

## **Conserver la couleur des spécimens botaniques en fluide**

*Evaluation de méthodes de préservation de la chlorophylle et des tannins*



Mémoire présenté par :

Joane Latty

Pour l'obtention du

Master of Arts HES-SO in Conservation-restoration  
Orientation objets archéologiques et ethnographiques

Année académique 2020-2021

Remise du travail : *19.07.2021 (version corrigée :12.10.2021)*

Jury : *26.08.2021*

Nombre de pages : *142 (84 sans annexes)*

*«Wir sehen niemals das Grün des Blattes als Wirkung auf uns, sondern als Grün des Blattes.»*

“Nous ne voyons jamais le vert de la feuille comme un effet sur nous, mais comme le vert de la feuille.”

**Heidegger**

Engagement

*« J'atteste que ce travail est le résultat de ma propre création et qu'il n'a été présenté à aucun autre jury que ce soit en partie ou entièrement. J'atteste également que dans ce texte toute affirmation qui n'est pas le fruit de ma réflexion personnelle est attribuée à sa source et que tout passage recopié d'une autre source est en outre placé entre guillemets. »*

Date et signature :

## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier particulièrement l'équipe du projet LIQUOR au complet, sans qui ce travail n'aurait pu avoir lieu : Dre Laura Brambilla, ma maîtresse de stage, pour m'avoir impliqué dans ce projet et avoir été toujours disponible ; Mme Marion Dangeon, pour sa connaissance précieuse de la conservation en fluide ; et Mme Elodie Granget, pour son aide de tout instant et dans bien des domaines.

Ensuite, je dois également beaucoup à plusieurs personnes de l'Université de Neuchâtel : en premier lieu Dr. Jason Grant, mon mentor, pour m'avoir guidé dans le choix des plantes à tester et m'avoir apporté son point de vue pertinent de botaniste expérimenté. Je souhaite aussi remercier particulièrement monsieur le professeur Felix Kessler et Dre Armelle Vallat : le premier car il m'a conseillé sur la méthode et les techniques nécessaires pour mener mes tests à bien, et la seconde pour m'avoir guidé dans la préparation des spécimens à l'analyse LC-MS et avoir réalisé ces dernières. Mme Véronique Douet ainsi que l'équipe de recherche travaillant avec Dre Edith Joseph ont également ma gratitude pour m'avoir prêté du matériel.

A ce propos, je remercie Mme Brigitte Lienert de la Haute-Ecole d'art de Berne qui m'a prêté les enceintes de vieillissement accéléré à la lumière, ainsi que M. Thierry Jacot et M. Philippe Marmy de la Haute-Ecole Arc pour m'avoir laissé emprunter du matériel fort utile.

Merci également à M. Simon Moore, M. Andries van Dam et M. John Simmons, tout trois d'éminents spécialistes de la conservation en fluide, pour avoir répondu à mes questions. De même, je sais gré à Dr. Alexander Kocyan, directeur du Musée Botanique de l'Université de Zürich, des discussions qu'il m'a accordé sur le sujet de l'intérêt de la conservation des spécimens végétaux en fluide. Puisqu'il est question de savoir, je ne peux ignorer Mme Anne Cuenat, qui m'a grandement aidé à accéder aux ressources documentaires nécessaires. A titre plus personnel, je tiens aussi à remercier mon frère Arnaud, pour m'avoir mené à mieux comprendre les phénomènes physiques auxquels je faisais face.

Enfin, je tiens à remercier le collège de diplôme master dans son entier pour son accompagnement tout au long du processus ayant conduit au parachèvement de mes études en conservation-restauration, soit : Dr. Régis Bertholon, directeur de la section CR de la Haute-Ecole Arc, Mme Hortense de Corneillan, présidente du jury, et les professeurs Dr. Christian Degrieny, M. Valentin Boissonnas et M. Tobias Schenkel.

## Tables des matières

|  |    |
|--|----|
| Résumé .....   | 3  |
| Abstract .....   | 4  |
| Introduction générale.....   | 5  |
| 1. Préservation de la couleur des spécimens botaniques en fluide .....     | 6  |
| 1.1. Conserver les plantes en fluide .....                                 | 6  |
| 1.1.1. Pourquoi et quel matériel conserver ? .....                         | 6  |
| 1.1.2. La conservation des plantes en fluide en général .....              | 8  |
| 1.2. Les pigments des plantes.....   | 11 |
| 1.2.1. Introduction .....  | 11 |
| 1.2.2. Les chlorophylles et autres tétrapyrroles .....                     | 11 |
| 1.2.3. Les terpénoïdes .....   | 13 |
| 1.2.4. Les flavonoïdes .....   | 14 |
| 1.2.5. Les bétalaïnes.....   | 15 |
| 1.2.6. Les quinonoïdes .....   | 16 |
| 1.2.7. Divers .....  | 17 |
| 1.2.8. Les « tannins », des polyphénols ambigus.....                       | 17 |
| 1.2.9. Problématiques de conservation <i>a priori</i> .....                | 19 |
| 1.2. Historique de la conservation des couleurs des plantes en fluide..... | 22 |
| 2. Préservation de la chlorophylle .....                                   | 26 |
| 2.1. Les chlorophylles : structure et dégradation.....                     | 26 |
| 2.2. Techniques de « préservation » .....                                  | 28 |
| 2.2.1. Recettes existantes .....   | 28 |
| 2.2.2. Autres pistes.....  | 31 |
| 2.3. Méthode et matériel .....   | 32 |
| 2.3.1. Choix des spécimens à tester .....                                  | 32 |
| 2.3.2. Evaluation du changement d'aspect des échantillons .....            | 34 |
| 2.3.3. Déroulement standard des tests .....                                | 36 |
| 2.3.4. Détermination des variantes à tester.....                           | 39 |
| 2.4. Résultats et discussion.....  | 42 |

|        |  |     |
|--------|--|-----|
| 2.4.1. | Influence des sels de cuivre .....   | 42  |
| 2.4.2. | Influence des techniques visant à diminuer l'oxydation des pigments et des tissus.....   | 46  |
| 2.4.3. | Recettes spéciales.....  | 51  |
| 2.4.4. | Discussion générale sur la « fixation » de la chlorophylle .....   | 53  |
| 3.     | Prévenir la migration des « tannins » – ou maintenir le fluide clair.....  | 56  |
| 3.1.   | Coloration/brunissement des phénols.....   | 56  |
| 3.2.   | Techniques de préservation.....  | 57  |
| 3.3.   | Méthode et matériel .....  | 58  |
| 3.3.1. | Choix des spécimens à tester .....   | 58  |
| 3.3.2. | Déroulement standard des tests .....   | 60  |
| 3.3.3. | Détermination des variantes à tester.....  | 64  |
| 3.4.   | Résultats et discussion.....   | 66  |
| 3.4.1. | Ecorce de pin : polymérisation.....  | 66  |
| 3.4.2. | Orobanches : antioxydant et « hydrophobisation ».....  | 67  |
|        | Synthèse et perspectives .....   | 70  |
|        | Conclusion générale.....   | 74  |
|        | Glossaire.....   | 76  |
|        | Bibliographie .....  | 78  |
|        | Crédits photographiques.....   | 84  |
|        | Annexe I – Liste des recettes de préservation de la couleur.....   | 85  |
|        | Annexe II – Détail des paramètres des variantes testées.....   | 91  |
|        | Annexe III – Graphes colorimétriques.....  | 96  |
|        | Annexe IV – Graphes climatiques.....   | 109 |
|        | Annexe V – Photographies des échantillons.....   | 114 |
|        | Annexe VI – Colorimétrie : détermination de l'erreur de mesure .....   | 129 |
|        | Annexe VII – Calcul et titration du SO <sub>2</sub> .....  | 132 |
| 1.     | Calcul de la concentration en SO <sub>2</sub> d'après l'augmentation de volume .....   | 132 |
| 2.     | Titration du SO <sub>2</sub> dans les solutions contenant du SO <sub>2</sub> ou du Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> dissout ..... | 132 |
|        | Annexe VIII – Analyse des dérivés de chlorophylles par LC-MS .....   | 134 |
|        | Annexe IX – Liste des produits.....  | 138 |

## Résumé

Ce mémoire prend place au sein du projet LIQUOR, de l'unité de recherche en conservation-restauration de la Haute-Ecole Arc de Neuchâtel. Celui-ci s'articule autour de la conservation des plantes en fluide dans le cadre patrimonial, afin d'établir des recommandations à ce propos. Le présent travail traite plus spécifiquement de la question de la décoloration des parties vertes (chlorophylle) et du brunissement du fluide causés par la migration de substances brunes (« tannins »).

L'étude des moyens de préservation de la chlorophylle a commencé par une recherche des différentes recettes proposées au cours du XX<sup>e</sup> siècle. En se basant sur celles-ci, des tests de conservation ont été menés sur des feuilles de petits pois placées dans des éprouvettes. Ainsi, plusieurs séries ont été lancées pour évaluer l'impact des sels de cuivre, de divers antioxydants et d'autres substances sur le maintien de la couleur verte. Les résultats ont montré que le cuivre est effectivement capable de maintenir l'apparence verte plus longtemps, et ce probablement par une substitution de l'ion  $Mg^{2+}$  par un ion  $Cu^{2+}$  au sein de la chlorophylle. Cependant, les pigments ainsi modifiés restent suffisamment solubles dans l'éthanol pour que celui-ci soit prohibé en vue d'une conservation durable : l'utilisation d'une solution aqueuse contenant un antiseptique semble être la réponse à apporter pour contrer la migration du pigment. Le changement de couleur pour un vert plus bleu et terne ainsi qu'une sensibilité à long terme à la lumière restent problématiques.

Les tests de la seconde partie, sur le brunissement du fluide, ont été menés sur des échantillons d'écorce de pin (également en éprouvettes) et sur des orobanches (en bocal). Trois approches ont été expérimentées afin de prévenir ce phénomène. Premièrement, la polymérisation des phénols dans le spécimen pour les rendre insolubles a été testée sur l'écorce de pin : le formaldéhyde s'est révélé efficace. Deuxièmement, l'immersion définitive ou temporaire dans un liquide apolaire afin de prévenir la migration des pigments hydrosolubles a été évaluée sur des spécimens d'orobanche. Seule l'immersion définitive a été concluante en termes de coloration, mais un problème de microorganismes est survenu. Troisièmement, l'usage d'un antioxydant a également été testé sur les orobanches. Il a permis d'empêcher le brunissement, mais a altéré certaines couleurs du spécimen. A ce propos, un constat important est que ce phénomène de brunissement du fluide n'est pas nécessairement causé par des composés colorés *in vivo*. De plus, d'autres pigments que les tannins sont plus ou moins impliqués dans le phénomène, certains étant aussi vulnérables au blanchiment causé par l'antioxydant.

## Abstract

This master thesis is part of the LIQUOR project, of the cultural heritage conservation research unit of the University of Applied Science Arc in Neuchâtel (Switzerland). This project focuses on the conservation of plants in fluid in the context of heritage, to establish recommendations in this regard. The present work deals more specifically with the question of the discoloration of the green parts (chlorophyll) and the darkening of the fluid caused by the migration of brown substances ("tannins").

The study of the means of preserving chlorophyll began with a search of the various recipes proposed during the 20th century. Based on these, preservation tests were conducted on pea leaves placed in test tubes. Thus, several series were launched to evaluate the impact of copper salts, various antioxidants and other substances on the maintenance of the green color. The results showed that copper is indeed able to maintain the green appearance for a longer period, probably by a substitution of the  $Mg^{2+}$  ion by a  $Cu^{2+}$  ion within the chlorophyll. However, pigments modified in this way remain sufficiently soluble in ethanol that this solvent should be prohibited for long term preservation: the use of an aqueous solution containing an antiseptic seems to be the answer to counteract pigment migration. The change of color to a bluer and duller green as well as a long-term sensitivity to light remain problematic.

The second part tests, on fluid darkening, were conducted on pine bark samples (also in test tubes) and on broomrapes (in jars). Three approaches were tested to prevent this phenomenon. First, polymerization of phenols in the specimen to make them insoluble was tested on pine bark: formaldehyde proved effective. Second, permanent or temporary immersion in a non-polar liquid to prevent migration of water-soluble pigments was evaluated on broomrape specimens. Only permanent immersion was successful in terms of staining, but a problem with microorganisms occurred. Third, the use of an antioxidant was also tested on broomrape. It prevented browning but altered some colors of the specimen. In this regard, an important finding is that this fluid darkening phenomenon is not necessarily caused by *in vivo* colored compounds. Moreover, other pigments than tannins are more or less involved in the phenomenon, some of them being also vulnerable to bleaching caused by the antioxidant.

## Introduction générale

Les collections de plantes en fluide sont relativement méconnues et discrètes en comparaison de celles relatives au règne animal. Cela s'explique probablement par leur aptitude à être conservées par séchage, en herbier, ce qui est à la fois plus simple et moins coûteux. En revanche, si elles sont actuellement plus rares ou plus discrètes, l'attrait pour cette technique de préservation particulière semble être souvent allé de pair avec celui pour les spécimens zoologiques : ainsi, la découverte du saint-graal qu'est la conservation en formol\* a été expérimentée simultanément pour les deux par Isaac et Ferdinand Blum dans les années 1890<sup>1</sup>.

Il arrive donc que ce type de collections soient momentanément oubliées – ce qui accroît leur attrait lorsqu'elles sont pour ainsi dire redécouvertes. C'est précisément ce qui est arrivé à la collection de l'Université de Zürich : lors de son travail de master en conservation-restauration, en 2016, Mme Marion Dangeon a pu mesurer l'étendue de l'intérêt et de la complexité de cette collection. Cela a conduit à la formation du projet FLUIDIS en 2019, qu'elle a mené avec Dre Laura Brambilla de l'unité de recherche en conservation de la Haute-Ecole Arc de Neuchâtel. Ce premier volet, visant à mieux appréhender les différents paramètres influant sur la décoloration des spécimens conservés en fluide, a été suivi par le projet LIQUOR en 2021. Celui-ci se divise en quatre modules – enquête sur les valeurs que portent ces collections, définition d'un fluide approprié, amélioration de la tenue des couleurs, et sélection d'un matériau de scellement idoine – qui doivent aboutir à un cinquième : la mise en place d'un protocole de conservation des spécimens botaniques en fluide.

Le présent travail s'inscrit dans la troisième partie de ce projet, qui se focalise sur la problématique du maintien des couleurs. Ces dernières ne sont souvent pas ou très mal conservées, les spécimens en fluide évoluant généralement vers un brun-jaune – voire un brun foncé. Durant le siècle passé, certains botanistes ou conservateurs ont proposé des recettes afin de contrer ce processus. Malgré cela, le scepticisme est toujours de mise pour certains. Le but de ce travail est donc d'évaluer l'effet de ces recettes *a priori* peu pratiquées, actuellement, et de manière plus générale d'estimer à quel point la conservation de certaines teintes est envisageable.

En raison de sa durée, ce travail s'est focalisé sur deux familles de pigments\*<sup>2</sup>, les autres étant abordées par les autres membres du projet. Il s'agit de la chlorophylle et des tannins. La première a été choisie car elle est quasi-omniprésente dans le règne végétal et que la majorité des recettes historiques la concerne ; la problématique principale est sa dégradation rapide. Les tannins ne constituent pas une famille bien définie, comme il le sera exposé plus loin, mais ils sont emblématiques de la seconde problématique liée à la décoloration. En effet, il arrive qu'une substance colorante migre dans le fluide et rende ce dernier non seulement coloré, mais éventuellement opaque au point de ne plus pouvoir distinguer le spécimen ! C'est ce qu'avait constaté Mme Marion Dangeon avec des boutons de rafflesia

---

<sup>1</sup> Musiał *et al.*, 2016, p. 33-34.

<sup>2</sup> Les mots marqués d'un astérisque sont référencés dans le Glossaire, p.76-77.

notamment, qui avaient totalement noirci le liquide malgré plusieurs changements. Il convient de préciser que ce travail se focalise sur les plantes terrestres, la question des algues n'étant pas explicitement abordée. Il en va de même pour les champignons, inclus dans la discipline de la botanique mais appartenant à un autre règne.

Le présent document s'articule en trois parties : une première qui présente la problématique de conservation des plantes en fluide en général, puis esquisse un portrait des différentes familles de pigments végétaux avant d'exposer les recettes existantes de manière assez générale. La seconde partie traite de la chlorophylle de manière plus détaillée, avec une description de la partie expérimentale et une discussion des résultats obtenus. La troisième partie, sur les « tannins », s'organise de manière similaire. Enfin, une synthèse précisant les points encore à explorer précède la conclusion.

## **1. Préservation de la couleur des spécimens botaniques en fluide**

### **1.1. Conserver les plantes en fluide**

#### 1.1.1. Pourquoi et quel matériel conserver ?

La méthode de conservation classique, pour les plantes, est par séchage et sous presse afin de créer des herbiers dont la conservation est relativement aisée. L'intérêt pour la méthode en fluide est avant tout liée aux études morphologiques, typiquement pour les spécimens dont le séchage et pressage sont dommageables pour la lecture de la structure et/ou difficile à mettre en place. Cela concerne notamment les fleurs complexes comme les orchidées, et les parties très charnues comme les fruits mous ou les succulentes en général. Le but du processus est donc avant tout d'avoir une bonne lecture de la structure du spécimen, de pouvoir prendre des mesures, dessiner sa forme, etc.<sup>3</sup>



*Fig. 1 : l'orchis bouc est un exemple typique de plante ayant des pièces florales complexes qu'un pressage ne pourrait conserver convenablement.*

---

<sup>3</sup> Bridson & Forman, 1998, p. 94 et communication orale de Dr. Jason Grant, professeur titulaire au laboratoire de génétique évolutive de l'Université de Neuchâtel, printemps 2021.

Il existe néanmoins d'autres raisons pour la préservation des végétaux en fluide, comme la conservation temporaire en vue de réaliser des coupes microscopiques, ou encore la volonté de pouvoir exposer certains spécimens à un public ciblé (étudiants) ou non (musées). C'est cette dernière raison, liée à la valeur pédagogique des spécimens ainsi préservés, qui fait le plus appel à la problématique de la conservation des colorations originales.

Cependant, la préservation de la couleur des plantes conservées en fluide ne semble pas être une nécessité pour nombre de botanistes passés et surtout actuels. En effet, si le but est de témoigner de la couleur exacte, ils préfèrent en principe utiliser des spécimens frais – les travaux pratiques des étudiants se calquent simplement sur la saison idéale, le printemps – ou sinon il leur suffit de prendre des photos des spécimens frais *in situ* – quitte à les cueillir ensuite pour une étude morphologique<sup>4</sup>. Il apparaît donc que cet intérêt concerne plutôt les musées, avec pour but la préservation de l'aspect globale des spécimens botaniques à exposer. Néanmoins, ceux-ci se tournent parfois vers les plantes artificielles, les modèles anatomiques ayant l'avantage de pouvoir représenter une version agrandie et plus compréhensible de certains détails<sup>5</sup>. Mais le recours à des alternatives fait aussi écho au manque de succès de la préservation des couleurs en fluide, ce qui implique que l'amélioration de ces techniques pourrait changer les habitudes dans le domaine<sup>6</sup>. Une enquête auprès de telles institutions patrimoniales sera réalisée prochainement par l'équipe du projet LIQUOR afin de mieux définir quelles sont leurs pratiques, besoins et attentes en la matière.

Dans tous les cas, il se trouve que la question de la conservation des couleurs en fluide a intéressé plus d'un scientifique ou technicien jusqu'à aujourd'hui. Il n'est pas impossible que le manque d'intérêt de certains acteurs du domaine pour ces techniques de préservation soit dû à un certain fatalisme, la conservation parfaite de la plupart des couleurs à long terme étant *a priori* une cause perdue. En effet, les pigments organiques sont par leur nature habituellement au centre de réactions photochimiques<sup>7</sup>. Il y a donc une suspicion envers certaines recettes de ne jouer qu'un rôle de teinture, sans réellement préserver les pigments de la plante. C'est le cas de celles qui emploient des sels de cuivre pour préserver la couleur verte des végétaux<sup>8</sup>.

Par ailleurs, la conservation en fluide présente un problème y compris pour les personnes qui ne souhaitent pas conserver la couleur : la migration des pigments dans le fluide peut rendre celui-ci opaque ou du moins altérer la visibilité du spécimen. Si un renouvellement du fluide peut paraître être une solution aisée, il arrive dans certains cas que l'extraction de substance colorante continue après

---

<sup>4</sup> Communications orales de Dr. Jason Grant, professeur titulaire au laboratoire de génétique évolutive de l'Université de Neuchâtel, et de Dr. Alexander Kocyan, directeur du Musée Botanique de l'Université de Zürich, 2020- 2021.

<sup>5</sup> Hangay & Dingley, 1985, p. 23. Ces modèles sont aussi très utilisés pour l'enseignement dans les écoles : communication écrite de Dr. Alexander Kocyan, directeur du Musée Botanique de l'Université de Zürich, 06.07.2021.

<sup>6</sup> Communication écrite de Dr. Alexander Kocyan, directeur du Musée Botanique de l'Université de Zürich, 06.07.2021

<sup>7</sup> Davies, 2004, p. 1 et 6.

<sup>8</sup> Plus de détails à ce sujet au chapitre 2.2.1 - *Recettes existantes*, p. 28.

plusieurs changements<sup>9</sup>. Cela implique une manipulation répétée qui peut être malcommode si la méthode de scellement n'est pas prévue pour une ouverture régulière ou que le spécimen doit être exposé au public<sup>10</sup>.

### 1.1.2. La conservation des plantes en fluide en général

Le principe (actuel) de conservation en fluide de spécimens issus du règne végétal ou animal peut être résumé en deux étapes : la fixation et la conservation. La première n'a pas de définition précise, mais les buts principaux recherchés sont de tuer les tissus, de stopper tout processus d'autolyse, et si possible de renforcer les tissus fragiles en limitant au maximum les dommages macro et micro-structuraux<sup>11</sup>. Une distinction est faite entre les « vrais » fixateurs qui sont capables de créer des liaisons covalentes entre les protéines (donc un renfort structurel) et ceux qui ne provoquent qu'une coagulation de celles-ci - donc une dénaturation, ce qui permet de stopper l'autolyse enzymatique<sup>12</sup>. Ceux de la première catégorie sont des aldéhydes, dont le formaldéhyde est le plus connu, alors que ceux de la seconde sont de nature plus variée : alcools, acides organiques et cétones notamment.

Pour la présente étude, la nécessité de la présence d'un « vrai » fixateur dans la recette ne sera pas débattue pour deux raisons : premièrement, la discipline la plus concernée par une éventuelle préservation de la couleur d'origine semble être l'étude morphologique et non l'anatomie, l'histologie, la cytologie ou autre discipline dont l'observation est de l'ordre du microscopique<sup>13</sup>. Or, les aldéhydes permettent de réticuler un réseau de protéines<sup>14</sup>, mais il semblerait que la littérature ne parle pas d'un éventuel effet sur les polysaccharides, qui constituent l'essentiel de la paroi cellulaire végétale<sup>15</sup>. Il est donc probable que l'effet de renforcement des tissus protéiques offert par les aldéhydes ne soit pas absolument nécessaire au maintien structurel de la plupart des végétaux<sup>16</sup>.

Deuxièmement, la question principale de la présente étude concerne le maintien de la teinte et non de la structure macro ou microscopique. Si une destruction trop importante de la première est constatée, cela sera cependant pris en compte dans l'évaluation des résultats. Ainsi, la phase dite de fixation au

---

<sup>9</sup> Communication orale de Mme Marion Dangeon, conservatrice-restauratrice au Musée Botanique de Zürich notamment, automne 2020.

<sup>10</sup> Cette problématique sera traitée dans la partie 3 - *Prévenir la migration des « tannins » – ou maintenir le fluide clair*, p. 56.

<sup>11</sup> Pour plusieurs propositions de définitions, selon le point de vue disciplinaire, voir : Simmons, 2014, p. 26. Le fait de « tuer » les tissus n'y est pas mentionné, mais il semble que la mort des tissus est très souvent associée à la fixation. Voir par exemple : Feder & O'Brien, 1968, p. 123.

<sup>12</sup> Venteo & Velot, 2010, p. 26 et Simmons, 2014, p. 26 et 27.

<sup>13</sup> Voir : 1.1.1 - *Pourquoi et quel matériel conserver ?*, p. 6-7. De plus, il est probable que pour une observation à l'échelle microscopique (par exemple des organelles dans la cellule) il soit plus intéressant d'effectuer des teintures sélectives que de conserver la couleur majoritaire d'origine.

<sup>14</sup> Venteo & Velot, 2010, p. 26.

<sup>15</sup> Il y a néanmoins des protéines insérées dans la matrice polysaccharidique, mais en faible nombre comparativement : Albenne *et al.*, 2014, p. 225.

<sup>16</sup> La proposition d'utiliser un fluide ne contenant pas de formaldéhyde, pour les spécimens dédiés aux études morphologiques, semble aller dans ce sens : Bridson & Forman, 1998, p. 226. Néanmoins, il semblerait que le formaldéhyde utilisé en fixation ait bel et bien un effet durcissant sur les tissus végétaux (Granget, Elodie. 2021. « Traitement des données FLUIDIS - 18 mois » UR-Arc CR, Rapport intermédiaire LIQUOR, non publié), et est recommandé pour les spécimens très délicats destinés aux études anatomiques : Bridson & Forman, 1998, p. 226.

sens classique ne sera pas étudiée. Néanmoins, comme la plupart des recettes de préservation de la couleur propose une phase initiale visant à « fixer » la couleur du spécimen frais avant de le placer dans un fluide de conservation<sup>17</sup>, le terme de « fixation » sera utilisé faute de mieux mais avec un sens complètement différent de celui classiquement attribué dans le domaine. Pour éviter toute confusion, le terme sera utilisé dans ce sens uniquement avec des guillemets<sup>18</sup>.

Le fluide utilisé pour la conservation peut être évalué selon plusieurs caractéristiques. La liste ci-dessous reprend l'essentiel des propositions de van Dam et de Simmons<sup>19</sup>, discutées en fonction de la présente problématique :

- **Effet antiseptique** : simple inhibition (*-statique*) ou destruction (*-cide*), différents microorganismes (*bactéri-*, *fongi-*). C'est la caractéristique principale d'un fluide conservateur. La notion ne sera pas approfondie ici, bien qu'évoquée lorsque nécessaire, notamment car il faudrait probablement réaliser des tests à plus long terme pour vérifier l'efficacité antiseptique.
- **Equilibre hydrique** : le remplacement de l'eau par un autre solvant cause souvent une rétraction des tissus, et parfois un gonflement (acide acétique). Cela concerne aussi et surtout le fluide de fixation, mais si celui de conservation est de nature différente alors il se peut qu'un changement dimensionnel intervienne après le transfert. Si cela peut induire des modifications chromatiques importantes dans le cas des couleurs « physiques » de certains tissus animaux<sup>20</sup>, cela devrait avoir un effet plus modéré sur l'aspect des plantes dont la couleur semble rarement entièrement due à ce phénomène. Cela pourrait néanmoins nuire à une éventuelle étude morphologique menée sur le spécimen.
- **Domaine de solubilité** : si l'agent antiseptique n'est pas l'unique solvant et qu'il est soluble en milieu apolaire, alors il risque de migrer dans les tissus gras et de faire perdre sa propriété antimicrobienne au fluide. Ce problème ne devrait pas être marqué avec la majorité des plantes, globalement moins riches en lipides que les animaux.
- **pH** : l'effet antiseptique ne devrait pas être dépendant du pH ou au moins être efficace dans la fourchette attendue d'utilisation. La régulation du pH peut être utile pour sélectionner quels types de composés on souhaite préserver, mais il n'est généralement pas possible de trouver un domaine qui convienne à tous.
- **Etat liquide** : cela semble évident, mais certains produits utilisés dans la conservation en fluide peuvent se figer à basse température<sup>21</sup> alors que d'autres pourraient être trop près de leur point

---

<sup>17</sup> Voir le chapitre 1.2. - *Historique de la conservation des couleurs des plantes en fluide*, p. 22.

<sup>18</sup> A l'exception éventuelle des abréviations, typiquement *fix.* opposé à *cons.* pour différencier la phase durant laquelle telle solution est utilisée.

<sup>19</sup> van Dam, 2003, p. 105-106 et Simmons, 2014, p. 300.

<sup>20</sup> Simmons, 2014, p. 75-76.

<sup>21</sup> Par exemple, le formaldéhyde tend à se polymériser en paraformaldéhyde vers les 14°C et en dessous (Simmons, 2014, p. 103), ou encore le *tert*-butanol proposé pour la conservation des fleurs rouges et bleues par Wagstaffe & Fidler a son point de fusion à 25°C – mais les auteurs suggèrent que la solution (comprenant d'autres ingrédients) reste liquide jusqu'à 18°C. Voir : Wagstaffe & Fidler, 1968, p. 292.

d'évaporation et poser rapidement des problèmes si l'étanchéité du scellement n'est pas parfaite<sup>22</sup>.

- **Effet fixatif** : ce n'est pas nécessaire pour un fluide de conservation, mais certains contiennent néanmoins du formaldéhyde, probablement soit parce qu'il s'agit d'une recette « deux en un » (sans fixation précédant la conservation), soit parce que l'on considère que faire perdurer le processus de fixation est bénéfique, et/ou encore parce que l'on profite essentiellement de ses propriétés antiseptiques<sup>23</sup> qui permettent de l'utiliser en faible concentration dans une phase essentiellement aqueuse.
- **Préservation de la couleur** : ce n'est pas une caractéristique communément recherchée, probablement car la perte de la couleur originale a été souvent acceptée comme un mal nécessaire ou qu'elle permettait la teinture sélective des parties voulues<sup>24</sup>. Cette dernière option implique aussi une aptitude à préserver la couleur de la part du fluide de conservation, mais les problématiques diffèrent quelque peu et souvent il s'ensuit une préparation histologique complète et non pas une préservation en fluide sur le long terme<sup>25</sup>. Dans le cas des plantes, la préservation de la couleur semble avoir suscité plus d'intérêt, mais l'étape cruciale se joue souvent lors de la « fixation » et moins lors de la conservation.
- **Stabilité à long terme** : la lumière, l'oxygène de l'air ou encore la température ambiante sont autant de facteurs qui peuvent altérer un fluide de conservation sur le long terme. En plus, le(s) solvant(s) et éventuels autres produits antiseptiques devraient être relativement inertes chimiquement en présence de sels couramment utilisés comme tampons.
- **Couleur et transparence** : un bon fluide de conservation doit permettre l'observation détaillée du spécimen sans avoir besoin de le sortir, ce qui implique qu'il soit incolore et transparent.
- **Toxicité et inflammabilité** : ces caractéristiques indésirables sont inhérentes au domaine de la conservation en fluide, le formaldéhyde étant cancérigène et l'éthanol inflammable, entre autres. Toutefois, la tendance est à un usage plus modéré des substances les plus dangereuses, dans la mesure du possible<sup>26</sup> – et certaines ont déjà été abandonnées<sup>27</sup>. Dans cette étude, cette question ne sera pas centrale car la réussite de la préservation de la couleur des plantes est suffisamment difficile pour ne pas imposer de limites supplémentaires. Les composés hautement dangereux seront néanmoins éliminés d'office.
- **Coût et disponibilité** : cette contrainte est moins évidente dans le cadre d'une étude en laboratoire, mais il faudrait tenir compte de la faisabilité d'une recette proposée à grande échelle et aussi en tant que solution à utiliser *in situ* lors d'études de terrain.

---

<sup>22</sup> Typiquement l'éthanol ; voir : Simmons, 2014, p. 62.

<sup>23</sup> C'est un antiseptique puissant : van Dam, 2003, p. 108.

<sup>24</sup> Voir aussi le chapitre 1.1.1. *Pourquoi et quel matériel conserver ?*, p. 6.

<sup>25</sup> Sur le sujet de la préparation microscopique, voir : Johansen, 1940.

<sup>26</sup> Le formaldéhyde est toutefois difficilement remplaçable : Moore, 2009.

<sup>27</sup> Typiquement le « sublimé corrosif » ou chlorure de mercure, très utilisé durant les deux derniers siècles. Voir notamment la liste de recettes recensées par Simmons : Simmons, 2014, p. 199 – 274 ; voir aussi p. 53.

Le focus du présent travail portant sur le maintien de la couleur d'origine, c'est cet aspect qui sera le plus étudié. Les différentes caractéristiques nécessaires à une bonne fixation et conservation en général ne pouvant pas être ignorées, elles seront néanmoins gardées en arrière-plan et discutées lorsque nécessaire.

## **1.2. Les pigments des plantes**

### 1.2.1. Introduction

Le règne végétal dispose de toute une palette de pigments dont les fonctions sont très souvent multiples, et la teinte produite non-exclusive. Ainsi, il semble plus pertinent de les classer par familles chimiques – quoique cette notion puisse aussi faire preuve d'une certaine perméabilité. C'est ce dernier système de classification qui a été présentement retenu, mais l'ordre de présentation tiendra compte des autres considérations : les familles de pigments directement impliqués dans la photosynthèse seront présentées en premier, puis celles dont les rôles sont habituellement moins considérés comme vitaux. Puis viendront les familles de pigments dont la répartition taxonomique est faible, et enfin ceux qui ne sont pas toujours présentés en tant que colorants. A ce propos, il convient de noter que si le blanc peut être dû à la présence de pigments (blanc-crème, ou blanc mais absorbant dans les UV), il peut aussi être dû à l'absence de pigments (air dans les cellules). Enfin le noir, très rare, est généralement dû à la saturation d'un pigment dont les concentrations habituelles le font paraître d'une certaine couleur (violet typiquement)<sup>28</sup>.

### 1.2.2. Les chlorophylles et autres tétrapyrroles

Les tétrapyrroles sont des molécules comportant quatre cycles aromatiques de cinq atomes dont 1 d'azote (=pyrrole), linéaires ou cycliques. Dans le premier cas, il s'agit le plus souvent de catabolites ou de produits intermédiaires, mais certaines ont bel et bien un rôle typique de pigment<sup>29</sup>, comme les phycobillines chez les cyanobactéries et les rhodophycées\*, par exemple<sup>30</sup>. Les tétrapyrroles cycliques – ou porphyrines – ont un rôle prépondérant chez les plantes vertes.

En effet, cette famille de pigment pourrait se résumer à « la chlorophylle », en termes d'importance chromatique observée. Toutefois, ce terme ne devrait pas être employé au singulier : il existe plusieurs variantes de chlorophylles, dont deux sont nettement majoritaires chez les plantes terrestres. Les chlorophylles *a* et *b* (Fig. 2 et 3, p. 12) y sont quasi omniprésentes, à différentes concentrations relatives, mais toujours avec une majorité de la première par rapport à la seconde<sup>31</sup>. Si les différentes chlorophylles présentent des spectres d'absorption de la lumière visible légèrement différents, toutes se situent dans les tons verts – et c'est là l'apanage de cette famille<sup>32</sup>.

---

<sup>28</sup> Młodzińska, 2009, p. 13-14.

<sup>29</sup> Les rôles principaux des pigments sont de participer au processus de photosynthèse et/ou d'être liés à la fonction reproductive, mais il y en a d'autres, de défense notamment. Davies, 2004, p. 5-10.

<sup>30</sup> Delgado-Vargas *et al.*, 2000, p. 185.

<sup>31</sup> Davies, 2004, p. 23-24.

<sup>32</sup> En effet, les autres familles de pigments ne permettent en principe pas d'obtenir des tons verts. Les pigments à base tétrapyrrole autre que les chlorophylles peuvent avoir d'autres teintes, mais ils ne sont pas présents dans les

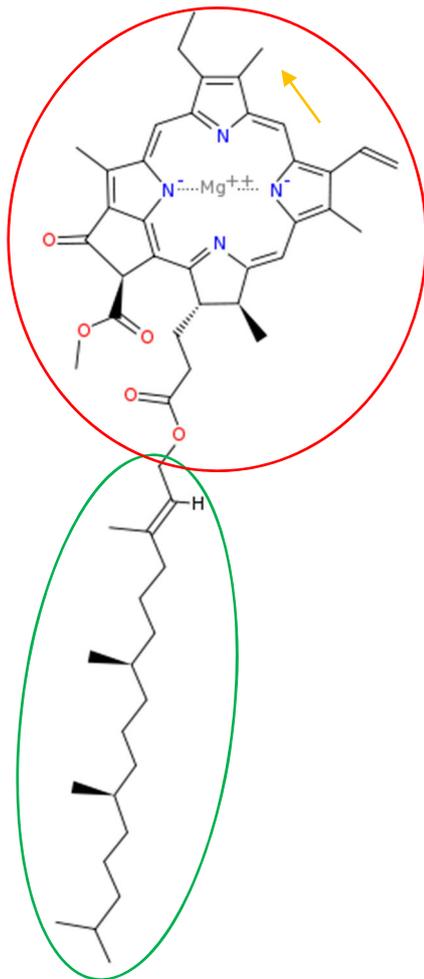


Fig. 2 : chlorophylle a ; le tétrapyrrole cyclique (rouge) caractérise les chlorophylles et leurs dérivés ; la chaîne phytyle (verte) est plutôt labile.

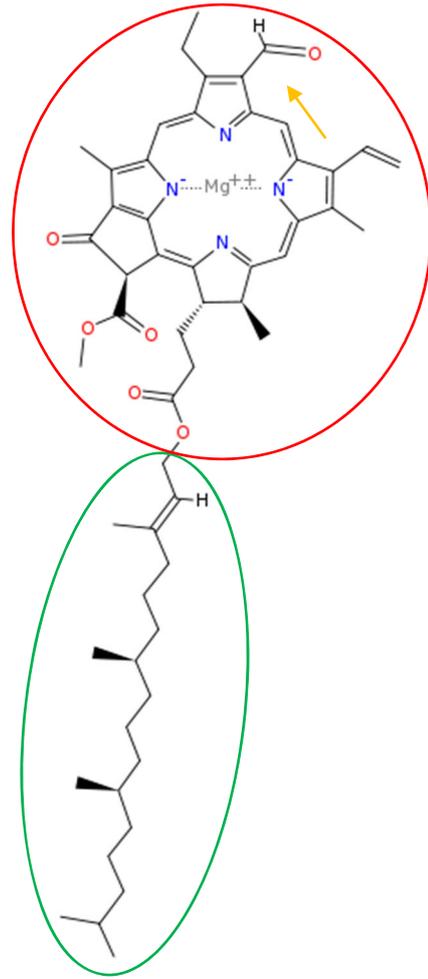


Fig. 3 : chlorophylle b ; la seule différence avec la chlorophylle a se trouve dans le remplacement d'un groupe méthyle par un aldéhyde (flèche jaune).

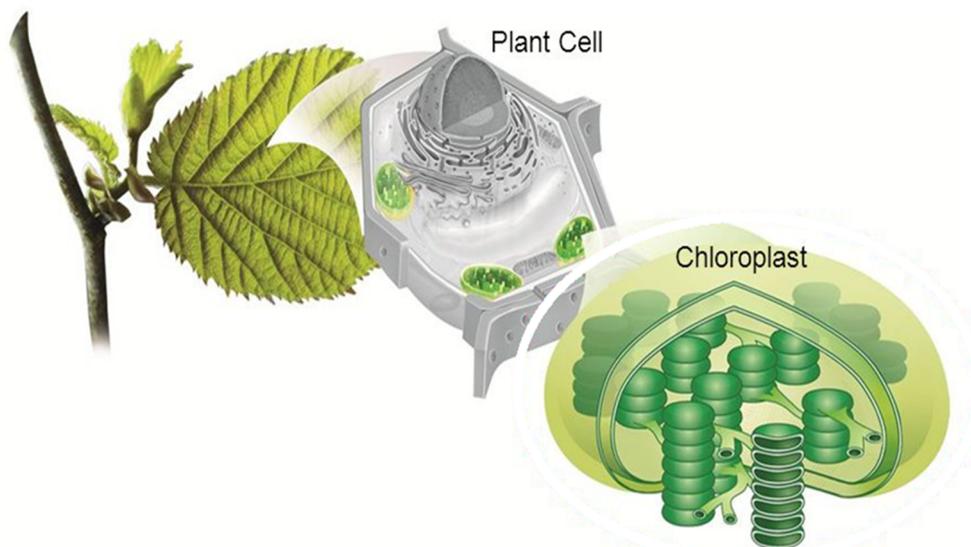


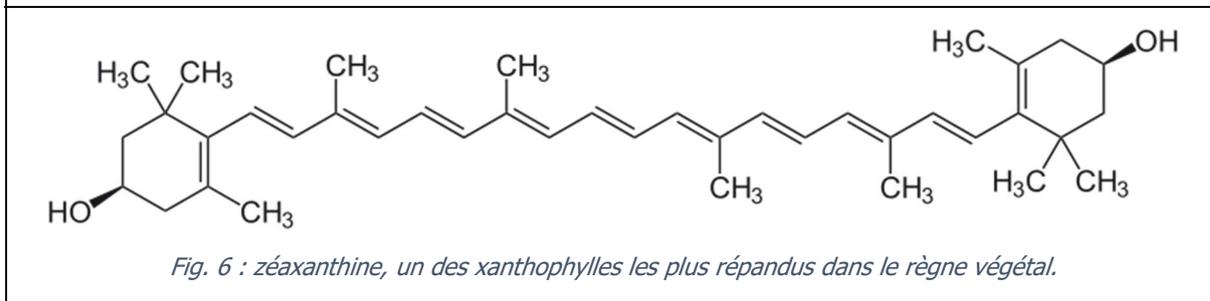
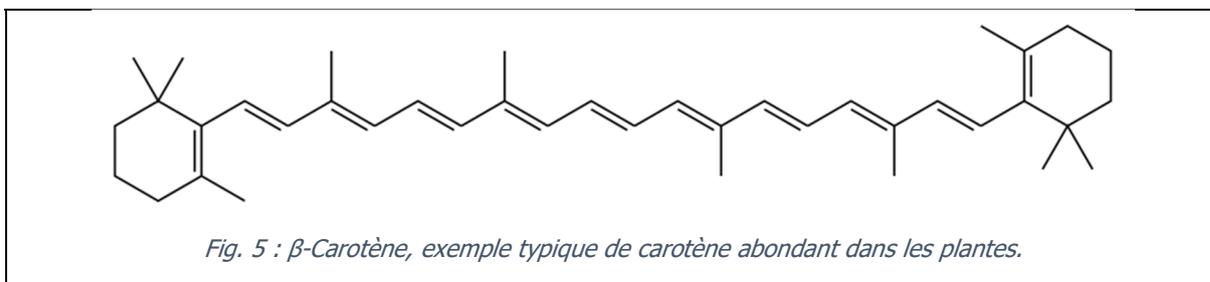
Fig. 4 : schéma des chloroplastes dans une cellule végétale, et du thylakoïde au sein de ce dernier.

plantes terrestres (phycobillines) ou probablement en trop faible quantité pour avoir une influence. En effet, les plantes contiennent aussi de l'hème, par exemple : Espinas *et al.*, 2012.

Le rôle désormais célèbre de ces molécules est de participer directement à la photosynthèse en captant une partie de l'énergie du rayonnement électromagnétique émise par le soleil. Pour cette raison, on retrouve les chlorophylles essentiellement dans les feuilles, bien qu'il y en ait aussi parfois sur les tiges, les fruits ou les fleurs. Au sein d'une cellule, les chlorophylles se trouvent dans le thylakoïde, une structure membraneuse formant de petits empilements (*grana*) et se situant dans les chloroplastes (Fig. 4)<sup>33</sup>. Pour plus de détails sur les chlorophylles, voir le chapitre 2.1 *Les chlorophylles : structure et dégradation*, p. 24.

### 1.2.3. Les terpénoïdes

Autrement appelées isoprénoïdes, ces molécules se caractérisent par leur unité de base isoprène (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>, deux liaisons insaturées) dont le double s'appelle terpène (C<sub>10</sub>). Si plusieurs pigments se trouvent dans la famille des iridoïdes (monoterpénoïdes), ils n'ont qu'une importance mineure par rapport aux caroténoïdes – soit les carotènes et leurs variantes oxygénées, les xanthophylles<sup>34</sup>. La plupart de ces pigments sont des tétraterpénoïdes relativement symétriques (Fig. 5 et 6).



Les caroténoïdes participent à la photosynthèse au côté des chlorophylles, à la fois directement en captant de l'énergie qu'ils transfèrent au système chlorophyllien, et en protégeant ces derniers d'un éventuel excès de radiation<sup>35</sup>. Ce rôle crucial explique l'omniprésence de ces pigments chez les organismes photosynthétiques. Leurs teintes varient du jaune au rouge en passant par l'orange, et se dévoilent notamment à l'automne lorsque la chlorophylle se dégrade<sup>36</sup>.

Si les plus connus d'entre eux sont tous présents dans les feuilles au sein des chloroplastes, une plus grande diversité de cette large famille (plus de 600 variantes) participe aux teintes des fleurs et des

<sup>33</sup> Buchanan *et al.*, 2015, p. 510.

<sup>34</sup> Delgado-Vargas *et al.*, 2000, p. 193

<sup>35</sup> Młodzińska, 2009, p. 10

<sup>36</sup> Coder, 2012.

fruits, avec parfois une spécificité telle qu'elle permet l'identification d'une espèce. On en retrouve aussi dans les racines, les tubercules et même dans le bois de certaines essences d'arbre<sup>37</sup>.

#### 1.2.4. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont une famille très large (plus de 7000 espèces chimiques identifiées<sup>38</sup>) dont la caractéristique commune est un squelette (Fig. 7) formé d'une unité benzopyrane (= cycle benzénique + hétérocycle avec O) lié à un groupe phényle (= cycle benzénique moins un H substitué). Le nom de cette famille provient du latin *flavus*, « jaune », qui est la teinte donnée par de nombreux membres des sous-groupes aurones, chalcones, flavonols et flavones notamment<sup>39</sup>. Certains d'entre eux ne donnent qu'une couleur crème, voire sont incolores, mais ont néanmoins un rôle important dans la pigmentation des plantes car ils absorbent les UV (contraste utile pour les insectes avec les carotènes qui les renvoient) ou encore peuvent influencer la teinte d'autres pigments par co-pigmentation<sup>40</sup>. Ce phénomène se produit avec les anthocyanes, qui sont le groupe de flavonoïdes le plus important en termes de diversité de couleurs, allant du bleu au rouge et même à l'orange, en passant par toute une gamme de violets<sup>41</sup>. Ces pigments sont en fait des hétérosides, la moitié aglycone dite « anthocyanidine » ayant besoin de sa liaison avec un ose\* (Fig. 9) pour être suffisamment stable<sup>42</sup>. Enfin, les tannins condensés sont également présents dans de nombreuses plantes, mais ne permettent que des teintes brun-rouge. Ils sont aussi appelés « proanthocyanidines », car des anthocyanes résultent de leur hydrolyse acide<sup>43</sup>. A propos de cette catégorie, voir le chapitre 1.1.8 *Les « tannins », des polyphénols ambigus*, p. 9.

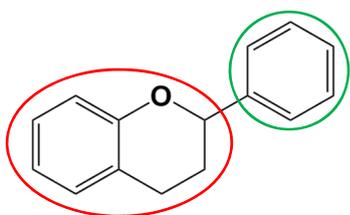


Fig. 7 : structure de base des flavonoïdes, composée d'un benzopyrane (rouge) et d'un phényle (vert).

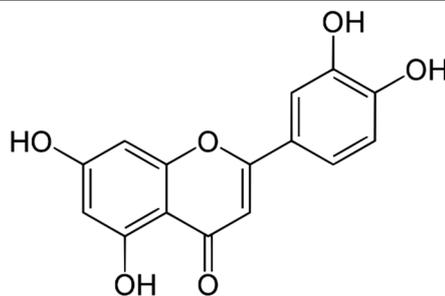


Fig. 8 : lutéoline, une flavone qui doit son nom à une plante tinctoriale célèbre, la gaude.

<sup>37</sup> Davies, 2004, p. 3 et Delgado-Vargas *et al.*, 2000, p. 197-198

<sup>38</sup> Davies, 2004, p. 2.

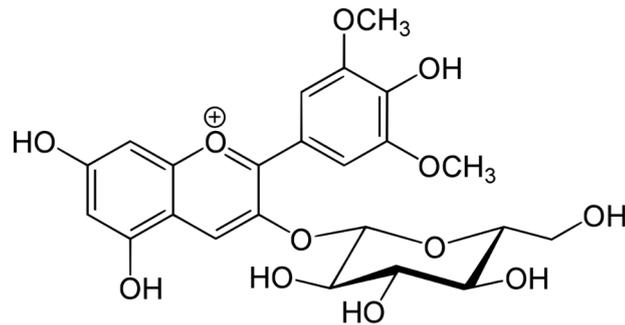
<sup>39</sup> Davies, 2004, p. 7-8.

<sup>40</sup> Delgado-Vargas *et al.*, 2000, p. 186.

<sup>41</sup> En réalité, la gamme de couleur théoriquement possible s'étend aussi au vert et au jaune, mais il semblerait que des milieux au pH suffisamment basique pour cela n'existe pas dans les plantes.

<sup>42</sup> Morata *et al.*, 2019, p. 383.

<sup>43</sup> Dixon *et al.*, 2005.



*Fig. 9 : malvidin-3-glucoside, ou variante (simple) de combinaison d'une anthocyanidine (basé sur le cation flavylum, soit un flavonoïde comportant un ion oxonium) avec un sucre donnant ainsi un anthocyane à proprement parler.*

Les flavonoïdes ne participent pas directement au processus de photosynthèse, et sont probablement apparus après les terpénoïdes et les tétrapyrroles<sup>44</sup>. Néanmoins, en plus de leur rôle visible dans les tissus reproducteurs, il semblerait qu'ils puissent participer à protéger le complexe photosynthétique de radiations excessives et aider à réabsorber l'azote lors de la sénescence des feuilles à l'automne – c'est pourquoi il y en a beaucoup plus dans les tissus à cette période, contrairement aux carotènes déjà présents mais masqués par la chlorophylle<sup>45</sup>. A l'inverse des deux familles précédentes, les pigments flavonoïdes sont localisés dans la vacuole et non dans les plastides<sup>\*46</sup>.

#### 1.2.5. Les bétalaïnes

Les bétalaïnes ont bien des points communs avec les anthocyanes, comme le fait que leurs variantes bétacyanines soient liées à des groupements oses et acyles (Fig. 10). Néanmoins, leur structure de base – dérivée de la tyrosine – est très différente : une molécule d'acide bétalamique liée à un cyclo-DOPA dans le cas des bétacyanines et à un groupement amine dans le cas des bétaxanthines (Fig. 11)<sup>47</sup>. Ceci implique la présence de deux atomes d'azote dans des hétérocycles, dont l'un est chargé positivement (N<sup>+</sup>). Comme leur nom l'indique (xanthos = jaune), les bétaxanthines exhibent une couleur jaune alors que les bétacyanines ont plutôt des teintes variant entre les rouges et les pourpres.

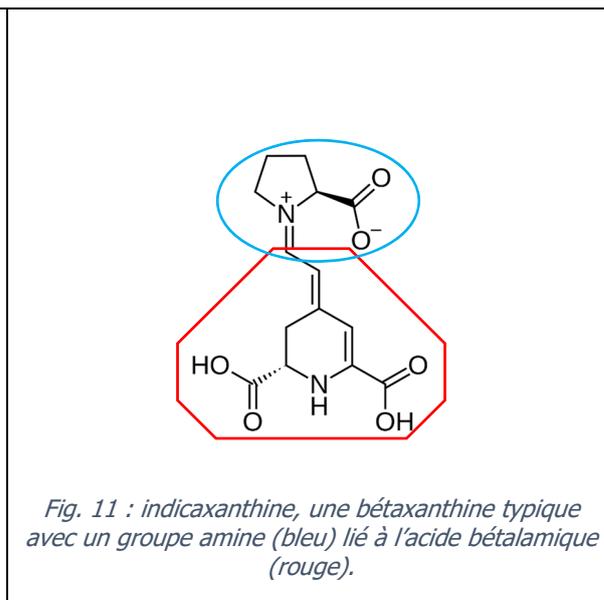
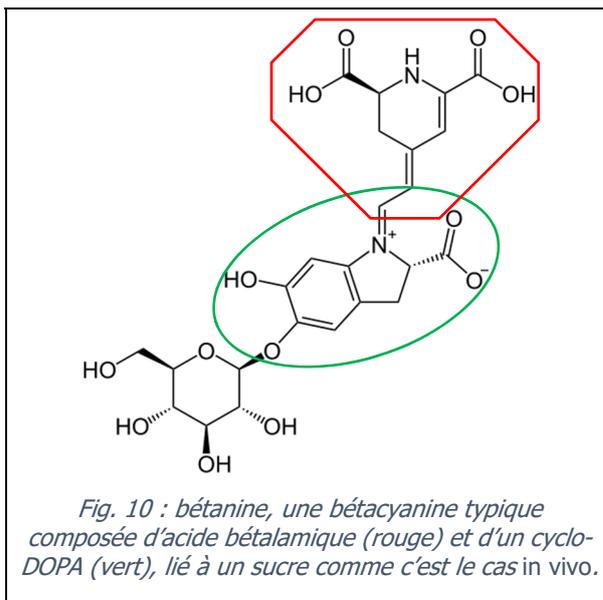
---

<sup>44</sup> Martin 1995, p. 50-51.

<sup>45</sup> Swami *et al.*, 2020, p. 567-568 et Coder, 2012.

<sup>46</sup> Davies, 2004, p. 3.

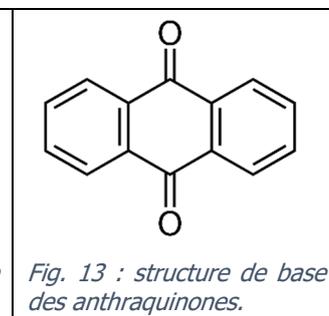
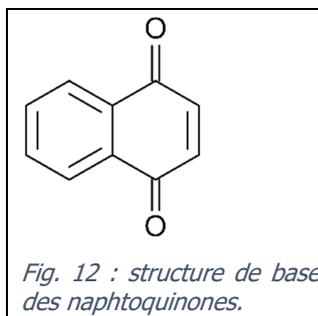
<sup>47</sup> Tanaka *et al.*, 2008.



Les bétalaines comme les anthocyanes se retrouvent dans des plantes vasculaires, mais ces deux familles de pigments sont mutuellement exclusives : les anthocyanes sont présents dans la plupart des espèces, à l'exception d'une majorité de celles de l'ordre des Caryophyllales, qui elles contiennent des bétalaines<sup>48</sup>. Ces dernières se retrouvent également dans la vacuole des cellules, et participent à la coloration aussi bien des fleurs et des fruits que des racines, des feuilles, etc.

### 1.2.6. Les quinonoïdes

Ce groupe partage comme trait commun un cycle benzénique dont deux hydrogènes ont été substitués par deux oxygènes doublement liés au carbone correspondant (groupe carbonyle) ; ceci intervient le plus souvent sur des carbones opposés (Fig. 12 et 13). Les quinones sont une famille de molécules très



variées et qui interviennent de diverses manières dans le métabolisme des plantes (photosynthèse notamment), mais ceux qui sont considérés comme des pigments appartiennent aux deux sous-groupes suivants : naphthoquinones (ajout d'un cycle benzénique au cycle quinonique) et anthraquinones (ajout d'un cycle benzénique de chaque côté du cycle quinonique)<sup>49</sup>.

En termes d'occurrence dans les végétaux, les colorants quinoniques sont relativement négligeables, comparés aux familles présentées précédemment. En revanche, ils constituent une famille importante selon le point de vue de l'histoire de la teinture. En effet, l'alizarine (anthraquinonique) et la juglone (naphthoquinonique) sont les colorants principaux de la garance et du brou de noix<sup>50</sup>, par exemple.

<sup>48</sup> Tanaka *et al.*, 2008.

<sup>49</sup> Delgado-Vargas *et al.*, 2000, p. 182-183.

<sup>50</sup> Montazer *et al.*, 2004, p. 162.

### 1.2.7. Divers

Il existe encore de nombreux types de pigments végétaux, mais ils sont plutôt rares. Par exemple, les indigoïdes que l'on trouve dans l'indigotier, la guède et diverses autres plantes. Toutefois, ce ne sont pas réellement des pigments *in vivo* mais uniquement des précurseurs qui s'oxydent et deviennent bleus une fois exposés à l'air – ce qui rapproche leur problématique de celle des tannins<sup>51</sup>. Les dihydropyranes constituent une autre petite famille de pigments assez souvent cités car ils donnent leur teinte à plusieurs bois tropicaux (pernambouc, campêche). Ce sont des molécules assez proches des flavonoïdes<sup>52</sup>. De manière générale, la plupart de ces familles rares ont une base phénolique et des caractéristiques qui peuvent les rapprocher d'un groupe plus large (typiquement flavonoïdes ou quinones), mais ils ont soit une biosynthèse différente soit un arrangement plus complexe et/ou inhabituel. Parmi ceux présents dans des plantes dont le pouvoir tinctorial est reconnu, il convient de citer : les quinochalcons (carthame), les diarylheptanoïdes (curcuma) ou encore les méthides de quinone (dragonnier, santal)<sup>53</sup>.

### 1.2.8. Les « tannins », des polyphénols ambigus

Cette catégorie n'est pas toujours aisée à cerner, notamment parce qu'elle regroupe des molécules de diverses origines biosynthétiques. De plus, la problématique de leur aspect coloré ou non, cruciale en l'occurrence et discutée plus loin dans ce chapitre, ajoute à la confusion. Mais de manière générale, les rôles primaires des tannins sont plutôt tournés vers la défense de la plante contre les agressions extérieures<sup>54</sup> que vers les messages visuels à but reproductif ou la photosynthèse. Néanmoins, cela dépend encore de la définition qu'on veut bien leur donner.

Le terme « tannin », provenant du tan ou poudre d'écorce de chêne utilisée pour tanner le cuir<sup>55</sup>, est effectivement utilisé de manière assez variable : il peut par exemple simplement désigner une substance tannante (apte à se lier aux protéines, donc à les dénaturer, et à provoquer une réticulation entre elles) ou alors exprimer l'ensemble des polyphénols du règne végétal<sup>56</sup>. Actuellement, il semble néanmoins qu'il y ait une sorte de consensus scientifique autour de la définition donnée par Swain & Bate-Smith en 1962<sup>57</sup>. Ainsi les tannins seraient des composés phénoliques hydrosolubles ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3'000 g/mol – ce sont des oligomères. Cette définition comprend donc certains composés que l'on pourrait classer autrement, tels les proanthocyanidines présentés plus haut (1.1.4 *Les flavonoïdes*, p. 6) dans la grande famille des flavonoïdes.

Habituellement, les tannins sont divisés en deux sous-familles distinctes du point de vue chimique et biosynthétique : les tannins dits « condensés » ou proanthocyanidines et les tannins dits

---

<sup>51</sup> Voir les chapitres : 1.2.8. *Les « tannins », des polyphénols ambigus*, p. 17 et 3.1. - *Coloration/brunissement des phénols*, p. 56.

<sup>52</sup> Patel, 2011, p. 408.

<sup>53</sup> Davies, 2004, p. 228-240.

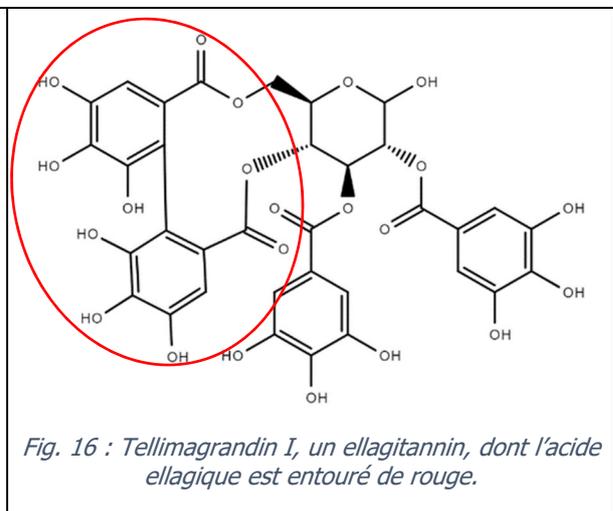
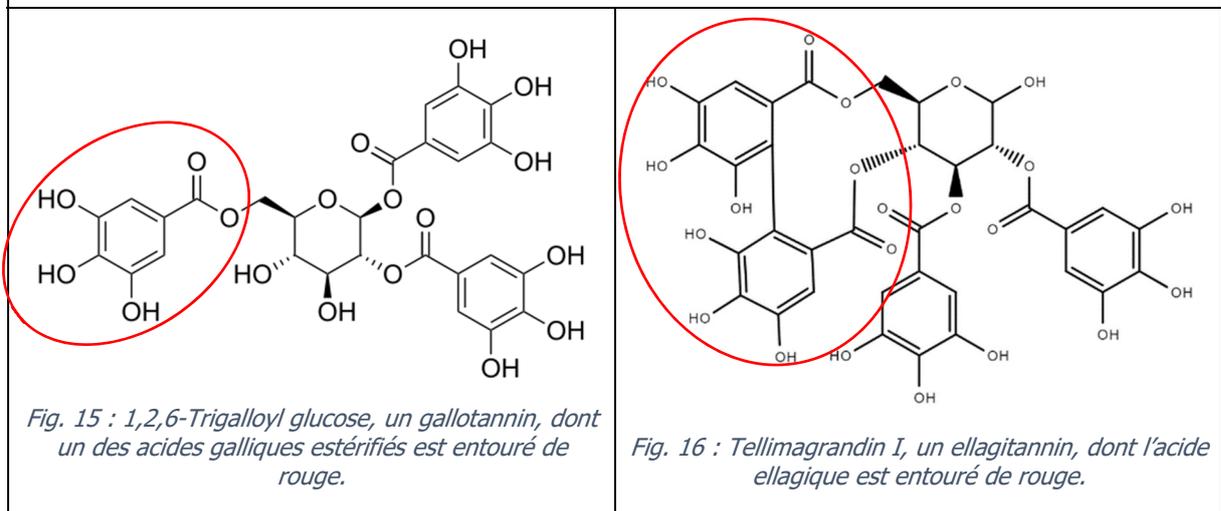
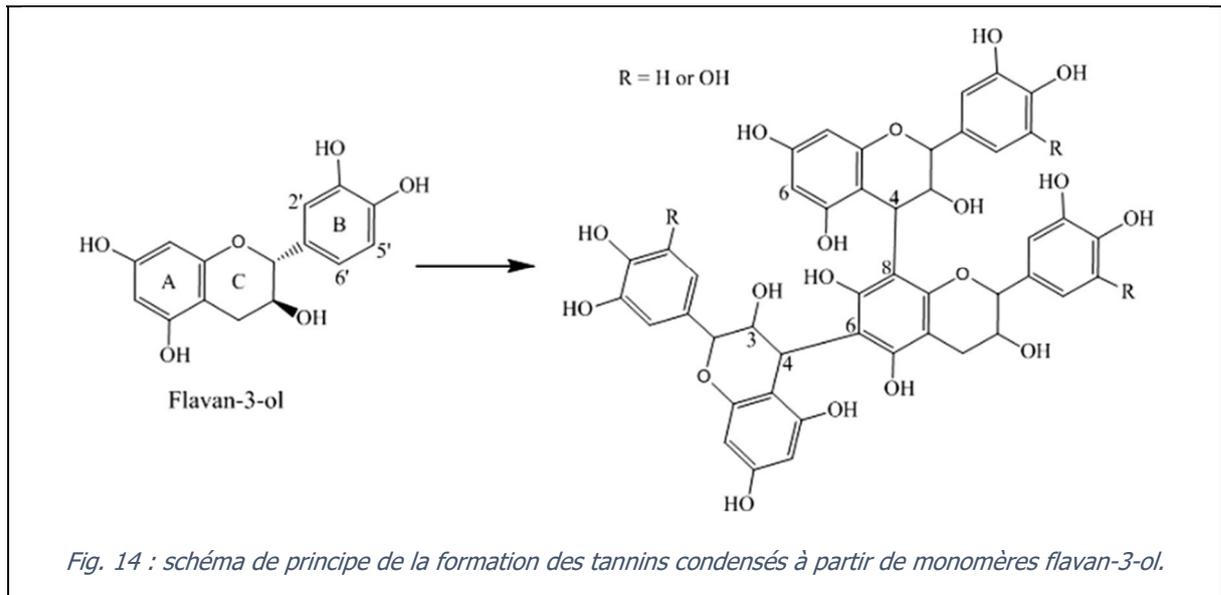
<sup>54</sup> Arbenz & Avérous, 2015, p. 2626.

<sup>55</sup> Centre National de Ressources Textuelles et Lexicales [en ligne], 2021.

<sup>56</sup> Selosse, 2019, p. 22 et 313 notamment.

<sup>57</sup> Arbenz & Avérous, 2015, p. 2627.

« hydrolysables ». Les premiers sont des oligomères (3 à 8 unités) formés par condensation de flavan-3-ols (Fig. 14)<sup>58</sup>, ces derniers ayant une structure proche de celles des anthocyanines, basés eux sur le cation flavylum<sup>59</sup>. Les tannins hydrolysables sont formés d'un cœur de glucose ou autre polyol sur lequel sont estérifiées plusieurs molécules d'acide gallique et une d'acide ellagique (elle-même issue de la combinaison de deux unités d'acide gallique), ou seulement d'acides galliques<sup>60</sup>. Dans le premier cas on parle d'ellagitannins (Fig. 16), et dans le second de gallotannins (Fig. 15). Il existe également les tannins dits « complexes », ou encore les phlorotannins des algues brunes, mais définir ces catégories moins courantes excède le cadre de ce travail.



