



N° d'ordre : 10/2014

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

Mme Fatimazahra El Bergadi

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Isolement, identification et lutte contre les microorganismes impliqués dans la biodétérioration du bois et du papier du patrimoine historique de l'ancienne médina de Fès

Thèse présentée et soutenue le 01 mars 2014 devant le jury composé de

Nom Prénom	Titre	Etablissement	
Iraqi Houssaini Mohammed	PES	FST-Fès	Président
Boukir Abdellatif	PES	FST-Fès	Rapporteur
Koussa Tayeb	PES	FS-El Jadida	Rapporteur
Ennaji Moulay Mustapha	PES	FST-Mohammedia	Rapporteur
Fikri Benbrahim Kawtar	PES	FST-Fès	Examineur
Benslimane Rachid	PES	EST-Fès	Examineur
Koraichi Ibsouda Saad	PES	FST-Fès	Directeur de thèse

Laboratoire d'accueil : Biotechnologie Microbienne

Etablissement : Faculté des Sciences et Techniques de Fès



Résumé de la thèse

Le bois monumental et le papier des ouvrages historiques peuvent être la cible des champignons et des bactéries qui produisent des enzymes hydrolytiques capables de dégrader les constituants organiques de ces deux matériaux et par conséquent affectent la stabilité des monuments et des ouvrages à valeur culturelle et historique. Dans ce contexte, l'étude des espèces microbiennes et de leurs mécanismes enzymatiques impliqués dans l'altération du bois et du papier était nécessaire pour prévenir le développement des microorganismes et contrôler le processus de la biodétérioration de ces deux principaux constituants du patrimoine. En premier temps, nous nous sommes intéressés à l'isolement et l'identification des champignons et des bactéries colonisateurs de ces deux matériaux, tout en déterminant leurs profils enzymatiques par criblage de leurs activités cellulolytiques, amylolytiques, pectinolytiques et ligninolytiques. Ensuite, nous avons mesuré l'activité cellulase (CMCase et FPUase) des isolats présélectionnés et identifiés, et nous avons évalué l'effet de la température et du pH. L'implication de ces isolats dans le processus de la biodétérioration du bois est confirmée *in vitro* par apparition des pourritures à la surface et par constatation des pertes de masse des éprouvettes attaquées. Par contre, la croissance fongique à la surface des papiers artificiellement contaminés est vérifiée par des observations au microscope électronique à balayage en confirmant l'apparition du foxing et l'enregistrement des pertes de masse. En deuxième temps, nous avons évalué l'effet antifongique des extraits et des huiles essentielles de certaines plantes médicinales et aromatiques vis-à-vis des champignons isolés du bois et du papier. Les résultats obtenus sont encourageants pour la synthèse des produits de préservation. Les extraits aqueux et éthanolique de *Thymus vulgaris* et d'*Allium sativum* et les huiles essentielles d'*Eugenia caryophyllata* et d'*Origanum compactum* sont trouvés capables d'inhiber la croissance des souches isolées du bois et du papier. L'action inhibitrice des huiles est démontrée *in vitro* sur des éprouvettes de bois inoculées par *Aspergillus niger*.

Mots clés : Bois, papier, biodétérioration, pourriture, foxing, cellulase, huiles essentielles.

Sommaire

Introduction générale.....	1
Organisation du mémoire	3
Revue bibliographique	4
I. Patrimoine de la ville de Fès	4
1. Patrimoine historique de la ville de Fès	4
1.1 Brève histoire de la ville de Fès	4
1.2 Fès, patrimoine universel.....	5
1.3 Médersas Sehrij et Sbaiyine.....	5
1.4 Projets et visions pour restaurer et préserver les monuments et les sites historiques marocains.....	7
2. Patrimoine culturel	8
2.1 Valeur et origine des ouvrages et des manuscrits.....	8
2.2 Cas de la bibliothèque Al Quaraouiyine de Fès	8
2.2.1 Historique.....	8
2.2.2 Collection patrimoniale.....	8
2.2.3 Etat de dégradation des ouvrages	9
II. Présentation générale du bois et du papier.....	9
1. Structure du bois	9
1.1 Structure macroscopique	9
1.2 Microstructure du bois.....	10
2. Composition chimique du bois et du papier	11
2.1 Cellulose.....	12
2.2 Hémicelluloses	14
2.3 Lignine	15
3. Bois du cèdre.....	16
3.1 Histoire du bois de cèdre.....	16
3.2 Caractéristiques du bois de cèdre	17
3.3 Bois de cèdre, un bois monumental.....	17
III. Biodétérioration du patrimoine	18
1. Organismes responsables de la biodétérioration du bois et du papier.....	19
1.1 Insectes à larves xylophages.....	19
1.2 Térébrants marins	20
1.3 Bactéries	20
1.3.1 Formes de dégradation des bactéries et leurs mécanismes d'action.....	20
1.3.2 Conditions de développement.....	21
1.3.3 Dommages et dégâts causés	22
1.4 Champignons	23
1.4.1 Cycle de développement.....	23

