

- SCHLÄPPI, D., KETTLER, N., STRAUB, L., GLAUSER, G. & NEUMANN, P. 2020. Long-term effects of neonicotinoid insecticides on ants. *Communications Biology* 3(1): 335. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-1066-2>
- SHAHID, N., BECKER, J. M., KRAUSS, M., BRACK, W. & LIESS, M. 2018. Pesticide body burden of the crustacean *Gammarus pulex* as a measure of toxic pressure in agricultural streams. *Environmental Science & Technology* 52(14): 7823–7832. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01751>
- SIMON-DELISO, N., AMARAL-ROGERS, V., BELZUNCES, L. P., BONMATIN, J. M., CHAGNON, M., DOWNS, C., FURLAN, L., GIBBONS, D. W., GIORIO, C., GIROLAMI, V., GOULSON, D., KREUTZWEISER, D. P., KRUPKE, C. H., LIESS, M., LONG, E., MCFIELD, M., MINEAU, P., MITCHELL, E. A. D., MORRISSEY, C. A., ... WIEMERS, M. 2015. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research International* 22(1): 5–34. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3470-y>
- SUR, R. & STORK, A. 2003. Uptake, translocation and metabolism of imidacloprid in plants. *Bulletin of Insectology* 56: 35–40.
- TENNEKES, H. A. & SANCHEZ-BAYO, F. P. 2011. Time-dependent toxicity of neonicotinoids and other toxicants: Implications for a new approach to risk assessment. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology* 01(S4). <https://doi.org/10.4172/2161-0525.S4-001>
- TOMIZAWA, M. & CASIDA, J. E. 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of selective action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45: 247–268. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930>
- TOMIZAWA, M. & CASIDA, J. E. 2011. Neonicotinoid insecticides: Highlights of a symposium on strategic molecular designs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(7): 2883–2886. <https://doi.org/10.1021/jf103856c>
- VAN DEN BRINK, P. J., VAN SMEDEN, J. M., BEKELE, R. S., DIERICK, W., DE GELDER, D. M., NOTEBOOM, M. & ROESSINK, I. 2016. Acute and chronic toxicity of neonicotinoids to nymphs of a mayfly species and some notes on seasonal differences. *Environmental Toxicology and Chemistry* 35(1): 128–133. <https://doi.org/10.1002/etc.3152>

WEBOGRAPHY

- BAYER CROPS SCIENCE AG. n.d. *Synergistic insecticide mixtures patent*. Retrieved February 3, 2020, from <https://patents.google.com/patent/US20090215760A1/en>
- OFFICE FÉDÉRAL DE L'AGRICULTURE. 2018. *Décision de portée générale sur l'interdiction d'utiliser certains produits phytosanitaires (4924)*. Retrieved February 25, 2020, from <https://www.admin.ch/opc/fr/federal-gazette/2018/4924.pdf>
- OFFICE FÉDÉRAL DE L'ENVIRONNEMENT. 2019. *Méthodes d'analyse et d'appréciation des cours d'eau en Suisse: Macrozoobenthos*. <https://www.bafu.admin.ch/bafu/fr/home/themen/thema-wasser/wasser--publikationen/publikationen-wasser/methoden-zur-untersuchung-und-beurteilung-der-fliebgewaesser-makrozoobenthos-stufe-f.html>
- OFFICE FEDERAL DE TOPOGRAPHIE SWISSTOPO. n.d. *Map of Switzerland*. Retrieved November 1, 2021, from map.geo.admin.ch
- PERLA. n.d. *Homepage*. Retrieved March 13, 2020, from <http://www.perla.developpement-durable.gouv.fr/index.php>

PRÉVENIR LE BRUNISSEMENT DU FLUIDE DE CONSERVATION DES SPÉCIMENS BOTANIQUES

JOANE LATTY¹, ELODIE GRANGET²,
MARION DANGEON² & LAURA BRAMBILLA³

¹ Diplômé d'un master en conservation-restauration, effectué dans le cadre du projet LIQUOR, à la Haute-École Arc. Haute-École Arc, HES-SO Haute-École spécialisée de Suisse occidentale, Espace de l'Europe 11, 2000 Neuchâtel, Suisse. joane@windowslive.com

² Assistante de recherche dans le projet LIQUOR de l'unité de recherche en conservation-restauration de la Haute-École Arc. Haute-École Arc, HES-SO Haute-École spécialisée de Suisse occidentale, Espace de l'Europe 11, 2000 Neuchâtel, Suisse. elodie.granget@he-arc.ch / marion.dangeon@he-arc.ch

³ Professeure HES associée, maître de stage de JL pour le travail de diplôme et responsable du projet LIQUOR. Haute-École Arc, HES-SO Haute-École spécialisée de Suisse occidentale, Espace de l'Europe 11, 2000 Neuchâtel, Suisse. laura.brambilla@he-arc.ch

Résumé

Les spécimens botaniques conservés en fluide tendent à se décolorer et à rendre le fluide brunâtre. C'est en particulier problématique dans le cas où ceux-ci doivent être exposés. Les principaux composés mis en cause sont diverses espèces de tanins. Plusieurs méthodes pour contrer ce phénomène ont été évaluées. L'adjonction de SO_{2(aq)} comme antioxydant et l'usage de paraffine liquide comme solvant apolaire empêchant la migration ont été testés sur des spécimens d'*Orobancha hederæ* un spécimen aux tissus clairs. Enfin, la fixation au formaldéhyde a été évaluée sur des échantillons d'écorce de *Pinus nigra*, dont les tissus sont déjà foncés. La plupart des variantes testées ont réussi à significativement retarder le brunissement du fluide, mais aucune n'a pu maintenir les couleurs originales des spécimens.

Abstract

Botanical specimens preserved in fluid tend to discolor and make the fluid brownish. This is particularly problematic when the specimens need to be exhibited. The main compounds involved are various types of tannins. Multiple methods have been evaluated for counteract this phenomenon. The addition of SO₂ and the use of liquid paraffin as nonpolar solvent to block the migration were tested on *Orobancha hederæ* specimens (light-colored tissues), while fixation using formaldehyde was evaluated on *Pinus nigra* bark samples (dark-colored tissues). Most of the variants tested were successful in delaying the browning of the fluid, but none were able to maintain the original color of the specimen.

Zusammenfassung

In Flüssigkeit aufbewahrte botanische Exemplare neigen dazu, sich zu verfärben und die Flüssigkeit braun werden zu lassen. Das ist besonders problematisch, wenn sie ausgestellt werden sollen. Es handelt sich hauptsächlich um verschiedene Gerbstoffarten. Es wurden mehrere Methoden zur Verhinderung dieses

Problems untersucht. Die Zugabe von wässrigem SO_2 als Antioxidans und die Verwendung von flüssigem Paraffin als apolares Lösungsmittel zur Prävention von Migration wurden an *Orobancha hederæ* getestet, einem Exemplar mit hell gefärbtem Gewebe. Schließlich wurde die Formaldehyd-Fixierung an Rindenmaterial von *Pinus nigra* untersucht, dessen Gewebe bereits dunkel ist. Die meisten der getesteten Varianten konnten die Bräunung der Flüssigkeit deutlich verzögern, aber keine konnte die ursprünglichen Farben der Exemplare konservieren.

