



La biocontamination des documents graphiques détecter, prélever, analyser

Malalanirina S Rakotonirainy

► To cite this version:

Malalanirina S Rakotonirainy. La biocontamination des documents graphiques détecter, prélever, analyser. Support Tracé, 2018, 18. hal-02947927

HAL Id: hal-02947927

<https://hal.science/hal-02947927>

Submitted on 29 Sep 2020

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

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

La biocontamination des documents graphiques

détecter, prélever, analyser

Malalanirina Sylvia Rakotonirainy*

Cette première journée d'étude consacrée à la biocontamination a été organisée par l'ARSAG en hommage à Françoise Flieder. La lutte contre la contamination fongique a été pour elle un combat important qu'elle a poursuivi sans relâche, autant que les responsabilités de directrice du CRCDG le lui permettaient. Ce fut alors une grande satisfaction quand, en 1992, le ministère de la Culture accorda au laboratoire un poste d'ingénieur en microbiologie. À partir de là, les études purent se diversifier et se développer.

Nous nous sommes préoccupés en premier lieu de la désorption de l'oxyde d'éthylène sur différents maté-

riaux, car plusieurs articles avaient été publiés sur ses effets cancérogènes. En même temps, nous avons étudié les solutions alternatives à ce composé, ce qui nous a amenés à tester comparativement les rayons gamma, les rayons bêta, les micro-ondes et le CO₂ supercritique. La recherche sur la qualité et le traitement de l'air dans les locaux de stockage n'a pas été en reste. Plusieurs études ont concerné la détection précoce des contaminations. Grâce à l'ARSAG, elles furent complétées sur le terrain par des campagnes de sensibilisation à la connaissance et la prévention des moisissures auprès des restaurateurs et des conserva-

* Centre de recherche sur la conservation (CRC, USR 3224), Sorbonne universités, MNHN, MIC, CNRS, CP 21, Paris, France

teurs. Malheureusement et malgré des décennies de sensibilisation, le risque biologique reste encore sous-évalué dans la gestion des collections.

Nous donnerons quelques définitions et introduirons la notion de biocontamination des documents graphiques par les micro-organismes. Qui sont-ils, comment les détecter, les prélever et les analyser ?

La biocontamination

La contamination est la présence d'un élément indésirable dans un fluide, sur une surface ou dans un espace protégé. Cet élément, qui peut être une particule chimique ou biologique, entraîne une perturbation d'ordre qualitatif ou quantitatif qui peut être observée immédiatement ou se révéler ultérieurement. On parle de biocontamination quand il s'agit de micro-organismes, et d'aérobiocontamination quand ceux-ci sont aéroportés. Les micro-organismes sont des organismes invisibles à l'œil nu, unicellulaires ou multicellulaires, qui ne peuvent donc être identifiés qu'à l'aide d'un microscope (ASPEC, 2008).

L'air n'étant pas stérile, les micro-organismes sont omniprésents autour de nous, à l'extérieur mais également à l'intérieur des bâtiments. L'air extérieur qui entoure les locaux est une source non négligeable de polluants biologiques qui pénètrent par les ouvrants ou à cause de problèmes d'étanchéité. Cependant, les collections, les fluides, les installations de traitement de l'air, les appareillages, les personnes, les insectes, sont également des vecteurs importants de micro-organismes. Leur qualité et leur quantité dans l'air varient suivant les saisons. Pour les moisissures par exemple, le taux de spores dans l'air extérieur est en général au maximum en août et au minimum en novembre-décembre. Les valeurs maximales sont estimées aux environs de 1000 spores par m³ d'air. Le taux dans l'air varie également selon que l'on est en ville ou à la campagne.

Pour les moisissures, certains genres sont caractéristiques de l'air intérieur comme *Aspergillus*, *Penicillium* tandis que d'autres sont représentatifs de la flore extérieure comme *Cladosporium* ou *Alternaria*.

