Identification des moisissures et de leurs métabolites secondaires colonisant des supports papiers : évaluation de la toxicité sur des cellules épithéliales respiratoires in vitro

Sarah Boudih

▶ **To cite this version:**

Sarah Boudih. Identification des moisissures et de leurs métabolites secondaires colonisant des supports papiers : évaluation de la toxicité sur des cellules épithéliales respiratoires in vitro. Sciences agricoles. Université Paris-Est, 2011. Français. NNT : 2011PEST0002 . tel-00781807

HAL Id: tel-00781807
https://theses.hal.science/tel-00781807

Submitted on 28 Jan 2013

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.

Thèse

Présentée pour l'obtention du diplôme de

Docteur de l'Université Paris EST

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Ecole doctorale : Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement et Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Sarah BOUDIH

Le 12 décembre 2011

Identification des moisissures et de leurs métabolites secondaires colonisant des supports papiers. Evaluation de la toxicité sur des cellules épithéliales respiratoires *in vitro*.

Jury

Monsieur le Professeur Jorge Boczkowski	Président
Madame Valérie Fessard	Rapporteur
Monsieur David Garon	Rapporteur
Monsieur le Professeur Hervé Chéradame	Examinateur
Monsieur le Professeur Stéphane Bretagne	Directeur de thèse
Monsieur Marcel Delaforge	Co-directeur de thèse

A ma famille, pour son soutien, son écoute et sa patience.

A la mémoire de mes deux grands pères.

A Samy, Marion, Kendys et Laure pour votre présence.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur le Professeur Stéphane Bretagne de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Je le remercie pour ses critiques constructives et avisées qui m'ont permis de mener à bien mon travail.

Mes sincères remerciements s'adressent également à Monsieur le docteur Marcel Delaforge pour avoir dirigé mon travail de chimie analytique au sein du CEA. Je le remercie de l'attention qu'il m'a accordée, de son écoute et de ses conseils.

Je remercie Madame le docteur Malalanirina Sylvia Rakotonirainy, pour son encadrement sur le thème du foxing. Je la remercie pour son accueil au sein du CRCC, ses conseils et ses encouragements.

Mes remerciements vont également aux membres du Jury qui me font l'honneur de juger ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Madame le Docteur Françoise Botterel pour son encadrement durant ces trois années de thèse, son écoute, ses conseils et sa présence dans les moments difficiles. Je la remercie de m'avoir initiée aux rudiments de la mycologie avec patience et disponibilité, et de m'avoir encadrée pour la rédaction de ce manuscrit.

Je voudrais remercier Monsieur le Docteur Olivier Puel de m'avoir fourni les papiers peints ensemencés en espèces fongiques et de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail en tant que membre de mon comité de thèse, tout comme je remercie Madame le Docteur Florence

Forget. Merci également à Gabriel Reboux de m'avoir fourni les milieux de culture, et d'avoir été disponible avec son équipe pour chacune de mes questions.

Je remercie Monsieur le Docteur Christian Bories pour m'avoir initiée aux techniques de cultures cellulaires, Mademoiselle le Docteur Odile Cabaret de m'avoir initiée à la PCR en temps réel, Madame Sylvie Thao pour son aide en HPLC, Mademoiselle Anaïs Roussel et Madame Danièle Rivollet pour leur aide précieuse.

Un grand merci à Mesdames les Docteurs Françoise Foulet et Martine Liance pour leur aide et bonne humeur.

L'occasion m'est donnée de remercier l'ensemble des membres du laboratoire de Parasitologie de l'hôpital Henri Mondor, de l'équipe LSOD du CEA de Saclay et du CRCC. Je remercie chacun d'entre eux pour m'avoir permis de mener à bien mon travail durant ces trois années.

Je remercie les amis, les proches, qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de cette thèse. Merci à tous de votre présence : Samy, Kendys, Bruno, Laure, Nicolas, Marion, Fanny, Yoshié, Claire, Laetitia.

Enfin, je remercie ceux sans qui rien de tout cela n'aurait été possible : mes parents et mon frère, pour leur aide et leurs encouragements.

PREAMBULE

Ce travail a bénéficié du soutien financier de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES ex AFSSET), avec le projet AFSSET 2008-EST0827, et du Ministère de la Culture et de la Communication avec le projet PNRCC 2008 (Programme National de Recherche sur la Connaissance et la Conservation des matériaux du patrimoine).

Il a été réalisé au sein des trois unités suivantes :

- le laboratoire de Parasitologie-Mycologie de la Faculté de Médecine de Créteil sous la direction du Professeur Stéphane Bretagne (PUPH),
- le CEA de Saclay au sein de l'unité iBiTec-S, SB2SM sous la direction de Monsieur Marcel Delaforge (directeur de recherches CNRS),
- le Centre de Recherche sur la Conservation des Collections (CRCC) sous l'encadrement de Madame Malalanirina Sylvia Rakotonirainy (ingénieur de recherches).

La réalisation de ce travail a également donné lieu à une collaboration avec Messieurs Olivier Puel de l'Unité TOXALIM INRA/INP/UPS de Toulouse et Gabriel Reboux du laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Besançon, UMR Chrono-Environnement de Franche-Comté.

COMMUNICATIONS

Communications affichées

Boudih S., Rakotonirainy M., Puel O., Delaforge M., Bretagne S. Viabilité fongique et analyse par HPLC-UV-MS de papiers détériorés par le foxing. Journées ABIES. Paris 1-2 avril 2010.

Boudih S., Rakotonirainy M., Puel O., Delaforge M., Bretagne S. Viabilité fongique et analyse par HPLC-UV-MS de papiers détériorés par le foxing. Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale. Angers 19 mai 2010.

Boudih S., Rakotonirainy M., Puel O., Delaforge M., Bretagne S. Le foxing est-il d'origine fongique? Congrès de la Société Française de Microbiologie. Marseille 2-4 juin 2010.

Communications orales

Boudih S., Rakotonirainy M., Puel O., Delaforge M., Bretagne S. Viabilité fongique et analyse par HPLC-UV-MS de papiers détériorés par le foxing. Programme National de Recherche sur la Connaissance et la Conservation des matériaux du patrimoine culturel 2008. Archives Nationales de France Paris 29 septembre 2009.

Boudih S., Reboux G., Scherer E., Puel O., Roussel A., Delaforge M., Bretagne S. Moisissures et métabolites secondaires issus de papiers peints de logements insalubres. Evaluation du risque mycotoxicologique sur des cellules respiratoires *in vitro.* Besançon 6 juin 2011. AFSSET 2008-EST0827.

Boudih S., Reboux G., Scherer E., Puel O., Roussel A., Delaforge M., Bretagne S. Moisissures et métabolites secondaires issus de papiers peints de logements insalubres. Evaluation du risque mycotoxicologique sur des cellules respiratoires *in vitro.* Journée des mycotoxines. Toulouse 18 janvier 2011.

Roussel S., Reboux G., Million L., Parchas M-D, Vacheyrou M., Boudih S., Skana F., Delaforge M., Rakotonirainy M.S. Evaluation de la contamination fongique des archives et des symptômes ressentis par le personnel. Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale. Paris 18-19 novembre 2011.

Communications écrites

Boudih S., Rakotonirainy M.S., Roussel A., Cabaret O., Puel O., Reboux G., Botterel F., Delaforge M., Bretagne S. Biotic foxing from a nineteenth century book studied using ATP bioluminescence, culture, and HPLC-UV-MS: evaluation of mycotoxins as biomarkers for fungal presence. Soumis à Analytical and Bioanalytical Chemistry.

Roussel S., Reboux G., Million L., Parchas M.D., Boudih S., Skana F., Delaforge M., Rakotonirainy M.S. Microbiological evaluation of ten French archives and link to occupational symptoms. En révision dans Indoor Air.

LISTE DES ABREVIATIONS

ACN	Acétonitrile
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIA	Milieu agar pour actinomycètes (Actinomycetes Isolation Agar)
ARNm	Acide ribonucléique messager
ATP	Adénosine triphosphate
a_w	Activité en eau (water activity)
βt	Béta tubuline
CIE	Commission Internationale de l'Eclairage
COV	Composés Organiques Volatils
CRCC	Centre de Recherche sur la Conservation des Collections
Ct	Cycle seuil (Cycle threshold)
CYP	Cytochrome P450
DMSO	Diméthylsulfoxide
D.O.	Densité optique
ESI	Ionisation par ElectroSpray (electrospray ionisation)
eV	Electron Volt
Fluo	Fluorimétrie
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
HPLC	Chromatographie Liquide à Haute Performance (High Perfomance Liquid Chromatography)
Ig	Immunoglobuline
IL-8	Interleukine 8
ITS	Internal Transcribed Spacers
MS	Spectrométrie de Masse (Mass Spectrometry)
m/z	Masse par unité de charge
MEB-EDX	Microscopie Electronique à Balayage-Détecteur de rayons X à Dispersion d'Energie
MeOH	Méthanol
MIP	Polymère à Empreintes Moléculaires (Molecularly Imprinted Polymer)

MTT	Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
NCPT	Nouvelle Collection du laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie de l'INRA de Toulouse
NRRL	Northern Regional Research Laboratory
OTA	Ochratoxine A
PVDF	Polyfluorure de Vinylidène
qPCR	PCR quantitative en temps réel
RLU	Unités relatives de lumière (Relative Light Units)
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
rpm	Rotations par minute
SBS	Syndrome des Bâtiments Malsains
SDS	Sodium dodécylsulfate
SPE	Extraction sur Phase Solide (Solid Phase Extraction)
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha
Tris EDTA	Trishydroxyméthylaminométhane acide éthylène diamine tétracétique
UE	Union Européenne
UV	Ultra Violet

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS ____ *3*

PREAMBULE ____ *5*

COMMUNICATIONS ____ *6*

LISTE DES ABREVIATIONS ____ *8*

TABLE DES MATIERES ____ *10*

INTRODUCTION ____ *12*

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE ____ *14*

I) Généralités ____ **15**

I-1) Les champignons ____ 15

I-2) Métabolites secondaires et mycotoxines ____ 21

II) Le papier ____ **30**

II-1) Généralités ____ 30

II-2) Historique ____ 31

II-3) Dégradations biologiques de la cellulose ____ 33

II-4) Foxing ____ 35

III) Champignons et leurs métabolites en milieux intérieurs ____ **39**

III-1) Champignons en milieux intérieurs ____ 40

III-2) Métabolites fongiques sur différents substrats en milieux intérieurs ____ 42

IV) Effets des champignons et de leurs mycotoxines ____ **44**

IV-1) Historique ____ 44

IV-2) Effets des champignons et de leurs mycotoxines sur la santé humaine ____ 44

V) Effets des champignons et de leurs mycotoxines sur des modèles cellulaires respiratoires *in vitro* ____ **47**

V-1) Modèle cellulaire respiratoire *in vitro* utilisé ____ 47

V-2) Médiateurs de l'inflammation ____ 47

V-3) Enzymes du Métabolisme des Xénobiotiques (EMX) ____ 48

DEMARCHE ____ *51*

I) Foxing ____ **51**

II) Papiers peints ____ **53**

MATERIELS ET METHODES ____ *54*

I) Supports étudiés ____ **55**

I-1) Foxing ____ 55

I-2) Papiers peints ____ 55

II) Mesure des coordonnées chromatiques du foxing par le système L*a*b* CIE ____ **56**

III) Analyse MEB-EDX du foxing ____ **58**

IV) Evaluation de la viabilité des micro-organismes du foxing par ATPmétrie 59

V) Mise en culture du foxing 63

VI) Etude microbiologique des papiers peints 65

VII) Analyse par HPLC-UV-MS du foxing et des papiers peints 68

VIII) Cytotoxicité du foxing et des papiers peints 73

VIII-1) Cultures cellulaires 73

VIII-2) Test MTT 74

VIII-3) Expression des médiateurs de l'inflammation et du CYP 1A1 77

RESULTATS *80*

I) Foxing 81

I-1) Caractérisation 81

I-2) ATPmétrie 84

I-3) Mise en culture 85

I-4) Analyse HPLC-UV-MS 86

I-5) Tests MTT 90

II) Papiers peints 91

II-1) Analyses microbiologiques 91

II-2) Analyse HPLC-UV-MS 93

II-3) Tests MTT 107

II-4) Expression des médiateurs de l'inflammation 108

DISCUSSION *111*

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES *119*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES *121*

ANNEXES *151*

Annexe I) Protocole de PCR pour l'amplification des ADN issus des isolats obtenus après mise en culture du foxing 152

Annexe II) Séquences des amorces utilisées par l'identification des espèces fongiques des papiers peints 154

Annexe III) Protocole de l'Extraction sur Phase Solide (SPE) d'extraits de foxing 155

Annexe IV) Milieux de culture, réactifs, matériel 156

Annexe V) Protocole de PCR mycoplasme 158

Annexe VI) Quantités de réactifis pour l'extraction des ARN issus de cellules exposées aux extraits de papiers peints et programme de reverse transcription 160

Annexe VII) Quantités des réactifs, programme de qPCR séquences des amorces utilisées pour les papiers peints 161

ARTICLE *162*

RÉSUMÉ *185*

INTRODUCTION

Les moisissures sont des champignons filamenteux microscopiques, susceptibles de coloniser des substrats très différents tels que les produits alimentaires, les textiles, les papiers, le bois, etc. Elles peuvent être utiles dans certaines industries telles que l'industrie fromagère ou pharmaceutique, mais elles peuvent aussi être néfastes en altérant les propriétés physiques et chimiques du substrat qu'elles colonisent comme le papier. Lorsque les conditions d'humidité et de température favorables sont réunies, ces moisissures peuvent produire des métabolites secondaires (Alborch *et al.* 2011; Cahagnier *et al.* 1995; Mateo *et al.* 2002). Parmi ces métabolites secondaires, les mycotoxines sont susceptibles de représenter un danger pour la santé humaine et animale.

Plusieurs travaux ont porté sur l'identification des moisissures et de la toxicité de leurs mycotoxines dans le domaine alimentaire (Bennett et Klich 2003; Bouhet et Oswald 2005; Centeno et Calvo 2002; Chapeland-Leclerc *et al.* 2005; Makun *et al*. 2010; Rundberget *et al.* 2003; Tanaka *et al.* 2000). De même, dans les habitats intérieurs, différents genres de moisissures (*Alternaria sp., Cladosporium sp., Aspergillus sp., Penicillium sp.*), peuvent être retrouvés (Chaumont *et al.* 2001; Reboux *et al.* 2010). Ainsi, il a été montré que l'inhalation des spores fongiques est associée à des symptômes allergiques se manifestant cliniquement par de l'asthme, des rhinites, voire des pneumopathies d'hypersensibilité (Barnes *et al.* 2001; Andersson *et al.* 2003). Les champignons filamenteux ont aussi été associés, par certains auteurs, au syndrome des bâtiments malsains (SBS), qui se manifeste par des difficultés respiratoires, des céphalées, une rhinite, une conjonctivite, voire des nausées (Cooley *et al.* 1998). Les mycotoxines peuvent être véhiculées par des poussières et ainsi être aérosolisées et inhalées. L'inhalation de ces poussières peut entraîner un dépôt pulmonaire des mycotoxines et représenter un danger pour la santé humaine. Les connaissances sur la toxicité liée à l'inhalation des moisissures et de leurs mycotoxines portent essentiellement sur une espèce fongique donnée ou une mycotoxine donnée (Bellanger *et al.* 2009; Bünger *et al.* 2004; Khoufache *et al.* 2010). Peu d'études ont été réalisées sur l'évaluation de la toxicité associée aux mycotoxines issues de matrices complexes comme les substrats des milieux intérieurs. Les bâtiments historiques abritant des papiers patrimoniaux sont souvent mal ventilés et d'hygrométrie non contrôlée. La contamination des livres par les moisissures y est quasiment inévitable. Parmi les diverses altérations observées sur ces livres patrimoniaux, de petites

taches brunes nommées « foxing » peuvent apparaître. Les causes exactes de ce phénomène restent encore inconnues. L'hypothèse d'une origine fongique probable est étayée par l'observation en microscopie de spores fongiques (Arai 2000; Rakotonirainy *et al*. 2007). Ces taches de foxing peuvent, à terme, entraîner l'illisibilité du document qu'elles altèrent voire sa perte totale. Il est donc important de pouvoir identifier les espèces fongiques présentes dans le foxing, afin de pouvoir développer des traitements antifongiques spécifiques. La recherche des mycotoxines dans les taches de foxing constitue également une donnée importante concernant le risque sanitaire pour le personnel des archives papiers ou des bibliothèques, exposé à des livres altérés par le foxing.

De même, parmi les matrices où peuvent se développer les champignons et leurs métabolites, les papiers peints pourraient représenter un risque potentiel pour l'homme. Il est donc essentiel de pouvoir disposer d'outils permettant de rechercher les métabolites fongiques, en particulier les mycotoxines, issus de papiers peints de logements naturellement moisis et d'en évaluer la toxicité.

Notre travail consiste en l'étude de deux types de supports papiers : des papiers patrimoniaux altérés par le foxing et des papiers peints moisis issus de logements dont les habitants ont été diagnostiqués comme porteurs de symptômes allergiques et du SBS.

Les objectifs de ce travail sont d'une part, d'identifier les espèces fongiques de ces deux types de supports papiers et, d'autre part, de déterminer si des métabolites fongiques y sont produits. Pour les papiers altérés par le foxing, il s'agira également de mieux comprendre le rôle des espèces fongiques dans le processus de formation du foxing. Dans le cas des papiers peints, il s'agira de déterminer si une corrélation peut être faite entre une espèce fongique donnée ou un métabolite donné et les symptômes des habitants des logements.

Enfin la dernière partie de ce travail consistera à évaluer sur un modèle cellulaire respiratoire *in vitro,* si les deux types de supports papiers étudiés entraînent une toxicité.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I) Généralités

I-1) Les champignons

I-1-a) Définitions

Les champignons ou Fungi sont des organismes eucaryotes dépourvus de chlorophylle les qualifiant d'organismes hétérotrophes. Une source de carbone organique est donc nécessaire à leur développement. Dans l'arbre du vivant, ils constituent un groupe à part au sein des eucaryotes. Classiquement, les champignons étaient regroupés dans un règne distinct, celui des eumycètes (figure 1) ou cinquième règne (Kendrick 2000). Les classifications les plus récentes font apparaître les champignons dans le règne unique des eucaryotes et plus précisément dans le groupe des Opisthokonta (Adl *et al.* 2005; Simpson et Roger 2002, 2004). A l'instar des autres organismes vivants, les champignons sont subdivisés en classes, en ordres, en familles, puis en genres et espèces. Ces deux derniers termes étant utilisés pour les désigner. La classification des champignons est d'abord basée sur un mode de reproduction sexuée ou phase téléomorphe. Ce critère définit quatre des cinq groupes principaux : les chytridiomycètes, les zygomycètes, les basidiomycètes et les ascomycètes. Certaines moisissures sont le plus souvent ou exclusivement rencontrées à un stade de multiplication asexuée, dit anamorphe. Ces organismes sont alors classés d'après le mode de production des spores asexuées ou conidies. Ces espèces sont classées dans le cinquième ordre, les Deutéromycètes ou *Fungi imperfecti*. Dans le présent travail nous ne parlerons que des champignons filamenteux microscopiques.

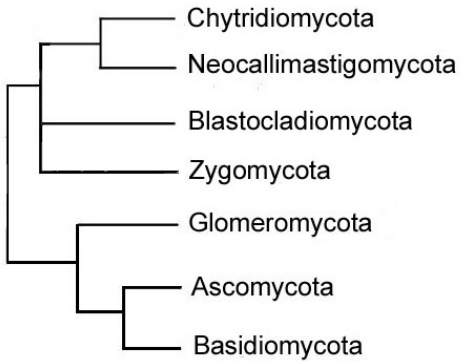


Figure 1 : Les grands groupes des eumycètes (d'après Durrieu 2008).

I-1-b) Caractéristiques morphologiques des champignons filamenteux

La structure des champignons repose sur leur appareil végétatif appelé thalle, constitué d'hyphes ou cellules allongées en forme de filaments tubulaires de 2 à 10 µm de diamètre. Ces hyphes comprennent les organites classiques d'une cellule : noyau, mitochondrie, cytoplasme, vésicules. Ils peuvent être cloisonnés ou non et leur association forme le mycélium (figure 2). Comme pour tout substrat, la colonisation des supports papiers est réalisée par extension et ramification des hyphes parfois visibles sous forme de petites tâches colorées à leur surface. Les hyphes puisent l'eau et les substances organiques dans les différents substrats qu'ils colonisent pour leur développement.

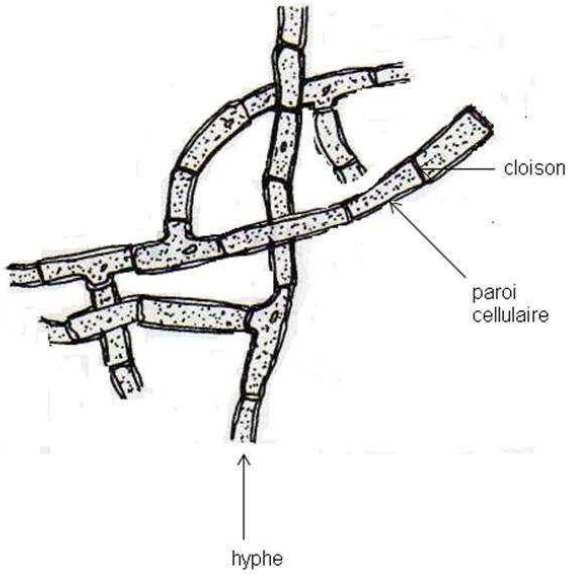


Figure 2 : Structure d'un hyphe et son développement vers la formation d'un mycélium, (d'après Chabasse *et al.* 2002 modifié).

I-1-c) Dissémination

Les champignons se propagent sur différents substrats, par l'intermédiaire de spores qui sont des corpuscules de 2 à 250 µm de diamètre. Les spores sont disséminées principalement par l'air ambiant ou par le contact de l'homme. Lorsqu'elles se déposent sur un substrat organique, tel que le support papier, elles germent si les conditions d'humidité et de température y sont favorables. Elles y pénètrent par voie chimique (production d'enzymes, de toxines) ou par voie mécanique en exerçant une pression sur le substrat (Chabasse *et al.*

1999). Les dégradations biologiques du papier seront développées dans le chapitre III) de cette partie.

Le cycle de vie des champignons comprend deux types de reproduction :

i) une reproduction asexuée, au cours de laquelle une spore ou un fragment de mycélium croit et se développe sur un substrat (figure 3). Le mycélium émet des conidiophores à l'extrémité desquels des conidies sont émises puis disséminées;

ii) la reproduction sexuée, implique la rencontre de deux mycélium de signes sexuels opposés. Un mycélium à n chromosomes va rencontrer un autre mycélium à polarité complémentaire pour donner lieu à la fusion des cytoplasmes, ce qui engendre un nouveau mycélium à 2n chromosomes. Les cycles de vie diffèrent d'un champignon à un autre selon leur type de spores.

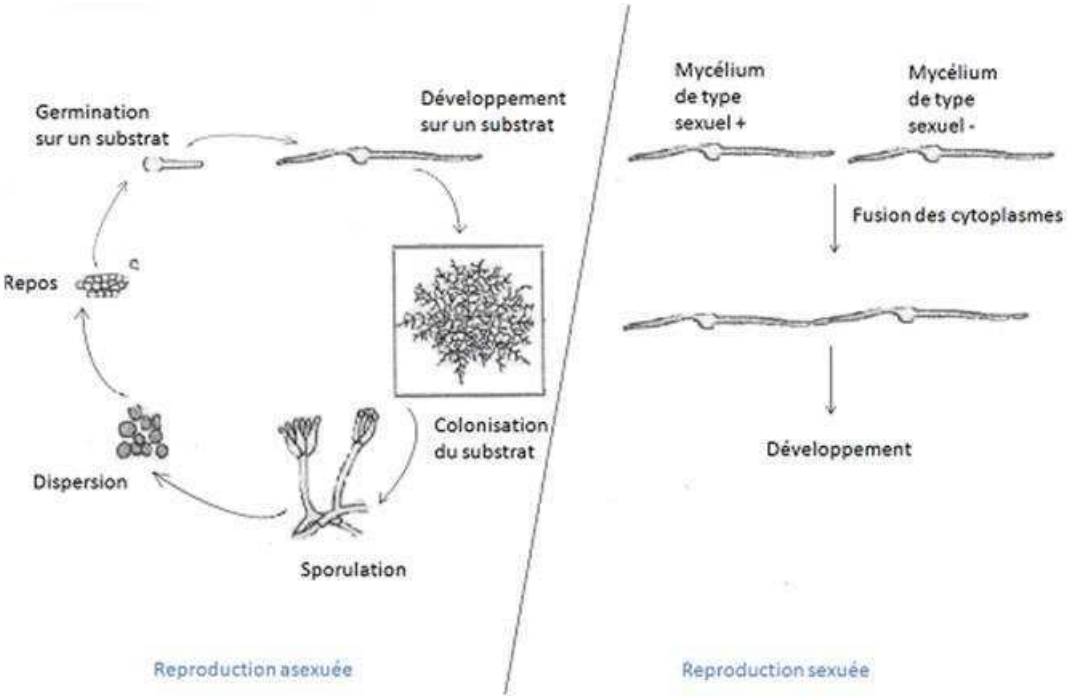


Figure 3 : Cycle de vie des champignons (d'après Roquebert 2002 modifié).

I-1-d) Identification des champignons

Les champignons microscopiques filamenteux sont nommés selon des règles internationales précises énoncées au XVIII^{ème} siècle par Carl Von Linné, comprenant un nom de genre, suivi du nom de l'espèce et du nom de l'auteur l'ayant décrit. Par exemple *Aspergillus fumigatus* Fresenius signifie que le champignon *A. fumigatus* a été décrit en premier par J.B. Georg W. Fresenius.

Dans le cadre de ce travail portant sur la colonisation des papiers par les champignons, Il est important de pouvoir les identifier afin d'envisager des méthodes préventives à leur développement. L'identification des champignons repose sur des critères macroscopiques, microscopiques et moléculaires après isolation et culture sur milieux de culture. Les critères macroscopiques reposent sur l'observation des colonies et de leur couleur recto et verso, leur taille, leur relief, leur aspect (filamenteux, collant), leur transparence (opaque, translucide), l'allure des contours et la pigmentation. Les critères microscopiques sont fondés sur l'aspect morphologique des différentes structures des champignons : le type de thalle (septé ou non), la couleur des hyphes (foncées ou claires), la forme des spores, l'origine des spores (endogène ou exogène), la forme des têtes (en forme de pinceau, aspergillaire). La figure 4, indique l'exemple des genres *Penicillium* et *Aspergillus* qui se différencient par l'aspect macroscopique et microscopique avec par exemple ici, la forme des têtes très différentes en termes de vésicules, phialides etc.

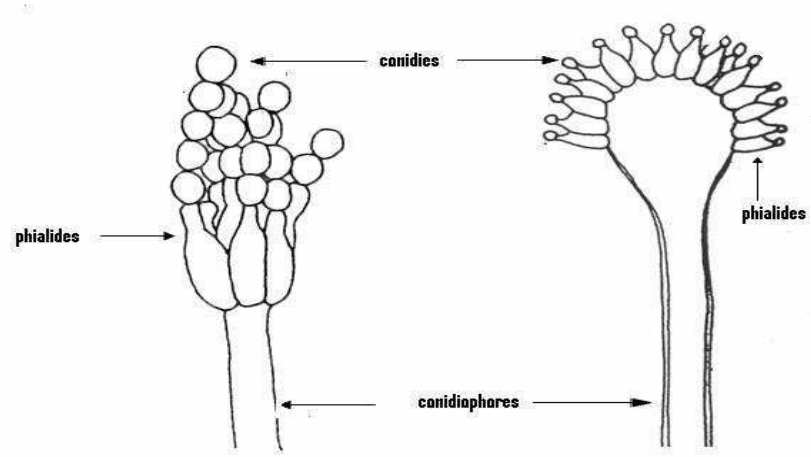


Figure 4 : Schéma de la structure d'un *Penicillium* à gauche et de celle d'un *Aspergillus* à droite (d'après Chabasse *et al.* 2002).

Outre des critères morphologiques, il existe maintenant des critères moléculaires qui permettent une identification précise des espèces. Les loci les plus souvent testés sont les ADN codant pour les differentes fractions des ARN ribosomaux. Nous avons utilisé les critères morphologiques et moléculaires (ADN), afin d'identifier les champignons présents sur les papiers peints et les zones de foxing de papiers patrimoniaux.

I-1-e) Conditions physico-chimiques de développement des champignons sur les papiers

Le développement d'un champignon sur un substrat donné, dépend des conditions environnementales dans lesquelles il est entreposé, mais également des propriétés intrinsèques du substrat sur lequel il se développe. Dans le cas du support papier les conditions de température, d'humidité dans lesquelles il est entreposé peuvent y entrainer le développement des champignons. En plus de ces conditions environnementales, la nature chimique des composants du papier peut également influer sur le développement des champignons. Nous proposons de développer ces trois facteurs.

- La température.

Les champignons sont classés selon la gamme de température à laquelle ils se développent. On distingue quatre catégories citées ci-dessous, des plus fréquentes au moins fréquentes, indiquées en tableau I.

Tableau I : Catégories de champignons selon leur gamme de température de développement (d'après Roquebert 1997).

Types de champignons	**Gamme de température**	**Température optimale**
Mésophiles	0 à 50°C	15 à 30°C
Thermophiles	20 à 50°C	35 à 40°C
Thermotholérants	0 à 50°C	15 à 40°C
Psychrophiles	0 à 20°C	0 à 17°C

Les champignons sont majoritairement mésophiles. A coté des quatre catégories de champignons citées en tableau I, il existe des champignons qui se développent dans des conditions extrêmes. C'est le cas par exemple des champignons dits thermorésistants pouvant se développer jusqu'à 80°C comme *Aspergillus fischieri* (Conner et Beuchat 1987). Dans les bibliothèques ou les logements comportant des papiers, la température ambiante est donc un

facteur qui aura une influence sur le développement des espèces fongiques sur les papiers. Peu de bibliothèques ou de logements sont équipés de systèmes de régulation de température.

- Humidité relative et activité en eau (a_w : water activity)

Le maintien d'une humidité ambiante à des taux inférieurs à la gamme de développement des champignons est primordial afin de préserver les documents papiers d'une colonisation fongique. Dans les centres d'entrepôt de documents, les papiers se mettent en équilibre avec l'humidité relative ambiante ou RH (Roquebert 2002). Ainsi, le développement fongique dépend non seulement de l'humidité relative ambiante, mais aussi de l'activité en eau du substrat ($RH = a_w * 100$). L'activité en eau mesure la disponibilité en eau d'un substrat donné. Les valeurs de l'a_w vont de 0 à 1. C'est le rapport de la pression partielle d'eau de ce substrat sur la pression de l'eau pure à la même température selon la formule :

$$a_w = P\ H_2O_{\ substrat} / P\ H_2O_{\ pure}$$

La majorité des moisissures se développe à une a_w située entre 0,85 et 0,99 (Pitt et Hacking 1997). Les champignons se développant à fort taux d'humidité sont qualifiés d'hygrophiles. C'est le cas par exemple de *Cladosporium, Fusarim, Mucorales.* D'autres champignons xérophiles ont la capacité de se développer à une a_w inférieure à 0,85 (Pitt 1975). C'est le cas par exemple de certaines espèces fongiques décrites sur les substrats papier comme *A. penicillioides* ou *Eurotium herbariorum* (Arai 2000). Il a été montré que ces deux dernières espèces fongiques peuvent croître à partir d'une a_w de 0,747 (Andrews et Pitt 1987; Chirife *et al.* 1996).

Cependant, peu de centres d'entrepôts de documents papiers disposent de systèmes de régulation de l'humidité ambiante.

- La composition chimique du substrat.

Le développement d'un champignon sur un substrat donné est lié à des propriétés inhérentes au champignon telles que la capacité à produire des métabolites (enzymes, pigments, synthèse de toxines). La dégradation enzymatique de la cellulose du papier est développée en chapitre III de cette partie.

Outre les propriétés inhérentes au champignon à dégrader un substrat, la composition même de celui-ci influe sur le développement du champignon. En effet, la présence d'atomes

nécessaires au champignon, comme le carbone ou l'azote favorise la croissance du champignon. Au contraire, une matrice très complexe avec la présence d'inhibiteurs de croissance, ne favorise pas la croissance des champignons. Ainsi *A. fumigatus* se développe mieux sur milieu Sabouraud que sur milieu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium), plus riche en vitamines et en minéraux (Meletiadis *et al.* 2001). Le développement moins rapide d'*A. fumigatus* sur milieu RPMI 1640 est probablement dû au fait que la complexité de ce milieu requiert une digestion plus élaborée de ses composants. *Stachybotrys atra* se développe sur du papier, de la paille ou du foin, mais ne se développe pas sur des matériaux d'isolation faits de papier recyclé traité avec des complexes à base de bore utilisés comme retardateur de feu (Nikulin *et al.* 1994). L'hypothèse qui peut être émise à cette absence de croissance sur les matériaux de construction, est que le bore agirait comme un antifongique (Dembitsky *et al.* 2011).

Nous étudions deux types de papiers : les papiers issus d'un livre du 19ème siècle et les papiers peints. L'époque de fabrication de ces deux types de papiers implique des procédés de fabrication et des matières premières différents. C'est pourquoi l'historique de fabrication du papier est développé au chapitre II de cette partie.

I-2) Métabolites secondaires et mycotoxines

Nous avons énoncé au paragraphe précédent la définition des moisissures, leurs caractéristiques et leurs conditions de développement. Il arrive parfois que ces moisissures produisent des métabolites secondaires dont certains, les mycotoxines, peuvent représenter un risque pour la santé humaine. C'est pourquoi, dans le cadre de cette étude sur les supports papiers naturellement contaminés par les moisissures, nous nous sommes intéressés aux métabolites secondaires fongiques, et particulièrement aux mycotoxines.

I-2-1) Définition

Le terme mycotoxine dérive du grec « mycos », signifiant champignon et du latin *toxicum* signifiant «poison». Les mycotoxines sont des molécules capables, à de faibles concentrations, d'induire un effet toxique (Reboux *et al.* 2006). Ce sont des métabolites secondaires produits après la phase de croissance du champignon. Ils se distinguent des métabolites primaires comme par exemple les produits de la glycolyse, qui sont primordiaux pour tout être vivant.

Le métabolisme secondaire est très diversifié, d'où la multitude de métabolites secondaires. Tous les métabolites secondaires ne sont pas néfastes pour l'homme. Il en est ainsi pour les antibiotiques (Sidhu 2002). Il existe environ 300 à 400 mycotoxines (Elidemir *et al.* 1999). D'après leur structure chimique, les mycotoxines sont considérées comme stables et en particulier thermostables (Bullerman *et al.* 2007; Frémy *et al.* 2005).

Plusieurs genres de moisissures sont connus comme étant producteurs de mycotoxines. Parmi eux, *Aspergillus, Fusarium, Penicillium, Alternaria, Claviceps*. Une même espèce fongique peut produire plusieurs sortes de mycotoxines selon les conditions de culture et une même mycotoxine peut être produite par plusieurs espèces fongiques différentes. Quelques exemples de genres de moisissures et de leurs mycotoxines sont regroupés dans le tableau II ci-dessous.

Tableau II : Principaux genres de moisissures et leurs mycotoxines associées.

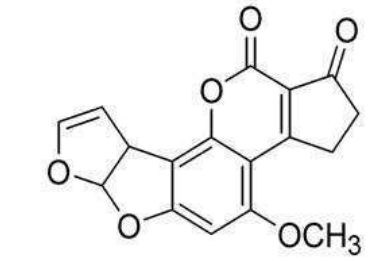
Espèce fongique productrice	**Mycotoxines associées**
Aspergillus sp.	gliotoxine, fumagilline, acide helvolique, trypacidine, fumitrémorgines, fumiquinazolines, aflatoxines, ochratoxines, stérigmatocystine
Alternaria sp.	alternariol, acide ténuazonique
Claviceps sp.	alcaloïdes (ergotamine et dérivés)
Fusarium sp.	trichothécènes (déoxynyvalénol, toxine T-2, diacétoxyscirpénol, nivalénol), zéaralénone, fumonisines, fusarine, moniliformine
Penicillium sp.	ochratoxine A, pénitrem A, acide cyclopiazonique, patuline, citrinine

I-2-2) Structure des mycotoxines

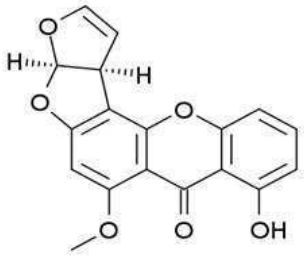
Les mycotoxines sont des métabolites de faible poids moléculaire, généralement inférieur à 500 g/mol qui ont, pour la plupart, une structure hétérocyclique. Nous citons quelques exemples de mycotoxines les plus connues.

- Les aflatoxines

Produites par plusieurs *Aspergillus* comme *A. parasiticus* entre 25 et 36°C (Molina et Gianuzzi 2002). Ce sont des dérivés coumariniques. Elles sont solubles en milieu polaire organique (DMSO, méthanol, chloroforme). Les aflatoxines dérivent de la stérigmatocystine.



Structure de l'aflatoxine B1



Structure de la stérigmatocystine

Figure 5 : Structure de l'aflatoxine B1 et de la stérigmatocystine.

- Les ochratoxines

Produites par les genres *Penicillium* et *Aspergillus* comme par exemple *Penicilliun viridicatum, P. verrucosum, A. ochraceus, A. niger*. Ce dernier produit l'ochratoxine A à une température optimale entre 20 et 25°C (Esteban *et al.* 2004*).* Les ochratoxines résultent de la condensation d'un résidu phénylalanine et d'un dérivé isocoumarinique.

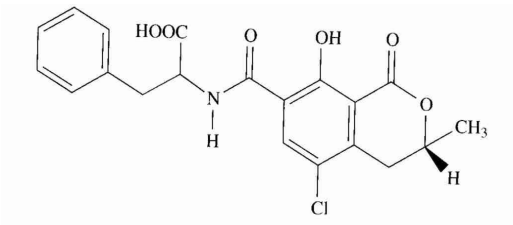


Figure 6 : Structure chimique de l'ochratoxine A (OTA).

- Les fumonisines

Produites par le genre *Fusarium*, il s'agit de chaînes d'hydroxyles de carbone à la différence des aflatoxines ou des ochratoxines. Les fumonisines sont solubles dans l'eau.

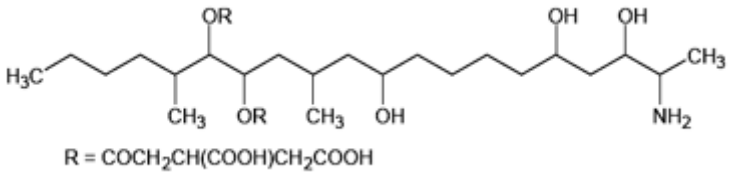


Figure 7 : Structure de la fumonisine B1.

- Les trichothécènes

Elles sont produites par le genre *Fusarium.* C'est le cas de *Fusarium sporotrichiodes* qui produit la toxine T2, le nivalénol, le déoxynivalénol sur maïs (Molto *et al.* 1997)

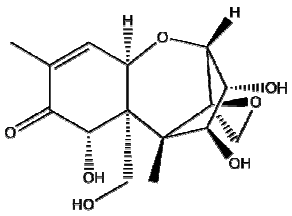


Figure 8 : Structure du nivalénol.

- La patuline

Cette mycotoxine est produite par plusieurs *Penicillium* comme par exemple *P. expanseum* qui produit la patuline entre 0 et 30°C (Sommer *et al.* 1974).

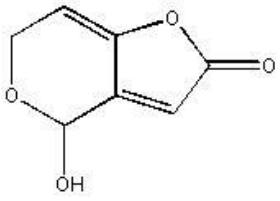


Figure 9 : Structure de la patuline.

Après avoir donné quelques exemples de structures de mycotoxines, nous évoquerons, dans le paragraphe suivant, les gènes impliqués dans leur synthèse ainsi que les différentes voies de biosynthèse des mycotoxines.

I-2-3) Gènes impliqués dans la synthèse des mycotoxines

Les gènes impliqués dans la synthèse des mycotoxines sont regroupés en cluster (ensemble de gènes regroupés en une zone de l'ADN). En 1992 Chang (Chang *et al.* 1995) découvre les gènes impliqués dans la biosynthèse des aflatoxines. Différentes expériences de clonage des gènes impliqués dans la biosynthèse des aflatoxines ont permis de situer plusieurs de ces gènes dans une région de l'ADN de 70 kb du chromosome III chez *A. flavus*. Dans le cas d'*A. nidulans*, les gènes impliqués dans la synthèse de la stérigmatocystine sont situés sur le chromosome IV (Butcko *et al.* 1999). La figure 10 indique les clusters respectifs pour les aflatoxines et pour la stérigmatocystine qui est un intermédiaire de la synthèse des aflatoxines.

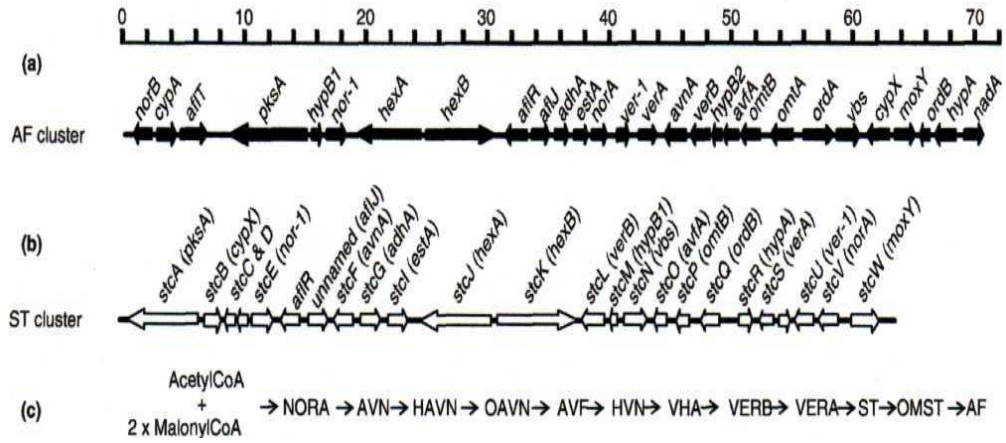


Figure 10 : Représentation schématique du cluster codant pour la synthèse des aflatoxines (AF) et de la stérigmatocystine (ST) chez *Aspergillus sp.* (d'après Cary et Ehrlich 2006). Barre supérieure = longueur en kilobases. Les flèches horizontales indiquent le sens de la transcription. En (a) et (b) sont indiqués les clusters respectifs des aflatoxines et de la stérigmatocystine. En (c) sont indiquées les étapes de la biosynthèse des aflatoxines. NOR= acide norsolinique; AVN=avérantine; HAVN=hydroxy avérantine; OAVN=oxo avérantine; AVF=avérufine; HVN=hydroxyversicolorone; VHA=versicolorone hémiacetal acétate ; VERB=versicolorine B; VERA=versicolorine A; ST=stérigmatocystine; AF=aflatoxine

I-2-4) Les voies de synthèse des mycotoxines

Les mycotoxines ne constituent pas une classe chimique à part. Elles ont trois origines chimiques différentes : les acides aminés, les polycétoacides et les terpènes. Le tableau III indique quelques exemples de mycotoxines et leur origine chimique.

Tableau III: Quelques mycotoxines et leur origine chimique.

Mycotoxines dérivées des acides aminés	**Mycotoxines dérivées des polycétoacides**	**Mycotoxines dérivées des terpènes**
Alcaloïdes de l'ergot	Aflatoxines	Toxine T-2
Gliotoxine	Citrinine	Verrucarrine
Roquefortine	Stérigmatocystine	Déoxynivalénol
Sporidesmine	Zéaralénone	
Ochratoxines		

La diversité de structure d'une mycotoxine à une autre résulte de la variabilité des voies de biosynthèse dont les réactions sont catalysées par différentes enzymes. Les différentes voies de synthèse des mycotoxines dérivent du coenzyme A (CoA). Celui-ci est ensuite acétylé en un polycétide ou polycétoacide via une polycétide synthase (PKS), pour conduire à la synthèse des mycotoxines dérivées de ploycétoacides (Figure 11).