Mots-clés

Conservation en fluide, décoloration, brunissement, composés phénoliques.

INTRODUCTION

La conservation des plantes en fluide est pratiquée depuis le XIX^e siècle au moins (SIMMONS, 2014) comme technique alternative au séchage en herbiers, particulièrement intéressante pour les études morphologiques des spécimens ayant un volume important et/ou une structure tridimensionnelle complexe et fragile (BRIDSON *et al.*, 1998). Le principe général de ce processus comprend deux ou trois étapes successives, soit : 1) le prélèvement du spécimen, 2) la mise en bain de fixation éventuelle durant un jour ou plus et 3) la mise en fluide de conservation, le récipient étant alors scellé. Les buts principaux de la fixation sont d'inhiber l'autolyse des tissus tout en améliorant leur résistance mécanique et leur stabilité chimique (VENTEO & VELOT, 2010). Ceci est rendu possible en utilisant un aldéhyde, généralement une solution diluée de formaldéhyde, qui formera de nouvelles liaisons covalentes. La fixation n'étant pas une étape indispensable, les spécimens sont parfois directement immergés dans un alcool, généralement de l'éthanol, ce qui provoque la dénaturation des protéines et évite le développement de moisissures. On parle alors de «demi-fixation» ou «fausse fixation» (SIMMONS, 2014).

Une fois en fluide, le spécimen tend à perdre ses couleurs, par dégradation des pigments au sein des tissus et par migration des

premiers au sein du fluide, ces deux processus étant parfois liés (BUTLER, 1918). Le second cas cause la coloration du fluide, au point que, selon la nature et quantité de pigments qui ont migré, celui-ci devient opaque – ce qui nuit évidemment à la bonne observation du spécimen (fig. 1a et c). Bien que dans un laboratoire de botanique, si le spécimen est conservé pour étude morphologique, le fluide puisse aisément être remplacé, la situation est plus problématique lorsqu'il s'agit d'une collection muséale. En effet, une telle intervention implique que le conservateur-restaurateur doive briser le scellement d'origine (DANGEON, 2016), ce qui devrait être évité car il est partie intégrante du bien patrimonial et éventuellement un témoin historique précieux – au même titre que le fluide, d'ailleurs. Si cela s'avère néanmoins nécessaire pour redonner sa visibilité au spécimen, alors il faut s'attendre à ce que le fluide doive être renouvelé plusieurs fois. En effet, la figure 1 montre qu'un fluide déjà renouvelé au moins une fois après plus d'un demi-siècle de conservation peut se colorer à nouveau fortement en l'espace de quelques dizaines d'années, et qu'un nouveau changement n'a pu prévenir une nouvelle opacification du fluide en l'espace de cinq ans. Ainsi, afin de réduire les coûts d'interventions répétées et de prévenir ce problème à l'avenir, il serait intéressant de pouvoir stopper ce phénomène de migration des pigments dans le fluide.

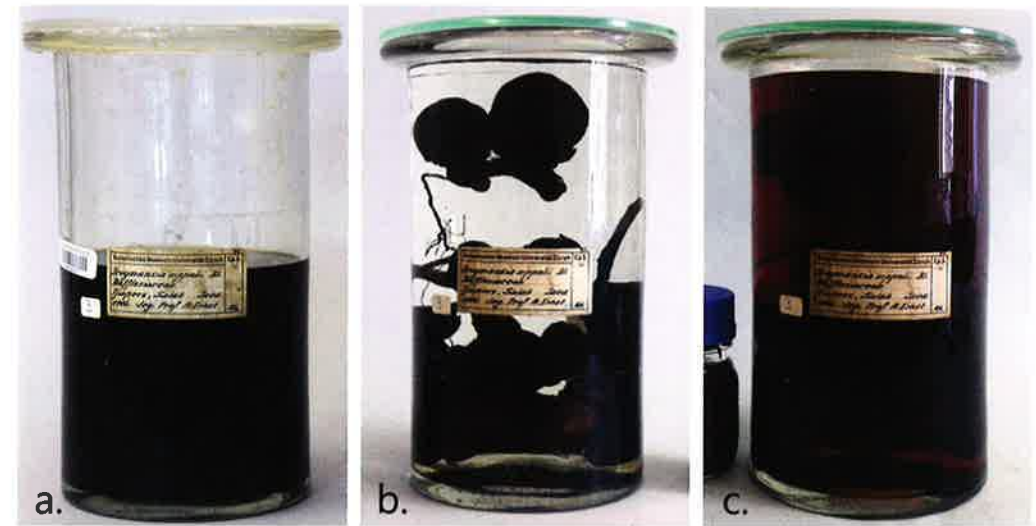


Figure 1. Bourgeons de *Brugmansia zippelii* Blume (actuellement *Rhizanthus zippelii* Blume) conservés en fluide (éthanol 70%), don d'A. Ernst au Zürich Botanischer Museum en 1906. a) 2016, avant renouvellement du fluide (au moins un renouvellement du fluide documenté dans les années 1980); b) 2016 après renouvellement du fluide; c) le même fluide au printemps 2021. © HE-Arc & Zürich Botanischer Museum

Le musée botanique de l'université de Zurich et la Haute-École Arc conservation-restauration travaillent d'ailleurs sur diverses questions en lien avec la conservation des couleurs des spécimens botaniques en fluide depuis 2018. C'est dans ce cadre que la présente étude sur la coloration du fluide a été réalisée. En fait cet article présente les résultats d'un travail de diplôme de master en conservation-restauration effectué dans le cadre du projet LIQUOR (Investigation and conservation of botanical wet collections) à la Haute-École Arc.

En réalité, le phénomène de coloration du fluide est plus complexe que la simple migration de pigments : le brunissement généralement observé, sur le long terme, est probablement dû à la fois à la dégradation de certains pigments (les chlorophylles notamment, voir GAUR *et al.*, 2006 & PETROVIĆ *et al.*, 2017) au sein du fluide et à l'oxydation et

polymérisation de composés phénoliques possiblement incolores à l'origine, *in vivo* – tels les tannins (BITTNER, 2006; CHEYNIER *et al.*, 2006). Il convient donc de considérer qu'il est théoriquement possible de jouer autant sur l'inhibition de l'oxydation et de la polymérisation de ces composés au sein du fluide que sur le blocage de la migration de ces composés et des divers pigments.

La plupart des recettes présentes dans la littérature du XX^e siècle à propos du maintien des couleurs des spécimens botaniques concernent la préservation des plantes vertes par le biais des sels de cuivre (LATTY, 2021; cela a commencé avec : AMANN, 1896; WOODS, 1897; TRAIL, 1908). Il y a néanmoins quelques auteurs qui traitent de la problématique du brunissement, typiquement dans le cas des plantes holoparasites (STRASBURGER, 1911; BUTLER, 1918; NIEUWLAND & SLAVIN, 1928; VAN STEENIS, 1935). Malgré quelques

variantes dans les proportions, la méthode de préparation ou le solvant utilisé, l'idée générale est toujours la même : utiliser une solution de dioxyde de soufre pour tenter de prévenir l'oxydation des composés phénoliques (simplifié $\text{SO}_{2(aq)}$ dès à présent).

