



VIABILITE DES MOISSURES DANS LES TACHES DE FOXING / DOSAGE DE L'ATP PAR BIOLUMINESCENCE

Malalanirina Sylvia Rakotonirainy
Centre de Recherche sur la Conservation des
Collections, USR 3224 CNRS-MNHM-MCC

Introduction

La présence de moisissure est une menace importante pour les collections car la détérioration fongique des matériaux constitutifs de ces collections est quasiment irréversible et peut amener à leur destruction si on n'intervient pas. Parmi les diverses altérations caractéristiques des œuvres sur papier, la présence de petites piqûres colorées appelées communément "foxing" pose un sérieux problème pour la conservation. Deux types de foxing sont décrits : le foxing dit biologique avec des taches irrégulières, d'une couleur jaunâtre à rousse et le foxing métallique de forme ronde et régulière, de couleur brun-foncée (Figure 1). Les observations au microscope montrent la présence d'éléments fongiques à l'intérieur des taches de foxing biologique. Pour déterminer le rôle de ces éléments dans la formation du phénomène, il est indispensable de caractériser les espèces présentes. Devant la difficulté d'obtenir des développements lorsque l'on met des taches de foxing sur un milieu de culture, la viabilité des souches est devenue un sujet de discussion entre les scientifiques. Nous avons choisi d'utiliser une méthode indépendante de la culture pour évaluer la viabilité de ces souches. L'ATPmétrie qui consiste à doser l'ATP (adénosine triphosphate) par bioluminescence, a été appliquée à neuf livres, datant des 19^{ème} et 20^{ème} siècles, altérés par le foxing.

Abstract

Previous studies found evidence of mold-like structures in some colored areas on paper damaged by foxing; many species have not been identified and their role in the phenomenon is not yet understood. In order to better understand their involvement in this type of paper decay, we focused our attention first on their viability. Here we demonstrate the reliability and sensitivity of the ATP bioluminescence assay compared with conventional method based on cultivation, which have rarely give rise to in vitro growth from foxed papers. From nine books dating from the 19th and 20th centuries, the mean ATP amount of foxed spots ranged from 0.29 to 3.63 ng/cm², suggesting the presence of strains inside the brownish spots and giving evidence of their viability. Outside the spots, ATP content could be considered negligible, with a mean ATP amount of 0 to 0.03 ng/cm². ATP assay appears as a useful and robust method for the detection and quantification of viable elements in foxing spots.

Tableau 1 : Quantité d'ATP dans les taches brunes (FX) et dans les zones claires (ZC) des documents détériorés par le foxing

Livre	Date	Echantillon	ATP ± ET (ng/2.8cm ²)	ATP (ng/cm ²)	Quantité d'ATP FX/ZC
B1	1852	FX	5.64 ± 4.27	2.01	113
		ZC	0.05 ± 0.04	0.02	
B2	1850	FX	1.13 ± 1.52	0.40	17
		ZC	0.06 ± 0.02	0.02	
B3	1847	FX	0.82 ± 0.47	0.29	16
		ZC	0.05 ± 0.05	0.02	
B4	1942	FX	7.15 ± 3.04	2.55	29
		ZC	0.25 ± 0.24	0.09	
B5	1834	FX	10.16 ± 3.32	3.63	339
		ZC	0.03 ± 0.03	0.01	
B6	1863	FX	10.16 ± 2.98	3.63	1016
		ZC	0.01 ± 0.01	0.00	
B7	1864	FX	4.69 ± 4.94	1.68	78
		ZC	0.06 ± 0.07	0.02	
B8	1865	FX	1.67 ± 1.11	0.60	24
		ZC	0.07 ± 0.05	0.03	
B9	1866	FX	5.33 ± 5.20	1.90	133
		ZC	0.04 ± 0.05	0.01	

