ArcheoSciences

Revue d'archéométrie

35 | 2011

Varia / International ArBoCo Workshop

La conservation des os gras : recherche d'un traitement de dégraissage des squelettes de baleine

The Conservation of Fatty Bones: Research of a Degreasing Treatment for Whale Skeletons

Élodie Guilminot, Gwenaël Lemoine, Charlène Pele, Laurent Poisson et Michel Surbled

Édition électronique

URL : <https://journals.openedition.org/archeosciences/3175>

DOI : 10.4000/archeosciences.3175

ISBN : 978-2-7535-1849-0

ISSN : 2104-3728

Éditeur

Presses universitaires de Rennes

Édition imprimée

Date de publication : 30 avril 2011

Pagination : 201-212

ISBN : 978-2-7535-1847-6

ISSN : 1960-1360

Référence électronique

Élodie Guilminot, Gwenaël Lemoine, Charlène Pele, Laurent Poisson et Michel Surbled, « La conservation des os gras : recherche d'un traitement de dégraissage des squelettes de baleine », *ArcheoSciences* [En ligne], 35 | 2011, mis en ligne le 30 avril 2013, consulté le 01 mars 2022. URL : <http://journals.openedition.org/archeosciences/3175> ; DOI : <https://doi.org/10.4000/archeosciences.3175>

Ce document a été généré automatiquement le 1 mars 2022.

Article L.111-1 du Code de la propriété intellectuelle.

La conservation des os gras : recherche d'un traitement de dégraissage des squelettes de baleine

The Conservation of Fatty Bones: Research of a Degreasing Treatment for Whale Skeletons

Élodie Guilminot, Gwenaél Lemoine, Charlène Pele, Laurent Poisson et Michel Surbled

1. Introduction

- 1 Un squelette de rorqual commun *Balaenoptera physalus*, couramment appelé baleine, est exposé au muséum de Nantes depuis 1995 (fig. 1).

Figure 1 : Squelette de rorqual commun exposé au muséum de Nantes.

Figure 1: Fin whale skeleton in the Nantes Museum.

- 2 Malgré un traitement par immersion dans une solution à base de trichloroéthane et de chloroforme¹, les os présentent des dépôts de matière grasse brune (fig. 2) suintant et dégageant une odeur rance à des températures estivales.

Figure 2 : Dépôts de matière grasse brune sur l'omoplate du rorqual de Nantes.

Figure 2: Brown fatty deposits on the Nantes fin whale scapula.

- 3 Le dégraissage, réalisé de 1991 à 1995, n'a pas pu être mené à cœur, faute de temps, de moyens mais surtout de méthodes de contrôle.
- 4 Aujourd'hui le traitement des squelettes anciens insuffisamment dégraissés est le plus souvent réalisé par immersion dans des solvants organiques, inflammables et très toxiques, surtout dans les grandes quantités nécessaires pour dégraisser un squelette de baleine. De plus, ces méthodes ne sont pas sans effet sur l'os : elles peuvent entraîner une altération de ses constituants qui fausse toute étude scientifique ultérieure ainsi que des déformations qui rendent difficile le remontage du squelette.
- 5 Dans le cadre du Programme national de recherche sur la connaissance et la conservation des matériaux du patrimoine culturel (PNRCC), Arc'Antique mène en partenariat avec Archimex et l'IUT de Laval une recherche sur la conservation des squelettes gras. Le but est de proposer une nouvelle solution nettoyante sélective ayant un pouvoir dégraissant élevé, tout en respectant l'intégrité des constituants de l'os. Aucun résidu nocif, toxique ou inflammable ne doit demeurer dans l'os pour des raisons de conservation, d'hygiène et de respect de l'environnement. Après la caractérisation des graisses par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) et Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG), plusieurs voies sont explorées pour répondre au mieux à ces critères :
- 6
 - la voie enzymatique, à base de lipases associées à des solvants,
 - le nettoyage dans différents solvants avec ou sans moteur d'extraction (chauffage, pression, agitation...),
 - le CO₂ supercritique.
- 7 Le suivi des traitements est réalisé par spectroscopie Raman.

2. État de l'art

Les os de cétacés, des os particulièrement poreux et gras

- 8 Le rorqual commun ou *Balaenoptera physalus*, appartenant à l'ordre des cétacés, est le deuxième plus grand mammifère du monde. Le spécimen exposé au Muséum de Nantes mesurait 18,60 mètres pour 35 tonnes. La masse du squelette, évaluée après dégraissage, est de 1,5 tonne.
- 9 Les os des mammifères marins sont spongieux et légers, excepté la fine couche externe ou périoste, qui est dure et compacte. Ces os sont gorgés de graisse, composée à 80 % de triglycérides, mais aussi d'acides gras libres, de cholestérol libre, de diacylglycérol, de cires et d'autres lipides complexes comme les phospholipides (Ruchonnet *et al.*, 2006 ; Yunoki *et al.*, 2008).
- 10 Les triglycérides résultent de la condensation d'acides gras avec un triol, le glycérol, par des liaisons esters (fig. 3).

Figure 3 : Formation d'une molécule de triglycéride.
 Figure 3: Formation of a triglyceride molecule.

- 11 Ces acides gras sont principalement insaturés et possèdent généralement une chaîne longue de 14 à 22 carbones. Les composants majoritaires sont l'acide oléique (C18:1)² et l'acide palmitoléique (C16:1) et plus de 10 % d'acides gras hautement insaturés (C20:5, C22:5 et C22:6).

