastic (acides moronique et oléanonique) ont été trouvée par CLHP/UV et confirmée en CPG-SM. Les acides moronique et oléanonique sont en général les molécules retrouvées dans la résine mastic vieillie et elles servent de marqueurs chimiques pour l'identification de cette résine. A part ces deux composés, le lupéol et la  $\beta$ -amyrine ont été également identifiés dans l'échantillon G12.

Ce manuscrit regroupe une étude analytique sur les trois résines triterpénique, l'oliban, la dammar et la mastic et il représente une modeste participation à la connaissance de ces matériaux complexes, utilisés dans divers domaines, en pharmacie, en cosmétologie, en médecine et aussi dans le domaine du patrimoine culturel et dans l'Art. En espérant qu'il servira pour approfondir et pour aller encore plus loin dans notre connaissance et dans la recherche.

# Références bibliographiques

Abdel Wahad S.M., Aboutabl E.A., El-Zalabani S.M., Fouad H.A., De Pooter H.L., El-Fallaha B. (1987), «The essential oil of olibanum», *Planta Medica*, 53 (4), p. 382-384.

Aksamija A., Mathe C. et Vieillescazes C. (2012), «Liquid chromatography of triterpenic resins after derivatization with dansyl chloride», *Journal of liquid chromatography and related technologies*, 35 (9), p. 1082-6076.

Albani J. R. (2001), «Absorption et fluorescence, principes et application», Editions TEC&DOC, Londres-Paris-New York.

Al Said M., Ageel A.M., Parmar N.S. et Tariq M. (1986), «Evaluation of mastic obtained from *Pistacia lentiscus* crude drug for gastric and duodenal anti-ulcer activity», *Journal of Ethnopharmacology*, 15 (3), p. 271-278.

Al-Harrasi A. et Al-Saidi S. (2008), «Phytochemical Analysis of the Essential Oil from Botanically Certified Oleogum Resin of *Boswellia sacra* (Omani Luban)», *Molecules*, 13 (9), p. 2181-2189.

Ammon H.P.T. (2002), «Boswellic acids (components of frankincense) as the active principle in treatment of chronic inflammatory diseases», *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 152 (15-16), p. 373-378.

Anderson J.A.R. (1975), «The potential of illipe nuts (*Shorea* spp.) as an agricultural crop» *In: Williams et al.* (eds.) *Proceeding of Symposium on South East Asian Plant Genetic Resources*, Bogor, Indonesia, March 20-22, 1975., p. 217-230. BIOTROP, Bogor.

Anderson K.B., Winans R.E., Botto R.E. (1992), «The nature and fate of natural resins in the geosphere-II. Identification, classification and nomenclature of resinites», *Organic Geochemistry*, 18, p. 829-841.

Anonymous (1985)(a), «Dipterocarps of South-Asia», RAPA Monograph 4/85, FAO Regional Office for the Asia and the Pacific, Bangkok.

Anonymous (1985)(b), «Statistic of external trade in Sarawak» (1976-1986). Dept. Of Statistic (Sarawak Branch), Kuching.

Appanah S., Ashton M.S., Bawa K.S., Curtet L., Elouard C., Jantan I., Krisnapillay B., Lee S.S., Maury-Lechon G., Shiva M.P., Tompsett P.B. and Weinland G. (1998), «A Review of Dipterocarps – Taxonomy, ecology and silviculture», editors Simmathiri Appanah et Jennifer M. Turnbull, by Center for International Forestry Research, Bogor, Indonesia.

Arias M., Penichet I., Ysambertt F., Bauza R., Zougagh M., Ríos Á. (2009), «Fast supercritical fluid extraction of low- and high-density polyethylene additives : Comparison with conventional reflux and automatic Soxhlet extraction», *The Journal of Supercritical Fluids*, 50 (1), p. 22-28.

Assimopoulou A.N. et Papageorgiou V.P. (2005), «GC-MS analysis of penta- and tetracyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part I. *Pistacia lentiscus* var. Chia», *Biomedical Chromatography*, 19 (4), p. 285-311.

Assimopoulou A.N., Zlatanov S.N. et Papageorgiou V.P. (2005), «Antioxidant activity of natural resins and bioactive triterpenes in oil substrates», *Food Chemistry*, 92 (4), p. 721-727.

Aston F. W. (1919), «A positive ray spectograph», *Philosophical Magazine Series 6*, 38 (228), p. 707-714.

Atchley, E.G. et Cuthbert F. (1909), «A history of the use of incense in divine worship», Longmans, Green and Co, London.

Banwell C. N. and McCash E. M. (1994), «Fundamentals of Molecular Spectroscopy», McGraw Hill.

Barbier C. (1982), Rapport de mission: projet encens du Nord Est Somalien.

Barton D.H.R. and Seoane E. (1956), «Triterpenoids. Part XXII. The constitution and stereochemistry of masticadienonic acid», *Journal of the Chemical Society*, p. 4150-4157.

Basar S., Koch A., König W.A. (2001), «A verticillane-type diterpene from *Boswellia carterii*», *Flavour and Fragrance Journal*, 5 (16), p. 315-318.

Bégin D. et Gérin M. (1999), «La substitution des solvants par le d-limonène», Département de médecine du travail et d'hygiène du milieu, Université de Montréal, IRSST.

Benthin B., Danz H. et Hamburger M. (1999), «Pressurized liquid extraction of medicinal plants», *Journal of Chromatography A*, 837 (1-2), p. 211-219.

Bianchini J.-P., Gaydou E.M., Rafaralahitsimba G., Waegell B. et Zahra P. (1988), «Dammarane derivatives in the fruit lipids of *Olea Madagascariensis*», *Phytochemistry*, 27 (7), p. 2301-2304.

Bisset N.G., Chavanel V., Lantz J.-P. et Wolff R.E. (1971), «Constituants sesquiterpéniques des résins du genre *Shorea*», *Phytochemistry*, 10 (10), p. 2451-2463.

Bisset N.G., Diaz M.A., Ehret C., Ourisson G., Palmade M., Patil F., Pesnelle P. et Streith J. (1966), «Etudes chimio-taxonomiques dans la famille des Dipterocarpacees-II: Constituants du genre *Dipterocarpus* Gaertn. F. Essai de classification chimio-taxonomique», *Phytochemistry*, 5, p. 865-880.

Bisset N.G., Diaz-Parra M.A., Ehret C. et Ourisson G. (1967), «Etudes chimio-taxonomiques dans la famille des Dipterocarpacees-III: Constituants des genres *Anisoptera* Korth., *Cotylelobium* Pierre, *Dryobalanops* Gaertn. F. et *Upuna* Sym. », *Phytochemistry*, 6, p. 1396-1405.

Blair R.W. et Byron F.E. (1926), «Notes on dammar penak», *Malayan Forest Record*, 4, Kuala Lumpur.

Boar R.B., Couchman L.A., Jaques A.J. et Perkins M.J. (1984), «Isolation from *Pistacia* resins of a bicyclic triterpenoid representing an apparent trapped intermediate of squalene 2,3-epoxide cyclization», *Journal of the American Chemical Society*, 106, p. 2476-2477.

Boiteau P. et Chanez M. (1964), «Structure chimique des triterpénides cicatrisants majeurs», *Ann. de l'Univ. de Mad. (médecine)* T2-1964 V.4, p. 109-113.

Bona S.G., Bono L., Dagheta L et Marone P. (2001), «Bactericidal activity of *Pistacia lentiscus* gum mastic against *Helicobacter pylori*», *American Journal of Gastroenterology*, September suppl.; S49.

Brewis S. et Halsall T.G. (1961), «The Chemistry of Triterpenes and Related Compounds», Part XXXVIII. The Acidic Constituents of Dammar Resin, *Journal of the Chemical Society*, p. 646-50.

Brewis S., Halsall T.G., Harrison H.R. et Hodder O.J.R. (1970), «Crystallographic structure determination of a triterpene dimethyl ester epsilon-lactone from dammar resin», *Journal of the Chemical Society D*, p. 891-892.

Brown J. M. (1998), «Molecular Spectroscopy», Oxford University Press.

Brügel W. (1962), «An Introduction to Infrared Spectroscopy», Methuen&Co. Ltd.

Bruneton J. (1999), «Pharmacognésie Phytochimie, Plantes médicinales», 3<sup>ème</sup> édition, TEC et DOC, Paris.

Burkill I.H. (1935), «Dictionary of the economic products of the Malay Peninsula», 2 vols. Crown Agents for the Colonies, London.

Carlyle L. A. (1991), «Critical Analysis of Artists' Handbooks, Manuals and Treatises on Oil Painting published in Britain between 1800-1900: with reference to selected 18th century sources», PhD dissertation, Courtauld Institute of Art, University of London.

Carlyle L., Binnie N.E., Van der Doelen G., Boon J., McLean B. and Ruggles A. (1998), «Traditional Painting Varnishes Project: Preliminary Report on Natural and Artificial Aging and a Note on the Preparation of Cross-sections» In: *Postprints of Firnis, Material Aesthetik Geschichte, International Kolloquium, Braunschweig*, p. 110-127.

Carter R. L. (1998), «Molecular Symmetry & Group Theory», John Wiley & Sons

Cerny J., Vystrcil A. et Huneck S. (1963), «Ube rein neues triterpen aus Dammar-Harz», *Chemische Berichte*, p. 3021-3023.

Chatot G., Castegnaro M., Roche J.L., Fontanges R, avec la collaboration technique de Obaton P. (1971), «Etude comparée des ultra-sons et du soxhlet dans l'extraction des hydrocarbures polycycliques atmosphériques», *Analytica Chimica Acta*, 53 (2), p. 259-265.

Chen Y., Xie M.-Y., Gong X.-F. (2007), «Microwave-assisted extraction used for isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*», *Journal of Food Engineering*, 81 (1), p. 162-170.

Claude B., Morin P., Lafosse M., Belmont A.-S. et Haupt K. (2008), «Selective solid-phase extraction of a triterpene acid from a plant extract by molecularly imprinted polymer», *Talanta*, 75 (2), p. 344-350.

Colthup N. B., Daly L. H. and Wiberley S. E. (1975), «Introduction to Infrared & Raman Spectroscopy», Academic Press.

Copley J.S. (1914), «Letters and Papers of John Singleton and Henry Pelham, 1739-1776», Boston, Massachusetts Historical Society, p. 342.

Coppens J.J.W. (1995), «Olibanum (frankincense), myrrh and opoponax resins and oils», *Flavours and Fragrances of Plant Origin, Non-Wood Forest Products*, FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 1.

Corsano S. et Nicoletti R. (1967), «The structure of incensole», *Tetrahedron*, 23 p. 1977-1984.

Corsano S., Iavarone C. (1964), «Isolamento dall'incenso dell'acido 3-acetil-11-ossi-bosvellico», *Gazzetta Chimica Italian*, 94, p. 328-339.

Costes C. (1966), «Biosynthèse du phytol des chlorophylles et du squelette tétraterpénique des caroténoïdes dans les feuilles vertes», *Phytochemistry*, 5, (3), p. 311-324.

Croteau R., Kutchan T.M., Lewis N.G. (2000), *Natural Products (Secondary Metabolites Chapter 24. «Biochemistry & Molecular Biology of Plants»*, B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones; Eds. ©2000, American Society of Plant Physiologist.

Croteau, R. (1998), «The discovery of terpenes» In: *Discoveries in Plant Biology*, p. 329-343, eds. S.-d. Kung and S.-f. Yang; World Scientific, Singapore.

Culioli G., Mathe C., Archier P. et Vieillescazes C. (2003), «A lupane triterpene from frankincense (*Boswellia* sp., Burseraceae)», *Phytochemistry*, 62 (4), p. 537-541.

Cuoco G. (2009), «Etude chimique et caractérisation de principes colorants historiquement employés dans l'impression des indiennes en Provence»; Ph.D. thesis, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse.

Dahmen U., Gu Y.L., Dirsch O., Fan L.M. et Li J. (2001), «Boswellic acid, a potent anti-inflammatory drug, inhibits rejection to the same extent as high dose steroids», *Transplantation Proceedings*, 33 (1-2), p. 539-541.

Daniels V., Stacey R. and Middleton A. (2003), *Conservation Science and Analytical Chemistry Report «The Blackening of Egyptian Blue»*; The British Museum, Department of Conservation, Documentation and Science.

Davidson D.F.D. (1948), Report on the gum mastic industry in Chios. *Bulletin of the Imperial Institute*, 46, p. 184-191.

de la Rie E.R. (1988), «Stable Varnishes for Old Master Paintings», Ph.D. Thesis, University of Amsterdam.

de la Rie E.R. (2003), «Why use synthetic picture varnish?» Bernier J.-C., Guignot F., Mohen J.-P., Potier P. (Eds.), *Art et Chimie – Les polymères*, p. 63-68.

De Vartavan C.T. (2007), «Pistacia species in relation to their use as varnish and “incense” (sntr) in pharaonic Egypt», *Bulletin of Parthian and Mixed Oriental Studies*, 2, p. 63-92.

Denoel A. (1958), «Burséracées», *Matière médicinale végétale (Pharmacognésie)*, p. 511-515.

Derrick M. (1989), «Fourier Transform Infrared Spectral Analysis of Natural Resins Used in Furniture Finishes», *Journal of the American Institute for Conservation (JAIC)*, 28, (1), p. 43-56.

Diaz M.A. et Ourisson G. (1966), «Etudes chimiotaxonomiques dans la famille des Dipterocarpacees I», *Phytochemistry*, 5 (5), p. 855-863.

Diaz M.A., Ehret C., Ourisson G., Palmade M., Patil F., Pesnelle P. et Streith J. (1966), «Constituants des résins de Dipterocarpus vietnamiens», *Vietnam Chimica Acta*, p. 79-85.

Diem M. (1994), «Introduction to Modern Vibrational Spectroscopy», Wiley.

Dietemann P. (2003), «Towards More Stable Natural Resin Varnishes for Paintings; The Aging of Triterpenoid Resins and Varnishes», Ph.D. Thesis, Swiss Federal Institute of Technology (ETH) Zürich.

Duke J.A. (1983), «Medicinal Plants of the Bible», Trado-Medic Books, New York, p. 90.

Duke J.A. (1985), CRC Handbook of medicinal Herbs. CRC Press, Boca Raton.

Dupéron J. (1979), «Contribution à l'étude de *Boswellia sacra*: anatomie de la plantule et de la tige agée», Bulletin du Musée national d'Histoires Naturelle, Paris, 4<sup>e</sup> (1), sect. B, 3, p. 171-189.

Dupéron J. (1993), «L'encens et les *Boswellia*: Historique. Apport de l'anatomie à la systématique de trois *Boswellia* de Somalie et du Yémen», Revue de Cytologie et de Biology Végétales – Le Botaniste, 16 (3-4), p. 185-209.

Echard J.P., Benoit C., Peris-Vicente J., Malecki V., Gimeno-Adelantado J.V. et Vaiedelich S. (2007), «Gas chromatography/mass spectrometry characterisation of historical varnishes of ancient Italian lutes and violin», Analytica Chimica Acta, 584 (1), p. 172-180.

Evershed R.P., Van Bergen P.F., Peakman T.M., Leigh-Firbank E.C., Horton M.C. (1997), «Archaeological frankincense», Nature, 390, p. 667-668.

Fattorusso E., Santacroce C. et Xaasan C.F. (1985), «Dammarane triterpenes from the resin of *Boswellia frereana*», Phytochemistry, 24 (5), p. 1035-1036.

Fattorusso E., Santacroce C., Xaasan C.F. (1983), «4(23)-dihydroroburic acid from the resin (incense) of *Boswellia carterii*», Phytochemistry, 22 (12), p. 2868-2869.

Faure P. (1987), «Parfums et aromates de l'Antiquité», librairie Arthème Fayard, Hachette/Pluriel, Evreux, p. 234-235.

Feller R.L. (1964), «What's in a name? Dammar or serendipity in the library», The Crucible, 49 (8).

Feller R.L., Stolow N., and Jones E.H. (1985), «On picture varnishes and their solvents», rev. and enlarged ed. Washington, D.C., National Gallery of Art, p. 158-59.

Flesch G. et Rohmer M. (1988), «Procaryotic hopanoids: The biosynthesis of the bacteriohopane skeleton. Formation of isoprenic units from two distinct acetate pools and a novel type of carbon/carbon linkage between triterpenes and D-ribose», European Journal of Biochemistry, 175, p. 405-411.

Flückiger F.A. et Hanbury D. (1878), «Histoires des drogues d'origines végétale», traduction et notes de Y. L. de Lanessan, Paris, Octave Doin I, p. 261.

Forcellese M.L., Nicoletti R., Petrossi U. (1972)(a), «The structure of isoincensole-oxide», *Tetrahedron*, 28 (2), p. 325-331.

Forcellese M.L., Nicoletti R., Santarelli C. (1972)(b), «The revised structure of isoincensole-oxide», *Tetrahedron Letters*, 39, p. 3783-3786.

Garnero J. (1996), «Huiles essentielles», édition Techniques de l'ingénieur, traité Constantes physico-chimiques.

Gettens R.J. and Stout G.L. (1966), «Painting Materials, a short Encyclopaedia», Dover publications Inc. New York.

Gianno R. (1990), «Semelai Culture and Resin Technology», Connecticut Academy of Arts and Science, New Haven.

Goodwin T. W. (1977), «The prenyl lipids of the membranes of higher plants» *Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants*-editors M. Tevini et H. K. Lichtenthaler; p. 29-47, Springer-Verlag, Berlin.

Goodwin T. W. (1981), «Biosynthesis of plant sterols and other triterpenoids» *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*-editors J. W. Porter et S. L. Spurgeon; Vol 1, p. 444-480, John Wiley and Sons, New York.

Gritti F. et Guiochon G. (2010)(a), «Mass transfer resistance in narrow-bore columns packed with 1,7  $\mu\text{m}$  particles in very high pressure liquid chromatography», *Journal of Chromatography A*, 1217 (31), p. 5069-5083.

Gritti F. et Guiochon G. (2010)(b), «Performance of columns packed with the new shell Kinetex C-18 particles in gradient elution chromatography», *Journal of Chromatography A*, 1217 (10), p. 1604-1615.

Gritti F., Sanchez C. A., Farkas T. et Guiochon G. (2010), «Achieving the full performance of highly efficient columns by optimizing conventional benchmark high-performance liquid chromatography instruments», *Journal of Chromatography A*, 1217 (18), p. 3000-12.

Grougnet R., Magiatis P., Mitaku S., Skaltsoumis A-L., Cabalion P., Tillequin F. et Michel S. (2011), «Dammarane Triterpenes from *Gardenia aubryi* Vieill.», *Helvetica Chimica Acta*, 94 (4), p. 656-661.

Grundwag M. et Werker E. (1976), «Comparative wood anatomy as an aid to identification of *Pistacia* L. species», *Israel Journal of Botany*, 25, p. 152-167.

Gupta I., Parihar A., Malhotra P., Singh G.B., Ludtke R. (1997), «Effects of *Boswellia serrata* gum resin in patients with ulcerative colitis», *European Journal of Medical Research*, 2 (1), p. 37-43.

Haken H. and Wolf H. C. (1995), «Molecular Physics and Element of Quantum Chemistry: Introduction to Experiments and Theory», Springer

Haluk J.P. (2005), «Les arbres à parfums», Laboratoire de Biochimie Appliquée, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA), Nancy, France.

Hamm S., Lesellier E., Bleton J., Tchaplà A. (2003), «Optimisation of headspace solid microextraction for gas chromatography/mass spectrometry analysis of widely different volatility and polarity terpenoids in olibanum», *Journal of Chromatography A*, 1018 (1), p. 73-83.

Handa, S.S., Khanuja S.P.S., Longo G. et Rakesh D.D. (2008), «Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants», International Centre for Science and High Technology, Trieste, p. 21-25.

Haralampidis K., Trojanowska M. et Osbourn A. E. (2002), «Biosynthesis of Triterpenoid Saponins in Plants», *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 75, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Harrison H.R., Hodder O.J.R., Brewis S. et Halsall T.G. (1971), «Chemistry of triterpenes and related compounds XLVII. Crystal and molecular structure of «compound B», a triterpene dimethyl ester epsilon-lactone from dammar resin», *Journal of the Chemical Society C*, p. 2525-2529.

Hartmann T. (2007), «From waste products to ecochemicals : Fifty years research of plant secondary metabolism», *Phytochemistry* 68 (22-24), p. 2831-2846.

Hartwell J. (1967), «Plants used against cancer», *Lloydia*, 30 (4), p. 395-397.

Hassan H.S., Musa A.M., Usman, M.A. et Abdulaziz, M. (2009), «Preliminary phytochemical and antispasmodic studies of the stem bark of *Boswellia dalzielii*», *Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8 (1).

Hepper N. (1969), «Arabian and African frankincense trees», *Journal of Egyptian Archaeology*, 55, p. 66-72.

Hernández-Vázquez L., Mangas S., Palazón J. et Navarro-Ocaña (2010), «Valuable medicinal plants and resins: Commercial phytochemicals with bioactive properties», *Industrial Crops and Products*, 31, p. 476-480.

Herzberg G. (1945), «Molecular Spectra and Molecular Structure in Infrared and Raman Spectra of Polyatomic Molecules», D. Van Nostrand Company.

Hildebrandt J.M. (1878), «Note sur l'encens et la myrrhe», *Sber. Ges. Naturf. Freunde Berlin*, p. 195-197.

Hillis, W.E. (1987), «Heartwood and Tree Exsudates», Springer-Verlag, New York Inc.

Honda K. (1990), «GC-MS and <sup>13</sup>C-NMR studies on the biosynthesis of terpenoid defensive secretions by the larvae of papilionid butterflies (*Luehdorfia* and *Papilio*)», *Insect Biochemistry*, 20 (3), p. 245-250.

Horváth Cs., Preiss B.A. et Lipsky S. R. (1967), *Anal. Chem.*, 39, p. 1422-1428.

Hovaneissian M., Archier P, Mathe C. et Vieillescazes C. (2006), «Contribution de la chimie analytique à l'étude des exsudats végétaux styrax, storax et bejoin», *Comptes Rendus Chimie*, 9 (9), p. 1192-1202.

Hovaneissian M., Archier P, Mathe C., Culioli G. et Vieillescazes C. (2007), «Analytical investigation of styrax and bezoin balsams by HPLC-PAD-Fluorimetry and GC-MS», *Phytochemical Analysis* (2008), 19 (4), p. 301-310.

Hovaneissian M. (2005), «Differentiation de substances naturelles par diverses techniques analytiques: Spectroscopie IRTF, CLHP/UV-Visible/Fluorimétrie et CPG-SM. Application à l'étude d'échantillons officinaux et archéologiques», travail de these à l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse.

Howes F.N., (1949), «Vegetable Gums and Resins», Chronica Botanica, Waltham, Massachusetts.

<http://www.amb-grece.fr/grece/mastic.htm>

<http://www.universalis.fr/encyclopedie/spectroscopie/1-historique/>

Huan M.T., Badmaev V., Ding Y., Liu Y. et Xie J.G. (2000), «Anti-tumor and anti-carcinogenic activities of triterpenoid,  $\beta$ -boswellic acid», BioFactors (Oxford, England), 13 (1-4), p. 225-230.

Huwez F.U., Thirlwell D., Cockayne A. et Ala'Aldeen D.A.A. (1998), «Mastic gum kills *Helicobacter pylori*», The New England Journal of Medicine, 339 (26), p. 1946.

Jafarsidik J. (1987), «Dammar resin producing tree species and their distribution in Indonesia», Duta Rimba, 8182, p. 7-11.

Jensen W.B. (2007), «The Origin of the Soxhlet extractor», Journal of Chemical Education, 84 (12), p. 1913-1917.

Jing Y., Nakajo S., Xia L., Nakaya K. et Fang Q. (1999), «Boswellic acid acetate induces differentiation and apoptosis in leukemia cell lines», Leukemia Research, 23 (1), p. 43-50.

Jones J.K.N., Nunn J.R. (1955), «The structure of frankincense Gum», J. Am. Chem. Soc., 77 (21), p. 5745-5746.

Jost T., Sell Y. et Foussereau J. (1989), «Contact allergy to Manila resin. Nomenclature and physico-chemistry of Manila, kauri, damar and copal resins», Contact Dermatitis, 21, p. 228-238.

Kappers I.F., Aharoni A., Van Herpen T., Luckerhoff L., Dicke M., Bouwmeester H.J. (2005), «Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to *Arabidopsis*», Science, 309, p. 2070-2072.

Kirkland J.J. (1970), «Superficially Porous Supports for Liquid Chromatography», U.S. Patent 3505785.

Kirtikar K.R. et Basu B.D. (1935), «Indian medicinal plants», Vol. I, Bishen Singh Mahendra Pal Singh, Dehra Dun.

Klein E. et Obermann H. (1978), «(S)-1-isopropyl-4,8,12-trimethyl-cyclotetradeca<sup>3E,7E,11E</sup>-trien-1-ol, ein neues cembrenol aus dem ätherischen öl von olibanum», *Tetrahedron Letters*, 4 p. 349-352.

Koller J., Baumer U., Grosser D. et Schmid E. (1997), «Mastic in Baroque and Rococo Lacquers», ed. K. Walch and J. Koller, *Arbeitshefte des Bayerischen Landesamtes für Denkmalpflege*, 81, Karl M. Lipp Verlag, München, p. 347-358.

Kulshreshtha M.J., Kulshreshtha D.K. et Rastogi R.P. (1972), «The triterpenoids - a review», *Phytochemistry*, 11, p. 2369-2381.

Lampert C.D. (2003), «The characterisation and radiocarbon dating of archaeological resins on Southeast Asian ceramics», Ph.D. Thesis, University of Bradford.

Langenheim J.H. (2003), «Plant resins», Timber Press Portland, Cambridge.

Lavie D., Frolow F., et Meshulam H. (1984), «The X-ray structure of methyl shoreate and the stereochemistry of eichlerianic acid, cabraleone and ocotillone», *Tetrahedron*, 40 (2), p. 419-420.

Le petit Larousse, 1993; Dictionnaire encyclopédique, Larousse

Lefebvre J.-P., Lasaygne P., Potel C. et de Belleval J.-F. (2004), «L'acoustique ultrasonore et ses applications», 1<sup>ère</sup> partie Spécial ultrasons; *Revue Acoustique & Techniques*, 36, CIDB-SFA Editeur.

Lesesne C.B. (1992), «The postoperative use of wound adhesives. Gum mastic versus benzoin», *Journal of Dermatologic Surgery and Oncology*, 18 (11), p. 990.

Liu J.-J., Nilsson A., Stina O., Badmaev V. et Duan R.-D. (2002), «Keto- and acetyl-keto-boswellic acids inhibit proliferation and induce apoptosis in Hep G2 cells via a caspase-8 dependent pathway», *International Journal of Molecular Medicine*, 10 (4), p. 501-505.

Loret V. (1949), «La résine de térébinthe (Sonter) chez les anciens égyptiens», IFAO, Le Caire.

Luque de Castro M.D. et García-Ayuso L.E. (1998), «Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future», *Analytica Chimica Acta*, 369 (1-2), p. 1-10.

Luque de Castro M.D. et Priego-Capote F. (2010), «Soxhlet extraction: Past and present panacea», *Journal of Chromatography A*, 1217 (16), p. 2383-2389.

Mabberley D.J. (1997), «The Plant-book», ed. 2. University of Cambridge Press, Cambridge.

Mahajan B., Taneja S.C., Sethi V.K., Dhar K.L. (1995), «Two terpenoids from *Boswellia serrata* gum resin», *Phytochemistry*, 39 (2), p. 453-455.

Mantel, C.L. (1950), «The natural hard resins –their botany, sources and utilisation», *Economic Botany*, 4, p. 203-242.

Marner F.-J., Freyer A., et Lex J. (1991), «Triterpenoids from gum mastic, the resin of *Pistacia Lentiscus*», *Phytochemistry*, 30 (11), p. 3709-3712.