<sup>58</sup> Arbenz & Avérous, 2015, p. 2628. On appelle aussi cette molécule « catéchine », qui résulte en un autre synonyme des tannins condensés : tannins catéchiques. Khanbabaee & van Ree, 2001, p. 647.

<sup>59</sup> Morata *et al.*, 2019, p. 395.

<sup>60</sup> Arbenz & Avérous, 2015, p. 2628.

La question de la couleur des tannins ne semble pas aisée à trancher : selon les auteurs, les tannins sont plutôt associés aux teintes brunes<sup>61</sup>, alors que pour d'autres les tannins bruts *in vivo* sont incolores<sup>62</sup> ! Cela pourrait simplement s'expliquer par une différence entre leur état « brut » et leurs versions oxydées, liées à des protéines et/ou davantage polymérisées<sup>63</sup>. Cependant, l'acide tannique pur (un tannin hydrolysable) présente bel et bien une teinte brune en solution aqueuse, par exemple. Il est possible que la remarque sur l'absence de couleur chez les tannins concerne plus les tannins condensés. Du moins les exemples sont nombreux : un fruit immature riche en tannin condensé<sup>64</sup> reste vert (chlorophylle), et un fruit mur qui subit une altération physique exposant le liquide vacuolaire à l'oxygène de l'air brunit à partir de ce moment précis.

A l'inverse, il se trouve que l'usage populaire et imprécis du terme s'applique parfois aussi à des composés phénoliques autres, pour autant qu'ils possèdent une teinte brune ou brun-rouge. En plus de partager une gamme de teintes similaires, ces composés se trouvent souvent dans les mêmes parties des plantes, et où les autres pigments sont plus rares : écorce, racines, enveloppe des graines, etc. Cela va de polyphénols proches comme les phlobaphènes à des molécules de nature assez différente, telles les quinones. Par exemple, le brou de noix est fréquemment associé aux tannins – car il en contient – mais en oubliant que le colorant principal est la juglone, un naphthoquinone. Cette confusion est cependant utile pour le cas présent, car le problème constaté est la migration de composé(s) brunâtre(s) dans le fluide de conservation, sans aucune précision sur la nature de ceux-ci. Ainsi, pour cette étude, le concept plus large de « substance brune soluble dans les solvants polaires » sera utilisé, qu'il s'agisse réellement de tannins au sens biochimique, d'autres composés phénoliques, ou plus probablement d'un mélange des deux.

### 1.2.9. Problématiques de conservation *a priori*

Si tous les pigments absorbent de l'énergie lumineuse et sont à ce titre susceptibles de photooxydation, ils sont loin d'être égaux dans leur résistance aux différents facteurs d'altération – considérés après la mort de la plante. Les anthocyanes sont sans doute les plus fragiles car en plus de leur dégradation aisée en composés incolores, ils sont très sensibles au pH, qui influence directement leur teinte – ce qui en fait d'excellents indicateurs colorés. Les chlorophylles ne résistent guère mieux mais leur teinte varie moins, passant simplement d'un vert vif à un vert olive – avant de perdre toute couleur<sup>65</sup>. La faible résistance à long terme de ces deux familles de pigments se traduit dans la pratique tinctoriale par le fait qu'aucune teinture dite « grand teint » n'utilise un membre de ces deux familles<sup>66</sup>. Dans le cas de

---

<sup>61</sup> Coder, 2012, p. 10

<sup>62</sup> Zhen *et al.*, 2021, p. 1.

<sup>63</sup> Stafford, 2000, p. 41-42.

<sup>64</sup> Ashok & Upadhyaya, 2012, p. 46.

<sup>65</sup> Pour plus de détail, voir : 2.1 Les chlorophylles : structure et dégradation, p. 22.

<sup>66</sup> Les teintures considérées comme « grand teint », en Europe, sont principalement la gaude (jaune), la garance (rouge), la cochenille (carmin) et l'indigo (bleu). Par exemple, voir : Cardon, 1978, p. 111-122.

la conservation en fluide, la chlorophylle présente un intérêt marqué car elle est quasi-omniprésente et qu'il semble possible de la stabiliser<sup>67</sup>.

Les caroténoïdes sont bien plus résistants aux différents facteurs de dégradation, comme en témoignent notamment les exemples de récupération de ces pigments par certains animaux, après avoir consommés des végétaux en contenant. Cela est également visible dans le fait qu'une teinte jaune succède très souvent à la perte du vert chlorophyllien des feuilles, que ce soit *in vivo*, avec des feuilles séchées, ou en fluide. Probablement autant omniprésents que les chlorophylles, leur conservation en fluide est *a priori* moins problématique et ce pas uniquement grâce à leur plus grande tenue dans le temps : comme ils sont la plupart du temps masqués par les chlorophylles, *in vivo*, c'est la teinte conférée par ces dernières qui est le plus souvent en jeu.

Les familles de pigments moins courants, comme les bêtaïnes ou les indigoïdes, présentent des sensibilités très diverses qui ne seront pas discutées ici du fait de leur relative rareté.

Le problème de migration dans le fluide est probablement dépendant du domaine de solubilité du pigment et du mélange de solvants utilisé. De manière générale, on peut classer les familles de pigments selon leur localisation dans la cellule : les caroténoïdes et les chlorophylles se situent dans les plastides et sont liposolubles, alors que les composés phénoliques (flavonoïdes, bêtaïnes, tannins) présents essentiellement dans la vacuole sont plutôt considérés comme hydrosolubles. Il convient de considérer que « liposoluble », dans la littérature spécifique à ce domaine, s'oppose à « hydrosoluble » mais ne signifie pas nécessairement une affinité avec les hydrocarbures : le domaine de solubilité semble le plus souvent se trouver corrélé à celui des solvants polaires aprotiques. Il serait donc théoriquement possible d'utiliser un mélange principalement aqueux ou du glycérol pour limiter la migration des pigments liposolubles, mais la pratique ne semble pas si simple, notamment car l'altération des pigments peut induire un changement de polarité marqué<sup>68</sup>. A l'inverse, le blocage de la migration des pigments hydrosolubles paraît compromis avec les recettes habituelles de conservation en fluide, qui ne comprennent presque jamais de mélange totalement aprotique. Cette question épineuse sera abordée dans la partie 3 *Préservation des tannins (condensés ?)*, p. 31.

---

<sup>67</sup> Voir le chapitre 2.2. - *Techniques de « préservation »*, p. 28.

<sup>68</sup> C'est le cas des chlorophylles qui perdent leur chaîne phytyle : voir le chapitre 2.1. - *Les chlorophylles : structure et dégradation*, p. 26.

Tableau 1 : récapitulatif des caractéristiques générales des différentes familles de pigments<sup>69</sup>.

| Famille                                 | Teintes   | Localisation principale <sup>70</sup> | Résistance générale <sup>71</sup> | Solubilité        |
|---|---|---------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|
| Chlorophylles                           |    | Feuilles                              | -                                 | Lipo.             |
| Caroténoïdes                            |    | Feuilles                              | +                                 | Lipo.             |
| Flavonols, aurones, chalcones, flavones |    | Fleurs                                | +/-                               | Hydro.            |
| Anthocyanes                             |    | Fleurs                                | --                                | Hydro.            |
| Proanthocyanidines                      |    | Parties jeunes/immatures, écorce      | +                                 | Hydro.            |
| Phlobaphènes                            |    | Ecorce                                | ++                                | Lipo.             |
| Dihydropyranes                          |   | Tissus ligneux                        | -                                 | Hydro.            |
| Bétalaïnes                              |  | Racines, fleurs                       | -                                 | Hydro.            |
| Anthraquinone                           |  | Racines                               | +                                 | Hydro.            |
| Naphtoquinones                          |  | Ecorce                                | +                                 | Hydro.            |
| Indigoïdes                              |  | Feuilles                              | +                                 | Lipo.<br>(oxydés) |
| Tannins hydrolysables                   |  | Ecorce, tissus ligneux                | +                                 | Hydro.            |

<sup>69</sup> Informations tirées notamment de : Davies, 2004 ; Delgado-Vargas *et al.*, 2000 ; Jadhav & Bhujbal, 2020 ; Młodzińska, 2009 ; Yusuf *et al.*, 2017 ; Patel, 2011.

<sup>70</sup> La localisation dans la plante est indiquée de manière à évoquer les parties les plus emblématiques pour la famille de pigments concernée, mais dans la plupart des cas les différents types de pigments peuvent se retrouver dans plus ou moins toutes les parties.

<sup>71</sup> Indication au doigt mouillé de leur résistance à la dégradation photo-chimique, mais cela dépend d'un colorant à l'autre et surtout du milieu (ce qui est valable dans la nature ou en teinture ne l'est pas forcément dans la conservation en fluide). De plus, leur résistance est ici appréciée surtout selon la perte de coloration et ensuite selon le changement de teinte, ce qui donne une évaluation positive des tannins et des indigoïdes alors qu'en réalité ils s'oxydent et passent d'un état incolore à un état coloré.

## 1.2. Historique de la conservation des couleurs des plantes en fluide

En préambule, il convient de préciser que cette brève présentation chronologique de la littérature spécifique à ce domaine repose sur un état de l'art encore frais et incomplet – à la fois car certaines sources n'ont pu être consultées et parce qu'il y en a sans doute encore de nombreuses à découvrir. Plus spécifiquement, il y a probablement un biais de sur-représentation des sources anglosaxonnes et indiennes, en partie pour des raisons évidentes de langue utilisée préférentiellement pour la recherche mais aussi car une partie non négligeable des sources sont issues d'une compilation dans la thèse de Verma<sup>72</sup>.

A l'exception de tentatives éparses probables<sup>73</sup>, la conservation des couleurs des plantes en fluide a vraisemblablement réellement débuté vers la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, notamment en s'inspirant d'une pratique alors extrêmement répandue, en France particulièrement, dans l'industrie des aliments conservés en boîte : le « verdissage », ou « reverdissage »<sup>74</sup>. Le principe général du bon maintien de la teinte verte lorsque l'on cuisine des légumes dans des récipients en alliages cuivreux était alors connu depuis longtemps<sup>75</sup>, mais il s'appliquait désormais à une échelle industrielle et était complété par des ajouts, comme des saumures auxquelles on ajoutait du sulfate de cuivre<sup>76</sup>. Le débat sur les risques pour la santé faisait alors rage<sup>77</sup>, et c'est dans ce contexte que les premiers scientifiques ont émis l'hypothèse que le cuivre pourrait bien être lié à la chlorophylle<sup>78</sup> et non agir comme une simple teinture<sup>79</sup>. Ils avaient remarqué un phénomène similaire avec le zinc, mais les composés cuivrés s'étaient avérés bien plus stables<sup>80</sup>.

Ainsi, il semble que ce soit vers le milieu des années 1890 que sont publiés les premiers témoignages de conservation de collections botaniques en utilisant des sels de cuivre pour préserver la couleur<sup>81</sup>. L'argument de la stabilité des « phyllocyanates de cuivre » a sans doute été très important<sup>82</sup>, mais il est

---

<sup>72</sup> Verma, 2008, p. 19-26.

<sup>73</sup> Par exemple, Cleghorn aurait suggéré en 1838 de conserver la couleur des plantes durant quelques mois avec une solution aqueuse de sel commun (NaCl). Verma, 2008, p. 20.

<sup>74</sup> Davenport, 1953, p. 11 et Wiley *et al.*, 1887, p. 1042-1046.

<sup>75</sup> Wiley *et al.*, 1887, p. 1016-1017.

<sup>76</sup> Hart, 1952, p. 14.

<sup>77</sup> Davenport, 1953, p. 10-12 et Wiley *et al.*, 1887.

<sup>78</sup> Ils parlaient plutôt de « phyllocyanine » pour ce qui était sans doute un mélange de chlorophylles *a* et *b*, et de « phylloxanthine » pour ce qui devait être un mélange de carotènes/xanthophylles, le terme chlorophylle désignant apparemment l'extrait vert des plantes que l'on pouvait ensuite séparer en ces deux substances supposées. La structure chimique de la chlorophylle n'a été élucidée que dans les années 1930 par Fischer et ses collègues – et certains de ses composés sont encore trouvés et décrits actuellement. Voir : Seely, 1966, p. 68-69.

<sup>79</sup> Les deux noms qui ressortent à ce propos sont Tschirch et Schunck. Cf : Davenport, 1953, p. 11-13 et Wiley *et al.*, 1887, p. 1043 pour des citations du premier. Pour des travaux du second, cf. : Schunck, 1883 ; Schunck, 1885 et Schunck, 1886. Dans le domaine de la conservation des spécimens en fluide, ils sont cités respectivement par : Woods, 1897, p. 206 et Trail, 1908, p. 49-50.

<sup>80</sup> Schunck, 1885, p. 339.

<sup>81</sup> J. W. H. Trail en 1896 au Royaume-Uni et A. F. Woods en 1897 aux USA. Bien qu'étant d'une branche parallèle, à savoir la préparation des spécimens botaniques pour la microscopie, il convient également de citer la contribution de J. Amann en 1896 en Suisse, car il a également utilisé des sels de cuivre dans ce but. De plus, sa formule spécifique de fluide (lactophénol) a été reprise comme recette pour la conservation des plantes en fluide de manière générale. Cf : Trail, 1908 ; Woods, 1897 ; Amann, 1896 et Fig. 20, p. 29 pour la réutilisation de la recette d'Amann.

<sup>82</sup> Woods, 1897, p. 206.

probable que l'impression de conserver réellement la matière d'origine et non de teindre artificiellement les spécimens ait pesé lourdement dans la décision de recourir à de telles méthodes.

## Chronologie non-exhaustive de la littérature concernant la préservation des couleurs des plantes en fluide

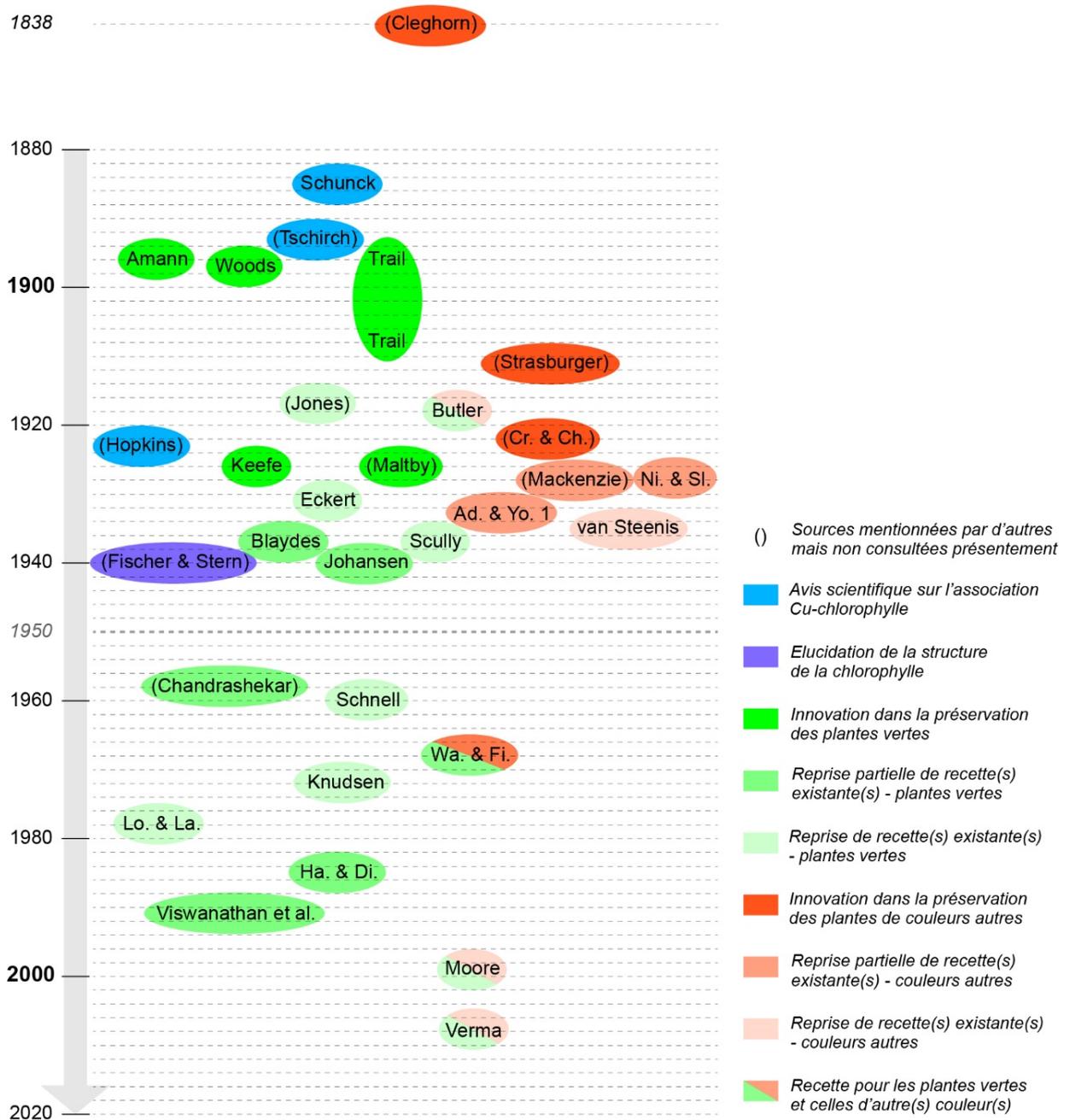


Fig. 17 : chronologie de la littérature concernant la préservation des couleurs des plantes en fluide.

Suite aux travaux précurseurs de Trail et Woods, plusieurs botanistes ou autres personnes impliquées ont repris, adapté et éventuellement inventé de nouvelles recettes visant à conserver les couleurs des plantes en fluide durant tout le XX<sup>e</sup> siècle (Fig. 17). Néanmoins, les réelles innovations<sup>83</sup> ont

<sup>83</sup> Pour plus de détail sur ce qui est considéré ou non comme une innovation dans le domaine, voir le chapitre 2.2.1. *Recettes existantes*, p. 28.

pratiquement toutes vu le jour avant le milieu du siècle. Il convient également de préciser que le terme de « couleurs » employé au pluriel recouvre une réalité assez inégale : l'essentiel des efforts a été tourné vers la teinte verte et l'emploi de sels de cuivre<sup>84</sup>, seuls les plus optimistes ayant prétention à préserver les autres pigments.

Si la question de la chlorophylle se résume à l'emploi du cuivre, celle des autres familles de pigments peut se résumer à l'emploi des sulfites en solution aqueuse (Fig. 18, p. 25) – aussi utilisé pour les plantes vertes, parfois. Il ne s'agit donc pas de « fixer » la matière colorante, mais d'éviter son oxydation le plus longtemps possible. Sans surprise, cela a mieux fonctionné pour les pigments de base plutôt stables (carotènes) que pour ceux très sensibles à leur milieu (anthocyanes)<sup>85</sup>. Qui plus est, la constatation d'une préservation acceptable des couleurs les moins fragiles sans aucune adaptation d'une recette prévue pour la chlorophylle, sans sulfite, a été faite dès les débuts. Ainsi, A. F. Woods note en 1897 : « *Usually it will also effectively preserve the browns, reddish browns, and yellows, such as occur in injured or diseased portions of stems, leaves, or fruits* »<sup>86</sup>. F. J. Scully, qui propose deux recettes visant à préserver les couleurs autres en plus du vert, avoue également que cela fonctionne mieux pour les fleurs jaunes que celles rouges ou bleues – et conseille finalement de récolter les fruits encore verts afin de réussir la conservation de leur couleur !<sup>87</sup> Il convient de garder ces observations à l'esprit lorsque l'on consulte des sources secondaires ultérieures<sup>88</sup> qui reprennent ces recettes censées préserver « les couleurs » en général – ce qui était éventuellement le but initial, mais pas l'observation finale.

L'utilisation des sulfites a été plutôt conseillée pour les spécimens « incolores » ayant tendance au brunissement (voir le chapitre 3.1 *Les tannins, structure et problématique(s)*, p. 37), les fleurs et fruits jaunes, et un peu plus rarement les rouges. Les résultats obtenus avec ces derniers varient probablement beaucoup en fonction de la nature des pigments dont la teinte est issue, soit anthocyanes, bétalaines ou carotènes. Cela explique sans doute la plus grande diversité de recette pour cette teinte. Par exemple, à propos des fruits rouges, Wagstaffe & Fidler (1968) s'écartent de la « traditionnelle » solution aqueuse enrichie en sulfites pour proposer une solution de chlorure de zinc dissout dans un mélange formol/glycérol<sup>89</sup>. Mais plus exceptionnel, ils proposent enfin une solution (comprenant un alcool tertiaire, un agent réducteur et un complexant) pour conserver les fleurs rouges et bleues<sup>90</sup> – soit les délicates anthocyanes. Après cela, il ne semble plus qu'il y ait eu de réelle innovation dans le domaine jusqu'à aujourd'hui.

---

<sup>84</sup> Pour plus de détails, voir le chapitre 2.2.1 *Recettes existantes*, p. 28.

<sup>85</sup> C'est une déduction d'après les types de couleurs censés être efficacement préserver la majorité de ces recettes ; voir : Annexe I – Liste des recettes de préservation de la couleur, p. 85.

<sup>86</sup> Woods, 1897, p. 206.

<sup>87</sup> Scully, 1937, p. 18.

<sup>88</sup> Par exemple, Hangay & Dingley mentionnent une recette de Knudsen dans leur ouvrage de 1985, censée préserver les couleurs alors qu'il s'agit manifestement de la recette « B » de Scully. Il convient de noter qu'il est parfois difficile de trancher entre source primaire et secondaire, dans le sens qu'un auteur peut très bien avoir lu une recette et la retranscrire sans la tester, ou l'avoir pratiquée sans réelle évaluation, ou au contraire l'avoir testée et modifiée selon ses observations – ceci n'étant pas toujours explicite.

<sup>89</sup> Wagstaffe & Fidler, 1968, p. 292.

<sup>90</sup> Wagstaffe & Fidler, 1968, p. 292.

## Evolution des recettes censées préserver les couleurs autres que le vert

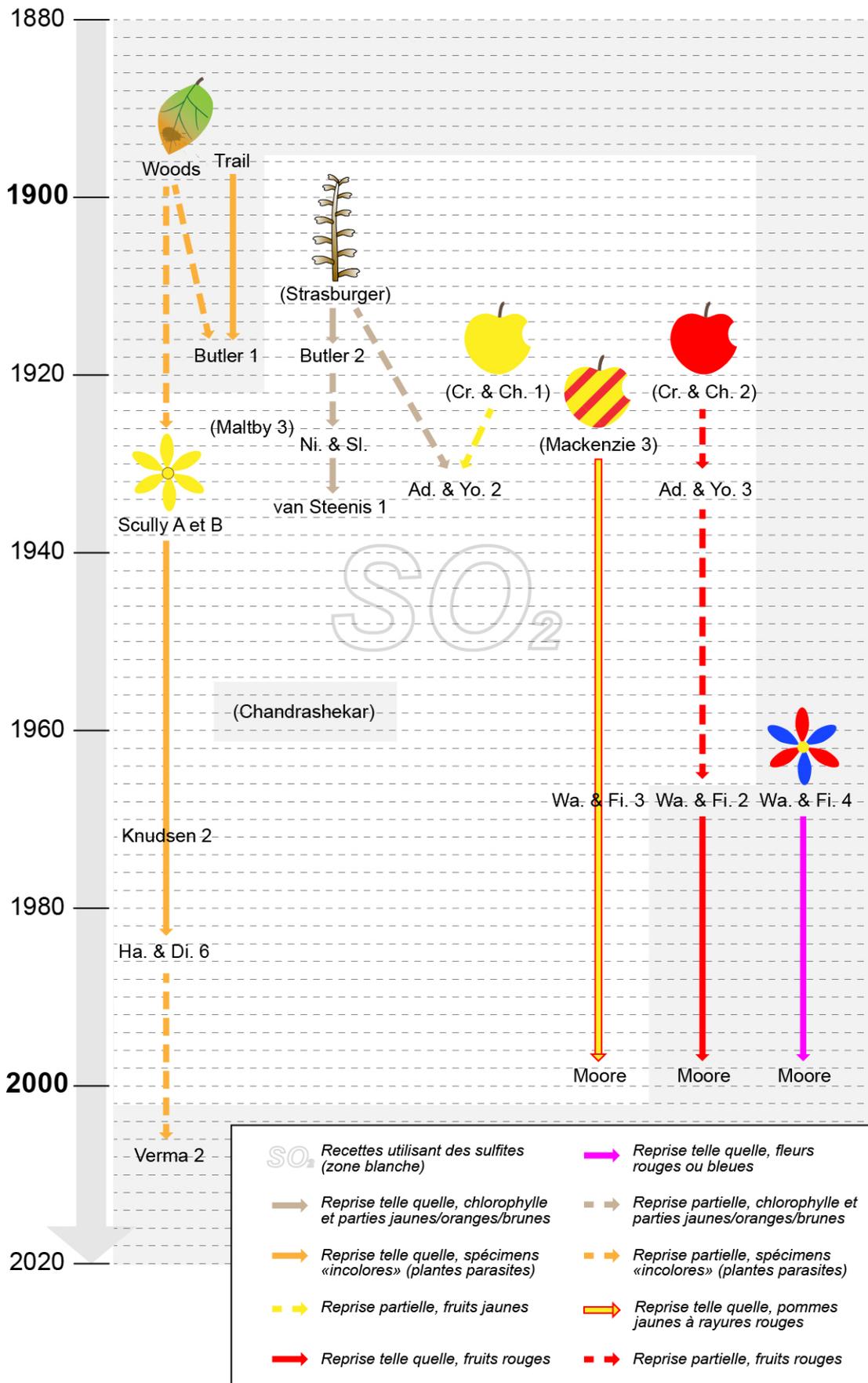


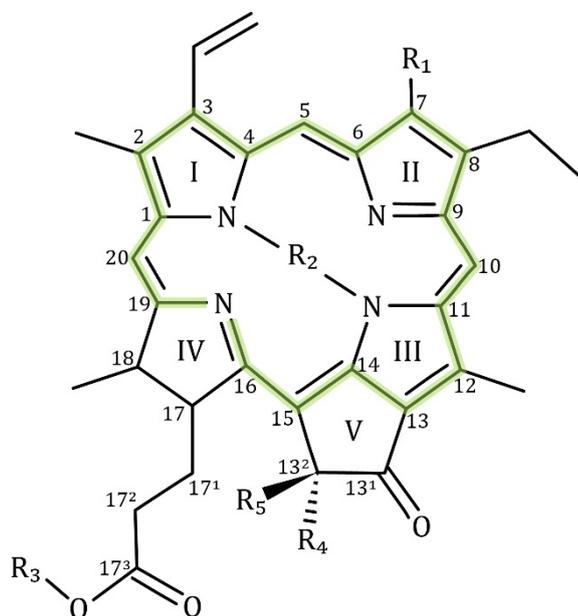
Fig. 18 : schéma de l'évolution historique des recettes visant à conserver les couleurs autres que le vert.

## 2. Préservation de la chlorophylle

### 2.1. Les chlorophylles : structure et dégradation

Ainsi qu'il l'a été exposé au chapitre 1.1.2 *Les chlorophylles et autres tétrapyrroles*, les chlorophylles et leurs dérivés se basent sur une structure commune, la chlorine, qui est un tétrapyrrole cyclique dont la continuité du système conjugué a été interrompue par réduction du cycle IV. De plus, elles partagent une caractéristique spécifique aux porphyrines végétales (par opposition à l'hème, par exemple) : la présence d'un cinquième cycle accolé au troisième cycle pyrrole. Enfin, ce qui caractérise les chlorophylles à proprement parler sont à la fois la présence d'une chaîne phytyle (hydrophobe) et d'un ion  $Mg^{2+}$  complexé au centre du tétrapyrrole<sup>91</sup>.

Tableau 2 : structure des chlorophylles et de leurs dérivés ; en vert le système conjugué.



| Pigments naturels                  | R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub>     | R <sub>5</sub> |
|------------------------------------|-----------------|----------------|----------------|--------------------|----------------|
| Chlorophylle a                     | CH <sub>3</sub> | Mg             | phytyle        | COOCH <sub>3</sub> | H              |
| Chlorophylle b                     | CHO             | Mg             | phytyle        | COOCH <sub>3</sub> | H              |
| Chlorophyllides                    | a/b             | Mg             | H              | COOCH <sub>3</sub> | H              |
| Phéophytines                       | a/b             | 2H             | phytyle        | COOCH <sub>3</sub> | H              |
| Phéophorbides                      | a/b             | 2H             | H              | COOCH <sub>3</sub> | H              |
| 13 <sup>2</sup> -hydroxychlorophi. | a/b             | Mg             | phytyle        | COOCH <sub>3</sub> | OH             |
| Pyrophéophytines                   | a/b             | 2H             | phytyle        | H                  | H              |
| Pyrophéophorbides                  | a/b             | 2H             | H              | H                  | H              |
| <b>Pigments artificiels</b>        |                 |                |                |                    |                |
| Cu-phéophytines <sup>92</sup>      | a/b             | Cu             | phytyle        | COOCH <sub>3</sub> | H              |
| Cu-phéophorbides                   | a/b             | Cu             | H              | COOCH <sub>3</sub> | H              |
| <i>Etc.</i>                        | ...             | ...            | ...            | ...                | ...            |

N.B. : en présence de solvants organiques et en milieu alcalin, le cycle V est clivé et donne divers composés dont le nom varie cette fois en fonction de la chlorophylle initiale, soit chlorine pour la *a* et rhodine pour la *b*.

A l'inverse, les dérivés issus de leur dégradation sont donc généralement caractérisés par l'absence d'un ou plusieurs de ces éléments (Tableau 2). En revanche, ils gardent en principe la caractéristique qui différencie la chlorophylle *a* de la chlorophylle *b*, soit la présence d'un groupe méthyle ou aldéhyde en position 7<sup>93</sup> : chaque type de dérivé existe donc normalement en deux variantes, qui ne seront pas systématiquement présentées ici.

Le mécanisme de dégradation des chlorophylles *in vivo* n'a pas encore été entièrement élucidé, mais il semblerait que plusieurs enzymes soient impliquées dans la perte de la chaîne phytyle et de l'ion

<sup>91</sup> Buchanan *et al.*, 2015, p. 514-517 et Aparicio-Ruiz *et al.*, 2011, p. 11'102.

<sup>92</sup> Le nom « chlorophylle » est normalement réservé aux composés qui contiennent du magnésium, le nom phéophytine (ou autre en fonction des restes) s'appliquant aux autres complexes métalliques. Néanmoins, par abus de langage, on parle parfois de complexes Cu-chlorophylle.

<sup>93</sup> Pour une illustration, voir le chapitre : 1.2.2. *Les chlorophylles et autres tétrapyrroles*, p. 11.

complexé  $Mg^{2+}$ <sup>94</sup>. Les dérivés résultants sont appelés respectivement chlorophyllides et phéophytines, et lorsque les deux sont perdus on parle alors de phéophorbides. Les composés sans  $Mg^{2+}$  sont plutôt vert olive et non vert vif comme les chlorophylles<sup>95</sup> ; les phéophorbides sont ensuite dégradés en molécules incolores (Fig. 19). Un autre mécanisme de dégradation possible, *in vivo*, semble causé par la présence des phénols convertis en radicaux\* phénoxy par des peroxydases, qui oxydent à leur tour les chlorophylles (groupe hydroxyle en 13<sup>2</sup>) ; les hydroxychlorophylles sont instables et également dégradées en composés incolores<sup>96</sup>.

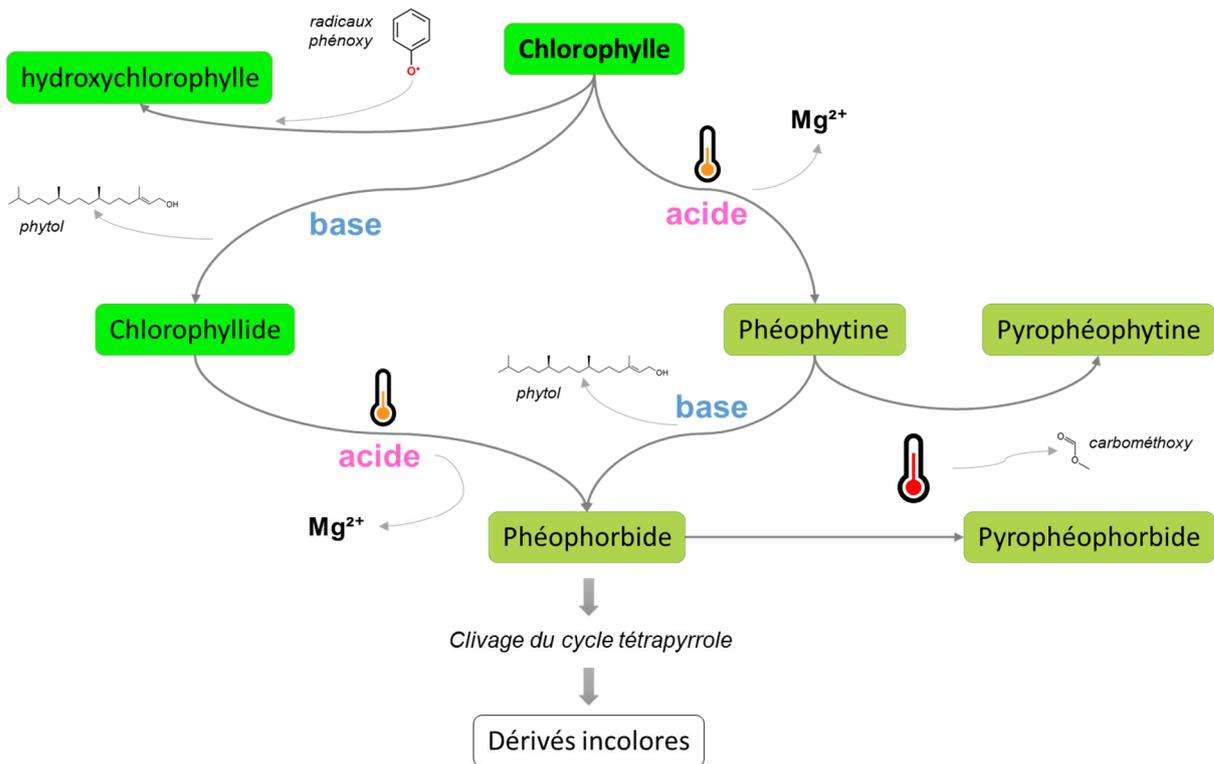


Fig. 19 : schéma du processus de dégradation non-enzymatique des chlorophylles.

Une partie de ces mécanismes est attendu lors de la préservation en fluide, du moins entre la cueillette et la pénétration au cœur des chloroplastes du fluide : cette dernière devrait inhiber ces processus car les différents fixateurs utilisés sont à même de dénaturer les enzymes<sup>97</sup>. En revanche, des processus de dégradation similaires peuvent avoir lieu pour d'autres raisons. Ainsi, un milieu acide et/ou un élèvement de la température provoque la perte de l'ion  $Mg^{2+}$ , alors qu'un milieu basique (ou très acide) favorise la perte de la chaîne phytyle<sup>98</sup>. Une température suffisamment élevée, par exemple si la recette comprend

<sup>94</sup> Syvash & Zolotareva, 2017, p. 20 et 22 et Buchanan *et al.*, 2015, p. 949.

<sup>95</sup> La question de la couleur exacte de chaque dérivé est difficile à trancher, car elle n'est souvent pas mesurée et aussi parce que cela dépend aussi probablement du milieu (air ou solvant), de sa concentration – et de la présence d'autres pigments, lorsqu'on évalue l'effet visuel au sein d'un spécimen végétal. Pour les dérivés sans  $Mg^{2+}$ , les termes les plus courants semblent être vert- ou brun olive, mais une étude sur la couleur des thés affirme que les phéophorbides sont bruns alors que les phéophytines seraient carrément noires – donnant leur couleur au thé noir. Voir : Zhang & Ruan, 2016, p. 260.

<sup>96</sup> Syvash & Zolotareva, 2017, p. 20, 24 et 25.

<sup>97</sup> Voir le chapitre 1.1.2. *La conservation des plantes en fluide en général*, p. 8.

<sup>98</sup> Gaur *et al.*, 2006, p. 3, Porra *et al.*, 1989, p. 392 et Scotter *et al.*, 2005, p. 1166.

une ébullition, devrait également faire apparaître des dérivés dits « pyro- » par perte du groupe carbométhoxy en 13<sup>2</sup><sup>99</sup>.

Enfin, la lumière est une source de dégradation indirecte : les chlorophylles, en tant que pigments photosynthétiques, absorbent certaines longueurs d'ondes du spectre électromagnétique et transfèrent immédiatement cette énergie à d'autres molécules, formant notamment de dangereux oxygènes singulets\*<sup>100</sup>. Ces derniers causeraient de nombreux dégâts aux cellules vivantes si des antioxydants\* n'étaient pas naturellement présents – tels les caroténoïdes, par exemple<sup>101</sup>. Cependant, les tissus morts conservés en fluide ne sont plus à même de générer ou régénérer ces molécules protectrices et l'accumulation d'espèces réactives (oxygène singulet\*, anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène, radicaux phénoxy, etc.) semble inévitable, provoquant entre autres l'oxydation des chlorophylles elles-mêmes.

## 2.2. Techniques de « préservation »

### 2.2.1. Recettes existantes

Ainsi qu'il l'a été mentionné dans le chapitre 1.2.3 (*Historique de la conservation des couleurs des plantes en fluide*, p. 18), l'idée principalement exploitée par les botanistes désireux de conserver le vert des plantes consiste à stabiliser le tétrapyrrole en remplaçant l'ion métallique complexé : si le magnésium est labile, le zinc l'est moins, et le cuivre encore moins<sup>102</sup>. Dès les débuts, différents sels de cuivre en solution ont donc été utilisés. L'anion ne devrait théoriquement pas avoir une influence sur la teinte obtenue, puisque c'est le cation seul qui est nécessaire. Pourtant, en pratique, il semble qu'il y ait une préférence pour le sulfate et l'acétate de cuivre<sup>103</sup> – peut-être pour des raisons de disponibilité. Le CuSO<sub>4</sub> est le sel le plus souvent cité pour les recettes à froid, alors que l'acétate de cuivre est le seul proposé lorsqu'une ébullition est recommandée<sup>104</sup> – bien que Woods ait initialement proposé l'un comme l'autre pour une recette à froid<sup>105</sup>. Plus intrigant, la recette de « Culactol » inventée par Amann nécessite de l'acétate et du chlorure de cuivre simultanément<sup>106</sup>, ce qui plaiderait pour des propriétés différentes et sciemment sélectionnées. Enfin, Keefe conseille de substituer le chlorure de cuivre et le nitrate d'uranium de sa recette initiale par de l'acétate de cuivre lorsque l'on souhaite conserver des algues bleu-vert<sup>107</sup>. Si le retrait du nitrate d'uranium dans ce cas semble censé, la substitution du chlorure par l'acétate de cuivre ne s'explique guère que par une teinte résultante supposée différente.

---

<sup>99</sup> Viera *et al.*, 2019, p. 5 et Zhong *et al.*, 2021, p. 1-2.

<sup>100</sup> Choe & Min, 2005, p. 146 et Gaur *et al.*, 2006, p. 7.

<sup>101</sup> Buchanan *et al.*, 2015, p. 519.

<sup>102</sup> Schunck, 1884, p. 339. A ce moment la structure de la chlorophylle était encore inconnue, mais les expériences prouvaient déjà que certains métaux donnaient des composés verts plus stables que d'autres. La légère supériorité du cuivre sur le zinc a été confirmée par la suite, avec différents facteurs de dégradation. Par exemple, voir : Zvezdanović *et al.*, 2012, p. 187 et Al-Dabbas *et al.* 2017, p. 4.

<sup>103</sup> Voir : Fig. 20, p. 29.

<sup>104</sup> Il est possible que cela soit lié à l'idée générale de ces recettes à chaud : pénétrer plus rapidement à cœur. En effet, l'acide acétique est connu pour accélérer ce phénomène et est utilisé systématiquement dans ces recettes : cela impliquant nécessairement la formation d'acétate de cuivre dans la solution, autant en utiliser directement.

<sup>105</sup> Woods, 1897, p. 207.

<sup>106</sup> Amann, 1896, p. 19. Le nom utilisé par Amann est « *Lactophenol-Kupferlösung* », mais la contraction en « Culactol » proposée par Eckert sera retenue car plus pratique : (Eckert), 1932, p. 69.

<sup>107</sup> Keefe, 1926, p. 332.



Les deux recettes précitées (Amann et Keefe) comportent des ingrédients inhabituels (acide lactique + phénol et nitrate d'uranium respectivement) et ont probablement pour cette raison toujours été reprises sans modification. En revanche, les recettes plus classiques utilisant le sulfate ou l'acétate de cuivre comportent d'innombrables variantes. Il est possible de les classer selon le mélange de solvants employé. Toutefois, le choix des solvants ne semble pas prépondérant dans la réussite du maintien de la couleur verte puisque de nombreuses recettes ne proposent que de l'eau – du moins lors de la phase de fixation<sup>108</sup>. Celles qui emploient des mélanges autres utilisent généralement des fluides fixateurs classiques (formol, FAA\*, etc.) prévus pour avoir une action sur la structure des tissus et non sur leur couleur<sup>109</sup>.

En revanche, un additif fréquemment cité a un rôle *a priori* plus important pour la conservation des chlorophylles : les ions sulfites qui sont des antiseptiques et surtout des antioxydants. En regardant de plus près, on s'aperçoit qu'en réalité d'autres recettes adoptent une tactique visant à diminuer la présence d'oxygène dans la solution et/ou le spécimen à conserver. Outre l'option chimique, qui est invariablement représentée par l'emploi des sulfites, il existe en effet des moyens physiques.

Ainsi, Woods propose en 1897 d'immerger le spécimen dans de l'alcool à 90 – 95% pour 15 à 20 minutes, ou de le mettre dans l'eau et d'utiliser une pompe à vide. Il suggère aussi de le placer dans de l'eau préalablement bouillie afin d'en extraire les gaz dissouts, de faire de même avec la solution de « fixation » contenant le sel de cuivre. Il précise enfin que combiner toutes ces techniques permet d'obtenir de bons résultats<sup>110</sup>. Certaines de ces options sont reprises par Blaydes en 1937 (Blaydes 1b<sup>111</sup>) puis par Hangay et Dingley en 1985 (Ha. & Di. 3), mais elles restent peu prisées en comparaison de l'emploi des sulfites. La recette proposant de placer le spécimen dans une solution bouillante d'acétate de cuivre, développée par Trail au début du XXe siècle, a rencontré plus de succès et pourrait aussi être classée dans les techniques de diminution du taux de dioxygène dissout. Néanmoins, cela est douteux car il est probable que l'oxydation soit plutôt accélérée par un tel processus, et le but visé est clairement une pénétration plus rapide du cuivre à l'intérieur des tissus<sup>112</sup>.

Il convient encore de distinguer les recettes qui proposent un fluide de « fixation » différent de celui de conservation et celles, plus rares, qui proposent de placer le sel de cuivre directement dans l'unique fluide de conservation<sup>113</sup>. Cette seconde option semble moins prisée, comme le montre Scully qui

---

<sup>108</sup> C'est le cas des recettes : Maltby 1, Ad. & Yo. 1, Scully A et B, Wa. & Fi. 1a, Knudsen 2, Ha. & Di. 4, 5 et 6. Pour leur positionnement chronologique, voir : Fig. 20, p. 29. Pour plus de détail sur ces recettes et leur numérotation arbitraire, voir : Annexe I – Liste des recettes de préservation de la couleur, p. 39. Pour les sources originales ou secondaires, voir, selon l'ordre précité : Verma, 2008, p. 21 ; Adriano & Yonzon, 1933, p. 122-123 ; Scully, 1937 ; Wagstaffe & Fidler, 1968, p. 291 ; Knudsen, 1972, p. 56 ; Hangay & Dingley, 1985, p. 20

<sup>109</sup> Voir la colonne « Solvant(s) » du Tableau 9 dans : Annexe I – Liste des recettes de préservation de la couleur, dès p. 86.

<sup>110</sup> Woods, 1897, p. 207.

<sup>111</sup> Pour la numérotation des recettes, voir la note de bas de page 99, p. 26.

<sup>112</sup> Trail, 1908, p. 50. Il aurait déjà écrit un bref témoignage de sa recette en 1896 (c'est pourquoi le schéma de la Fig. 20, p. 29 présente Trail aussi à cette date), mais cette source n'a pu être consultée.

<sup>113</sup> Voir la colonne « Conservation » du Tableau 9 dans : Annexe I – Liste des recettes de préservation de la couleur, dès p. 86.

propose une telle variante (Scully A) mais en précisant que pour une conservation à long terme, elle ne vaut pas la version à deux fluides distincts (Scully B)<sup>114</sup>.

### 2.2.2. Autres pistes

Plutôt que d'utiliser des sulfites, il serait théoriquement envisageable d'ajouter des antioxydants naturellement présents dans les plantes. Les végétaux contiennent de nombreuses molécules capables de piéger les radicaux libres – dont beaucoup sont d'ailleurs des pigments : caroténoïdes, flavonoïdes, tannins condensés et hydrolysables, et même les chlorophylles<sup>115</sup> ! Le problème est qu'en remplissant leur rôle elles se dégradent, ce qui n'est évidemment pas souhaitable pour les pigments en l'occurrence. Mais d'autres piègeurs de radicaux sont parfois utilisés pour contrer l'oxydation dans les aliments, tel l'acide ascorbique<sup>116</sup>. S'il est utile pour supprimer les espèces d'oxygène réactives, il semble encore plus efficace lorsqu'il est combiné au tocophérol<sup>117</sup>. En effet, ce dernier combat efficacement la peroxydation\* des lipides au sein des feuilles *in vivo*, cette dégradation étant nuisible pour les chlorophylles<sup>118</sup>, et l'acide ascorbique régénère (réduit) ensuite le radical tocophéryl ainsi formé en tocophérol<sup>119</sup>. Il convient de préciser que comme pour les sulfites, l'effet attendu est une amélioration du processus visant à substituer l'ion  $Mg^{2+}$  par un ion  $Cu^{2+}$ , que ce soit en ralentissant l'oxydation des phéophytines et phéorphorbides en composés incolores avant que la substitution ait pu avoir lieu ou en prévenant la dégradation à long terme dans le fluide de conservation.

L'irradiation de plantes vertes après leur récolte par des rayons UV-B, UV-C ou électroniques semble capable de réduire leur jaunissement<sup>120</sup>. Les causes semblent être une diminution de l'activité enzymatique et aussi peut-être une augmentation de la production d'acide ascorbique : ceci n'est donc *a priori* pas applicable aux spécimens botaniques en fluide, puisque les tissus sont en principe assez rapidement tués.

Un facteur sur lequel les recettes existantes semblent peu jouer est le pH du fluide de conservation. En effet, si l'on regarde le mécanisme de dégradation des chlorophylles<sup>121</sup>, il semblerait qu'une préservation en milieu basique pourrait bien être la solution – la dégradation s'arrêtant au stade des chlorophyllides, encore vert vif. Cela peut cependant entraîner d'autres problèmes. Premièrement, une dégradation structurelle pourrait survenir, par le biais de l'altération des pectines des parois cellulaires notamment<sup>122</sup>. Il va de soi qu'un milieu très acide est également susceptible d'altérer la structure des végétaux, mais

---

<sup>114</sup> Scully, 1937, p. 19.

<sup>115</sup> Bensid *et al.*, 2020, p. 6.

<sup>116</sup> Gordon, 1990, p. 11.

<sup>117</sup> Aussi appelé vitamine E, l'acide ascorbique étant la vitamine C.

<sup>118</sup> Kunert & Ederer, 1985, p. 85.

<sup>119</sup> Kunert & Ederer, 1985, p. 85 et 88. Pour une description plus détaillée du mécanisme, valable aussi *in vitro*, voir : Choe & Min, 2005, p. 154 et Choe & Min, 2009, p. 355-356.

<sup>120</sup> Srilaong *et al.*, 2011, Chairat *et al.* 2013, Pongsri *et al.* 2021, et Yamauchi, 2015, p. 108.

<sup>121</sup> Chapitre 2.1. *Les chlorophylles : structure et dégradation*, p. 26.

<sup>122</sup> Ces dernières assurent en grande partie la liaison intercellulaire et sont sensibles aux bases : Kilcast, 2004, p. 249. Selon Gaur *et al.*, les sels alcalins détruisent également la cellulose des parois cellulaires : Gaur *et al.* 2006, p. 5. De manière générale, il semble qu'une altération structurelle soit souvent associée au milieu basique : Coultate, 2016, p. 234 et Viera *et al.*, 2019, p. 13.

il est possible que les acides faibles, très utilisés pour la conservation des aliments, soient moins problématiques que les bases faibles à ce sujet. Dans tous les cas, malgré le risque d'hydrolyse des tissus en milieu basique ou acide, un milieu neutre est à éviter afin de contrer le développement des microorganismes<sup>123</sup>. Secondement et plus important, la perte de la chaîne phytyle entraîne une diminution du caractère hydrophobe de la chlorophylle, augmentant les risques de migration dans un fluide ayant généralement une base aqueuse<sup>124</sup>.

Le problème de la décoloration du spécimen par migration du pigment dans le fluide ne semble pas être cité tel quel dans les recettes, peut-être parce que les Cu-phéophytines ne posent pas vraiment ce problème dans les fluides recommandés. Sur le principe, s'il s'avérait que cela soit néanmoins problématique, il devrait être possible de jouer sur la polarité du fluide. Voir la remarque à ce propos au chapitre 1.1.9 Problématiques de conservation *a priori*, p. 13.

Enfin, il est possible d'envisager des mesures de conservation préventive comme la diminution de l'éclairage. Toutefois, la raison d'être de spécimens botaniques dont on a volontairement tenté de préserver la couleur est a priori d'être exposés, ou en tous cas vus assez régulièrement pour remplir leur rôle pédagogique. Il est aussi envisageable de baisser quelque peu la température pour ralentir les réactions chimiques, mais cela est problématique avec certains fluides tels le glycérol (point de fusion à 17.8°C) et le formol (le formaldéhyde polymérise à 14°C<sup>125</sup>). De plus, si le but de ces collections est d'être suffisamment consultable, la conservation en chambre froide ne semble pas indiquée. Ainsi, la marge de manœuvre permise par la modification de ces facteurs n'est pas suffisante pour régler le problème de dégradation des chlorophylles magnésiennes, mais devrait permettre d'améliorer quelque peu la conservation à long terme de composés déjà suffisamment stables.

## 2.3. Méthode et matériel

### 2.3.1. Choix des spécimens à tester

Le choix de plantes vertes disponibles pour une telle étude est extrêmement étendu, et les variables spécifiques aux espèces et susceptibles d'influencer la réussite d'une « fixation » de la couleur le sont également. Cela va de la teinte initiale à la structure permettant une plus ou moins bonne diffusion<sup>126</sup>, en passant par les nombreux composés biochimiques pouvant par exemple accélérer ou inhiber l'oxydation de la chlorophylle<sup>127</sup>. De plus, il a été prouvé qu'une recette idéale doit dans tous les cas être adaptée – en termes de concentration du sel de cuivre notamment – à chaque espèce<sup>128</sup>. Or, le but prioritaire de la présente étude est de déterminer si la complexation de l'ion Cu<sup>2+</sup> a bien lieu, puis

---

<sup>123</sup> Simmons, 2014, p. 5.

<sup>124</sup> deMan, 1990, p. 222.

<sup>125</sup> Simmons, 2014, p. 103.

<sup>126</sup> Par exemple, la composition et l'épaisseur de la cuticule ainsi que l'arrangement des stomates sont susceptibles d'influencer grandement la pénétration des fluides au sein d'une feuille. Cf : Fernández & Eichert, 2009.

<sup>127</sup> Par exemple, certains composés phénoliques sont susceptibles de participer à la dégradation de la chlorophylle (Yamauchi *et al.*, 2004) alors que d'autres pourrait au contraire la protéger (Smirnov, 2005, p. 70) aux côtés d'autres antioxydants comme les caroténoïdes ou l'acide ascorbique (Smirnov, 2005, p. 75 et 77).

<sup>128</sup> Verma, 2008, p. 119.

d'évaluer l'apport de différentes espèces chimiques et/ou procédés de manière globale – et non de trouver et ajuster les paramètres idéaux pour différents types de plante. Le choix d'une seule espèce, pour la majorité des tests, a donc été retenu afin de diminuer le nombre de variables parasites\*.

Par ailleurs, le taux de chlorophylles de plantes en extérieur peut varier considérablement d'un spécimen à l'autre, mais aussi au sein d'un même spécimen en fonction de la partie concernée, de la météo et du cycle circadien\* notamment<sup>129</sup>. Ainsi, une espèce aisément cultivable dans des conditions relativement stables et reproductibles, poussant rapidement et fournissant des feuilles (ou folioles, voir Fig. 21) d'une taille suffisamment petite pour être mise en éprouvette mais assez grandes pour que l'évaluation des changements de teinte soit aisée a été choisie : *Pisum sativum* (petit pois). Ceux de la variété Rani (Eldo), fournis par Samen Mauser AG, ont été utilisés.

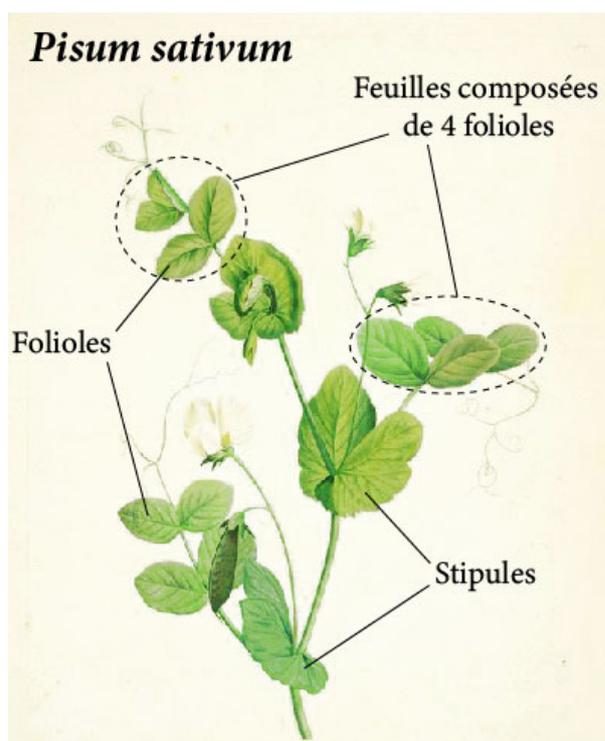


Fig. 21 : adaptation d'une « gravure botanique Rousseau » afin de distinguer les pièces foliacées.

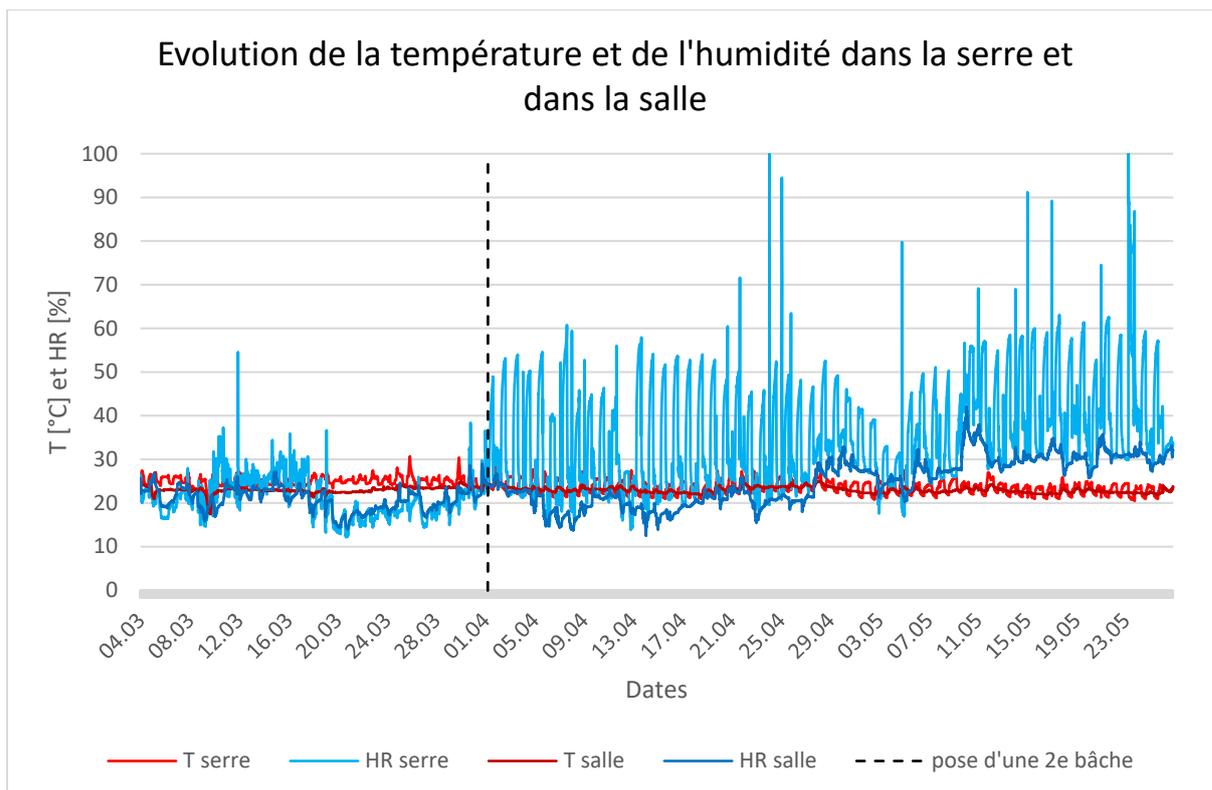
L'utilisation d'échantillons de faible taille (une foliole de *Pisum Sativum*  $\approx 2$  à  $5 \text{ cm}^2$ ) placée en éprouvette a été choisie pour permettre la réalisation d'un plus grand nombre de tests – et l'économie de solvant. Les semis ont été placés dans un terreau pour semis sans tourbe Ricoter®, sans engrais, arrosé quotidiennement par un mélange 2:1 d'eau bouillie et d'eau déionisée. Les pousses ont grandi sous un éclairage alterné de 15h à 2'500 lux environ et 9h dans la nuit<sup>130</sup>. La température et l'humidité relative moyenne y était de  $23.7^\circ\text{C}$  et  $35.3\%$  respectivement, avec une variation quotidienne d'environ  $3$  à  $5^\circ\text{C}$  et  $30\%$  HR (Graphe 1, p. 34)<sup>131</sup>. Les folioles ont été prélevées pour les tests entre 9 et 19 jours après les semences<sup>132</sup>, toujours avant qu'il y en ait plus de 2 par feuilles ou que la plante commence à dépérir ; les folioles présentant des « défauts » visibles n'ont pas été sélectionnées dans la mesure du possible.

<sup>129</sup> Voir par exemple : Huang *et al.*, 2011, Minotta & Pinzauti, 1996, et Vågen *et al.*, 2003.

<sup>130</sup> Des bâches ont été installées afin de diminuer l'impact de la lumière du soleil (par les fenêtres) et de l'éclairage artificiel de la salle sur l'éclairage reçu par les plantes. Toutefois, des variations allant jusqu'à  $1'000$  lux environ, dues à l'impact direct du soleil le matin, n'ont pu être évitées. Par ailleurs, c'est la valeur mesurée au niveau du sol, mais elle augmente logiquement lorsque la plante pousse et se rapproche du tube fluorescent.

<sup>131</sup> Ces variations journalières importantes de l'humidité relative sont dues aux variations de température, elles-mêmes directement liées au cycle jour-nuit du système d'éclairage. Pour plus de détails, voir : Annexe IV – Graphes climatiques, p. 109.

<sup>132</sup> L'idéal aurait été de les cueillir toutes après la même durée, mais cela n'a pas été possible à la fois pour des raisons d'impératifs temporels et de différences notables dans la vitesse de croissance des pousses – ce qui prouve que la maîtrise totale des variables indésirables affectant les plantes et leur croissance est extrêmement difficile.



Graph 1 : la pose d'une 2e bâche, plus opaque, a permis de mieux isoler de la lumière extérieure et surtout de mieux contenir l'humidité au sein de la serre. Ainsi, l'effet de la température interne (influencée directement par l'éclairage interne) sur l'humidité relative est plus fort – celle-ci influant probablement à son tour sur la quantité d'eau relâchée par les plantes. Voir : Annexe IV – Graphes climatiques, Graphes 33-34, p. 110.

Si le choix de limiter autant que possible les variables provenant des échantillons – considérées en l'occurrence comme parasites\* – est utile pour mieux déterminer l'effet des variables provoquées\* issues des recettes, il va de soi qu'à terme les différences d'une plante à l'autre dans la nature peuvent et devraient aussi être considérées comme des variables invoquées\* dont l'évaluation de l'impact sur la réussite des recettes de « fixation » est nécessaire.

### 2.3.2. Evaluation du changement d'aspect des échantillons

L'ensemble des critères utilisés pour déterminer la qualité d'un produit de fixation et/ou de conservation<sup>133</sup> ne sera pas utilisé ici, puisqu'il est avant tout question de la tenue de la couleur.

L'évaluation des effets des différentes recettes sur la tenue (migration et dégradation) de la chlorophylle a été réalisée de manière directe par la simple prise de photographies du spécimen dans son fluide, et de manière indirecte en mesurant la couleur du fluide à l'aide d'un spectrophotomètre. Cette dernière permet avant tout d'observer l'importance de la migration des pigments au sein du fluide, mais aussi de témoigner d'une éventuelle dégradation de ceux-ci dans ce même milieu. De plus, une photographie de chaque spécimen pris entre deux verres de montre maintenu humide a été réalisée après la fin de chaque série, afin d'avoir un témoignage direct. Cette opération n'a pas été réalisée sous forme de suivi

<sup>133</sup> Voir le chapitre 1.1.2. *La conservation des plantes en fluide en général*, p. 8.

régulier, contrairement aux précédentes, car le risque de dommage lors de la manipulation et d'altération des résultats a été jugé trop important.

La mesure spectrale du fluide à l'aide du spectrophotomètre est convertie en coordonnées tridimensionnelles dans l'espace CIELab, où les axes sont :  $L^*$  la luminosité,  $a^*$  l'axe « rouge - vert »<sup>134</sup> et  $b^*$  l'axe jaune – bleu (Fig. 22 et 23). Le même espace considéré en coordonnées polaires a pour rayon  $C$  (chroma\*) et pour angle  $h$  (teinte\*). La valeur de luminosité s'étant révélée être sujette à la plus grande incertitude de mesure<sup>135</sup> et le chroma illustrant de manière très satisfaisante la migration des pigments dans le fluide incolore, c'est la valeur de ce dernier qui sera utilisée. Concernant l'altération des pigments en solution, c'est plutôt la valeur de l'angle de teinte qui sera choisie – bien que la dégradation en composés incolores soit révélée par le chroma. Enfin, la représentation de l'évolution sur le plan  $a^*b^*$  sera parfois utilisée, mais elle a le défaut de ne pas pouvoir illustrer l'évolution chronologique.

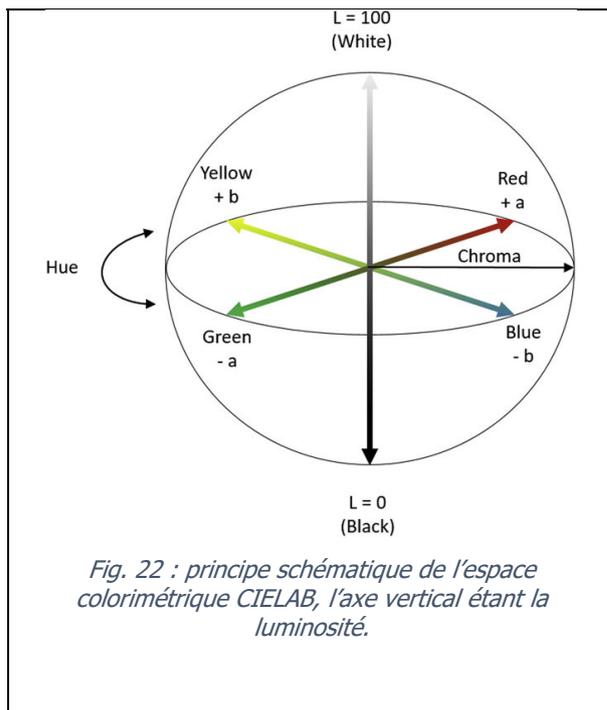


Fig. 22 : principe schématique de l'espace colorimétrique CIELAB, l'axe vertical étant la luminosité.

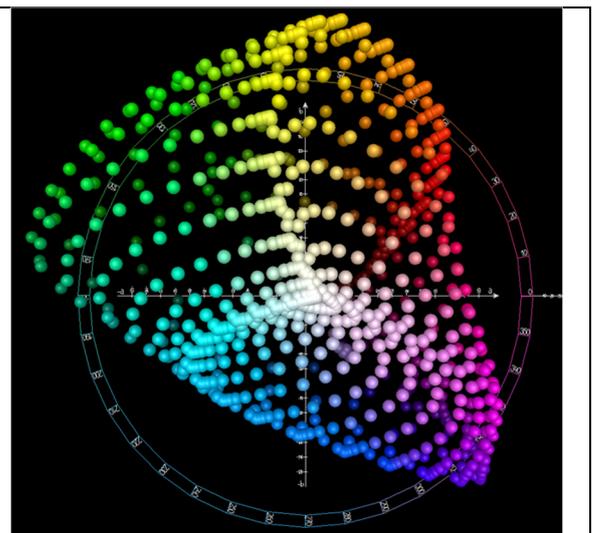


Fig. 23 : vue du dessus de l'espace colorimétrique CIELAB.  $L_{max}$  dirigé vers le lecteur au centre,  $a^*$  = axe droite-gauche et  $b^*$  = axe haut-bas.