Techniques actuelles de dégraissage³

- 12 La technique la plus utilisée sur les spécimens frais est la macération en solution aqueuse, dont l'efficacité est due à l'action des bactéries. La température des bains peut varier de 35 à 60-70 °C, voire jusqu'à 100 °C (il s'agit alors de « cuisson »). Divers additifs sont ajoutés dans les solutions aqueuses :
- 13 – des tensioactifs (détergents favorisant la dissolution des graisses),
 – du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), oxydant qui permet de dissoudre la graisse et de blanchir les os,
 – de la soude (NaOH) ou de la potasse (KOH), bases saponifiant les graisses,
 – des enzymes, principalement des protéases telles que la papaïne ou la neutrase : elles influencent peu le dégraissage car elles interviennent sur les protéines (étape d'écharnage) et non sur les graisses.
- 14 Lorsque la macération est insuffisante pour dégraisser les os, ce qui est le cas pour les squelettes gras tels que la baleine, le dégraissage est réalisé dans des bains de solvants organiques. Les solvants utilisés sont des alcools (éthanol, méthanol), des aldéhydes (formol), des cétones (acétone, méthyléthylcétone) et des solvants chlorés (trichloréthane, trichloréthylène, perchloréthylène).

Altérations de l'os liées à ces méthodes

- 15 L'efficacité de ces traitements est variable mais tous ces procédés ont en commun de dégrader la matière osseuse de façon conséquente (Williams, 1999 ; Fernández-Jalvo & Monfort, 2008). Les causes de ces dégradations sont variées :

- 16 – attaques chimiques ou biologiques,
 - dissolution de constituants structurant le matériel osseux,
 - déshydratation.
- 17 Les solvants chlorés favorisent l'acidification du matériau en formant de l'acide chlorhydrique. La macération longue, les températures élevées, les bases qui dénaturent la partie protéinique de l'os, les oxydants et les solvants organiques desséchant l'os provoquent des dégâts irréversibles : l'os perd sa consistance, devient mou ou cassant, se fissure.
- 18 L'utilisation des solvants organiques est certainement la technique la plus efficace mais non sans conséquence sur la conservation de l'os. Ces produits chimiques présentent par ailleurs divers inconvénients, exacerbés lors des traitements d'envergure comme ceux des baleines : ils sont inflammables, irritants au contact de la peau, toxiques par inhalation voire cancérogènes (trichloréthylène). Les solvants chlorés sont néfastes pour l'environnement, ce qui implique la prise en compte de leur recyclage.
- 19 Cette étude a donc pour but de proposer un nouveau protocole de traitement à la fois efficace, respectant l'intégrité de l'os et, si possible, moins nuisible à l'environnement.

3. Étude expérimentale : recherche d'un traitement de dégraissage adapté et suivi du traitement

Corpus

- 20 Dans le cadre de cette étude, il est impossible d'utiliser les os du squelette de la baleine exposé au Muséum de Nantes pour mettre au point les paramètres de traitement. Seuls des prélèvements de graisse seront réalisés sur ce squelette afin de déterminer la nature, la composition et l'état de dégradation de ces graisses. En conséquence, d'autres échantillons d'os de balénéidés représentatifs de la problématique du squelette de rorqual de Nantes ont été collectés : vertèbres provenant du Centre de Recherche des Mammifères Marins (CRMM) de La Rochelle et côtes confiées par Pierre-Henri Fontaine, cétologue québécois.
- 21 Ces os sacrificiables ont déjà été traités par macération, mais présentent de nouveau des suintements de graisses superficiels. Les analyses par chromatographie présentées ci-dessous permettront de connaître la nature de ces graisses et de savoir si elles sont bien représentatives de notre problématique.
- 22 Pour les différents tests de dégraissage, des échantillons d'environ 4,5 cm × 3 cm × 1 cm et de masse de l'ordre de 15 g ont été découpés dans une vertèbre grasse du CRMM. Ces échantillons sont principalement constitués de spongiosa (structure la plus poreuse de l'os) gorgée de graisse. La porosité ouverte facilite les transferts de matière, ces conditions favorables pour l'extraction des graisses ne sont pas totalement représentatives des conditions des traitements de dégraissage mais permettent une première approche afin de sélectionner les solutions efficaces.

Nature des graisses à traiter

Analyse par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Méthodologie

- 23 La CCM permet de déterminer les différentes familles de lipides en présence.
- 24 Un double développement est effectué dans un solvant A (acétate de méthyl [50 ml]), isopropanol (50 ml), chloroforme (50 ml), méthanol (20 ml), KCl à 0,25 %_{mas} (18 ml) qui permet de séparer les glycolipides et les phospholipides, puis dans un solvant B (hexane [160 ml]), diéthyl éther (40 ml), acide acétique glacial (4 ml) qui permet de séparer les lipides neutres. Les plaques sont révélées par le réactif de Molish (a-naphtol [0,25 g]), éthanol 50 ml, acide sulfurique à 20 %_{vol} (50 ml).
- 25 Quatre échantillons de graisses ont été prélevés sur les os :
 - 26 – en surface et à cœur sur la vertèbre grasse de balénéidé provenant du CRMM,
 - en surface et à cœur sur le squelette du rorqual du Muséum de Nantes.
- 27 Ces graisses sont comparées à des échantillons de référence : un acide gras (C22:6), un phospholipide (phosphatidylcholine), un triglycéride (trioléine), un ester de cholestérol et une cire (oléate d'oléyle).

Résultats et discussion

- 28 Les résultats obtenus par CCM montrent que parmi les graisses analysées aucune tâche ne correspond aux triglycérides ni aux phospholipides (fig. 4).

Figure 4 : Plaque de Chromatographie sur Couche Mince en double développement et une dimension.

Figure 4: Plate of Thin-layer chromatography under one dimensional double development.

