

# Thèse de Doctorat

Présenté à

*L'Université de Pau et des Pays de l'Adour*

Par

*Maïté Berdoulay*

Pour l'obtention du grade de

*Docteur*

*Spécialité : Ecologie Microbienne*

---

## *Analyses physico-chimiques et microbiologiques de façades en pierre exposées aux embruns marins du Golfe de Gascogne*

---

*Soutenue publiquement le 28 novembre 2008*

*Après avis de :*

*Marie Libert  
Pr Yvan Moënne Loccoz*

*Commissariat à l'Energie Atomique (CEA)  
Université de Lyon 1*

*Rapporteur  
Rapporteur*

*Devant la commission d'examen formée de :*

*Pr Henry Cardy  
Pr Michel Magot  
Pr Claude Mouches  
Dr Jean-Claude Salvado  
Jacques Tortos  
Dr Jesus Valero*

*Université de Pau et des Pays de l'Adour  
Université de Pau et des Pays de l'Adour  
Université de Pau et des Pays de l'Adour  
Université de Pau et des Pays de l'Adour  
Nobatek  
Inasmet – Tecnalia*

*Co-directeur de thèse  
  
Directeur de thèse*



**IPREM**



Comité des États  
du Pays Basque





## Remerciements

---

*Au terme de ce doctorat, effectué à l'UFR Sciences et Techniques de la Côte Basque, au sein de l'Equipe Environnement et Microbiologie de l'IPREM, j'adresse mes remerciements au Pr Robert Duran pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.*

*Je remercie également Jacques Tortos, Directeur du Centre de Ressource Technologique Nobatek, pour avoir coordonné et financé la thèse sous CIFRE avec l'Université de Pau et des Pays de l'Adour.*

*Je remercie le Conseil des Elus du Pays Basque, le Conseil Régional Aquitaine et le Conseil Général des Pyrénées Atlantique pour avoir soutenu financièrement ce projet.*

*Je tiens à remercier Marie Libert et Yvan Moënné-Loccoz pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Je remercie également Michel Magot, Jesus Valero, Claude Mouches et Jacques Tortos pour avoir bien voulu participer à mon Jury de thèse.*

*Mes remerciements vont également à Jean-Claude Salvado, directeur de thèse, et Henry Cardy, co-directeur de thèse, pour m'avoir fait confiance et m'avoir guidée durant ces trois années.*

*Je remercie également le maire de Biarritz et Mme Françoise Pautrizel, directrice du Musée de la Mer, pour avoir autorisé l'exposition de pierres sur la terrasse du musée. Merci également à Vincent Gaillet pour son accueil et son aide au Musée de la Mer.*

*Un grand merci à Jesus de la Fondation INASMET pour sa disponibilité et qui m'a fait profiter à de nombreuses reprises de ses connaissances en microbiologie et sur la biodétérioration de monuments.*

*Merci aux autres membres du comité de thèse, Benjamin et Oïana pour l'aide apportée au cours de ma thèse.*

*Un grand merci aussi à Fanny, ma première stagiaire, qui m'a beaucoup aidée et qui a fait grandement avancer mes travaux.*

*Je remercie Dominique pour la gestion administrative de la thèse. Merci à Henry et Hélène pour les conseils scientifiques qu'ils m'ont fourni et qui m'ont beaucoup aidé au cours de la thèse.*

*Mes remerciements vont également à tous les permanents du laboratoire, pour leurs conseils et leur gentillesse : Rémy, Béatrice, Christine, Pierre, Cristiana, Régis, Jean-Philippe, Régis, Solange, Pat, Marie-Jo, Christine et Claude. Merci également à toute l'équipe de Nobatek.*

*Je pense avec plaisir aux bons moments passés à Montaury, je les dois aux enseignants chercheurs, administratifs, techniciens, informaticiens et autres permanents qui forment la « grande famille » de l'UFR.*

*Je n'oublie pas Elena, Sylvain, Nicolas, Gaël, Damien, Louis-Romain, Dung, Wen, Raphaëlle, Auriane, Pierre-Jo, Guillaume, Benji, Sylvain, Sandrine, Ludo, Isa, Sabrina, « les » Magali; Laurent, je vous souhaite à tous beaucoup de bonheur et de réussite, ainsi qu'à Didi, Jean-Fa, Julien, Lulu, Carline, Nono, Yann et Jean-Marc, les biologistes de Poitiers.*

*Un grand merci aux frérots, sœurette, beaux-frérots et belles-sœurette, ainsi que la famille de Nicolas qui ont su me soutenir, me changer les idées et me remonter le moral durant les moments durs.*

*Merci à papa et maman pour votre soutien constant et toute l'aide que vous avez pu m'apporter malgré les dissensions.*

*Chouchou, merci d'avoir été là, d'avoir supporté mes sautes d'humeur et mes longs bavardages au téléphone. Merci de tout cœur pour tes conseils, ton soutien et de m'avoir toujours encouragée.*

*Spéciale dédicace à tous mes amis : Virginie, Lauriane, Sophie, Max, Maylis, Myriam, Valéry, Fon, Marie, Sian, Chantal, Philippe, Jéjé et Cristelle, les « anciens » du cyber, et les membres de la peña Campera, pour tous les bons moments passés avec eux.*

# Sommaire

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>I - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>5</b>
INTRODUCTION .....	5
1- LA PIERRE ET LES MICROORGANISMES .....	7
1.1- <i>Facteurs influençant la colonisation de la pierre par les microorganismes ou bioréceptivité de la pierre</i> .....	8
1.1.1- Propriétés physico-chimiques des pierres .....	8
1.1.2- Facteurs environnementaux .....	9
1.2- <i>Les colonisateurs de la pierre</i> .....	10
1.2.1- Les différents colonisateurs .....	11
1.2.2- Les méthodes d'adaptation des microorganismes à la pierre et son environnement .....	16
1.2.3- Conclusion .....	18
2- ETUDE DE LA BIODIVERSITE.....	20
2.1- <i>Les méthodes microbiologiques et biochimiques</i> .....	21
2.2- <i>Les techniques basées sur la biologie moléculaire</i> .....	22
2.3- <i>La RFLP, méthode de biologie moléculaire</i> .....	26
2.3.1- Extraction de l'ADN de l'échantillon environnemental.....	27
2.3.2- Amplification par PCR et choix des amorces .....	28
2.3.3- Clonage et identification phylogénétique.....	32
2.4- <i>Conclusion</i> .....	33
3- LES PROCESSUS DE BIODETERIORATION DE LA PIERRE.....	36
3.1- <i>Importance de l'eau</i> .....	36
3.1.1- Action directe de l'eau.....	37
3.1.2- Action indirecte de l'eau.....	38
3.2- <i>Détérioration de la pierre par les microorganismes</i> .....	41
3.2.1- Effets de la croissance des microorganismes sur la pierre .....	41
3.2.2- Les effets de la pigmentation des microorganismes sur la pierre.....	42
3.2.3- L'action des exo-polysaccharides dans la biodétérioration de la pierre .....	42
3.2.4- Sécrétions d'acides par les microorganismes et solubilisation de la pierre .....	43
3.3- <i>Le rôle des sels marins</i> .....	45
3.3.1- Processus chimiques de la détérioration de la pierre en présence des sels marins .....	45
3.3.2- L'environnement marin et la biodétérioration .....	46
3.4- <i>Les méthodes d'étude de la biodétérioration de la pierre</i> .....	48
3.5- <i>Conclusion sur la biodétérioration de la pierre</i> .....	49
4- TRAITEMENTS ET PROTECTION DE LA PIERRE.....	53
4.1- <i>Traitements curatifs</i> .....	53
4.2- <i>Méthodes préventives</i> .....	53

4.3-	<i>Traitements biologiques</i> .....	55
	CONCLUSION.....	56
<b>II -</b>	<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>59</b>
1.2-	<i>Pierres pour l'étude dans le temps</i> .....	60
1.3-	<i>Echantillonnage</i> .....	60
2-	ANALYSES BIOLOGIQUES .....	61
2.1-	<i>Microbiologie classique</i> .....	61
2.1.1.	Conservation.....	61
2.1.2.	Milieux de culture.....	61
2.1.3.	Culture et isolement des souches .....	62
2.2-	<i>Techniques de biologie moléculaire</i> .....	63
2.2.1-	Extraction de l'ADN génomique .....	63
2.2.2-	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et purification .....	64
2.2.3-	Construction de banques de clones .....	66
2.2.4-	Criblage des banques de clones par RFLP .....	66
2.2.5-	Séquençage des profils .....	66
2.2.6-	Analyses statistiques.....	68
3-	TECHNIQUES PHYSICO-CHIMIQUES D'ANALYSE DE LA PIERRE .....	69
3.1-	<i>Calcul de la densité des pierres</i> .....	69
3.2-	<i>Calcul de la capillarité des pierres</i> .....	69
3.3-	<i>Microscopie électronique à balayage</i> .....	70
3.4-	<i>Diffraction aux Rayons X (DRX)</i> .....	71
3.5-	<i>Porosité selon la méthode BET</i> .....	71
3.6-	<i>Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier, couplée à la technique de Réflexion Diffuse</i> <i>DRIFT</i> .....	71
3.7-	<i>Spectrométrie de Photoélectron X</i> .....	72

---

<b>III - TRAVAUX EXPERIMENTAUX : LA PIERRE CALCAIRE D'ANGOULEME ET LE GRES D'IGUELDO EXPOSES AUX EMBRUNS MARINS.....</b>	<b>75</b>
INTRODUCTION .....	75
1- CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES PIERRES D'ANGOULEME ET D'IGUELDO .....	77
2- ETUDE DE LA DEGRADATION CHIMIQUE D'UNE PIERRE D'ANGOULEME EN MILIEU MARIN.....	80
2.1- <i>Analyses XPS</i> .....	81
2.2- <i>Analyses DRIFT</i> .....	82
2.3- <i>Analyses DRX</i> .....	85
2.4- <i>Mesure de la porosité au BET</i> .....	86
2.5- <i>Conclusion</i> .....	87
3- ETUDE DES BIOFILMS PRELEVES SUR LA FAÇADE DE LA VILLA ISABEL EN CALCAIRE ET DE LA MAIRIE DE ST-SEBASTIEN EN GRES.....	89
3.1- <i>Mise au point de la méthode ARDRA pour l'identification des microorganismes se développant sur des pierres de construction</i> .....	90
3.1.1- Abstract .....	91
3.1.2- Introduction .....	92
3.1.3- Materials and Methods .....	93
3.1.4- Results and discussion .....	96
3.1.5- Conclusion.....	107
3.1.6- References .....	108
3.2- <i>Conclusion du chapitre</i> .....	111
CONCLUSION.....	114

<b>IV - TRAVAUX EXPERIMENTAUX : PROCESSUS DE COLONISATION DE LA PIERRE CALCAIRE D'ANGOULEME EXPOSEE AUX EMBRUNS MARINS.....</b>	<b>115</b>
INTRODUCTION .....	115
1- DISPOSITIF EXPERIMENTAL.....	117
2- SUIVI DE L'EVOLUTION PHYSICO-CHIMIQUE DES PIERRES EXPOSEES SUR LA TERRASSE DU MUSEE DE LA MER DE BIARRITZ PENDANT LES 22 MOIS D'EXPOSITION .....	119
2.1- <i>Les analyses ESCA, DRIFT et DRX</i> .....	119
2.2- <i>Densité, capillarité et porosité des pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz</i> .....	120
2.2.1- Densité.....	120
2.2.2- Capillarité.....	121
2.2.3- Porosité.....	122
2.3- <i>Observations visuelles et microscopiques des surfaces des pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz</i> .....	123
3- ETUDE DES MICROORGANISMES S'ETANT DEVELOPPES SUR LES PIERRES EXPOSEES PAR MICROBIOLOGIE CLASSIQUE .....	126
3.1- <i>Etude dans le temps des microorganismes cultivables</i> .....	126
3.2- <i>Identification des microorganismes cultivables</i> .....	129
4- IDENTIFICATION DES MICROORGANISMES PAR BIOLOGIE MOLECULAIRE.....	132
4.1- <i>Extraction de l'ADN total de la communauté microbienne présent dans chaque échantillon et amplification par PCR</i> .....	132
4.2- <i>Clonage et construction de banques de clones</i> .....	133
4.3- <i>Analyse ARDRA des différents prélèvements et séquençage</i> .....	134
4.3.1- <i>Analyse phylogénétique des microorganismes présents sur les pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer</i> .....	134
4.3.2- <i>Représentativité des banques de clones</i> .....	151
5- DISCUSSION .....	153
5.1- <i>Processus de colonisation</i> .....	153
5.2- <i>Considérations sur les microorganismes identifiés</i> .....	156
CONCLUSION.....	161
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>163</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>171</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>181</b>



## Abréviations

---

**ADN** : Acide **d**ésoxyribonucléique

**ARDRA** : **A**mplified **r**ibosomal **DNA** **r**estriction **a**nalysis (analyse par restriction de l'ADN ribosomal amplifié)

**ARN** : Acide **r**ibonucléique

**BET** : **B**romure d'**é**thidium

**BET** : **B**runauer, **E**mmett et **T**eller

**BLAST** : **B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool

**pb** : **P**aire de **b**ase

**DGGE/TGGE** : **D**enaturing/**T**emperature **g**el **g**radient **e**lectrophoresis (électrophorèse sur gel en gradient dénaturant ou de température)

**dNTP** : **D**ésoxynucléotide **t**riphosphate

**DRIFT** : **D**iffuse **r**eflection and **i**nfrared **F**ourier **t**ransform spectroscopy

**DRX** : **D**iffraction aux **r**ayons **X**

**EMBL** : **E**uropean **M**olecular **B**iology **L**aboratory

**EPS** : **E**xo-**p**olysaccharide

**ESEM** : **E**nvironmental **s**canning **e**lectron **m**icroscopy (microscopie électronique à balayage environnemental)

**ITS** : **I**nternal **t**ranscribed **s**pacer

**LB** : **L**ubria **B**ertani

**MEB** : **M**icroscopie électronique à **b**alayage

**NCBI** : **N**ational **C**enter for **B**iotechnology **I**nformation

**PCR** : **P**olymerase **c**hain **r**eaction (réaction de polymérisation en chaîne)

**RDP** : **R**ibosomal **D**atabase **P**roject

**RFLP** : **R**estriction **f**ragment **l**engh **p**olymorphism

**TBE** : **T**ris **b**orate **E**DTA

**UTO** : **U**nité **t**axonomique **o**pérationnelle

**UV** : **U**ltra **V**iolet

**X-Gal** : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

**XPS** : **X**-ray **p**hotoelectron spectroscopy

---

# Glossaire

---

**Antibiose** : Effet inhibiteur sur un microorganisme.

**Autotrophe** : Organisme produisant des composés organiques complexes à partir de molécules organiques simples ( $\text{CO}_2$ ). Cela implique qu'ils sont capables de réaliser la synthèse de tous leurs constituants, sans exception.

**Bioréceptivité** : Totalité des paramètres qui contribue à l'établissement, l'ancrage et le développement d'une population sur un matériau. Ce sont les paramètres environnementaux, mais aussi les propriétés physico-chimiques du matériau.

**Epilithique** : Se dit des microorganismes se développant à la surface de la pierre.

**Endolithique** : Se dit des microorganismes se développant en profondeur dans la pierre.

**Eucaryote** : Etre dont les cellules sont toutes composées de trois éléments fondamentaux : la membrane, le cytoplasme et le noyau, ce dernier contenant le programme génétique de la cellule.

**Génoype** : Information portée par le génome d'un organisme.

**Hétérocyste** : Cellule différenciée fixatrice d'azote, présente chez certaines cyanobactéries filamenteuses.

**Hétérotrophe** : Organisme qui requiert des substrats organiques pour son développement.

**Hydrogénase** : Enzyme qui permet d'oxyder le dihydrogène.

**Hyphes** : Long filament ramifié que l'on trouve principalement chez les champignons mais également chez certaines bactéries comme les actinomycètes et les streptomycètes.

**Lithotrophe** : Organisme qui utilise une substance minérale comme donneur d'électrons lors de son métabolisme énergétique.

**Lixiviation** : Provenant du latin *lixivium* (lessive), la lixiviation désigne le lessivage de produits solides par un solvant approprié, entraînant l'extraction des parties solubles.

**Métabolisme** : Ensemble des transformations moléculaires et énergétiques qui se déroulent de manière ininterrompue dans une cellule ou organismes vivants. C'est un processus ordonné, qui fait intervenir des processus de dégradation (catabolisme) et de synthèse organique (anabolisme).

**Nitrogénase** : Enzyme qui catalyse la réduction de l'azote  $\text{N}_2$  en ammoniac  $\text{NH}_4^+$ . La nitrogénase a aussi une activité hydrogénase.

**Phénotype** : Ensemble des traits observables ou mesurables (caractères anatomiques, morphologiques, moléculaires, physiologiques, éthologiques) caractérisant un être vivant donné.

**Phototrophe** : Organisme capable de se développer en utilisant l'énergie lumineuse.

**Phylogénie** : Etude des origines évolutive d'un groupe d'êtres vivants, établie sur la comparaison de la structure moléculaire des ADN, qui permet d'établir le degré de parenté génétique entre plusieurs lignées d'êtres vivants.

**Polymorphisme** : Se définit par une variation des caractères au sein d'une même population.

**Procaryote** : Etre vivant dont les cellules ne comportent pas de noyau.

**Ribotype** : Un ribotype regroupe l'ensemble des gènes codant pour l'ARN ribosomique de la petite sous-unité ribosomale présentant le même polymorphisme.

**RubisCO** : la ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase/oxygénase est l'enzyme principale qui permet la fixation du CO<sub>2</sub> (fonction carboxylase), mais aussi l'O<sub>2</sub> (fonction oxygénase), par un organisme.

**Ubiquiste** : du Latin *Ubique* qui signifie en toute chose et tout être. Se dit d'un organisme capable de se développer dans des habitats variés.

## Liste des figures

<b>Figure I-1</b> : Développement d'algues sur du grès (site internet 1).....	12
<b>Figure I-2</b> : Eglise « Nossa Senhora das Dores » (Porto Alegre, Brésil) montrant des biofilms noirs au niveau des infiltrations d'eau (Crispim <i>et al.</i> , 2004) .....	12
<b>Figure I-3</b> : Approches basées sur la PCR pour l'analyse d'acides nucléiques environnementaux. (D'après Mitchell et Zuccaro (2006). .....	25
<b>Figure I-4</b> : Démarche générale employée pour estimer la diversité microbienne de la pierre. ....	27
<b>Figure I-5</b> : Organisation génétique de l'opéron codant pour les ARN ribosomiques procaryotes. ....	29
<b>Figure I-6</b> : L'opéron du gène d'ARNr ribosomique des eucaryotes. L'opéron comprend trois gènes principaux (molécules d'ARNr 5.8S, 18S et 25S ou 28S), et des régions « entre-espaces » entremêlés (IGS – intergenic spacer, NTS – non-transcribed spacer, ETS – externally transcribed spacer, ITS – internally transcribed spacer) (D'après (Mitchell et Zuccaro, 2006). .....	30
<b>Figure I-7</b> : Photos de dégradations de la pierre : croûtes noires formées sur une pierre non poreuse (A1), ou poreuse (A2); Alvélisations et désagrégations sableuses (B1-B2) ; Altération en plaque (C) (Beck, 2006). .....	40
<b>Figure II-1</b> : Situation géographique des différents sites de prélèvement des biofilms : Biarritz (bleu) et St-Sébastien (vert) situés sur le plan du littoral basque (A) ; plan détaillé de Biarritz et l'emplacement de la villa Isabel (bleu) (B) ; et plan détaillé de St-Sébastien avec l'emplacement de la mairie (vert) (C). .....	59
<b>Figure II-2</b> : Photo des pierres en cours d'expérimentation pour le calcul de la capillarité... ..	70
<b>Figure II-3</b> : Stratégies adoptées pour l'étude des pierres de façade. ....	73
<b>Figure III-1</b> : Porosité comparée de la pierre calcaire d'Angoulême et du grès d'Igueldo selon la terminologie de Young. ....	78
<b>Figure III-2</b> : Photos de la Villa Isabel (A) et des différentes zones étudiées : zone couverte par un biofilm rouge (B), zone couverte par un biofilm noir (C), balustre rongée (D), zone alvéolée (E) et zone lisse (F). ....	80
<b>Figure III-3</b> : Spectre DRIFT de l'échantillon L (spectre vert) superposé avec celui de CaSO <sub>4</sub> (spectre rouge). .....	84

- Figure III-4 :** Spectre DRIFT de l'échantillon L (spectre vert) superposé avec celui de MgSO<sub>4</sub>, 8H<sub>2</sub>O (spectre rouge)..... 84
- Figure III-5 :** Agarose gel electrophoresis of total DNA extracted from a limestone microbial biofilm. Track M: Lambda/*Hind* III molecular weight DNA marker. Tracks 1 and 2 : Total DNA extracted with the Easy-DNA™ or the UltraClean™ Soil DNA Isolation kit, respectively. Tracks 3 and 4 : Same total DNA extracted as tracks 1 and 2 respectively, but stored at 4°C for 6 days before electrophoresis. Tracks 5 : Total DNA extracted with the UltraClean™ Soil DNA Isolation kit using a soft cell lysis method..... 98
- Figure III-6 :** PCR amplification of rDNA from total DNA extracted from a limestone microbial biofilm. Track M: Lambda/*Hind* III molecular weight DNA marker (23130pb, 9416 pb, 6557 pb, 4361 pb, 2322 pb, 2027 pb, 564 pb). Track 1 : 16S rDNA amplified with the 8F/1489R primers. Track 2 : ITS DNA amplified with the ITS1/ITS4 primers.99
- Figure III-7 :** Restriction profiles of 16S rDNA clones from bacteria belonging to the microbial community of a limestone biofilm. Tracks 1: Low DNA mass ladder (100-2000 pb). Tracks 2 to 24 : Restriction profiles of 23 clones digested either by *Hae*III (top) or *Hin*fl restriction enzyme (bottom)..... 100
- Figure III-8 :** Phylogenetic tree of partial 16S rDNA gene sequences (613 pb) of SLB clones isolated from microbial community of a limestone biofilm. Percentages of 100 bootstraps re-samplings that support branching points above 50% confidence are indicated. GenBank accession numbers are given in parentheses. The number of clones having the same ribotype is indicated within grey boxes. The number of clones grouped into the same phylotype is given within black boxes. Scale bar represents 0.02 nucleotide changes per position. .... 102
- Figure III-9 :** Phylogenetic tree of partial 16S rDNA gene sequences (637 pb) of SSB clones isolated from microbial community of a sandstone biofilm. Percentages of 100 bootstraps re-samplings that support branching points above 50% confidence are indicated. GenBank accession numbers are given in parentheses. The number of clones having the same ribotype is indicated within grey boxes. The number of clones grouped into the same phylotype is given within black boxes. Scale bar represents 0.2 nucleotide changes per position. .... 104
- Figure III-10 :** Phylogenetic tree of partial ITS region sequences (513 pb) of ILB clones isolated from microbial community of a limestone biofilm. Percentages of 100 bootstraps re-samplings that support branching points above 50% confidence are indicated. GenBank accession numbers are given in parentheses. The number of clones having the

same ribotype is indicated within grey boxes. The number of clones grouped into the same phylotype is given within black boxes. Scale bar represents 0.05 nucleotide changes per position. .... 105

**Figure III-11** : Phylogenetic tree of partial ITS region sequences (549 pb) of ISB clones isolated from microbial community of a sandstone biofilm. Percentages of 100 bootstraps re-samplings that support branching points above 50% confidence are indicated. GenBank accession numbers are given in parentheses. The number of clones having the same ribotype is indicated within grey boxes. The number of clones grouped into the same phylotype is given within black boxes. Scale bar represents 0.2 nucleotide changes per position. .... 105

**Figure III-12** : Estimated phylotype richness (left panels) and coverage (right panels) versus library size for the four libraries constructed from limestone and sandstone biofilms. The two top panels are related to 16S rDNA clone libraries from limestone (SLB clones, open symbols) and sandstone (SSB clones, filled symbols) biofilms. The two bottom panels concern ITS clone libraries from limestone (ILB clones, open symbols) and sandstone (ISB clones, filled symbols) biofilms. .... 107

**Figure III-13** : Procédure de biologie moléculaire adoptée pour identifier les microorganismes se développant sur des façades en pierre. .... 111

**Figure IV-1** : Pierres calcaires d'Angoulême exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz, face à la mer. .... 117

**Figure IV-2** : Face recto (A) et face verso (B) d'une pierre calcaire d'Angoulême exposée pendant 22 mois sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz. .... 123

**Figure IV-3** : Observations au Microscope Electronique à Balayage à basse pression (A et B) et haute pression (C) des « points » verts s'étant formés sur la face verso des pierres avec un agrandissement d'une zone des points verts (D). .... 124

**Figure IV-4** : Graphiques représentant le nombre de bactéries en log d'UFC/cm<sup>2</sup> détectées sur milieu nutritif avec et sans ajout de sels, en fonction des prélèvements sur les faces recto (A) et verso (B) des pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz.... 127

**Figure IV-5** : Graphiques représentant le nombre de champignons en UFC/cm<sup>2</sup> détectés sur milieu Sabouraud avec et sans ajout de sels, en fonction des prélèvements sur les faces recto (A) et verso (B) des pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz. .... 127