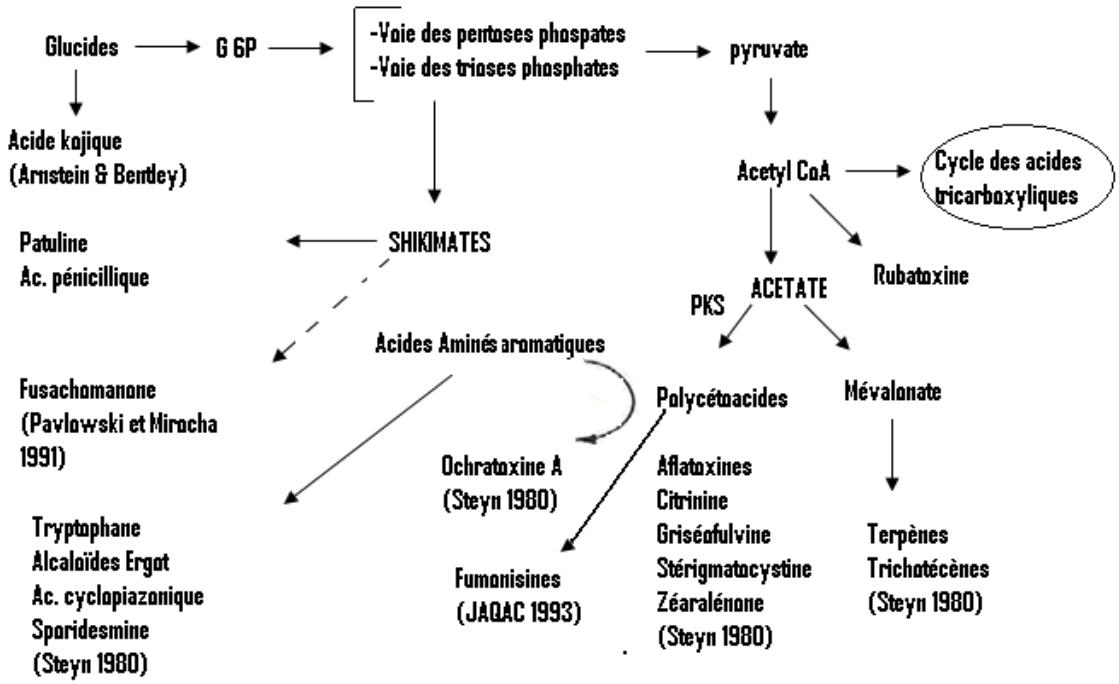


Figure 11 : Voies de biosynthèse de quelques mycotoxines (d'après Tabuc 2007).
G-6P : glucose 6 phosphate, PKS : polycétide synthase, CoA : Coenzyme A

L'utilisation d'inhibiteurs enzymatiques ou de précurseurs enrichis par des isotopes stables (^{13}C, ^{15}N), a permis de proposer des hypothèses sur les étapes de biosynthèse de quelques mycotoxines. Par exemple, la biosynthèse des aflatoxines synthétisées par plusieurs espèces fongiques (*A. flavus*, *A. parasiticus)*, a été très étudiée en raison des effets cancérigènes de ces mycotoxines (Huff et Hamilton 1979) (Figure 12).

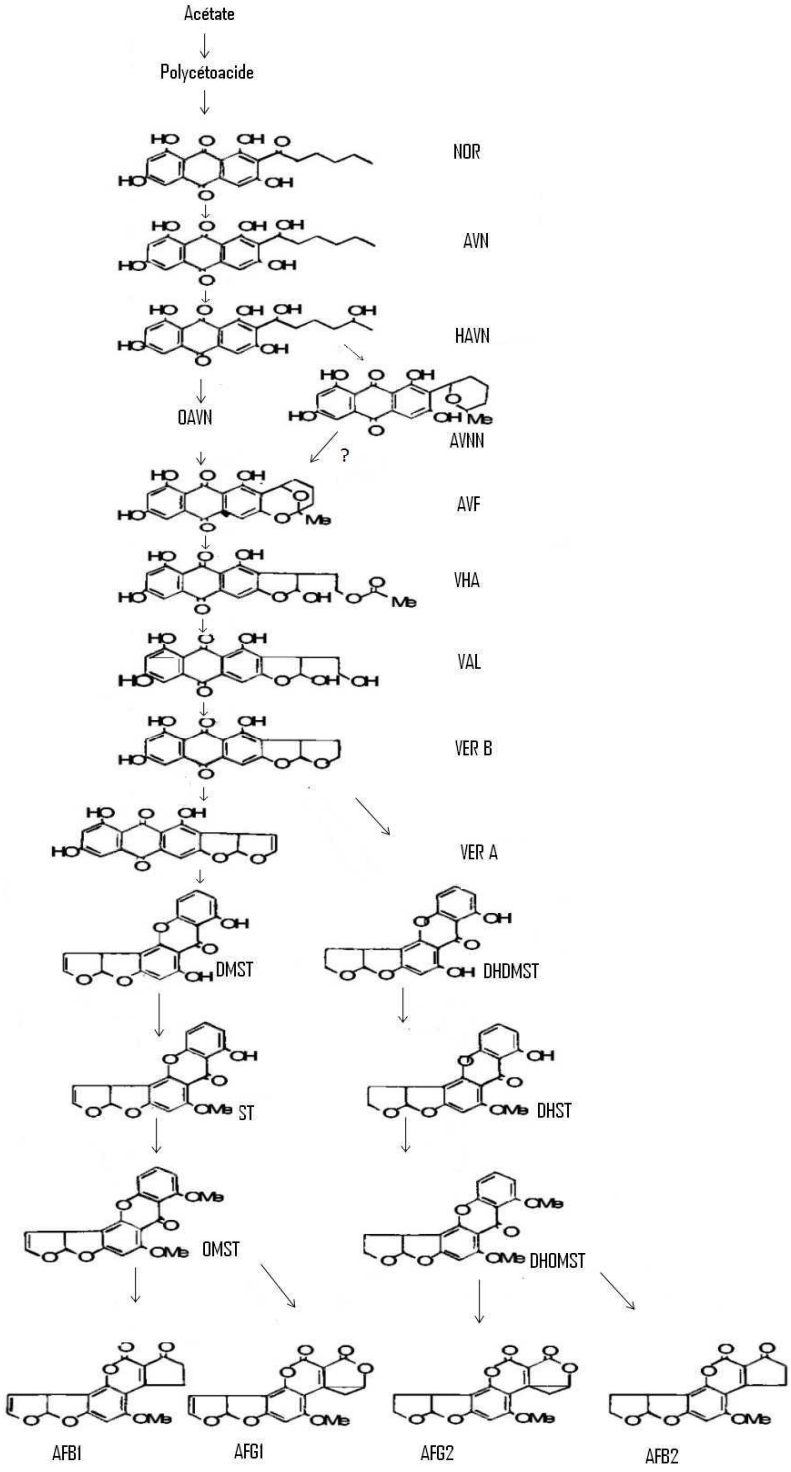


Figure 12 : Hypothèse de voies de biosynthèse d'aflatoxines (d'après Huff et Hamilton 1979). NOR=acide norsolinique; AVN=avérantine; HAVN=hydroxyavérantine; OAVN=oxo avérantine; AVF=avérufine; HVN=hydroxyversicolorone; VHA=versicolorone hémiacetal

acétate; VAL=versiconal; VERB=versicolorine B; VERA=versicolorine A; ST=stérigmatocystine ; AF= aflatoxine; DHST= dihydrostérigmatocystine; DHDMST= dihydrodéméthylsterigmatocystine; DMST=déméthylsterigmatocystine; DHDMST= dihydrodéméthylsterigmatocystine.

I-2-5) Conditions environnementales modulant la toxinogenèse

La synthèse des mycotoxines, encore appelée toxinogenèse, est un processus d'une grande complexité. Il semblerait qu'il s'agisse d'une réaction du champignon face à des conditions environnementales stressantes (température, humidité trop élevées ou trop basses).

La littérature rapporte essentiellement l'influence des conditions environnementales sur la production de mycotoxines sur milieux de culture et peu ou pas sur des supports papiers. Nous proposons de développer dans le présent paragraphe quelques exemples de production de mycotoxines sur des milieux de culture.

La toxinogenèse est liée à la croissance fongique. Ainsi, les facteurs influençant la croissance fongique, influencent également la toxinogenèse. Ils ne sont cependant pas nécessairement du même ordre de grandeur que les conditions optimales de développement d'une espèce fongique donnée.

La combinaison température/humidité est la plus importante parmi les facteurs pouvant influer sur la toxinogenèse. Pour une même a_w et sur un même substrat, la température permettant la production d'une mycotoxine est voisine de celle à partir de laquelle commence le développement de l'espèce fongique productrice. Par exemple, sur milieu YES (Yeast Extract Sucrose), à une a_w de 0,9, *A. flavus* se développe dès 20°C, et la production d'aflatoxines se fait à partir de 25°C et est optimale à 30°C (Gqaleni *et al.* 1997).

La toxinogenèse dépend également de la nature chimique du substrat dans ou sur lequel se développe l'espèce fongique. Une même espèce fongique peut produire des mycotoxines différentes selon le milieu. C'est le cas pour *P. verrucosum* qui produit de la citrine sur milieu YES, à la fois de la citrine et de l'ochratoxine A sur milieu analogue au pain, et aucune de ces deux mycotoxines sur un milieu analogue au fromage (eau 51%, matières grasses 24,5%, protéines 21,6%, cendres 2,9 %) (Kokkonen *et al.* 2005).

Enfin, la présence d'autres micro-organismes peut également modifier la concentration finale de mycotoxines. Des taux d'AFB1 ajoutée au lait avant fermentation à des concentrations de 600 à 1400 µg/kg, ont été réduits respectivement de 97 à 90 % dans le yaourt à pH 4. L'hypothèse émise est qu'au cours de la fermentation, les bactéries lactiques

dégraderaient l'AFB1 (Rasic *et al.* 1991). Une autre étude a également montré que certaines espèces fongiques seraient capables de dégrader des mycotoxines. C'est le cas d'*A. niger* qui convertirait l'ochratoxine A en ochratoxine α sur milieu YES (Varga *et al.* 2000).

Sur des milieux complexes tels que les papiers, la présence d'autres micro-organismes, en plus des espèces fongiques peut également avoir lieu. C'est le cas de *Bacillus sp.* qui a été retrouvé sur des livres anciens altérés par le foxing (De Paolis et Lippi 2008 ; Montemartini Corte *et al.* 2003). La recherche d'autres micro-organismes dans les substrats papiers altérés par le foxing permettrait ainsi de mieux comprendre leur rôle dans le processus de formation du foxing. Ceci fera l'objet d'une partie de ce travail.

II) Le papier

II-1) Généralités

Quelle que soit la matière première à partir de laquelle le papier est fabriqué (bois, textiles, coton), les fibres de cellulose en sont le constituant principal. La cellulose est un polymère glucidique (polysaccharide), formé par l'enchaînement de monomères de glucose, reliés par des liaisons glycosidiques β 1-4 (figure 13). Deux monomères de glucose forment une unité cellobiose. Le nombre de monomères de glucose définit le degré de polymérisation (DP) de la cellulose.

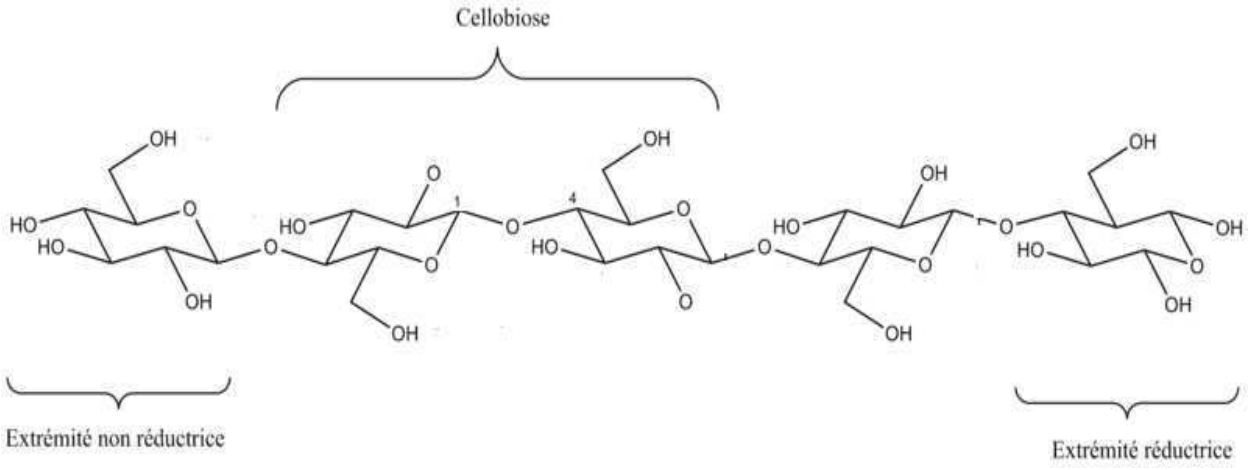


Figure 13 : Représentation de la chaîne de cellulose.

Le grand nombre de groupements hydroxyles permet l'établissement de liaisons hydrogènes intra et intermoléculaires formant ainsi un réseau tridimensionnel qui assure la cohésion du papier (Gandini et Pasquini 2012).

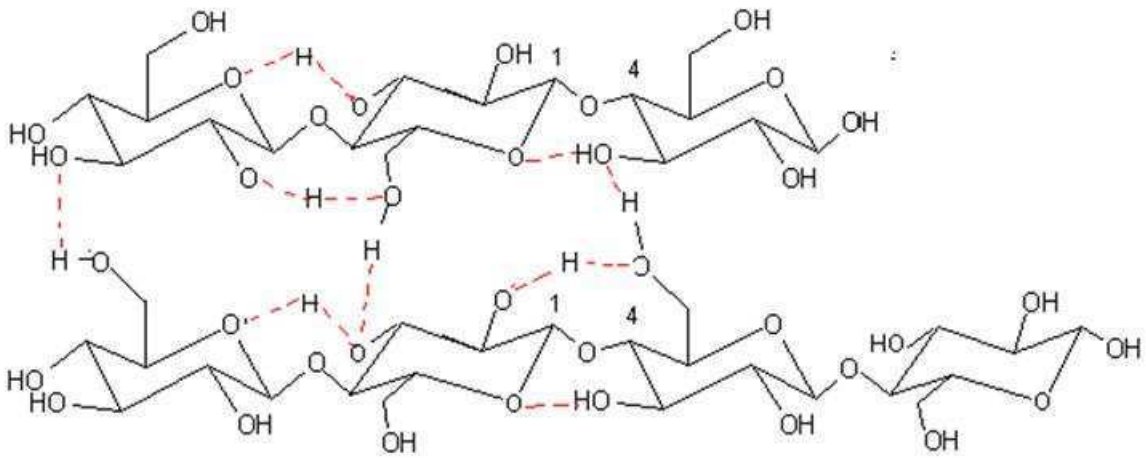


Figure 14 : Liaisons hydrogènes inter et intramoléculaires au sein de la fibre de cellulose.

II-2) Historique

La fabrication du papier comprend quatre étapes principales schématisées en figure 15. Selon l'époque à laquelle le papier a été fabriqué, les matières premières, les encollages, les procédés de fabrication sont différents.

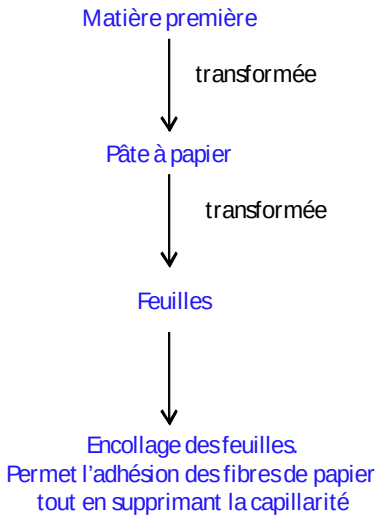


Figure 15 : Principales étapes de fabrication du papier.

Entre le IIème et le Xème siècle, en Asie centrale et en Indochine, la matière première du papier était à base de composants textiles (chanvre, lin) mélangés à des matières végétales (chanvre, écorce de mûrier, bambou). A cette époque, l'encollage était réalisé avec de l'amidon de riz. Du XIIème au XIXème siècle, le papier chiffon est utilisé pour la fabrication du papier. Il est composé de différentes fibres végétales (chanvre, lin, coton) ayant déjà servi sous forme de fils ou de tissus (De Biasi 1999). Jusqu'au XIXème siècle, la pâte était encollée à la gélatine puis celle-ci a été remplacée par la colophane à laquelle était ajouté de l'alun afin de précipiter la colle (Ministère de la culture et de la communication, http://www.culture.gouv.fr).

Jusqu'au XVIIIème siècle, le procédé de fabrication du papier consistait à bouillir les fibres textiles. Elles étaient ensuite défibrées puis écrasées pour obtenir une pâte. Cette dernière était ensuite mélangée à l'eau pour être transformée en feuille par tamisage. La pâte était blanchie avec de l'eau de chaux, écrasée avant d'être encollée (Vernus 2004).

A partir du XVIIIème siècle, face aux difficultés d'approvisionnement en chiffon, le bois a été utilisé comme matière première pour la fabrication du papier. De nos jours, le bois constitue la matière première principale de fabrication du papier. Le bois est composé principalement de cellulose, lignine, hémicellulose et matières extractibles (graisses, cires, alcools etc). Il existe deux types de fibres de bois, les résineux (épicéa, pin, sapin) et les feuillus (chêne, peuplier, hêtre, bouleau). Quelle que soit la fibre de bois utilisée, le procédé de fabrication du papier consiste à toujours extraire la cellulose du bois. Deux types de procédés sont utilisés : le procédé chimique et le procédé mécanique.

Le procédé chimique sépare les fibres de cellulose des autres composants du bois, notamment la lignine, par deux traitements acide et alcalin : le bisulfite (où le SO_2 transforme la lignine en matière soluble), et la soude (Ministère de la culture et de la communication www.culture.gouv.fr). On obtient ainsi des fibres solides et de grande pureté, très résistantes au vieillissement. Ce procédé de fabrication à température et pression élevées, est la base des papiers d'édition et d'écriture actuels.

Le procédé mécanique consiste à broyer le bois entre des meules pour en récupérer les fibres. La chaleur dégagée permet de ramollir la lignine qui cimente les fibres entre elles. Contrairement à la voie chimique, le procédé mécanique utilise d'autres éléments du bois, comme la lignine et les résines (Ministère de la culture et de la communication http://www.culture.gouv.fr). Ce procédé permet d'obtenir une pâte à papier destinée à en faire du papier journal ou du papier d'emballage.

L’encollage de ces papiers, se réalise en introduisant dans la pâte à papier un savon de résine obtenu par réaction de la colophane sur la soude. Du sulfate d'aluminium est ajouté, ce qui entraîne la diminution du pH provoquant la précipitation d'acides résiniques à partir d'ions résinates (Ministère de la culture et de la communication, http://www.culture.gouv.fr).

Une fois la pâte mécanique ou chimique obtenue, des charges comme le carbonate de calcium, la pierre de chaux, le kaolin, lui sont ajoutées. Ces charges permettent de combler les interstices du papier en le rendant plus régulier. Les charges donnent également au papier une surface plus lisse et plus souple. En plus des charges, des adjuvants sont également ajoutés au papier afin de donner au produit fini les propriétés voulues, notamment la résistance, l’imperméabilité et la teinte. C’est par exemple le cas de l’ajout de colorants ou de pigments qui permettent de donner au papier une teinte uniforme, ou encore l’ajout d’azurants optiques qui permettent d’augmenter la blancheur du papier (http://www.arcticpaper.com).

Les différents agents ajoutés au papier (charges, teinte, encollage), afin de lui donner les propriétés souhaitées, peuvent également, à long terme, entraîner la dégradation des fibres de cellulose. La cellulose peut être dégradée à la fois par des facteurs extrinsèques (température, humidité, oxygène) ou des facteurs intrinsèques (encollage du papier, traitements acides), via des réactions d’hydrolyse et d’oxydation (Choisy 1997). Dans ce travail, nous ne nous intéressons pas à ces dégradations d’origine chimique, mais aux contaminants biologiques qui peuvent dégrader, par le biais de leurs métabolites, la structure du papier. Ceci fera l’objet du prochain paragraphe.

II-3) Dégradations biologiques de la cellulose

La biodétérioration et la biodégradation sont deux termes se rapportant aux dégradations biologiques. La biodétérioration est définie comme l’ensemble des modifications des propriétés physico-chimiques et mécaniques d’un matériau ou d’un matériel par l’action d’organismes vivants. Ces modifications sont inopportunes et préjudiciables à l’utilisation et/ou au bon fonctionnement du matériau ou du matériel. La biodégradation est définie comme l’ensemble des réactions de transformation ou de destruction des éléments constitutifs d’un matériau dû à l’action d’une ou plusieurs entités biologiques (Hilaire 1994) C’est à cette dernière définition que nous nous intéressons dans ce travail.

Différents organismes sont susceptibles de dégrader la cellulose par le biais de leurs métabolites (bactéries, champignons, insectes). Dans le cas des champignons, il a été indiqué précédemment qu’ils peuvent dégrader les substrats en sécrétant des toxines, des pigments, ou

encore des enzymes telles que les cellulases qui dégradent la cellulose. La dégradation de la cellulose par les cellulases a été très étudiée en raison de l'importance de ces enzymes dans les industries pharmaceutiques, agro-alimentaires et textiles (Gusakov *et al.* 2000; Karmaker et Ray 2011; Kovacs *et al.* 2008; Li *et al.* 2007; Park *et al.* 2011; Singhania *et al.* 2010). Il existe trois types de cellulases : l'endo 1-4-β-D glucanase, l'exo 1-4-β-D glucanase et la β glucosidase. Elles peuvent être produites séparément ou sous forme de complexe (Bhat et Bhat 1997). Le mécanisme d'hydrolyse de la cellulose se ferait dans un premier temps via un premier acide aminé de la cellulase qui protone l'oxygène de la liaison glycosidique. Un second acide aminé de l'enzyme chargé négativement arrache un hydrogène à une molécule d'eau formant ainsi un ion HO^- qui agit comme un nucléophile sur un carbone d'une molécule de glucose. La liaison glycosidique se trouve ainsi rompue (figure 16).

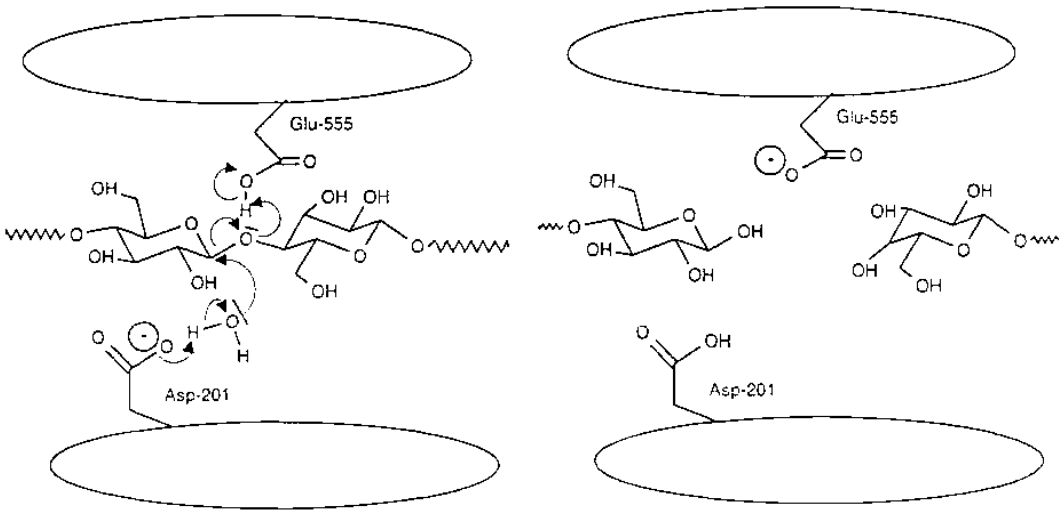


Figure 16 : mécanisme d'hydrolyse de la cellulose par la cellulase (d'après Béguin et Aubert 1994).

Asp : Acide aspartique en position 201 de la séquence de l'enzyme

Glu : Acide glutamique en position 555 de la séquence de l'enzyme

En plus des dégradations chimiques et biologiques qui ont été évoquées dans le paragraphe précédent, un autre type de dégradation peut toucher les supports papiers sous forme de petites taches brunes nommées foxing, objet d'une partie de ce travail.

II-4) Foxing

II-4-a) Définition

Le « foxing » est un terme utilisé dans la littérature anglo-saxonne définissant de petites taches jaunes à brunâtres, en référence à la couleur du renard « fox » (« piqûres » en français). L'utilisation première de ce terme remonte à 1848 (Carter 1980; Meynell 1979). Au Japon, ce phénomène est qualifié de « hoshi » signifiant « étoiles » (Owen et Derow 1992).
L'étude du foxing a débuté dès les années 1930 (Manso *et al.* 2009) par les scientifiques et professionnels de la conservation. Différents substrats peuvent être altérés par le foxing (livres, œuvres graphiques, timbres), comme l'illustre la figure 17.

Figure 17 : Exemple d'un livre altéré par le foxing.

II-4-b) Etiologies proposées

Malgré les différentes études et recherches relatives au foxing, les causes de ce phénomène demeurent incertaines. Plusieurs hypothèses ont été avancées :

- Etiologie abiotique

Elle résulterait essentiellement d'éléments métalliques qui proviendraient du processus même de fabrication du papier (Manso *et al.* 2009; Cain et Miller 1982). Les métaux décrits dans les taches de foxing, ont été mis en évidence par MEB-EDX (Microscopie Electronique à Balayage Détecteur de rayons X à Dispersion d'Energie).
La nature des métaux présents dans le foxing est différente selon les études : fer (Cain et Miller 1982) cuivre, zinc, manganèse, aluminium (Manso *et al*. 2009) ont été décrits.

- Etiologie biotique

Des micro-organismes dans le foxing tels que des bactéries (De Paolis et Lippi 2008) et principalement des champignons ont été mis en évidence dans le foxing. Les spores des champignons ont été observées dans le foxing par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) (Arai 2000; Florian et Manning 2000; Meynell et Newsam 1978; Rakotonirainy *et al.* 2007). Un exemple est indiqué en figure 18.

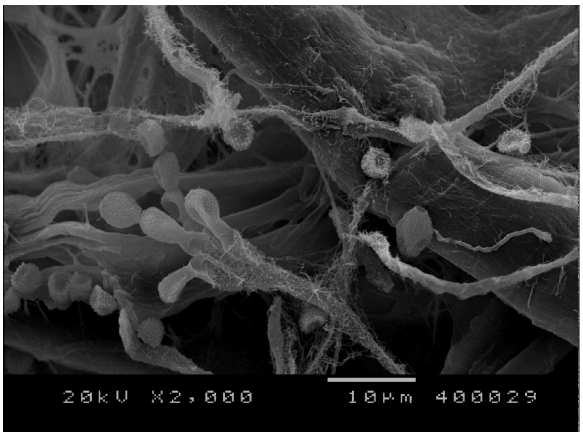


Figure 18 : Eléments fongiques observés dans une tache de foxing au MEB (d'après Rakotonirainy *et al.* 2007).

Même si les champignons filamenteux ont pu être mis en cause dans le foxing, leur viabilité au sein de ces taches reste controversée. Certains auteurs parlent de structures mortes (Florian et Manning 2000) ou de difficultés à obtenir des isolats (Rakotonirainy *et al*. 2007); d'autres, au contraire, ont obtenu des isolats en mettant en culture des papiers altérés par le foxing. Les espèces fongiques qui ont été identifiées dans le foxing, l'ont été par culture sur milieux tels que PDA (Potato Dextrose Agar), MEA (Malt Extract Agar) (Arai 2000) ou par amplification de la région ITS1-ITS2 par des amorces universelles (Rakotonirainy *et al.* 2007).

Les différentes espèces fongiques identifiées varient d'une étude à l'autre, mais font partie des espèces fongiques communes de l'environnement : *Alternaria, Aspergillus, Byssochlamys, Chaetomium, Fusarium, Hormodendrum, Monilia, Mucor, Penicillium, Stemphylium* (Beckwith *et al.* 1940), *A. penicilloides, Eurotium herbariorum* (Arai 1987), *A. carneus, A. flavus, A. fumigatus, A. niger, A. terreus, A. tamari, Gliocladium roseum, P. funiculosum* (Nol *et al.* 1983), *A. repens* (Cain 1987). Cette variabilité peut s'expliquer par la différence des supports papiers étudiés et de leur environnement. La viabilité des espèces

fongiques dans le foxing est une donnée importante afin de connaitre leur métabolisme, et le relier ainsi à la production de mycotoxines. Il convient donc d'utiliser une méthode quantitative permettant de doser un indicateur de viabilité. Nous avons utilisé l'ATPmétrie dont le principe est détaillé dans le chapitre matériel et méthodes.

III-4-c) Classification

Une des difficultés rencontrées dans l'étude du foxing, résulte du fait qu'il n'existe pas de caractérisation de celui-ci reposant sur des bases communes. En effet, plusieurs classifications existent. Selon les auteurs Cain and Miller (Cain et Miller 1982; Cain 1984), la classification du foxing est basée sur sa forme, sa fluorescence sous ultra violet (UV). Ils ont ainsi montré que le foxing est une entité tridimensionnelle et distinguent deux types de foxing.

- "Bullseye"ou littéralement œil de bœuf.

Il s'agit de taches de foxing rondes dont le centre est noir possédant des anneaux concentriques moins colorés comme le montre la figure 19. Selon Florian (Florian et Manning 2000), ces taches de foxing, circulaires, résulteraient du contact avec les métaux lors du processus de fabrication du papier.

Figure 19 : Exemple de foxing de type « bullseye » (image CRCC).

Selon les études, la teneur en éléments métalliques dans le foxing, diffère. Press (Press 2001), n'a pas trouvé de différence significative de quantités de fer entre les zones de foxing et les zones témoins. A l'inverse, Gallo et Pasquariello (Gallo et Pasquariello 1989) ont trouvé plus de fer dans le foxing. Des traces de cuivre ont aussi été impliquées dans la formation de taches brunes. Arai (Arai 2000) qui n'avait trouvé aucun métal dans le foxing, avait conclu à une origine fongique de ce phénomène. Le foxing de type bullseye ne fluoresce pas en son centre sous lumière UV. Il apparait noir, alors que les contours fluorescent dans le jaune. Ce

type de foxing aurait toujours, en son centre, des éléments métalliques (Owen et Derow 1992).

- "Snowflake" Littéralement les flocons de neige

Ces taches de foxing présentent des contours irréguliers. Elles sont jaunes/brunes (figure 20).

Figure 20 : Exemple de foxing de type « snowflake » (image CRCC).

Le terme « snowflake » tire son origine de sa couleur blanche sous rayonnement UV. La présence d'hyphes dans ces zones et leur absence dans les zones autour des « snowflake », ferait de ce type de foxing un phénomène associé à la présence d'une activité fongique (Owen et Derow 1992). Ce type de tache serait d'origine fongique (Arai 2000; Florian et Manning 2000). Nous avons étudié des taches de foxing ayant l'aspect de flocons de neige.

Le foxing illustré par les figures 19 et 20 est à distinguer des moisissures classiques pouvant coloniser des livres représentées en figure 21. Ces moisissures sur les livres ont un mycélium visible à l'œil nu, qui peut se développer sur plusieurs pages, alors que le foxing se présente comme de petites taches circulaires.

Figure 21 : Exemple d'un livre moisi.

II-4-d) Mécanismes de formation du foxing

Si des hypothèses relatives à la cause du foxing, ont pu être émises par différents auteurs comme décrit précédemment, le mécanisme de formation du foxing reste bien moins décrit. La principale description de la formation du foxing, a été réalisée par Arai en 1993 proposant que les spores aériennes se déposent sur le substrat papier, germent pour se développer ensuite en filaments mycéliens. Ceux-ci métabolisent des oligosaccharides et des acides aminés qui agissent entre eux au travers de la réaction de Maillard qui a lieu entre la fonction carbonyle d'un oligosaccharide et la fonction amine d'un acide aminé. Les mélanines synthétisées à la suite de réactions de Maillard ont pour précurseurs naturels la tyrosine, le dihydronaphtalène, le catéchol ou encore la dihydrodopamine. Ce sont des composés aromatiques pouvant entrainer le jaunissement ou le brunissement du papier

Les zones tachées présentes sur les papiers imprimés, peuvent aboutir à l'illisibilité du document qu'elles détériorent, ce qui peut entraîner, à terme sa perte. L'identification des agents biotiques et abiotiques présents dans le foxing, est une étape nécessaire en vue d'une meilleure compréhension de ce phénomène afin d'envisager, à plus long terme, le développement de méthodes préventives. Ainsi, nous avons caractérisé les agents abiotiques et biotiques du foxing.

III) Champignons et leurs métabolites en milieux intérieurs

Nous avons vu dans le précédent paragraphe les espèces fongiques contaminant le premier type de support papier étudié : papiers patrimoniaux altérés par le foxing. Nous allons nous intéresser au second type de support papier étudié : les papiers peints sur lesquels des champignons peuvent se développer et y sécréter des métabolites secondaires.

Nous débuterons ce paragraphe par la description des contaminations fongiques en milieux intérieurs dans lesquels se trouvent les papiers peints d'intérêts, pour ensuite développer la recherche de marqueurs fongiques sur les substrats de ces milieux intérieurs.

III-1) Champignons en milieux intérieurs

Dans les pays développés, l'homme passerait 47 à 51 semaines par an enfermé dans un espace clos (Reboux *et al.* 2010), ainsi, l'impact sanitaire des moisissures en milieux intérieurs, revêt un intérêt particulier.

Les études concernant la population fongique dans des locaux professionnels : scieries, caves, boulangeries (Chaumont *et al.* 2001), dans des habitations (Jovanovic *et al.* 2004; Niemeier *et al.* 2006; Santucci *et al.* 2007) et dans des locaux publics (écoles, stations de métros, hôpitaux), (Salonen *et al.* 2007; Sautour *et al.* 2009), rapportent essentiellement la présence des genres *Alternaria, Aspergillus, Cladosporium, Penicillium* (Garett *et al.* 1998*;* Hamilton et Eggleston 1997*;* Husman 1996, Strachan 1990*).*Le tableau IV rassemble, les principales moisissures en milieu intérieur sur différents substrats.

Tableau IV : Principales moisissures retrouvées en milieu intérieur selon le substrat de croissance (d'après l'INSP 2002)

Substrat	Mosissures retrouvées
Aliments	*Aspergillus sp.* *Eurotium sp.* *Penicillium sp.* *Rhizopus sp.* *Xeromyces sp.* Certaines levures
Grains, ceréales et fourrage	*Aspergillus sp.* *Eurotium sp.* *Claviceps purpurea (*ergot du seigle) *Fusarium sp.* *Stachybotrys sp.*
Produits faits de cellulose tel le papier, le carton et le boirs	Alternaria sp. *Chaetomium sp.* *Cladosporium sp.* *Epicoccum sp.* *Stachybotrys sp.*
Bois (bois d'oeuvre, souches, arbres etc.)	*Armilaria mellea* *Ceratocystis sp.* *Chaetomium sp.* *Phialophara sp.* *Serpula lacrymans*
Matériaux de construction et autres produits : • Murs peints • Papier peint • Placopâtre • Cuir • Calfeutrage synthétique	*Aspergillus sp.* Aureobasidium sp. Cladosporium sp. Exophiala sp. Penicillium sp. Phoma sp. *Stachybotrys sp.* *Scopulariopsis sp.* *Trichoderma sp.*
Végétaux en décomposition (à l'intérieur comme à l'extérieur)	*Alternaria sp.* *Cladosporium sp.* *Epicoccum sp.*

Il est cependant difficile de comparer les études entre elles car les contaminations fongiques comptées en UFC/m^3 (Unités Formant des Colonies/m^3) sont très différentes d'une étude à une autre et le nombre d'UFC/m^3 est aussi, parfois différent, au sein d'une même

étude, selon les lieux de mesure au sein d'un même local. Par ailleurs, les méthodes de mesure ne sont pas toujours les mêmes. Certains auteurs décrivent l'utilisation de la sédimentation passive des spores sur des milieux de culture en boite de Petri : Czapek, malt agar (Bogomolova *et al.* 2009). D'autres auteurs décrivent l'utilisation d'impacteurs d'air sur milieux DG-18 (Dichloran Glycérol) ou MEA (Malt Extract Agar) et en comptent les UFC/m^3 par rapport au débit d'air de l'appareil utilisé (O'Connor *et al.* 2004), ou l'utilisation de la PCR quantitative en temps réel (qPCR) (Meklin *et al.* 2007).

Des travaux ont également portés sur la contamination fongique des substrats des milieux intérieurs : poussières, livres, étagères, matelas. Quatre techniques principales sont utilisées (Jovanovic *et al.* 2004; Niemeier *et al.* 2006; Salonen *et al.* 2007; Santucci *et al.* 2007) :

- aspiration des poussières par un aspirateur équipé d'un filtre pour particules, lequel est ensuite mis en suspension dans de l'eau/Tween. La suspension de spores ainsi obtenue est diluée et mise en culture;
- le prélèvement par écouvillonnage qui consiste à frotter la surface d'intérêt avec un écouvillon humidifié puis à le mettre en culture;
- l'empreinte gélosée où un milieu de culture est appliqué directement sur la surface d'intérêt (par exemple le milieu Sabouraud);
- le ruban adhésif étalé sur le substrat, puis transféré ensuite sur une lame de verre pour être examiné au microscope.

La population fongique sur ces différents substrats est comparable à celle trouvée dans les mêmes milieux intérieurs de ces substrats. Si plusieurs études rapportent les contaminations fongiques aériennes en milieux intérieurs et sur certains supports de ces milieux intérieurs, la littérature est restreinte en ce qui concerne les métabolites sur ces substrats; en particulier les mycotoxines.

III-2) Métabolites fongiques sur différents substrats en milieux intérieurs

Des études se sont intéressées aux Composés Organiques Volatils (COV) produits sur des matériaux de construction (Moularat *et al.* 2008) ou sur des milieux de culture (Wilkins *et al.* 1999) artificiellement contaminés par des espèces fongiques. Les COV détectés lors de ces études, appartiennent à différentes familles chimiques : alcools, cétones, éthers, esters, terpènes, acides etc. Pour certains de ces auteurs, la production des COV est dépendante du substrat et serait spécifique aux champignons (Moularat *et al.* 2008). Cependant, cette étude

n’a été réalisée que sur trois espèces fongiques : *A. niger*, *A. versicolor* et *P. brevicompactum* et demande à être développée davantage afin de confirmer ou d’infirmer le fait que les COV peuvent être utilisés en tant que biomarqueurs des champignons. En effet les COV peuvent être émis par les revêtements des murs ou les matériaux de construction. Il peut donc s’avérer difficile dans une matrice complexe de distinguer l’origine des COV détectés.

Les mycotoxines quant à elles, sont des molécules spécifiques des champignons, parfois produites par une ou plusieurs espèces fongiques. Elles peuvent donc être utilisées comme biomarqueurs de ces organismes dans les environnements intérieurs et sur différents supports. Pour les supports papiers qui font l’objet de ce travail, les travaux rapportant la production de mycotoxines, concernent essentiellement des papiers peints artificiellement contaminés par des espèces fongiques. Par exemple, la production de satratoxines H et G sur du papier peint artificiellement contaminé par *S. atra* (Nikulin *et al.* 1994) ou encore de la stérigmatocystine sur papier peint artificiellement contaminé par *A. versicolor* (Moularat et Robine 2006; Nielsen *et al.* 1998). Quelques auteurs ont travaillé sur la production de mycotoxines sur des papiers peints naturellement contaminés par les moisissures dans des habitations ayant connu des fuites d’eau prolongées (Nielsen *et al.* 1999). Parmi les espèces fongiques retrouvées *A. versicolor* (dont la 5-méthoxystérigmatocystine a été retrouvée), *P. chrysogenum* et *Chaetomium sp.* (dont les chaetoglobosines ont été retrouvées) *S. atra* (dont des trichotécènes ont été retrouvées).

Ces études sur les substrats papiers naturellement contaminés par les moisissures, restent cependant restreintes; c’est pourquoi notre travail porte sur l’identification des moisissures et de leurs métabolites secondaires sur deux types de substrats papiers : les papiers peints et les papiers patrimoniaux, naturellement contaminés par des champignons.

IV) Effets des champignons et de leurs mycotoxines

Nous avons vu dans les généralités que les spores de champignons et leurs mycotoxines peuvent représenter un danger potentiel pour l'homme. Après un rapide historique des intoxications humaines dues aux mycotoxines, nous aborderons les principaux effets toxiques connus pour la santé humaine.

IV-1) Historique

Les premiers effets par ingestion ont été décrits au Moyen âge, suite à la consommation de pain contaminé par *Claviceps purpurea* (ergotisme), communément décrits par « feu sacré » ou « feu de Saint-Antoine ». Les signes cliniques se manifestaient par des gangrènes ou encore des hallucinations. Entre 1942 et 1947, une autre intoxication est décrite en Russie sous le nom de ATA (Aleucie Toxique Alimentaire), par consommation de farine contaminée par *Fusarium sp*. et *Trichoderma sp.* (Chapeland-Leclerc *et al.* 2005). A l'époque, la présence des moisissures sur les aliments n'avait pas été corrélée à ces symptômes. Ce n'est que vers les années 1960 que la mise en cause de la toxicité des moisissures a été envisagée. L'aflatoxine a alors été reconnue responsable d'intoxication de dindonneaux ayant ingérés de l'arachide contaminée. En France, la dernière épidémie due à la consommation de farines contaminées par *Claviceps sp.* remonte à 1951 à Pont St-Esprit dans le Gard.

IV-2) Effets des champignons et de leurs mycotoxines sur la santé humaine

Trois effets pathologiques nocifs pour la santé humaine sont reconnus comme pouvant être consécutifs à l'exposition aux champignons : les effets immunologiques, les infections fongiques et les intoxications par les mycotoxines. Ces dernières sont détaillées dans le tableau VI.

Les effets immunologiques sont liés à des réactions allergiques de type I (IgE dépendantes) ou de type III (IgG dépendantes), suite à l'exposition de protéines allergisantes pouvant activer ou aggraver les allergies. Les genres *Cladosporium, Alternaria, Penicillium, Aspergillus*, seraient fréquemment associés aux allergies et aggraveraient des pathologies telles que la rhinite ou l'asthme (Bourrier *et al.* 1996; Bush et Prochnau 2004; Frew 2003; Muller *et al.* 2002; Smit *et al.* 2011).

Les champignons filamenteux sont essentiellement des champignons ubiquitaires naturellement peu ou non pathogènes. Ce sont des agents d'infections opportunistes qui

expriment leur pouvoir pathogène dans des conditions cliniques favorables à leur installation dans l'organisme. Plusieurs pathologies ont été décrites chez l'homme. Elles touchent principalement l'appareil respiratoire, mais plus rarement aussi d'autres organes. L'aspergillose pulmonaire invasive est la principale et la plus grave des pathologies dues à ces champignons (Fleck *et al.* 1999; Grandière-Perez *et al.* 2002; Paugam *et al.* 2010; Tabone 2003).

Les effets liés aux mycotoxines (regroupés dans le tableau V), sont attribués à la présence de doubles liaisons C = C jouant souvent un rôle dans la toxicité et les propriétés cancérigènes des mycotoxines en formant des adduits à l'ADN (Bennett et Klich 2003).

Tableau V : Effets des principales mycotoxines sur l'homme et mécanismes d'action cellulaires et moléculaires identifiés (d'après AFSSA 2009).

Mycotoxine	**Effets**	**Mécanismes d'action cellulaires et moléculaires**
Aflatoxine B1 et M1	Hépatotoxicité Génotoxicité Cancérogénicité Immunomodulation	Formation d'adduits à l'ADN Péroxydation lipidique Bioactivation par des CYP 450 Conjugaison aux Glutathion-transférases
Ochratoxine A	Néphrotoxicité Génotoxicité Immunomodulation	Impact sur la synthèse des protéines Inhibition de la production d'ATP Détoxication par les peptidases
Trichothécènes (A et B)	Hématotoxicité Immunomodulation Toxicité cutanée	Induction de l'apoptose sur progéniteur Hématopoïétique et cellules immunitaires Impact sur la synthèse des protéines Altération des immunoglobulines
Patuline	Neurotoxicité Mutagenèse *in vitro*	Inhibition indirecte d'enzymes
Zéaralénone	Fertilité Reproduction	Liaison aux récepteurs oestrogéniques Bioactivation par des déshydrogénases Conjugaison aux glucuronyltransférases
Fumonisine B1	Lésion du système nerveux central Hépatotoxicté Génotoxicité Immunomodulation	Inhibition de la synthèse de céramide et altération du rapport sphinganine/sphingosine Altération du cycle cellulaire

V) Effets des champignons et de leurs mycotoxines sur des modèles cellulaires respiratoires *in vitro*

Nous avons vu dans le paragraphe précédent que les mycotoxines entrainent des réactions cellulaires toxiques chez l'homme. Il est donc important de disposer de modèles cellulaires *in vitro* afin d'étudier l'effet des mycotoxines. Nous avons utilisé un modèle cellulaire représentatif du tractus respiratoire sur lequel la toxicité des papiers étudiés a été évaluée par 3 méthodes :

- le test MTT (dont le principe est détaillé dans le paragraphe matériel et méthodes),
- l'expression des médiateurs de l'inflammation,
- et l'expression des Enzymes du Métabolisme des Xénobiotiques (EMX).

