Chapitre 26

Les lipides de l'os : un nouveau proxy des régimes alimentaires

Martine Regert
Uniersité Nice Sophia Antipolis, CNRS, CEPAM, UMR 7264, 06300 Nice, France.

26.1 Introduction

Au sein de la fraction organique de l'os, ce sont majoritairement les protéines, et en particulier le collagène, qui ont été étudiés en archéologie, que ce soit pour répondre à des objectifs de datation (^{14}C, racémisation des acides aminés), de reconstitution des régimes alimentaires à l'aide des valeurs de δ^{13}C et de δ^{15}N ou dans le cadre d'approches paléogénétiques (ADN). Or, les os contiennent également des lipides, même si c'est en quantité plus réduite que le collagène. Le caractère hydrophobe des constituants de cette famille chimique, ainsi que la diversité de leurs squelettes hydrogéno-carbonés, en font des marqueurs moléculaires de choix qui se conservent relativement bien dans les sédiments anciens [1]. En contexte archéologique, leur recherche depuis une vingtaine d'années au sein de la matrice sédimentaire [2] et surtout dans la paroi poreuse des récipients en céramique [3-6], a montré qu'ils étaient porteurs d'informations ouvrant la voie à une meilleure compréhension de l'histoire des produits de la ruche sur le temps long [7], à l'étude des produits laitiers [8, 9] et plus largement des matières grasses animales [10] ou encore à celle des substances végétales [11-13] pendant la préhistoire et les périodes historiques.

Dans cette mouvance de la caractérisation moléculaire et isotopique des lipides dans des substrats archéologiques, une équipe anglaise a cherché, dans le courant des années 1990 et 2000, à extraire les lipides non polaires de l'os (*i.e.* sans recherche des phospholipides) afin d'en déterminer le potentiel informatif, notamment en termes de contribution à la reconstitution des régimes alimentaires [14-21]. Nous détaillons dans ce chapitre les résultats de ces investigations, en insistant sur les perspectives désormais ouvertes par ces recherches innovantes.

26.2 Les lipides conservés dans les ossements archéologiques

Malgré la mention dès les années 1960 de la conservation possible de lipides dans des os fossiles [22, 23], ce n'est que dans les années 1990 que les premiers essais pour les extraire ont été publiés. Grâce à la mise en place d'un protocole de préparation des échantillons et d'analyse adapté, la quantité et la nature des constituants biomoléculaires conservés ont pu être déterminées par chromatographie en phase gazeuse et couplage avec la spectrométrie de masse [14]. Dans un second temps, les valeurs de $\delta^{13}C$ du principal biomarqueur détecté, à savoir le cholestérol, ont été déterminées par GC-C-IRMS (*gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry*) [15-18] sur une série de spécimens archéologiques. Par la suite, des études fines, basées sur des expérimentations de nourrissage contrôlé d'animaux domestiques, ont permis, d'une part, d'obtenir des précisions sur le *turnover* du cholestérol et, d'autre part, de préciser la part du bol alimentaire à l'origine de l'incorporation ou de la biosynthèse du cholestérol dans les tissus osseux [19-21]. L'ensemble de ces travaux a abouti à montrer que le cholestérol, en complément du collagène et de la bioapatite de l'os, pouvait être considéré comme un nouvel indicateur des régimes alimentaires des populations du passé.

26.2.1 Considérations expérimentales

Toute la difficulté de l'opération consiste à pouvoir extraire d'une matrice organo-minérale complexe et dégradée une infime quantité de lipides. Pour ce faire, le protocole mis en place consiste à prélever une quantité de l'ordre de quelques grammes (typiquement 1,8 à 2,6 g selon les cas) d'un ossement, de broyer l'échantillon puis d'extraire la fraction lipidique à l'aide de solvants organiques [14]. Après dérivation par triméthysilylation, l'extrait lipidique total est analysé en chromatographie en phase gazeuse (CPG) dans des conditions appropriées. Cette étape analytique permet de séparer les différents constituants moléculaires du mélange et de les quantifier grâce à l'ajout initial, en quantités connues, de standards internes idoines. Si nécessaire, une seconde analyse par couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG-SM) permet de déterminer la formule chimique de chacune des molécules séparées en CPG.