Martindale W. (1958), «The extra pharmacopoeia», Vol. II, Pharmaceutical Press, London.

Mathe C. (2003), «Etude de résines naturelles; Caractérisation par CLHP et CPG couplées à divers modes de détection: UV/Visible, Fluorimétrie et Spectrométrie de masse», travail de thèse à l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse.

Mayer L. and Myers G. (2002), «A note on the early use of dammar varnish», *Studies in Conservation*, 47 (2), p. 134-138.

Mayer L. and Myers G. (2010), «American painters and varnishing : British, French and German connections», *Journal of the Institute of Conservation*, 33 (2), p. 117-127.

McHale J. L. (1999), «Molecular Spectroscopy», Prentice Hall, 1<sup>st</sup> edition, Upper Saddle River, New Jersey.

Mills J.S. (1956), «The constitution of the neutral, tetracyclic triterpenes of Dammar resin», *Journal of the Chemical Society*, p. 2196-2202.

Mills J.S. et Werner A.E.A. (1955), « The chemistry of Dammar resin », *Journal of the Chemical Society*, p. 3132-3140.

Mills J.S. et White R. (1987), «Natural resins and lacquers» In: *The Organic chemistry of Museum Objects*, ed. 2, p. 95-128, First Edition, Butterworth Heinemann, London.

Mladenovic M. et Barkovic D. (1939), «Zur Kenntnis des Dammarharzes – Über Dammarharzsäuren», *Monatshefte für Chemie*, 73 (1), p. 206-213.

Mothes K. (1980), «Nebenwege des Stoffwechsels bei Pflanze, Tier und Mikrobe», *Mitt. Chem. Ges. DDR* 27, p. 2-10.

Naves Y.R. (1974), «Technologie et chimie des parfums naturels: essences concrètes, résinoïdes, huiles et pommades aux fleurs», *Masson et Cie*, Paris, p. 256-258.

Nicoletti R. et Forcellese M.L. (1968), «The structure of incensole-oxide», *Tetrahedron*, 24 (22), p. 6519-6525.

Nieuwenhuize J., Poley-Vos C.H., van den Akker A.H., van Delft W. (1991), «Comparison of Microwave and Conventional Extraction Techniques for the Determination of Metals in Soil, Sediment and Sludge Samples by Atomic Spectrometry», *Analyst*, 116, p. 347.

Obermann H. (1977), «Die chemischen und geruchlichen unterschiede von Weihrauchharzen», *Dragoco Report*, 24, p. 260-265.

Obermann H. (1978), «Les acides monoterpéniques comme oligo-éléments dans l'essence d'oliban»; *Dragoco Report*, 3, p. 55-60.

Ouedraogo A., Thiombiano A., Hahn-Hadjali K. et Guinko S. (2006), «Régénération sexuelle de *Boswellia dalzielii* Hutch., un arbre médicinal de grande valeur au Burkina Faso», *Bois et forêts des tropiques*, 289 (3).

Pan X., Niu G. et Liu H. (2002), «Comparison of microwave-assisted extraction and conventional extraction techniques for the extraction of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza bunge*», *Biochemical Engineering Journal*, 12 (1), p. 71-77.

Pani P. et Rastogi R.P. (1979), «The triterpenoids – a review», *Phytochemistry*, 18 (7), p. 1095-1108.

- Papageorgiou V.P., Bakola-Christianopoulou M.N., Apazidou K.K. et Psarros E.E. (1997), «Gas chromatographic-mass spectroscopic analysis of the acidic triterpenic fraction of mastic gum», *Journal of Chromatography A*, 769 (2), p. 263-273.
- Papageorgiou V.P., Sagredos A.N. et Moser R. (1981), «GCL-MS computer analysis of the essential oil of mastic gum», *Chimica Chronika, new series* 10, p. 119-124.
- Pardhy R.S., Bhattacharya S.C. (1978), «Tetracyclic triterpene acids from the resin of *Boswellia serrata* Roxb.», *Indian Journal of Chemistry B*, p. 174-175.
- Parfitt D. E., Badenes M. L., (1997), «Phylogeny of the genus *Pistacia* as determined from analysis of the chloroplastgenome», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 94(15), p. 7987-7992.
- Park Y.S., Lee J.H., Bondar J., Safayhi J.A. et Golubic M. (2002), «Cytotoxic action of acetyl-11-keto-beta-boswellic acid (AKBA) on meningioma cells», *Planta medica*, 68 (5), p. 397-401.
- Paul M., Brüning G., Weihrather J. et Jauch J. (2011), «Qualitative and Quantitative Analysis of 17 Different Types of Tetra- and Pentacyclic Triterpenic Acids in *Boswellia papyrifera* by a Semi-Automatic Homomodal 2D HPLC method», *Chromatographia*, 74 (1-2), p. 29-40.
- Paul W. et Steinwedel H. S. (1953), *Z Naturforsch.*, 8, p. 448.
- Paul W., Reinhard H. P., von Zahn U. (1958), *Z. Phys.*, 152, p. 143.
- Poehland B.L., Carta B.K., Francis T.A., Hyland L.J., Allaudeen H.S. et Troupe N. (1987), «In-vitro antiviral activity of dammar resin triterpenoids», *Journal of Natural Products*, 50 (4), p. 706-713.
- Poole F. C. (2003), «*The Essence of Chromatography*», Elsevier.
- Priego-López E., Velasco J., Dobarganes M.C., Ramis-Ramos G., Luque de Castro M.D. (2003), «Focused microwave-assisted Soxhlet extraction : an expeditive approach for the isolation of lipids from sausage products», *Food Chemistry*, 83 (1), p. 143-149.

Proietti G., Strappaghetti G., Corsano S. (1981), «Triterpenes of *Boswellia frereana*», *Planta Medica*, 41, p. 417-418.

Qureshi N. et Porter J. W. (1981), «Conversion of acetyl-coenzyme A to isopentenyl pyrophosphate» *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*-editors J. W. Porter et S. L. Spurgeon; Vol 1., p. 47-94, John Wiley and Sons, New York.

Rani S.S. et Pullaiah T. (2002), «A taxonomic survey of trees in Eastern Ghats», *Proceedings of National Seminar on the Conservation of Eastern Ghats. 24-26<sup>th</sup> March 2002 at Tirupati, EPTRI, Hyderabad, India*, p. 5-15.

Rappard F.W. (1937), «De dammar van Bengkoelen», *Tectona*, 30, p. 897-915.

Reddy C.S., Murthy M.S.R. et Dutt C.B.S. (2002), «Vegetational diversity and endemism in Eastern Ghats», *Proceedings of National Seminar on Conservation of Eastern Ghats, 24-26<sup>th</sup> March 2002 at Tirupati, EPTRI, Hyderabad, India*, p. 109-134.

Regert M. et Rolando C. (2002), «Identification of archaeological adhesives using direct inlet electron ionization mass spectrometry», *Analytical Chemistry*, 74 (5), p. 965-975.

Rohmer M., Knani M., Simonin P, Sutter B. et Sahm H. (1993), «Isoprenoid biosynthesis in bacteria: A novel pathway for early steps leading to isopentenyl diphosphate», *Biochemical Journal*, 295, p. 517-524.

Rohmer M., Seemann M., Horbach S., Bringer-Meyer S. et Sahm H. (1996), «Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis», *Journal of American Chemical Society*, 118, p. 2564-2566.

Roland S. Gohlke (1959), «Time-of-Flight Mass Spectrometry and Gas-Liquid Partition Chromatography», *Analytical Chemistry*, 31 (4), p. 535-541.

Rouessac F. et Rouessac A. avec la collaboration de Cruché D. (2004), «Analyse chimique; Méthodes et techniques instrumentales modernes», 6<sup>e</sup> édition, Dunod Paris

Rüdiger A.L., Siani A.C., Veiga Junior V.F. (2007), «The Chemistry and Pharmacology of the South America genus *Protium* Burm. F. (Burseraceae)», *Pharmacognosy Reviews*, 1 (1), p. 93.

Safayhi H. et Sailer E.R. (1997), «Anti-inflammatory of pentacyclic triterpenes», *Planta Medica*, 63 (6), p. 487-493.

Safayhi H., Boden S.E., Schweiser S., Ammon H.P. (2000), «Concentration-dependent potentiating and inhibitory effects of *Boswellia* extracts on 5-lipoxygenase product formation in stimulated PMNL», *Planta medica*, 66 (2), p. 110-113.

Safayhi H., Rall B., Sailer E.R. et Ammon H.P. (1997), «Inhibition by boswellic acids of human leukocyte elastase», *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 281 (1), p. 460-463.

Sailer E.R., Hoernlein R.H., Ammon H.P.T. et Safayhi H. (1996)(b), «Structure-activity-relationships of 5-lipoxygenase-inhibition by boswellic acids», *European journal of pharmaceutical sciences*, 4 (1), p. S54.

Sailer E.R., Hoernlein R.H., Schneider N., Ammon H.P.T., Safayhi H. (1996)(a), «Synthesis of a radio-iodinated photoaffinity analogue of the direct, non-redox, non-competitive 5-lipoxygenase inhibitor acetyl-11-keto-boswellic acid», *European journal of pharmaceutical sciences*, 4 (1), p. S113.

Sanchez C. and Farkas T. (2012) – American laboratory, Online Resource for Laboratory Scientists – Technical articles (<http://www.americanlaboratory.com>) - l'image et le texte

Savoir R., Tursch B., Huneck S. (1967), «Présence d'acide 11-céto-b-boswellique dans l'encens», *Bull. Soc. Chim. Belges*, 76, p. 368-370.

Seoane E. (1956), «Further crystalline constituents of gum mastic», *Journal of the Chemical Society*, p. 4158-4160.

SEPASAL database (1999), Royal Botanical Gardens, Kew.

Shelef L.A., Naglik O.A. et Bogen D.W. (1980), «Sensitivity of some common food-borne bacteria to the spices sage, rosemary and allspice», *Journal of Food Science*, 45 (4), p. 1042-1044.

Shiva M.P. et Jantan I. (1998), «Non-Timber Forest Products from Dipterocarps», *A Review of Dipterocarps – Taxonomy, ecology and silviculture*, editors Simmathiri Appanah et

Jennifer M. Turnbull by Center for International Forestry Research, Bogor, Indonesia, p. 187-199.

Site officiel de Phenomenex (<http://www.phenomenex.com/Products/Detail/Kinetex>)

Skoog D. A., West D. M., Holler J. F. (1997) «Fundamentals of analytical chemistry», 7<sup>th</sup> edition; De Boeck & Larcier s.a., Paris, Bruxelles.

Smith A. L. (1979), «Applied Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Techniques and Analytical Problem Solving», Chemical Analysis series, 54, New York, John Wiley & Sons.

Snatzke G., Vértesy L. (1967), «Über die neutrlen sesqui- und triterpene des weihrauches», Monatshefte für chemie und verwandte teile anderer wissenschaften, 98 (1), p. 121-132.

Solomon Raju A.J., Vara Lakshmi P., Venkata Ramana K. et Hareesh Chandra P. (2012), «Entomophily, ornithophily and anemochory in the self-incompatible *Boswellia ovalifoliolata* Bal. & Henry (Burseraceae), an endemic and endangered medicinally important tree species», Journal of Threatened Taxa, 4(7), p. 2673-2684.

Soxhlet F. (1879), «Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes», Polytechnisches J. (Dingter's), p. 232-461.

Spurgeon S. L. et Porter J. W. (1981), «Introduction» Biosynthesis of Isoprenoid Compounds—editors J. W. Porter et S. L. Spurgeon; Vol 1., p. 1-46, John Wiley and Sons, New York.

Stout, S.A. (1995), «Resin-derived hydrocarbons in fresh and fossil dammar resins and Miocene rocks and oils in the Mahakam Delta, Indonesia», In: Anderson, K.B., Crelling, J.C. (Eds.), Amber, Resinite, and Fossil Resins: ACS Symposium Series, 617, p. 43–75. American Chemical Society, Washington, D.C.

Svoboda K.P., Hampson J.B., Hall L. (2001), «*Boswellia* from Somalia, a source of high quality frankincense», Medicinal Plant Conversation, 7, p. 16-19.

Tadesse W., Desalegn G. et Alia R. (2007), «Natural gum and resin bearing species of Ethiopia and their potential applications», Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales, 16(3), p. 211-221.

Tantra I.G.M. (1979), «The establishment of tengkawang plantations in Indonesia» In: Proceedings of the Symposium on Management of Forest Production in Southeast Asia, April 19-22, 1977, Bangkok, Thailand. BIOTROP Special Publication No. 4. BIOTROP, Bogor, Indonesia.

Tessema Y.A. (2012), «Ecological and Economic Dimensions of the Paradoxical Invasive Species- *Prosopis juliflora* and Policy Challenges in Ethiopia», Journal of Economics and Sustainable Development (www.iiste.org), 3 (8).

Theunis H.B.L.M., Foubert K., Pollier J., Gonzalez-Guzman M., Goossens A., Vlietinck J.A., Pieters A.C.L., Apers S. (2007), «Determination of saponins in *Maesa lanceolata* by LC-UV: Development and validation», Phytochemistry, 68, p. 2825-2830.

Thomson J. J. (1913), «Rays of positive electricity», Proceedings of the Royal Society A 89, p. 1-20.

Thulin M. et Warfa A.M. (1987), «The frankincense trees (*Boswellia* spp., Burseraceae) of northern Somalia and southern Arabia», Kew. Bulletin, 42 (3), p. 487-500.

Torquebiau E.F. (1984), «Manmade dipterocarp forest in Sumatra», Agroforestry Systems 2, p. 103-127.

Tschirch A. (1906), «Die Harze und Harzbehälter», 2<sup>ème</sup> edition, Vol. 2, Boruträger, Leipzig.

Vahur S., Teearu A., Haljasorg T., Burk P., Leito I. et Kaljurand I. (2012), «Analysis of Dammar resin with MALDI-FT-ICR-MS and APCI-FT-ICR-MS», Journal of Mass Spectrometry, 47 (3), p. 392-409.

Van Aarssen B.G.K., Cox H.C., Hoogendoorn P., et De Leeuw J.W. (1990), «A cadinene biopolymer present in fossil and extant dammar resins as a source for cadinanes and bicadinanes in crude oils from Southeast Asia», Geochimica et Cosmochimica Acta, 54 (11), p. 3021-3031.

Van Bergen P.F., Peakman T.M., Leigh-Firbank E.C., Evershed R.P. (1997), «Chemical evidence for archaeological frankincense: boswellic acids and their derivatives in solvent soluble and insoluble fractions of resin-like materials», Tetrahedron Letters, 38 (48), p. 8409-8412.

Van den Berg K.J., Van der Horst J., Boon J.J. and Sudmeijer O. (1998), «Cis-1,4-poly- $\beta$ -myrcene ; the structure of the polymeric fraction of mastic resin (*Pistacia lentiscus* L.) elucidated», Tetrahedron Letters, 39, p. 2645-2648.

van der Doelen G. A., van den Berg K. J., Boon J. J., Shibayama N., de la Rie E. R. et Genuit W. J. L. (1998), «Analysis of fresh triterpenoid resins and aged triterpenoid varnishes by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation (tandem) mass spectrometry», Journal of Chromatography A, 809 (1-2), p. 21-37.

van der Doelen G.A. (1999), «Molecular studies of fresh and aged triterpenoid varnishes», Ph. D. Thesis, University of Amsterdam

Vieillescazes C. (1992), «Contribution à la connaissance des matériaux résineux utilisés en Egypte Ancienne; Caractérisation par CLHP et spectroscopie», travail de thèse à Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse

Virot M., Tomao V., Colnagui G., Visinoni F., et Chemat F. (2007), «New microwave-intergrated Soxhlet extraction: An advantageous tool for the extraction of lipids from food products», Journal of Chromatography A, 1174 (1-2), p. 138-144.

Watin, J.-F. (1774), «L'art du peintre, doreur, vernisseur: Ouvrage utile aux artistes & aux amateurs», 2<sup>ème</sup> édition, Paris: Chez Grangé, 1774, 4 supplement.

Watkins S. (2000), «L'encens: une matière première mythique», Parfums Cosmétiques Actualités, 155, p. 54-57.

Watt G. (1889), «A dictionary of the economic products of India», Cosmo Publications, Delhi.

Wenders E. (1998), «Dammar als Gemäldefirnis – Untersuchungen zu Löslichkeit, Glanz und Oberflächenrauhheit», Diplomarbeit, Staatliche Akademie der Bildenden Künste, Stuttgart.

Werner O., Sanchez-Gomez P., Guerra J. et Martinez J. F. (2001), «Identification of *Pistacia x saportae* Burnat (Anacardiaceae) by RAPD analysis and morphological characters », Scientia horticultrae, 91 (1-2), p. 179-186.

Whitmore T.C. (1980)(a), «A monograph of *Agathis*», *Plant Systematics and Evolution*, 135 (1-2), p. 41-69.

Winterstein A., Stein G. (1932), «Untersuchungen in der saponinreihe. X. Mitteilung. Zur kenntnis der mono-oxy-triterpensäuren», *Hoppe-Seyler's zeitschrift für physiologische chemie*, 208, p. 9-25.

Wojtkowiak B. et Chabanel M. (1977), «Spectrochimie Moléculaire», *Technique & Documentation*, Paris, France.

Zhao W., Entschladen F., Liu H., Niggemann B. et Fang Q. (2003), «Boswellic acid acetate induces differentiation and apoptosis in highly metastatic melanoma and fibrosarcoma celles», *Cancer Detection and Prevention*, 27 (1), p. 67-75.

Zhou J.Y., Cui R. (2002), «A new lupane from the resin *Boswellia carterii*», *Chinese Chemical Letters*, 13, p. 65-66.

Zumbühl S., Knochenmuss R., Wülfert S., Dubois F., Dale M.J. et Zenobi R. (1998), «A graphite-assisted laser desorption/ionization study of light-induced ageing in triterpene dammar and mastic varnishes», *Analytical Chemistry*, 70 (4), p. 707-715.

# Matériel et méthodes

## Réactifs et solvants

La liste des réactifs et solvants employés dans ce travail est répertoriée dans le tableau suivant (tableau 38).

Réactifs	Masse molaire (g.mol <sup>-1</sup> )	Numéro CAS	Fournisseur
Cholestérol	386,65	[57-88-5]	ACROS Organics
Lupéol	426,72	[545-47-1]	Extrasynthèse
α-amyrine	426,73	[638-95-9]	Extrasynthèse
β-amyrine	426,72	[559-70-6]	Extrasynthèse
Bromure de potassium	119,00	[7758-02-3]	Uvasol, Merck
Hydroxyde de sodium	39,99	[1310-73-2]	Merck
Chlorure de dansyle	269,75	[605-65-2]	ACROS Organics
Acide chlorhydrique	36,46	[7647-01-0]	ACROS Organics
Sulfate de sodium	142,04	[7757-82-6]	Riedel-de Haen
Hydroxyde de potassium	56,10	[1310-58-3]	Merck
Hydrogénocarbonate de sodium	84,01	[144-55-8]	Fluka
Chlorure de sodium	58,44	[7647-14-5]	Merck
Diéthyléther, grade analytique	74,12	[60-29-7]	VWR Prolabo, Merck
Acétonitrile, grade analytique	41,05	[75-05-8]	Merck
Méthanol, grade analytique	32,04	[67-56-1]	Merck, VWR Prolabo
Méthanol, technique	32,04	[67-56-1]	VWR Prolabo
Dichlorométhane	84,93	[75-09-2]	Merck
Acide trifluoroacétique	114,02	[76-05-1]	ACROS Organics
Pyridine	79,09	[110-86-1]	ACROS Organics
n-hexane, technique	86,17	[110-54-3]	VWR Prolabo
R-(+)-limonène, grade analytique	136,23	[5989-27-5]	Fluka Analytical
Acide acétique	60,05	[64-19-7]	Prolabo
Ethanol	46,07	[64-17-5]	Merck

Tableau 38 - Réactifs et solvants utilisés

# 1. Protocoles de préparation des échantillons

## PO-1. Analyse par IRTF

Tous les échantillons ont été préparés de la même façon : 1% de la substance à analyser a été broyée à l'aide d'un mortier et d'un pilon en agate dans du bromure de potassium. La poudre ainsi obtenue a été ensuite comprimée sous une pression de 10 t/cm<sup>2</sup>, avec une presse manuelle afin d'obtenir une pastille fine et translucide.

## PO-2. Analyse spectrofluorimétrique

Les échantillons ont été solubilisés dans du méthanol de grade analytique, suivi d'un bain aux ultrasons pendant 10 min et d'une filtration sur cartouche (Dynaguard 0,2 µm). La densité optique de ces solutions a ensuite été mesurée par spectroscopie UV-Visible de façon à obtenir une solution dont la bande d'absorbance de plus haute intensité soit inférieure ou égale à 0,07. Enfin la solution résultante a été analysée par spectrofluorimétrie.

### PO-2.1. Analyse spectrofluorimétrique - détermination de couple $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$

La recherche du couple  $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$  a été réalisée manuellement. La longueur d'onde d'absorption maximale du spectre UV/Visible de l'échantillon traité ( $A \leq 0,07$ ) a été le point de départ pour fixer la longueur d'onde d'excitation initiale. Après enregistrement du spectre de fluorescence, la longueur d'onde d'émission a été déterminée. Le cheminement inverse a ensuite été effectué, c'est-à-dire qu'à partir de la  $\lambda_{em}$  obtenue précédemment, on a observé le spectre d'excitation, ce qui a permis d'optimiser la longueur d'onde d'excitation, et ainsi de suite jusqu'à la fixation définitive du couple de longueur d'onde optimale ( $\lambda_{exc} / \lambda_{em}$ ).

### PO-2.2. Greffage avec le chlorure de dansyle (Dzl)

La réaction de greffage de Dzl a été optimisée avec une stœchiométrie de 1 : 2 des réactifs de départ. 2-6 mg de Dzl sont ajoutés à 1-3 mg de la molécule standard ou de la résine, dans la pyridine, à température ambiante. La solution obtenue est placée sous agitation magnétique pendant une nuit. Après évaporation de solvant à sec sous vide, suivie de

trois lavages avec du dichlorométhane, pour chasser la pyridine résiduelle, on ajoute du méthanol. La solution ainsi obtenue est filtrée sur les filtres de porosité de 0.2 µm (Minisart RC 25, 0.2 µm, Sartorius, Goettinger, Allemagne) puis injectée en CLHP. Pour les échantillons archéologiques, la quantité de départ est 5 mg (Aksamija et al., 2012).

### **PO - 3. Préparation des échantillons résineux (oliban, dammar et mastic) pour l'analyse en CLHP**

0,07 g d'oliban (0,03 g pour la dammar et la mastic) sont mis dans 2 mL (3 mL dans le cas des extraits) de méthanol puis la solution est placée sous ultrasons pendant 10 minutes et centrifugée pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu est directement injecté en CLHP.

### **PO-4. Extraction en phase solide (SPE)**

Les cartouches utilisées sont de type Phenomenex Strata C18-E, (55 µm, 70 Å), 200 mg/3 mL). Les solvants employés sont l'acétonitrile de grade analytique (C) et le méthanol de grade analytique (D). Le protocole est optimisé et adapté en fonction de la nature et de la polarité des molécules étudiées. (Theunis et al., 2007). La préparation initiale de l'échantillon est décrite dans le protocole indiqué précédemment, **PO-3**.

Le conditionnement de la cartouche: 1,2 mL de C, puis 1,2 mL de D

Dépôt: 2 mL d'échantillon préparé selon le protocole PO-3.

Lavage: 1,2 mL du mélange 85:15 C/D pour l'oliban

Lavage: 1,2 mL du mélange 92 : 8 C/D pour la dammar et la mastic

Elution: 1,2 mL de C

### **PO-5. Méthode de dérivation via la formation de dérivés triméthylsilylés**

5 à 10 mg d'échantillon à analyser sont triméthylsilylés avec 0,1 mL d'une solution constituée de 0,5 mL de pyridine anhydre, 0,45 mL d'hexaméthylidisilazane (HMDS) et 0,3 mL de triméthylchlorosilane (TMSCl). La réaction est effectuée à température ambiante pendant 30 min, temps au bout duquel la solution est évaporée à sec sous courant d'azote ou d'argon avec un chauffage inférieur à 40°C. Le résidu ainsi obtenu est alors solubilisé dans 0,6 mL d'éther diéthylique, filtré sur les filtres à seringue avec la membrane

d'acétate de cellulose de 0,2  $\mu\text{m}$  (VWR International), puis la solution est directement injectée en CPG/SM.

Une variante est réalisée avec le R-(+)-limonène comme solvant. L'échantillon est directement solubilisé dans le R-(+)-limonène, triméthylsilylé selon le protocole précédemment cité sans ajout de solvant après la filtration, puis directement injecté en CPG/SM.

#### **PO-6.1. Extraction par chauffage à reflux**

1g de résine est mis dans un ballon de 100 mL et 50 mL de solvant sont ajoutés (figure 68). Le temps d'extraction est de 4h. L'extrait obtenu est filtré et évaporé à sec, puis pesé. Après chaque extraction, le rendement a été calculé par rapport à la masse de résine de départ. Pour l'analyse en CLHP, les échantillons ont préparés selon le protocole **PO-3**.

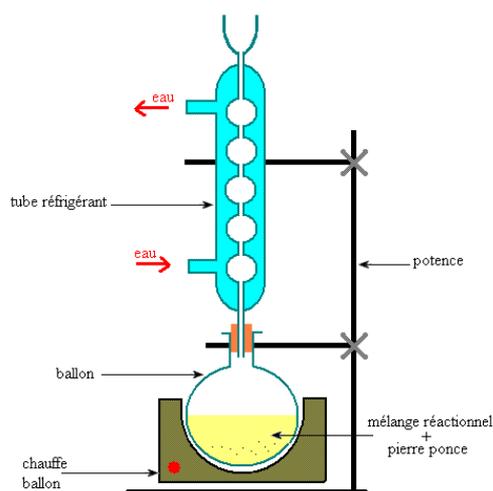


Figure 68 - Schéma du montage à reflux.

#### **PO-6.2. Extraction par Soxhlet**

1g de résine est mis dans la cartouche et 50 mL de solvant sont ajoutés dans un ballon de 100 mL (figure 69). Le temps d'extraction est de 4h. L'extrait obtenu est évaporé à sec, puis pesé. Après chaque extraction, le rendement a été calculé par rapport à la masse de résine de départ. Pour l'analyse en CLHP, les échantillons ont préparés selon le protocole **PO-3**.

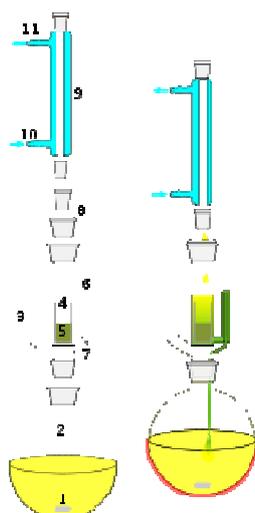


Figure 69 - Schéma d'extraction des résines par Soxhlet

### PO-6.3. Extraction assistée par ultrasons

0,5 g de résine sont mis dans un ballon de 50 mL, additionnés de 25 mL de solvant. Le mélange est placé aux ultrasons pendant 10 minutes. Deux sources d'ultrasons ont été testées, le bain à ultrasons et le prototype de bac à ultrasons (figure 70). Les solutions obtenues sont filtrées, puis évaporées à sec. Le rendement a été calculé par rapport à la masse de résine de départ.