V-1) Modèle cellulaire respiratoire *in vitro* utilisé

Il existe plusieurs types de modèles cellulaires de l'épithélium bronchique ou pulmonaire permettant des études d'interactions cellulaires ou moléculaires entre des agents microbiens, sous toute leur forme (agent entier, métabolites secondaires, …) et les cellules. Parmi les nombreuses lignées utilisables *in vitro*, les cellules A549 sont des cellules alvéolaires de type II provenant d'un carcinome pulmonaire, qui permettent un grand nombre d'études d'interactions. Une des qualités de ce modèle est sa robustesse et sa facilité d'utilisation puisque les cellules sont à confluence en 6 jours environ et qu'elles peuvent donc être utilisées très facilement et rapidement. Un des défauts de ce modèle est qu'il s'agit d'une lignée, isolée d'un cancer bronchique et que de ce fait, les réactions des cellules sont totalement différentes des cellules primaires épithéliales bronchiques. Néanmoins, la réaction inflammatoire de ces cellules face à une agression fongique, telle que des métabolites secondaires, reflète l'épithélium respiratoire humain et permet des études de sécrétion de cytokines.

V-2) Médiateurs de l'inflammation

La réponse immunitaire est le fruit de l'interaction entre des lymphocytes T, des lymphocytes B et des cellules présentatrices d'antigènes, ce qui peut aboutir à la prolifération cellulaire, à la production d'anticorps, à la différenciation de cellules cytotoxiques, ou encore à l'augmentation de l'activité des cellules phagocytaires. La communication entre les cellules est assurée par des contacts cellulaires : les cytokines. Ce sont des glycoprotéines, de communication, synthétisées par les lymphocytes T ou par d'autres cellules et/ou tissus,

agissant à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction. Leur taille est généralement inférieure à 30 kDa. Les cytokines sont regroupées en différents sous-groupes parmi lesquels : les interleukines, les Tumor Necrosis Factor, les Colony Stimulating Factors. Les interleukines (IL) sont des cytokines regroupées sous cette terminologie sans parenté biochimique ni de fonction, mais classées par commodité. La famille du " Tumor Necrosis Factor " (TNF) regroupe de nombreuses molécules apparentées biochimiquement telles que TNF-α et -*β*. Enfin les " Colony Stimulating Factors " (CSF) sont des facteurs sécrétés par les macrophages et les lymphocytes T. Ils agissent sur l'activation, la différenciation et la prolifération cellulaire. Ils sont impliqués dans l'hématopoïèse, pouvant également moduler les fonctions des cellules matures auxquelles ils ont donné naissance.

Bellanger *et al*. (Bellanger *et al.* 2009) ont étudié l'impact de spores fongiques sur des cellules respiratoires *in vitro* exposées à des spores d'*A. fumigatus* dont l'expression de l'IL-8, du TNF-α et du GM-CSF a été évaluée. Cette étude a montré une surexpression de ces 3 médiateurs de l'inflammation 4 à 10 fois plus que les témoins après 8 h et 24 h d'exposition. D'autres études ont porté sur l'impact de spores et de mycélium d'*A. fumigatus, d'A. versicolor, de Stachybotrys chartarum* sur l'expression de l'IL-6, l'IL-8 et le TNF-α issus de cellules exposées à ces champignons (Huttunen *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2005). Une autre étude a montré que, parmi quatre mycotoxines commerciales d'*A. fumigatus* (l'acide helvolique, la fumagilline, la gliotoxine et le verruculogène), seule la gliotoxine entraînait une surexpression du TNF-α à 30 min (Poirier *et al.* 2009). Peu d'études portent sur l'expression de médiateurs de l'inflammation issus de cellules exposées à un mélange complexe de métabolites fongiques, plus représentatif des conditions réelles d'exposition de l'homme. Ceci fera l'objet de ce travail.

V-3) Enzymes du Métabolisme des Xénobiotiques (EMX)

Les substances étrangères à l'organisme (par exemple les mycotoxines), sont qualifiées de xénobiotiques. Lorsqu'elles pénètrent à l'intérieur de l'organisme, elles subissent des réactions de biotransformation en vue de leur élimination. Ces réactions sont catalysées par un ensemble d'enzymes désignées sous le nom d'Enzymes du Métabolisme des Xénobiotiques (EMX).

Les réactions de biotransformation se subdivisent en 3 phases : la phase I, également appelée phase de fonctionnalisation, comporte surtout des réactions d'hydrolyse et d'oxydation. Les enzymes impliquées sont principalement des systèmes multienzymatiques

catalysant des réactions de monooxydation, que sont les cytochromes P-450 (CYP-450). La phase II, regroupe les réactions de conjugaison à un cosubstrat hydrophile, par exemple le glutathion ou un sucre. Ces réactions conduisent généralement à un produit hydrosoluble pouvant être éliminé dans l'urine ou dans la bile. Enfin, la phase III, prenant en charge, soit le composé parental hydrophobe, soit les métabolites conjugués, permet d'expulser les composés vers le compartiment extracellulaire, mettant en jeu des transporteurs comme les protéines MDR et MRP (Multi Drug Resistance et Multidrug Resistance associated Protein). La figure 22 schématise les différentes phases du métabolisme des xéniobiotiques.

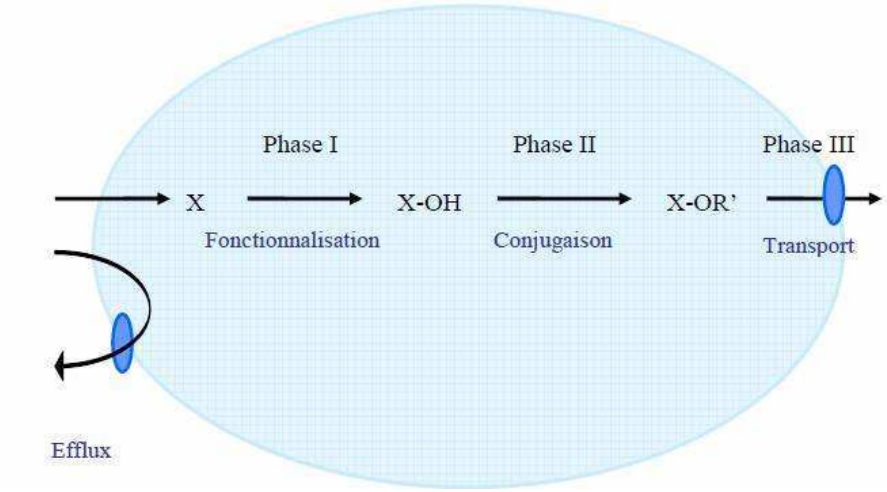


Figure 22 : Représentation schématique des différentes phases du métabolisme (d'après Gharbi 2010).

L'exposition aux xénobiotiques peut entraîner des modifications de l'expression de certaines EMX et des CYP-450; en particulier parmi eux le cytochrome P450 1A1 (CYP 1A1) peut être induit par les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) qui sont des composés présents dans les particules de diesel ou générés lors des grillades (Vakharia *et al.* 2001). Le mécanisme implique le récepteur nucléaire AhR (Aryl hydrocarbon Receptor) qui, après fixation d'un hydrocarbure dans le cytoplasme, est transloqué dans le noyau et se lie à une séquence consensus (XRE – Xenobiotic Responsive) (Hahn 1998).

S'agissant des mycotoxines, des études ont également montré que plusieurs d'entre elles (toxine T-2, zéaralénone, aflatoxines) entraînent l'activation du récepteur AhR et une surexpression du CYP 1A1 (Ayed-Boussema *et al.* 2011; Kruber *et al.* 2011, Storvik *et al.* 2011). Les mycotoxines sont également décrites comme pouvant être métabolisées par le CYP 1A1 en produits plus toxiques. C'est le cas des aflatoxines qui ont fait l'objet de nombreuses études ayant montré que l'aflatoxine B1 est métabolisée en aflatoxine M1 et en aflatoxine 8-9,

époxide, molécule très toxique qui peut se lier à l'ADN (Diaz *et al.* 2010). L'étude de l'expression du CYP 1A1 de cellules exposées à des mycotoxines, constitue donc un bon moyen d'évaluer la toxicité de ces xénobiotiques.

Nous avons évalué l'expression du CYP 1A1 issu de cellules exposées à des extraits de papiers naturellement contaminés par des espèces fongiques.

DEMARCHE

Notre travail consiste en l'étude de deux types de supports papiers : des papiers patrimoniaux altérés par le foxing et des papiers peints moisis issus de logements, dont les habitants ont été diagnostiqués comme porteurs de symptômes allergiques et du SBS. Les objectifs de ce travail sont d'une part, d'identifier les espèces fongiques de ces deux types de supports papiers et, d'autre part, de déterminer si des métabolites fongiques y sont produits.

I) Foxing

Le foxing se manifeste par de petites taches jaunes à brunes de forme circulaire pouvant exister sur différents types de substrats (papiers, tableaux). Ces taches peuvent à plus ou moins long terme, entraîner l'illisibilité voire la perte totale des documents qu'elles altèrent. L'identification des agents présents dans le foxing est donc une étape importante afin de mieux comprendre leur rôle dans le processus de formation du foxing et développer ainsi des méthodes préventives à leur apparition. Plusieurs travaux ont été réalisés afin d'étudier le foxing et en particulier son éventuelle origine fongique. Mais il subsiste plusieurs problématiques.

i) Les différentes études sur le foxing ont montré la présence de métaux et/ou d'espèces fongiques. Certains auteurs ont ainsi distingué un foxing d'origine métallique et un foxing d'origine fongique en se basant sur sa couleur et sa forme. Cette classification présente l'inconvénient d'être subjective, car elle repose sur des critères visuels.

ii) Les identifications des espèces fongiques dans le foxing ont été réalisées essentiellement par mise en culture de papiers foxés ou amplification de l'ADN de zones foxées. Ces méthodes peuvent présenter des biais en amplifiant préférentiellement des espèces fongiques présentes en grande quantité ou facilement détectables par rapport à d'autres. De plus, l'obtention d'isolats après mise en culture n'est pas toujours systématique. Par ailleurs, la littérature décrit essentiellement la recherche d'espèces fongiques et très peu la recherche d'autres micro-organismes (actinomycètes, bactéries).

iii) Le métabolisme des différentes espèces fongiques du foxing a été très peu étudié, en particulier la recherche de mycotoxines. Pourtant, cette donnée constitue une information importante vis-à-vis du personnel de bibliothèques ou d'archives en contact avec des livres altérés par le foxing.

Nous nous sommes essentiellement intéressés à l'origine fongique du foxing et au risque éventuel de mycotoxines dans celui-ci sur l'épithélium respiratoire. Nous avons également cherché d'autres origines à ce foxing en particulier métallique, ou d'autres micro-organismes comme les actinomycètes ou les bactéries. Les objectifs de l'étude sur le foxing sont les suivants :

- caractériser le foxing par des méthodes physiques afin d'en décrire la couleur de manière numérique, et rechercher la présence de métaux;
- rechercher la nature et la viabilité des micro-organismes du foxing;
- caractériser des extraits hydro-organiques du foxing par des méthodes de chimie analytique afin de rechercher la présence ou non de mycotoxines et d'évaluer si cette démarche peut-être une alternative aux méthodes de biologie moléculaire pour identifier les espèces fongiques;
- évaluer la cytotoxicité des extraits hydro-organiques de foxing sur des modèles cellulaires *in vitro* représentatifs de l'épithélium respiratoire.

La démarche suivie a consisté à :

- mesurer les coordonnées chromatiques des taches de foxing à l'aide du système L*a*b* (CIE 1978);
- rechercher des éléments métalliques dans les zones foxées par MEB-EDX;
- évaluer la viabilité des micro-organismes présents dans le foxing par la méthode d'ATPmétrie. Cette viabilité a été comparée à celle d'un témoin positif : papier artificiellement contaminé par *A. fumigatus*, moisissure rencontrée dans l'environnement;
- rechercher la présence d'autres micro-organismes en utilisant des milieux de culture destinés à la recherche d'actinomycètes en plus des milieux usuels destinés à la culture fongique;
- rechercher la présence de mycotoxines dans des extraits hydro-organiques de foxing par analyse analytique par HPLC-MS;
- évaluer la toxicité de ces extraits hydro-organiques sur des cellules A549 à l'aide d'un test MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium).

II) Papiers peints

Les papiers peints constituent un support susceptible d'être colonisé par des moisissures. Une étude réalisée par le CHU de Besançon portant sur des patients habitant dans des logements contaminés par des moisissures, tous atteints de différents symptômes (conjonctivite, rhinite, SBS etc.), a permis de collecter des papiers peints moisis et non moisis. La problématique de l'étude sur les papiers peints moisis est de déterminer, s'il est possible d'associer une espèce fongique donnée et/ou des métabolites secondaires donnés, aux pathologies dont souffrent les habitants de ces logements. Pour répondre à cette problématique, les objectifs de l'étude sur les papiers peints moisis issus de logements ont été les suivants :

- rechercher quatre des espèces fongiques les plus fréquentes dans l'environnement dans les échantillons de papiers peints; cette partie a été réalisée par le CHU de Besançon;
- rechercher des métabolites fongiques dans les extraits hydro-organiques des papiers peints et déterminer s'ils peuvent être reliés aux espèces fongiques détectées;
- évaluer la cytotoxicité des extraits hydro-organiques de papiers peints sur un modèle cellulaire respiratoire.

La démarche suivie a été de :

- rechercher quatre espèces fongiques communes de l'environnement *(P. chrysogenum, A .versicolor, C. sphaerospermum, S. chartarum)* par mise en culture et qPCR des papiers peints moisis et non moisis;
- rechercher des métabolites secondaires dans les extraits hydro-organiques des papiers peints moisis par HPLC-UV-MS;
- évaluer la toxicité de ces mêmes extraits sur des cellules A549 via le test MTT ainsi que l'étude de l'expression des médiateurs de l'inflammation (IL-8, TNF-α, GM-CSF) et du CYP 1A1.

MATERIELS ET METHODES

I) Supports étudiés

I-1) Foxing

L'étude de taches de foxing a été réalisée sur un livre datant de 1852 : « Philosophie Der Griecher » (Dr Eduard Zeller). Ce livre est constitué de papier chiffon principalement à base de deux fibres végétales, le chanvre et le lin. Il présente de petites taches tridimensionnelles de forme circulaire et de couleur jaune/brune de dimensions 0,2 à 1 cm de diamètre. Les taches de foxing sont réparties de manière aléatoire sur toutes les pages du livre (extérieur et centre des pages).

Figure 23 : Première de couverture du livre étudié altéré par du foxing.

I-2) Papiers peints

Onze couples de papiers peints moisis et non moisis, jugés à l'œil nu, ont été chacun prélevés de onze logements différents issus de la région de Besançon. Les occupants de ces logements ont été diagnostiqués, par un médecin spécialiste, comme présentant différents symptômes regroupés dans le tableau VI.

Tableau VI : Symptômes des habitants des 11 logements contaminés par des moisissures

1 : symptôme diagnostiqué; 0 : symptôme non diagnostiqué, M : papier peint moisi, NM : papier peint non moisi.

	symptômes des habitants des logements diagnostiqués par un médecin spécialiste							
numéro du logement	asthme	rhinite	conjonctivite	SBS	greffe rénale	pneumopathie infiltrante diffuse	bronchite	trachéite spasmodique
1	1	1	1	0	0	0	0	0
2	0	1	0	0	0	0	0	0
3	1	1	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	1	0
5	1	1	0	0	0	0	0	0
6	1	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	1	0	0	0	0
8	0	0	0	1	0	0	0	0
9	0	0	0	0	1	0	0	0
10	1	0	0	0	0	0	0	1
11	0	0	0	0	0	1	0	0

.

II) Mesure des coordonnées chromatiques du foxing par le système L*a*b* CIE

Afin de caractériser de manière numérique la couleur des taches de foxing, nous en avons mesuré les coordonnées chromatiques. Elles ont été comparées à celles d'une tache de foxing induite par du fer, dans le but de mieux préciser l'origine du foxing étudié (métallique ou fongique). Le principe de cette méthode est rappelé ci-dessous.

II-1) Principe

La mesure de la couleur à l'aide des coordonnées chromatiques du système L*a*b* a été mise en place par la Commission Internationale de l'Eclairage (CIE 1978). Il s'agit d'un modèle tridimensionnel comprenant les trois paramètres suivants :

- La composante **L*** détermine la clarté de l'échantillon avec une échelle variant de 0 pour le noir à 100 pour le blanc.

- La composante **a*** dont les valeurs s'étendent de +128 à -128, représente la gamme de l'axe rouge pour les valeurs allant de +128 à 0, et la gamme de l'axe vert pour les valeurs comprises entre -128 et 0.
- La composante **b*** dont les valeurs vont de +128 à -128 représente la gamme de l'axe jaune pour les valeurs allant +128 à 0, et la gamme de l'axe bleu pour les valeurs comprises entre -128 et 0.

Le diagramme des couleurs est représenté par la figure 24.

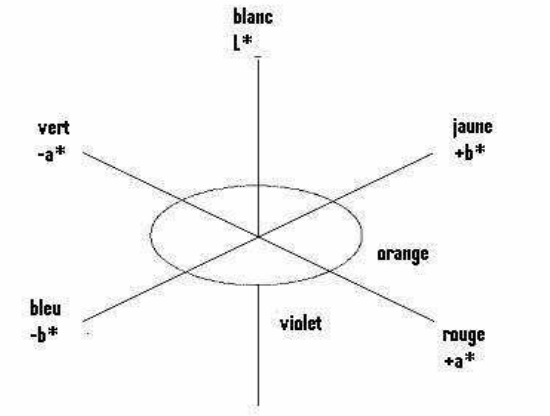


Figure 24 : Diagramme de l'axe de couleur L*a*b* (d'après Bicchieri *et al.* 2002 modifié).

II-2) Appareillage

La mesure des coordonnées chromatiques relatives à la couleur des taches de foxing du livre étudié, a été effectuée par le biais d'un spectrocolorimètre portable (X-Rite SP64, Massy, France) sur les échantillons de papiers. Une surface de 0,28 cm^2 de papier altéré par le foxing et non altéré par le foxing a été découpée à l'aide d'une perforeuse. Chaque papier a été placé au centre de l'appareil. Celui-ci délivrait un rayon sur l'échantillon qui renvoyait une réponse dont les coordonnées L*a*b* ont été mesurées. Le pourcentage d'erreur de mesure de cet appareil est de ± 2%.

II-3) Mesures

Les résultats numériques sont exprimés avec un écart type à la moyenne résultant de la mesure de 6 échantillons différents de foxing sur différentes pages. Ils ont été comparés à 6 échantillons non tachés du même livre. Les analyses statistiques ont été réalisées par un test

non paramétrique de Mann-Whitney à l'aide d'un logiciel Statview 5. Une différence entre deux valeurs a été considérée comme significative pour un $p < 0,01$.

Un autre type de papier, le papier Whatman (formé uniquement de fibres de cellulose) a été dopé avec 6,3 µg de $FeCl_3$ et vieilli durant un mois en chambre climatique à 65% d'humidité relative à 80°C (norme ISO 5630-3). Ses coordonnées chromatiques ont été ensuite mesurées de la même façon que pour les échantillons de foxing, de manière à comparer les coordonnées L*a*b* d'une tache de foxing naturelle et celle d'une tache de foxing induite par un métal.

III) Analyse MEB-EDX du foxing

La recherche des éléments métalliques dans le foxing étudié est une étape importante afin de mieux comprendre l'origine du foxing étudié, mais aussi de mieux préciser le rôle des différents agents abiotiques dans le processus de formation du foxing étudié. Cette recherche d'éléments métalliques dans le foxing a été effectuée par MEB-EDX.

III-1) Principe

Le principe du MEB repose sur un balayage de l'échantillon à analyser (sans prétraitement) par un faisceau d'électrons produit par un filament de tungstène sous une tension de 20 keV. En réponse, l'échantillon réémet principalement quatre types de particules : les électrons Auger, les électrons rétrodiffusés, les rayons X et les électrons secondaires. Dans le cadre de l'analyse du foxing, nous avons utilisé ces deux dernières particules. L'analyse des rayons X émis par un échantillon permet d'obtenir des informations relatives à la nature chimique des éléments présents dans cet échantillon et de dresser ainsi le spectre en éléments chimiques de l'échantillon. En effet, chaque élément chimique réémet une réponse qui lui est spécifique, ce qui permet de reconstituer le spectre de l'analyse globale en éléments chimiques de l'échantillon.

L'image de l'échantillon est obtenue par le biais des électrons secondaires. Il est possible d'attribuer à chaque élément chimique de l'échantillon une couleur et de faire une image de la répartition d'un élément chimique sur la surface de l'échantillon. Cette image est appelée cartographie.

III-2) Mesures

Une surface de 1 cm^2 de papier altéré et non altéré par le foxing a été découpée sous une loupe à l'aide d'un scalpel. Six échantillons foxés et six échantillons non foxés ont été montés sur un film de carbone à l'aide d'un ruban adhésif afin d'être analysés par MEB-EDX. Les analyses MEB-EDX du livre étudié ont été réalisées au CRCC (MNHN) avec un MEB JEOL JMS-5410 LV équipé d'un système d'analyse de rayons X Link Pentafet (Oxford instruments, Oxford, Royaume-Uni). Le spectre en éléments chimiques des papiers a été réalisé sur le logiciel Link Isis (Oxford instruments, Oxford, Royaume-Uni). La distance de l'échantillon était de 20 mm. L'intensité et la tension du filament de tungstène étaient respectivement de 20 keV et de 57 µA sous 9 Pa. Le temps d'acquisition était de 50 s.

IV) Evaluation de la viabilité des micro-organismes du foxing par ATPmétrie

Après avoir caractérisé les agents abiotiques du foxing, nous nous sommes intéressés aux agents biotiques. Nous avons commencé par les caractériser en évaluant leur viabilité par ATPmétrie. Cette méthode a été adaptée aux espèces fongiques par le CRCC où une solution de DMSO/Tris EDTA (90/10 v/v) a été retenue comme étant la solution extractrice optimale d'ATP de différentes espèces fongiques lors d'une étude réalisée au CRCC sur des solutions aqueuses de différentes spores fongiques (Rakotonirainy et Arnold 2008). La viabilité des espèces fongiques du foxing a également été comparée à un témoin positif (papier artificiellement contaminé par *A. fumigatus*), afin de mieux situer l'activité métabolique des espèces fongiques du foxing par rapport à celle d'une moisissure classique.

IV-1) Principe

L'ATP est une molécule produite chez les eucaryotes au sein d'un organite cellulaire appelé mitochondrie, au cours de la phosphorylation oxydative par transfert des électrons. Elle est présente en quantité constante dans les cellules vivantes du fait d'un équilibre entre sa synthèse et sa dégradation et est absente des cellules mortes. A ce titre, l'ATP constitue donc un bon indicateur de viabilité des organismes. La molécule d'ATP (Adénosine TriPhosphate) est la source d'énergie principale présente chez tous les organismes vivants. Cette molécule fournit l'énergie nécessaire au déroulement de nombreuses réactions enzymatiques au sein de la cellule vivante. Chimiquement il s'agit d'un nucléotide triphosphate formé d'un

nucléoside : l'adénosine, comprenant une base azotée (l'adénine) et un sucre le (ribose), et de trois groupements phosphate comme le montre la figure 25 :

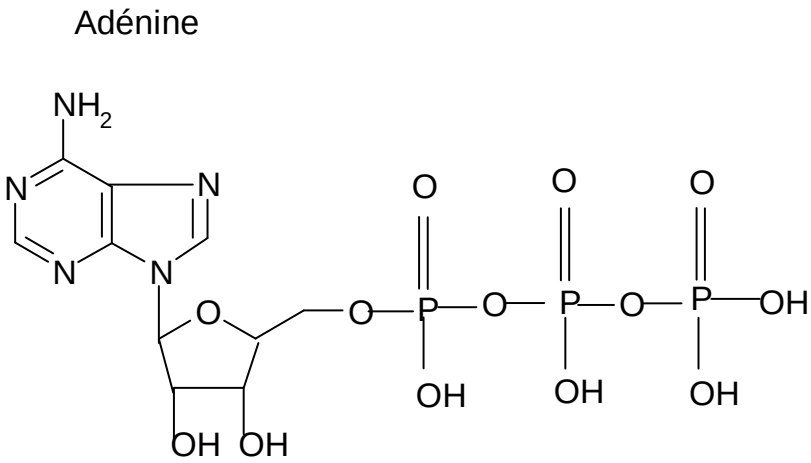


Figure 25 : Structure de la molécule d'ATP (adénosine triphosphate).

La méthode d'ATPmétrie a été utilisée dans plusieurs domaines dans le cadre de la détection microbienne tels que l'abattage découpe (Minvielle *et al*. 1999) ou encore l'alimentation (Miller et Galston 1990). Elle n'a jamais été appliquée aux espèces fongiques du foxing. Nous utiliserons cette méthode dans notre travail afin d'évaluer la viabilité des espèces fongiques du foxing. Le principe est développé dans le paragraphe suivant.

La détection de l'ATP peut être réalisée grâce au principe de la luminescence, propriété qu'ont certaines molécules à restituer sous forme de photons l'énergie absorbée au cours d'une excitation. Cette propriété de luminescence est naturellement présente chez certains organismes. On parle alors de bioluminescence. Ces organismes transforment l'énergie chimique emmagasinée en énergie lumineuse sous forme de photons. Cette conversion est réalisée par le biais d'enzymes naturellement présentes chez ces organismes vivants. Le système luciférine/luciférase, où la luciférine constitue le substrat et la luciférase l'enzyme, a été décrit comme étant le système ayant la propriété de bioluminescence (Champiat *et al.* 1993). La molécule d'ATP est reconnue spécifiquement en tant que substrat par le biais du complexe luciférine-luciférase en présence d'oxygène et d'ions magnésium. Il se forme alors, un complexe à l'état excité émettant des photons. Cette émission de photons peut-être mesurée dans le cadre des méthodes ATP métriques, par un luminomètre reflétant la quantité de lumière émise sous forme de RLU (Relative Light Units), car la quantité de photons est proportionnelle à la RLU.

Cette méthode d'ATPmétrie est utilisée en routine au CRCC sur des extraits de différentes matrices dont on soupçonne la contamination par des moisissures afin de déterminer rapidement si celles-ci sont viables. Elle n'a jamais été appliquée, aux micro-organismes de taches de foxing et a été utilisée dans le cadre de ce travail.

IV-2) Protocole

Tous les échantillons de papiers analysés ont été découpés à l'aide d'une perforeuse de 0,6 cm de diamètre (0,28 cm^2) préalablement stérilisée près d'un bec bunsen en vue d'éviter toute contamination lors de l'échantillonnage.

Le dosage de la molécule d'ATP a été réalisé en trois étapes :

- Extraction des spores fongiques des papiers étudiés.

Cinq papiers altérés par le foxing et non altérés par le foxing de 0,28 cm^2 ont été découpés à l'aide de la perforeuse et ont été mis en suspension dans une solution d'eau à 0,05 % de tween 80 (500 µL). Ils ont ensuite été broyés à l'aide de billes en verre dans un vibrobroyeur MM 200 (Retsch, Eragny sur Oise, France) durant 1 minute à 1500 rpm (rotations par minute). Le surnageant de la solution obtenue après broyage a été conservé en vue d'en doser la quantité d'ATP.

- Extraction de la molécule d'ATP présente dans les spores.

Les extractions ont été réalisées avec une solution DMSO-Tri EDTA (Diméthylsulfoxide/ Tampon Tris éthylène diamine tétracétique) (90/10 v /v) préchauffée à 100 ° C durant 2 min puis ajoutée à la suspension de spores (500 µL). La solution ainsi obtenue a été agitée au vortex puis chauffée à 100°C durant 2 min avant d'être refroidie dans de la glace. L'extrait de l'échantillon (1 mL) était ainsi prêt pour les mesures d'ATP.

- Dosage de la molécule d'ATP.

Le contenu en ATP a été déterminé, d'abord par l'ajout de 50 µL luciférine/luciférase à l'extrait. Une première lecture dans un luminomètre (Turner Designs 20/20, Sunnyvale, Etats-Unis) a été réalisée donnant une valeur de RLU (Relative Light Units), puis 5 µL d'ATP standard de 10 µmol/L (kit SL 144-041 de Biothema, Haninge, Suède) ont été ajoutés donnant une valeur RLU'. La quantité d'ATP a été calculée par la formule suivante :

$Q_{ATP}\,(ng) = [RLU - RLU_{blanc} /(RLU' - RLU)] \times Q_{ATP\ standard\ (ng)}$

La RLU du blanc est celle du solvant eau à 0,05 % de tween 80.

La même procédure a été appliquée à un témoin positif : papiers du même livre non foxés et à un témoin positif : papier du livre étudié ensemencé par *A. fumigatus* (NRRL

35693, Collection du Northern Regional Research Laboratory). Les conidies d'*A. fumigatus* ont été prélevées d'une culture sur PDA datant de 7 jours. Une solution de 250 µL contenant 6.10^5 spore /mL a été appliquée en spray sur 25 cm^2 de papiers non foxés. Ils ont ensuite été placés dans une boite de Pétri et mis à 26°C sous atmosphère saturée en eau durant un mois. Ce protocole a été réalisé par le laboratoire de pharmacologie et de toxicologie de l'INRA de Toulouse.

IV-2) Limites de détection

Etant donné des teneurs en structures fongiques dans le foxing, inférieures à celle d'une moisissure, nous avons voulu déterminer les limites de détection en quantité d'ATP et en nombre de spores de la méthode d'ATPmétrie.

Les limites de détection de la méthode d'ATPmétrie en quantité d'ATP et en nombre de spores ont été évaluées en mesurant la RLU de solutions aqueuses d'ATP de concentrations croissantes (tableau VII), et de solutions aqueuses de spores de quantités croissantes (tableau VIII).

Tableau VII : Valeurs de RLU mesurées par le luminomètre TD 20/20 de solutions aqueuses contenant des quantités d'ATP connues.

Quantité d'ATP(ng)	**0**	**1. 10^{-4}**	**2,5.10^{-4}**	**5.10^{-4}**	**5.10^{-3}**	**5.10^{-2}**	**0,1**
Moyenne RLU	0,065	0,111	0,201	0,246	0,822	8,73	15,68
Ecart type RLU	0,003	0,000	0,020	0,026	0,024	1,07	0,635

D'après le tableau VII, la plus petite valeur de RLU non nulle de 0,1 est obtenue pour une quantité d'ATP de 0,1 pg qui constitue la limite de détection de cette technique en quantité d'ATP.

Tableau VIII : Valeurs de RLU mesurées par le luminomètre TD20/20 de solutions aqueuses contenant des quantités de spores connues.

Nombre de spores/mL	100000	10000	1000	100
Moyenne RLU	26,647	1,437	0,125	0,068
Ecart type RLU	2,919	0,221	0,075	0,035

Pour le nombre de spores, la plus petite valeur de RLU non nulle (0,125) est obtenue pour une solution de spores à 10^3/mL.
Il convient de noter que nous avons obtenu une relation linéaire entre les valeurs de RLU et la quantité d'ATP ou le nombre de spores.

V) Mise en culture du foxing

Nous avons vu que plusieurs espèces fongiques avaient été identifiées par plusieurs auteurs en mettant en culture des papiers altérés par le foxing. Ces mises en culture ne sont pas toujours fructueuses. Afin de déterminer si les taches de foxing du livre étudié permettent d'obtenir des isolats fongiques, nous les avons mises en culture sur des milieux usuellement utilisés pour les espèces fongiques. Nous avons également mis en culture des zones non altérées par le foxing afin de déterminer si, seules les zones de foxing permettent d'obtenir des isolats, et d'évaluer ainsi la contamination du livre. Enfin, nous avons utilisé des milieux de culture Cœur Cervelle permettant la croissance des actinomycètes et des bactéries.

V-1) Protocole

Une surface de 0,28 cm^2 de papiers altérés ou non par le foxing, a été découpée à l'aide d'une perforeuse près d'un bec bunsen afin d'éviter toute contamination. Trois morceaux de papiers foxés et non foxés ont ensuite été ensemencés sous une hotte à flux laminaire sur les milieux de culture suivants :

- Milieux Cœur Cervelle (Becton et Dickinson, Le Pont-De-Claix, France). Ces milieux de culture sont utilisés essentiellement en milieu hospitalier afin de rechercher un grand nombre de micro-organismes incluant levures, bactéries et moisissures. Sa composition riche à base d'infusion de cervelle, pourrait permettre de favoriser la culture de micro-organismes non encore isolés dans le foxing.
- Milieux malt agar afin d'obtenir des isolats fongiques.

- Milieux R8 décrit par Amner et utilisé pour les actinomycètes (Amner *et al.* 1989).
- Milieux pour actinomycètes (Actinomycètes Isolation Agar, AIA) (Becton et Dickinson, Le Pont-De-Claix, France).

Deux essais ont été réalisés dans lesquelles deux milieux de chaque milieu de culture ont été utilisés. Chaque milieu de culture a été incubé à 26 °C durant 7 jours. Cette température d'incubation inférieure à 30 °C, a été choisie de manière à ne pas favoriser les espèces comme *A. fumigatus,* qui sont parmi les rares capables de proliférer à des températures supérieures à 30°C.

V-2) Identification microbiologique

Les isolats fongiques obtenus ont été repiqués sur milieu malt agar et incubés 7 jours à 26°C afin de réaliser une empreinte adhésive qui a été observée au microscope afin d'identifier le genre fongique.

V-3) Extraction et purification de l'ADN issu des isolats fongiques obtenus par mise en culture des papiers altérés par le foxing

Lorsque des isolats fongiques ont été obtenus, la procédure d'extraction de l'ADN a été la suivante :

- broyage chimique de la paroi des champignons par ajout de 2 mL de tampon de lyse (Qiagen, Courtaboeuf, France) au tube de culture contenant le champignon. Un lysat enrichi en spores a ainsi été obtenu après avoir gratté la surface de culture du champignon avec une anse stérile, puis il a été ensuite agité au vortex durant 30 secondes;
- broyage mécanique de la paroi des champignons effectué par transfert du lysat à l'aide d'une pipette en plastique à usage unique, dans des tubes contenant des billes en céramiques (kit MagNa Lyser Green Beads, Roche Diagnostics, Meylan, France). Les tubes contenant les billes de céramiques ont ensuite été mis à centrifuger à 5000 rpm durant 30 secondes et refroidis dans la glace avant d'être à nouveau centrifugés à 3000 rpm durant 4 min. Le surnageant obtenu a été conservé en vue d'en purifier l'ADN;
- purification de l'ADN sur un automate MagNa Pure Compact System (Roche Diagnostics, Meylan, France) avec pour volume d'échantillon d'ADN à purifier 400

µL et pour volume d'élution 100 µL (kit Isolation Kit for Cells and Tissues, Roche Diagnostics, Meylan, France).

La vérification de la pureté de l'ADN et la quantification de l'ADN extrait ont été réalisées après chaque extraction et purification d'ADN fongique. Il a été vérifié que le rapport de la densité optique : DO 260 / DO 280 était compris entre 1,8 et 2, signifiant que la purification de l'ADN a été correctement réalisée et que la contamination protéique était faible. La quantité d'ADN mesurée dans chaque échantillon était en moyenne de 20 ng/µL.

Une fois l'extraction et la purification de l'ADN réalisées, l'amplification de l'ADN a été réalisée en ciblant les gènes appartenant au complexe génétique codant pour les ARN ribosomaux 18S, 28S et 5,8S, ainsi que le gène codant pour la ß-tubuline. Les paires d'amorces ITS1 (5´-TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG-3´) et ITS4 (5´-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3´) (White *et al.* 1990), ont été utilisées pour les amplifications d'ADN issu de tous les isolats. Les amorces ß-t2a (5'-GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC-3') et ß-t2b (5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3') (Glass et Donaldson 1995) ont été utilisées pour les isolats dont l'empreinte sur adhésif permettait l'identification du genre *Penicillium.* Le protocole suivi pour l'amplification génique est indiqué en annexe I.

Le résultat de l'amplification de l'ADN par Polymerase Chain Reaction (PCR) a été vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%, révélé au bromure d'éthidium visualisé sous UV. Les fragments amplifiés ont été séquencés en utilisant les mêmes amorces. Le séquençage a été réalisé à la plateforme génomique de l'Institut Mondor de Recherche Biomédicale. L'analyse des produits PCR (2 µL par réaction) a été effectuée par le biais d'un séquenceur automatique capillaire (ABI Prism 3130xl Genetic Analyser, Applied Biosystems). Les séquences obtenues ont été comparées sur GenBank par rapport aux banques de données disponibles sur le National Center for Biotechnology Information (NCBI) en utilisant BLASTN (Blast nucleotide pairwise search program) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Seules les séquences ayant un pourcentage de similarité de 99-100% avec les séquences fongiques de références ont été retenues.

VI) Etude microbiologique des papiers peints

Afin de connaître la population fongique des papiers peints moisis issus de logements, les espèces fongiques les plus communes de l'environnement y ont été recherchées. Ces expériences ont été réalisées par le laboratoire de Chrono-environnement de Besançon. Les

onze couples de papiers moisis et non moisis ont été découpés pour une surface totale de 2 cm^2 et extraits dans 2 mL de Tween à 0,1% après agitation 10 min au Stomacher (VWR, Fontenay-sous-Bois, France), puis 200 µL d'extraits de chaque papier peint ont été utilisés pour la qPCR (dont le principe est rappelé dans le paragraphe suivant). Les ARNm des différents échantillons ont été extraits sans kit (Keswani *et al*. 2005). Deux extraits ont été réalisés pour chaque liquide de rinçage, avec et sans contrôle interne.

VI-1) Recherche des espèces fongiques par culture

100 µL de liquide de rinçage de chaque papier peint ont été ensemencés sur milieux DG-18 et malt agar. La lecture a été réalisée après dix jours d'incubation à 30°C et 20°C respectivement. L'ensemble des espèces fongiques ont été identifiées selon les critères macroscopiques et microscopiques.

VI-2) Recherche des espèces fongiques par PCR quantitative en temps réel (qPCR)

Principe de la qPCR

La qPCR permet de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à chaque cycle de la PCR (environ 46 cycles). Des sondes fluorescentes se fixent sur l'ADN (technologie SYBR) et fluorescent. L'appareil de PCR établit un seuil de fluorescence. Lorsque la quantité d'ADN permet aux sondes fluorescentes de dépasser le seuil de fluorescence, alors on obtient un nombre de cycles de PCR appelé "Ct" pour "Cycle threshold" ou cycle seuil. Cette valeur permet de quantifier l'ADN fluorescent.

Extraction

Dans les tubes pré remplis de billes de céramique (Roche diagnostics, Meylan, France), ont été ajoutés 200 µL de Bouillon Cœur Cervelle (BCC) (Becton et Dickinson, Franklin Lakes, Etats-Unis) et 200 µL d'échantillon. Un vibro-broyage des spores a été réalisé dans le Magna Lyser (Roche Diagnostics, Meylan, France) : trois fois 10 secondes à 6500 rpm avec refroidissement (d'une durée d'une minute) dans le bloc prévu à cet effet après chaque broyage. Les tubes ont ensuite été placés au bain-marie à 100°C pendant 10 minutes, puis 10 minutes dans la glace, pour permettre la libération de l'ADN. Une centrifugation de 2 minutes à 8000 rpm a permis d'obtenir un volume de surnageant de 200 µL constituant l'extrait.

Extraction avec contrôle interne (Geotrichum candidum)

La quantité de *G. candidum* à ajouter à nos échantillons pour pouvoir ensuite interpréter la présence ou l'absence d'inhibiteurs de PCR, a été déterminée après différents essais sur des lingettes tests. La concentration la plus adéquate pour notre travail était de 10^3 spores/mL. La suspension à 10^5 spores/mL (diluée au 1/100 par le protocole d'extraction) a donc été utilisée pour la mise en évidence d'inhibiteurs. En pratique, dans les tubes ont été ajoutés 198 µL de BCC, 2 µL de la suspension de spores de *G. candidum* calibrée à 10^5 spores/mL (dilution au 1/100) et 200 µL de notre échantillon. La suite de la procédure a été identique à l'extraction sans contrôle interne décrite dans le paragraphe précédent.

La réalisation de la PCR spécifique *G. candidum* sur ces extraits contenant une quantité connue de *G. candidum*, permet, en comparant le Ct attendu et le Ct obtenu, de détecter la présence d'inhibiteurs.

L'amplification a été réalisée sur Light Cycler 480 (Roche Diagnostics, Meylan, France) pour *A. versicolor* et sur le 7500 fast (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) pour *P. chrysogenum*, *C. sphaerospermum* et *S. chartarum.* Les séquences des amorces et du contrôle interne utilisées pour identifier les quatre espèces fongiques dans les papiers peints, sont indiquées en annexe II. Le protocole de PCR suivi a été adapté à partir de celui décrit par Haugland (Haugland *et al.* 1999).

q PCR sur Light Cycler Roche

Le mélange réactionnel (15 µL) a été composé pour chaque échantillon de 2,4 µL de $MgCl_2$, 1,6 µL de sonde (1 pmol/µL), 4 µL de mélange d'amorces (5 pmol/µL), 2 µL de Master Mix (Kit LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes, Roche Diagnostics, Meylan, France), 0,25 µL d'UNG (Uracyl DNA Glycosylase) et 4,75 µL d'eau distillée stérile. Ce mélange a été introduit dans un capillaire de 20 µL (Roche Diagnostics, Meylan, France) avec 5 µL d'extrait d'ADN.

PCR sur 7500 fast Applied

Le mélange réactionnel (15 µL) a été composé de 10 µL de Gene Expression Master MIX (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), 0,8 µL de sonde (2 pmol/µL), 4 µL de mélange d'amorces (5 pmol/µL), et 0,2 µL d'eau distillée stérile. Ce mélange a été ensuite déposé dans une plaque 96 puits (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) avec 5 µL d'extrait d'ADN.

Les conditions d'amplification étaient identiques sur les deux appareils : 10 minutes à 95°C, puis 40 cycles contenant 15 secondes à 95°C (étape de dénaturation) et 1 minute à 60°C (étape d'hybridation-élongation).

Le Ct est déterminé automatiquement par l'appareil et interprété en fonction de gammes d'étalonnage en spores/mL amplifié pour chaque espèce à chaque série. Pour chaque série, il a également été ajouté, à la suite des échantillons, un témoin négatif d'extraction (extrait réalisé sur 200 µL d'eau distillée stérile) et un témoin négatif d'amplification (eau distillée stérile).

VII) Analyse par HPLC-UV-MS du foxing et des papiers peints

Pour les deux types de substrats étudiés (papiers peints et papiers altérés par le foxing), une fois les analyses microbiologiques effectuées, nous avons recherché les métabolites fongiques, en particulier les mycotoxines par HPLC-UV-MS. Dans le cadre de l'étude du foxing, il s'agissait également de déterminer si cette stratégie pouvait être une alternative aux méthodes de biologie moléculaire. Dans le cadre des papiers peints, il s'agissait de déterminer si les métabolites détectés pouvaient être reliés aux espèces fongiques mises en évidence par microbiologie. Après avoir rappelé le principe de cette méthode, le protocole commun aux deux types de papiers étudiés est exposé dans les paragraphes ci-dessous.

VII-1) Principe

La chromatographie est une technique analytique permettant de séparer des composés entraînés par une phase mobile à travers une phase stationnaire. La phase stationnaire utilisée au cours de ce travail est de type phase inverse (hydrophobe), portant des chaînes aliphatiques de 18 atomes de carbone, greffées sur de la silice, ayant une affinité pour adsorber les composés hydrophobes. La phase mobile est constituée d'un gradient linéaire d'eau ou de

tampon et d'une quantité croissante d'un solvant organique apolaire ACN (acétonitrile) qui entraîne les analytes vers le détecteur. Dans ce cas, les composés polaires sont élués en début de gradient et les composés hydrophobes en cours de gradient. Dans notre travail, nous avons utilisé un gradient linéaire de deux phases mobiles (tableau IX) :

- phase A : eau/ACN (90/10 v/v) à 10 mM d'acétate d'ammonium,
- phase B : eau/ACN (10/90 v/v).