L'exposition des documents à ces polluants biologiques est un facteur de risque important (Flieder F., Capderou C., 1999). Ils peuvent en effet dégrader, détériorer, voire détruire tous les matériaux qui les constituent.

Nature des micro-organismes

On trouve deux types de micro-organismes dans les collections de documents graphiques : les bactéries et les levures/moisissures. Ce qui distingue les deux ? Les bactéries sont des procaryotes, sans véritable noyau, leur matériel génétique est organisé sous la forme d'un nucléoïde. Ce sont des organismes unicellulaires, aérobies ou anaérobies, autotrophes ou hétérotrophes. Les levures/moisissures sont des eucaryotes, leur matériel génétique est enfermé dans un noyau. Ce sont des organismes aérobies, hétérotrophes car dépourvus de chlorophylle, ils ne peuvent pas comme les plantes synthétiser leur matière organique à partir du CO₂ atmosphérique et doivent donc puiser dans le milieu ambiant l'eau et les substances organiques et minérales nécessaires à leur propre synthèse.

Les conditions de croissance des micro-organismes

Outre les besoins nutritifs spécifiques à chaque espèce, un certain nombre de facteurs vont déterminer la croissance des micro-organismes et favoriser la biocontamination : la composition de leur substrat, leur métabolisme et les conditions environnementales.

En ce qui concerne les besoins nutritifs, la bactérie a besoin de carbone, d'hydrogène, d'azote, de soufre et de phosphore ainsi qu'en moindres quantités, de nombreux autres éléments tels que le potassium, le sodium, le calcium, le magnésium, le fer ou le manganèse. La capacité d'une bactérie à utiliser un nutriment déterminé dépend de l'existence d'un système enzymatique de dégradation adéquat et d'un processus d'entrée (perméase) du nutriment dans la cellule. Pour les moisissures, les éléments les plus importants quantitativement pour la croissance cellulaire sont le carbone, l'azote, l'hydrogène, l'oxygène, le potassium, le phosphore, le magnésium, le soufre et le calcium. Les moisissures ont également besoin d'oligo-éléments (cuivre, fer, molybdène, manganèse...), de vitamines, de sels minéraux, etc. Certains éléments vont pouvoir passer directement dans la cellule (vitamines), d'autres (amidon, cellulose) seront transformés par des enzymes (amylases, cellulases) avant ce passage.

Que ce soient les bactéries ou les moisissures, les micro-organismes doivent avoir l'arsenal enzymatique nécessaire pour dégrader le substrat, mais ceux qui produisent les enzymes spécifiques sont plus aptes à le dégrader que les autres.

La température de l'environnement détermine le type de reproduction, la morphologie et parfois les éléments

nutritifs nécessaires à la croissance des micro-organismes. On définit plusieurs classes suivant la gamme de température dans laquelle ils se développent, mais la majorité des espèces retrouvées sur les documents graphiques et dans les locaux de stockage sont mésophiles : elles se développent préférentiellement à des températures comprises entre 30 et 40 °C pour les bactéries, et entre 15 et 40 °C pour les levures/moisissures.

La plupart des bactéries sont neutrophiles et se développent à des pH compris entre 5,5 et 8. Il existe néanmoins des bactéries acidophiles se développant à des pH très bas (1-6), et des bactéries alcalinophiles qui se développent à des pH de 8,5-11,5. Les levures et moisissures sont peu sensibles au pH, mais la majorité a une croissance optimale à pH 5,5-6.