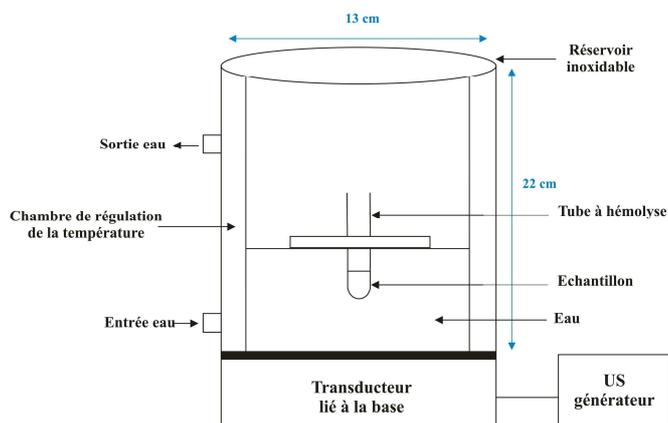


Figure 70 - Prototype SOLEX 160 utilisé pour l'extraction des résines.

### PO-6.4. Obtention des fractions acide/neutre

4,5 g de résine en poudre sont dissouts dans 5 mL d'éther diéthylique et 33 mL de méthanol. La partie insoluble (polysaccharides) de la résine est éliminée par filtration et la solution résultante est évaporée à sec sous vide. Le liquide visqueux obtenu est à

nouveau dissout dans le mélange 5/33 v/v éther/méthanol puis rééaporé. Cette opération est renouvelée deux fois. Le produit résultant de la dernière évaporation est solubilisé dans 38 mL d'éther et extrait 3 fois avec 10 mL d'une solution à 5% de carbonate de sodium. La phase étherée est collectée puis extraite trois fois avec 7 mL d'une solution à 0,5 M en hydroxyde de sodium. La phase organique restante contient les molécules neutres, c'est-à-dire ne possédant pas de fonction acide carboxylique. Elle sera séchée puis évaporée à sec. Quant aux extraits aqueux, ils sont rassemblés puis acidifiés avec de l'acide chlorhydrique, suivi de trois extractions à l'éther. L'ensemble de ces phases est alors séché, puis évaporé à sec donnant ainsi la fraction acide de la résine. Le schéma d'extraction des fractions acide/neutre est présent sur la figure 71:

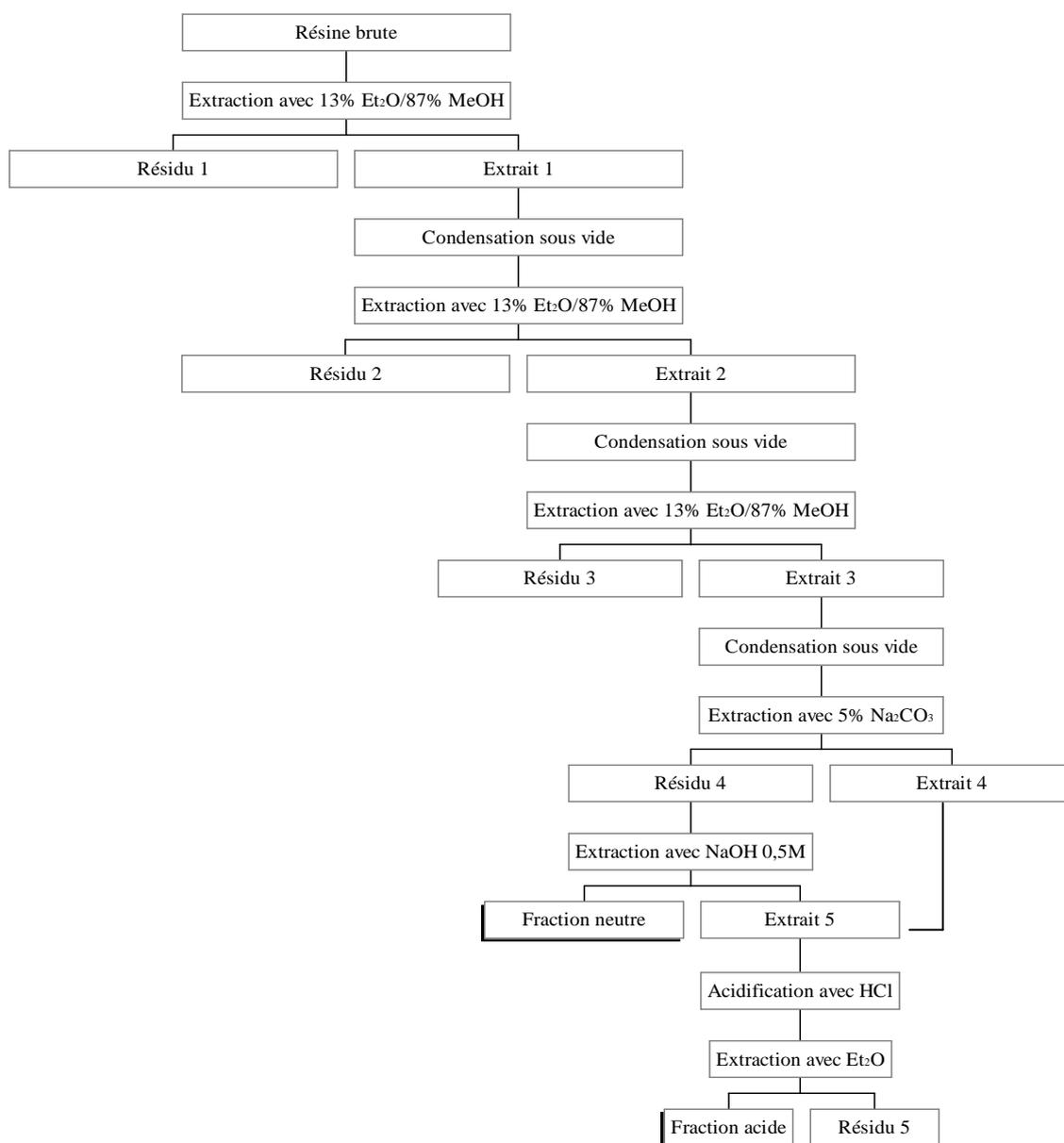


Figure 71 –Extraction des fractions acides et neutres

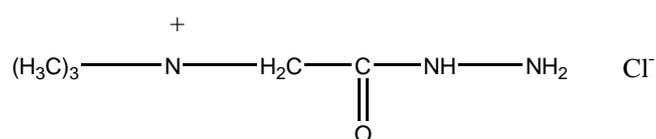
#### PO-6.5. Extraction discontinue liquide-liquide

La résine commerciale d'oliban (Somalie) est préalablement placée au congélateur pendant 2h puis broyée à l'aide d'un mixeur électrique. 6 g de résine sont placés dans la cartouche du Soxhlet et extraits avec 250 mL de diéthyléther dans l'appareil de soxhlet pendant une nuit. Après évaporation du solvant, 1 g de résidu est dissout dans 20 mL de diéthyléther, puis 5 mL de KOH 5% sont ajoutés. L'extraction discontinue est réalisée dans l'ampoule à décanter ; suivent trois lavages avec 5 mL de KOH 5%. Après la séparation des phases, la phase aqueuse est lavée trois fois avec 5 mL de diéthyléther. Les phases organiques sont collectées, lavées avec la solution saturée de NaCl, puis séchées avec du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Le solvant est évaporé sous vide pour donner la fraction neutre (une masse visqueuse et odorante du couleur orange-jaune).

Les phases alcalines aqueuses sont collectées et acidifiées, en refroidissant, jusqu'à pH 2-3 avec HCl concentré, suivi de trois lavages avec 5 mL de diéthyléther. Les phases organiques sont collectées, lavées avec la solution saturée de NaCl et séchées avec du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Le solvant est évaporé sous vide pour donner la fraction contenant des acides triterpéniques (masse jaunâtre) avec un rendement d'environ 0.3 g (Paul M. et al., 2011).

#### PO-6.6. Séparation des produits cétoniques par le réactif T de Girard

7 g de réactif T de Girard, de formule :



sont mélangés à 90 mL d'éthanol et à 24 mL d'acide acétique. On ajoute alors la résine étudiée (1 g). Le mélange est laissé 1 heure à 80°C (bain-marie thermostaté). Après refroidissement, le mélange est versé sur de l'eau saturée par 60 g de NaHCO<sub>3</sub>. La solution obtenue subit trois extractions successives à l'aide d'éther diéthylique. La phase organique résultante est lavée ensuite quatre fois à l'eau. Dans la fraction étherée ainsi obtenue se trouvent les produits non cétoniques. La phase aqueuse est acidifiée par de l'acide chlorhydrique concentré, puis extraite trois fois à l'éther. Les produits cétoniques libérés par l'acidification sont ainsi séparés.

## 2. Techniques spectroscopiques

### 2.1. Le spectromètre Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF)

L'étude infrarouge a été effectuée à l'aide d'un spectromètre à Transformée de Fourier Thermo-Nicolet Avatar 360 FT-IR E.S.P. La configuration de l'acquisition est de 64 balayages, avec une résolution de  $4\text{ cm}^{-1}$  en format % de transmission, à l'aide d'un détecteur DTGS KBr et du logiciel de traitement E.Z. OMNIC version 8.0.

Les échantillons analysés étant des résines végétales naturelles, dures et élastiques à la fois, nous avons privilégié le mode de préparation pastille de KBr à celui de la phase liquide ou de l'A.T.R.

### 2.2. La spectrofluorimétrie : détermination du couple d'excitation et d'émission du chlorure de dansyle

L'étude par spectrofluorimétrie a été réalisée à l'aide d'un spectrofluorimètre Jobin-Yvon (Spectrofluoromax-2), équipé d'une lampe au Xénon de 150W. Toutes les mesures ont été effectuées dans une cuve en quartz de 10 mm de trajet optique, thermostatée à  $25^{\circ}\text{C}$ . L'ouverture des fentes d'excitation et d'émission ont été fixées à 5 nm, afin d'optimiser la qualité des spectres obtenus.

Le couple des longueurs d'onde optimale  $\lambda_{\text{exc.}}/\lambda_{\text{em.}}$  pour le chlorure de dansyle est trouvé :

$$\lambda_{\text{exc.}} = 347\text{ nm et } \lambda_{\text{em.}} = 530\text{ nm}$$

## 3. Techniques chromatographiques

### 3.1. La Chromatographie Liquide à Haute performance couplée à une barrette de photodiodes et à un fluorimètre (CLHP/UV/Fluo.)

#### 3.1.1. Matériel

Le système de chromatographie liquide à haute performance utilisé est constitué d'une pompe Thermo Scientific Spectra System P4000, un injecteur Rhéodyne 7125 équipé d'une boucle d'injection de 20 $\mu$ L connecté à une colonne en phase inverse C18. Une colonne (Phenomenex, Luna C-18, 250 x 4.6 mm, 5 $\mu$ m) a été utilisée pour l'analyse des molécules greffées avec le chlorure de dansyle. Deux autres colonnes ont été également utilisées, une colonne classique (Merck : LiChroCART, Purospher STAR RP-18<sup>®</sup> (5 $\mu$ m), 250mm x 4mm d. i.) et une colonne Kinetex core-shell (Phenomenex : Kinetex 2,6  $\mu$ m, C18, 100 mm x 4,60 mm). Durant l'analyse chromatographique chaque colonne est thermostatée à 30°C à l'aide d'un four à colonne. Le premier détecteur employé est une barrette de photodiodes Waters (modèle 996) relié en série à un fluorimètre Waters 470. Le logiciel d'acquisition est Empower Pro (Waters) version 5.00.

#### 3.1.2. Gradient CLHP de l'oliban - colonnes Luna et Purospher :

La phase mobile est composée d'eau bidistillée acidifiée à 0,01% en acide trifluoroacétique (A) et d'acétonitrile (B). La séparation s'effectue selon le gradient suivant (tableau 39) avec un débit constant de 1 mL/min. Dans le cas des analyses après le greffage de chlorure de dansyle, le temps d'analyse est prolongé jusqu'à 120 min.

Temps (min)	0	14	34	37	90 ou 120
A %	85	15	15	0	0
B %	15	85	85	100	100

Tableau 39 – Gradient optimal de l'oliban par CLHP

### 3.1.3. Gradient CLHP de la dammar et la mastic - colonnes Luna et Purospher :

La phase mobile est composée d'eau bidistillée acidifiée à 0,01% en acide trifluoroacétique (A) et d'acétonitrile (B). La séparation s'effectue selon le gradient suivant présenté par le tableau 40 avec un débit constant de 0,8 mL/min. Dans le cas des analyses après le greffage de chlorure de dansyle, le temps d'analyse est prolongé jusqu'à 70 min (van der Doelen et al. 1998).

Temps (min)	0	30	39	40	50 ou 70
A %	20	2	2	0	0
B %	80	98	98	100	100

Tableau 40 – Gradient optimal de la dammar et la mastic par CLHP

### 3.1.4. Gradient CLHP de l'oliban - colonne Kinetex

Solvant A : eau bidistillée acidifiée à 0,01% en acide trifluoroacétique

Solvant B : acétonitrile

Le gradient employé est résumé dans le tableau suivant (tableau 41) avec le débit constant de 1,2 mL/minute.

Temps (min)	0	4	9	10	24
A %	85	15	15	0	0
B %	15	85	85	100	100

Tableau 41 – Gradient optimal de l'oliban par CLHP

### 3.1.5. Gradient CLHP de la dammar et la mastic - colonne Kinetex

Solvant A : eau bidistillée acidifiée à 0,01% en acide trifluoroacétique

Solvant B : acétonitrile

Le gradient employé est résumé dans le tableau suivant (tableau 42) avec le débit constant de 1,2 mL/minute.

Temps (min)	0	8	10	11	15
A %	20	2	2	0	0
B %	80	98	98	100	100

Tableau 42 – Gradient optimal de la dammar et la mastic par CLHP

### 3.2. La Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à un Spectromètre de Masse (CPG/SM)

Les analyses en chromatographie en phase gazeuse ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe Varian Saturn 3900, équipé d'un injecteur Varian 1177 et couplé à un spectromètre de masse à trappe à ions, Varian 2100 T. La colonne capillaire utilisée possède une longueur de 30 m, un diamètre interne de 0,25 mm et une épaisseur de film de 0,25  $\mu\text{m}$  de 5% phényl, 95% diméthylsiloxane : il s'agit d'une CP-Sil 8 CB Low Bleed/MS (Varian). Le voltage du multiplicateur d'électron est à 1400 V, le temps d'ionisation dure 25000  $\mu\text{s}$ . et il s'effectue par impact électronique. La ligne de transfert, la trappe à ions et l'enceinte de la trappe ("manifold") sont respectivement maintenues à 300°C, 200°C et 50°C. Le détecteur scanne des masses comprises entre 40 et 650 ( $m/z$ ) avec un voltage ionisant de 70 eV. Les échantillons sont injectés (1  $\mu\text{L}$ ) en mode splitless ou split dont le rapport varie en fonction du type d'échantillons à analyser. Un débit continu de 1 mL/min d'hélium de grade analytique est utilisé.

#### 3.2.1. Gradient CPG pour l'étude des résines

Les conditions d'analyse ainsi que le gradient, sont présentés dans le tableau 43 :

Température en °C	Montée de température (°C/min)	Temps de maintien de la température	Temps total (min)
50	-	2	10
250	8	0	27
350	3	0	60
$T_{\text{trappe}} = 200^\circ\text{C}$	$T_{\text{ligne de transfert}} = 300^\circ\text{C}$	$T_{\text{injecteur}} = 250^\circ\text{C}$	Splitless/Split de 100

Tableau 43 – Gradient optimal pour l'analyse globale des résines en CPG/SM

#### 3.2.2. Gradient CPG pour l'étude de la partie triterpénique

Les conditions d'analyse ainsi que le gradient, sont présentés dans le tableau 44 :

Température en °C	Montée de température (°C/min)	Temps de maintien de la température	Temps total (min)
190	-	2	2
265	3	0	27
285	10	0	29
300	0,5	0	59
$T_{\text{trappe}} = 200^\circ\text{C}$	$T_{\text{ligne de transfert}} = 300^\circ\text{C}$	$T_{\text{injecteur}} = 250^\circ\text{C}$	Splitless/Split de 100

Tableau 44 – Gradient optimal pour l'analyse des di- et triterpènes en CPG/SM

# **Annexes**

# **Annexe 1**

## **Spectres de masse des molécules identifiées**

## Acide lupéolique-TMS ( $C_{36}H_{64}O_3Si_2$ , $600 \text{ gmol}^{-1}$ )

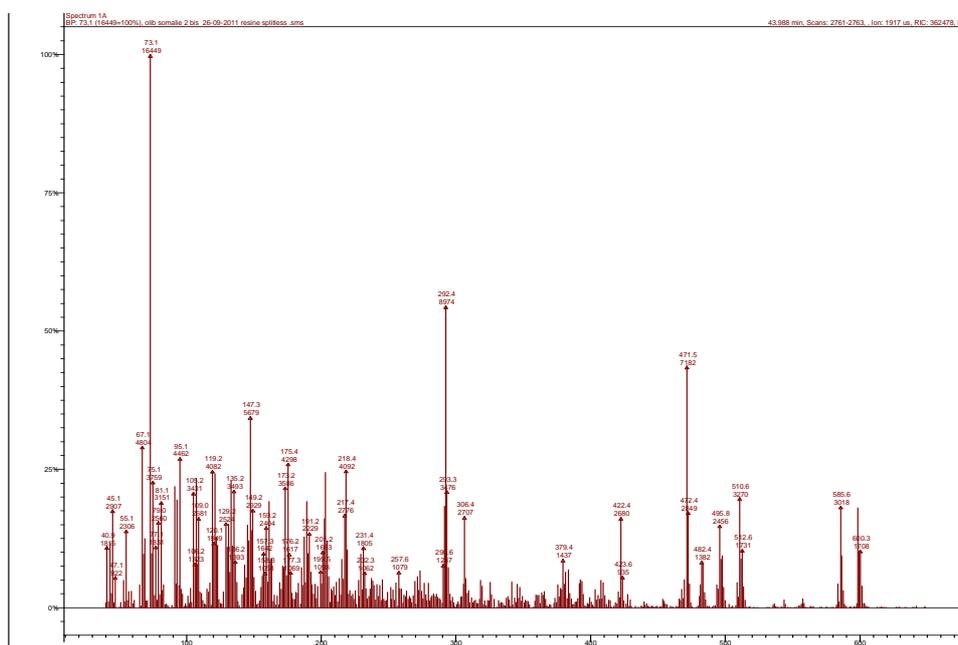
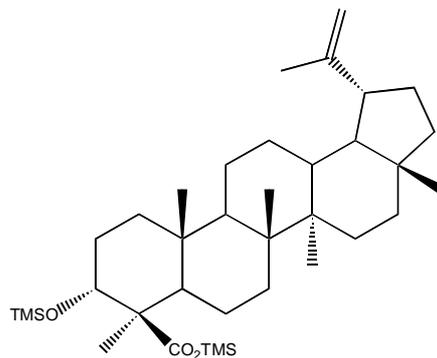


Figure 72 – Spectre de masse obtenu d'acide lupéolique-TMS

Acide- $\alpha$ -boswellique-TMS ( $C_{36}H_{64}O_3Si_2$ , 600  $gmol^{-1}$ )

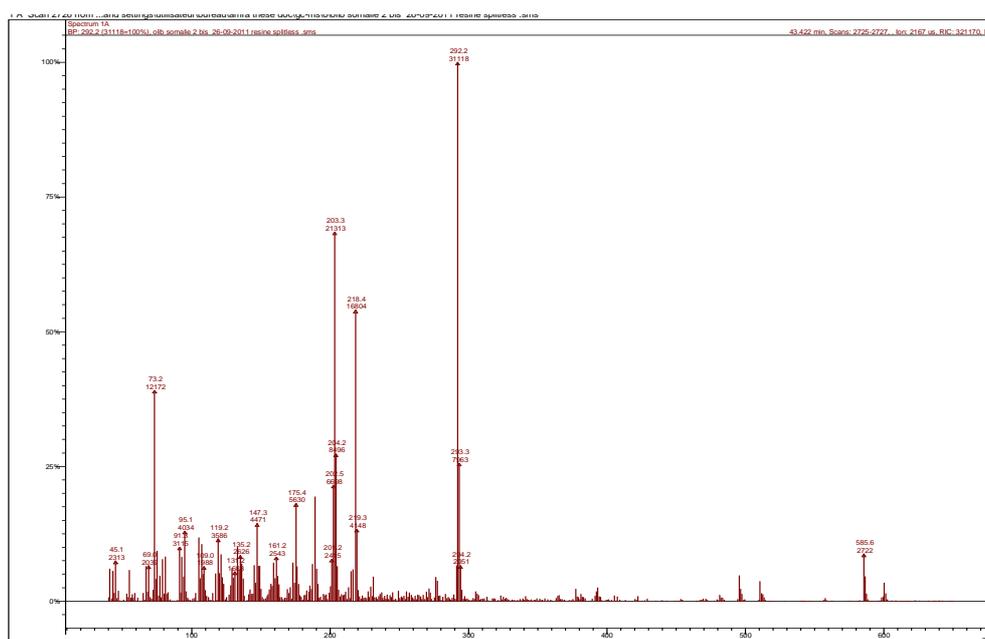
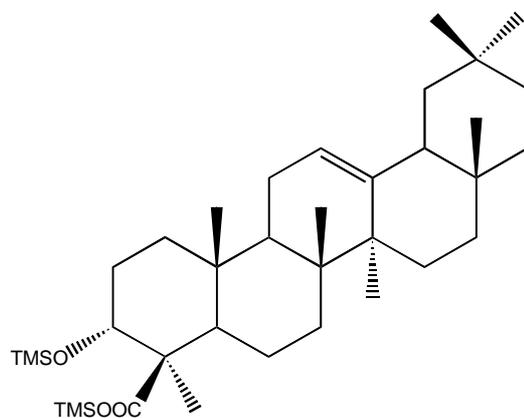


Figure 73 – Spectre de masse obtenu d'acide- $\alpha$ -boswellique-TMS

## Acide $\beta$ -boswellique-TMS ( $C_{36}H_{64}O_3Si_2$ , 600 $gmol^{-1}$ )

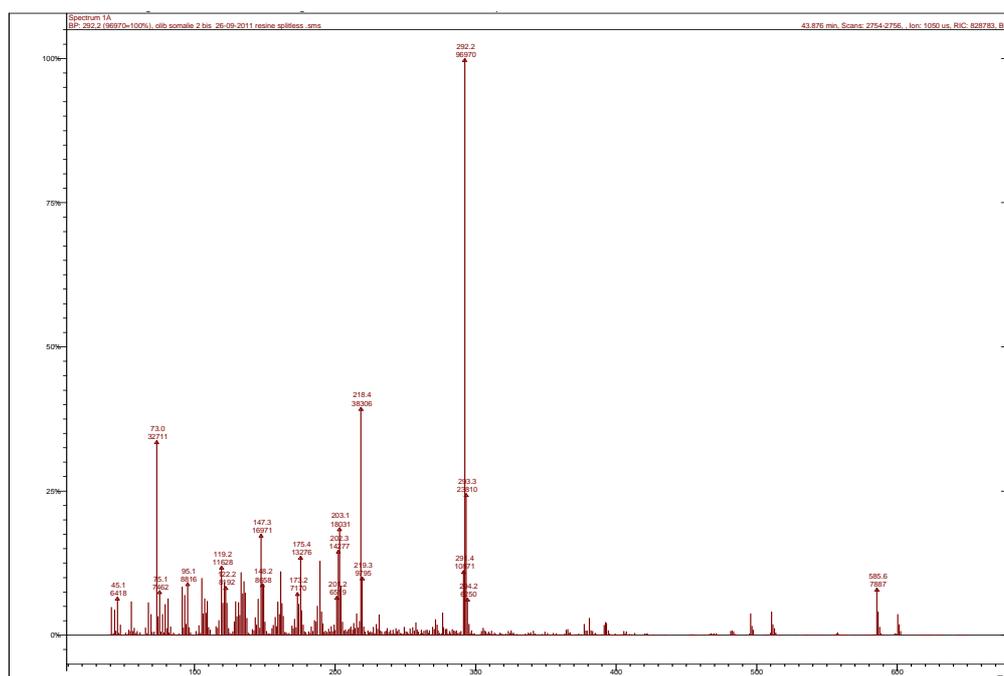
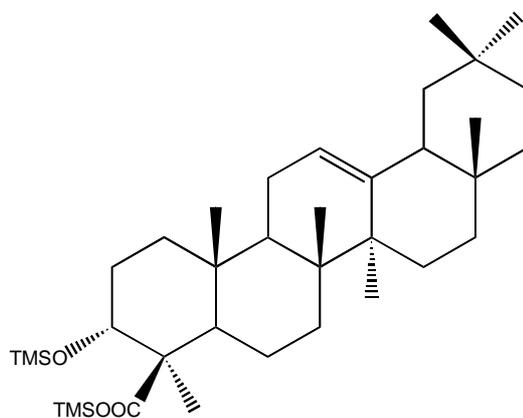


Figure 74 - Spectre de masse obtenu d'acide- $\beta$ -boswellique-TMS

## Acide 3-O-acétyl-lupéolique-TMS ( $C_{35}H_{58}O_4Si$ , $570 \text{ g mol}^{-1}$ )

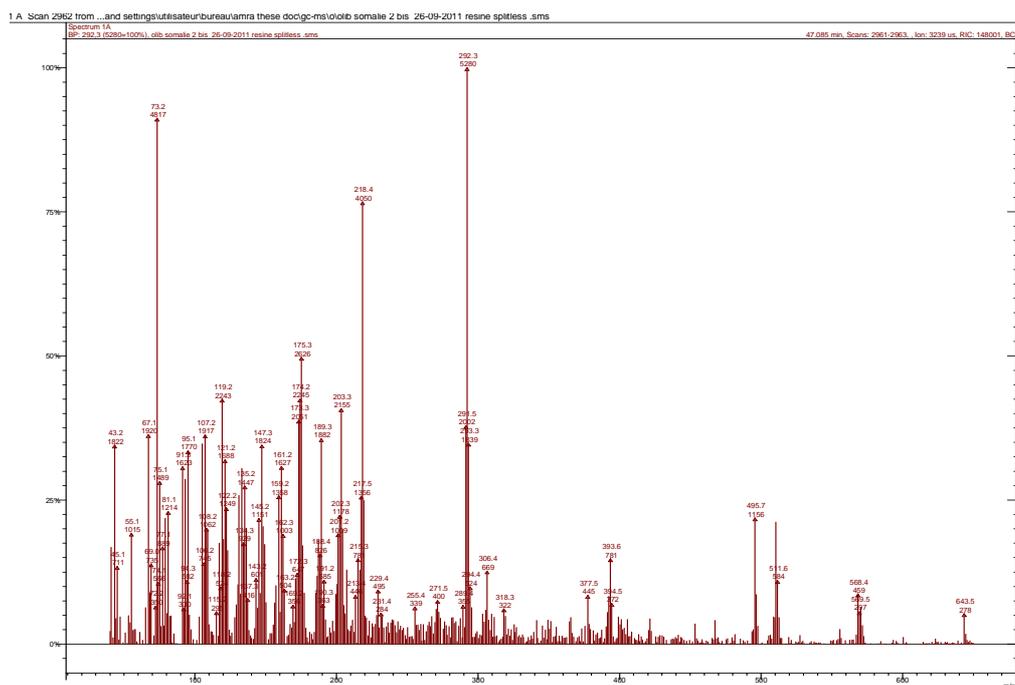
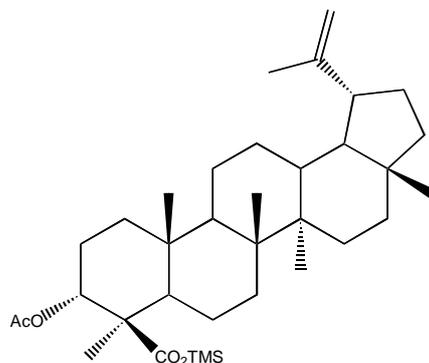