Tableau IX : Conditions du gradient pour l'HPLC-UV-MS.

Temps (min)	**Pourcentage de la phase B**
0,01	2
5	2
25	80
28,5	2
34,5	2

La colonne utilisée pour la séparation des composés est une Modulo 6 Cart QS Kromasil de type C18 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) dont la taille des particules est de 5 µm. Les dimensions de la colonne sont de 150* 2 mm. La séparation des composés a été effectuée à température ambiante et le volume d'injection était de 20 µL.

Trois types de détecteurs ont été utilisés au cours de ce travail :

- Détecteur UV à barrette diodes

Il permet de mesurer l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne. Il fournit, en plus du chromatogramme, des renseignements spectraux permettant de s'assurer de l'identité des composés séparés. Ce détecteur est composé d'une rangée de diodes dont chacune indique l'absorbance moyenne sur un intervalle de longueurs d'onde. Il permet une mesure simultanée de plusieurs longueurs d'ondes grâce à l'alignement de

photodiodes fonctionnant en intégrateur de lumière. Dans notre travail, la détection UV a été réalisée sur un détecteur Shimadzu-M10 AVP à 254 et 280 nm.

- Détection par fluorimétrie

Les molécules fluorescentes ont la propriété d'être excitées à une certaine longueur d'onde (λ_{exc}). Le retour à l'état fondamental s'effectue par libération d'une partie de l'énergie reçue sous la forme d'une onde lumineuse à une longueur d'onde dite d'émission (λ_{em}), supérieure à celle de l'onde incidente. Ce phénomène qui caractérise certaines molécules est appelé fluorescence.

Les structures aromatiques sont généralement des molécules fluorescentes. De nombreuses mycotoxines possèdent une ou plusieurs fonctions aromatiques pouvant être excitées et être fluorescentes. La détection fluorimétrique est généralement plus sensible que l'UV. Nous avons utilisé un détecteur Waters dont les longueurs d'onde d'excitation et d'émission ont été respectivement de λ_{exc} = 278 nm et λ_{em} = 460 nm.

- Détection par spectrométrie de masse

Cette méthode de détection permet de mesurer des rapports masse/charge (*m/z*) de molécules ionisées par arrachement ou addition de protons ou autres ions générés dans la source ionique. Le principe de cette méthode repose sur l'ionisation de la molécule grâce aux différents constituants d'un spectromètre de masse cités ci-dessous.

∗ Source d'ionisation : Elle permet d'ioniser la molécule à étudier en la transformant en ion par perte ou gain de charge. Dans le cadre de ce travail, l'ionisation par électrospray (ESI) a été utilisée. Elle se déroule à pression atmosphérique, et à température ambiante. Ce mode d'ionisation est le plus adapté pour les couplages avec l'HPLC et pour des molécules de la taille des mycotoxines. Les composés, généralement dissous dans une solution aqueuse (mélange méthanol-eau ou acétonitrile-eau, dans des proportions allant de 10 à 90%), sont introduits dans la source par l'intermédiaire d'un capillaire venant de la sortie de la colonne de chromatographie (dans le couplage HPLC-MS). Sous l'action d'un gaz nébuliseur (N_2), et d'un champ électrique, un fin brouillard de gouttelettes mono et polychargées est créé. Un champ électrique appliqué entre le capillaire et une contre-électrode, permet l'ionisation de ces gouttelettes. Celles-ci diminuent progressivement de taille par évaporation du solvant et la tension superficielle qui maintient la gouttelette en état, devient plus petite que la répulsion électrostatique de type coulombienne, due à la présence des charges. C'est ainsi que la gouttelette éclate en plusieurs gouttelettes filles multichargées et la désolvatation se poursuit.

Le processus se répète plusieurs fois. On obtient ainsi une suite de cascades d'explosions coulombiennes. Le phénomène s'arrête lorsqu'il ne reste plus qu'une seule molécule présentant une ou plusieurs charges, car l'énergie correspondant à la répulsion coulombienne ne permet pas de rompre les liaisons covalentes. L'ionisation d'une molécule peut se faire par perte d'un atome d'hydrogène ($M\text{-}H^+$). On parle alors d'ionisation en mode négatif. Elle peut également se faire par gain d'un atome d'hydrogène ($M+H^+$), on parle d'ionisation en mode positif. On obtient ainsi un composé avec sa masse/charge notée *m/z.* Le tableau X indique un exemple d'ionisation en mode positif et négatif de la molécule d'aflatoxine B1.

Tableau X : Exemple de la *m/z* de l'aflatoxine B1 en ionisation positive et négative.

	M (g/mol)	**($M+H^+$)** ***m/z* en mode positif**	**($M\text{-}H^+$)** ***m/z* en mode négatif**
Aflatoxine B1	312,3	313,3	311,3

* Interface : permet de focaliser et de transmettre les ions vers l'analyseur.
* L'analyseur : il sépare les ions en fonction de leur rapport *m/z*. Il existe différents analyseurs : magnétique, quadripolaire, temps de vol, trappe d'ions, trappe d'ions associée à des octopôles. Ce dernier est celui utilisé au cours de ce travail. Il est possible de coupler plusieurs analyseurs ou d'associer plusieurs types d'ionisation afin de réaliser de la spectrométrie de masse à plusieurs dimensions, en utilisant successivement le pouvoir séparateur de chaque analyseur. Ce procédé permet d'obtenir les fragments de l'ion analysé dans le premier analyseur et permet ainsi d'avoir des données conduisant à des informations structurales. Il permet ainsi d'avoir des informations quant au positionnement de groupements fonctionnels sur une molécule par comparaison à une molécule mère. De ce fait, il est très utilisé lors d'études structurales du métabolisme des médicaments ou de composés exogènes. Il ne permet cependant pas d'avoir des informations sur la stéréochimie des différentes fonctions. La figure 26 schématise l'exemple d'une fragmentation MS^2 d'une molécule M.

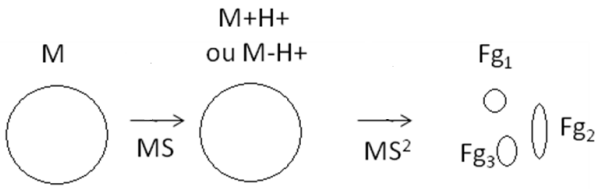


Figure 26 : Schéma d'ionisation d'une molécule M et de sa fragmentation après MS^2 en fragments Fg_1, Fg_2, Fg_3. M+H+ : ionisation en mode positif de la molécule M, M-H+ : ionisation en mode négatif de la molécule M, MS : spectrométrie de masse à une dimension, MS^2 : spectrométrie de masse à deux dimensions.

Cette méthode permet essentiellement d'obtenir 3 informations : la masse moléculaire du composé étudié, la masse des fragments de ce composé, la quantité du composé étudié.

Au cours de ce travail, les analyses en spectrométrie de masse ont été effectuées sur un spectromètre de masse utilisé avec trappe d'ions Esquire (Bruker Daltonick GmbH, Bremen, Allemagne). L'énergie d'ionisation utilisée a été de 4,5 kV. La température du capillaire a été fixée à 330°C. Les flux du gaz principal et des gaz auxiliaires étaient respectivement de 40 et 10 mL/min. L'énergie de collision était de 0,70 V.

VII-2) Protocole

Les échantillons de papiers altérés par le foxing ont été découpés avec une perforeuse de 0,6 cm de diamètre. Une surface de 11,3 cm^2 a été analysée pour les papiers altérés par le foxing et une surface de 1 cm^2 a été analysée pour les papiers peints issus de logements. Les différents échantillons ont été extraits dans 1 mL de solvant eau/Acétonitrile (ACN)/ méthanol (MeOH) en proportion 40/30/30 (v/v/v) durant 2 jours, sous agitation magnétique à l'aide de 1 g de billes (glasperlen B. Braun Biotech. International GmbH, Melsungen, Allemagne). Les extraits obtenus ont ensuite été centrifugés sur une centrifugeuse (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) à 4700 tours/min durant 10 min puis filtrés sur filtre PVDF (Polyfluorure de Vinylidène) 0,22 µm avant d'être analysés par HPLC-UV-MS.

Pour les papiers altérés par le foxing, une étape de préconcentration de l'échantillon par extraction sur phase solide (SPE) a été effectuée sur une cartouche de type C18 de 100 mg de phase, selon le protocole décrit en annexe III, avant l'analyse par HPLC-UV-MS, et une détection par fluorimétrie a été ajoutée selon les conditions exposées précédemment. Les 20

µL injectés en HPLC représentent respectivement 0,02 cm^2 de surface de papier injectée pour les papiers peints et 0,23 cm^2 pour le foxing.

Des témoins positifs dont on sait qu'ils produisent des métabolites fongiques, ont été également analysés par HPLC-UV-MS. Le témoin positif pour les papiers altérés par le foxing, était un papier du livre étudié, ensemencé par *A. fumigatus* (NRRL 35693) et les témoins positifs des papiers peints issus des logements, étaient 4 papiers peints ensemencés chacun par une des espèces fongiques suivantes : *A. versicolor* (NCPT 91, Nouvelle Collection du laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie de l'INRA de Toulouse), *C. sphaerospermum* (NCPT 149), *S. chartarum* (NCPT 92), *P. chrysogenum (*NRRL 3592). L'ensemencement a été réalisé par Olivier Puel (INRA Toulouse) selon le protocole décrit en paragraphe IV-1.

VIII) Cytotoxicité du foxing et des papiers peints

La finalité de notre travail était d'évaluer si les supports papiers étudiés contaminés par des espèces fongiques, peuvent représenter un risque toxique pour les personnes exposées par inhalation. Nous avons pour cela utilisé une lignée cellulaire représentative du tractus respiratoire qui a été exposée aux mêmes extraits étudiés par HPLC-UV-MS de foxing et de papiers moisis issus de logements. La toxicité a été évaluée par test MTT et expression des médiateurs de l'inflammation ainsi que du CYP 1A1.

VIII-1) Cultures cellulaires

Les cellules étudiées appartenaient à la lignée humaine A549 (DSMZ, ACC 107, Braunschweig, Allemagne) issue d'un carcinome alvéolaire pulmonaire.

Culture

Les cultures des cellules A549 ont été réalisées en atmosphère humide à 37°C sous 5% de CO_2. Le milieu de culture utilisé était composé de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's nutrient Mixture, Invitrogen, Villebon sur Yvette, France), additionné de sérum de veau foetal à 10% et de 0,5% de gentamicine (à 10 mg/ml) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Ce milieu de culture était renouvelé toutes les 48 heures (Annexe IV). La lignée A549 a été entretenue par culture en flasques de 25 cm^2 et repiquée une fois par semaine.

Recherche d'une contamination par les mycoplasmes

La contamination des cultures par des mycoplasmes (contaminants des voies respiratoires) a été recherchée tous les mois par PCR sur le surnageant de culture (*Mycoplasma* Détection Kit for conventional PCR, Venor®GeM, Minerva Biolabs, Biovalley, Marne-la-Vallée, France). C'est un contaminant cellulaire qui pourrait biaiser les expériences de cultures cellulaires. La présence d'un contrôle interne a permis de vérifier l'absence d'inhibiteur d'ADN polymérase (Annexes V). Aucun mycoplasme n'a été retrouvé

VIII-2) Test MTT

Principe

Nous avons utilisé le test MTT afin d'évaluer la cytotoxicité des extraits des deux supports papiers étudiés. Le test au bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium ou MTT, décrit par Mossman (Mossman 1983), est utilisé afin de déterminer la mortalité de cellules exposées à un composé. Le principe de ce test repose sur la métabolisation du MTT en cristaux de formazan de couleur bleue par les succinates déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes. La quantité de précipité formée est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes. Après dissolution des cristaux de formazan dans un agent de lyse, un dosage de la densité optique à 550 nm par spectroscopie, permet de connaître la quantité de cellules vivantes.

Plusieurs travaux ont porté sur l'utilisation du test MTT afin de déterminer la toxicité des mycotoxines : gliotoxine, citrinine, déoxynivalénol, zéaralénone, fumonisine B1, fumagilline, verruculogène, moniliformine etc. (Bünger *et al.* 2004, Cetin et Bullerman 2005; Kreja et Seidel 2002; Tammer *et al.* 2007). Il est calculé la CI_{50}, c'est-à-dire la concentration en mycotoxines entrainant 50% de mort cellulaire. Plus la CI_{50} est faible, plus la mycotoxine est considérée comme toxique. Parmi les mycotoxines testées, la gliotoxine serait celle ayant la CI_{50} la plus faible (0,3 µM) sur des cellules nommées A549, représentatives de l'épithélium respiratoire (Bünger *et al.* 2004). Le tableau XI regroupe des exemples de mycotoxines et leur CI_{50} calculée sur cellules A 549.

Tableau XI Quelques exemples de mycotoxines et de leurs CI_{50} obetnues sur cellules A 549 (d'après Bünger *et al.* 2004).

Mycotoxines	**CI_{50} (µM)**
Gliotoxine	0,3
Malformine A1	0,4
Acide mycophénolique	356,9
Pénitrem A	20,5
Stérigmatocystine	3,7
verruculogène	Toxicité non observée
Roquefortine C	Toxicité non observée

Protocole

Les cellules ont été ensemencées dans des plaques de culture de 96 puits (Techno Plastic Products, Trasadingen, Suisse) (surface d'un puits = 0,33 cm^2). Chaque puits contenait 1.10^4 cellules qui ont été incubées 24 h à 37°C sous 5% de CO_2. Les cellules ont été exposées durant 24 h à 5 µL d'extraits hydro-organiques de papiers peints et de foxing. Soit l'équivalent de 0,005 cm^2 de surface de papier injectée pour les papiers peints et 0,05 cm^2 pour le foxing. La durée d'exposition s'appuie sur des travaux réalisés par Bunger (Bünger *et al.* 2004), qui a évalué la toxicité par test MTT de plusieurs mycotoxines (gliotoxine, fumagilline, stérigmatocystine, roquefortine C, verruculogène, pénitrem A, acide mycophénolique, malformine A). Le volume d'extrait choisi (5 µL), résulte de l'évaluation de la toxicité du solvant d'extraction des papiers étudiés eau/ACN/MeOH entrainant le moins de mortalité cellulaire par test MTT. La figure 27 montre le pourcentage de cellules vivantes en fonction du volume d'eau/ACN/MeOH auquel les cellules A549 ont été exposées.

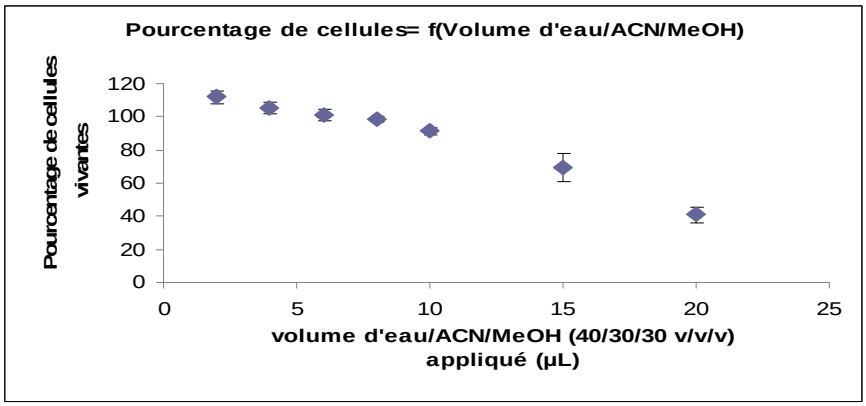


Figure 27 : Pourcentage de cellules A549 vivantes en fonction du volume d'eau/ACN/MeOH appliqué et révélé par test MTT.

Les témoins négatifs consistaient en des puits non exposés et les témoins positifs en des puits exposés à des concentrations en gliotoxine supérieures à sa CI_{50} (Bünger *et al.* 2004). Chaque échantillon a été testé sur 4 puits et sur trois essais différents. Après ce délai, 10 µL d'une solution de MTT (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) à 5 mg/mL dilués dans du D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Invitrogen, Villebon sur Yvette, France) ont été ajoutés dans chaque puits, et les plaques ont été incubées pendant 4 h à 37°C sous 5 % de CO_2. A la fin de cette incubation, les cellules ont été lysées et les cristaux de formazan dissous par une solution d'acide chlorhydrique/isopropanol (HCl 0,01N, à 10% de SDS/isopropanol 50/50 v/v) (100 µL par puits). Les densités optiques (DO) ont ensuite été lues à 550 nm.

Expression des résultats

Pour chaque échantillon, le pourcentage de survie cellulaire a été exprimé par rapport à des puits témoins selon la formule suivante :

Survie X (%) = (DO_X – $DO_{0\% \text{ cellules vivantes}}$/ $DO_{\text{témoin}}$- $DO_{100\% \text{ cellules vivantes}}$) X 100

- DO_X : DO dans les conditions X
- $DO_{100\% \text{ cellules vivantes}}$: DO des cellules non exposées
-$DO_{0\% \text{ cellules vivantes}}$: DO des cellules mortes

Analyse statistique des résultats par test MTT

Les pourcentages de survie cellulaire moyenne dans chaque condition testée ont été comparés statistiquement au pourcentage de survie moyen dans les puits témoins par un test t de Student. Les différences observées ont été considérées comme significatives pour $p < 0,05$.

VIII-3) Expression des médiateurs de l'inflammation et du CYP 1A1

Protocole

Les cellules A549 ont été ensemencées dans une plaque de 24 puits (Becton et Dickinson, Le Pont De Claix, France). Chaque puits contenait 4.10^4 cellules dans 1 mL de milieu. Les plaques ont été incubées 6 jours à 37°C, sous 5% de CO_2 avant d'être exposées à 25 µL d'extraits hydro-organiques de papiers peints moisis et non moisis durant 6 h. Chaque échantillon a été testé sur deux puits et deux cultures différentes.

Comme pour le test MTT, le volume et le temps d'exposition ont été choisis après avoir exposé les cellules A549 à trois volumes (10, 25 et 50 µL) de la solution d'extraction des papiers étudiés (eau/ACN/MeOH, 40/30/30 v/v/v) durant 3 h, 6 h et 24 h. Le volume le plus élevé et le temps maximal induisant le moins d'expression des cytokines et du CYP 1A1 ont été retenus, soit 25 µL durant 6 h. Un exemple est indiqué en figure 28 de l'expression du CYP 1A1 issu de cellules A549 exposées à différents volumes du solvant organique après 3 h, 6 h et 24 h d'exposition.

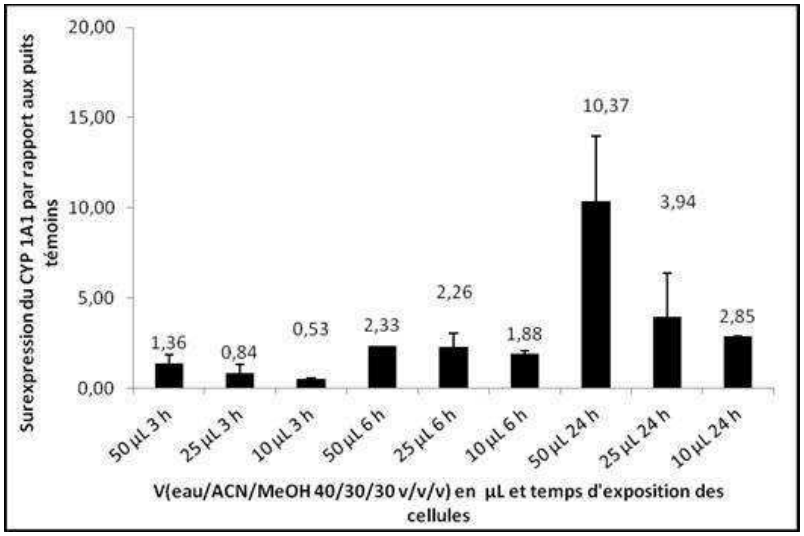


Figure 28 : Expression du CYP 1A1 issu de cellules A549 exposées à différents volumes d'eau/ACN/MeOH 40/30/30 (v/v/v) durant 3 h, 6 h et 24 h.

Extraction de l'ARN

Après élimination du milieu de culture de chaque puits, 200 µL de tampon de lyse (kit Roche Diagnostics, Meylan, France) ont été utilisés pour lyser les membranes cellulaires.
L'extraction de l'ARN a été réalisée sur automate MagNa Pure Compact System (Roche Diagnostics, Meylan, France) capable de traiter 8 échantillons simultanément. Les lysats cellulaires ont été placés dans l'automate ainsi que les tubes destinés à recevoir les extraits (volume d'élution de 50 µL). Les cartouches contenant l'ensemble des réactifs (MagNa Pure RNA isolation kit, Roche Diagnostic, Meylan, France), ont été introduites dans l'automate ainsi que 20 µL de DNAse par échantillon. La durée de l'extraction était d'environ 35 minutes. Les extraits d'ARN ont ensuite congelés à -80°C.

Reverse transcription

Les ADNc ont été obtenus par reverse transcription avec amorces aléatoires (random hexamer) permettant une amplification globale de tous les ARN présents dans l'extrait. La réaction a été réalisée sur un thermocycleur GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) (annexe VI). Un témoin sans reverse transcriptase et un témoin sans ARN ont été inclus dans chaque série. Les ADNc ont été conservés à -20°C.

qPCR

La quantification des ARNm cibles a été faite par qPCR avec le gène de référence TBP (TATA Box Binding Protein) et puits calibrateurs sur LightCycler 480 (Roche diagnostics, Meylan, France) (annexe VII). Le prémix LightCycler 480 SYBR® Green I Master (Roche diagnostics, Meylan, France) utilisé, contenait la FastStart Taq ADN polymérase, les dNTP, le $MgCl_2$ et du SYBR Green permettant la détection de l'amplification par fluorescence. Un mix a été préparé par gène à étudier (cible et référence). Les ADNc ont été dilués au $1/20^{e}$ dans de l'eau ultra pure avant amplification. La séquence des amorces utilisées pour le dosage de l'IL-8, du TNF-α, du GM-CSF et du gène de référence TBP, est indiquée en annexe VII.

Expression des résultats

La quantification relative des ARNm a été réalisée par la méthode ΔΔCt permettant d'exprimer la production d'ARNm d'un gène cible par rapport à un gène de référence (TBP) au sein de chaque puits cellulaire. Cette valeur a ensuite été rapportée à celle des puits calibrateurs (« témoins non exposés ») afin de déterminer la valeur de ratio normalisé « N ». « N » traduit l'expression du gène cible dans les puits exposés par rapport aux puits non exposés. Par exemple N = 8, signifie que les cellules du puits observé transcrivent 8 fois plus d'ARNm du gène étudié que les cellules des puits calibrateurs.

$$N = \frac{\mathbf{E}_{\textit{gène cible}}^{(\mathbf{Ct}\textit{gène cible non exposé} - \mathbf{Ct}\textit{gène cible exposé})}}{\mathbf{E}_{\textit{gène de référence}}^{(\mathbf{Ct}\textit{gène de référence non exposé} - \mathbf{Ct}\textit{gène de référence exposé})}}$$

N : Ratio normalisé

E : Rendement de PCR (théorique = 2)

Ct : Cycle threshold

Cible : Gène étudié

Référence : Gène TBP

Exposé : Puits exposés à un extrait de papier

Non exposé : Puits calibrateurs, non exposés

RESULTATS

I) Foxing

Nous avons débuté l'étude sur le foxing en caractérisant la couleur de celui-ci par une méthode numérique, et en y recherchant des agents abiotiques tels que les métaux. Dans un second temps, nous avons caractérisé les agents biotiques du foxing en évaluant leur viabilité, leur capacité à pousser sur des milieux de culture et à produire des mycotoxines. Cette démarche a été adoptée afin de mieux préciser le rôle des différents agents biotiques et abiotiques dans le processus de formation du foxing, et pour évaluer si le personnel de bibliothèques en contact avec des livres foxés, est exposé à un risque toxique via les mycotoxines.

I-1) Caractérisation

I-1-a) Mesure des coordonnées chromatiques par le système L*a*b*CIE

La couleur des taches de foxing du livre étudié a été caractérisée par le système L*a*b* CIE. Elle a été comparée à celle d'un papier Whatman dopé en $FeCl_3$ et vieilli sous enceinte climatique durant 1 mois, de manière à comparer la couleur du foxing étudié à celle d'une tache induite par le fer.

Le tableau XII indique les coordonnés L*a*b* relatives à la couleur de 6 zones tachées par le foxing et 6 zones non tachées par le foxing du livre étudié. Ces mêmes coordonnées relatives à un papier Whatman dopé en $FeCl_3$ et vieilli durant 1 mois en chambre climatique, sont indiquées en tableau XIII.

Tableau XII : Coordonnées chromatiques des zones foxées et non foxées du livre étudié.
Les résultats statistiques sont issus d'un test de Mann et Whitney. La significativité des zones foxées par rapport aux zones non foxées est exprimée par ** pour $p < 0,001$.

	Echantillons	L*	a*	b*
Livre étudié altéré par le foxing	Zones foxées (n=6)	85,4 ±2,3**	2,2±1,2**	14,4 ± 2,5**
	Zones non foxées (n=6)	90,1±0,4	0±0,1	8,1 ±0,8

Tableau XIII : Coordonnées chromatiques des zones foxées et d'un papier Whatman dopé avec 6,3 µg/4 cm^2 de $FeCl_3$ (n=3) vieilli durant un mois.
Les résultats statistiques sont issus d'un test de Mann et Whitney. La significativité des zones foxées par rapport aux zones non foxées est exprimée par ** pour p < 0,001.

Echantillons	**L***	**a***	**b***
Zones foxées (n=6)	85,4±2,3**	2,2±1,2**	14,4±2,5**
Papier Whatman contenant 6,7 µg de $FeCl_3$ vieilli 1 mois en enceinte climatique (n=6)	72,8±0,4	5,1±0,1	14,7±0,2
Papier Whatman non dopé (n=6)	91,3±0,1	0,75±0,0	7,0±0,4

D'après le tableau XII, la luminosité (L *) de taches non foxées est 1,05 plus élevée (*p = 0,0003*) que les taches foxées pour le livre étudié. Les valeurs a * de taches de foxing sont faiblement positives (partie rouge de l'axe vert-rouge du diagramme L*a*b*). Pour les spots non foxés les valeurs sont proches de 0 (*p = 0,0003*). Les valeurs b * sont 1,78 plus élevées pour les taches de foxing attestant d'une couleur située dans la gamme de l'axe jaune des taches de foxing (*p = 0,0003*).

La comparaison entre les coordonnées chromatiques des taches foxées du livre étudié et celles d'un papier Whatman dopé avec 6,7 µg de $FeCl_3$ (tableau XIII), met en évidence le fait que la luminosité (L*) de zones foxées est 1,17 fois plus élevée que celle d'une tache de fer (*p = 0,003*). Au contraire, le facteur a * relatif à l'intensité de la couleur rouge, indique une valeur 2,32 fois plus élevée pour le fer par rapport à une tache de foxing liée à la couleur rouge des oxydes ferriques (*p=0,003*).

Ainsi, la mesure de la couleur des taches de foxing par le système L*a*b* CIE, a permis de les caractériser de manière numérique et objective. Leurs coordonnées chromatiques, sont significativement différentes des taches d'origine ferrique. Afin de de

d'affirmer cette hypothèse, il convient d'analyser les taches de foxing étudiées par MEB-EDX en vue de rechercher la présence éventuelle de fer ou d'autres métaux.

I-1-b) Analyse par MEB-EDX

L'analyse MEB-EDX d'échantillons de papiers foxés et non foxés de 1cm^2 est présentée en figure 29.

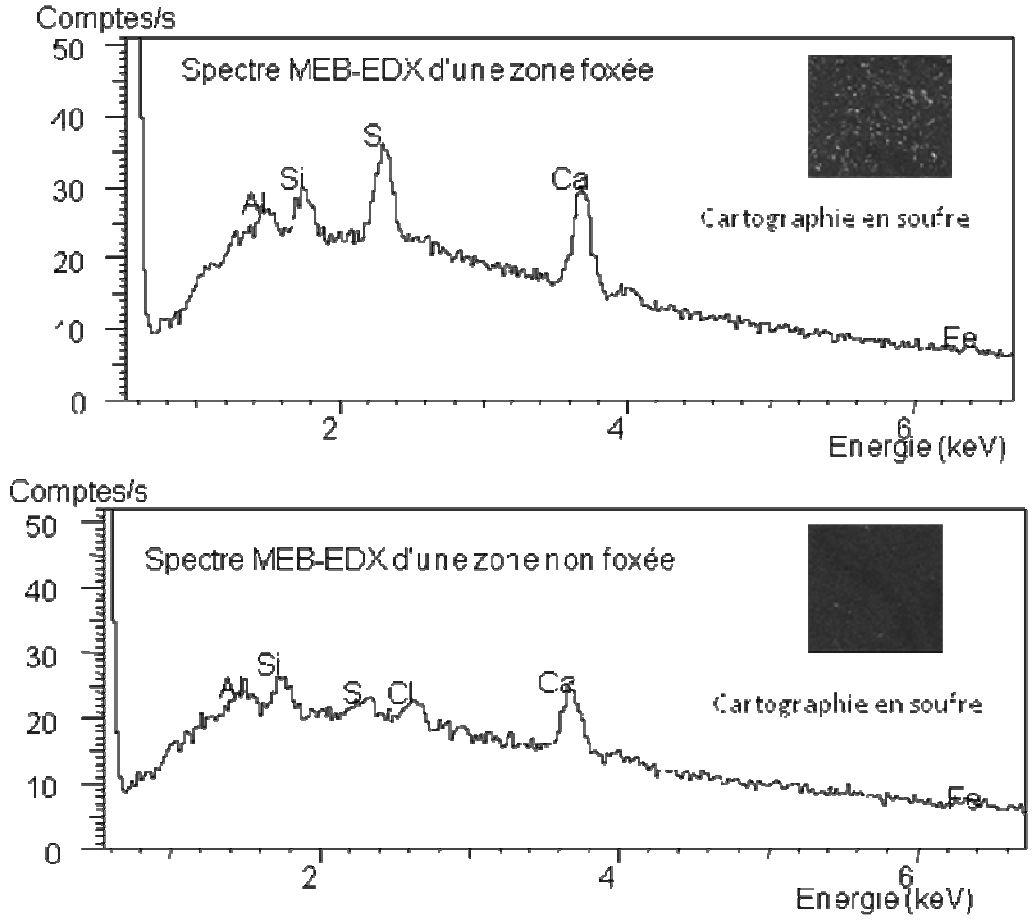


Figure 29 : Spectres MEB-EDX de zones foxées et non foxées. En encart sont indiquées les cartographies en soufre des papiers étudiés (n=6).

La comparaison des spectres MEB-EDX entre les zones de foxing et les témoins zones non foxées, met en évidence la présence de calcium et de soufre dans les zones de foxing et ses témoins. Aucun métal n'a été détecté, et en particulier, ni cuivre, ni fer. Seule la présence de soufre est plus élevée dans les taches de foxing.

L'absence de métal dans le foxing étudié permet d'en exclure l'origine métallique. Après avoir caractérisé les agents abiotiques du foxing, nous allons nous intéresser aux agents biotiques afin d'évaluer leur métabolisme et ainsi leur degré d'implication dans le processus de formation du foxing.

I-2) ATPmétrie

La présence d'ATP a été recherchée dans les extraits aqueux de zones foxées et non foxées du livre étudié. Les valeurs de RLU de papiers foxés (1,4 cm^2/mL) et de 3 lots de papiers non foxés (1,4 cm^2/mL) (n=3), sont indiquées sur l'histogramme de la figure 30.

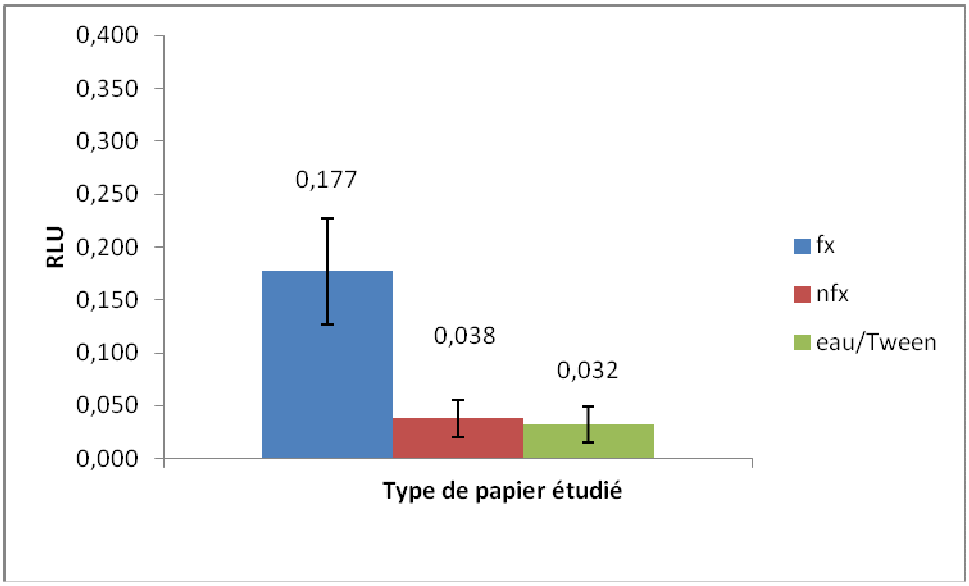


Figure 30 : RLU de papiers foxés (fx) et non foxés (nfx) (n=3).

Les valeurs de RLU des papiers foxés sont 4,6 fois plus élevées que celles des papiers non foxés ($p < 0,001$). Ceci témoigne d'une plus grande quantité d'ATP dans les zones foxées que dans les témoins. Cependant, la valeur de RLU de 0,177 des papiers foxée est faible puisqu'elle correspond à une quantité d'ATP de 0,3 pg. Cette valeur est proche de la limite de détection estimée à 0,1 pg (Tableau VII). La multiplication de la surface de papier d'un facteur 10 n'a pas non plus permis d'augmenter la réponse en RLU.

La RLU du témoin positif (papier artificiellement contaminé par *A. fumigatus)* est de 13,77±1,16, ce qui correspond à une quantité d'ATP de 0,1 ng. Ainsi, la viabilité des micro-organismes présents dans le foxing est nettement inférieure à celle d'une moisissure telle

qu'*A. fumigatus* cultivée sur papier durant 1 mois en laboratoire. Néanmoins, la différence significative de RLU entre les papiers foxés et non foxés a permis d'envisager leur mise en culture afin de vérifier l'obtention d'isolats fongiques et de rechercher la présence éventuelle d'autres micro-organismes dans le foxing.

I-3) Mise en culture

L'identification des espèces fongiques après mise en culture des papiers altérés par du foxing est résumée en tableau XIV.

Tableau XIV : Espèces fongiques identifiées après mise en culture de papiers détériorés par du foxing sur différents milieux de culture.

Types de milieux utilisés	**Mise en culture du foxing (essai 1)**	**Mise en culture du foxing (essai 2)**
Cœur cervelle	*A. fumigatus* *P. crustosum*	*A. niger*
Malt agar	*A. fumigatus*	Négatif
R8	*P. chrysogenum*	Négatif
Czapek	négatif	Négatif
AIA	négatif	Négatif

D'après le tableau XIV, la mise en culture du foxing permet d'obtenir des isolats fongiques. En effet, *A. fumigatus*, *A. niger* et *P. crustosum*, ont été identifiés sur milieu Cœur Cervelle. Sur les milieux R8 et malt agar, des isolats de *P. chrysogenum et* d'*A. fumigatus* ont été respectivement identifiés. Les témoins papiers non foxés ont tous été négatifs, attestant que seules les zones de foxing sont contaminées par des spores fongiques. Par ailleurs, tous les papiers foxés n'ont pas permis de donner des isolats fongiques, ce qui implique que les zones de foxing ne sont pas homogènes entre elles. Aucune bactérie, ni aucun actinomycète n'ont été détectés.

Nous avons montré que les espèces fongiques dans le foxing sont viables et permettent d'obtenir des isolats. Afin de mieux préciser leur activité métabolique et le rôle qu'elles pourraient jouer dans le processus de formation du foxing, nous avons recherché des mycotoxines dans des extraits de foxing. Par ailleurs, les méthodes de mise en culture présentent l'inconvénient d'amplifier préférentiellement certaines espèces fongiques par rapport à d'autres. Ce biais ne permet donc pas l'identification de la population fongique complète du foxing. Aussi, nous avons également voulu déterminer si la stratégie de recherche de mycotoxines pouvait être une alternative aux méthodes de biologie moléculaire, afin d'identifier les espèces fongiques du foxing.

I-4) Analyse HPLC-UV-MS

Les métabolites fongiques ont été recherchés dans les extraits de foxing. Le profil idéal serait d'observer un chromatogramme comportant des pics relatifs aux mycotoxines dans les extraits de foxing qui seraient absents du chromatogramme des extraits de papiers non foxés de ce même livre.

Les chromatogrammes obtenus par HPLC-UV de papiers colonisés par le foxing et non colonisés par le foxing pour une surface de 11,3 cm^2/mL après concentration par SPE, sont exposés en figure 31.

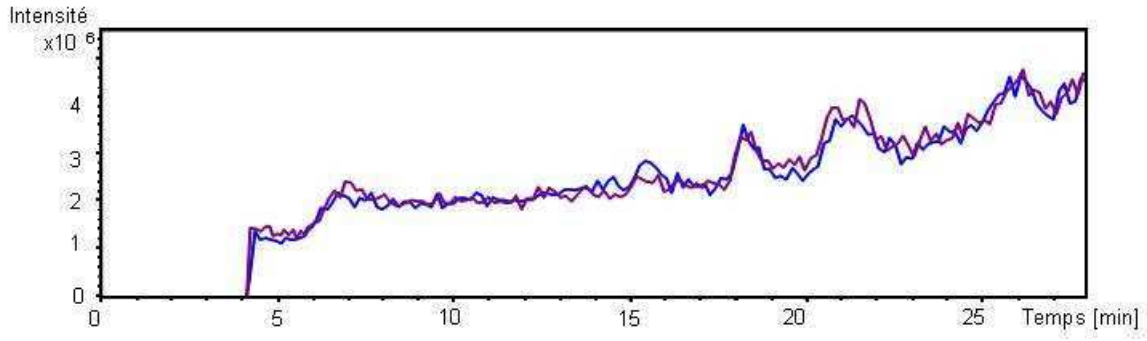


Figure 31 : Chromatogrammes des extraits de papiers détériorés par le foxing (violet) et non détériorés par le foxing (bleu) à 254 nm, obtenus par analyse par HPLC-UV de 11,3 cm^2/mL de papiers après concentration par SPE.

Les chromatogrammes des papiers altérés par le foxing et les témoins sont superposables. Ceci a été confirmé par l'analyse par spectrométrie de masse des chromatogrammes des deux types de papier, en analysant le spectre de masse de *m/z* 150 à

m/z 800 par paliers de 50 et par analyse par HPLC-Fluorescence. Un témoin positif, papier du même livre contaminé par *A. fumigatus*, a été également analysé par HPLC-UV-MS. Les chromatogrammes sont présentés en figure 32.

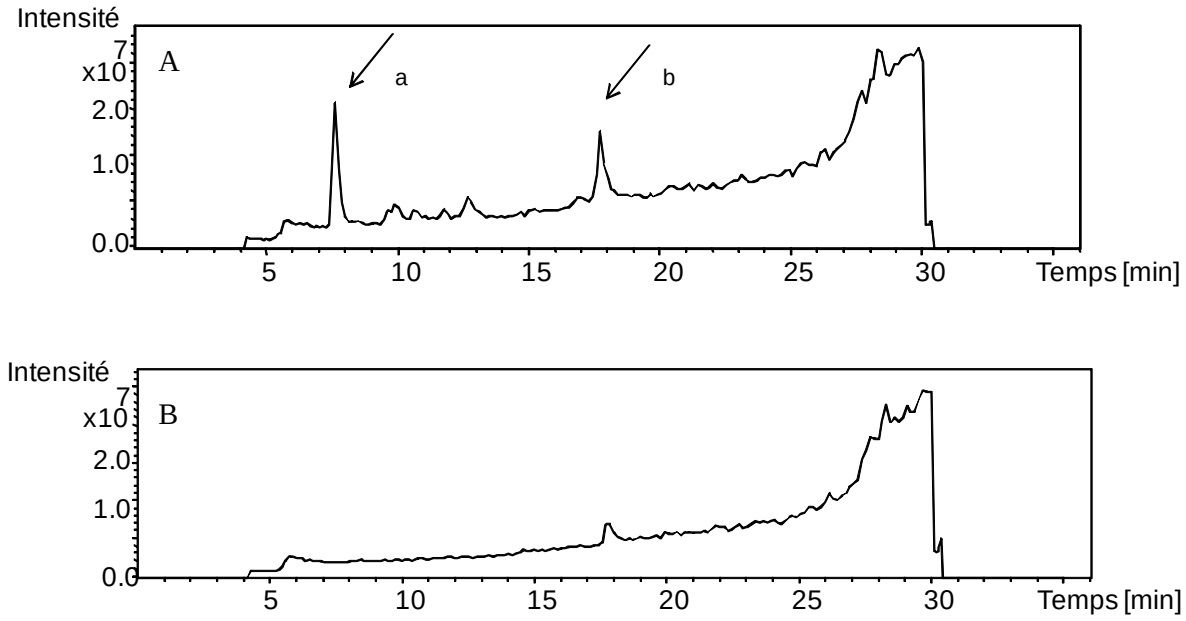


Figure 32 : Chromatogrammes représentant les courants ioniques totaux en mode négatif de 20 µL de l'extrait hydro-organique de 1 cm^2/mL d'extraits de papier du livre étudié ensemencé par *A. fumigatus* (A) et son témoin, papier du livre étudié non ensemencé (B). Les flèches a et b indiquent les principaux pics mis en évidence.

La figure 32 met en évidence des pics chromatographiques non présents dans le témoin. Le composé au temps de rétention 7,5 min (pic a), répondant à *m/z* 651 en mode négatif et celui au temps de rétention 18 min (pic b) de *m/z* = 445 en mode négatif, ne sont pas répertoriés parmi les mycotoxines d'*A. fumigatus*. Les spectres de masse de ces deux principaux composés sont indiqués en figure 33.

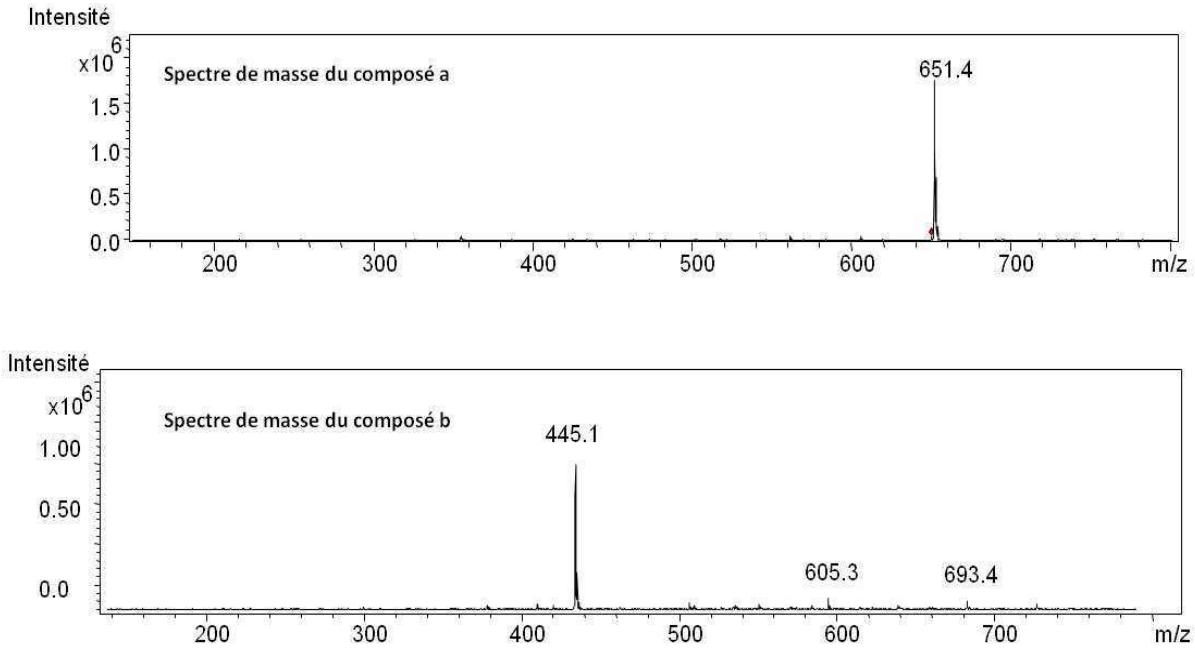


Figure 33 : Spectres de masse des deux principaux composés a et b, mis en évidence dans le chromatogramme A représentant les courants ioniques totaux en mode négatif de 20 µL de l'extrait hydro-organique de 1 cm^2/mL d'extrait de papier du livre étudié, ensemencé par *A. fumigatus.*

La recherche spécifique de mycotoxines connues d'*A. fumigatus*, a également été réalisée et est présentée en figure 34. Il a été vérifié qu'elles sont absentes du papier témoin.