Cependant, le facteur le plus important pour la croissance des micro-organismes est l'eau qui constitue 90% de leur poids. L'eau est l'élément essentiel des échanges de substances avec l'environnement et c'est le solvant dans lequel toutes les réactions métaboliques se font. L'activité en eau (a_w) du substrat est très importante car elle détermine la quantité d'eau disponible pour que le micro-organisme puisse se développer. La quantité d'eau du substrat est étroitement liée à l'humidité relative de l'environnement : il y a un échange permanent entre les matériaux et l'environnement, jusqu'à ce qu'un équilibre entre les deux soit atteint. L'activité en eau et l'humidité relative à l'équilibre (ERH) sont liées par la relation :

$$a_w = \frac{\text{ERH}}{100}$$

Ainsi une humidité relative de 65% correspond à une activité en eau de 0,65.

Le développement des bactéries nécessite une activité en eau comprise entre 0,99 et 0,91 (fig. 1) ; elle se situe entre 0,99 et 0,85 pour les levures, et entre 0,99 et 0,80 pour les moisissures. Mais il existe des espèces xérophiles capables de se développer sur des substrats secs ayant une activité en eau comprise entre 0,85 et 0,65. On voit ainsi que si les bactéries ne peuvent se développer qu'à des taux d'humidité très élevés, ce n'est pas le cas des moisissures qui peuvent croître à partir d'une humidité relative de 65%. Sauf en cas d'inondation, on rencontre donc peu de contamination bactérienne dans les collections de documents graphiques.

La contamination fongique, en revanche, est l'un des fléaux récurrents des lieux de stockage et d'exposition ; elle représente pour eux un vrai risque. Les moisissures sont en effet omniprésentes dans leur environnement, et les matériaux de nature organique qui entrent dans la composition des documents graphiques sont des nutriments de choix. Nous n'aborderons donc ici que le cas des moisissures.

Aspect de la contamination fongique

Le développement fongique sur un document peut prendre plusieurs aspects : poudreux, duveteux ou filamenteux, présence de taches colorées allant du beige au noir, rose, ou jaune (fig. 2). Du fait de leur caractère microscopique, il est relativement difficile de repérer de façon certaine des moisissures sur un support car les taches de pigmentation peuvent être dues à d'autres types de dégradation. Dans tous les cas, rien que par l'aspect extérieur, il est pratiquement impossible de déterminer si elles sont actives ou pas sans faire de prélèvements et de mises en culture, ou analyser leur viabilité par d'autres méthodes de détection (ATPmétrerie, Pétrifilms™, cytométrie de flux, etc.). Les moisissures sont des champignons microscopiques. Leur appareil végétatif, appelé thalle, est formé d'une multitude de filaments ramifiés dont l'ensemble constitue le mycélium. Chacun de ces filaments est un hyphe. Les hyphes sont cloisonnés ou pas selon les groupes ; leur paroi, qui contient de la chitine ou de la cellulose, est plus ou moins épaisse et structurée. La perméabilité de cette paroi est un facteur très important dans le développement du champignon, car c'est à travers elle que s'effectuent les échanges avec le

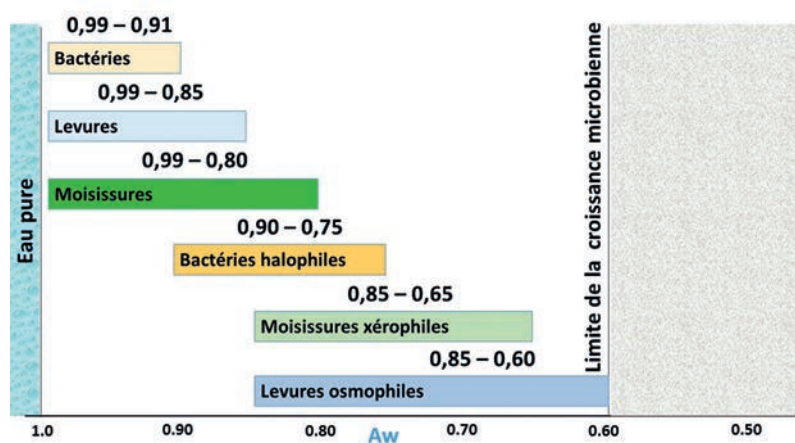


Figure 1. L'activité en eau (a_w) des bactéries, levures et moisissures



Figure 2. Les différents aspects de la contamination fongique © CRC.

substrat. Les hyphes ont une croissance apicale et une ramification latérale. Les parties apicales faiblement différenciées, sont fragiles et perméables, notamment aux composés chimiques. C'est pour cela qu'un traitement antifongique sera d'autant plus efficace que la moisissure est jeune.