Figure 75 - Spectre de masse obtenu d'acide 3-O-acétyl-lupéolique-TMS

## Acide 3-O-acétyl- $\alpha$ -boswellique-TMS ( $C_{35}H_{58}O_4Si$ , 570 gmol<sup>-1</sup>)

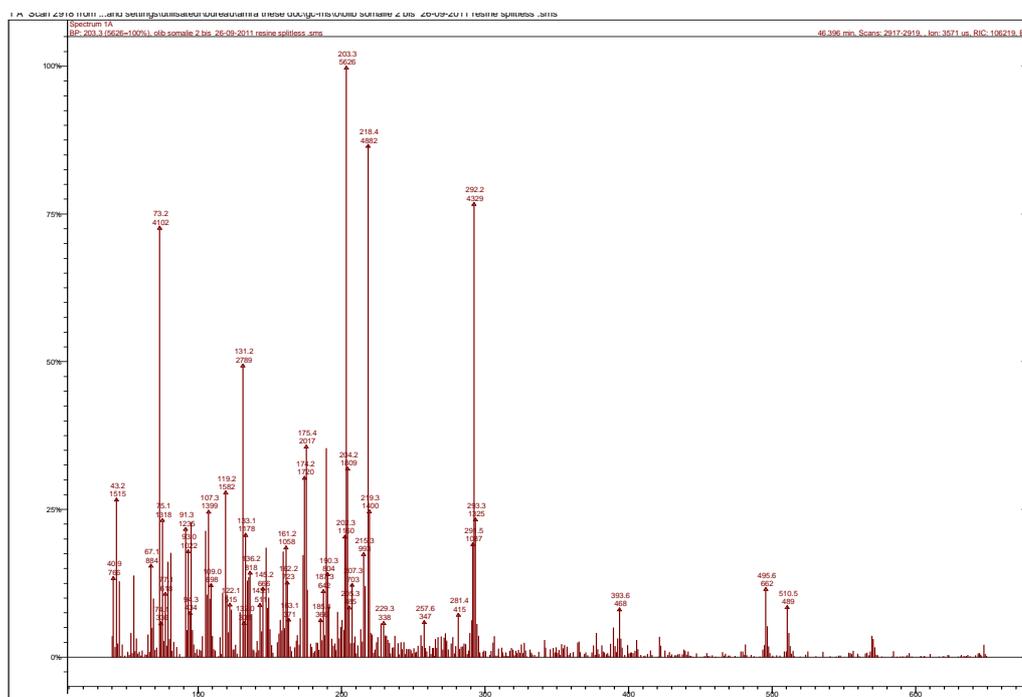
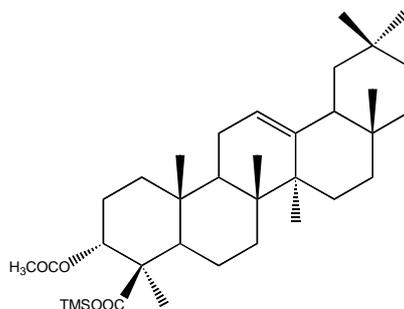


Figure 76 - Spectre de masse obtenu d'acide 3-O-acétyl- $\alpha$ -boswellique-TMS

## Acide 3-O-acétyl-β-boswellique-TMS ( $C_{35}H_{58}O_4Si$ , 570 $g\text{mol}^{-1}$ )

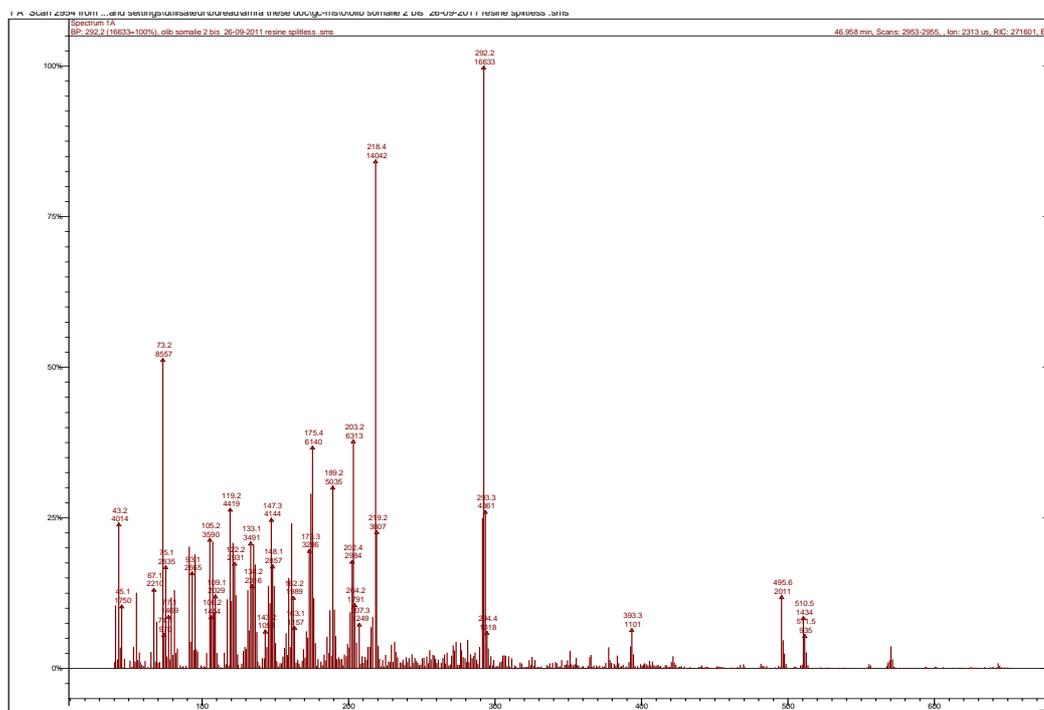
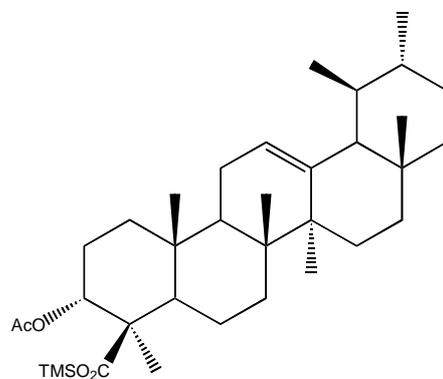


Figure 77 - Spectre de masse obtenu d'acide 3-O-acétyl-β-boswellique-TMS

### 3-épi-lupéol-TMS ( $C_{33}H_{58}OSi$ , $498 \text{ gmol}^{-1}$ )

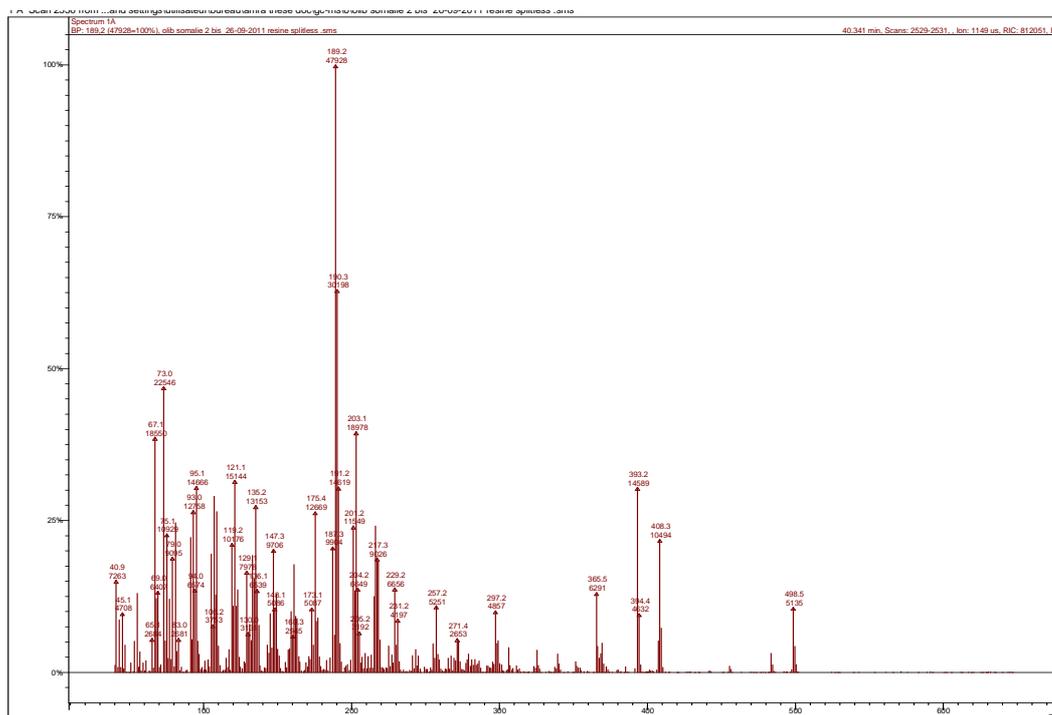
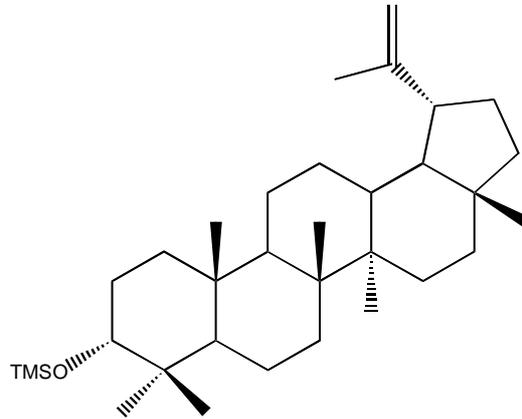


Figure 78 - Spectre de masse obtenu de 3-épi-lupéol-TMS

# Lupéol-TMS ( $C_{33}H_{58}OSi$ , 498 $gmol^{-1}$ )

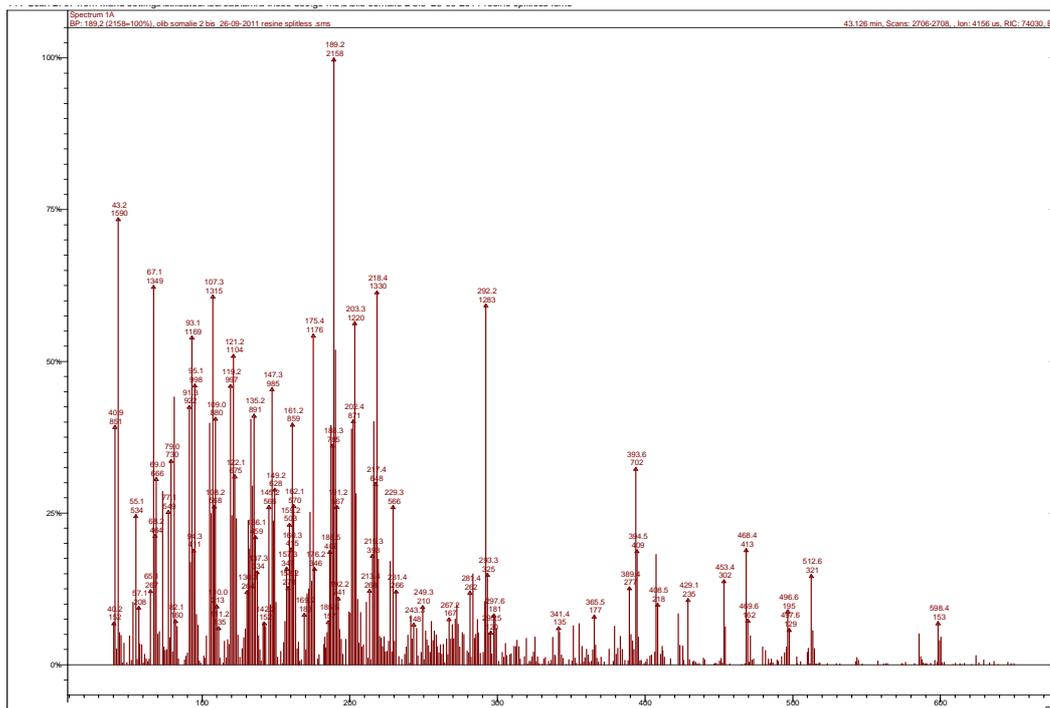
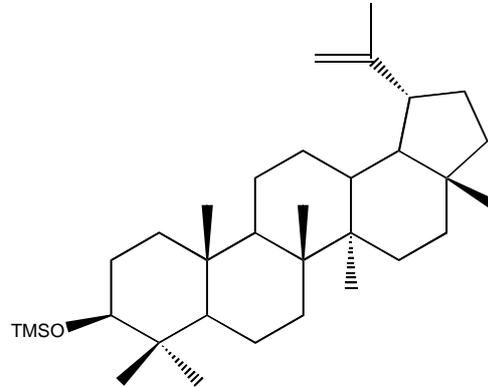


Figure 79 - Spectre de masse obtenu de lupéol-TMS

**$\beta$ -amyrénone (C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O, 424 g·mol<sup>-1</sup>)**

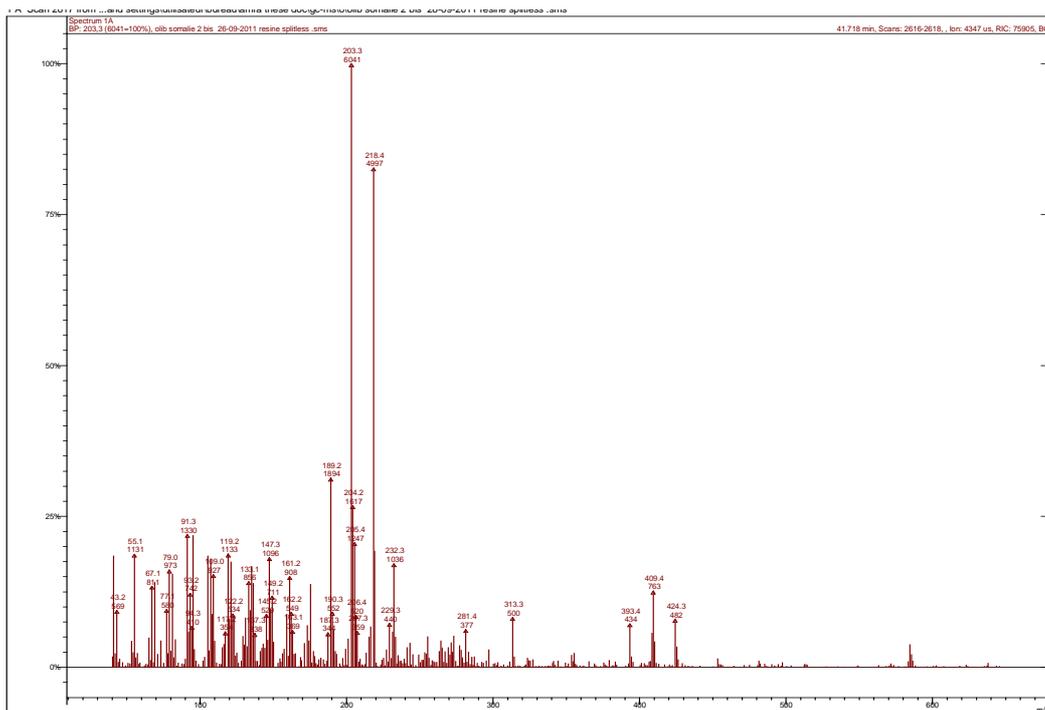
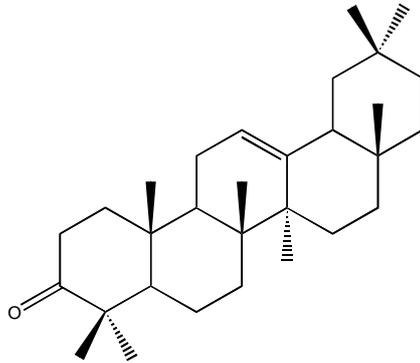


Figure 80 - Spectre de masse obtenu de  $\beta$ -amyrénone

**$\alpha$ -amyrénone (C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O, 424 g·mol<sup>-1</sup>)**

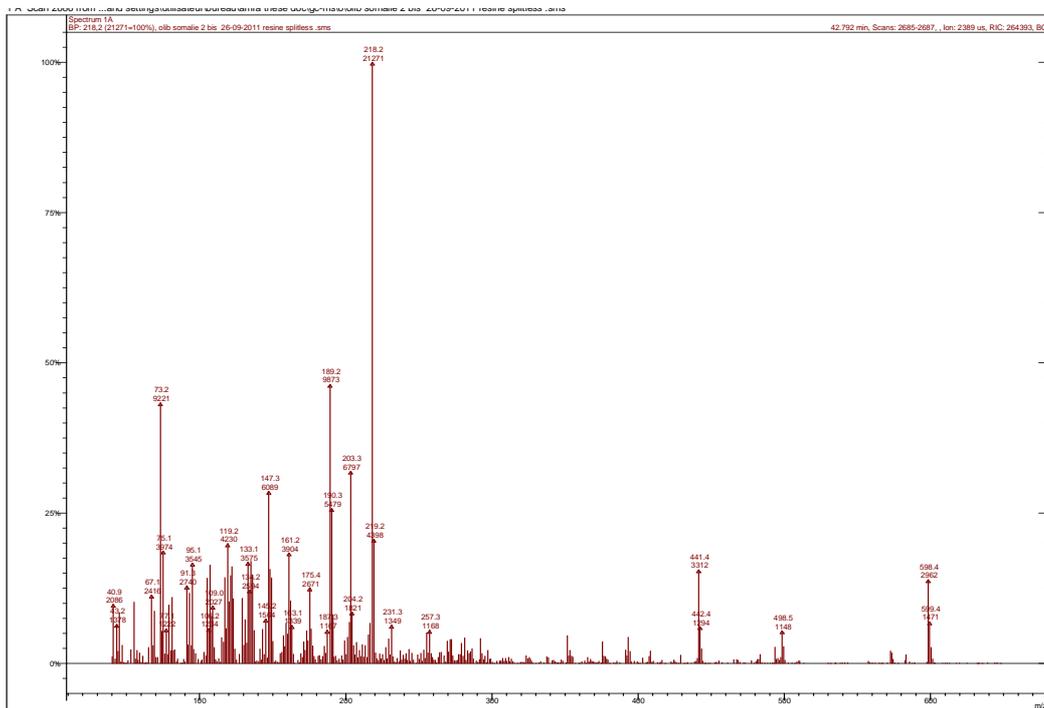
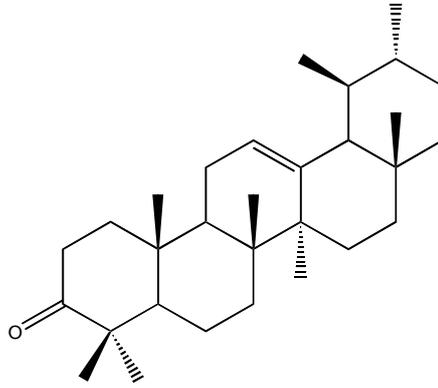


Figure 81 - Spectre de masse obtenu de  $\alpha$ -amyrénone

### 3-épi- $\alpha$ -amyrine-TMS ( $C_{33}H_{58}OSi$ , 498 $gmol^{-1}$ )

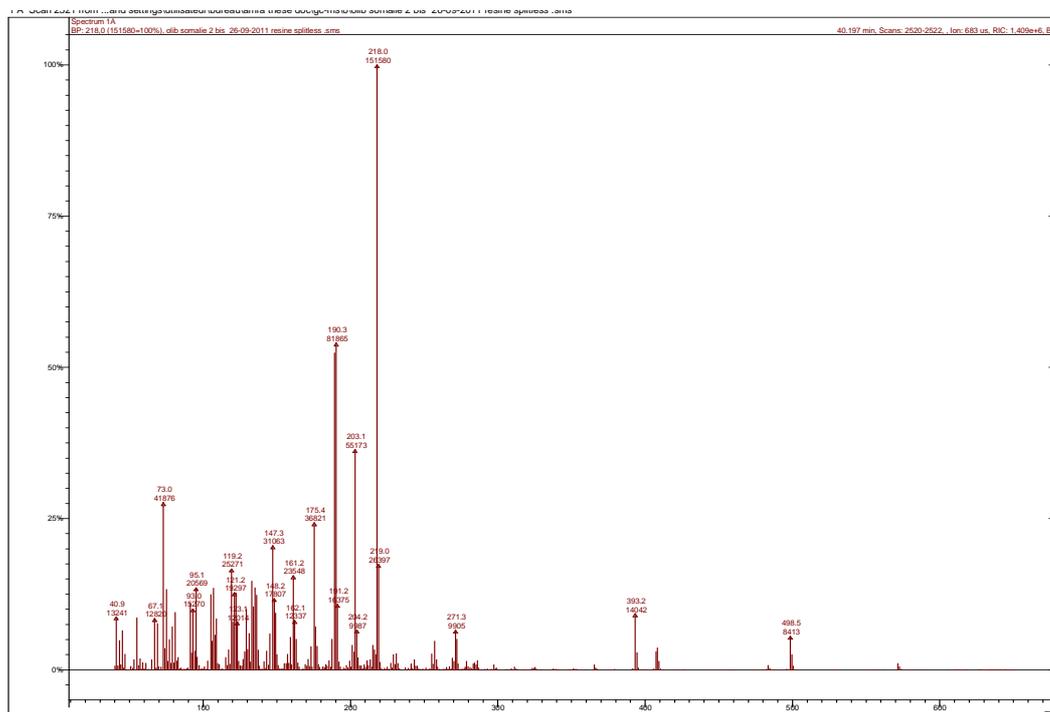
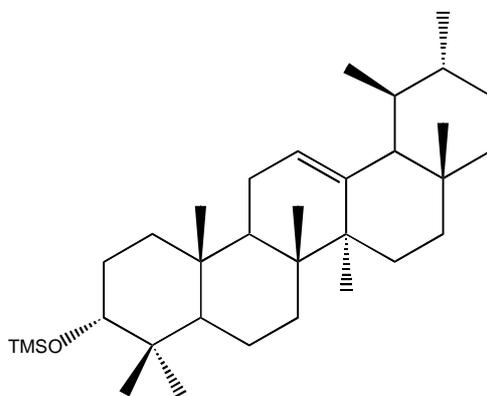


Figure 82 - Spectre de masse obtenu de 3-épi- $\alpha$ -amyrine

3-épi-β-amyrine-TMS ( $C_{33}H_{58}OSi$ , 498  $gmol^{-1}$ )

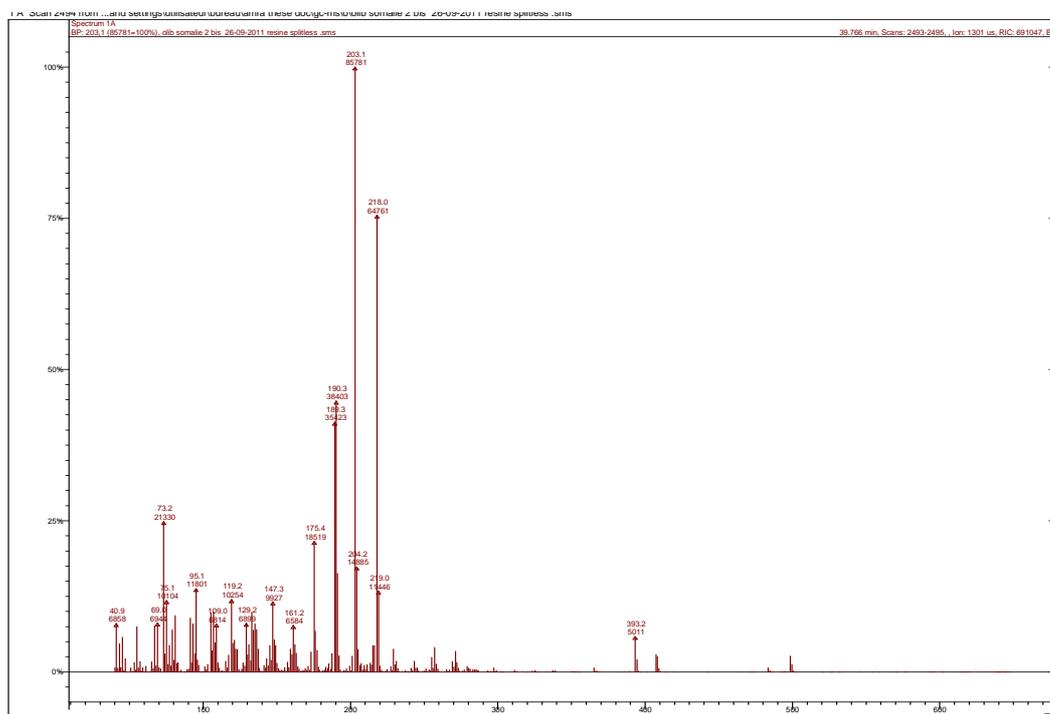
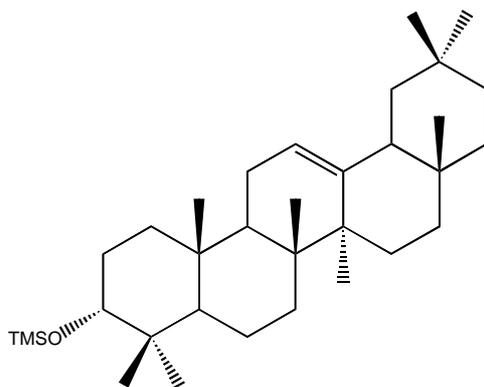


Figure 83 - Spectre de masse obtenu de 3-épi-β-amyrine

**$\beta$ -amyrine-TMS ( $C_{33}H_{58}OSi$ , 498  $gmol^{-1}$ )**

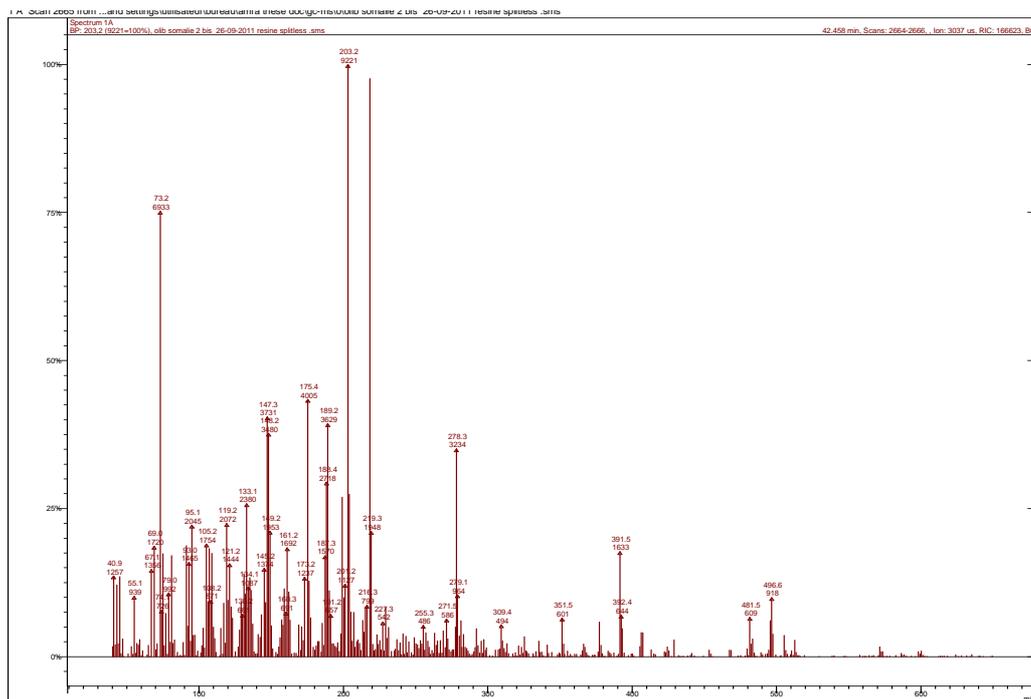
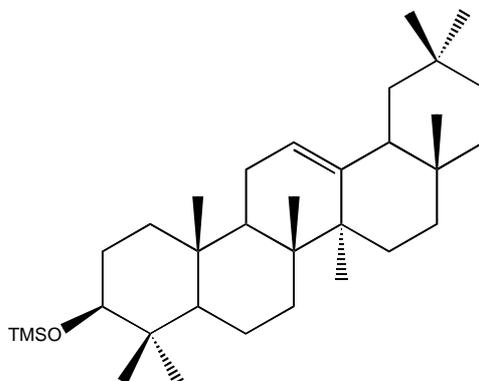