<b>Figure IV-6</b> : Précipitations et températures moyennes de la ville de Biarritz, durant les mois de juin 2006 à mars 2008 (MétéoCiel, <a href="http://www.meteociel.fr">www.meteociel.fr</a> ).....	128
<b>Figure IV-7</b> : Concentrations en ions chlorures ( $\text{Cl}^-/\text{cm}^2/\text{j.}$ ) déposés entre 2000 et 2005 sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz (Musée de la Mer de Biarritz, communication personnelle).....	129
<b>Figure IV-8</b> : Arbre phylogénétique représentant les séquences partielles d'ADNr 16S des clones provenant du premier prélèvement. En rouge les clones isolés de la face recto, en vert les clones isolés de la face verso. La colonne de gauche représente le nombre de clones par ribotypes et la colonne de droite représente le nombre de clones par phylotype.....	135
<b>Figure IV-9</b> : Arbre phylogénétique représentant les séquences partielles ITS des clones provenant du premier prélèvement. En rouge les clones isolés de la face recto, en vert les clones isolés de la face verso et en jaune les clones isolés à la fois sur la face recto et la face verso. La colonne de gauche représente le nombre de clones par ribotypes et la colonne de droite représente le nombre de clones par phylotype. ....	136
<b>Figure IV-10</b> : Arbre phylogénétique représentant les séquences partielles d'ADNr 16S des clones provenant du deuxième prélèvement. En rouge les clones isolés de la face recto, en vert les clones isolés de la face verso. La colonne de gauche représente le nombre de clones par ribotypes et la colonne de droite représente le nombre de clones par phylotype.....	137
<b>Figure IV-11</b> : Arbre phylogénétique représentant les séquences partielles ITS des clones provenant du deuxième prélèvement. En rouge les clones isolés de la face recto, en vert les clones isolés de la face verso. La colonne de gauche représente le nombre de clones par ribotypes et la colonne de droite représente le nombre de clones par phylotype.....	138
<b>Figure IV-12</b> : Arbre phylogénétique représentant les séquences partielles d'ADNr 16S des clones provenant du troisième prélèvement. En rouge les clones isolés de la face recto, en vert les clones isolés de la face verso et en jaune les clones isolés à la fois sur la face recto et la face verso. La colonne de droite représente le nombre de clones par ribotypes et la colonne de gauche représente le nombre de clones par phylotype.....	139
<b>Figure IV-13</b> : Arbre phylogénétique représentant les séquences partielles ITS des clones provenant du troisième prélèvement. En rouge les clones isolés de la face recto, en vert les clones isolés de la face verso. La colonne de gauche représente le nombre de clones par ribotypes et la colonne de droite représente le nombre de clones par phylotype.....	140

- Figure IV-14** : Arbre phylogénétique représentant les séquences partielles d'ADNr 16S des clones provenant du quatrième prélèvement. En rouge les clones isolés de la face Recto, en vert les clones isolés de la face verso. La colonne de gauche représente le nombre de clones par ribotypes et la colonne de droite représente le nombre de clones par phylotype..... 141
- Figure IV-15** : Arbre phylogénétique représentant les séquences partielles ITS des clones provenant du quatrième prélèvement. En rouge les clones isolés de la face recto, en vert les clones isolés de la face verso. La colonne de gauche représente le nombre de clones par ribotypes et la colonne de droite représente le nombre de clones par phylotype..... 142
- Figure IV-16** : Arbre phylogénétique représentant les séquences partielles d'ADNr 16S des clones provenant du cinquième prélèvement. En rouge les clones isolés de la face recto, en vert les clones isolés de la face verso et en jaune les clones isolés à la fois sur la face recto et la face verso. La colonne de gauche représente le nombre de clones par ribotypes et la colonne de droite représente le nombre de clones par phylotype..... 143
- Figure IV-17** : Arbre phylogénétique représentant les séquences partielles ITS des clones provenant du cinquième prélèvement. En rouge les clones isolés de la face recto, en vert les clones isolés de la face verso et en jaune les clones isolés à la fois sur la face recto et la face verso. La colonne de gauche représente le nombre de clones par ribotypes et la colonne de droite représente le nombre de clones par phylotype. .... 144
- Figure IV-18** : Arbre phylogénétique représentant les séquences partielles d'ADNr 16S des clones provenant du sixième prélèvement. En rouge les clones isolés de la face Recto, en vert les clones isolés de la face verso et en jaune les clones isolés sur la face recto et la face verso. La colonne de gauche représente le nombre de clones par ribotypes et la colonne de droite représente le nombre de clones par phylotype. .... 145
- Figure IV-19** : Arbre phylogénétique représentant les séquences partielles ITS des clones provenant du sixième prélèvement. En rouge les clones isolés de la face recto, en vert les clones isolés de la face verso et en jaune les clones isolés sur la face recto et la face verso. La colonne de gauche représente le nombre de clones par ribotypes et la colonne de droite représente le nombre de clones par phylotype. .... 146
- Figure IV-20** : Arbre montrant les affiliations phylogénétiques du gène codant pour l'ARNr 16S partiel (608 pb) du clone et de la souche proches du genre *Herbaspirillum*. La barre d'échelle représente 0,01 substitutions par sites. .... 159
- Figure IV-21** : Evolution de la biodiversité microbienne à la surface des pierres calcaires d'Angoulême exposées 22 mois aux embruns marins de Biarritz. .... 161



**Figure A** : Arbre montrant les affiliations phylogénétique de tous les clones procaryotes provenant des trois sites (Villa Isabel en rouge, mairie de St-Sébastien en bleu, et terrasse du musée de la mer de Biarritz en jaune). La barre d'échelle représente 0,05 substitutions par sites..... 168

## Liste des tableaux

<b>Tableau I-1</b> : Paramètres influençant la bioréceptivité d'une pierre (Warscheid et Braams, 2000).....	10
<b>Tableau I-2</b> : Terminologie des préfixes servant à identifier les métabolismes rencontrés au sein du monde bactérien ( <i>trophe</i> vient du grec « <i>nourrir</i> »).....	10
<b>Tableau I-3</b> : Activité microbienne impliquée dans la détérioration de matériaux de construction (Gaylarde et Morton, 1999).....	51
<b>Tableau I-4</b> : Caractéristiques des différents groupes de biocides. ....	54
<b>Tableau II-1</b> : Amorces utilisées pour les réactions de PCR. ....	65
<b>Tableau III-1</b> : Teneur en éléments oxydés de la pierre calcaire d'Angoulême (Analyse faite par le laboratoire UT2A, IPREM, Pau).....	77
<b>Tableau III-2</b> : Teneur en éléments oxydés du grès d'Igueldo (J. Valero, communication personnelle). ....	77
<b>Tableau III-3</b> : Composition en sels de l'eau de mer.....	78
<b>Tableau III-4</b> : Composition des différents échantillons prélevés sur la Villa Isabel en pourcentage atomique. ....	81
<b>Tableau III-5</b> : Pics principaux des composés de référence dans les spectres DRX des échantillons analysés. ....	85
<b>Tableau III-6</b> : Taille des pores en m <sup>2</sup> /g des échantillons de pierre d'Angoulême prélevés sur la Villa Isabel. ....	86
<b>Tableau IV-1</b> : Densité des pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer après différents temps d'exposition. ....	120
<b>Tableau IV-2</b> : Coefficients d'absorption des pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer après différents temps d'exposition. ....	121
<b>Tableau IV-3</b> : Porosités en termes de surface des pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer après différents temps d'exposition.....	122
<b>Tableau IV-4</b> : Tableau montrant les résultats de culture des bactéries sur milieu nutritif obtenus à partir des pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz. Sur	

chaque face le nombre d'UFC/cm <sup>2</sup> des triplicats avec et sans présence de sels, ont été calculés.....	126
<b>Tableau IV-5</b> : Tableau montrant les résultats de culture des champignons sur milieu Sabouraud, obtenus à partir des pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz. Sur chaque face le nombre d'UFC/cm <sup>2</sup> des triplicats avec et sans présence de sels, ont été calculés.....	126
<b>Tableau IV-6</b> : Microorganismes isolés des différentes pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz.....	131
<b>Tableau IV- 7</b> : Banques de clones des différents prélèvements réalisés sur les pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz, ainsi que le nombre de ribotypes obtenus par ARDRA et le nombre de chimères identifiées après séquençage.....	133
<b>Tableau IV-8</b> : Présence ou absence des différentes bactéries identifiées sur les pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz. Les cases coloriées correspondent aux prélèvements (1 à 6) et à la face (R=recto, V=verso) sur lesquels le microorganisme a été identifié.....	148
<b>Tableau IV-9</b> : Présence ou absence des différentes algues identifiées sur les pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz. Les cases coloriées correspondent aux prélèvements (1 à 6) et à la face (R=recto, V=verso) sur lesquels le microorganisme a été identifié.....	149
<b>Tableau IV-10</b> : Présence ou absence des différents champignons identifiés sur les pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz. Les cases colorées correspondent aux prélèvement (1 à 6) et à la face (R=recto, V=verso) sur lesquels le microorganisme a été identifié.....	150
<b>Tableau IV-11</b> : Diversité et indices de Chao1 de chaque banques de clones pour les ADNr 16S et ITS de chaque prélèvement et chaque face des pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz.....	152



## Introduction générale

---

Les pierres des monuments et des constructions sont continuellement exposées à différents agents responsables de leur vieillissement, comme le vent, la pluie, le soleil, ou l'humidité. Bien qu'inéluctable, l'évolution de la dégradation de la pierre dépend de sa composition minérale et des conditions environnementales (Papida *et al.*, 2000; Warscheid et Braams, 2000). A ces facteurs s'ajoute le phénomène de biodétérioration ; en effet, il a été clairement établi que les microorganismes présents à la surface des pierres sous forme de biofilms jouent un rôle conséquent dans leur altération (Gaylarde et Morton, 1999; Mottershead *et al.*, 2003). Il a été estimé que 20 à 30% de la détérioration de la pierre est le résultat d'une activité biologique (Wakefield et Jones, 1998).

En milieu côtier, les bâtiments en pierre subissent une très forte détérioration, due à la présence de sels. Nobatek, Centre de Ressource Technologique récemment implanté sur la côte basque, s'est intéressé à la biodétérioration de la pierre en environnement marin. Nobatek a mis en place le projet ENSEL, soutenu par le Conseil des Elus du Pays Basque, qui a pour but de caractériser les pathologies de la pierre liées à l'environnement marin et de développer de nouveaux procédés de traitements spécifiques. Cette thèse fait partie intégrante de ce projet et fait l'objet d'un partenariat sous forme de convention CIFRE entre Nobatek et l'Université de Pau et des Pays de l'Adour. L'essentiel des recherches a été réalisé au sein de l'antenne du laboratoire de l'Equipe Environnement et Microbiologie (EEM) de l'Institut Pluridisciplinaire de Recherche sur l'Environnement et les Matériaux (IPREM), située sur le campus de Montaury, à Anglet. Nobatek a également fait appel aux compétences d'Inasmet (St-Sébastien, Espagne), qui a travaillé sur la biodétérioration des pierres, et de Labein (Bilbao, Espagne) qui travaille dans le domaine de la construction, pour mener à bien ce projet.

La plupart des recherches menées jusqu'à présent se sont focalisées sur l'étude des paramètres physico-chimiques de la détérioration et très peu d'études concernant les processus biologiques ont été reportées dans la littérature. Cependant, il est maintenant admis que les microorganismes jouent un rôle important dans la dégradation de la pierre et les recherches portant sur la biodégradation deviennent de plus en plus nombreuses dans les publications récentes.

Les microorganismes communément trouvés à la surface des pierres de construction sont des bactéries autotrophes et hétérotrophes, des champignons, des algues et des lichens (Gaylarde et Gaylarde, 2000; Gorbushina, 2007). Les effets néfastes causés par ces microorganismes sont d'ordre esthétique (modification de la couleur), physique (altération du matériau par pénétration et par impulsion de contraintes mécaniques) et chimique (corrosion de la matière minérale) (Warscheid et Braams, 2000).

La caractérisation des communautés microbiennes colonisant la pierre est une étape préalable indispensable pour assurer le contrôle du processus de biodétérioration et l'élaboration de traitements adaptés. Afin de caractériser les microorganismes présents sur les pierres, les méthodes de microbiologie classique, qui consistent en la mise en culture des microorganismes sur milieux synthétiques, ont été très utilisées. Cependant ces méthodes permettent uniquement d'identifier les microorganismes cultivables. Les méthodes moléculaires basées sur l'analyse du polymorphisme de l'ADN ont été développées au cours des 20 dernières années (Head *et al.*, 1998; Nocker *et al.*, 2007). Cependant, en ce qui concerne les biofilms microbiens responsables de la détérioration de la pierre de construction, très peu d'études moléculaires ont été décrites (Gonzalez et Saitz-Jimenez, 2005), et parmi elles, aucune n'a concerné jusqu'à présent la totalité d'une communauté microbienne.

La possibilité des microorganismes de former des biofilms leur fournit des avantages, comme une accessibilité accrue aux nutriments, une protection contre les toxines (biocides, métaux lourds, radiations UV), et constitue un abri contre la prédation. L'importance de la colonisation des surfaces par les microorganismes est donc de plus en plus reconnue. Cependant la dynamique de colonisation des surfaces dans les systèmes naturels, en particulier les premières étapes de colonisation, reste encore mal connue (Dang et Lovell, 2000). Il est présumé que la colonisation des surfaces par les bactéries suit une série ordonnée de processus. D'abord les espèces pionnières interagissent avec le support, forment l'assemblage initial sur la surface et produisent les exopolymères. La croissance et la reproduction de ces microorganismes va contribuer à la maturation du biofilm et modifier les caractéristiques de surfaces, ce qui va permettre le recrutement de nouveaux microorganismes. L'identification des microorganismes pionniers est donc un travail essentiel afin de pouvoir lutter contre les processus de biodétérioration des pierres.

Ce manuscrit s'articule autour de 4 parties. La première partie concerne une synthèse bibliographique (**Partie I**) qui présentera les connaissances actuelles sur les microorganismes

colonisant les façades en pierre et les méthodes d'analyses de ces microorganismes. D'autre part elle fera l'état de l'art sur les processus de biodétérioration ainsi que les modes de traitements existants actuellement pour lutter contre ceux-ci. Suivront, dans la partie II, les procédures expérimentales mises en œuvre tout au long de cette étude. Les résultats acquis et leurs interprétations feront l'objet des **parties III et IV**. Dans un premier temps (**partie III**), les mécanismes de détérioration chimique de deux types de pierre de construction les plus fréquentes sur le littoral du golfe de Gascogne, la pierre calcaire d'Angoulême et le grès d'Igueldo, ont été analysés. Cette étude a montré que les pierres sont fortement dégradées par les sels marins. En même temps, les biofilms microbiens qui se sont développés sur ces deux types de pierre ont été caractérisés. Pour ce faire, une méthode moléculaire permettant le génotypage des microorganismes eucaryotes et procaryotes se développant sur la pierre de construction a été développée, et fera l'objet d'une publication dans une revue de rang A. Ainsi, la méthode ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) a été adaptée aux biofilms microbiens présents à la surface des pierres. Cette phase a nécessité la sélection d'une méthode efficace pour extraire l'ADN de l'ensemble des microorganismes composant les biofilms, de la mise au point de l'amplification par PCR des gènes ribosomiques (ADNr 16S pour les procaryotes et régions ITS –Internal Transcribed Spacers - pour les eucaryotes), de leur clonage, de leur criblage par analyse de restriction, puis de leur séquençage pour pouvoir in fine procéder à l'identification des microorganismes.

La méthode ARDRA a été également utilisée afin d'évaluer l'évolution de la biodiversité microbienne au cours du processus de colonisation de la pierre par les microorganismes (**partie IV**). Des pierres calcaires d'Angoulême, fraîchement extraites d'une carrière et donc dépourvues de toute colonisation microbienne, ont été exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz en juin 2006. La biodiversité microbienne a été déterminée sur chacune des faces des pierres prélevées au bout de 6 mois d'exposition, puis quatre mois, puis tous les trois mois.

Cette analyse moléculaire des microorganismes prélevés à des temps croissants sur les pierres exposées aux embruns marins a permis de préciser la chronologie du processus de colonisation et d'identifier des organismes colonisateurs primaires particulièrement originaux.

En parallèle des analyses biologiques, des analyses physico-chimiques (porosité, densité, capillarité, microscopie, DRIFT, DRX, XPS) ont été réalisées sur les pierres exposées afin de suivre l'évolution de la structure chimique et physique des pierres au cours des 22 mois d'exposition.

Deux pierres de construction répandues sur le littoral du golfe de Gascogne ont été étudiées durant cette thèse, au niveau de leur composition physico-chimique, ainsi qu'au niveau des biofilms microbiens qui les ont colonisées. D'autre part, ces mêmes études ont été réalisées afin d'évaluer l'évolution de la pierre calcaire d'Angoulême aux premiers stades de son exposition aux embruns marins. Une conclusion générale sera consacrée à l'ensemble des résultats obtenus et aux différentes perspectives envisagées pour donner suite à ce travail.



# **I - Etude Bibliographique**

---

## **Introduction**

La pierre de construction est continuellement exposée à différents facteurs détériorants, comme le vent, la pluie, le soleil, ou l'humidité. A ces facteurs s'ajoute l'effet des microorganismes (biodétérioration), qui sont capables de se développer sur n'importe quelle surface sous forme de biofilms.

Avec l'ère industrielle, la concentration en composés organiques et inorganiques dans l'air a fortement augmentée, aggravant le processus de détérioration de la pierre. C'est pourquoi il est important pour la conservation de notre patrimoine historique d'étudier ce processus dans le but de le réduire, voire d'y remédier (Warscheid et Braams, 2000).

Les processus de détérioration par des agents physiques et chimiques sont bien connus alors que l'étude de la biodétérioration de la pierre n'est que très récente. Afin d'évaluer et trouver des solutions pour remédier à ce problème, il est nécessaire dans un premier temps de déterminer quels sont les acteurs responsables de ce processus.

Etudier la biodétérioration de la pierre revient : 1) à déterminer quels microorganismes composent les communautés épilithiques ; 2) à savoir s'il existe une relation entre les genres ou les espèces de microorganismes et la composition de la pierre ; 3) à identifier les microorganismes qui ont un rôle actif dans les processus de biodétérioration de la pierre et 4) à reconnaître le plus tôt possible les microorganismes détériorogènes (Tomaselli, 2000).

Dans cette revue bibliographique nous nous attacherons à exposer les différents travaux qui abordent ces questions en général et plus particulièrement celles qui font référence aux environnements marins qui nous préoccupent plus particulièrement.

Dans une première partie nous nous intéresserons au processus de colonisation de la pierre. Nous verrons que la nature, les propriétés, ainsi que certains paramètres environnementaux vont prédisposer une surface en pierre à être colonisée par des microorganismes. Nous décrirons ensuite quels microorganismes sont capables de se développer dans ces types d'écosystèmes et par quels moyens. Une deuxième partie sera consacrée aux méthodes actuelles qui permettent d'identifier les microorganismes. Dans la troisième partie, nous nous intéresserons au processus de biodégradation lui-même, qu'il soit de nature physique et/ou chimique et nous mettrons l'accent sur les environnements marins.

Enfin, dans la dernière partie, nous verrons quels traitements préventifs ou curatifs sont utilisés actuellement pour protéger les façades en pierre.

## **1- La pierre et les microorganismes**

Les microorganismes peuvent exister en tant que cellules libres (bactéries planctoniques), mais sont généralement retrouvés sur une surface et/ou interface inerte ou vivante (bactéries sessiles). Ils produisent des substances extracellulaires qui constituent une matrice complexe englobant les microorganismes, le tout formant le biofilm.

Les biofilms sont une forme de vie privilégiée pour les microorganismes, car en effet, ils leur permettent de se développer sur tout type d'interface, y compris air/eau, où suffisamment d'humidité est présente. De plus, se développer au sein d'un biofilm présente un avantage pour les bactéries sessiles comparées aux planctoniques. Quand des bactéries sont attachées à une surface, un nouveau phénotype apparaît : métabolisme différent, plus grand échange du matériel génétique, communication par l'intermédiaire de molécule-signaux spéciales (Quorum-sensing), qui résulte en une résistance accrue aux agressions extérieures, et une meilleure accessibilité aux aliments.

Il faut noter cependant que les biofilms ne sont pas des entités ayant des propriétés constantes. En effet, leurs caractéristiques sont dépendantes de l'environnement et des espèces de microorganismes qui les composent.

Lorsque la pierre de construction est extraite et exposée à un nouvel environnement, des microorganismes vont s'y déposer et être capables de la coloniser progressivement pour finalement former un biofilm à la surface de celle-ci. Les microorganismes sur les surfaces en pierre se développent très rarement en colonies comprenant une seule espèce : elles forment plutôt des communautés croissant collectivement. Cependant toute croissance de biofilm sur une pierre est influencée d'une part par ses propriétés physico-chimiques intrinsèques et d'autre part, par l'environnement dans lequel elle se situe. Avant toute étude de biodétérioration de la pierre, il est nécessaire de connaître non seulement les microorganismes présents, donc la biodiversité, mais aussi les facteurs influençant cette colonisation, afin de bien comprendre les différents processus impliqués dans la dégradation. Dans ce chapitre nous tacherons de décrire ces paramètres.

## **1.1- Facteurs influençant la colonisation de la pierre par les microorganismes ou bioréceptivité de la pierre**

En 1995, Guillite propose comme définition de la bioréceptivité : « la totalité des propriétés qui contribue à l'établissement, l'ancrage et le développement d'une population microbienne, flore ou faune sur ce matériau». En effet ce sont non seulement les caractéristiques physico-chimiques de la pierre mais également l'environnement dans lequel elle se situe qui vont influencer la colonisation de la surface de cette pierre par les microorganismes. Ces paramètres physico-chimiques et environnementaux définissent ainsi la bioréceptivité de la pierre (Shirakawa *et al.*, 2003) (Tableau I-1).

### **1.1.1- Propriétés physico-chimiques des pierres**

Papida *et al.* (2000) ont étudié en laboratoire la colonisation des bactéries sur trois types de pierre : la dolomite brune, le calcaire mou, et un calcaire poreux rose. Ils observent une préférence des colonisateurs pour les substrats les plus durs, qui offrent un environnement stable pour leur attachement et développement.

De même, les études de Tomaselli *et al.* (2000), ont montré une préférence des microorganismes pour tel ou tel substrat. Les cyanobactéries unicellulaires sembleraient préférer les substrats calcaires, alors que les cyanobactéries filamenteuses dépourvues d'hétérocystes, comme *Phormidium tenue*, *P. autumnale* et *Microcoleus vaginatus*, préfèrent les substrats siliceux.

Miller *et al.* (2006) ont cherché à déterminer les indices de bioréceptivité de la pierre pour les microorganismes phototrophes comme les cyanobactéries et les algues vertes. Ils ont démontré que la bioréceptivité est essentiellement contrôlée par la composition chimique et physique du substrat. En effet les souches microbiennes utilisées ont une meilleure croissance sur les substrats carbonés que sur les substrats siliceux. Le développement extensif des cyanobactéries et des micro-algues est donc influencé par la composition chimique de la pierre et facilité par la nature poreuse de la plupart des surfaces calcaires sur les monuments romains d'Italie.

Shirakawa *et al.* (2003) ont étudié les facteurs influençant la bioréceptivité d'un mortier vis-à-vis de champignons. Ils ont montré que les paramètres comme la granulométrie, la porosité, le degré de carbonatation du mortier et la relative humidité à laquelle les échantillons de mortier ont été exposés, sont des facteurs clés influençant la bio réceptivité de ces mortiers vis-à-vis des champignons.

Enfin, la microflore se développe plus facilement dans des systèmes poreux où l'accumulation d'eau est facilitée, ce qui favorise la croissance de cette microflore (May, 2003).

Les caractéristiques chimiques de la pierre peuvent également influencer la présence de microorganismes. En effet une pierre est susceptible d'être plus ou moins colonisée suivant les minéraux qui la constituent (carbone minéral, argile, Fe, Mn...) car ils peuvent être source de nutriments pour les microorganismes. Les pierres riches en carbone minéral comme le calcaire vont favoriser la présence de lichens et de champignons, puisque facilement attaquables par ceux-ci via la sécrétion d'acides (Warscheid et Braams, 2000).

Plusieurs facteurs comme la composition chimique, la densité des grains, la porosité, la rétention d'eau, la dureté de la surface, influencent donc la bioréceptivité de la pierre, et différemment selon le type de microorganismes (Tomaselli *et al.*, 2000).

### **1.1.2- Facteurs environnementaux**

L'emplacement d'une pierre influe sur sa bioréceptivité. En effet, en milieu côtier marin, les sels très agressifs, la rendent bioréceptive (augmentent la porosité, la rétention d'eau). C'est pourquoi de fortes détériorations de la pierre sont observées dans ces environnements. D'un autre côté un environnement tropical présente des conditions idéales pour la croissance bactérienne (Papida *et al.*, 2000).

Le vent et la pluie permettent l'apport de composés nutritifs, et l'humidité empêche le dessèchement, ce qui favorise la croissance bactérienne. D'un autre côté, les hautes températures, la sécheresse, les radiations solaires sont des conditions de stress pour les microorganismes, favorisant leur pénétration dans la pierre (Papida *et al.*, 2000; Warscheid et Braams, 2000).

De plus, les apports atmosphériques de nutriments, sous la forme de composés organiques volatils ou particulaires vont favoriser la croissance des microorganismes. Le manque d'apports en nutriments organiques peut sévèrement freiner la croissance des microorganismes même en conditions climatiques favorables. Inversement, une pollution trop importante peut nuire à la croissance. L'azote, élément essentiel pour les microorganismes,

peut par son apport atmosphérique accélérer la croissance des algues et des cyanobactéries (Chertov *et al.*, 2004).

<b>Paramètres généraux</b>	<b>Paramètres spécifiques favorisant la bioréceptivité</b>
propriétés physiques	Rugosité de la surface, degré d'hygrométrie élevé, porosité élevée
composition chimique	Teneur en carbonates > 3 % p/v ; présence de composés organiques fossilisés ; teneur en feldspath, argile ou minéraux ferrugineux > 5 % p/v
localisation, exposition	Températures modérées, forte humidité, salinité élevée
pollution atmosphérique	Oxydes d'azote et de soufre, composés organiques

**Tableau I-1** : Paramètres influençant la bioréceptivité d'une pierre (Warscheid et Braams, 2000).

### 1.2- Les colonisateurs de la pierre

Tous les groupes majeurs des microorganismes (chimio-lithotrophes, chimio-organo-hétérotrophes et photo-litho-autotrophes – voir Tableau I-2 pour les terminologies) peuvent être rencontrés dans les communautés de biofilms colonisant les pierres. Les algues, les bactéries, les champignons, les protozoaires, tout comme les animaux microscopiques tels que les mites et autres insectes, peuvent être présents. De plus, dans des lieux tempérés, les mousses peuvent former une partie de la communauté.