Tableau 2 : Estimation du nombre de spores fongiques dans les taches de foxing

Livres	Surface des taches (cm ²)*	Estimation graphique su nombre de spores/2.8 cm ²		Nombre de spores théoriques/tache	Quantité d'ATP calculée (ng)/tache
		y1**	y2		
B1	0.36 ± 0.32	2.85 10 ⁶	2.93 10 ⁶	37.16 10 ⁴	0.73
B2	0.26 ± 0.08	0.64 10 ⁶	0.03 10 ⁶	3.11 10 ⁴	0.10
B3	0.45 ± 0.13	0.43 10 ⁶	0.00	5.38 10 ⁴	0.13
B4	0.07 ± 0.03	3.68 10 ⁶	3.85 10 ⁶	9.41 10 ⁴	0.18
B5	0.21 ± 0.16	5.21 10 ⁶	5.79 10 ⁶	41.25 10 ⁴	0.76
B6	0.27 ± 0.16	5.21 10 ⁶	5.79 10 ⁶	41.20 10 ⁴	0.98
B7	0.33 ± 0.22	2.37 10 ⁶	2.36 10 ⁶	27.87 10 ⁴	0.55
B8	0.26 ± 0.18	0.80 10 ⁶	0.43 10 ⁶	5.71 10 ⁴	0.16
B9	0.21 ± 0.05	2.79 10 ⁶	2.82 10 ⁶	21.04 10 ⁴	0.40

* Moyenne de 6 mesures de taches prises au hasard dans différentes pages du livre
** y1: y interception avec la ligne de régression d'A. niger; y2: y interception avec la ligne de régression d'A. penicilloïdes

L'ATPmétrie

L'adénosine triphosphate (ATP) est un intermédiaire majeur et obligatoire du métabolisme cellulaire. Elle intervient dans la régulation de l'activité enzymatique et est responsable du transport et du stockage de l'énergie nécessaire aux réactions métaboliques. A la mort des cellules, l'ATP n'est plus synthétisée et les molécules résiduelle sont rapidement dégradées par des ATPases. L'ATP est donc un bon marqueur de viabilité. En présence d'oxygène, l'ATP peut être dosée spécifiquement par une réaction de bioluminescence grâce au complexe luciférine/luciférase de la luciole. La réaction produit des photons mesurables dans un luminomètre et dont la quantité est directement, proportionnelle à la quantité d'ATP.

L'ATP est extrait à 100°C avec du DMSO à 90 % dans un tampon TE (Tris-EDTA), pH7,75. Les échantillons de papier sont traités au préalable, une nuit à 37°C avec de la cellulase pour libérer les éléments fongiques des fibres. Pour chaque livre, la présence d'ATP est évaluée aussi bien dans les taches que dans les zones claires, sur 2,8 cm² de papier.

Test de viabilité

La luminescence dans les zones claires (ZC) est très faible, similaire à celle de l'eau. La quantité d'ATP est quasi-nulle (<0,09 ng/ cm²), Par contre dans les taches de foxing (FX), la quantité d'ATP varie entre 0,29 et 3,63 ng/cm² (Tableau 1, Figure 2). Cette différence entre les taches et les zones claires est confirmée par le rapport entre les quantités d'ATP dans les taches et les zones non tachées allant de 16 à 1016. Ceci donne la preuve de la viabilité des éléments fongiques dans les taches de foxing.

Evaluation du nombre de spores viables dans les taches de foxing

Le nombre de spores viables dans les taches de foxing est estimé par extrapolation sur la courbe de régression entre la quantité d'ATP et le nombre de spores viables d'*Aspergillus niger* et *Aspergillus penicilloïdes*, deux espèces identifiées dans les taches à partir de l'analyse de l'ADN (Figure 3). Suivant les livres, le nombre moyen de spores varie de 3,11 10⁴ à 41,25 10⁴ par tache (Tableau 2). Il est à noter que le nombre de spores par tache n'est pas proportionnel à sa taille, comme on le constate par exemple pour les livres B5 et B9, ayant la même taille de taches mais il y a deux fois plus de spores dans les taches de B9.