- 29 Ces graisses contiennent principalement des lipides neutres, et plus particulièrement des acides gras libres. Les tâches en haut de la plaque sont plus difficiles à identifier. Elles peuvent correspondre à une cire et/ou à un ester de cholestérol (Morvan, 2010).
- 30 Pour le rorqual du Muséum comme pour les échantillons disponibles pour notre étude, ces analyses montrent que les graisses à extraire des os sont des graisses dégradées. Les

triglycérides se sont déjà transformés en acides gras libres. Dans un premier temps, les traitements aqueux auxquels le squelette a été soumis ont entraîné une pénétration d'eau au cœur des os et ainsi provoqué des phénomènes d'hydrolyse. Par la suite, au cours de l'exposition, les fluctuations d'humidité relative, la chaleur, l'oxygène et l'activité bactérienne entraînent une dégradation de la graisse en acides libres. L'oxydation des lipides, d'autant plus forte pour les molécules très insaturées, provoque leur rancissement : la formation de peroxydes sous l'effet de l'oxygène engendre, par rupture de chaîne, la production de radicaux libres, la réticulation des lipides et la production d'aldéhydes, produits volatiles responsables de l'odeur (Allen *et al.*, 1991). L'oxydation progressive des triglycérides dans les squelettes insuffisamment dégraissés explique que nombre d'entre eux semblent stables pendant des années avant qu'une soudaine altération n'apparaisse, sous la forme d'os gras : une fraction de la graisse est devenue plus mobile et migre vers la surface d'autant plus quand la température augmente.

Analyse par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

Méthodologie

- 31 La CPG permet d'affiner les résultats de la CCM en identifiant les acides gras en présence (nombre de carbones et d'insaturations).
- 32 Les extraits de graisse sont analysés après avoir été saponifiés puis méthylés selon la méthode décrite par H.T. Slover *et al.* (Slover, 1979). Les analyses sont effectuées avec un chromatographe en phase gazeuse (Thermo Electron Corporation, Les Ulis, France) équipé d'un injecteur de fente (1 :15) à 250 °C et d'un détecteur d'ionisation flamme à 280 °C, et d'une colonne de CP-SIL 88 (25 m X 0.25 de X millimètre, 0.2 épaisseur de film de μm , Varian, Les Ulis, France). L'azote est employé comme gaz vecteur (1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$). La température du four est maintenue à 120 °C pendant 4 minutes, puis augmentée à 220 °C (6 °C. min^{-1}).
- 33 Les échantillons de graisses analysés ont été prélevés sur les os suivants :
- 34 – en surface et à cœur de la vertèbre grasse de balénéidé provenant du CRMM,
– en surface et à cœur d'une côte de balénéidé fournie par P.-H. Fontaine,
– en surface d'une omoplate, d'une vertèbre et d'une côte du rorqual du Muséum de Nantes.
- 35 Ces graisses sont comparées à des standards d'acides gras.

Résultats et discussion

- 36 Les analyses par chromatographie en phase gazeuse montrent que la graisse du squelette de rorqual du Muséum de Nantes est composée d'acides gras libres dont la longueur de chaîne varie entre 14 et 22 carbones. Les acides gras majoritaires identifiés sont le C18:1 (acide oléique), le C16:0 (acide palmitique), le C16:1 (acide palmitoléique), le C14:0 (acide myristique), le C20:1 (acide gadoléique) et le C18:0 (acide stéarique) (fig. 5).

Figure 5 : Chromatogramme en phase gazeuse d'un extrait de graisse prélevée à la surface de l'omoplate du rorqual de Nantes.

Figure 5: Gaz chromatogram of an extract of grease taken on the surface of the Nantes fin whale scapula.

- 37 Ces graisses sont aussi constituées de cires et d'esters de cholestérol. Le taux de saturation des acides gras (C16:0, C14:0 et C18:0) est élevé, ce qui est caractéristique des graisses dégradées (Ackman *et al.*, 1965).
- 38 On note de légères variations de proportions en fonction du type d'os et de l'espèce considérée, de l'âge du spécimen et du traitement de dégraissage. Cependant les résultats sont relativement proches de ceux du rorqual du Muséum ; ces os de balénéidés pourront donc être utilisés lors de la définition des paramètres de traitement de dégraissage.

Suivi du traitement par spectroscopie Raman

- 39 Les analyses des os sont réalisées avant et après traitement par FT-Raman. Les résultats sont donnés dans les paragraphes qui suivent, pour chaque traitement testé.
- 40 L'appareillage est un spectromètre Raman Brucker RFS 100 à transformée de Fourier avec un laser ND : YAG ($\lambda = 1064 \text{ nm}$). Les spectres sont obtenus avec une puissance modulée entre 100 et 340 mW, après 100 accumulations dans une gamme spectrale comprise entre 100 et 3500 cm^{-1} et une résolution de 4 cm^{-1} . Les analyses sont réalisées soit directement sur la surface de l'os, soit sur les carottes prélevées à l'aide d'un trocart médical (de 3 mm de diamètre et de 1 à 3 cm de longueur). La surface de mesure est de l'ordre de 1 mm^2 .
- 41 Les spectres obtenus permettent d'identifier des vibrations caractéristiques de la partie minérale, de la partie organique et des graisses (Le Blond *et al.*, 2009) (fig. 6).

Figure 6 : Spectre FT-Raman obtenu sur un os avant traitement avec les pics caractéristiques de la partie minérale, de la partie organique et des graisses.

Figure 6: FT-Raman spectrum of a bone before treatment, with the characteristic peaks of the mineral part, the organic part and of greases.