Les moisissures se multiplient grâce à des spores et des conidies qui résultent d'une reproduction asexuée ou sexuée (fig. 3). Les deux modes de reproduction peuvent être simultanés sur le même thalle, ou dissociés. Les spores sont des organes de propagation, mais également de résistance. Selon l'espèce, elles mesurent de 1 à 200 μm et peuvent être facilement disséminées par les mouvements d'air, les contacts, les frottements... Elles sont entourées d'une paroi plus

ou moins épaisse et sont ainsi susceptibles de rester plusieurs mois, voire plusieurs années, à l'état latent jusqu'à ce que les conditions environnementales soient favorables à leur germination.

Le cycle d'une contamination

Lorsque les conditions sont favorables à leur développement, les spores qui se sont déposées sur les matériaux vont germer en quelques heures et donner naissance à un tube germinatif qui deviendra un filament mycélien. Ce filament va d'abord croître en surface et peut pénétrer dans le substrat s'il possède des enzymes appropriées. La dégradation provoquée est à la

fois physique et chimique : dégradation physique causée par la pénétration et la propagation des filaments mycéliens dans le substrat, ce qui désorganise les fibres de cellulose du papier par exemple, puis dégradation chimique due à la sécrétion d'enzymes. Les filaments mycéliens vont rapidement former un réseau pour coloniser des surfaces plus importantes. Lors de cette phase de croissance, la moisissure va libérer dans le substrat les composés issus de son métabolisme, tels que des toxines, des pigments et d'autres substances chimiques diverses souvent acides, ce qui entraîne une dégradation caractéristique de l'acidité. Après quelques heures à quelques jours suivant les espèces, la moisissure va sporuler. Ces spores seront disséminées dans l'air au moindre courant d'air, vont

se déposer sur d'autres substrats où elles pourront rester plusieurs mois à l'état de latence et résister à des conditions défavorables.

Ce cycle de contamination peut aller très vite en fonction des paramètres thermo-hygrométriques et de la disponibilité en éléments nutritifs. Une bibliothèque peut ainsi se contaminer entièrement en un week-end.

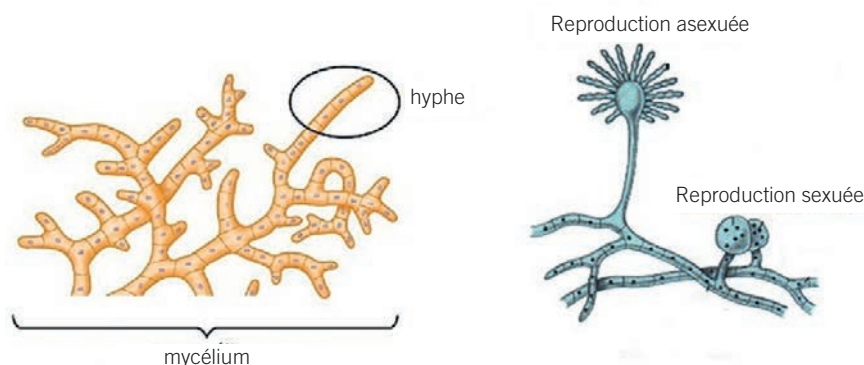


Figure 3. Structure du mycélium et mode de reproduction des moisissures © CRC.