<i>Source d'énergie</i>	<i>Donneur d'électrons</i>	<i>Source de carbone</i>
chimique = <b>chimio-</b>	composé inorganique = <b>litho-</b>	CO <sub>2</sub> = <b>auto-</b>
lumineuse = <b>photo-</b>	composé organique = <b>organo-</b>	composé organique = <b>hétéro-</b>

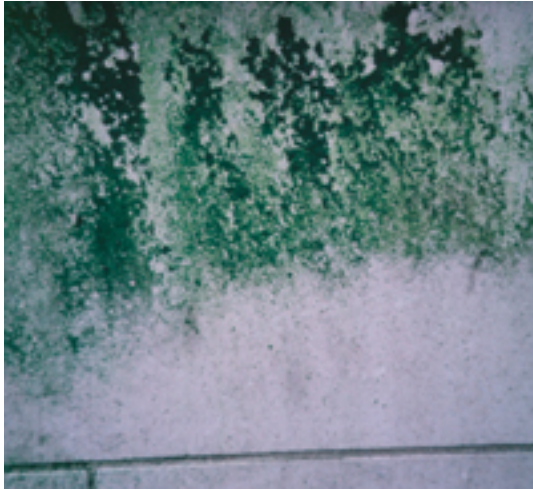
**Tableau I-2** : Terminologie des préfixes servant à identifier les métabolismes rencontrés au sein du monde bactérien (*trophe* vient du grec « *nourrir* »).

### 1.2.1- Les différents colonisateurs

#### a- Les microorganismes phototrophes

Les microorganismes phototrophes peuvent se développer sur les surfaces en pierre (phototrophes épilithiques) ou peuvent pénétrer de quelques millimètres dans les pores des pierres (phototrophes endolithiques). Parmi les microorganismes phototrophes, les algues et les cyanobactéries sont les plus communément rencontrées sur la pierre, et leur présence est facilement identifiable par la coloration résultante sur la façade (Tomaselli *et al.*, 2000; Warscheid et Braams, 2000; McNamara *et al.*, 2005; Fernandes, 2006) (Figure I-1). En effet, par la présence des pigments de chlorophylle, les algues et les cyanobactéries teignent les façades de vert. Lorsque les biofilms sont plus anciens, la coloration verte noircit. Les algues et les cyanobactéries ainsi que d'autres bactéries phototrophes tels que les bactéries phototrophes anoxygéniques peuvent posséder d'autres pigments comme les caroténoïdes, qui vont provoquer des colorations rouges, brunes ou jaunes à la surface des façades.

Les algues ont un rôle majeur dans la défiguration de bâtiments. Elles sont particulièrement répandues dans des aires ombragées avec un taux d'humidité important, comme les environnements ruraux ou les aires plus boisées. Dès qu'elles disposent suffisamment d'eau, les algues microscopiques forment un groupe d'organismes capables de coloniser n'importe quelle surface. Le substrat solide peut abriter une densité d'algues plus ou moins importante. Les algues vertes principalement rencontrées sur les façades en pierre sont *Chlorella*, *Desmococcus*, *Phycopeltis*, *Printzina*, *Trebouxia*, *Trentepohlia* et *Stichococcus* (Gorbushina, 2007).



**Figure I-1 :** Développement d'algues sur du grès (site internet 1)



**Figure I-2 :** Eglise « Nossa Senhora das Dores » (Porto Alegre, Brésil) montrant des biofilms noirs au niveau des infiltrations d'eau (Crispim *et al.*, 2004)

Les cyanobactéries épilithiques sont probablement les Eubactéries les plus étudiées. Les cyanobactéries épilithiques et endolithiques peuvent être trouvées dans les déserts chauds et froids, les régions tempérées, les semi-déserts et les savanes, les forêts, et même des régions polaires. Les biofilms épilithiques dominés par les cyanobactéries sont généralement associés aux infiltrations d'eau sur les surfaces de pierre (Figure I-2) et forment des traînées noires. Des espèces diverses coccoïdes ou filamenteuses, comme *Calothrix*, *Gloeocapsa*, *Nostoc*, *Stigonema*, *Phormidium*, *Scytonema* sont trouvées sur les surfaces en pierre (Gorbushina, 2007). Tomaselli *et al.* (2000) ont montré une préférence des cyanobactéries pour certains substrats. En effet certains genres et espèces de cyanobactéries sont plus fréquemment associés aux substrats calcaires comme *Myxosarcina concinna*, *Chroococcus minor*, *Gloeocapsa biformis*, *Pleurocapsa sp.* et *Scytonema sp.*, et d'autres aux substrats artificiels (peintures, enduits) comme *Nostoc punctiforme*, *N. muscorum*, *Chroococcidiopsis*, et enfin *Leptolyngbya* sur les fresques et les plâtres. La préférence des genres de *Chlorophyceae*, *Apatococcus* et *Stichococcus* pour les substrats calcaires est également à remarquer.



Gaylarde et Morton (1999) listent également les bactéries photosynthétiques considérées comme capables de détériorer les pierres et ciments :

*Aphanocapsa*, *Aphanothece*, *Calothrix*, *Chaemisiphon*, *Chroococcus*, *Gloeocapsa*, *Hyella*, *Microcoleus*, *Myxosarcina*, *Nostoc*, *Phormidium*, *Plectonema*, *Pleurocapsa*, *Schizothrix*, *Scytonema*, *Synechocystis*, *Tolypothrix*.

Pour conclure, grâce à leurs capacités de photosynthèse et de fixation de l'azote atmosphérique, les cyanobactéries sont des composants importants des biofilms de roche. De plus, elles sont bien adaptées à la dessiccation et aux radiations solaires (Crispim et Gaylarde, 2005).

Les lichens constituent un cas particulier de microorganismes phototrophes se développant sur les surfaces en pierre. Ils sont définis comme : une association symbiotique entre une algue ou cyanobactérie (photobionte) et un champignon ou une bactérie hétérotrophe (mycobionte), qui forme un thalle stable bien caractérisé morphologiquement et physiologiquement. Le photobionte est chargé de fournir le carbone, alors que le mycobionte fournit l'eau et les sels minéraux nécessaires au développement du lichen (COALITION, 2002; Watanabe *et al.*, 2005).

En général, la relation symbiotique des lichens est irréversible, et si les constituants sont séparés et cultivés indépendamment ils ne peuvent pas spontanément se recombinaer (Watanabe *et al.*, 2005). Il faut de plus remarquer que la relation symbiotique entre le photobionte et le mycobionte peut être du commensalisme ou du mutualisme. Watanabe *et al.* (2005) semblent être les premiers à reporter des interactions symbiotiques entre *Chlorella*, des bactéries ou des champignons. Ils montrent que les souches CSSB-1 et CSSB-2 proches du genre *Sphingomonas* présentent un commensalisme avec *C. sorokiniana*, recevant des nutriments de la micro-algue sans en affecter sa croissance. Pour finir, cette association symbiotique représente un avantage écologique pour le lichen, puisqu'il permet au thalle de coloniser une large gamme de substrats, même dans des conditions difficiles, dans des environnements extrêmes, ce qui explique qu'on les retrouve même dans des milieux très inhospitaliers. Cette association peut s'être développée comme un système rationnel de survie au niveau de la sélection naturelle (Adamo et Violante, 2000).

b- Les bactéries chimio-organotrophes et chimio-lithotrophes

Il est connu depuis le début des recherches sur la biodétérioration de la pierre que les bactéries chimio-organotrophes et chimio-lithotrophes sont abondantes sur les différents types de roches.

Les bactéries chimio-lithotrophes oxydent des composés inorganiques comme l'ammoniaque, les nitrites, le sulfure d'hydrogène, les thiosulfates, pour obtenir l'énergie. Il en résulte le rejet d'acide nitreux par *Nitrobacter*, d'acide nitrique par *Nitrosomonas* et d'acide sulfurique par *Thiobacillus* (Warscheid et Braams, 2000).

Un petit groupe de bactéries cultivables organo-hétérotrophes (*Arthrobacter* sp., *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Paenibacillus* sp., *Pseudomonas* sp. et *Rhodococcus* sp.) ont été identifiées comme les microorganismes les plus communément présents à la surface de la pierre (Albertano et Urzi, 1999; Videla *et al.*, 2000). La présence des Actinomycètes est connue pour être restreinte aux étapes avancées de la colonisation de la roche (Albertano et Urzi, 1999).

L'identification directe par biologie moléculaire des microorganismes se développant à la surface des pierres a permis d'identifier des bactéries jusqu'alors jamais observées sur les pierres. De nouvelles bactéries appartenant aux alpha- (*Halomonas*, *Clostridium*), beta- et gamma-protéobactéries ont été identifiées (Gurtner *et al.*, 2000; Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2001a; Sarro *et al.*, 2006; Imperi *et al.*, 2007). Sarro *et al.* (2006) de même que Suihko *et al.* (2007) ont identifié des bactéries appartenant au genre *Deinococcus* qui sont connues pour être très résistants aux radiations UV mais aussi à la dessiccation. Sarro *et al.* (2006) ont aussi identifié des Acidobactéries. Les Actinobactéries du genre *Rubrobacter* ont été observées sur des façades colorées de rouge par le biofilm (Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2001c; Imperi *et al.*, 2007).

Gurtner *et al.* (2000) et Rölleke *et al.* (1998) se sont intéressés aux Archaeobactéries et ont identifiés des bactéries halotolérantes appartenant aux genres *Halobacterium*, *Haloferax* et *Halococcus* à la surface de fresques murales à l'aide des techniques de biologie moléculaire.

Des bactéries méthanotrophes ont également été isolées de maçonneries. Le méthane atmosphérique seul, ne peut pas aider la croissance des méthanotrophes. Cependant, les augmentations en concentrations locales causées par les émissions anthropogéniques de

méthane et méthanol ou par des producteurs endolithiques de méthane, peuvent être suffisantes pour la croissance des méthanotrophes sur des maçonneries (Kussmaul *et al.*, 1998).

c- Les champignons microscopiques

Les champignons sont ubiquistes dans l'environnement et accomplissent un nombre important de fonctions écologiques, notamment dans le recyclage des molécules carbonées dans les sols. Malgré cela, notre connaissance de la diversité des communautés de champignons, en particulier du sol, et de leur fonctionnement reste restreinte par rapport à celle des bactéries (Anderson et Cairney, 2004). Environ entre 5-10% d'espèces de champignons ont été décrites, sachant qu'il existe environ 1-1,5 million d'espèces (Viaud *et al.*, 2000; Sert *et al.*, 2007).

Les champignons de la pierre peuvent être divisés en deux groupes majeurs :

a) les Hyphomycètes et les Coelomycètes comme *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Phoma* et beaucoup d'autres. Ils dominent sous les conditions favorables (saison douce, forte humidité, nutriments abondants, proximité du sol) (Gorbushina, 2007).

b) les champignons méristématiques ou « levures noires » mélanisées comme les Ascomycètes de l'ordre des *Chaetothyriales*, *Dothideales*, *Capnodiales*. Ils dominent sous des conditions d'environnement difficiles et hostiles (Hirsch *et al.*, 1995; Sert *et al.*, 2007). Les champignons méristématiques sont parfaitement adaptés à la vie sur les pierres, et sont les habitants les plus persistants des surfaces de pierre, car ils sont capables de se développer sous forme de microcolonies (« yeast like » ou levures noires, voir la définition après). Ils sont considérés comme des spécialistes de l'affaiblissement de la pierre (voir paragraphe 3.2), avec les bactéries coryneformes et les actinomycètes. Ils forment des petits points sur la surface de la pierre (ou « biopitting ») (Sterflinger et Gorbushina, 1997).

Il existe quelques rares cas où les communautés de champignons épilithiques du marbre, du calcaire, du grès et des autres surfaces en pierre ont été complètement inventoriées. Il y a toujours peu d'espèces qui ont été décrites et caractérisées (Sert *et al.*, 2007). Cela est en partie dû à des différences phénotypiques entre deux isolats d'une même espèce de champignon qui peuvent être aussi prononcées que pour deux espèces distinctes

(Gomes *et al.*, 2002). Cependant Gaylarde et Morton (1999) citent quelques champignons impliqués dans la détérioration de la pierre (isolés ou identifiés par biologie moléculaire) :

*Alternaria, Aspergillus, Aureobasidium, Botrytis, Candida, Cladosporium, Curvularia, Exophiala, Fusarium, Mucor, Paecilomyces, Penicillium, Phoma, Sporobolomyces, Trichoderma, Verticillium.*

Les substrats minéraux exposés aux stress environnementaux ont tendance à perdre les nutriments organiques et sont donc réfractaires à une croissance mycélienne rapide. Pour surmonter ces difficultés, certains groupes de champignons ont abandonné leur système d'élongation par les hyphes (qui est plus approprié pour la pénétration et l'utilisation de substrats) et ont adopté une croissance par micro-colonies ou comme les levures, c'est pourquoi ils ont été appelés levures noires. Ces formes plus petites et compactes leur permettent de se protéger plus efficacement contre la chaleur et la dessiccation. En d'autres termes, les champignons habitant la pierre se développent souvent comme des micro-colonies, structures qui augmentent leur survie et leur persistance sur les surfaces exposées à des stress environnementaux. De plus, la présence de pigments de mélanine leur permet de mieux résister aux radiations UV (Gorbushina, 2007; Sert *et al.*, 2007).

### **1.2.2- Les méthodes d'adaptation des microorganismes à la pierre et son environnement**

Classiquement un environnement extrême est défini comme un milieu dont les conditions environnementales sont à la limite des conditions tolérées par les cellules biologiques. Les conditions de vie tolérées par l'être humain servent usuellement de référence pour définir ce type d'environnements. Le terme « extrême » inclut entre autres des conditions physiques de température, radiation ou de pression en dehors de la gamme tolérées par l'homme, ou encore des conditions géochimiques de dessiccation ou d'anoxie. Ce terme est par exemple couramment employé pour désigner des milieux comme les sources chaudes ou les milieux saturés en sel (Herrera, 2006).

L'environnement dans lequel est exposée une pierre de construction est très souvent déclaré comme extrême. En effet, celle-ci va être exposée à des cycles de variations de température ainsi que d'exposition aux UV brutaux, de même que des cycles

d'humidité/sécheresse, ou gel/dégel. Les microorganismes présents sur ces pierres vont développer divers moyens de protection (exo-polymères, pigments, antioxydants...) contre cet environnement extrême.

Tout d'abord, un contact proche et synergique est établi entre les différents microorganismes dans les biofilms se développant sur les pierres. En effet, les habitants de la pierre doivent résister à plusieurs stress physiques, et sont donc rarement sujets à des compétitions et antibioses biologiques. Cette thèse a été en premier élaborée pour les microorganismes habitant l'Antarctique, puis s'est largement appliquée à tous les biofilms de pierre. Dans les environnements hostiles des pierres, le coût des activités métaboliques pour la survie est si élevé que les antibioses sont souvent défavorables.

Les organismes poikilo-tolérants (du grec *poikilos* = différent) adaptés aux stress utilisent donc leur énergie pour survivre et ainsi la plupart des produits secondaires du métabolisme sont destinés à les protéger des stress physiques et non à combattre d'autres compétiteurs.

Le biofilm développé à la surface d'une pierre, résulte d'associations mutuelles neutres ou bénéfiques entre les microorganismes phototrophes ou chimio-organotrophes (Gorbushina, 2007).

Un autre mécanisme permettant aux microorganismes de se protéger contre ces variations et expositions est la sécrétion de substances exo-polymères (EPS), constituées essentiellement de polysaccharides, mais comprenant aussi des lipides et des protéines. Cette mixture complexe aide à la consolidation du biofilm et le protège, mais constitue aussi un réservoir pour le stockage des nutriments (Fernandes, 2006). Les EPS servent également à l'osmo-protection des cellules, ainsi qu'à retenir l'eau durant de longues périodes, caractéristique importante pour maintenir la vie lors des périodes de sécheresse. Les EPS permettent donc de :

- 1- faciliter l'accès à la vapeur d'eau de l'atmosphère et la retenir durant de longues périodes,
- 2- stocker des nutriments
- 3- établir une protection physique contre les agressions extérieures
- 4- fixer les particules en suspensions dans l'air (apport de nutriments)

La synthèse de pigments (photosynthétiques ou non) est également un mécanisme de protection des microorganismes vis-à-vis de l'environnement extrême dans lequel ils évoluent. Ces pigments constituent en effet un bouclier réel contre les effets néfastes des radiations UV (Gorbushina, 2007).

### **1.2.3- Conclusion**

Les microorganismes sur les surfaces en pierre se développent très rarement en colonies comprenant une seule espèce. Ils forment plutôt des communautés croissant collectivement.

Trois paramètres vont influencer la colonisation de la pierre par les microorganismes :

1- les propriétés chimiques et physiques de la pierre : les pierres poreuses vont abriter un plus grand nombre de microorganismes car les conditions de vie à l'intérieur de la pierre sont plus modérées qu'à la surface de la pierre.

2- les conditions climatiques qui peuvent être extrêmes : ensoleillement très fort, humidité extrême, températures très élevées ou très basses, qui vont favoriser la présence d'espèces adaptées à ces conditions.

3- la disponibilité en nutriments : les nutriments organiques peuvent être fournis à la fois par les organismes autotrophes présents sur le matériau ou par les particules de l'air (salissures, carbonates, composés aromatiques).

Les surfaces solides exposées à l'atmosphère sont colonisées par des écosystèmes complexes au niveau de leur structure et fonction. Celles-ci sont très variées : surface des plantes, sédiments, sols et pierre. Les biofilms de pierre sont constitués d'algues, de champignons, de bactéries phototrophes, hétérotrophes et lithotrophes. Ces derniers vont se développer de façon synergique, en fonction de l'environnement et du substrat. Afin de se protéger des conditions environnementales extrêmes de la pierre, ils sont adaptés ou se sont adaptés en développant des mécanismes de protection (EPS, pigments, pénétration). Cependant ces mécanismes de protection, bénéfiques pour les microorganismes vont avoir un effet néfaste sur le substrat, et vont provoquer une biodétérioration de la pierre.

Mais avant d'exposer les mécanismes connus de biodétérioration de la pierre, nous allons voir dans le chapitre suivant de cette synthèse bibliographique quels sont les méthodes pour étudier la diversité microbienne d'un échantillon environnemental.

## **2- Etude de la biodiversité**

Depuis maintenant plusieurs années, la relation existant entre la biodiversité, définie simplement comme un nombre d'espèces présentes dans un système, et le fonctionnement de cet écosystème, fait l'objet d'un intérêt particulier au sein de la communauté des biologistes, et tend de plus en plus à devenir une préoccupation de notre société. Le souci de conserver la biodiversité et son rôle dans le maintien d'une biosphère fonctionnelle a motivé un grand nombre de travaux, qui ne cesse encore aujourd'hui de croître. En effet, dans de nombreuses études, les ambitions implicites, mais néanmoins réelles, sont très souvent (i) de caractériser la biodiversité afin de mieux comprendre (voir même manipuler) le fonctionnement de l'écosystème et (ii) de montrer que la capacité d'un environnement à répondre à diverses perturbations peut dépendre en partie de la diversité de l'écosystème.

De manière générale, la diversité peut être définie comme étant « la mesure de la composition en espèces d'un écosystème, en terme du nombre d'espèces et de leurs abondances relatives » (Legendre et Legendre, 1984). Appliquer cette définition aux communautés microbiennes revient donc à décomposer la diversité en deux éléments : non seulement le nombre d'espèces microbiennes ou UTOs (Unités Taxonomiques Opérationnelles) dans la communauté, mais également leur abondance.

Ensuite, appréhender la diversité d'une communauté microbienne présente dans un environnement revient à essayer de répondre à trois questions : (i) Combien d'espèces, ou UTOs, sont présentes dans la communauté et dans quelle proportion ? », (ii) « Quelles sont ces espèces ou UTOs ? », et encore (iii) « quelles fonctions assurent-elles au sein de cet écosystème ? ». Cette dernière question reste encore aujourd'hui très difficile à aborder, car l'étude de la diversité se fait aujourd'hui en majorité à l'aide des techniques de biologie moléculaire qui permettent d'identifier phylogénétiquement de nombreux microorganismes dont les propriétés métaboliques restent inconnues car non cultivés. De plus, un même microorganisme peut exercer plusieurs fonctions différentes dans un même écosystème ou selon un environnement.

Une des plus grandes difficultés à étudier les communautés microbiennes vient de l'immense diversité du monde microbien. Selon plusieurs estimations, nous ne connaissons



que 0,5% à 10% de toute la diversité du monde microbien présent dans la biosphère (Rondon *et al.*, 2000; Curtis *et al.*, 2002).

Pourtant notre vision de cette diversité microbienne a évolué au cours du temps, avec les diverses méthodologies disponibles, et continue encore aujourd'hui de s'améliorer avec les récents progrès réalisés en génétique et biologie moléculaire. Ces dernières méthodologies, associées aux sciences de l'environnement, ont permis d'accéder par exemple à la fraction des microorganismes non-cultivables. Différentes techniques (microbiologiques, biochimiques et moléculaires) permettent de caractériser les communautés microbiennes. Deux revues de qualités résument bien l'utilisation de ces différentes méthodes pour des échantillons environnementaux, en particulier pour le sol (Kozdroj et Van Elsas, 2001; Kirk *et al.*, 2004).

Bien que ces techniques soient utilisées de plus en plus fréquemment pour l'analyse des sols, elles n'ont été que peu utilisées pour la préservation et la restauration du patrimoine culturel. Jusqu'à récemment, l'identification des microorganismes vivants responsables de la détérioration de ces matériaux se faisait par les méthodes classiques d'identification phénotypiques. Cette tendance change, comme cela est démontré par la quantité de travaux récemment publiés qui se focalisent dans l'utilisation de techniques basées sur la biologie moléculaire pour la détection de microorganismes présents sur la pierre. Ces techniques complètent et élargissent les informations réunies jusqu'à présent par les méthodes conventionnelles d'identification (Fernandes, 2006).

Il faut noter que l'étude de la diversité microbienne d'échantillons de sol fait l'objet de nombreuses publications. Etant donné que l'écosystème « sol » est proche de celui de la « pierre », nous nous sommes plusieurs fois appuyés sur ces références pour les chapitres qui suivent.

### **2.1- Les méthodes microbiologiques et biochimiques**

Les premières méthodes à avoir été utilisées sont les méthodes microbiologiques. En effet la diversité peut être estimée en cultivant les microorganismes sur des milieux sélectifs. Cette méthode est rapide et économique, mais présente l'inconvénient de sélectionner les microorganismes et de favoriser ceux qui ont une croissance rapide.

La caractérisation des microorganismes isolés fait souvent appel aux systèmes API et Biolog qui sont basés sur les activités métaboliques et physiologiques des microorganismes. Ils sont très utiles pour évaluer la diversité fonctionnelle de la communauté. Ces méthodes présentent le désavantage de détecter uniquement les microorganismes cultivables. Or il est estimé que seulement 1% des espèces microbiennes d'un échantillon environnemental peut être cultivé (Röllerke *et al.*, 1996; Kozdroj et Van Elsas, 2001).

L'analyse FAME (*Fatty Acid Methyl Ester*), qui ne nécessite pas de cultiver les microorganismes, se base sur leur identification grâce à la composition en acides gras de leur membrane. Ceux-ci sont directement extraits d'un échantillon, puis méthylés et analysés par chromatographie gazeuse. Cependant cette méthode nécessite un grand nombre de cellules ce qui peut interférer sur la détection d'espèces mineures et elle ne permet de différencier que les groupes taxonomiques majeurs d'une communauté. Dans le cas de la pierre, Heyrman *et al.* (1999) se sont servi de l'analyse FAME pour faire la caractérisation primaire de microorganismes hétérotrophes et la comparaison de trois peintures murales dégradées par les microorganismes.

## ***2.2- Les techniques basées sur la biologie moléculaire***

Pour s'affranchir du problème des microorganismes non cultivables, les techniques de biologie moléculaire se sont développées, ce qui a permis une caractérisation plus exhaustive de la diversité microbienne. De plus, grâce à ces méthodes, la quantité d'échantillon nécessaire a été fortement réduite, permettant d'ouvrir les recherches vers des micro-habitats qu'il était impossible d'étudier auparavant.

En effet, basées sur les spécificités du génome de chaque espèce (phylogénie), les techniques de biologie moléculaire permettent de distinguer génétiquement les microorganismes dans des environnements complexes. Dans la Figure I-3 il est montré la démarche générale de l'approche moléculaire lors de l'étude d'une communauté microbienne.

Les techniques de biologie moléculaire consistent en l'extraction de l'ADN ou ARN d'un échantillon, puis l'amplification par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) à l'aide d'amorces universelles d'une région spécifique de cet ADN (Möhlenhoff *et al.*, 2001; Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2001a; Prosser, 2002). Cette population de fragments de gènes est

considérée comme représentative de la population microbienne naturelle. Enfin, le polymorphisme existant entre les régions cibles de chacune des espèces est déterminé par différentes méthodes de biologie moléculaire (Kozdroj et Van Elsas, 2001; Kirk *et al.*, 2004) (Figure I-3).

La méthode DGGE (*Dénaturing Gradient Gel Electrophoresis*) est fréquemment utilisée pour déterminer le polymorphisme existant entre les différentes séquences d'ADN amplifiées. Elle est basée sur la migration différentielle des séquences d'ADN dans un gel de polyacrylamide contenant un gradient d'agents chimiques dénaturant, en fonction de leur séquence et de leur pourcentage en GC. La TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*) est basée sur le même principe, sauf que l'électrophorèse est réalisée dans un gradient de température. Cette méthode est la plus couramment rencontrée pour l'étude de la biodiversité microbienne de la pierre (Rölleke *et al.*, 1996; Gurtner *et al.*, 2000; Möhlenhoff *et al.*, 2001; Gonzales et Saitz-Jimenez, 2005) car la méthode est rapide et permet de comparer facilement deux communautés, mais également les bandes d'intérêt du gel DGGE ou TGGE peuvent être excisées du gel d'électrophorèse, réamplifiées et séquencées, ou transférées sur des membranes et hybridées avec des sondes spécifiques pour permettre une caractérisation plus fine de la diversité structurale et fonctionnelle de la communauté microbienne.

La SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*) permet la séparation des ADN dans un gel de polyacrylamide grâce aux variations de mobilité en fonction des structures secondaires adoptées par les différentes séquences d'ADN. Cette technique permet de visualiser le profil de la communauté.

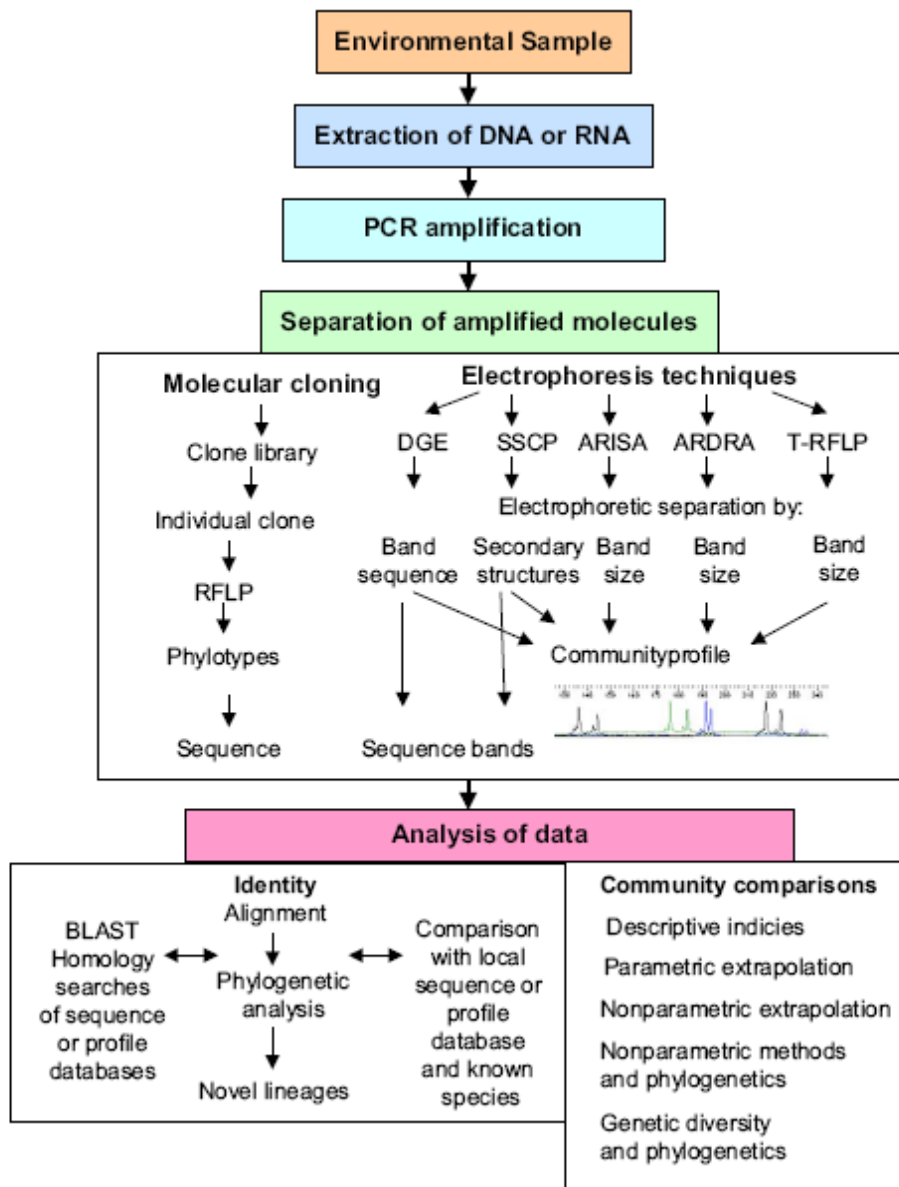
L'ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) ou plus généralement la RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) permettent d'analyser le polymorphisme grâce aux différences de longueur de fragments de restriction. Dans ce cas, les séquences d'ADN amplifiées sont digérées par des enzymes de restriction et les fragments de différentes longueurs résultants sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose non dénaturant. Cette méthode a été testée par Tomaselli *et al.* (Tomaselli *et al.*, 2000), couplée avec les méthodes de culture pour estimer la biodiversité des microorganismes photosynthétiques se développant sur des monuments en pierre.

La T-RFLP (*Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism*) dérive de la RFLP, mais une amorce de PCR est marquée par fluorescence, permettant la détection, par

électrophorèse sur capillaire, uniquement des fragments terminaux des ADN digérés par les enzymes, ce qui simplifie les profils de digestion.

Le clonage des gènes amplifiés et leur séquençage permet d'obtenir une information et une discrimination plus fine des groupes microbiens. La comparaison des séquences obtenues avec celles des bases de données détermine quels groupes phylogénétiques sont présents et, dans la majorité des cas, permet une identification plus détaillée. Cette approche est particulièrement utile pour l'étude des bactéries, pour lesquelles un grand nombre de séquences d'ADNr sont disponibles dans les bases de données. Elles contiennent des séquences d'un très grand nombre de bactéries cultivées en laboratoire et aussi de clones obtenus à partir de différents environnements, qui ne sont représentés que par des séquences d'ADN. Les bases de données sur les champignons grandissent, mais aujourd'hui elles sont moins étendues et informatives que pour les bactéries, excepté pour les groupes phylogénétiques qui ont fait l'objet d'études taxonomiques détaillés. Si un nombre suffisant de clones ont été séquencés, l'estimation de l'abondance relative des différents groupes peut être obtenue (Prosser, 2002).

Les techniques de biologie moléculaire les plus utilisées pour l'analyse de la biodiversité microbienne sont donc basées sur l'analyse de l'ADN en ciblant des gènes. La plupart des études sont ciblées sur les gènes codant pour l'ADN ribosomal de la petite sous-unité. L'analyse de l'ARNr 16S est aujourd'hui largement utilisée pour l'étude de populations bactériennes, et l'analyse des gènes codant pour l'ARNr 18S et des espaces internes transcrits (ITS : Internal Transcribed Spacer) sont utilisés de plus en plus pour analyser les populations fongiques. Les gènes codant pour l'ARNr sont des gènes idéaux car ils possèdent des régions conservées entre toutes les bactéries ou champignons, facilitant l'alignement de séquence lorsque des comparaisons sont faites, alors que d'autres régions exhibent des degrés de variations différents, ne permettant pas la distinction entre différents groupes. L'analyse de la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S chez les bactéries permet une discrimination fine. Chez les champignons, la séquence du gène codant pour l'ARNr 18S ne permet qu'une discrimination au niveau des genres et très rarement au niveau des espèces, mais une information plus fine peut être obtenue par l'analyse des régions ITS (Prosser, 2002) (discuté ci-après).



**Figure I-3 :** Approches basées sur la PCR pour l'analyse d'acides nucléiques environnementaux. (D'après Mitchell et Zuccaro (2006).

Il doit être souligné, qu'aujourd'hui, aucun couple unique d'amorces ou technique d'étude de profil des communautés n'est optimal pour l'estimation de la diversité microbienne, mais ils doivent être choisis suivant le but de la recherche, le groupe de microorganismes ciblés et le contenu des banques de données. Par exemple, l'analyse de la diversité fongique, sur la base de la richesse et de l'abondance relative ainsi que la dynamique de la communauté, est compliquée à la fois par la nature mycélienne des champignons et la présence potentielle des spores dans l'échantillon donné (Anderson et Cairney, 2004).

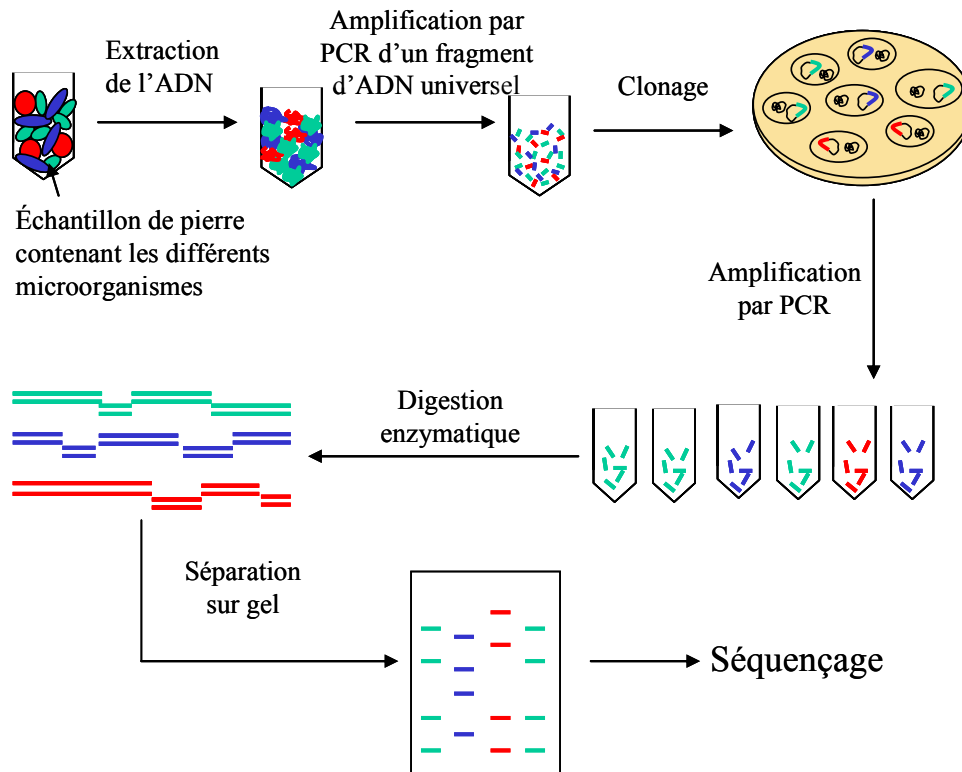
Durant la thèse, nous avons utilisé les méthodes de clonage et RFLP pour analyser la diversité microbienne des biofilms se développant sur la pierre de construction, c'est pourquoi elles vont être détaillées dans la partie suivante.

Viaud *et al.* (2000) ont testé la RFLP à la fois sur des champignons cultivés et l'ADN total extrait du même échantillon environnemental. Ils ont montré que cette méthode est performante et qu'une diversité plus grande est observée à partir de l'analyse directe de l'ADN total extrait par rapport aux méthodes de culture.

### **2.3- La RFLP, méthode de biologie moléculaire**

La technique de clonage et RFLP repose sur l'analyse du polymorphisme d'un gène cible présent chez tous les micro-organismes de la communauté microbienne étudiée (Figure I-4).

Tout d'abord l'ADN de tous les microorganismes prélevés dans l'échantillon est extrait. Un gène cible de l'ADN est ensuite amplifiée par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) à l'aide d'amorces universelles. Chaque fragment d'ADN amplifié provenant de microorganismes différents du mélange est cloné dans des cellules bactériennes afin d'être isolé. Pour cela, ils sont intégrés dans un vecteur plasmidique qui est ensuite transféré dans *Escherichia coli* afin qu'ils s'y répliquent. Ces vecteurs sont ensuite extraits d'*E. coli* et le gène cible porté par chacun des clones d'*E. coli* est amplifié par PCR. Ces différents amplicons sont alors digérés par des enzymes de restriction qui couperont l'ADN en différents endroits selon le polymorphisme des gènes cibles isolés. Les profils sont analysés dans le but de regrouper les gènes identiques censés appartenir à la même espèce. L'ADN de chaque groupe, représentant une espèce ou genre différent, est finalement séquencé pour identifier cette espèce par comparaison avec l'ensemble des séquences d'ADN déposées dans les banques de données (Kozdroj et Van Elsas, 2001).



**Figure I-4 :** Démarche générale employée pour estimer la diversité microbienne de la pierre.

Dans les paragraphes suivants, les différentes étapes de cette démarche vont être discutées plus en détail.

### 2.3.1- Extraction de l'ADN de l'échantillon environnemental

Les analyses moléculaires de communautés microbiennes d'échantillons environnementaux requièrent une extraction et des méthodes de purification efficaces et non biaisés. L'extraction directe de l'ADN d'échantillons environnementaux produit plus d'ADN, contient moins d'acides humiques, requiert un temps plus court et introduit moins de biais que les méthodes d'extraction indirecte pour lesquelles les cellules sont séparées de la matrice de l'échantillon avant l'extraction (Yang *et al.*, 2007).

La lyse de cellules microbiennes d'habitats environnementaux marque une étape critique dans les approches basées sur la PCR. En effet une lyse des cellules peut être plus ou moins rigoureuse. Il existe plusieurs méthodes de lyse des cellules qui sont physiques, chimiques ou enzymatiques.

Plusieurs publications concernent les méthodes d'extraction directe de l'ADN d'échantillons environnementaux et comparent les différentes méthodes de lyse et de purification (Bürgmann *et al.*, 2001; Möhlenhoff *et al.*, 2001; Haugland *et al.*, 2002; Kirk *et al.*, 2004; Carrigg *et al.*, 2007). Certaines études montrent que les trois méthodes de lyse sont efficaces (Yang *et al.*, 2007), alors que d'autres travaux démontrent que la méthode de lyse physique est plus efficace (Krsek et Wellington, 1999; Zhou *et al.*, 2000).

Il faut chercher à utiliser la meilleure méthode permettant une lyse fiable et reproductible de toutes les cellules bactériennes, tout comme l'extraction d'acides nucléiques intacts et l'élimination de toute substance susceptible d'inhiber les étapes ultérieures, comme les acides humiques, les exopolymères bactériens et les protéines (Kozdroj et Van Elsas, 2001; Anderson et Cairney, 2004). De plus, des composés variés, biotiques et abiotiques, provenant des écosystèmes environnementaux, comme les particules inorganiques ou matières organiques, peuvent affecter l'efficacité de lyse et peuvent interférer avec la purification de l'ADN qui suit (Wintzingerode *et al.*, 1997).

D'autre part, Anderson et Cairney (2004) expliquent que la quantité d'échantillon utilisé pour l'extraction de l'ADN peut influencer la quantité d'ADN extrait. Ils ont observé des changements dans la structure de la communauté fongique d'un échantillon homogène de sol lorsque moins d'1 g d'échantillon est utilisé pour l'extraction de l'ADN, alors qu'aucun changement dans la diversité bactérienne de ce même échantillon n'est observé lorsqu'entre 0,125 et 4 g sont utilisés.

### **2.3.2- Amplification par PCR et choix des amorces**

La PCR est l'acronyme anglais de "*Polymerase Chain Reaction*", réaction de polymérisation en chaîne. C'est une technique d'amplification enzymatique (grâce à la Taq polymérase) qui permet, à partir d'ADN, d'obtenir un grand nombre (plusieurs milliards) de copies identiques d'un fragment cible de cet ADN. Le choix des amorces qui encadrent la séquence cible et permettent son amplification, est donc primordial pour l'identification des microorganismes présents dans un échantillon environnemental.

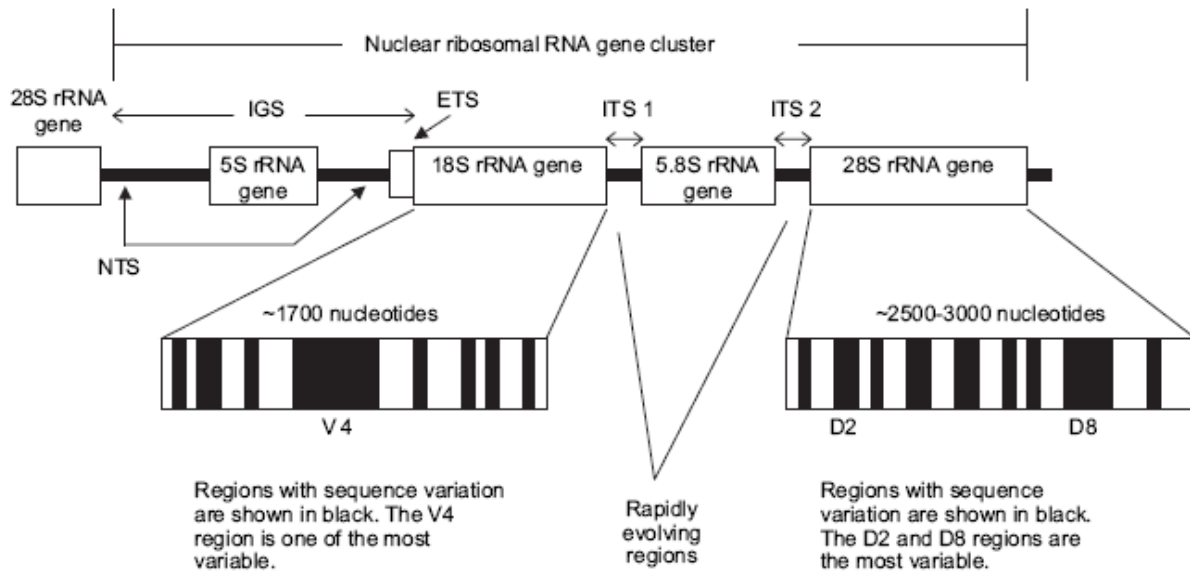


Le gène codant pour l'ARN ribosomique 16S de la petite sous-unité des ribosomes (Figure I-5) est le plus couramment amplifié pour l'analyse de la biodiversité bactérienne (Weisburg *et al.*, 1991). Ce gène consiste en des régions conservées et variables, et le choix des amorces va conditionner l'étendue du champ taxonomique étudié. En effet, il existe aujourd'hui un grand nombre d'amorces cibles qui va permettre d'amplifier l'ADN de bactéries appartenant à différents taxons comme par exemple les Eubactéries ou les Archaeobactéries, ou alors des amorces dites universelles vont permettre d'amplifier l'ADN de toutes les bactéries. Cette approche est devenue un outil très important dans l'étude de communautés bactériennes présentes dans des échantillons environnementaux (Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2001a).



**Figure I-5 :** Organisation génétique de l'opéron codant pour les ARN ribosomiques procaryotes.

Les champignons, qui sont des organismes eucaryotes, ne possèdent pas les mêmes ARN ribosomiques que les bactéries qui sont des organismes procaryotes. Ils doivent donc être analysés séparément. Or, l'étude de la diversité par biologie moléculaire est moins répandue chez les eucaryotes, en particulier au niveau des champignons. Le choix des amorces et donc du gène cible à amplifier pour identifier les champignons d'un échantillon environnemental est encore discuté. Cependant l'étude de la région de l'ADN codant pour les sous-unités ribosomiques est aujourd'hui établie. La Figure I-6 montre ce gène.



**Figure I-6 :** L'opéron du gène d'ARNr ribosomique des eucaryotes. L'opéron comprend trois gènes principaux (molécules d'ARNr 5.8S, 18S et 25S ou 28S), et des régions « entre-espaces » entremêlés (IGS – intergenic spacer, NTS – non-transcribed spacer, ETS – externally transcribed spacer, ITS – internally transcribed spacer) (D'après (Mitchell et Zuccaro, 2006).

Au contraire des bactéries, l'identification taxonomique des champignons basée sur les séquences de la sous-unité ribosomique des eucaryotes, l'ARNr 18S, est plus problématique. En effet l'identification est limitée au niveau du genre ou de la famille. Cela est premièrement dû au manque relatif de variations dans le gène d'ARNr 18S entre espèces fongiques relativement proches, résultant de la période d'évolution relativement courte du règne des champignons comparé à celle des bactéries (Zhou *et al.*, 2000; Anderson et Cairney, 2004).

En revanche les régions ITS de l'ADNr bénéficient d'un taux d'évolution rapide, et il en résulte une variation de séquence plus grande entre des espèces relativement proches, comparé aux régions codantes plus conservées du gène codant pour l'ADNr 18S (Anderson et Cairney, 2004). C'est pourquoi afin d'obtenir une meilleure résolution, d'autres études ont analysé les régions d'espaces non-codants (ITS). Cependant, nombre de régions ITS eucaryotes séquencées restent limitées et sont donc bien moins représentées dans les banques de données, comparées aux séquences d'ADNr 16S procaryotes. Mais ce problème s'atténue au fur et à mesure que les banques de données se remplissent (Prosser, 2002).

Une étude de Sert *et al.* (2007) montre néanmoins que lors de l'identification moléculaire de champignons, en particulier de *Coniosporium*, une souche uniquement avait 100% d'homologie ITSI+II, 5,8S avec *C. perforans*. Les autres souches n'ont pas pu être clairement identifiées au niveau de l'espèce à cause d'un manque d'homologie avec les

espèces de *Coniosporium* présentes dans les banques de gènes. Cependant, toutes les souches sont morphologiquement très similaires et la région ITS est connue pour être très variable chez les levures noires (Sert *et al.*, 2007).

White *et al.* (1990) ont défini les premières amorces de PCR pour l'amplification des gènes codant pour l'ADNr 18S et ITS fongique. Bien que ces amorces ont été dessinées alors que les informations de séquences étaient limitées, elles ont prouvées être des instruments très puissants et sont toujours largement utilisées. Ces amorces ont été, quoi qu'il en soit, dessinées pour amplifier le champ taxonomique le plus large possible, et ainsi, dans certains cas l'ADN de plantes a pu être amplifié lors d'études d'échantillons mixtes d'ADN de champignons et eucaryotes. Les amorces ITS1 couplées aux amorces ITS4 ont été spécialement utilisées pour amplifier des champignons de communautés mixtes d'ADN (Anderson et Cairney, 2004).

A titre d'exemple, Gomes *et al.* (2002) ont observé deux bandes sur les régions ITS amplifiées correspondant à des modèles de plantes et champignons ; ces résultats confirment que les amorces ITS1/ITS4 ne sont pas spécifiques des champignons et permettent une vision très large des populations provenant d'échantillons environnementaux.

Nous ne savons toujours pas de nos jours, comment l'amplification par PCR est influencée par le choix des amorces de PCR et l'abondance de certains microorganismes identifiés dans la communauté d'un échantillon d'ADN, et si le microorganisme le plus abondant est préférentiellement amplifié au dépend des autres microorganismes. De plus, le nombre de copies d'opérons ribosomiques est différent selon les espèces. Par exemple, *Clostridium paradoxum* possède 15 copies du gène codant pour l'opéron de l'ARNr 16S alors qu'*Escherichia coli* en possède 7 (Farrelly *et al.*, 1995; Wintzingerode *et al.*, 1997). Il a par ailleurs été démontré que les bactéries à croissance lente ont moins de copies d'opérons que les bactéries à croissance rapide. Chez les champignons, le nombre exact de copies de l'opéron de l'ARNr reste pour la plupart des espèces inconnu (Anderson et Cairney, 2004). Cette variation entre copies complique la quantification des différentes espèces microbiennes dans un pool d'ADN mixte si l'opéron de l'ARNr est la région ciblée.

### 2.3.3- Clonage et identification phylogénétique

Le séquençage direct de l'ensemble des gènes codant pour l'ARNr 16S ne peut pas être envisagé directement à partir de communautés microbiennes. Ils doivent tout d'abord être clonés avant d'être séquencés. La technique RFLP permet ensuite de réduire le nombre de clones à séquencer : en regroupant les clones en UTOs, seulement quelques représentants de chacune des UTOs sont séquencés.

Cependant, il est difficile de déterminer combien d'analyses de clones sont requises pour visualiser la diversité contenue dans un échantillon. La détermination du nombre de clones à analyser est d'autant plus difficile qu'aucune communauté microbienne n'a jamais été aujourd'hui mesurée (Dunbar *et al.*, 2002).

Afin de pallier à ce problème, des courbes de collection ou d'abondance ainsi que des estimateurs de richesse spécifique ont été produits, et permettent de vérifier si une librairie de clones est suffisamment large pour estimer une richesse phylotypique stable d'une communauté microbienne environnementale (Kemp et Aller, 2004). Les estimateurs les plus couramment utilisés sont les estimateurs  $S_{Chao1}$  et  $S_{ACE}$ .

Le nombre de clones à analyser est différent selon l'échantillon étudié mais aussi selon le gène ciblé. Par exemple, lors de l'étude d'une communauté eucaryote de sol cultivé, selon le gène codant pour les régions ITS ou pour l'ARNr 18S, Anderson *et al.* (2003) ont montré que le nombre de clones requis était différent. De même, étudier la communauté bactérienne à l'aide du gène codant pour l'ARNr 16S requiert plus de clones qu'étudier la communauté fongique de ce même échantillon à l'aide du gène codant pour l'ARNr 18S.

L'identité d'une séquence environnementale est obtenue après une recherche d'homologie dans les banques de données, comme « Genbank » au Centre National pour l'Information Biotechnologique (NCBI, <http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), soutenu par l'Institut Européen de Bio-informatique (EMBL-Bank, <http://www.ebi.ac.uk/embl/>), le « Ribosomal Database Project » (<http://rdp.cme.msu.edu/> ; <http://www.psb.ugent.be/rRNA/blastrna.html>), et le projet AFTO (<http://aftol.biology.duke.edu/pub/blastUpload>) (Gonzales et Saitz-Jimenez, 2005; Mitchell et Zuccaro, 2006). Les séquences inconnues sont alignées avec celles qui sont connues et présentes dans les banques de données. Les recherches effectuées par l'Outil Local de Base de Recherche (ou BLAST pour Basic Local Alignment and Search Tool) au NCBI fournit la liste

des résultats probables correspondant à la séquence inconnue, avec les valeurs de similarités des séquences.

Par ailleurs l'identification de séquences fongiques pose problème. En effet, les banques de données génétiques sont sous-représentées pour beaucoup de groupes de champignons. Le « Genbank » du NCBI est la base de données la plus large et il abrite environ 16400 séquences représentant des espèces fongiques. Ce sont des séquences d'ARNr principalement d'ascomycètes, représentant approximativement 63% de toutes les séquences déposées, 34% pour les Basidiomycètes et 1% de Zygomycètes. Cette déficience de dépôts peut rendre l'identification de séquences environnementales difficile sans l'accès à d'autres sources d'informations, comme celles dérivées d'une collection de cultures locales (Mitchell et Zuccaro, 2006). En conséquence, la précision taxonomique de beaucoup de séquences dans les bases de données peut être remise en question. Dans une étude de trois groupes taxonomiques majeurs, Bridge *et al.* (2003) rapportent un taux d'erreur d'identification de 20% (Mitchell et Zuccaro, 2006).