Figure 84 - Spectre de masse obtenu de  $\beta$ -amyrine

**$\alpha$ -amyrine-TMS ( $C_{33}H_{58}OSi$ , 498  $gmol^{-1}$ )**

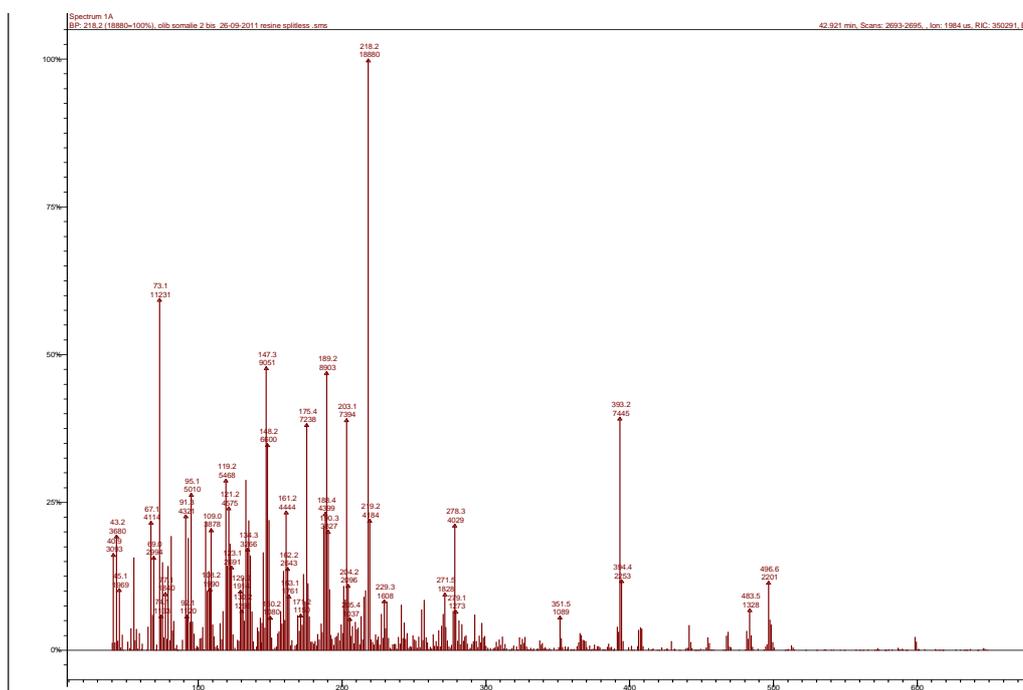
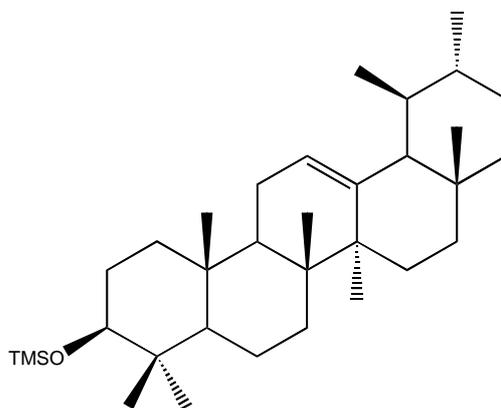


Figure 85 - Spectre de masse obtenu de  $\alpha$ -amyrine

## Dammaradiénone (C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O, 424 g·mol<sup>-1</sup>)

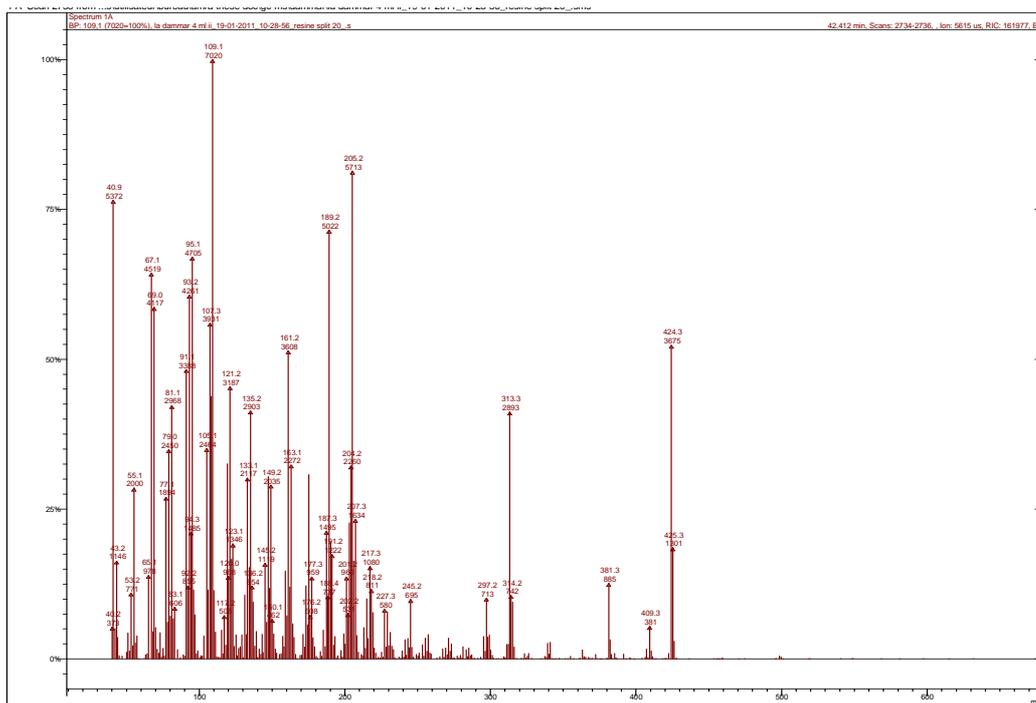
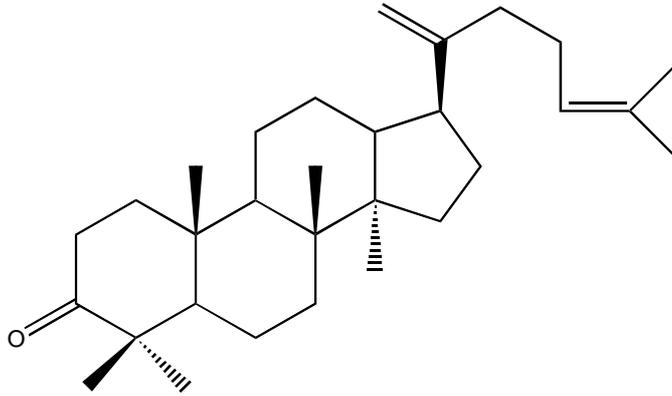


Figure 86 - Spectre de masse obtenu de dammaradiénone

## Dammaradiénole-TMS ( $C_{33}H_{58}OSi$ , 498 $g\text{mol}^{-1}$ )

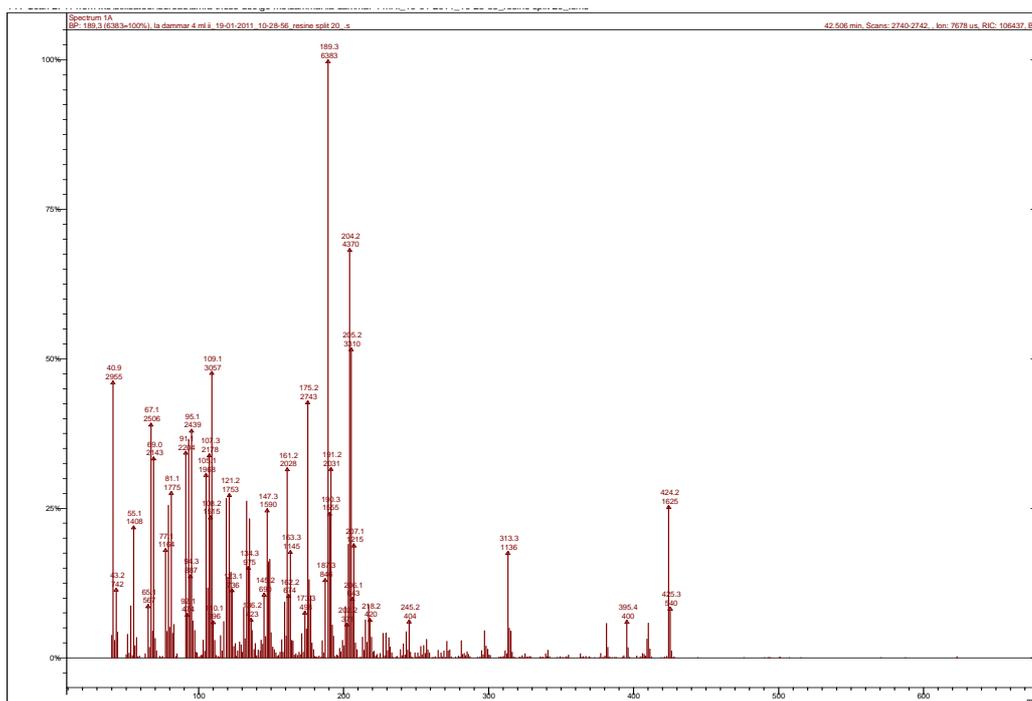
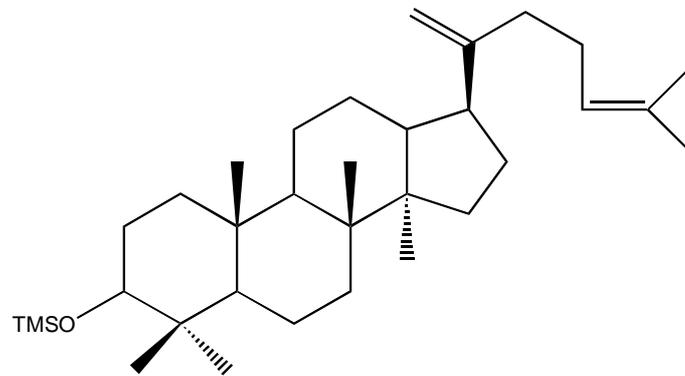


Figure 87 - Spectre de masse obtenu de dammaradiénole-TMS

# Tirucallol-TMS ( $C_{33}H_{58}OSi$ , 498 $gmol^{-1}$ )

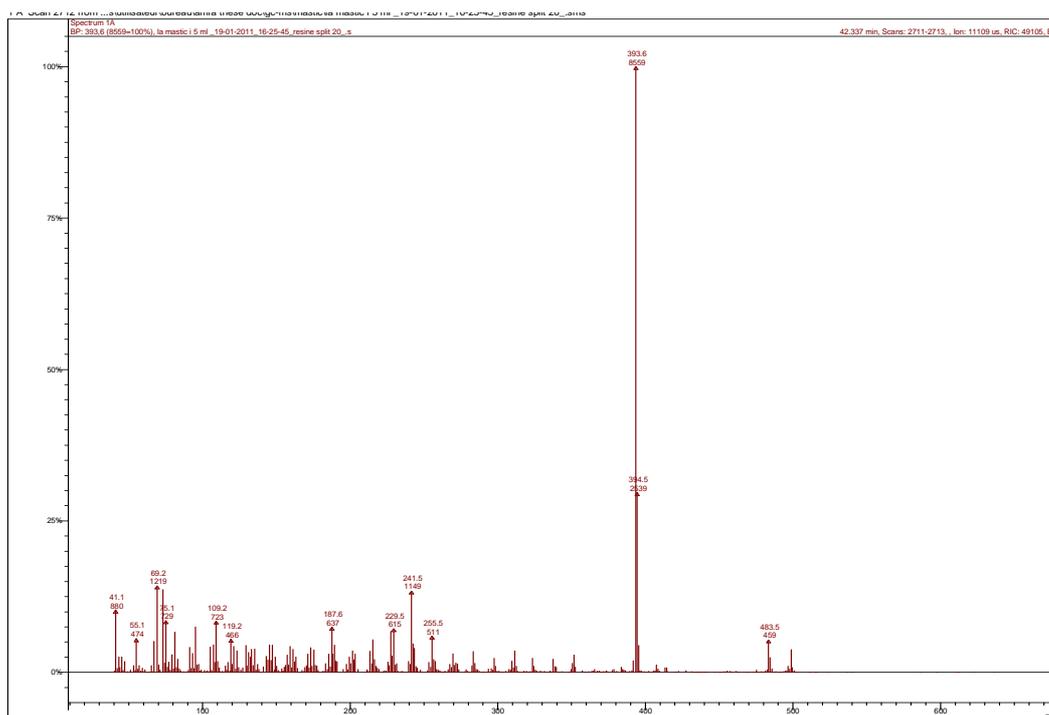
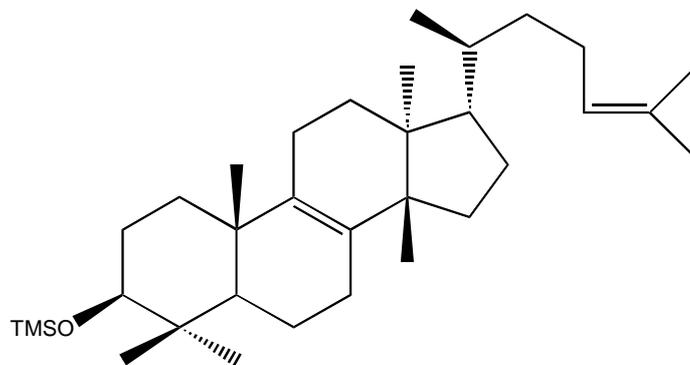


Figure 88 – Spectre de masse obtenu de tirucallol-TMS



# Nor $\beta$ -amyrone ( $C_{30}H_{48}O$ , 424 $gmol^{-1}$ )

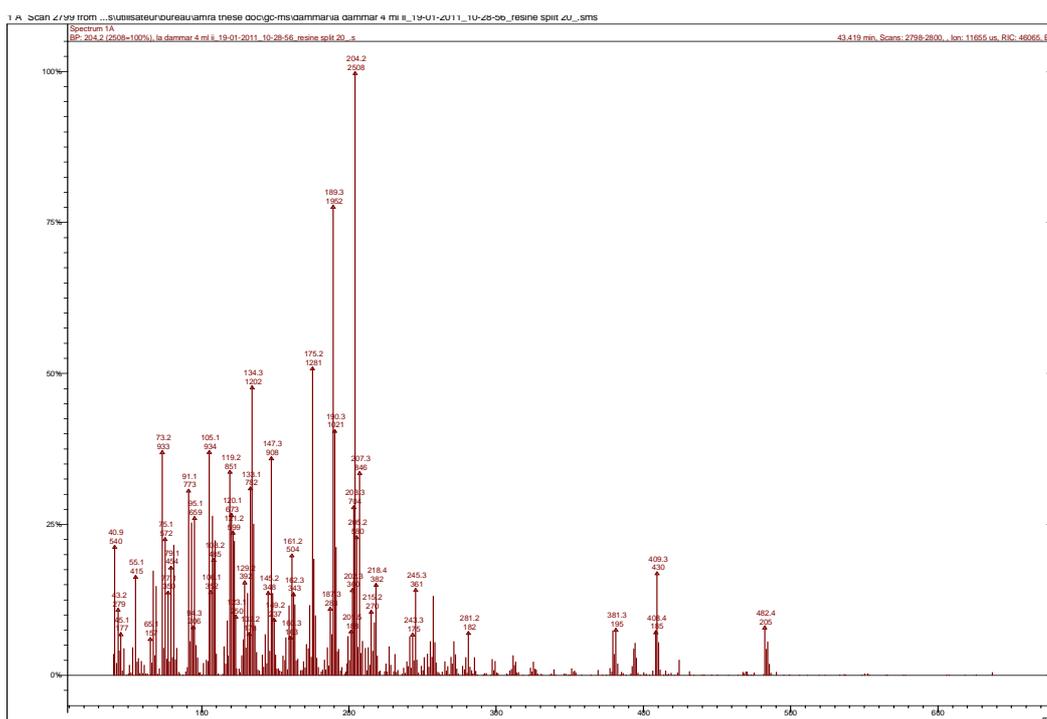
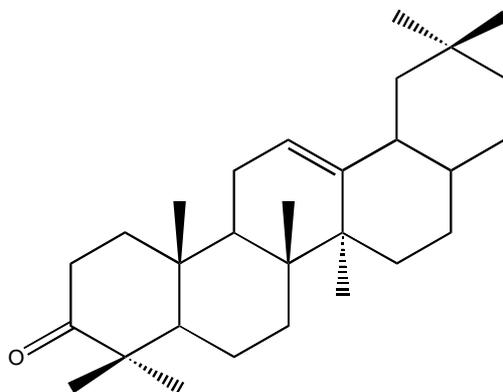


Figure 90 – Spectre de masse obtenu de nor  $\beta$ -amyrone

***Epi-α*-amyrine-TMS (C<sub>33</sub>H<sub>58</sub>OSi, 498 g·mol<sup>-1</sup>)**

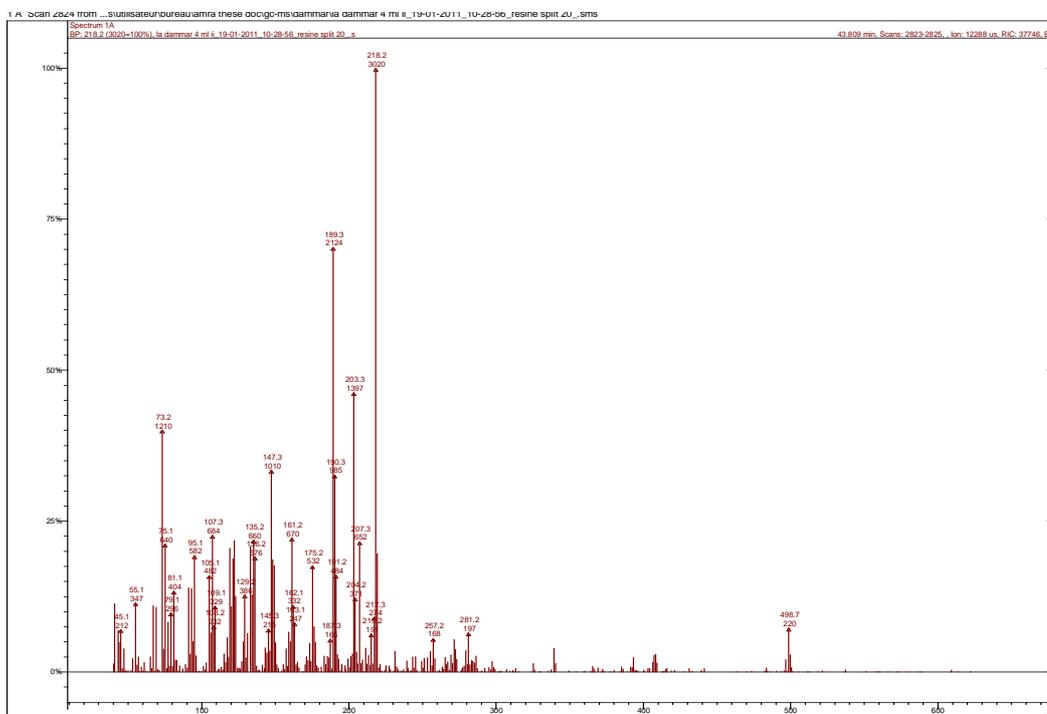
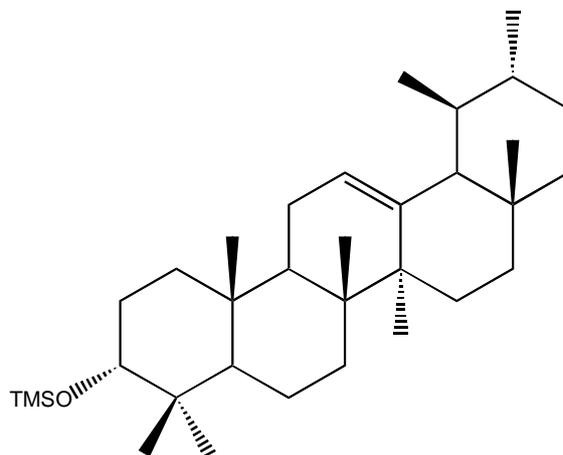


Figure 91 – Spectre de masse obtenu de *Epi-α*-amyrine

## Lupéol-TMS ( $C_{33}H_{58}OSi$ , 498 $gmol^{-1}$ )

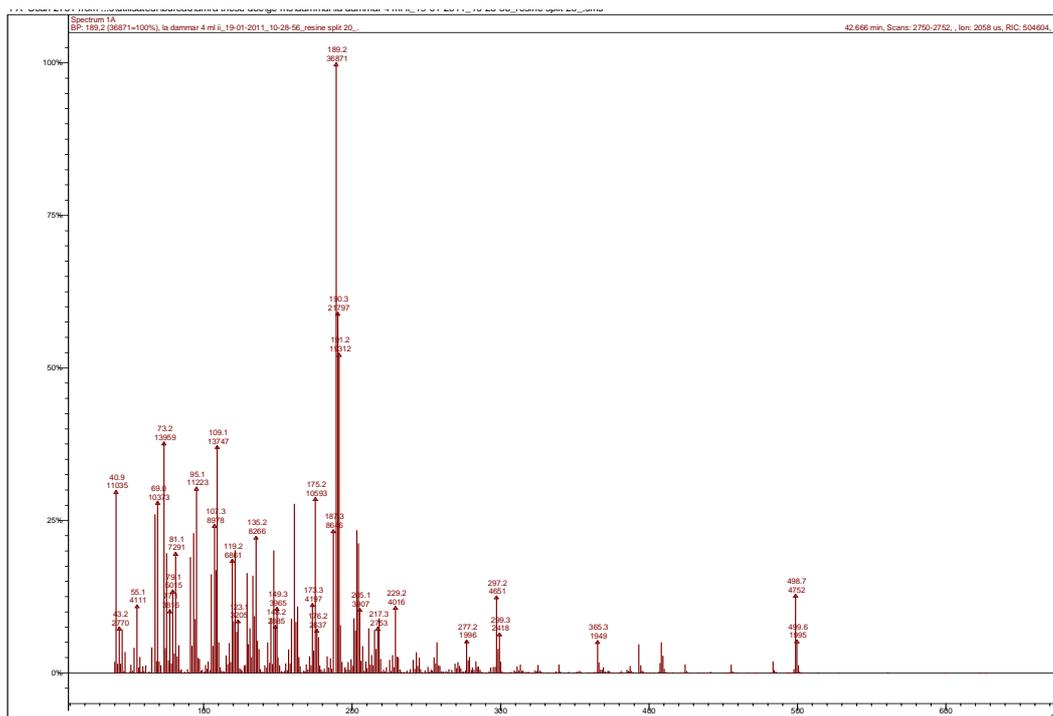
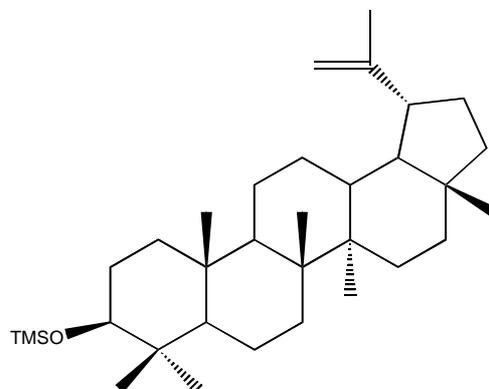


Figure 92 – Spectre de masse obtenu de lupéol-TMS

**$\beta$ -amyrine-TMS ( $C_{33}H_{58}OSi$ , 498  $gmol^{-1}$ )**

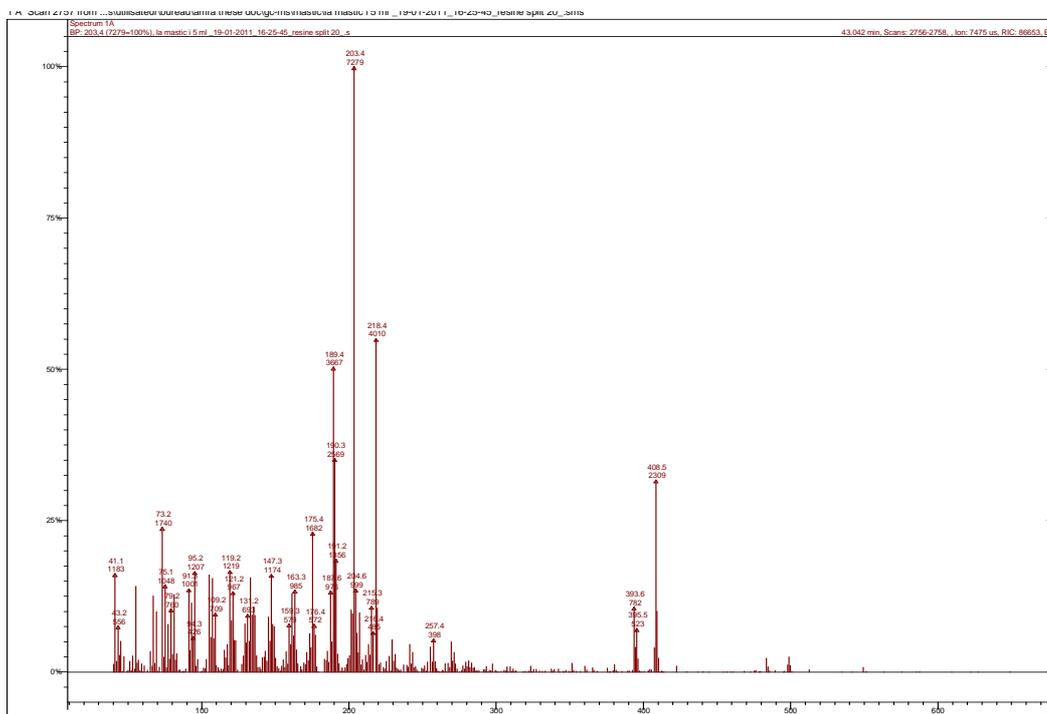
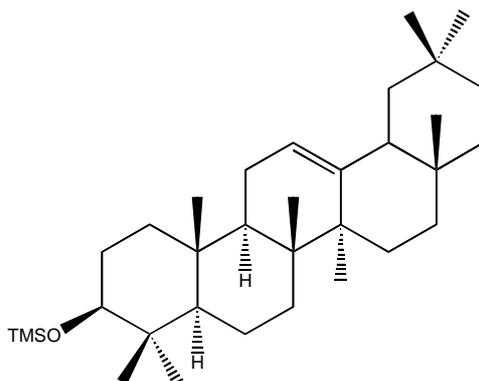