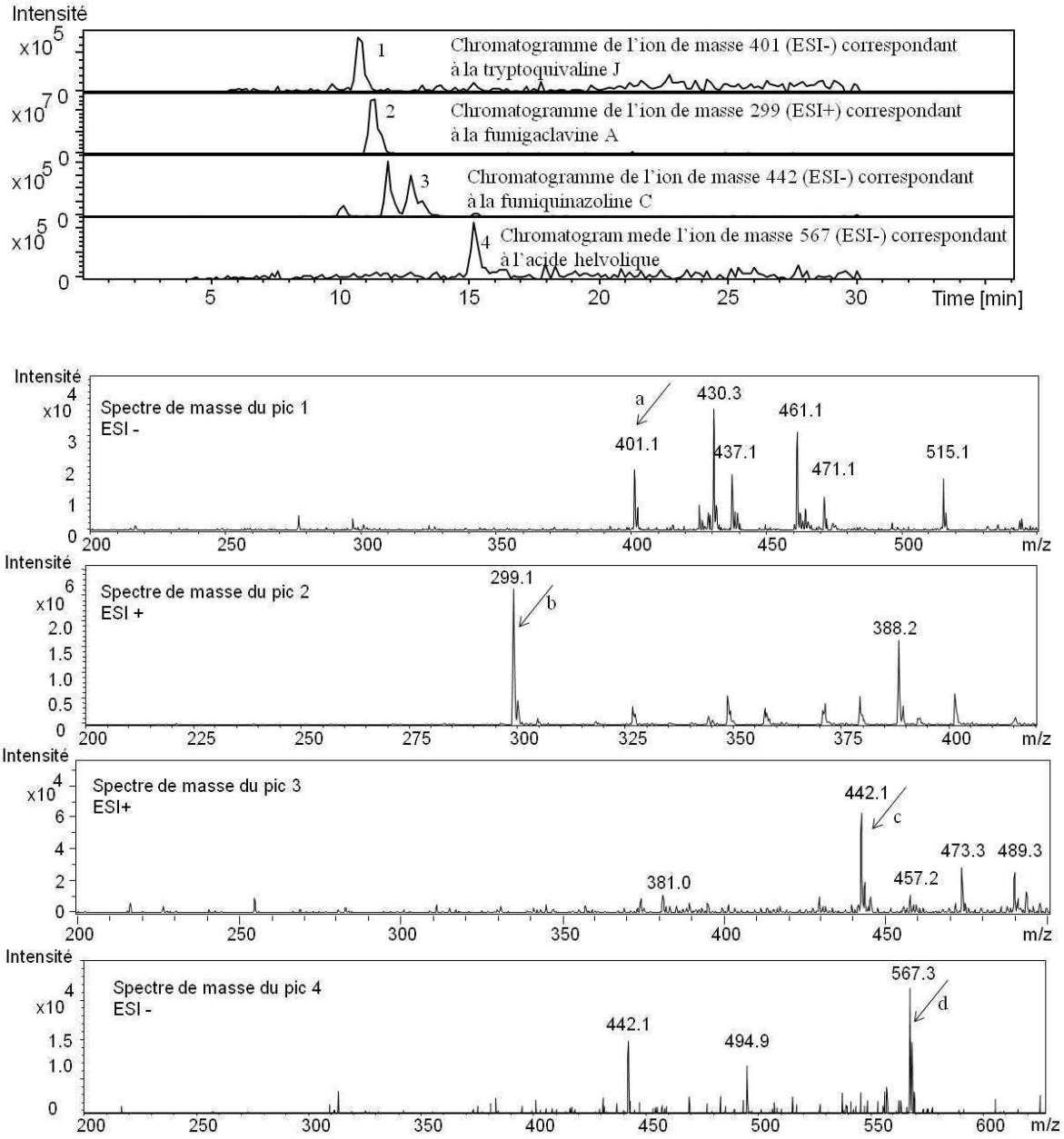


Figure 34 : Chromatogrammes et spectres de masse d'un papier du livre étudié, ensemencé par *A. fumigatus* et maintenu en étuve pendant un mois. Les ions spécifiques de mycotoxines connues telles que la tryptoquivaline J *(m/z* = 401 en ESI-, flèche a) et la fumigaclavine A (*m/z* = 299 en ESI+, flèche b), ont été respectivement retrouvés aux temps de rétention 10,4 et 11,7 min. Les ions spécifiques de la fumiquinazoline C (*m/z* = 442 en ESI-, flèche c) et de l'acide helvolique (*m/z*= 567 en ESI-, flèche d), ont été détectés respectivement aux temps de rétention 13 et 14,9 min.

La figure 34 indique que des mycotoxines connues d'*A. fumigatus*, ont été mises en évidence. La tryptoquivaline J (*m/z* = 401, temps de rétention (tr) 10,5 min) et la fumigaclavine A (*m/z* = 299 à tr = 11 min), ont été respectivement détectées en mode négatif et positif. Trois pics ont été observés à *m/z* = 442 en mode négatif. Celui à 13 min a le même tr que la fumiquinazoline C (Communication O. Puel). L'acide helvolique (*m/z* = 567) a été également mis en évidence à tr = 14,9 min.

Les mycotoxines pourraient être présentes dans le foxing en très faibles quantités, non détectables par les méthodes analytiques utilisées. Pour cette raison, l'évaluation de la toxicité d'extraits de foxing sur des cellules pulmonaires en culture (lignée A549) par le test de cytotoxicité (MTT) a été envisagée.

I-5) Tests MTT

La figure 35 représente les résultats de 3 tests de cytotoxicité des cellules A549 à l'aide du test MTT réalisés indépendamment sur les mêmes extraits de foxing dont les résultats analytiques ont été précédemment exposés.

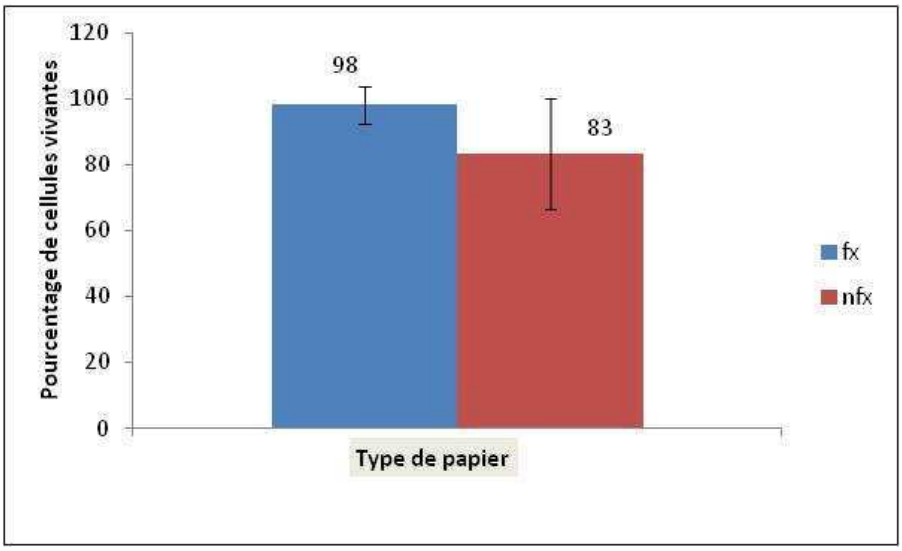


Figure 35 : Pourcentage de cellules A549 exposées à 5 µL d'extraits de papiers détériorés par le foxing (fx) (11,3 cm^2/mL) et non détériorés par le foxing (nfx) (11,3 cm^2/mL).

Il n'y a pas de différence significative entre le pourcentage de cytotoxicité des cellules A549 exposées à des papiers détériorés par le foxing et les papiers témoins non foxés. Ces résultats sont corrélés à ceux obtenus par HPLC-UV-MS ne mettant pas en évidence de pics significatifs relatifs à des mycotoxines.

Nous allons dans la seconde partie de ce travail, nous intéresser au second type de substrat étudié : les papiers peints issus de logements, naturellement contaminés par des moisissures.

II) Papiers peints

De la même manière que pour le foxing, les papiers peints moisis issus de logements dont les habitants ont été diagnostiqués comme porteurs de plusieurs symptômes allergiques, ont été caractérisés en y recherchant les espèces fongiques les plus communes de l'environnement par biologie moléculaire. Dans un second temps, la recherche de métabolites fongiques a été effectuée par HPLC-UV-MS, afin de déterminer s'il est possible d'établir un lien entre les métabolites fongiques détectés par HPLC-UV-MS, et les espèces fongiques détectées par microbiologie. Enfin, la toxicité de ces mêmes extraits hydro-organiques a été évaluée. Cette démarche a été réalisée en vue de déterminer s'il est possible de relier une espèce fongique donnée ou un métabolite donné aux symptômes des habitants de ces logements.

II-1) Analyses microbiologiques

Le tableau XV regroupe les résultats obtenus pour la recherche des espèces fongiques suivantes : *A. versicolor, S. chartarum, P. chrysogenum, C. sphaerospermum,* par qPCR et culture pour les onze couples de papiers peints moisis et non moisis.

Tableau XV : Résultats de la recherche par culture et par qPCR d'espèces fongiques dans les papiers peints issus de logements (Résultats du Laboratoire Chrono environnement Besançon). POS : cultures positives, Ct : Cycle threshold. Une PCR est considérée négative pour un Ct supérieur à 45. M : papier peint moisi, NM : papier peint non moisi.

		P. chrysogenum		***A. versicolor***		***C. sphaerospermum***		***S. chartarum***	
Numéros des logements		Culture *Penici-llium sp.*	qPCR	Culture	qPCR	Culture	qPCR	Culture	qPCR
1	**M**		POS	POS	POS	POS	POS		POS
	NM		POS		POS				
2	**M**	POS	POS			POS	POS		
	NM						POS		
3	**M**	POS	POS		POS		POS		
	NM						POS		
4	**M**	POS	POS		POS		POS		
	NM						POS		
5	**M**	POS							
	NM		POS						
6	**M**	POS	POS	POS	POS		POS		
	NM						POS		
7	**M**	POS	POS	POS	POS		POS	POS	POS
	NM				POS				POS
8	**M**	POS	POS	POS	POS		POS	POS	POS
	NM		POS		POS		POS	POS	POS
9	**M**		POS		POS		POS		
	NM				POS		POS		
10	**M**			POS	POS				
	NM						POS		
11	**M**			POS	POS		POS		
	NM	POS					POS		

D’après le tableau XV, les espèces fongiques *P. chrysogenum*, *A. versicolor*, *C. sphaerospermum*, sont retrouvées sur les papiers peints dans presque tous les logements, soit par qPCR, soit par culture. Les résultats positifs en qPCR et négatifs en culture, s’expliquent par la présence de l’ADN de l’espèce fongique, qui n’est pas viable et donc non apte à donner un isolat sur milieu de culture. Deux cas de culture positive et de qPCR négative ont été rencontrés pour les logements 5 et 11. Ces cas peuvent s’expliquer par le fait que la qPCR a détecté *P. chrysogenum*, mais que l’identification des cultures n’a été faite que sur le genre *Penicillium.*.

Dans le cadre de ce travail d’identification des espèces fongiques présentes dans les papiers peints moisis, le CHU de Besançon a également effectué des prélèvements d’air et de surface dans les habitations. Les résultats d’air et de surface sont comparables à ceux des papiers peints avec pour espèces majoritaires ayant le plus d’UFC/m^3 : *Penicillium sp., A. versicolor et C. sphaeropermum. S. chartarum* a été peu détecté. D’autres espèces fongiques minoritaires ont été détectées comme *A. nidulans* et *A. glaucus.*

Nous avons vu que des espèces fongiques ont été détectées dans les papiers peints par biologie moléculaire, et qu’il est difficile d’associer. Nous allons, dans la suite de ce travail, nous intéresser à la recherche des métabolites fongiques, pour tenter d’établir un lien avec les espèces fongiques détectées par microbiologie.

II-2) Analyse HPLC-UV-MS

Le tableau XVI regroupe les principaux métabolites secondaires présents dans les papiers moisis de chacun des 11 logements. Les spectres HPLC-MS des extraits de papiers peints des logements ont été analysés par paliers de 50 et les métabolites fongiques connus ont été recherchés.

Tableau XVI **:** Profil des signaux de masse de métabolites secondaires détectés dans des extraits hydro-organiques des papiers peints moisis de chacun des 11 logements.

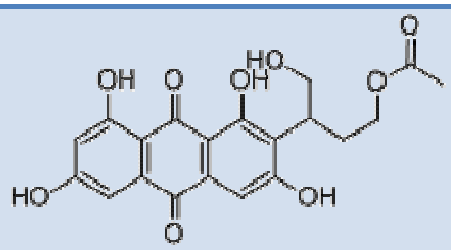
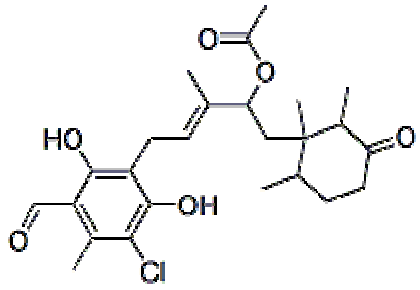
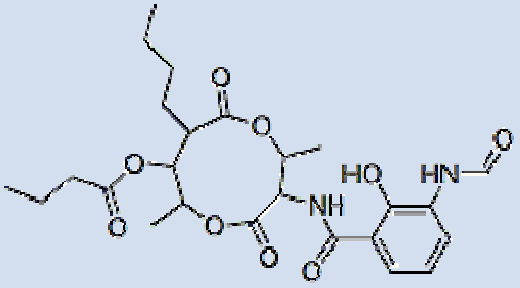
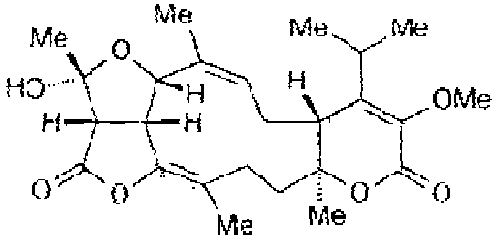
***m/z* en ESI-**		**387**	**401**	**445**	**463**	**487**	**505**
N° du logement		tr = 17,9-18,3 min	tr = 11,1-11,7 min	tr = 17,2-17,6 min	tr = 14,7-15,4 min	tr= 19,8-20,6 min	tr = 23,9-24,5 min
1	**M**	p (1.10^7)	p (4.10^6)	p ($0,5.10^6$)	p (4.10^6)	p (4.10^6)	a
	NM	a	a	a	a	a	a
2	**M**	a	a	p ($0,5.10^6$)	a	a	a
	NM		a	a	a	a	a
3	**M**	p (2.10^5)	a	a	a	a	p (6.10^5)
	NM	a	a	a	a	a	a
4	**M**	a	a	p ($0,5.10^6$)	a	a	p (1.10^6)
	NM	a	a	a	a	a	a
5	**M**	a	a	a	a	a	p ($0,5.10^6$)
	NM	a	a	p (1.10^6)	a	a	a
6	**M**	a	a	a	p ($1,5.10^5$)	a	a
	NM	a	a	a	a	a	a
7	**M**	a	a	a	p (1.10^6)	p (2.10^6)	a
	NM	a	a	a	a	a	a
8	**M**	a	a	a	p (1.10^6)	p (2.10^6)	a
	NM	a	a	a	a	a	a
9	**M**	a	a	a	a	a	a
	NM	a	a	a	a	a	a
10	**M**	a	a	p (6.10^5)	a	a	a
	NM	a	a	a	a	a	a
11	**M**	a	a	a	a	a	a
	NM	a	a	a	a	a	a

Les *m/z* ont été classées par ordre croissant. a = absent, p = présent, entre parenthèses est indiquée l'intensité du pic en spectrométrie de mass, tr = temps de rétention. Le bruit de fond est d'environ 10^4. M : papier peint moisi; NM : papier peint non moisi.

D’après le tableau XVI, neuf papiers peints comportent des composés dont les *m/z* sont présentes dans les papiers peints moisis et absentes des papiers peints non moisis. Ils peuvent ainsi être qualifiés de métabolites fongiques. Par recherche dans une banque de données (Handbook of secondary metabolites, Cole *et al.* 2003), les composés de *m/z* 387, 463, 505 et 445 peuvent être attribués respectivement aux composés suivants :

- Le versiconol acétate de masse molaire 388 g/mol. Ce composé a été isolé chez *A. parasiticus* (Yabe *et al.* 1991). Ce champignon n’a pas été retrouvé par biologie moléculaire, ni dans les papiers peints, ni dans les prélèvements d’air ou de surface. Le versiconol acétate est un intermédiaire dans la voie de biosynthèse des aflatoxines. D’après la formule de ce composé en tableau XVII, il s’agit d’un composé hydroxylé. Son spectre MS^2 (figure 36), montre une perte de 18 g/mol entre le composé de *m/z* 387 et son fragment de *m/z* 369. Il s’agit donc probablement d’un composé hydroxylé, en accord avec la formule du versiconol acétate en tableau XVII.
- La chloronectrine de masse 464 g/mol est un antibiotique produit par *Nectria coccinea* qui n’a pas été retrouvé par biologie moléculaire.
- L’antimycine A_4 de masse 506 g/mol est un antifongique produit par *Streptomyces sp.* qui est parfois retrouvé dans les jus de fruits (Ortiz-Gomez *et al.* 1995). *Streptomyces sp.* n’a pas été retrouvé par biologie moléculaire.
- L’atronone B de masse 446 g/mol, produit par *S. chartarum* (Hinkley *et al.* 2003). *S. chartarum* a été retrouvé dans les papiers peints issus des logements 1, 7 et 8.

Tableau XVII : Formules du versiconol acétate, de la chloronectrine, de l'antimicyne A_4 et de l'atranone B.

Composés	Structure chimique
Versiconol acétate	
Chloronectrine	
Antimycine A_4	
Atranone B	

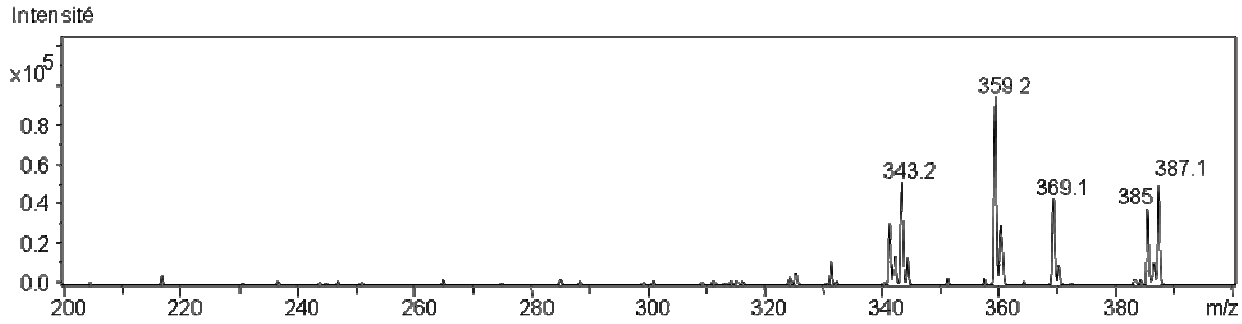


Figure 36 : Spectre MS^2, du composé de *m/z* 387 en ESI –

Nous avons vu, dans la revue bibliographique, que la production de métabolites secondaires fongiques est dépendante du substrat. Etant donné que peu d'études rapportent la production de métabolites fongiques sur support papier peint, nous avons ensemencé chacune des quatre espèces fongiques détectées par biologie moléculaire (*S. chartarum*, *A. versicolor*, *C. sphaerospermum*, *P. chrysogenum*), sur un papier peint non posé nous servant de référence. Nous y avons recherché les métabolites trouvés dans les papiers peints des logements. Le tableau XVIII montre que les composés de *m/z* 401 et 487 seraient des métabolites de *S. chartarum.*

Tableau XVIII : Recherche des métabolites issus de papiers peints de logements dans des papiers peints ensemencés artificiellement par des espèces fongiques.
a= absent, p= present. Entre parenthèses est indiqué l'intensité du signal en spectrométrie de masse

***m/z* en ESI-**	**387**	**401**	**445**	**463**	**487**	**505**
	tr = 17,9-18,3 min	tr = 11,1-11,7 min	tr = 17,2-17,6 min	tr = 14,7-15,4 min	tr= 19,8-20,6 min	tr = 23,9-24,5 min
P. chrysogenum	a	a	a	a	a	a
A. versicolor	a	a	a	a	a	a
C. sphaerospermum	a	a	a	a	a	a
S. chartarum	a	p (3.10^6)	a	a	p ($0,6.10^6$)	a

Afin de s'assurer que les composés de *m/z* 401 et 487 présents dans les extraits de papiers peints de logements moisis ont la même structure que les composés de *m/z* 401 et 487 détectés dans l'extrait de papier peint artificiellement ensemencé par *S. chartarum*, leur spectre de second ordre (MS^2) a été étudié. Il est présenté en figures 37a et 37b.

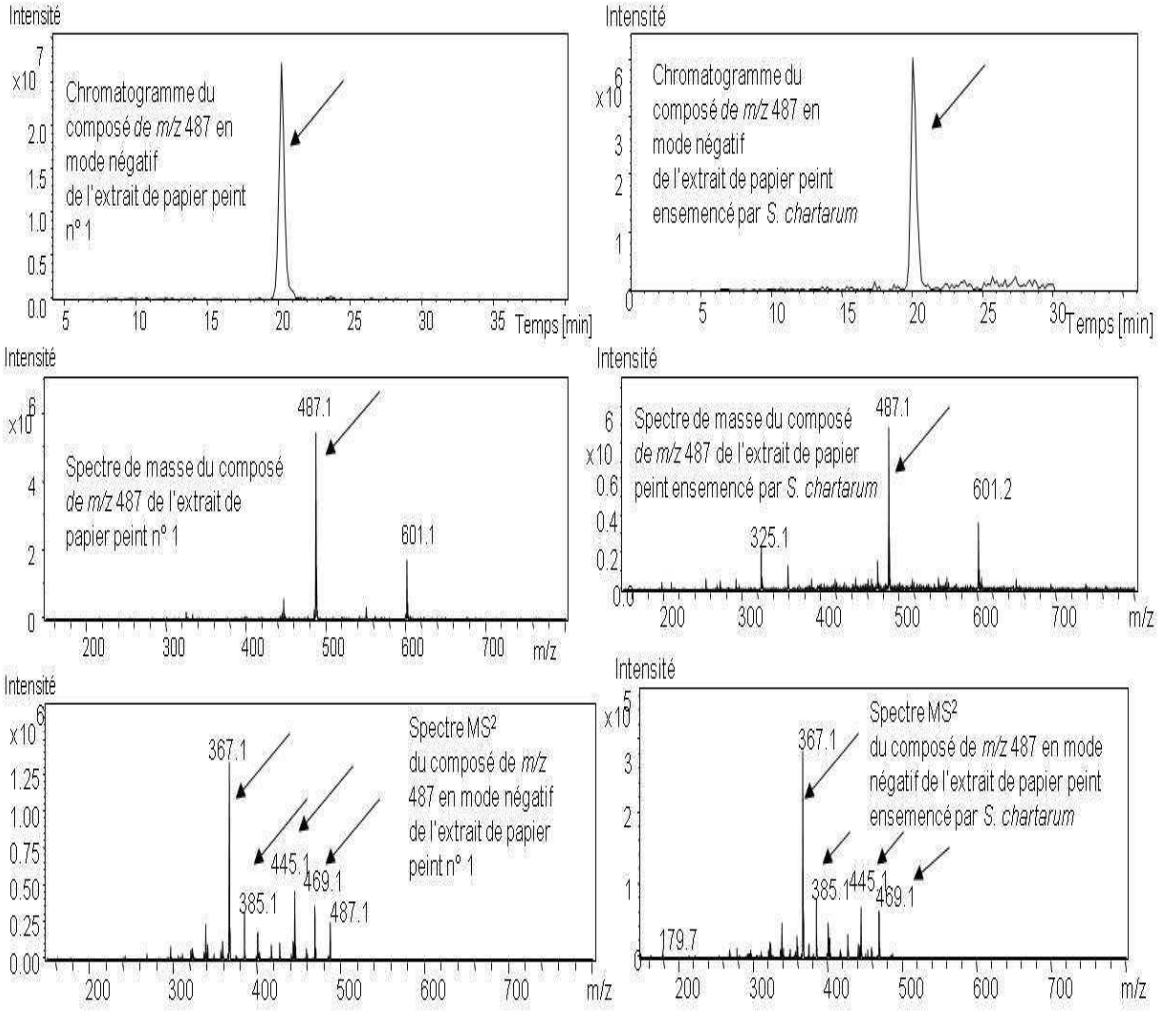


Figure 37a : Chromatogrammes et spectres de masse du composé de *m/z* = 487 issu de l'extrait de papier peint moisi n° 1 (à gauche) et de l'extrait du papier peint artificiellement contaminé par *S. chartarum (*à droite*).*

En première ligne sont indiqués les chromatogrammes, en deuxième ligne les spectres de masse et en troisième ligne, la MS^2 du composé de *m/z* = 487 où les ions fils sont indiqués par des flèches.

Le composé de *m/z* 487 détecté à 20 min dans l'extrait de papier peint n°1 et dans l'extrait de papier peint artificiellement contaminé par *S. chartarum* se fragmente en composés de *m/z* 469, 445, 385 et 367 pour les deux extraits. Le composé de *m/z 487* retrouvé

dans l'extrait de papier peint n°1 possède donc la même structure que celui retrouvé dans l'extrait de papier peint artificiellement contaminé par *S. chartarum.* Ce composé peut donc être attribué à *S. chartarum.*

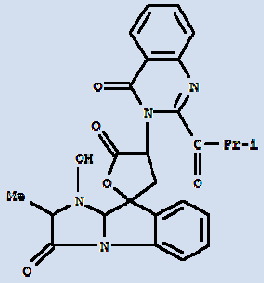
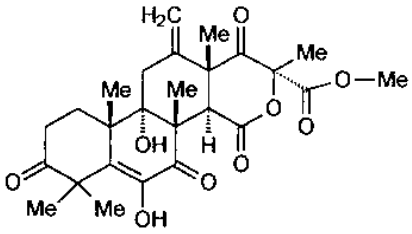
Les hypothèses de fonctions relatives à la structure du composé de *m/z* 487 sont exposées dans le tableau XIX. Le fragment de *m/z* = 469 possède une différence de masse de 18 g/mol avec le composé parental 487 ce qui pourrait correspondre à la perte d'une molécule d'eau. Ainsi le composé de *m/z* 487, serait un composé hydroxylé.
Les fragments de *m/z* 469, 445, 385 et 367 issus du composé de *m/z 487* ont également été retrouvés dans les extraits des papiers peints 7 et 8.

Tableau XIX : Hypothèses de fonctions de la structure du composé de *m/z* = 487. Utilisation de la MS^2 pour identifier des fonctions présentes sur le composé de m/z 487. Fg : fragments issus du composé parental M ou d'un autre fragment.

***m/z* du composé M**	***m/z* des fragments du composé parental M**	**Hypothèses de fonctions pouvant correspondre à la différence de masse entre le composé M et chaque fragment ou entre fragments**
487	Fg1 : 469	(-18 g/mol par rapport à M) H_2O
	Fg2 : 445	(-42 g/mol par rapport à M) C_2H_2O, $NCNH_2$, NCO
	Fg3 : 385	(-60 g/mol par rapport à Fg2) C_3H_7OH
	Fg4 : 367	(-18 g/mol par rapport à Fg3) H_2O

Le composé de masse 488 g/mol est probablement un composé hydroxylé. Selon le Handbook of fungal metabolites, plusieurs métabolites secondaires correspondraient à une masse de 488 g/mol : la tryptoquivaline B produite par *A. clavatus* et *A. fumigatus*, la terrotonine produite par *A. terreus* (Springer *et al.* 1979). Ils ne sont pas associés à *S. chartarum* dans la littérature, leurs formules sont indiquées en tableau XX.

Tableau XX : Formule de la tryptoquivaline B et de la terrotonine.

Composé	Structure chimique
Tryptoquivaline B	
terrotonine	

Le composé de *m/z* 401 détecté à 11 min, dans l'extrait de papier peint n°1 et dans l'extrait de papier peint artificiellement contaminé par *S. chartarum*, se fragmente en composés de *m/z* 373, 357 et 329 pour les deux extraits (figure 37b). Le composé de *m/z* 401 retrouvé dans l'extrait de papier peint n°1 possède donc la même structure que celui retrouvé dans l'extrait de papier peint artificiellement contaminé par *S. chartarum.* Ce composé peut donc être attribué à *S. chartarum*.

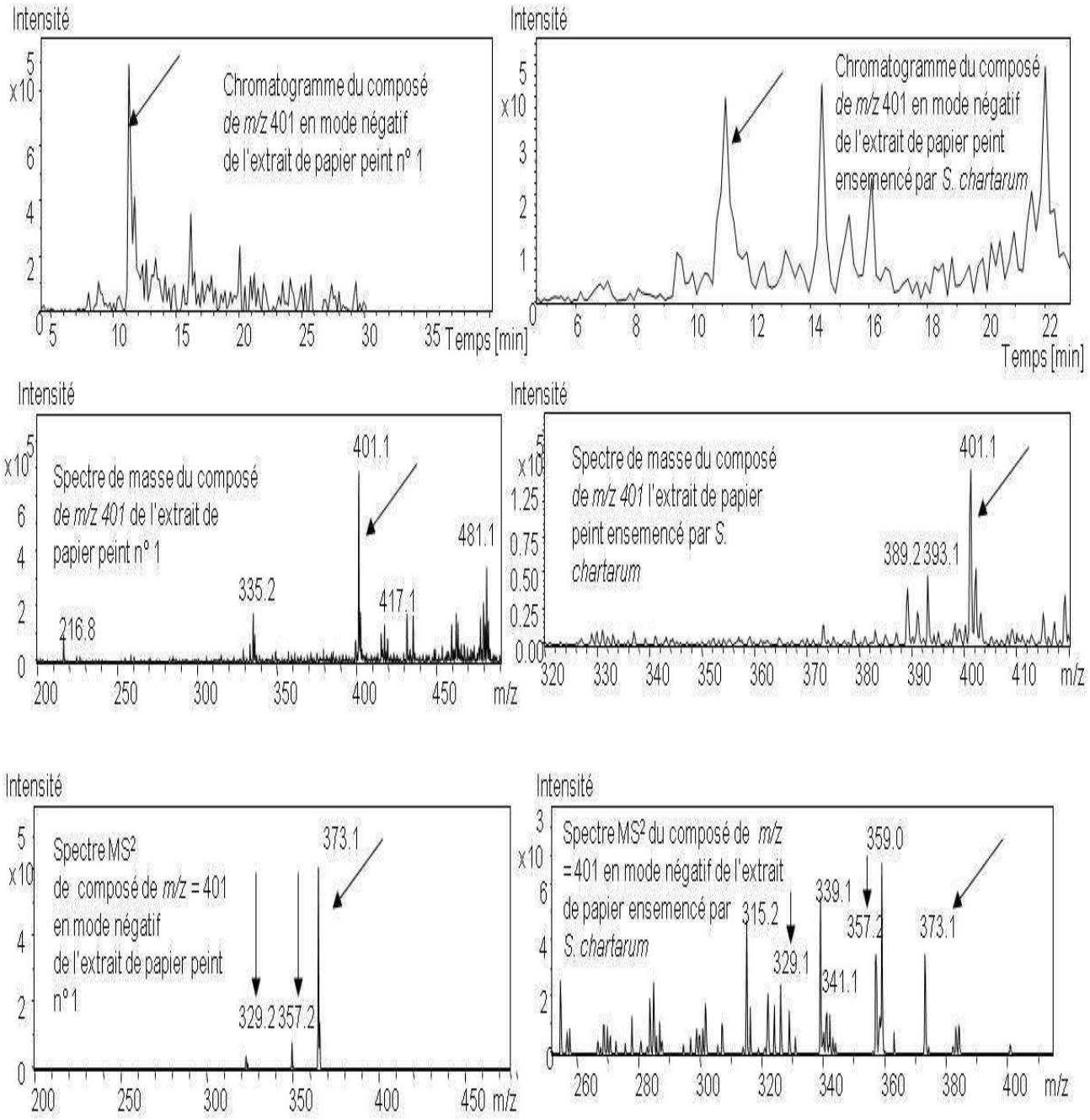


Figure 37b : Chromatogrammes et spectres de masse du composé de *m/z* = 401 issu de l'extrait de papier peint moisi n° 1 (à gauche) et de l'extrait du papier peint artificiellement contaminé par *S. chartarum (*à droite*).*

En première ligne sont indiqués les chromatogrammes, en deuxième ligne les spectres de masse et en troisième ligne la MS^2 du composé de *m/z* =401 où les ions fils sont indiqués par des flèches.

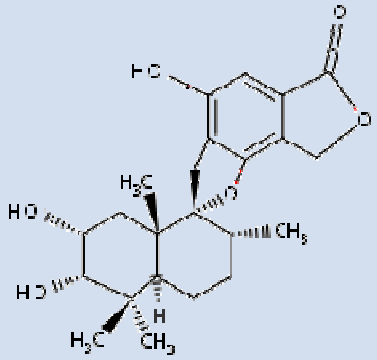
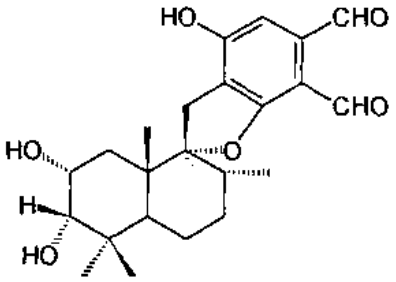
Les hypothèses de fonctions de ce composé relatives à la MS^2 sont regroupées dans le tableau XXI. Le fragment de *m/z* = 373 possède une différence de masse de 28 avec le composé 401, ce qui pourrait correspondre à la perte d'un groupement éthylène ou N-CH_2. Ainsi, le composé de masse 402 g/mol, serait un composé insaturé.

Tableau XXI : Hypothèses de fonctions de la structure du composé de *m/z* = 401. Utilisation de la MS^2 pour identifier des fonctions présentes sur le composé de *m/z* = 401.
Fg : fragment issus du composé parental M ou d'un autre fragment

***m/z* du composé M**	**m/z des fragments du composé parental M**	**Hypothèses de fonctions pouvant correspondre à la différence de masse entre le composé M et chaque fragment ou entre fragments**
401	Fg1 : 373	(-28 g/mol par rapport à M) $H_2C=CH_2$ ou N-CH_2
	Fg2 : 357	(-44 g/mol par rapport à M) C_2H_6 ,C_2H_2O, CO_2, N_2O,$CONH_2$,$NHCH_2$ CH_3
	Fg3 : 329	(-28 g/mol par rapport à Fg2) $H_2C=CH_2$ ou N-CH_2

Selon le Handbook of fungal secondary metabolites, deux composés de 402 g/mol sont associés à *Stachybotrys sp.*
-2α- hydroxystachybotrylactone (produit par *S. chartarum*),
-K-76 (produit par *S. Complementi*),
Leurs formules sont indiquées en tableau XXII.

Tableau XXII : Formules de la 2α- hydroxystachybotrylactone, et du composé K-76.

Composé	Structure chimique
2α- hydroxystachybotrylactone	
K-76	

La recherche de métabolites fongiques dans les extraits de papiers peints de logements, a permis de détecter des pics relatifs à des métabolites fongiques, contrairement au foxing. Grâce à l'ensemencement individuel d'espèces fongiques sur papier peint et à l'aide de la MS^2, nous avons pu relier les composés de *m/z* 401 et 487 à *S. chartarum.*

L'identification des autres composés est difficile en raison de la diversité des métabolites fongiques et de la complexité des conditions de production des métabolites fongiques, différentes d'un substrat à un autre. En particulier, 4 des six composés détectés dans les extraits de papiers de logements, n'ont pas été retrouvés dans aucun des extraits de papiers peints artificiellement ensemencé par *P. chrysogenum, C. sphaerospermum, A. versicolor.*

Afin d'améliorer les connaissances sur la production des métabolites fongiques dans la matrice papier peint, nous avons également analysé les spectres de masses des papiers peints artificiellement ensemencés par *P. chrysogenum, C. sphaerospermum, A. versicolor* et *S. chartarum* mis en culture durant 1 mois (figures 38 à 40). Ils ont été analysés par paliers de 50 et en recherchant les métabolites fongiques spécifiques de chacune des espèces fongiques.

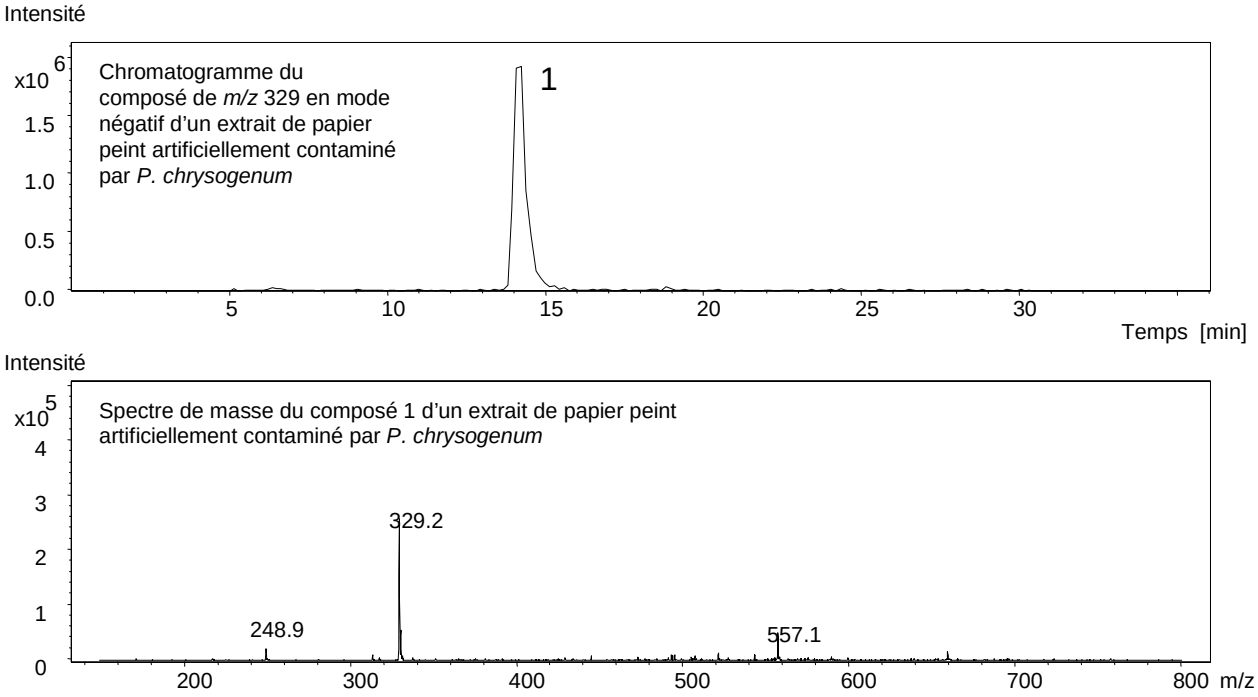


Figure 38: Chromatogramme du composé de *m/z* 329 en ESI- d'un extrait de papier peint artificiellement contaminé par *P. chrysogenum* et son spectre de masse.

Le composé 1 correspond à un métabolite relatif à *P. chrysogenum* à 13,9-14,4 min de *m/z*= 329 (mode négatif). Cinq composés répertoriés dans le Handbook of fungal secondary métabolites correspondent à une masse molaire de 330 g/mol : Aflatoxines B2, G2, M, (Wilson et King 1995). Ces composés n'ont pas été associés jusqu'ici à *P. chrysogenum.* Le composé de *m/z* 329 est probablement un nouveau composé non encore répertorié pour cette espèce fongique. Lors de la recherche des métabolites connus de *P. chrysogenum*, un composé de *m/z = 265* en mode négatif a été détecté à 16,8 min. Ce composé n'est pas associé à *P. chrysogenum* dans la littérature, mais peut correspondre aux composés suivants : hydroxytrichodermol, produit par *Myrothecium roridum* (Jarvis *et al.* 1985), tsugicoline A, produit par *Echinodontium tsugicola* (Arnone *et al.* 1995).

Pour l'extrait de papier peint artificiellement contaminé par *C. sphaerospermum*, aucun pic chromatographique significatif n'a été détecté. Il semblerait que le substrat papier ne favoriserait par la production de métabolites fongiques pour *C. sphaerospermum.* La non détection de métabolites relatifs à *C. sphaerospermum* a été déjà rapportée dans une étude sur milieu Dichloran Rose Bengal Yeast Extract Sucrose Agar (Anderson et Frisvad 2004).

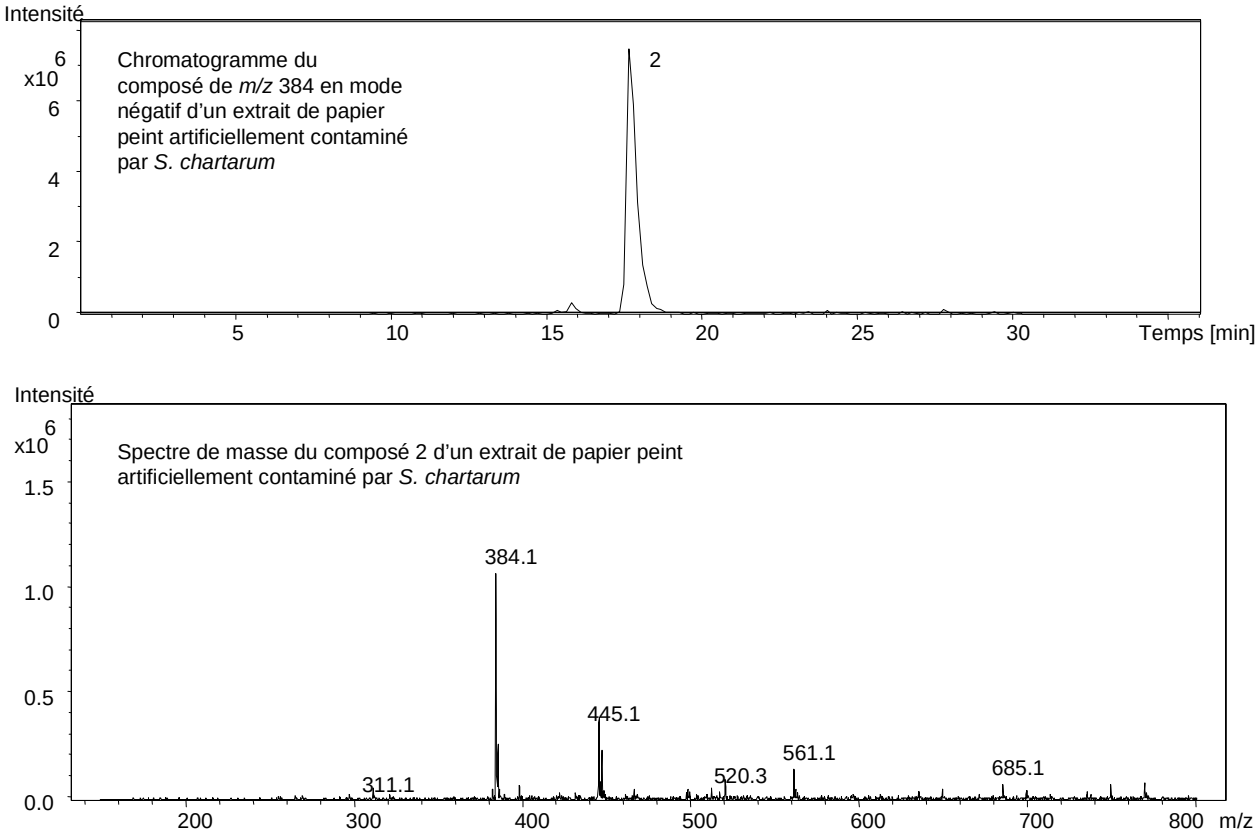


Figure 39 : Chromatogramme du composé de *m/z* 384 en ESI-d'un extrait de papier peint artificiellement contaminé par *S. chartarum,* et son spectre de masse.