Deux autres pistes ont également été explorées dans le cadre de cette étude, visant cette fois à stopper la migration plutôt qu'à inhiber l'oxydation. Premièrement et sachant que les molécules concernées sont plutôt hydrosolubles (YUSUF *et al.*, 2017), l'usage d'un fluide apolaire a été testé à la fois en tant qu'imprégnation en vue d'un transfert dans un fluide de conservation d'éthanol 70% (donc polaire) et en tant que simple fluide de conservation à long terme. Secondement et sachant que les composés phénoliques peuvent être insolubilisés par le biais d'un aldéhyde (BRAGHIROLI *et al.*, 2019), cette piste a été testée.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

L'*Orobanche hederæ* Duby (fig. 2) a été choisie pour tester l'effet du dioxyde de soufre et pour évaluer l'utilisation d'un fluide apolaire. Ce choix a été effectué en se basant sur l'étude des recettes traitant du problème du brunissement et qui font toutes références aux plantes holoparasites (STRASBURGER, 1911; BUTLER, 1918; NIEUWLAND & SLAVIN, 1928; VAN STEENIS, 1935). Pour tester l'effet d'une polymérisation des composés phénoliques au sein du spécimen, une écorce d'arbre, soit celle de *Pinus nigra* Arnold (fig. 3) a été utilisée. Cette espèce est réputée contenir des tannins condensés (PIZZI, 2008). L'idée de provoquer une polymérisation au sein du spécimen implique que ce dernier soit déjà brun à la base, sinon il risque de brunir lors du processus.

Les spécimens d'*O. hederæ* ont toujours été prélevés en juin, dans des conditions similaires pour garantir une certaine reproductibilité des résultats. Les spécimens ont ensuite été découpés en tronçons afin qu'ils puissent entrer dans des bocaux remplis avec 350 ml



Figure 2. Spécimen d'*O. hederæ*. © HE-Arc

de fluide et que la masse totale pour chaque spécimen soit égale à 20 ± 1 g. Chaque variante testée a fait l'objet de simples duplicats pour des raisons de disponibilité des spécimens.

Les échantillons d'écorce de *P. nigra* ont également été prélevés par beau temps, en juin. Plus spécifiquement, des petits rectangles allongés d'une masse de $0,7 \pm 0,01$ g ont été débités dans les plaques du rhytidome, comprenant dans leur épaisseur uniquement une couche de phloème secondaire mort et une couche de périderme – à l'exception du phellème qui a été ôté.

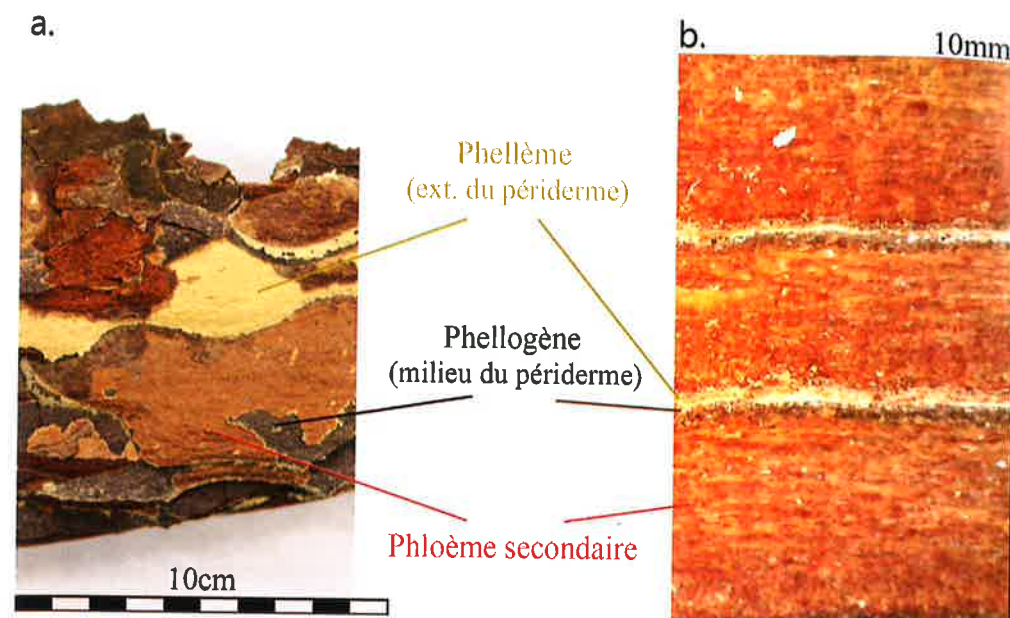


Figure 3. Échantillon de rhytidome de *P. nigra*, constitué d'une succession alternée de couches de périderme et phloème secondaire. a) vue du dessus de plusieurs plaques différentes délamées à divers niveaux ; b) vue en coupe au microscope numérique (agrandissement 50 x). © HE-Arc

Le $\text{SO}_{2(aq)}$ a été préparé, en s'inspirant de la méthode proposée par NIEUWLAND & SLAVIN (1928), de la manière suivante : du bisulfite de sodium, NHSO_3 (Sigma-Aldrich, ACS reagent), a été ajouté en excès dans de l'éthanol à 70% (VWR Chemicals, absolute + eau déionisée), puis de l'acide chlorhydrique (Carlo Erba, 38%) a été utilisé pour ajuster la solution à $\text{pH} = 1,8$. Cette valeur a été choisie car c'est le premier pKa des sulfites, c'est-à-dire qu'il y a autant de SO_2 que d'ions HSO_3^- en solution, et donc qu'elle offre un certain effet tampon. Enfin, la solution a été filtrée afin de retirer l'éventuel précipité des sels non dissous.

Le solvant sélectionné pour le fluide de conservation apolaire est la paraffine liquide (Droguerie Schneitter, Neuchâtel), car ceux plus légers (solvants hydrocarbures tels que le toluène, xylène, hexane, etc.) présentent

a priori tous des problèmes de toxicité et d'inflammabilité exacerbés par leur volatilité. Sa viscosité permettait également d'envisager une imprégnation lente mais plus résistante au dégorgement sur le long terme.

Le formaldéhyde (Sigma-Aldrich, solution aqueuse à $\geq 34,5\%$ m/m) a été choisi pour provoquer la polymérisation des composés phénoliques comme les tannins condensés, car c'est un aldéhyde réputé être très efficace à cet effet (PIZZI, 2008). Toutefois, c'est une très petite molécule et il est possible qu'elle ne soit pas en mesure de créer des ponts méthylènes entre les sites réactifs de polymères déjà suffisamment grands, c'est pourquoi le phénol (Sigma-Aldrich, unstabilized - ReagentPlus®) a également été testé comme complément pour aider à créer des liaisons entre sites plus distants.