Figure 93 – Spectre de masse obtenu de  $\beta$ -amyrine-TMS

## Hydroxydammarénone-TMS (I ou II) (C<sub>33</sub>H<sub>58</sub>O<sub>2</sub>Si, 512 g·mol<sup>-1</sup>)

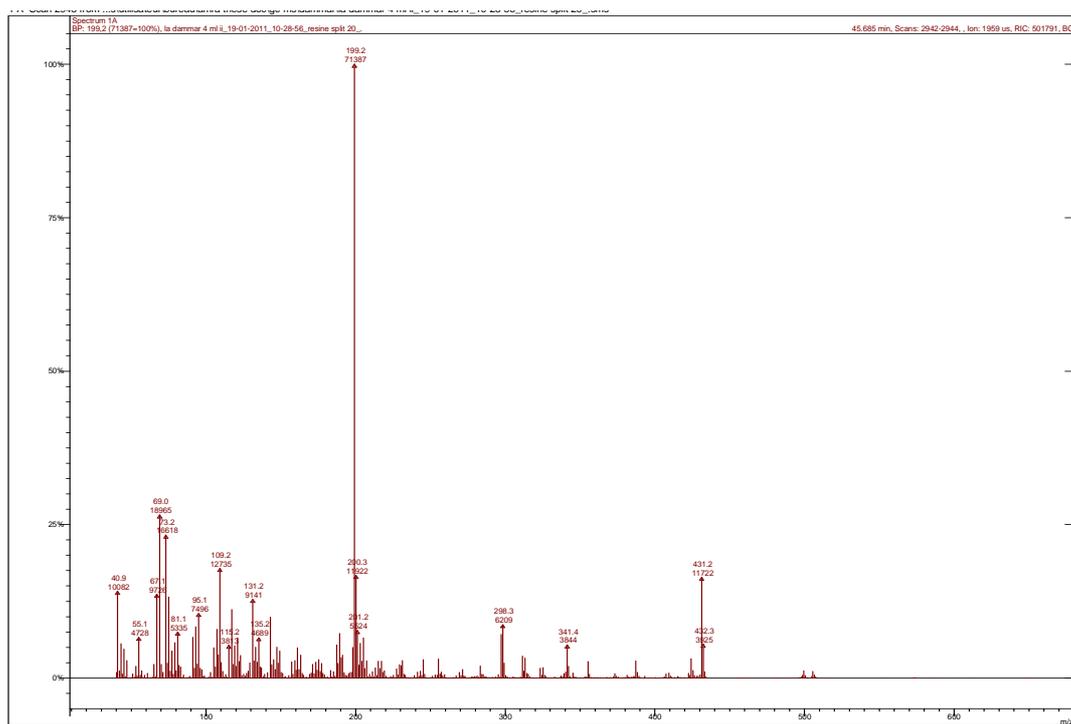
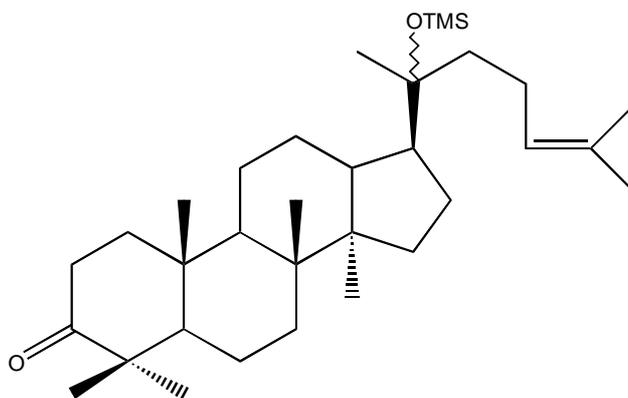


Figure 94 – Spectre de masse obtenu de hydroxydammarénone-TMS (I ou II)

## Dammarénediole-TMS ( $C_{36}H_{66}O_2Si_2$ , $586 \text{ gmol}^{-1}$ )

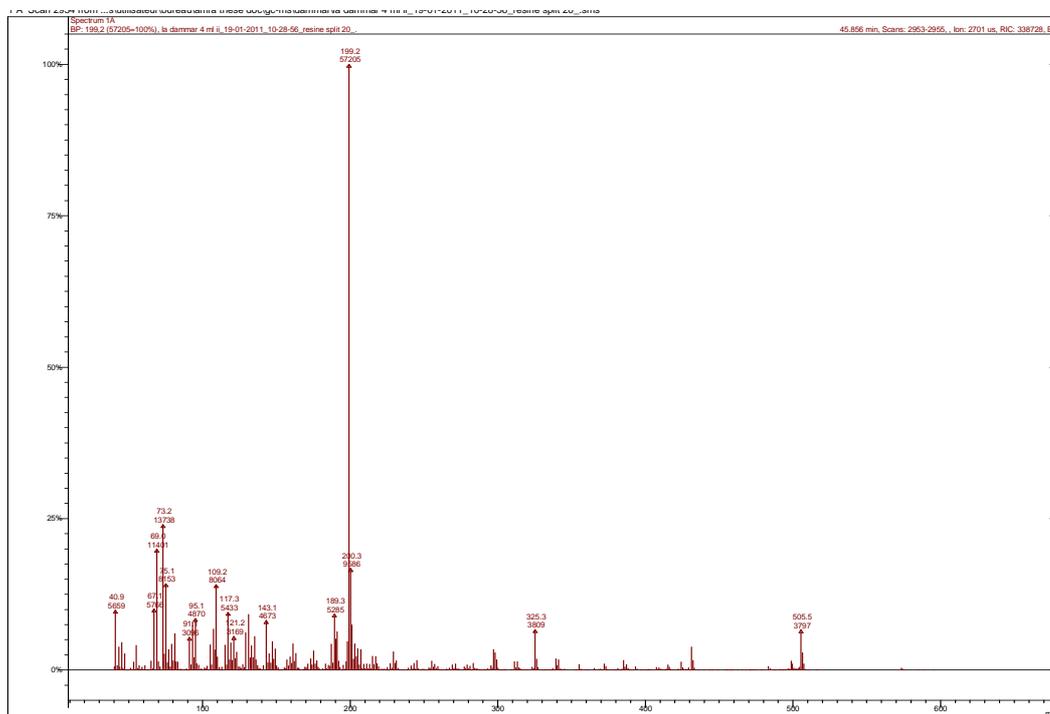
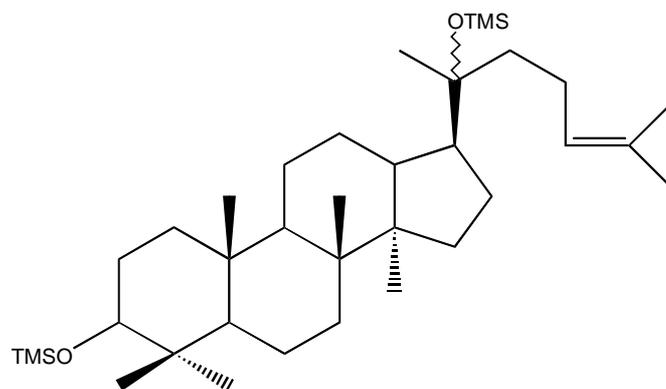


Figure 95 – Spectre de masse obtenu de dammarénediole-TMS

## Acide moronique-TMS ( $C_{33}H_{54}O_3Si$ , 526 $gmol^{-1}$ )

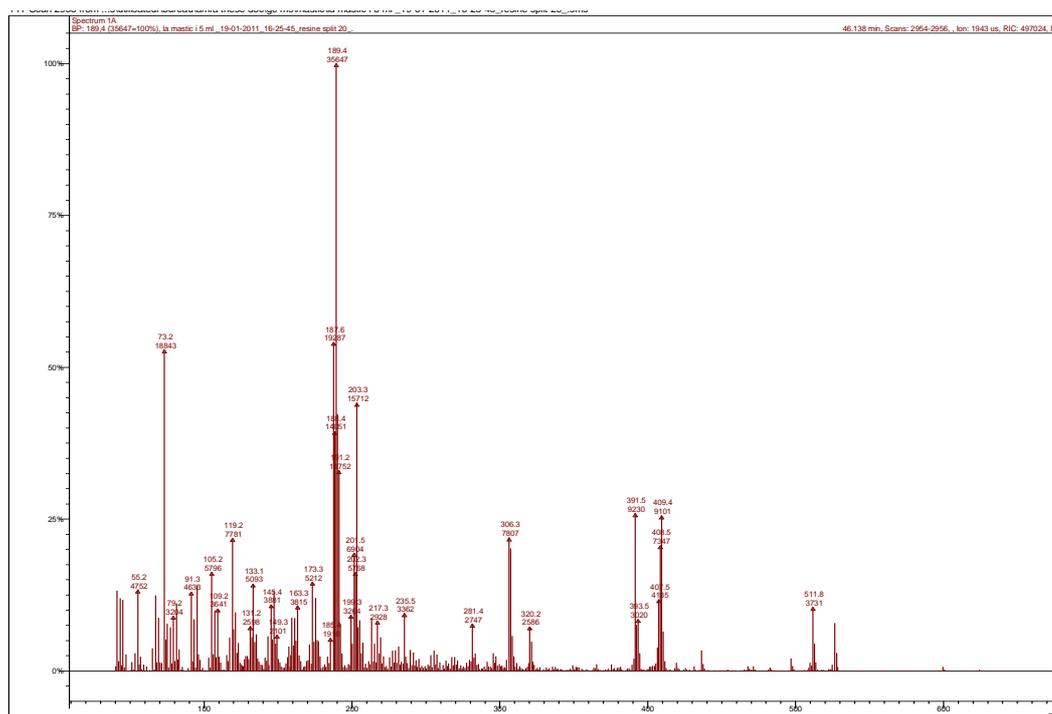
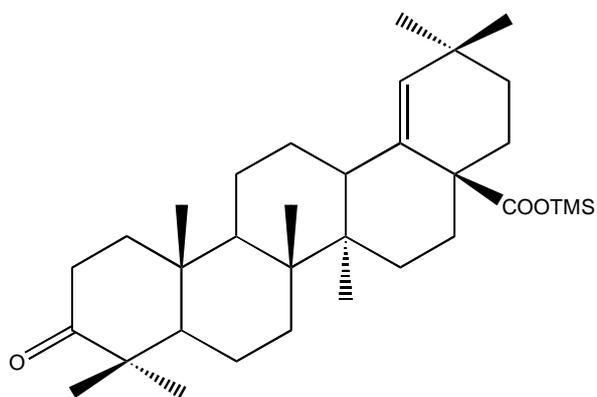


Figure 96 – Spectre de masse obtenu d'acide moronique-TMS

## Acide oléanonique-TMS ( $C_{33}H_{54}O_3Si$ , 526 $gmol^{-1}$ )

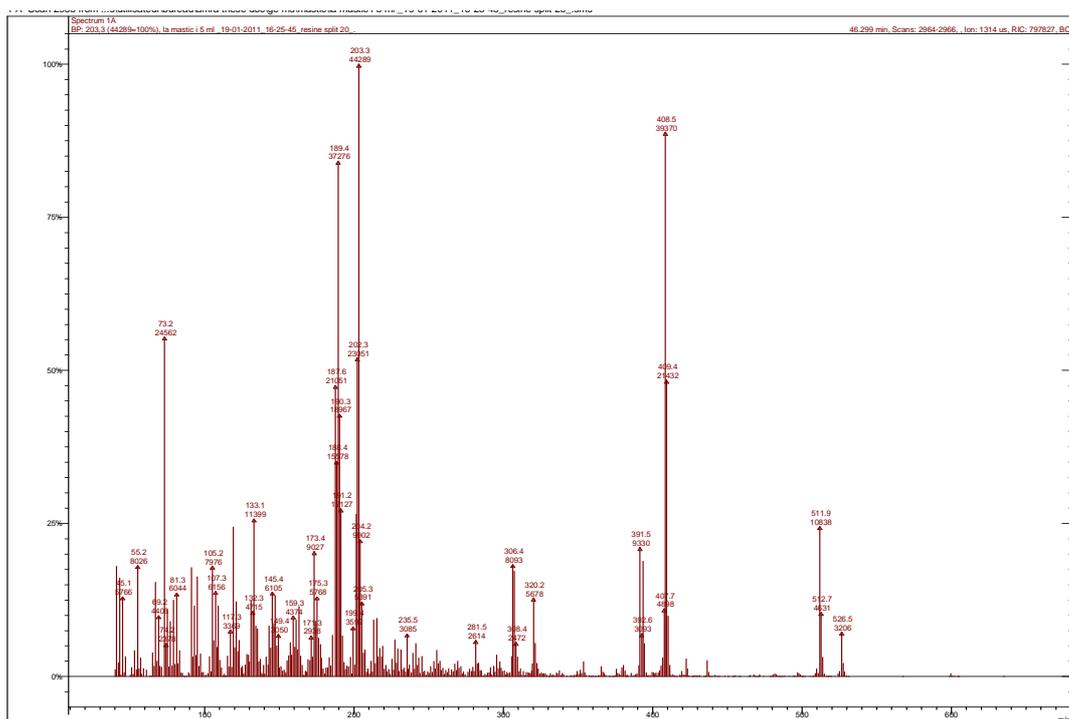
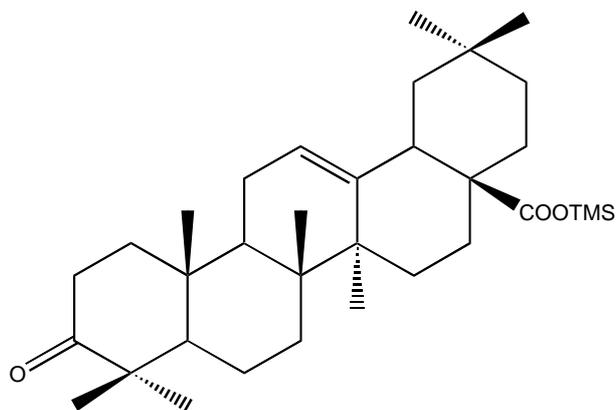


Figure 97 – Spectre de masse obtenu d'acide oléanonique-TMS

## Acide dammarénolique-TMS ( $C_{36}H_{66}O_3Si_2$ , $602 \text{ g mol}^{-1}$ )

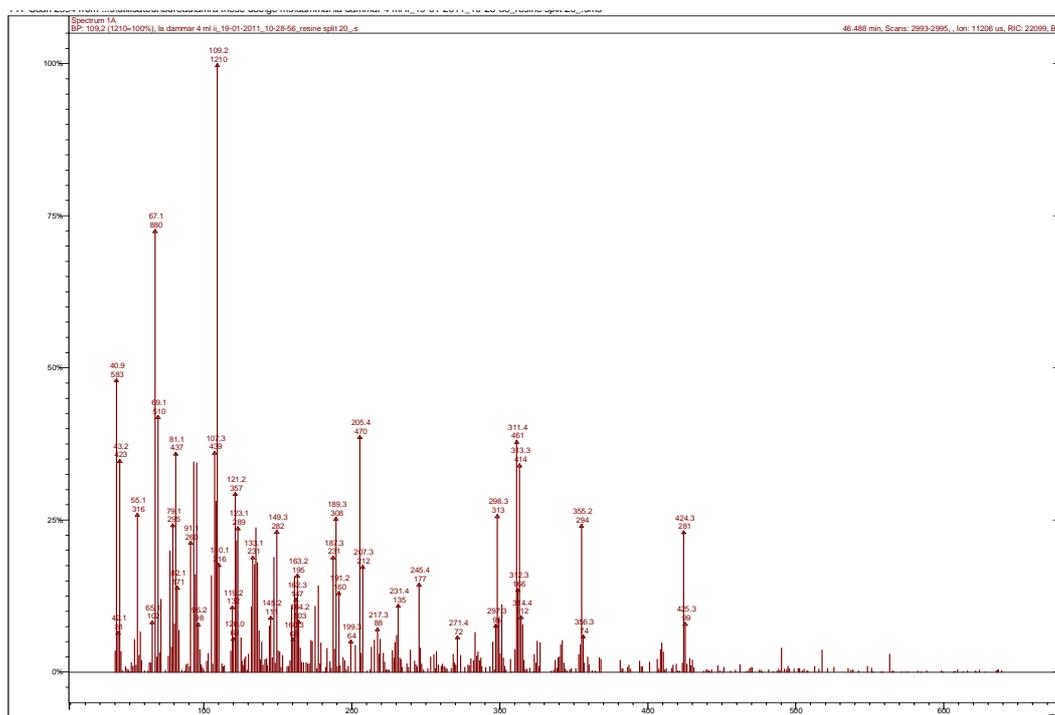
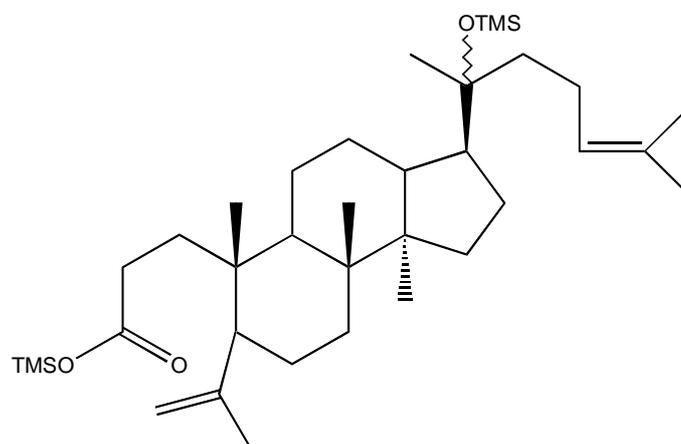


Figure 98 – Spectre de masse obtenu d'acide dammarénolique-TMS

## Aldéhyde oléanonique ( $C_{30}H_{46}O_2$ , $438 \text{ g mol}^{-1}$ )

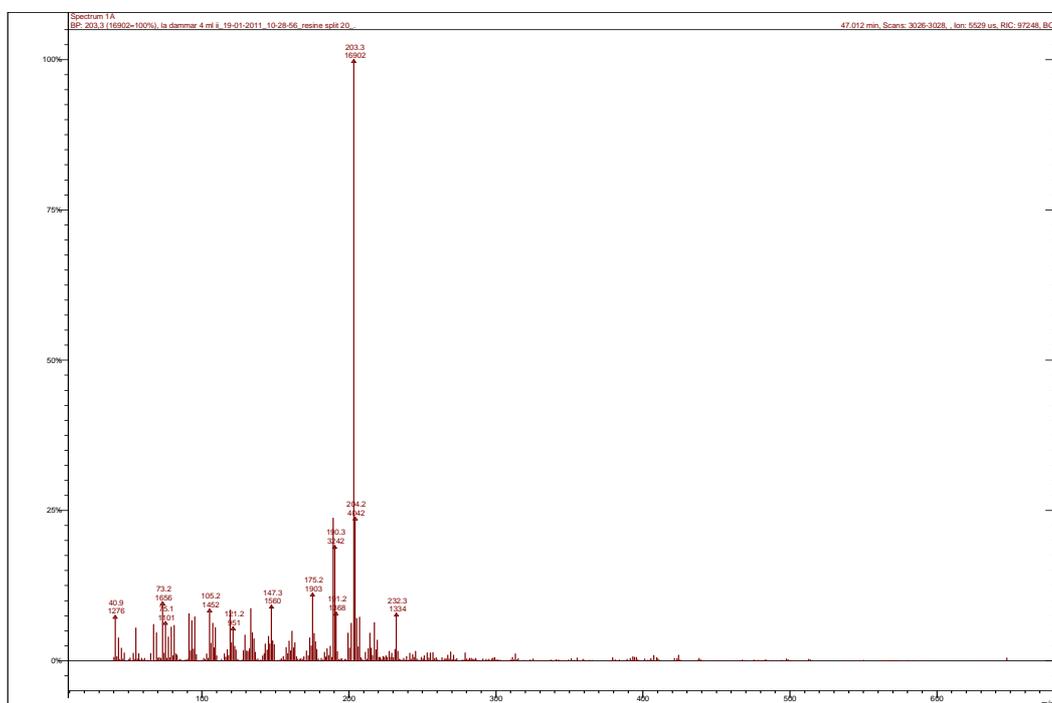
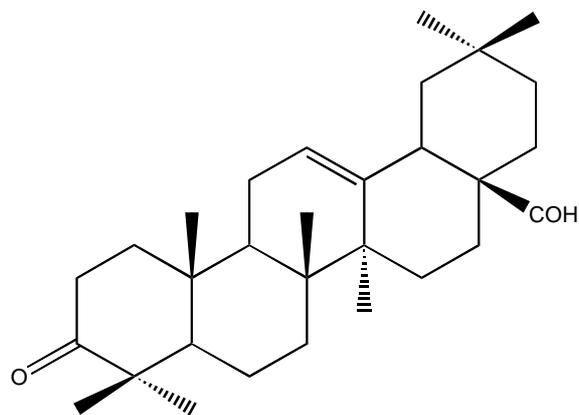


Figure 99 – Spectre de masse obtenu d'aldéhyde oléanonique

## Aldéhyde ursonique ( $C_{30}H_{46}O_2$ , $438 \text{ gmol}^{-1}$ )

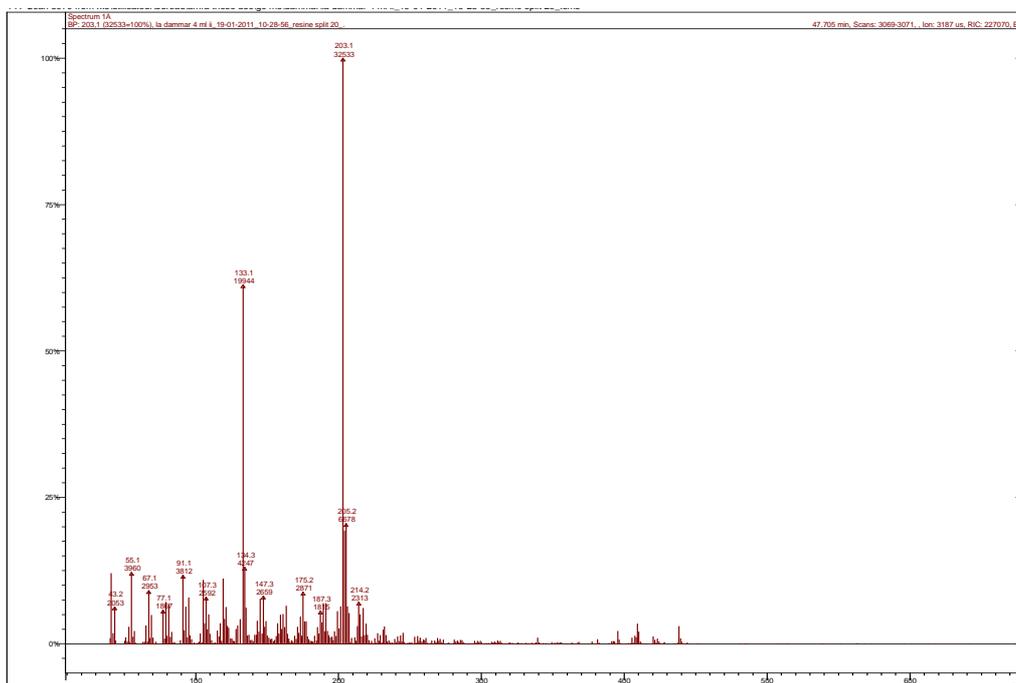
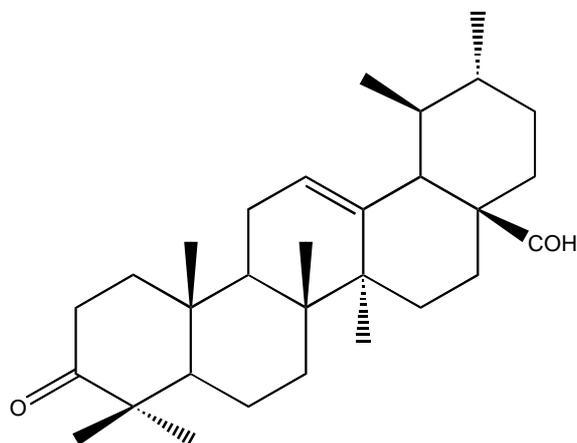


Figure 100 – Spectre de masse obtenu d'aldéhyde ursonique

## Acide ursonique-TMS ( $C_{33}H_{54}O_3Si$ , 526 $g\cdot mol^{-1}$ )

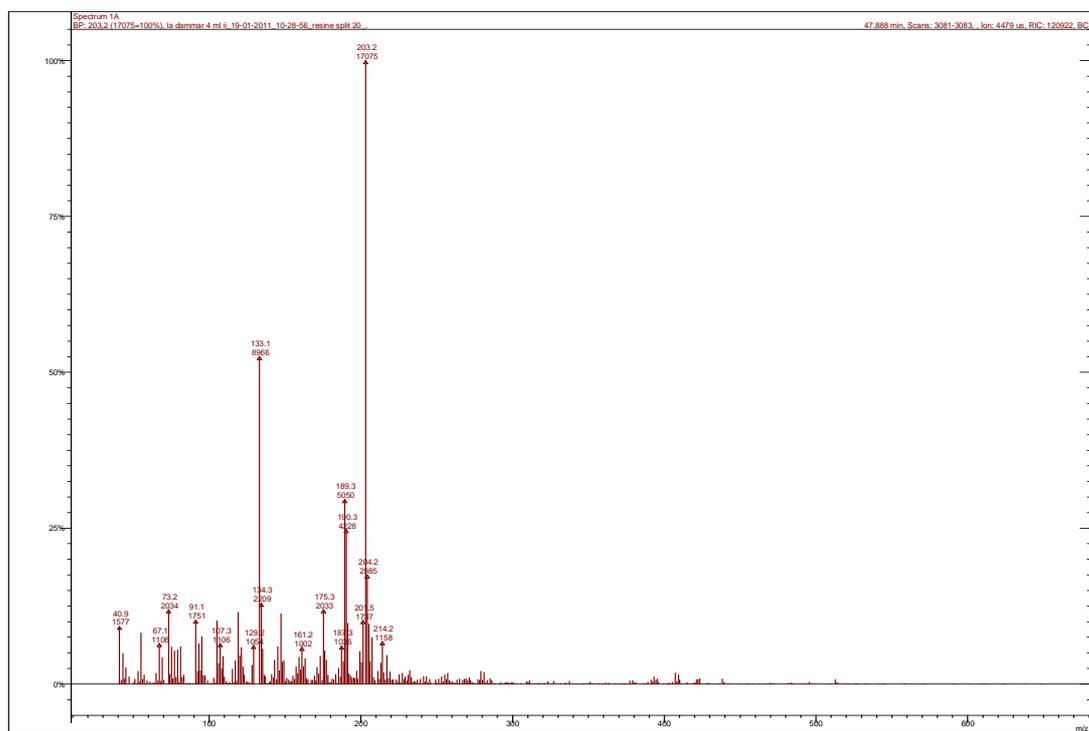
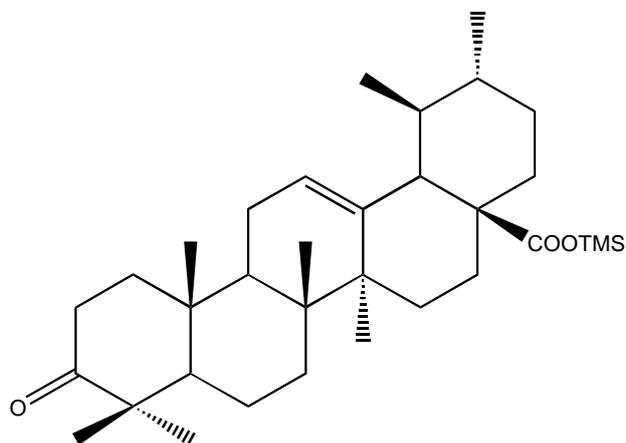
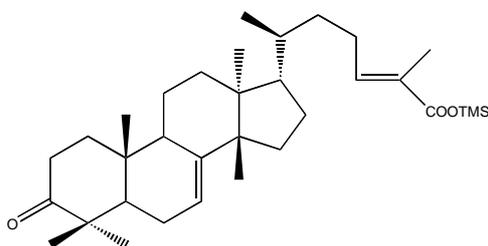