D'un point de vue méthodologique, il a par ailleurs été nécessaire de s'assurer : (i) que les constituants détectés, quantifiés et identifiés provenaient bien de la matrice osseuse elle-même et non des sédiments ; (ii) qu'aucune contamination n'était liée aux procédures de laboratoire ; (iii) que les composés considérés avaient une distribution homogène dans les différentes parties d'un même os mais aussi au sein des différents ossements et des dents constituant un squelette. Pour ce faire, les premières études ont pris en considération les lipides extraits de la matrice sédimentaire [14] et les lipides ont été extraits de différentes parties d'un fémur [15], de diverses dents [16] et de différents ossements [15]. La composition lipidique ainsi que les valeurs de $\delta^{13}C$ des molécules détectées ont alors pu être comparées en fonction des échantillons étudiés et il a été montré que les lipides obtenus étaient bien issus de l'os lui-même et que les données étaient homogènes au sein d'un os et entre les différentes parties d'un individu.

En ce qui concerne les valeurs de $\delta^{13}C$ des molécules étudiées, elles ont été déterminées par GC-C-IRMS en tripliquant systématiquement les mesures, et la précision obtenue était de l'ordre de 0,3 à 0,4 ‰ [15, 16].

26.2.2 Les constituants lipidiques identifiés

Dès les premières analyses réalisées sur des ossements de contextes et de d'âges variés (Paléolithique supérieur, Mésolithique, Néolithique, Antiquité, Moyen Âge) provenant de différentes espèces (cheval, cochon, vache, humain), il s'est avéré que des lipides étaient systématiquement conservés [14]. Si dans les os contemporains, les triglycérides dominent le signal, c'est le cholestérol qui est généralement le composant majoritaire des échantillons archéologiques. L'absence ou la faible quantité des triglycérides, sensibles au phénomène d'hydrolyse, s'explique par des processus d'altération post-dépositionnels. Le cholestérol est généralement accompagné d'un cortège de produits de dégradation résultant de phénomènes de réduction microbienne (3b-hydroxy-cholest-5-en-7-one) ou d'oxydation (5a- et 5b-cholestanol) comme le montre la Figure 1, ou encore de marqueurs bactériens (hopan-22-ene). Des acides gras saturés ($C_{12:0}$, $C_{14:0}$, $C_{16:0}$ et $C_{18:0}$) et insaturé ($C_{18:1}$) sont aussi présents en quantités variables [14, 15]. Sans surprise, c'est dans les dents que le cholestérol se conserve le mieux [16].

Les quantités de lipides extraits varient de quelques dizaines à une centaine de microgrammes par gramme d'os sec, la concentration en cholestérol variant de quelques microgrammes à quelques dizaines de microgrammes par gramme [14]. La quantité de cholestérol nécessaire pour procéder à une mesure du $\delta^{13}C$ étant de l'ordre de 50 ng, ces quantités se sont révélées suffisantes pour des analyses isotopiques [16].

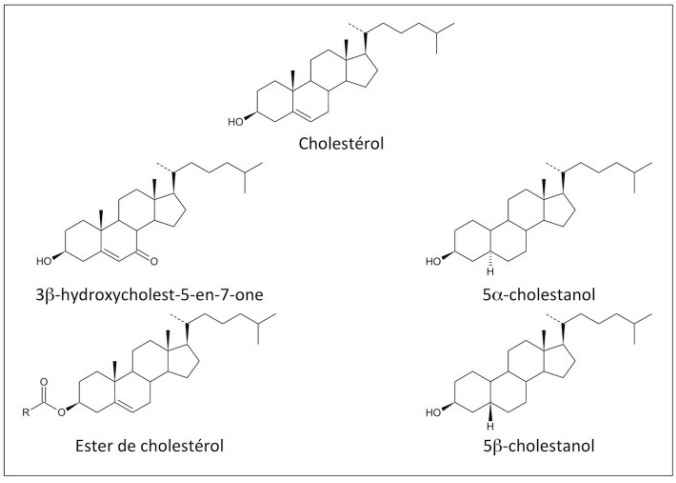


Figure 1 – Formules chimiques des principaux constituants moléculaires identifiés dans la fraction lipidique d'ossements archéologiques. D'après [15].

26.3 Les lipides de l'os, support d'information sur les régimes alimentaires

La potentialité d'un constituant moléculaire ou d'un élément chimique à être utilisé comme marqueur biogéochimique des régimes alimentaires des populations du passé dépend de plusieurs facteurs : (i) la part du bol alimentaire à l'origine de l'incorporation ou de la biosynthèse des marqueurs considérés ; (ii) les processus biosynthétiques mis en jeu et (iii) le *turnover* des biomarqueurs utilisés. Ainsi, plus ce *turnover* est faible, plus les informations obtenues correspondent à une longue période de la vie de l'individu et plus il est difficile de percevoir des changements ténus ou rapides de régimes alimentaires au cours du temps. Un marqueur ne fournit donc généralement qu'une vision partielle des aliments consommés. L'exploitation conjointe de plusieurs marqueurs complémentaires constitue un atout majeur pour améliorer la résolution des informations obtenues.