## **2.4- Conclusion**

A l'origine de nombreuses études, l'exploration de la diversité des communautés microbiennes présentes dans un environnement a longtemps mis en œuvre des méthodes indirectes comprenant une étape de mise en culture des bactéries en laboratoire. Ces méthodes reposent sur la notion de culture pure, selon laquelle une population clonale dérive de la division cellulaire d'une cellule unique. Or ces méthodologies, pourtant à la base même de la microbiologie, présentent de nombreuses limites. Il est en effet reconnu depuis plusieurs années que la « cultivabilité », ou encore la capacité d'une cellule à former des colonies sur un milieu de culture, est extrêmement variable selon les bactéries. Il s'avère difficile de faire développer les microorganismes en conditions de laboratoire. Les raisons de cette « non-cultivabilité » restent parfois obscures, mais il n'est pas difficile de concevoir que les conditions artificielles de culture en laboratoire sont probablement trop restrictives selon les microorganismes. Et malgré le souci de reproduire au mieux les conditions environnementales, de nombreux facteurs potentiellement essentiels pour la croissance de certains microorganismes restent non maîtrisés en laboratoire, comme le rôle des phages lysogéniques, l'influence du « quorum-sensing », ou encore bien d'autres effets imprévisibles

de la micro-niche. Les interactions entre microorganismes, existant dans l'environnement naturel, peuvent également s'avérer très influentes sur la croissance des bactéries en laboratoire, et certaines nécessiteront la présence d'autres types de microorganismes pour se développer de manière optimale (Herrera, 2006).

Les méthodes sélectives de mise en culture n'ont donc permis de prendre en compte qu'une faible partie de la diversité des microorganismes existant réellement. Dans le cas du sol, le nombre de bactéries donnant des colonies sur milieux de culture est par exemple estimé entre seulement 0,1 et 10%.

Depuis les travaux pionniers de Torsvik *et al.* (1990) mettant en évidence des bactéries non cultivées en étudiant directement l'ARN extrait d'un échantillon environnemental, de nouvelles méthodes moléculaires, qualifiées de génomique environnementale, ont été mises au point pour déterminer plus exactement la diversité des communautés bactériennes en s'affranchissant du biais de la culture (Herrera, 2006).

Le bénéfice le plus important des techniques moléculaires est donc la possibilité de caractériser la diversité sans requérir aux méthodes de cultures en laboratoire. De plus, l'identification moléculaire est plus rapide que les méthodes basées sur la culture des microorganismes et devient la méthode la plus choisie pour les identifications de nombreux groupes environnementaux (Prosser, 2002).

Depuis quelques années, les études de la biodétérioration se sont développées en parallèle de l'introduction des outils moléculaires pour la détection de communautés microbiennes dans des matériaux détériorés.

Cependant, comme pour de nombreuses techniques utilisées pour l'étude de la diversité microbienne, des biais sont toujours présents et agissent comme facteurs limitants dans la large application des technologies moléculaires en général, et dans les études de biodétérioration en particulier (Kozdroj et Van Elsas, 2001; Prosser, 2002; Saitz-Jimenez) :

- La plupart des applications ont pour but la détermination phylogénétique, la détection et l'énumération des microorganismes.

- Les méthodes d'échantillonnage et les procédures afin de conserver l'échantillon durant le transport au laboratoire peuvent énormément changer les relations entre les différents composants de la microflore.

- Les procédures d'extraction d'ADN peuvent ne pas être totalement couronnées de succès pour la détection de microorganismes possédant des parois épaisses, et ainsi une sous-estimation des résultats de la population colonisatrice.

- Enfin, l'amplification par PCR peut également présenter des biais en favorisant l'amplification de certains fragments, pouvant ainsi fausser l'estimation de la biodiversité.

Afin de résoudre ces problèmes, il faut d'abord optimiser les protocoles concernant les procédures d'échantillonnage, d'extraction, éventuellement la suppression des inhibiteurs de digestion d'ADN et d'amplification par PCR, et la PCR elle-même. Il est nécessaire d'identifier les inconvénients, les limitations et les solutions possibles aux techniques qui seront utilisées.

En conclusion, l'analyse des fragments d'ADN ribosomiques, via les techniques de clonage-séquençage, reste aujourd'hui l'une des approches les plus utilisées pour analyser les communautés bactériennes présentes dans un environnement naturel. Cependant, les données générées par cette approche doivent être correctement interprétées, sans être extrapolées. En effet, dans tous les cas, le gène ADNr16S ne représente en moyenne que 0,05% du génome complet des cellules procaryotes, et ne permet en aucune façon de prédire les activités (physiologie), le « style de vie » (niche écologique) ou encore les propriétés biochimiques des cellules bactériennes. De nombreux exemples ont établi que les bactéries présentant plus de 97% de similarité au niveau de leur gène ADNr 16S montraient un comportement physiologique et écologique significativement différent (Herrera, 2006)

### 3- Les processus de biodétérioration de la pierre

Certaines études ont été réalisées pour comprendre le rôle des agents biologiques sur la détérioration de la pierre, cependant il est clair que plusieurs facteurs physiques, chimiques et biologiques agissent ensembles de façon synergique pour affecter la durabilité du matériau (Crispim et Gaylarde, 2005). En même temps, la biodétérioration d'une pierre résulte d'interactions complexes établies par les microorganismes coexistant ensembles (Warscheid et Braams, 2000; Fernandes, 2006).

Les modèles de détérioration varient en fonction de la localisation sur le monument (exposition à la pluie, au vent, aux aérosols). De même, de nombreux paramètres intrinsèques au matériau (nature de la pierre, fissuration, porosité...) ou liés au milieu externe (présence d'ions  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ..., température...) vont influencer la dynamique de détérioration. Aghamiri et Schwartzman (2002) ont montré que les lichens peuvent dégrader 100 à 1000 fois plus vite qu'une détérioration inorganique.

Les microorganismes sont capables de détériorer physiquement, esthétiquement et chimiquement les pierres. Cependant, il faut noter que sans la présence d'eau, les microorganismes seraient incapables de se développer et donc la biodétérioration n'existerait pas. De plus il est connu que l'eau est un agent très important dans les processus de détérioration (De Muynck *et al.*, 2008). C'est pourquoi dans une première partie l'importance de l'eau dans la détérioration et biodétérioration sera exposée. La deuxième partie de ce chapitre sera consacrée à la biodétérioration de la pierre proprement dite. Puis dans une troisième partie sera décrite l'influence des sels marins sur la pierre et les microorganismes s'y développant. Enfin, les différents moyens employés aujourd'hui pour évaluer la biodétérioration de la pierre seront détaillés dans une dernière partie.

#### 3.1- Importance de l'eau

Dans la majorité des cas, le principal vecteur de l'altération des pierres est l'eau (De Muynck *et al.*, 2008; Ling *et al.*, 2008). Sous forme liquide, elle rentre par capillarité dans le réseau poreux des pierres et peut, soit geler et induire des contraintes mécaniques, soit



dissoudre les minéraux les plus solubles. Ainsi, la circulation de l'eau dans une pierre s'accompagne d'une dissolution, puis d'une recristallisation des minéraux lors de l'évaporation de l'eau.

On peut distinguer deux types d'effets à l'intérieur ou à proximité d'une pierre : l'eau agissant en tant que telle et l'eau servant à transporter un autre composé actif, provenant du voisinage ou de la pollution (Site internet 2).

### **3.1.1- Action directe de l'eau**

L'eau qui accède à la surface extérieure est une eau courante (ruissellement) ou de l'eau battante (pluie). Elle ne séjourne pas et ne se fixe pas sur cette surface. On parle généralement d'eau libre.

L'eau peut s'insérer à l'intérieur de la pierre par effet de tension superficielle puis par capillarité depuis l'émergence des canaux de la porosité et des fissures. On parle ici d'eau liée ou associée.

Elle pénètre très lentement dans la pierre et possède non seulement une importante force de pénétration mais aussi un temps de résidence, donc un temps d'action, suffisamment long pour permettre la dissolution des sels et des minéraux. L'eau devient une solution ionique très active qui provoque des réactions chimiques associées. Lors de la pénétration par capillarité, il y a gonflement de la pierre. Ce nouvel état circulatoire conduit à éliminer progressivement, par ordre de solubilité décroissante, certains composants minéraux de la pierre. Cela se réalise dans une zone interne, parallèle à la surface externe, pratiquement située à une profondeur constante pour une pierre donnée. Il s'ensuit une "altération en plaque (Figure I-7) qui se fissure pour décoller et tomber.

Cette eau va permettre aux microorganismes de s'hydrater, mais elle va également permettre un apport en minéraux nécessaires au développement des microorganismes. L'action de la croissance des premiers colonisateurs de la pierre, comme les microorganismes phototrophes (les algues et les cyanobactéries) est un paramètre à ne pas négliger au niveau de la biodétérioration de la pierre. Ces microorganismes peuvent en effet agir par rétention d'eau, prédisposant ainsi la surface à la colonisation par des organismes potentiellement plus

détériorogènes, comme les champignons, les mousses, et les plantes supérieures (Gaylarde et Morton, 1999).

### 3.1.2- Action indirecte de l'eau

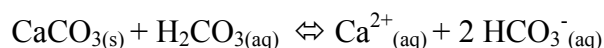
Dans le cas d'une action indirecte, ce n'est pas l'eau qui est en cause, ce sont les fluides, gaz ou solides qu'elle transporte. Ces additifs ne sont pas tous toujours dus à la pollution mais ils le sont le plus souvent.

La pluie et l'eau des remontées capillaires sont chargées de différents composés chimiques apportés par la pollution et présents dans l'atmosphère, le sol ou le sous-sol. Il s'agit essentiellement :

- de gaz : gaz carbonique, anhydride sulfurique, oxydes d'azote,
- d'acides et composés ammoniacés : acide chlorhydrique, acide fluorhydrique, ammoniac,
- de fumées porteuses de composés carbonés, suies, flammèches,
- de phosphates et nitrates,
- de poussières solides minérales ou organiques,
- d'engrais de jardinage,
- de sels d'entretien hivernal des rues et des routes,
- de peintures (graffitis, etc.).

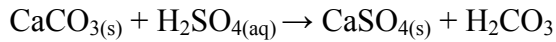
Ces produits initient souvent une série de réactions chimiques. Les cycles d'activités peuvent être très complexes et se terminer après de nombreuses étapes.

Prenons l'exemple le plus courant du dioxyde de carbone largement présent dans l'atmosphère. Sous forme d'acide carbonique il dissout la calcite (Liu *et al.*, 2005) en initiant l'équilibre calco-carbonique :



La dissolution d'un matériau calcaire en milieu acide entraîne une chute de résistance mécanique de ce matériau. La décalcification des matériaux à forte teneur en calcaire peut entraîner des modifications importantes de leurs propriétés physiques (ANDRA, 2004).

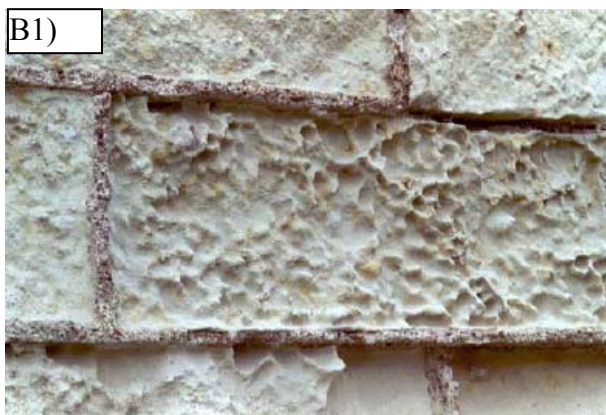
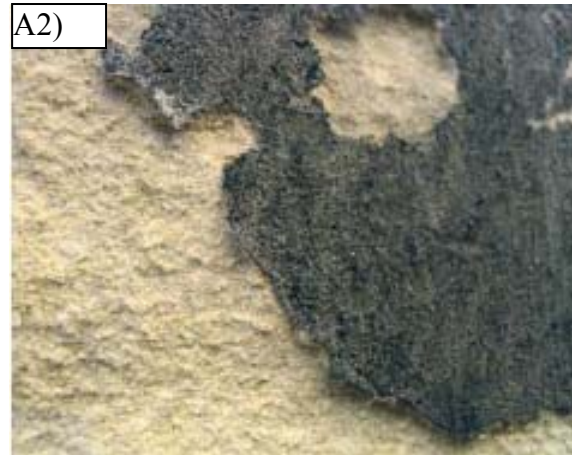
Un autre exemple très étudié concerne le soufre à l'état d'anhydride sulfurique SO<sub>2</sub>. En présence d'eau il se transforme en acide sulfurique qui dissout la calcite et conduit à la formation de gypse suivant l'équation :



Le gypse qui se forme apparaît sous forme de plaques blanchâtres en surface des pierres. La formation du gypse entraîne des dommages mécaniques car les cristaux occupent plus de place que les molécules qui leur ont donné naissance. Cette dilatation "cristallochimique" détruit la cohésion de la pierre. De plus, lorsque l'atmosphère est polluée, les particules vont être piégées lors de la formation du gypse et créer les fameuses « croûtes noires » présentes sur de nombreuses façades (Figure I-7 A1-A2).

Ainsi les pierres, suite aux altérations chimiques résultant de réactions entre l'atmosphère, l'eau et le matériau, peuvent présenter plusieurs types de dégradations : alvéoles, desquamation, noircissement, précipitation de microcristaux (Figure I-7), parfois toutes visibles sur un même édifice (ANDRA, 2004).

L'eau joue donc un rôle essentiel dans la détérioration chimique des pierres, car elle est un solvant pour toutes les réactions. Mais elle va également permettre les processus de biodétérioration de la pierre, tout d'abord en rendant la pierre bioréceptive, permettant ainsi le développement des microorganismes (hydratation, apports de minéraux et autres composés). Ensuite, en véhiculant les composés bio-chimiques ayant une action sur la détérioration de la pierre, et aussi en créant les phénomènes de contraction/expansion du biofilm lors des cycles de sécheresse/humidité.



**Figure I-7 :** Photos de dégradations de la pierre : croûtes noires formées sur une pierre non poreuse (A1), ou poreuse (A2); Alvéolisations et désagréations sableuses (B1-B2) ; Altération en plaque (C) (Beck, 2006).

### **3.2- Détérioration de la pierre par les microorganismes**

Les microorganismes sont capables de se développer à la surface des pierres sous forme de biofilm. Cependant cette surface présente un environnement stressant pour ceux-ci. Diverses propriétés leur permettent de se protéger et de survivre dans cet environnement, en particulier leur morphologie, leur métabolisme (sécrétion d'acides, EPS), leur pigmentation. Cependant ces mécanismes bien que bénéfiques pour les microorganismes, vont avoir une action néfaste sur la pierre. Dans diverses publications ils sont résumés en trois processus : biodétérioration physique, biodétérioration chimique, et biodétérioration esthétique.

Dans les paragraphes suivants nous nous attacherons à présenter comment ces différents processus vont causer des dommages à la pierre, en distinguant 4 actions : (1) l'action de la biodétérioration par la croissance des microorganismes, (2) l'action de la biodétérioration par les pigments, (3) l'action de la biodétérioration par la présence des exopolysaccharides, et (4) l'action de la biodétérioration par la production d'acides et autres.

#### **3.2.1- Effets de la croissance des microorganismes sur la pierre**

En plus de leur croissance à la surface de la pierre, les microorganismes colonisent également l'intérieur de la pierre. Les lichens et les champignons peuvent causer des dommages très sérieux par la pénétration physique. Les hyphes fongiques sont capables de pénétrer profondément la pierre, induisant une détérioration mécanique. La croissance des cellules force la séparation des grains minéraux, de même que les micro-vibrations constantes dues à leur mobilité. La pénétration permet simultanément le transport de l'eau et des nutriments dans la pierre, ce qui facilite la colonisation interne de la pierre par les bactéries, induisant ainsi la détérioration biochimique (Gorbushina, 2007; Sert *et al.*, 2007).

Dans le cas des lichens, l'expansion et la contraction du thalle, conséquence de l'humidification et du séchage de ses substances gélatineuses, est un des mécanismes décrit comme le plus important dans la biodétérioration physique de la pierre (Adamo et Violante, 2000).

En résumé, la croissance des microorganismes peut avoir une action détérioratrice physique pour deux raisons :

- la pénétration des hyphes ou filaments,

- les gonflements et les contractions du biofilm ou des lichens dûs aux cycles de sécheresse/humidité,

### **3.2.2- Les effets de la pigmentation des microorganismes sur la pierre**

Le développement d'un biofilm microbien est fréquemment associé à une coloration biogénique de la pierre. Les champignons, les algues, les actinomycètes et autres eubactéries (*Pseudomonas*, *Micrococcus*) ainsi que les archaebactéries, produisent de la chlorophylle, des carotènes, des caroténoïdes et de la mélanine qui leur servent de protection contre l'exposition aux UV. Les pigments photosynthétiques que possèdent les algues et les cyanobactéries vont entraîner une coloration verte des pierres. Les pigments de mélanine, principalement présents chez les champignons, colorent les façades de noir et les caroténoïdes, présents chez de nombreux microorganismes, y compris les algues et les cyanobactéries, vont provoquer une coloration de jaune à rouge des façades.

Tandis que les pigments photosynthétiques permettent principalement aux algues et cyanobactéries de se développer, la présence de mélanine dans la paroi externe des cellules des champignons forme une barrière protectrice efficace contre les influences environnementales défavorables qui peuvent inclure les composés micro-biocides (Gaylarde et Morton, 1999; Gorbushina, 2007).

En résumé les pigments, qui permettent essentiellement aux microorganismes de se protéger des radiations UV, ont une action de biodétérioration esthétique, plus ou moins visible à la surface des constructions et qui peut être catastrophique dans le cas de surfaces de forte valeur patrimoniale (monuments historiques, fresques, caves préhistoriques).

### **3.2.3- L'action des exo-polysaccharides dans la biodétérioration de la pierre**

L'attachement des microorganismes est la première étape dans la formation du biofilm sur la pierre, et l'adhésion des cellules au substrat est due aux EPS.

Les EPS sont des bio-polymères d'origine microbienne dans lesquels les microorganismes du biofilm sont incorporés. En fait, tous les microorganismes sont capables

de produire des bio-polymères. Contrairement à ce que l'on pense, les EPS sont plus que de simples exo-polysaccharides. Ils comprennent, en plus, une grande variété de protéines, glycoprotéines, glycolipides, et dans certains cas, une quantité surprenante d'ADN (e-DNA) (Flemming *et al.*, 2007). Dans les biofilms environnementaux, les polysaccharides sont fréquemment des composants mineurs. Néanmoins, tous les biopolymères EPS sont fortement hydratés et forment une matrice, qui conserve ensemble les cellules du biofilm et retient l'eau (Flemming *et al.*, 2007).

D'une part, les EPS détériorent la pierre à cause des cycles répétés d'humidité/sécheresse qui induisent l'expansion et la contraction du biofilm. Ce processus conduit à une fragilisation de la matrice de la pierre (Papida *et al.*, 2000; Warscheid et Braams, 2000; Kumar Saha *et al.*, 2005). D'autre part, l'eau conservée par les EPS pendant de longues périodes, va permettre des réactions chimiques tout comme des processus de dissolution du minéral (Krumbein, 2004). En général, ces multiples processus de dissolution induisent le rejet important de nutriments minéraux nécessaires à la croissance et la survie des organismes (Papida *et al.*, 2000; Warscheid et Braams, 2000; Gorbushina, 2007)

En résumé, les EPS vont avoir une action directe et indirecte dans les processus de biodétérioration de la pierre. L'action directe est la fragilisation de la pierre par des phénomènes de contraction et expansion. L'action indirecte est la rétention d'eau qui va favoriser les processus chimiques de détérioration. Les EPS vont donc être acteurs des processus de biodétérioration physique et chimique.

### **3.2.4- Sécrétions d'acides par les microorganismes et solubilisation de la pierre**

Les attaques acides sont les principaux processus de détérioration chimique par les microorganismes. Les microorganismes sont capables d'obtenir des pierres quelques éléments dont ils ont besoin pour leur métabolisme (calcium, aluminium, silice, fer et potassium) en excréant des acides organiques (acide citrique, acide gluconique, acide oxalique...) et inorganiques (oxyde de soufre) variés qui dissolvent la matrice minérale de la pierre pour former des complexes avec des composés contenus dans celle-ci, ou chélater des ions tels que  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{2+}$ ,  $\text{Si}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ . Bertron (2004) a étudié l'effet de différents acides produits

dans des lisiers de porcs sur des ciments et montre que l'agressivité relative des différents acides dépend essentiellement de leur constante de dissociation. Les quatre acides du lisier testés (acide acétique, propionique, butyrique et iso-butyrique) ont ainsi une agressivité équivalente, alors que l'acide lactique, et l'acide acétique ont une agressivité supérieure, conformément à la valeur de leur constante de dissociation.

De plus, les résultats ont montré le faible taux de lixiviation du silicium, de l'aluminium et du fer et confirment aussi un résultat connu : le calcium présente un taux de lixiviation le plus élevé de tous les éléments.

La sécrétion d'acides organiques induit donc une lixiviation des liants de la pierre, avec fragilisation de la structure cristalline.

Un autre mécanisme indirect de lixiviation des pierres est la respiration des bactéries et des champignons. En effet elle augmente la concentration en  $\text{CO}_2$  local, résultant en la formation de  $\text{H}_2\text{CO}_3$  qui fait baisser le pH de la surface de la pierre au niveau de la zone de contact. Les carbonates, les phosphates et les silicates sont ainsi lixiviés hors de la roche par l'acide carbonique (Gorbushina, 2007).

La détérioration par sécrétion d'acides agressifs par les microorganismes a pour résultat final la destruction physique et chimique de la pierre. D'autres attaques chimiques peuvent intervenir également, comme des réactions alcalines faisant varier le pH, ou des oxydations de cations minéraux. De plus, les EPS vont interagir avec les composés de la pierre et favoriser les activités d'échanges de cations (Papida *et al.*, 2000; Warscheid et Braams, 2000).

Ainsi les microorganismes en respirant, en cherchant à capter des minéraux pour se nourrir, vont avoir une action biodétérioratrice chimique.



### 3.3- Le rôle des sels marins

Il est connu que les sels marins peuvent contribuer à la détérioration des façades en pierre. Mais quelle est l'influence réelle des sels sur la croissance des microorganismes ?

Dans une première sous-partie nous expliquerons comment les sels détériorent la pierre, et dans une seconde partie sera exposée l'influence de ces sels sur les biofilms.

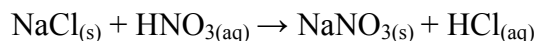
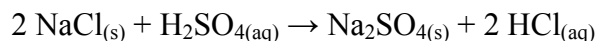
#### 3.3.1- Processus chimiques de la détérioration de la pierre en présence des sels marins

En environnement marin, les aérosols marins constituent la source majeure d'apports atmosphériques en sels.

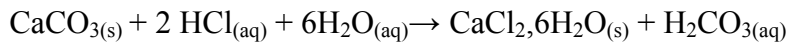
La dégradation des roches par les sels peut résulter de deux phénomènes. La répétition des cycles de dissolution et cristallisation du NaCl, peut entraîner le dessertissage des grains constitutifs de la roche. Cette action, qui modifie la porosité du matériau, est d'autant plus destructrice qu'elle est fréquente. Elle dépend des propriétés physiques de la roche qui déterminent le niveau des évaporations en surface ou en profondeur ainsi que de l'exposition ; ce sont ces conditions qui induiront le type de dégradation : les désagréations et les desquamations (Cardell *et al.*, 2003).

Il a été montré que la réactivité du SO<sub>2</sub> sur les sels marins devenait plus importante en présence de NO<sub>2</sub> et d'humidité relative forte (80%) (Chabas, 1997).

En milieu fortement pollué, SO<sub>2</sub> et NO<sub>2</sub> forment, en présence d'eau, l'acide sulfurique et l'acide nitrique. NaCl va réagir avec l'acide sulfurique et l'acide nitrique suivant :



Ces réactions ont pour conséquence la production d'acide chlorhydrique qui peut par la suite réagir sur les matériaux carbonatés. A Venise, le rôle d'HCl dans les processus de dégradation de la pierre a été démontré par la présence d'antarticite (CaCl<sub>2</sub>, 6 H<sub>2</sub>O) par DRX. La réaction invoquée est la suivante (Chabas, 1997):



NaCl peut également jouer un rôle moteur dans les processus de dégradation des pierres calcaires par l'acide carbonique, en jouant le rôle de complexant vis-à-vis de  $\text{Ca}^{2+}$  et en déplaçant l'équilibre de dissociation de  $\text{CaCO}_3$  vers sa disparition.

La détérioration chimique par les sels marins va donc dépendre du degré d'humidité et des cycles de sécheresse/humidité de l'environnement, mais également de la présence de polluants atmosphériques notamment  $\text{SO}_2$  et  $\text{NO}_2$  (Chabas, 1997).

### 3.3.2- L'environnement marin et la biodétérioration

Peu d'études sur l'influence des sels marins sur le développement des microorganismes colonisant les façades en pierre ont été réalisées.

Mottershead *et al.* (2003) se sont intéressés à caractériser, suivant l'orientation des façades en pierre d'un bâtiment exposé aux embruns marin, les biofilms qui s'y sont développés.

La façade nord face à la mer, peu exposée aux radiations solaires, mais subissant l'afflux des embruns, montre un biofilm visible, dont les algues sont les microorganismes prédominants. Ils embrassent une large diversité biologique, dont de nombreux groupes marins. Le biofilm couvre totalement la pierre, et montre la croissance de filaments non ramifiés (des algues vertes), qui remplissent les irrégularités de la surface et les espaces intergranulaires du substrat, créant ainsi des conditions environnementales très stables à la surface de la roche. La matrice extracellulaire du biofilm forme une couche épaisse sur la surface et ne pénètre dans la structure de la roche que très rarement. De plus, les cristaux de sel sont observés à la surface du biofilm, mais jamais en contact du substrat.