- 42 La proximité des pics caractéristiques de la partie organique avec ceux caractéristiques des lipides limite leur exploitation. L'intensité des pics caractéristiques de chaque constituant de l'os (960 cm^{-1} pour la partie minérale, $1\,270\text{ cm}^{-1}$ et $2\,940\text{ cm}^{-1}$ pour la partie organique, $2\,850\text{ cm}^{-1}$ et $1\,296\text{ cm}^{-1}$ pour la graisse) est déterminée à partir de la déconvolution des spectres (Foucher, 2010). Le rapport de ces différents pics nous permet d'évaluer l'efficacité du dégraissage (minéral (960 cm^{-1})/ graisse ($2\,850\text{ cm}^{-1}$), collagène ($1\,270\text{ cm}^{-1}$)/ graisse ($2\,850\text{ cm}^{-1}$), protéine ($2\,940\text{ cm}^{-1}$)/ graisse ($2\,850\text{ cm}^{-1}$) et l'impact du traitement de dégraissage sur les composés de l'os (minéral (960 cm^{-1})/ collagène ($1\,270\text{ cm}^{-1}$) et minéral (960 cm^{-1})/protéine ($2\,940\text{ cm}^{-1}$)).

Traitement par voie enzymatique

Principe

- 43 La graisse du squelette de morue du Muséum de Nantes étant déjà dégradée en acides gras libres, l'utilisation des lipases pour dégrader les triglycérides est inefficace. Seule l'option de l'estérification des acides gras dans l'éthanol, catalysée par une lipase est possible :

- 44 L'intérêt de ce traitement réside dans la différence de solubilité des esters éthyliques et des acides gras libres dans l'éthanol. La solubilité d'acides gras libres (acide stéarique [C18:0] et palmitique [C16:0]) et des esters éthyliques correspondants est déterminée dans l'éthanol à partir des mesures d'absorbance par spectrométrie à $\lambda = 620\text{ nm}$ et à λ

= 650 nm. Les résultats (fig. 7) montrent que les esters sont beaucoup plus solubles que les acides gras : à partir de 150 mg/L, les acides gras libres saturant la solution d'éthanol alors que les solutions contenant plus de 500 mg/L d'esters éthyliques ne sont toujours pas saturées (Dubreuil, 2009).

Figure 7 : Mesures d'absorbance des acides palmitique (C16:0) et stéarique (C18:0) sous forme d'acide gras libre (AGL) et son ester éthylique (EE), dans l'éthanol.

Figure 7: Absorptance measurements of the palmitic (C16: 0) and stearic (C18: 0) acids in the form of free fatty acid (AGL) and its ethyl ester (EE), in ethanol.

Sélection des enzymes

Méthodologie

- 45 Les lipases testées par l'I.U.T. de Laval, commercialisées par trois grandes sociétés internationales – Amano (Japon), Novozymes (Danemark) et Sigma-Aldrich (USA), sont :
- 46 – Lipase AY « Amano » 30,
 – Lipase F-AP 15,
 – Lipase M « Amano » 10,
 – Lipase M « Amano » 15,
 – Lipase A,
 – Lipozyme® TL IM,
 – Lipase acrylic resin,
 – Novozymes® 435,
 – Lipozyme® RM IM,
 – Lecitase® NOVO LVN 00013,
 – Lipozyme® TL 100L.
- 47 L'ensemble de ces enzymes sont immobilisées sur des microbilles de résine à l'exception de la Lipozyme® TL 100L qui est sous forme liquide. Les enzymes sont testées sur un mélange d'acide myristique (C14:0) et d'acide oléique (C18:1) dans de l'éthanol anhydre (proportion du mélange 5 (C18:1)/ 1 (C14:0). 20 mg d'enzymes sont ajoutés au mélange d'acides. L'ensemble est thermo-mixé pendant 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 heure ou 2 heures, à température ambiante (agitation 800 rpm). L'efficacité de la réaction enzymatique est évaluée en dosant par CPG la quantité d'esters éthyliques produits.

Résultats et discussion

- 48 L'enzyme DF Amano 15 produit la quantité d'esters éthyliques la plus importante mais d'autres enzymes, comme la Lipase F-AP 15, la Lipase acrylic resin, la Novozyme® 435 ou la Lipozyme® TL 100L, donnent aussi de bons résultats. Par contre, la Lecitase® Novo LVN n'a aucun effet (fig. 8).

Figure 8 : Aires des pics en CPG, proportionnelles à la quantité d'esters éthyliques produits à partir de mélanges d'acides gras.

Figure 8: Surfaces of the peaks in CPG, proportional to the quantity of ethyl esters produced from mixtures of fatty acids.

- 49 Les enzymes immobilisées sur des microbilles se solubilisent difficilement dans l'éthanol et risquent d'avoir des difficultés à pénétrer à l'intérieur des os. Les enzymes sous forme liquide sont donc plus adaptées à notre problématique de traitement de dégraissage, c'est pourquoi dans la suite de l'étude, la lipozyme TL 100L (liquide) sera sélectionnée, en plus de la lipase DF Amano 15 (poudre) qui a donné les meilleurs résultats.

Tests de dégraissage des os aux enzymes

Méthodologie

- 50 Les enzymes sélectionnées sont testées sur des échantillons d'os provenant de la vertèbre grasse du CRMM. Chaque échantillon d'os est immergé dans un pot hermétiquement fermé contenant 40 ml de solution. Les solutions sont composées de :
- 51 – solvant sans enzyme (40 ml d'éthanol),
 – solvant actuellement utilisé pour nettoyer les surfaces d'os gras au Muséum (40 ml acétone),

– solvant avec enzymes (40 ml d'éthanol + 40 mg d'enzymes immobilisées sur microbilles ou 36 ml d'éthanol + 4 ml d'enzymes sous forme liquide).

- 52 Le pot est placé dans une chambre d'incubation agitée à 170 rpm et thermostatée à 30 °C pendant 72 ou 100 heures. Après un bain de dégraissage, les os sont séchés sous hotte, avant d'être pesés et photographiés.