En particulier, le collagène, dont les valeurs de $\delta^{13}C$ et $\delta^{15}N$ sont utilisées depuis plus d'une trentaine d'années pour reconstituer les diètes de nos ancêtres ou de différentes espèces animales, donne essentiellement une image de l'alimentation protéique et exclut donc une bonne partie des glucides et des lipides ingérés [21]. Le cholestérol, qui peut se conserver pendant des millénaires dans des ossements, est majoritairement issu des glucides et des lipides ; son *turnover* est par ailleurs plus élevé que celui du collagène. C'est donc un candidat de choix pour venir compléter le signal alimentaire déterminé jusqu'à présent principalement à partir du collagène de l'os.

26.3.1 Relations entre les valeurs $\delta^{13}C$ des constituants de l'os et les régimes alimentaires

Les relations entre les valeurs des $\delta^{13}C$ des constituants de l'os et les régimes alimentaires ont en large partie été établies sur la base d'expérimentations de nourrissage contrôlé d'animaux ainsi que sur la connaissance des processus d'incorporation et de biosynthèse des marqueurs considérés au sein des tissus osseux [19-21].

Ces expérimentations ont montré que :

- les valeurs de $\delta^{13}C$ du collagène sont majoritairement liées à l'alimentation protéique ;

- les valeurs de $\delta^{13}C$ du cholestérol, de même que celles de la bioapatite, fournissent des indications plus globales sur les régimes alimentaires englobant aussi l'apport lipidique et glucidique ;

- le *turnover* du cholestérol est plus important que celui du collagène et de la fraction minérale de l'os.

Pour ce dernier point, le *turnover* a été estimé en mesurant les valeurs de $\delta^{13}C$ des constituants de l'os au cours d'un changement de régime alimentaire contrôlé chez des rats : nourris pendant 91 jours uniquement par un régime à base de plantes en C_3, leur alimentation a ensuite été modifiée pour ne plus reposer que sur des plantes en C_4. Après seulement 40 jours de ce nouveau régime alimentaire, le $\delta^{13}C$ du cholestérol

avait augmenté de 7,3 ‰, alors que pendant le même temps, les valeurs de $\delta^{13}C$ du collagène et de la fraction minérale de l'os ne s'étaient enrichies que de 0,7 et 1,0 ‰ respectivement.

26.3.2 Applications archéologiques

À l'heure actuelle, l'exploitation du *proxy* cholestérol comme indicateur des régimes alimentaires a concerné deux populations médiévales des sites de Barton-on-Humber et Abingdon Vineyard en Angleterre [15-17] ainsi que quelques sujets mésolithiques [17]. Pour les sites médiévaux, il s'agissait de comparer le régime alimentaire de populations ayant vécu près de la mer (Barton-on-Humber) et à l'intérieur des terres (Abingdon Vineyard), mais aussi d'évaluer la complémentarité des signaux obtenus à partir du collagène et du cholestérol (Figure 2).

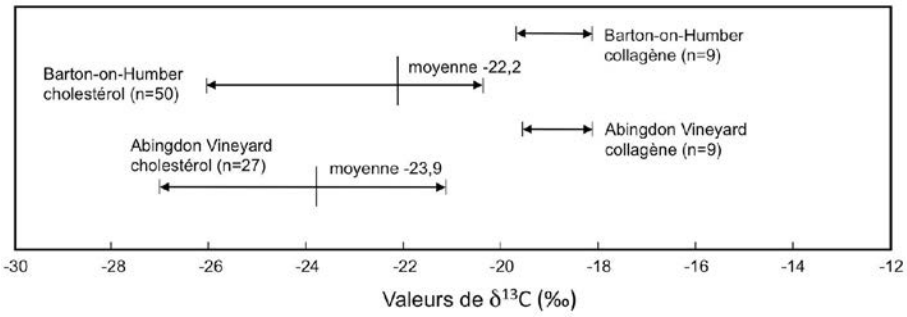


Figure 2 – Comparaison des valeurs de $\delta^{13}C$ obtenues sur le collagène et le cholestérol d'ossements archéologiques provenant de deux sites médiévaux britanniques, l'un situé sur la côte (Barton-on-Humber) et l'autre à l'intérieur des terres (Abingdon Vineyard). D'après [17].