Le composé 2 en figure 39 correspond à un métabolite relatif à *S. chartarum* à 17,4-18,3 min de *m/z* = 384 (mode négatif). Un composé répertorié dans le Handbook of fungal secondary metabolites correspond à une masse molaire de 385 g/mol : la stachybotrine B, métabolite de *S. chartarum*, espèce fongique retrouvée dans notre travail par biologie moléculaire. Lors de la recherche de mycotoxines connues de *S. chartarum,* deux composés de *m/z* = 659,4 et 533 en mode négatif ont été retrouvés respectivement à 13,5 et 23 min. Ces composés ne sont pas associés à *S. chartarum* dans la littérature. Le composé de *m/z* = 659,4 n'est pas répertorié dans la banque de données utilisée. Le composé de *m/z* = 533 pourrait correspondre aux composés suivants : Antimycine $A_{2,}$ et acide ganodérique L.

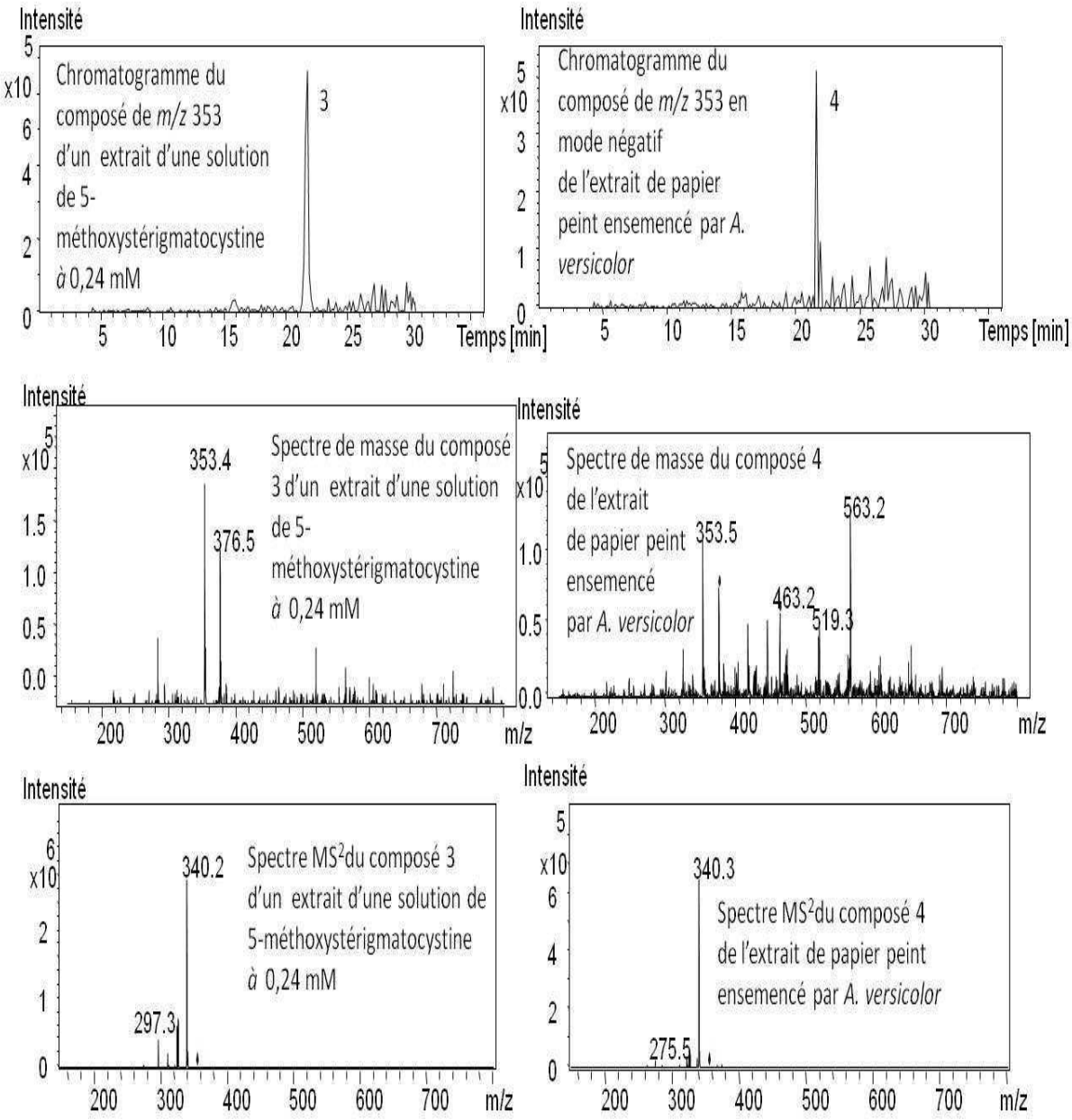


Figure 40 : Chromatogrammes et spectres de masse du composé de *m/z* = 353 (ESI-) issu d'une solution de 5-méthoxystérigmatocystine (à gauche) et de l'extrait du papier peint artificiellement contaminé par *A. versicolor (*à droite*).*

En première ligne sont indiqués les chromatogrammes, en deuxième ligne les spectres de masse et en troisième ligne la MS^2 du composé de *m/z* =353 (ESI-).

D'après la figure 40, le composé 4 correspond à un métabolite relatif à *A. versicolor* à 21,3 min de *m/z* = 353 (mode négatif); il a le même temps de rétention qu'une solution de

5-méthoxystérigmatocystine (composé 3). Par ailleurs, la MS^2 des composés 3 et 4, montre un fragment 340 issu des composés 3 et 4.

Il est à noter que la stérigmatocystine n'a pas été retrouvée dans l'extrait de papier peint artificiellement ensemencé par *S.chartarum*.

Nous avons détecté dans les papiers peints moisis de logements plusieurs métabolites fongiques. Dans la suite de ce travail, le risque mycotoxicologique des extraits hydro-organiques de ces papiers peints a été évalué sur un modèle cellulaire respiratoire *in vitro*, sur lequel a été effectué un test MTT, l'expression des médiateurs de l'inflammation et du CYP 1A1.

II-3) Tests MTT

L'analyse par HPLC-UV-MS avait permis de mettre en évidence des composés dont les *m/z* sont présentes uniquement sur les papiers peints moisis. Afin de déterminer si ces métabolites peuvent avoir un effet sur un modèle cellulaire *in vitro*, des cellules A549 ont été exposées durant 24 h à des extraits de papiers peints moisis et non moisis (issus des 11 logements), sur lesquelles un test MTT a été réalisé et dont les résultats sont présentés en figure 41.

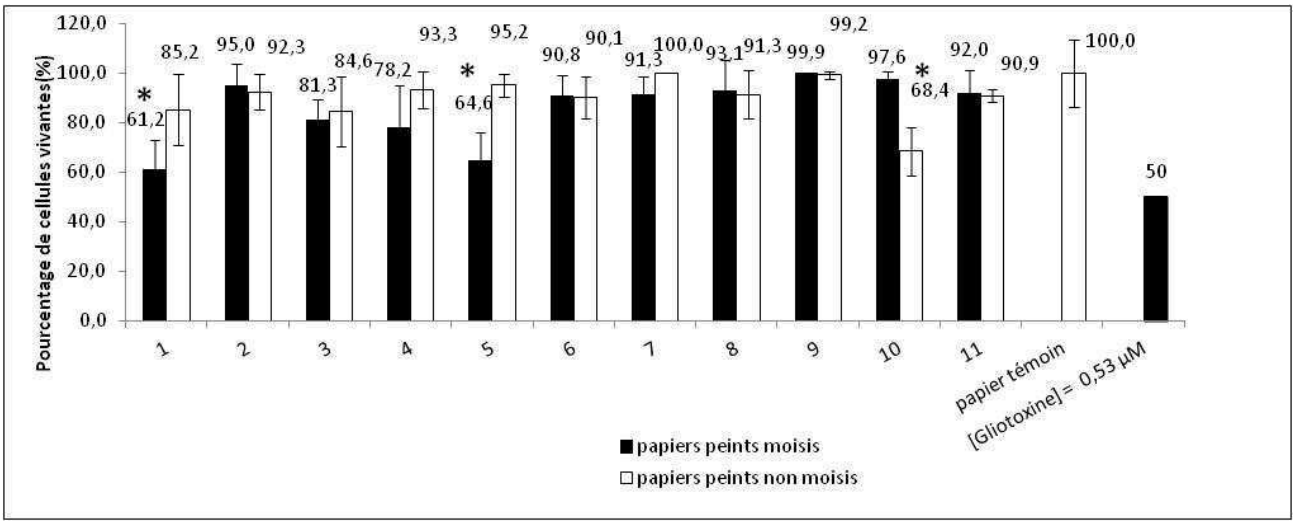


Figure 41 : Pourcentage de cellules vivantes A549 exposées à des extraits de papiers moisis et non moisis issus de 11 logements, et d'un papier peint non moisi non encollé (Résultats issus de trois cultures indépendantes exposées durant 24 heures à 5 µL d'extraits de papiers peints de 1 cm^2/mL). En ***** est indiqué le pourcentage de cellules vivantes significativement différent du papier peint témoin.

La figure 41 met en évidence une différence significative de pourcentage de cellules vivantes des papiers peints moisis 1 et 5, par rapport au papier peint témoin. Le pourcentage de mortalité cellulaire est de 38,8% et 35,4% respectivement pour les papiers peints 1 et 5.
La diminution du pourcentage de cellules vivantes exposées aux extraits de papiers peints moisis 1 et 5, peut s'expliquer par différents composés de *m/z* présentées en tableau XVI.. La CI_{50} de la gliotoxine au cours des 3 tests MTT était de 0,53 ± 0,32 µM. Ainsi, la toxicité des papiers peints moisis 1 et 5, est plus faible que celle d'une solution de gliotoxine de 0,53 µM induisant 50% de mortalité.
Ces résultats montrant une toxicité de deux papiers peints, sont en accord avec la présence de métabolites fongiques détectés par HPLC-UV-MS. Dans la suite de ce travail, nous avons évalué le potentiel pro-inflammatoire de ces extraits.

II-4) Expression des médiateurs de l'inflammation

Après l'évaluation de la cytotoxicité des extraits hydro-organiques des papiers peints moisis, il a été évalué l'expression des médiateurs de l'inflammation (TNF-α, IL-8, GM-CSF) et du CYP 1A1 de cellules A549 exposées à ces mêmes extraits. Les résultats sont présentés en figures 42a à 42c.

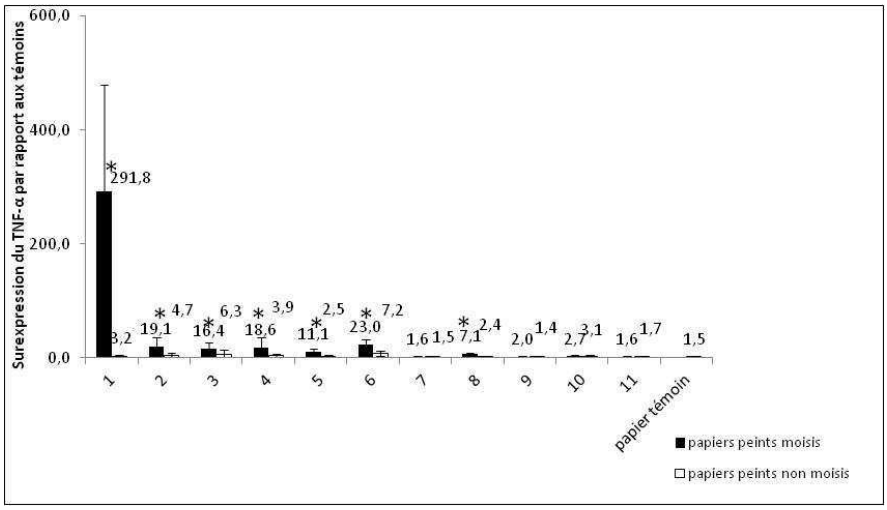


Figure 42a : Expression du TNF-α, de cellules A549 exposées durant 6 h à 25 µL d'extraits hydro-orgnaniques de papiers peints moisis (noirs) et non moisis (blancs). Résultats de deux cultures indépendantes. En * sont indiqués les échantillons significativement différents du papier peint témoin (non moisi non encollé).

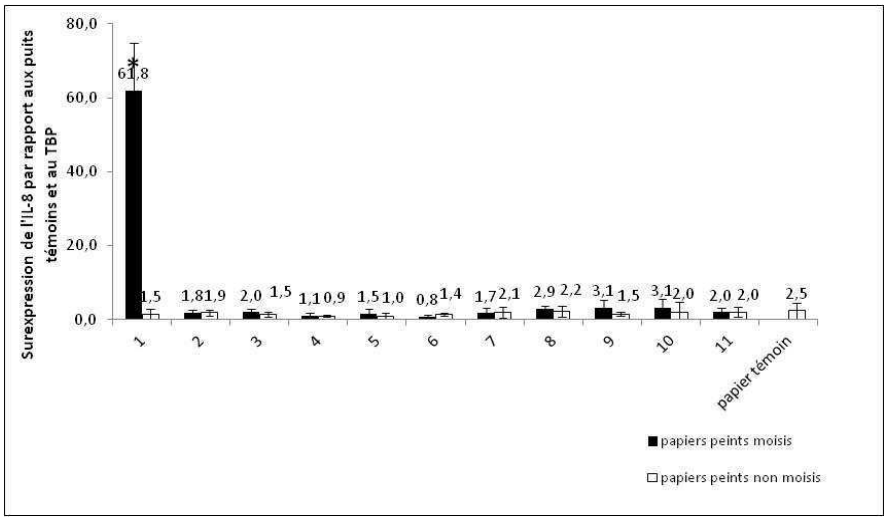


Figure 42b : Expression de l'IL-8 de cellules A549 exposées durant 6 h à 25 µL d'extraits hydro-orgnaniques de papiers peints moisis (noirs) et non moisis (blancs). Résultats de deux cultures indépendantes. En * sont indiqués les échantillons significativement différents du papier peint témoin (non moisi non encollé).

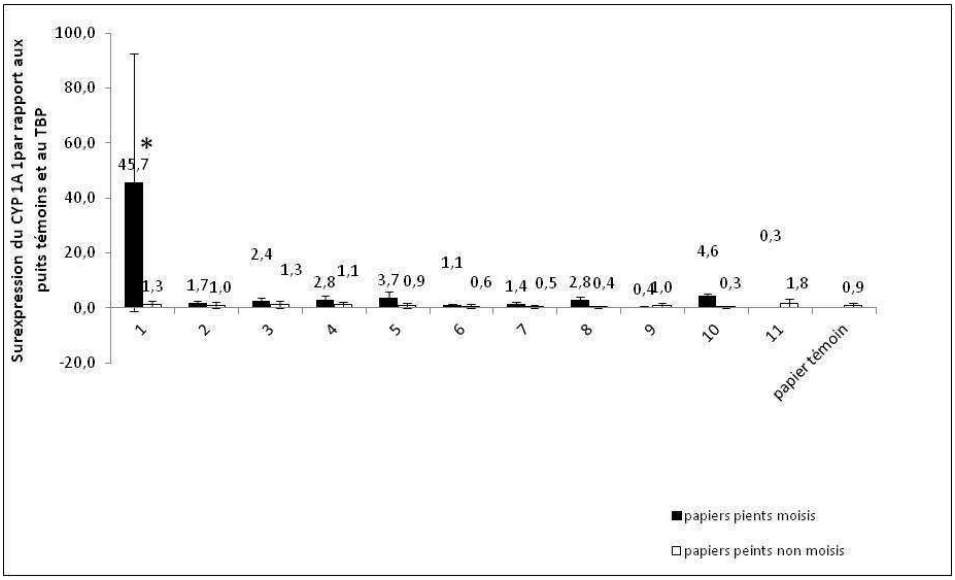


Figure 42c : Expression du CYP 1A1, de cellules A549 exposées durant 6 h à 25 µL d'extraits hydro-orgnaniques de papiers peints moisis (noirs) et non moisis (blancs). Résultats de deux cultures indépendantes. En * sont indiqués les échantillons significativement différents du papier peint témoin (non moisi non encollé).

La figure 42a, met en évidence une surexpression du TNF-α pour les papiers peints mosis 1 à 6 et le papier peint moisi 8 ($p < 0,03$). Dans tous ces papiers peints des métabolites fongiques avaient été détectés (tableau XVI). Une surexpression de l'IL-8 et du CYP 1 A1 ($p < 0,03$) a été observée uniquement pour le papier peint moisi 1. Aucune surexpression de GM-CSF n'a été observée.

DISCUSSION

Notre travail a consisté en l'étude de deux types de supports papiers : d'une part, des papiers patrimoniaux altérés par le foxing et d'autre part, des papiers peints moisis issus de logements, dont les habitants ont été diagnostiqués comme porteurs de symptômes allergiques. Les objectifs principaux de ce travail étaient d'identifier si des espèces fongiques étaient présentes sur ces deux types de supports papiers et de déterminer si des métabolites fongiques y sont produits. Pour le foxing, nous avons également cherché d'autres origines, en particulier métallique, ou d'autres micro-organismes comme les actinomycètes ou les bactéries. Enfin, les métabolites fongiques retrouvés ont été testés sur des cellules pulmonaires en culture afin d'y chercher une toxicité.

L'originalité de notre travail sur le foxing a consisté à évaluer si la recherche de mycotoxines pouvait être une alternative aux méthodes classiques de biologie moléculaire afin d'identifier les espèces fongiques du foxing. Parallèlement à cette stratégie, nous avons combiné un ensemble de méthodes physiques et bioanalytiques afin d'améliorer les connaissances et la caractérisation des agents abiotiques et biotiques du foxing, dans le but de mieux comprendre le ou les causes de ce phénomène. L'utilisation de méthodes physiques nous a permis d'une part, grâce à la spectrocolorimétrie, de proposer une méthode numérique et donc objective afin de décrire la couleur du foxing, et d'autre part de mettre en évidence que les coordonnées chromatiques du foxing étudié sont significativement différentes d'un foxing d'origine ferrique. Jusqu'ici la couleur du foxing a été décrite dans littérature de manière visuelle et donc subjective. Press (Press 2001) avait défini une échelle de « degré de foxing » fondée sur l'observation visuelle allant de 0 pour l'absence de foxing, à 10 pour un degré total de foxing. Cette échelle dépend de la vision de chaque observateur et ne peut-être utilisée en tant que base commune de la description de la couleur du foxing. Cain (Cain 1984) avait distingué deux types de foxing : des taches de foxing très foncées en leur centre à contours circulaires (appelées bullseyes), qui seraient d'origine métallique, et des taches de foxing plus claires à contours irréguliers (appelées snowflakes), qui seraient associées à un phénomène fongique. La encore, il s'agit d'une description visuelle et subjective. Grâce à l'utilisation de la spectrocolorimétrie et du système L*a*b*, nous avons décrit la couleur du foxing par des données numériques et objectives. Cette méthode définie par le CIE (CIE 1978)

pourrait être utilisée pour de futures études sur le foxing afin de disposer d'une base commune pour la mesure de la couleur de celui-ci. Nous avons également démontré que les coordonnées chromatiques du foxing étudié dans ce travail sont significativement différentes de celles d'une tache de fer. Cependant si la spectrocolorimétrie permet de définir la couleur du foxing de manière numérique et objective, il est difficile avec cette seule technique d'appréhender l'origine du foxing. On ne peut qu'émettre l'hypothèse que notre foxing n'est probablement pas d'origine ferrique. Seule l'analyse MEB-EDX a confirmé l'absence de fer et de tout autre métal, et nous a permis d'exclure l'origine métallique du foxing dans notre travail. Cette absence de métaux dans le foxing avait déjà été décrite dans la littérature. A ce titre, Arai (Arai 2000), n'avait trouvé ni fer, ni cuivre, ni zinc, et avait conclu à l'origine fongique du foxing. Press et Florian (Press 2001; Florian 1996) n'avaient pas trouvé non plus une concentration en fer significativement différente dans les zones altérées par le foxing par rapport aux zones de papiers témoins. Par ailleurs, l'analyse MED-EDX a montré plus de soufre dans les zones altérées par le foxing que dans les zones témoins. Le soufre pourrait avoir pour origine l'alun, additif ajouté au XIXème siècle pour précipiter les colles (Ministère de la culture et de la communication, http://www.culture.gouv.fr) qui accentuerait la décoloration du papier (Missori *et al.* 2006; Brückle 1993). Mais ce soufre, qui se présente à l'état naturel sous forme de cristaux jaunes pourrait également provenir d'espèces fongiques qui l'auraient sécrété en se déposant au niveau du papier. En effet le soufre est un élément essentiel pour tous les êtres vivants. Il est présent dans deux acides aminés naturels, la cystéine et la méthionine. La quantité de soufre plus élevée dans le foxing par rapport aux zones témoins, soulève la question d'un dépôt des spores fongiques antérieur à la formation du foxing, ou d'un dépôt des spores fongiques postérieur à la formation du foxing. Afin de répondre à cette question, il conviendrait de contaminer artificiellement une page de papier par un champignon, (idéalement du papier Whatman, formé de 100% de cellulose, et donc dépourvu de soufre ou de métal), et de le laisser se développer sur le papier pendant plusieurs mois, voire plusieurs années. Il suffirait ensuite de débarrasser la surface du papier du mycélium développé, soit en grattant la surface du papier, ou, comme certains auteurs l'ont fait, en lavant le papier avec une solution SDS/eau/Tween 40 (Pinzari *et al.* 2010), et observer si des taches de foxing sont apparues et si elles contiennent du soufre par une étude MEB-EDX.

Après la caractérisation du foxing par des méthodes physiques, nous avons utilisé des méthodes bioanalytiques afin d'en caractériser les agents biotiques. La viabilité des micro-

organismes du foxing a été évaluée par ATPmétrie et a mis en évidence une quantité d'ATP de l'ordre du pg dans les zones foxées, significativement plus élevée que les zones témoins. Nous avons ainsi démontré que la quantité d'ATP dans le foxing est 1000 fois plus faible que la quantité d'ATP produite par une moisissure classique telle qu'*A.* fumigatus laissée à pousser sur du papier pendant 1 mois. Nous avons pu, comparer de manière quantitative la viabilité des éléments fongiques du foxing par rapport à une moisissure cultivée sur papier durant 1 mois. Cette technique d'ATPmétrie rapide et facile à réaliser, est actuellement utilisée en routine au CRCC afin d'expertiser des œuvres graphiques dont on soupçonne une contamination fongique.

Ainsi, pour la première fois, la viabilité des micro-organismes du foxing a pu être quantifiée et démontrée de manière numérique. Jusqu'à présent, la viabilité des micro-organismes dans le foxing avait été démontrée par mise en culture (Arai 2000; Beckwith *et al.* 1940, Florian 1996; Florian et Manning 2000; Montemartini Corte *et al.* 2003) ou par amplification directe de l'ADN dans les zones de foxing (Rakotonirainy *et al.* 2007). La culture présente l'inconvénient d'être longue (plusieurs jours), et d'entraîner d'éventuels faux négatifs par l'utilisation de milieux de culture non adéquats aux espèces fongiques à rechercher. L'obtention d'isolats fongiques, à partir de la mise en culture de papiers altérés par le foxing, confirme les résultats d'ATPmétrie en faveur de micro-organismes viables dans le foxing. Des espèces fongiques identifiées dans le foxing ont été déjà décrites dans la littérature (Arai 1987 et 2000; Beckwith *et al.* 1940; Cain 1987; Nol *et al.* 1983). Si certains auteurs ont identifié des espèces fongiques xérophiles telles qu'*A. penicilloides* et *Eurotium herbariorum* (Arai 1987), nous avons, nous aussi, retrouvé des espèces xérophiles, *A. niger* et *P. chrysogenum*. Les autres espèces fongiques identifiées (*A. fumigatus* et *P. crustosum*), ne sont pas xérophiles.

Les milieux de culture fongique, décrits dans la littérature pour la mise en culture des papiers altérés par le foxing, sont des milieux pauvres de types PDA, MEA, DG-18 (Arai 2000; Beckwith *et al.* 1940; Florian et Manning 2000; Nol *et al.* 1983). A côté de ces milieux, nous avons voulu utiliser des milieux de culture destinés à la culture d'autres micro-organismes tels que les bactéries ou actinomycètes en utilisant des milieux Cœur Cervelle, R8 et AIA (Actinomycetes Isolation Agar). Tous les papiers foxés n'ont pas permis de donner des isolats fongiques, impliquant des zones de foxing non homogènes entre elles. Par ailleurs, aucune bactérie, ni aucun actinomycète n'ont été détectés (Roquebert 2002, De Paolis et Lippi 2008).

Nous avons ensuite recherché des mycotoxines fongiques dans le foxing afin de poursuivre la caractérisation fongique et de rechercher une alternative aux méthodes de biologie moléculaire qui présente des biais, avec en particulier celui de ne détecter que les espèces prédominantes (Bellemain *et al.* 2010). Les métabolites fongiques ont été recherchés dans les extraits de foxing. Le profil idéal aurait été d'observer un chromatogramme comportant des pics relatifs aux mycotoxines dans les extraits de foxing qui seraient absents du chromatogramme des extraits de papiers non foxés de ce même livre. Aucun pic chromatographique n'a été détecté, et nous avons vérifié la non production de mycotoxines par *A. fumigatus* sur des zones non foxées du livre étudié par un champignon. Les chromatogrammes des papiers altérés par le foxing et les témoins sont superposables. Ceci a été confirmé par l'analyse par spectrométrie de masse des chromatogrammes des deux types de papier, et par analyse par HPLC-Fluorescence. Au moins deux hypothèses expliquant l'absence de mycotoxines peuvent être évoquées :

- Soit le foxing est bien dû aux champignons et leur croissance ne s'accompagne pas de mycotoxines. Celles-ci peuvent aussi être en trop faible quantité pour les seuils de détection actuels, ou elles ont été dégradées après leur formation au cours du temps. On peut supposer que la faible quantité d'ATP, de l'ordre du pg, explique que le métabolisme des spores soit ralenti et que la production de mycotoxines y soit faible ou inexistante.
- Soit la présence de spores n'est que le reflet d'une altération du papier avec une « adhésion » des spores sur ces endroits lésés. Cependant, l'observation de filaments en MEB va à l'encontre de cette hypothèse.

La non détection de mycotoxines dans les extraits hydro-organiques de papiers altérés par le foxing n'exclue pas formellement la présence de mycotoxines en très faibles quantités mais contrairement à nos attentes, ils ne peuvent être utilisés en tant que biomarqueurs d'une contamination fongique. Des auteurs, intéressés par la recherche de biomarqueurs de champignons, ont proposé la recherche d'acides aminés par chromatographie sur couche mince et la recherche d'acides organiques par isotachophorèse (Araï 2000). D'autres auteurs se sont intéressés à la détection de groupements carbonyle ou de groupements amides primaires et secondaires par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Bicchieri *et al.* 2002; Manso *et al.* 2009; Zotti *et al.* 2011). Bien que certains auteurs aient pu émettre l'hypothèse d'une signature spécifique des champignons par les groupements amides, il n'en reste pas moins que ces mêmes groupements peuvent se retrouver sur la matrice papier. De

plus, ces fonctions chimiques ne sont pas spécifiques d'une espèce fongique donnée et ces méthodes ne peuvent pas répondre à la stratégie d'identification des espèces fongiques du foxing.

En raison de la forte toxicité cellulaire de certaines mycotoxines, un effet sur des cellules A549 aurait pu être observé malgré de très faibles concentrations (Bünger *et al.* 2004). Il n'y a pas de différence significative entre le pourcentage de cytotoxicité des cellules A549 exposées à des papiers détériorés par le foxing et les papiers témoins non foxés. Ces résultats sont corrélés à ceux obtenus par HPLC-UV-MS ne mettant pas en évidence de pics significatifs relatifs à des mycotoxines. Aucune différence significative de toxicité par le test MTT entre les papiers altérés par le foxing et les témoins n'a été mise en évidence, ajoutant un argument supplémentaire pour l'absence de mycotoxines dans les taches foxées du manuscrit étudié. Cependant, en l'absence de méthodes analytiques plus sensibles, la présence de mycotoxines dans le foxing en quantités très faibles ne peut être exclue.

Dans le cas du deuxième support papier étudié qu'étaient les papiers peints moisis issus de logements, la particularité de l'étude consistait à identifier directement sur ces matrices complexes la population fongique par microbiologie, ses métabolites par chimie analytique et évaluer si ces matrices complexes pouvaient entrainer une cytotoxicité sur un modèle cellulaire respiratoire *in vitro.*

Parmi les quatre espèces fongiques recherchées (*Cladosporium sphaerospermum*, *A. versicolor* et *P. chrysogenum, S. chartarum*), seul *S. chartarum* est retrouvé uniquement dans 3 des papiers peints des logements alors que les trois autres espèces sont retrouvées dans la majorité des papiers des logements. L'absence de *S. chartarum* dans la majorité des logements, peut s'expliquer par la nécessité d'une disponibilité en eau élevée pour cette espèce fongique en milieu intérieur : aw> 0,90 (Husman 1996; INPS 2002, Maheux 1998). Cependant, nous ne pouvons pas conclure sur ce point puisque nous ne disposions pas des informations relatives aux taux d'humidité dans les différents logements étudiés.

Dans seulement 2 logements, un SBS a été diagnostiqué, et c'est dans ces 2 logements que *S. chartarum* a été identifié par culture et/ou qPCR. Cette espèce fongique pourrait ainsi être reliée au SBS. L'association des espèces fongiques au SBS n'est pas clairement établie dans la littérature. Certains auteurs y ont associé *Aspergillus sp., Penicillium sp., S. chartarum* au

SBS (Al-Ahmad *et al.* 2009; Cooley *et al.* 1998; Saijo *et al.* 2011) sans explication convaincante.

Contrairement aux extraits hydro-organiques du foxing dans lesquels aucun métabolite fongique n'avait été détecté, des pics chromatographiques dans les extraits de papiers peints moisis ont été mis en évidence. Ces métabolites étaient absents des papiers peints non moisis. La plus grande quantité de moisissures, par rapport au papier foxé de la première partie de ce travail, explique cette différence, les méthodes analytiques ayant pour cette application une sensibilité suffisante. Cependant, seuls deux composés de *m/z* 401 et 487 issus des extraits de papiers peints moisis des logements 1, 7 et 8, ont pu être attribués à *S. chartarum.* Ces résultats sont en adéquation avec les analyses microbiologiques, puisque *S. chartarum* a été détecté dans ces mêmes logements. L'identification des autres composés a été difficile en raison du manque de connaissances concernant la production des métabolites fongiques sur des matrices telles que le papier peint. Pour contourner cette difficulté, nous avons ensemencé artificiellement des papiers peints par une des 4 espèces fongiques retrouvées en culture. L'analyse HPLC-MS de ces papiers peints artificiellement contaminés a permis de mettre en évidence des mycotoxines connues comme la 5-méthoxystérigmatocystine, connue pour être produite par *A. versicolor*, mais pas les métabolites retrouvés dans les papiers de logement naturellement contaminés par ces mêmes espèces fongiques. Quelques auteurs ont décrit la production de mycotoxines sur papiers peints naturellement contaminés par les moisissures dans des habitations qui ont connu des fuites d'eau prolongées (1 à 5 L/jour durant 3 à 6 mois) (Nielsen *et al.* 1999). Des trichothécènes (qui ne correspondent pas aux composés de *m/z* 401 et 487 retrouvés dans notre étude) ont ainsi pu être détectés sur des matériaux de construction contaminés naturellement par *S. chartarum* (Gravesen *et al.* 1999).

La première hypothèse de la différence entre les profils chromatographiques obtenus au cours de ce travail et ceux décrits dans la littérature, est notre méconnaissance du spectre sur des milieux différents, avec des conditions d'hygrométrie, d'éclairage et de chaleur non contrôlées. Cependant, le support en lui-même ne semble pas en cause, puisque l'ensemencement artificiel est possible. On peut toujours suspecter que des produits annexes (colles, compositions chimiques des papiers, colorants …), puissent jouer un rôle et expliquer aussi certaines différences de profil entre les deux types d'échantillons (papiers peints issus de logements naturellement moisis, et témoins papiers artificiellement ensemencés) contaminés avec la même espèce.

La deuxième hypothèse à la différence entre les profils chromatographiques obtenus au cours de ce travail et ceux décrits dans la littérature, est qu'il existe une chronologie différente avec des espèces présentes à un moment donné et qui disparaissent par la suite, en laissant des mycotoxines. Ce peut être aussi une raison de l'impossibilité d'identifier des espèces majeures peut-être non cultivables. Dans ce cas, on pourrait proposer un séquençage en masse de ces échantillons pour retrouver les espèces non cultivables.

Les tests de cytotoxicité des cultures de cellules (cellules A549) ont montré une augmentation significative de la cytotoxicité de deux papiers peints moisis (1 et 5) par rapport au papier peint témoin. Seul, un papier peint moisi (Numéro 1) a entrainé une surexpression significative concomitante du TNF-α, de l'IL-8 et du CYP 1A1, respectivement supérieure d'un facteur 12,7; 19,9 et 9,9 par rapport aux autres papiers peints moisis. Ce logement 1 est celui où les habitants se plaignaient le plus de symptômes : asthme, rhinite et conjonctivite. Le profil microbiologique de ce logement ne se distingue pas des autres logements. Soit cet effet est dû à un métabolite de *m/z* 401 issu de *S. chartarum*, présent uniquement dans l'extrait de papier peint moisi 1, soit ces augmentations s'expliquent par une combinaison de plusieurs métabolites qui agiraient par effets synergiques (Speijers et Speijers 2004). Ainsi, des auteurs ont décrits une exposition à de multiples mycotoxines pouvant mener à une synergie de celles-ci (Korpi *et al.* 1999) et que des effets combinés de mycotoxines sont supérieurs aux effets individuels de chaque mycotoxine (Tammer *et al.* 2007). La littérature décrit un excès de symptômes irritatifs, respiratoires, … chez les occupants d'un milieu présentant des problèmes de moisissures (*S. chartarum, A. versicolor*) et d'humidité (Jarvis et Morey 2001; Hodgson *et al.* 1998).

Par ailleurs, étant donné la complexité des matrices papiers étudiées, les effets cellulaires observés pourraient aussi être dus à des composés autres que les mycotoxines non détectables par HPLC-MS. Ainsi, des protéases peuvent être incriminées, pour lesquelles plusieurs auteurs décrivent l'augmentation de l'expression des cytokines notamment l'IL-8 (exposition de cellules à des protéases d'*A. fumigatus* de *P. chrysogenum* ou d'*Alternaria* (Borger *et al.* 1999; Tai *et al.* 2006; Tomee *et al.* 1997). Mais il peut aussi s'agir de β (1–3) glucanes, polymères de glucose de haut poids moléculaire, présents dans les parois fongiques. Ces composés sont également décrits comme pouvant provoquer des mécanismes irritatifs lors d'expositions aux moisissures domestiques (Rylander *et al.* 1998). Cependant, les β glucanes ne sont pas spécifiques d'une espèce donnée, et les effets auraient dû être liés à la

quantité de colonies. Ces effets cytotoxiques pourraient aussi être dus à des Composés Organiques Volatils (COV), émis soit par les espèces fongiques, soit par les papiers peints. Une étude réalisée des cellules A 549 en utilisant le test MTT a montré que le 1-décanol était le COV le plus toxique (Kreja *et al.* 2002). Ces COV pourraient être identifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans le cadre de ce travail de l'évaluation de la toxicité des supports papiers naturellement contaminés par des champignons se trouvant dans les bibliothèques, des archives ou des logements, nous avons étudiés deux types de supports papier : les papiers altérés par le foxing et les papiers peints moisis.

L'objectif principal du travail sur le foxing consistait à rechercher par HPLC-MS des mycotoxines afin d'identifier les espèces fongiques et s'affranchir des biais induits par les méthodes de biologie moléculaire. Aucune mycotoxine n'a pas été détectée et les tests MTT qui n'ont pas montré d'effets cytotoxiques confirment l'absence ou la faible quantité de mycotoxines dans le foxing. En effet il est possible que la sensibilité des méthodes utilisées soit insuffisante. L'autre possibilité est que les champignons détectés ne sont que des contaminants qui se sont simplement localisés sur des zones déjà lésées du manuscrit. Une alternative permettant d'amplifier l'ensemble des séquences d'ADN de la population fongique altérant un support papier serait le séquençage en masse. Cette méthode ne nécessite pas de passer par le clonage pour amplifier toutes les séquences d'ADN de la matrice étudiée et évite donc les biais dus à l'amplification de quelques séquences privilégiées ciblées par les amorces utilisées. Pour l'instant, le coût de cette tecnique reste élevé et la quantité de données informatiques générées nécessite du personnel dédié à cette tache. Il est en effet attendu d'avoir à trier dans la masse des séquences obtenues, et de retrouver celles qui proviennent du support, des contaminations humaines dues à la lecture des documents, et celles d'intérêt relevant des moisissures présentes. De toute manière, cette technique ne permettra pas de distinguer les champignons éventuellement responsables du foxing, de ceux simplement présents au moment du prélèvement.

L'analyse par HPLC-MS des extraits de papiers peints moisis a mis en évidence plusieurs métabolites secondaires. Deux d'entre eux ont pu être reliés à *S. chartarum* retrouvé en culture sur le même support. Cependant, d'une façon générale, nous n'avons pas observé de corrélation entre les cultures et la présence de métabolites connus pour être associés aux moisissures cultivées. Cela peut être dû à la méconnaissance de ce que les moisissures peuvent produire sur des milieux complexes comme le papier peint. Pour continuer à

identifier ces composés, il faudrait fractionner les extraits hydro-organiques de ces matrices complexes, les séparer et purifier par HPLC-UV, puis les analyser par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) du proton ou du ^{13}C. Cependant, cette étude structurale (RMN) est peu sensible et requiert des quantités de l'ordre du mg. Ces techniques permettraient de répondre à la présence ou non d'une mycotoxine spécifique dans un milieu donné, mais pas à la détection de métabolites secondaires fongiques sans lien immédiat avec les champignons cultivés. Une hypothèse serait qu'en fait les populations fongiques et microbiennes sur du papier moisi soient beaucoup plus complexes, avec de nombreuses interactions difficiles à démêler. Là encore, un séquençage en masse des papiers pourrait permettre d'identifier de nombreuses espèces que l'on ne sait pas, ou qu'on ne peut pas cultiver. Il n'en reste pas moins que les tests de cytotoxicité *in vitro* des extraits de papiers peints ont été positifs pour certains papiers, en particulier ceux contaminés par *S. chartarum*. La toxicité très élevée de certains papiers peints moisis pourrait être liée non à une mycotoxine en particulier, mais plutôt à des combinaisons de métabolites fongiques. Il conviendra donc de prendre en compte la toxicité de plusieurs métabolites de natures différentes : mycotoxines mais également COV et antigènes. Le peu de standards disponibles et la combinatoire exponentielle des associations possibles rend difficile l'avancée dans ce sens. Concernant les symptômes décrits par les habitants des logements d'où sont issus les papiers moisis, il est difficile de les relier à une espèce fongique ou un métabolite donné.

Le risque sanitaire des personnes exposées aux papiers moisis suppose qu'il y ait exposition à une ou plusieurs substances et que celles-ci soient quantitativement suffisantes pour que le risque puisse apparaître (Centre Rhône-Alpes d'Epidémiologie et de Prévention Sanitaire 2002). Les extraits hydro-organiques testés sur le modèle cellulaire *in vitro* au cours de ce travail ne sont pas probablement le reflet de l'exposition réelle des personnes en contact avec les supports papiers étudiés. Il est donc difficile d'évaluer le risque sanitaire des personnes exposées aux papiers peints moisis ce qui mériterait de futures études intégrant ce paramètre.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adl S.M., Simpson A.G., Farmer M.A., Andersen R.A., Anderson O.R., Barta J.R., Bowser S.S., Brugerolle G., Fensome R.A., Fredericq S., James T.Y., Karpov S., Kugrens P., Krug J., Lane C.E., Lewis L.A., Lodge J., Lynn D.H., Mann D.G., McCourt R.M., Mendoza L., Moestrup O., Mozley-Standridge S.E., Nerad T.A., Shearer C.A., Smirnov A.V., Spiegel F.W., Taylor M.F. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. Journal of Eukaryotic Microbiology (2005) 52, 399-451.

Adolphe M., Barlovatz-Meimon G. Culture de cellules animals. Methodologies applications. Eds Inserm (1988).

Al-Ahmad M. , Manno M., Ng V., Ribeiro M., Liss G. M., Tarlo S. M. Symptoms after mould exposure including *Stachybotrys chartarum* and comparison with darkroom disease. Allergy (2010) 65, 245-255.

Alborch L., Bragulat M.R., Abarca M.L., Cabañes F.J. Temperature and incubation time effects on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus sclerotioniger* and *Aspergillus lacticoffeatus* on culture media. Letters in Applied Microbiology (2011) 52, 208-212.

Amner W., Edwards C., McCarthy A.J. Improved medium for recovery and enumeration of the farmer's lung organism, *Saccharomonospora viridis*. Applied of Environmental Microbiology (1989) 55**,** 2669-2674.

Anderson B., Frisvad J.C. Natural Occurrence of Fungi and Fungal Metabolites in Moldy Tomatoes. Journal of Agricultural and Food Chemistry (2004) 52, 7507-7513.

Andersson M., Downs S., Mitakakis T., Leuppi J. Marks G. Natural exposure to *Alternaria* spores induces allergic shinitis symptoms in sensitized children. Pediatric Allergy and Immunology (2003) 14, 100-105.

Andersson M. A., Nikulin M., Koljalg U., Andersson M. C.,.Rainey F., Reijula K., Hintikka E.-L., Salkinoja-Salonen M. Bacteria, Molds, and Toxins in Water-Damaged Building Materials. Applied and Environmental Microbiology (1997) 63, 387-393.

Andrews S., Pitt J. I. Further Studies on the Water Relations of Xerophilic Fungi, Including Some Halophiles. Journal of General Microbiology (1987) 133, 233-238.

Arai H. Foxing caused by Fungi: twenty five years of study, International Biodeterioration and Biodegradation (2000) 46, 181-188.

Arai H. Microbiological studies on the conservation of paper and related cultural properties: part 5, physiological and morphological characteristics of fungi isolated from foxing formation mechanisms and countermeasures. Science for Conservation (1987) 26, 43-52.

Arnone A., Brambilla U., Nasini G., Vajna de Pava O. Isolation and Structure Elucidation of Tsugicolines A-D, Novel Protoilludane Sesquiterpenes from Laurilia tsugicola. Tetrahedon (1995) 51, 13357-13364.

Artic paper http://www.arcticpaper.com/fr/FR-Local-site/Services/Le-Guide-du-Papier-non-couche/Papier/The-make-up-of-paper/ (2010).

Ayed-Boussema I., Pascussi J.M., Maurel P., Bacha H., Hassen W. Zearalenone activates pregnane X receptor, constitutive androstane receptor and aryl hydrocarbon receptor and corresponding phase I target genes mRNA in primary cultures of human hepatocytes. Environmental Toxicology and Pharmacology (2011) 31, 79-87.

B

Barnes C., Tuck J., Simon S., Pacheco F., Hu F., Portnoy J. Allergenic materials in the house dust of allergy clinic patients. Annals of Allergy Asthma and Immunology (2001) 86, 517-523.

Beckwith T. D., Swanson W. H., Liams T. M. Deterioration of Paper: the Cause and Effect of Foxing. Publications of the University of California at Los Angeles in Biological Sciences (1940) 1, 299-356.

Béguin P., Aubert J.-P. The biological degradation of cellulose. FEMS Microbiology Reviews (1994) 13, 25-58.

Bellemain E., Carlsen T., Brochmann C., Coissac E., Taberlet P., Kauserud H. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an *in silico* approach reveals potential PCR biases BMC Mircobiology (2010) 10, 189-198.

Bellanger A.P., Millon L., Khoufache K., Rivollet D., Bieche I., Laurendeau I., Vidaud M., Botterel F., Bretagne S.. *Aspergillus fumigatus* germ tube growth and not conidia ingestion induces expression of inflammatory mediator genes in the human lung epithelial cell line A549. Journal of Medical Microbiology (2009) 58, 174-179.

Bennett, J. W., Klich M. Mycotoxins. Clinical Microbioligy Reviews (2003) 16, 497-516.