Figure 101 – Spectre de masse obtenu d'acide ursonique-TMS

## Acide (iso)masticadiénonique-TMS ( $C_{33}H_{52}O_3Si$ , $526 \text{ gmol}^{-1}$ )



Ou

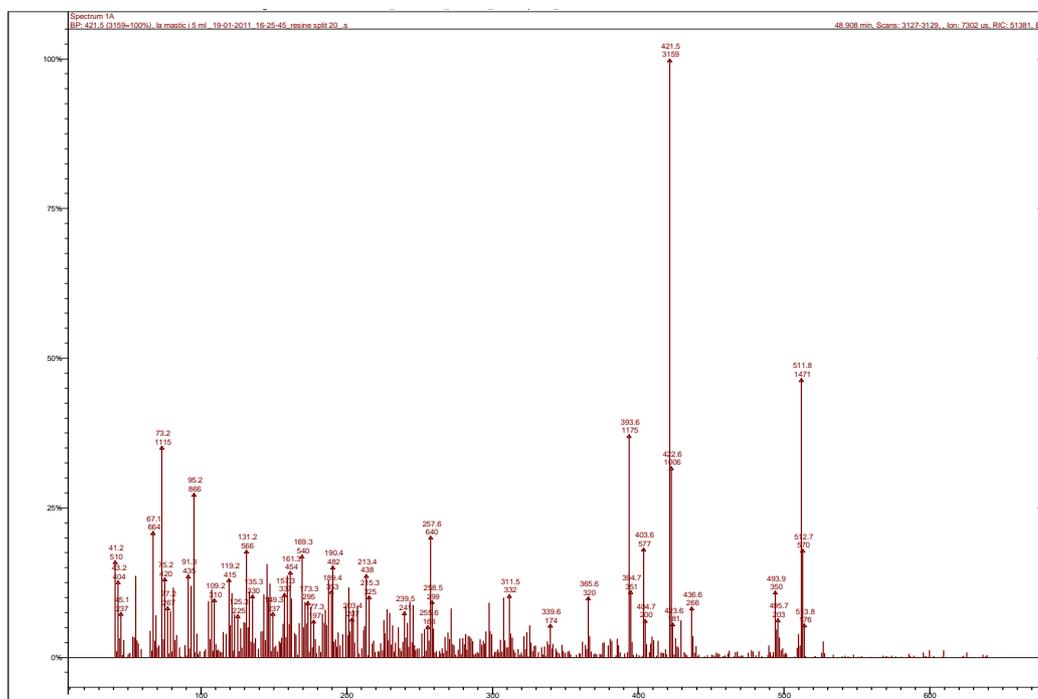
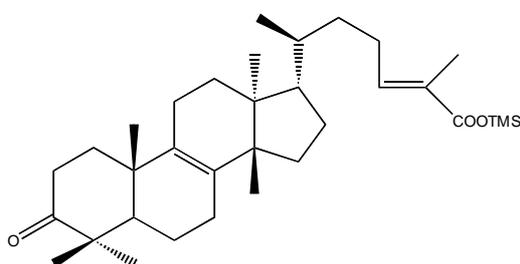
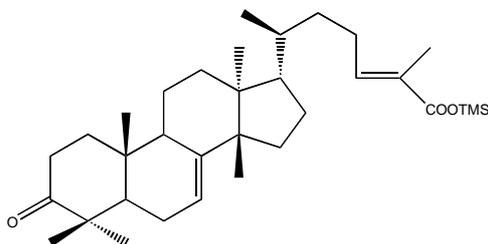


Figure 102 – Spectre de masse obtenu d'acide (iso)masticadiénonique-TMS

## Acide (iso)masticadiénonique-TMS ( $C_{33}H_{52}O_3Si$ , $526 \text{ gmol}^{-1}$ )



Ou

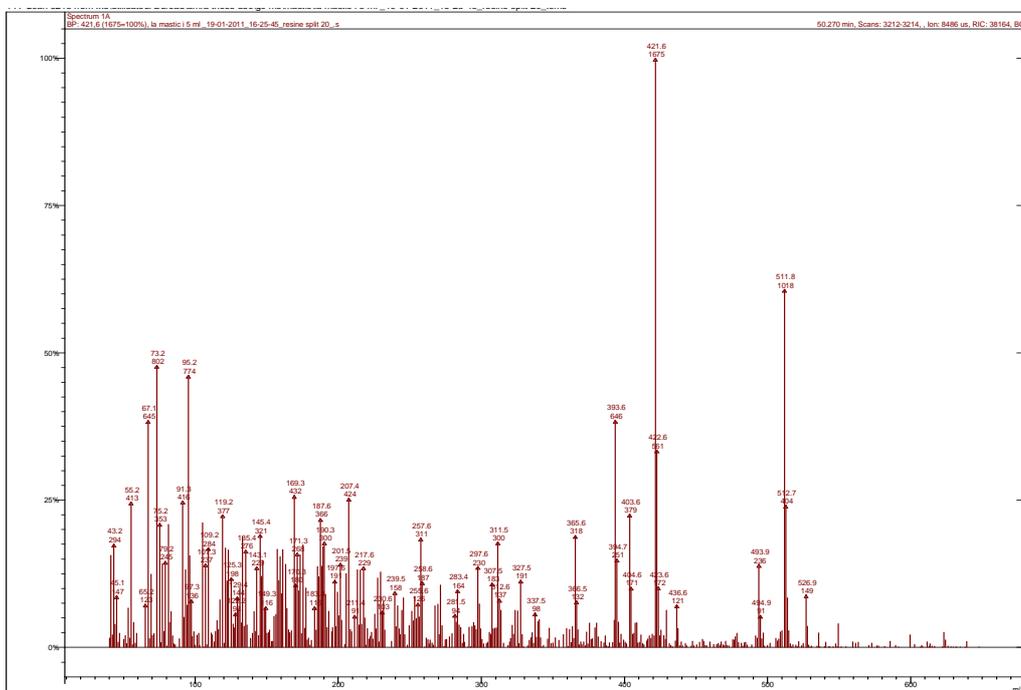
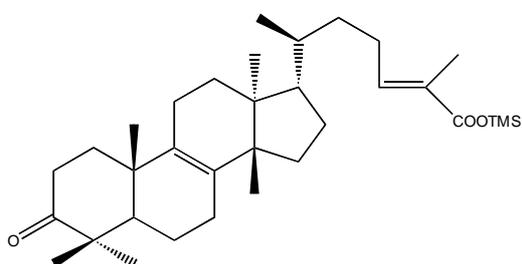


Figure 103 - Spectre de masse obtenu d'acide (iso)masticadiénonique-TMS

# Annexe 2

# **Annexe 3**

## **Chromatogrammes de KBA et AKBA**

## Acide 11-céto-β-boswellique (KBA)

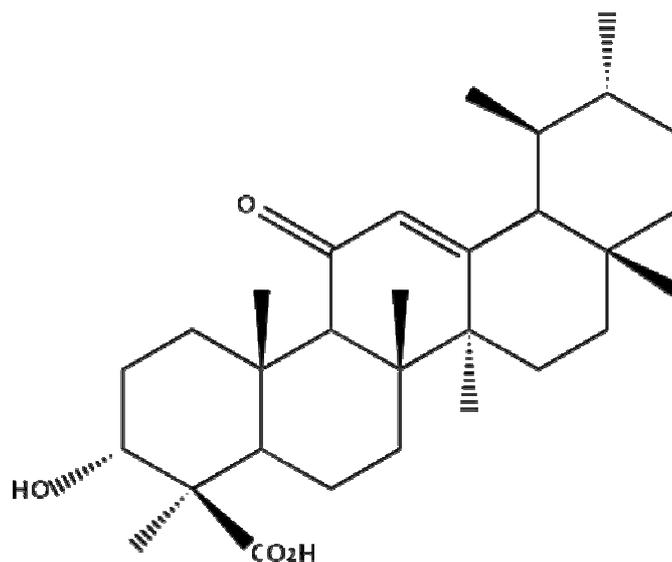


Figure 104 – Structure d'acide 11-céto-β-boswellique ( $C_{30}H_{48}O_4$ ,  $468 \text{ gmol}^{-1}$ )

- **Acide 3α-acétyl-11-céto-β-boswellique (AKBA)**

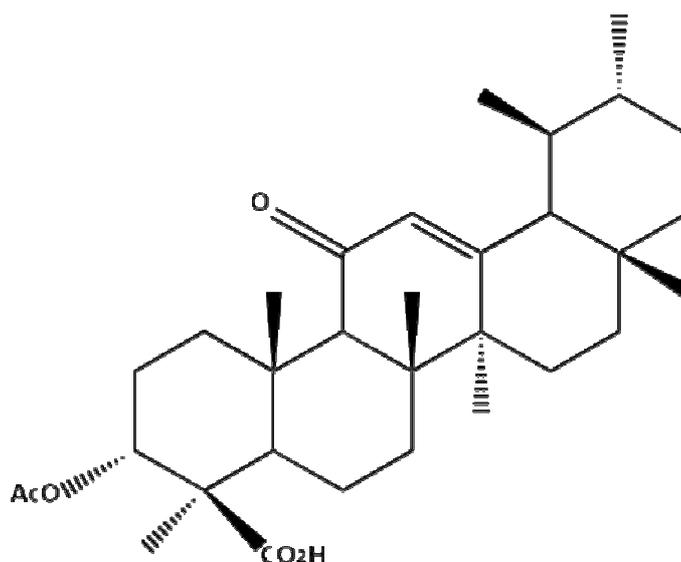


Figure 105 – Structure d'acide 3α-acétyl-11-céto-β-boswellique ( $C_{32}H_{46}O_4$ ,  $490 \text{ gmol}^{-1}$ )

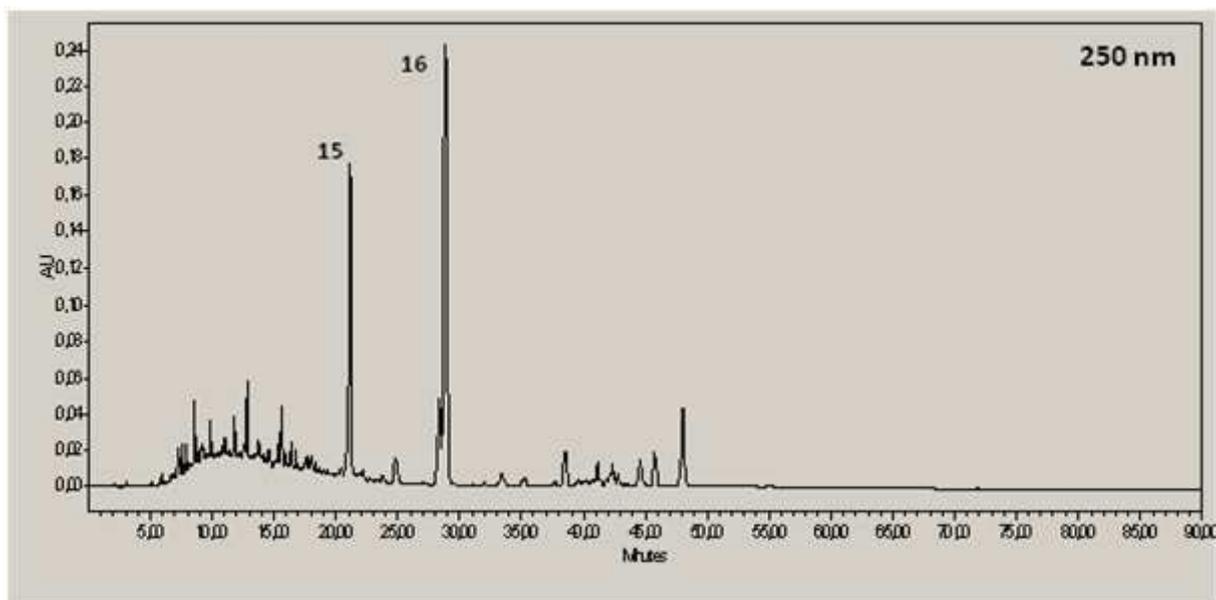


Figure 106 – Chromatogramme de la fraction acide de l’oliban commercial de Somalie (Sté Encens du Monde), colonne classique RP-18

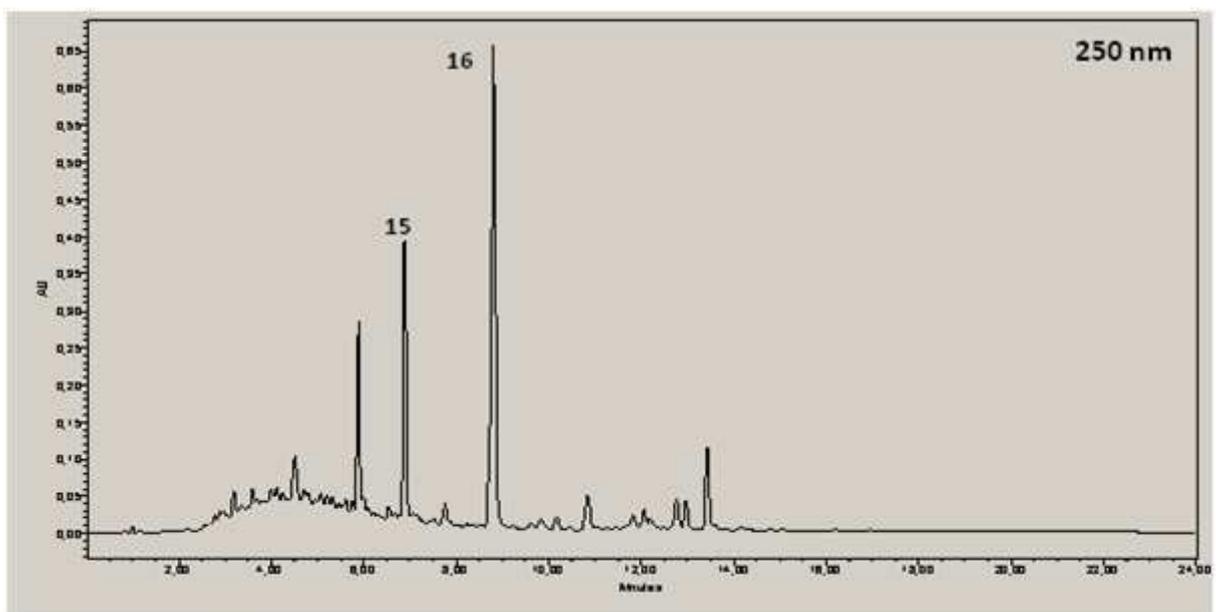


Figure 107 – Chromatogramme de la fraction acide de l’oliban commercial de Somalie (Sté Encens du Monde), colonne Kinetex

N°	Nom du composé	$t_R$ -RP-18 (min)	$t_R$ - Kinetex (min)
15	Acide 11-céto- $\beta$ -boswellique (KBA)	21,3	7,0
16	Acide 3-O-acétyle-11-céto- $\beta$ -boswellique (AKBA)	29,0	8,8

Tableau 45 – Les  $t_R$  correspondants pour les composés KBA et AKBA

# **Annexe 4**

## **Les échantillons bosniens**

## **La Galerie nationale de Bosnie-Herzégovine et son historique**

Les échantillons bosniens proviennent de prélèvements opérés sur six tableaux de la Galerie nationale de Bosnie-Herzégovine, en 2010 et en 2011.

La Galerie nationale d'Art de Bosnie-Herzégovine, située à Sarajevo, capitale du pays, est formée le 11 octobre 1946, sous la République fédérative populaire de Yougoslavie, par décision gouvernementale de la république populaire de Bosnie-Herzégovine.

Elle ouvre ses portes au public à partir de 1959 pour l'inauguration de sa première exposition permanente. Au départ, la collection de la Galerie comptait 600 œuvres et aujourd'hui ce chiffre est multiplié par dix, et la galerie conserve plus 6000 œuvres d'art moderne et contemporain. Les collections de la galerie sont réparties par thématique : art de la Bosnie-Herzégovine, art de la Yougoslavie, collection des donations internationales, collection de Ferdinand Hodler, les icônes, les photographies et les nouveaux médias, et l'archive visuelle «NADA» (L'espoir). En plus de ses collections, la Galerie a mis en place plusieurs ateliers, notamment l'atelier de restauration.

L'institution n'a pas fermé durant la guerre de 1992 à 1995. Elle a au contraire fait preuve de force puisqu'elle a présenté quarante deux expositions au moment de cette lourde page de son histoire.

Il est important de souligner que la conséquence de cette période conflictuelle est la perte de cinquante et une œuvres du patrimoine culturel de la Bosnie-Herzégovine. Ces disparitions ont été confirmées en 1993 par l'INTERPOL mais figurent toujours sur la liste des œuvres recherchées.

Malheureusement, la période actuelle est la plus fragile pour la Galerie. Les accords de Dayton signé en 1995 qui ont mis fin à la guerre de Bosnie n'ont pas précisé à qui revenait la responsabilité des institutions culturelles du pays. Ce vide juridique laisse place à des difficultés d'organisation et participe à la fatalité de la situation dans laquelle est plongée la Galerie et interroge quant à son devenir incertain (source : [www.ugbih.ba](http://www.ugbih.ba), le site officiel de la Galerie).

## Quelques mots sur les peintres bosniens

Les prélèvements ont été réalisés en 2010 et en 2011. En totalité, douze échantillons ont été prélevés sur six tableaux différents. Quatre de ces œuvres datent de la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, du début et du milieu du XX<sup>ème</sup> siècle. Ces tableaux ont été réalisés par des maîtres de la peinture qui ont marqué l'art de cette époque en Yougoslavie et en Bosnie-Herzégovine. Deux autres prélèvements proviennent de deux portraits d'un auteur inconnu.

Ci-dessous sont présentées les biographies des artistes de ces œuvres.

### **Behaudin Selmanović**

Né le 4 juillet 1915 à Pljevlja en république socialiste fédérative de Yougoslavie (SFRJ), mort à Sarajevo en 1972.

Ce peintre est un personnage solitaire dans la scène artistique bosnienne, sans précurseur direct. Dans un contexte plus large, on pourrait le rapprocher des œuvres de Matisse ou de Cézanne. Ses œuvres sont uniques dans la peinture bosnienne et cet artiste est facilement reconnaissable. La majorité de ses travaux est liée au thème de la nature morte, avec la domination de la couleur et de la planéité. Par son insistance de la stylisation et du monochromie dans ses œuvres, Selmanović essaye de monter la simplicité (source : [www.ugbih.ba](http://www.ugbih.ba), le site officiel de la Galerie).

Les échantillons ont été prélevés de l'œuvre nommée «Les pommes» («Jabuke», Figure 108), Behaudin Selmanović, Galerie nationale d'art de Sarajevo.



Figure 108 – L'oeuvre «Jabuke», Behaudin Selmanović

## Csikos Sessia Bela

Né à Osijek (Croatie) en 1864, son père était un capitaine au service de la monarchie Austro-hongrois et il a été honoré pour ses mérites du titre «Sessia» (il a participé dans la bataille en Italie, sur la rivière Sessia). Csikos Bela a également fait une carrière militaire mais très brève, car il commença ses études à Vienne (Autriche) chez Julius Berger, puis au côté du professeur Lindenschmit à Munich, et en Italie. Le peintre passa toute sa vie à Zagreb, en Croatie, où il meurt en 1931.

Csikos Sessia Bela est considéré comme l'un des plus grands représentants du symbolisme et de la sécession en ex-Yougoslavie, aujourd'hui en Croatie. Il est aussi un des fondateurs de l'Académie des Beaux arts à Zagreb (Source: Vijenac, broj 467, 26.01.2012. Matica hrvatska).

Après madame Metka Kraigher-Hozo, professeur renommé, actuellement en retraite, de l'Académie des Beaux arts de Sarajevo, l'évêque Josip Juraj Strossmayer, l'un des croates les plus influençables et des plus importants de XIX<sup>ème</sup> siècle, qui s'attacha durant sa vie à faire remplacer les œuvres de Bosnie-Herzégovine en Croatie. Il s'agit des œuvres

réalisées pendant que la Bosnie-Herzégovine était une province autonome de l'empire Austro-hongrois (1878-1914). C'est la raison pour laquelle il ne reste que peu d'œuvres de cette période.

L'œuvre de Csikos Sessia Bela d'où l'échantillon a été prélevé provient de la Galerie nationale d'art de Sarajevo, nommée «En garde» («Na straži») est present sur la figure 109.



Figure 109 – L'oeuvre «Na straži», Csikos Sessia Bela

## Aleksandar Kumrić

Né à Kostajnica (République de Croatie), le 22 novembre 1898, mort à Belgrade (République de Serbie) le 12 juin 1983.

Aleksandar Kumrić commença la peinture à l'Académie des Beaux arts de Zagreb, puis il a continué à l'École d'art de Belgrade. Il partit améliorer son style à Vienne (Autriche), puis à Paris (France).

Il vécut et créa ses œuvres à Novi Sad et à Belgrade. Il a été membre de l'association artistique «Lada» et de l'association des artistes de Serbie (ULUS). Il travailla également comme enseignant à l'Académie de l'association des artistes de Belgrade.

Aleksandar Kumrić a commencé à développer son style chez son professeur M. Milovanović à Belgrade, puis il s'est tourné vers l'impressionnisme, sous l'influence de Paris, à travers des œuvres de Monnet (Source : Spomen-zbirka Pavla Beljanskog).

Les échantillons proviennent de l'œuvre nommée «L'olivier» («Maslina», figure 110), appartenant à la collection de la Galerie nationale d'art à Sarajevo.



Figure 110 – L'œuvre «Maslina», Aleksandar Kumrić

## Špiro Bocarić

Né en 1876 à Budva (Montenegro), Spiro commença son chemin de peintre à Dubrovnik (Croatie), puis il a poursuivi ses études au Studio Scuola Disegno et au Regio Istituto di Belle Arti à Venise (Italie), en 1895. Il rejoint son frère aîné Anastas, également peintre, à Mostar (Bosnie-Herzégovine), en 1896. Plus tard, Špiro repart pour Sarajevo et finalement pour Banja Luka, où il retrouve sa mort en 1941.

Au départ, les frères ont un style très semblable, classique et conformiste, qui s'est reflété dans les portraits de la fin de XIX<sup>ème</sup> siècle et du début du XX<sup>ème</sup> siècle. Plus tard, la peinture d'Anastas se rapproche du romantisme et Špiro adopte le style impressionnisme. Ils travaillèrent ensemble à Mostar et à Sarajevo, leur nom à l'époque signifiait le début du mouvement du « portrait de citoyen » et caractérisait une période dorée en Bosnie-Herzégovine.

La peinture de portrait a joué un rôle principal dans le travail créatif de Špiro Bocarić, notamment durant la période de 1906 à 1914, où il a beaucoup fait de portraits, sur commande ou d'après photographie.

Entre 1930 et 1941 Špiro Bocarić s'investit dans un travail muséal en Bosnie-Herzégovine, plus précisément à Banja Luka. Il essaya de développer de nombreuses activités muséologiques et de collecter l'immense richesse ethnographique de son peuple, conservée dans des maisons privées ou dans des villages. Il publia aussi le premier guide touristique de Banja Luka et la région de Vrbas et il s'est intéressé à la photographie (Source : Zlatni ramovi brace Bocarić-Dragana Ivanović).

Son tableau «Portrait du prêtre Čukarilo» («Portret popa Čukarila», figure 111) fait partie de collection de la Galerie nationale d'art à Sarajevo, d'où les échantillons ont été prélevés.



Figure 111 – L'oeuvre «Portret popa Čukarila», Špiro Bocarić

## Ilija Kurilić

Né le 12 avril en 1893 à Stolac (Bosnie-Herzégovine), mort le 22 juin 1941 à coté de Ljubinje (Bosnie-Herzégovine). Suite à certains problèmes politiques de l'époque il fut emprisonné en Hongrie, à Arad, où il dessina sur les murs. Lorsqu'il fut relâché, il revint à Stolac, où il peignit des portraits au charbon et des paysages à la peinture à l'huile. Il réalisa également des icônes et il semble qu'il exécuta aussi des fresques pour certaines églises de cette région, mais malheureusement aujourd'hui il n'existe pas de données fiables sur cette discipline. Ilija Kurilić fut grandement influencé par des peintres tchécoslovaques de la période de 1933 à 1938. Durant cette période plusieurs peintres tchécoslovaque vinrent à Stolac : Alojz Forajt, Marcel Krasicki et Jan Odra. Ilija a collecté de cette période environ quarante œuvres à l'huile sur toile, pour la préparation de sa propre première exposition qui aurait du se tenir en Tchécoslovaquie, mais cela ne s'est jamais réalisée, car à la même période la Tchécoslovaquie entra en guerre et tomba sous le siège des Allemandes.

D'après l'auteur de cette source, il existe une information selon laquelle Kurilic a exposé ses travaux à Sarajevo. Les tableaux collectés pour l'exposition prévue en Tchécoslovaquie ont disparus et leur localisation reste inconnue (Source: Stolaclook, autor Đorđe Đorđević). Le tableau «L'église» («Crkva», figure 112) d'où les échantillons ont été prélevés fait partie de collection de la Galerie nationale d'art à Sarajevo.



Figure 112 – L'oeuvre «Crkva», Ilija Kurilić

## Portraits

Deux échantillons de vernis ont été prélevés de deux tableaux dont les auteurs sont inconnus. Il s'agit des peintures représentant les portraits de deux homes et elles font partie de collection de la Galerie nationale d'art à Sarajevo (figures 113 et 114).