Tableau 1. Liste des variantes de conservation en fluide testées sur les spécimens d'*O. hederæ*. Or = Orobanche, E = EtOH 70%, P = paraffine liquide, sul = adjonction de SO₂, F = formol 3,5%, G = glycérol 70%, Car = *O. caryophyllacea*, et une virgule sépare le fluide de fixation du fluide de conservation. Tous les échantillons sont stockés dans le noir à température ambiante.

Échantillon	Principe testé	Fixation	Conservation	pH
OrEsul	SO ₂ _(aq) → antioxydant	-	NaHSO _{3(s)} dans EtOH _(aq) 70 %	1,8
OrP,Esul	Imprégnation apolaire, puis SO ₂ _(aq)	Paraffine liquide	NaHSO ₃ dans EtOH 70 %	1,8
OrP,E	Imprégnation apolaire	Paraffine liquide	EtOH 70 %	6,5
OrP	Conservation en milieu apolaire	-	Paraffine liquide	-
OrF,G	Formaldéhyde polymérisation	Formol 3,5 %	Glycérol 70 %	6,0
OrE	Témoin dans EtOH	-	EtOH 70 %	6,5
OrG	Témoin dans glycérol	-	Glycérol 70 %	6,0
OrCar	Comparaison avec une <i>O. caryophyllacea</i>	-	EtOH 70 %	6,5

Tableau 2. Liste des variantes de fixation testées sur les échantillons de *P. nigra*. F = formaldéhyde, E = éthanol 70%, ph = adjonction de phénol; les chiffres indiquent la proportion relative de formaldéhyde ou de phénol par rapport aux autres échantillons. Tous les échantillons sont stockés dans le noir à température ambiante.

Échantillon	Formald. [g/100 g]	Phénol [g/L]	Durée fix. [j]	Paramètre testé
F0.1	3,5	-	1	Formaldéhyde 3,5 % (recette largement utilisée dans les musées)
F1	35,0	-	1	Augmentation des concentrations de formaldéhyde
F0.5	17,5	-	1	
F0.1_3j	3,5	-	3	
F0.1'	3,5	-	1	Témoin non manipulé
F0.5ph5	17,5	50	1	Variations des concentrations de phénol et formaldéhyde
F0.5ph0.5	17,5	5	1	
F0.1ph5	3,5	50	1	
F0.1ph0.5	3,5	5	1	
E	-	-	-	Témoin dans l'EtOH à 70 %

Après un éventuel traitement préalable (1 jour de fixation ou 3 jours d'imprégnation) en fonction des variantes (voir tableaux 1 et 2), les spécimens ont été placés dans le fluide de conservation pour quatre semaines dans une armoire à solvants avec ventilation forcée, à température

ambiante et à l'abri de la lumière. L'évolution de l'aspect du fluide a été contrôlée visuellement, des photos des spécimens en fluide ayant été prises à un intervalle de jours croissant (0, 1, 3, 6, 14, 21 et 28 j) et des conditions d'éclairage identiques. Par ailleurs, la couleur du fluide a

également été mesurée par réflectance à l'aide d'un spectrophotomètre X-Rite Ci62L+RTL, selon les mêmes intervalles. Pour cela, 6 ml de fluide ont été prélevés à chaque fois (soit la totalité pour les éprouvettes et ~1,7% pour les bocal) puis remis dans le récipient. Les échantillons dont le fluide de conservation était de la paraffine liquide n'ont pas été mesurés pour des raisons pratiques. Après traitement des données colorimétriques, il s'est avéré que la grandeur la plus appropriée pour exprimer le changement de couleur dans le fluide, et donc celle utilisée pour le présent travail est le chroma, soit le rayon du plan horizontal de l'espace CIELCh. Il a été

considéré comme bon révélateur de la migration des pigments car plus le fluide est coloré plus sa valeur est élevée (ZUPPIROLI *et al.*, 2012).

RÉSULTATS

Les spécimens témoins d'*O. hederæ* simplement conservés dans de l'éthanol à 70% ont prouvé que cette espèce cause un brunissement important du fluide (fig. 4a, b et c), et que deux renouvellements (à 7 puis 19 jours) ne suffisent pas à résoudre le problème (fig. 4d, e, f et g). Un test similaire sur un spécimen d'*O. caryophyllacea* Sm., de couleur plus claire que

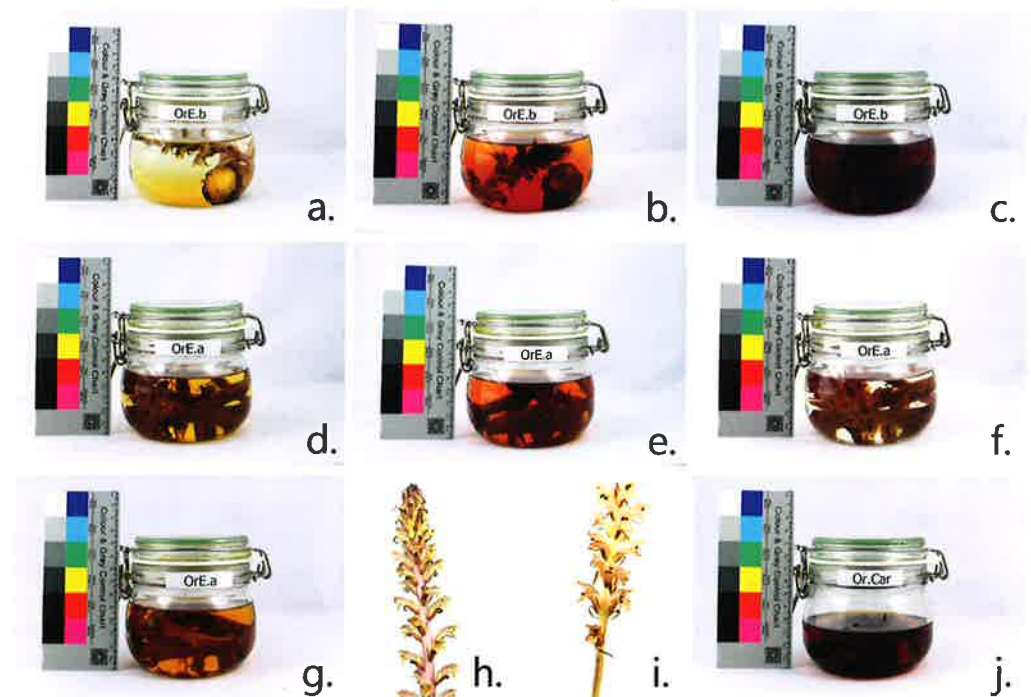


Figure 4. Évolution de la coloration de l'EtOH 70% au cours du temps pour *O. hederæ* sans renouvellement du fluide : a) + 2 h ; b) + 3 j ; c) + 28 j. Comparaison pour *O. hederæ* dans l'EtOH 70% avec renouvellement du fluide : d) + 6 j dans le premier fluide ; e) + 15 j suite à un renouvellement du fluide à + 7 j ; f) + 19 j après un nouveau changement le jour même ; g) + 28 j (deux changements en tout). Comparaison des spécimens frais et de leur fluide respectif après 28 j : h) spécimen d'*O. hederæ* frais ; i) spécimen d'*O. caryophyllacea* frais ; j) fluide de conservation (EtOH 70%) de *O. caryophyllacea* après 28 j de conservation sans changement, à comparer avec c). © HE-Arc