Bhat M.K., Bhat S. Cellulose degrading enzymes and their potentialindustrial applications. Biotechnology Advances (1997) 15, 583-620.

Bicchieri M., Ronconi S., Romano F.P., Pappalardo L., Corsi M., Cristoforetti G., Legnaioli S., Palleschi V., Salvetti A., Tognoni E. Study of foxing stains on paper by chemical methods, infrared spectroscopy, micro-X-ray fluorescence spectrometry and laser induced breakdown spectroscopy. Spectrochimica Acta B (2002) 57, 1235-1249.

Borger P. Koëter G.H., Timmerman J. A. B.,2 Vellenga E.. Tomee J. F. C,2 Kauffman H. F. 4 Proteases from *Aspergillus fumigatus* Induce Interleukin (IL)–6 and IL-8 Production in Airway Epithelial Cell Lines by Transcriptional Mechanisms. The Journal of Infectious Diseases (1999) 180, 1267–1274.

Bogomolova E., Kirtsideli I. Airborne fungi in four stations of the St. Petersburg Underground railway system. International Biodeterioration and Biodegradation (2009) 63, 156-160.

Bouhet S., Oswald I. The effects of mycotoxins, fungal food contaminants, on the intestinal epithelialcell-derived innate immune response. Veterinary Immunology and Immunopathology (2005) 108, 199-209.

Boudra H., Morgavi D.P. Mycotoxin risk evaluation in feeds contaminated by *Aspergillus fumigatus* Animal Feed Science and Technology (2005) 120, 113-123.

Bourrier T., Albertini M., Vivinus S., Gari-ToussaintM., Crenesse D., Mariani R. Allergie isolée aux moisissures A propos de quatorze enfants sensibilisés *Alternaria.* Revue française d'Allergologie. (1997) 2, 194-199.

Brückle I. http://cool.conservation-us.org/byorg/abbey/an/an17/an17-4/an17-407.html (1993)

Brzonkalik K., Herrling T., Syldatk C., Neumann A. The influence of different nitrogen and carbon sources on mycotoxin production in *Alternaria alternata.* International Journal of Food Microbiology (2011) 147, 120-126.

Bullerman L. B., Bianchini A. Stability of mycotoxins during food processing, International Journal Food Microbiology (2007) 119, 140-146.

Bünger J., Westphal G., Mönnich A., Hinnendahl B., Hallier E., Müller M. Cytotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxins. Toxicology (2004) 202, 199–211.

Bush Robert K., Prochnau Jay J. *Alternaria*-induced asthma. Journal of Allergy and Clinical Immunology (2004) 113, 227-234.

Bush R.K., Jay M. Portnoy J.M., Saxon A, Terr A.I., Wood R.A. Environmental and occupational respiratory disorders. The medical effects of mold exposure. Journal of Allergy and Clinical Immunology (2006) 117, 326-333.

Butchko R. A. E., Adams Thomas H., Keller N. P. *Aspergillus nidulans* Mutants Defective in *stc* Gene Cluster Regulation. Genetics Society of America (1999) 153, 715-720.

Bünger J., Westphal G., Monnich A., Hinnendahl B., Hallier E., Muller M. Cytotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxins. Toxicology (2004) 202, 199-211.

C

Cabaret O., Puel O., Botterel F., Pean M., Khoufache K., Costa J.M., Delaforge M., Bretagne S. Metabolic detoxication pathways for sterigmatocystin in primary tracheal epithelial cells. Chemical research in Toxicology (2010) 15, 1673-1681.

Cabral J.P.S. Can we use indoor fungi as bioindicators of indoor air quality? Historical perspectives and open questions. Science of the Total Environment (2010) 408, 4285–4295.

Cahagnier B., Melcion D., Richard-Molard D. Growth of *Fusarium moniliforme* and its biosynthesis of fumonisin B1 on maize grain as a function of different water activities. Letters

in Applied Microbiology (1995) 20, 247–251.

Cai GH., Hashim JH., Hashim Z., Ali F., Bloom .E, Larsson L., Lampa E., Norbäck D. Fungal DNA, allergens, mycotoxins and associations with asthmatic symptoms among pupils in schools from Johor Bahru, Malaysia. Pediatric Allergy and Immunology (2010) 22, 290-298.

Cain C. E., Miller B. A. Photographic, spectral and chromatographic searches into the nature of foxing, Preprints American Institute for Conservation, 10th Annual Meeting, Milwaukee, (1982) 54-62.

Cain C. E. Proposed Classification of Foxing, Postprints from the AIC 10th Annual Meeting, Milwaukee (1984).

Cain C. E. Paper Foxing: Biochemical Effects of Fungal Infections of Paper, Journal of the Mississippi Academy of Science (1987) 32-24.

Carter H.A. The Chemistry of Paper Preservation Part 2. The Yellowing of Paper and Conservation Bleaching. Journal of Chemical Education (1996) 73, 1068-1073.

Carter H.A. Chemistry in the Comics. The acidity of paper. Journal of Chemical Education (1989) 66, 883-886.

Cary J.W., Ehrlich K.C. Aflatoxigenicity in *Aspergillus*: molecular genetics, phylogenetic relationships and evolutionary implications. Mycopathologia (2006) 162, 167-77.

Centeno S., Calvo, M. A. Mycotoxins Produced by Fungi Isolated from Wine Cork Stoppers. Pakistan Journal of Nutrition (2002) 1, 267-269.

Cetin Y., Bullerman L.B. Cytotoxicity of Fusarium mycotoxins to mammalian cell cultures as determined by the MTT bioassay. Food and Chemical Toxicology (2005) 43, 755-764.

Chabasse D., Guiguen C.I., Contet Audonneau N. Mycologie Médicale Eds Masson (1999).

Chabasse D., Bouchara J-P ; De gentile L., Brun S., Cimmon B., Penn P. Cahier de formation les moisissures d'intérêt médicale (2002).

Champiat D., Larpent J.L. Bio-chimi-luminescence, principes et applications. Eds Masson (1993).

Chang P. K., Ehrlich K.C., Yu J., Bhatnagar D., Cleveland, T.E. Increased Expression of *Aspergillus parasiticus* aflR, Encoding a Sequence-Specific DNA-Binding Protein, Relieves Nitrate Inhibition of Aflatoxin Biosynthesis. Applied Environmental Microbiology (1995) 61, 2372-2377.

Chaumont J.P., Simeray J., Mandin D., Adessi B. Moisissures et allergies des professions agricoles et de l'agroalimentaire. Revue Française Allergologie et Immunologie Clinique (2001) 41, 253-256.

Chirife J., Gonzalez H., Resnik S. On water dynamics and germination time of mold spores in concentrated sugar and polyol solutions. Food Research International (1996) 28, 531-535.

Cole R., Schweikert M., Jarvis B. Handbook of fungal secondary metabolites 3 volumes (2003).

Commision Internationale de l'Eclairage. Recommendations on uniform color spaces, color difference equations, psychometric color terms. Supplement No. 2 d'une publication du CIE No. 15 (E- 1.3.1) Paris, France: Bureau Central de la CIE (1978).

Conner D.E., Beuchat L.R. Heat resistance of ascospores of *Neosartorya fischeri* as affected

by sporulation and heating medium. International Journal of Food Microbiology (1987) 4, 303-312.

Conseil Canadien des archives. Manuel de conservation des documents d'archive (2003) 3, 14-30.

Cooley J.D., Wong W.C., Jumper C.A., Straus D.C. Correlation between the prevalence of certain fungi and sick building syndrome. Occupational and Environmental Medicine (1998) 55, 579-584.

D

Damoglou A.P., Campbell D.S. The effect of pH on the production of patulin in apple juice. Letters in Applied Microbiology (1986) 2, 9-11.

De Biasi P.M. Le papier, une aventure au quotidien. Eds Gallimard (1999).

Dembitsky V.M., Al Quntar A., Srebnik M. Natural and Synthetic Small Boron-Containing Molecules as Potential Inhibitors of Bacterial and Fungal Quorum Sensing. Chemical Reviews (2011) 111, 209-237.

De Paolis M. R., Lippi D. Use of metabolic and molecular methods for the identification of a *Bacillus* strain isolated from paper affected by foxing, Microbiological Research (2008) 163, 121-131.

Diaz G. J., Murcia H. W., Cepeda S. M. Cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of aflatoxin B1 in chickens and quail. Poultry Science (2010) 89, 2461-2469.

Durrieu G. http://www.associationmycologiquetoulouse.ups-tlse.fr/spip.php?article23 (2008)

Durovic M., Zellinger J. Chemical Processes in the Bleaching of Paper in Library and Archival Collections. Restaurator (1993) 14, 78-101.

E

Elidemir O., Colasurdo G.N., Rossmann S.N., Fan L.L. Isolation of *Stachybotrysen* from the lung of a child with pulmonary hemosiderosis. Pediatrics (1999) 104, 964-966.

Esteban A., Abarca M.L., Bragulat M.R., Cabañes F.J. Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli. Research in Microbiology (2004) 155, 861-866.

F

Fang Z., Ouyang Z., Hu L., Wang X, Zheng X., Lin X. Culturable airborne fungi in outdoor environments in Beijing, China. Science of the Total Environment (2005) 350, 47-58.

Fleck E., Rabaud C., Béot S., Chemardin J., Amiel C., May T., Canton P. Aspergillose pulmonaire invasive et infection par le VIH. Médecine et Maladies Infectieuses (1999) 29, 301-306.

Florian M.-L. E. The role of conidia of fungi in fox spots. Studies in conservation (1996) 41, 65-75.

Florian M.-L. E., Manning L. SEM analysis of irregular fungal spot in an 1854 book: population dynamics and species identification. International Biodeterioration and Biodegradation (2000) 46, 205-220.

Fogle M.R., Douglas D.R., Jumper C.A., Straus D.C. Growth and Mycotoxin Production by *Chaetomium globosum* Is Favored in a Neutral pH. International Journal of Molecular Sciences (2008) 9, 2357-2365.

Forsell J. H., Witt M. F., Tai J-H., Jensen R., Pestka J. J. Effects of 8-week exposure of the B6C3F1 mouse to dietary deoxynivalenol (vomitoxin) and zeara-lenone. Food and Chemical Toxicology (1986) 24, 213-219.

Frémy J.M, Grosso F., Dragacci S. Analyse et detection de mycotoxines. Techniques de l'ingénieur (2005).

Frew A. J. Mold allergy: Some progress made, more needed. Journal of Allergy and Clinical Immunology (2004) 113, 216-218.

G

Garret M.H., Rayment P.R., Hooper M.A., Abramson M.J., Hooper B.M. Indoor airborne fungal spores, house dampness, and association with environmental factors and respiratory health in Children. Clinical and Experimental Allergy (1998) 28, 459-467.

Gallo F., Pasquariello, G. Foxing: Ipotesi sull'originebiologica", Bolletino dell'Istituto Centrale per la Patologia del Libro (1989) 43, 139-175.

Gandini A., Pasquini D. The impact of cellulose fibre surface modification on some physico-chemical properties of the ensuing papers. Industrial Crops and Products (2012) 35, 15–-21.

Gharbi H. Réponse de l'épithélium respiratoire exposé à *Aspergillus fumigatus* : effets sur l'expression pulmonaire des enzymes du métabolisme des xénobiotiques. Mémoire M2 de l'Université ParisVI (2010).

Glass, N. L., Donaldson, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Applied Environmental Microbiology (1995) 61, 1323-1330.

Gock M.A., Hocking A.D., Pitt J.I., Poulos P.G. Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi. International Journal of Food Microbiology (2003) 81, 11-19.

Gourama H., Bullerman L.B. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. Journal of Food Protection (1995) 58, 1249-1256.

Gqaleni N., Smith J.E., Lacey J., Gettinby G. Effects of Temperature, Water Activity, and Incubation Time on Production of Aflatoxins and Cyclopiazonic Acid by an Isolate of *Aspergillus flavus* in Surface Agar Culture. Applied and Environmental Microbiology (1997) 63, 1048-1053.

Grandière-Perez L., Penn P., Gardembas M., Boasson M. Approche diagnostique non agressive de l'aspergillose pulmonaire invasive en hématologie. Analyse rétrospective d'une série de 16 cas. La Revue de Médecine Interne (2002) 23, 259-266.

Gravesen S., Nielsen P., Iversen R., Nielsen K. Microfungal Contamination of Damp Buildings-Examples of Risk. Environmental Health Perspectives (1999) 107, 505-508.

Gusakov A.V., Sinitsyn A.P., Berlin A.G., Markov A.V., Ankudimova N.V. Surface hydrophobic amino acid residues in cellulase molecules as a structural factor responsible for their high denim-washing performance. Enzyme and Microbial Technology (2000) 27, 664-671.

H

Hadj Ali W., Derrien D., Alix F., Pérollier C., Lépine O., Bayoudh S., Chapuis-Hugon F., Pichon V. Solid-phase extraction using molecularly imprinted polymers for selective extraction of a mycotoxin in cereals. Journal of Chromatography A (2010) 1217, 6668–6673.

Hahn M.E. The aryl hydrocarbon receptor: A comparative perspective. Comparative Biochemistry and Physiology (1998) 121, 23-53.

Hamilton R.G., Eggleston P.A. Envriomental allergen analyses. Methods (1997) 13, 53-60.

Hanaoka F.; Takashi M. ; Enomoto T. ; Yamada M. ; Tanaka S. ; Wataya Y.; Hayatsu H. Contamination by ATP of commercial dATP samples causing erroneous results in studies of DNA replication in isolated HeLa cell nuclei. Journal of biochemistry (1985) 97, 383-386.

Harris J.P., Mantle P.G. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. Phytochemistry (2001) 58, 709-716.

Haugland R.A., Vesper S.J., Wymer L.J. Quantitative measurement of *Stachybotrys chartarum* conidia using real time detection of PCR products with the TaqMan (TM) fluorogenic probe system. Molecular and Cellular Probes (1999) 13, 329-340.

Hendry K.H., Cole E.C A review of mycotoxins in indoor air. Journal of Toxicology and Environmental Health (1993) 38, 183-198.

Hilaire D. Biodétérioration des matériaux. Eds EDP (1994).

Hinkley S. F., Moore J.A., Squillari J., Tak H., Oleszewski R., Mazzola E. P., Jarvis B. B. New atranones from the fungus *Stachybotrys chartarum.* Magnetic Resonance in Chemistry (2003) 41, 337–343.

Hodgson M., Morey P., Leung W. Y., Morrow L., Miller D., Jarvis B., Robbins H., Halsey J., Storey E. Buiding associtated pulmonary diseases from exposure to Stachybotrys chartarum and Aspergillus versicolor. JOEM (1998) 40, 241-249.

Huff W.E., Hamilton P.B. Mycotoxins – their biosynthesis in fungi: Ochratoxins–metabolites of combined pathways. Journal of Food Protection (1979) 42, 815-820.

Husman T. Health effects of indoor-air microorganisms. Scandinavian Journal of Work, Environmental and Health (1996) 22, 5–13.

Huttunen K., Hyvarinen A., Nevalainen A., Komulainen H., Hirvonen M. R. Production of proinflammatory mediators by indoor air bacteria and fungal spores in mouse and human cell lines. Environmental Health Perspectives (2003) 111, 85-92.

Huttunen K., Rintala H., Hirvonen M.R., Vepsalainen A., Hyvarinen A., Meklin T., Toivola M., Nevalainen A. Indoor air particles and bioaerosols before and after renovation of moisturedamaged buildings: The effect on biological activity and microbial flora. Environmental Research (2008) 107, 291-298.

I

INSP rapport annuel. Les risques à la santé associés à la présence de moisissures en milieu intérieur. Québec (2002).

J

Jarvis B.B., Lee Y.W., Yatawara C.S., Mazzocchi D.B., Flippen-Anderson J.L., Gilardi R., George C. 7α Hydroxytrichodermol A new Trichothecene from *Myrothecium roridum*. Applied Environmental Microbiology (1985) 50, 1225-1228.

Jarvis J.Q., Morey P.M. Allergic respiratory disease and fungal remediation in a building in a subtropical climate. Applied Occupational Enviromental Hygiene (2001) 16, 380-388.

Jovanovic S., Felder-Kennel A., Gabrio T., Kouros B., Link B., Maisner V., Piechotowski I., Schick K.H., Schrimpf M., Weidner U., Zöllner I., Schwenk MI Indoor fungi levels in homes of childrenwith and whithout allergy history. International Journal of Hygiene and Environmental Health (2004) 207, 369-378.

K

Karmaker M., Ray R.R. Current Trends in Research and Application of Microbial Cellulases. Research Journal of Microbiology (2011) 6, 41-53.

Kendrick B. The fifth kingdom. Troisième Eds (2000).

Keswani J, Kashon ML, Chen BT. Evaluation of interference to conventional and real-time PCR for detection and quantification of fungi in dust. Journal of Environmental Monitoring (2005) 7, 311-318.

Khoufache K., Cabaret O., Farrugia C., Rivollet D., Alliot A., Allaire E., Cordonnier C., Bretagne S., Botterel F. Primary *in vitro* culture of porcine tracheal epithelial cells in an air-liquid interface as a model to study airway epithelium and *Aspergillus fumigatus* interactions. Medical Mycology (2010) 48, 1049-1055.

Khoufache K., Puel O., Loiseau N., Delaforge M., Rivollet D., Coste A., Cordonnier C., Escudier E., Botterel F., Bretagne S. Verruculogen associated with *Aspergillus fumigatus* hyphae and conidia modifies the electrophysiological properties of human nasal epithelial cells. *BMC Microbiology* (2007) *7*, 1-11.

Kokkonen M., Jestoi M., Rizzo A. The effect of substrate on mycotoxin production of selected *Penicillium* strains. International Journal of Food Microbiology (2005) 99, 207-214.

Korpi A., Kasanen J.P., Alarie Y., Kosma V.M., Pasanen A.L. Sensory irritating potency of some microbial volatile organic compounds (MVOCs) and a mixture of five MVOCs. Archives of Environmental Health (1999) 54, 347–352.

Kovacs K., Megyeri L., Szakacs G., Kubicek C.P., Galbe M., Zacchi G. *Trichoderma atroviride* mutants with enhanced production of cellulase and β-glucosidase on pretreated willow. Enzyme and Microbial Technology (2008) 43, 48-55.

Kreja L., Seidel H.J. On the cytotoxicity of some microbial volatile organic compounds as studied in the human lung cell line A549. Chemosphere **(**2002) 49, 105-110.

Kruber P., Trump S., Behrens J., Lehmann I. T-2 toxin is a cytochrome P450 1A1 inducer and leads to MAPK/p38- but not aryl hydrocarbon receptor-dependent interleukin-8 secretion in the human intestinal epithelial cell line Caco-2. Toxicology (2011) 284, 34-41.

L

Lee M.G., Li S., Jarvis B.B., Petska J.J. Effects of stratoxins and other macrocyclic trichotecenes on IL-2 production and viability of EL-4 thymoma cells. Journal of toxicology and Environmental Health (1999) 57, 459-474.

Lewin M., Herman F. M. Oxidation and aging of cellulose. Macromolecular Symposia (1997) 118, 715-724.

Liams T. M., Beckwith T. D. Notes on the Causes and Prevention of Foxing in Books." The Library Quarterly (1935) 5, 407-418.

Li C., Yoshimoto M., Fukunaga K., Nakao K. Characterization and immobilization of liposome-bound cellulase for hydrolysis of insoluble cellulose. Bioresource Technology (2007) 98, 1366–1372

M

Maheux L. Session on microbial contamination. Occupational and environmental health services agency. Health Canada (1998).

Maïsadour Semences http://www.maisadour-semences.fr/maitriser-les-fusarium-gestion-du-risque-mycotoxines/mycotoxines.php?menu=introduction&page=lexique&page2=definition#4 (2009)

Makun H. A., Anjorin S. T., Moronfoye B., Adejo F. O., Afolabi O. A., Fagbayibo G.,Balogun B. O., Surajudeen A. A. Fungal and aflatoxin contamination of some human food commodities in Nigeria. African Journal of Food Science (2010) 4, 127-135.

Manso M., Pessanha S., Figueira F., Valadas S., Guilherme A., Afonso M., Rocha A. C., Oliveira M. J., Ribeiro I., Carvalho, M. L. Characterisation of foxing stains in eighteenth to nineteenth century drawings using non-destructive techniques. Analytical and Bioanalytical Chemistry (2009) 395, 2029-2036.

Mason C.D., Rand T.G., Oulton M., Mac Donald J.M. Scott J.E. Effects of *Stachybotrys chartarum (atra*) conidia and isolated toxin on lung surfactant production homeostasis. Natural Toxins (1998) 61, 27-33.

Mateo J.J., Mateo R., Jimenez M. Accumulation of type A trichothecenes in maize, wheat and rice by *Fusarium sporotrichioides* isolates under diverse culture conditions. International Journal of Food Microbiology (2002) 72, 115-123.

Meklin T., Reponen T., McKinstry C., Cho S-H., Grinshpun S.A., Nevalainen A., Vepsäläinen A., Haugland R.A., LeMasters G., Vesper S.J. Comparison of mold concentrations quantified by MSQPCR in indoor and outdoor air sampled simultaneously. Science of the Total Environment 382 (2007) 130-134.

Meletiadis J., Meis J., Mouton J.W., Verweu PE. Analysis of Growth Characteristics of Filamentous Fungi in Different Nutrient Media. Journal of Clinical Microbiology (2001) 39, 478-484.

Meynell G. Notes on Foxing, Chlorine Dioxide Bleaching and Pigments. The Paper Conservator (1979) 4, 30-32.

Miller R., Galston G. Bioluminescent methods for the detection of potential spoilage organisms in packaged beers. Society for Applied Bacteriology. Technical Series (1990) 26, 153-159.

Ministère de la Culture et de la Communication. http://www.culture.gouv.fr/culture/conservation/dswmedia/fr/txt_grap.htm

Minvielle B., Rugraff Y. Intérêt de l'ATP métrie pour la validation et l'optimisation du nettoyage-désinfection dans le secteur de abattage-découpe. Techniporc (1999) 22, 5-9.

Missori M., Righini M., Dupont A.-L. Gelatine sizing and discoloration: A comparative study of optical spectra obtained from ancient and artificially aged modern papers. Optics Communications (2006) 263, 289-294.

Molina M., Giannuzzi L. Modelling of aflatoxin production by Aspergillus parasiticus in a solid medium at different temperatures, pH and propionic acid concentrations. Food Research International (2002) 35, 585-594.

Molto G.A., Gonzalez H.H., Resnik S.L., Pereyra Gonzalez A. Production of trichothecenes and zearalenone by isolates of *Fusarium spp*. from Argentinian maize. Food Additives and Contaminants (1997)14, 263-268.

Montero R., Serrano L., Davila V. M., Ito A., Plancarte A. Infection of rats with *Taenia taeniformis metacestodes* increases hepatic CYP450, induces the activity of CYP1A1, CYP2B1 and COH isoforms and increases the genotoxicity of the procarcinogens benzo[a]pyrene, cyclophosphamide and aflatoxin B_1. Mutagenesis (2003) 18, 211-216.

Montemartini Corte A., Ferroni A., Salvo V.S. Isolation of fungal species from test samples and maps damaged by foxing, and correlation between these species and the environment. International Biodeterioration and Biodegradation (2003) 51,167–173.

Mortimer D.N., Parker I., Shepherd M.J., Gilbert J. A. Limited survey of retail apple and grape juices for the mycotoxin patulin. Food Additives and Contaminants (1985) 2, 165-170.

Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods (1983) 65, 55-63.

Moularat S., Robine E., Ramalho O., Oturan M. Detection of fungal development in closed spaces through the determination of specific chemical targets. Chemosphere (2008) 72, 224-232.

Moularat S., Robine E. Mesure des mycotoxines aéroportées. Revue française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique (2006) 46, 180-183.

Muller A., Lehmann I., Seiffart A., Diez U., Wetzig H., Borte M., Herbarth O. Increased incidence of allergic sensitisation and respiratory diseases due to mould exposure: results of the Leipzig Allergy Risk children Study (LARS). International Journal of Hygiene and Environmental Health (2002) 204, 363-365.

N

Nguyen M. T. Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vitenam. Etudes des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines. Thèse de doctorat de l'Institut national polytechnique de Toulouse 2007.

Nielsen K. F. Mycotoxin production by indoor molds. Fungal Genetics and Biology (2003) 39, 103-117.

Nielsen K. F., Mogensen J. M., Johansen M., Larsen T. O., Frisvad, J. C. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. Analytical and Bioanalytical Chemistry (2009) 395, 1225-1242.

Nielsen K.F., Thrane U., Larsen T.O., Nielsen P.A., Gravesen S. Production of mycotoxins on artificially inoculated building materials. International Biodeterioration and Biodegradation (1998) 42, 9-16.

Nielsen K.F., Gravesen S., Nielsen P.A., Andersen B., Thrane U., Frisvad J.C. Production of mycotoxins on artificially and naturally infested building Materials. Mycopathologia (1999) 145, 43-56.

Niemeier R.T., Sivasubramani S.K., Reponen T., Grinshpun S.A. Assessment of fungal contamination in moldy homes: comparison of different methods. Journal of Occupational and Environmental Hygiene (2006) 3, 262-273.

Nikulin M.,Pasanen A.-L., Berg S., Hintikka E-L. *Stachybotrys atra* Growth and Toxin Production in Some Building Materials and Fodder under Different Relative Humidities. Applied and Environmental Microbiology (1994) 60, 3421-3424.

Nikulin M., Reijula L., Jarvis B.B., Veijalainen P., Hintikka E.L. Effects of intranasal exposure to spores of *Stachybotrys atra* in mice. Fundamental Applied Toxicology (1997) 35, 182-188.

Nol L., Henis Y., Kenneth R. G. Biological factors on foxing in postage stamp papers, International Biodeterioration and Biodegradation (1983) 19, 19-25.

O

O'Connor GT. Walter M., Mitchell H., Meyer K; Kattan M., Morgan W. J., Gruchalla R.S., Pongracic J. MD,f Er Smartt E., Stout J. W., Evans R., Crain E.F., Burge H.A. Airborne fungi in the homes of children with asthma in low-income urban communities: The Inner-City Asthma Study. Journal of Allergy and Clinical Immunology (2004) 114, 509-606.

Ortiz-Gomez M. T., Perez-Arribas L. V., Leon-Gonzalez M. E., Polo-Diez L. M. Liquid Chromatography Determination of Simazine and Antimycin A in Must. Journal of Agricultural and Food Chemistry *(*1995) 43, 2883-2886.

Owen A., Derow D. Foxing. American institute for conservation of historic and artistic works. Book and paper Consevation Catalog (1992) 13, 1-39.

P

Park E.Y., Naruse K., Kato T. Improvement of cellulase production in cultures of *Acremonium* cellulolyticus using pretreated waste milk pack with cellulase targeting for biorefinery. Bioresource Technology (2011) 102, 6120–6127.

Paugam A., Baixench M.-T., Lebuisson A., Dupouy-Camet J. Diagnostic de l'aspergillose bronchopulmonaire invasive : valeur du dosage du galactomannane dans le lavage bronchoalvéolaire de patients immunodéprimés. Pathologie Biologie (2010) 58, 100-103.

Peat J.K., Tovey E., Mellis C.M., Leeder S.R., Woolcock A.J. Importance of house dust mite and *Alternaria* allergens in childhood asthma: an epidemiological study in two climatic regions of Australia. Clinical and Experimental Allergy (1993) 23, 812-820.

Phillipe G., Baldet P., Héois B., Ginisty C. Reproduction sexuée des conifères et production de semences en verger à graines. Cemagref (2006).

Pinzari F., Zotti M., De Mico A., Calvini P. Biodegradation of inorganic components in paper documents: Formation of calcium oxalate crystals as a consequence of *Aspergillus terreus* Thom growth. International biodegradation and bioderioration (2010) 64, 499-505.

Pitt J.I. Xerophilic fungi and the spoilage of foods of plant origin.Water Relations of Food. London: Academic Press (1975).

Pitt J.I., Hocking A.D. Fungi and food spoilage. Eds Springer (1997).

Pitt J.I., Hocking A.D. Influence of Solute and Hydrogen Ion Concentration on the Water Relations of some Xerophilic Fungi. Journal of General Microbiology (1977) 101, 35-40.

Poirier P., Hinzpeter A, Farrugia C., Botterel F., Fanen P., Bretagne S. Glucans induce higher IL-8 and TNF-alpha mRNA production in Cystis Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) deficient than in non-deficient respiratory epithelial cells. Trends in Medical Mycology (TIMM-4). Athènes, Grèce, 18-21 October (2009).

Portnoy J.M., Barnes C.S., Kennedy K. Sampling for indoor fungi. Current Reviews of Allergy and Clinical Immunology (2004)113, 189-198.

Press R.E. Observation on the foxing of paper. International Biodeterioration and Biodegradation (1976) 12, 27-30.

Press R.E. Observation on the foxing of paper. International Biodeterioration and Biodegradation (2001) 48, 94-97.

R

Rajasekar A., Balasubramanian R. Assessment of airborne bacteria and fungi in food courts. Building and Environment (2011) 46 2081-2087.

Rakotonirainy M.S., Heude E., Lavédrine B. Isolation and attempts of biomolecular characterization of fungal strains associated to foxing on a 19th century book. Journal of Cultural Heritage (2007) 8, 126-133.

Rakotonirainy M.S., Arnold S. Development of a new procedure based on the energy charge measurement using ATP bioluminescence assay for the detection of living mould from graphic documents. Luminescence (2008) 23, 182-186.

Rasic J.L., Skrinjar M., Markov S. Decrease of aflatoxin B1 in yogurt and acidified milks. Mycopathologia (1991) 113, 117-119.

Reboux G. Mycotoxins: health effects and relationship to other organic compounds. Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique (2006) 46, 208-212.

Reboux G., Bellanger AP., Roussel S., Grenouillet F., Sornin S., Piarroux R. Indoor moulds concentration in Eastern France. Indoor Air (2009) 19, 446-453.

Reboux G., Bellanger A.-P., Roussel S., Grenouillet F., L. Millon L. Moulds in dwellings: Health risks and involved species. Revue Française d'Allergologie (2010) 27, 169-179.

Roquebert M.-F. Moisissures contaminant les biens culturels. Collection Patrimoine. Heritage Series (2002).

Roquebert M.-F. Les moisissures, nature biologie et contamination (1997) http://www.culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/cours/roqueber.htm#Bibliographie.

Ross MA., Curtis L., Scheff PA., Hrhorczuk D.O., Ramakrishnan V., Wadden R.A., Persky V.W. Association of astham symptoms and severity with indoor bioaerosols. Allergy (2000) 55, 705-711.

Rundberget T., Skaar I., Flaøyen A. The presence of Penicillium and *Penicillium* mycotoxins in food wastes. International Journal of Food Microbiology (2004) 90, 181-188.

Rylander R, Norrhall M, Engdahl U, Tunsater A, Holt P.G. Airways inflammation, atopy, and 1-3-beta-D-glucan exposures in two schools. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine (1998)158, 1685-1687.

S

Saadoun D., Bieche I., Maisonobe T., Asselah T., Laurendeau I., Piette J.C., Vidaud M., Cacoub P. Involvement of chemokines and type 1 cytokines in the pathogenesis of hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia vasculitis neuropathy. Arthritis Rheum (2005) 52, 2917-2925.

Saijo Y., Kanazawa A.. Araki A., Morimoto K., Nakayama K., Takigawa T., Tanaka M., Shibata E., Yoshimura T., Chikara H., Kishi R. Relationships between mite allergen levels, mold concentrations, and sick building syndrome symptoms in newly built dwellings in Japan. Indoor Air (2011) 21, 253-263**.**

Salonen H. Lappalainen S, Lindroos O., Harju R., Reijula K. Fungi and bacteria in mould-damaged and non-damaged office environments in a subarctic climate. Atmospheric Environment (2007) 41, 6797-6807.

Santucci R., Meunier O., Ott M., Herrmann F., Freyd A., De Blay F. Fungic contamination of residence: 10 years assessment of analyses. Revue Française d'Allergologie (2007) 47, 402-408.

Sautour M., Sixt N., Dalle F., L'Ollivier C., Fourquenet V., Calinon C., Paul K., Valvin S., Maurel A., Aho S., Couillault G., Cachia C., Vagner O., Cuisenier B., Caillot D., Bonnin A. Profiles and seasonal distribution of airborne fungi in indoor and outdoor environments at a French hospital. Science of the Total Environment (2009) 407, 3766-3771.

Sidhu G.S. Mycotoxin genetics and gene clusters. European Journal of Plant Pathology (2002) 108, 705-711.

Simpson A.G.B., Roger A.J. Eukaryotic evolution: getting to the root of the problem. Current Biology (2002) 12, R691-R693.

Simpson A.G.B.; Roger A.J. The real 'kingdoms' of eukaryotes. Current Biology (2004) 14, R693-696.

Singhania R.R., Sukumaran R. K., Patel A.K., Larroche C., Pandey A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. Enzyme and Microbial Technology (2010) 46, 541-549.

Smit L.A. M. Bouzigon E ., Bousquet J., Le Moual N., Nadif R., Pin I. Lathrop M., Demenais F., Kauffmann F., Siroux V. Mold allergen sensitization in adult asthma according to integrin β3 polymorphisms and Toll-like receptor 2/1596 genotype. Journal of Allergy and Clinical immunology (2011) 128, 185-191.

Sommer N.F., Buchanan J.R., Fortlage R.J. Production of Patulin by *Penicillium expansum*. Applied Microbiology (1974) 28, 589-593.

Speijers G.J.A. and Speijers M.H.M. Combined toxic effects of mycotoxins. Toxicology

Springer J.P., Dorner J.W., Cole R.J., Cox R.H. Terrotonin a toxic compound from *Aspergillus terrus.* Journal or Organic Chemistry (1979) 44, 4852-4854.

Storvik M., Huuskonen P., Kyllönen T., Lehtonen S., El-Nezami H., Auriola S.' Pasanen M. Aflatoxin B1 – a potential endocrine disruptor – up-regulates CYP19A1 in JEG-3 cells. Toxicology letters (2011) 202, 161-167.

Strachan D.P., Flannigan B., McCabe E.M., Mc Garry F. Quantification of airborne moulds in the homes of children with and withour wheeze. Thorax (1990) 45, 383-387.

Swindle M. M, Smith A. C. Comparative anatomy and physiology of the pig. Scandinavian . Journal of. Laoratory. Animal Science. (1998) 25, 1–10.

T

Tabone M.D. Aspergillose pulmonaire invasive chez les enfants immunodéprimés : méthodes diagnostiques et classification. Archives de pediatrie (2003) 5, 582s-587s.

Tabuc C. Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de l'Institut Natinal de Polytechnique de Toulouse et de l'Université de Bucarest (2007).

Tai H.-Y., Tam M. F., Chou H., Peng H.-J., Su S.-N., Perng D.-W, Shen H.-D. Pen ch 13 allergen induces secretion of mediators and degradation of occludin protein of human lung epithelial cells. Allergy (2006) 61, 382–388.

Tammer B., Lehmann I., Nieber K., Altenburger R. Combined effects of mycotoxin mixtures on human T cell function. Toxicology Letters (2007) 170, 124-133.

Tanaka K., Sago Y., Zheng Y., Nakagawa H., Kushiro M. Mycotoxins in rice. International Journal of Food Microbiology (2007) 119, 59-66.

Tanaka T., Yoneda A., Inoue S., Sugiura Y., Ueno Y. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A (2000) 882, 23-28.

Tomee C. J. F., Wierenga A .T. J. Hiemstra P. S., Kauffman H. F., Proteases from *Aspergillus fumigatus* Induce Release of Proinflammatory Cytokines and Cell Detachment in Airway Epithelial Cell Lines. The Journal of Infectious Diseases (1997) 176, 300–303.

Tuomi T., Saarinen L., Reijula K. Detection of polar and macrocyclic trichothecene mycotoxins from indoor environments. The Analyst (1998) 123, 1835-1841.

Tuomi T., Reijula K., Johnsson T., Hemminki K., Hintikka E. L., Lindroos O., Kalso S., Koukila-Kahkola P., Mussalo-Rauhamaa H. and Haahtela T. Mycotoxins in crude building materials from water-damaged buildings, Applied Environmental Microbiolgy (2000) 66, 1899-1904.

V

Vakharia D., Liu N., Pause R., Fasco M., Bessette E., Zhang Q. Kaminsky L. Polycyclic aromoatic hydrocarbon/metal mixtures effect on PAH induction of CYP 1A1 in human HEP G2 cells. Drug metabolism and disposition (2001) 29, 999-1006.

Varga J, Kriswtina R., Téren J. Degradation of Ochratoxin A by *Aspergillus* species. International Journal of Food Microbiology (2000) 59, 1-7.

Vernus M. La fabuleuse histoire du papier. Eds cabédita (2004).

W

White T. J., Bruns T., Lee S. and Taylor, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic. PCR Protocols: a guide to methods and applications. eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press,

Inc., New York. Eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York (1990) 315-322.

Wilson D.M., King J.K. Production of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in pure and mixed cultures of *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. Food Additives and Contaminants (1995) 12, 521-525.

Woese C., Kandler O., Wheelis M.L. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya Proceedings of the National Academy of Sciences (1990) 87, 4576-4579.

Y

Yabe K., Ando Y., Hamasakti T. Biosynthesis relationship among aflatoxins B1, B2, G1, and G2. Applied and Environmental Microbiology (1988) 54, 2101-2106.

Yabe K., Ando Y., Hamasaki T. A metabolic grid among versiconal hemiacetal acetate, versiconol acetate, versiconol and versiconal during aflatoxin biosynthesis. Journal of General Microbiology (1991) 137, 2469-2475.

Yu J., Bhatnagar D., Cleveland T.E. Completed sequence of aflatoxin pathway gene cluster in *Aspergillus parasiticus*. FEBS Letters. (2004) 564, 126-130.

Yuan Y., Zhuang H., Zhang T., Liu J. Patulin content in apple products marketed in Northeast China. Food Control (2010) 21, 1488-1491.

Z

Zhang Z., Liu R., Noordhoek J. A., Kauffman, H. F. Interaction of airway epithelial cells (A549) with spores and mycelium of *Aspergillus fumigatus*. Journal of Infection (2005) 51, 375-382.

Zardetto S. Effect of modified atmosphere packaging at abuse temperature on the growth of Penicillium aurantiogriseum isolated from fresh filled pasta. Food Microbiology (2005) 22, 367-371.

Zotti M., Ferroni A., and Calvini P. Mycological and FTIR analysis of biotic foxing on paper substrates. International Biodeterioration and Biodegradation (2011) XXX, 1-10.

ANNEXES

Annexe I) Protocole de PCR pour l'amplification des ADN issus des isolats obtenus après mise en culture du foxing

Amorces ITS1-ITS4 : Quantités de réactifs nécessaires à l'amplification de l'ADN par les amorces ITS1-ITS4 (à gauche) et programme d'amplification (à droite).

Réactifs	Volume par tube à amplifier en µL
Eau	31,75
Tampon Fast Taq 10X	5
$MgCl_2$ à 25 mM	4
dNTP à 2mM	5
Amorce ITS1 à 10 µM	1
Amorce ITS4 à 10 µM	1
Taq polymérase 5 UI/µL	0,25
Volume du prémélange	48

Phases d'amplification	Temps et température
Dénaturation	8 minutes à 95°C 30 minutes à 95°C
Hybridation	30 minutes à 55°C
Elongation	1heure à 72°C 5 minutes à 72°C

Amorces βt2a- βt2b **:** Quantités de réactifs nécessaires à l'amplification de l'ADN par les amorces βt2a- βt2b (à gauche) et programme d'amplification (à droite).

Réactifs	Volume par tube à amplifier en µL
Eau	29,75
Tampon Fast Taq 10X	5
$MgCl_2$ à 25 mM	6
dNTP à 2mM	5
Amorce βt2a à 10 µM	1
Amorce βt2b à 10 µM	1
Taq polymérase 5 UI/µL	0,25
Volume du prémélange	48

Phases d'amplification	Temps et température
Dénaturation	7 minutes à 95°C 30 minutes à 95°C
Hybridation	30 minutes à 61°C
Elongation	1 heure à 72°C 10 minutes à 72°C

Annexe II) Séquences des amorces utilisées par l'identification des espèces fongiques des papiers peints

- *Aspergillus versicolor*

Amorce sens AversF2 5'-CGGCGGGGAGCCCT

Amorce antisens AversR1 5'-CCATTGTTGAAAGTTTTGACTGATCTTA

Sonde versP1 5'-AGACTGCATCACTCTCAGGCATGAAGTTCAG

- *Cladosporium sphaerospermum*

Amorce sens CsphaF1 5'-ACCGGCTGGGTCTTTCG

Amorce antisens CsphaR1 5'-GGGGTTGTTTTACGGCGTG

Sonde CsphaP1 5'-CCCGCGGCACCCTTTAGCGA

- *Penicillium chrysogenum*

Amorce sens PchryF4-1 5'-GCCTGTCCGAGCGTCACTT

Amorce antisens PchryR8 5'-CCCCCGGGATCGGAG

Sonde PenP6 5'-CCAACACACAAGCCGTGCTTGAGG

- *Stachybotrys chartarum*

Amorce sens StacF4 5'-TCCCAAACCCTTATGTGAACC

Amorce antisens StacR5 5'-GTTTGCCACTCAGAGAATACTGAAA

Sonde StacP2 5'-CTGCGCCCGGATCCAGGC

- *Geotrichum candidum*

Amorce sens NS92F 5'-CACCGCCCGTCGCTAC

Amorce antisensGcandR1 5'-AGAAAAGTTGCCCTCTCCAGTT

Sonde GeoP2 5'-TCAATCCGGAAGCCTCACTAAGCCATT

Annexe III) Protocole de l'Extraction sur Phase Solide (SPE) d'extraits de foxing

- Ajout de 4 volumes d'eau par rapport au volume total de l'échantillon
- Conditionnement de la cartouche avec 1 mL ACN+ 3 mL eau
- Percolation avec 1 mL d'échantillon
- Lavage avec 2 mL eau/ACN 90/10 (v/v)
- Elution avec 1 mL eau/ACN 50/50 (v/v) + 1,5 mL ACN pur
- Evaporation sous vide
- Reprise dans 100 µL eau/ACN 50/50 (v/v)= > analyse LC- UV

Annexe IV) Milieux de culture, réactifs, matériel

	Produit	Fabricant
Culture cellulaire	Dulbecco's Modified Eagle's nutrient Mixture (DMEM)	Invitrogen
	Dulbecco's Modified Eagle's nutrient Mixture/F-12 (DMEM/F12)	
	Sérum de veau fœtal	
	Pénicilline/Streptomycine;Pyruvate sodique 100X ; Trypsine EDTA 1X	
	Gentamicine 10 mg/ml	Sigma Aldrich
	Flasques 25 cm², Plaques 96 puits (TPP, Trasadingen, Suisse)	Falcon
	Eau distillée	Gibco
	Acrylamide	Gibco
	TrisBorate EDTA Buffer TBE 10X	Euromedex
	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin TEMED	Euromedex
	Persulfate d'ammonium APS	Euromedex
PCR mycoplasmes	Mycoplasma PCR detection kit VenorGem	Minerva Biolabs
	Precision molecular mass standard	Biorad
	Gel loading solution	Sigma Aldrich
Réactifs divers	Dyméthyl sulfoxyde DMSO	Prolabo
	Dulbecco s Phosphate Buffered Saline DPBS	Invitrogen

	A549
Composition du milieu de culture	Dulbecco's Modified Eagle's nutrient Mixture (DMEM) 500ml Sérum de veau fœtal 10 % Gentamicine 0,5 %
Entretien (toutes les 48h)	5ml de milieu par flasque de 25cm² 1ml de milieu par puits
Repiquage	5 ml de trypsine EDTA par flasque de 25 cm² pendant 10 minutes à 37°C Neutralisation par 5 ml de SVF Centrifugation 7 minutes à 1500tr/min Reprise du culot par 5ml de milieu
	Comptage des cellules en cellule de Malassez, évaluation de la mortalité par coloration au bleu trypan 10 %
Ensemencement des flasques	2.10^4 cellules/cm²
Ensemencement des puits	2.10^4 cellules/cm²

Annexe V) Protocole de PCR mycoplasme

➢ 100 µL de surnageant de culture cellulaire sont prélevés et incubés à 95°C pendant 5 minutes, puis centrifugés 5 secondes.