Prélèvement des moisissures

Pour avoir une idée exacte de la vitalité des micro-organismes sur les objets, il est indispensable de réaliser des prélèvements (Rakotonirainy M. S., 1993). Les techniques de détection utilisées reposent sur la culture de particules recueillies, donnant naissance à des colonies visibles à l'œil nu sur un milieu nutritif approprié. Les résultats sont exprimés en nombre d'unités formant colonies par unité de volume (UFC/m³) ou de surface (UFC/cm²) selon qu'on analyse l'air ou les surfaces.

Analyse de l'air

La recherche des contaminants atmosphériques est réalisée par impaction ou par sédimentation. L'impaction se fait à l'aide d'un biocollecteur d'air et consiste à aspirer un volume d'air donné au travers d'une surface perforée ; les particules biologiques en suspension dans cet air viennent se coller sur un milieu de culture contenu dans une boîte de Pétri placée dans l'instrument. Après un temps d'incubation (en général de 3 jours), les colonies sont visibles. Cette méthode est à la fois quantitative et qualitative car on peut identifier les espèces collectées si nécessaire.

La sédimentation consiste à recueillir sur un milieu de culture les micro-organismes qui se déposent sur les surfaces. Suivant l'intensité des mouvements de l'air, les micro-organismes de l'atmosphère se déposent à une vitesse qui dépend de leur forme, de leur taille mais aussi du degré hygrométrique. En atmosphère calme, ils ont tendance à descendre verticalement et rapidement, formant sur les surfaces un inoculum important qui n'est pas toujours détectable par les analyses d'air mais qui est susceptible d'entrer en croissance si les facteurs environnementaux le permettent. Toutes les souches ne se déposant pas sur les surfaces, la méthode par sédimentation est surtout un marqueur des micro-organismes présents dans l'air et susceptibles de se déposer sur un substrat et, par conséquent, de présenter un risque pour les matériaux. Les boîtes de Pétri contenant un milieu de culture sont laissées ouvertes au sol pendant 1 heure, elles sont ensuite incubées pendant 2 à 7 jours selon la croissance des souches et le niveau d'envahissement des boîtes. Les colonies développées sont alors comptées (exprimées en nombre d'UFC/h) puis identifiées. Cette méthode est à la fois quantitative et qualitative.

Analyse des surfaces

Pour échantillonner les surfaces, on utilise deux méthodes d'empreintes : les boîtes de contact de type RODAC et les Pétrifilms™. Les boîtes RODAC sont

indiquées quand il s'agit de surfaces bien planes et imperméables. Pour prélever les spores, le dessus gélosé de la boîte est appliqué pendant une dizaine de secondes sur la surface à échantillonner. Les boîtes sont ensuite refermées et incubées dans une étuve microbiologique à 23-26 °C. Les colonies développées sont comptées au bout d'une semaine (exprimées en nombre d'UFC/cm²).

Il est également possible d'utiliser des Pétrifilms™ (Rakotonirainy M. S., 2017). Ce sont des films prêts à l'emploi, enduits d'un milieu de culture gélifié déshydraté dont la composition dépend des micro-organismes recherchés. Pour prélever les spores, il faut d'abord réhydrater le Pétrifilm™ avec 1 mL d'eau distillée et attendre 1 heure à température ambiante que le milieu se solidifie. On soulève ensuite le film supérieur afin de décoller la gélose et on applique soigneusement celle-ci sur la surface à contrôler. L'avantage des Pétrifilms™ réside dans le fait qu'ils peuvent être incubés pendant 2 à 3 jours à température ambiante ; il n'est donc pas nécessaire de faire appel à un laboratoire spécialisé pour avoir une évaluation rapide du niveau de contamination. Cette méthode ne permet pas l'identification des souches. Les résultats sont exprimés en nombre d'UFC/cm².

Les surfaces peuvent également être échantillonnées par écouvillonnage. Le prélèvement est réalisé à l'aide d'un écouvillon se présentant sous la forme d'une tige en bois ou en plastique avec une extrémité en coton ou en matériau synthétique.