1.4.2	Conditions générales de développement.....	24
1.4.2.1	Facteurs physiques	24
1.4.2.2	Facteurs chimiques	26
1.4.3	Types des champignons dégradant le bois	26
1.4.3.1	Champignons lignicoles.....	27
1.4.3.2	Agents d'échauffure	28
1.4.3.3	Champignons lignivores.....	28
1.4.4	Champignons du papier.....	32
2.	Enzymes requises pour la dégradation des principaux composants du bois et du papier.....	35
2.1	Cellulases	35
2.2	Hémicellulases	36
2.3	Enzymes de la dépolymérisation de la lignine.....	37
3.	Classes de risque biologique (classe d'emploi)	37
IV.	Préservation	39
1.	Préservation du bois.....	39
1.1	Traitements préventifs	39
1.1.1	Imprégnation des produits chimiques	39
1.1.2	Modification du bois par modification de la paroi cellulaire	39
1.1.3	Traitements thermiques.....	40
1.2	Traitements curatifs	40
1.3	Nouvelles alternatives à faible impact	40
1.3.1	Chitosanes	40
1.3.2	Trompolones	41
1.3.3	Huiles essentielles.....	41
2.	Préservation du papier	42
2.1	Conservation préventive	42
2.2	Conservation curative	42
2.2.1	Traitements chimiques	42
2.2.2	Traitements non chimiques	42
MATERIELS ET METHODES		44
A.	Isolement, identification et caractérisation des microorganismes impliqués dans la biodétérioration du bois et du papier	44
I.	Isolement, identification et caractérisation des isolats du bois et du papier.....	44
1.	Prélèvement et préparation des échantillons.....	44
2.	Préparation des milieux de culture.....	46
3.	Culture et isolement des microorganismes	46
3.1	Préparation des échantillons.....	46
3.2	Ensemencement dans les milieux	47
3.3	Croissance.....	47
3.4	Isolement, purification et conservation des souches.....	47
4.	Caractérisation microbiologique classique des isolats.....	47

4.1 Observations macroscopique et microscopique et coloration de Gram.....	47
4.2 Test de catalase	48
4.3 Effet de la température et du pH sur la croissance.....	48
4.4 Sporulation.....	48
5. Mise en évidence des activités extracellulaires	48
5.1 Détermination qualitative des activités enzymatiques	49
5.1.1 Activité cellulase	49
5.1.2 Activité amylase.....	49
5.1.3 Activité pectinase.....	49
5.1.4 Activité ligninase.....	49
5.2 Dosage colorimétrique de l'activité cellulase	50
5.2.1 Dosage de l'activité CMCase.....	51
5.2.2 Dosage de l'activité FPUase.....	52
5.3 Dosage des protéines.....	53
5.4 Effet de la température et du pH sur la production enzymatique des isolats...	54
6. Identification moléculaire.....	54
6.1 Extraction de l'ADN génomique.....	55
6.2 Amplification de l'ADNr 5,8S (champignons) et ADNr 16S (bactéries) par PCR.....	55
6.3 Electrophorèse sur gel d'agarose	57
6.3.1 Préparation du gel.....	57
6.3.2 Dépôt des produits d'amplification.....	57
6.3.3 Migration.....	57
6.3.4 Visualisation.....	58
6.4 Purification des produits PCR par les billes magnétiques	58
6.4.1 Fixation de l'ADN.....	58
6.4.2 Lavages	58
6.4.3 Elution de l'ADN	59
6.4.4 Réaction de séquençage.....	59
6.5 Analyse informatique des séquences	61
II. Etude de la biodétérioration <i>in vitro</i> du bois et du papier	61
1. Préparation du matériel	61
2. Dégradation du bois	62
2.1 Test des pourritures.....	62
2.2 Mesure de la perte de masse	62
2.3 Effet de la température	63
3. Test de la dégradation du papier	63
3.1 Test de la colonisation du papier en milieu liquide	63
3.2 Test de la diffusion des spores	64
3.3 Test de dégradation et du « foxing ».....	64
3.3.1 Observation visuelle	64
3.3.2 Observation au MEB.....	64
3.4 Mesure de la perte de masse	65