Figure 113 – Le portrait 1, l'artiste inconnu



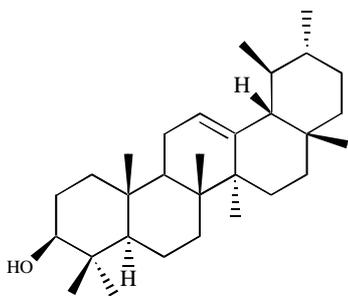
Figure 114 – Le portrait 2, l'artiste inconnu

# **Annexe 5**

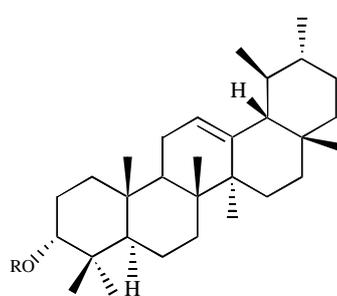
**Structures des molécules presentes dans les trois  
résines**

## Structures des molécules présentes dans les trois résines

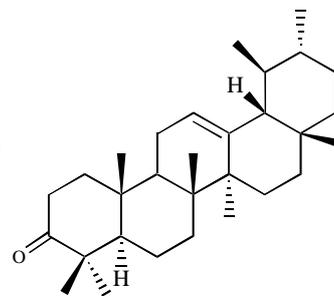
### Les ursanes et les oléananes



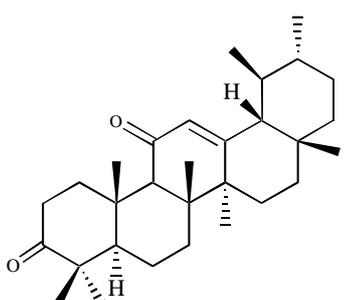
$\alpha$ -amyrine



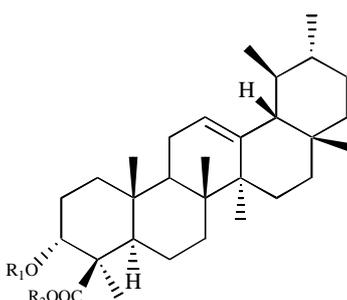
R = -H : 3-épi- $\alpha$ -amyrine  
R = -COCH<sub>3</sub> : dérivé acétylé



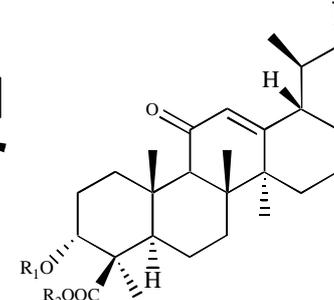
$\alpha$ -amyrénone



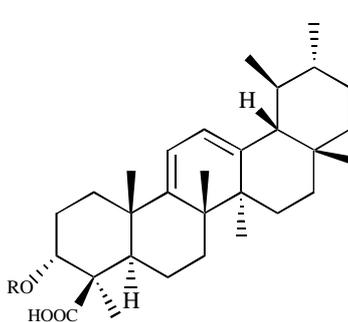
11-céto- $\alpha$ -amyrénone



R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = -H: Ac. $\beta$ -boswellique  
R<sub>1</sub> = -COCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = -H: acétate  
R<sub>1</sub> = -COCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = -CH<sub>3</sub>: ester méthylique de l'acétate  
R<sub>1</sub> = -H, R<sub>2</sub> = -CH<sub>3</sub>: ester méthylique

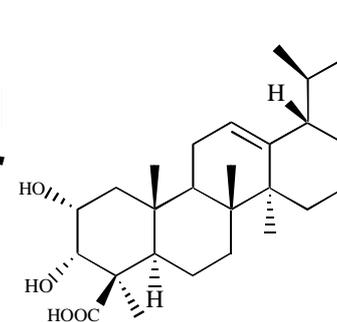


R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = -H: Ac.11-céto- $\beta$ -boswellique  
R<sub>1</sub> = -COCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = -H: acétate  
R<sub>1</sub> = -COCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = -CH<sub>3</sub>: ester méthylique de l'acétate  
R<sub>1</sub> = -H, R<sub>2</sub> = -CH<sub>3</sub>: ester méthylique

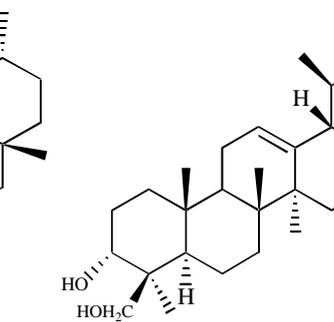


R = H: Ac. 3 $\alpha$ -hydroxy-urs-9,11-dièn-24-oïque

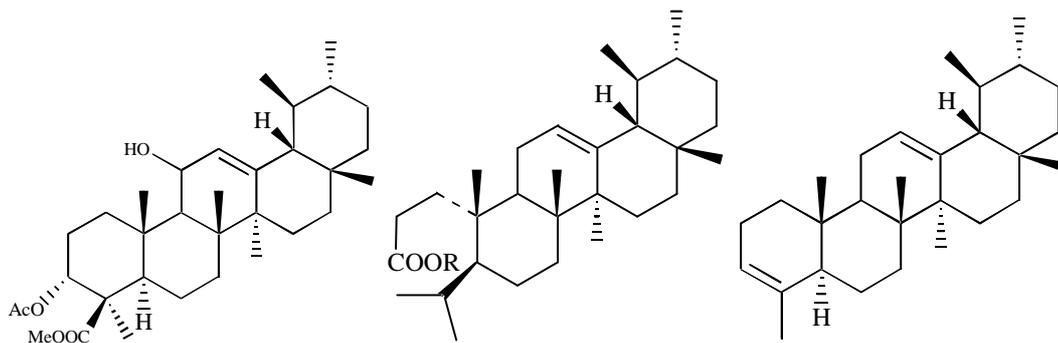
R = CH<sub>3</sub>CO: Ac. 3 $\alpha$ -acétoxy-urs-9,11-dièn-24-oïque



Ac. 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihydroxy-urs-9,12-dièn-24-oïque



urs-12-èn-3 $\alpha$ , 24-diol

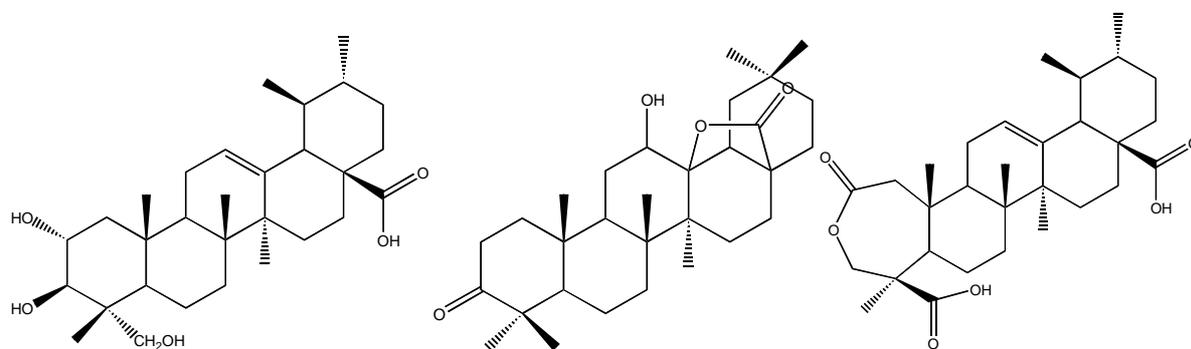


3 $\alpha$ -acétyl-11-méthoxy- $\beta$ -boswellique

R = -H: Ac. 4(23)-dihydroroburique

24-nor-urs-3,12-diène

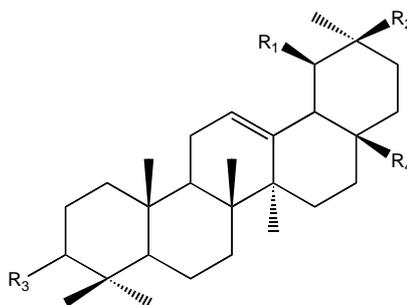
R = -CH<sub>3</sub>: ester méthylique correspondant



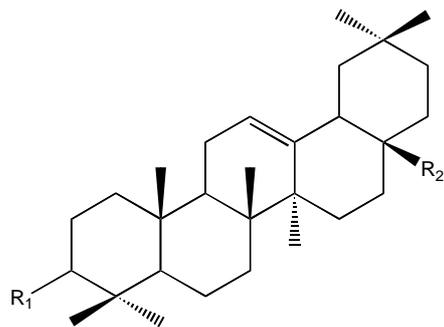
Acide asiatique

Lactone hydroxyoléanonique

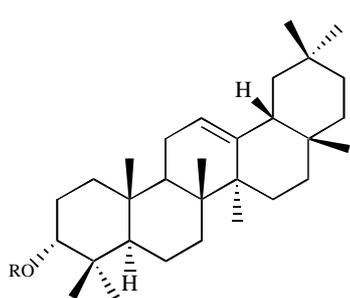
Ac. 23-hydroxy-2,3-sécours-12-ène-2,3,28-trioïque (2→23)- lactone



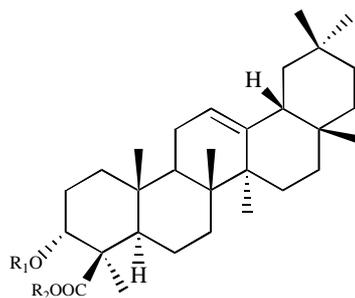
Composé	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
nor-oléanane (nor-ursane)	H/CH <sub>3</sub>	H/CH <sub>3</sub>	O	H
Aldéhyde oléanonique	H	CH <sub>3</sub>	O	CHO
Aldéhyde ursonique	CH <sub>3</sub>	H	O	CHO
Acide oléanolique	H	CH <sub>3</sub>	OH, H	COOH
Acide ursolique	CH <sub>3</sub>	H	OH, H	COOH
Acide oléanonique	H	CH <sub>3</sub>	O	COOH
Acide ursonique	CH <sub>3</sub>	H	O	COOH



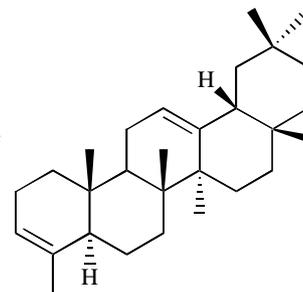
Composé	R1	R2
$\beta$ -amyrine	OH, H	CH <sub>3</sub>
$\beta$ -amyrone	O	CH <sub>3</sub>
Nor- $\beta$ -amyrine	OH, H	H
Nor- $\beta$ -amyrone	O	H
Nor-oléan-17 $\alpha$ -3-one	O	H
28-hydroxy- $\beta$ -amyrone	O	OH
Acide 18 $\alpha$ H-oléanonique	O	COOH
Gérmancol	OH, H	CH <sub>3</sub>
Acide moronique	O	COOH



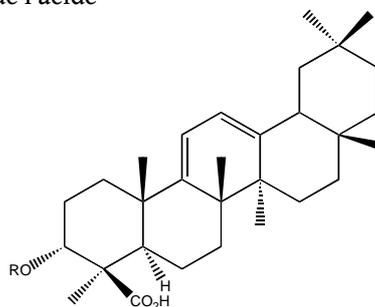
R = -H: 3-épi- $\beta$ -amyrine



R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = -H : Ac.  $\alpha$ -boswellique  
 R<sub>1</sub> = -COCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = -H : dérive acétylé  
 R<sub>1</sub> = -COCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = -CH<sub>3</sub> : ester méthylique  
 de l'acétate  
 R<sub>1</sub> = -H, R<sub>2</sub> = -CH<sub>3</sub> : ester méthylique  
 de l'acide



24-nor-oléan-3,12-diène



R = H: Ac. 3 $\alpha$ -hydroxy-oléan-9,11-dièn-24-oïque  
 R = CH<sub>3</sub>CO: Ac. 3 $\alpha$ -acétyl-hydroxy-oléan-9,11-dièn-24-oïque

Figure 115 – Les ursanes et oléananes présents dans l'oliban, la dammar et la mastic

## Les lupanes

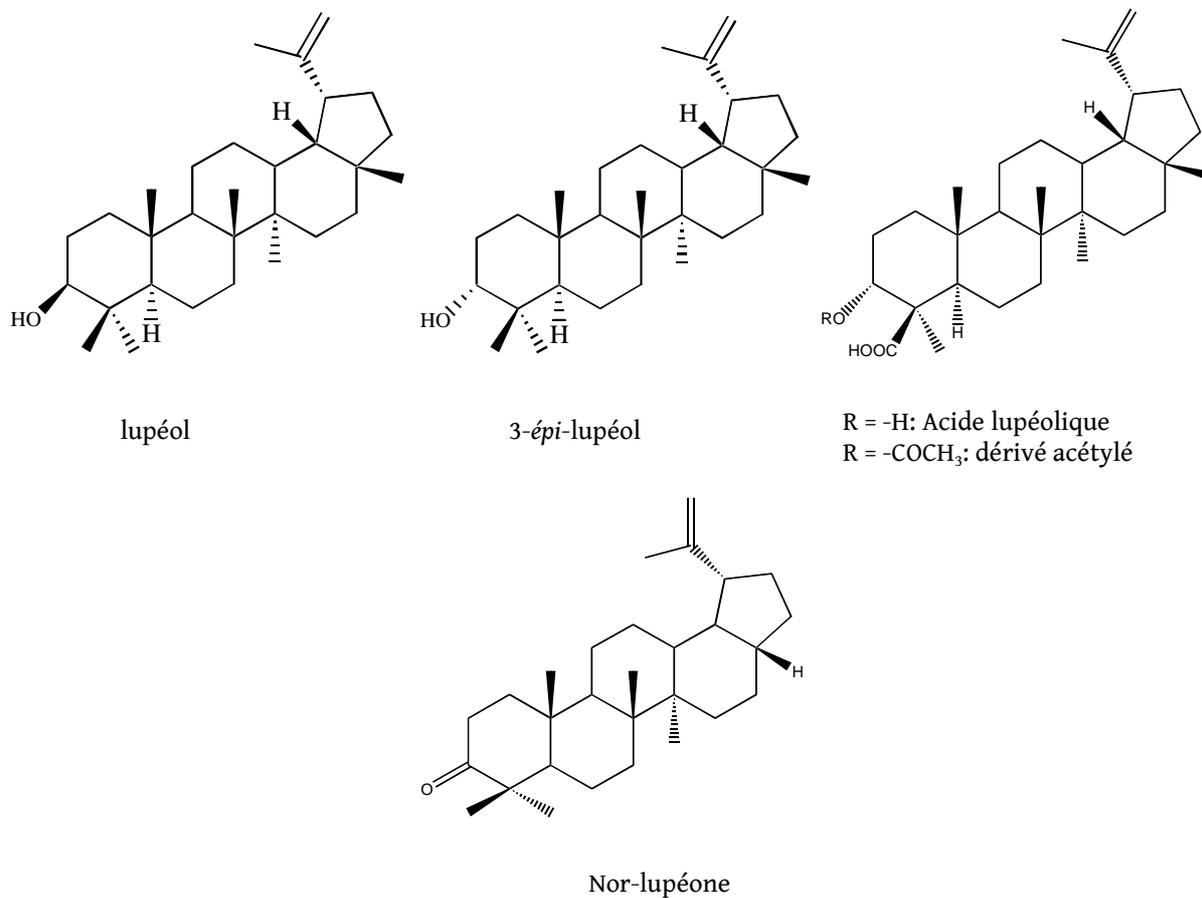
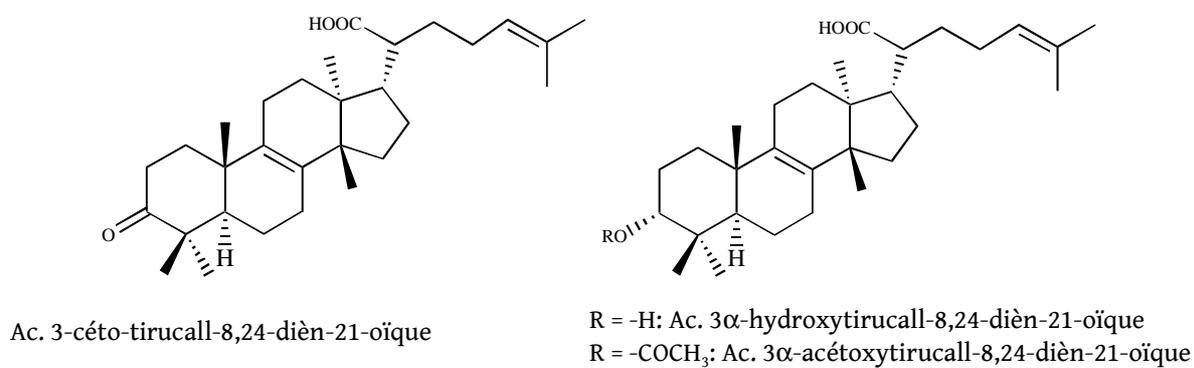
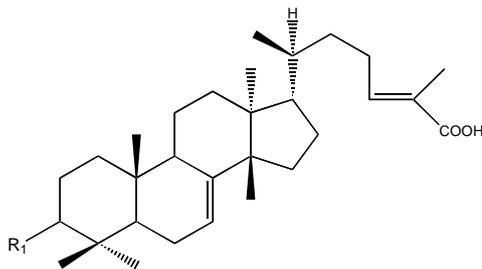
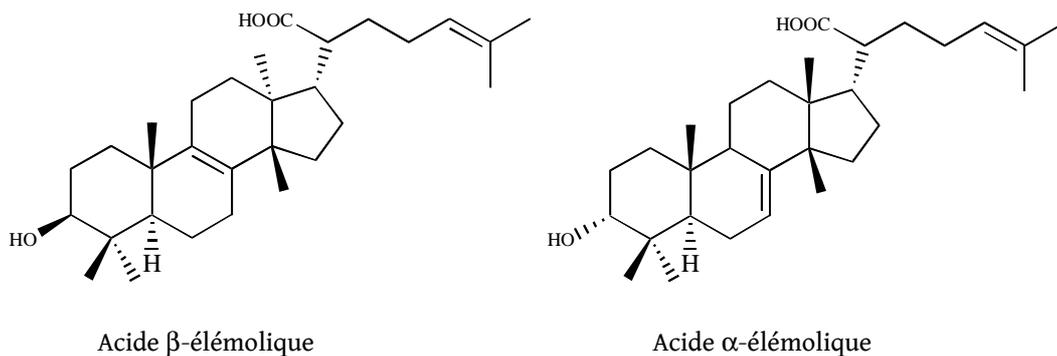


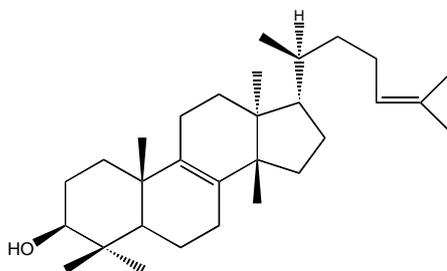
Figure 116 - Les lupanes présents dans l'oliban, la dammar et la mastic

## Les tirucallanes





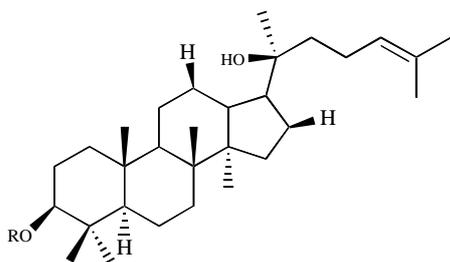
Composé	R1
Acide masticadiénonique	O
Acide isomasticadiénonique	O
Acide masticadiénolique	OH, H
Acide 3-épi-isomasticadiénolique	OH, H
Acide 3-O-acétyle-2-épi-masticadiénolique	CH <sub>3</sub> COO
Acide 3-O-acétyle-2-épi-isomasticadiénolique	CH <sub>3</sub> COO



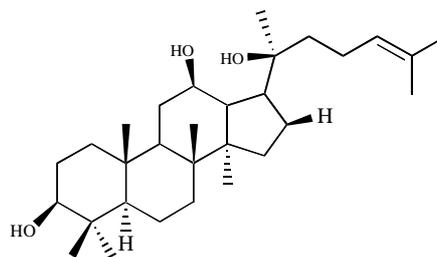
Tirucallol

Figure 117 – Les tirucallanes présents dans l'oliban, la dammar et la mastic

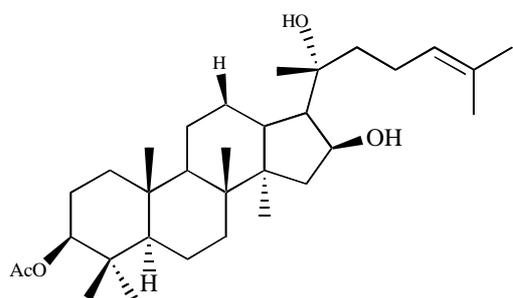
## Les dammaranes



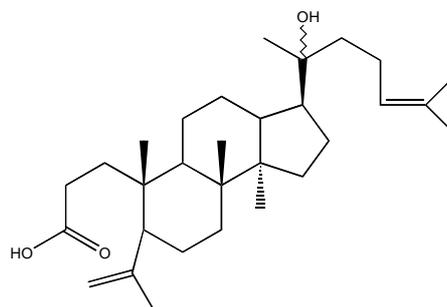
R = -H: 3β,20(S)-dihydroxydammar-24-ène



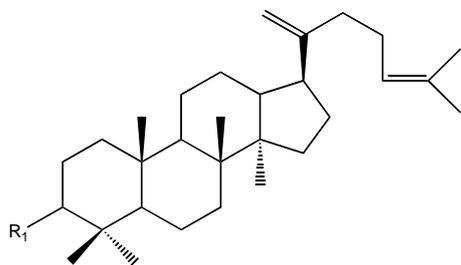
20(S)-protopanaxadiol



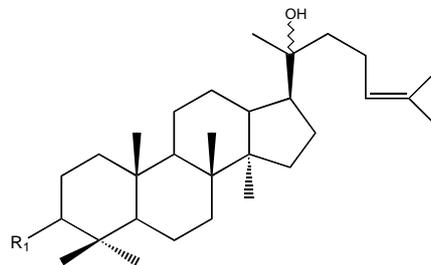
3β-acetoxy-16(S),20(R)-dihydroxydammar-24-ène



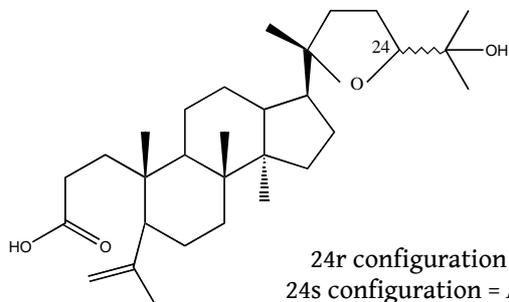
Acide dammarénolique



R = -OH: dammaradiénole  
R = O: dammaradiénone



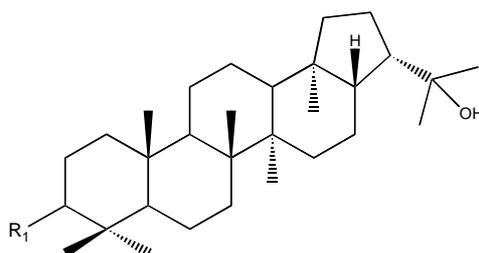
R = O: hydroxydammarénone  
R = CH<sub>3</sub>COO: 3-acétoxy-  
hydroxydammarénone  
R = -OH: dammarénediole



24r configuration = Ac. shoréique  
24s configuration = Ac. eïchlérianique

Figure 118 – Les dammaranes présents dans l'oliban, la dammar et la mastic

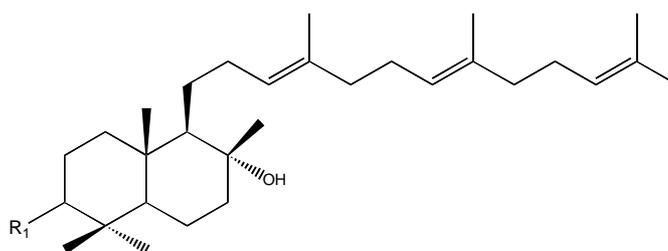
## Les hopanes



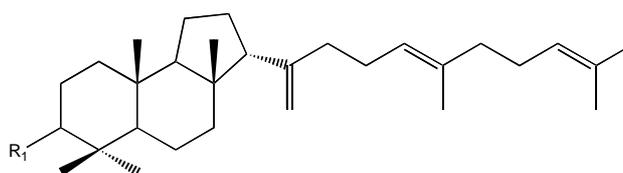
Composé	R <sub>1</sub>
Hydroxyhopanone	O
3-acétoxy-22-hydroxyhopanone	CH <sub>3</sub> COO

Figure 119 – Les hopanes présents dans l’oliban, la dammar et la mastic

## Les tritérpènes bi- et tricycliques



Composé	R1
(3L, 8R)-3,8-dihydroxypolypoda-13E, 17E, 21-triène	OH, H
(8R)-3-oxo-8-hydroxypolypoda-13E, 17E, 21-triène	O



Composé	R1
3-hydroxy-malabarica14(26), 17E, 21-triène	OH, H
3-oxo-malabarica-14(26), 17E, 21-triène	O

Figure 120 – Les tritérpènes bi- et tricycliques présents dans l’oliban, la dammar et la mastic

## Résumé

Ce travail porte principalement sur l'étude de la partie triterpénique de trois résines végétales naturelles et commercialement disponibles, l'oliban, la dammar et la mastic, par diverses techniques analytiques (IRTF, CLHP/UV, CLHP/UV/Fluorimétrie et CPG-SM). Une étude fluorimétrique a été réalisée sur ces trois résines *via* réaction de greffage d'un marqueur de fluorescence (chlorure de dansyle), ce qui a permis de détecter les molécules triterpéniques par fluorimétrie, de diminuer leur seuil de détection et d'obtenir une empreinte digitale fluorimétrique spécifique pour chaque résine étudiée. Ce protocole a été appliqué avec succès sur un échantillon archéologique (G14) et le matériel résineux a été identifié (résine oliban, espèce *B. frereana*). La partie triterpénique a été extraite par divers procédés d'extraction (le reflux, le Soxhlet et les ultrasons) en utilisant trois différents solvants (le méthanol, le n-hexane et le d-limonène) dans le but de déterminer les conditions optimales pour l'extraction et l'identification des molécules triterpéniques par CLHP/UV. Deux colonnes de phase inverse ont été testées dans ce travail : une colonne classique RP-18 (Merck) et une colonne «core-shell» Kinetex (Phenomenex) pour essayer d'optimiser les conditions d'analyse. La colonne Kinetex a permis une diminution de temps d'analyse de 73% pour l'oliban et de 70% pour la dammar et la mastic, ce qui représente un résultat très encourageant. Le protocole optimisé a été appliqué avec succès sur l'échantillon archéologique G12 supposé contenir de la mastic, ce qui a été confirmé par les analyses CLHP/UV et CPG-SM. Une étude quantitative de rendement et d'aire relative du pic a été également réalisée. Les extraits ont été analysés par CLHP/UV et CPG-SM. Pour l'analyse en CPG-SM, la préparation des échantillons a été faite à travers la formation des dérivés TMS (triméthylsilylés) dans le but de créer une base de données de dérivés TMS pour les résines dammar et mastic. L'identification des composés caractérisés dans ce travail a été faite selon la littérature spécialisée, les  $t_r$  et les spectres UV correspondants. Le d-limonène, un solvant «vert», a été utilisé pour la première fois pour l'extraction de ce genre de matériaux, à notre connaissance et il permet une formation directe des dérivés TMS, en présence de solvant d'extraction. Au même temps, sept échantillons artistiques supposés contenir un vernis à base d'une résine naturelle, en provenance de la Galerie Nationale de Sarajevo (Bosnie-Herzégovine) ont été analysés et seulement pour un de ces sept échantillons, il a été mis en évidence la présence d'une gomme-résine naturelle. L'étude scientifique des échantillons bosniens agrandira la documentation sur l'Art et sur le patrimoine culturel de Bosnie-Herzégovine, qui rencontre un période difficile depuis la dernière guerre (1992-1995).

**Mots-clés:** résines naturelles végétales, oliban, dammar, mastic, triterpènes, extraction, reflux, Soxhlet, ultrasons, d-limonène, CLHP/UV, Fluorimétrie, CPG-SM, colonne Kinetex, échantillon archéologique, échantillon artistique, patrimoine culturel de Bosnie-Herzégovine.

## Abstract

This work is focused on the study of triterpene part of three natural plant resins commercially available, olibanum (frankincense), dammar and mastic, by various analytical techniques (FTIR, HPLC / UV, HPLC / UV / Fluorimetry and GC -MS). A fluorimetric study was conducted on these three resins *via* grafting reaction of a fluorescent marker (dansyl chloride), which allowed to detected triterpene molecules by fluorimetry, decreasing their detection threshold and to obtain a specific fluorimetric fingerprint for each studied resin. This protocol has been successfully applied on an archaeological sample (G14) and the resinous material has been identified (the olibanum resin, the species *B. frereana*). A triterpenic fraction was extracted by various extraction procedure (reflux, Soxhlet and ultrasounds) using three different solvents (methanol, n-hexane, and d-limonene) in order to determine the optimal conditions for the extraction and identification of triterpenic molecules by HPLC / UV. Two reversed phase columns were tested in this work: a classical column RP-18 (Merck) and column «core-shell» Kinetex (Phenomenex) to try to optimize the analysis conditions. Kinetex column has allowed a reduction of analysis time to 73% for analyses of olibanum and to 70% for analyses of dammar and mastic resin, and this is a very encouraging result. The optimized protocol was successfully applied on the archaeological sample G12, which was supposed to contain mastic resin and this hypothesis was confirmed by HPLC/UV and GC-MS analysis. A quantitative study of performance and the relative area of the peaks were also performed. The extracts were analyzed by HPLC / UV and GC-MS. Concerning GC-MS analysis, sample preparation was done through formation of TMS derivatives (trimethylsilyl) with the aim of creating a database of TMS derivatives for dammar and mastic resins. The identification of compounds characterized in this work was done according to the literature, and corresponding  $t_r$  et UV spectra. D-limonene, one of «green» solvents, has been used for the first time for the extraction of these materials, according to our knowledge and it allows a direct formation of TMS derivatives in the presence of extraction solvent. At the same time, seven artistic samples supposed to contain a varnish based on a natural resin from the National Gallery of Sarajevo (Bosnia and Herzegovina) were analyzed and for only one of these seven samples we found the presence of a natural gum resin. The scientific study of Bosnian samples expands the scientific documentation in art and cultural heritage of Bosnia and Herzegovina, which encounters a difficult period after the last war (1992-1995).

**Keywords:** natural plant resins, olibanum, frankincense, dammar, mastic, triterpenic molecules, extraction, reflux, Soxhlet, ultrasound, d-limonene, HPLC / UV, Fluorimetry, GC-MS, Kinetex column, archaeological sample, artistic sample, cultural heritage of Bosnia and Herzegovina.