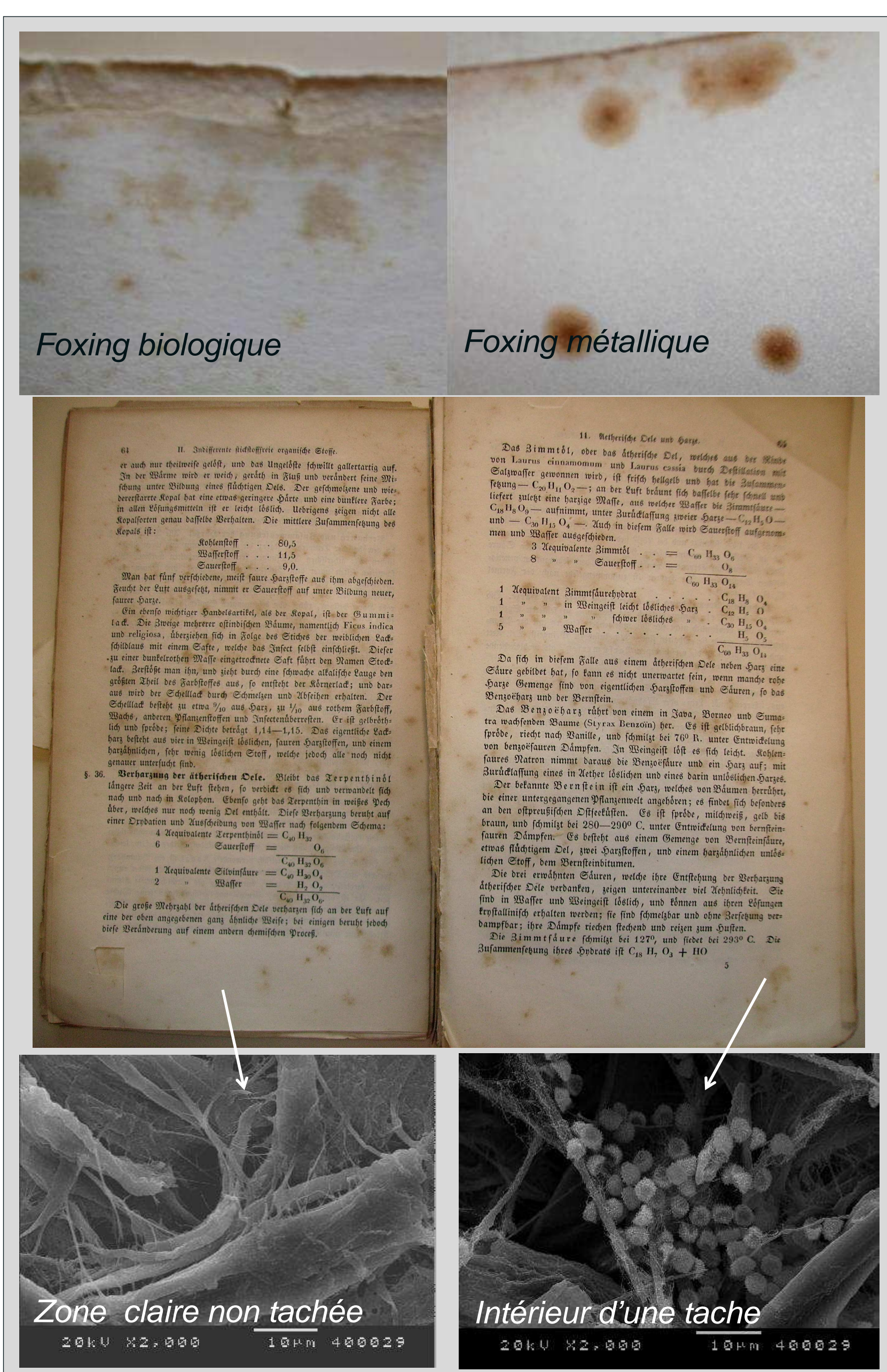


Figure 1: Taches de foxing et observation au microscope de zone claire (à gauche) et tache brune (à droite)