3.4.1 Effet du temps d'exposition	65
3.4.2 Effet de la température	65
B. Recherche des plantes à effet antifongique contre les agents destructeurs du bois et du papier	65
I. Recherche des plantes à effet antifongique	66
1. Recherche des extraits des plantes à effet antifongique	66
1.1 Screening préliminaire des plantes médicinales	66
1.2 Etude de l'activité antifongique des extraits aqueux et éthanoliques.....	67
1.2.1 Méthode de diffusion des disques.....	67
1.2.2 Détermination de la CMI.....	68
2. Recherche des huiles essentielles à effet antifongique	68
2.1 Screening préliminaire des HE.....	69
2.2 Méthode de diffusion des disques.....	69
2.3 Méthode de micro-atmosphère.....	69
2.4 Détermination de la CMI.....	70
II. Traitement du bois par les HE	70
III. Analyse statistiques.....	71
RESULTATS ET DISCUSSIONS	72
A. Isolement, identification et caractérisation des microorganismes impliqués dans la biodétérioration du bois et du papier	72
I. Isolement, identification et caractérisation des isolats du bois et du papier	72
1. Etude des sites et inspection visuelle.....	72
2. Isolement des microorganismes	73
3. Caractérisation microbiologique classique des isolats.....	75
3.1 Observations macroscopique et microscopique et coloration de Gram	75
3.2 Test de la sporulation	77
3.3 Production de la catalase	77
3.4 Effet des paramètres physico-chimiques sur la croissance des isolats.....	78
3.4.1 Effet de la température	78
3.4.2 Effet du pH.....	79
4. Identification moléculaire des isolats	80
5. Caractérisation enzymatique	86
5.1 Screening préliminaire des activités enzymatiques	87
5.2 Effet de la température sur les activités hydrolytiques en milieu solide	95
5.3 Activité cellulase en milieu liquide	98
5.3.1 Activité CMCCase.....	98
5.3.2 Activité FPUase.....	103
5.3.3 Effet de la température et du pH sur les activités CMCCase et FPUase	107
5.3.3.1 Effet de la température	107
5.3.3.2 Effet du pH.....	109

II. Biodétérioration <i>in vitro</i> du bois et du papier	111
1. Dégradation du bois <i>in vitro</i>	112
1.1 Pourritures du bois.....	112
1.2 Mesure de la perte de masse	115
1.2.1 Effet du temps d'exposition	115
1.2.2 Effet de la température	117
2. Dégradation artificielle du papier.....	118
2.1 Colonisation du papier en milieu liquide.....	118
2.2 Diffusion des spores et développement du « foxing ».....	119
2.3 Test du « foxing ».....	120
2.3.1 Observation macroscopique	120
2.3.2 Observation au MEB.....	121
2.4 Perte de masse.....	123
2.4.1 Effet du temps d'exposition	123
2.4.2 Effet de la température	125
B. Plantes à effet antifongique contre les agents destructeurs du bois et du papier	126
I. Plantes à effet antifongique	127
1. Screening préliminaire des plantes.....	127
2. Activité antifongique des extraits aqueux et éthanoliques	127
3. Concentrations minimales inhibitrices.....	131
II. Huiles essentielles à effet antifongique	132
1. Criblage antifongique de 7 HE.....	132
2. Activité antifongique des HE.....	133
3. Concentrations minimales inhibitrices.....	136
III. Traitement du bois par les HE	138
Conclusion générale et perspectives	140
Références bibliographiques	145
Annexes	165