<sup>134</sup> Les couleurs attribuées à l'axes  $a^*$  sont entre guillemets car les teintes réellement présentes à  $0^\circ$  et  $180^\circ$  sont plutôt un rouge tirant sur le pourpre et un bleu-vert – les trois couleurs « primaires » (RGB ou CMY) ayant logiquement un écart d'environ  $120^\circ$  chacune.

<sup>135</sup> Pour plus de détails sur l'obtention de l'incertitude de mesure, voir : Annexe VI – Colorimétrie : détermination de l'erreur de mesure, p. 129.

### 2.3.3. Déroulement standard des tests

Chaque variante a fait l'objet d'un « triplicat ». Lors de la fixation, les folioles d'une même variante ont été placées ensemble, à raison de 4mL de fluide par foliole. Après fixation, chaque foliole a été placée séparément dans une éprouvette fermée avec 6mL de fluide de conservation. Le jour zéro des mesures correspond à la mise en fluide de conservation, mais les fluides de « fixation » ont été observés et mesurés au besoin afin de témoigner d'une éventuelle migration lors de cette phase.

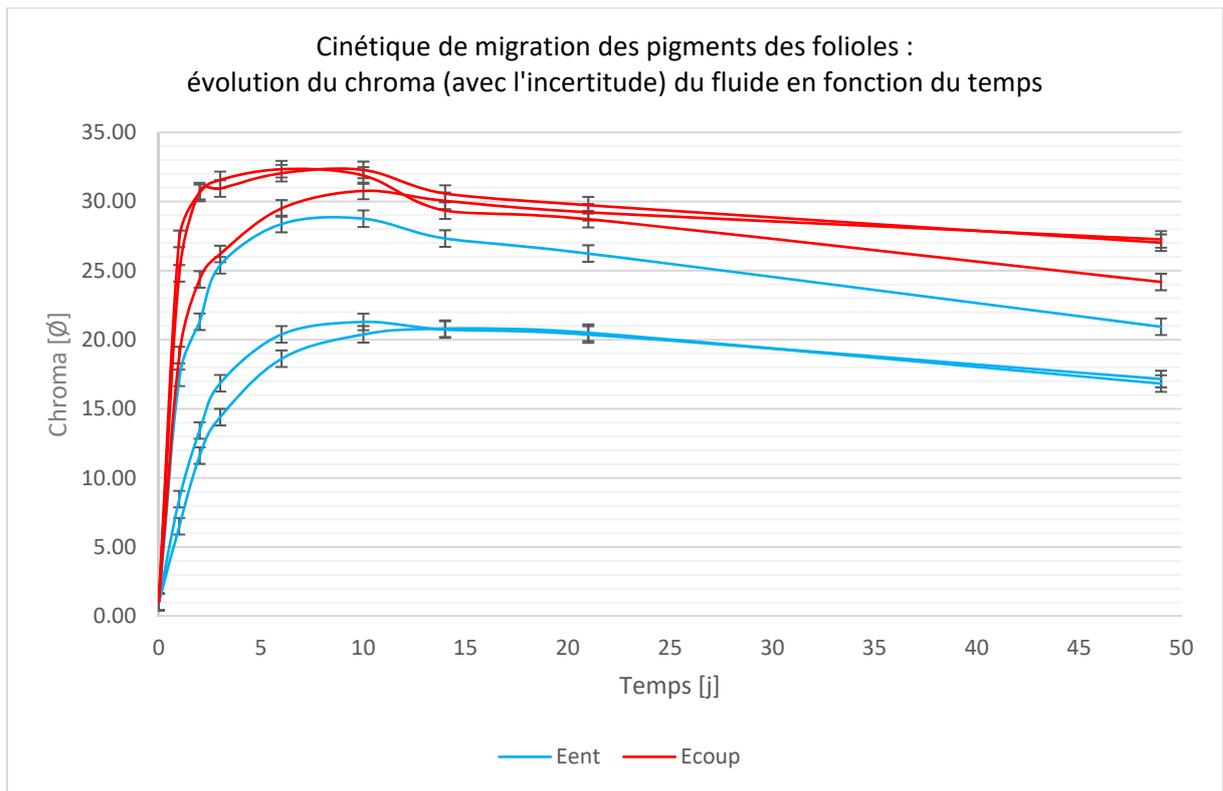
Le but premier étant d'évaluer l'effet de « fixation » de la couleur, la plupart des spécimens des recettes en deux phases (fix. puis cons.) ont été placés dans de l'éthanol à 70% en tant que fluide de conservation, car c'est un classique dans le domaine<sup>136</sup> et que c'est un mélange qui solubilise de nombreux pigments dont la chlorophylle (quoique moins que l'acétone, par exemple<sup>137</sup>) : cela permet donc d'évaluer le problème de migration en même temps que celui de dégradation des pigments. Des tests préliminaires ont montré qu'après quelques jours seulement, l'essentiel de la substance colorante avait déjà été transmise du spécimen au fluide<sup>138</sup>. La dégradation de la majorité des chlorophylles en composés olivâtres (probablement des phéophytines), au sein du fluide, est achevée après une dizaine de jours (Graphe 2, p. 37). Il semble que s'amorce ensuite un long (plusieurs mois probablement) revirement de l'angle de teinte vers sa valeur initiale (Graphe 3, p. 37), soit celle du fluide pur : ceci trahit la dégradation des dérivés des chlorophylles en composés incolores. Au vu des changements très rapides au début (migration et dégradation de vert à jaune-vert), l'espacement standard des mesures a été déterminé ainsi : 1j, 3j, 6j, 10j, 14j, 21j, 28j, 49j. Pour les spécimens simplement conservés dans l'EtOH à 70%, un renouvellement du fluide a été opéré au 11<sup>e</sup> jour, soit lorsque la courbe du chroma (qui révèle la migration) s'est suffisamment aplanie.

---

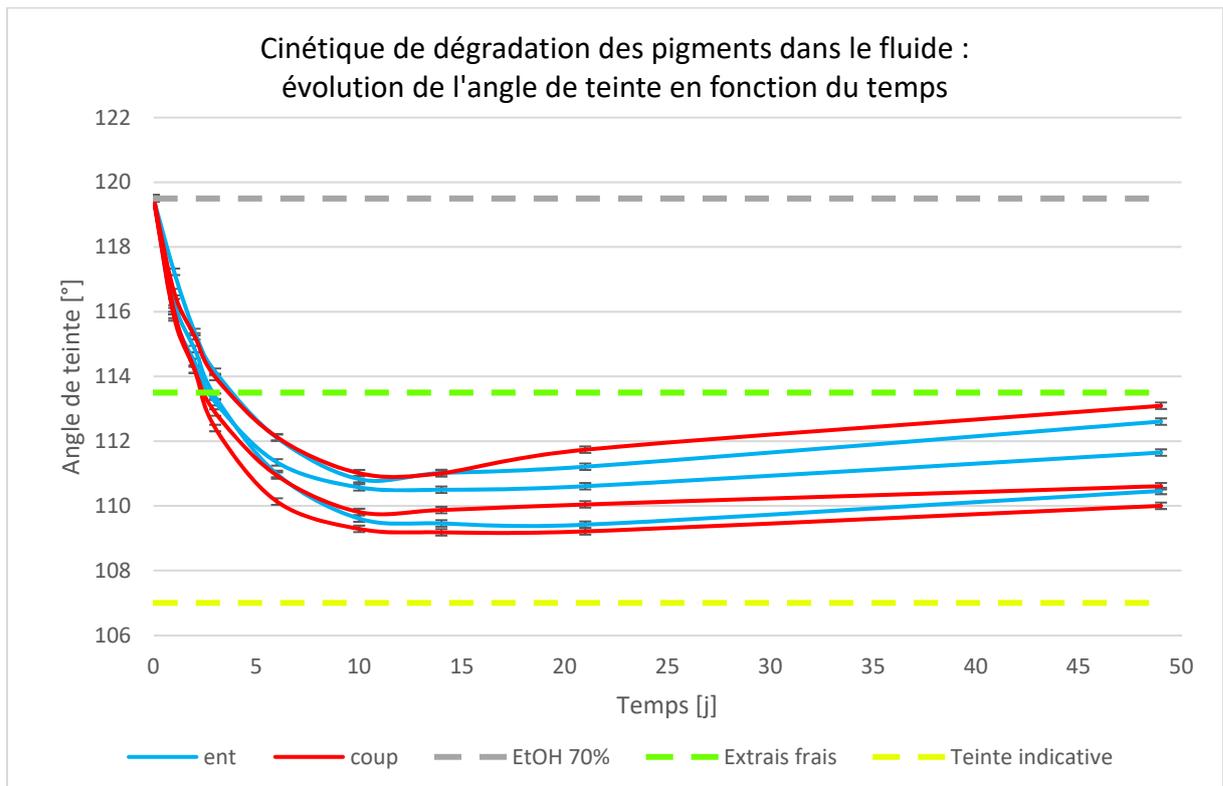
<sup>136</sup> De manière générale dans la conservation en fluide, l'éthanol à 70% est très fréquemment proposé : Dangeon, 2016, p. 21 et aussi consulter la liste de recettes dans : Simmons, 2014, dès p. 199. On le retrouve aussi dans la conservation des spécimens botaniques, notamment avec la référence dans le domaine qu'est le Kew Garden : Bridson & Forman, 1998, p. 226-231.

<sup>137</sup> La chlorophylle, considérée comme « hydrophobe » ou « liposoluble », est souvent extraite des plantes à l'aide d'acétone à 80%. Communication orale de monsieur le professeur Felix Kessler, Directeur de l'Institut de botanique et du laboratoire de physiologie végétale de l'Université de Neuchâtel, printemps 2021.

<sup>138</sup> Un triplicat de folioles entières faisant 30mg (Eent) et un de folioles sectionnées à la même masse (Ecoup) ont été testés. Voir : Graphe 2, p. 37. De manière générale, pour les codes utilisés pour les recettes, voir l'Annexe II – *Détail des paramètres des variantes testées*, Tableaux 10 et 11, p. 91.



Graph 2 : cinétique de migration des pigments des folioles de *Pisum sativum* dans l'EtOH à 70%.



Graph 3 : cinétique de dégradation des pigments dans l'EtOH à 70% ; la valeur à j0 correspond à la teinte du solvant pur (indiquée en gris), mais il va de soi que le chroma est tellement faible qu'elle est imperceptible à l'œil nu. L'indication de la teinte d'un extrait de pigments frais<sup>139</sup> permet de constater une dégradation (jaunissement).

<sup>139</sup> Cet extrait ainsi : broyage de folioles de *Pisum sativum* à l'azote liquide, puis extraction dans l'acétone à 80% durant 10min. Il s'agit donc d'un mélange de chlorophylles a et b, de caroténoïdes, et d'autres substances.

Un éventuel effet de la manipulation répétée lors des mesures a été évalué sur la même série préliminaire qui a servi à établir la cinétique de dégradation. En effet, l'exposition à la lumière (le stockage étant dans une armoire fermée), l'apport d'oxygène lors du prélèvement du fluide (les 6mL que contiennent l'éprouvette sont entièrement prélevés à chaque fois), le mouvement ou encore un éventuel changement de température sont autant de facteurs susceptibles d'affecter les résultats. Il semble cependant que ces effets aient été très peu prononcés, à la fois sur la migration et la dégradation<sup>140</sup>. Après sept semaines, une série centrée sur la photooxydation a démontré que la manipulation cause néanmoins une accélération de la dégradation des pigments en composés incolores dans le fluide (Fig. 24 et 25)<sup>141</sup>. Le spectre visible s'est révélé légèrement plus destructeur que les UV proches (Fig. 26 et 27). En prévision de recettes où les effets de la manipulation devraient être plus prononcés<sup>142</sup>, chaque triplicat a été doublé, le second étant maintenu dans le noir sans aucune mesure jusqu'au 21<sup>e</sup> jour au moins.

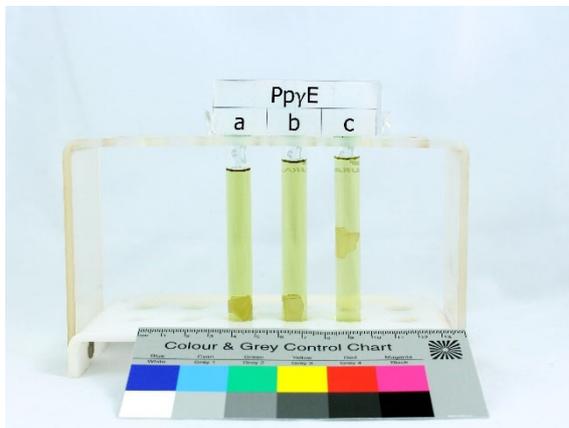


Fig. 24 : triplicat de folioles en éthanol manipulé régulièrement dans le cadre des mesures, après 49j.

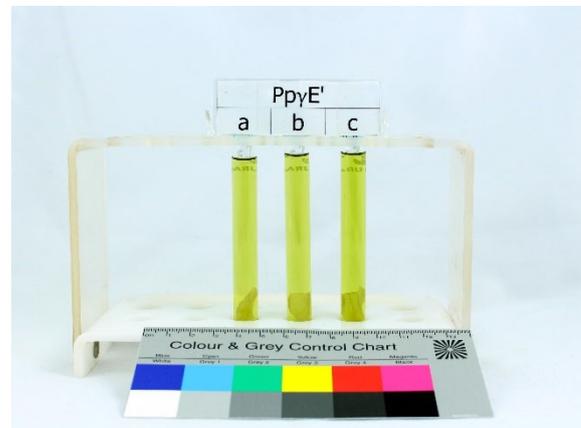


Fig. 25 : triplicat laissé dans le noir, sans manipulation, après 49j.

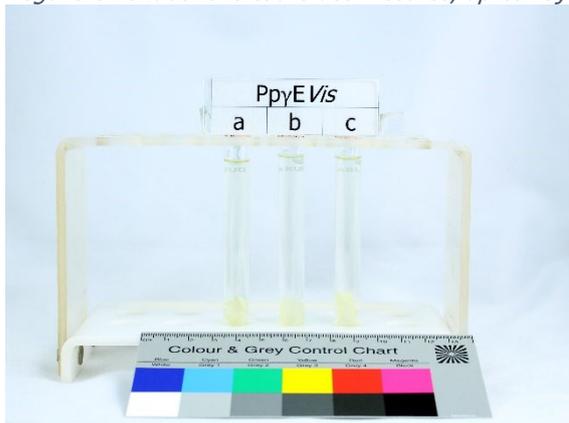


Fig. 26 : triplicat exposé à la lumière visible, après 3j.

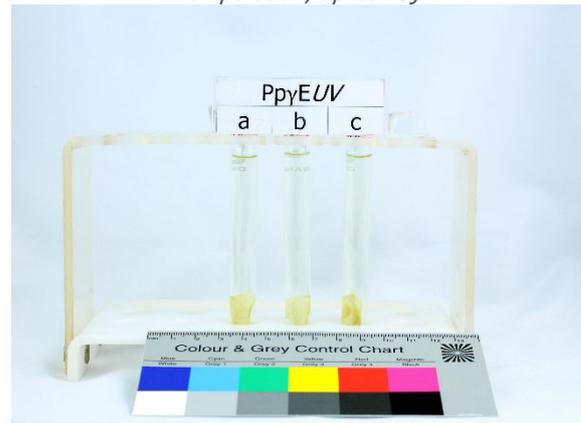


Fig. 27 : triplicat exposé aux UV-A, après 3j.

<sup>140</sup> Voir : Annexe III – Graphes colorimétriques, Graphe 6 et Graphe 7, p. 96.

<sup>141</sup> Voir aussi : Annexe III – Graphes colorimétriques, Graphe 10, p. 98 et Graphe 11, p. 99.

<sup>142</sup> Typiquement celles qui ont des antioxydants, l'ajout involontaire mais régulier d'air lors des mesures risquant à terme d'annuler leur effet.

Afin d'augmenter la reproductibilité des tests, il a été envisagé de couper toutes les folioles à la même masse, soit 30mg  $\pm$ 0.5mg. Cette option a été comparée au fait de les laisser entières, la fourchette massique atteignable d'une récolte d'une trentaine de folioles de taille similaire ayant été estimée à  $\pm$ 10mg, soit de 20 et 40mg. Comme attendu, le fait d'avoir sectionné les folioles accélère quelque peu la migration des pigments, mais la différence reste mince et est compensée par une moins grande dispersion des valeurs d'un spécimen à l'autre<sup>143</sup>. Finalement, afin de renforcer la visibilité des phénomènes et de diminuer encore l'impact de la variation de masse tolérée ( $\pm$ 0.5mg), la masse de 40mg a été retenue pour tester les recettes.

#### 2.3.4. Détermination des variantes à tester

La première question à laquelle les tests doivent répondre est : les ions Cu<sup>2+</sup> ont-ils réellement remplacé le Mg<sup>2+</sup> au sein du trétrapyrrole, ou la teinte verte est-elle uniquement le résultat de la présence de sels de cuivre (sulfate, acétate, chlorure) ? En effet, si l'on sait par l'industrie alimentaire que cette substitution fonctionne dans certains cas, il n'est *a priori* pas absolument certain que cela soit le cas lorsque la plante est intacte (et non broyée ou en purée) et dans un fluide que partiellement aqueux, par exemple. Il y a de nombreux « obstacles » à parcourir par le cuivre avant d'arriver au contact des chlorophylles qui n'ont pas encore migré dans le fluide : cuticule\*, épiderme (les cellules photosynthétiques étant essentiellement dans le parenchyme, au milieu de la feuille), puis parois cellulaires, membrane cellulaire, membranes des chloroplastes et enfin celle des thylakoïdes. De fait, les avis divergent à ce sujet dans le domaine de la conservation en fluide, et la réponse à cette question devrait avoir un impact sur le jugement de ces recettes en tant que « fixateurs » effectifs de la substance colorante d'origine ou simple teinture.

Comme il l'a été exposé au chapitre 2.2.1 *Recettes existantes*, p. 26, une seconde question liée à la première apparaît rapidement lorsqu'on consulte les différentes recettes : la teinte résultante est-elle influencée par l'anion du sel utilisé ? L'hypothèse rationnelle à ce sujet paraît être négative. De la même manière, il devrait être possible de varier le mélange de solvants sans que cela ait un impact direct sur la teinte mais uniquement sur la texture des tissus. Afin de vérifier cela, une première série d'échantillons a été testée avec les 3 sels de cuivre proposés par la littérature, dans l'eau (avec de l'acide acétique dans le cas de l'acétate de cuivre<sup>144</sup>) et dans le FAA (Tableau 3, p. 40). De plus, la variante originale à l'acétate de cuivre a été testée, soit par ébullition, et une variante à froid ne comprenant qu'un seul fluide pour la « fixation » et la conservation a aussi été choisie – soit celle proposée par Viswanathan *et al.*<sup>145</sup>.

---

<sup>143</sup> Voir : Annexe III – Graphes colorimétriques, Graphe 8 et Graphe 9, p. 97 et Tableau 14, p. 98.

<sup>144</sup> La littérature semble toujours les associer. Voir la remarque de la note : 104, p. 28.

<sup>145</sup> Viswanathan *et al.*, 1991.

Tableau 3 : codes des variantes de la première série, sur les sels de Cu et les solvants.

| <b>Sel</b><br><b>Solvant</b> | Sulfate de Cu | Acétate de Cu | Acétate de Cu         | Chlorure de Cu |
|------------------------------|---------------|---------------|-----------------------|----------------|
| Eau                          | Wcus          | Wcua          | Wcua° (100°C)         | Wcuc           |
| FAA (sauf<br>Wcua #)         | Acus          | Acua          | Wcua# (cons., formol) | Acuc           |

Un autre axe important à explorer est celui des techniques visant à combattre l'oxydation au sein du fluide et de la plante : il est possible de le diviser en techniques physiques et moyens chimiques, mais aussi par leur emploi en « fixation » ou en conservation. Il serait effectivement intéressant de savoir si le moment critique pour freiner l'oxydation se situe lors de la « fixation », possiblement pour préserver les phéophytines avant que le cuivre ne s'y loge, ou s'il est plus important d'avoir une protection à long terme des Cu-phéophytines.

Les techniques physiques ne sont pas explicitement proposées pour le fluide de conservation, elles n'ont donc été testées qu'en « fixation », en les combinant ainsi : vide d'air ou immersion dans l'alcool à 95%, puis « fixation » dans une solution aqueuse de sulfate de cuivre préalablement bouillie. Ce sel de cuivre a été choisi pour toutes les variantes de techniques « antioxydation » après que les résultats de la première série (sels + solvants) sont tombés.

Les antioxydants les plus utilisés, soient les sulfites, ont été testés en « fixation » et en conservation, selon deux approches différentes qui se retrouvent dans les recettes<sup>146</sup> : en « fixation », une solution aqueuse de SO<sub>2</sub> a été utilisée, selon deux concentrations différentes (Tableau 4, p. 41) car les recettes disponibles n'ont pas permis de trancher cette question<sup>147</sup>. En revanche, la recette en conservation a été basée sur la version où l'on utilise un sel (sulfite de sodium), le paramètre mal défini par la littérature étant cette fois le pH<sup>148</sup> : une variante a été testée avec de l'acide sulfurique à 96% (cela donne un pH d'environ 1) et une autre avec de l'acide sulfurique à 30% (pH ≈ 6)<sup>149</sup>.

<sup>146</sup> Recettes partant du gaz SO<sub>2</sub> : Maltby 1, Mackenzie, Ad. & Yo. 1, Scully A, Schnell, Wa. & Fi. 1a, Ha. & Di. 5. Recettes partant du sel Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> : Scully B, Knudsen 2, Ha. & Di. 4, Ha. & Di. 6. Voir : Verma, 2008, p. 21-22 ; Adriano & Yonzon, 1933, p. 122 ; Scully, 1937, p. 17-18 ; Schnell, 1960, p. 32 ; Wagstaffe & Fidler, 1968, p. 291 ; Hangay & Dingley, 1985, p. 20 ; Knudsen, 1972, p. 56.

<sup>147</sup> Seuls Adriano & Yonzon mentionne une valeur de concentration utilisable (6%), mais il s'agit d'une recette pour un fluide de conservation. Les mêmes auteurs proposent aussi de la réaliser soi-même en faisant buller du SO<sub>2</sub> dans de l'eau pendant 15 à 20 min par litre. C'est une proposition similaire qui est faite par Maltby et Wagstaffe & Fidler, ces derniers mentionnant plutôt l'augmentation de volume comme repère pour atteindre une concentration de 1.75% massique. Dans tous les cas, la durée du bullage ne permet pas de savoir la concentration finale car le débit n'est pas précisé, et l'augmentation de volume non-plus – à moins de calculs extrêmement compliqués – du fait de la compressibilité des gaz ; d'ailleurs, la valeur de 1.75% semble obtenue en faisant abstraction de ce phénomène. Voir : Annexe VII – Calcul et titration du SO<sub>2</sub>, 1. *Calcul de la concentration en SO<sub>2</sub> d'après l'augmentation de volume*, p. 132. Enfin, Scully, Schnell et Mackenzie (d'après Verma) ne mentionne qu'une solution déjà prête à l'emploi, sans indication sur sa concentration. Pour les sources, voir la note précédente.

<sup>148</sup> La quantité d'acide fort (HSO<sub>4</sub> ou HCl) est indiquée, mais pas sa concentration initiale. Scully, 1937, p. 18 et Hangay & Dingley, 1985, p. 20.

<sup>149</sup> Voir Annexe I – Liste des recettes de préservation de la couleur, p. 85.

Des recettes plus inhabituelles ont aussi été testées, dont deux incluent du  $\text{CuSO}_4$  et des sulfites dans le fluide de conservation. Elles n'ont donc pas de phase préalable de « fixation », quoique celle tirée de Hangay & Dingley comprenne une première étape plutôt insolite : l'immersion dans une solution de silicate de sodium. Cette dernière, aussi appelée « verre-liquide », a été utilisée pour conserver les œufs sans réfrigération car elle bouche les pores de la coquille<sup>150</sup>. Elle a été proposée pour la conservation de spécimens botaniques entre deux lames de verre, mais son utilisation pour des spécimens conservés en fluide est plus étonnante car le principe attendu par la recette est sans doute la formation d'un gel de silice au contact de la solution acide de conservation<sup>151</sup> (pH=2) ; or, ce gel devrait avoir une certaine rigidité *a priori* incompatible avec la flexibilité requise lors de la manipulation de ces spécimens.

Tableau 4 : résumé des variantes testées à propos des antioxydants + recettes spéciales

| Type / Utilisation      | Sulfites  | Antiox nat.   | Autres  |
|-------------------------|---|---|---|
| <b>Fix.</b>             | $\text{SO}_2$<br>- 5%<br>- 0.5%   | Tocophérol puis $\text{H}^+$<br>ascorbique<br>- $\text{H}^+$ asc. seul<br>- Toc. 1%<br>- Toc. 0.01% | Vide d'air puis $\text{Wcus}$ <sup>152</sup><br>bouilli |
|                         |   |   | EtOH 95% durant 20min puis $\text{Wcus}$<br>bouilli     |
| <b>Cons. après fix.</b> | $\text{Na}_2\text{SO}_3$<br>- pH 1<br>- pH 6  | Tocophérol  |   |
| <b>Cons. uniquement</b> | « Verre-liquide », puis $\text{Na}_2\text{SO}_3$<br>+ $\text{CuSO}_4$ + $\text{ZnSO}_4$ |   |   |
|                         | $\text{SO}_2$ + $\text{H}^+$ borique  |   |   |
| <b>Autres</b>           |   | Tocophérol, pas de Cu   | « Culactol », pas d'antioxydant                         |

Parmi les recettes dont la composition se démarque des autres, celle de Keefe et celle d'Amann ont été reprises plusieurs fois<sup>153</sup>. Toutefois, la première ne sera pas testée car elle comprend du nitrate d'uranium<sup>154</sup> – qui donne sans doute une belle teinte vert vif. La seconde est celle qu'Eckert nomme « Culactol », qui a la particularité de comprendre du phénol, de l'acide lactique et de la glycérine (mélange des 3 = « lactophénol ») en plus du chlorure et de l'acétate de cuivre. La variante la plus concentrée en lactophénol, proposée par Knudsen, a été retenue<sup>155</sup>.

<sup>150</sup> Beckwith, 1917.

<sup>151</sup> L'acide neutralise la substance alcaline ( $\text{Na}_2\text{O}$ ) qui inhibe la polymérisation de la silice. Liu & Ott, 2020, p. 2.

<sup>152</sup> Soit solution aqueuse de  $\text{CuSO}_4$ . Pour l'abréviation, voir le Tableau 3 ci-dessus. De manière générale, cette abréviation sera réutilisée ainsi car cette solution est la base de beaucoup des recettes testées.

<sup>153</sup> Voir Fig. 20, p. 29.

<sup>154</sup> Keefe, 1926, p. 332.

<sup>155</sup> Les variations des proportions entre chaque ingrédient est fréquente pour une recette ayant par ailleurs exactement les mêmes composés, mais elles sont parfois telles qu'une erreur de transcription n'est pas à exclure

Enfin, des antioxydants naturels ont aussi été testés, en « fixation » et en conservation. En « fixation », du tocophérol a été ajouté à de l'éthanol à 95% (moyen physique + chimique), puis de l'acide ascorbique a été ajouté à la solution aqueuse de  $\text{CuSO}_4$  pour la « fixation ». Le tocophérol a été testé à deux concentrations différentes<sup>156</sup>, mais toujours à une molarité inférieure à celle de l'acide ascorbique afin d'assurer la régénération du tocophérol. Ce dernier a aussi été testé en conservation, mais pas l'acide ascorbique car il se dégrade dans l'EtOH à 70%<sup>157</sup> ; une variante sans « fixation » préalable a été testée pour évaluer l'effet de l'antioxydant sur les chlorophylles magnésiennes.

## 2.4. Résultats et discussion

### 2.4.1. Influence des sels de cuivre

De manière générale, il est apparu que les sels de cuivre sont capables de donner une plus grande stabilité à la couleur verte des folioles ; le phénomène est particulièrement flagrant lorsque les spécimens sont soumis à un vieillissement accéléré à la lumière (Fig. 29). Cela n'empêche cependant pas une assez forte migration de substance(s) colorante(s) dans le fluide dès les premiers jours (Fig. 28)<sup>158</sup>, dans la plupart des cas, mais l'évolution de la teinte du fluide diverge rapidement de celle des spécimens non « fixés » : elle passe du jaune-vert (phéophytines, phéophorbides) à un vert tirant plus sur le bleu que celui du mélange frais de chlorophylles magnésiennes<sup>159</sup>. Il s'agit possiblement d'un mélange de sels de Cu et de Cu-phéophytines.

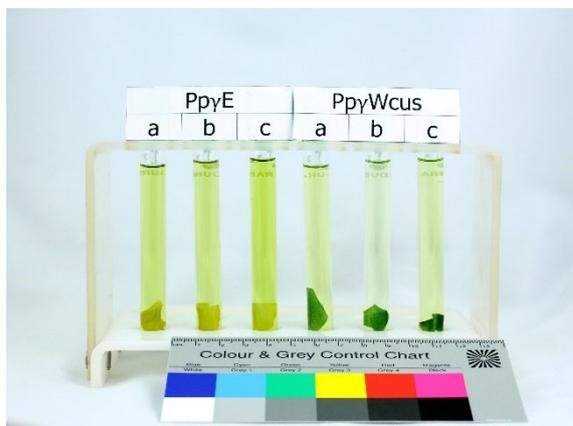


Fig. 28 : triplicat non-fixé (gauche) et "fixé" au  $\text{CuSO}_4$  (droite) après 3j et deux mesures (j1 et j3).

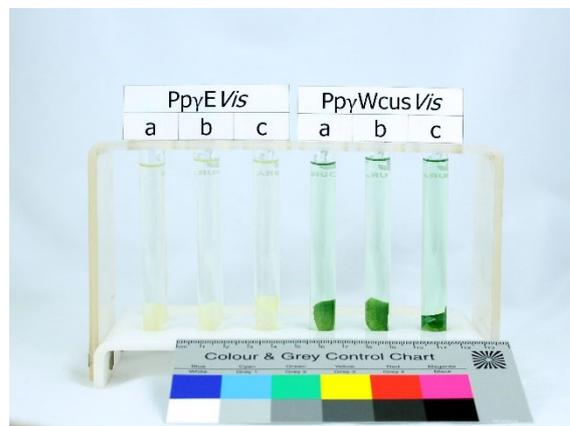


Fig. 29 : : triplicat non-fixé (gauche) et "fixé" au  $\text{CuSO}_4$  (droite) après 3j d'exposition à la lumière.

Le fait que cette teinte soit au moins en partie donnée par des complexes Cu-phéophytines est suggérée par la relative homogénéité de cette même teinte dans tous les échantillons, alors que les sels (sulfate,

---

(surtout qu'il s'agit généralement d'un facteur 10). En l'occurrence, la concentration de lactophénol dans l'eau passe de 5% à 80% (m/m) entre la recette originale et celle proposée par Knudsen (qui l'a reprise d'une source qui n'a pu être consultée). A l'inverse, Eckert propose de diluer 1 part de la solution à 5% dans 5 ou 6 parts d'une autre solution ne contenant pas de lactophénol... Voir : Amann, 1896, p. 19 ; (Eckert), 1932, p. 69 ; Knudsen, 1972, p. 56 ; Locquin & Langeron, 1983, p. 111 ; Hangay & Dingley, 1985, p. 19.

<sup>156</sup> Il semblerait que l'effet « antioxydant » ne soit pas nécessairement relié de manière linéaire à la concentration, mais qu'il y ait plutôt un optimum qui ne correspond pas à la concentration maximale. Voir : Evans *et al.*, 2002.

<sup>157</sup> Hsu *et al.*, 2012.

<sup>158</sup> Voir aussi : Annexe III – Graphes colorimétriques, Graphe 12, p. 99.

<sup>159</sup> Voir : Annexe III – Graphes colorimétriques, Graphe 13 p. 100.

acétate et chlorure) de cuivre peuvent donner des teintes assez variées, allant du vert-turquoise au bleu clair ou foncé suivant les situations (Fig. 30). Par ailleurs, une observation au microscope révèle que la teinte verte est située dans des zones définies au sein des cellules, qui plus est correspondant visiblement aux chloroplastes (Fig. 31 et 32). Enfin, en plus de ces indices en faveur d'une réelle stabilisation des tétrapyrroles par les ions  $\text{Cu}^{2+}$  plutôt que d'une simple « teinture », une confirmation analytique a été tentée par LC-MS. Mais pour l'instant, cette méthode n'a permis de détecter qu'un peu de Cu-phéophytine  $\text{b}^{160}$  – alors qu'une large quantité de complexes de cuivre était attendue sur l'échantillon analysé<sup>161</sup>.



Fig. 30 : teintes bleutées typiques des solutions de sels de cuivre.

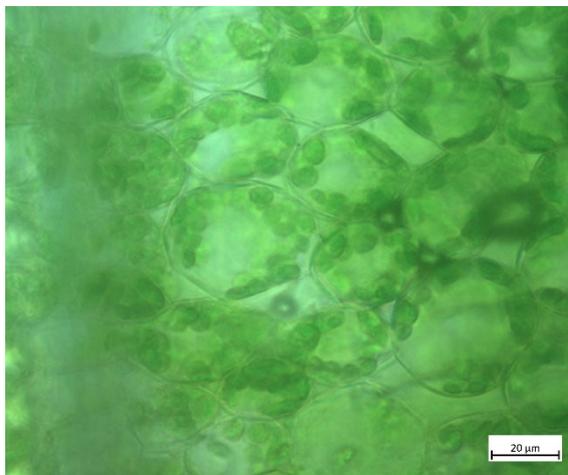


Fig. 31 : vue au microscope (500x) d'une foliole fraîche de *Pisum sativum*, les chloroplastes étant placés sur le pourtour des cellules (effet probable de la lumière).

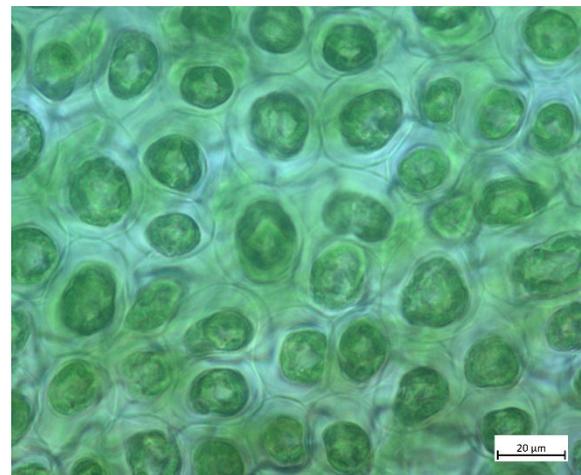


Fig. 32 : vue au microscope (500x) du spécimen *Wcua*<sup>o</sup>.a montrant clairement que les chloroplastes, coagulés au centre des cellules, sont porteurs de la couleur verte.

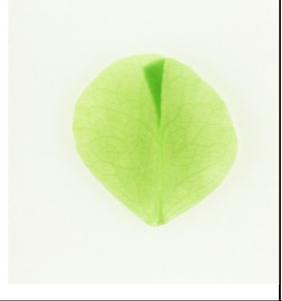
Les différents sels de cuivre ne donnent donc pas de teintes notablement différentes, mais il semble néanmoins qu'ils aient parfois une influence sur le succès de la recette puisqu'en solution aqueuse, le  $\text{CuSO}_4$  a donné une couleur plus durable (soit plus résistante à la dissolution par le fluide de

<sup>160</sup> Voir l'Annexe VIII – Analyse des dérivés de chlorophylles par LC-MS, p. 134.

<sup>161</sup> Il s'agit d'une variante à l'acétate de cuivre par ébullition (*Wcua*<sup>o</sup>), car il s'agit d'une des recettes ayant donné une teinte verte marquée et durable.

conservation, probablement). Ce sel a aussi plus fait ressortir les vaisseaux que les autres (Tableau 5)<sup>162</sup>.

Tableau 5 : comparaison de l'effet des différents sels de cuivre et solvants sur la « fixation » de la couleur<sup>163</sup>.

| Sel               | Eau, résultat + saturé  | Eau, résultat - saturé  | FAA, résultat + saturé   | FAA, résultat - saturé  |
|-------------------|---|---|--|---|
| CuSO <sub>4</sub> |    |    |    |    |
| Acétate de Cu     |   |   |   |   |
| CuCl <sub>2</sub> |  |  |  |  |

Le mélange de solvant utilisé semble avoir une forte influence sur le résultat final, non en termes de teinte mais plutôt de chroma<sup>164</sup>. En effet, les solutions de FAA ont pénétré bien plus rapidement que celles aqueuses dans les folioles, mais elles ont aussi extrait rapidement des chlorophylles ou dérivés, comme en témoigne la couleur des fluides de « fixation » après deux jours (Fig. 33 et 34)<sup>165</sup>. Celle contenant du CuCl<sub>2</sub> a étonnamment donné une couleur plus saturée aux folioles que les autres au début (migration lente), mais beaucoup de matière colorante a été perdue par après<sup>166</sup>. De manière générale, les recettes au FAA semblent donner des résultats plus pâles que celles à l'eau à cause de ce problème

<sup>162</sup> De manière générale, les illustrations des résultats présentées dans le texte sont choisies pour être représentatives de la réussite maximum d'une recette, c'est-à-dire qu'un des spécimens ayant la couleur la plus saturée est choisi. Mais il y a souvent de grandes différences d'une foliole à l'autre, le lecteur est donc invité à consulter l'entier des résultats (2 triplicats pour chaque variante) en : Annexe V – Photographies des échantillons, p. 114.

<sup>163</sup> La déchirure sur le spécimen « fixé » à l'eau et au CuSO<sub>4</sub> (Wcus.a) est due à la manipulation.

<sup>164</sup> En plus des exemples dans le texte, voir : Annexe V – Photographies des échantillons, p. 114-118.

<sup>165</sup> Voir également : Annexe III – Graphes colorimétriques, Graphe 14, p. 100.

<sup>166</sup> Voir : Annexe III – Graphes colorimétriques, Graphe 12, p. 99.

d'extraction rapide<sup>167</sup>. Le mécanisme de pénétration paraît d'ailleurs différent, puisque dans l'eau les folioles flottent longtemps (un poids les force à rester immergées) et que l'on remarque une plus forte coloration des vaisseaux : il est probable que les sels pénètrent uniquement par ces derniers et non directement à travers la cuticule ou par les stomates\*.



Fig. 33 : fluides de "fixation" aqueux après 2j ; la teinte est restée bleue.



Fig. 34 : fluides de "fixation" au FAA après 2j, ayant pris une teinte plus verte<sup>168</sup>.

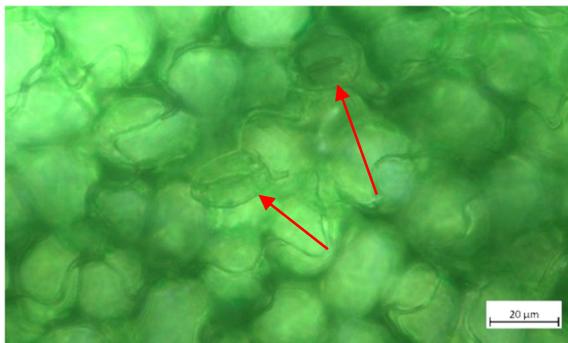


Fig. 35 : foliole fraîche vue au microscope (500x), focus sur l'épiderme inférieure incolore (stomates indiquées).

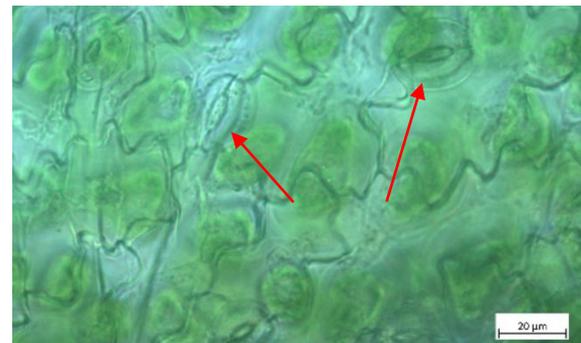


Fig. 36 : fol. Wcua<sup>o'</sup>.a vue au microscope (500x), focus sur l'épiderme inférieure incolore (stomates indiquées).

Le procédé de « fixation » par ébullition est effectivement rapide (3min suffisent largement) et efficace en termes de solidité de la couleur. La teinte obtenue est un vert tirant plus sur le bleu qu'avec les autres recettes (Fig. 37 et 38) : cela peut être dû à la fois à la présence de composés différents (Cupyrophéophytines) et à une modification structurelle des tissus. En effet, les folioles traitées ainsi apparaissent plus translucides, très souples, un peu moles et fragiles – comme des légumes verts cuits. Si cela n'est pas trop problématique tant que les spécimens restent en fluide, leur sortie à l'air libre durant une vingtaine de minutes – lors du renouvellement du liquide de conservation – a entraîné une rétractation extrême et irréversible (Fig. 39 et Fig. 40).

<sup>167</sup> D'après Blaydes, il est normal qu'une décoloration intervienne au début de la « fixation », mais les spécimens devraient reverdir après 3 ou 4 jours. Or, la « fixation » a duré seulement 2 jours. Cependant, des tests sur une plus longue durée (jusqu'à 2 semaines !) n'ont pas permis d'obtenir de résultats sensiblement différents.

<sup>168</sup> Pour apprécier l'écart avant/après, voir : Annexe III – Graphes colorimétriques, Graphe 14, p. 100.



Fig. 37 : *Wcua*<sup>o</sup>.a après 50j dans l'EtOH 70%

Fig. 38 : *Wcus*'b après 50j dans l'EtOH 70%.

Fig. 39 : *Wcua*<sup>o</sup>.a après 20min hors du fluide.

Fig. 40 : triplicat *Wcua*<sup>o</sup> après chang. du fluide.

Enfin, la recette testée de « fixation » obtenue directement par le fluide de conservation s'est révélée efficace à prévenir la migration des pigments (l'absence d'éthanol expliquant cela)<sup>169</sup>. La couleur obtenue est une des plus saturées et homogènes, mais elle est assez terne, olivâtre (comparer Fig. 42 à Fig. 43). Enfin, la teinte bleutée du fluide est restée constamment visible (Fig. 41)<sup>170</sup>.

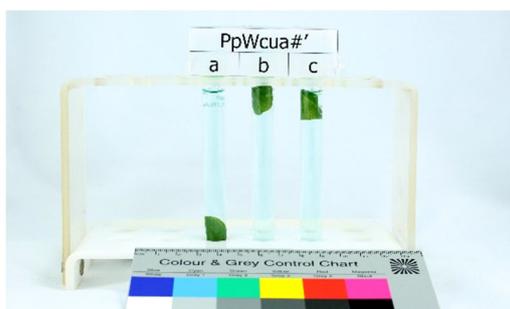


Fig. 41 : triplicat *Wcua*#' après 49j.



Fig. 42 : *Wcua*#'.a après 50j.



Fig. 43 : *Wcus.a* après 50j.

#### 2.4.2. Influence des techniques visant à diminuer l'oxydation des pigments et des tissus

La recette de « fixation » au sulfate de cuivre dans l'eau ayant donné le meilleur résultat des trois sels testés, elle a été utilisée comme base pour tester l'influence des techniques visant à réduire l'oxydation. La durée du procédé a été augmentée à 3 jours au lieu de 2 afin d'être sûr que la pénétration soit suffisante<sup>171</sup>.

Les moyens physiques ne se sont pas révélés très efficaces puisque pratiquement aucun changement dans la migration et dans la dégradation des pigments n'a été observé<sup>172</sup>. La technique par vide d'air

<sup>169</sup> Voir : Annexe III – Graphes colorimétriques, Graphe 15, p. 101.

<sup>170</sup> Cela n'aurait peut-être pas été le cas si la recette de Viswanathan *et al.* avait été suivie à la lettre, c'est-à-dire saturer en acétate de cuivre l'eau puis ajouter la même quantité d'acide acétique au lieu de saturer directement le mélange 1:1 d'eau et d'acétate de cuivre. Cette procédure, suivie pour la solution concentrée d'acétate de cuivre utilisée pour les différentes recettes, provient de : Wagstaffe & Fidler, 1968, p. 291. Voir aussi : Viswanathan *et al.*, 1991.

<sup>171</sup> Comme exposé au chapitre 2.4.1 - *Influence des sels de cuivre*, p. 44, la pénétration de la solution aqueuse par les vaisseaux de la foliole est lente ; certains spécimens suggèrent qu'elle a été incomplète lors du procédé sur 2 jours : Annexe V – Photographies des échantillons, p. 114-115.

<sup>172</sup> Voir : Annexe III – Graphes colorimétriques, Graphe 16, p. 101 et Graphe 17, p. 102.

(Fig. 44) n'a visiblement pas fonctionné correctement, car il y avait encore de nombreuses bulles dans la solution ; il faudrait réitérer l'expérience avec une dépression supérieure à 0.4 bar. L'immersion dans l'éthanol à 95% pendant 20 minutes a eu au moins l'avantage d'enlever de l'air et/ou de réduire le caractère hydrophobe des folioles : ils ne flottaient pas dans la solution aqueuse de « fixation ». Il semblerait aussi qu'il y ait eu un peu moins d'accumulation de substance colorante dans les vaisseaux, la répartition étant peut-être un peu plus homogène (Fig. 45, comparée à Fig. 46).



Fig. 44 : Ø.c après 50j.



Fig. 45 : E95'.a après 50j.



Fig. 46 : Wcus'.a après 50j.

La solution de « fixation » à laquelle a été ajouté du SO<sub>2</sub> à 5% a commencé par faire brunir fortement les folioles, mais après quelques heures le vert était revenu<sup>173</sup> et finalement, elle a permis une meilleure conservation de la couleur – soit un vert un peu plus vif que celui obtenu avec la solution sans SO<sub>2</sub> (Fig. 47 comparée à Fig. 46). Celle à 0.5% n'a pas eu d'effet positif. Les deux solutions ont visiblement endommagé la structure cellulaire, les chloroplastes n'étant pas organisés en cercle comme avec les autres recettes (Fig. 49 comparée à Fig. 50). De plus, les folioles étant moles et la surface légèrement pelucheuse au touché ; elles ont aussi fait ressortir les dommages causés par les brucelles lors de la manipulation (Fig. 47 et 48).

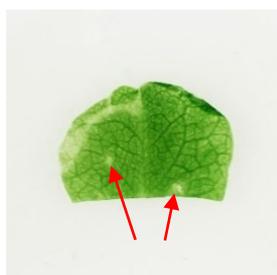


Fig. 47 : S5'.b après 50j, altération due à la manip.

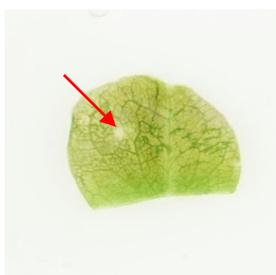


Fig. 48 : S0.5'.a après 50j, altération due à la manip.

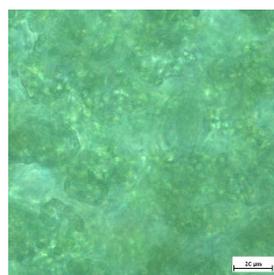


Fig. 49 : S5'.c vue au microscope (500x).

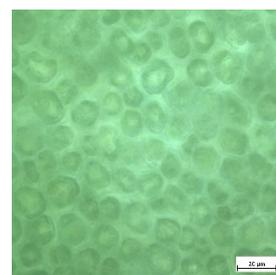


Fig. 50 : Wcus'.b vue au microscope (500x).

En comparaison, les solutions aqueuses contenant des sulfites utilisées en conservation ont donné de meilleurs résultats (vert plus vif, plus saturé), mais la quasi-absence de migration est à mettre sur le compte du solvant (Fig. 52 à 54, p. 49)<sup>174</sup>, l'eau seule ayant remplacé l'éthanol à 70%. La variante à pH=1 a visiblement subi l'influence de la manipulation, car les spécimens mesurés régulièrement ont

<sup>173</sup> Ce phénomène semble lié au pH très acide de la solution (0.8), car il a aussi été observé sur des feuilles de sumac immergées dans une solution d'éthanol à 70% avec de l'acide chlorhydrique ayant un pH=1.

<sup>174</sup> Voir : Annexe III – Graphes colorimétriques, Graphe 18, p. 102.

développé une couleur plus claire et légèrement marbrée de brun-jaune (Fig. 52 comparée à Fig. 53). Il se pourrait que ce soit dû à l'adjonction d'air, mais dans ce cas la variante à pH=6 aurait également dû être affectée, la quantité de sulfite étant a priori égale – voire moindre, selon les résultats d'une titration<sup>175</sup>. Un autre phénomène, complémentaire, explique peut-être mieux cela : plus le pH est bas, plus il y a de SO<sub>2</sub> par rapport aux autres ions sulfites (Fig. 51). Or, celui-ci étant gazeux, une partie s'échappe du récipient à chaque ouverture<sup>176</sup>. Il y a donc dû avoir plus de perte d'antioxydant dans la variante à pH=1. Par ailleurs, il a été constaté que le pH de la variante à pH=6 chutait fortement avec le temps<sup>177</sup> ; il se pourrait qu'ensuite un problème similaire à celui précité survienne, à moins que ce dernier ne soit lié uniquement à la concentration en acide sulfurique.

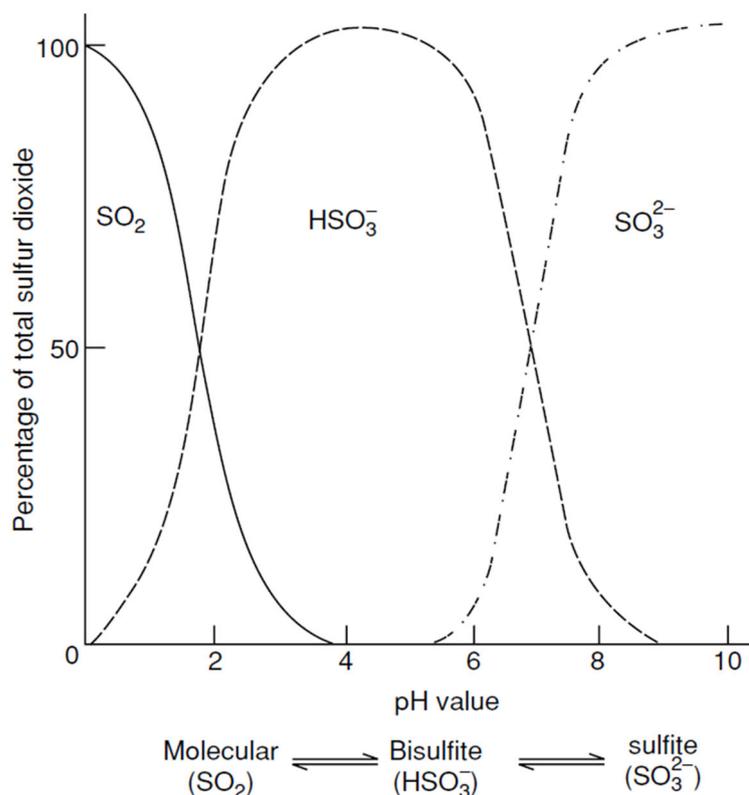


Fig. 51 : diagramme de spéciation des sulfites simplifié, dans une solution idéale.

<sup>175</sup> Voir : Annexe VII – Calcul et titration du SO<sub>2</sub>, 2. Titration du SO<sub>2</sub> dans les solutions contenant du SO<sub>2</sub> ou du Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> dissout, p. 132.

<sup>176</sup> Cela est confirmé olfactivement.

<sup>177</sup> Le pH d'un stock d'environ 100mL a passé de 6.2 à 5.7 en un mois. Celui de la solution de l'échantillon Pp,sul6.a chuté à 2.7 en 3 semaines seulement. Afin de vérifier que le phénomène ne soit pas dû uniquement à la manipulation, le triplicat témoin a été mesuré après 50 jours et les valeurs suivantes ont été mesurées : 1.1 , 2.7 et 2.9. Un nouveau double triplicat (nommé « Pp,sul6? ») a été lancé avec une nouvelle solution pour vérifier la répétabilité du phénomène d'acidification prononcé : cette dernière a été confirmée, le pH étant redescendu aux alentours de 3 (en moyenne). Il se peut qu'il s'agisse d'une oxydation des sulfites en sulfates due au dioxygène dissout, mais cela n'a pu être vérifié car le spot-test semi-quantitatif disponible était trop sensible (et les sulfites interfèrent) et la méthode de titration utilisée précédemment pour déterminer la molarité des sulfites en solution pas assez précise ; voir : Annexe VII – Calcul et titration du SO<sub>2</sub> - 2. Titration du SO<sub>2</sub> dans les solutions contenant du SO<sub>2</sub> ou du Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> dissout, p. 132.



Fig. 52 : ,sul1.c après 50j. Fig. 53 : ,sul1'.c après 50j. Fig. 54 : ,sul6.c après 50j. Fig. 55 : Wcus.a, exemple le plus saturé du triplicat.

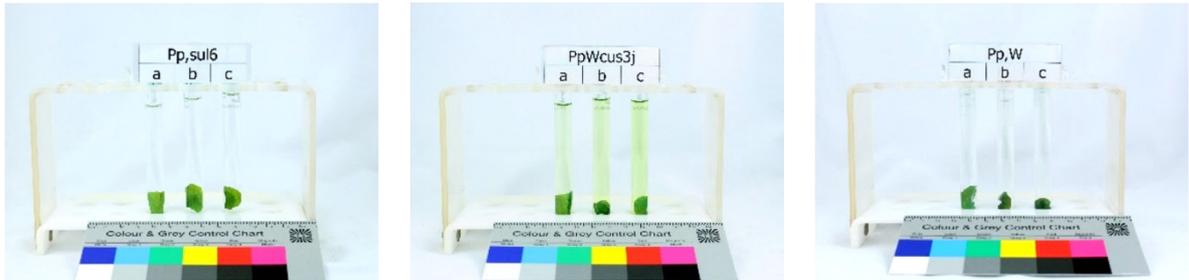


Fig. 56 : triplicat conservé dans une solution aq. de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  après 49j. Fig. 57 : triplicat conservé dans de l'EtOH après 10j. Fig. 58 : triplicat conservé dans de l'eau après 49j.

La variante utilisant du  $\text{SO}_2$  dissout dans la solution de conservation faisant aussi office de « fixation » (donc avec du  $\text{CuSO}_4$ ) n'a pas donné de résultats sensiblement différents de celles où la « fixation » diffère et précède la conservation en solution aqueuse de sulfites<sup>178</sup>. Le fluide reste cependant bleuté<sup>179</sup>, et les couleurs sont légèrement plus ternes – mais pas autant qu'avec la variante « deux-en-un » sans sulfites Wcua# (Fig. 56 à 64). Ces observations coïncident avec celle de Scully, qui a justement proposé une recette à deux solutions (Scully B) et une où la « fixation » est réalisée par le liquide de conservation (Scully A) : « Formula "A" also gave good results, but the solution was not as clear and the colors were not as well retained. »<sup>180</sup>



Fig. 59 : Sbo#.c ap. 50j. Fig. 60 : ,sul6.c ap. 50j. Fig. 61 : Wcua#'.a ap. 50j. Fig. 62 : Wcus.a ap. 50j.

<sup>178</sup> Voir : Annexe III – Graphes colorimétriques, Graphe 19, p. 103 et Graphe 20, p. 103.

<sup>179</sup> Il le serait peut-être un peu moins si la recette était respectée à la lettre : une concentration de 50g/L de  $\text{CuSO}_4$  a été utilisé au lieu des 15g/L proposés, afin d'avoir une concentration identique à d'autres variantes (notamment la solution de « fixation » Wcus utilisée dans la plupart des cas) pour une meilleure comparabilité.

<sup>180</sup> Scully, 1937, p. 19.

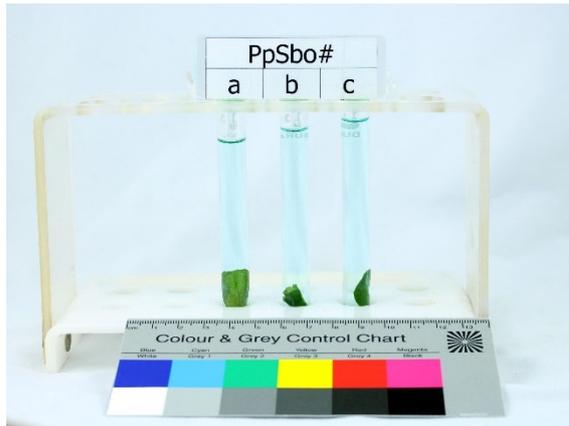


Fig. 63 : triplicat correspondant à la recette "Scully A" soit « deux-en-un » (sel de Cu en cons.), après 49j.



Fig. 64 : triplicat correspondant à la recette "Scully B" soit en deux solutions distinctes, après 49j.

Enfin, l'emploi d'antioxydants naturels ne s'est pas révélé très prometteur. L'ajout d'acide ascorbique dans la solution de « fixation » a provoqué la réduction d'une partie des ions  $\text{Cu}^{2+}$  en cuivre métallique, laissant une poudre cuivrée sur le fond du récipient (Fig. 65 à 67) et sur les folioles. Celle-ci n'a pu être entièrement enlevée par rinçage, mais elle a disparu après plusieurs semaines de conservation dans l'éthanol à 70% : il est probable que le cuivre se soit réoxydé. L'apparence des folioles après 50 jours n'est pas mieux que sans acide ascorbique, voire pire : les dommages dus à la manipulation initiale ressortent, comme dans le cas où la solution de « fixation » contient du  $\text{SO}_2$ . C'est probablement un effet des solutions très acides, celle d'acide ascorbique ayant un  $\text{pH}=1.7$  et celles de  $\text{SO}_2$  0.8 (5%) et 1.4 (0.5%).

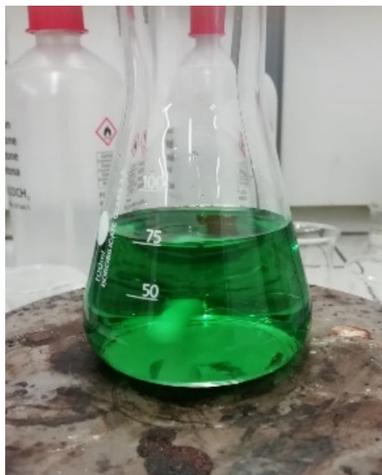


Fig. 65 : préparation de la solution de  $\text{CuSO}_4$  + acide ascorbique, le sel de cuivre étant totalement dissout.

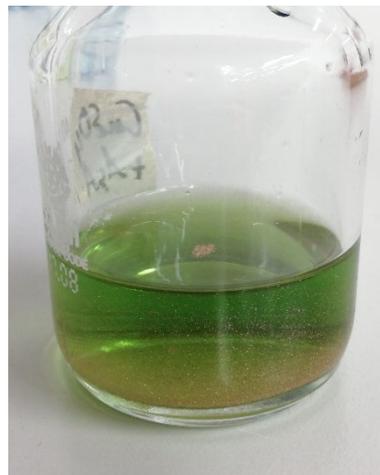


Fig. 66 : solution après "fixation", une partie du  $\text{Cu}^{2+}$  ayant été réduite et formant un dépôt pailleté.

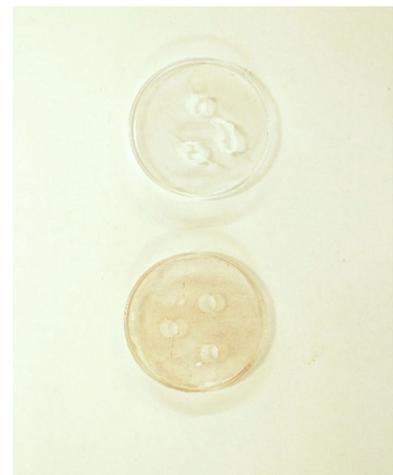


Fig. 67 : dépôt de cuivre métallique sur un élément utilisé pour maintenir en immersion les folioles.

L'ajout d'une phase préliminaire d'immersion dans l'éthanol à 95% contenant du tocophérol n'a pas permis d'améliorer le procédé, au contraire : la concentration testée la plus élevée (10g/L) semble même avoir augmenté le phénomène de migration dans les premiers jours. Enfin, l'adjonction de 0.1g/L de

tocophérol dans l'éthanol à 70% n'a pas permis d'améliorer la conservation de la couleur des folioles simplement « fixées » dans une solution aqueuse de  $\text{CuSO}_4$ , ni de folioles n'ayant subi aucun traitement préalable<sup>181</sup>.

### 2.4.3. Recettes spéciales

La recette de « Culactol » (code : Gphla) a permis d'obtenir une couleur assez saturée, mais très inhomogène, avec des zones brunes importantes (Fig. 68). Les zones arborant un vert plus vif se situent toujours du côté où la foliole a été sectionnée, révélant probablement une pénétration incomplète du fluide de « fixation » par ce bord. Cela est sans doute dû à la viscosité importante du fluide : il serait



Fig. 68 : *Gphla.c* après 50j.

donc intéressant de voir si le problème disparaît en utilisant la variante originellement proposée par Amann<sup>182</sup>, soit une proportion de 5% de lactophénol au lieu de 80%. Comme vu précédemment sur les spécimens dont le bain de fixation comportait du  $\text{SO}_2$ , les dommages dus à la manipulation avec les brucelles ressortent, probablement à cause du pH très acide ( $\approx 1$ <sup>183</sup>). Là aussi, une variante moins concentrée en lactophénol devrait diminuer le problème.

En revanche, la recette avec immersion préalable dans un bain de « verre-liquide » s'est révélée étonnamment intéressante. Bien que certains spécimens présentent également des zones olivâtres, celles-ci sont bien moins importantes et marquées que pour la recette précédente. Mais surtout, là où il y a du vert, la couleur est vive et est la plus proche des tons originaux (Fig. 74 et 75) qui a été obtenue de toutes les recettes (Fig. 69 et 70 comparées à Fig. 71, 72 et 76). Cet aspect pourrait être dû à la préservation des chlorophylles magnésiennes, mais cela semble très peu probable en milieu très acide ( $\text{pH} \approx 2$ <sup>184</sup>). De plus, l'exposition continue à la lumière visible<sup>185</sup> durant 2 semaines, après les 50 jours de conservation standard, a révélé une tenue trop bonne pour ces composés (Fig. 73).

---

<sup>181</sup> Annexe III – Graphes colorimétriques, Graphe 21, p. 104 et Graphe 22, p. 104.

<sup>182</sup> Amann, 1896, p. 19.

<sup>183</sup> La valeur a été lue sur un papier indicateur.

<sup>184</sup> La valeur a été lue sur un papier indicateur.

<sup>185</sup> Pour les paramètres des enceintes de vieillissement à la lumière, voir : Annexe IV – Graphes climatiques, Graphe 36 à Graphe 39, p. 112 - 113.



Fig. 69 : *sil,sul#'.c* ap. 50j    Fig. 70 : *sil,sul#.a* ap. 50j    Fig. 71 : *,sul6.a* ap. 50j    Fig. 72 : *,sul6.c* ap. 50j.



Fig. 73 : *sil,sul#'.c* et *Sbo#'.c* après 2sem. lum.    Fig. 74 : foliole fraîche.    Fig. 75 : foliole fraîche.    Fig. 76 : *Wcus.a* ap. 50j.

Il se pourrait donc que ce vert plus vif soit dû à la présence de Zn-phéophytines. Toutefois, ce n'est pas parce que le  $ZnSO_4$  est présent en plus grande quantité (10x plus) que le  $CuSO_4$  qu'il y a forcément plus de complexes de zinc que de cuivre, car la réaction de formation de ces derniers prévaut sur ceux du zinc<sup>186</sup>. L'inhabituelle qualité de la couleur résultante pourrait aussi être causée par un effet physique, soit d'excellent maintien de la structure d'origine des folioles (y compris la cuticule), soit d'une nouvelle couche en surface due au silicate de sodium. A ce propos, bien que certaines folioles aient parues inhabituellement pliées au début de leur transfert dans le fluide de conservation (Fig. 77), elles n'ont jamais présenté la rigidité que l'on aurait pu attendre avec un tel procédé.



Fig. 77 : triplicat *sil,sul#* 2h après immersion dans le fluide de cons.

Fig. 78 : cristal extrait du fond de l'éprouvette de *sil,sul#.a*

Fig. 79 : cristaux noircis après exposition à la lum. de *sil,sul#'.c*.

Il convient encore de noter que la concentration en sulfate de cuivre de la solution était suffisamment peu élevée ( $\sim 5g/L$ ) pour ne donner pratiquement aucune coloration à celui-ci<sup>187</sup>. En revanche, la concentration élevée en sulfate de zinc est probablement responsable de la formation de cristaux incolores/blancs au sein de la solution (Fig. 78) – mais en assez faible quantité et déposés au fond,

<sup>186</sup> Jones *et al.*, 1977, p. 153.

<sup>187</sup> Voir : Annexe III – Graphes colorimétriques, Graphe 23, p. 105 et Graphe 24, p. 105.

donc peu gênant pour l'appréciation visuelle des spécimens. Etonnamment, l'exposition continue à la lumière visible semble les avoir fait noircir (Fig. 79).