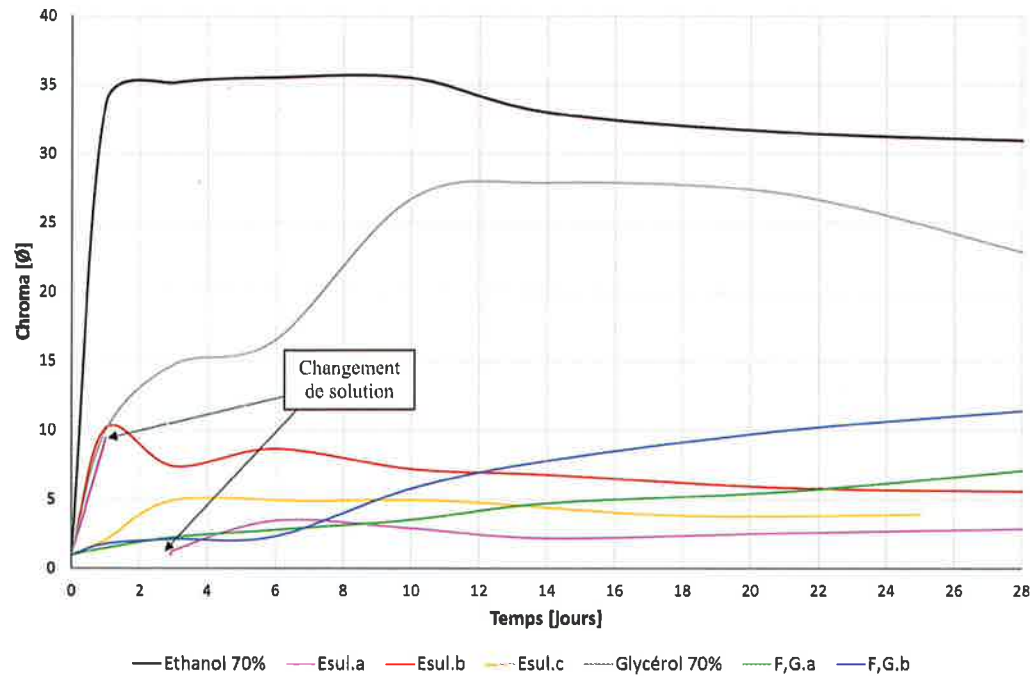


Figure 5. Évolution du chroma des fluides en fonction du temps chez *O. hederæ*. Éthanol 70 % : témoin sans SO₂ ; Esul.a : NaHSO₃ dans EtOH à pH=1,8 durant 3 j, puis pH=4,7 ; Esul.b : NaHSO₃ dans EtOH à pH=1,8 durant 3 j, puis pH=3 et redescende progressive vers pH=2 ; Esul.c : NaHSO₃ dans EtOH à pH=4,7, durée totale de 25 j ; glycérol 70 % : témoin sans fixation au formaldéhyde ; F,G.a et F,G.b : fixation au formol à 3,5 % puis conservation en glycérol à 70 %.

l'*O. hederæ* (fig. 4h et i), a confirmé que le brunissement (fig. 4j comparé à 4c) est dû principalement à des composés qui sont incolores *in vivo* mais brunissent lorsqu'ils se dégradent une fois le spécimen cueilli.

Les fluides contenant du SO_{2(gaq)} n'ont effectivement pas bruni, mais ils ont présenté une teinte rose marquée après seulement un jour de conservation (fig. 6a), probablement due à la présence de pigments anthocyanes qui réagissent au pH très acide. Pour remédier à cela, le pH des solutions a été progressivement augmenté à l'aide de NaOH jusqu'à atteindre le point à partir duquel les anthocyanes sont à nouveau majoritairement incolores ou jaune clair, c'est-à-dire au-dessus d'environ 3. Le fluide d'un des deux spécimens

(OrEsul.a) a été remplacé par une nouvelle solution saturée de bisulfite de sodium dans de l'éthanol à 70% et à pH = 4,7 (fig. 6b et c) alors que l'autre (OrEsul.b) n'a pas été remplacé mais simplement ajusté à pH = 3 par adjonction d'hydroxyde de sodium (Sigma-Aldrich, ACS reagent ≥97%). Afin de témoigner de la réversibilité ou non de la teinte rose également prise par certaines zones des spécimens (fig. 6b), un autre spécimen a été placé directement dans une solution saturée de bisulfite de sodium dans de l'éthanol à 70% avec un pH = 4,7. Ces modifications ont permis de diminuer largement la coloration du fluide sur la durée de la période d'expérimentation (fig. 6d, e et f). En effet, la valeur de leur chroma se situe aux alentours de 5 (fig. 5), ce qui signifie que leur couleur

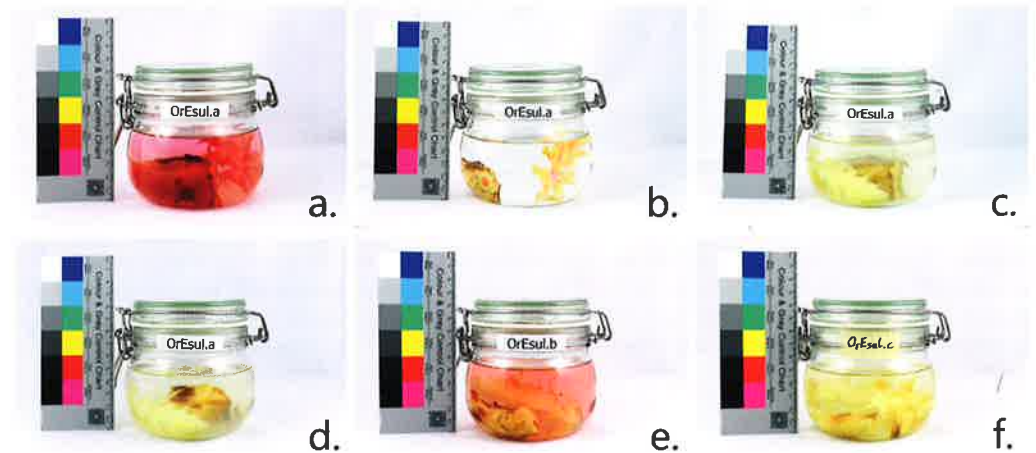


Figure 6. Impact du NaHSO₃ dans de l'EtOH 70 % et du pH sur la coloration du fluide. a) OrEsul + 1 j à pH=1,8 ; b) OrEsul + 3 j, 2 h après renouvellement par le même fluide à pH=4,7 (on peut encore voir des zones rosées sur les fragments d'orobanche) ; c) OrEsul + 6 j (pH~4,7) ; d) OrEsul + 28 j (pH~4,7) ; e) OrEsul + 28 j mais dont le pH a été ajusté à 3 après 3 j et est redescendu à 2,2 ; f) OrEsul + 28 j toujours conservé à pH=4,7. © HE-Arc

est perceptible en comparaison d'un fluide totalement incolore – le minimum perceptible se situant entre 3,5 et 1 suivant l'observateur (MOKRZYCKI & TATOL, 2011). En comparaison, le chroma du témoin en éthanol 70% est rapidement monté au-dessus de 30, soit une valeur environ six fois plus élevée.