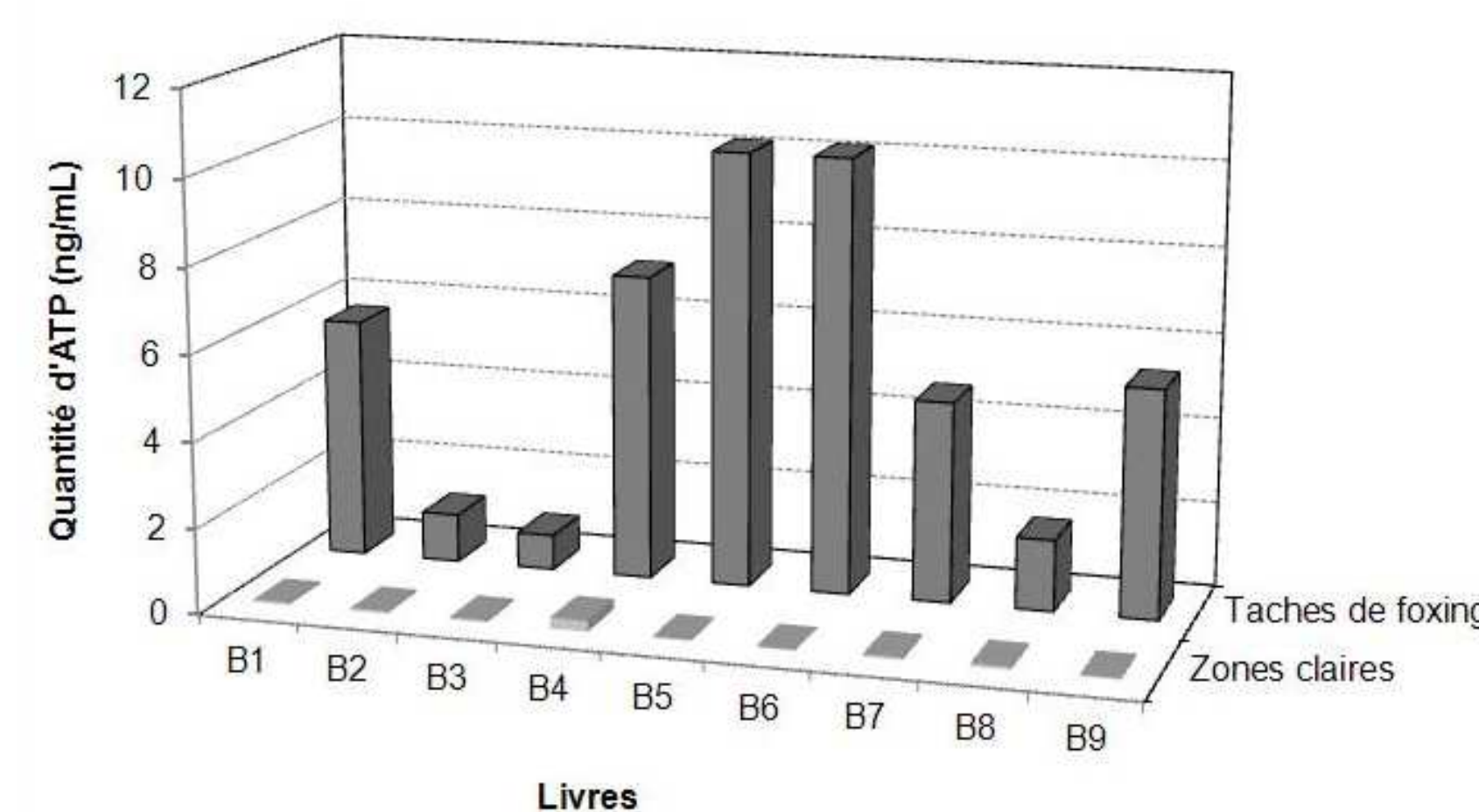


Figure 2: Quantité d'ATP dans les taches de foxing et les zones claires, pour 2,8 cm² de papier