Résultats et discussion

- 53 Les traitements testés pendant 72 ou 100 heures ne permettent pas de dégraisser entièrement les échantillons d'os de vertèbre. Les pertes de masse liées à l'extraction des graisses restent de l'ordre de la dizaine de %. Les résultats obtenus en présence d'enzymes sont peu probants et guère meilleurs que ceux obtenus avec l'éthanol seul (tableau 1).

Tableau 1 : Perte de masse des échantillons d'os traités à l'éthanol, à l'acétone et aux enzymes.
Table 1: Loss of mass of the samples of bones treated with ethanol, acetone and enzymes.

Traitement	Durée	Masse initiale	Masse finale	Perte de masse
Ethanol	72H	17,2550g	15,4088g	10,7%
	2 × 72H		14,3561g	16,8%
	100H	20,1239g	18,2036g	9,5%
Acétone	72H	14,4744g	12,5371g	13,4%
	2 × 72H		12,1003g	16,4%
	100H	10,9699g	8,7949g	19,1%
DF Amano 15	72H	12,9092g	11,0221g	14,6%
	2 × 72H		10,1797g	21,1%
	100H	15,2912g	13,8201g	9,6%
TL 100L	72H	14,2454g	13,3498g	6,3%
	2 × 72H		12,8609g	9,7%
	100H	15,2528g	14,3954g	5,6%

- 54 De plus, les observations visuelles montrent que les dégraissages ne sont pas homogènes (tâches brunes localisées).
- 55 La réaction d'estérification s'effectue dès la première heure ; l'augmentation de la durée de traitement ne favorise pas le dégraissage au cœur de l'os. Les traitements les plus courts ont donc été renouvelés une fois. Les résultats de mesures de pertes de masse montrent que le renouvellement du traitement est bénéfique pour tous les traitements testés, sans exception. De plus, visuellement les échantillons paraissent moins gras en surface.
- 56 Par contre les analyses après traitement par FT-Raman infirment ces observations visuelles : le rapport minéral/lipides est inchangé, ce qui signifie que l'os n'est pas dégraissé (fig. 9).

Figure 9 : Interprétation des analyses par spectroscopie FT-Raman des os avant et après traitement par voie enzymatique ou par immersion dans l'hexane.

Figure 9: Interpretation of the analyses by FT-Raman spectroscopy of the bones before and after treatment by enzymatic way or immersion in hexane.

À gauche, bien que la partie collagène et la partie apatite soient conservées, aucun dégraissage n'est réalisé. À droite, les graphes indiquent un dégraissage mais aussi une dégradation des parties collagène et apatite.

On the left, although the collagenous part and the apatite part are preserved, the bones are not degreased.

On the right, the graphs indicate a degreasing but also a degradation of the collagenous part and apatite.

- 57 Le traitement enzymatique n'est donc pas adapté à notre problématique de dégraissage du squelette du rorqual exposé au Muséum de Nantes. Toutefois ce traitement offre des perspectives intéressantes pour un dégraissage de surface ou pour l'utilisation des lipases avant que les graisses soient dégradées (lors de la préparation des squelettes).

Traitements par solvants

Identification des solvants dégraissants les plus efficaces

Méthodologie

- 58 Le choix du solvant (ou du mélange de solvants) a été réalisé à partir des critères suivants :
- 59 – coûts faibles directs et indirects (stockage, protection des personnes et des biens, recyclage/destruction, désolvantisation),
 – traitement respectueux de l'intégrité physico-chimique des os,
 – solvants fortement dégraissants,
 – solvants facilement éliminables des os après traitement (volatils).
- 60 Mais compte tenu de la nature des graisses à traiter (graisses dégradées) et de la difficulté à les extraire de l'os, il semble impossible de se limiter au choix de solvants non toxiques, non inflammables et respectueux de l'environnement.
- 61 Les solvants testés sont les suivants :

- 62 – les hydrocarbures légers (hexane, heptane),
– le chloroforme,
– le dichlorométhane,
– l'huile de silicone de très faible viscosité,
– l'oléate de méthyle,
– le limonène,
– le mélange chloroforme/méthanol (2/1 et 80/20 v/v),
– le mélange alcane/alcool : heptane/isopropanol (80/20) ou hexane/isopropanol (80/20), proportions indiquées en volume.
- 63 Les essais ont été menés sur des échantillons découpés en cube provenant du cœur d'une vertèbre très grasse du CRMM, en simple immersion, à température ambiante ou en chauffant à 60-80 °C. En raison du nombre limité des échantillons à disposition, les échantillons ainsi traités par Archimex peuvent avoir subi plusieurs traitements successifs. Ils sont finis par un traitement en soxhlet dans un mélange de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (azéotrope : 80/20) afin de réaliser le bilan massique.

Résultats et discussion

- 64 Parmi les solvants non retenus, citons les huiles végétales, le limonène, l'oléate de méthyle et l'huile de silicone qui ne sont pas volatils et nécessiteraient l'utilisation d'un second solvant volatil afin de les extraire de l'os après le traitement. Le limonène pourrait être efficace si on le chauffe à 85 °C, mais c'est un solvant allergène.
- 65 Les solvants les plus efficaces sont (fig. 10) : les mélanges alcane/alcool, le dichlorométhane, les mélanges chloroforme/méthanol (2/1 et azéotrope 80/20 v/v) et, dans une moindre mesure, les alcanes (hexane, heptane).

Figure 10 : Résultats des tests de dégraissage atmosphérique par solvants.

Figure 10: Tests results of atmospheric degreasing by solvents.