La façade sud, quant à elle, présente une surface moins pigmentée, mais c'est la plus détériorée bien qu'elle soit protégée des embruns.

Cette différence de colonisation et de détérioration peut s'expliquer par le fait que sur une surface ombragée avec un fort taux d'humidité, un biofilm est capable de se développer de façon continu et peut ainsi former une barrière protectrice physique contre les agents de

dégradation physiques et chimiques. Au contraire, sur une surface exposée au soleil, les microorganismes vont chercher à se protéger et vont donc préférentiellement occuper des positions en contact direct avec la roche et en profondeur, et ainsi agir comme agents détériorant primaires. De plus, leur distribution discontinue permet l'accès direct de la surface de la pierre aux agents physiques et chimiques de détérioration.

Dans cette étude Mottershead *et al.* (2003) ont montré que l'orientation par rapport au soleil semble avoir plus d'influence que les embruns marins sur la colonisation de la pierre. La présence de sels marins semble influencer les types de microorganismes qui vont se développer, mais ne paraît pas avoir d'effet inhibiteur sur le développement du biofilm.

Une autre étude réalisée par Papida *et al.* (2000) montre que les sels augmentent la densité des EPS et affectent leurs propriétés hydrauliques. Ainsi le NaCl réduit la viscosité des polysaccharides. Cette réduction de viscosité va conduire en une diminution des échanges et des transports d'ions et autres composés entre les cellules, et entraînerait ainsi peut-être une fragilisation du biofilm.

Videla *et al.* (2000) ont réalisé une étude sur deux sites au Mexique : le site Maya d'Uxmal localisé à 60 km de la mer et le site de Tulum localisé à 50 m de la mer. Uxmal se trouve dans un environnement rural non pollué alors que Tulum est situé dans un environnement urbain fortement pollué. Il est de plus exposé aux embruns marins. L'étude montre que la corrosion biologique aurait lieu plutôt dans le site d'Uxmal, alors que l'exposition aux embruns et aux polluants atmosphériques serait la principale cause de détérioration pour le bâtiment de Tulum.

L'action des embruns marins sur les biofilms n'est pas encore totalement élucidée. Cependant de nombreux microorganismes d'origine marine ou non sont capables de résister à de fortes concentrations en sels et de se développer sur les surfaces en pierres exposées aux embruns marins. En environnement marin, la détérioration de la pierre par les agents chimiques extérieurs, en particulier les sels, semble beaucoup plus forte que la biodétérioration par les microorganismes. L'environnement va surtout influencer les espèces de microorganismes qui vont coloniser la pierre.

### **3.4- Les méthodes d'étude de la biodétérioration de la pierre**

Vazquez-Calvo *et al.* (2007) ont utilisé des méthodes microscopiques (Microscopie optique, Microscopie de fluorescence, Microscopie Electronique à Balayage (MEB), et Microanalyse par sonde électronique (EPMA) pour caractériser les patines de biofilms.

La microscopie optique leur a permis de déterminer les caractéristiques pétrographiques du substrat de pierre. Il est également possible de mesurer par cette technique l'épaisseur du biofilm (maximum, minimum et moyenne).

La microscopie par fluorescence a permis de visualiser toute fissure à la surface de la pierre, mais également de déterminer si le contact entre le biofilm et la pierre est continu ou discontinu.

La Microscopie Electronique à Balayage (MEB) a permis d'avoir principalement des informations sur la texture et la structure de la patine. La Microscopie Electronique Environnementale (ESEM) permet la visualisation du matériau dans son état d'hydratation de départ, mais il n'est pas possible d'obtenir une haute résolution des images. La MEB classique offre un niveau de résolution supérieur, cependant elle requiert le recouvrement d'une fine couche d'or et la déshydratation de l'échantillon, rendant le processus plus long et non réversible (Shirakawa *et al.*, 2003).

La Microscopie par sonde électronique (EPMA) a permis de générer des profils et des cartes de distribution élémentaire.

Lazzarini *et al.* (2007) ont étudié la détérioration du portail « Bab Agnaou » à Marrakech. Ils se sont servis de la Diffraction de Rayons-X (DRX) pour étudier les composés minéralogiques de la pierre, de la microscopie optique et électronique pour déterminer la nature et la texture de la pierre. La porosité a été évaluée à l'aide d'un porosimètre au mercure. Les analyses conductimétriques et quantitatives des anions composants les sels solubles ont été réalisées avec un chromatogramme ionique. Enfin les substances protéiques et lipidiques ont été analysées par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à un Spectromètre de Masse (GC-MS).

Ils ont pu ainsi observer une patine organique qui recouvrait la façade, des exfoliations, des désagréments, des fissures et une quantité non négligeable de gypse. Ces

différentes analyses leur ont donc permis d'évaluer l'état de dégradation du portail, afin de pouvoir proposer les traitements curatifs et préventifs les plus adéquats.

Afin d'évaluer la bioréceptivité d'un mortier, Shirakawa *et al.*(2003) ont réalisé des mesures de pH, de carbonatation, de MEB classique et environnemental et d'humidité.

Plusieurs méthodes peuvent donc être utilisées pour identifier le niveau de biodétérioration de la pierre. Les méthodes microscopiques permettent de visualiser l'état de la pierre et même les interactions entre les microorganismes et le substrat, voire d'observer *in situ* les microorganismes. Les méthodes spectroscopiques (de réflectance, de RAMAN) et de fluorescence (haute résolution ou non) permettent la caractérisation de produits de métabolisme et des pigments. Les méthodes biochimiques comme l'analyse de l'ATP ou de l'activité des déshydrogénases permettent d'étudier l'activité métabolique et d'établir des profils de distribution des microorganismes. Enfin les méthodes de diffraction de rayons X permettent de visualiser l'état de la pierre (porosité, densité...) (Warscheid et Braams, 2000).

Ces techniques sont plus ou moins coûteuses et plusieurs peuvent être couplées pour une meilleure analyse.

### **3.5- Conclusion sur la biodétérioration de la pierre**

La croissance des microorganismes affecte de façon négative les matériaux de construction comme la brique, le grès, le marbre le calcaire et la chaux. Les activités microbiennes majeures qui sont importantes dans la biodétérioration de matériaux de construction sont résumées dans le Tableau I-3.

La désagrégation physique et la dissolution chimique des pierres est avant tout un mécanisme induit par une pénétration en profondeur des microorganismes pour une croissance endolithique dans un environnement plus protecteur (Gorbushina, 2007). Les microorganismes jouent également un rôle majeur dans le changement de couleur des surfaces (Sert *et al.*, 2007).

Par ailleurs, les modèles de détérioration varient en fonction de la localisation sur le monument. Les mécanismes de détérioration accélérés ont été observés sur des surfaces exposées à la pluie, au vent, aux aérosols marins, où les sels cristallisent dans les pores à

cause des variations d'humidité et de température. L'accumulation de croûtes noires et le développement de patines biologiques sont produits sur des substrats abrités qui fournissent des conditions environnementales appropriées pour l'attachement des microorganismes et leur développement (Papida *et al.*, 2000).

Les champignons et les phototrophes (algues et cyanobactéries) ne sont pas les seuls microorganismes impliqués dans la formation des biofilms et la réduction de la durabilité des structures. Les bactéries peuvent aussi jouer un rôle important. Bien que la croissance fongique et algale soit très souvent visible à l'œil nu, les bactéries peuvent être présentes sur une surface apparemment propre, en nombre suffisant pour exercer des effets nocifs. Ces effets peuvent inclure la corrosion du matériau due à la production d'acides organiques ou inorganiques ou d'autres activités métaboliques microbiennes. Les bactéries chimiolithotrophes, qui poussent avec très peu de nutriments, peuvent conditionner la surface, la rendant favorable à la colonisation par d'autres microorganismes (Gaylarde et Morton, 1999).

Ainsi les différents phénomènes qui peuvent intervenir dans la dégradation de matériaux de pierre à cause des microorganismes peuvent être résumés par :

- la production de substances extracellulaires polymériques (EPS) qui causent les stress mécaniques sur la structure minérale due aux cycles de sécheresse et humidité,
- l'altération de la perméabilité à l'eau du minéral par le dépôt de surfactant,
- l'accumulation des polluants atmosphériques,
- la production d'acides organiques et inorganiques qui conduit à la dissolution des carbonates de la pierre et la décohésion des grains. De même le CO<sub>2</sub> produit par le microorganisme lors de la respiration, peut agir comme un acide (acide carbonique) s'il est dissous dans l'eau,
- les changements de couleur par les pigments,
- les changements de porosité dans le matériau,
- la décohésion des grains de roche par des pressions internes causant de sérieuses pertes de matériau.

Il ne faut pas oublier que l'eau joue également un rôle important dans les processus de détérioration et biodétérioration de la pierre, directement ou indirectement.

activité microbienne	dommages causés	matériaux affectés
Croissance sur la surface	Coloration, rétention d'eau	Ciment, carreaux de céramique, pierre, briques, plâtre, bois, peintures, tuiles de toiture
Production d'acide	Corrosion, érosion	Ciment, pierre, métal
Enzymes hydrolytiques	Augmentation de la fragilité, érosion	Bois, peinture
Chélation	Corrosion, gravure à l'eau-forte	Métal, ciment, pierre, vitre
Production d'H <sub>2</sub> S	Corrosion	Métal
Croissance de filaments microbiens	dommages physique à la surface, augmentation de la perméabilité	Ciment, pierre, bois, surfaces peintes, plâtre, plastiques
Croissance/activité non homogène	Corrosion due à la concentration des cellules	Métaux
Activité métabolique	Formation de soufflures, fragilisation	surfaces peintes, plastiques

**Tableau I-3 :** Activité microbienne impliquée dans la détérioration de matériaux de construction (Gaylarde et Morton, 1999).

Les microorganismes sont capables de détériorer la pierre, cependant, dans certains cas, le développement du biofilm va avoir un effet protecteur.

En effet, il a été montré que sur le trottoir en calcaire du forum de la cité romaine Baelo Claudia (Cadiz, Espagne), les dalles qui ne sont pas couvertes par des lichens présentent une détérioration plus forte que celles colonisées par les lichens (Adamo et Violante, 2000). Dans cet environnement particulièrement agressif, les effets combinés du vent, des sels et de l'eau peuvent facilement désintégrer le substrat. Bien que l'interface lichen-calcaire montre une certaine détérioration, la biodétérioration est un processus de détérioration beaucoup plus lent qu'un processus physique ou chimique. Ainsi dans certains cas le lichen peut agir comme une armature protégeant la pierre contre les conditions atmosphériques. Avec un substrat poreux, comme la pierre calcaire du trottoir du forum Baelo Claudia, la présence des lichens retarde l'absorption de l'eau de pluie, amoindrissant partiellement les processus de dissolution et précipitation, l'impact des gouttes et les changements de température (Adamo et Violante, 2000).

D'autres études ont conclu à une dégradation plus forte de la pierre lorsque celle-ci n'est pas colonisée par un biofilm visible, en particulier en environnement marin (Videla *et al.*, 2000; Mottershead *et al.*, 2003).

Ainsi, dans les cas où la présence des microorganismes n'est pas désirée sur les monuments ou bâtiments, à cause de la détérioration inesthétique, avant de décider quelle méthode appliquer pour le nettoyage, il serait opportun de savoir quels microorganismes doivent être enlevés. L'idée est de « connaître avant d'agir ». L'évaluation des dommages biologiques est possible par la connaissance des espèces de microorganismes présentes sur la pierre.



## **4- Traitements et protection de la pierre**

Plusieurs traitements existent à l'heure actuelle pour protéger et conserver la pierre. Certains sont curatifs et d'autres préventifs et ont leur propre efficacité. Cependant la plupart sont appliqués sans aucune connaissance des processus de détérioration existants à la surface de la pierre.

### ***4.1- Traitements curatifs***

La remise à neuf des façades peut se faire par nettoyage à l'eau ou à l'eau de javel. Cependant ces traitements peuvent abîmer la pierre et poser des problèmes de rétention d'eau de la pierre ou être toxiques dans le cas de l'eau de javel (Warscheid et Braams, 2000). Pour palier à ces problèmes le nettoyage à sec par propulsion de particules peut être réalisé.

Lorsque les dommages sont conséquents, il est possible d'utiliser des consolidants (silanes, résines acryliques et époxy), des composés hydrophobes (polysiloxanes), des enduits...(Warscheid et Braams, 2000).

Des études sont en cours pour trouver des traitements efficaces, mais pour l'instant les traitements curatifs s'avèrent inefficaces à long terme, ce qui conduit à retraiter la façade régulièrement.

### ***4.2- Méthodes préventives***

Du point de vue de l'utilisateur, le traitement préventif doit avoir les propriétés générales qui suivent : a) efficace contre le problème causé par les microorganismes, b) simple et sûr d'utilisation, c) pas d'effets défavorables sur le matériau qui doit être traité/protégé, d) peu cher, e) capable de fournir la protection pendant la durée de temps demandée (Gaylarde et Morton, 1999).

L'eau est le premier agent responsable de la détérioration des pierres. Une première voie de protection de la pierre est donc l'emploi de traitements qui sont hydrofuges et/ou de consolidants de surfaces dans le but d'empêcher l'eau ou d'autres agents de détérioration d'entrer dans le cœur de la pierre (Ling *et al.*, 2008).

L'application d'enduits hydrofuges est une bonne stratégie, mais seulement quand le matériau est préparé à l'avance. Appliquer le produit lorsque que le matériau est humide, ou déjà infecté, provoque plus de dégâts, puisque l'eau nécessaire à la croissance microbienne est piégée et ne peut s'évaporer (Gaylarde et Morton, 1999).

Cependant l'utilisation d'hydrofuges et/ou de consolidants n'a pas encore prouvé son efficacité. Dans la plupart des cas des microorganismes résistants ou capables de se servir des composés organiques présents dans le produit, se développent à la surface (Rodriguez-Navarro *et al.*, 2003).

L'autre voie beaucoup plus utilisée est l'emploi de biocides.

Ces produits peuvent être grossièrement classés en 4 catégories, en fonction de leur structure chimique et leur mode d'action antimicrobienne (Tableau I-4):

Catégorie	Caractéristiques	Exemples
Agents oxydants	Large gamme d'activité, peut être bon marché	Halogènes, ozone, peroxydes organiques
Agents dénaturants	Potentiel pour la spécificité, mais peut être trop éco-toxique	Aldéhydes, phénols, métaux lourds, isothiazolones
Agents surfactants	Nettoyage et activité dispersante	Ammonium quaternaire, savons ménagers
Inhibiteurs de la synthèse de stérols	Uniquement fongicide et algicide	Triazoles, imidazoles

**Tableau I-4 :** Caractéristiques des différents groupes de biocides.

Ce sont des composés chimiques qui inhibent ou tuent les microorganismes (Gaylarde et Morton, 1999; Warscheid et Braams, 2000). Les composés à base de sels d'ammonium quaternaires sont les biocides les plus utilisés. Beaucoup de biocides à base de dérivés organiques et halogénés sont également commercialisés. Cependant on ne sait généralement pas précisément ce qui est contenu dans les produits commerciaux et très souvent ces composés sont toxiques pour l'environnement (Warscheid et Braams, 2000; Ascaso *et al.*, 2002). Par le passé, les composés à base de métaux lourds, les organométalliques, étaient très utilisés car très efficaces, mais aujourd'hui ils sont interdits car extrêmement toxiques.

Les biocides sont donc des produits chimiques toxiques qui peuvent affecter à la fois les organismes microscopiques et macroscopiques, dont l'homme. Ils doivent donc être choisis avec grande attention. Les paramètres les plus importants à considérer lorsque l'on choisi de traiter une façade sont : a) la gamme de microorganismes en présence, b) la compatibilité chimique avec le matériau à traiter, c) la toxicologie du biocide et les conditions de sécurité, d) le prix du produit. Le mode d'application doit aussi importer dans le choix du produit : il peut être utilisé comme nettoyant, ou dans un enduit ou une peinture qui va le fixer à la surface (Gaylarde et Morton, 1999).

### **4.3- Traitements biologiques**

La plupart des traitements actuels sont inefficaces et/ou toxiques pour l'environnement. Afin de s'affranchir de ces problèmes, la recherche de produits non écotoxiques a vu le jour.

Récemment, la minéralisation du carbonate par les bactéries a été proposée comme une méthode écologique pour l'environnement afin de protéger les pierres d'ornement carbonatées (Rodriguez-Navarro *et al.*, 2003; LRMH, 2005; De Muynck *et al.*, 2008). Certaines bactéries comme *Myxococcus Xanthus* sont capables de former une couche de carbonate de calcium protectrice à la surface de la pierre. Cette technique est nouvelle et encore à l'état expérimental (Rodriguez-Navarro *et al.*, 2003; LRMH, 2005).

D'autres recherches se sont focalisées sur l'utilisation de biosurfactants. En effet des études récentes ont montré que le pré-conditionnement des surfaces avec des composés tensio-actifs d'origine microbienne (biosurfactants) peut nettement réduire la contamination microbienne sur le matériau et ainsi réduire ou endiguer la formation d'un nouveau biofilm (Meylheuc *et al.*, 2006).

Enfin Orgaz *et al* (2006) on cherché à employer les enzymes antibioses sur les biofilms s'étant développés sur la pierre.

Beaucoup d'idées existent afin de lutter contre les processus de colonisation et biodétérioration de la pierre, qui ne sont pas toxiques pour l'environnement. Cependant ces techniques sont récentes et encore en phase d'expérimentation et d'amélioration.

## **Conclusion**

La biodétérioration de la pierre résulte de la combinaison de plusieurs facteurs. Les recherches sur la biodétérioration étant récentes il est important dans un premier temps de bien comprendre ces différents facteurs.

Le premier facteur concerne la pierre elle-même. Quelle est sa composition, dans quel environnement se trouve-t-elle ? En effet, l'environnement a un rôle majeur dans le type et l'ampleur de la détérioration de notre patrimoine culturel. Non seulement l'altération de ce matériau est due à l'action de facteurs naturels, comme le vent, la pluie ou la température, mais aussi, de nombreuses études démontrent que la pollution atmosphérique accélère considérablement le processus de dégradation des monuments, tout comme l'environnement particulier qu'est la zone côtière, où il est reconnu que les sels marins ont un effet accélérateur de la dégradation de la pierre. L'orientation de la pierre par rapport au soleil ainsi que ses propriétés physiques et chimiques intrinsèques vont avoir également un effet sur la biodétérioration de la pierre.

Le deuxième facteur intervenant dans la biodétérioration de la pierre est, bien sûr, la colonisation de la pierre par les microorganismes. Les microorganismes communément trouvés à la surface des pierres de construction sont des bactéries autotrophes et hétérotrophes, des champignons, des algues et des lichens (Gaylarde et Gaylarde, 2005 ; Gorbushina, 2007). Dans les environnements très changeants où se situe la pierre, ses habitants subissent de longues périodes stressantes induisant généralement une phase de dormance, qui est soudainement interrompue par un retour occasionnel de conditions favorables permettant la croissance. Ce sont uniquement les microorganismes possédant une gamme très large de tolérance à ces stress multiples qui sont capables de s'établir sur la pierre.

Les recherches actuelles sur les biofilms de la pierre ont montré que les communautés d'algues dominent habituellement sur des surfaces humides, et des environnements nuageux et pluvieux. Les biofilms à dominance de cyanobactéries ont besoin d'humidité, mais peuvent survivre durant des périodes de sécheresse et d'irradiation plus étendues que ceux à dominance d'algues. Le développement du lichen est lent, et requiert une composition de roche spécifique, de l'air pur et de l'humidité (Viles et Gorbushina, 2003). Enfin, grâce à leur croissance modulable et adaptable, les champignons dominent sous des environnements extrêmement variables. Au contraire des lichens, les champignons sont capables d'utiliser les

composés anthropogéniques apportés par l'air et sont donc dominants dans des conditions urbaines (Saitz-Jimenez).

Il existe diverses méthodes pour identifier les microorganismes qui se développent sur des pierres. Jusqu'à récemment, les techniques de microbiologie classiques, basées sur la croissance des microorganismes sur des milieux de culture synthétiques, étaient très utilisées. Cependant, bien que nous fournissant une information sur le métabolisme du microorganisme, ces méthodes ne permettent de distinguer qu'une part infime des microorganismes présents à la surface de la terre. En effet, il est généralement admis que les microorganismes cultivables ne représentent qu'une faible proportion (environ 1%) de la totalité des organismes présents au sein d'un échantillon environnemental (Ward *et al.*, 1990). Afin de contourner ce problème, les techniques de biologie moléculaire se sont développées ces 20 dernières années. Elles consistent en une succession d'étapes qui commencent généralement par l'extraction de l'ADN ou ARN de l'échantillon, puis l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) de régions spécifiques ou non de cet ADN à l'aide d'amorces. Cette population de gènes est considérée comme représentative de la population microbienne naturelle. Enfin, le polymorphisme existant entre les régions cibles de chacune des espèces est déterminée par différentes méthodes de biologie moléculaire (Kozdroj et Van Elsas, 2001; Kirk *et al.*, 2004). L'analyse du polymorphisme peut se faire après clonage, par la méthode RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) lorsque la communauté est peu diversifiée, cependant la technique de DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) est la technique la plus employée pour révéler la diversité génétique des microorganismes s'étant développés sur des façades en pierre. Le gène codant pour l'ARN ribosomique de la petite sous-unité ribosomale est le plus couramment employé pour l'étude d'une communauté microbienne. Le gène codant pour l'ARNr 16S bactérien est largement représenté dans les bases de données. Chez les eucaryotes, le gène codant pour l'ARNr 18S est employé, cependant il peut ne pas montrer suffisamment de polymorphisme pour différencier des individus au niveau de l'espèce. Pour une analyse plus fine, l'ADN englobant les régions ITS peut être étudié.

L'influence des microorganismes sur la pierre est le dernier facteur à étudier lorsque nous cherchons à comprendre les processus de biodétérioration. En effet, la colonisation de la pierre sous la forme d'un biofilm par les microorganismes peut induire des dommages esthétiques (pigmentation), mécaniques (décollements, fissures, ...) et chimiques (bio-solubilisation), entraînant la destruction de la pierre.

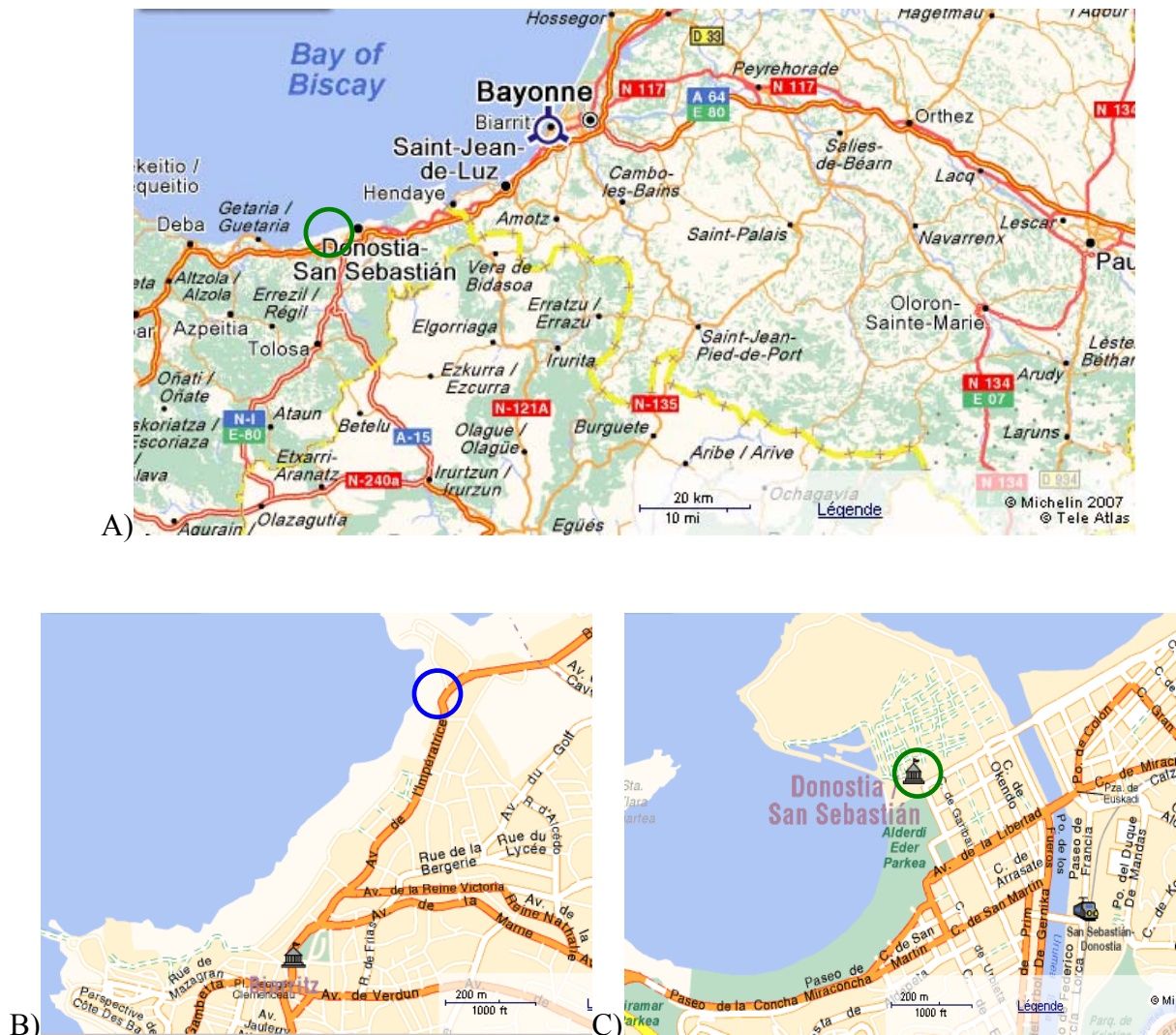
Une fois que tous ces facteurs ont été bien ciblés et compris, la protection de la pierre peut être réalisée. Actuellement il existe divers traitements, curatifs et/ou préventifs, applicables à la pierre. Cependant, beaucoup s'avèrent peu efficaces, de nouveaux microorganismes étant capables de se développer sur les substrats traités ; de plus, certains sont toxiques pour l'environnement et interdits d'utilisation. Des recherches sont encore nécessaires pour trouver de nouveaux procédés et produits.