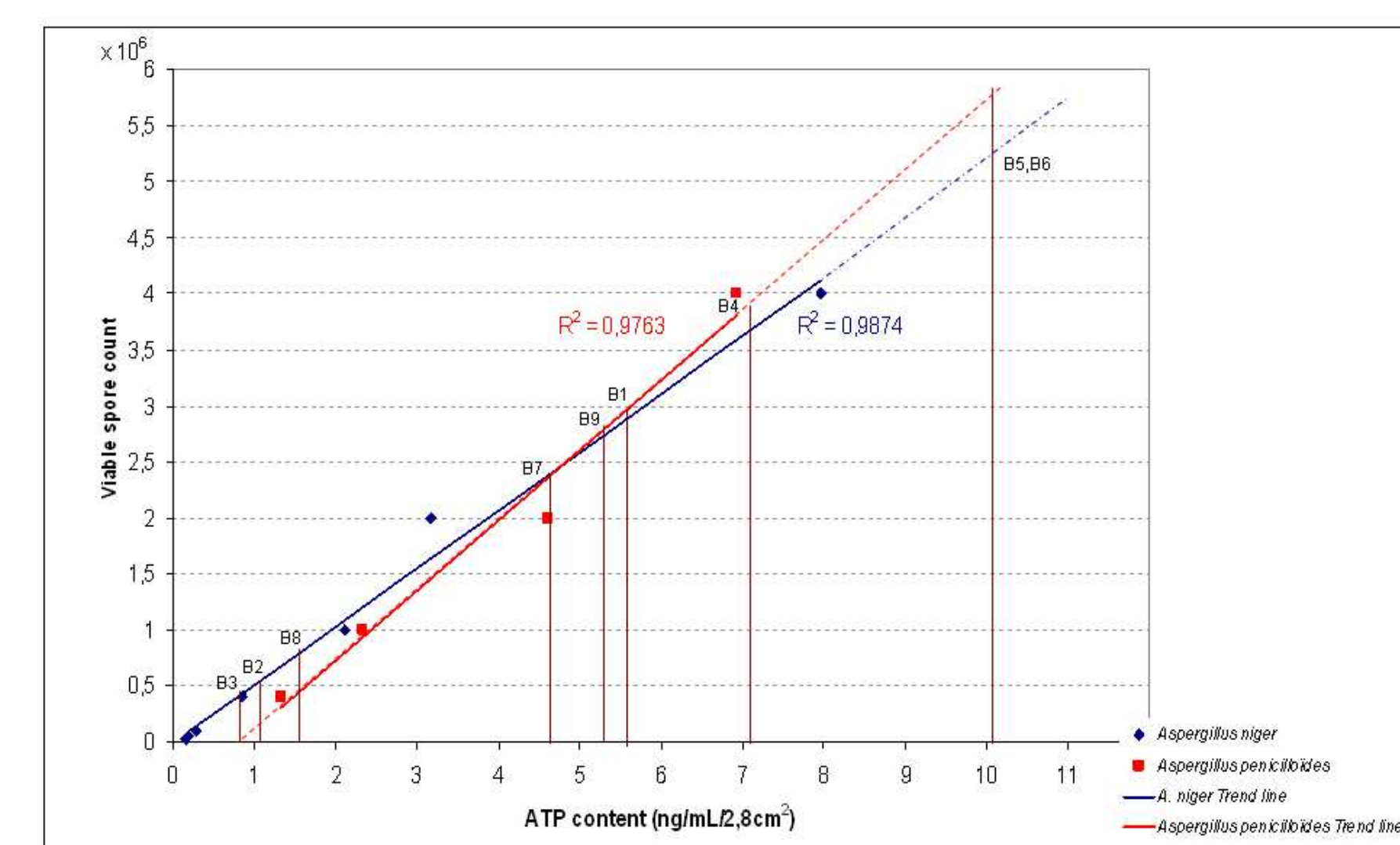


Figure 3: Nombre de spores d'*Aspergillus niger* et *Aspergillus penicilloïdes* en fonction de la quantité d'ATP. La quantité d'ATP des échantillons de papier est projetée sur les lignes de régression et l'interception « y » correspond au nombre de spore par 2,8 cm² de papier