- 66 Le dégraissage dans l'heptane à 70-80 °C pendant 24 heures est efficace mais il n'est pas total (86 % de la graisse est extraite). L'hexane à chaud (60-65 °C) pendant 25 heures (soit 200 cycles en soxhlet) a une efficacité voisine (88 % de la graisse est extraite). L'utilisation d'un alcane à chaud nécessite des conditions indispensables de sécurité qu'offre la technique du soxhlet, mais celle-ci n'est pas envisageable pour le traitement d'un os entier. L'utilisation de l'hexane en simple immersion à température ambiante reste efficace, le dégraissage n'est pas total mais les 2/3 de la graisse sont tout de même extraits. La graisse brune est extraite, il ne reste plus dans l'os qu'une graisse blanche solide (fig. 11).

Figure 11 : Extraits obtenus lors des traitements par immersion dans les mélanges alcane/isopropanol (80/20) sous pression et échantillons d'os avant et après traitement.

Figure 11: Extracts obtained with the treatments by immersion in the alkane/isopropanol (80/20) mixtures under pressure and samples of bone before and after treatment.

- 67 Cette solution, simple d'utilisation, peut être adaptée au traitement d'os entiers. Cependant l'hexane est un solvant toxique.
- 68 Les mélanges alcane/alcool à 80 °C sont très efficaces : le mélange heptane/isopropanol (80/20) a été testé en simple immersion pendant 6 heures (96 % de la graisse est extraite). Le risque de ce traitement est de déshydrater l'os en raison de la présence de l'isopropanol.
- 69 Les solvants chlorés sont très efficaces. Le dichlorométhane a été testé en soxhlet à 35 °C (89 % de la graisse est extraite) et le mélange chloroforme/méthanol a été testé en simple immersion pendant 2 mois à température ambiante (environ 96 % de la graisse est extraite) ou en soxhlet à 45-50 °C (dégraissage considéré comme total).
- 70 On note que la graisse à extraire est particulièrement figée et faiblement soluble à température ambiante. Il est impossible de l'extraire totalement sans utiliser le traitement par $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (azéotrope) en soxhlet à 45-50 °C pendant 15 à 90 cycles. Les quantités de graisse à extraire sont très importantes, elles représentent 40 à 50 % de la masse des échantillons.
- 71 Les analyses FT-Raman de ces échantillons montrent que ces traitements ne sont pas sans impact sur les différents composés de l'os. Les rapports minéral/protéines augmentent d'un facteur 1-2 à 4 (fig. 9). Cependant, les altérations les plus importantes sont constatées sur les échantillons ayant subi le plus grand nombre de cycles de soxhlet par $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$. Cette étape de finition n'est donc pas sans conséquence sur l'intégrité de l'os, et il est dès lors difficile de connaître l'impact réel des autres solvants testés. C'est pourquoi cette étape de finition ne sera plus réalisée sur les prochains os traités à Archimex.

Extraction par solvants sous pression

Principe et méthodologie

- 72 Les essais sous pression sont réalisés en autoclave à 75 °C, sous pression variable d'azote, dans le mélange le plus efficace : hexane/isopropanol 80/20 v/v (T ébullition : 62 °C à pression atmosphérique). L'os subit des séquences d'oscillations successives de pression d'azote entre 5 et 10 bar, entrecoupées de temps de macération. Les oscillations de pression créent des turbulences qui favorisent l'extraction des graisses. L'étape finale d'extraction consiste à amener brusquement à pression atmosphérique l'os immergé dans le solvant à l'état subcritique (température de traitement supérieure à la température d'ébullition). En d'autres termes, cette brusque détente provoque, au cœur de l'os, une ébullition qui expulse les derniers résidus de graisse.

Résultats et discussion

- 73 Les essais menés montrent que les oscillations de pression créent des turbulences qui favorisent l'extraction des graisses. Le dégraissage par le mélange hexane/isopropanol à l'état subcritique (T traitement : 75 °C ; T ébullition : 62 °C) est rapide (quelques heures) et très efficace. Malgré ces résultats probants, l'utilisation d'un autoclave pour des os entiers reste peu envisageable (conditions de sécurité et coût d'un autoclave de grandes dimensions trop importants).

Extraction par CO₂ supercritique

Principe et méthodologie

- 74 Le CO₂ est un solvant liposolubilisant ; les éléments protéiques sont par contre insolubles dans le CO₂, cette méthode est donc *a priori* sans risque pour la partie organique de l'os. Elle permet des extractions sélectives sans dénaturer le matériau grâce aux conditions de température modérées. Le CO₂ est un gaz non-toxique, ininflammable, inerte, inodore, incolore et insipide. Son utilisation ne génère pas de résidus polluants. C'est un gaz peu coûteux.
- 75 La taille réduite de la molécule, une faible masse molaire, une structure peu fonctionnalisée et un caractère ionique faible sont autant de facteurs de solubilité dans le CO₂ supercritique. À titre de référence, à 250-300 bar et 35-40 °C, les triglycérides ont une solubilité de l'ordre de 1 % dans le CO₂. Les acides gras libres sont donc plus solubles sous réserve qu'ils ne soient pas trop fonctionnalisés par des dégradations oxydatives. Les phospho- et glycolipides sont en revanche insolubles en raison de leur caractère ionique ou de leur polarité. Les stérols sont très faiblement solubles et ne peuvent être extraits qu'en ajoutant quelques pourcentages d'éthanol au CO₂ supercritique.
- 76 L'extraction par CO₂ a été testée sur un échantillon d'os découpé en cube provenant du cœur d'une vertèbre très grasse du CRMM à 37-39 °C (19,4 kg de CO₂, densité : 0,91-0,94) et sur le même échantillon imprégné d'éthanol à 36-38 °C (12 kg de CO₂, densité : 0,92-0,94).