#### 2.4.4. Discussion générale sur la « fixation » de la chlorophylle

Bien qu'une confirmation analytique soit encore attendue, il semblerait que les sels de cuivre sont bel et bien capables de créer des complexes avec les dérivés des chlorophylles dans le cas de la conservation de spécimens botaniques en fluide. Ces complexes sont plus stables que les chlorophylles magnésiennes, c'est-à-dire qu'ils résistent mieux à la lumière, au milieu acide et à la migration provoquée par la dissolution dans l'éthanol à 70%. Il semblerait néanmoins qu'à court ou moyen terme (quelques mois ou dizaines d'années, voir : Tableau 6), ce solvant et la lumière visible aient raison de ces pigments également. Il faudrait réaliser un vieillissement accéléré sur des spécimens « fixés » puis conservés dans un fluide limitant fortement la migration, afin de vérifier si la photooxydation est renforcée par le fait que les pigments soient en solution dans le fluide et non plus dans les chloroplastes ; cela permettrait peut-être d'atteindre une conservation à long terme (100 ans) dans des conditions muséales idéales.

Tableau 6 : durées simulées max. et min. par l'exposition à 4'000 lux durant 49 jours des spécimens.

| Scénario   | Eclairement | h/j | j/ans | Mlxh par an | Durée simulée          |
|------------|-------------|-----|-------|-------------|------------------------|
| Idéal      | 50 lux      | 8   | 300   | 21.90       | <b>39 ans + 2 mois</b> |
| Expos. max | 5'000 lux   | 12  | 365   | 0.12        | <b>3 mois et demi</b>  |

Une autre solution pour ralentir la décoloration semble être de suivre une recette « deux-en-un », c'est-à-dire qu'un sel de cuivre est dissout dans le liquide de conservation. Il faudrait néanmoins trouver un compromis pour que la concentration n'impacte pas trop la couleur du fluide mais qu'il y ait assez de « réserve » pour contrer la perte de  $\text{Cu}^{2+}$  par photooxydation – si cela fonctionne réellement ainsi, ce qui devrait être prouvé par un test à long terme.

Les recettes contenant des sulfites en conservation se sont révélées intéressantes pour... contrer la migration des pigments, ce qui est simplement dû à l'eau ! Cela révèle que l'intérêt de ces composés soufrés réside peut-être plus dans leurs propriétés antiseptiques que dans leur capacité antioxydante. En effet, si utiliser de l'eau sans adjonction de solvant organique est la solution pour résoudre le problème de la migration, il soulève un autre problème : celui du développement de microorganismes. Les recettes de conservation en fluide proposent plusieurs autres composés ayant des propriétés antiseptiques, comme l'acide borique, le phénol ou le formaldéhyde<sup>188</sup>, mais ce dernier a une influence négative sur la teinte<sup>189</sup> ; pour les autres, il conviendrait de réaliser des tests pour comparer leur effet

---

<sup>188</sup> Van Dam, 2003, p. 105.

<sup>189</sup> Dangeon, Marion, Laura Brambilla et Emilie Cornet. 2021. « Conservation-restoration of a Botanical museum fluid collection: practice and research » UR-Arc CR, Rapport FLUIDIS, non publié.

à ceux des sulfites. Idéalement, il faudrait trouver un antiseptique qui soit efficace à une concentration n'impliquant pas un pH trop bas (disons en dessus de 3), car un milieu très acide endommage visiblement la structure des plantes. Enfin, il est certainement possible d'utiliser des concentrations très différentes en fonction des parties et espèces de plantes, certaines ayant un taux élevé de composés antiseptiques dans leur composition – phénoliques notamment.

Au-delà des problèmes de décoloration et de migration des pigments, un aspect reste très problématique : les couleurs obtenues sont bien dans les teintes vertes, mais elles ne correspondent pas aux verts des folioles fraîches – à l'exception éventuelle de la recette par immersion préalable dans une solution de silicate de sodium (sil,sul#), qui s'en approche beaucoup. Les recettes contenant uniquement un sel de cuivre provoquent une couleur très terne (c'est encore plus flagrant en dehors du fluide) par rapport au vert vif observé *in vivo*. Peut-être que le zinc permet d'obtenir une couleur plus acceptable, mais le problème est sans doute plus vaste. En effet, les camaïeux de vert qu'arborent les différentes espèces – et les différentes parties d'une même plante – ne sont pas dus uniquement au ratio de chlorophylle *b* par rapport à la chlorophylle *a* (Fig. 80), ni même à la présence d'autres pigments (typiquement des caroténoïdes, voir Fig. 81), mais aussi à un effet physique en fonction de la structure des tissus et de leur revêtement. Par l'exemple, l'aspect pruiné – c'est-à-dire poudreux et cireux, blanc ou même bleuté – en surface de certains végétaux est dû à une couche importante de cire cuticulaire. La répartition des cellules photosynthétiques au sein de l'épaisseur de la feuille à probablement aussi une influence qui, combinée à l'effet optique conféré par la cuticule, fait que l'aspect d'une feuille est souvent très différent entre le dessus et le dessous (Fig. 82 à 85).



Fig. 80 : exemple de variation de teinte due au ratio de chlorophylle *a/b* et total au sein d'une même plante (*hellebore fétide*).

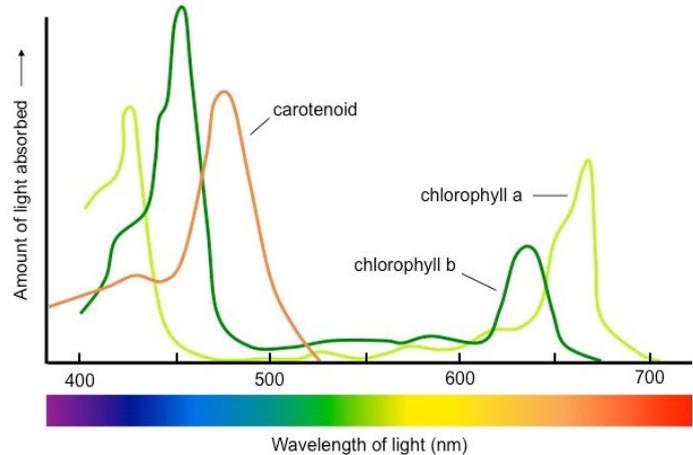


Fig. 81 : spectres d'absorption des pigments les plus impliqués dans la coloration des feuilles, celle-ci variant notamment en fonction de leurs proportions respectives.



Fig. 82 : foliole fraîche (Pp) vue du dessus.

Fig. 83 : foliole fraîche vue du dessous (pruiné).

Fig. 84 : foliole fraîche vue du dessus dans l'EtOH.

Fig. 85 : foliole fraîche vue du dessous dans l'EtOH.

Lors de la préservation en fluide, il semble probable qu'une partie de ces caractéristiques structurales soient altérées, notamment par les solvants organiques et les acides – sans parler du fait que l'indice de réfraction du fluide est différent de celui de l'air (comparer Fig. 82 et 83 à 84 et 85). Ainsi, il semble *a priori* impossible de retenir réellement les couleurs d'origine des plantes vertes, dans toute leur complexité. Au mieux, une recette de « fixation » peut permettre d'obtenir une teinte homogène à la bonne saturation\* – souvent trop homogène, probablement – pour une partie/zone donnée de la plante, mais probablement pas toutes. Mais dans la plupart des cas, il est fort probable que la couleur ne soit pas assez vive, marbrée par endroits (pénétration incomplète) et que les vaisseaux ressortent car ils sont plus foncés – alors que c'est plutôt l'inverse qui est observé sur les spécimens frais. Dans ce dernier cas, il y a cependant un avantage : la structure vasculaire est plus aisément lisible.

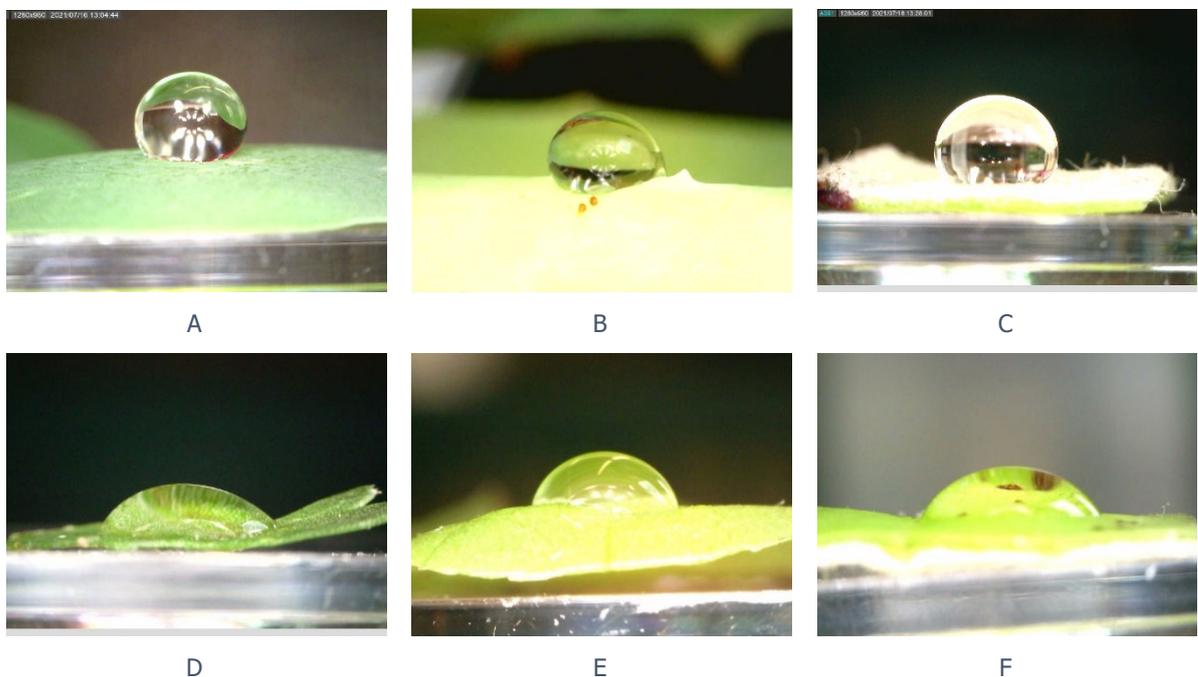


Fig. 86 : goutte d'eau déposée sur une feuille ou foliole de *Pisum sativum* (A), *Aloe vera* (B), *Tussilago* dessous (C) et dessus (F), *apiacée* (D) et *Taraxacum* (E). Les bryophytes ne sont pas illustrées car elles absorbent immédiatement la goutte d'eau.

Ces remarques amènent à la considération suivante : la première est qu'en restant optimiste sur le sujet, il faudrait à présent mener des tests sur des plantes autres que les petits pois, et en « situation réelle » – c'est-à-dire la plante entière, au moins dans certains cas, et dans des bocaux plutôt que des petites éprouvettes. Il devrait ainsi être possible de déterminer le degré de succès possible suivant le type de plantes (certaines couleurs, plus ternes notamment, seraient plus faciles à approcher que d'autres), et d'affiner les recettes selon les besoins. La question de la pénétration sera particulièrement importante dans le cas où la cuticule est très épaisse ou hydrophobe (celle des petits pois l'est passablement, voir Fig. 86), et que la plante est grande et/ou épaisse : si la pénétration ne peut se faire que par les vaisseaux sectionnés, cela pourrait être très long, et il faudrait alors peut-être reconsidérer les antioxydants pour leur capacité supposée à ralentir les processus d'altération avant que le cuivre ne soit parvenu à stabiliser les tétrapyrroles. L'injection en plusieurs points pourrait aussi être envisagée.

### **3. Prévenir la migration des « tannins » – ou maintenir le fluide clair**

#### **3.1. Coloration/brunissement des phénols**

Comme il l'a été présenté au chapitre 1.1.8 - *Les « tannins », des polyphénols ambigus*, p. 10, le problème de coloration du fluide par des substances brunâtres issues de plantes ne peut se résumer à ce qu'on appelle les « tannins » *stricto-sensu*. Ainsi, la définition suivante a été retenue pour le présent travail : substance brune soluble dans les solvants polaires. Qui plus est, cette substance est brune lorsqu'elle crée le problème visuel au sein du fluide de préservation, mais pas nécessairement avant.

Ce passage d'un composé phénolique incolore à une version colorée peut être résumé à deux phénomènes différents mais pas mutuellement exclusifs : l'oxydation et la polymérisation. Le premier cas n'est pas spécifique aux « tannins », les indigoïdes devenant également colorés lors de leur oxydation, par exemple<sup>190</sup>. L'oxydation des polyphénols produit typiquement des dérivés quinoniques<sup>191</sup>, souvent responsables d'une coloration brune voire noire<sup>192</sup>.

Le brunissement par polymérisation est, lui, typique des « tannins », qu'ils s'agissent de tannins *stricto sensu*, de phlobaphènes, d'hétéropolymères comprenant des anthocyanes à leurs extrémités (= « pigments polymériques »<sup>193</sup>) ou encore de mélanges complexes entre phénols et protéines<sup>194</sup>. Il est aussi synonyme d'altération, puisque ce phénomène se produit notamment lorsque les tissus végétaux se dégradent : cela implique, pour la conservation en fluide, que le problème ne se limite pas nécessairement à contrer la migration de substances mais aussi à prévenir leur dégradation.

---

<sup>190</sup> Davies, 2004, p. 225.

<sup>191</sup> Loudon & Parise, 2016, p. 862.

<sup>192</sup> Bittner, 2006, p. 207.

<sup>193</sup> Ce terme est utilisé dans le domaine de l'œnologie, où les anthocyanes et les tannins sont très étudiés. Par exemple : Cheynier *et al.*, 2006.

<sup>194</sup> Les proanthocyanidines ne se polymérisent pas qu'entre elles, mais souvent avec d'autres molécules. Tanaka *et al.*, 1999, p. 766.

### 3.2. Techniques de préservation

Apparemment, il n'y a pas de recette de préservation en fluide qui propose explicitement une solution à la problématique des « tannins ». En revanche, plusieurs proposent une solution pour les holoparasites\* (Orobanches, Monotropes, Rafflesia, etc.), soient des plantes qui ne produisent pas de chlorophylle. Elles ont souvent un ton de base blanc ou brunâtre, mais comportent aussi du rouge, du violet ou encore du jaune ; elles sont réputées pour brunir voire noircir lorsqu'on les conserve par séchage<sup>195</sup>. Ces recettes, qui se résument à un seul principe (les sulfites), seront présentées plus bas. L'organisation de ce chapitre s'articule autour des différentes problématiques posées par les « tannins », à défaut d'avoir des recettes offrant des solutions différentes pour la guider.

Premièrement, la problématique commune à tous les pigments concernés est celle de la migration : en effet, le seul moyen d'empêcher le brunissement du fluide par les pigments déjà bruns au sein de la plante, comme la juglone<sup>196</sup>, est de les forcer à rester dans la plante. Ces pigments étant globalement hydrosolubles, les fluides de conservation habituels ne peuvent au mieux que ralentir mais clairement pas stopper leur migration. La solution idéale pourrait sembler être de les conserver en milieu apolaire, mais cela pose généralement d'autres problèmes, car les solvants concernés sont soit assez volatiles et souvent très toxiques et inflammables<sup>197</sup>, soit gras et poisseux (huiles minérales) et donc peu pratiques si on doit sortir le spécimen du fluide pour mieux l'étudier. L'huile de paraffine a néanmoins été proposée par Mackenzie pour les pommes jaunes, lors d'une phase initiale de fixation (avec du formol), mais les spécimens sont ensuite conservés dans une solution de dioxyde de soufre<sup>198</sup>. La source originale n'a pu être consultée, mais il est envisageable que le but soit de rendre les tissus hydrophobes par imprégnation. Il serait donc intéressant de tester cette idée sur des espèces ayant la problématique des « tannins », et aussi une variante où les spécimens seraient conservés dans l'huile minérale – les désavantages de cette dernière étant modérés en comparaison des hydrocarbures plus légers.

Les recettes proposées pour les plantes parasites sont apparemment destinées à contrer une des deux causes de coloration des phénols incolores : l'oxydation. En effet, elles proposent toutes l'utilisation de sulfites<sup>199</sup> en solution dans de l'éthanol, la différence résidant dans le fluide de conservation. Strasburger propose vraisemblablement l'utilisation du formol à 4%, alors que Nieuwland & Slavin optent pour du xylène avec un peu d'alcool saturé en Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (ou simplement ce dernier sans xylène) ; van Steenis propose également de laisser dans la solution alcoolique saturée en sulfites. Nieuwland & Slavin mentionnent d'autres essais moins concluants, incluant du camphre, de l'eau chlorée et de l'eau de

---

<sup>195</sup> Nieuwland & Slavin, 1928, p. 103.

<sup>196</sup> Voir les deux chapitres suivants : 1.1.6 - *Les quinonoïdes*, p. 10 et 1.1.8 - *Les « tannins », des polyphénols ambigus*, p. 10.

<sup>197</sup> Les hydrocarbures ne sont pratiquement jamais proposés pour la conservation en fluide. Néanmoins, le xylène a été proposé par Nieuwland & Slavin pour la conservation de plantes telles les Monotropes, après les avoir préalablement immergées dans une solution alcoolique de sulfite de sodium. Nieuwland & Slavin, 1928, p. 103.

<sup>198</sup> Verma, 2008, p. 22.

<sup>199</sup> A partir de SO<sub>2</sub> pour Strasburger, de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> pour Nieuwland & Slavin, et soit de NaHSO<sub>3</sub> soit de KHSO<sub>3</sub> pour van Steenis. Butler, 1918, p. 67 ; Nieuwland & Slavin, 1928, p. 103 ; van Steenis, 1935, p. 341.

Javelle ; le problème du chlore semble être qu'il décolore toutes les couleurs des spécimens, sans discrimination<sup>200</sup>.

Enfin, la polymérisation des phénols semble être un phénomène à double tranchant : elle sature et fonce leur couleur, mais elle les rend aussi plus insolubles<sup>201</sup>. Ainsi, l'idéal serait de provoquer cette réaction au sein de la plante afin de prévenir la migration des phénols, puis de l'inhiber dans le fluide pour qu'il reste clair même si certains composés s'y sont solubilisés. Si la seconde proposition ne semble pas problématique, la première ne serait évidemment envisageable que pour les spécimens déjà suffisamment bruns *in vivo* pour ne pas risquer une modification de couleur trop importante. De plus, cette solution semble surtout pouvoir s'appliquer aux tannins condensés dont la polymérisation, provoquée par des aldéhydes notamment (Fig. 87), est largement pratiquée pour réaliser des adhésifs<sup>202</sup>.

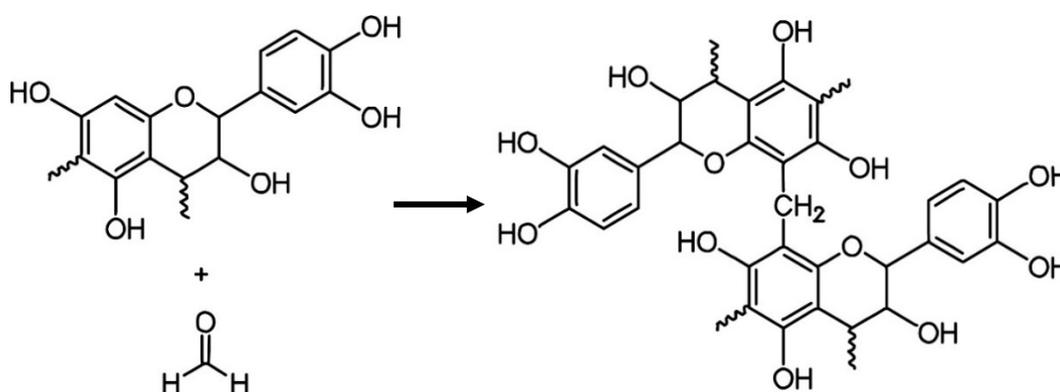


Fig. 87 : principe de base de la polymérisation des tannins condensés induite par les aldéhydes (ici le plus simple d'entre eux, le formaldéhyde) en formant des ponts méthylène.

### 3.3. Méthode et matériel

#### 3.3.1. Choix des spécimens à tester

Les seules recettes approchant la problématique des « tannins » nomment explicitement des plantes parasites dépourvues de chlorophylles : les orobanches ont été choisies pour réaliser les tests car elles étaient relativement disponibles. Plus spécifiquement, *Orobanche hederæ* (Fig. 88 A) a été utilisée, *Orobanche caryophyllacea* (Fig. 88 B) ayant uniquement servi de comparaison dans un cas. Il convient de noter que ce type de plantes bénéficie particulièrement d'une conservation en fluide car elles ne se pressent pas aisément en herbier et que leur structure tridimensionnelle en est affectée. Elles sont également intéressantes car elles ne sont pas uniquement incolores mais présentent diverses teintes dans les violets-pourpres et les jaunes – celles-ci étant apparemment influencées par les conditions d'ensoleillement notamment. Elles ont toujours été ramassées en journée, en juin, par beau temps mais dans des conditions relativement ombragées, avec le maximum de fleurs ouvertes et non-fanées, et la tige sectionnée le plus bas possible.

<sup>200</sup> Pour Strasburger : Butler, 1918, p. 67. Pour les autres : Nieuwland & Slavin, 1928, p. 103-104 et van Steenis, 1935, p. 341.

<sup>201</sup> Falcão & Araújo, 2018, p. 70.

<sup>202</sup> Pizzi, 2008, p. 180 et 184 notamment.



Fig. 88 : spécimens frais d'*Orobanche hederaceae* (A) et d'*Orobanche caryophyllacea* (B), et échantillons conservés en EtOH 70% durant un mois de feuilles d'orties (C) et de sumac (D), d'écorce d'if (E), de marronnier (F) et de pin (G), et de coquilles de noix broyées (H).

Les orobanches n'étant pas brunes et ne contenant pas nécessairement un taux élevé de tannins<sup>203</sup>, elles ont été prévues pour les tests avec les sulfites et pour les tentatives d'« hydrophobisation » ou conservation en milieu apolaire, mais pas pour les tests visant à faire polymériser les tannins à l'intérieur de la plante. Pour cela, plusieurs plantes censées contenir des tannins ont été testées rapidement dans de l'éthanol à 70% (Fig. 88 C à H), mais le résultat n'était pas toujours très voyant : par exemple, les feuilles de sumac vinaigrier et les coquilles de noix n'ont pas donné une coloration vraiment foncée au fluide (Fig. 88 D et H)<sup>204</sup>. En revanche, les écorces de pin, de chêne et de marronnier d'Inde ont fortement coloré le fluide (Fig. 88 F et G). L'écorce de pin a été retenue par sa grande disponibilité, sa propreté<sup>205</sup>, et parce qu'elle est réputée contenir des tannins condensés particulièrement aptes à la polymérisation par les aldéhydes<sup>206</sup>. Elle a été récoltée par beau temps, en mars puis en mai, en évitant : les zones humides, les parties infestées d'insectes, et la couche située le plus à l'extérieur.

### 3.3.2. Déroulement standard des tests

De manière générale, la même méthode de mesures colorimétriques et prise de photos que pour les chlorophylles a été utilisée<sup>207</sup>. Lors de l'interprétation des résultats, il conviendra de garder à l'esprit que si la comparaison des mesures entre elles fait sens, celle des photos est sujette à caution : elles ne sont comparables que si le fluide est dans un récipient identique. En effet, pour la gamme de couleurs



Fig. 89 : même fluide en bocal et en éprouvette.

concernées par la problématique des « tannins », l'influence de l'épaisseur du fluide sur sa teinte est très forte. La décroissance exponentielle de la transmittance en fonction de l'épaisseur du milieu de transmission<sup>208</sup> induit, dans le cas des teintes initialement jaunes, un déplacement bathochrome\* du spectre de transmittance<sup>209</sup>. Autrement dit, un liquide jaune clair devient progressivement plus foncé et plus rouge lorsque la distance que parcourt la lumière en son sein augmente (Fig. 89 et Graphe 4). Cela implique que la couleur

<sup>203</sup> Aucune preuve dans ce sens n'a pu être trouvée.

<sup>204</sup> Pour les coquilles de noix, acheter dans le commerce, il est possible que ce soit dû à un blanchiment. Voir : Boaghi, 2016.

<sup>205</sup> C'est une écorce organisée en plaques, qui ne s'effrite pas et contient assez peu d'organismes étrangers, contrairement à l'écorce de chêne, par exemple – ce qui pose un problème autre pour garder le fluide clair.

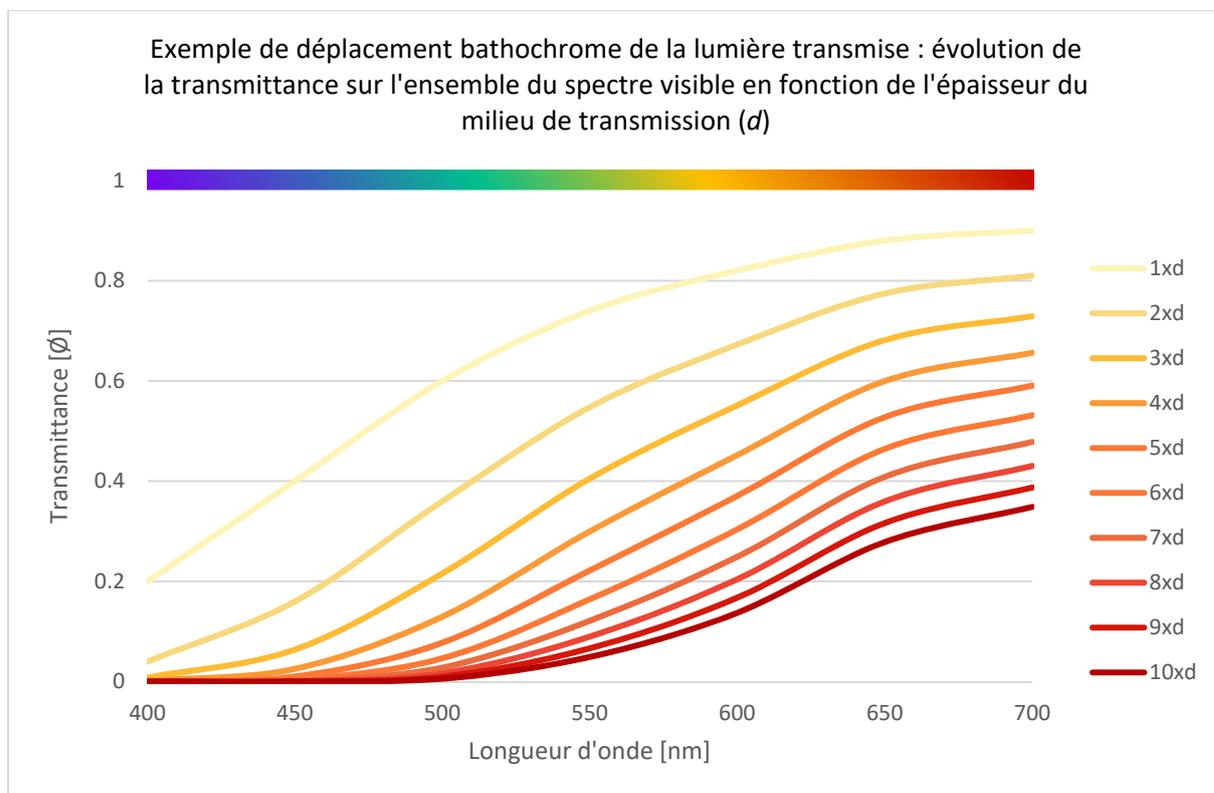
<sup>206</sup> Pour la présence de proanthocyanidines chez l'espèce *Pinus sylvestris*, voir : Porter, 1989, p. 673-674. Pour l'aptitude particulière à la polymérisation des tannins condensés des espèces de pins en général, voir : Pizzi, 2008, p. 185.

<sup>207</sup> Voir : 2.3.2. - *Evaluation du changement d'aspect des échantillons*, p. 34.

<sup>208</sup> C'est une partie de la loi de Beer-Lambert, qui prend également en compte le coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon$ ) et la concentration du pigment dans le milieu ( $c$ ). Si  $d$  est la distance, alors :  $T = 10^{-\epsilon cd}$  pour chaque longueur d'onde.

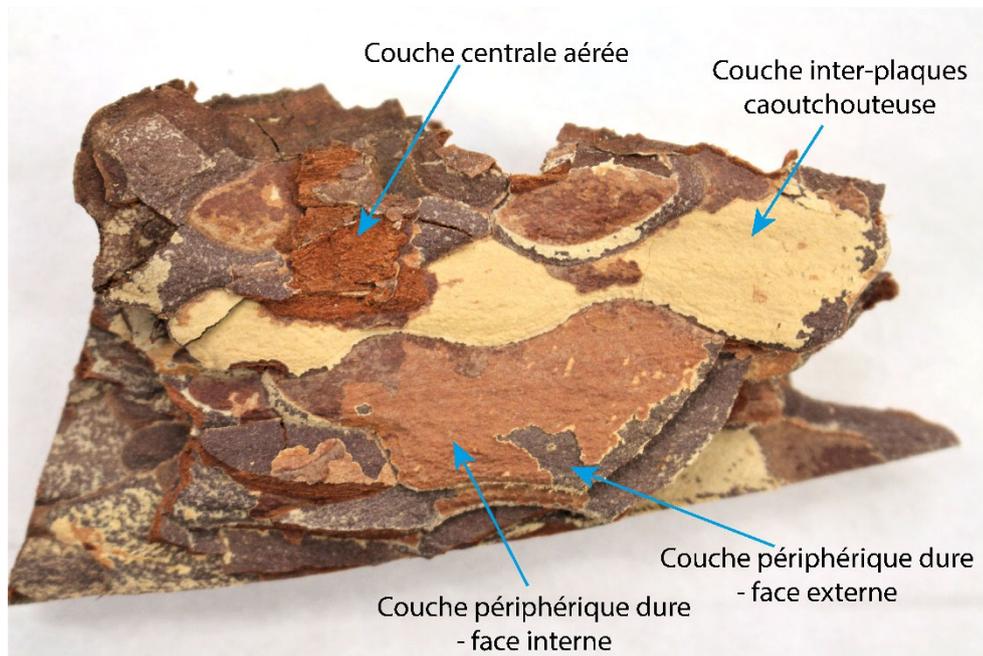
<sup>209</sup> C'est effet est logiquement moins prononcé sur les couleurs dont le spectre est plus ou moins symétrique, comme les verts, et inversé dans le cas des bleus turquoise (déplacement hypsochrome\*).

d'un fluide observé dans des éprouvettes – ou mesuré par le colorimètre dans une cellule de 1cm de profondeur – ne correspond pas à la couleur qu'aurait ce même fluide s'il remplissait un bocal de plus de 10cm de diamètre.



Graph 4 : principe du déplacement bathochrome dû à l'augmentation de l'épaisseur du fluide.

Afin de pouvoir multiplier les tests, ceux avec l'écorce de pin ont été miniaturisés – soit réalisés dans des éprouvettes. Une série préliminaire a été menée pour établir la cinétique de migration et évaluer un éventuel impact du mode de préparation de l'écorce. En effet, l'écorce de pin a une structure empilée (Fig. 90, p. 62), et chaque plaque comporte une couche centrale épaisse et aérée brun-rouge, entourée par une paroi brun foncé et relativement dure (très lignifiée, probablement). Cette dernière est elle-même recouverte d'une substance beige caoutchouteuse, qui fait probablement office d'isolant et/ou de joint entre les plaques. L'écorce a été débitée selon trois modes : 1) en petits carrés d'environ 6x6mm en enlevant systématiquement la paroi dure sur une des faces (exposant ainsi la partie aérée brun-rouge) et toute trace de la substance beige ; 2) en petits carrés d'environ 6x6mm en enlevant la paroi dure sur une des faces mais en laissant la substance beige sur l'autre face ; 3) en petits bouts de formes quelconques en enlevant la paroi dure sur une des faces de manière sommaire. Le premier mode de préparation étant très chronophage, c'est pour cela que les autres ont été évalués. Chaque éprouvette a été remplie avec 1.5g  $\pm$ 0.01 d'écorce de pin, et remplie autant que possible d'éthanol à 70% - soit environ 5mL.



*Fig. 90 : coupe d'écorce de pin à différents niveaux pour illustrer les différentes couches.*

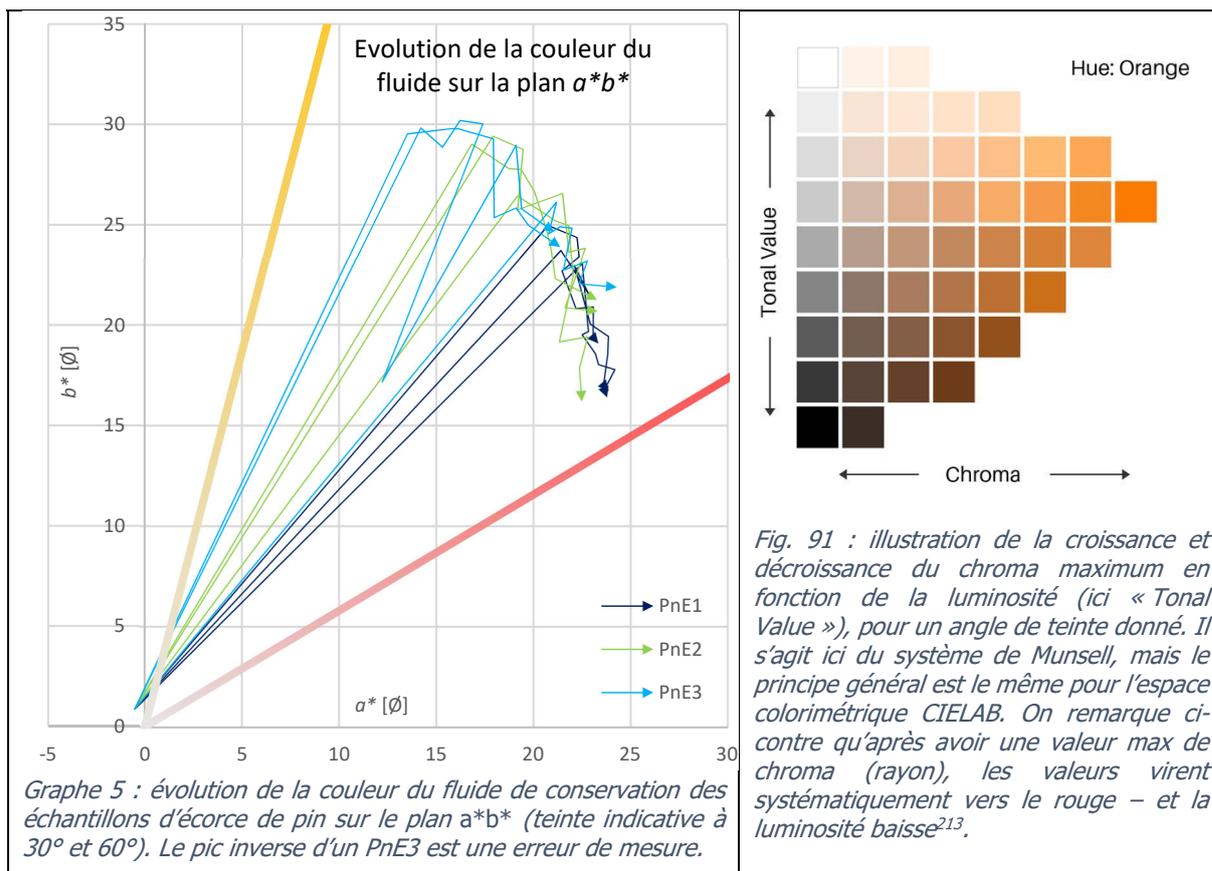
La cinétique de migration s'est révélée extrêmement nette et rapide, le chroma du fluide ayant atteint sa valeur maximum après 1 jour seulement – et étant ensuite quasiment constant (Graphe 5, p. 63)<sup>210</sup>. Cependant, cela ne signifie pas que la concentration en substance(s) colorante(s) n'a pas augmenté : il semblerait plutôt que le chroma ait atteint une valeur limite (environ 35) que le fluide coloré de cette manière ne peut pas dépasser, et qu'ensuite l'augmentation de la concentration continue à influencer selon la loi de Beer-Lambert sur la décroissance logarithmique de la transmittance<sup>211</sup> – ce qui se traduit par une baisse de la luminosité, donc du chroma (Fig. 91, p. 63)<sup>212</sup>. Dans ce cas, il est donc intéressant de considérer la valeur de luminosité.

---

<sup>210</sup> Voir : Annexe III – Graphes colorimétriques, Graphe 25, p. 106.

<sup>211</sup> Voir : note 209.

<sup>212</sup> Voir aussi : Annexe III – Graphes colorimétriques, Graphe 25, p. 106, Graphe 26, p. 106 et Graphe 27, p. 107.



Pour revenir aux échantillons d'écorce de pin, il semble que plus la proportion de matière aérée brun-rouge est élevée (donc plus le mode de préparation est poussé, dans l'ordre : E1>E2>E3) moins le liquide est coloré et plus la teinte tire vers les rouges (Graphe 5)<sup>214</sup>. Toutefois, ces différences ne sont pas très marquées. De plus, les trois modes de préparation testés ont le désavantage de rendre le prélèvement complet du fluide difficile (les bouts d'écorce s'accumulant au fond et prenant beaucoup d'espace), de relâcher des particules visibles d'écorce et de ne pas permettre l'emploi de 6mL de fluide (idéaux pour les mesures colorimétriques). De manière générale, trop débiter l'écorce s'éloigne des conditions supposées habituelles de conservation, où des plaques entières – voire des empilements – pourraient être placées dans le fluide. Ainsi, pour les tests de polymérisation, l'écorce a plutôt été préparée de cette manière : 1 seul rectangle allongé de 0.7g ±0.01 par éprouvette, et toujours l'enlèvement de la paroi dure sur une face (afin de favoriser la migration) et de la substance beige en générale (afin de diminuer les variables parasites). L'espacement des mesures prévu était similaire à celui prévu pour la chlorophylle, pour correspondre au caractère exponentiel décroissant du phénomène de migration.

Les orobanches ont, à l'inverse, été préparées de manière moins rigoureuse mais plus réaliste car elles sont relativement volumineuses et qu'il n'est possible de les récolter qu'une fois par année : il paraissait

<sup>213</sup> Voir : Annexe III – Graphes colorimétriques, Graphe 26, p. 106.

<sup>214</sup> Voir aussi : Annexe III – Graphes colorimétriques, Graphe 27, p. 107.

donc intéressant d'avoir un aperçu global de leur comportement en fluide, incluant l'inflorescence\* et le bas de la tige. Une inflorescence complète étant néanmoins trop grande pour rentrer dans les bocaux à disposition, elles ont été débitées en tronçons les plus longs possibles, en commençant par les extrémités (pointe de l'inflorescence et tige proche des racines) et jusqu'à obtenir un total de 20g ±1. En principe, deux spécimens par variante au lieu de trois ont été utilisés afin de limiter la quantité de fluide utilisé.

### 3.3.3. Détermination des variantes à tester

Pour la série de tests visant à provoquer la polymérisation des tannins condensés au sein de l'écorce de pin, le formaldéhyde a été retenu car il semblerait que ce soit un agent polymérisant particulièrement efficace dans ce cas<sup>215</sup>. Cependant, il est possible que cette molécule soit trop courte pour continuer à provoquer des liaisons lorsque les polymères sont devenus imposants et que les groupes réactifs sont trop éloignés<sup>216</sup>. L'ajout d'un agent pontant, comme le phénol, peut théoriquement palier à ce problème<sup>217</sup>. Ainsi, les paramètres suivants ont été testés : la concentration du formaldéhyde dans l'eau, la durée de fixation, et l'ajout de phénol dans le but de créer des polymères plus longs (pour les détails discutés ci-dessous, voir Tableau 7, p. 65).

Les concentrations du formaldéhyde ont été choisies selon le maximum possible (35%)<sup>218</sup>, une valeur proche de celle habituellement employée pour les liquides fixateurs (3.5%), et un intermédiaire entre les deux (17.5%)<sup>219</sup>. La durée de fixation standard a été fixée arbitrairement à 1 jour, les échantillons de faible taille et « mis à nu » sur une face (retrait de la paroi dure et de la substance isolante) devant *a priori* absorber relativement rapidement le liquide ; cette durée a néanmoins été triplée sur un triplicat afin d'évaluer ce paramètre. Enfin, la concentration en phénol a été choisie relativement arbitrairement, une valeur s'approchant de la saturation dans l'eau à 20°C (83 g/L) et l'autre étant 10x moindre.

---

<sup>215</sup> D'autres molécules, principalement des aldéhydes mais pas que (l'hexamine est une exception notable), sont utilisées pour provoquer la réticulation des proanthocyanidines. Le formaldéhyde étant souvent cité pour son efficacité et étant aussi un composé que l'on retrouve très fréquemment dans la conservation en fluide, il semblait idéal pour un premier test. Pour les autres agents pontants, voir par exemple : Tondi, 2017, p. 2.

<sup>216</sup> Pizzi & Sharfetter, 1978, p. 1746.

<sup>217</sup> Le resorcinol semble plus efficace (il a deux groupes hydroxyles attachés au cycle benzénique au lieu d'un pour le phénol), mais son acquisition est coûteuse et du phénol était disponible (reste de l'utilisation pour la recette de « Culactol » avec les chlorophylles). Pour différentes combinaisons de formaldéhyde, resorcinol et phénol, voir : Pizzi & Sharfetter, 1978, p. 1746-1749. Par ailleurs, on pourrait penser à simplement remplacer le formaldéhyde (CH<sub>2</sub>O) par un aldéhyde de plus grande taille, comme le glutaraldéhyde (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>), mais cela n'implique pas nécessairement une polymérisation accrue, au contraire : Lacoste *et al.*, 2013, p. 404.

<sup>218</sup> D'habitude la valeur en g/100g d'eau d'une solution aqueuse de formaldéhyde saturée est 37% : Simmons, 2014, p. 29. Cependant, le produit utilisé en l'occurrence indique ≥34.5 wt. %, arrondi ici à 35%.

<sup>219</sup> La valeur de 3.5% est proche de 3.7%, habituellement citée sous la forme « 10% » car il s'agit d'un dixième de la solution saturée diluée dans 9/10 d'eau : Simmons, 2014, p. 29.

Tableau 7 : détail des variantes testées avec l'écorce de pin (Pn) lors de la série visant à faire polymériser les tannins condensés.

| Code (Pn...) | Formald.<br>[g/100g] | Phénol [g/L] | Durée fix. [j] | Remarques                  |
|--------------|----------------------|--------------|----------------|----------------------------|
| E            | -                    | -            | -              | Témoin dans l'EtOH à 70%   |
| F1           | 35.0                 | -            | 1              | -                          |
| F0.5         | 17.5                 | -            | 1              | -                          |
| F0.1         | 3.5                  | -            | 1              | -                          |
| F0.1_3j      | 3.5                  | -            | 3              | -                          |
| F0.1'        | 3.5                  | -            | 1              | Témoin laissé dans le noir |
| F0.5ph5      | 17.5                 | 50           | 1              | -                          |
| F0.5ph0.5    | 17.5                 | 5            | 1              | -                          |
| F0.1ph5      | 3.5                  | 50           | 1              | -                          |
| F0.1ph0.5    | 3.5                  | 5            | 1              | -                          |

Concernant les orobanches, les deux témoins en éthanol à 70% ont été traités de deux manières différentes : le premier a fait l'objet d'un renouvellement du fluide après 1 semaine, afin d'évaluer l'ampleur du phénomène de migration, alors que l'autre a été laissé sans aucun changement. Un spécimen de l'espèce *Orobanche caryophyllacea* a également été placé dans de l'éthanol à 70%, car il était nettement moins coloré et qu'il permet donc de mieux illustrer le phénomène de brunissement des composés phénoliques initialement incolores (de manière générale, voire le Tableau 8, p. 66).

Les orobanches ont été testées selon les deux axes proposés au chapitre 3.2 - *Techniques de préservation*, p. 48 : l'utilisation des sulfites pour contrer l'oxydation (proposition des recettes existantes) et l'idée de prévenir la migration des substances colorantes (même si encore incolores). La 1<sup>ère</sup> variante (Esul) suit les recettes proposées avec l'adjonction de sulfites dans de l'éthanol à 70% en tant qu'unique fluide de conservation. La 2<sup>ème</sup> (P,Esul) s'inspire de la suggestion de Mackenzie pour les pommes jaunes à rayures rouges, soit un premier bain dans de la paraffine liquide suivi d'une conservation identique à la variante précédente<sup>220</sup>. La 3<sup>ème</sup> reprend cette idée mais sans l'utilisation d'antioxydants, afin de voir si l'« hydrophobisation » réussit et suffit seule. La 4<sup>ème</sup> explore l'idée de simplement laisser le spécimen dans un milieu apolaire pour sa conservation à long terme.

Par ailleurs, l'idée de « bloquer » les tannins en provoquant leur polymérisation par le formaldéhyde, bien qu'a priori peu recommandable pour des spécimens non bruns de base, a été testée. Après fixation, les orobanches ont été placées dans du glycérol à 70% plutôt que de l'éthanol, afin de limiter la migration éventuelle d'autres pigments – un échantillon témoin a donc été placé dans du glycérol sans fixation préalable. La durée de fixation au formaldéhyde ou immersion dans de la paraffine de toutes

<sup>220</sup> L'utilisation d'éthanol à 70% plutôt que d'eau comme solvant, comme proposé par Mackenzie, a été choisie car la densité de l'éthanol est proche de celle de la paraffine (~0.8) et que le spécimen ne devrait pas flotter.

les variantes a été déterminée à 3 jour<sup>221</sup>.

Tableau 8 : détail des variantes testées avec les orobanches (*Or*) lors de la série visant à tester les sulfites comme antioxydant et la paraffine liquide pour stopper la migration.

| Principe                             | Code (Or...) | Fix.              | Cons.                            |
|--------------------------------------|--------------|-------------------|----------------------------------|
| Témoin dans EtOH                     | E            | -                 | EtOH 70%                         |
| Comparaison avec une autre espèce    | .Car         | -                 | EtOH 70%                         |
| Antioxydant en cons.                 | Esul         | -                 | NaHSO <sub>3</sub> dans EtOH 70% |
| Hydrophob. puis antiox. en cons.     | P,Esul       | Paraffine liquide | NaHSO <sub>3</sub> dans EtOH 70% |
| « Hydrophobisation »                 | P,E          | Paraffine liquide | EtOH 70%                         |
| Cons. en milieu hydrophobe           | P            | -                 | Paraffine liquide                |
| Fix. puis limitation de la migration | F,G          | Formol 3.5%       | Glycérol 70%                     |
| Témoin dans glycérol                 | G            | -                 | Glycérol 70%                     |

### 3.4. Résultats et discussion

#### 3.4.1. Ecorce de pin : polymérisation

L'effet du formaldéhyde, seul ou combiné avec du phénol, sur la migration de substance(s) colorante(s) provenant de l'écorce de pin dans le fluide est évident (Fig. 92 et 93) : il semblerait qu'il y ait bien eu une polymérisation accrue des tannins condensés. Il se peut qu'en plus de limiter leur propre extraction, ils aient ralenti celle d'autres composés bruns – qu'il s'agisse de versions oxydées des tannins condensés ou d'autres molécules – car leur polymérisation leur confère des propriétés adhésives<sup>222</sup>. L'ajout de phénol ne paraît pas bénéfique car les fluides des spécimens fixés avec ce mélange présentaient tous une teinte jaune légèrement perceptible à l'œil nu (Fig. 94), et plus il y avait de phénol par rapport au formaldéhyde, plus l'effet était marqué<sup>223</sup>. La variation de la concentration du formaldéhyde seul et de la durée de fixation n'a pas eu d'impact visible sur les résultats.



Fig. 92 : triplicat témoin après 28j dans de l'EtOH 70%.



Fig. 93 : triplicat fixé dans du formol 3.5% après 28j.



Fig. 94 : triplicat fixé dans formol 3.5% + phénol 5% après 28j.

Ces tests ont aussi permis de révéler une grande variabilité d'un échantillon à l'autre : il semblerait que l'utilisation de plusieurs morceaux provenant de diverses plaques, lors des tests préliminaires, ait eu un

<sup>221</sup> Il y avait encore quelques bulles qui s'échappaient de l'extrémité des tiges des orobanches, mais la pénétration de la paraffine liquide semblait presque complète.

<sup>222</sup> Pizzi, 2008.

<sup>223</sup> Voir : Annexe III – Graphes colorimétriques, Graphe 28, p. 107.

effet d'homogénéisation que l'on ne retrouve pas dans le cas où un unique rectangle allongé a été prélevé pour chaque échantillon. Un test complémentaire, avec un triplicat standard (rectangle allongé) et un second où le morceau unique a été débité en plusieurs petits carrés (mais utilisés pour le même échantillon), a démontré que cette grande variabilité dépend bien des variations d'une plaque à l'autre et pas du mode de débitage.

#### 3.4.2. Orobanches : antioxydant et « hydrophobisation »

La migration de substance(s) potentiellement colorante(s) des orobanches dans le fluide est très importante, comme le révèle les spécimens conservés dans de l'éthanol à 70%. En effet, au sein du bocal, le liquide passe du brun-jaune au brun-rouge en l'espace d'une semaine environ, puis continue de s'assombrir et paraît quasiment opaque après un mois (Fig. 95 à 97)<sup>224</sup> : la concentration ne cesse donc d'augmenter. Un (code : E.a) des 3 spécimens simplement conservés en alcool a fait l'objet d'un renouvellement du fluide après 1 semaine, puis après 11 jours (donc 18 depuis le début). Comme attendu, le phénomène de migration est moins prononcé après le premier changement, et encore moins après le suivant, mais il reste encore très marqué : l'impact visuel est tel qu'un troisième renouvellement au moins est nécessaire<sup>225</sup>. Le spécimen d'*Orobanche caryophyllacea* conservé en éthanol à 70% a également fortement teinté le liquide (Fig. 98), ce qui prouve que l'essentiel des composés bruns se forment après que la plante a été mise en fluide – cette dernière étant très peu colorée lors de la cueillette (Fig. 88 B, p. 59).



Fig. 95 : après 1j.



Fig. 96 : après 3j.



Fig. 97 : après 28j.



Fig. 98 : après 28j.

Parmi les deux méthodes testées pour contrer le brunissement du fluide, celle consistant à jouer sur la différence de solubilité entre le milieu de conservation et le spécimen ne s'est pas révélée concluante. Non seulement l'imprégnation préalable de paraffine liquide n'a pas permis de limiter la migration, mais en plus des gouttes d'huile parsemaient le fluide de conservation, ajoutant à la turbidité de celui-ci (Fig. 99, p. 68). Le suivi des spécimens ainsi préparés et conservés dans l'éthanol à 70% et dans la solution de sulfite de sodium a donc été arrêté après le premier jour. En revanche, les orobanches directement conservées dans l'huile de paraffine sont celles qui ont le mieux conservé leur coloration d'origine et qui ont le moins coloré le fluide, durant la première semaine de suivi. Mais après une dizaine de jours, un épais duvet gris recouvrait par endroit les spécimens, évoquant le développement de microorganismes (Fig. 100, p. 68) ; le suivi a été stoppé après 2 semaines.

<sup>224</sup> Pour la série complète de photos : Annexe V – Photographies des échantillons, p. 126, Fig. 336-345.

<sup>225</sup> Voir : Annexe III – Graphes colorimétriques, Graphe 29, p. 108 et Graphe 30, p. 108, et Annexe V – Photographies des échantillons, p. 126, Fig. 332-335.



Fig. 99 : spécimen imprégné de paraffine puis conservé dans de l'EtOH à 70% après 1j.



Fig. 100 : spécimen conservé dans de la paraffine liquide après 10j (microorganismes indiqués).

L'autre approche, celle consistant à contrer l'oxydation – et peut-être par la même occasion la polymérisation ? – des phénols incolores, s'est révélée efficace à prévenir le brunissement. Toutefois, le pH ( $1.8 = pK_a$ ) de la solution initiale de sulfite de sodium semble avoir été responsable d'une forte coloration rose du fluide, après un jour de conservation (Fig. 101). En conséquence, le fluide d'un spécimen (Esul.a) a été remplacé par une solution à pH 4.7 (obtenu par saturation de  $\text{NaHSO}_3$  sans ajustement) après 3 jours, et un spécimen frais (Esul.c) a alors été placé dans cette même solution – pour voir si la coloration rose sur le spécimen était réversible. L'autre spécimen conservé dans la solution initiale (Esul.b) n'a pas fait l'objet d'un changement de fluide mais uniquement d'un ajustement du pH à 3.0 (+ NaOH), un test rapide ayant montré que le virage coloré se situait aux alentours de  $\text{pH}=2$  (Fig. 102).



Fig. 101 : solution de  $\text{NaHSO}_3$  à  $\text{pH}=1.8$  après 1j.



Fig. 102 : tests sur des sections d'orobanches, ici à  $\text{pH} 1.8$  et  $\text{pH} 3$ .



Fig. 103 : solution de  $\text{NaHSO}_3$  à  $\text{pH} = 4.7$  après 10j.

Le spécimen Esul.a, ayant fait l'objet d'un changement pour une solution à  $\text{pH}=4.7$ , a perdu la coloration rosée qu'il avait développée dans certaines zones (Fig. 103)<sup>226</sup>. Les fluides de ce spécimen et de l'autre

<sup>226</sup> Pour la série complète des photos : Annexe V – Photographies des échantillons, p. 127, Fig. 348-357.

conservé dans la même solution (Esul.c) sont restés quasiment incolores si ce n'est une légère teinte jaune<sup>227</sup> – plus visible sur les spécimens eux-mêmes – alors que celui du spécimen conservé dans la solution à pH=3 est redevenu un peu rosé<sup>228</sup> : une mesure après 30 jours a confirmé que le pH avait chuté à 2.2. Ces observations sont intéressantes car elles prouvent qu'il n'y a pas que des tannins *stricto-sensu* impliqués dans la coloration des orobanches et donc du fluide. En effet, une telle sensibilité au pH est typique des anthocyanes. La base structurale de la partie aglycone (anthocyanidine) de ces derniers peut se décliner sous différentes formes, celle considérée comme centrale étant le cation flavylum : ce dernier prédomine uniquement en pH très acide<sup>229</sup> et est rouge (Fig. 104). L'augmentation du pH favorise la base quinoïdale pourpre puis bleue par déprotonation successive. Néanmoins, en pH moyennement acide et dans des conditions hydroalcooliques comme celles des vins rouges, c'est la forme hémiacétale (dite aussi carbinol-pseudobase) résultant de l'hydrolyse d'un des carbones du cycle pyrylium qui prédomine<sup>230</sup>, celle-ci étant incolore – mais une partie de ces molécules s'altèrent davantage, l'ouverture du cycle pyrylium conduisant à la formation de chalcones qui eux sont jaunes pâles. Enfin, les sulfites favorisent la création d'un composé sulfuré (ion bisulfite attaché au cycle pyrylium) également incolore, cette réaction étant réversible<sup>231</sup>.

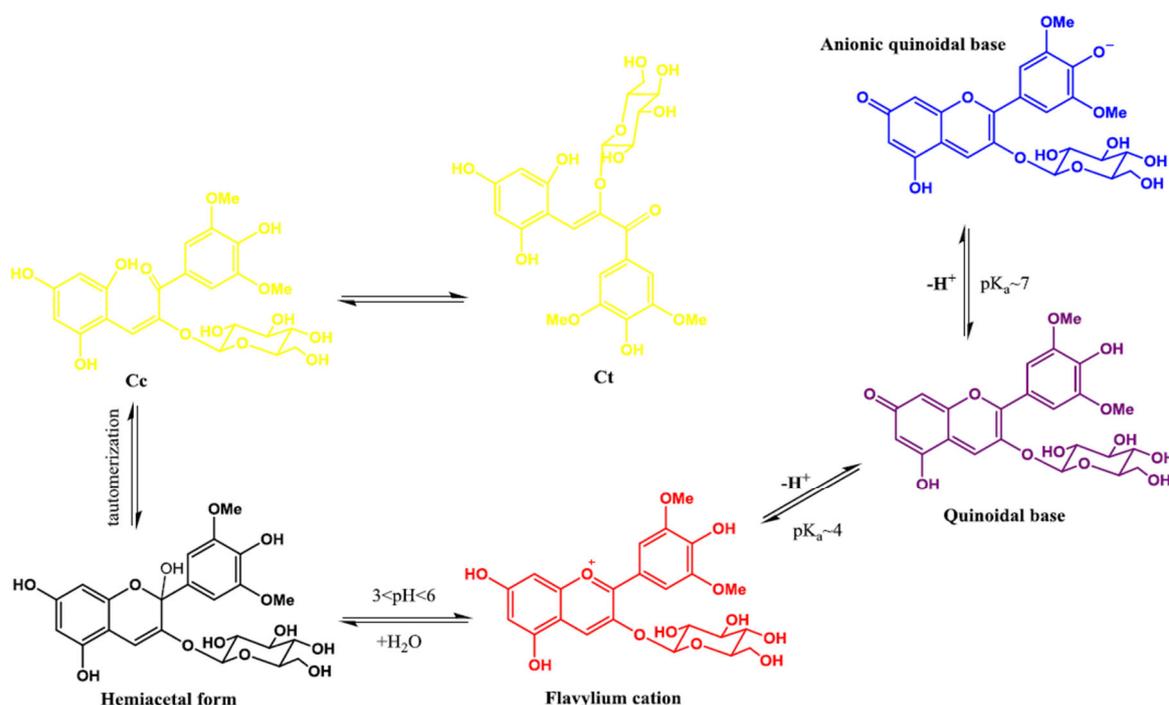


Fig. 104 : équilibre des réactions entre les différentes espèces issues du cation flavylum en fonction du pH notamment ; il manque la réduction par l'ion bisulfite en composé incolore.

<sup>227</sup> Annexe V – Photographies des échantillons, p. 128, Fig. 368-373.

<sup>228</sup> Voir : Annexe V – Photographies des échantillons, p. 127-128, Fig. 358-367.

<sup>229</sup> Du moins lorsqu'il est libre : *in vivo*, d'autres molécules peuvent former une structure protectrice autour et interférer sur ce paramètre – notamment par le phénomène de copigmentation. Voir : Rein, 2005, p. 28.

<sup>230</sup> He *et al.*, 2012, p. 1578.

<sup>231</sup> Morata *et al.*, 2019, p. 394-395.

Considérant cela, il est probable que la teinte rose du fluide amorcée aux alentours de pH=2 soit due à la prédominance du cation flavylum dans ces conditions. L'aspect pratiquement incolore mais néanmoins légèrement jaunâtre des fluides dont le pH se situe entre 4 et 5 est probablement causé à la fois par : la réduction du cation par les sulfites, présents en excès, l'hydrolyse du cation en forme hémiacétale incolore, et par la présence de chalcones. Concernant ces derniers, il est également probable qu'une partie de la teinte jaune soit due à des caroténoïdes, ceux-ci étant attestés chez l'*Orobanche hederæ*<sup>232</sup>.

Pour revenir au but principal de ces tests, il faut noter que l'absence de brunissement n'est pas synonyme de victoire totale : non seulement la coloration d'origine est perdue (les spécimens sont devenus quasiment incolores<sup>233</sup>) mais en plus le fluide, à défaut d'être brun, n'est pas « clair » pour autant. En effet, malgré une filtration initiale, de nombreux cristaux se sont formés qui restent en partie en suspension et rendent ainsi le liquide passablement turbide. Le fluide du spécimen Esul.a a été filtré après deux semaines, mais a resurgi peu de temps après. Il serait intéressant de mieux ajuster la concentration au départ (inférieure à la saturation) pour éviter de nombreuses filtrations par après, mais il faudrait également vérifier que cela ne compromette pas la conservation sur le long terme.

Enfin, la fixation au formaldéhyde semble avoir limité la migration dans le liquide de conservation (glycérol 70%), mais il faut relativiser quelque peu ce succès car une partie des substances colorantes avait déjà migré dans le fluide de fixation et que l'aspect brun des spécimens ne diffère guère de celui de spécimens séchés. Le glycérol seul ralenti la migration, mais si le phénomène est plus lent, il n'est clairement pas moins prononcé, comme le prouve l'opacité du fluide après 4 semaines.

De manière générale, les tissus sont ramollis par la solution hydroalcoolique contenant des sulfites (probablement en raison du pH bas) et par le glycérol, alors qu'ils sont durcis par l'éthanol à 70% seul – ce qui est intéressant car la structure globale de l'inflorescence est plus aisément visible lorsque l'on sort le spécimen du fluide.

## Synthèse et perspectives

Premièrement, l'étude sur la « fixation » de la couleur verte a permis d'établir les points suivants :

- Les sels de cuivre permettent d'obtenir une couleur plus solide.
- Les complexes cuivre-dérivés de chlorophylles sont néanmoins sensibles à la lumière : l'ajout de sels de Cu/Zn dans le fluide de conservation pourrait atténuer le problème.

---

<sup>232</sup> Baccarini & Melandri, 1967.

<sup>233</sup> Voir les photos hors fluide dans l'Annexe V – Photographie des échantillons, p. 126-128.

- La couleur obtenue avec le cuivre n'est pas identique à celle des spécimens frais : il faudrait vérifier si l'utilisation de zinc à la place du cuivre améliorerait la teinte (moins bleue/terne). Une autre piste à explorer est la conservation en milieu alcalin afin de préserver les chlorophylles.
- La solution au problème de migration des pigments est l'utilisation d'eau sans éthanol. Cela induit la problématique de l'agent antiseptique à utiliser : un pH fortement acide étant dommageable pour les tissus, il faudrait tester l'efficacité des sulfites en milieu neutre ou faiblement acide, et évaluer d'autres antiseptiques adaptés à ce pH. Le glycérol à 60-70%, bactériostatique, est une autre option.
- L'utilisation de l'eau comme seul solvant en « fixation » et en conservation induit un autre risque : la dégradation enzymatique. Une immersion préliminaire dans l'éthanol à 95% pourrait prévenir le problème tout en enlevant la contrainte de maintenir le spécimen immergé dans le bain aqueux de « fixation ».
- La pénétration de la solution aqueuse de sel de cuivre se fait par les canaux et non à travers la cuticule, dans le cas des feuilles de petits pois. Il est possible que cela soit problématique sur des spécimens de taille plus importante car si la pénétration est lente, les risques divers de dégradation augmentent avant que la couleur ne soit « fixée ». L'usage d'antioxydants et/ou antiseptiques dans le fluide de « fixation » sera alors à reconsidérer.
- Les contraintes spécifiques au travail de terrain n'ont pas été évaluées, mais une piste intéressante de préservation temporaire pourrait être l'usage de silicate de sodium.
- Enfin, aucune des solutions proposées ne présentent de risque majeur pour la santé ou la conservation des autres collections. Inflammabilité : l'usage de solvants organiques en conservation est déconseillé à cause du problème de migration des pigments. Toxicité : le formaldéhyde ne semble pas utile pour la conservation de la couleur ; il reste les sulfites, mais leur utilisation en pH moins acide devrait pratiquement arrêter le dégagement de SO<sub>2</sub>.

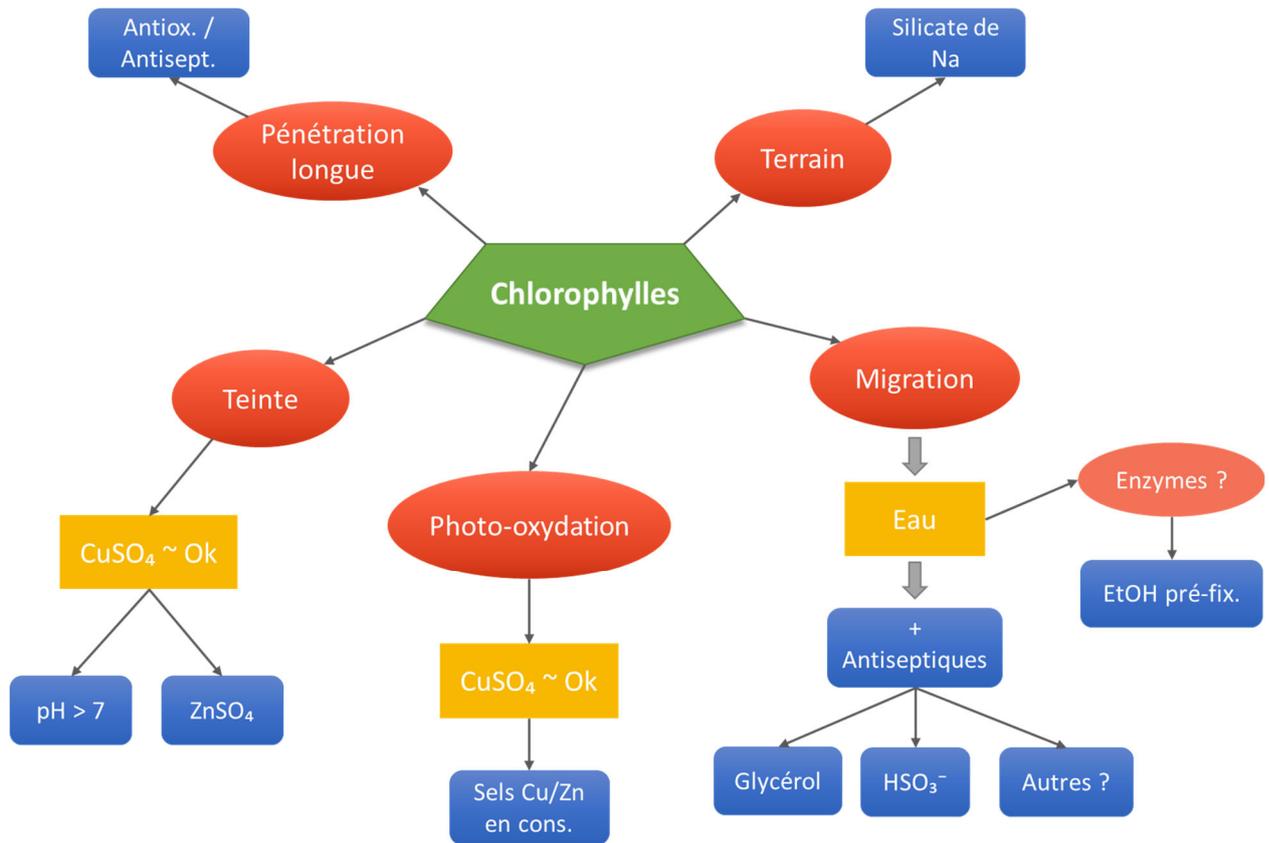


Fig. 105 : schéma synthétique des conclusions pour les différentes sous-problématiques liées à la préservation de la couleur verte due aux chlorophylles.

