

INTRODUCTION

Depuis quelques années, les restaurateurs connaissent bien la haute toxicité de plusieurs produits qu'ils utilisent. Non seulement ils sont mauvais pour l'environnement et les œuvres d'art, mais aussi pour les restaurateurs qui les manipulent. En effet, il y a une incidence claire de maladies cancéreuses et d'autre nature, produites à cause de ces substances nocives.

Dans la première partie de cette thèse nous essayons de trouver une alternative à la toxicité des produits de restauration avec l'étude approfondie de l'utilisation d'enzymes.

Les enzymes sont des systèmes moins toxiques que beaucoup de produits utilisés en restauration. Elles s'emploient surtout pour éliminer les impuretés pendant les nettoyages ou pour la séparation des matériaux adhérents comme, par exemple, les adhésifs, les protéines, l'amidon et les triglycérides^[9,35,36] qui sont impossibles à éliminer avec d'autres méthodes plus conventionnelles. Ces enzymes également sont utilisées pour la datation d'œuvres d'art^[37], comme biocides^[38], etc. Malgré ces avantages, l'emploi de ces protéines en Espagne reste insuffisant à cause du peu d'information et de connaissance sur leur mode de manipulation. Par contre, dans le reste de l'Europe, elles sont utilisées depuis plusieurs décennies.

L'usage d'enzymes en restauration apparut dans les années soixante quand Sheridan^[39] utilisa la trypsine pour éliminer un adhésif protéique. Malheureusement, vingt ans ont été nécessaires pour observer un développement en routine de l'emploi d'hydrolases dans les nettoyages et dans d'autres traitements

³⁵ GRATTAN, D., et al., "The use of enzymes in partially non-aqueous media". *Conservation of Library and Archives Materials and the Graphic Arts*, Ed. G. Petherbridge, Butterworths, London, 1987, pp. 15-24.

³⁶ VAN DER REYDEN, D., "Recent Scientific Research in paper Conservation". *Journal of the American Institute for Conservation*, 31 (1), 1992, pp. 117-138.

³⁷ CAMPANELLA L., ANTONELLI A., FAVERO G., TOMASSETTI M., "New archeometric method for wood based on an enzymatic biosensor" *L'Actualité Chimique*, 2001, pp. 14-20.

³⁸ VALENTIN, N. et al. "Analyses of deteriorated Spanish glass windows: cleaning methods using gel systems" *Triennial meeting (11th), Edinburgh, 1-6 September 1996*, ICOM. Committee for Conservation, Paris, 1996, pp. 851-856.

³⁹ SHERIDAN J., "Enzymes, as they relate to the conservator of paintings" *exposition of painting conservation*, Ed. Brooklyn Museum, Nueva York, 1962.

d'œuvres d'art. O. Wendelbo & B. Fosse.^[40], F. Makes^[41,42,43], A. De La Chapelle^[44], R. Wolbers^[45, 46], P. Cremonesi^[6, 47, 48, 49], Belluci^[9,10] ou Banik^[6] ont été les grands précurseurs dans l'utilisation de ce type de protéines. Ces études se sont concentrées surtout sur l'usage des hydrolases. Cependant, il existe différents types d'enzymes, utiles en restauration : les transférases, les lyases, les isomérases, les ligases (synthétases) et oxydoréductases, qui ont différentes fonctions comme, par exemple, la capacité de créer ou recréer des liaisons covalentes^[50]. C'est cette fonction que nous avons utilisée afin d'envisager la possibilité de renforcer le papier, par synthèse de fibres de cellulose enzymatique.

Actuellement, la consolidation de la cellulose peut se réaliser grâce à consolidants naturels (des gels cellulosiques) et/ou synthétiques (les acryliques, les polyvinyles, les polyamides, etc.) Ils ont une faible toxicité, mais ils ont également, divers inconvénients. Ces matériaux sont en effet invasifs et peuvent bloquer la fibre en empêchant son mouvement naturel ou même dénaturer le matériel. S'il existe un déséquilibre dans l'homogénéité de l'application du consolidant, cela peut également produire des tensions ; cela s'appelle effet tampon.

⁶ WENDELBO, O., FOSSE, B., "Protein Surgery. A Restoring Procedure Applied on Paper", *Restaurator*, 1970, pp. 245-248.