Cette méthode consiste à arracher les micro-organismes de leur support par frottement, mais son efficacité dépend beaucoup de l'opérateur qui la met en œuvre. L'utilisation de deux écouvillons successifs sur la même surface peut permettre de diminuer ce biais. On utilise préférentiellement des écouvillons secs mais sur des rayonnages, on peut les humidifier légèrement avec de l'eau stérile pour faciliter le décollement des micro-organismes. Afin de quantifier le niveau de contamination, les prélèvements peuvent être réalisés sur une surface définie. Les échantillons prélevés sont ensuite ensemencés sur des milieux nutritifs, puis incubés. On peut aussi ensemer les échantillons sur des Pétrifilms™, ce qui est bien pratique.

Ces méthodes culturales ne donnent pas de résultats fiables car seuls 10 % des micro-organismes poussent et sont détectés.

Une alternative à la méthode culturale est l'ATPmétrie, c'est-à-dire le dosage de triphosphate par bioluminescence (Rakotonirainy M. S., 2004). L'ATP sert à transporter et stocker l'énergie des cellules vivantes, il a une concentration constante et n'est plus synthétisé à la

mort des cellules. C'est donc un marqueur de viabilité. Le dosage en lui-même consiste à mettre en présence un échantillon à analyser avec une enzyme appelée luciférase qui réagit avec l'ATP en émettant une lumière fluorescente quantifiable avec un luminomètre. Le résultat est exprimé en unité relative de lumière (ULR ou RLU en anglais). Le nombre d'ULR est directement proportionnel à la concentration d'ATP dans les cellules.

Il existe dans le commerce des kits d'ATPmétrie prêts à l'emploi, très pratiques (Rakotonirainy M. S., 2016). Malheureusement, ils ont été développés pour extraire l'ATP des cellules bactériennes, et les résultats peuvent parfois ne pas être fiables sur des cellules fongiques, dont les parois cellulaires sont différentes de celles de bactéries. Ces kits peuvent néanmoins être utilisés pour contrôler l'efficacité d'un traitement ou d'un dépoussiérage. Les prélèvements des échantillons se font par écouvillonnage. Cette méthode ne permet pas l'identification des souches.

Analyse des documents

Lorsqu'il s'agit d'un ou de quelques documents isolés, l'identification des espèces n'est vraiment pas nécessaire car les traitements proposés ne sont pas spécifiques (Rakotonirainy M. S., 2007). Cependant, elle l'est quand on est en présence d'une contamination de grande ampleur. L'identification peut alors s'avérer indispensable pour définir le plan d'action contre les moisissures ou évaluer les risques pour la santé. Certaines espèces fongiques sont à l'origine de pathologies plus ou moins graves. L'identification des souches permet de savoir si on est en présence d'espèces particulières ou pas, ce qui peut donner des indices sur les sources de la contamination ainsi que sur sa vitesse de propagation.

L'identification des champignons repose sur un examen macroscopique et microscopique des colonies. Elle consiste à observer la morphologie des spores et des structures qui leur donnent naissance. Plus lourde mais fréquemment utilisée aussi, est l'identification par analyse de l'ADN (Rakotonirainy M. S. *et al.*, 2011). Ce type d'analyse requiert une structure de laboratoire spécialisée, du matériel spécifique et du personnel qualifié.

Prévention de la contamination fongique

Pour empêcher le développement des moisissures et des micro-organismes en général, quelques règles simples sont résumées ci-dessous.

- Réduire le nombre de micro-organismes entrants :
 - Maintenance structurelle du bâtiment
 - Limitation des ouvertures extérieures
 - Contrôle des collections entrantes
- Limiter les contacts entre les micro-organismes et les collections :
 - Protection des documents dans des conditionnements appropriés
 - Mise en place de procédures pour les mouvements, le stockage, le transport, et les expositions
 - Dépoussiérage régulier des locaux et des collections
- Empêcher le développement des micro-organismes :
 - Gestion du climat
 - Brassage de l'air
 - Entretien des locaux et des collections
 - Maintenance des systèmes de traitement de l'air
 - Procédures de conservation appropriées : choix de matériaux résistants à l'humidité et donc moins vulnérables à l'attaque des moisissures pour les murs, les rayonnages, les couvertures de livres, etc.