Cependant, le fluide du spécimen OrEsul.b a progressivement viré à nouveau vers le rose, bien que son chroma n'ait pas augmenté. Ceci correspond à la chute du pH mesurée après vingt-huit jours (pH = 2,2). Par ailleurs, tous les fluides contenant du SO₂ étaient turbides, probablement du fait de la précipitation d'une partie du bisulfite de sodium auparavant dissout. La filtration après quatorze jours (= 11 j après le remplacement) du fluide OrEsul.a n'a pas résolu le problème qui a resurgi après quelques jours. Enfin, le SO₂ a également causé la perte des teintes violettes des spécimens, qui n'ont gardé que des nuances entre le blanc et le jaune pâle suivant les zones (fig. 10c).

L'imprégnation de paraffine liquide n'a visiblement pas fonctionné puisqu'autant les spécimens conservés ensuite dans de l'éthanol à 70% que ceux conservés dans la solution contenant du SO₂ ont eu un comportement similaire à ceux de spécimens non imprégnés – les fluides étant devenus respectivement bruns (fig. 7a) et roses (fig. 7b) après seulement un jour. De plus, de la paraffine s'est extraite des spécimens et a créé des gouttes d'huile dans le fluide, ajoutant à la turbidité. Pour ces raisons, ces tests ont été arrêtés après un jour. En revanche, la conservation directement dans de la paraffine liquide s'est révélée plus intéressante : non seulement le fluide ne s'est visiblement pas coloré, mais en plus les spécimens traités ainsi sont ceux qui ont gardé leurs couleurs d'origine le plus longtemps. Mais un autre problème s'est révélé après dix jours : le développement de micro-organismes formant un duvet gris sur les spécimens (fig. 7c). Pour cette raison, ces tests ont été arrêtés après deux semaines.



Figure 7. Impact de la paraffine liquide sur la coloration du fluide. a) + 1 j, après 3 j d'imprégnation puis transfert du spécimen dans de l'EtOH 70 % ; b) + 1 j, après 3 j d'imprégnation puis transfert du spécimen dans de l'EtOH 70 % saturé en NaHSO₃ à pH=1,8 ; c) + 14 j toujours dans de la paraffine liquide, on note le développement d'un duvet grisâtre (flèche rouge). © HE-Arc

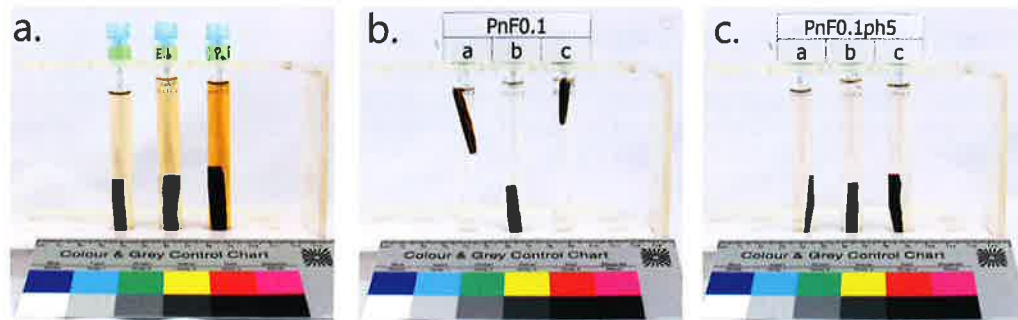


Figure 8. Impact de la fixation au formaldéhyde sur la coloration du fluide de conservation (EtOH 70 %) d'échantillons d'écorce de *P. nigra*. a) + 28 j sans fixation préalable (témoin) ; b) + 28 j après fixation au formol 3,5 % ; c) + 28 j après fixation au formol 3,5 % + 5 % de phénol. © HE-Arc

La fixation préalable au formaldéhyde des échantillons d'écorce de *P. nigra* a permis de garder le fluide de conservation (éthanol 70 %) clair (fig. 8a et b), la valeur du chroma restant en dessous de 10 contre 20 à 35 environ pour les témoins non fixés (fig. 9). Aucune différence n'a pu être soulignée en fonction de la concentration (F1, F0.5 et F0.1) ou du temps de fixation (F0.1_3j comparé à F0.1). En revanche, l'adjonction de phénol s'est révélée plutôt négative puisque les fluides qui en contenaient présentaient une teinte jaunâtre (fig. 8c). Celle-ci semble d'autant plus prononcée que la concentration

relative en phénol est importante (F0.1ph5 > F0.5ph5 > F0.1ph0.5 > F0.5ph0.5), bien que les écarts de chroma soient légers (fig. 9).

Enfin, la fixation au formaldéhyde des spécimens d'*O. hederæ*, suivie par une conservation dans du glycérol à 70 %, a permis d'obtenir un brunissement plus faible du fluide que sans fixation (fig. 5) – bien qu'il faille considérer que le fluide de fixation a également bruni. Les spécimens, eux, n'ont pas plus bruni (fig. 10b) que ceux non fixés et conservés dans de l'éthanol ou du glycérol à 70 % (fig. 10a).