⁴¹ MAKES, F., *Enzymatic consolidation of paintings*, Ed. Department of History of Art and Architecture University of Goteborg, Goteborg, 1979.

⁴² MAKES, F., "Enzymatic consolidation of a painting: Seventeenth century landscape from Skokloster Palace", En *Science and technology in the service of conservation. Preprints of the contributions to the Washington congress*, International Institute for Conservation, London, 1982, pp. 135-138.

⁴³ MAKES, F., *Enzymatic consolidation of the portrait of Rudolf II as "Vertumnus" by Giuseppe Arcimboldo with a new multi-enzyme preparation isolated from Antarctic Krill (Euphausia superba)*, Acta universitatis gothoburgensis, Göteborg, 1988.

⁴⁴ BANIK, G., CREMONESI, P., DE LA CHAPELLE, A., MONTALBANO, A., *Nuove metodologie nel restauro del materiale cartaceo*, Il prato, Padova, 2003.

⁴⁵ WOLBERS, R., *Cleaning painted surfaces: Aqueous methods*, Archetype Publication, London, 2000.

⁴⁶ WOLBERS, R. C., *Abstracts of Papers of The American Chemical Society*, 2000, p. 220.

⁴⁷ BELLUCI, R., CREMONESI, P., "L' uso degli enzimi nella conservazione e nel restauro dei dipinti", *Kermes, arte e tecnica del restauro* n° 26, 1994, pp. 45-64.

⁴⁸ BELLUCCI, R., CREMONESI, P., PIGNAGNOLI, G., "A preliminary note on the use of enzymes in conservation: the removal of aged acrylic resin coatings, with lipase", *Studies in Conservation*, 44 (4), 1999, pp. 278-281.

⁴⁹ CREMONESI, P., *L'uso degli enzimi nella pulitura di opere policrome*, Il prato, Padova, 2002.

⁵⁰ LEHNINGER, A., NELSON, D., COX, M., *Principios de Bioquímica*, 4° Edición, Ed. Omega, Barcelona, 2006, pp. 211-212.

De plus, certains de ces matériaux initialement non toxiques, peuvent devenir toxiques pendant leur application ou leur élimination, car il est parfois nécessaire d'y ajouter des solvants.

Sur les supports poreux comme la cellulose, leur application peut être irréversible car ils peuvent s'introduire dans les interstices des fibres.

De plus, beaucoup d'entre eux, après un temps, deviennent cassables, très rigides, acides, jaunissent, s'affaiblissent, et perdent finalement leur fonction première et les papiers doivent être à nouveau traités.

Il semble donc que les processus et matériaux de consolidation disponibles aujourd'hui sur le marché ne soient pas satisfaisants pour les restaurateurs.

Pour cette raison, nous proposons une alternative basée sur l'hypothèse qu'il est possible de substituer l'usage des consolidants polymériques par des enzymes. Celles-ci devront créer des unions glucosidiques dans les fibres de cellulose du papier et les renforcer sans introduire de matériel invasif, nuisible à long terme.

Étude bibliographique

Les enzymes sont utilisées en restauration depuis quelques décennies, en Europe et dans le reste du monde.

Sheridan^[51], fut un précurseur lorsqu'il utilisa la trypsine pour nettoyer des adhésifs protéiques, en 1962. Cependant, nous devons attendre 8 ans, pour voir apparaître la publication de Wendelbo et Fosse^[52], utilisant une enzyme protéolytique. Enfin, nous devons attendre 10 ans de plus pour pouvoir accéder à plusieurs études d'enzymologie appliquées à la restauration. Les recherches plus connues sont celles de Segal et Cooper qui utilisèrent la α -amylase afin d'éliminer de la pâte d'amidon ou de la trypsine provenant d'adhésifs de nature protéique utilisés dans de

⁵¹ SHERIDAN, J., "Enzymes, as they relate to the conservator of paintings", *exposition of painting conservation, Brooklyn Museum*, Brooklyn, 1962.