## II - Matériels et Méthodes

### 1- Sites d'études et stratégies d'échantillonnage

#### 1.1- Sites d'études

Deux pierres ont été choisies pour l'étude : le calcaire d'Angoulême (utilisé comme pierre d'angles et des balcons sur la Côte Basque) et le grès d'Igueldo (utilisé comme pierre de façades dans la vieille ville de St-Sébastien). La Figure II-1 montre les différents sites de prélèvement et leur emplacement géographique.



**Figure II-1 :** Situation géographique des différents sites de prélèvement des biofilms : Biarritz (bleu) et St-Sébastien (vert) situés sur le plan du littoral basque (A) ; plan détaillé de Biarritz et l'emplacement de la villa Isabel (bleu) (B) ; et plan détaillé de St-Sébastien avec l'emplacement de la mairie (vert) (C).

### ***1.2- Pierres pour l'étude dans le temps***

Pour l'étude dans le temps, des pierres de Richemont (même type que la pierre d'Angoulême) fraîchement extraites d'une carrière (Rocamat Pierre Naturelle, Mérignac, France) de dimensions 20 x 10 x 2 cm, ont été exposées en juin 2006 sur la terrasse du musée de la mer à Biarritz, face à la mer (orientées Ouest). Différents prélèvements ont été réalisés au bout 6 mois, 4 mois, puis tous les trois mois jusqu'en mars 2008.

Le choix des pierres prélevées s'est fait à l'aide d'un calcul statistique de tirage aléatoire. A chaque prélèvement 10 pierres sont récupérées (3 pour les études de biologie moléculaire, 3 pour les études de microbiologie classique et 4 pour les études physico-chimiques).

### ***1.3- Echantillonnage***

Environ 40 mg d'échantillon sont récupérés dans un microtube stérile en grattant la surface de la pierre à l'aide d'un scalpel stérile. L'échantillon est placé à 4°C le temps du transport, puis conservé à -20°C jusqu'à utilisation.



## 2- Analyses Biologiques

### 2.1- Microbiologie classique

#### 2.1.1. Conservation

La biomasse des souches isolées sur boîtes de Pétri est récupérée et conservée par congélation à -80°C dans un milieu LB supplémenté avec 30% de glucose.

#### 2.1.2. Milieux de culture

Afin de cultiver des bactéries et des champignons, deux types de milieux nutritifs sont utilisés :

- Culture des champignons sur milieu Sabouraud dont la composition est la suivante :

Casein peptone	5 g/l	
Meat peptone	5 g/l	
D(+) glucose	40 g/l	pH final 7,4 +/- 0,2
Chloramphenicol	0,5 g/l	
Agar	15 g/l	

- Culture des bactéries sur gélose nutritive dont la composition est la suivante :

Meat extract	1 g/l
Yeast extract	2 g/l
Peptone	5 g/l
Sodium chloride	5 g/l
Agar	15 g/l

Les deux milieux sont réalisés en duplicats dans lesquels sont ajoutés du NaCl à 30g/L.

Les quatre milieux sont stérilisés par autoclave 20 min à 120 °C puis coulés sur boîte de Pétri.

### **2.1.3. Culture et isolement des souches**

#### **a- Préparation des échantillons**

Afin de séparer les microorganismes de la pierre et de dissocier les agglomérats, environ 200 mg d'échantillon de pierre sont ajoutés à 10 ml de tampon d'extraction (à base de Tween 80). Le tout est agité doucement (environ 50 rpm) pendant 1h.

Des dilutions dans du sérum physiologique sont ensuite réalisées à  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$ . Trois solutions d'échantillon sont obtenues : à  $10^0$ ,  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$ .

\* Composition de la solution de tampon d'extraction à base de Tween 80

Tween 80	0,001%	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,6 g	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,2 g	pH final 5,6 +/- 0,2
NaCl	8 g	
qsp H <sub>2</sub> O déminéralisée	q.s.p.1 L	

#### **b- Ensemencement dans les milieux**

- Pour les bactéries :

200 µL de chaque dilution sont étalés sur les différentes boîtes de Pétri.

- Pour les champignons :

200 µL de l'échantillon non dilué est ensemencé en masse dans le milieu Sabouraud avec et sans ajout de NaCl.

#### **c- Croissance**

Les boîtes de Pétri contenant la gélose nutritive et le milieu Sabouraud sont incubées à température ambiante pendant 5 jours.

d- Isolement et identification des microorganismes

Toute colonie distincte s'étant développée sur les boîtes de Pétri est prélevée et étalée sur pétri individuel contenant le même milieu sur lequel elle s'est développée.

Son ADN est ensuite extrait, purifié et amplifié par PCR, puis séquencé. Ces étapes sont décrites dans la partie « Biologie moléculaire ».

## **2.2- Techniques de biologie moléculaire**

### **2.2.1- Extraction de l'ADN génomique**

Toutes les extractions d'ADN génomiques, à partir des différents échantillons issus de la pierre ou de cultures pures, ont été réalisées à l'aide du kit UltraClean™ Soil DNA extraction (Mobio Laboratories Inc, Solana Beach, Californie) selon les recommandations du fournisseur. Ce kit combine deux types différents de lyses cellulaires, une lyse mécanique par broyage et une lyse enzymatique.

Après extraction, la séparation des ADN génomiques est réalisée par migration électrophorétique sur gel d'agarose à 1 % (m/v) dans un tampon TBE 0,5X (Tris-Borate 90mM, EDTA 1 mM) sous une tension de 100V durant 20 min. La migration des différents échantillons se fait en parallèle d'un marqueur de poids moléculaire (Lambda/Hind III, échelle de 564 pb à 23130 pb, Interchim). La présence de BEt à 0,5 µg.ml<sup>-1</sup> dans le gel, permet de visualiser l'ADN sous lumière UV.

NB : Afin de vérifier des éventuelles contaminations, un témoin a été réalisé à partir du premier tube fourni par le kit UltraClean™ Soil DNA extraction (Mobio Laboratories Inc, Solana Beach, Californie) auquel rien n'a été ajouté. Toutes les étapes de la procédure de biologie moléculaire ont été réalisées sur ce témoin.

## 2.2.2- Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et purification

### a- Amplification par PCR traditionnelle

Les réactions de PCR sur les ADNs génomiques sont réalisées à l'aide d'une ADN Polymérase *Taq* (5 PRIME Inc, USA). Ces réactions sont réalisées selon les conditions préconisées par le fournisseur. Les amorces utilisées sont répertoriées dans le Tableau II-1.

Les réactions de PCR ont été réalisées dans le milieu réactionnel suivant :

ADN matrice	≈ 100 ng
Amorces (10 μM)	5 μL
Mélange de dNTP (2 mM chaque)	5 μL
<i>Taq</i> polymérase (5 U/μL)	0,25 μL
Tampon polymérase (10X)	5 μL
H <sub>2</sub> O q.s.p.	50 μL

Le programme utilisé pour les réactions de PCR sur colonies est le suivant :

Dénaturation	94°C ; 5 min
30 cycles de :	Dénaturation : 94°C ; 30 sec
	Hybridation des amorces : 55 à 60°C ; 30 sec
	Élongation : 72°C ; 45 sec
Elongation finale :	72°C ; 10 min

Les produits PCR sont purifiés par migration électrophorétique sur gel d'agarose à 1% (m/v) dans un tampon TAE 1X (Tris-acétate 90 mM, EDTA 1 mM) sous une tension de 35V durant la nuit (environ 15h). La migration des différents échantillons se fait en parallèle d'un marqueur de poids moléculaire (PCR DNA marker, échelle de 50 pb à 2000 pb, Interchim). La présence de BEt à 0,5 μg.ml<sup>-1</sup> dans le gel, permet de visualiser l'ADN sous lumière UV.

Les bandes fluorescentes représentant les produits PCR sont découpées et les ADN sont purifiés à l'aide du kit commercial GFX<sup>TM</sup> DNA Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Science, Uppsala, Suède).

Nom de l'amorce	Gène amplifié	Température d'hybridation utilisée.	Séquence (5'→3')
8F 1489R	<i>ADNr16S</i>	<b>48</b>	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG TAC CTT GTT ACG ACT TCA (Weisburg, 1991)
M13F M13R	<i>Plasmide (insert)</i>	<b>56</b>	GTA AAA CGA CGG CCA G CAG GAA ACA GCT ATG AC
ITS1 ITS4	<i>ITS1, 5,8S et ITS2</i>	<b>48</b>	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC (White <i>et al.</i> , 1990)

**Tableau II-1 :** Amorces utilisées pour les réactions de PCR.

#### b- Amplification par PCR sur colonie

Ces réactions PCR sont réalisées à l'aide d'une ADN polymérase *Taq* (5 PRIME Inc, USA). Après transformation, les colonies montrant une croissance sur le milieu sélectif ont été repiquées sur une nouvelle boîte LB sélective puis piquées (source d'ADN matrice) dans le mélange réactionnel suivant :

Amorces (10 µM)	2 µL de chaque
Mélange de dNTP (2 mM chaque)	2,5 µL
Tampon (10X)	2 µL
<i>Taq</i> polymérase (5 U/µL, au dernier moment)	0,1 µL
H <sub>2</sub> O q.s.p	25 µL

Le programme utilisé pour les réactions de PCR sur colonies est le même que celui de PCR traditionnelle excepté le temps de dénaturation initial qui est augmenté à 10 minutes afin d'améliorer la lyse des cellules et la libération de l'ADN matrice. Les amorces utilisées dans ce cas sont les amorces M13F/M13R fournies dans le kit de clonage. Elles permettent d'amplifier un fragment d'ADN contenant l'insert, encadré par deux portions du plasmide (ajoutant environ 200 pb à l'insert). L'usage de ces amorces permet de s'affranchir du problème de l'ADN génomique d'*Escherichia coli*.

Les produits PCR sont purifiés à l'aide du kit commercial GFX™ DNA Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Science, Uppsala, Suède).

### **2.2.3- Construction de banques de clones**

4 µl des produits PCR purifiés sont clonés dans le vecteur pCR 2.1-TOPO (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant. Le mix de ligation est transformé dans les cellules d'*E. coli* OneShot® TOPO10 Electrocomp™ (Invitrogen), et les clones sont sélectionnés sur milieu LB solide contenant 100 µg/ml d'Ampicilline et 0,1 M de X-Gal.

Les colonies blanches (contenant l'insert) sont repiquées sur une nouvelle boîte de Pétri contenant le même milieu LB sélectif. L'insert de 96 clones blancs pris au hasard est réamplifié par PCR selon le protocole détaillé précédemment.

### **2.2.4- Criblage des banques de clones par RFLP**

Les produits PCR purifiés à l'aide du kit commercial GFX™ DNA Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Science, Uppsala, Suède) et obtenus à partir des clones sélectionnés, sont analysés grâce à la technique RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) : ils sont soumis à une digestion enzymatique par deux enzymes de restriction : *Hinf* I et *Hae* III (10 U, New England Biolabs) pendant 3 heures à 37°C.

Les produits de digestion sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % dans du TBE 0,5X (Tris-borate 90 mM, EDTA 1 mM, pH 8.3) pendant environ 1 heure à 100V. La présence de BEt à 0,5 µg.ml<sup>-1</sup> dans le gel, permet de visualiser l'ADN sous lumière UV.

L'analyse visuelle des profils de digestion permet de faire des regroupements entre ribotypes identiques. Des clones représentatifs de chaque ribotype sont choisis et les produits PCR purifiés correspondants sont séquencés.

### **2.2.5- Séquençage des profils**

Les réactions de séquençage sont effectuées avec le kit BigDye® Terminator v1 .1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems). La quantité de matrice d'ADN nécessaire à la

réaction de séquence varie en fonction de la taille des produits PCR purifiés. Pour les séquences longues (> 1000 pb), les réactions de séquençage sont réalisées dans le milieu réactionnel suivant :

ADN matrice	10-40 ng
Amorce (10 µM)	2 µL
BigDye	1,5 µL
Tampon 5x	3 µL
H2O qsp	20 µL

Pour les séquences plus courtes (<1000 pb), les réactions de séquençage sont réalisées dans le milieu réactionnel suivant :

ADN matrice	5-20 ng
Amorce (10 µM)	2 µL
BigDye	1 µL
Tampon 5x	3,5 µL
H2O qsp	20 µL

Le programme utilisé pour les réactions de séquençage est le suivant :

Dénaturation	96 °C ; 1 min
25 cycles de :	Dénaturation : 96°C ; 15 sec
	Hybridation des amorces : 50°C ; 15 sec
	Élongation : 60°C ; 4 min

Les produits PCR obtenus sont purifiés et précipités selon le protocole suivant :

2 µL d'EDTA (125 mM) sont ajoutés au fond du tube PCR bloquant ainsi les DNAses. L'ensemble est additionné à un mélange contenant 2 µl de sodium acétate (3M) et 50 µl d'éthanol absolu. La réaction est laissée à température ambiante durant 15 minutes puis est centrifugée 30 min à 2500 g à température ambiante. Le surnageant est alors délicatement prélevé et jeté. Après ajout de 200 µL d'éthanol à 70 %, une nouvelle centrifugation est réalisée durant 15 minutes dans les mêmes conditions que la précédente. Le surnageant est de nouveau enlevé. Le précipité est laissé à sécher à l'abri de la lumière puis conservé à 4 °C.

Les échantillons sont ensuite analysés par électrophorèse capillaire (séquenceur ABI 3130 XL, Plateforme Génomique de Bordeaux) puis les résultats sont traités avec le logiciel Chromas v2.1.

La présence de séquences chimères est vérifiée à l'aide du logiciel CHIMERA-CHECK (<http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimera.cgi?su=SSU>) du Ribosomal Database Project II.

Après suppression des séquences chimères, les séquences des différents fragments d'ADN sont comparées aux séquences connues contenues dans les banques de données à l'aide du logiciel BLAST N (*Basic Local Alignment Search Tool*, [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)). Le logiciel Mega 4 est utilisé pour réaliser les multi-alignements des séquences d'ADN. Toutes les séquences ont leur taille qui est uniformisée puis le logiciel Mega 4 évalue les distances entre les séquences avec l'algorithme Kimura-2-parameter et les arbres phylogénétiques sont construits avec la méthode du Neighbor-joining. La robustesse des arbres est vérifiée en réalisant 100 bootstrap.

### **2.2.6- Analyses statistiques**

Pour vérifier si la bibliothèque de clone est suffisante pour représenter la diversité de l'échantillon environnemental, l'interface construit par Kemp et Aller (2004) et localisé à l'adresse <http://www.aslo.org/lomethods/free/2004/0114a.html>, a été utilisé, et où l'estimateur d'abondance  $S_{Chao1}$  et l'index « Good's C » de recouvrement sont calculés.



### 3- Techniques physico-chimiques d'analyse de la pierre

#### 3.1- Calcul de la densité des pierres

Afin de calculer la densité d'une pierre, celle-ci est au préalable séchée à 80°C au minimum 24h. Puis elle est pesée; nous avons **M2** la masse sèche de la pierre.

La pierre est ensuite immergée dans de l'eau jusqu'à ce qu'elle en soit saturée.

Un récipient rempli d'eau sur lequel une plaque en plexi ou en verre a été posée de manière à ce qu'il n'y ait aucune bulle d'air est pesé ; nous avons **M1** la masse du récipient + eau + plaque.

La pierre imbibée d'eau est déposée dans le récipient rempli d'eau puis la plaque est reposée dessus toujours de manière à ce qu'il n'y ait aucune bulle d'air ; nous avons **M3** la masse du récipient + pierre + eau + plaque.

La densité ou masse volumique de la pierre se calcule selon :  $\rho = M2 / (M1+M2-M3)$

La densité est donc la masse de la pierre sèche divisée par la masse du volume d'eau qu'elle remplace.

Les mesures de densités sont réalisées pour chaque prélèvement sur 6 pierres, et la moyenne est ensuite calculée.

#### 3.2- Calcul de la capillarité des pierres

Afin de calculer la capillarité d'une pierre il faut dans un premier temps mesurer sa masse sèche (**M2**) (cf. paragraphe 3-1). Ensuite il faut enduire cette pierre sauf une de ses faces de vernis afin d'obstruer les pores. La surface de la face non vernie est calculée. Dans notre cas, cette surface fait 20 cm<sup>2</sup>.

La pierre est ensuite déposée dans un récipient sur deux cales afin de ne pas toucher le fond, face non vernie vers le bas. Entre 5 et 10 mm d'eau sont ensuite ajoutés (Figure II-2).

Les pierres sont pesées après différents temps : 1 min, 5 min, 15 min, 30 min, 1h, 2h, 4h, 8h, 24h.



**Figure II-2** : Photo des pierres en cours d'expérimentation pour le calcul de la capillarité.

La courbe représentant en ordonnée la masse divisée par la surface ( $\text{g.cm}^{-2}$ ) et en abscisse la racine carrée du temps ( $\text{sec}^{1/2}$ ) est tracée.

Le coefficient de capillarité correspond à la pente de la partie linéaire de la courbe et s'exprime en  $\text{g.cm}^{-2}.\text{s}^{-1/2}$ .

Ce calcul du coefficient de capillarité est basé sur une norme espagnole : *UNE-EN 1925, Métodos de ensayo para piedra natural. Determinación del coeficiente de absorción de agua por capilaridad. Mars 1999.*

La capillarité est mesurée à chaque prélèvement sur 6 pierres et la moyenne est ensuite calculée.

### ***3.3- Microscopie électronique à balayage***

Pour observer la surface des pierres, deux appareils de microscopie électronique à balayage (MEB) ont été employés durant cette thèse. Les pierres sont découpées à la scie afin de ne faire pas plus de 2 cm de hauteur et largeur.

Une partie des échantillons a été observée à l'aide d'un appareil JEOL JSM-5910LV (Inasmet, St-Sébastien, Espagne). Ces observations nécessitent une préparation au préalable de l'échantillon : une fine couche d'or est déposée à la surface de la pierre.

Une autre partie des échantillons de pierre est observée à l'aide d'un Electroscan mode E3 (Hélioparc, Pau, France) qui est un microscope électronique à balayage à pression contrôlée (ou nom commercial : ESEM, Environmental Scanning Electron Microscopy). Cela

correspond à une pression de vapeur inférieure ou égale à 1 torr (133 Pa). Ce mode d'observation engendre une déshydratation partielle des échantillons mais permet leur observation sans préparation préalable.

### ***3.4- Diffraction aux Rayons X (DRX)***

L'identification des minéraux constituant la pierre par DRX, s'est faite sur des échantillons réduits à l'état de poudre.

Le diffractomètre utilisé est un Miniflex Rigaku. Les conditions d'analyse sont les suivantes : tension : 621 V ; angle de balayage : de 5° à 140° ; vitesse de rotation du goniomètre (détecteur) : 2°.min<sup>-1</sup>.

Le logiciel Windows Qualitative Analysis 4.2 de Rigaku Corp permet de traiter les données et la base de données ICDD (International center for diffraction data) sert à l'identification des pics.

### ***3.5- Porosité selon la méthode BET***

Les analyses BET (Brunauer, Emmett et Teller) se sont faites sur des échantillons réduits à l'état de poudre.

L'appareil utilisé est un ASAP 2010 Micropore de Micromeritics. Les conditions d'analyse sont les suivantes : l'échantillon est dégazé 48 à 120h sous vide poussé (10 µm Hg). L'étape d'enregistrement de l'isotherme d'adsorption-désorption est réalisée à la température d'ébullition de l'azote liquide soit 77 Kelvin.

### ***3.6- Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier, couplée à la technique de Réflexion Diffuse DRIFT***

Les analyses par spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier, couplée à la technique de Réflexion Diffuse (DRIFT) ont été réalisées au moyen d'un FTIR Nexus de ThermoNicolet, avec un détecteur MCT (Mercure Cadmium Tellure refroidi à 77K), couplé à l'accessoire de réflexion Diffuse Spectra-Tech.

Les analyses ont été réalisées sur des échantillons réduits à l'état de poudre et mélangés avec du KBr pour une proportion finale de 5% en poids de l'échantillon.

### ***3.7- Spectrométrie de Photoélectron X***

La Spectrométrie de Photoélectron X, appelée XPS ou ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis) a été réalisée au moyen d'un spectromètre SSI (Surface Science Instrument), couplé à un bâti ultravide Méca 2000. L'émission de photoélectrons résulte de l'irradiation de l'échantillon par la raie  $K_{\alpha 1,2}$  de l'aluminium ( $h\nu = 1486,6$  eV).

Les analyses XPS ont été réalisées sur des échantillons réduits à l'état de poudre.

Les différentes stratégies d'analyses physico-chimiques et microbiologiques des pierres développées dans le chapitre Matériels et Méthodes sont synthétisées dans le diagramme suivant (Figure II-3) :

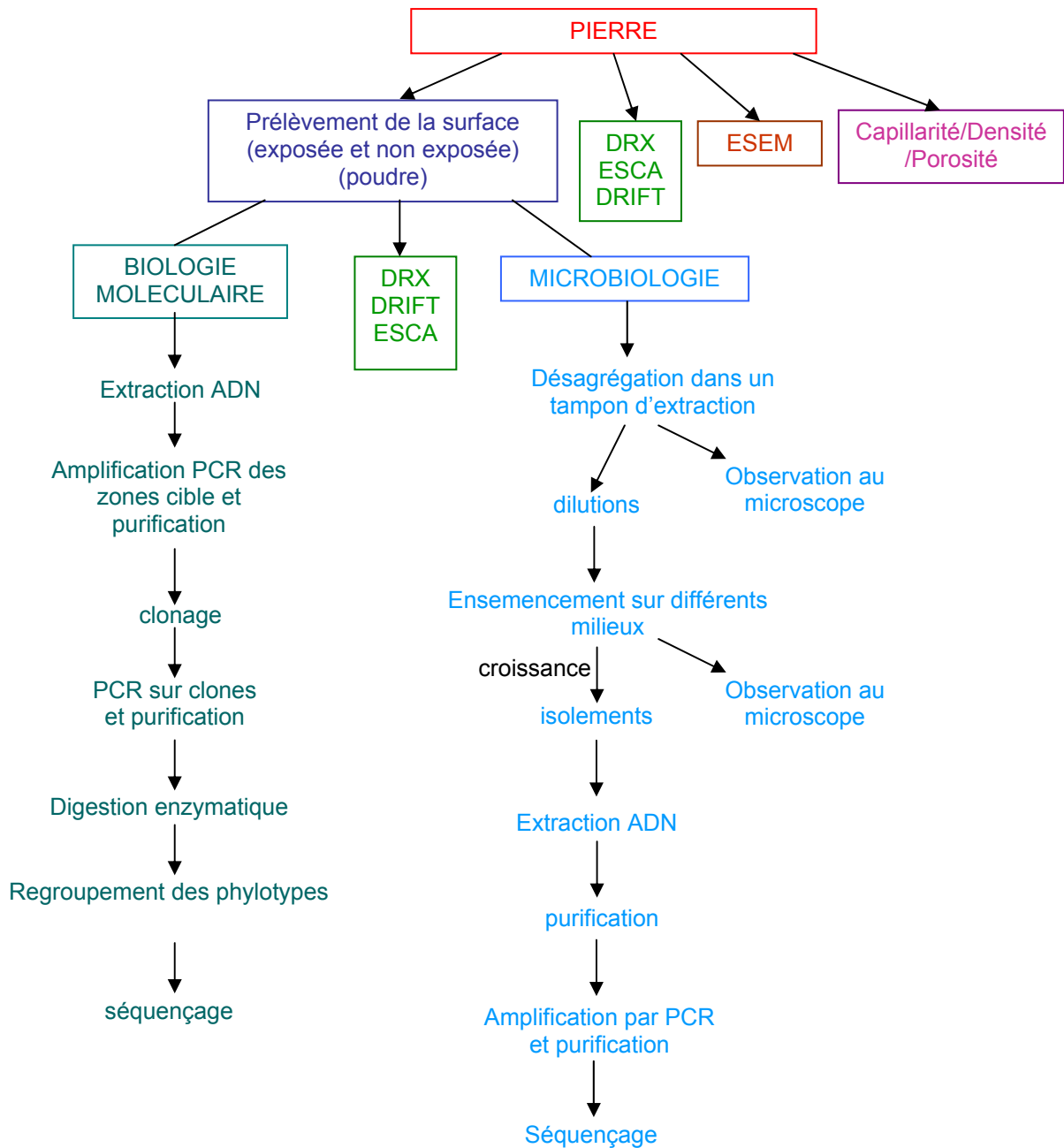


Figure II-3 : Stratégies adoptées pour l'étude des pierres de façade.



## **III - Travaux expérimentaux :**

### **La pierre calcaire d'Angoulême et le grès d'Igueldo exposés aux embruns marins**

---

#### **Introduction**

La plupart des bâtiments en pierres du littoral Basque ont été construits dans la deuxième partie du XIXe siècle, à l'occasion de l'arrivée de l'Impératrice Eugénie et de Napoléon III en 1854 à Biarritz. St-Sébastien fut reconstruite à partir de 1863 après avoir été ravagée par des incendies à 12 reprises.

L'environnement marin est réputé pour être agressif contre les constructions, notamment les pierres. Si l'on veut pouvoir lutter efficacement contre la dégradation des façades en pierre en environnement marin, il faut d'abord comprendre les processus physiques, chimiques et biologiques susceptibles d'intervenir dans un tel environnement.

Sur le littoral Atlantique, en particulier sur la Côte Basque, diverses pierres ont été utilisées pour la construction comme la pierre de Mousserolle (Cathédrale de Bayonne), la pierre de Bidache (pierre solide utilisée pour les fondations), la pierre d'Angoulême (corbeaux, encadrements de fenêtres). Le vieux centre de Saint-Sébastien (Espagne) a été construit en grès d'Igueldo.