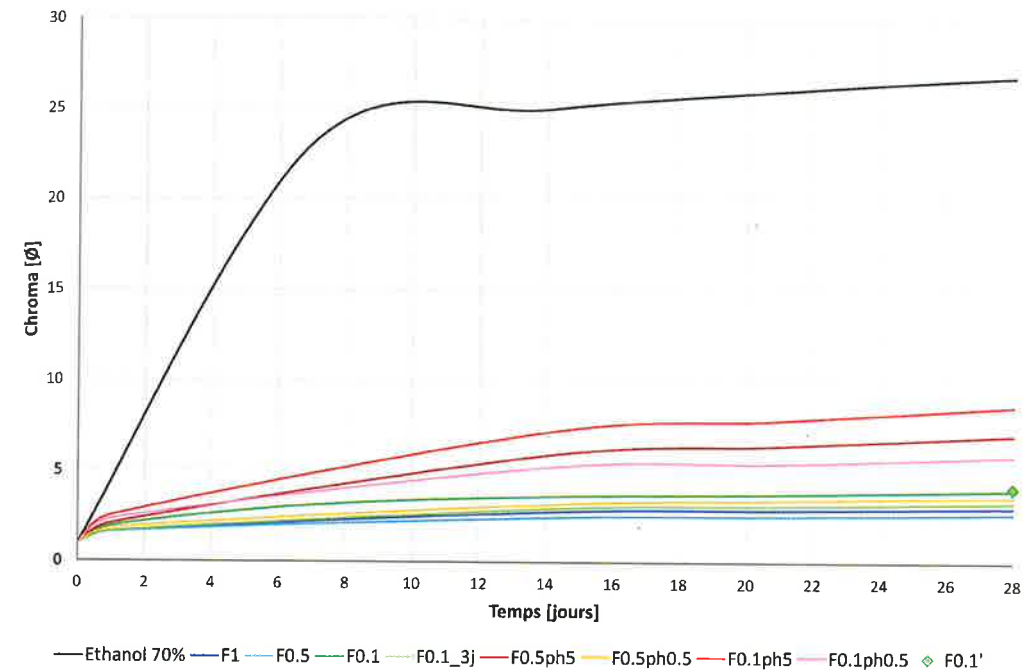


Figure 9. Évolution du chroma des fluides de conservation (EtOH 70 %) en fonction du temps chez *P. nigra*. Éthanol 70 % : témoin sans fixation préalable ; F1 : fixation dans formol 35 % ; F0.5 : fixation dans formol 17,5 % ; F0.1 : fixation dans formol 3,5 % ; F0.1_3j : fixation au formol 3,5 % sur 3 j au lieu de 1 j ; F0.5ph5 : fixation au formol 17,5 % + phénol 5 % ; F0.5ph0.5 : fixation au formol 17,5 % + phénol 0,5 % ; F0.1ph5 : fixation au formol 3,5 % + phénol 5 % ; fixation au formol 3,5 % + phénol 0,5 % ; F0.1' : témoin fixé au formol 3,5 % et laissé dans le noir sans mesures avant la fin des 28 j de test.



Figure 10. Spécimens d'*O. hederæ* hors fluide après 28 j. a) témoin conservé dans du glycérol à 70 % (OrG) ; b) idem mais après une fixation au formaldéhyde (OrF,G.a) ; c) conservé dans une solution hydroalcoolique de NaHSO₃ (OrEsul.c). Dans aucun des cas les couleurs d'origine n'ont été préservées. © HE-Arc

DISCUSSION

Si plusieurs des options testées ont révélé une certaine efficacité à prévenir le brunissement du fluide, aucune d'entre elles n'a été en mesure de garder intactes toutes les couleurs d'origine. La difficulté vient du fait que l'*O. hederæ* ne contient visiblement pas que des composés phénoliques incolores. Ce spécimen contient également d'autres pigments tels des anthocyanes, comme semble indiquer le virage coloré en milieu acide. En effet, ces pigments subissent des variations structurales – en fonction du pH notamment – qui affectent leur couleur (REIN, 2005). L'aspect rose en milieu fortement acide est probablement dû à la prédominance du cation flavylum (rouge) dans ce cas, alors que la perte de couleur en milieu faiblement acide est vraisemblablement due à l'hémiacétal (incolore) et/ou à la variante soufrée (incolore) issue de la réduction opérée par l'ion bisulfite (HE *et al.*, 2012). La teinte jaunâtre des spécimens et des fluides peut s'expliquer à la fois par la présence de chalcones issus de la dégradation de l'hémiacétal (MORATA *et al.*, 2019) mais aussi par la présence de caroténoïdes (BACCARINI & MELANDRI, 1967). Additionnellement, aucune de ces conditions ne permet de garder les tons violets/pourpres d'origine : la base quinoïdale pourpre nécessite à la fois un pH adapté (faiblement acide) pour sa stabilité, mais également d'être protégée par des phénomènes naturels de copigmentation contre l'hydrolyse (HE *et al.*, 2012). Dans tous les cas, un choix semble devoir être fait entre le brunissement (autolyse et/ou polymérisation artificielle) et la décoloration (SO₂) des spécimens. À compter que les conditions de pH extrêmes mettent également en péril l'intégrité structurale des spécimens ainsi que leur exploitabilité dans le cadre de recherches génétiques ou protéomiques. Cependant, l'utilisation d'un fluide apolaire reste une option à explorer davantage car moins risquée pour le spécimen.

En effet, la paraffine liquide a permis de garder les couleurs d'origine des spécimens plus longtemps que les autres fluides, probablement car elle n'accélère pas les divers phénomènes de dégradation, mais elle n'a néanmoins pas réussi à empêcher le brunissement à terme. Cela peut être dû à l'incapacité de la paraffine liquide à stopper l'autolyse des spécimens ou l'oxydation des pigments. Toutefois, il se peut aussi qu'elle ait un effet inhibiteur mais ne pénètre pas assez rapidement. Pour cela, il serait intéressant de réaliser des bains progressifs d'imprégnation favorisée par un solvant apolaire plus léger, comme le xylène que proposaient déjà NIEUWLAND & SLAVIN (1928). Dans tous les cas, il faudrait utiliser un antiseptique adapté à ce milieu afin d'éviter le développement de micro-organismes. Les performances de divers antiseptiques déjà largement utilisés pour la conservation de spécimens en fluide pourraient être évaluées sur le long terme dans la paraffine.

La toxicité reste potentiellement problématique pour la plupart des options considérées dans cette étude, puisque les solutions de dioxyde de soufre libèrent du SO_{2(g)} qui est fortement irritant et que le formaldéhyde ainsi que de nombreux hydrocarbures sont cancérigènes. Le problème du premier diminue toutefois à mesure que le pH augmente, l'ion bisulfite étant la seule espèce présente à partir de pH = 4 environ – soit une valeur également désirable pour la couleur du fluide. Le formaldéhyde pourrait lui être remplacé par d'autres aldéhydes moins toxiques, voire d'autres agents pontants (voir PIZZI, 2008). Il serait d'ailleurs probablement intéressant d'en mettre en petite quantité dans le fluide de conservation des spécimens initialement bruns, au cas où la fixation n'a pas été assez longue. Enfin, comme il l'a été discuté, des solvants apolaires volatils pourraient être utilisés lors de la préparation initiale, sous hotte aspirante, ce qui reste acceptable.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude préliminaire a permis de confirmer l'efficacité, à court terme du moins, des recettes proposées durant la première moitié du xx^e siècle pour prévenir le brunissement du fluide de conservation des plants holoparasites, ici avec des spécimens d'*O. hederæ*. Elle a permis d'identifier les paramètres problématiques pour leur conservation sur le long terme (pH extrême, dégradation des autres pigments), guidant la suite des expérimentations vers l'élaboration de variantes plus adaptées de ces recettes. De même, la conservation dans un milieu apolaire comme la paraffine liquide semble également capable d'empêcher ce phénomène et pourrait être une option envisageable à condition d'assurer une bonne imprégnation et d'y adjoindre un antiseptique. Enfin, partant du principe que certains spécimens sont parfois déjà bruns, l'insolubilisation des composés phénoliques par polymérisation provoquée par le formaldéhyde a fonctionné sur des échantillons d'écorce de *P. nigra*. Ces spécimens rejoignent donc la longue liste des cas en attente d'un substitut au formaldéhyde qui serait moins toxique et permettrait leur exposition dans les espaces publics.