⁵² WENDELBO, O., FOSSE, B., "Protein "Surgey" A Restoring Procedure Applied on Paper" *Restaurator press* Vol. 1, Denmark, 1970, pp. 245-248.

restaurations anciennes. Banik ^[53 et54] mis au point de son côté une compresse d'amylases prête à l'utilisation. Une autre chercheuse, Ariane De La Chapelle, a développé différentes applications des enzymes, comme par exemple, l'article écrit par elle et Patrick Choisy où ils ont démontré qu'il était possible d'éliminer les taches de « foxing » à l'aide de peroxydases fongiques dans un milieu aqueux et sans utiliser de méthodes chimiques. Dans un autre article d'Ariane de La Chapelle ^[55], une méthode simple est décrite pour détecter la présence de traces de colle. Paolo Cremonesi a lui aussi beaucoup étudié ce type de protéines. Il a écrit un ouvrages dans lequel ^[56] il explique et énumère l'emploi d'enzymes dans les nettoyages de peintures polychromes. Dans un autre article qu'il a publié avec Roberto Bellucci et Ginebra Pignagnoli ^[57], il démontre de manière expérimentale, que les lipases sont capables d'hydrolyser les couches non grasses des pellicules acryliques de Paraloid® B - 72. Richard Wolbers créa également un gel de lipases pour éliminer les couches d'huile sur des couches de résine naturelle. En Espagne, des chercheurs ont également publié des articles sur ce thème. Nieves Valentín ^[58], Andrés Sánchez et Isabel Herraéz, ont notamment publié l'utilisation d'un mélange de lysozymes dans un gel d'agarose permettant de désinfecter et de nettoyer les vitres infestés de *Bacillus Subtilis*. Isabel Blasco Castiñeyra, quant à elle a étudié ces derniers années, l'utilisation d'enzymes protéolytiques ^[59].

⁵³ BANIK, G., "Removal of Starch paste adhesives and relinings from paper based objects by means of Enzyme poultices" *Materiali tradizionali ed innovativi nella pulitura dei dipinti e delle opere policrome mobili: atti del primo congresso internazionale colore e conservazione, Piazzola su Brenta (PD), 25-26 ottobre 2002*, Il Prato, Padova, 2003, pp. 33-38.

⁵⁴ BANIK, G., CREMONESI, P., LA CHAPELLE, A., MONTALBANO, L., *Nuove metodologie nel restauro del materiale cartaceo*, Il Prato, Padova, 2003.

⁵⁵ LA CHAPELLE, A., CHOISY, P., GALLO, F., LEGOY, D., «Emploi d'amylases et de protéases pour la restauration d'arts graphiques » *Materiali tradizionali ed innovativi nella pulitura dei dipinti e delle opere policrome mobili: atti del primo congresso internazionale colore e conservazione, Piazzola su Brenta (PD), 25-26 ottobre 2002*, Ed. Il Prato, Padova, 2003.

⁵⁶ CREMOSI, P., *L'uso degli enzimi nella pulitura di opere policrome*, Ed. Il prato, Padova, 2002.

⁵⁷ BELLUCCI, R., CREMONESI, P., PIGNAGNOLI, G. "A preliminary note on the use of enzymes in conservation: the removal of aged acrylic resin coatings with lipase", *Studies in conservation Vol. 44*, 1999, pp. 278-281.

⁵⁸ VALENTIN, N. et al., "Analyses of deteriorated Spanish glass windows: cleaning methods using gel systems" *Triennial meeting (11th), Edinburgh, 1-6 September 1996* ICOM, Committee for Conservation, Paris, 1996, pp. 851-856.

⁵⁹ BLASCO, I., DE LA VIÑA, S., SAN ANDRÉS, M., "La utilización de enzimas proteolíticas en procesos de limpieza de policromías. Importancia de la realización de estudios previos de caracterización de los preparados enzimáticos", *XV Congreso de Conservación y Restauración de Bienes Culturales*, Murcia, 2004, pp.203-212.

La consolidation de la cellulose en restauration a quant à elle toujours été effectuée avec des consolidants naturels, synthétiques ou un mélange des deux ^[60].

L'utilisation d'enzymes pour consolider les œuvres d'art en restauration est nouveau. Cependant, dans la littérature scientifique, nous avons trouvé des articles décrivant la synthèse de la cellulose grâce à des bactéries ^[61, 62 63 et64] ou grâce à l'usage d'enzymes comme la « cellulose synthase » qui est capable de biosynthétiser la cellulose ^[65] ou l'enzyme hydrolytique cellulase ^[66, 67 et68] qui peut biocatalyser dans certaines conditions la synthèse de la Cellulose.