Secondement, l'étude sur les moyens de contrer le brunissement du fluide, symbolisé par les tannins, a permis de préciser les points suivants :

- Un renouvellement répété du fluide semble nécessaire pour d'autres plantes parasites que celles du genre *Rafflesia*. Mais si cette méthode simple est adoptée, il convient de prévoir un scellement aisément réversible.
- Le principe de contrer l'oxydation (et la polymérisation) par l'emploi des sulfites semble bien fonctionner pour les Orobanches, mais il induit la perte de couleurs du spécimen. De plus, le pH doit être suffisamment haut pour éviter qu'une teinte rose ne se développe, et l'usage préconisé à saturation des sulfites rend le fluide turbide : il faudrait tester des concentrations moindres.
- Le maintien des différentes colorations du spécimen n'a pas été étudié spécifiquement, mais l'utilisation de paraffine liquide en conservation pourrait se révéler intéressante.
- Différence de solubilité : le principe d'imprégner le spécimen d'un liquide visqueux apolaire pour contrer la migration dans le fluide de conservation hydrophile n'a pas fonctionné.

- Différence de solubilité : la conservation en milieu apolaire est prometteuse, mais elle ne dispense pas de l'usage d'un antiseptique.
- L'usage de formaldéhyde pour provoquer la polymérisation des phénols avant leur migration dans le fluide s'est révélée efficace sur des échantillons d'écorce de pin. Pour une efficacité à long terme, il serait intéressant de tester un léger ajout de ce réactif au fluide de conservation.
- En termes de toxicité, le SO<sub>2</sub> et le formaldéhyde sont problématiques. L'usage des sulfites à pH>4 devrait supprimer le problème du premier<sup>234</sup>. Pour le second, il serait intéressant de tester des aldéhydes moins nocifs (glyoxal, glutaraldéhyde) ou même d'autres types d'agents pontant (comme l'hexamine, par exemple)<sup>235</sup>.
- Enfin, les différentes options étudiées restent problématiques en termes d'inflammabilité (présence d'éthanol et de paraffine) et ne sont pas très pratiques pour une conservation *in situ*.

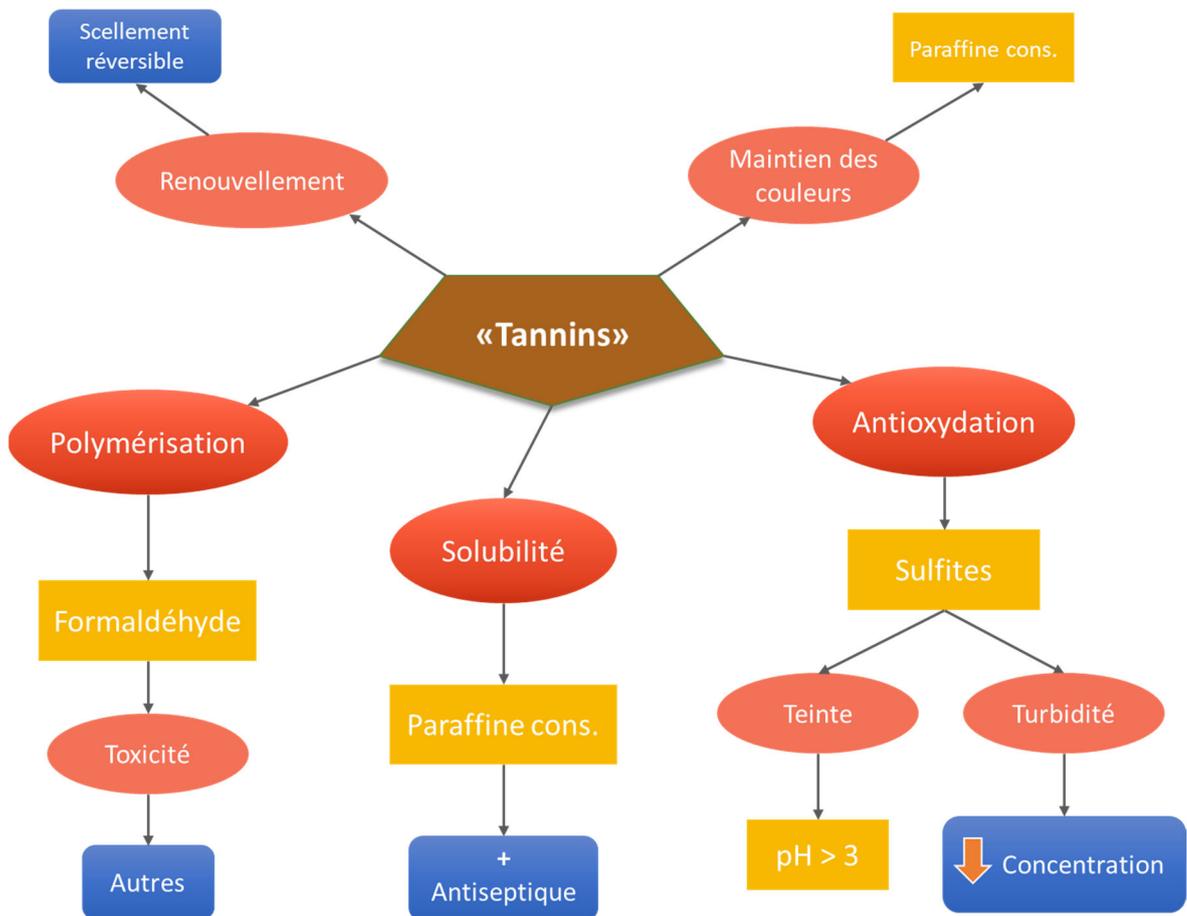


Fig. 106 : schéma synthétique des conclusions pour les différentes sous-problématiques de l'inhibition du brunissement du fluide lié aux tannins et autres composés phénoliques.

<sup>234</sup> Voir : Fig. 51, p. 48.

<sup>235</sup> Pizzi, 2008, p. 187.

## Conclusion générale

Cette étude a permis de mieux appréhender les possibilités et limitations de la préservation des couleurs des spécimens botaniques en fluide, et notamment d'évaluer les effets globaux des sels de cuivre et des sulfites sur la tenue de la couleur verte des petits pois. Néanmoins, trois facteurs importants devraient encore être évalués pour conclure de manière plus générale sur l'ensemble des plantes vertes : la longue durée, la taille des spécimens, et leur diversité structurelle et chimique.

En effet, les échantillons n'ont été suivis que durant sept semaines, et il est possible que les résultats soient bien différents après une année ou plus. Le vieillissement accéléré à la lumière visait à pallier cela, mais l'on sait que ce type de tests ne reproduit jamais de manière absolument exacte un vieillissement réel. Cependant, il reste encore à définir la durée visée par le procédé de conservation. Un cas typique de recours à ces méthodes semble être lié aux expositions temporaires au sein d'un musée, soit de quelques mois à un ou deux ans environ. Ainsi, les phénomènes observés et reportés dans ce mémoire ne devraient pas différer grandement de ceux impliqués dans ce scénario. A ce propos, la question est rarement abordée explicitement par les personnes ayant proposées des recettes, mais il paraît que certaines n'ont pas été prévues pour durer plus de quelques mois ou années<sup>236</sup>.

La taille des spécimens est un facteur important car il peut induire un délai important avant la pénétration à cœur – le recours à l'injection pourrait alors être envisagé. De plus, l'usage de bocaux plutôt que d'éprouvettes changent la perception de ce qui est acceptable ou non, autant pour le fluide que le spécimen lui-même<sup>237</sup>. Mais les caractéristiques physico-chimiques globales d'un spécimen sont susceptibles d'avoir une influence encore plus grande sur la tenue de la couleur (Fig. 107, p. 75), sans parler du fait que celles-ci déterminent la coloration *in vivo* – cette dernière pouvant être très éloignée de ce qui est obtainable avec des sels de cuivre. Une nouvelle série de tests sera donc menée avec des spécimens variés, dans des bocaux de taille typiquement utilisée dans le domaine. Les espèces évaluées seront choisies parmi celles qui ont le plus de raisons d'être conservées en fluide, soit les plantes grasses, et aussi parmi celles qui présentent une hydrophobicité de surface similaires et opposées à celle des petits pois – comme les bryophytes, qui n'ont pas de cuticule. Il serait également intéressant de tester ces recettes sur des fruits et légumes verts, également difficiles à conserver autrement, car cela pourrait remettre en question l'idée de ne plus utiliser de solvants organiques : en effet, la conservation du volume de spécimens charnus dépend beaucoup des fluides utilisés, comme l'a révélé le projet précédant celui-ci, FLUIDIS<sup>238</sup>.

---

<sup>236</sup> Par exemple, Adriano & Yonzon spécifient que la solution de dioxyde de soufre ne dure qu'entre 4 et 12 mois, après il faut la renouveler (mais quid de l'aspect des spécimens ?) ; Scully précise que sa solution « B » a donné de bons résultats sur des spécimens collectés durant les deux dernières années ; ou encore, Trail informe le lecteur que certaines algues ont été bien conservées selon le procédé d'acétate de cuivre à chaud, «to keep in stock for the use of students during the year ». Adriano & Yonzon, 1933, p. 123 ; Scully, 1937, p. 18 ; Trail, 1908, p. 50.

<sup>237</sup> Notamment à cause de l'augmentation de la lumière absorbée en fonction de l'épaisseur du fluide ; voir la remarque à ce sujet au chapitre : 3.3.2. - *Déroulement standard des tests*, p. 36.

<sup>238</sup> Granget, Elodie. 2021. « Traitement des données FLUIDIS - 18 mois » UR-Arc CR, Rapport intermédiaire LIQUOR, non publié.



Fig. 107 : spécimens de *Primula vulgaris* (A), *Taraxacum officinale* (B), *Sedum album* (C) et *Helleborus foetidus* (D) après 4 mois dans de l'EtOH 70% (les fluides sont colorés mais pas les spécimens).

Les résultats de ce mémoire compléteront ceux obtenus par les autres membres du projet LIQUOR, sur la conservation des autres pigments notamment. Cela permettra ensuite de combiner les problématiques : si l'idéal serait de traiter chaque partie colorée différemment avec une autre recette<sup>239</sup>, en pratique il arrive souvent que plusieurs pigments se côtoient. Certains semblent faire bon ménage, notamment la chlorophylle et les caroténoïdes, mais d'autres sont moins compatibles avec le procédé choisi pour conserver tel ou tel aspect : cela a pu être souligné dans le cas des orobanches, le blanchiment offert pas les sulfites évitant le brunissement mais décolorant par la même occasion les anthocyanes.

Enfin, les résultats obtenus pour les plantes vertes ouvrent une question plus large, d'ordre éthique : si ni l'apparence exacte (nuance de vert) ni la matière ( $Mg^{2+} \rightarrow Cu^{2+}$ ) d'origine ne sont entièrement préservées, l'objectif de conservation est-il réellement atteint ? Il serait possible d'objecter que l'évocation de la couleur d'origine est suffisante – pour distinguer les parties vertes des autres, par exemple – et désirable. Mais dans ce cas, pourquoi ne pas envisager purement et simplement une teinture artificielle ? D'autant que cela a été proposé par plusieurs auteurs<sup>240</sup>. S'il paraît douteux que la taille de l'espèce chimique impliquée puisse être un critère, il semblerait néanmoins que la perception du rôle du cuivre en tant que stabilisant de la chlorophylle et non comme teinture additionnelle ait pesé dans le choix du recours fréquent à cette méthode<sup>241</sup>. L'observation des folioles traitées ainsi a offert un argument intéressant en faveur d'une authenticité préservée : la couleur est maintenue dans son emplacement d'origine, soit les chloroplastes – ce qui ne serait pas forcément le cas avec une teinture. Dans tous les cas, il apparaît que cette question d'ordre culturelle est intimement liée aux techniques employées, car elle influence leur usage autant que l'existence de ces dernières modifie la perception de ce qui est acceptable ou non : si une technique parvenait à conserver entièrement les chlorophylles magnésiennes, il est probable que les méthodes au cuivre soient accusées de falsification et tombent dans l'oubli.

---

<sup>239</sup> C'est ce que suggère Mackenzie : Verma, 2008, p 21.

<sup>240</sup> Stone, 1899, p. 538, Hangay & Dingley, 1985, p. 23 et Verma, 2008, p. 146. Ce dernier propose de teindre les spécimens à sécher et non à mettre en fluide, mais il propose également une autre idée peu habituelle dans le domaine : utiliser le génie génétique pour améliorer la conservation des fleurs.

<sup>241</sup> Trail, 1908, p. 49-50.

## Glossaire

- **Antioxydant** : terme générique désignant une substance chimique réductrice (donneuse d'électrons) et utilisée dans ce but. On parle aussi et plus spécifiquement de piègeurs de radicaux libres (*scavengers*) lorsque l'antioxydant donne une molécule d'hydrogène au radical libre, le stabilisant ainsi, et de désactivateurs (*quencher*s) lorsqu'il s'agit d'abaisser l'énergie de l'oxygène singulet. (Choe & Min, 2009, p. 351 et 354)
- **Circadien** (cycle ou rythme) : « D'une durée d'un jour et d'une nuit. Se dit spécialement du rythme des variations périodiques d'une fonction ou du taux d'une substance biologique dans l'organisme au cours des vingt-quatre heures. » (Centre National de Ressources Textuelles et Lexicales [en ligne], 2021)
- **Cuticule** : « Revêtement cireux hydrofuge de l'épiderme des végétaux. » (Eggenberg *et al.*, 2021, p. 104)
- **Déplacement bathochrome** : décalage d'un pic ou d'une bande spectrale vers les grandes longueurs d'ondes électromagnétiques (décalage vers le rouge), opposé au déplacement hypsochrome vers les courtes longueurs d'ondes (décalage vers le bleu).
- **FAA** : Formol – acide Acétique – Alcool, fluide fixateur courant pour les plantes. (Bridson & Forman, 1998, p. 228)
- **FPA** : Formol – acide Propionique – Alcool, alternative au FAA. ((Bridson & Forman, 1998, p. 229)
- « **Fixation** » : phase temporaire d'immersion dans un liquide, ayant pour but de préserver la couleur et précédant la mise en fluide dans le liquide de conservation. (Définition utilisée uniquement pour ce mémoire, d'où la présence des guillemets)
- **Formol** : solution de formaldéhyde (gaz) dans l'eau. (Centre National de Ressources Textuelles et Lexicales [en ligne], 2021)
- **Holoparasite** : « Plante parasite non chlorophyllienne qui, ne réalisant pas la photosynthèse, dépend totalement de son hôte pour se nourrir. » (Eggenberg *et al.*, 2021, p. 104)
- **Inflorescence** : « Ensemble de fleurs et de bractées (organe foliacé) diversement agencées qui ne sont pas séparées par de vraies feuilles. » (Eggenberg *et al.*, 2021, p. 107)
- **Isocycle** : cycle constitué uniquement d'atomes de carbone (opposé à hétérocycle, comprenant des hétéroatomes = autre que C ou H).
- **Lactophénol** : mélange d'acide lactique, de phénol et de glycérol. (Amann, 1896, p. 19)
- Morphologie, anatomie, cytologie, etc. (si pas dans bouquin, définition, voir : Carrillo-Lopez et Yahia, Chapter 6 - Morphology and Anatomy, 2019)
- **Ose** : synonyme de monosaccharide, sucre simple (Centre National de Ressources Textuelles et Lexicales [en ligne], 2021)
- **Oxygène singulet, anion superoxyde** : espèces très réactives dérivées de l'oxygène moléculaire (O<sub>2</sub>). (Descamps-Latscha, *Encyclopædia Universalis* [en ligne], 2021)

- **Peroxydation lipidique** (ou rancissement oxydatif) : mécanisme de dégradation des graisses par oxydation, impliquant notamment la formation de radicaux peroxydes (ROO<sup>\*</sup>). Ce phénomène s'auto-entretient. (Kunert & Ederer, 1985 et Coultate, 2016, p. 126-133)
- **Pigments** : terme générique pour les molécules colorées en botanique (il n'y a pas la distinction entre pigment et teinture selon la solubilité dans le medium, comme c'est le cas habituellement en conservation-restauration).
- **Plastides** : « Organite caractéristique des cellules des végétaux supérieurs capable de fixer diverses substances et dans lequel peuvent s'accumuler des pigments, dont le plus important est la chlorophylle. » (Centre National de Ressources Textuelles et Lexicales [en ligne], 2021)
- **Radicaux libres** (phénoxy, tocophéryl, etc.) : « Un radical libre est un fragment obtenu par scission d'une molécule et qui possède un électron célibataire, non apparié, ce qui lui confère une grande réactivité chimique. » (Futura Sciences [en ligne], 2021) L'électron apparié est noté « • ».
- **Rhodophycées** : espèces appelées communément algues rouges. (Feldmann, *Encyclopædia Universalis* [en ligne], 2021)
- **Saturation** : ce terme est souvent utilisé comme synonyme du chroma, alors qu'une distinction est faite par la Commission Internationale de l'Eclairage. Voici sa définition : "colourfulness of an area judged in proportion to its brightness". (définition 17-22-073 de la Commission Internationale de l'Eclairage [en ligne], 2020) Ainsi, la saturation est plus liée à la perception humaine, c'est-à-dire qu'une couleur plus sombre aura une saturation supérieure à une couleur plus claire de chroma équivalent (cette dernière étant perçue comme plus fade).
- **Stomate** : « Ensemble de deux cellules de l'épiderme des feuilles capables de former entre elles une ouverture par laquelle s'effectuent les échanges gazeux et l'évapotranspiration. » (Eggenberg *et al.*, 2021, p. 150)
- **Variable dépendante** : variable que l'on observe ou mesure après l'introduction ou la manipulation de variables indépendantes (coloration du fluide, par exemple). (Gangloff, 2008)
- **Variable indépendante** : facteur que l'on fait varier pour obtenir des résultats (ingrédient d'une recette, par exemple). Elle peut être invoquée ou provoquée. (Gangloff, 2008)
- **Variable invoquée** : variable qui n'est pas causée par le chercheur (différences d'une espèce à l'autre, par exemple). (Gangloff, 2008)
- **Variable parasite** : variable indésirable susceptible d'influencer les résultats et que l'on cherche à maîtriser (différence d'un spécimen à l'autre, par exemple) ; elle devient alors une variable contrôlée. (Gangloff, 2008)
- **Variable provoquée** : variable causée par le chercheur (variation dans la quantité d'un ingrédient, par exemple). (Gangloff, 2008)

## Bibliographie

- Adriano, F. T., et Emilia Yonzon. 1933. « Notes on the natural color preservation of Philippine plant materials for museum or exhibition purposes ». *Natural and Applied Science Bulletin - University of the Philippines* 3 (1) : 121-25.
- Al-Dabbas, Maher, Mohammed Saleh, Hani Hamad, et Waseem Hamadeh. 2017. « Chlorophyll Color Retention in Green Pepper Preserved in Natural Lemon Juice: GREEN PEPPER COLOR PRESERVATION ». *Journal of Food Processing and Preservation* 41 (4) : e13055. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13055>.
- Amann, Jules. 1896. « Conservierungsflüssigkeiten und Einschlussmedien für Moose, Chloro- und Cyanophyceen. » *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und mikroskopische Technik*. 13 : 18-21. <https://www.biodiversitylibrary.org/bibliography/3927>.
- Aparicio-Ruiz, Ramón, Ken M. Riedl, et Steven J. Schwartz. 2011. « Identification and Quantification of Metallo-Chlorophyll Complexes in Bright Green Table Olives by High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Quadrupole/Time-of-Flight ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (20) : 11100-108. <https://doi.org/10.1021/jf201643s>.
- Arbenz, Alice, et Luc Avérous. 2015. « Chemical modification of tannins to elaborate aromatic biobased macromolecular architectures ». *Green Chemistry* 17 (5) : 2626-46. <https://doi.org/10.1039/C5GC00282F>.
- Ashok, Praveen Kumar, et Kumud Upadhyaya. 2012. « Tannins are Astringent ». *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 1 (3) : 45-50.
- Baccarini, A., et B. A. Melandri. 1967. « Studies on Orobanche hederæ Physiology: Pigments and CO<sub>2</sub> Fixation ». *Physiologia Plantarum* 20 (1) : 245-50. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1967.tb07159.x>.
- Beckwith, Theodore Day. 1917. « Preserving eggs ». *Oregon Agricultural College Extension Bulletin* 190 : 1-4.
- Bensid, Abdelkader, Nariman El Abed, Abderrahmane Houicher, Joe M. Regenstein, et Fatih Özogul. 2020. « Antioxidant and antimicrobial preservatives: Properties, mechanism of action and applications in food – a review ». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 0 (0) : 1-17. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1862046>.
- Bittner, S. 2006. « When quinones meet amino acids: chemical, physical and biological consequences ». *Amino Acids* 30 (3) : 205-24. <https://doi.org/10.1007/s00726-005-0298-2>.
- Boaghi, Eugenia. 2016. « Impact of treatment with oxidative bleaching agents on walnut (*Juglans Regia* L.) shell chromatic parameters ». *Ukrainian Food Journal* 5 (4) : 644-52. <https://doi.org/10.24263/2304-974X-2016-5-4-4>.
- Bridson, Diane M., Leonard Forman, et Royal Botanic Gardens, Kew, dir. 1998. *The herbarium handbook*. 3rd ed. Kew : Royal Botanic Gardens.
- Buchanan, Bob B., Wilhelm Gruissem, et Russell L. Jones. 2015. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. 2nd éd. Chichester (UK) : Wiley Blackwell.
- Butler, O. 1918. « On the preservation of phytopathological specimens in their natural colors ». *Phytopathology* 8 : 66-68.
- Cardon, Dominique. 1978. *Pratique de la teinture végétale*. Paris : Fleurus.

- Chairat, B., P Nutthachai, et S. Varit. 2013. « Effect of UV-C treatment on chlorophyll degradation, antioxidant enzyme activities and senescence in Chinese kale ». *International Food Research Journal* 20 (2) : 623-28.
- Cheyrier, V., Montserrat Dueñas-Paton, E. Salas, C. Maury, J. Souquet, P. Sarni-Manchado, et H. Fulcrand. 2006. « Structure and properties of wine pigments and tannins ». *Undefined*.  
<https://www.semanticscholar.org/paper/Structure-and-properties-of-wine-pigments-and-Cheyrier-Due%C3%B1as-Paton/37530f3ea06a2e6024ba03e2da9e0b96a111897a>.
- Choe, Eunok, et David B. Min. 2005. « Chemistry and Reactions of Reactive Oxygen Species in Foods ». *Journal of Food Science* 70 (9) : R142-59. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb08329.x>.
- Choe, Eunok, et David B. Min. 2009. « Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods ». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8 (4) : 345-58.  
<https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00085.x>.
- Coder, Kim. 2012. « Autumn Leaf Color Development ». Warnell School of Forestry & Natural Resources University of Georgia.
- Coulter, Tom. 2016. *Food - The Chemistry of its Components*. 6th éd. Cambridge : The Royal Society of Chemistry.
- Dangeon, Marion. 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, Neuchâtel : He-Arc CR.
- Davenport, Sara Jeannette. 1953. « Review of Literature on Health Hazards of Metals: Copper ». U.S. Department of the Interior, Bureau of Mines.
- Davies, Kevin. 2004. *Plant pigments and their manipulation*. Vol. 14. Annual Plant Reviews. Oxford : Blackwell Publishing.
- Delgado-Vargas, F., A. R. Jiménez, et O. Paredes-López. 2000. « Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability ». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40 (3) : 173-289.  
<https://doi.org/10.1080/10408690091189257>.
- deMan, John M. 1990. *Principles of food chemistry*. 2nd éd. New York : Chapman & Hall.
- Dixon, Richard A., De-Yu Xie, et Shashi B. Sharma. 2005. « Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? » *New Phytologist* 165 (1) : 9-28. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01217.x>.
- Eggenberg, Stefan, Yann Fragnière, Jacques Sciboz, et Gregor Kozłowski. 2021. *Le glossaire illustré pour la botanique de terrain*. Haupt.
- Espinás, Nino A., Koichi Kobayashi, Shigekazu Takahashi, Nobuyoshi Mochizuki, et Tatsuru Masuda. 2012. « Evaluation of Unbound Free Heme in Plant Cells by Differential Acetone Extraction ». *Plant and Cell Physiology* 53 (7) : 1344-54. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs067>.
- Evans, J. C., D. R. Kodali, et P. B. Addis. 2002. « Optimal tocopherol concentrations to inhibit soybean oil oxidation ». *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79 (1) : 47-51.  
<https://doi.org/10.1007/s11746-002-0433-6>.
- Falcão, Lina, et Maria Araújo. 2018. « Vegetable Tannins Used in the Manufacture of Historic Leathers ». *Molecules* 23 (5) : 1081. <https://doi.org/10.3390/molecules23051081>.

- Fernández, V., et T. Eichert. 2009. « Uptake of Hydrophilic Solutes Through Plant Leaves: Current State of Knowledge and Perspectives of Foliar Fertilization ». *Critical Reviews in Plant Sciences* 28 (1-2) : 36-68. <https://doi.org/10.1080/07352680902743069>.
- Gangloff, Bernard. 2008. « Les Fondements méthodologiques du savoir scientifique ». Presses universitaires de Rouen et du Havre.
- Gaur, Shalini, US Shivhare, et Jasim Ahmed. 2006. « Degradation of chlorophyll during processing of green vegetables: a review ». *Stewart Postharvest Review* 2 (5) : 1-8. <https://doi.org/10.2212/spr.2006.5.14>.
- Gordon, M. H. 1990. « The Mechanism of Antioxidant Action in Vitro ». Dans *Food Antioxidants*. Sous la direction de B. J. F. Hudson, 1-18. Elsevier Applied Food Science Series. Dordrecht : Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-0753-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-009-0753-9_1).
- Grasel, Fábio dos Santos, Marco Flôres Ferrão, et Carlos Rodolfo Wolf. 2016. « Development of methodology for identification the nature of the polyphenolic extracts by FTIR associated with multivariate analysis ». *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 153 : 94-101. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.08.020>.
- Hangay, George, et Michael Dingley. 1985. *Biological museum methods*. Sydney ; Orlando : Academic Press.
- Hart, F. Leslie. 1952. « A History of the Adulteration of Food Before 1906 ». *Food, Drug, Cosmetic Law Journal* 7 (1) : 5-22. <https://www.jstor.org/stable/26654178>.
- He, Fei, Na-Na Liang, Lin Mu, Qiu-Hong Pan, Jun Wang, Malcolm J. Reeves, et Chang-Qing Duan. 2012. « Anthocyanins and Their Variation in Red Wines I. Monomeric Anthocyanins and Their Color Expression ». *Molecules* 17 (2) : 1571-1601. <https://doi.org/10.3390/molecules17021571>.
- Hsu, Hsin-Yun, Yi-Chin Tsai, Chi-Chang Fu, et James Swi-Bea Wu. 2012. « Degradation of Ascorbic Acid in Ethanolic Solutions ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (42) : 10696-701. <https://doi.org/10.1021/jf3032342>.
- Huang, Wenjiang, Zhijie Wang, Linsheng Huang, David W. Lamb, Zhihong Ma, Jincheng Zhang, Jihua Wang, et Chunjiang Zhao. 2011. « Estimation of vertical distribution of chlorophyll concentration by bi-directional canopy reflectance spectra in winter wheat ». *Precision Agriculture* 12 (2) : 165-78. <https://doi.org/10.1007/s11119-010-9166-5>.
- Jadhav, Reshma V., et Santosh S. Bhujbal. 2020. « A Review on Natural Food Colors ». *Pharmaceutical Resonance* 2 (2) : 12-20.
- Johansen, Donald Alexander. 1940. *Plant Microtechnique*. 1<sup>re</sup> éd. New York and London : McGraw-Hill Book Company.
- Jones, Ivan D., Raymond C. White, Eleanor Gibbs, Lillian S. Butler, et Larry A. Nelson. 1977. « Experimental formation of zinc and copper complexes of chlorophyll derivatives in vegetable tissue by thermal processing ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 25 (1) : 149-53. <https://doi.org/10.1021/jf60209a030>.
- Keefe, A. M. 1926. « A preserving fluid for green plants ». *Science* 64 (1657) : 331-32. <https://doi.org/10.1126/science.64.1657.331>.
- Khanbabaee, Karamali, et Teunis van Ree. 2001. « Tannins: Classification and Definition ». *Natural Product Reports* 18 (6) : 641-49. <https://doi.org/10.1039/B101061L>.
- Kilcast, David. 2004. *Texture in food – Volume II: Solid foods*. Cambridge : Woodhead Publishing.
- Knudsen, J. W. 1972. *Collecting and preserving plants and animals*. London : Harper & Row.

- Kunert, Karl Josef, et Martina Ederer. 1985. « Leaf aging and lipid peroxidation: The role of the antioxidants vitamin C and E ». *Physiologia Plantarum* 65 (1) : 85-88. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1985.tb02364.x>.
- (Eckert). 1932. « Laboratory Hints from the Literature ». *Stain Technology* 7 (2) : 67-72. <https://doi.org/10.3109/10520293209116074>.
- LaBorde, Luke F., et Joachim H. von Elbe. 1994. « Chlorophyll Degradation and Zinc Complex Formation with Chlorophyll Derivatives in Heated Green Vegetables ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42 (5) : 1100-1103. <https://doi.org/10.1021/jf00041a010>.
- Lacoste, C., M. C. Basso, A. Pizzi, M.-P. Laborie, D. Garcia, et A. Celzard. 2013. « Bioresourced pine tannin/furanic foams with glyoxal and glutaraldehyde ». *Industrial Crops and Products* 45 (février) : 401-5. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.12.032>.
- Liu, Songxia, et William K. Ott. 2020. « Sodium silicate applications in oil, gas & geothermal well operations ». *Journal of Petroleum Science and Engineering* 195 (décembre) : 107693. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2020.107693>.
- Locquin, Marcel, et Maurice Langeron. 1983. *Handbook of Microscopy*. 1st english translation. Cambridge : Butterworth & Co.
- Loudon, G. Marc, et Jim Parise. 2016. *Organic chemistry*. 6th éd. Greenwood village, Colorado : Roberts and Company Publishers.
- Martin, Hans-Dieter. 1995. « The Function of Natural Colorants: The Biochromes ». *CHIMIA International Journal for Chemistry* 49 (3) : 45-68.
- Menet, Marie-Claude. 2011. « Principes de la spectrométrie de masse ». *Revue Francophone des Laboratoires* 2011 (437) : 41-53. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(11\)71211-4](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(11)71211-4).
- Minotta, Gianfranco, et Simone Pinzauti. 1996. « Effects of light and soil fertility on growth, leaf chlorophyll content and nutrient use efficiency of beech (*Fagus sylvatica* L.) seedlings ». *Forest Ecology and Management* 86 (1-3) : 61-71. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(96\)03796-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(96)03796-6).
- Młodzińska, Eva. 2009. « Survey of Plant Pigments: Molecular and Environmental Determinants of Plant Colors ». *Acta Biologica Cracoviensia, Botanica*, 51 (1) : 7-16.
- Montazer, Majid, Maziar Parvinzadeh, et Amir Kiumarsi. 2004. « Colorimetric properties of wool dyed with natural dyes after treatment with ammonia ». *Coloration Technology* 120 (4) : 161-66. <https://doi.org/10.1111/j.1478-4408.2004.tb00223.x>.
- Moore, Simon. 2009. « The future of fluid preservation - fixation in the balance: the case for using formalin ». *NatSCA News*, n° 16 : 18-22.
- Morata, A., C. López, W. Tesfaye, C. González, et C. Escott. 2019. « Anthocyanins as Natural Pigments in Beverages ». *Value-Added Ingredients and Enrichments of Beverages* 14 (janvier) : 383-428. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816687-1.00012-6>.
- Musiał, Agata, Ryszard W. Gryglewski, Stanislas Kielczewski, Marios Loukas, et Justyna Wajda. 2016. « Formalin use in anatomical and histological science in the 19th and 20th centuries ». *Folia Medica Cracoviensia* 56 (3) : 31-40.
- Nieuwland, J. A., et A. D. Slavin. 1928. « Preservation of *Monotropa* and Similar Plants without Discoloration ». *Proceedings of the Indiana Academy of Science* 38 : 103-4. <https://journals.iupui.edu/index.php/ias/article/view/4972>.

- Patel, B. H. 2011. « Natural dyes ». Dans *Handbook of Textile and Industrial Dyeing*, 1 : 395-424. Textiles. UK : Woodhead Publishing.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781845696955500118>.
- Pérez-Gálvez, Antonio, Isabel Viera, et María Roca. 2020. « Development of an accurate and direct method for the green food colorants detection ». *Food Research International* 136 : 109484.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109484>.
- Pizzi, A., et H. O. Scharfetter. 1978. « The chemistry and development of tannin-based adhesives for exterior plywood ». *Journal of Applied Polymer Science* 22 (6) : 1745-61.  
<https://doi.org/10.1002/app.1978.070220623>.
- Pizzi, Antonio. 2008. « Tannins: Major Sources, Properties and Applications ». Dans *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, 179-99. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045316-3.00008-9>.
- Pongsri, Ratchagon, Sukanya Aiama-or, Varit Srilaong, Apiradee Uthairatanakij, et Pongphen Jitareerat. 2021. « Impact of electron-beam irradiation combined with shellac coating on the suppression of chlorophyll degradation and water loss of lime fruit during storage ». *Postharvest Biology and Technology* 172 (février) : 111364. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111364>.
- Porra, R. J., W. A. Thompson, et P. E. Kriedemann. 1989. « Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 975 (3) : 384-94.  
[https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(89\)80347-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(89)80347-0).
- Porter, L. J. 1989. « Condensed Tannins ». Dans *Natural Products of Woody Plants: Chemicals Extraneous to the Lignocellulosic Cell Wall*. Sous la direction de John W. Rowe, 651-90. Springer Series in Wood Science. Berlin, Heidelberg : Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-74075-6\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-642-74075-6_18).
- Rein, Maarit. 2005. « Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins ». Academic Dissertation, Helsinki : University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology, Food Chemistry Division.
- Rendle, A. B. 1916. "Preservation of natural colour in plants". *Nature* 98 (2454) : 191-92.
- Schnell, Raymond. 1960. « Techniques d'herborisation et de conservation des plantes dans les pays tropicaux ». *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée* 7 (1) : 1-48.  
<https://doi.org/10.3406/jatba.1960.2593>.
- Schunck, Henry Edward. 1883. « V. Note on the constitution of chlorophyll ». *Proceedings of the Royal Society of London* 36 (228-231) : 183-85. <https://doi.org/10.1098/rspl.1883.0095>.
- Schunck, Henry Edward. 1884. « Contributions to the Chemistry of Chlorophyll. Part I. [Abstract] ». *Proceedings of the Royal Society of London* 38 : 336-40. <https://www.jstor.org/stable/114259>.
- Schunck, Henry Edward. 1886. « Contributions to the chemistry of chlorophyll ». *Proceedings of the Royal Society of London* 39 (239-241) : 348-61. <https://doi.org/10.1098/rspl.1885.0024>.
- Scotter, Michael J., Laurence Castle, et Dominic Roberts. 2005. « Method development and HPLC analysis of retail foods and beverages for copper chlorophyll (E141[i]) and chlorophyllin (E141[ii]) food colouring materials ». *Food Additives & Contaminants* 22 (12) : 1163-75.  
<https://doi.org/10.1080/02652030500306885>.
- Scully, Francis J. 1937. « Preservation of Plant Material in Natural Colors ». *Rhodora* 39 (457) : 16-19.  
<https://www.jstor.org/stable/23302481>.

- Seely, G.R. 1966. « The Structure and Chemistry of Functional Groups\*\*Contribution No. 216 from the Charles F. Kettering Research Laboratory, Yellow Springs, Ohio. The preparation of this chapter was supported in part by National Science Foundation Grant No. GB-2089. » Dans *The Chlorophylls*, 67-109. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4832-3289-8.50009-6>.
- Selosse, Marc-André. 2019. *Les goûts et les couleurs du monde: une histoire naturelle des tannins, de l'écologie à la santé*. Arles : Actes Sud.
- Simmons, John E. 2014. *Fluid preservation: a comprehensive reference*. Lanham : Rowman & Littlefield.
- Smirnoff, Nicholas. 2005. « Ascorbate, Tocopherol and Carotenoids: Metabolism, Pathway Engineering and Functions ». Dans *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*, 53-86. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470988565.ch3>.
- Srilaong, Varit, Sukanya Aiamla-or, Alisa Soontornwat, Masayoshi Shigyo, et Naoki Yamauchi. 2011. « UV-B irradiation retards chlorophyll degradation in lime (*Citrus latifolia* Tan.) fruit ». *Postharvest Biology and Technology* 59 (1) : 110-12. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.07.006>.
- Stafford, Helen A. 2000. « The Evolution of Phenolics in Plants ». Dans *Recent Advances in Phytochemistry*, 34 : 25-54. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-9920\(00\)80003-9](https://doi.org/10.1016/S0079-9920(00)80003-9).
- Steenis, C. G. G. J. van. 1935. « On the Preservation of Botanical Specimens in Liquid ». *Chronica Botanica* 1 : 341-42.
- Stone, G. E. 1899. « Formalin as a Preservative for Botanical Specimens ». *Journal of Applied Microscopy* 2 (10).
- Swami, Shrikant Baslingappa, Santosh Namdevrao Ghgare, Seema Shrikant Swami, Kishore J. Shinde, Sandeep Baban Kalse, et Ishwar Lakhichand Pardeshi. 2020. « Natural pigments from plant sources: A review ». *The Pharma Innovation Journal* 9 (10) : 566-74. <https://www.thepharmajournal.com/archives/?year=2020&vol=9&issue=10&ArticleId=5292>.
- Syvash, O. O., et O. K. Zolotareva. 2017. « REGULATION OF CHLOROPHYLL DEGRADATION IN PLANT TISSUES ». *Biotechnologia Acta* 10 (3) : 20-30. <https://doi.org/10.15407/biotech10.03.020>.
- Tanaka, Takashi, Zhi-Hong Jiang, Gen-ichiro Nonaka, et Isao Kouno. 1999. « Modification of the Solubility of Tannins: Biological Significance and Synthesis of Lipid-Soluble Polyphenols ». Dans *Plant Polyphenols 2*. Sous la direction de Georg G. Gross, Richard W. Hemingway, Takashi Yoshida, et Susan J. Branham, 761-78. Boston, MA : Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4139-4\\_42](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4139-4_42).
- Tanaka, Yoshikazu, Nobuhiro Sasaki, et Akemi Ohmiya. 2008. « Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids ». *The Plant Journal* 54 (4) : 733-49. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03447.x>.
- Tondi, Gianluca. 2017. « Tannin-Based Copolymer Resins: Synthesis and Characterization by Solid State <sup>13</sup>C NMR and FT-IR Spectroscopy ». *Polymers* 9 (6) : 223. <https://doi.org/10.3390/polym9060223>.
- 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)* 1908 (2) : 49-52. <https://doi.org/10.2307/4111831>.
- Vågen, Ingunn M., Roar Moe, et Eli Ronglan. 2003. « Diurnal temperature alternations (DIF/drop) affect chlorophyll content and chlorophyll a/chlorophyll b ratio in *Melissa officinalis* L. and *Ocimum basilicum* L., but not in *Viola wittrockiana* Gams. ». *Scientia Horticulturae* 97 (2) : 153-62. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(02\)00141-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(02)00141-3).
- van Dam, Andries. 2003. « DMDM-HYDANTOIN: THE PROMISING RESULT OF A SEARCH FOR AN ALTERNATIVE IN FLUID PRESERVATION OF BIOLOGICAL SPECIMENS ». *Collection Forum* 18 (1-2) : 104-15.

- Verma, Praveen Kumar. 2008. « Preservation of Botanical Specimens Retaining the Natural Colour Pigments ». Doctor of Philosophy in Museology, Aligarh (India) : Aligarh Muslim University.
- Viera, Isabel, Antonio Pérez-Gálvez, et María Roca. 2019. « Green Natural Colorants ». *Molecules* 24 (1) : 154. <https://doi.org/10.3390/molecules24010154>.
- Viswanathan, M. V., H. B. Singh, et P. R. Bhagwat. 1991. « A novel wet preservation method for plants ». *Journal of Scientific and Industrial Research* 50 (12) : 989-90.
- Wagstaffe, Reginald, et J. Havelock Fidler. 1968. *The preservation of natural history specimens*. Vol. 2. New York : Philosophical Library.
- Wiley, H. W., K. P. McElroy, et W. D. Bigelow. 1887. « Foods and food adulterants ». *Bulletin of U.S. Department of Agriculture - Division of Chemistry* 13.
- Woods, Albert F. 1897. « A Method of Preserving the Green Color of Plants for Exhibition Purposes ». *Botanical Gazette* 24 (3) : 206-9. <https://www.jstor.org/stable/2464571>.
- Yamauchi, Naoki. 2015. « Postharvest Chlorophyll Degradation and Oxidative Stress ». Dans *Abiotic Stress Biology in Horticultural Plants*. Sous la direction de Yoshinori Kanayama et Alexey Kochetov, 101-13. Tokyo : Springer Japan. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-55251-2\\_8](https://doi.org/10.1007/978-4-431-55251-2_8).
- Yamauchi, Naoki, Yoshio Funamoto, et Masayoshi Shigyo. 2004. « Peroxidase-mediated chlorophyll degradation in horticultural crops ». *Phytochemistry Reviews* 3 (1) : 221-28. <https://doi.org/10.1023/B:PHYT.0000047796.98784.06>.
- Yusuf, Mohd, Mohd Shabbir, et Faqeer Mohammad. 2017. « Natural Colorants: Historical, Processing and Sustainable Prospects ». *Natural Products and Bioprospecting* 7 (1) : 123-45. <https://doi.org/10.1007/s13659-017-0119-9>.
- Zhang, Q., et J. Ruan. 2016. « Tea: Analysis and Tasting ». Dans *Encyclopedia of Food and Health*, 1st éd., 256-67. Oxford : Academic Press - Elsevier. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849472006875>.
- Zhen, Lili, Heiko Lange, et Claudia Crestini. 2021. « An Analytical Toolbox for Fast and Straightforward Structural Characterisation of Commercially Available Tannins ». *Molecules* 26 (9) : 2532. <https://doi.org/10.3390/molecules26092532>.
- Zhong, Siqiong, Amanda Bird, et Rachel E. Kopec. 2021. « The Metabolism and Potential Bioactivity of Chlorophyll and Metallo-chlorophyll Derivatives in the Gastrointestinal Tract ». *Molecular Nutrition & Food Research* 65 (7) : 2000761. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202000761>.
- Zvezdanovic, Jelena, Dejan Markovic, et Sanja Milenkovic. 2012. « Zinc(II) and copper(II) complexes with pheophytin and mesoporphyrin and their stability to UV-B irradiation: Vis spectroscopy studies ». *Journal of the Serbian Chemical Society* 77 (2) : 187-99. <https://doi.org/10.2298/JSC110310175Z>.

## Crédits photographiques

Les figures suivantes ont un copyright autre que celui de l'auteur de ce travail (et de la H-E Arc) :

- Fig. 1-3, 5-13, 15-16, 23 : ©Wikimedia
- Fig. 4 : ©William Halmeck (sur Quora)
- Fig. 14 : ©Grasel *et al.*, 2016
- Fig. 21 : ©informations-documents.com
- Fig. 22 : ©Ly *et al.*, 2020
- Fig. 51 : ©Jarvis, 2003
- Fig. 81 : ©BioNinj
- Fig. 87 : ©Arbenz & Avérous, 2015
- Fig. 91 : ©Ben Edwards sur Pinterest
- Fig. 104 : ©Oliveira *et al.* 2014

## Annexe I – Liste des recettes de préservation de la couleur

Le tableau suivant présente les recettes selon un ordre chronologique. Il ne s'agit pas d'un tableau exhaustif à propos des plantes conservées en fluide, car il manque notamment de nombreuses recettes concernant les algues et champignons, et certaines destinées aux plantes vertes mais sans qu'aucun ingrédient de « fixation » de la couleur ne soit utilisé ont été omises. Par ailleurs, certaines sources ayant un rapport direct avec le présent sujet ont été écartées si la finalité de conservation prévue est le séchage<sup>242</sup>. Voici quelques remarques à propos des différentes colonnes.

- **Code** : nom de l'auteur, si plusieurs recettes -> numérotation proposée par l'auteur, sinon numérotation dans l'ordre exposé par l'auteur ; dans ce dernier cas, la détermination de ce qui constitue une recette distincte ou une simple variante a été faite en fonction de la technique de « fixation » plus que celle de conservation (si cette dernière est distincte), mais arbitraire cela reste assez arbitraire et pourrait être envisagé autrement.
- **Source** : aucune spécification (-) = source primaire sans citation d'une source d'inspiration, nom d'un auteur en écriture normale = citation de cette source par l'auteur de la recette concernée, nom en italique entre parenthèses = source qui cite cet auteur dans le cas où la source originale n'a pu être consultée ; dans ce dernier cas, toute la ligne est en italique pour souligner que les informations exactes sont sujettes à caution.
- **Spécimens types** : cette information est donnée selon le point de vue des pigments majoritairement concernés plus que des espèces spécifiques (parfois spécifiées), c'est pourquoi toute la ligne est colorée en fonction de cette information.
- **Solvant(s)** : = solvants autres que l'eau, qui est toujours présente – sauf dans le cas de l'imprégnation dans l'huile de paraffine proposée par Mackenzie ; certains composés liquides à température ambiante n'ont pas été considérés comme des solvants, comme certains acides forts utilisés pour ajuster le pH des sulfites, alors que les acides organiques ont été considérés comme des solvants car ils entrent souvent dans la composition des fluides de préservation (ex : FAA = Formalin-Alcohol-Acetic acid).
- **Maintien couleur** : indique si la méthode de préservation de la couleur est basée plutôt sur une « fixation » dans un premier fluide précédant celui de conservation (= Fix), ou si le maintien de la couleur est obtenu par le même fluide qui sera utilisé pour la conservation à long terme (= Cons) ; si on ne peut pas réellement parler de « fixation » comme dans le cas de la chlorophylle, alors l'indication est placée entre parenthèses.
- **Antiox.** : indique l'utilisation éventuelle d'un antioxydant chimique ou d'un moyen physique de diminution du taux d'O<sub>2</sub> (c'est-à-dire évacuation de l'air à l'aide d'une pompe à vide, pré-ébullition de la solution, ou bain dans l'alcool à 90-95%) ; le nom du composé chimique actif est indiqué le cas échéant (avec précision de l'utilisation en fixation ou en conservation), sinon l'indication « Physique » est utilisée ; si l'ébullition est pratiquée plus pour obtenir une pénétration rapide dans les tissus (elle est alors réalisée en même temps que le spécimen est plongé dans le fluide), l'indication est alors entre parenthèses.
- **Conservation** : précision sur le fluide de conservation s'il est différent, sinon « Idem ».

---

<sup>242</sup> Par exemple, Rendle cite Trail et commente l'usage qu'il a fait de cette recette (en ne parlant que d'un séchage final et non de l'option de garder en fluide, alors que Trail évoque les deux) ou encore Fessenden, cité par Wagstaffe & Fidler, a probablement inspiré leur recette de conservation des anthocyanes alors que lui prévoyait ensuite d'enrober les spécimens dans une résine synthétique. Voir : Rendle, 1916, p. 191 et Wagstaffe & Fidler, 1968, p. 292.

Tableau 9 : liste des recettes de préservation de la couleur.

| Code                   | Date | Auteur                       | Source                        | Spécimens types   | Particularité                                       | Sels Cu                         | Solvant(s)                      | Maintien couleur | Antiox.                 | Conservation                            |
|------------------------|------|------------------------------|-------------------------------|---|---|---------------------------------|---------------------------------|------------------|-------------------------|---|
| <i>Cleghorn</i>        | 1838 | <i>Cleghorn</i>              | <i>(Verma)</i>                | <i>Plantes « colorées »</i>                                     | <i>NaCl</i>   | -                               | ?                               | ?                | -                       | <i>Idem</i>                             |
| Amann 2                | 1896 | Amann                        | -                             | Plantes vertes, plutôt algues et bryophytes                     | H <sup>+</sup> lactique + phénol                    | Cl + acétate                    | -                               | Cons             | ?                       | Idem                                    |
| Woods                  | 1897 | Woods                        | -                             | Plantes vertes (préserve aussi jaunes, bruns, etc.)             | Vide d'air, pré-ébullition, et/ou EtOH              | SO <sub>4</sub> / acétate       | Glycérol, formol                | Fix              | Physique                | Idem sans Cu, ou autre excepté EtOH pur |
| Trail                  | 1908 | Trail                        | -                             | Plantes vertes (pas les trop fragiles, car ébullition)          | Ebullition  | Acétate                         | H <sup>+</sup> acétique         | Fix              | (physique)              | Base formol ou EtOH                     |
| <i>Strasburger</i>     | 1911 | <i>Strasburger</i>           | <i>(Butler)</i>               | <i>Monotropes</i>   | -   | -                               | <i>EtOH</i>                     | ?                | <i>Sulfites</i>         | ?                                       |
| <i>Jones</i>           | 1917 | <i>Jones</i>                 | <i>(Verma)</i>                | <i>Plantes vertes</i>   | <i>Ebullition</i>                                   | <i>Acétate</i>                  | <i>H<sup>+</sup> acétique</i>   | <i>Fix</i>       | <i>(physique)</i>       | ?                                       |
| Butler 1               | 1918 | Butler                       | Trail                         | Plantes vertes avec pathologies sombres                         | Ebullition  | Acétate                         | H <sup>+</sup> acétique         | Fix              | (physique)              | Formol                                  |
| Butler 2               | 1918 | Butler                       | Strasburger                   | Spécimens incolores ou pathologiques avec pigments liposolubles | Sulfites en fix                                     | -                               | -                               | (Fix)            | Sulfites en fix         | Formol                                  |
| <i>Cr. &amp; Ch. 1</i> | 1922 | <i>Cruess &amp; Christie</i> | <i>(Adriano &amp; Yonzon)</i> | <i>Fruits et légumes jaunes</i>                                 | <i>H<sup>+</sup> borique</i>                        | <i>SO<sub>4</sub></i>           | <i>Formol</i>                   | <i>(Cons)</i>    | <i>Sulfites en cons</i> | <i>Idem</i>                             |
| <i>Cr. &amp; Ch. 2</i> | 1922 | <i>Cruess &amp; Christie</i> | <i>(Adriano &amp; Yonzon)</i> | <i>Fruits et légumes rouges et multicolores</i>                 | <i>NaCl, sirop de cane-à-sucre, KNO<sub>3</sub></i> | -                               | <i>Formol, glycérol / sirop</i> | <i>(Cons)</i>    | <i>Sulfites en cons</i> | <i>Idem</i>                             |
| <i>Maltby 1</i>        | 1926 | <i>Maltby</i>                | <i>(Verma)</i>                | <i>Parties vertes</i>   | -   | <i>SO<sub>4</sub></i>           | -                               | <i>Cons</i>      | <i>Sulfites en cons</i> | <i>Idem</i>                             |
| <i>Maltby 2</i>        | 1926 | <i>Maltby</i>                | <i>(Verma)</i>                | <i>Parties vertes</i>   | <i>Ebullition</i>                                   | <i>SO<sub>4</sub> / acétate</i> | <i>H<sup>+</sup> acétique</i>   | <i>Fix</i>       | <i>(physique)</i>       | ?                                       |
| <i>Maltby 3</i>        | 1926 | <i>Maltby</i>                | <i>(Verma)</i>                | <i>Autres couleurs ?</i>  | ?   | ?                               | ?                               | ?                | ?                       | ?                                       |

|                    |             |                    |                |   |   |                                     |                            |        |                         |                             |
|--------------------|-------------|--------------------|----------------|---|---|-------------------------------------|----------------------------|--------|-------------------------|-----------------------------|
| Keefee             | 1926        | Keefe              | -              | Plantes vertes  | Nitrate d'uranium                               | Cl                                  | FAA + glycérol             | Fix    | -                       | Idem, séchage, autre ?      |
| <i>Mackenzie 1</i> | <i>1928</i> | <i>Mackenzie</i>   | <i>(Verma)</i> | <i>Feuilles vertes</i>                                    | -   | SO <sub>4</sub>                     | ?                          | Fix    | Sulfites en fix et cons | ?                           |
| <i>Mackenzie 2</i> | <i>1928</i> | <i>Mackenzie</i>   | <i>(Verma)</i> | <i>Poires, coings et fruits mous</i>                      | -   | -                                   | Formol (ou en cons ?)      | ?      | Sulfites                | ?                           |
| <i>Mackenzie 3</i> | <i>1928</i> | <i>Mackenzie</i>   | <i>(Verma)</i> | <i>Pommes rouges, ou jaunes ou vertes à taches rouges</i> | Imprégnation de paraffine                       | (SO <sub>4</sub> en cons si vertes) | Huile de paraffine, formol | (Cons) | Sulfites en cons        | H <sub>2</sub> O + sulfites |
| Ni. & Sl.          | 1928        | Nieuwland & Slavin | -              | Monotropes  | Xylène en conservation                          | -                                   | EtOH                       | (Cons) | Sulfites en fix et cons | Idem ou xylène              |
| Eckert             | 1931        | Eckert             | -              | Algues vertes   | H <sup>+</sup> lactique + phénol                | Cl + acétate                        | Glycérol, formol           | Fix    | ?                       | (Destiné à la microscopie)  |
| Ad. & Yo. 1        | 1933        | Adriano & Yonzon   | -              | Fruits et légumes verts                                   | -   | SO <sub>4</sub>                     | -                          | Fix    | Sulfites en cons        | H <sub>2</sub> O + sulfites |
| Ad. & Yo. 2        | 1933        | Adriano & Yonzon   | -              | Fruits et légumes jaunes ou blancs                        | -   | -                                   | -                          | (Cons) | Sulfites en cons        | Idem                        |
| Ad. & Yo. 3        | 1933        | Adriano & Yonzon   | -              | Fruits et légumes rouges ou multicolores                  | H <sup>+</sup> borique                          | -                                   | Formol                     | (Cons) | Sulfites en cons        | Idem                        |
| van Steenis 1      | 1935        | van Steenis        | -              | Plantes parasites   | -   | -                                   | EtOH ?                     | (Cons) | Sulfites en cons        | Idem                        |
| van Steenis 2      | 1935        | van Steenis        | -              | Fruits oranges du Gonocaryum                              | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | -                                   | -                          | (Cons) | ?                       | Idem                        |
| Blaydes 1a         | 1937        | Blaydes            | -              | Plantes vertes, pénétration lente du fluide               | Ebullition                                      | SO <sub>4</sub>                     | FAA                        | Fix    | (physique)              | FAA, EtOH 70% ou autre      |
| Blaydes 1b         | 1937        | Blaydes            | -              | Plantes vertes  | Vide d'air                                      | SO <sub>4</sub>                     | FAA                        | Fix    | Physique                | FAA, EtOH 70% ou autre      |

|               |      |                    |          |                                  |                                       |                 |                                 |      |                  |                             |
|---------------|------|--------------------|----------|----------------------------------|---------------------------------------|-----------------|---------------------------------|------|------------------|-----------------------------|
| Blaydes 2     | 1937 | Blaydes            | -        | Plantes vertes                   | Adapt. fluide de Transeau pour algues | SO <sub>4</sub> | EtOH, formol                    | Fix  | -                | Idem ?                      |
| Scully A      | 1937 | Scully             | -        | Plantes vertes (à fleurs jaunes) | H <sup>+</sup> borique                | SO <sub>4</sub> | -                               | Cons | Sulfites en cons | Idem                        |
| Scully B      | 1937 | Scully             | -        | Plantes vertes à fleurs jaunes   | -                                     | SO <sub>4</sub> | -                               | Fix  | Sulfites en cons | H <sub>2</sub> O + sulfites |
| Johansen 1    | 1940 | Johansen           | -        | Plantes vertes ?                 | H <sup>+</sup> borique, pas de Cu     | -               | Glycérol                        | ?    | -                | Idem                        |
| Johansen 2    | 1940 | Johansen           | Conant ? | Plantes vertes                   | Ebullition                            | Acétate         | H <sup>+</sup> acétique         | Fix  | (physique)       | ?                           |
| Johansen 3    | 1940 | Johansen           | Conant ? | Plantes vertes                   | -                                     | Acétate         | H <sup>+</sup> acétique, formol | Fix  | -                | ?                           |
| Johansen 4    | 1940 | Johansen           | Blaydes  | Plantes vertes                   | FPA* proposé                          | SO <sub>4</sub> | FAA                             | Fix  | -                | ?                           |
| Johansen 5    | 1940 | Johansen           | -        | Plantes vertes                   | Ebullition ; idem Johansen 2          | Acétate         | H <sup>+</sup> acétique         | Fix  | (physique)       | 70% EtOH + 5% glycérol      |
| Johansen 6    | 1940 | Johansen           | Keefe    | Plantes vertes                   | Nitrate d'uranium                     | Cl              | FAA + glycérol                  | Fix  | -                | ?                           |
| Chandrashekar | 1958 | Chandrashekar      | (Verma)  | Plantes vertes et autres         | -                                     | SO <sub>4</sub> | Formol                          | Fix  | -                | Formol                      |
| Wa. & Fi. 1a  | 1968 | Wagstaffe & Fidler | -        | Plantes vertes                   | Sulfites en fix                       | SO <sub>4</sub> | -                               | Fix  | Sulfite en fix   | Formol                      |
| Wa. & Fi. 1b  | 1968 | Wagstaffe & Fidler | -        | Plantes vertes                   | -                                     | Acétate         | H <sup>+</sup> acétique         | Fix  | -                | Formol                      |
| Wa. & Fi. 1b' | 1968 | Wagstaffe & Fidler | -        | Plantes vertes                   | Ebullition                            | Acétate         | H <sup>+</sup> acétique         | Fix  | (physique)       | Formol                      |
| Wa. & Fi. 1c  | 1968 | Wagstaffe & Fidler | Keefe    | Plantes vertes                   | Nitrate d'uranium                     | Cl              | FAA + glycérol                  | Fix  | -                | Formol                      |

|                           |      |                           |                        |  |   |                           |                                 |        |                  |   |
|---------------------------|------|---------------------------|------------------------|--|---|---------------------------|---------------------------------|--------|------------------|---|
| Wa. & Fi. 2               | 1968 | Wagstaffe & Fidler        | -                      | Pommes et autres fruits rouges                     | ZnCl <sub>2</sub>                       | -                         | Formol, glycerol                | (Cons) | -                | Idem  |
| Wa. & Fi. 3               | 1968 | Wagstaffe & Fidler        | -                      | Pommes jaunes à taches rouges                      | Imprégnation de paraffine               | -                         | Paraffine, formol               | (Cons) | Sulfites en cons | H <sub>2</sub> O + sulfites                   |
| Wa. & Fi. 4               | 1968 | Wagstaffe & Fidler        | -                      | Fleurs rouges et bleues                            | Thiourée, citrates (jeu sur le pH)      | -                         | Tert-butanol                    | (Cons) | Thiourée en cons | Idem  |
| Knudsen 1                 | 1972 | Knudsen                   | Turtox service leaflet | Plantes vertes                                     | H <sup>+</sup> lactique + phénol        | Cl + acétate              | Glycérol                        | ?      | ?                | ?   |
| Knudsen 2                 | 1972 | Knudsen                   | Scully                 | Plantes à fleur, plutôt jaunes                     | -                                       | SO <sub>4</sub>           | -                               | Fix    | Sulfites en cons | H <sub>2</sub> O + sulfites                   |
| Ha. & Di. 1               | 1985 | Hangay & Dingley          | -                      | Fougères et « plantes à graines »                  | -                                       | SO <sub>4</sub>           | FAA                             | Cons   | -                | Idem  |
| Ha. & Di. 2               | 1985 | Hangay & Dingley          | -                      | Plantes vertes                                     | H <sup>+</sup> lactique + phénol        | Cl + acétate              | Glycérol                        | Fix    | ?                | ?   |
| Ha. & Di. 3               | 1985 | Hangay & Dingley          | -                      | Plantes vertes                                     | Vide d'air ou EtOH                      | SO <sub>4</sub> / acétate | Glycérol                        | ?      | Physique         | ?   |
| Ha. & Di. 4               | 1985 | Hangay & Dingley          | -                      | Plantes vertes                                     | Bain silicate de Na ; ZnSO <sub>4</sub> | SO <sub>4</sub>           | -                               | Cons   | Sulfites en cons | Idem (sauf silicate de Na utilisé seul avant) |
| Ha. & Di. 5               | 1985 | Hangay & Dingley          | -                      | Plantes vertes                                     | Sulfites en fix                         | SO <sub>4</sub>           | -                               | Fix    | Sulfites en fix  | Formol  |
| Ha. & Di. 6               | 1985 | Hangay & Dingley          | Knudsen                | Plantes colorées ( <i>vertes à fleurs jaunes</i> ) | -                                       | SO <sub>4</sub>           | -                               | Fix    | Sulfites en cons | H <sub>2</sub> O + sulfites                   |
| Viswanathan <i>et al.</i> | 1991 | Viswanathan <i>et al.</i> | -                      | Plantes vertes                                     | -                                       | Acétate                   | H <sup>+</sup> acétique, formol | Cons   | -                | Idem  |

|         |      |       |                    |                      |                                |                      |  |                      |                      |                                    |
|---------|------|-------|--------------------|----------------------|--------------------------------|----------------------|--|----------------------|----------------------|------------------------------------|
| Moore   | 1999 | Moore | Wagstaffe & Fidler | (plusieurs recettes) | Citation complète de Wa. & Fi. | (plusieurs recettes) | (plusieurs recettes)                         | (plusieurs recettes) | (plusieurs recettes) | (plusieurs recettes)               |
| Verma 1 | 2008 | Verma | -                  | Plantes vertes       | H <sup>+</sup> propionique     | SO <sub>4</sub>      | H <sup>+</sup> propionique, formol           | Fix                  | -                    | H <sup>+</sup> propionique, formol |
| Verma 2 | 2008 | Verma | -                  | Fleurs jaunes        | H <sup>+</sup> propionique     | -                    | Glycérol, formol, H <sup>+</sup> propionique | (Cons)               | -                    | Idem                               |

## Annexe II – Détail des paramètres des variantes testées

Tableau 10 : détails des variantes évaluées sur les folioles de petits pois (Pp) lors des tests préliminaires et de la série sur le vieillissement à la lumière.

| Cinétique + influence manipulation<br>(foliole : 30mg ± 0.5, entier ou sectionné) |                                  | Influence de la coupe (migration) vs influence<br>d'une variation des masses supérieure |                        | Influence de la lumière vis. et des UV<br>(foliole : 40mg ± 0.5, sectionné) |   |
|---|----------------------------------|---|------------------------|---|---|
| Ecoup   | Tous sectionnés                  | E30s  | Sectionné à 30mg ± 0.5 | γE'   | Noir complet → 49j  |
| Eent  | Tous entiers                     | E20-25e   | Entiers, 20-25mg       | γE  | Manipulation normale  |
| E2j   | Début des mesures après 2 jours  | E25-30e   | Entiers, 25-30mg       | γE <i>l/s</i>   | Exposé à ~ 4'000 lux, spectre visible <sup>243</sup>        |
| E3j   | Début des mesures après 3 jours  | E30-35e   | Entiers, 30-35mg       | γE <i>UV</i>  | Exposé à ~ 10'000 mW/m <sup>2</sup> , UV-A <sup>244</sup>   |
| E6j   | Début des mesures après 6 jours  | E35-40e   | Entiers, 35-40mg       | γWcus'  | Fix. au CuSO <sub>4</sub> , noir complet → 49j              |
| E10j  | Début des mesures après 10 jours |   |                        | γWcus   | Fix. au CuSO <sub>4</sub> , manipulation normale            |
| E14j  | Début des mesures après 14 jours |   |                        | γWcus <i>l/s</i>  | Fix. au CuSO <sub>4</sub> , ~ 4'000 lux, spectre vis.       |
| E21j  | Début des mesures après 21 jours |   |                        | γWcus <i>UV</i>   | Fix. au CuSO <sub>4</sub> , ~ 10'000 mW/m <sup>2</sup> , UV |

Tableau 11 : détails des variantes de recettes testées sur les folioles de petits pois (Pp)

| Code (Pp...) | Pré-fix. | « Fixation »  | Durée | pH  | Remarques                              | Conservation  | pH  | Remarques  | Inspiration                 |
|--------------|----------|---|-------|-----|--|---------------|-----|--|-----------------------------|
| E'           | -        | -   | -     | -   | -                                      | EtOH 70% v/v  | 6-7 | Témoin laissé dans le noir pour chaque série ; le témoin mesuré est γE (série lumière) | -                           |
| ,W           | -        | Idem <i>Wcus</i>                                    | 2j    | 4.2 | -                                      | Eau déionisée | 5.0 | Témoin de l'effet de l'eau sans additif en cons.                                       | -                           |
| Wcus         | -        | CuSO <sub>4</sub> : 1<br>Eau : 20                   | 2j    | 4.2 | $C_{CuSO_4} = 0.200 \text{ mol/L}$     | EtOH 70% v/v  | 6-7 | -  | (Ad. & Yo. 1)<br>(Scully B) |
| Wcus3j       | -        | Idem <i>Wcus</i>                                    | 3j    | 4.2 | -                                      | EtOH 70% v/v  | 6-7 | -  | -                           |
| Wcua         | -        | Acétate de Cu : 19<br>H <sup>+</sup> acétique : 125 | 2j    | 2.8 | $C_{Cu_{acét.}} = 0.091 \text{ mol/L}$ | EtOH 70% v/v  | 6-7 | -  | Wa. & Fi. 1b                |

<sup>243</sup> Pour le spectre exact de la source lumineuse et le niveau d'éclairement dans l'enceinte, voir : Annexe IV – Graphes climatiques, Graphe 36, p. 112 et Graphe 38, p. 113.