Le but du projet dans lequel s'inscrit ce travail de mémoire est non seulement de proposer des solutions pour prévenir le problème du brunissement des collections à venir, mais aussi de limiter les interventions sur les collections existantes. La prochaine étape sera donc de tester ces options sur des échantillons vieillis artificiellement, afin de pouvoir ensuite éventuellement les appliquer sur d'authentiques spécimens de collections muséales.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier :

- le projet LIQUOR de l'unité de recherche en conservation de la Haute-École Arc, financé par le RCDAV de la HES-SO, cette étude s'inscrivant dans le cadre plus large

de ce dernier qui vise à établir, à terme, un protocole de conservation-restauration des spécimens botaniques en fluide, et particulièrement Mme Marion Dangeon, restauratrice collaboratrice sur ce projet ;

- le professeur Jason Grant de l'Université de Neuchâtel, mentor de Joane Latty pour le travail de mémoire dont cet article est tiré ;
- le professeur Felix Kessler de l'Université de Neuchâtel, qui nous a conseillés sur la méthodologie à adopter ;
- de nombreuses autres personnes de l'Université de Neuchâtel et de la Haute-École Arc.

LEXIQUE

- Chroma : rayon du cercle dans l'espace colorimétrique L*C*h, le zéro de cette valeur correspond à un gris neutre (ou noir ou blanc si l'on se situe aux extrémités de la luminosité) alors que plus cette valeur augmente, plus la couleur est prononcée.
- Périclerme : ensemble du phellogène, du phellème et du phelloderme formant ce qu'on appelle vulgairement l'écorce.
- Phellème : tissu végétal produit par le phellogène et correspondant à l'extérieur de l'écorce (synonyme : suber, liège).
- Phellogène : cambium générant le phellème vers l'extérieur et le phelloderme vers l'intérieur (absent du schéma car trop mince et confondu avec le phellogène).
- Phloème : tissu végétal produit par le cambium vasculaire vers l'extérieur.
- Rythidome : écorce de certains arbres formée d'une succession alternée de périodermes et de phloème secondaire mort, l'éclatement en écailles vers la surface du périoderme générant périodiquement la création d'un nouveau périoderme.

BIBLIOGRAPHIE

- AMANN, J. 1896. Conservierungsflüssigkeiten und Einschlussmedien für Moose, Chloro- und Cyanophyceen. *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und mikroskopische Technik* 13: 18-21.
- BACCARINI, A. & MELANDRI, B. A. 1967. Studies on *Orobanche hederæ* Physiology: Pigments and CO₂ Fixation. *Physiologia Plantarum* 20(1): 245-250.
- BITTNER, S. 2006. When quinones meet amino acids: chemical, physical and biological consequences. *Amino Acids* 30(3): 205-224.
- BRAGHIROLI, F. L., AMARAL-LABAT, G., NEY BOSS, A. F., LACOSTE, C. & PIZZI, A. 2019. Tannin Gels and Their Carbon Derivatives: A Review. *Biomolecules* 9 (10): 587.
- BRIDSON, D. M., FORMAN, L. & ROYAL BOTANIC GARDENS, KEW (dir.). 1998. *The herbarium handbook*. 3rd ed. Royal Botanic Gardens. Kew.
- BUTLER, O. 1918. On the preservation of phytopathological specimens in their natural colors. *Phytopathology* 8: 66-68.
- CHEYNIER, V., DUEÑAS-PATON, M., SALAS, E., MAURY, C., SOUQUET, J., SARNI-MANCHADO, P. & FULCRAND, H. 2006. Structure and properties of wine pigments and tannins. *American Journal for Enology and Viticulture* 57(3): 298-305.
- DANGEON, M. 2016. La collection en fluide du Musée botanique de l'Université de Zurich: conservation-restauration de six spécimens, identification/sélection de solutions de préservation et tests d'étanchéité des matériaux de scellement. *Mémoire de master en conservation-restauration. Haute-École Arc. Neuchâtel*.
- GAUR, S., SHIVHARE, U. S. & AHMED, J. 2006. Degradation of chlorophyll during processing of green vegetables: a review. *Stewart Postharvest Review* 2(5): 1-8.
- HE, F., LIANG, N.-N., MU, L., PAN, Q.-H., WANG, J., REEVES, M. J. & DUAN, C.-Q. 2012. Anthocyanins and Their Variation in Red Wines I. Monomeric Anthocyanins and Their Color Expression. *Molecules* 17(2): 1571-1601.
- LATTY, J. 2021. Conserver la couleur des spécimens botaniques en fluide – Évaluation de méthodes de préservation de la chlorophylle et des tannins. *Mémoire de master en conservation-restauration. Haute-École Arc. Neuchâtel*.
- MOKRZYCKI, W. & TATOL, M. 2011. Color difference Delta E – A survey. *Machine Graphics and Vision* 20: 383-411.
- MOORE, S. 2010. Preservation of botanical specimens in fluids. *NatSCA News* 19: 85-88.
- MORATA, A., LÓPEZ, C., TESFAYE, W., GONZÁLEZ, C. & ESCOTT, C. 2019. Anthocyanins as Natural Pigments in Beverages. *Value-Added Ingredients and Enrichments of Beverages* 14: 383-428.
- NIEUWLAND, J. A. & SLAVIN, A. D. 1928. Preservation of *Monotropa* and Similar Plants without Discoloration. *Proceedings of the Indiana Academy of Science* 38: 103-104.
- PETROVIĆ, S., ZVEZDANOVIĆ, J. & MARKOVIĆ, D. 2017. Chlorophyll degradation in aqueous mediums induced by light and UV-B irradiation: An UHPLC-ESI-MS study. *Radiation Physics and Chemistry* 141: 8-16.
- PIZZI, A. 2008. Tannins: Major Sources, Properties and Applications. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources, Elsevier*, 179-199.
- REIN, M. 2005. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. *Academic Dissertation, Helsinki: University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology, Food Chemistry Division*.
- SIMMONS, J. E. 2014. *Fluid preservation: a comprehensive reference*. Rowman & Littlefield. Lanham.

- STRASBURGER, E. 1911. *Handbook of Practical Botany, English translation, 7th edition*. Macmillan. London.
- TRAIL, J. W. H. 1908. Museum Preparations. The Preservation of Green Colours in Botanical Specimens Exposed to Light. *Bulletin of Miscellaneous Information (Royal Botanic Gardens, Kew)* 2: 49-52.
- VAN STEENIS, C. G. G. J. 1935. On the Preservation of Botanical Specimens in Liquid. *Chronica Botanica* 1: 341-342.
- VENTEO, L. & VELOT, E. 2010. L'importance de la fixation en histochimie. *Revue française d'histotechnologie* 23(1): 25-32.
- WOODS, A. F. 1897. A Method of Preserving the Green Color of Plants for Exhibition Purposes. *Botanical Gazette* 24(3): 206-209.
- YUSUF, M., SHABBIR, M. & MOHAMMAD, F. 2017. Natural Colorants: Historical, Processing and Sustainable Prospects. *Natural Products and Bioprospecting* 7(1): 123-145.
- ZUPPIROLI, L., BUSSAC, M.-N. & GRIMM, C. 2012. *Traité des couleurs, 2^e éd. revue et augmentée*. Presses polytechniques et universitaires romandes [diff. Geodif], Lausanne [& Paris].