Résultats et discussion

- 77 L'utilisation de CO₂ supercritique avec ou sans co-solvant s'est en fait révélée inefficace sur nos graisses dégradées. Le traitement par CO₂ supercritique ne peut donc être appliqué dans notre cas.
- 78 De plus, les écueils prévisibles de ce traitement sont :
- 79 – une dépressurisation trop brusque, en fin d'essai, qui provoquerait l'éclatement de l'os,
– l'acidité carbonique générée par le CO₂ au contact de l'eau de constitution de l'os et qui risquerait de provoquer une attaque chimique,
– une dessiccation excessive de l'os au contact du CO₂ ou de certains co-solvants hydrophiles comme l'éthanol,
– le volume maximal des enceintes de traitement ; l'extracteur le plus grand est de l'ordre de 500 litres (2,70 m x diam 50 cm), ce qui ne permet pas de traiter les os du rorqual. Le coût des équipements est élevé et compte tenu du volume à traiter, la fabrication d'une enceinte sur mesure multiplierait le coût du traitement.
- 80 Le traitement par CO₂ supercritique reste malgré tout une solution intéressante tant pour le dégraissage que pour une désolvantisation poussée des os déjà traités par solvants.

4. Bilan et perspectives

- 81 Les analyses des graisses du squelette de rorqual du muséum de Nantes et des os de balénidés utilisés pour nos tests ont montré que les graisses à extraire sont dégradées en acides gras libres. Ces graisses sont aussi constituées de cires et d'esters de cholestérol. La diversité et la quantité de graisse à extraire (environ 50 % de la masse de l'os) rendent très difficile la mise au point d'un traitement de dégraissage. Après cette première année de campagnes d'essais, aucune solution entièrement satisfaisante n'est apparue.
- 82 Le nombre de solvants efficaces pour extraire ces graisses est en fait limité :
- 83 – chloroforme/alcool, efficace à température ambiante mais non sans risque d'altération de l'os,
– alcane/alcool, efficace à chaud,
– alcanes, efficaces à chaud et, dans une moindre mesure, à température ambiante.
- 84 Aucun ne donne totalement satisfaction par rapport au cahier des charges initial. Seul un compromis entre efficacité du dégraissage et respect de l'intégrité de l'os semble envisageable. Il faut donc judicieusement choisir entre la durée du traitement et l'ajout d'un moteur d'extraction (agitation, chauffage et/ou mise sous pression). Il est parfois préférable d'utiliser des solutions plus efficaces et plus réactives avec les autres composés de l'os mais sur des temps plus courts.
- 85 Le dégraissage rapide des pièces de petite taille est possible en simple immersion sous agitation à pression atmosphérique. Le dégraissage rapide des pièces de grandes dimensions nécessite l'utilisation d'un moteur d'extraction. La pression est un excellent moteur d'extraction mais les installations sont difficilement gérables (coût et sécurité) pour les pièces de grandes dimensions. À cause des conditions de sécurité, le chauffage des solutions est aussi difficilement envisageable, même dans des bacs étanches. Il sera donc nécessaire d'augmenter la durée du traitement. La nature des graisses obligera à envisager de forer les os entiers pour favoriser les transferts de matière et réussir à les dégraisser.
- 86 Pour le squelette de rorqual du Muséum, on optera donc pour un traitement de mise en œuvre simple et peu coûteuse : macération dans l'hexane à température ambiante en faisant varier les paramètres suivants : agitation intermittente ou permanente, durée du traitement, nombre de renouvellements du solvant, nettoyage final (utilisation d'un mélange hexane/isopropanol).
- 87 Le protocole de dégraissage sera déterminé en testant ce traitement sur un os entier. Le solvant sélectionné étant toxique et inflammable, on veillera au respect de l'environnement et du personnel réalisant le traitement, selon un cahier des charges qu'il reste à définir.
- 88 Les analyses des os après traitement par spectroscopie Raman seront poursuivies. Ces analyses restent qualitatives pour le suivi de l'efficacité du dégraissage. Il est donc indispensable de développer un autre outil : la Chromatographie en Phase Gazeuse pour le dosage des graisses présentes dans l'os. L'analyse des différents extraits de graisse sera aussi réalisée par chromatographie afin d'identifier les différentes compositions de ces graisses (graisses brunes et résidu blanc).

Les auteurs tiennent à remercier Pierre Watelet, conservateur du Muséum de Nantes, qui a initié cette recherche ; le Ministère de la Culture et de la Communication pour son support financier

dans le cadre d'un programme PNRCC ; Willy Dabin, du Centre de Recherche des Mammifères Marins (CRMM) de La Rochelle, et Pierre-Henri Fontaine (biologiste, spécialiste des mammifères marins et conservateur du Musée du squelette de l'Île Verte, Québec), pour les échantillons d'os de balénidés mis à disposition pour cette étude ; Jean-Yves Mevellec, Ingénieur de Recherche de l'Institut des Matériaux de Nantes (IMN) pour les analyses FT-Raman ; ainsi que tous les stagiaires (Laurence Dubreuil, Sabine Le Blond, Claire Musso, Delphine Morvan et Thibaut Foucher) qui ont contribué à cette étude.