<sup>244</sup> Pour le spectre exact de la source lumineuse et le niveau absolu d'UV dans l'enceinte, voir : Annexe IV – Graphes climatiques, Graphe 37, p. 112 et Graphe 39, p. 113.

|          |                            |  |      |     |  |   |     |  |                                  |
|----------|----------------------------|--|------|-----|--|---|-----|--|----------------------------------|
|          |                            | Eau : 1'025  |      |     |  |   |     |  |                                  |
| Wcua°    | -                          | Acétate de Cu : 19<br>H <sup>+</sup> acétique : 125<br>Eau : 125 | 3min | 2.4 | $C_{Cu_{acét.}} = 0.381 \text{ mol/L}$ | EtOH 70% v/v  | 6-7 | -  | Trail                            |
| Wcuc     | -                          | CuCl <sub>2</sub> : 1<br>Eau : 100                               | 2j   | 3.6 | $C_{CuCl_2} = 0.074 \text{ mol/L}$     | EtOH 70% v/v  | 6-7 | -  | (Al-Dabbas <i>et al.</i> , 2017) |
| Acus     | -                          | CuSO <sub>4</sub> : 0.2<br>FAA : 100                             | 2j   | 3.3 | $C_{CuSO_4} = 0.008 \text{ mol/L}$     | EtOH 70% v/v  | 6-7 | -  | Blaydes 1                        |
| Acua     | -                          | Acétate de Cu : 11<br>FAA : 200                                  | 2j   | 4.6 | $C_{Cu_{acét.}} = 0.275 \text{ mol/L}$ | EtOH 70% v/v  | 6-7 | -  | Johansen 3                       |
| Acuc     | -                          | CuCl <sub>2</sub> : 1<br>FAA : 100                               | 2j   | 2.2 | $C_{CuCl_2} = 0.074 \text{ mol/L}$     | EtOH 70% v/v  | 6-7 | -  | (Keefe)                          |
| Wcua#    | -                          | -  | -    | -   | -                                      | Acétate de Cu : 0.76<br>H <sup>+</sup> acétique : 5<br>Formaldéhyde : 1.85<br>Eau : 93.15                           | 3.1 | $C_{Cu_{acét.}} = 0.038 \text{ mol/L}$   | Viswanathan <i>et al.</i>        |
| ∅        | Vide d'air                 | Idem <i>Wcus</i>   | 3j   | 4.2 | Le vide n'a pu se faire assez          | EtOH 70% v/v  | 6-7 | -  | Woods                            |
| E95      | EtOH 95%,<br>20 min        | Idem <i>Wcus</i>   | 3j   | 4.2 | -                                      | EtOH 70% v/v  | 6-7 | -  | Woods                            |
| S5       | -                          | CuSO <sub>4</sub> : 1<br>SO <sub>2</sub> 5% : 20                 | 3j   | 0.8 | $C_{sulfite} = 0.780 \text{ mol/L}$    | EtOH 70% v/v  | 6-7 | 5% est une valeur standard et proche des 6% de Ad. & Yo.                       | Ad. & Yo. 1                      |
| S0.5     | -                          | CuSO <sub>4</sub> : 1<br>SO <sub>2</sub> 0.5% : 20               | 3j   | 1.5 | $C_{sulfite} = 0.078 \text{ mol/L}$    | EtOH 70% v/v  | 6-7 | -  | Wa. & Fi. 1a                     |
| ,sul1    | -                          | Idem <i>Wcus</i>   | 3j   | 4.2 | -                                      | Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> : 21<br>H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 96% : 16 mL<br>Eau : 1'000                   | 1.0 | 96% ≈ hautes concentrations du commerce<br>$C_{sulfite} = 0.167 \text{ mol/L}$ | Scully B                         |
| ,sul6    | -                          | Idem <i>Wcus</i>   | 3j   | 4.2 | -                                      | Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> : 21<br>H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 30% : 16 mL<br>Eau : 1'000                   | 6.2 | 30% ≈ basses concentrations du commerce<br>$C_{sulfite} = 0.167 \text{ mol/L}$ | Scully B                         |
| ,sul6?   | -                          | Idem <i>Wcus</i>   | 3j   | 4.2 | -                                      | Idem <i>,sul6</i>   | 6.2 | -  | Scully B                         |
| sil,sul# | Sol. de silicate de Na, 1j | -  | -    | -   | -                                      | CuSO <sub>4</sub> : 5<br>ZnSO <sub>4</sub> : 50<br>Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> : 16<br>HCl : 12 mL<br>Eau : 950 | 2.0 | Formation de cristaux après plusieurs semaines                                 | Ha. & Di. 4                      |
| Sbo#     | -                          | -  | -    | -   | -                                      | CuSO <sub>4</sub> : 10<br>SO <sub>2</sub> 5% : 3 mL   |     | -  | Scully A                         |

|          |                                      |  |    |     |   |   |     |   |                      |
|----------|--------------------------------------|--|----|-----|---|---|-----|---|----------------------|
|          |                                      |  |    |     |   | H <sup>+</sup> borique : 3<br>Eau : 200 |     |   |                      |
| as       | -                                    | CuSO <sub>4</sub> : 5<br>H <sup>+</sup> ascorbique : 1<br>Eau : 100  | 3j | 1.7 | Dépôt de cuivre métallique<br>après 2-3j<br>$C_{H^+_{asc.}} = 0.0568$ mol/L | EtOH 70% v/v                            | 6-7 | - | -                    |
| to1as    | EtOH 95% :<br>100 mL<br>Toco. : 1    | CuSO <sub>4</sub> : 5<br>H <sup>+</sup> ascorbique : 1<br>Eau : 100  | 3j | 1.7 | Dépôt de cuivre métallique<br>après 2-3j<br>$C_{toco.} = 0.0232$ mol/L      | EtOH 70% v/v                            | 6-7 | - | -                    |
| to0.01as | EtOH 95% :<br>100 mL<br>Toco. : 0.01 | CuSO <sub>4</sub> : 5<br>H <sup>+</sup> ascorbique : 1<br>Eau : 100  | 3j | 1.7 | Dépôt de cuivre métallique<br>après 2-3j<br>$C_{toco.} = 0.0002$ mol/L      | EtOH 70% v/v                            | 6-7 | - | -                    |
| ,to      | -                                    | Idem <i>Wcus</i>   | 3j | 4.2 | -   | EtOH 70% : 1'000<br>Tocophérol : 0.1    | 6-7 | - | -                    |
| *to      | -                                    | -  | -  | -   | -   | EtOH 70% : 1'000<br>Tocophérol : 0.1    | 6-7 | - | -                    |
| Gphla    | -                                    | Acétate de Cu : 1<br>CuCl <sub>2</sub> : 1<br>Phénol : 100<br>H <sup>+</sup> lactique : 100<br>Glycérol : 200<br>Eau : 100 | 3j |     | -   | EtOH 70% v/v                            | 6-7 | - | Knudsen 1<br>(Amann) |

Tableau 12 : détails des variantes testées sur les orobanches (Or)

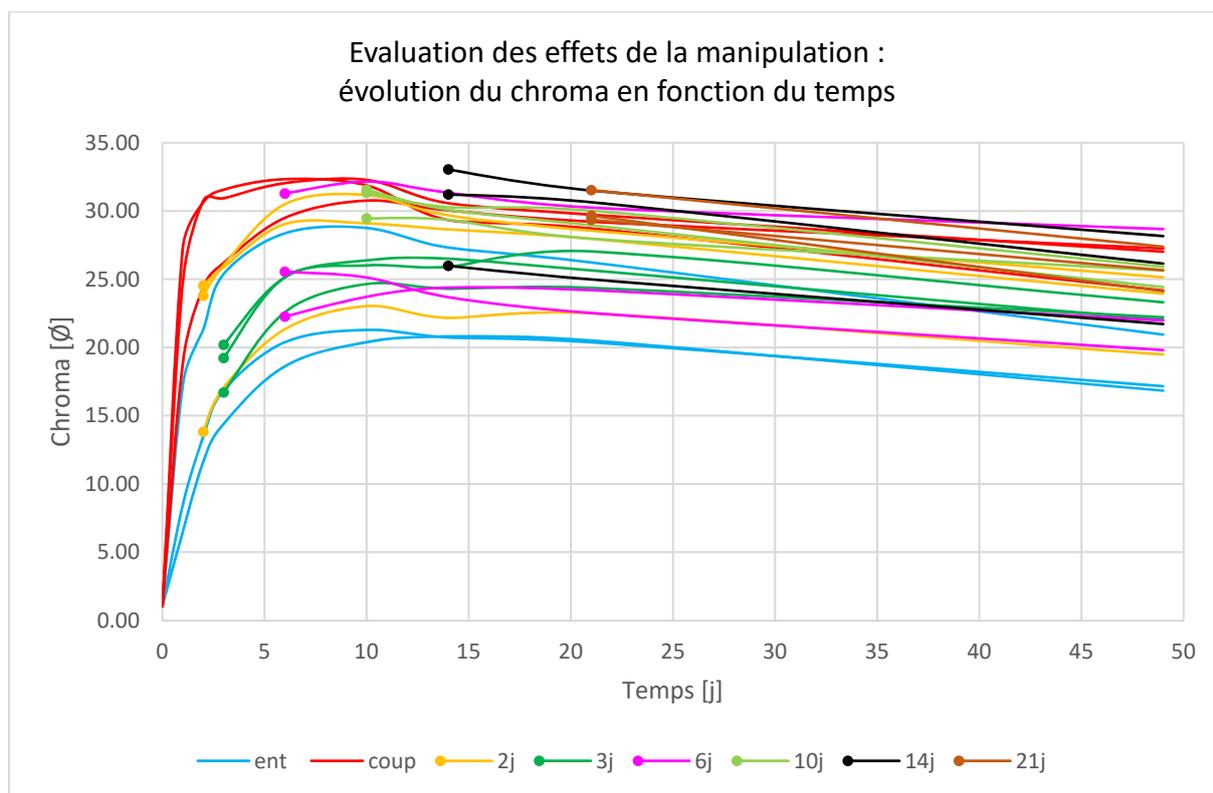
| Code (Or...) | Principe                 | Fix. / immers. préalable | Durée fix. | Cons.    | Adjuvant | pH  | Remarques  |
|--------------|--------------------------|--------------------------|------------|----------|----------|-----|--|
| E.a          | Témoins dans EtOH 70%    | -                        | -          | EtOH 70% | -        | 6-7 | Renouvellement du fluide après   |
| E.b          | Témoins dans EtOH 70%    | -                        | -          | EtOH 70% | -        | 6-7 | -  |
| .Car         | Comparaison autre espèce | -                        | -          | EtOH 70% | -        | 6-7 | Masse moindre (12.6g au lieu de 20g), donc adaptation ~ de la quantité de fluide |

|                 |  |                    |    |                    |   |           |   |
|-----------------|--|--------------------|----|--------------------|---|-----------|---|
| Esul.a          | Antioxydant en conservation              | -                  | -  | EtOH 70%           | Sulfite ajusté au pK <sub>a</sub> (1.8) avec HCl, puis changement pour pH=4.7 | 1.8 → 4.7 | Saturation  |
| Esul.b          | Antioxydant en conservation              | -                  | -  | EtOH 70%           | Sulfite ajusté au pK <sub>a</sub> (1.8) avec HCl, puis ajout NaOH → pH=3.0    | 1.8 → 3.0 | Saturation  |
| Esul.c          | Antioxydant en conservation              | -                  | -  | EtOH 70%           | Sulfite ajusté à pH=4.7   | 4.7       | Saturation  |
| P,Esul (a et b) | Hydrophob. en fix. puis antiox. en cons. | Huile de paraffine | 3j | H <sub>2</sub> O   | Sulfite ajusté au pK <sub>A</sub> (vers pH 2) avec HCl                        | 1.8       | Recette inspirée de celle pour les pommes jaunes à rayures rouges de Wagstaffe & Fidler |
| P,E (a et b)    | Hydrophobisation en fixation puis EtOH   | Huile de paraffine | 3j | EtOH               | -   | 6-7       | -   |
| P (a et b)      | Hydrophobisation en conservation         | -                  | -  | Huile de paraffine | -   | -         | -   |
| F,G (a et b)    | Fixation au formaldéhyde                 | Formaldéhyde 3.5%  | 3j | Glycérol 70%       | -   | 6         | -   |
| G               | Témoin dans glycérol 70%                 | -                  | -  | Glycérol 70%       | -   | 6         | -   |

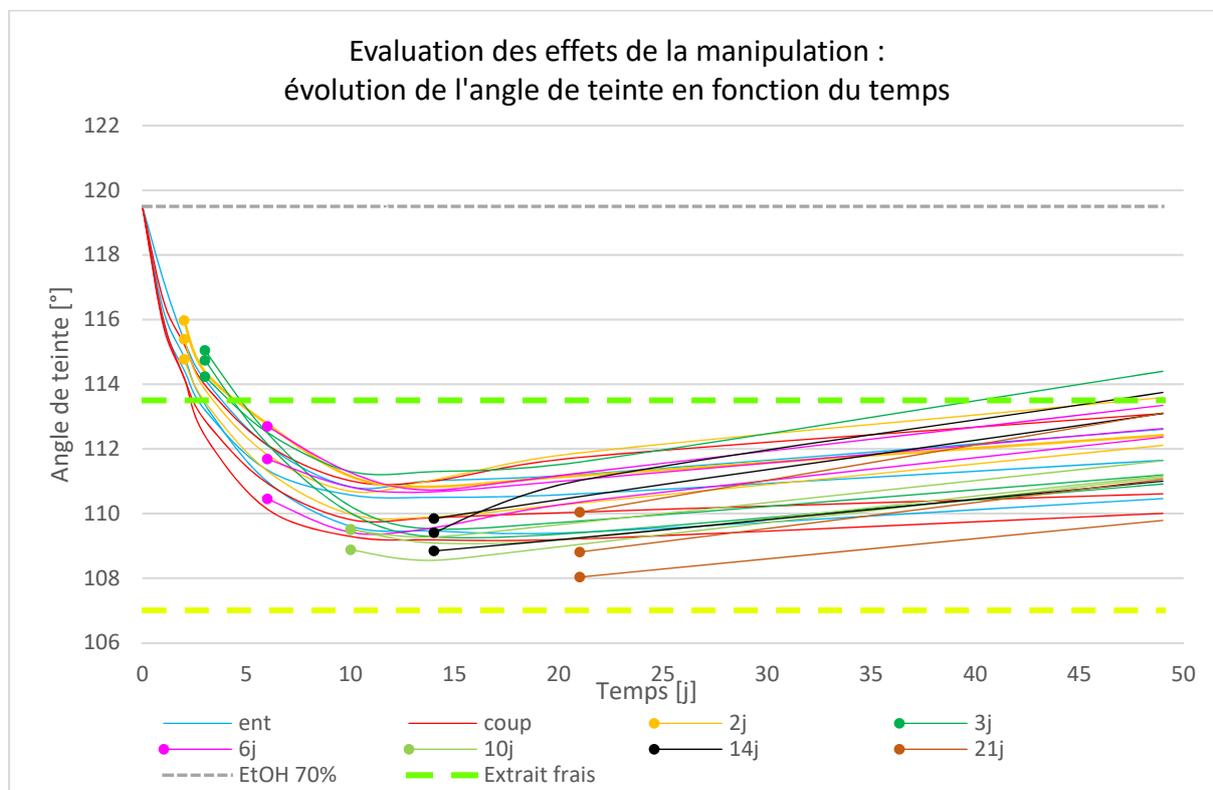
*Tableau 13 : principes d'établissement des codes pour les échantillons. En pratique, le code est souvent réduit au minimum d'éléments nécessaire pour pouvoir différencier les échantillons d'une même série.*

| <b>Elément</b>          | <b>Forme</b>           | <b>Emplacement</b>               | <b>Exemple</b>   |
|-------------------------|------------------------|----------------------------------|--|
| Espèce                  | Majuscule + minuscule  | Début                            | Pp = Petit pois  |
| Solvant                 | Majuscule              | Après l'espèce                   | E = Ethanol (70%)  |
| Adjuvant                | 2 ou 3 minuscules      | Après le solvant                 | cus = sulfate de cuivre                                    |
| Concentration           | Chiffres               | Après l'élément concerné         | S5 = solution aqueuse de SO <sub>2</sub> à 5%              |
| Succession              | Virgule                | Avant le second fluide           | ,sul = sulfites en cons.                                   |
| Recette « deux en un »  | Dièse                  | Fin                              | Wcua# = solution aqueuse d'acétate de cuivre en cons.      |
| Sans « fixation »       | Astérisque             | Avant le fluide de cons.         | *to = cons. dans le tocophérol sans fix.                   |
| Echantillon spécifique  | Point puis minuscule   | A la fin                         | OrE.a = 1 <sup>er</sup> échantillon d'orobanche en éthanol |
| Durée                   | Chiffre suivi de « j » | Après la phase concernée         | 3j = durant ou après 3 jours                               |
| Ebullition              | Degré                  | Après la phase concernée         | Wcua° = ébullition de la solution aq. d'acétate de Cu      |
| Vide d'air              | Ensemble vide          | Dépend                           | ∅  |
| Préparation du spécimen | « e » ou « s »         | Dépend                           | e = entier, s = sectionné                                  |
| Série sur la lumière    | Gamma                  | Après l'espèce, avant le solvant | γ  |

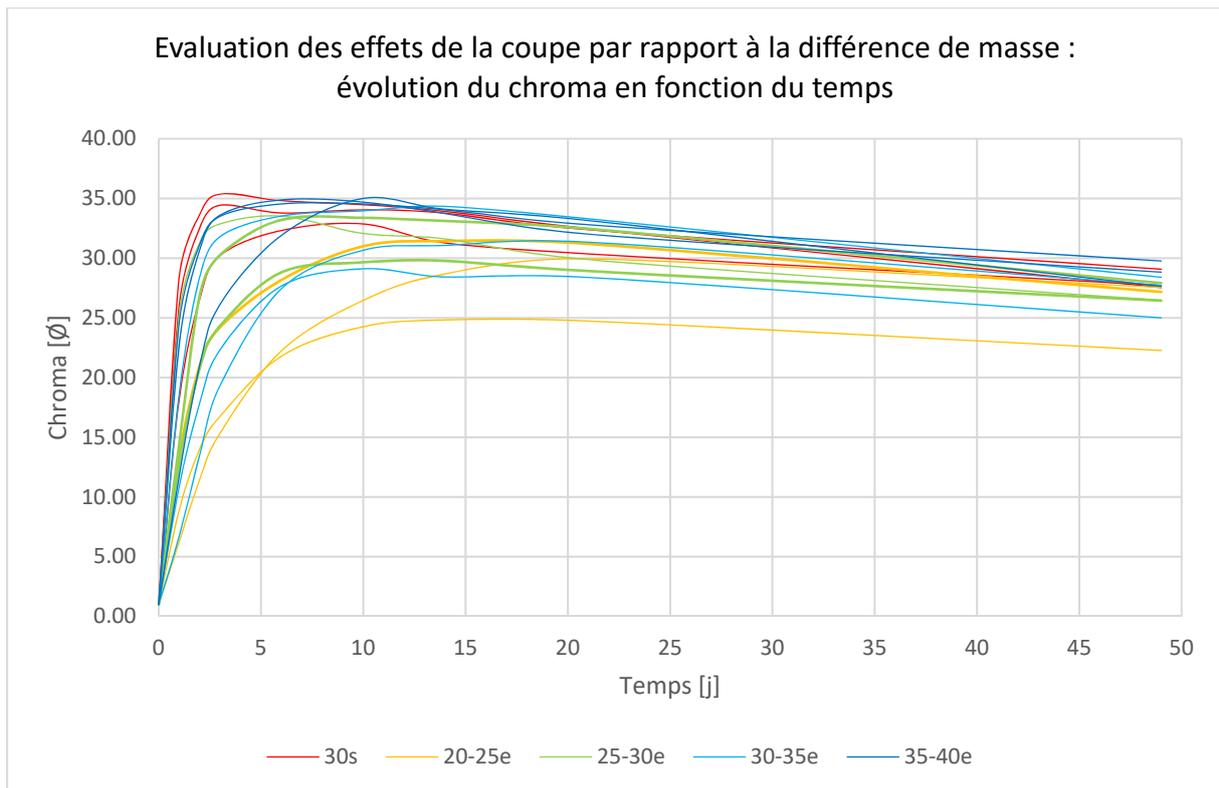
## Annexe III – Graphes colorimétriques



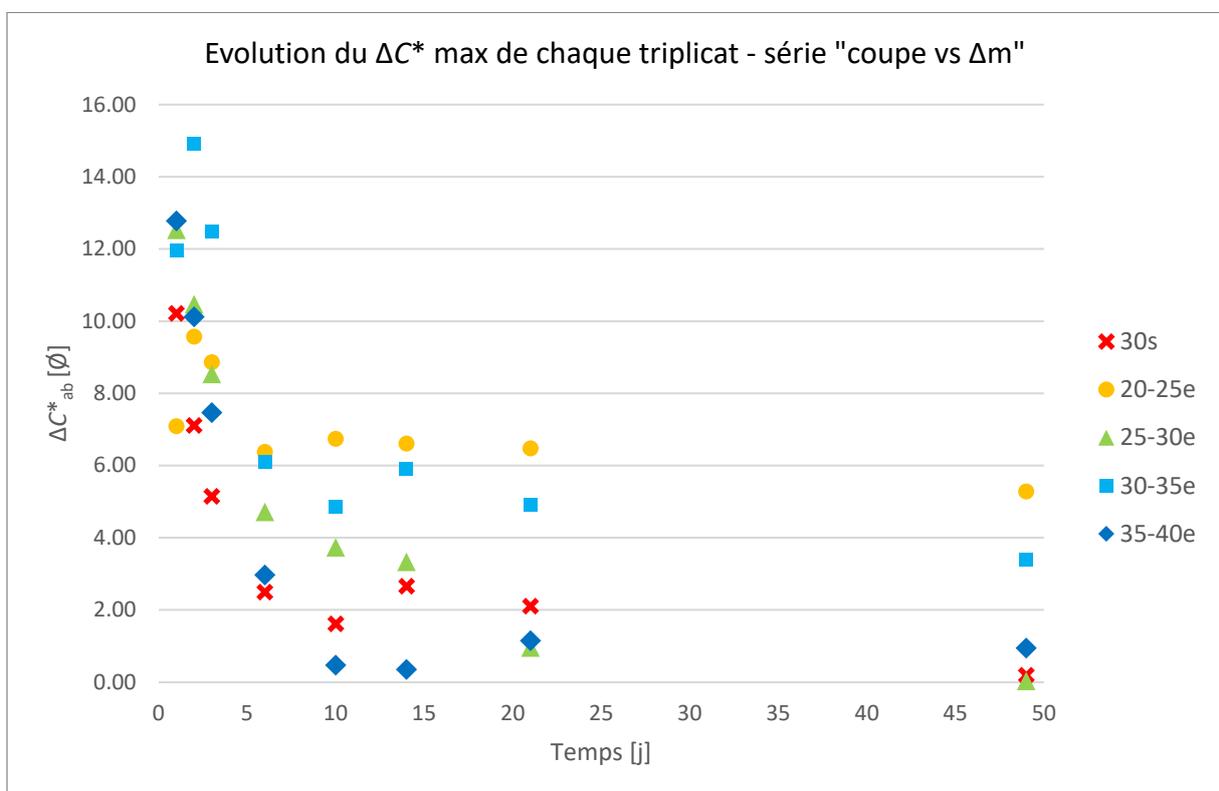
Grappe 6 : évaluation des effets de la manipulation sur la migration, en mesurant le fluide de triplicats uniquement à partir du jour indiqué dans leur nom. La variabilité d'un spécimen à l'autre est importante, et l'effet dû à la manipulation peu visible – peut-être un léger décalage dans le pic maximum.



Grappe 7 : évaluation des effets de la manipulation sur la dégradation des pigments, en mesurant le fluide de triplicats uniquement à partir du jour indiqué dans leur nom. La variabilité d'un spécimen à l'autre est importante, et l'effet dû à la manipulation peu visible – là aussi un léger décalage est perceptible.



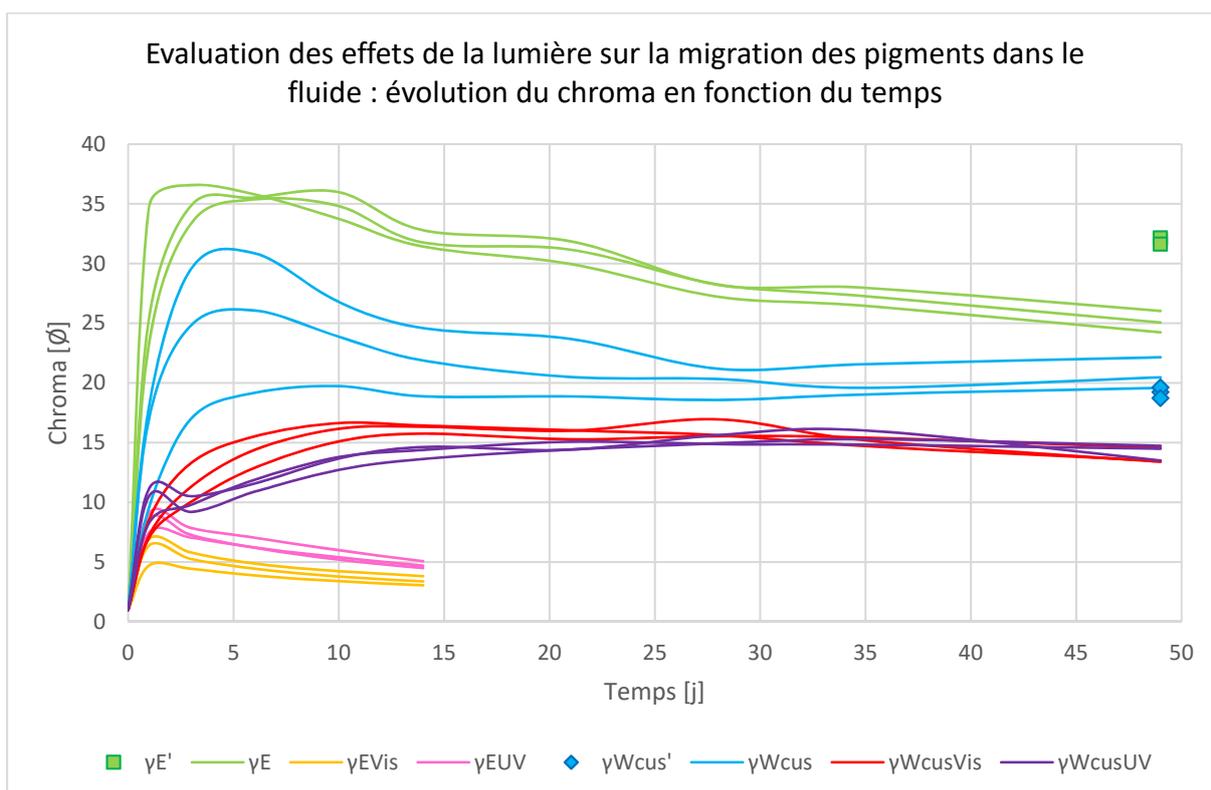
Grappe 8 : évolution du chroma de la série « coupe vs  $\Delta m$  », l'abréviation de chaque triplicat faisant référence à la masse des folioles en mg, « s » = sectionné et « e » = entier.



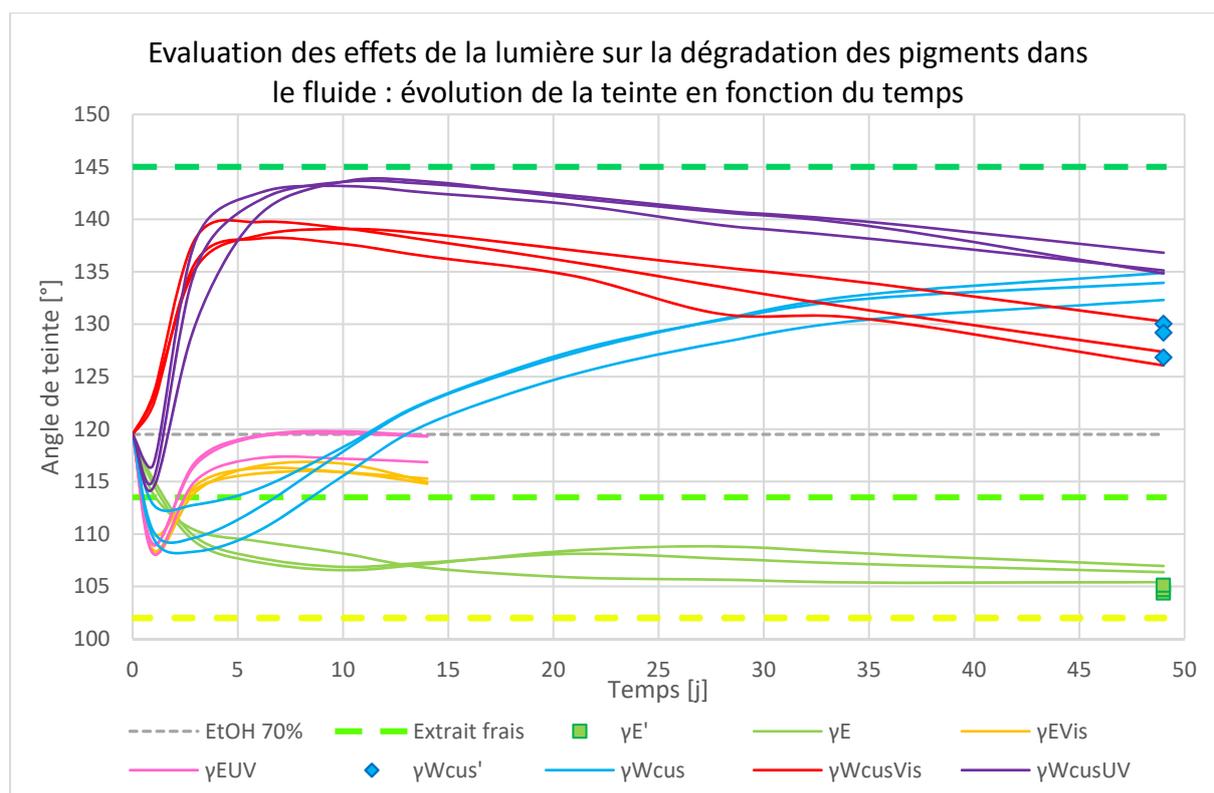
Grappe 9 : évolution de la différence max de chroma au sein de chaque triplicat. Il semblerait que le fait d'avoir sectionné les folioles à la même masse (30s) a eu un impact positif sur la réduction de cette variabilité. Il faut néanmoins relativiser ces résultats car la tolérance est toujours identique et donc non proportionnelle à la valeur nominale (voir le Tableau 14 ci-dessous).

Tableau 14 : rapport entre la tolérance de masse ( $\Delta m$ ) et la valeur nominale des folioles.

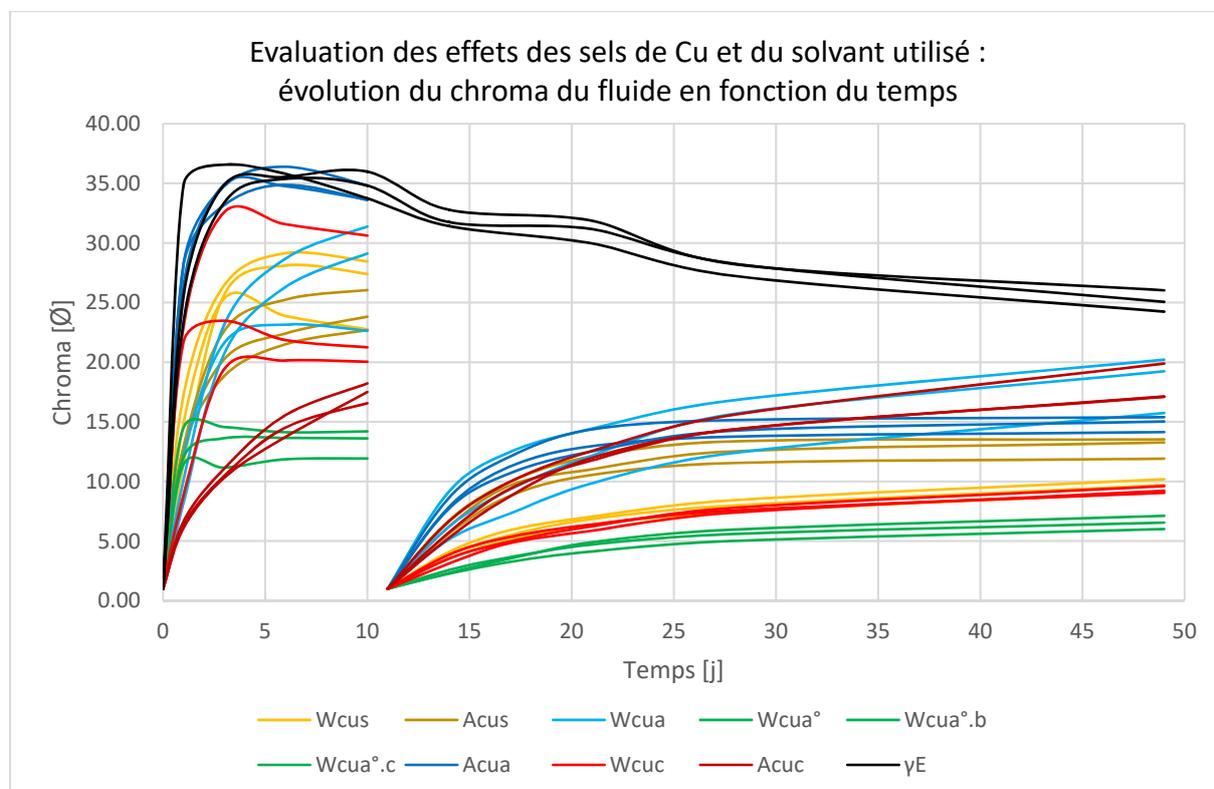
| Triplicat | Etat de la feuille | Valeur nominale | $\Delta m$ accepté | % $\Delta m$ / valeur nominale |
|-----------|--------------------|-----------------|--------------------|--------------------------------|
| PpE30s    | Sectionnée         | 30 mg           | $\pm 0.5$ mg       | 3%                             |
| PpE20-25e | Entière            | 22.5 mg         | $\pm 2.5$ mg       | 22%                            |
| PpE25-30e | Entière            | 27.5 mg         | $\pm 2.5$ mg       | 18%                            |
| PpE30-35e | Entière            | 32.5 mg         | $\pm 2.5$ mg       | 15%                            |
| PpE35-40e | Entière            | 37.5 mg         | $\pm 2.5$ mg       | 13%                            |



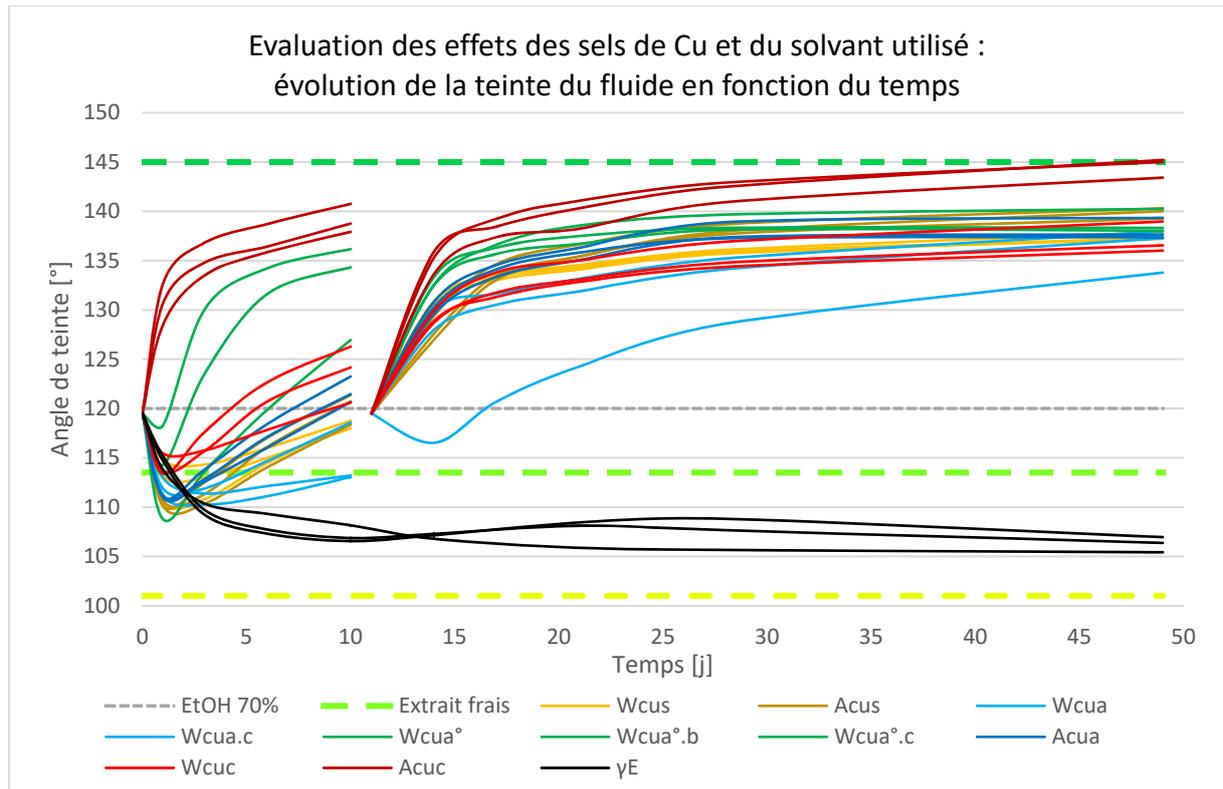
Graphe 10 : évolution du chroma des triplicats de la série « lumière », « fixé » ( $Wcus$ ) ou non ( $E$ ), dans le noir ( $'$ ), manipulé normalement ( $()$ ), exposé à 4'000 lux ( $Vis$ ) et à 10'000  $mW/m^2$  d'UV-A ( $UV$ ). Le test sur les triplicats non fixés et exposés à la lumière visible ou aux UV a été arrêté après 14j, les folioles étant complètement décolorées.



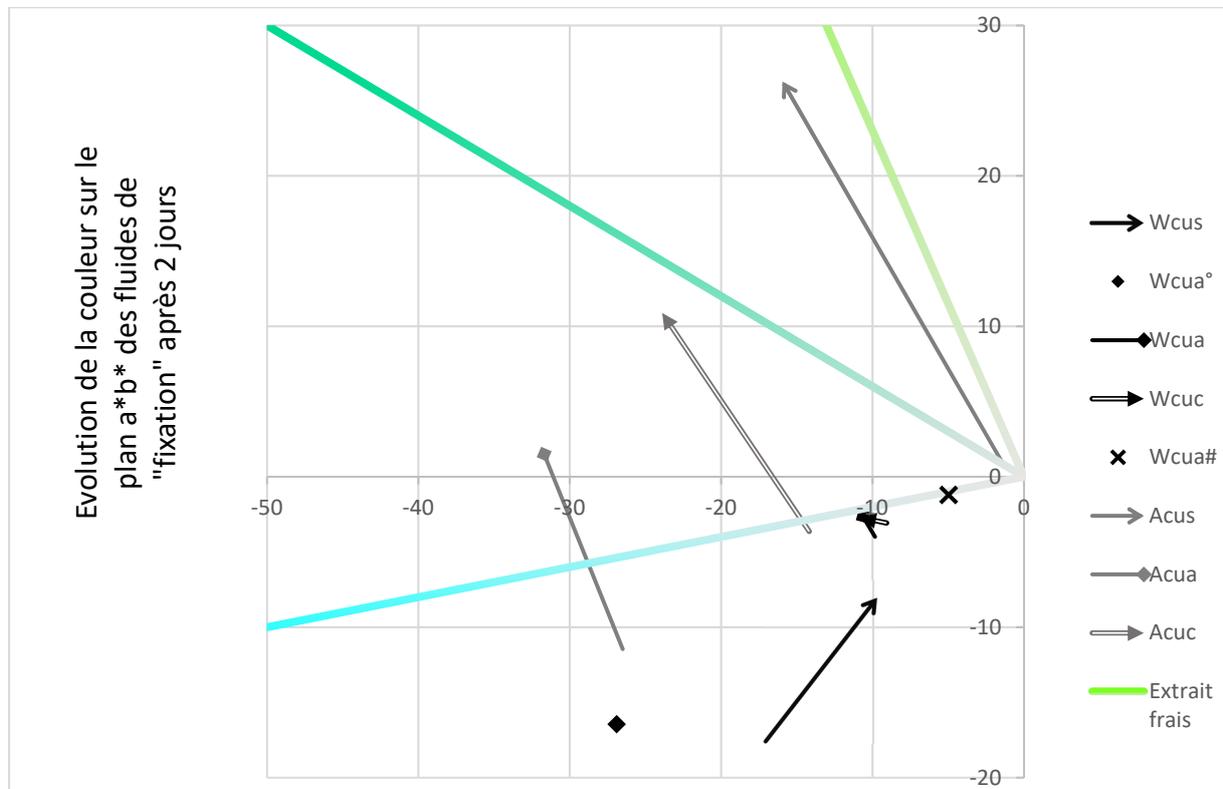
Grappe 11 : évolution de la teinte des triplicats de la série « lumière ». Pour les spécimens non-fixés, la lumière visible et les UV-A ont rapidement détruits les pigments au sein du fluide ( $\gamma E_{Vis}$  et  $\gamma E_{UV}$  vs  $\gamma E$  et  $\gamma E'$ ). L'effet a été bien plus lent et léger sur les spécimens « fixés » ( $\gamma W_{cusVis}$  et  $\gamma W_{cusUV}$ ), mais malgré la relative stabilité du chroma, l'évolution de l'angle de teinte ne trompe pas : il y a probablement une perte du cuivre complexé (la teinte se rapprochant de celles des phéophytines ou phéophorbides).



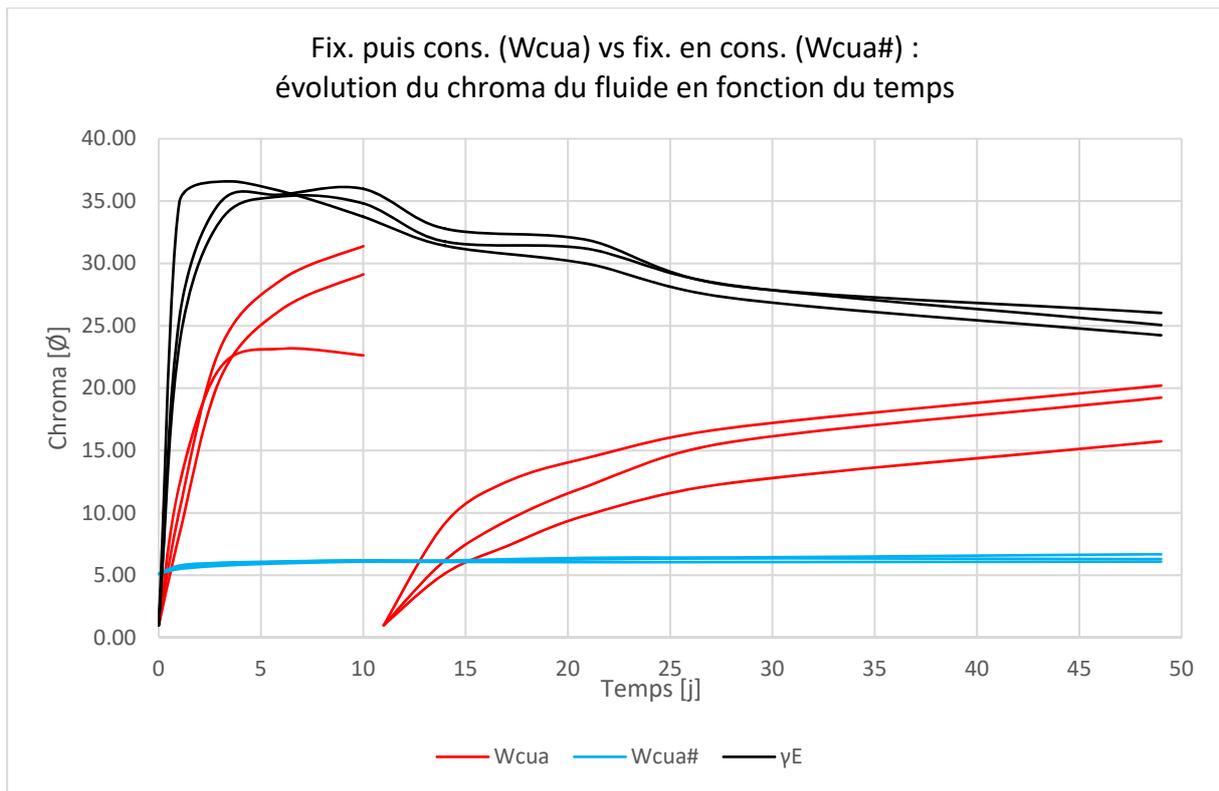
Grappe 12 : évolution du chroma de la série sur les sels de cuivre et l'eau vs FAA en « fixation ». Le fluide de conservation (EtOH 70%) a été renouvelé après 10j, sauf pour le témoin sans « fixation » ( $\gamma E$ ). Une migration est observée dans tous les cas, mais la plus faible est celle de la variante avec ébullition ( $W_{cua}^{\circ}$ ).



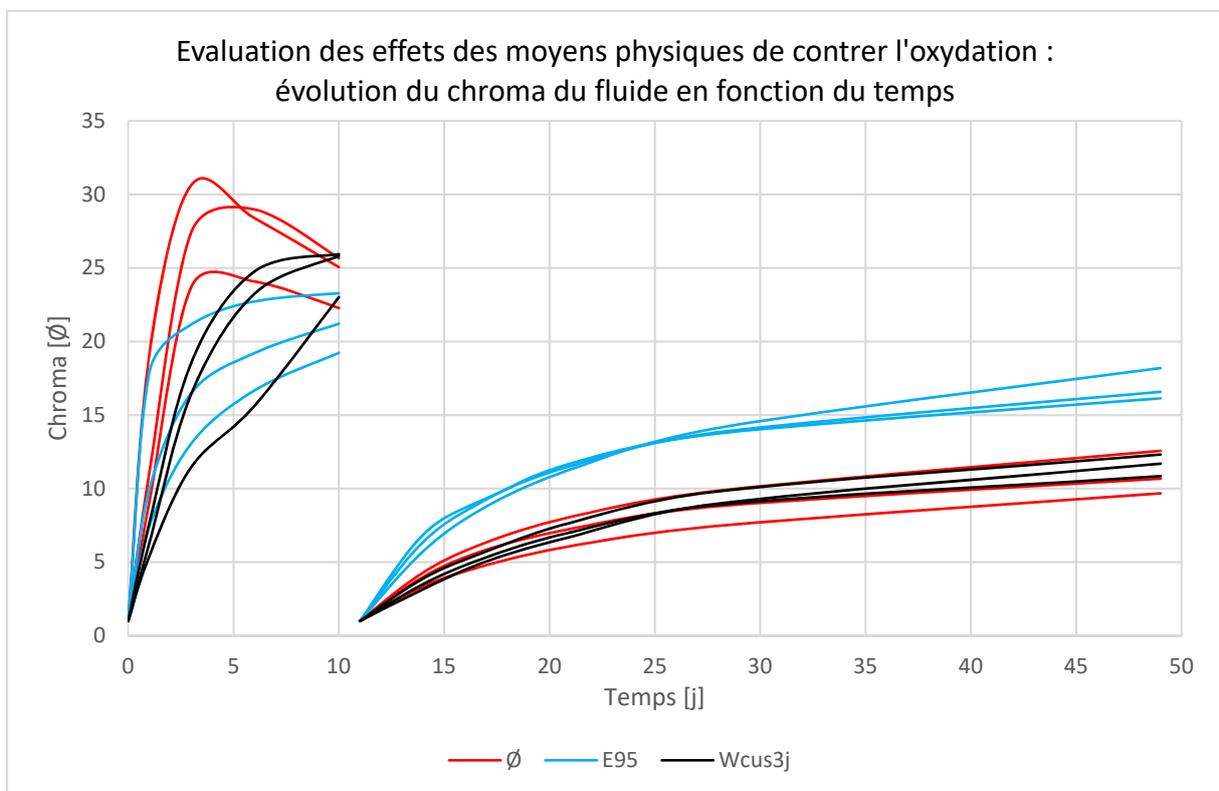
Graphe 13 : évolution de la teinte de la série sur les sels de cuivre et l'eau vs FAA en « fixation ». Le fluide de conservation (EtOH 70%) a été renouvelé après 10j, sauf pour le témoin sans « fixation » (γE). De manière générale, le vert des fluides tire plus sur le bleu que l'extrait frais et que le témoin sans « fixation ».



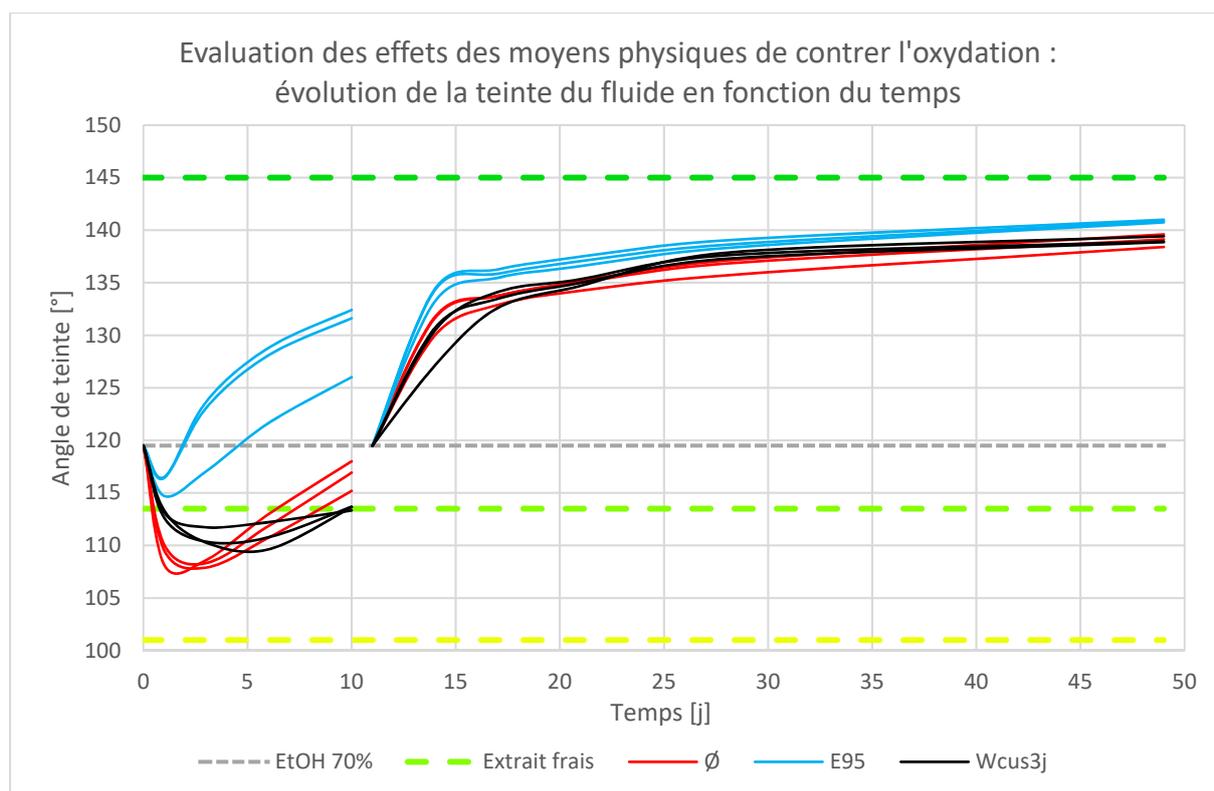
Graphe 14 : évolution de la couleur (sans la luminosité) du fluide de fixation de la série sur les sels de cuivre et l'eau vs FAA en « fixation ». Les fluides aqueux n'ont quasiment pas bougé, sauf le Wcus qui a perdu du chroma, alors que ceux avec du FAA (Acus, Acua et Acuc) se sont tous déplacés vers une teinte plus verte et moins bleue. Les teintes indicatives ont été placées arbitrairement, sauf celle de l'extrait frais de pigments.



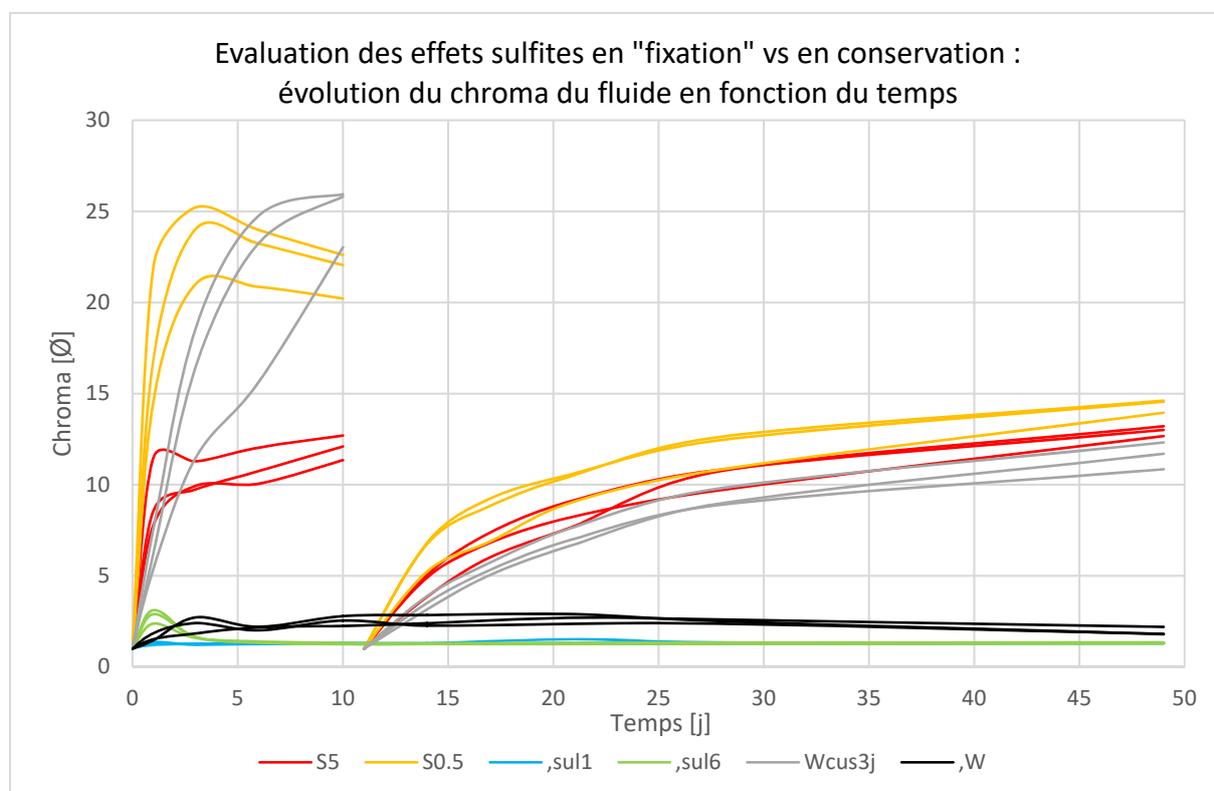
Grappe 15 : évolution du chroma du fluide du triplicat où l'acétate de cuivre était intégré à l'unique fluide de conservation (Wcua#) comparé au processus standard de « fixation » au sel de cuivre (Wcua) précédant la conservation sans sel de cuivre (uniquement EtOH 70%) et au témoin sans « fixation » (γE).



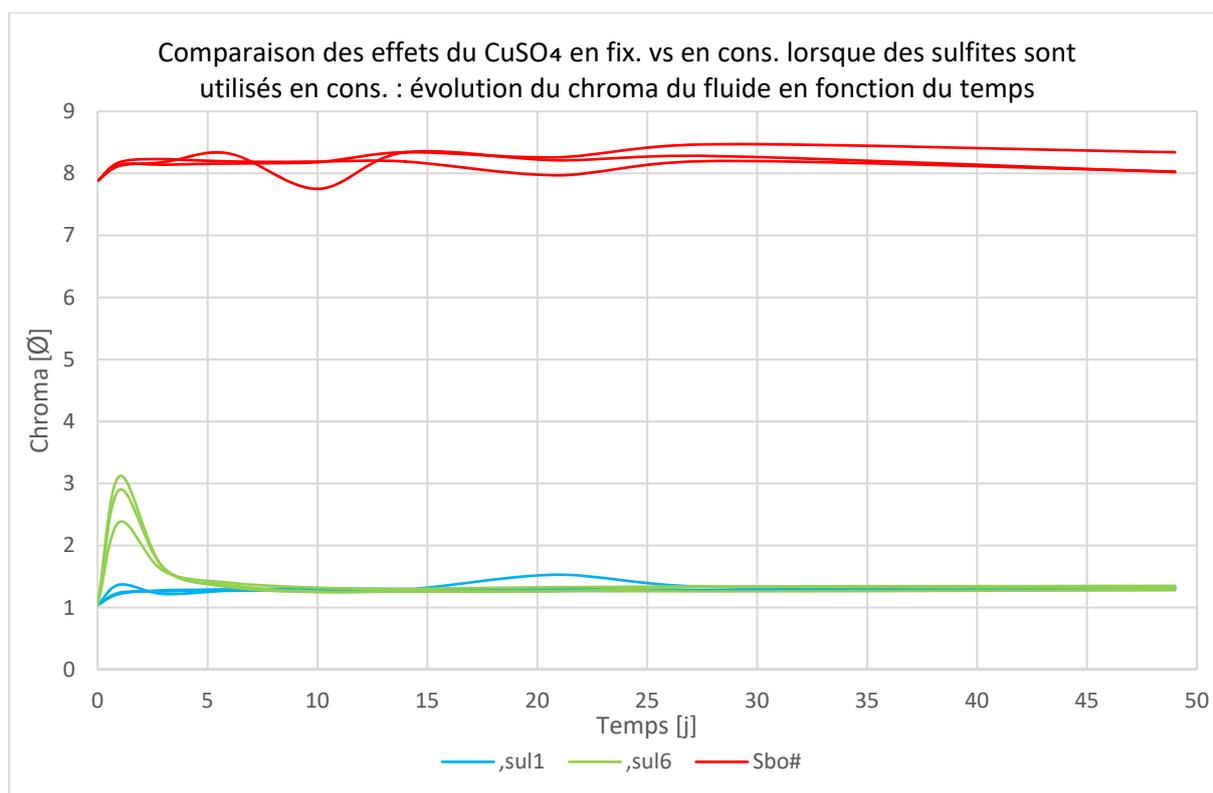
Grappe 16 : évolution du chroma du fluide des triplicats préparé par un vide d'air au début de la « fixation » (∅) et par une immersion préalable dans l'EtOH 95% (E95) comparé au témoin également « fixé » au  $\text{CuSO}_4$  durant 3j et dont le fluide de conservation (EtOH 70%) a aussi été renouvelé après 10j (Wcus3j).



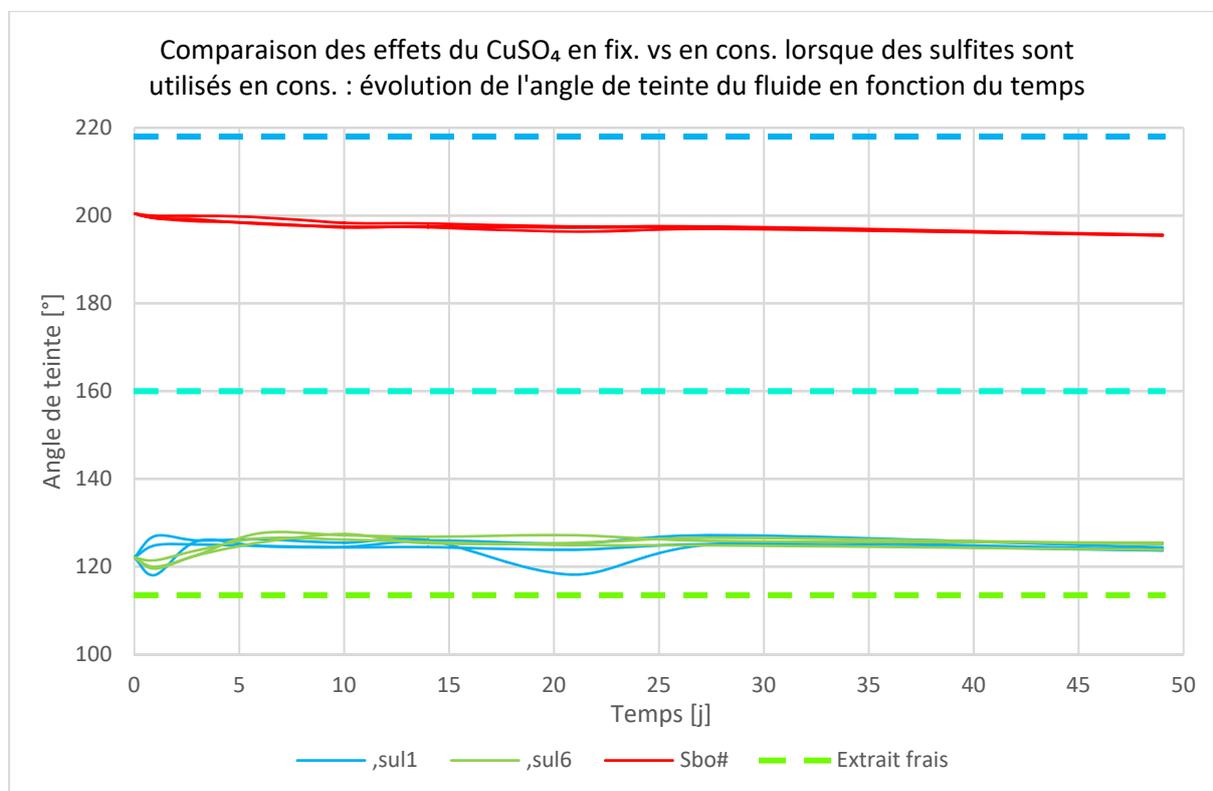
Grappe 17 : évolution de la teinte du fluide des triplicats préparé par un vide d'air au début de la « fixation » (Ø) et par une immersion préalable dans l'EtOH 95% (E95) comparé au témoin également « fixé » au CuSO<sub>4</sub> durant 3j et dont le fluide de conservation (EtOH 70%) a aussi été renouvelé après 10j (Wcus3j).