L'utilisation d'un mélange de solvant aqueux/non aqueux permet l'effet à cette enzyme de travailler, en utilisant un substrat spécifique (β -cellobiose fluoride), à l'inverse de sa nature hydrolytique [Figure 4], en créant des liaisons glucosidiques dans le papier dégradé [Figure 3].

Ces deux enzymes ont divers inconvénients. La première, la “cellulose synthase” est difficile à obtenir et à purifier. Une méthode de restauration utilisant cette enzyme serait donc économiquement impossible dans une restauration.

D'un autre côté, la cellulase est disponible en grandes quantités et facile à utiliser mais l'acétonitrile est un solvant toxique mais pour l'instant nécessaire à son

BLASCO, I., DE LA VIÑA, S., SAN ANDRÉS, M., “Fundamentos y antecedentes de la utilización de enzimas en tratamientos de limpieza” *PH53Boletín del Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico*, 53 especial criterios, 2005, pp.24-34.

⁶⁰ BAKER, C.A., “Methylcellulose et carboxymethylcellulose sodique: Étude par vieillissement accéléré des propriétés pour la conservation du papier » *IIC Xe Congrès International Paris 2-7 Septembre 1984*, SFIIC, Paris, 1984, pp.53-57.

⁶¹ MÉNDEZ M., MEMBRILLO J., “Mecanismos moleculares de la síntesis de celulosa en bacterias” *Revista Especializada en Ciencias Químico – Biológicas* Vol. 7, n° 001, México, 2004, pp.26-34.

⁶² CHÁVEZ- PACHECO, J.L., *et al.*, « Celulosa bacteriana en *Gluconacetobacter Xylinum*: Biosíntesis y Aplicación”, *Revista Especializada en Ciencias Químico – Biológicas* Vol. 7, n° 001, México, 2004, pp.18-25.

⁶³ SHODA, M., SUGANO, Y., “Recent Advances in Bacterial Cellulose Production”, *Biotechnology and Bioprocess Engineering* Vol.10, n°1, 2005, pp.1-8.

⁶⁴ CHAWLA, P.R., *et al.*, « Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications”, *Food Technology Biotechnology* Vol. 47, n°2, 2009, pp.107-124.

⁶⁵ <http://www.botany.utexas.edu/facstaff/facpages/mbrown/ongres/tspires/cellulose.htm>

⁶⁶ KOBAYASHI, S., SHODA, S., “Chemical síntesis of cellulose and cello-oligomers using a hydrolysis enzyme as a catalyst” *Int. J. Biol. Macromol.* Vol. 17 n° 6, 1995, pp.373-379.

⁶⁷ SHODA, S., FUJITA, M., KOBAYASHI, S., “Glycanase-Catalyzed Synthesis of Non-natural Oligosaccharides” *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* Vol.10 No. 54, 1998, pp.279-289.

⁶⁸ SHODA, S., KOHRI, M., KOBAYASHI, S., “Glycosidase-catalyzed synthesis of oligosaccharides through intermediate analogue substrates”, *Chemistry and Biology Research Signpost Kerala*, India, 2005.

activité synthase. Il est donc nécessaire de changer de solvant afin de diminuer au maximum la toxicité du traitement tout en maintenant l'activité cellulose synthase. C'est le cadre de notre étude.