BIBLIOGRAPHIE

- ACKMAN, R. G., EATON, C. A. et JANGAARD, P. M., 1965. Lipids of the whale (*Balaenoptera physalus*) from north atlantic waters. *Canadian Journal of Chemistry*, 43 (9), p. 1513-1520.
- ALLEN, N., EDGE, M. et HORIE, C., 1991. *Polymers in Conservation*. Royal Society of Chemistry.
- CARTER, D. et WALKER, A., 1999. *Care & Conservation of natural history collections*. Butterworth-Heinemann, Oxford.
- DUBREUIL, L. 2009. Mise au point d'un traitement de dégraissage d'un squelette de rorqual commun exposé au Muséum d'Histoire Naturelle de Nantes. Rapport de Stage d'IUT Génie Biologique de Saint Brieuc, réalisé à l'IUT de Laval.
- FERNÁNDEZ-JALVO, Y. et MONFORT, M. D. M., 2008. Experimental taphonomy in museums: Preparation protocols for skeletons and fossil vertebrates under the scanning electron microscopy. *Geobios* 41, p. 157-181.
- FOUCHER, T., 2010. *Suivi des traitements de dégraissage de squelette de baleine par spectroscopie Raman : optimisation du protocole*. Rapport de Stage de l'IUT Chimie Poitiers, réalisé à Arc'Antique.
- LE BLOND, S., GUILMINOT, E., LEMOINE, G., HUET, N. et MEVELLEC, J.-Y., 2009. FT-Raman spectroscopy: A positive means of evaluating the impact of whale bone preservation treatment. *Vibrational Spectroscopy*, 51, p. 156-161.
- MORVAN, D., 2010. *Dégraissage d'un squelette de baleine : Analyse des lipides et mise au point d'un traitement enzymatique*. Rapport de Stage de Licence Professionnelle Chimie Analytique mention Environnement de Clermont Ferrand, réalisé à l'IUT de Laval et à Arc'Antique.
- RUCHONNET, D., BOUTOUTE, M., GUINET, C. et MAYZAUD, P., 2006. Fatty acid composition of Mediterranean fin whale *Balaenoptera physalus* blubber with respect to body heterogeneity and trophic interaction. *Marine Ecology Progress Series*, 311, p. 165-174.
- SLOVER, H. T. et LANZA, E., 1979. Quantitative analysis of food fatty acids by capillary gaschromatography, *Journal of the American Oil Chemist Society*, 56, p. 933-943.
- WILLIAMS, S., 1999. Destructive preservation: a review of the Effect of Standard Preservation Practices on the Future Use of Natural History Collections. Göteborg.
- YUNOKI, K., ISHIKAWA, H., FUKUI, Y. et OHNISHI, M., 2008. Chemical properties of epidermal lipids, especially sphingolipids, of the Antarctic minke whale. *Lipids*, 43, p. 151-159.

NOTES

1. Macération des os dans l'eau (action des bactéries) pendant dix-huit mois, nettoyage à l'eau chaude et haute pression, test de cuisson des os, dégraissage par bain de mélanges de solvants (trichloréthane et chloroforme) pendant six mois, blanchiment à l'eau de javel et rinçage.
 2. Nomenclature des acides gras : le premier chiffre correspond au nombre de carbones, le second chiffre correspond au nombre d'insaturation(s).
 3. Dans la littérature, généralement la description de la préparation des squelettes ne dissocie pas la phase d'écharnage de celle du dégraissage des os. Ces données bibliographiques ont été complétées grâce à un questionnaire envoyé par Arc'Antique en 2007 auprès de la communauté des préparateurs ostéologiques, taxidermistes et conservateurs confrontés à cette problématique de squelettes gras.
-

RÉSUMÉS

Les techniques de dégraissage des collections ostéologiques ne donnent pas toujours entière satisfaction. De nombreux muséums d'histoire naturelle sont confrontés à la problématique des squelettes gras. C'est le cas du rorqual commun exposé au Muséum de Nantes. La présence de graisses dans l'os et à sa surface posent un problème d'esthétique (coloration brune), mais surtout de conservation de l'os : la graisse favorise le développement de micro-organismes et son évolution chimique peut altérer l'os. Un traitement de dégraissage est donc nécessaire. Les graisses à extraire sont dans un premier temps identifiées par Chromatographie sur Couche Mince et Chromatographie en Phase Gazeuse. Plusieurs traitements de dégraissage sont ensuite explorés : la voie enzymatique, les solvants et le CO₂ supercritique. Le choix du protocole de traitement dépend de son efficacité et de l'impact de la solution de dégraissage sur les composants de l'os. Ces travaux sont donc associés à l'étude de l'altération de l'os après traitement, par spectroscopie FT-Raman.

The degreasing methods used for osteological collections are not always completely satisfactory. Many natural history museums are confronted with the problem of fatty skeletons. It is the case of the fin whale of the Nantes Natural History Museum. Fatty bones are unaesthetic (brown colouring), but it is especially a problem of bone conservation: fat allows the development of micro-organisms and a chemical evolution may deteriorate the bone. A degreasing treatment is necessary. Fats to be extracted are initially identified by Thin Layer Chromatography and Gas Chromatography. Several treatments of degreasing are then explored: enzymatic way, solvents and supercritical CO₂. The choice of the protocol of treatment depends on its effectiveness and on the impact of the degreasing solution on the components of the bone. This work is thus associated with the study of the deterioration of the bone after treatment, by FT-Raman spectroscopy. The control of the effectiveness of degreasing will be lead by Gas Chromatography.

INDEX

Mots-clés : dégraissage, Raman, os gras, baleine

Keywords : degreasing, fatty bones, Raman, fin whale

AUTEURS

ÉLODIE GUILMINOT

Ingénieur de recherche. Arc'Antique, 26 rue de la Haute-Forêt, 44 300 Nantes.

(elodie.guilminot@arcantique.org)

GWENAËL LEMOINE

Conservatrice-restauratrice. Arc'Antique – 26 rue de la Haute-Forêt, 44 300 Nantes.

(arcantique.organique@orange.fr)

CHARLÈNE PELE

Apprentie ingénieur. Arc'Antique – 26 rue de la Haute-Forêt, 44 300 Nantes.

(arcantique.recherche@wanadoo.fr)

LAURENT POISSON

Chef du département Génie Biologique. Laboratoire des Lipases de l'Université du Maine, IUT

Laval – 52 rue des Docteurs-Calmette-et-Guérin, BP 2045, 53 020 Laval Cedex 09.

(laurent.poisson@univ-lemans.fr)

MICHEL SURBLED

Anciennement à Archimex, Vannes (56).