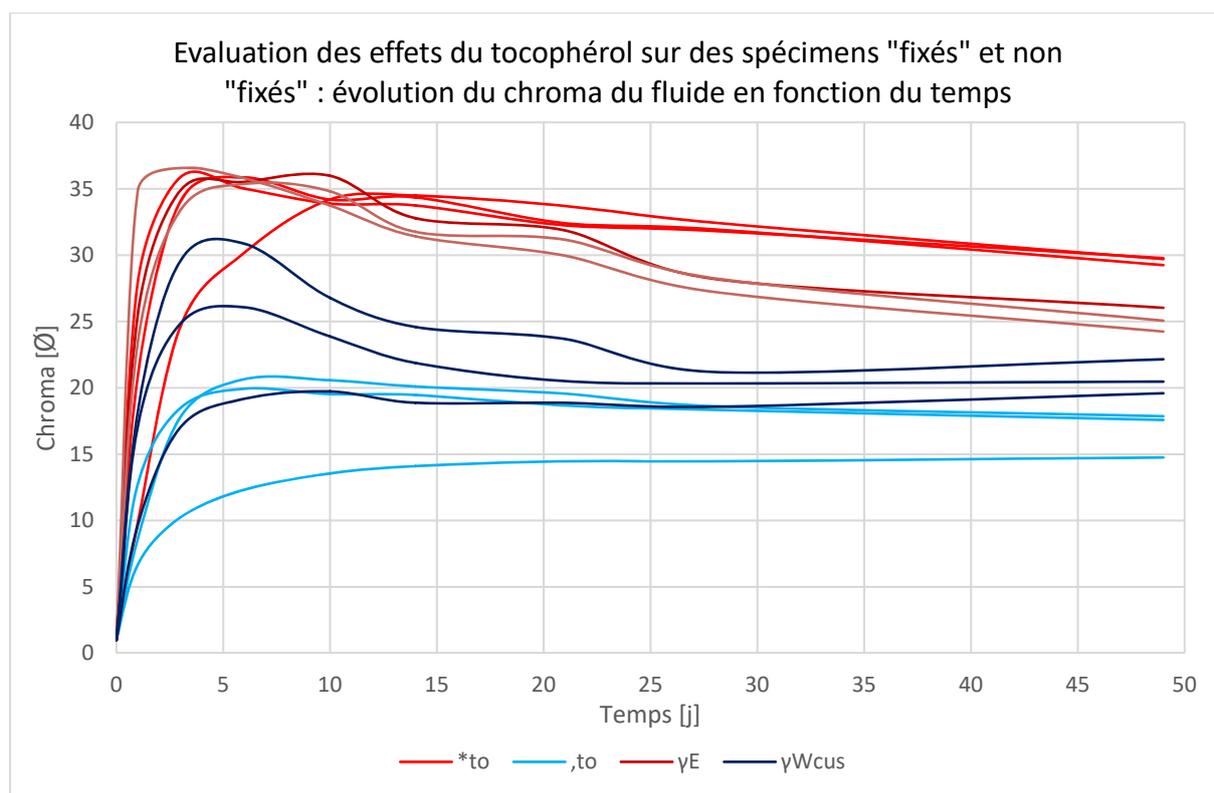
Grappe 18 : évolution du chroma du fluide des triplicats dont le fluide de « fixation » contenait du SO<sub>2</sub> puis ont été conservés en EtOH 70% (S5 et S0.5) et de ceux dont le fluide de conservation était une solution aqueuse de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (,sul1 et ,sul6). Ils sont comparés respectivement aux témoins « fixés » puis conservés dans l'EtOH 70% (Wcus3j) et « fixés » puis conservés dans l'eau (,W).



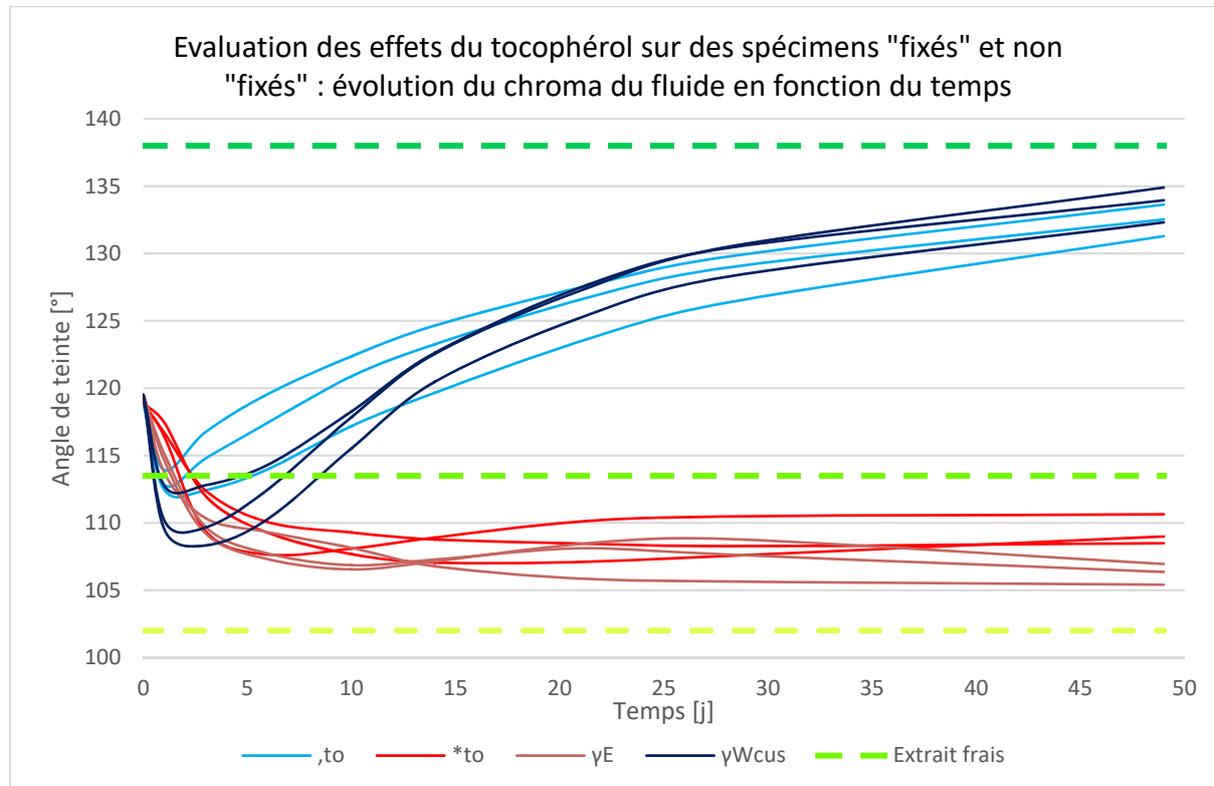
Graphe 19 : évolution du chroma du fluide des triplicats préparés selon « Scully B » et « Scully A » : dans les deux cas le fluide de cons. contient du  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  mais dans le premier (,sul1 et ,sul6) une fix. préalable au  $\text{CuSO}_4$  a été réalisée alors que dans le second le sel de Cu est présent dans le seul et unique fluide de cons. (Sbo#). Le chroma est initialement plus élevé pour ce dernier car le sel donne une couleur bleue, mais il est autant stable dans le temps.



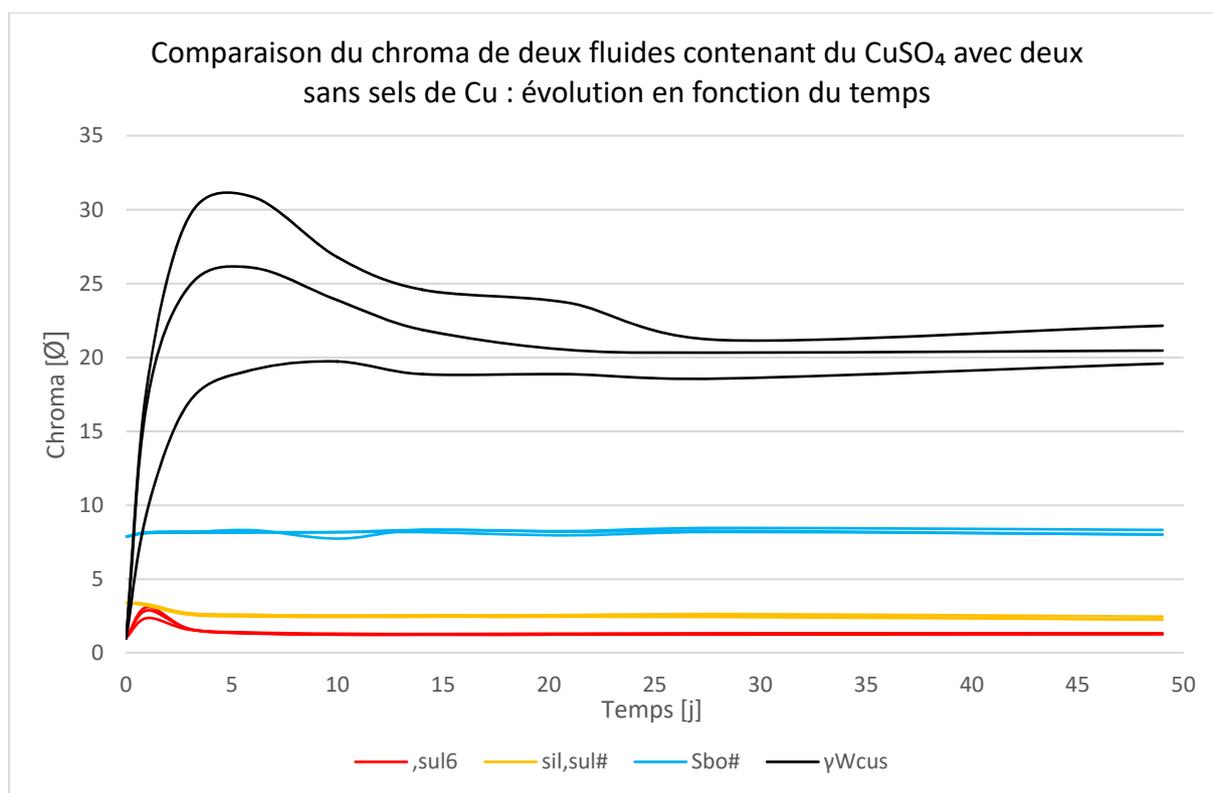
Graphe 20 : évolution de la teinte du fluide des triplicats préparés selon « Scully B » et « Scully A » (voir légende du graphe précédent) avec teintes indicatives à 220°, 160° et 119.5° (cette dernière correspondant à l'extrait frais).



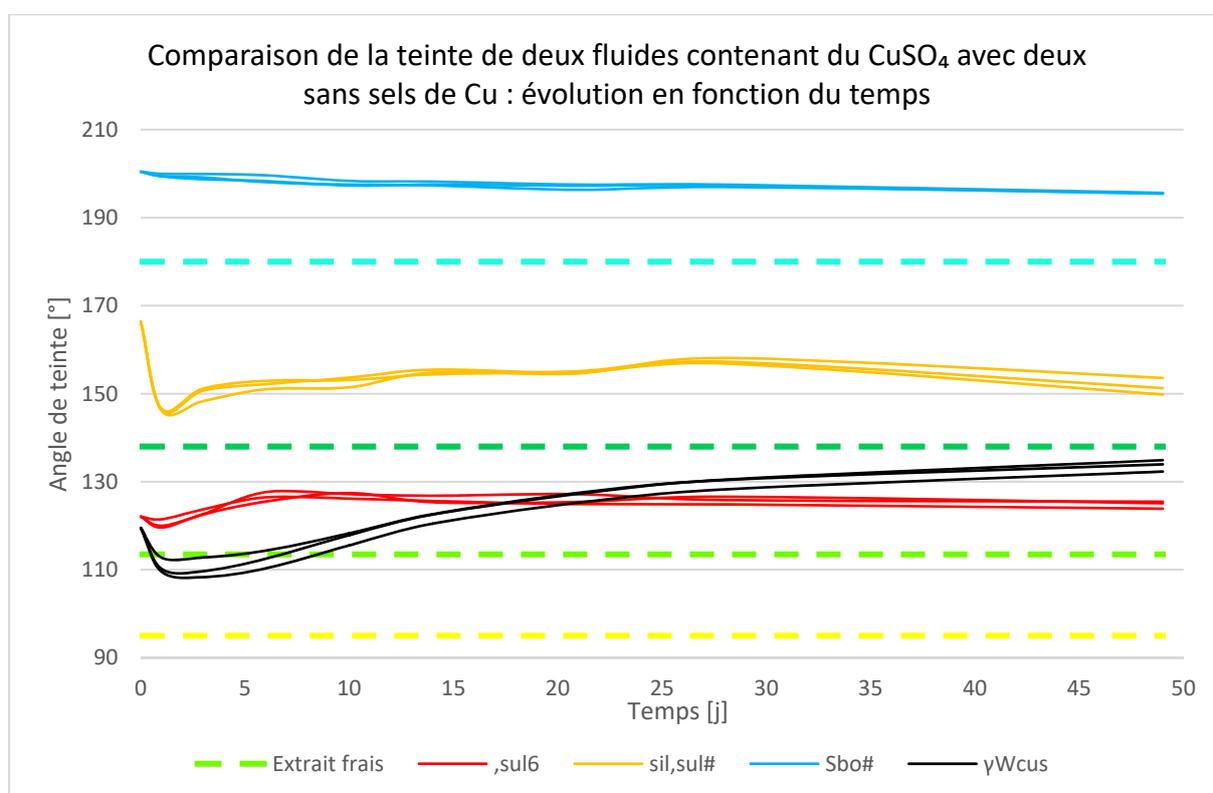
Graph 21 : évolution du chroma du fluide des triplicat dont le fluide de cons. était de l'EtOH 70% avec 0.1g/L de tocophérol, et qui étaient préalablement « fixés » (,to) ou non (\*to) au  $CuSO_4$ . Ils sont comparés aux témoins sans tocophérol, également « fixé » (γWcus) ou non (γE). Un quelconque effet positif du tocophérol contre la migration des pigments n'est pas perceptible.



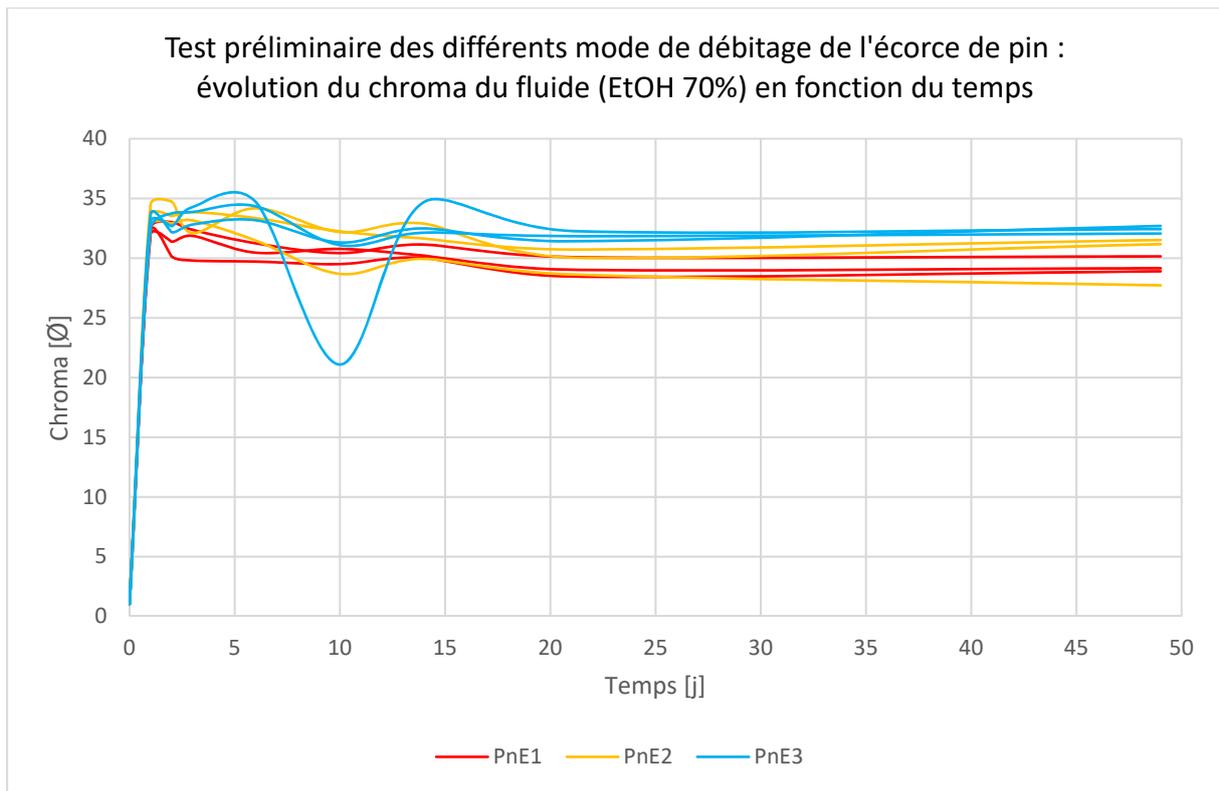
Graph 22 : évolution de la teinte du fluide des triplicat dont le fluide de cons. était de l'EtOH 70% avec 0.1g/L de tocophérol, et qui étaient préalablement « fixés » (,to) ou non (\*to) au  $CuSO_4$ . Ils sont comparés aux témoins sans tocophérol, également « fixé » (γWcus) ou non (γE). Un quelconque effet positif du tocophérol contre la dégradation des pigments n'est pas perceptible.



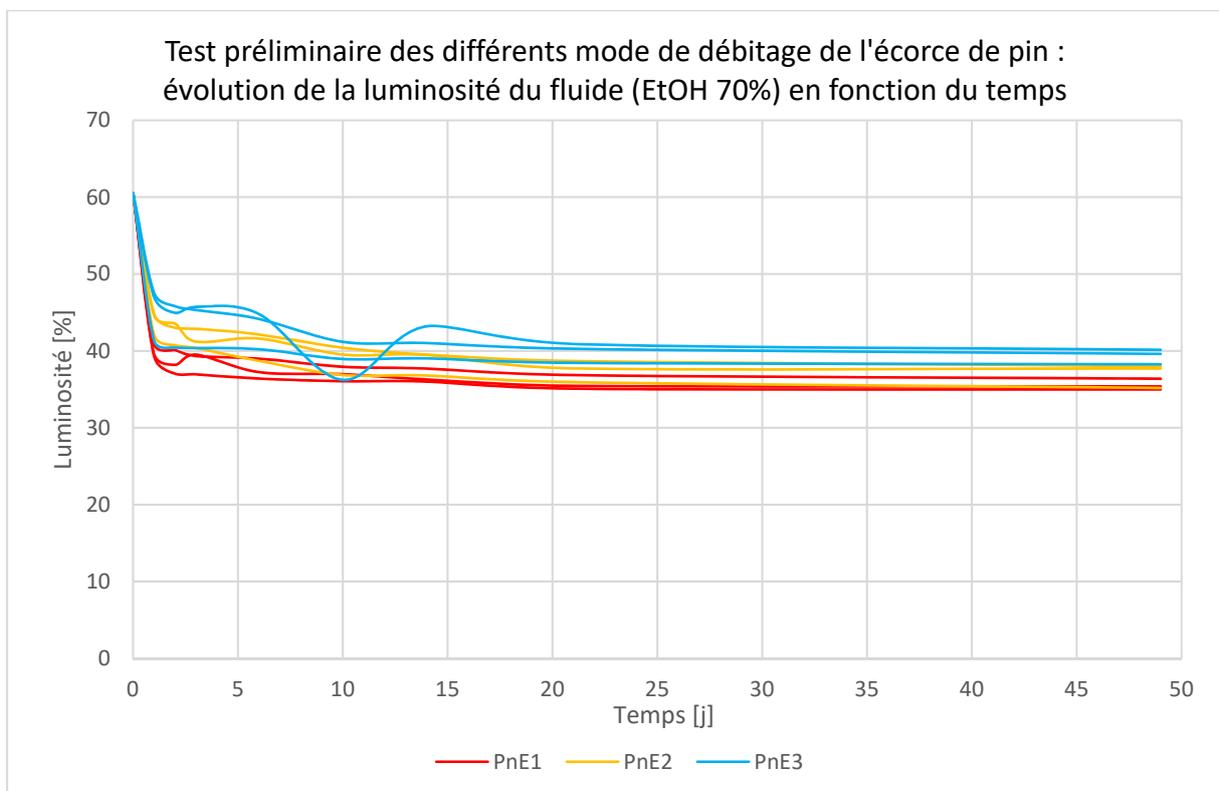
Graphe 23 : évolution du chroma de fluides contenant du  $\text{CuSO}_4$  (sil,sul# et Sbo#) comparé à une recette sans sel de Cu mais contenant aussi des sulfites (,sul6) et à un témoin dans l'EtOH 70% ( $\gamma\text{Wcus}$ ).



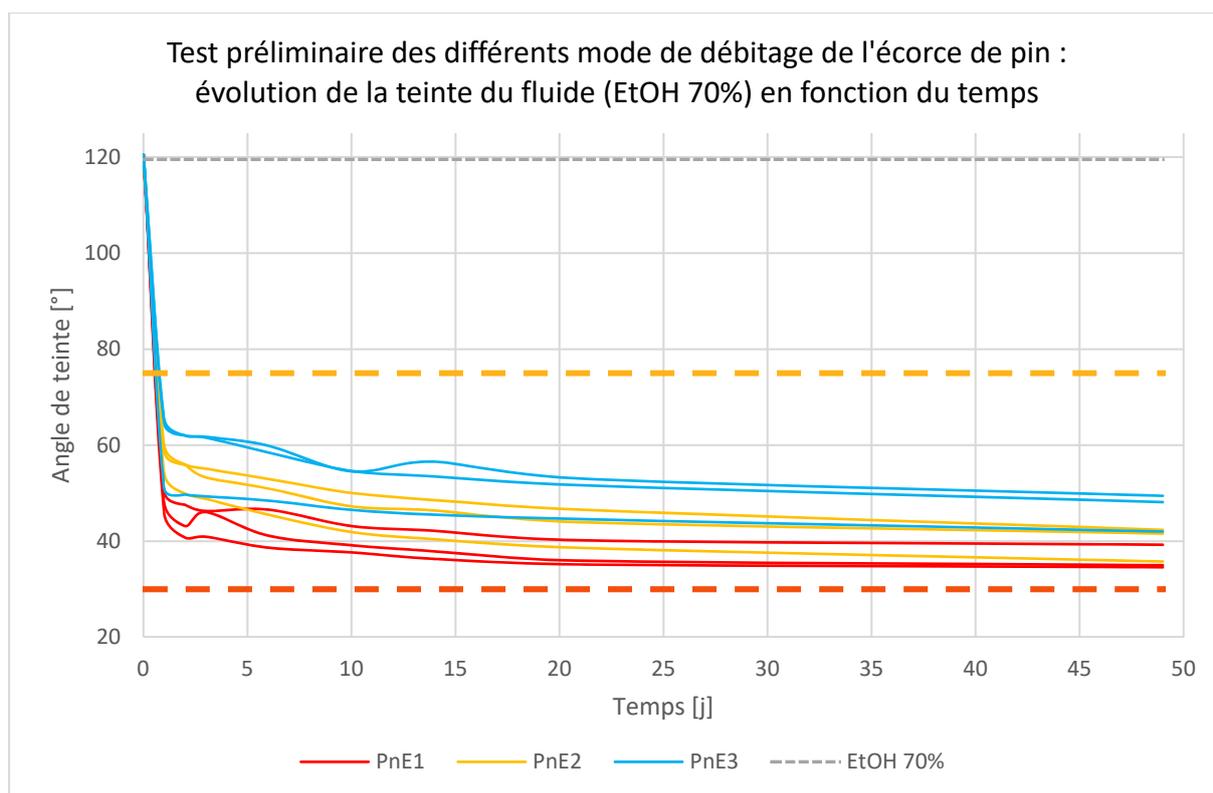
Graphe 24 : évolution de la teinte de fluides contenant du  $\text{CuSO}_4$  (sil,sul# et Sbo#) comparé à une recette sans sel de Cu mais contenant aussi des sulfites (,sul6) et à un témoin dans l'EtOH 70% ( $\gamma\text{Wcus}$ ). Teintes indicatives à  $180^\circ$ ,  $138^\circ$ ,  $113.5^\circ$  et  $95^\circ$  (l'avant-dernière correspondant à l'extrait frais).



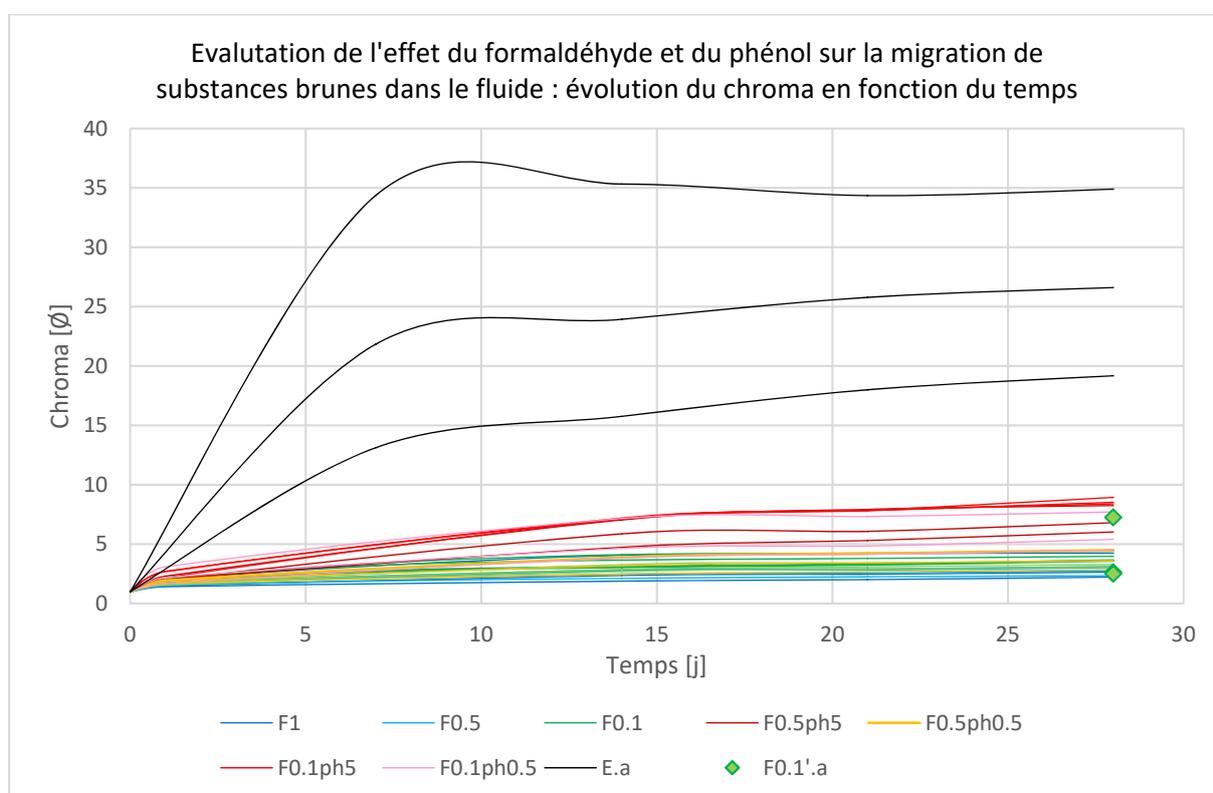
Graphe 25 : évolution du chroma du fluide des 3 triplicats d'écorce de pin, débités selon des modes différents. Le pic inversé à 10j est dû à une erreur de mesure.



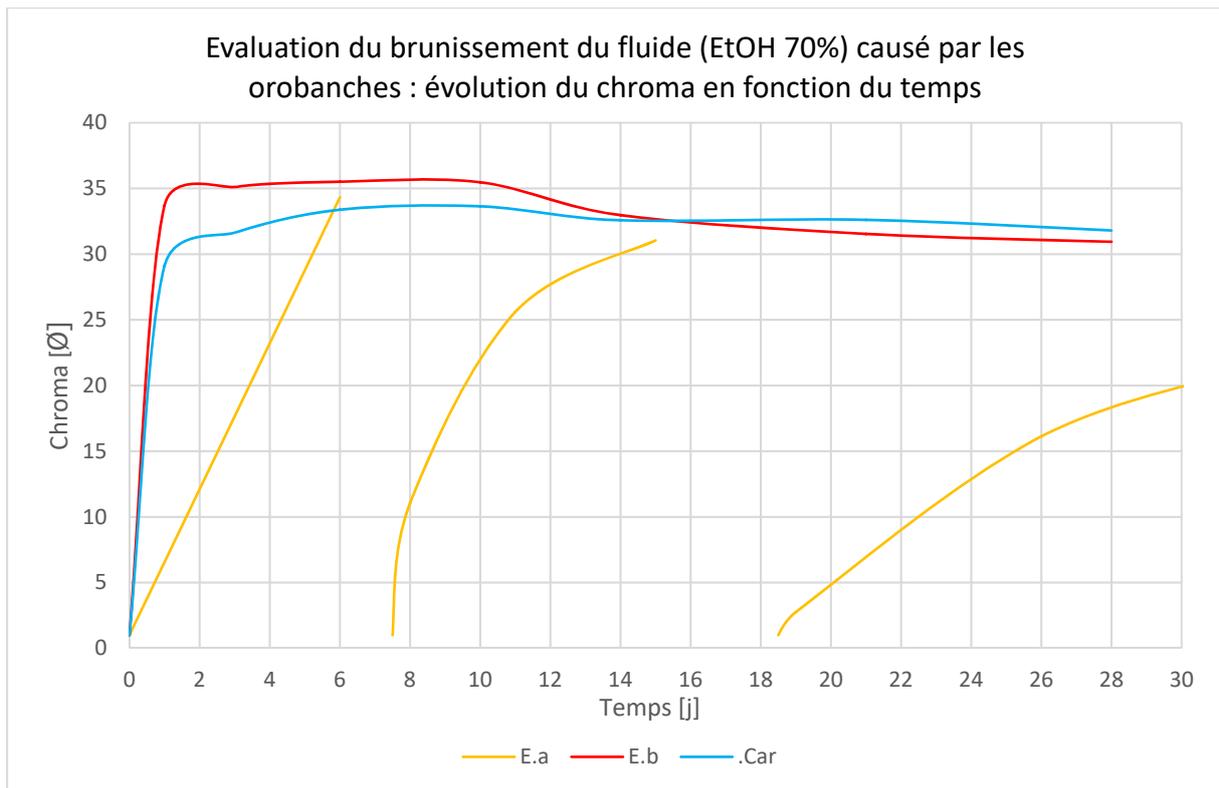
Graphe 26 : évolution de la luminosité du fluide des 3 triplicats d'écorce de pin, débités selon des modes différents.



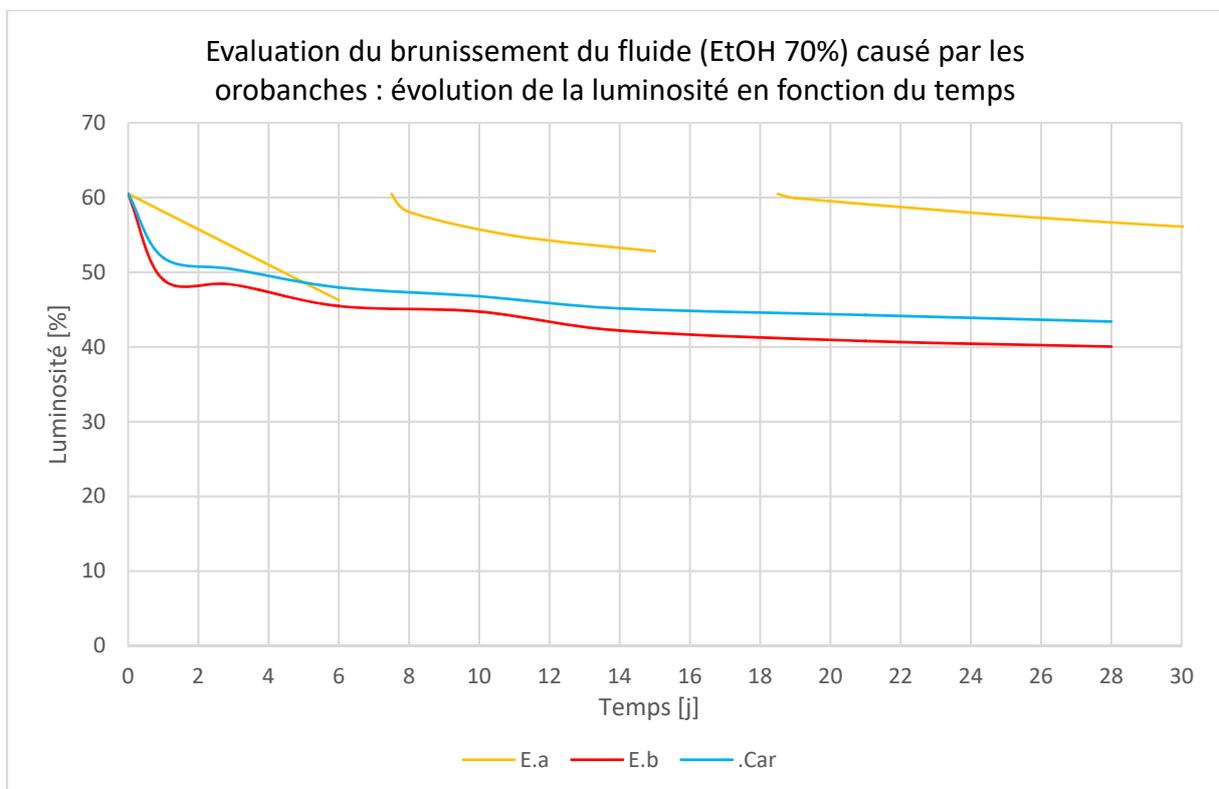
Graphe 27 : évolution de la teinte du fluide des 3 triplicats d'écorce de pin, débités selon des modes différents. Teintes indicatives à 75° et 30°.



Graphe 28 : évolution du chroma du fluide des tests visant à provoquer une polymérisation des tannins dans l'écorce de pin. Les 3 fixés uniquement au formaldéhyde n'ont eu pratiquement aucune migration, alors que le chroma de ceux contenant du phénol a légèrement augmenté, environ proportionnellement à la concentration en phénol.

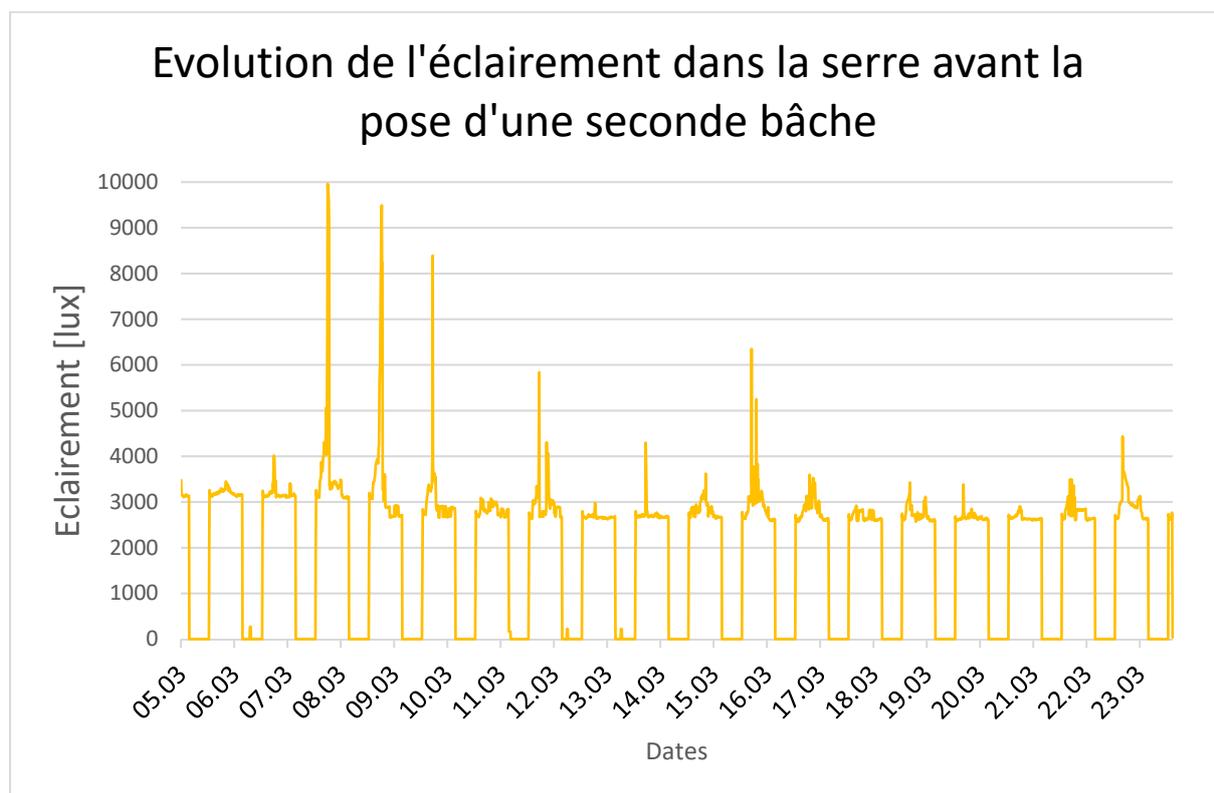


Graphe 29 : évolution du chroma du fluide des orobanches conservées en alcool. Le fluide du spécimen E.a a été renouvelé après une semaine puis 18j.

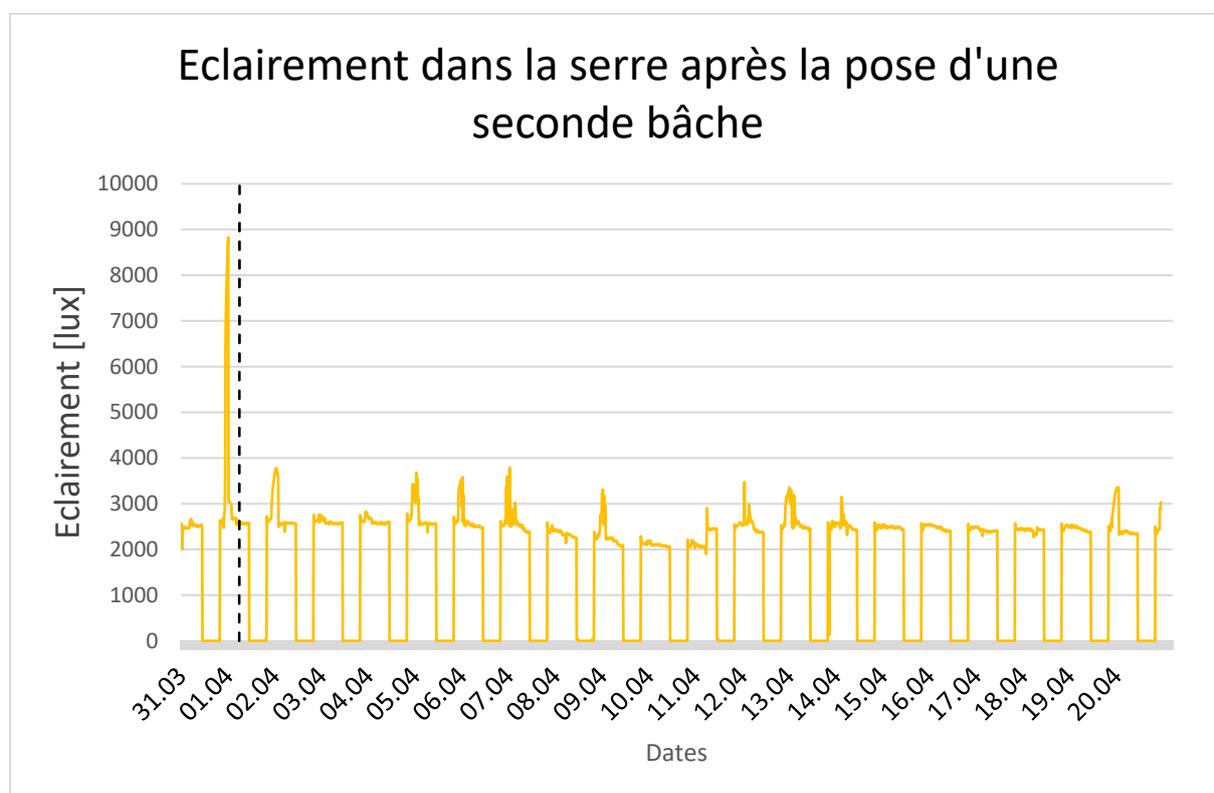


Graphe 30 : évolution de la luminosité du fluide des orobanches conservées en alcool.

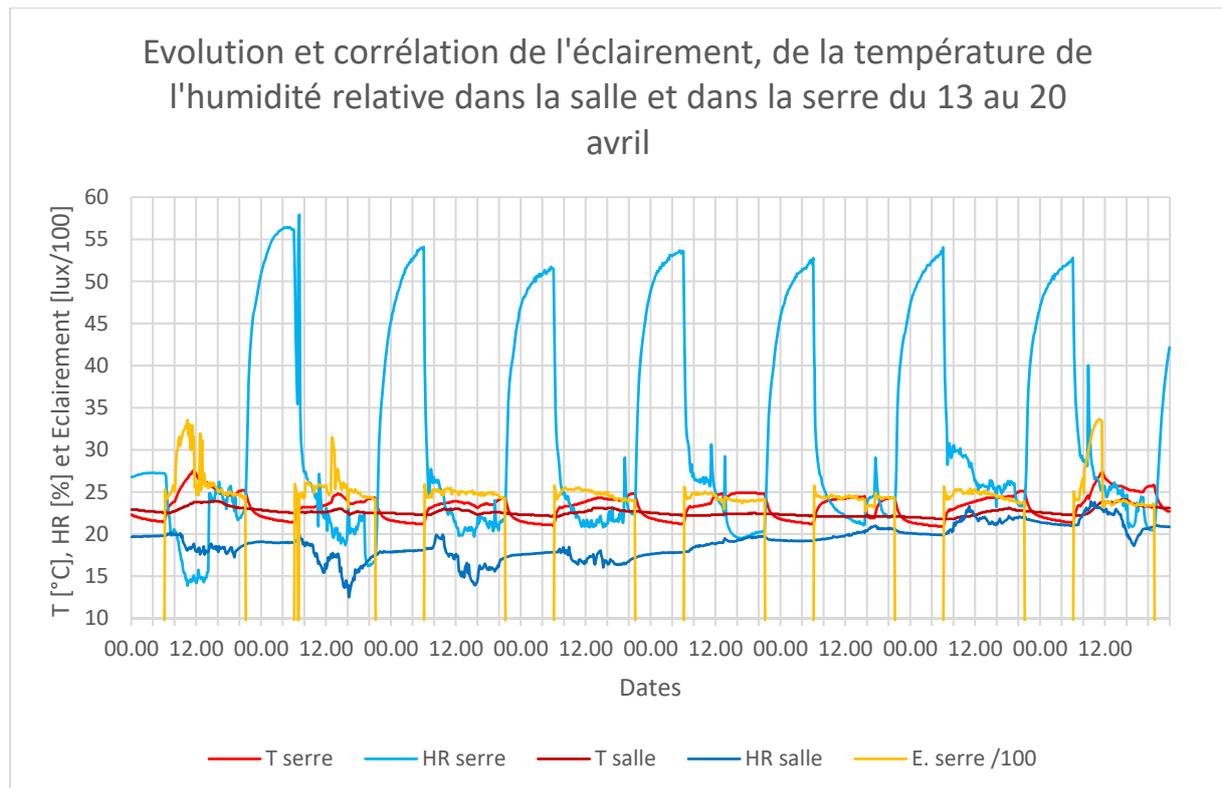
## Annexe IV – Graphes climatiques



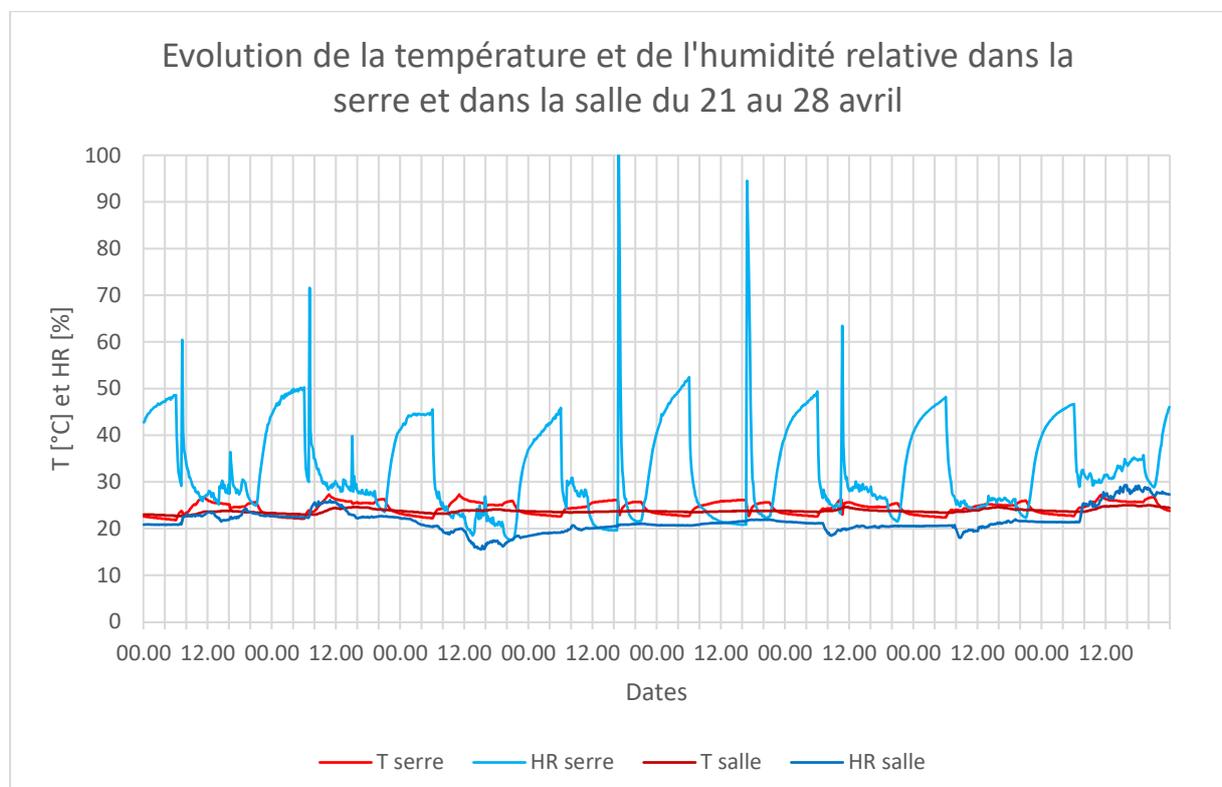
Graphe 31 : l'influence du soleil et de l'éclairage artificiel sur l'éclairement à l'intérieur de la serre a été diminuée par la pose d'une double couche de mousse PE directement autour de la serre et d'une bâche translucide sur la fenêtre et sur la serre du côté salle. L'éclairement direct du soleil le matin parvenait néanmoins à plus que doubler la valeur à l'intérieur de la serre, les jours de beau temps.



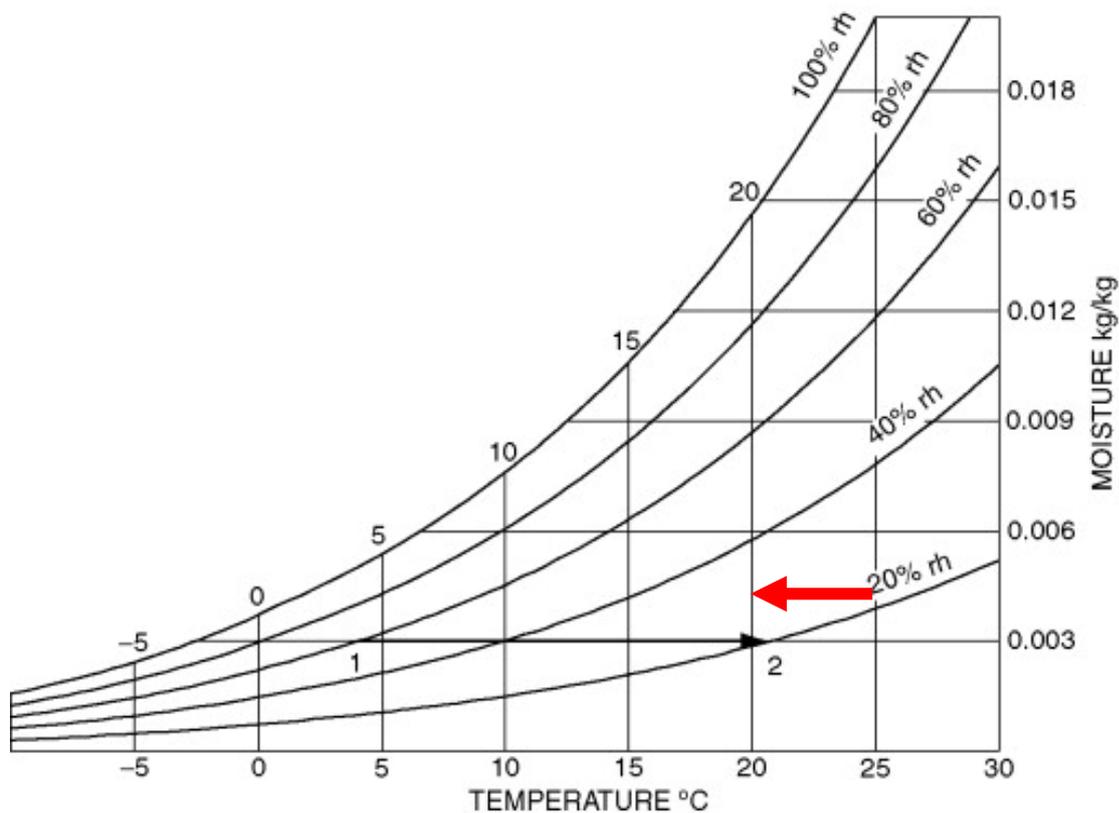
Graphe 32 : l'influence de l'éclairement direct du soleil a été nettement réduite après la pose d'une seconde bâche plus opaque que la première, le 1<sup>er</sup> avril – soit lors du démarrage des plantations utilisées pour les tests de recettes.



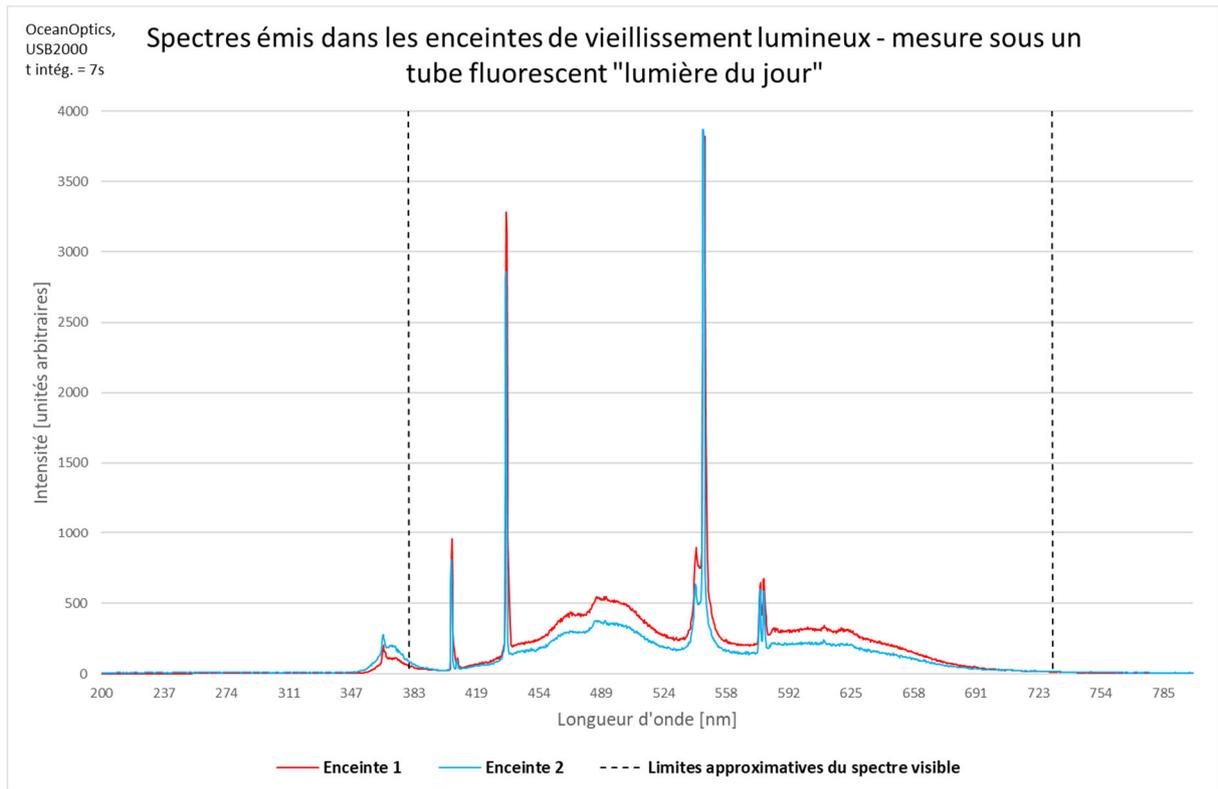
Graphe 33 : les variations de température et d'humidité relative dans la serre sont bien évidemment influencées par celles de la salle, mais l'influence du cycle jour-nuit de l'éclairage est nette, causant une chute de température de quelques degrés et une augmentation de l'humidité relative d'environ 30%. Cette dernière est trop importante pour être due uniquement à la variation de température (voir Graphe 34 et Graphe 35 ci-dessous) : la respiration des plantes est probablement responsable du reste.



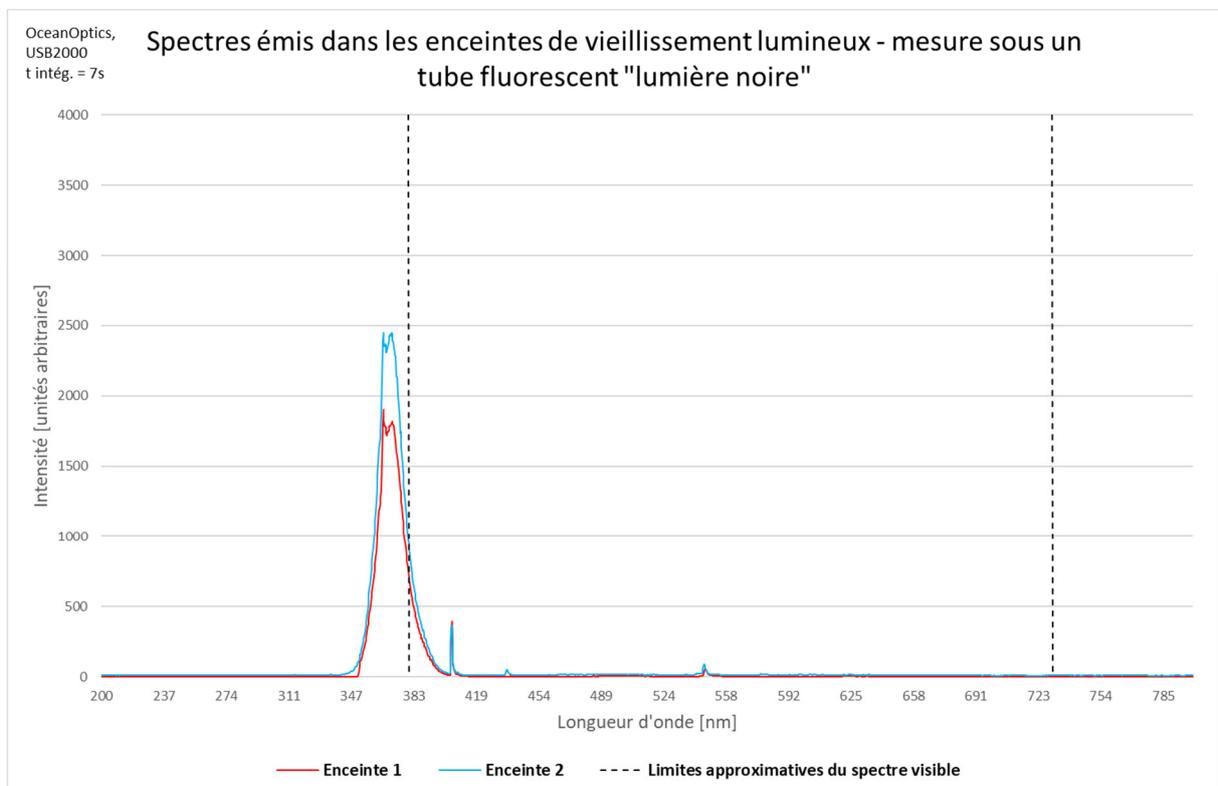
Graphe 34 : exemples de pics inhabituels (hors variation jour-nuit) d'humidité relative. Les pics matinaux succédant à la chute normale de l'humidité relative sont peut-être dus à une aération de la salle. Ceux de l'après-midi, excédant parfois les 100%, sont dus à l'arrosage.



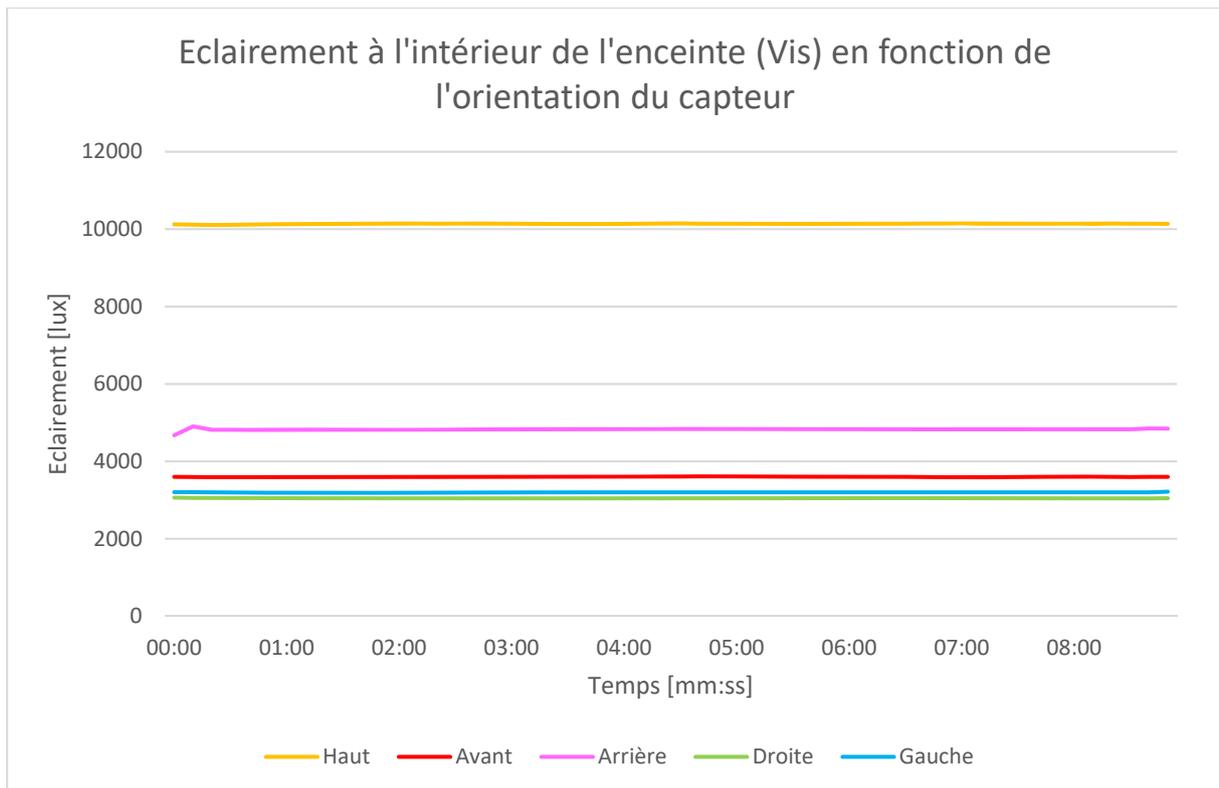
Graph 35 : ce diagramme psychrométrique (relation entre température, rapport de mélange eau/air et humidité relative) montre clairement que pour une baisse de 5°C environ, l'augmentation de l'humidité relative à partir de 20% (ou même 40%) devrait être inférieure à 10% - sans apport d'eau supplémentaire. Modèle de base : ©Montgomery & McDowall, 2008.



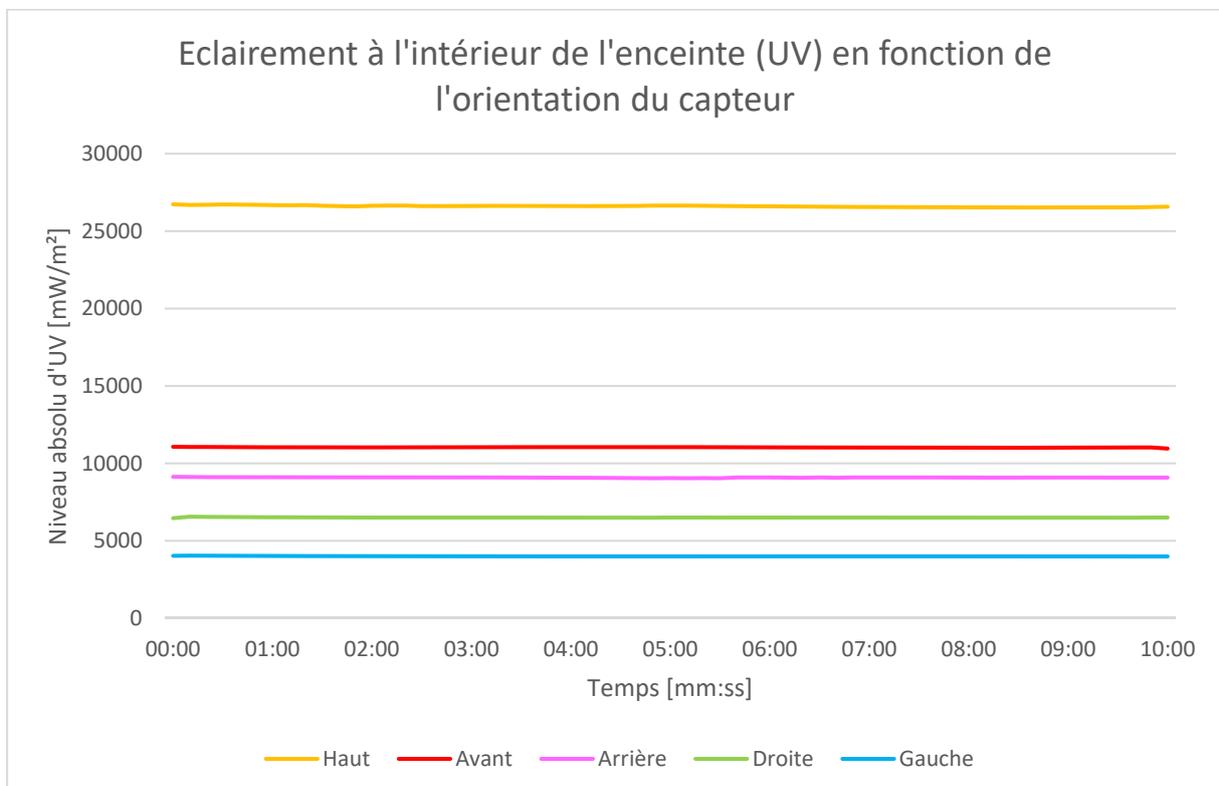
Graph 36 : mesure du spectre émis par un tube fluorescent Osram Biolux L 18W/965, situé essentiellement dans le domaine visible par l'œil humain.



Graph 37 : mesure du spectre émis par un tube fluorescent Philips TL-D 18W BLB, le pic principal se trouvant dans les UV proches (ou UV-A).



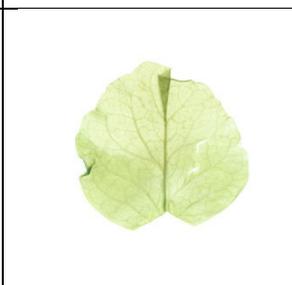
Graph 38 : mesure de l'éclairage subi dans l'enceinte « lumière visible » selon différentes orientations du capteur. Les valeurs diminuées environ de moitié sont dues à un changement d'angle de  $90^\circ$  du capteur (vertical au lieu d'horizontal pour la mesure « Haut »), ce qui correspond au changement de l'angle d'incidence majoritaire ( $\sim 60^\circ$ ,  $\cos\theta = 0.5$ ).

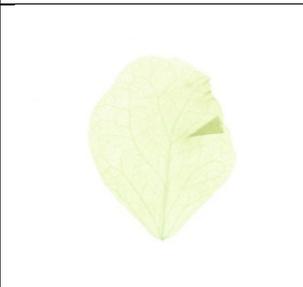
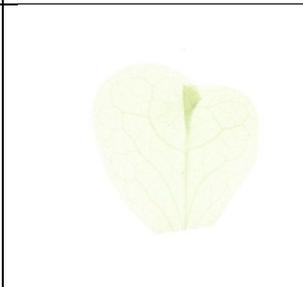
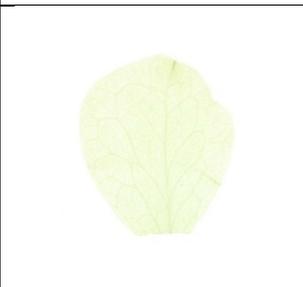
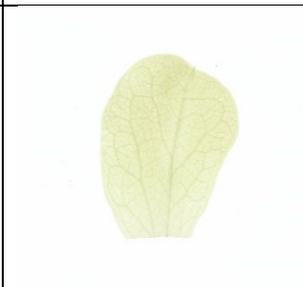
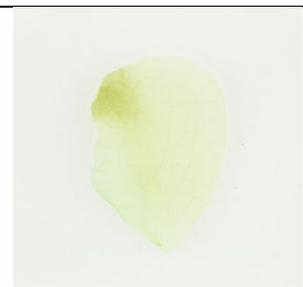
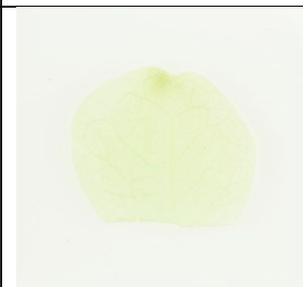
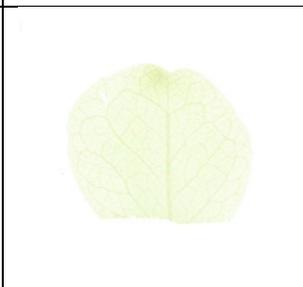


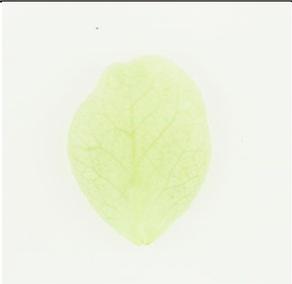
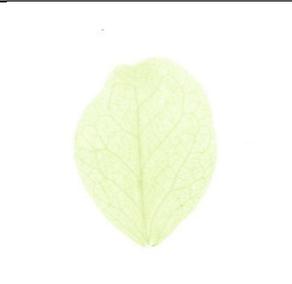
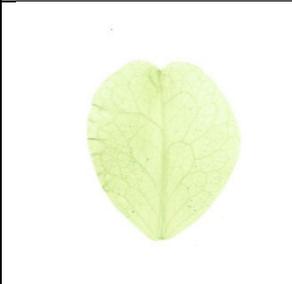
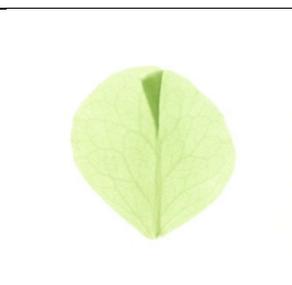
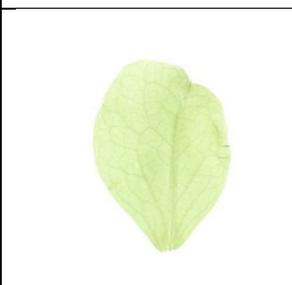
Graph 39 : mesure du niveau absolu d'UV au sol de l'enceinte « UV » selon différentes orientations du capteur. Là aussi les valeurs sont divisées environ par 2 lors du passage à la verticale par rapport au plafond de l'enceinte.