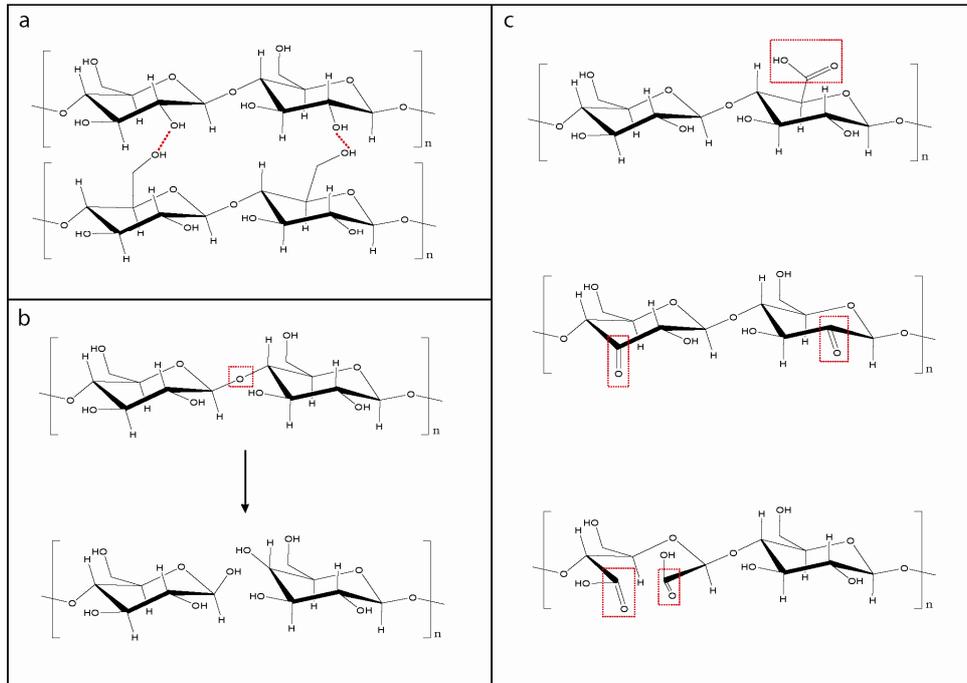


Figure 3. a) Structure des polymères des monosaccharides et ponts d'hydrogène (en rouge), b) hydrolyse qui se produit pendant le vieillissement des fibres de cellulose et c) possible réaction d'oxydation des fibres de cellulose.

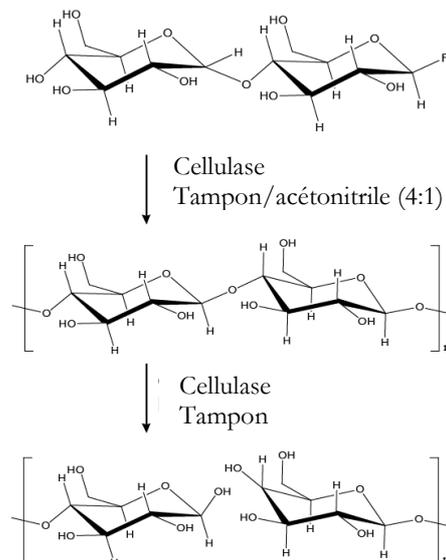


Figure 4. Les deux possibles réactions qui peuvent se produire à cause de la catalyse des cellulases. Cela dépend de la solution employée.

Hypothèse de travail et objectifs.

L'hypothèse principale de cette thèse est la possibilité de consolider les supports cellulósiques -comme le papier- grâce à des enzymes. Les fibres seraient renforcées en créant des liaisons glucosidiques sans la nécessité de rajouter un matériel invasif aux supports. L'application des consolidants toxiques serait limitée à certains cas ponctuels et seulement quand ils seraient réellement nécessaires.

En cas de succès, nous obtiendrons un système alternatif et moins nuisible, utilisant des matériaux biologiques –les enzymes-, dans le champ de la restauration et de la conservation des œuvres d'art.

Nous projetons donc de renforcer les fibres de cellulose sans l'introduction d'aucun agent nocif pour la conservation de l'œuvre, tout en rajoutant plus de résistance à la fibre. De cette manière, nous envisageons de pouvoir la manipuler sans risque de détérioration. Nous appliquerions des adhésifs (naturels ou synthétiques, toxique ou non) si cela se révélait strictement nécessaire.

Les objectifs de cette thèse sont :

- Approfondissement sur les connaissances de l'utilisation biotechnologique des enzymes.
- Recherche d'information sur l'utilisation actuelle des enzymes dans les processus de restauration et conservation d'œuvres d'art.
- Recherche des caractéristiques, causes et méthodes de consolidation des supports cellulósiques.
- Identification des côtés positifs et négatifs des traitements historiques, des matériels et des techniques de consolidation.
- Recherche d'une méthode efficace et sans danger pour la consolidation de matériaux cellulósiques grâce à des enzymes.
- Application de méthodes d'analyses scientifiques pour l'identification du vieillissement des supports cellulósiques.

- Mise au point d'un marquage enzymatique permettant d'identifier la dégradation des matériaux celluloses.
- Collaboration avec différents laboratoires scientifiques en Espagne et à l'étranger pour les besoins de l'étude.