Références bibliographiques

ASPEC, *La biocontamination : salles propres, environnement maîtrisés & zones de confinement*, Paris, Pyc Edition, 2008, 266 p.

Flieder F., Capderou C., *Sauvegarde des collections du patrimoine : la lutte contre les détériorations biologiques*, Paris, CNRS éditions, 1999, 256 p.

Rakotonirainy M. S., « Prélèvement et transport de moisissures », *Nouvelles de l'ARSAG*, n° 9, 1993, p. 12-13.

Rakotonirainy M. S., « Détection des moisissures : apport de la bioluminescence », *Support/Tracé*, n° 4, 2004, p. 50-55.

Rakotonirainy M. S., « Comment prélever des moisissures sur un document », *Support/Tracé*, n° 7, 2007, p. 68-69.

Rakotonirainy M. S., Boudih S., Delaforge M., « Caractérisation des micro-organismes dans les taches de foxing des papiers : nouvelles approches analytiques », *Support/Tracé*, n° 11, 2011, p. 116-122.

Rakotonirainy M. S., « Évaluation de la viabilité des contaminants fongiques sur les documents par ATPmétrie », *Support/Tracé*, n° 16, 2016, p. 138-145.

Rakotonirainy M. S. « Les disques de Petrifilms comme alternative aux milieux de culture pour le diagnostic microbiologique rapide dans les lieux de stockage des documents graphiques », *Support/Tracé*, n° 17, 2017, p. 160-166.

Résumé

La biocontamination des documents graphiques est un risque réel et majeur pour les collections car les dommages engendrés sont irréversibles. Si les bactéries ne peuvent être rencontrées qu'après des sinistres liés à

l'eau, les moisissures sont plus fréquentes car certaines espèces sont capables de se développer à des activités en eau relativement faibles (0,62-0,80). Pour détecter la présence de micro-organismes et surtout déterminer leur viabilité, il faut faire des prélèvements. Les méthodes usuelles consistent à rendre les micro-organismes visibles grâce à une mise en culture sur des milieux appropriés. Les résultats obtenus s'expriment alors en nombre d'unité formant colonies (UFC). Pour l'air, les prélèvements se font de manière dynamique, à l'aide d'un biocollecteur, ou statique, par la méthode de sédimentation. Les surfaces sont échantillonnées avec des boîtes de contact, des Pétrifilms™ ou par écouvillonnage puis mises en culture. Les prélèvements sur documents doivent être réalisés avec des écouvillons secs. L'identification repose ensuite sur un examen macroscopique et microscopique des colonies, ou par l'analyse de l'ADN.

Abstract

The biocontamination of graphic documents is a real and major risk for collections because the damages generated are irreversible. If bacteria can only be found after water related disasters, molds are more common, some species being able to develop at relatively low water activities (0.62-0.80). To detect the presence of micro-organisms and especially to determine their viability, samples must be taken. The usual methods consist in culturing the microorganisms on appropriate culture media, to make them visible. The results obtained are expressed in number of units forming colonies (UFC). For the air, the samples are taken dynamically using a biocollector or statically by the sedimentation method. Surfaces are sampled with contact boxes, with Petrifilms™ or by swabbing and then cultured. Sampling on documents should be taken with dry swabs. The identification is based on macroscopic and microscopic examination of the colonies, or by DNA analysis.

PROMUSEUM

MATÉRIELS ET MATÉRIAUX POUR LA CONSERVATION ET LA RESTAURATION



www.promuseum.eu