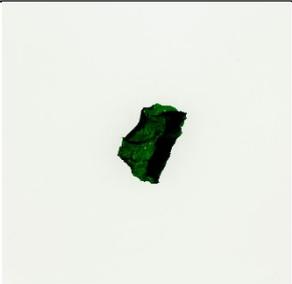
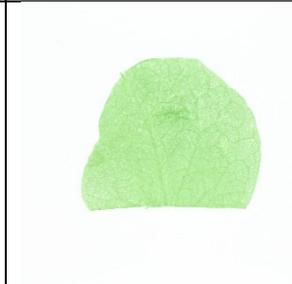
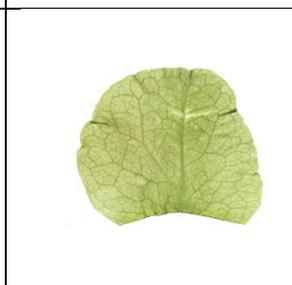
## Annexe V – Photographies des échantillons

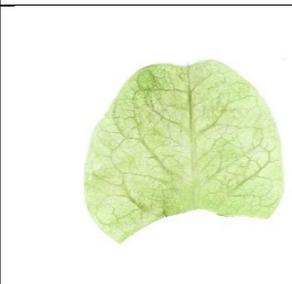
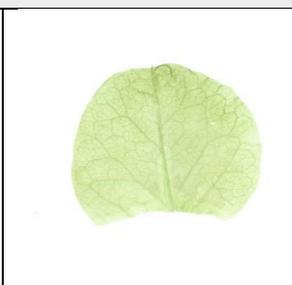
| Folioles de petits pois   |   |  |   |
|---|---|--|---|
| Dessus  | Dessous   | Dessus   | Dessous   |
|    |    |    |    |
| <i>Fig. 108 : foliole fraîche</i>   | <i>Fig. 109 : foliole fraîche</i>   | <i>Fig. 110 : foliole fraîche</i>  | <i>Fig. 111 : foliole fraîche</i>   |
| Réflexion   | Transmission  | Réflexion  | Transmission  |
|   |   |   |   |
| <i>Fig. 112 : foliole fraîche</i>   | <i>Fig. 113 : foliole fraîche</i>   | <i>Fig. 114 : foliole fraîche</i>  | <i>Fig. 115 : foliole fraîche</i>   |
|  |  |  |  |
| <i>Fig. 116 : Wcus.a</i>  | <i>Fig. 117 : Wcus.a</i>  | <i>Fig. 118 : Wcus.b</i>   | <i>Fig. 119 : Wcus.b</i>  |
|  |  |  |  |
| <i>Fig. 120 : Wcus.c</i>  | <i>Fig. 121 : Wcus.c</i>  | <i>Fig. 122 : Wcus'.a</i>  | <i>Fig. 123 : Wcus'.a</i>   |

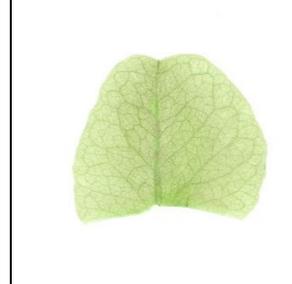
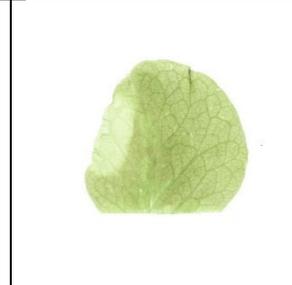
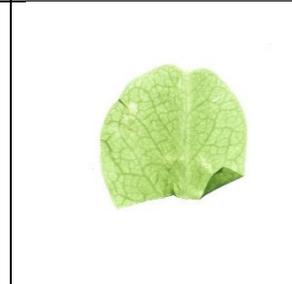
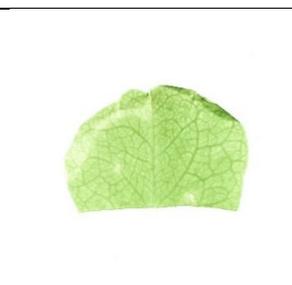
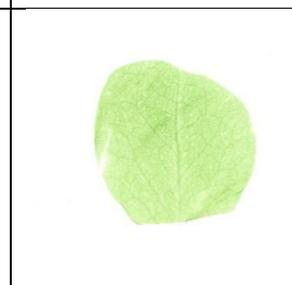
| Réflexion  | Transmission   | Réflexion   | Transmission   |
|--|--|---|--|
| <br><i>Fig. 124 : Wcus'.b</i>   | <br><i>Fig. 125 : Wcus'.b</i>   | <br><i>Fig. 126 : Wcus'.c</i>   | <br><i>Fig. 127 : Wcus'.c</i>   |
| <br><i>Fig. 128 : Wcua.a</i>    | <br><i>Fig. 129 : Wcua.a</i>    | <br><i>Fig. 130 : Wcua.b</i>    | <br><i>Fig. 131 : Wcua.b</i>    |
| <br><i>Fig. 132 : Wcua.c</i>   | <br><i>Fig. 133 : Wcua.c</i>   | <br><i>Fig. 134 : Wcua'.a</i>  | <br><i>Fig. 135 : Wcua'.a</i>  |
| <br><i>Fig. 136 : Wcua'.b</i> | <br><i>Fig. 137 : Wcua'.b</i> | <br><i>Fig. 138 : Wcua'.c</i> | <br><i>Fig. 139 : Wcua'.c</i> |
| <br><i>Fig. 140 : Wcuc.a</i>  | <br><i>Fig. 141 : Wcuc.a</i>  | <br><i>Fig. 142 : Wcuc.b</i>  | <br><i>Fig. 143 : Wcuc.b</i>  |

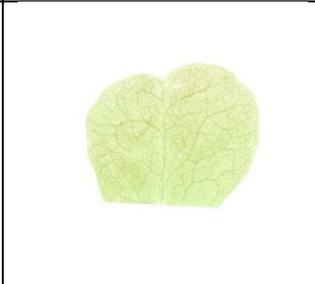
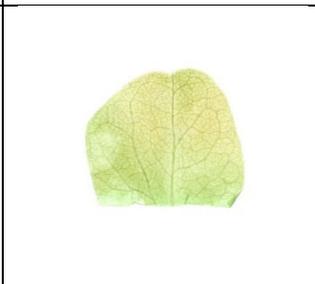
| Réflexion  | Transmission   | Réflexion   | Transmission   |
|--|--|---|--|
| <br><i>Fig. 144 : Wcuc.c</i>    | <br><i>Fig. 145 : Wcuc.c</i>    | <br><i>Fig. 146 : Wcuc'.a</i>   | <br><i>Fig. 147 : Wcuc'.a</i>   |
| <br><i>Fig. 148 : Wcuc'.b</i>   | <br><i>Fig. 149 : Wcuc'.b</i>   | <br><i>Fig. 150 : Wcuc'.c</i>   | <br><i>Fig. 151 : Wcuc'.c</i>   |
| <br><i>Fig. 152 : Acus.a</i>   | <br><i>Fig. 153 : Acus.a</i>   | <br><i>Fig. 154 : Acus.b</i>   | <br><i>Fig. 155 : Acus.b</i>   |
| <br><i>Fig. 156 : Acus.c</i>  | <br><i>Fig. 157 : Acus.c</i>  | <br><i>Fig. 158 : Acus'.a</i> | <br><i>Fig. 159 : Acus'.a</i> |
| <br><i>Fig. 160 : Acus'.b</i> | <br><i>Fig. 161 : Acus'.b</i> | <br><i>Fig. 162 : Acus'.c</i> | <br><i>Fig. 163 : Acus'.c</i> |

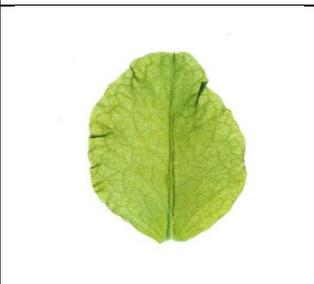
| Réflexion   | Transmission  | Réflexion   | Transmission   |
|---|---|---|--|
| <br><i>Fig. 164 : Acua.a</i>   | <br><i>Fig. 165 : Acua.a</i>   | <br><i>Fig. 166 : Acua.b</i>    | <br><i>Fig. 167 : Acua.b</i>    |
| <br><i>Fig. 168 : Acua.c</i>   | <br><i>Fig. 169 : Acua.c</i>   | <br><i>Fig. 170 : Acua'.a</i>   | <br><i>Fig. 171 : Acua'.a</i>   |
| <br><i>Fig. 172 : Acua'.b</i> | <br><i>Fig. 173 : Acua'.b</i> | <br><i>Fig. 174 : Acua'.c</i>  | <br><i>Fig. 175 : Acua'.c</i>  |
| <br><i>Fig. 176 : Acuc.a</i> | <br><i>Fig. 177 : Acuc.a</i> | <br><i>Fig. 178 : Acuc.b</i>  | <br><i>Fig. 179 : Acuc.b</i>  |
| <br><i>Fig. 180 : Acuc.c</i> | <br><i>Fig. 181 : Acuc.c</i> | <br><i>Fig. 182 : Acuc'.a</i> | <br><i>Fig. 183 : Acuc'.a</i> |

| Réflexion  | Transmission   | Réflexion   | Transmission   |
|--|--|---|--|
| <br><i>Fig. 184 : Acuc'.b</i>   | <br><i>Fig. 185 : Acuc'.b</i>   | <br><i>Fig. 186 : Acuc'.c</i>   | <br><i>Fig. 187 : Acuc'.c</i>   |
| <br><i>Fig. 188 : Wcua°.a</i>   | <br><i>Fig. 189 : Wcua°.a</i>   | <br><i>Fig. 190 : Wcua°.b</i>   | <br><i>Fig. 191 : Wcua°.b</i>   |
| <br><i>Fig. 192 : Wcua°.c</i>  | <br><i>Fig. 193 : Wcua°.c</i>  | <br><i>Fig. 194 : Wcua°.a</i>  | <br><i>Fig. 195 : Wcua°.a</i>  |
| <br><i>Fig. 196 : Wcua°.b</i> | <br><i>Fig. 197 : Wcua°.b</i> | <br><i>Fig. 198 : Wcua°.c</i> | <br><i>Fig. 199 : Wcua°.c</i> |
| <br><i>Fig. 200 : Wcua#.a</i> | <br><i>Fig. 201 : Wcua#.a</i> | <br><i>Fig. 202 : Wcua#.b</i> | <br><i>Fig. 203 : Wcua#.b</i> |

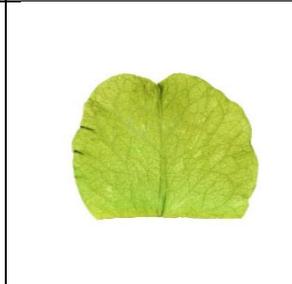
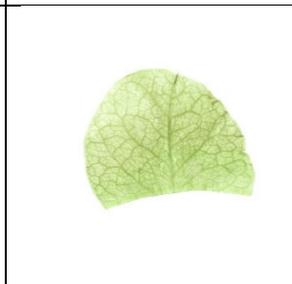
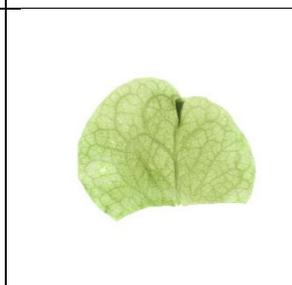
| Réflexion   | Transmission  | Réflexion  | Transmission  |
|---|---|--|---|
| <br><i>Fig. 204 : Wcua#.c</i>  | <br><i>Fig. 205 : Wcua#.c</i>  | <br><i>Fig. 206 : Wcua#!.a</i> | <br><i>Fig. 207 : Wcua#!.a</i> |
| <br><i>Fig. 208 : Wcua#!.b</i> | <br><i>Fig. 209 : Wcua#!.b</i> | <br><i>Fig. 210 : Wcua#!.c</i> | <br><i>Fig. 211 : Wcua#!.c</i> |
| <br><i>Fig. 212 : Ø.a</i>     | <br><i>Fig. 213 : Ø.a</i>     | <br><i>Fig. 214 : Ø.b</i>     | <br><i>Fig. 215 : Ø.b</i>     |
| <br><i>Fig. 216 : Ø.c</i>    | <br><i>Fig. 217 : Ø.c</i>    |  |   |
| <br><i>Fig. 218 : E95.a</i>  | <br><i>Fig. 219 : E95.a</i>  | <br><i>Fig. 220 : E95.b</i>  | <br><i>Fig. 221 : E95.b</i>  |

| Réflexion  | Transmission   | Réflexion   | Transmission   |
|--|--|---|--|
| <br><i>Fig. 222 : E95.c</i>   | <br><i>Fig. 223 : E95.c</i>   | <br><i>Fig. 224 : E95'.a</i>  | <br><i>Fig. 225 : E95'.a</i>  |
| <br><i>Fig. 226 : E95'.b</i>  | <br><i>Fig. 227 : E95'.b</i>  | <br><i>Fig. 228 : E95'.c</i>  | <br><i>Fig. 229 : E95'.c</i>  |
| <br><i>Fig. 230 : S5.a</i>   | <br><i>Fig. 231 : S5.a</i>   | <br><i>Fig. 232 : S5.b</i>   | <br><i>Fig. 233 : S5.b</i>   |
| <br><i>Fig. 234 : S5.c</i>  | <br><i>Fig. 235 : S5.c</i>  | <br><i>Fig. 236 : S5'.a</i> | <br><i>Fig. 237 : S5'.a</i> |
| <br><i>Fig. 238 : S5'.b</i> | <br><i>Fig. 239 : S5'.b</i> | <br><i>Fig. 240 : S5'.c</i> | <br><i>Fig. 241 : S5'.c</i> |

| Réflexion  | Transmission   | Réflexion  | Transmission  |
|--|--|--|---|
| <br><i>Fig. 242 : S0.5.a</i>    | <br><i>Fig. 243 : S0.5.a</i>    | <br><i>Fig. 244 : S0.5.b</i>     | <br><i>Fig. 245 : S0.5.b</i>     |
| <br><i>Fig. 246 : S0.5.c</i>    | <br><i>Fig. 247 : S0.5.c</i>    | <br><i>Fig. 248 : S0.5'.a</i>    | <br><i>Fig. 249 : S0.5'.a</i>    |
| <br><i>Fig. 250 : S0.5'.b</i>  | <br><i>Fig. 251 : S0.5'.b</i>  | <br><i>Fig. 252 : S0.5'.c</i>   | <br><i>Fig. 253 : S0.5'.c</i>   |
| <br><i>Fig. 254 : Gphla.a</i> | <br><i>Fig. 255 : Gphla.a</i> | <br><i>Fig. 256 : Gphla.b</i>  | <br><i>Fig. 257 : Gphla.b</i>  |
| <br><i>Fig. 258 : Gphla.c</i> | <br><i>Fig. 259 : Gphla.c</i> | <br><i>Fig. 260 : Gphla'.a</i> | <br><i>Fig. 261 : Gphla'.a</i> |

| Réflexion   | Transmission  | Réflexion  | Transmission  |
|---|---|--|---|
| <br><i>Fig. 262 : Gphla'.b</i>   | <br><i>Fig. 263 : Gphla'.b</i>   | <br><i>Fig. 264 : Gphla'.c</i>   | <br><i>Fig. 265 : Gphla'.c</i>   |
| <br><i>Fig. 266 : ,sul1.a</i>    | <br><i>Fig. 267 : ,sul1.a</i>    | <br><i>Fig. 268 : ,sul1.b</i>    | <br><i>Fig. 269 : ,sul1.b</i>    |
| <br><i>Fig. 270 : ,sul1.c</i>   | <br><i>Fig. 271 : ,sul1.c</i>   | <br><i>Fig. 272 : ,sul1'.a</i>  | <br><i>Fig. 273 : ,sul1'.a</i>  |
| <br><i>Fig. 274 : ,sul1'.b</i> | <br><i>Fig. 275 : ,sul1'.b</i> | <br><i>Fig. 276 : ,sul1'.c</i> | <br><i>Fig. 277 : ,sul1'.c</i> |
| <br><i>Fig. 278 : ,sul6.a</i>  | <br><i>Fig. 279 : ,sul6.a</i>  | <br><i>Fig. 280 : ,sul6.b</i>  | <br><i>Fig. 281 : ,sul6.b</i>  |

| Réflexion  | Transmission   | Réflexion   | Transmission   |
|--|--|---|--|
| <br><i>Fig. 282 : ,sul6.c</i>       | <br><i>Fig. 283 : ,sul6.c</i>       | <br><i>Fig. 284 : ,sul6'.a</i>      | <br><i>Fig. 285 : ,sul6'.a</i>      |
| <br><i>Fig. 286 : ,sul6'.b</i>      | <br><i>Fig. 287 : ,sul6'.b</i>      | <br><i>Fig. 288 : ,sul6'.c</i>      | <br><i>Fig. 289 : ,sul6'.c</i>      |
| <br><i>Fig. 290 : sil,sul#.a</i>  | <br><i>Fig. 291 : sil,sul#.a</i>  | <br><i>Fig. 292 : sil,sul#.b</i>  | <br><i>Fig. 293 : sil,sul#.b</i>  |
| <br><i>Fig. 294 : sil,sul#.c</i>  | <br><i>Fig. 295 : sil,sul#.c</i>  | <br><i>Fig. 296 : sil,sul#'.a</i> | <br><i>Fig. 297 : sil,sul#'.a</i> |
| <br><i>Fig. 298 : sil,sul#'.b</i> | <br><i>Fig. 299 : sil,sul#'.b</i> | <br><i>Fig. 300 : sil,sul#'.c</i> | <br><i>Fig. 301 : sil,sul#'.c</i> |

| Réflexion   | Transmission  | Réflexion  | Transmission  |
|---|---|--|---|
| <br><i>Fig. 302 : Sbo#.a</i>   | <br><i>Fig. 303 : Sbo#.a</i>   | <br><i>Fig. 304 : Sbo#.b</i>   | <br><i>Fig. 305 : Sbo#.b</i>   |
| <br><i>Fig. 306 : Sbo#.c</i>   | <br><i>Fig. 307 : Sbo#.c</i>   | <br><i>Fig. 308 : Sbo#'.a</i>  | <br><i>Fig. 309 : Sbo#'.a</i>  |
| <br><i>Fig. 310 : Sbo#'.b</i> | <br><i>Fig. 311 : Sbo#'.b</i> | <br><i>Fig. 312 : Sbo#'.c</i> | <br><i>Fig. 313 : Sbo#'.c</i> |
| <br><i>Fig. 314 : ,to.a</i>  | <br><i>Fig. 315 : ,to.a</i>  | <br><i>Fig. 316 : ,to.b</i>  | <br><i>Fig. 317 : ,to.b</i>  |
| <br><i>Fig. 318 : ,to.c</i>  | <br><i>Fig. 319 : ,to.c</i>  | <br><i>Fig. 320 : ,to'.a</i> | <br><i>Fig. 321 : ,to'.a</i> |

| Réflexion   | Transmission  | Réflexion  | Transmission  |
|---|---|--|---|
|  <p><i>Fig. 322 : ,to'.b</i></p> |  <p><i>Fig. 323 : ,to'.b</i></p> |  <p><i>Fig. 324 : ,to'.c</i></p> |  <p><i>Fig. 325 : ,to'.c</i></p> |
|  <p><i>Fig. 326 : *to.a</i></p>  |  <p><i>Fig. 327 : *to.a</i></p>  |  <p><i>Fig. 328 : *to.b</i></p>  |  <p><i>Fig. 329 : *to.b</i></p>  |
|  <p><i>Fig. 330 : *to.c</i></p> |  <p><i>Fig. 331 : *to.c</i></p> |  |   |

### Orobanches



Fig. 332 : après 5j



Fig. 333 : après 11j (1 renouvellement)



Fig. 334 : après 19j (2e renouvellement)



Fig. 335 : après 28j



Fig. 336 : partie de l'inflorescence ayant servi pour OrE.b



Fig. 337 : sections OrE.b après 28j dans EtOH 70%



Fig. 338 : après 2h



Fig. 339 : après 1j



Fig. 340 : après 3j



Fig. 341 : après 6j



Fig. 342 : après 10j



Fig. 343 : après 14j



Fig. 344 : après 21j



Fig. 345 : après 28j



Fig. 346 : inflorescence du spécimen utilisé pour Or.Car



Fig. 347 : spécimen Or.Car après 28j dans l'EtOH 70%

|   |   |  |   |
|---|---|--|---|
|  <p><i>Fig. 348 : inflorescence du spécimen utilisé pour OrEsul.a</i></p>    |   |  <p><i>Fig. 349 : spécimen OrEsul.a après 28j</i></p>                        |   |
|  <p><i>Fig. 350 : après 2h, pH=1.8</i></p>                                   |  <p><i>Fig. 351 : après 1j, pH=1.8</i></p>       |  <p><i>Fig. 352 : après 3j, pH=4.7</i></p>                                   |  <p><i>Fig. 353 : après 6j</i></p>   |
|  <p><i>Fig. 354 : après 10j</i></p>   |  <p><i>Fig. 355 : après filtration, 14j</i></p> |  <p><i>Fig. 356 : après 21j</i></p>   |  <p><i>Fig. 357 : après 28j</i></p> |
|  <p><i>Fig. 358 : inflorescence du spécimen ayant servi à OrEsul.b</i></p> |   |  <p><i>Fig. 359 : spécimen OrEsul.b après 28j dans EtOH + sulfites</i></p> |   |
|  <p><i>Fig. 360 : après 2h, pH=1.8</i></p>                                 |  <p><i>Fig. 361 : après 1j, pH=1.8</i></p>     |  <p><i>Fig. 362 : après 3j, pH=3</i></p>                                   |  <p><i>Fig. 363 : après 6j</i></p> |



## Annexe VI – Colorimétrie : détermination de l’erreur de mesure

Les mesures ont été prise avec un spectrophotomètre X-Rite de type Ci62L+RTL, dont la source lumineuse est une lampe au tungstène, et la gamme spectrale de 400 à 700nm avec un intervalle de 10nm. Il n’est pas explicitement prévu pour la mesure de liquides mais plutôt de surfaces solides ; toutefois, un conteneur en verre d’environ 8mL fourni par le fabricant permet, à l’aide du support approprié, de mesurer la couleur de liquide. Ayant une profondeur de 1cm, la zone de mesure excède donc les 14mm de diamètre spécifiés pour une surface solide.

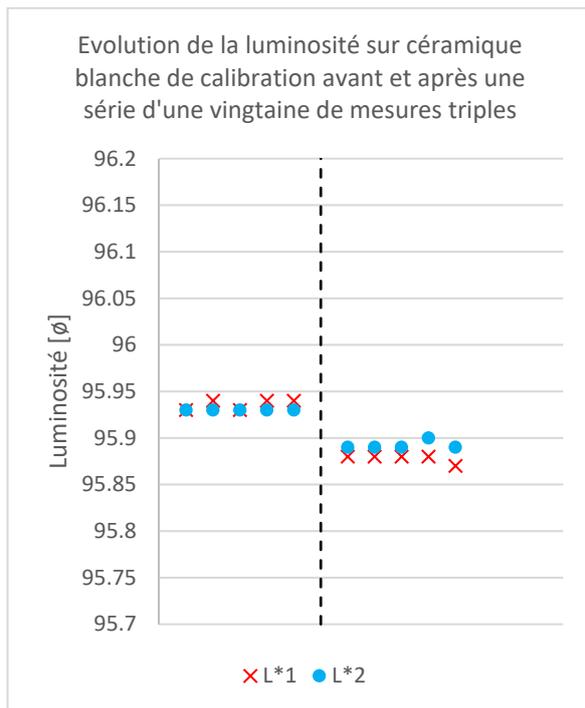
La répétabilité à court terme donnée par le fabricant est :  $\sigma_{n-1} = 0.05 \Delta E_{ab}^{*245}$  sur une surface en céramique blanche. La notion de « court terme » n’étant pas spécifiée, la distinction entre les différents axes et régions spatiales pas faite<sup>246</sup>, et surtout le cas de la mesure en fluide pas pris en compte, plusieurs séries de mesures ont été menées pour déterminer la répétabilité réelle avec cet instrument et des échantillons de type liquide incolore et liquide teinté par des dérivés de chlorophylles. De plus, des séries de mesures ont aussi été effectuées avec la céramique blanche de calibration et une autre verte également fournie par le fabricant, afin d’évaluer une éventuelle différence de comportement entre surface solide et volume liquide.

De manière générale, il a été difficile de définir une tendance en termes d’évolution dans le temps au fur et à mesure de la prise de mesures. Néanmoins, il semblerait que la luminosité tende à baisser sensiblement après une vingtaine de mesures triples espacées d’environ 3min (voir graphiques ci-dessous) – ce qui correspond à une série de mesure standard dans le cadre ce travail. De plus, l’écart-type d’une série continue de 30 mesures est plus important pour l’axe de la luminosité que pour les deux autres, dans le cas des fluides uniquement. Cela pourrait dû à la présence de bulles ou autres inhomogénéités susceptibles d’influencer la propagation de la lumière dans le liquide. Enfin, il arrive lors de la manipulation de la cuvette contenant le fluide qu’un peu de ce dernier coule au dos malgré la présence d’un couvercle : ceci résulte généralement dans une différence de luminosité telle qu’elle est immédiatement repérable comme étant une anomalie. Ces inconvénients ainsi que la capacité du plan  $a*b*$  a représenté efficacement les effets de la dégradation des pigments et de leur migration ont disqualifié la luminosité comme axe à utiliser dans ce cas.

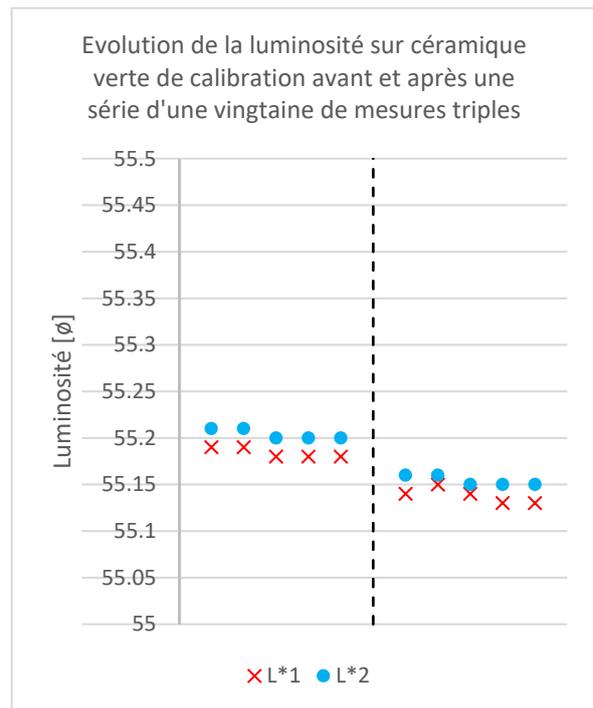
---

<sup>245</sup>  $\Delta E_{ab}^{*}$  est la distance euclidienne dans l’espace CIELab, soit la différence de couleur. Elle est censée être quasiment équivalente, perceptivement parlant, dans toutes les régions de l’espace – c’est la spécificité de CIELab par rapport à d’autres espaces colorimétriques moins adaptés à la vision humaine. C’est toutefois un idéal, en pratique cet espace comporte aussi des défauts en termes d’uniformité perceptive. Voir : Sharma & Rodríguez-Pardo, 2012.

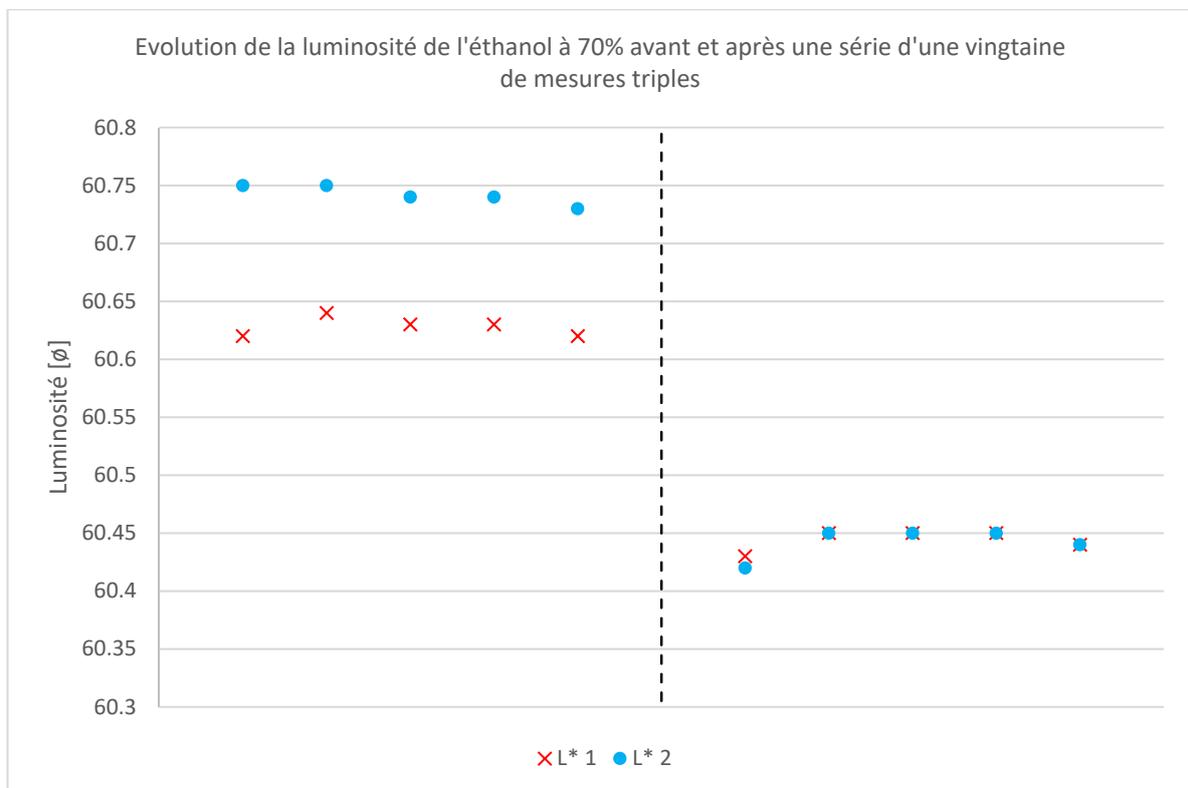
<sup>246</sup> Voir note précédente.



Graphe 40 : mesure de la luminosité sur la céramique blanche de calibration.



Graphe 41 : mesure de la luminosité sur la céramique verte de calibration.



Graphe 42 : mesure de la luminosité de l'éthanol à 70%.

L'incertitude de mesure pour une série de 3 mesures a été déterminée d'après l'écart-type obtenu sur une série de 30 mesures consécutives.

Ecart-type d'un échantillon de taille  $n$  (ici  $n=30$ ) :

$$\sigma_{n-1} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n |x_i - \bar{x}|^2}{n-1}}$$

Puis, l'incertitude de mesure de type A (répétabilité) a été calculée pour une série de 3 mesures ( $n=3$ ) :

$$U_A = k \frac{\sigma_{n-1}}{\sqrt{n}}$$

Où  $k$  est : facteur d'élargissement selon la loi de Student ; par exemple, pour  $n=3 \rightarrow k=3.18$

Tableau 15 : incertitudes obtenues pour chaque valeur de chaque échantillon.

| Echantillon                  | Indicateur             | L*          | a*          | b*          | C*          | h°          |
|------------------------------|------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Tuile blanche de calibration | <i>Valeur donnée</i>   | 95.93       | -0.51       | 2.13        | 2.19        | 103.47      |
|                              | <i>Moyenne mesurée</i> | 95.93       | -0.51       | 2.10        | 2.16        | 103.72      |
|                              | Etendue                | 0.03        | 0.01        | 0.02        | 0.02        | 0.22        |
|                              | Ecart-type             | 0.0102      | 0.0038      | 0.0041      | 0.0055      | 0.0495      |
|                              | <b>Incertitude</b>     | <b>0.02</b> | <b>0.01</b> | <b>0.01</b> | <b>0.01</b> | <b>0.09</b> |
| Tuile verte de calibration   | <i>Valeur donnée</i>   | 55.28       | -27.60      | 14.51       | 31.18       | 152.27      |
|                              | <i>Moyenne mesurée</i> | 55.16       | -27.86      | 14.63       | 31.46       | 152.29      |
|                              | Etendue                | 0.06        | 0.15        | 0.03        | 0.14        | 0.10        |
|                              | Ecart-type             | 0.0174      | 0.0400      | 0.0094      | 0.0382      | 0.0241      |
|                              | <b>Incertitude</b>     | <b>0.03</b> | <b>0.07</b> | <b>0.02</b> | <b>0.07</b> | <b>0.04</b> |
| EtOH 70%                     | Etendue                | 0.47        | 0.04        | 0.09        | 0.08        | 3.39        |
|                              | Ecart-type             | 0.1209      | 0.0094      | 0.0261      | 0.0199      | 0.9737      |
|                              | <b>Incertitude</b>     | <b>0.22</b> | <b>0.02</b> | <b>0.05</b> | <b>0.04</b> | <b>1.79</b> |
| Dérivés de chlorophylles     | Etendue                | 1.26        | 0.31        | 1.05        | 1.09        | 0.26        |
|                              | Ecart-type             | 0.4753      | 0.0829      | 0.3283      | 0.3368      | 0.0691      |
|                              | <b>Incertitude</b>     | <b>0.87</b> | <b>0.15</b> | <b>0.60</b> | <b>0.62</b> | <b>0.13</b> |

## Annexe VII – Calcul et titration du SO<sub>2</sub>

### 1. Calcul de la concentration en SO<sub>2</sub> d'après l'augmentation de volume

Voici la manière de préparer une solution aqueuse de SO<sub>2</sub> proposée par Wagstaffe & Fidler, 1968, p. 291 :

*a. Prepare a solution of sulphur dioxide (SO<sub>2</sub>) by bubbling the gas through 750 ml. of distilled water until the volume has increased to 755 ml. (=1.75 per cent by weight of SO<sub>2</sub>). Add 15 gm. of copper sulphate and stir until dissolved. Select a jar which will*

En résumé :

- Vol<sub>H<sub>2</sub>O</sub> = 0.750 L
- Vol<sub>sol</sub> = 0.755 L      donc, si on ignore la compressibilité du gaz :      Vol<sub>SO<sub>2</sub></sub> = 0.005 L

Cherchons la masse de SO<sub>2</sub> :

- d = 2.629 g/L

$$m_{SO_2} = Vol_{SO_2} \times d_{SO_2}$$

$$m_{SO_2} = 0.005L \times 2.629g/L = 0.013145g$$

Ensuite, le % en g/L (ou g/Kg, ça revient au même dans ce cas) :

$$\frac{m_{SO_2}}{Vol_{H_2O}} \times 100 = \frac{0.013145g}{0.75L} \times 100 = 1.753\%$$

Ce résultat correspond donc bien au pourcentage massique donné. Mais il ne fait pas de sens par rapport à ce qu'on sait par ailleurs sur les solutions aqueuses de SO<sub>2</sub>. Par exemple, la solubilité du SO<sub>2</sub> dans l'eau est d'environ 90g/L. Or, si l'on divise 90g par la densité du SO<sub>2</sub>, soit 2.6g/L, on obtient environ 30L de SO<sub>2</sub> dans 1L d'eau ! Il apparaît donc qu'il est bel et bien nécessaire de tenir compte du fait que le gaz est fortement comprimé lorsqu'il est incorporé à l'eau, mais cela est très complexe.

### 2. Titration du SO<sub>2</sub> dans les solutions contenant du SO<sub>2</sub> ou du Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> dissout

La concentration en SO<sub>2</sub> / sulfites des solutions réalisées en partant de l'un ou de l'autre a été déterminée par titrage iodimétrique (direct). La réaction est la suivante<sup>247</sup> :



Une solution titrante d'I<sub>2</sub> concentrée (0.05M) a été préparée ainsi : 20g d'iodure de potassium ont été dissouts dans 200mL d'eau double-distillée, puis 13g de diiode ont été ajoutés et le volume de la solution ajusté à 1L après avoir bien mélangé. L'iodure de potassium aide le diiode à se solubiliser dans l'eau

---

<sup>247</sup> Meites, 1963, Section 3, p. 71.

mais ne participe pas directement à la réaction d'oxydo-réduction lors de la titration<sup>248</sup>. La solution concentrée a ensuite été diluée par 5 afin d'obtenir une solution à 0.01M utilisée pour le titrage. Les premiers essais ont démontré que le point d'équivalence n'était pas réellement atteignable à cause d'un phénomène de réversibilité (la solution redevenait systématiquement jaune après avoir été incolore durant quelques secondes), probablement une réoxydation du I<sup>-</sup> en I<sub>2</sub> dû au pH trop acide<sup>249</sup>. Un tampon phosphate à pH 7 et 0.1M a été ajouté à raison de 10ml pour 100ml de solution titrante (→≈0.01M). Le pH obtenu ainsi n'a pu être mesuré car la teinte brune de la solution rend le papier indicateur inutilisable et risquerait de teindre le verre de l'électrode, mais après cela le titrage a pu être effectué sur toutes les solutions.

Tableau 16 : valeurs données (noir), calculées (bleu) et mesurées (vert) pour la titration des sulfites. La dernière colonne représente le ratio entre la molarité théorique et celle obtenue par mesure volumétrique.

|   | g/mol | g/L   | mol/L  | mL I <sub>2</sub> 0.01M | mol I <sub>2</sub> | mL sol. | mol/L SO <sub>2</sub> | Ratio |
|---|-------|-------|--------|-------------------------|--------------------|---------|-----------------------|-------|
| I <sub>2</sub> 0.01M                      | 253.8 | 2.54  | 0.0100 | -                       | -                  | -       | -                     | -     |
| SO <sub>2</sub> 5%                        | 64.1  | 50.00 | 0.7800 | 250                     | 0.0025             | 4.2     | 0.596                 | 0.76  |
| SO <sub>2</sub> 0.5%                      | 64.1  | 5.00  | 0.0780 | 100                     | 0.0010             | 18.0    | 0.056                 | 0.72  |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub><br>pH=1.0 | 126.0 | 21.00 | 0.1667 | 100                     | 0.0010             | 10.0    | 0.100                 | 0.60  |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub><br>pH=1.8 | 126.0 | 21.00 | 0.1667 | 100                     | 0.0010             | 10.6    | 0.094                 | 0.56  |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub><br>pH=6.2 | 126.0 | 21.00 | 0.1667 | 100                     | 0.0010             | 21.3    | 0.047                 | 0.28  |

Les résultats des solutions obtenues par adjonction de SO<sub>2</sub> gazeux correspondent à ce qui était attendu (soit la diminution d'un facteur 10 entre la première et la seconde), bien que la valeur absolue soit moins élevée que ce qui était attendu (ratio=0.7). En revanche, les différences selon le pH des 3 dernières solutions sont plus surprenantes, car la même quantité de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> a été utilisée à chaque fois. Il est possible que cela ait un rapport avec la stabilité de la solution titrante, mais aussi avec l'équilibre des différentes espèces de sulfites selon le pH. De manière générale, cette technique n'est pas aussi précise que le titrage iodométrique (indirect en retour) qui utilise de l'amidon comme indicateur coloré plus précis lors de la phase de retour. Elle a néanmoins permis d'affirmer que la molarité des solutions partant du Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> se situent globalement au sein de la fourchette des deux partant du SO<sub>2</sub> gazeux.

<sup>248</sup> Flinn Scientific, 2011, "Laboratory Solution Preparation".

<sup>249</sup> Ciesielski & Zakrzewski 2006.

## Annexe VIII – Analyse des dérivés de chlorophylles par LC-MS

LC-MS signifie *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*, soit la combinaison d'une technique de séparation (chromatographie) et d'une technique d'analyse élémentaire (spectrométrie de masse). Le principe général de la première est de séparer les analytes (composés chimiques étudiés) en fonction de leur affinité avec le liquide (éluant) et la phase stationnaire, le processus étant accéléré par une pressurisation. Ensuite, l'effluent (éluant + analytes) est transféré dans le spectromètre de masse où il est ionisé par un rayon de haute énergie (électronique, photonique ou ionique). Cela provoque la formation d'une variante ionisée de la molécule initiale (= ion moléculaire) et éventuellement la scission de celle-ci en fragments plus petits (= « ions fils »). La masse et la charge de ces ions sont mesurées et leur rapport ( $m/z$ ) est la valeur habituellement représentée sur l'abscisse du spectre de masse ; la charge est souvent égale à 1 et dans ce cas la valeur est simplement la masse de l'ion moléculaire (donc  $\pm 1$  unité atomique par rapport à la masse de la molécule initiale, en fonction de l'ionisation positive ou négative qui ajoute ou enlève un proton)<sup>250</sup>.

Le couplage de la MS à la LC permet donc (dans sa version la plus simple<sup>251</sup>) d'identifier des composés selon leur temps de rétention et leur masse moléculaire : c'est cette dernière qui a été utilisée pour tenter une première identification qualitative des dérivés de chlorophylles, par comparaison avec les valeurs données dans la littérature. Les appareils utilisés étaient un Acquity UPLC™ pour la LC et un Synapt G2 pour la MS, tous deux de la marque Waters. Il s'agit d'un spectromètre à quadripôle (Q) et utilisant le principe de « temps de vol » (TOF), c'est-à-dire que la distance parcourue par les ions durant leur chute est utilisée pour inférer leur masse respective.

Si la chromatographie et la spectrométrie de masse permettent de séparer des composés, un objet organique comme une feuille de plante comporte beaucoup trop de molécules différentes et nécessite donc une extraction sélective préalable des analytes. Une première méthode d'extraction<sup>252</sup> n'a pas permis d'identifier ensuite de complexes Cu - dérivés de chlorophylles à partir de folioles de *Pisum sativum* « fixées » à 100°C avec de l'acétate de cuivre ( $W_{Cu}^{\circ}$ ) :

Broyage à l'azote liquide → extraction au DMF (*N,N*-diméthylformamide) → lavage avec de l'hexane → transfert dans un mélange d'une solution aqueuse de NaCl 10% avec du diéthyl éther et de l'hexane (1:1) → après l'avoir bien agité, prélèvement de la phase supérieure → extraction du solvant à l'aide d'un évaporateur centrifuge → stockage à froid (-20°C) → → dissolution du résidu sec dans l'éluant pour réaliser la LC-MS.

Il est étrange qu'aucun dérivé de chlorophylles n'ait pu être détecté, avec ou sans Cu, alors que l'extrait avait bien une teinte verte. D'autres essais ont été menés, notamment une extraction à l'acétone avec des billes de verre placées dans le tube Eppendorf® et une immersion dans un bain à ultrasons de ce

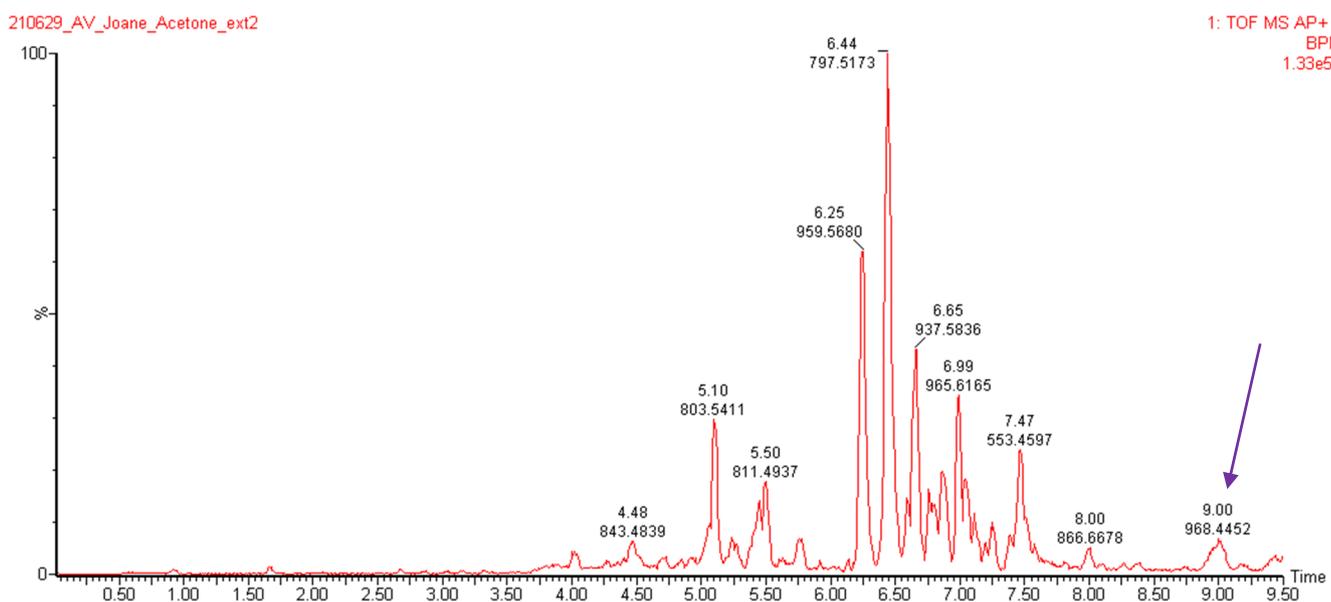
---

<sup>250</sup> Informations tirées de : Menet, 2011.

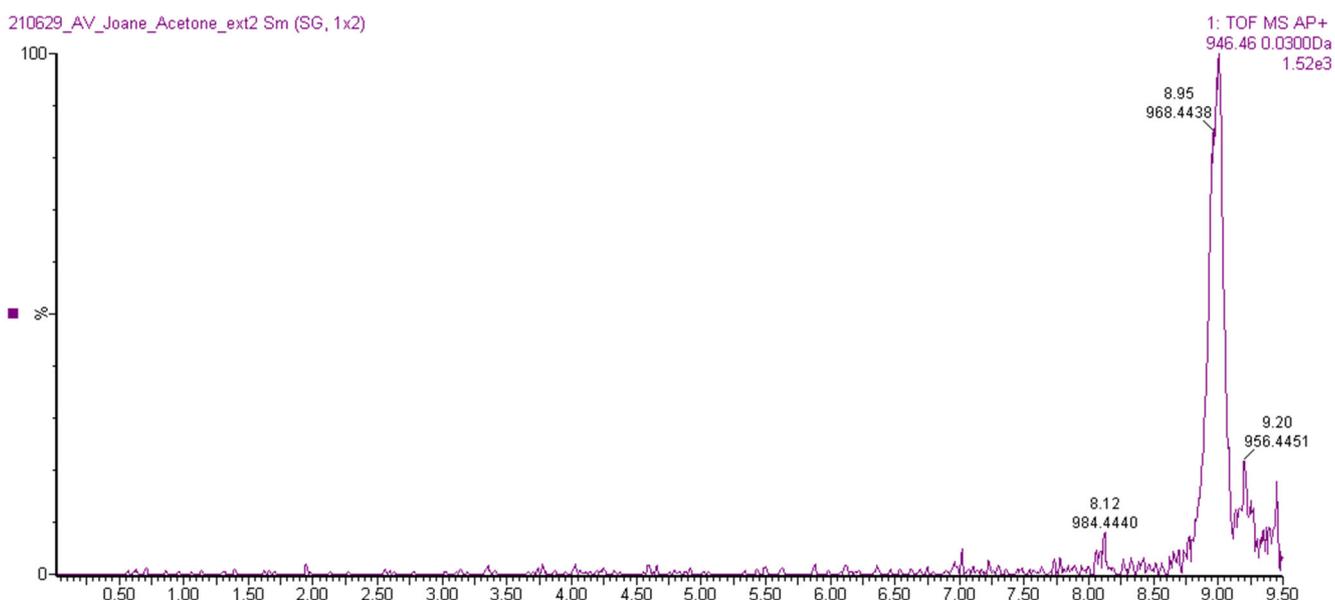
<sup>251</sup> Il est aussi possible de réaliser des analyses quantitatives extrêmement précises ou d'élucider la structure en utilisant la fragmentation lors de l'ionisation, par exemple.

<sup>252</sup> Inspirée de celle proposée par Pérez-Galvez *et al.*, 2020, p. 2.

dernier, afin de maximiser l'extraction de pigments. De nouvelles analyses avec comparaison à un standard de Cu-phéophytine *a* synthétisé à partir d'un standard de chlorophylle *a* (Sigma-Aldrich, Supelco,  $\geq 95.0\%$ , HPLC analytical standard) ont finalement permis de détecter les composés de masse égale à 932.5 et 946.5 unités atomiques (graphes 43-46), soit celles des cations moléculaires des Cu-phéophytines *a* et *b*<sup>253</sup>. C'est une preuve analytique que le cuivre s'est bien complexé au sein de certains tétrapyrroles. En revanche, aucune pyrophéophytine ou Cu-pyrophéophytine n'a été détectée sur les échantillons soumis à une ébullition, malgré la tentative de créer les standards correspondant à partir de la chlorophylle *a*. Enfin, la présence de Zn-phéophytines conjointement aux Cu-phéophytines a été détectée dans les échantillons dont le fluide de conservation comprenait du sulfate de cuivre et de zinc (graphes 47-48).

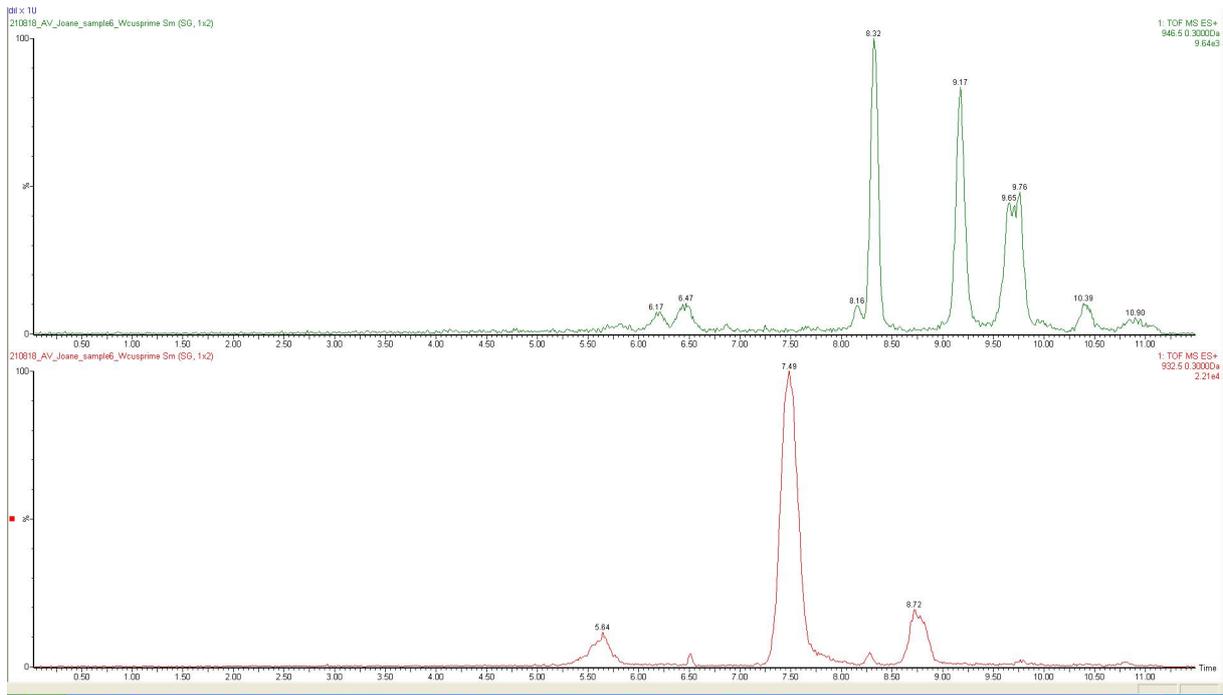


Graph 43 : chromatogramme d'un échantillon PpWcua° obtenu par UPLC/Q-TOF-MS en mode APCI positif.

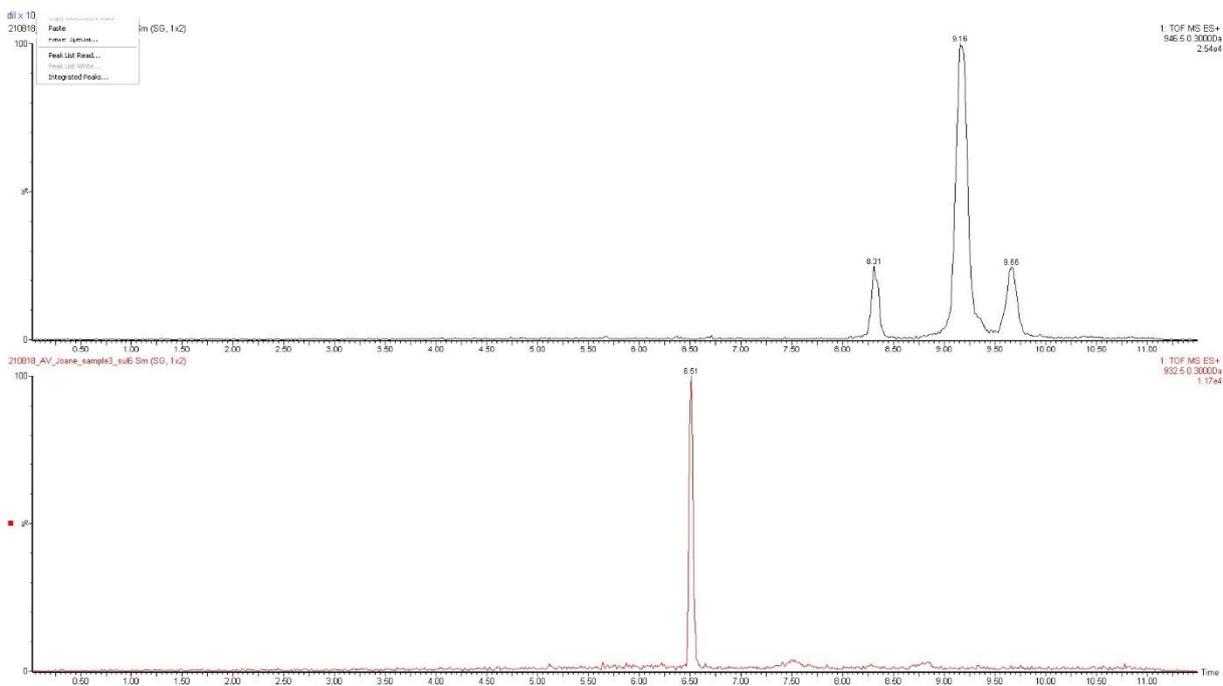


Graph 44 : focus sur le pic à 9min du chromatogramme précédent montrant que le max est à 946.46

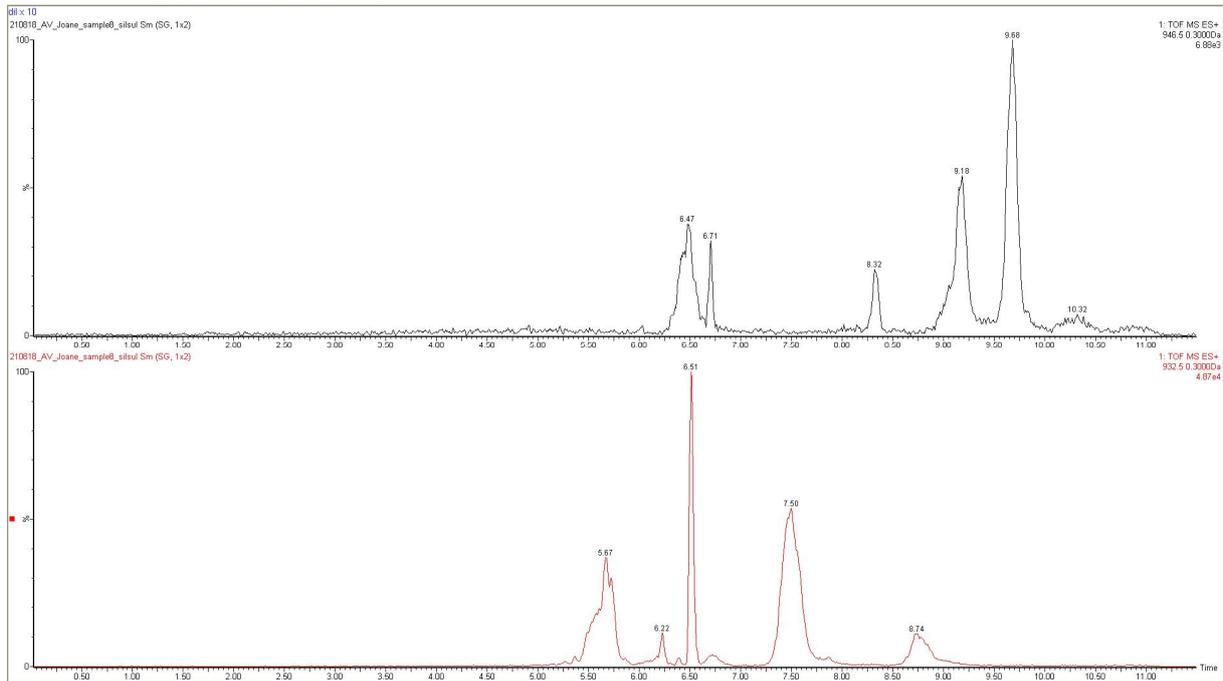
<sup>253</sup> Aparicio-Ruiz *et al.*, 2011, p. 11103.



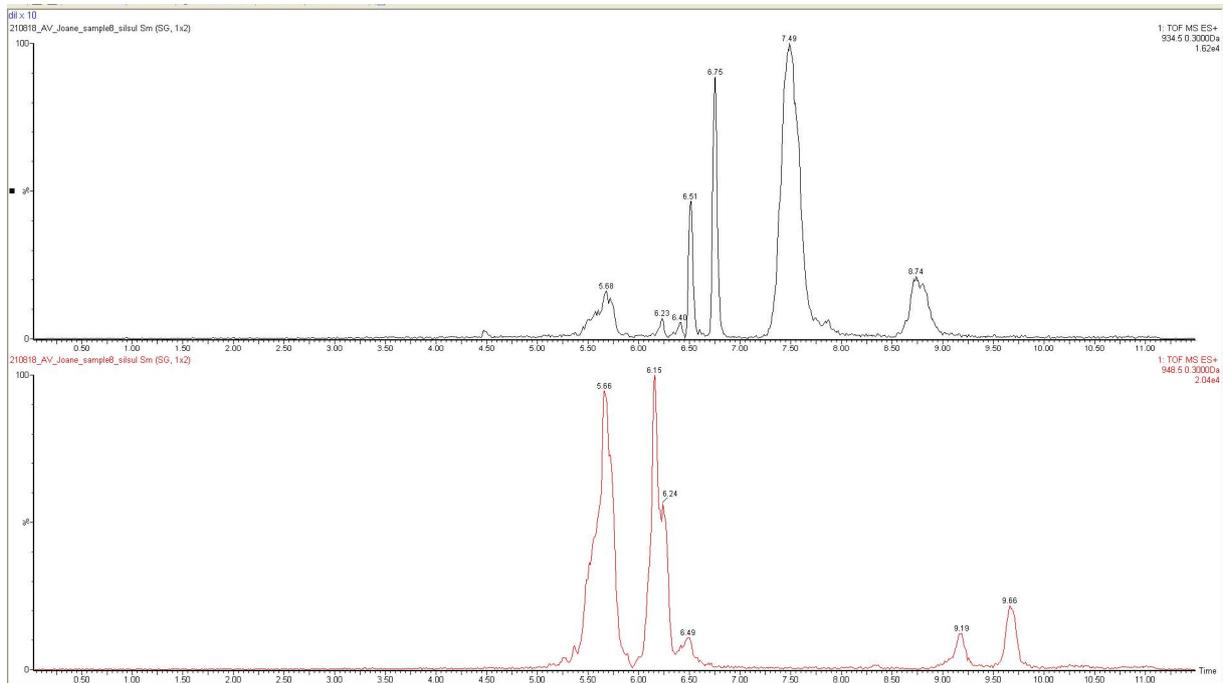
Graph 45 : pics correspondant à 946.5 (haut) et 932.5 (bas) tirés du chromatogramme du triplicat « Wcus' ».



Graph 46 : pics correspondant à 946.5 (haut) et 932.5 (bas) tirés du chromatogramme du triplicat « ,sul6 ».



Graph 47 : pics correspondant à 946.5 (haut) et 932.5 (bas) tirés du chromatogramme du triplicat « sil,sul# ».



Graph 48 : pics correspondant à 934.5 (haut) et 948.5 (bas) tirés du chromatogramme du triplicat « sil,sul# ». L'augmentation de unités atomiques par rapport aux complexes de cuivre correspond aux complexes de zinc.

## Annexe IX – Liste des produits

Tableau 17 : liste des produits utilisés lors des tests.

| Produits                               | Formule                               | Indication  | Pureté  | Fournisseur         |
|--|---------------------------------------|---|---|---------------------|
| Acétate de cuivre (II)                 | $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  | Monohydraté, ACS reagent                                  | ≥98%  | Sigma-Aldrich       |
| Acide chlorhydrique                    | HCl                                   | Pure  | 32%   | Carlo Erba          |
| Acide lactique (DL)                    | $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$      | -   | 90%   | Sigma-Aldrich       |
| Acide sulfurique                       | $\text{H}_2\text{SO}_4$               | -   | 96%   | Carlo Erba          |
| Chlorure de cuivre (II)                | $\text{CuCl}_2$                       | -   | ≥99%  | Sigma-Aldrich       |
| Diode                                  | $\text{I}_2$                          | -   | ?   | ?                   |
| Eau déionisée                          | $\text{H}_2\text{O}$                  | pH ≈ 5; conductivité ≈ 15μS                               | -   | -                   |
| Eau du robinet                         | $\text{H}_2\text{O}$                  | pH ≈ 7; conductivité ≈ 400μS                              | -   | -                   |
| Ethanol                                | $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$       | Absolu  |   | VWR Chemicals       |
| FAA                                    | -                                     | Fixateur histologique                                     |   | VWR Chemicals       |
| Glycérol                               | $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$      | Technical   |   | VWR Chemicals       |
| Huile de paraffine                     | HCHO                                  | -   | -   | Droguerie Scheitter |
| Hydroxyde de sodium                    | NaOH                                  | -   | ≥97.0%  | Sigma-Aldrich       |
| Iodate de potassium                    | $\text{KIO}_3$                        | -   | ≥99.5%  | OSI ?               |
| L-Acide ascorbique                     | -                                     | -   | ≥99%  | Sigma-Aldrich       |
| Phénol                                 | $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$       | unstabilized, ReagentPlus®                                | ≥99%  | Sigma-Aldrich       |
| Sodium bisulfite                       | $\text{NaHSO}_3$                      | ACS reagent   | ?   | Sigma-Aldrich       |
| Sodium phosphate monobasique           | $\text{NaH}_2\text{PO}_4$             | ReagentPlus   | ≥99.0%  | Sigma-Aldrich       |
| Solution aqueuse de formaldéhyde       | -                                     | "Formol"  | ≥34.5% wt.  | Sigma-Aldrich       |
| Solution aqueuse de silicate de sodium | $\text{Na}_2\text{O}(\text{SiO}_2)_x$ | reagent grade, sodium trisilicate solution, "water glass" | Na <sub>2</sub> O ~10.6%<br>SiO <sub>2</sub> ~26.5% | Sigma-Aldrich       |
| Solution aqueuse de SO <sub>2</sub>    | -                                     | "Acide sulfureux"   | 5%  | Droguerie Scheitter |
| Sulfate de cuivre (II)                 | $\text{CuSO}_4$                       | Pentahydraté, ACS reagent                                 | ≥98.0%  | Sigma-Aldrich       |
| Sulfite de sodium                      | $\text{Na}_2\text{SO}_3$              | -   | ?   | ?                   |
| α-Tocophérol                           | -                                     | -   | ≥95.5%  | Sigma-Aldrich       |