Sur le site de Barton-on-Humber, le $\delta^{13}C$ a été mesuré sur du cholestérol (concentration comprise entre 9 et 396 $mg.g^{-1}$ d'os sec) extrait du fémur de 50 individus [15]. Dans la majorité des cas, les valeurs obtenues étaient de l'ordre de –23 ‰, avec un spectre toutefois relativement large de valeurs puisque certains individus présentaient un $\delta^{13}C$ du cholestérol de –20 ‰ et d'autres de –26 ‰ [15]. Pour comparaison, la valeur de $\delta^{13}C$ du cholestérol chez des cochons nourris à base de régimes reposant uniquement sur des céréales en C_3 est de l'ordre de –28 ‰ [15]. Le cholestérol de la population considérée apparaît donc globalement enrichi en ^{13}C. À une époque où aucune plante en C_4 ne poussait sur les îles britanniques, cet enrichissement ne peut être lié à qu'à une alimentation reposant en partie sur les produits de la mer. Cette première étude a donc clairement montré que le cholestérol était un indicateur intéressant pour distinguer régime marin de régime terrestre. La comparaison des données obtenues pour cette population côtière avec celles de la population vivant à l'intérieur des terres à Abingdon Vineyard a montré que le $\delta^{13}C$ moyen pour Barton-on-Humber était plus élevé que pour Abingdon Vineyard, indiquant un enrichissement en ^{13}C pouvant être attribué à une plus forte consommation des produits de la mer [17]. En revanche, une telle différence entre les deux populations n'était pas perceptible à partir des données sur le collagène (Figure 2). Enfin, des valeurs sur le cholestérol de l'ordre de –20 ‰ ont été déterminées pour deux indivi-

dus mésolithiques mettant en évidence un régime alimentaire largement fondé sur l'exploitation de l'écosystème marin et côtier [17].

26.4 Conclusion

Ce chapitre, basé sur les recherches menées par l'équipe de Richard Evershed à Bristol et de ses collaborateurs [14, 21], montre comment le cholestérol est devenu un nouveau *proxy* permettant d'appréhender les régimes alimentaires à partir de la détermination de la valeur du $\delta^{13}C$ dans ce constituant. Contrairement au collagène qui est essentiellement relié à l'alimentaire protéique, le cholestérol rend en effet mieux compte de la diversité des différents aliments ingérés qu'ils soient de nature lipidique, glucidique, voire protéique. En outre, son *turnover* plus élevé que celui du collagène en fait un bon indicateur de variations ténues ou rapides des régimes alimentaires.

Ces découvertes récentes devraient maintenant permettre l'utilisation de ce nouvel indicateur de paléodiète en combinaison avec les données fournies par le collagène et la bioapatite, mais il sera essentiel de mettre en œuvre ces approches complémentaires de façon raisonnée, notamment en ce qui concerne les prélèvements nécessaires aux analyses. Toutes ces méthodes étant destructives, une démarche déontologique visant à la meilleure économie possible du fossile, sera en effet primordiale pour préserver au mieux les ossements fossiles nous étant parvenus.

Bibliographie

[1] G. Eglinton, G. A. Logan, Molecular preservation. Philosophical Transactions of the Royal Society.B 333 (1268), 315-328, 1991.

[2] P. H. Bethell, L. J. Goad, R. P. Evershed, The study of molecular markers of human activity : the coprostanol in the soil as an indicator of human faecal material. Journal of Archaeological Science.21, 619-632, 1994.

[3] R. P. Evershed, C. Heron, L. J. Goad, Analysis of organic residues of archaeological origin by high-temperature gas chromatography/mass spectrometry. Analyst.115 (10), 1339-1342, 1990.

[4] R. P. Evershed, H. R. Mottram, S. N. Dudd, S. Charters, A. W. Stott, G. J. Lawrence, A. M. Gibson, A. Conner, P. W. Blinkhorn, V. Reeves, New criteria for the identification of animal fats preserved in archaeological pottery. Naturwissenschaften.84, 402-406, 1997.

[5] S. N. Dudd, R. P. Evershed, A. M. Gibson, Evidence for varying patterns of exploitation of animal products in different prehistoric pottery traditions based on lipids preserved in surface and absorbed residues. Journal of Archaeological Science.26, 1473-1482, 1999.