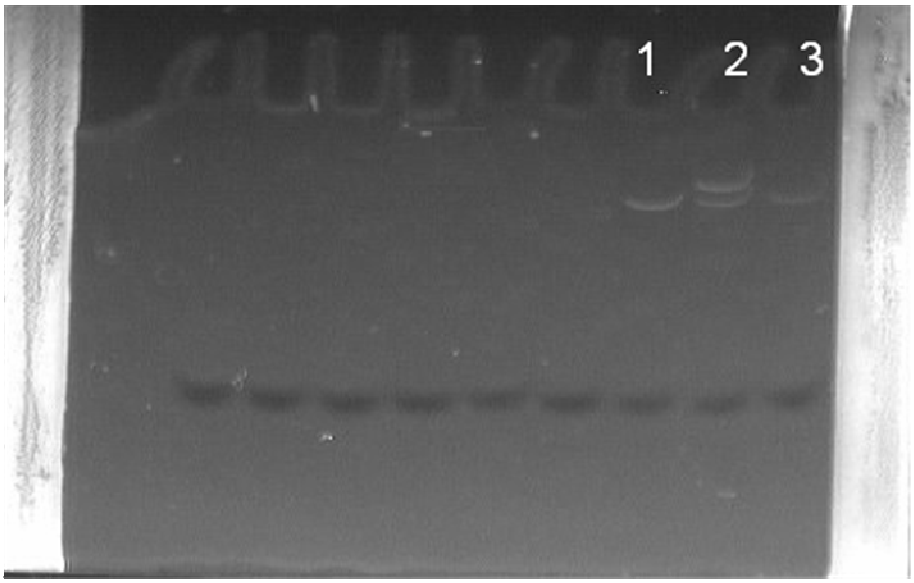
➢ 2 µL du surnageant est ajouté au mix de PCR

➢ 5 µL de chaque produit de PCR chargé par 2 µL de bleu de bromophénol sont déposés sur gel de polyacrylamide standard à 8 % en parallèle d'un marqueur de poids moléculaire.

➢ Un témoin négatif et un témoin positif sont intégrés à chaque série de cellules à tester.

➢ La migration se fait dans une cuve Mini PROTEAN 3 cell_Biorad® avec générateur MODEL 200/2.0_Biorad® (30 minutes à 180 volts). Après migration la révélation du gel est faite par incubation dans du BET 10% pendant 10 minutes. Une photo est prise et archivée.

Préparation du mix de PCR			**Programme d'amplification**	
Réactifs	**Volume par échantillon (µL)**		**Température (°C)**	**Temps**
Eau	12,3		94	5 minutes
Tampon Taq	2,5		94	30 secondes
MgCl2	3		55	30 secondes
Primers	2,5		72	30 secondes
Contrôle interne	2,5		72	1 minute
Taq Fast Start	0,2		4	∝
Echantillon	2		35 cycles	



Résultat d’une PCR mycoplasme

1 : Témoin négatif

2 : Témoin positif

3 : Surnageant de culture A549

Annexe VI) Quantités de réactifis pour l'extraction des ARN issus de cellules exposées aux extraits de papiers peints et programme de reverse transcription

Réactifs	Concentration finale	Volume/ échantillon (µL)
Tampon 5X	1X	4
DTT 0,1µM	0,01 µM	2
dNTP 5 mM each	0,5 mM	2
Random hexamers 0,5µg/µl	0,15 µg/µL	6
RNAsin 40U/µl	1 U/µL	0,5
H_2O qsp 16µl	/	1
Reverse transcriptase 200 U/µl	5 U/µL	0,5
Extrait d'ARN	/	4

Température (°C)	Temps	Nombre de cycles
25	10 min	1
42	30 min	1
99	5 min	1
4	∝	1

Annexe VII) Quantités des réactifs, programme de qPCR séquences des amorces utilisées pour les papiers peints

Réactifs	Concentration finale	Volume/ puits (µL)	Tempé-rature (°C)	Temps	Nom-bre de cycles	Acquisition du signal de fluorescence
LC480 SYBRGreen I Master2X ($MgCl_2$=10 mM)	0,6X ($MgCl_2$=3mM)	6	95	8 min	1	/
Upper Primer 50 µM	0,2 µM	0,08	95	10 s	50	/
Lower Primer 50 µM	0,2 µM	0,08	60	10 s		/
H_2O qsp 12 µL	/	5,84	72	15 s		1
Volume d'ADNc des échantillons dilués au 1/20ème	/	8	95	8 min	1	/

Séquences des amorces pour l'amplification des ADNc de l'IL-8, TNF-α et du GM-CSF

	Amorce sens	Amorce antisens	Référence
TBP	TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA	CACATCACAGCTCCCCACCA	Saadoun *et al.* 2005
IL-8	CACCGGAAGGAACCATCTCACTGT	TCCTTGGCAAAACTGCACCTTCA	
TNF-α	GCCCAGGCAGTCAGATCATCTT	CCTCAGCTTGAGGGTTTGCTACA	
GM-CSF	GACACACTGCTGCTGAGATGAATG	CAGGTCGGCTCCTGGAGGT	

ARTICLE

Sarah Boudih, Malalanirina Sylvia Rakotonirainy, Anaïs Roussel, Odile Cabaret, Olivier Puel, Gabriel Reboux, Françoise Botterel, Marcel Delaforge and Stéphane Bretagne

Biotic foxing from a nineteenth century book studied using ATP bioluminescence, culture, and HPLC-UV-MS: evaluation of mycotoxins as biomarkers for fungal presence

Soumis à Analytical and Bioanalytical Chemistry

Biotic foxing from a nineteenth century book studied using ATP bioluminescence, culture, and HPLC-UV-MS: evaluation of mycotoxins as biomarkers for fungal presence

Sarah Boudih[a,b,c], Malalanirina Sylvia Rakotonirainy[b]*, Anaïs Roussel[c], Odile Cabaret[a,d], Olivier Puel[e], Gabriel Reboux[f], Françoise Botterel[a,d], Marcel Delaforge[c] and Stéphane Bretagne[a,d]

[a]UMR BIPAR, UPEC, UPVM, ENVA, AFSSA, Créteil, France.

[b]Centre de Recherches sur la Conservation des Collections, USR 3224 CNRS/USM701 MNHN/MCC Paris, France

[c]CEA Saclay, DSV/iBiTec-S/SB2SM, CNRS URA2096, Gif sur Yvette, France

[d]Groupe hospitalier Chenevier-Mondor (AP-HP), Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Créteil, France

[e]TOXALIM INRA/INP/UPS Toulouse, France

[f]UMR 6249 CNRS Laboratoire de Chrono-Environnement, Centre universitaire de Franche-Comté, Besançon, France

* Corresponding author: Centre de Recherches sur la Conservation des Collections (CRCC) 36 rue Geoffroy Saint-Hilaire CP 21 75005 PARIS

Phone number: +331 40 79 53 00; Fax number: +331 40 79 53 12

e-mail: rakotoni@mnhn.fr

Abstract

Irreversible damages on paper caused by small yellowish brown stains known as foxing pose a problem for their conservation. Identification of biotic agents involved in foxing can lead to measures to prevent the loss of documents. We present different analytical approaches to characterize foxing from a nineteenth century book. The color of spots was first quantitatively characterized by L*a*b*CIE color space using spectrocolorimetry. Scanning Electron Microscopy-Energy dispersive X-ray detection spectra showed the presence of fungal spores and the absence of metal in the foxed areas. ATP bioluminescence assay showed a 4-times higher value of relative light units in the foxed areas, also suggestive of the presence of viable microorganisms. The culture on several non-specific media led to the growth of several mould species only in foxed areas (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium crustosum*, and *Penicillium chrysogenum*) with no bacteria. Although the isolated fungi are known to produce mycotoxins, the search for these secondary metabolites was negative using HPLC-UV-MS in contrast with the same paper artificially seeded with *A. fumigatus*. Although several methods assessed the presence of living mould in foxed areas, mycotoxins cannot be used as biomarkers unless more sensitive techniques are available.

Keys words: Foxing, fungi, ATP bioluminescence assay, L*a*b CIE color space, SEM-EDS, HPLC-UV-MS

Introduction

The reddish or yellowish brown stains known as foxing that affect paper can spread from page to page in books and lead to irreversible damage. Over time, this may obstruct the legibility of the document. These chromatic alterations therefore pose a serious problem for the conservation of documents and works on paper. Although scientific studies of this phenomenon began in the 1930's, [1] the exact mechanism of its formation is still unknown. Foxing spots alter essentially cellulose-based materials such as books, paintings or stamps [2-4]. To prevent their loss, it is important to know all the factors involved in the phenomenon and their different contributions. Characterization of these spots is a necessary prerequisite for understanding the phenomenon.

Both abiotic and biotic agents have been involved in foxing formation. Some abiotic agents such as metals or oxide groups have been shown by spectroscopic [1-5]. Biotic agents such as bacteria [6] and mainly fungi [7-13] have been found in foxed spots. Using light microscopy and Scanning Electron Microscopy (SEM), it is possible to observe fungal spores and hyphae in stained areas [14, 15]. The viability of the fungal structures observed in foxed spots remains a subject of discussion [15] as cultivation is not always successful [16]. Culture on conventional media (PDA, Czapek agar, malt agar, MEA) have yielded common airborne fungi such as *Aspergillus* and *Penicillium* species [7, 13, 17]. In addition to culture-based assays, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. and other mould species have been identified by PCR and sequencing of rRNA coding [16]. However, biases are possible in these molecular approaches arising from the use of so-called universal primers [18]. Recently the presence of amide functions displayed by FTIR-ATR spectroscopy supported the biotic origin of foxing but this detection is not specific to a given fungal species [13].

In the present work, we focused first on characterization of the studied book using spectrocolorimetry and the L*a*b* color space to avoid any subjective description of the studied spots. Second, we investigated the presence of metallic elements using Scanning Electron Microscopy-Energy Dispersive X-ray (SEM-EDS) analysis. Third, we used an ATP bioluminescence assay to detect the presence of viable microorganisms in foxing. Fourth, we seeded different culture media which are not specific for fungi. Finally, we searched for mycotoxins using HPLC-UV-MS. The association between several mycotoxins is very suggestive of the species involved since each fungal species has a specific spectrum of mycotoxin production [19-23]. Furthermore, as mycotoxins are considered stable [23, 24], it could be a means of reconstructing the historical fungal contamination of the document even if the fungi are no longer viable or no longer exist on the paper.

Materiel and Methods

The analyzed samples

This study was performed on a book entitled ‘‘Philosophie der Griechen, eine Untersuchung’’, by Dr Eduard Zeller, printed in Germany and published in 1852 (Fig. 1). Some pages showed several irregular brownish foxed spots occurring randomly on the text areas and their edges, associated with a discoloration of the leaf margins. Foxing of the facing pages was observed occasionally. Fiber analysis showed that the paper was made of linen and hemp. The book has been stored since 1995 in the dark at a relative humidity of 40% and in temperatures ranging from 20 to 32 °C. Storage conditions prior to its arrival in the laboratory were unknown. The pH was measured three times and was 6.3 ± 0.6 according to standard

TAPPI T509 om-02. This book has no heritage value and is considered as usable for destructive analysis.

Fig. 1: Front page of the analyzed book used for this study

L*a*b color of foxing

A portable spectrocolorimeter (X-Rite SP64, Massy, France) was used to evaluate the L*a*b* values. The L*a*b* model is a three dimensional model in which a vertical axis (L*) represents the lightness of the color (L* = 0 yields black and L* = 100 indicates diffuse white). The two other axes, a* and b* represent the color. They are orthogonal to the L* axis. Values of a* and b* range from -120 to +120: the a* negative values indicate green color, while positive values indicate red color. The b* negative values indicate blue color and positive values indicate yellow color. Measurements were performed on six foxed and six non-foxed spots from different pages of the studied book. Error on measurements is 2 %.

SEM-EDS analysis

Six foxed spots and six non-foxed spots were carbon-coated and analyzed with a JEOL JMS 5410 LV equipped with an X-ray analyzing system detector (Oxford instruments, Oxford, UK), used to create SEM-EDS spectra (the acquisition was run with the Link Isis software), and a secondary electron detector (Oxford Link Pentafet) to create an image of the samples (the acquisition was run with Semaphore software). The energy beam was 20 keV and the working distance was 20 mm. The limit of the equipment used to detect a metal such as iron is 8 mg of Fe SO_4 per cm^2 of Whatman paper.

ATP bioluminescence assay

Five 0.28 cm^2 pieces (i.e. a total of 1.4 cm^2) were cut from the book, in aseptic conditions with a sterile 0.6 cm diameter card punch (Esselte,Paris, France) and placed in a 2 mL Eppendorf tube containing 500 µL of sterile buffer, distilled water mixed with 0.05% of Tween 80 (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France). The pieces of paper were crushed for one minute in a Retsch crusher machine MM 200 (Retsch, Eragny sur Oise, France) by using 4 beads of glass at 1500 rotations per minute in order to release the fungal elements from the paper fibers. The suspension obtained was used directly for ATP extraction with boiling dimethylsulfoxide (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) as previously reported [25]. ATP is recognized as a substrate by the luciferin/luciferase (Biothema, Haninge, Sweden) complex and leads to a product at an excited state with emission of photons [25]. The 20 s. light emission of the reaction was measured with a Turner Designs' TD20/20 luminometer which has an accuracy of measurement of +/- 5%. The results were

expressed in relative light units (RLU) that corresponded to the ATP present in the samples. These were recorded as means of three independent measurements.

The same procedure was applied to an unfoxed paper sample artificially contaminated. After sterilization, the paper sample was placed in a Petri dish, seeded with 250 µL of a 6.10^5 spore suspension per mL of *Aspergillus fumigatus* (NRRL 35693), and incubated with high humidity at 26 °C for 1 month. The conidia used for seeding had been harvested from a 7-day-old pure culture on potato dextrose agar (PDA) medium grown at 25 °C.

Microbiological culture

Paper samples (0.28 cm^2 each) were cut from the book as described above. Three pieces of foxed and non-foxed papers were placed on different liquid or solid culture media. These included brain heart infusion (BHI) with chloramphenicol (Becton and Dickinson, Le Pont-De-Claix, France), R8 medium with the same composition described by Amner et al. [26], malt agar, and actinomycetes isolation agar medium (Becton et Dickinson, Le Pont-De-Claix, France). Tubes and plates were incubated for 7 days at 26 °C.

When culture was positive, the isolates were identified upon their phenotypic and genotypic features. For molecular identification, PCR amplification of fungal DNA was performed using universal primers targeting the ribosomal internal transcribed spacer region ITS-1 and ITS-2 [27], and the ß-tubulin gene region [28]. DNA extraction was performed using the ATL Tissue Lysis Buffer kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and the automatic MagNA Lyser Pure Compact System (Roche Diagnostics, Meylan, France) following the manufacturer's instructions. The primer pair ITS1 (5´-TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG-3´) and ITS4 (5´-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3´) was used for amplification of DNA

extracted from all the isolates obtained. The primer pair ß-t2a (5'-GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC-3') and ß-t2b (5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3') was used in addition to the ITS primer pair for Penicillium species identified from the isolates. All thermal cycling experiments were performed on a GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). The PCR amplicons were assessed in 2% agarose gels containing ethidium bromide, and were visualized under UV light. The amplified fragments were sequenced using the same primers as those used in the initial amplification.

Sequencing analysis of PCR products (2 µL per reaction) were performed in a capillary automatic sequencer (ABI Prism 3130xl Genetic Analyser, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions. The resulting sequences were used in similarity searches against GenBank entries that were available at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) website, using the BLASTN (Blast nucleotide) pair-wise search program (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Only sequence similarities of 99-100% were recorded.

HPLC-UV-MS and HPLC-UV-fluorescence

Forty paper samples of 0.28 cm^2 each (i.e. 11.3 cm^2) obtained as above were dissolved in 1 mL of water, acetonitrile (ACN, Carlo Erba, Val de Reuil, France) and methanol (MeOH, Carlo Erba, Val de Reuil, france) (40/30/30, v/v/v) using a Retsch crusher machine MM 200 as above. Supernatants were then passed through a 0.45 µm PVDF (Polyvinilidene fluoride) filter membrane and concentrated on a solid phase C18 column (SPE, Varian, Agilent Technologies, Massy, France) using a 100 mg phase cartridge which had been conditioned with 1 mL of ACN and 3 mL of water before use. The cartridge was washed with 2 mL

water/ACN (90/10, v/v) to eliminate impurities. Elution was performed by using 1 mL of water/ACN (50/50, v/v) and 1.5 mL of ACN. The collected analytes were dried under vacuum and then dissolved in 100 µL of water/ACN (50/50, v/v) before analysis by HPLC-UV-MS.

The present work was carried out on a gradient HPLC–mass spectrometer equipped with double reciprocating plunger pumps for constant flow delivery and a multiwavelength detector (Shimadzu SPD-M 10 Avp UV). Separation was achieved using a reverse phase Kromasil C18 column, 150 x 2.1 mm (Interchim, Montluçon, France), while a mixture of water/ACN (90/10, v/v) and 10 mM of ammonium acetate was used as the mobile phase A at a flow rate of 0.2 mL/min, with room temperature and water/ACN (10/90, v/v) used as in phase B. The elution gradient-based method consisted in raising the percentage of phase B from 2 to 80 % in 25 min.

Electrospray ionization was performed at 4.5 kV and the dry temperature was set to 310°C using a gas flow of 40 ml/min and an auxiliary gas flow of 10 ml/min. The collision energy was 0.70 V. For increased sensitivity, mycotoxins were also monitored by fluorescence detection (Waters 474) with lambdaexcitation = 278 nm and lambdaemission = 460 nm.

Statistical analysis

Numerical results were expressed with a standard deviation. Kruskal-Walis and a Mann-Whitney tests were used for non parametric data to compare the results between foxed and non-foxed areas. Statistical significance was defined for $p<0.01$. Results

Results

L*a*b color of foxing

The L*, a*, and b* values were respectively 85.4 ± 2.3, 2.2 ± 1.2, and 14.4 ± 2.5 for the 6 foxed spots, and 90.1 ± 0.4, 0.0 ± 0.1, and 8.1 ± 0.8 for the 6 non-foxed regions of paper. The luminosity (L*) of non-foxed spots was 1.05 higher ($p<0.001$) than that of foxed spots. The a* values of foxed spots were weakly positive (red part of the green-red axis), whereas for non-foxed spots the a* values were close to 0 ($p<0.001$). The b* values were 1.78 higher in foxed spots than in non-foxed regions of paper evidencing a shift to yellow of the foxed areas ($p<0.001$).

SEM-EDS analysis of foxing

Observations under optical microscope showed spores in foxed areas (Fig. 2).

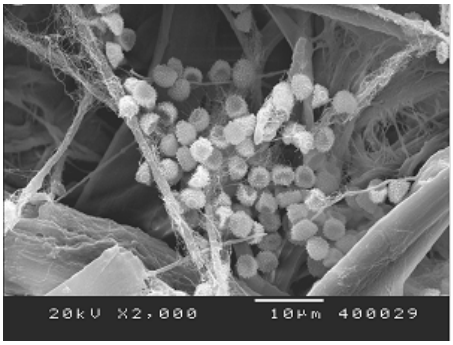


Fig. 2: Fungal spores observed by SEM- EDS in foxing

SEM-EDS spectra portrayed a higher presence of sulfur in the 6 foxed over the 6 non-foxed spots (Fig. 3), but no metal was detected in the studied book paper.

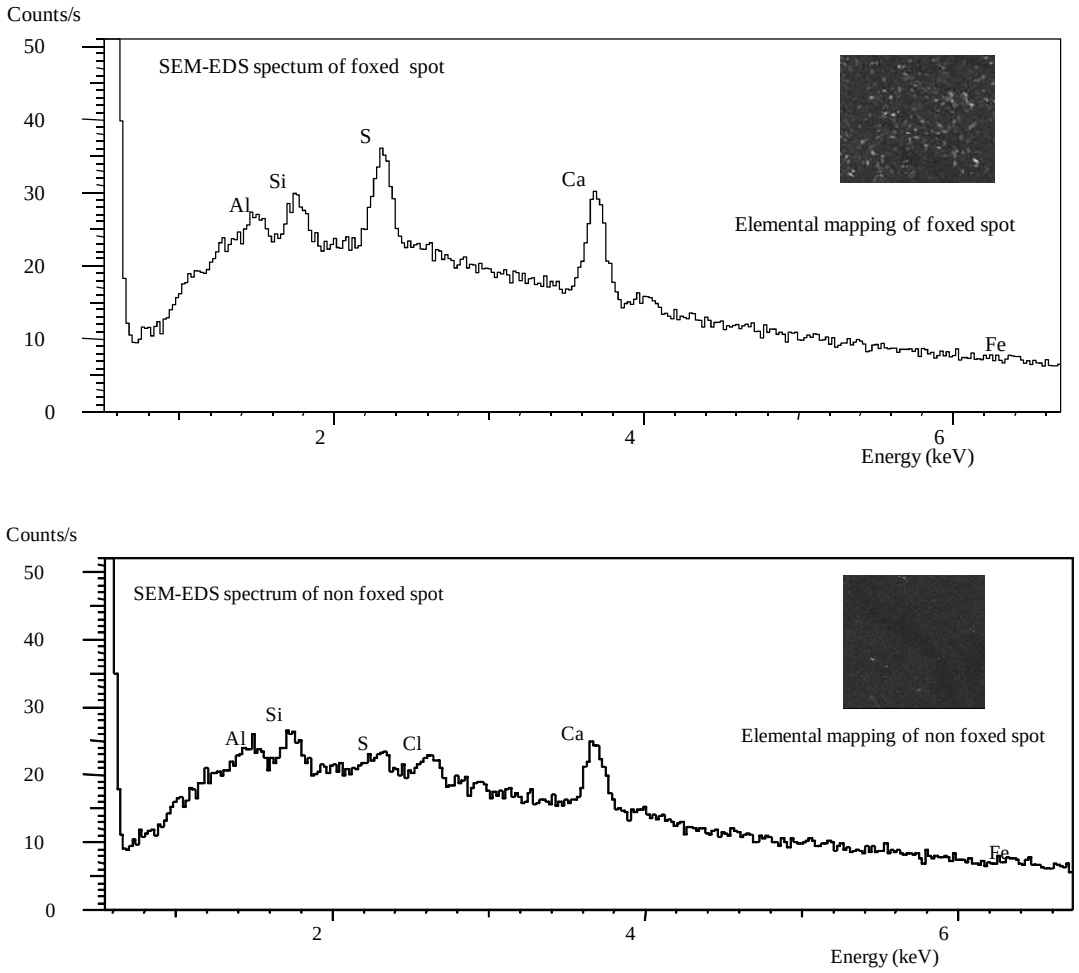


Fig. 3: SEM-EDS spectra of foxed and non foxed spots. Elemental mappings in the inserts

ATP bioluminescence assay of foxed and non-foxed spots

Based on three independent experiments, the RLU values of foxed spots (0.177 ± 0.06) were 4.6 higher ($p < 0.001$) than those of non-foxed regions (0.038 ± 0.017) of paper whereas the value for the buffer was 0.03 ± 0.017. The RLU value obtained with paper dating from the nineteenth century artificially contaminated with *Aspergillus fumigatus* was 73.4 higher ($p < 0.001$) than foxed areas (13.773 ± 1.160).

Microbiological culture

Three, one, and one mould isolates were cultured on BHI medium, R8 and malt agar, respectively. After microscopic examination, ITS and beta-tubulin sequencing definitively

identified these isolates as *Penicillium crustosum*, *Aspergillus fumigatus*, and *Aspergillus niger* on BHI medium, *Penicillium chrysogenum* on R8, and *Aspergillus fumigatus* on malt agar media. No isolates were obtained from non-foxed paper samples. No bacterial, yeast or actinomycete growth was observed.

HPLC-UV-MS and HPLC-UV-fluorescence

The UV chromatograms of foxed and non-foxed areas after HPLC-UV-MS showed no detectable peak related to mycotoxin or fungi secondary metabolites. Analysis of mass total ion current by range of 50 atomic mass units from *m/z* 300 to *m/z* 800 and fluorescence detection, did not reveal any peak related to secondary metabolites.

For the paper from the same studied book dating from 1852 and artificially seeded with the *Aspergillus fumigatus* strain (NRRL 35693), two peaks were found, one at retention time 7.5 min with a *m/z* of 651, and a second one at 18 min with a *m/z* of 445 (Fig. 4.) which was unidentified. Known mycotoxins were investigated by their specific ion mass in positive or negative ionization modes (Fig. 5). Typtoquivaline J (*m/z* = 401, Retention time (Rt) 10.5 min) and Fumigaclavine A (*m/z* = 299 Rt = 11 min) were respectively detected in negative and positive modes. Three peaks were observed at *m/z* 442 in negative mode and the one at 13 min had the same Rt as fumiquinazoline C. Helvolic acid (*m/z* = 567) was also detected at Rt 14.9 min in negative mode. Compounds found for the paper artificially seeded with *Aspergillus fumigatus* were sought on foxed spots but no peaks relating to them were found.

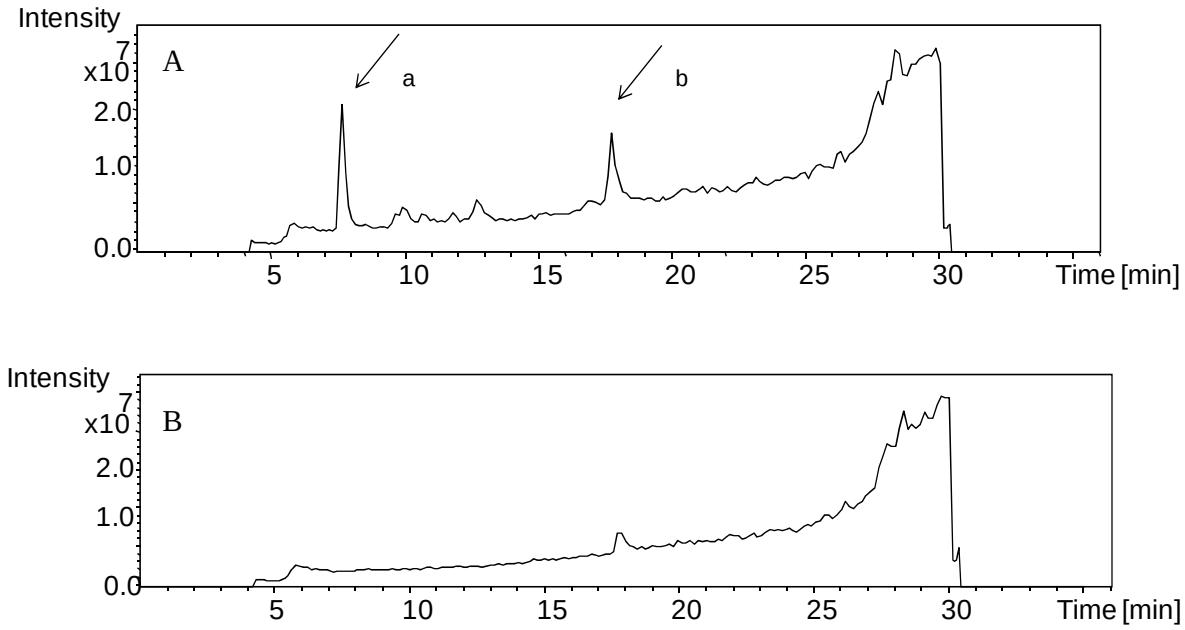


Fig. 4: Chromatogram of the Total Ion Current in mass spectrometry in negative mode of a paper seeded with *Aspergillus fumigatus* (A) and the control paper (B). First arrow(a): signal Molecular ion 651, Second arrow(b): signal Molecular ion 445

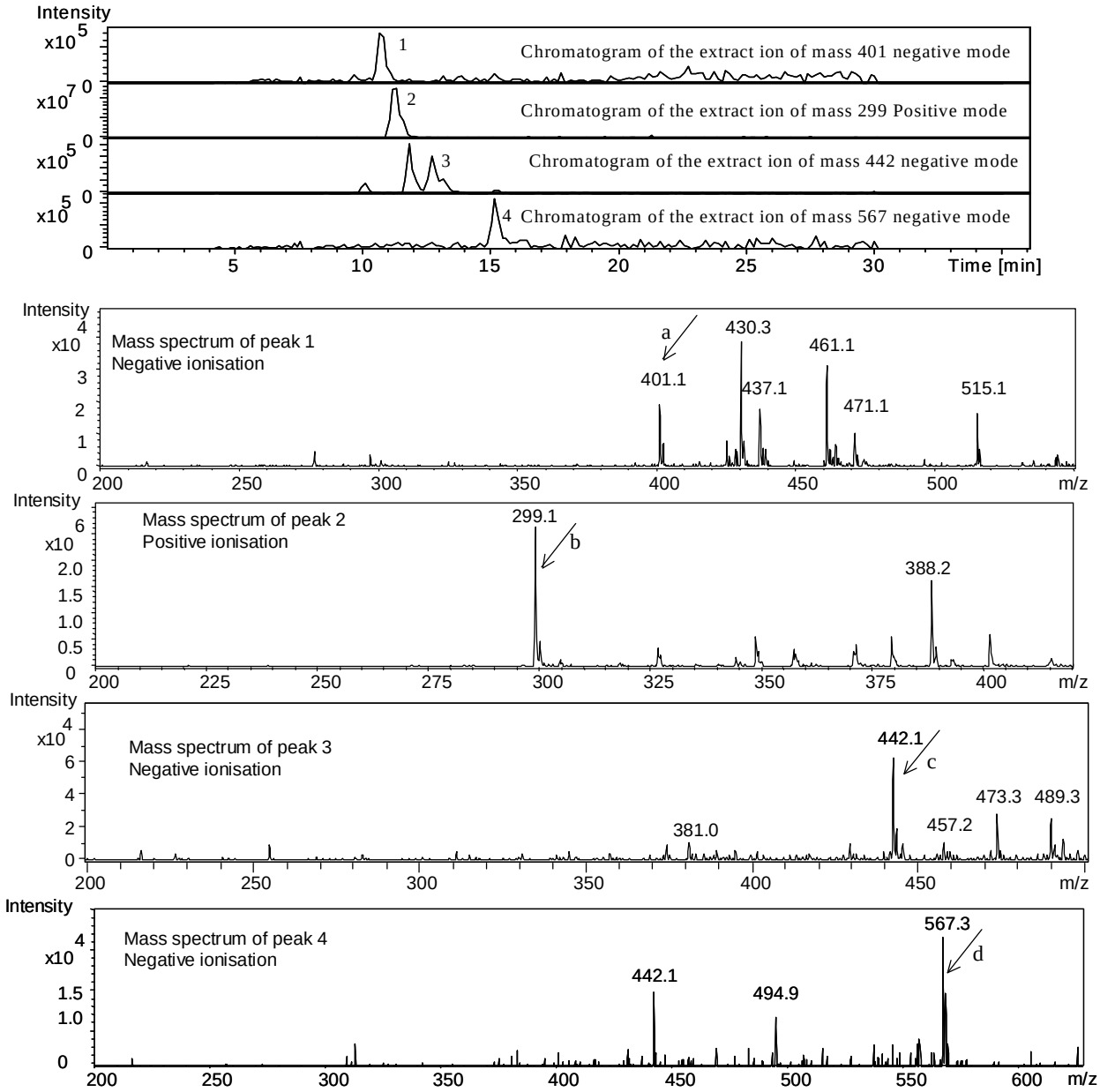


Fig. 5: Chromatogram and mass spectra of the 19th century paper seeded with *Aspergillus fumigatus*. Specific ion mass extraction of known mycotoxins such as tryptoquivaline J (*m/z* = 401 arrow a) in negative mode and fumigaclavine A (*m/z* = 299 arrow b) in positive mode, respectively at retention times 10.4 and 11.7 min. Extract ion in mass of fumiquinazoline C

(*m/z* = 442 arrow c) and helvolic acid (*m/z* = 567 arrow d) were detected in negative mode respectively at retention times 13 and 14.9 min.

Discussion

The purpose of this study was to characterize the micro-organisms in foxing by means of analytical and bioanalytical methods. First steps of this study consisted in using spectrocolorimetry and SEM-EDS to characterize respectively the color of foxing and their elemental composition.

Until recently characterization of foxed spots has relied on visual observation.[15, 29-31] As such, there is no unified approach to the analysis of foxed regions of paper. According to Florian [15] old fungal spots are rusty red, while contemporary fungal spots are black, gray, and green. Cain and Miller's classification [29,30]' distinguishes between four types of foxed spots, among them, snowflakes are red/brown to yellow spots with irregular shapes. Press established a subjective scale of foxing from 0, which represents no foxing, to 10, which represents maximum of foxing [31]. This spectrocolorimetry has previously been used for foxing spots artificially induced by metals [32]. We hereby propose a non-subjective observation through a numerical method using the L*a*b* color space never before described for natural foxing. This is an important step to standardize the definition of the foxing and to be able to discuss on common bases.

Comparison of SEM-EDS spectra of foxed and non-foxed spots showed clear of calcium and sulfur in foxed and non-foxed spots. No metal was detected in the studied book paper, specifically copper or iron, both of which have been described in previous studies, [14, 30, 31] showing that the studied spots are not due to metal oxidation. Elemental mapping

portrayed a higher presence of sulfur in foxing. This might come from an uneven repartition of alum (aluminium sulfate) used as glue in the nineteenth century.

The second steps of the current work consisted in characterizing micro-organisms in foxing using ATP bioluminescence assay, culture, and HPLC-UV-MS. Although the RLU values of foxed areas were greater by a factor 4.5 to unfoxed regions of paper upon ATP bioluminescence analysis, these values remain low when comparing with paper artificially seeded. Nevertheless, these low values in foxed areas probably explained the few mould isolates we were able to grow. The four species identified (*P. crustosum*, *P. chrysogenum*, *A. fumigatus* and *A. niger*) have been reported in previous studies as associated with foxing.[7,8,16] Due to the low number of isolates recovered, we cannot comment on the respective interest of the different culture media tested. The species identified are common airborne fungi and might arise from recent contamination of the book.

As the species identified above are known to produce mycotoxins under conventional laboratory conditions, [21, 22, 33], we searched for them using HPLC-UV, fluorescence and mass spectrometry techniques. No detectable peak related to mycotoxin or fungi secondary metabolites was detected. Since analysis from the same studied book dating from 1852 artificially seeded with the *A. fumigatus* strain showed the absence of mycotoxins, the absence of peaks in the foxed areas is not due to the paper matrix. The absence of mycotoxin might be explained by the10^{-7}M detection limit of the present HPLC-fluorescence.

Conclusion

The originality of this work relies on the use of analytical and bioanalytical methods, never before tested for studying natural foxing, such as L*a*b*CIE and ATP bioluminescence. We then tried to detect the diverse types of fungi that may have colonized foxed regions of this book through the detection of fungal-specific compounds. Here, the main focus was on secondary metabolites and especially mycotoxins using analytical tools such as HPLC-UV-MS. No secondary metabolites were detected with the present analytical methods in the foxed regions either for fungi in general or the species cultured from the foxed spots in particular. On the other hand, the quantity of mycotoxins, if any, may be sufficiently low to not present any biohazard for individuals manipulating foxed manuscripts.

Acknowledgments

Financial support: This work was supported in part by Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail grants (EST-2007-73 EST-2008-27) and PNRCC (Programme national de recherche sur la connaissance et la conservation des matériaux du patrimoine culturel) 2008 from the Ministère de la Culture et de la communication. We thank Danièle Rivollet for technical assistance.

Conflict of interest statement: none declared

References

1. Manso M, Pessanha S, Figueira F, Valadas S, Guilherme A, Afonso M, Rocha AC,

Oliveira MJ, Ribeiro I, Carvalho ML (2009) Characterisation of foxing stains in eighteenth to nineteenth century drawings using non-destructive techniques. Anal Bioanal Chem 395:2029 - 2036

2. Choi S. (2007) Foxing on paper: a litterature review. J Am Inst Conserv. 46: 37-152

3. Nyuksha PY (1994) Biodeterioration of paper and books. The library of the Russian Academy of Sciences, St Petersburg

4. Zyska B (1997) Fungi isolated from library materials: a review of the literrature. Int Biodeter and Biodegrad 40: 43-51

5. Palleschi V, Salvetti A, Tognoni E (2002) Study of foxing stains on paper by chemical methods, infrared spectroscopy, micro X-Ray fluroescence spectrometry and laser induced breakdown spectroscopy. Spectr Acta B 57: 1235-1249

6. De Paolis MR, Lippi D (2008) Use of metabolic and molecular methods for the identification of a Bacillus strain isolated from paper affected by foxing. Microbiol Res 163:121-131

7. Arai H (2000) Foxing caused by Fungi: twenty five years of study. Int Biodeter and Biodegrad 46:181-188

8. Beckwith TD, Swanson WH, Iiams TM (1940) Deterioration of Paper: the Cause and

Effect of Foxing. Publications of the University of California at Los Angeles in Biological Sciences 1, 299-356.

9. Cain CE (1987) Paper Foxing: Biochemical Effects of Fungal Infections of Paper. Journal of the Mississippi Academy of Science 32-24

10. Meynell G, Newsam RJ (1978) Foxing, a fungal infection of paper. Nature 274: 466-468

11. Montemartini Corte A, Ferroni A, Salvo VS (2003) Int Biodeter and Biodegrad 51:167-173

12. Montemartini Corte A, Zotti M (2005) Microfunghi bioderiogeni in archivi e biblioteche della liguria. Informatore Botanico italiano 37:854-855

13. Zotti M, Ferroni A, Calvini P (2011) Mycological and FTIR analysis of biotic foxing on paper substrates. Int Biodeter and Biodegrad:1-10

14. Florian M-LE (1996) The role of the Conidia of fungi in fox spots. Stud Conserv 41:65-75

15. Florian M-LE, Manning L(2000) SEM analysis of irregular fungal spot in an 1854 book: population dynamics and species identification. Int Biodeter and Biodegrad 46: 205-220

16. Rakotonirainy MS, Heude E, Lavedrine B (2007) Isolation and attempts of biomolecular characterization of fungal strains associated to foxing on a 19th century book. JCH 8: 126-133

17. Nol L, Henis Y, Kenneth RG (1983) Biological factors on foxing in postage stamp papers. Int Biodeter and Biodegrad 19: 19-25

18. Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kauserud H (2010) ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an *in silico* approach reveals potential PCR biases . BMC Microbiology 10: 189-198

19. Frisvad JC, Rank C, Nielsen KF, Larsen TO (2009) Metabolomics of *Aspergillus fumigatus*. Med Mycol 47: S53-S71

20. Frisvad JC, Thrane U, Samson RA, Pitt JI (2006) Important mycotoxins and the fungi which produce them. Adv in Exp Med Biol Experimental Medicine and Biol 571: 3-31

21. Nielsen KF (2003) Mycotoxin production by indoor molds. Fungal Genetics and Biology 39:103-117

22. Nielsen KF, Mogensen JM, Johansen M, Larsen TO, Frisvad JC (2009) Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. Anal Bioanal Chem Bioanal Chem; 395:1225-1242

23. Tuomi T, Reijula K, Johnsson T, Hemminki K, Hintikka EL, Lindroos O (2000) Mycotoxins in crude building materials from water-damaged buildings. Appl Environ Microbiol 66:904

24. Bullerman LB, Bianchini A (2007) Stability of mycotoxins during food processing. International Journal Food Microbiology 119:140 -146

25. Rakotonirainy MS, Arnold S (2008) Development of a new procedure based on the energy charge measurement using ATP bioluminescence assay for the detection of living mould from graphic documents. Luminescence 23:182-186

26. Amner W, Edwards C, McCarthy AJ (1989) Improved medium for recovery and enumeration of the farmer's lung organism, *Saccharomonospora viridis*. Applied Environmental Microbiology Appl Environ Microbiol 55:2669-2674

27. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. in PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York

28. Glass NL, Donaldson GC (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes.Appl Environ Microbiol 61:1323-1330

29. Cain CE (1984) Proposed Classification of Foxing. Book and Paper Group, American Institute for Conservation. Proceedings of the 10th Annual Meeting Posprints, Milwaukee

30. Cain CE, Miller BA (1982) Photographic spectral and chromatographic searches into the nature of foxing. Book and Paper Group, American Institute for Conservation. Proceedings of the 10th Annual Meeting Preprint, Milwaukee

31. Press RE (2001) Observation on the foxing of paper. Int Biodeter and Biodegrad 48: 94-97

32. Bicchieri M, Ronconi S, Romano FP, Pappalardo L, Corsi M, Cristoforetti G, Legnaioli S, Palleschi V, Salvetti A, Tognoni E (2002) tudy of foxing stains on paper by chemical methods, infrared spectroscopy, micro-X-ray fluorescence spectrometry and laser induced breakdown spectroscopy. Spectr Acta B 57: 1235-1249

33. Bunger J, Westphal G, Monnich A, Hinnendahl B, Hallier E, Muller M (2004)

Cytotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxins. Toxicology 202:199-211

RÉSUMÉ

Introduction : La présence des moisissures et de leurs mycotoxines dans les matrices complexes de papiers est peu étudiée. Notre travail a porté sur la recherche de mycotoxines sur les papiers patrimoniaux altérés par le foxing et les papiers peints moisis issus de logements dont les habitants ont été diagnostiqués comme porteurs de symptômes allergiques et du syndrome des bâtiments malsains.
Objectifs : Identifier les espèces fongiques de ces deux types de supports papiers et y déterminer la production de métabolites fongiques.
Matériels et Méthodes : Le foxing a été caractérisé par des techniques pluridisciplinaires (physiques, biologiques, bioanalytiques, tests de cytotoxicité). Les métabolites fongiques dans les extraits hydro-organiques de ces papiers ont été recherchés et identifiés par spectrométrie de masse afin d'évaluer s'ils pouvaient être reliés aux espèces fongiques détectées par microbiologie. Puis le risque toxique de ces extraits de papiers a été évalué sur un modèle cellulaire *in vitro*.
Résultats : Pour le foxing, nous avons pu en exclure une origine métallique et montrer que les micro-organismes présents dans celui-ci sont essentiellement des espèces fongiques. Pour les papiers peints, des pics relatifs à des métabolites fongiques ont été retrouvés. Grâce à l'ensemencement individuel d'espèces fongiques sur papier peint et à l'aide de la MS^2, nous avons pu relier les composés de *m/z* 401 et 487 à *S. chartarum*. Les tests de cytoxicité ont montré une augmentation significative de la cytotoxicité des cellules A549 avec certains papiers peints moisis par rapport au papier peint témoin. Les cellules A549 ont montré une surexpression du TNF-α, de l'IL-8 et du CYP 1A1, après contact avec ces mêmes papiers peints.
Discussion-Conclusion : Nous n'avons détecté aucune mycotoxine dans le foxing excluant ainsi d'éventuels liens entre inhalation de mycotoxines émanant de vieux manuscrits et symptomatologie respiratoire. Pour les habitants des logements et leurs symptômes respiratoires, il est difficile de les relier à une espèce fongique donnée ou à un métabolite donné, bien que *S. chartarum* ait pu être mis en cause. Ces premiers résultats doivent être confirmés par des études ultérieures.

Mots clés : Champignons, papiers, métabolites fongiques, HPLC-MS, cytokines, toxicité.

ABSTRACT

Introduction: Little study has been carried out on the presence of fungi and their mycotoxins in complex paper matrices. Our work has focused on finding mycotoxins on heritage paper altered by the foxing and wallpapers from moldy homes whose residents have been diagnosed with symptoms of allergies and sick building syndrome.
Objectives: To identify the fungal species of these two types of paper and to determine the production of fungal metabolites.
Materials and methods: The foxing has been characterized using multi-disciplinary technics (physical, biological, bioanalytical, cytotoxicity assays). The fungal metabolites in the hydro-organic extracts of these papers were sought and identified by mass spectrometry to assess whether they could be related to fungal species detected by microbiology. The toxicological risk of wallpaper extracts was then evaluated on model *in vitro* cells.
Results: For the foxing, we could exclude a metal origine and we showed that the microorganisms present are mainly fungal species. For wallpapers, fungal metabolites were found. By seeding individual fungal species on wallpaper and using MS^2, we were able to link the compounds of *m/z* 401 and 487 to *S. chartarum*. Cytotoxicity tests showed a significant increase in cytotoxicity of A549 cells with moldy wallpaper in comparison with the control wallpaper. A549 cells showed an overexpression of TNF-α after contact with these wallpapers as well as a significant overexpression of IL-8 and CYP 1A1.
Discussion-Conclusion: We detected no mycotoxin in foxing, thus excluding possible links between inhalation of mycotoxins from old manuscripts and respiratory symptoms. For people in their homes and respiratory symptoms, it is difficult to draw any relationships to a given fungal species or a metabolite although *S. chartarum* has been implicated. These initial results should be confirmed by further study.

Key words: Fungi, fungal metabolites, HPLC-MS, cytokines, toxicity.