[6] M. Regert, Elucidating pottery function using a multi-step analytical methodology combining infrared spectroscopy, mass spectrometry and chromatographic procedures. British Archaeological Reports. S1650, 61-76, 2007.

[7] M. Regert, Des chasseurs de miel néolithiques aux sculpteurs du xix^{e} siècle : une histoire des produits de la ruche et des cires revisitée par la chimie. Actualité chimique. 318, 52-57, 2008.

[8] R. P. Evershed, S. Payne, A. G. Sherratt, M. S. Copley, J. Coolidge, D. Urem-Kotsu, K. Kotsakis, M. Özdoğan, A. E. Özdoğan, O. Nieuwenhuyse, P. M. M. G. Akkermans, D. Bailey, R.-R. Andeescu, S. Campbell, S. Farid, I. Hodder, N. Yalman, M. Özbaşaran, E. Biçakci, Y. Garfinkel, T. Levy, M. M. Burton, Earliest date for milk use in the Near East and southeastern Europe linked to cattle herding. Nature. 455, 528-531, 2008.

[9] M. Salque, P. I. Bogucki, J. Pyzel, I. Sobkowiak-Tabaka, R. Grygiel, M. Szmyt, Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium BC in northern Europe. Nature. 493, 522-525, 2012.

[10] M. Regert, Analytical strategies for discriminating archaeological fatty substances from animal origin. Mass Spectrometry Reviews.30 (2), 177-220, 2011.

[11] M. Regert, N. Garnier, O. Decavallas, C. Cren-Olivé, C. Rolando, Structural characterization of lipid constituents from natural substances preserved in archaeological environments. Measurement Science and Technology. 14, 1620-1630, 2003.

[12] M. Regert, S. Vacher, C. Moulherat, O. Decavallas, Study of adhesive production and pottery function during Iron Age at the site of Grand Aunay (Sarthe, France). Archaeometry. 45, 101-120, 2003.

[13] M. Regert, T. Devièse, A.-S. Le Hô, A. Rougeulle, Reconstructing ancient Yemeni commercial routes during the Middle-Ages using structural characterisation of terpenoid resins. Archaeometry. 50, 668-695, 2008.

[14] R. P. Evershed, G. Turner-Walker, R. E. M. Hedges, N. Tuross, A. Leyden, Preliminary results for the analysis of lipids in ancient bones. Journal of Archaeological Science. 22, 277-290, 1995.

[15] A. W. Stott, R. P. Evershed, $\delta^{13}C$ analysis of cholesterol preserved in archaeological bones and teeth. Analytical Chemistry. 68, 4402-4408, 1996.

[16] A. W. Stott, R. P. Evershed, N. Tuross, Compound-specific approach to the $\delta^{13}C$ analysis of cholesterol in fossil bones. Organic Geochemistry. 26 (1/2), 99-103, 1997.

[17] A. W. Stott, R. P. Evershed, S. Jim, V. Jones. Cholesterol as a new source of palaeodietary information : experimental approaches and archaeological applications. Journal of Archaeological Science. 26, 705-716, 1999.

[18] S. Jim, A. W. Stott, R. P. Evershed, J. M. Rogers, S. H. Ambrose, Animal feeding experiments in the development of cholesterol as a palaeodietary indicator. British Archaeological Reports.S939, 68-77, 2001.

[19] M. R. Howland, L. T. Corr, S. M. M. Young, V. Jones, S. Jim, N. J. van der Merwe, A. D. Mitchell, R. P. Evershed, Expression of the dietary isotope signal in the compound-specific $\delta^{13}C$ values of pig bone lipids and amino acids. International Journal of Osteoarchaeology. 13, 54-65, 2003.

[20] S. Jim, S. H. Ambrose, R. P. Evershed, Natural abundance stable carbon isotope evidence for the routing and *de novo*synthesis of bone FA and cholesterol. Lipids. 38 (2), 179-186, 2003.

[21] S. Jim, S. H. Ambrose, R. P. Evershed, Stable carbon isotopic evidence for differences in the dietary origin of bone cholesterol, collagen and apatite : Implications for their use in palaeodietary reconstruction. Geochimica et Cosmochimica Acta. 68 (1), 61-72, 2004.

[22] S. K. Das, A. R. Doberenz, R. W. G. Wyckoff, The lipids in fossils. Comparative Biochemistry and Physiology. 23, 519-525, 1967.

[23] J. M. Everts, A. R. Doberenz, R. W. G. Wyckoff, Fatty acids in fossil bones. Comparative Biochemistry and Physiology. 26, 955-962, 1968.