Durant cette thèse, nous nous sommes intéressés à la dégradation de la pierre calcaire d'Angoulême et du grès d'Igueldo. Ces deux types de pierres sont différents par leur composition, mais présentent tous deux de très fortes dégradations en environnement marin. Nous nous sommes intéressés aux facteurs chimiques et biologiques qui peuvent causer cette dégradation.

Avant d'exposer les résultats de l'étude sur la détérioration chimique de la pierre d'Angoulême, nous présenterons les principales caractéristiques de la pierre d'Angoulême et de la pierre d'Igueldo, puis nous évoquerons les processus de dégradation attendus par chacune d'elle en milieu marin et les raisons qui nous ont poussés à limiter notre étude de la dégradation chimique à la pierre d'Angoulême. La dernière partie sera consacrée à l'identification des microorganismes présents sur la pierre d'Angoulême et le grès d'Igueldo. A cette occasion la méthode développée pour identifier les microorganismes présents sur la

pierre d'Angoulême et le grès d'Igueldo sera décrite sous forme d'un article soumis à la revue scientifique de rang A : *Journal of Micobiological Methods*.



## 1- Caractéristiques physico-chimiques des pierres d'Angoulême et d'Igueldo

La pierre d'Angoulême est principalement composée de calcaire  $\text{CaCO}_3$  (plus de 70%). D'autres éléments sont également présents sous forme d'oxyde (Tableau III-1):

Elément	Na	Mg	K	Fe	Al	Si	Ti	Mn	S
teneur en g/L	<0,2	1,1 ± 0,2	<0,2	6,6 ± 0,5	<0,05	4,5 ± 0,7	0,038 ± 0,001	0,04 ± 0,007	0,222 ± 0,0004

**Tableau III-1 :** Teneur en éléments oxydés de la pierre calcaire d'Angoulême (Analyse faite par le laboratoire UT2A, IPREM, Pau).

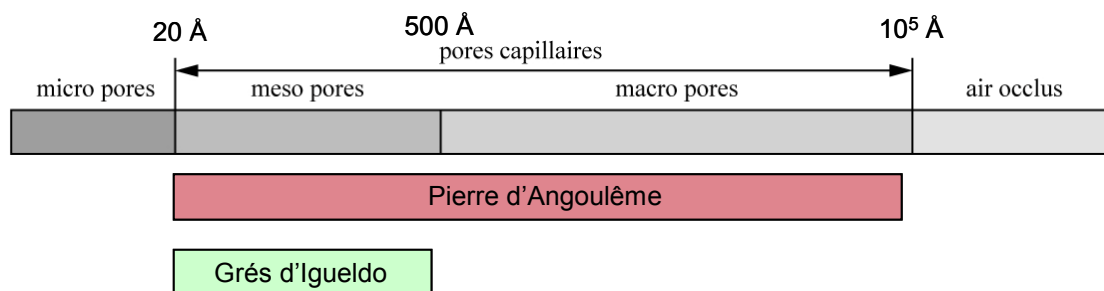
Le grès d'Igueldo est essentiellement composé de silice  $\text{SiO}_2$  (94%). Tout comme dans la pierre d'Angoulême, d'autres éléments sont également présents sous forme d'oxyde (Tableau III-2) :

Elément	Ca	Al	Fe	Mg	Mn	Ti	K	Na
teneur en g/L	0,7	16,2	0,4	1,6	0,1	1,3	9,4	2,2

**Tableau III-2 :** Teneur en éléments oxydés du grès d'Igueldo (J. Valero, communication personnelle).

Nous avons vu dans la partie « Etude Bibliographique » que la dégradation des pierres est particulièrement influencée par l'eau et sa pénétration dans les pores. Tout d'abord, lors des cycles hivernaux de gel/dégel, l'eau qui a pénétré profondément dans les pierres, peut exercer une pression physique sur la structure de la matrice en cristallisant et provoquer le même type d'effet que sur les canalisations d'eau courante. D'autre part l'eau peut transporter des agents chimiques qui vont agir sur la matrice minérale et ainsi la dissoudre. La porosité et la composition chimique des pierres sont donc deux paramètres à prendre en compte lors de l'étude des mécanismes de détérioration des pierres.

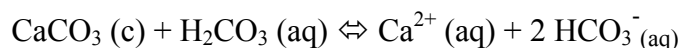
La structure porosimétrique des pierres et des ciments est le plus souvent étudiée au moyen du porosimètre à mercure. La taille des pores est très variable et diverses terminologies sont utilisées pour désigner les pores (ANDRA, 2004). Dans la terminologie de Young, le grès d'Igueldo est fait de méso-pores et la pierre d'Angoulême est faite de méso-pores et de macro-pores (Figure III-1) (LABEIN, Espagne, communication personnelle).



**Figure III-1 :** Porosité comparée de la pierre calcaire d'Angoulême et du grès d'Igueldo selon la terminologie de Young.

La pierre d'Angoulême, constituée majoritairement de carbonate de calcium  $\text{CaCO}_3$ , est à priori un matériau facilement dégradé, car constitué d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{CO}_3^{2-}$  liés entre eux par liaison ionique, alors que le grès d'Igueldo constitué majoritairement de silice  $\text{SiO}_2$ , est à priori plus résistant vis-à-vis des attaques chimiques puisque dans  $\text{SiO}_2$  les atomes de silicium et d'oxygène sont liés de façon covalente.

En milieu acide, même faible, le carbonate de calcium est rapidement dégradé. Ainsi en milieu acide carbonique tel qu'il résulte de la présence du  $\text{CO}_2$  atmosphérique en milieu humide, le carbonate de calcium participe à l'équilibre calco carbonique :



Dans un environnement marin, les pierres sont régulièrement aspergées par les embruns, sorte de pluie fine d'eau de mer dont nous rappelons la composition dans le Tableau III-3 suivant :

Type de sel	Concentration en g/L
NaCl	26,5
MgSO <sub>4</sub>	6,64
MgCl <sub>2</sub>	5,28
CaCl <sub>2</sub>	1,47
KCl	0,75
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,26
NH <sub>4</sub> Cl	0,00265

**Tableau III-3 :** Composition en sels de l'eau de mer.

Les sels peuvent jouer un rôle dans les processus de dégradation de la pierre en milieu marin. On remarque que les sels NaCl, MgSO<sub>4</sub> et MgCl<sub>2</sub> sont en quantité non négligeable dans l'eau de mer, ils doivent donc être considérés plus particulièrement.

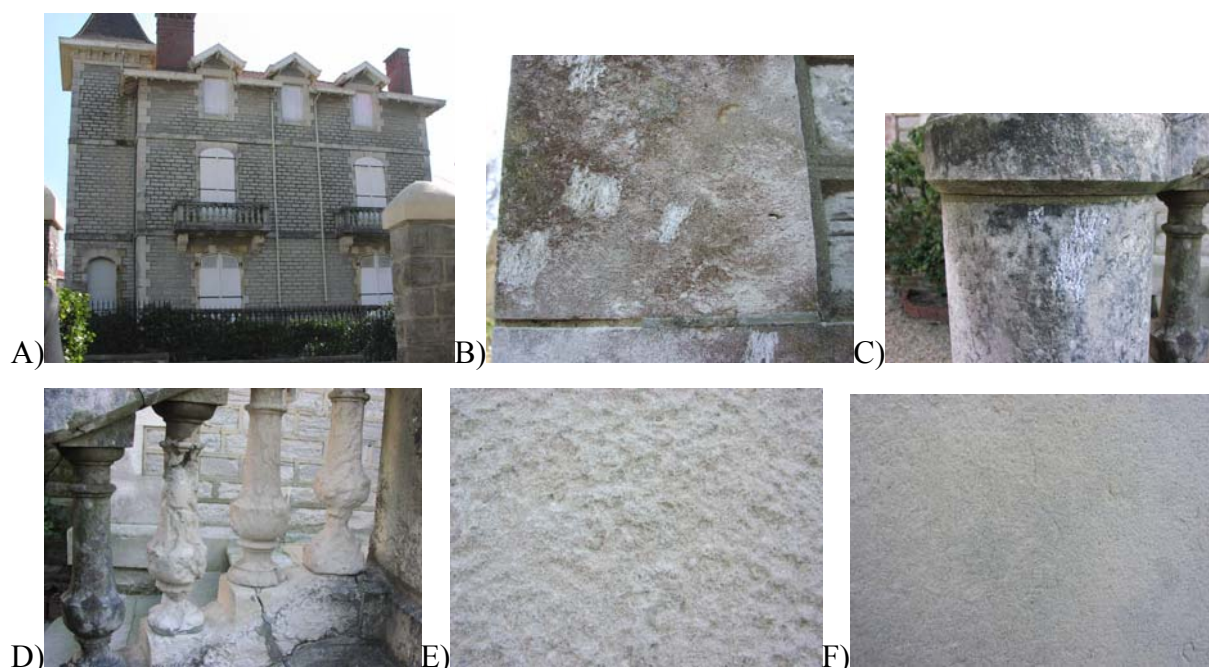
En environnement marin, la présence d'ions chlorures en provenance de NaCl, mais aussi celle d'autres ions comme SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, va contribuer à déplacer l'équilibre calco-carbonique dans le sens de la dégradation de CaCO<sub>3</sub> du fait de la complexation des ions Ca<sup>2+</sup> (Liu *et al.*, 2005). Dans le cas des grès, notamment le grès d'Igueldo, on peut penser que la dégradation chimique va s'opérer via les composés oxydés, présents en très faible quantité à savoir Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CaO, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, MgO, MnO, K<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>O qui vont être dissociés par chélation des ions métalliques avec les acides et donc disparaître, provoquant ainsi la fragilisation puis la détérioration du grès. Seul TiO<sub>2</sub>, composé très stable, ne saurait être dissocié par les sels marins.

On peut donc penser a priori qu'une dégradation chimique affectera toute la matrice d'une pierre d'Angoulême, conduisant ainsi à sa dissolution progressive alors que dans le cas du grès d'Igueldo il s'agirait plutôt de dissolution ponctuelle des différents oxydes métalliques présents dans la matrice de silice et conduisant à la dislocation de celle-ci.

Pour des raisons liées à cette plus grande fragilité de la pierre d'Angoulême vis-à-vis du grès d'Igueldo, mais également pour des raisons de disponibilité d'échantillons, mon travail de thèse dans le domaine de l'étude de la dégradation chimique en milieu marin s'est limité à la pierre d'Angoulême.

## 2- Etude de la dégradation chimique d'une pierre d'Angoulême en milieu marin

Durant la thèse nous avons étudié une pierre calcaire d'Angoulême présente sur les corbeaux, les encadrements de fenêtre et les pierres d'angle d'une villa, la Villa Isabel, située avenue de l'Impératrice à Biarritz, donc face à l'océan Atlantique (Figure III-2).



**Figure III-2 :** Photos de la Villa Isabel (A) et des différentes zones étudiées : zone couverte par un biofilm rouge (B), zone couverte par un biofilm noir (C), balustre rongée (D), zone alvéolée (E) et zone lisse (F).

Nous avons effectué un certain nombre de prélèvements sur des pierres présentant des degrés de dégradation différents. Certaines pierres ne présentaient aucune dégradation visible à l'œil nu (échantillon noté L pour lisse ; Figure III-2F), d'autres des alvéolisations (A pour alvéolé ; Figure III-2E), ou alors étaient colonisées par des biofilms (N pour biofilm noir, Figure III-2C et R pour biofilm rouge ; Figure III-2B). Enfin nous avons sélectionné un balustre de l'un des escaliers d'entrée présentant une très forte dégradation (B pour balustre ; Figure III-2D).

Ces différents prélèvements ont été analysés à l'aide de différentes techniques afin d'essayer d'estimer les processus à l'origine de ces dégradations observées.

## 2.1- Analyses XPS

La Spectrométrie de Photoélectron X, appelée XPS ou ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis) est une méthode basée sur la détermination à haute résolution de l'énergie de liaison des électrons atomiques, par effet photoélectrique sous l'irradiation d'une raie X monochromatique. L'intérêt de la technique réside dans la variation des énergies de liaison des atomes photo-ionisés en fonction de leur environnement chimique. Elle fournit deux informations : l'une sur la nature chimique des éléments, l'autre sur leur pourcentage atomique.

Nous avons effectué des analyses XPS sur les différents prélèvements opérés sur la Villa Isabel. Les échantillons ont été conditionnés et analysés sous forme de poudre.

Le Tableau III-4 résume les résultats obtenus pour chaque échantillon analysé.

	Villa ISABEL (Biarritz)				
	zone lisse (L)	zone alvéolée (A)	zone avec biofilm noir (N)	zone avec biofilm rosé (R)	balustre rongé (B)
carbone (C-C)	18,9	17,3	42,3	49,7	16,5
carbone (CO <sub>3</sub> )	11,0	14,5	5,3	5,3	14,0
carbone (C=O)	0,0	0,0	7,6	2,5	
Oxygène	49,6	48,5	33,1	30,2	49,1
Calcium	14,3	14,3	5,4	7,7	13,3
azote (organique)	0,4	0,6	3,0	2,2	0,3
soufre (SO <sub>4</sub> )	2,2	0,7	0,4	0,2	2,2
Chlore	0,4	0,6	0,1	0,3	0,4
Sodium	0,7	0,7	0,2	0,2	0,8
Silicium	1,3	2,1	1,6	1,4	1,7
Magésium	1,3	0,7	1,0	0,4	1,8
	100,0	100,0	100,0	100,1	100,0

Tableau III-4 : Composition des différents échantillons prélevés sur la Villa Isabel en pourcentage atomique.

Dans chacun des échantillons on trouve évidemment la présence de calcium et de carbone sous forme de carbonate en quantités quasiment stoechiométriques. Les zones présentant les biofilms noirs (N) et rouges (R), montrent en plus du CaCO<sub>3</sub>, une forte quantité de carbone (carbone de liaisons C-C ou C=C), et à un degré moindre, du carbone de groupement carbonyles C=O, ainsi que la marque de la présence d'azote organique, probablement de type NH. Ces éléments proviennent probablement des biofilms, les microorganismes possédant en effet plusieurs molécules avec des groupements C=O et NH

(notamment les protéines). La forte teneur en carbone révèle la présence de carbone organique, base de toute vie.

La zone lisse (L) et le balustre rongé (B) se différencient des autres zones par la présence de soufre, sous forme de sulfate  $\text{SO}_4^{2-}$ . Celui-ci a vraisemblablement été apporté par les embruns marins ; en effet l'eau de mer contient environ 6.64 g/L de  $\text{MgSO}_4$ .

Il faut remarquer que pour chaque zone le chlore n'est présent qu'en très faible quantité (<1%), en dépit de la nature même des embruns marins qui sont censés se déposer sur les façades exposées. Cela est néanmoins cohérent avec le fait qu'il s'agit de surfaces extérieures donc régulièrement lessivées par des pluies.

La présence d'éléments organiques sur les pierres colorées confirme qu'elles sont bien colonisées par des biofilms. Par ailleurs la seule espèce minérale, en dehors de  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{CO}_3^{2-}$  que nous ayons réussi à mettre en évidence est l'ion sulfate  $\text{SO}_4^{2-}$ . Si l'on admet la dégradation acide de  $\text{CaCO}_3$  et donc la libération d'ions calcium, on est a priori en droit de s'attendre à la formation de  $\text{CaCl}_2$  et de  $\text{CaSO}_4$ . Ces deux composés se différencient par des solubilités très différentes.  $\text{CaSO}_4$  a une solubilité dans l'eau très faible (0.2 g/L) comparée à celle de  $\text{CaCO}_3$  (0.0014g/L), alors que le chlorure de calcium a une solubilité très élevée (de 74.5 à 279 g/L selon le degré d'hydratation de  $\text{CaCl}_2$ ), près de 400 à 1400 fois supérieure à celle de  $\text{CaSO}_4$ . La quasi absence de chlore au sein des échantillons analysés est en accord avec la grande solubilité de  $\text{NaCl}$  et de  $\text{CaCl}_2$  et de leur élimination probable par lessivage. Par contre la présence de sulfate peut être indicative de la formation de  $\text{CaSO}_4$ .

Afin de confirmer la présence de  $\text{CaSO}_4$  au sein de certains échantillons nous avons procédé à l'analyse infrarouge à transformé de Fourier par réflexion diffuse (DRIFT).

## ***2.2- Analyses DRIFT***

La spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier, couplée à la technique de Réflexion Diffuse (DRIFT), est une méthode d'analyse relativement sensible, particulièrement adaptée à l'analyse de poudres et de surfaces rugueuses. La méthode est non-destructive et grâce à elle, des spectres de bonne qualité peuvent être obtenus avec une préparation minimale des échantillons. Dans le cas de poudre, il suffit de réaliser un mélange à 5% en poids de l'échantillon à analyser avec du KBr. Cette technique permet notamment de faire de l'analyse qualitative par comparaison avec des échantillons de référence. A la différence de

l'ESCA, la DRIFT fournit donc une information directe sur le type de structure dans laquelle un élément chimique est engagé.

La présence de l'ion sulfate  $\text{SO}_4^{2-}$  dans certains échantillons, mise en évidence par XPS, peut aussi bien s'expliquer par la présence de  $\text{MgSO}_4$  (contenu dans les embruns) que par celle de  $\text{CaSO}_4$  (réaction de  $\text{Ca}^{2+}$  avec  $\text{SO}_4^{2-}$ ). La DRIFT peut nous aider à déterminer le type de sulfate effectivement présent dans les échantillons B et L. La DRIFT peut également nous aider à confirmer l'absence de dépôt de  $\text{CaCl}_2$  observé par les analyses ESCA.

Les différents échantillons (B, N, R, L et A) prélevés sur la Villa Isabel ont été analysés par DRIFT et les spectres superposés avec ceux des références suivantes, enregistrées dans les mêmes conditions :  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  et  $\text{CaCl}_2$ .

Sur tous les spectres nous trouvons évidemment la présence de pics d'absorption caractéristiques de  $\text{CaCO}_3$  notamment les pics à 2983, 2874, 2572, 2140 et 1744  $\text{cm}^{-1}$  (cf. annexe 1). Sur aucun des spectres nous ne relevons la présence de pics d'absorption qui puissent être attribués à  $\text{CaCl}_2$  (cf. annexe 2). Les spectres des échantillons A, N et R ne présentent pas de pics d'absorption qui puissent être attribués à  $\text{MgSO}_4$  ou  $\text{CaSO}_4$  (cf. annexe 3). Par superposition des spectres DRIFT de l'échantillon L avec ceux de  $\text{CaSO}_4$  et  $\text{MgSO}_4$  (Figure III-3 et Figure III-4) nous constatons que les pics d'absorption de  $\text{CaSO}_4$  (2234, 2114, 1684 et 1620  $\text{cm}^{-1}$ ) sont présents dans les spectres DRIFT de L, tandis que le pic d'absorption caractéristique de  $\text{MgSO}_4$  à 1632  $\text{cm}^{-1}$  est absent. Il en est de même pour l'échantillon B (cf. annexe 4).

Il apparaît ainsi clairement que la zone lisse L et le prélèvement effectué sur le balustre rongé B contiennent du  $\text{CaSO}_4$  et non pas du  $\text{MgSO}_4$ .

A noter que pour des raisons de sensibilité et de superposition des spectres, les biofilms présents sur les échantillons N et R, ne sont pas visibles en DRIFT.

Ces analyses nous ont donc permis de prouver la présence de  $\text{CaSO}_4$  à la surface de certaines pierres de la Villa Isabel, et pas sur d'autres. Nous n'avons pas d'explication à la présence aléatoire de  $\text{CaSO}_4$  sur certaines pierres pas sur d'autres.

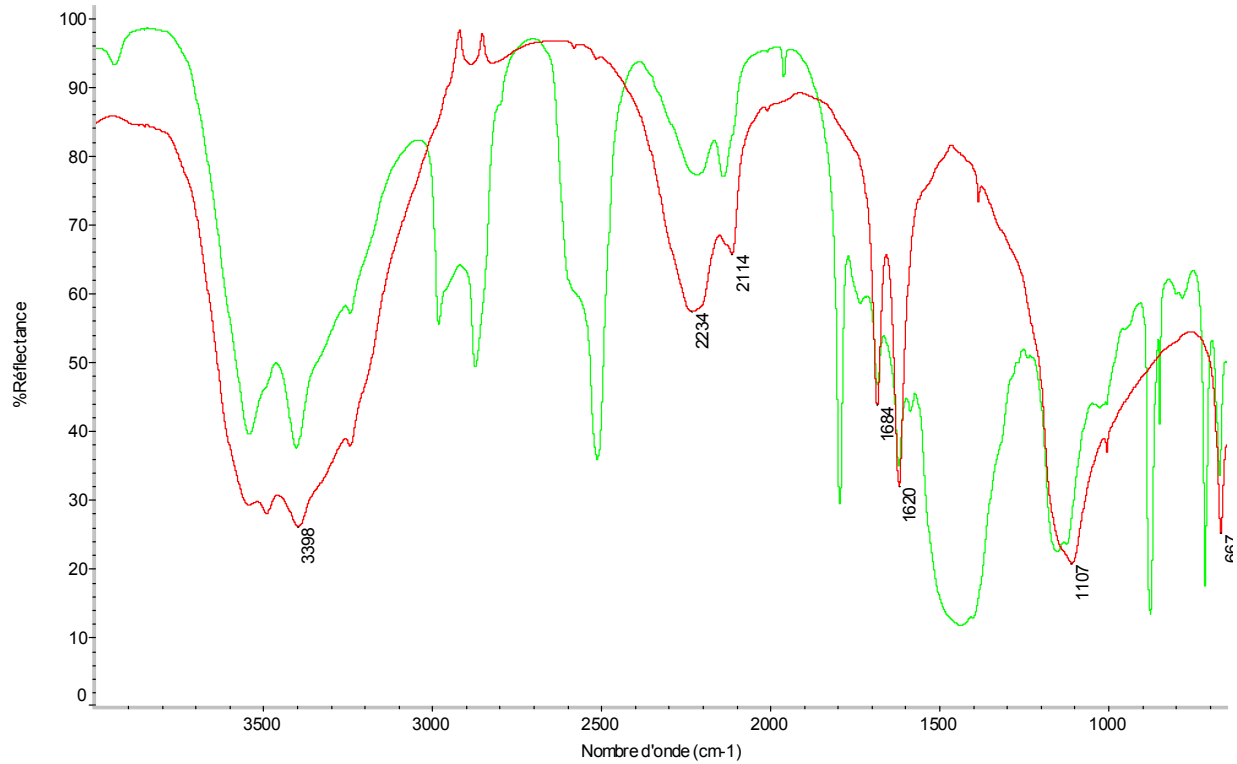


Figure III-3 : Spectre DRIFT de l'échantillon L (spectre vert) superposé avec celui de CaSO<sub>4</sub> (spectre rouge).

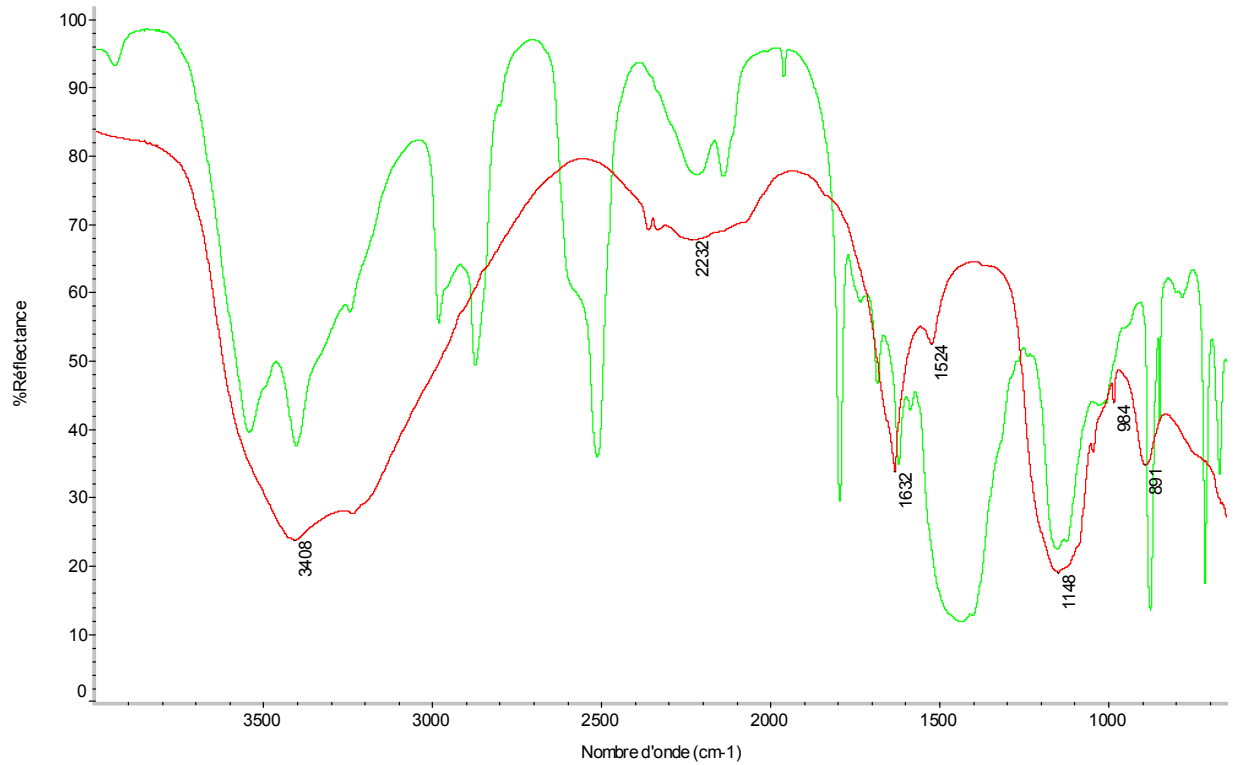


Figure III-4 : Spectre DRIFT de l'échantillon L (spectre vert) superposé avec celui de MgSO<sub>4</sub> · 8H<sub>2</sub>O (spectre rouge).



### 2.3- Analyses DRX

Les poudres prélevées sur les différentes zones sélectionnées sur la Villa Isabel ont été analysées par diffraction des Rayons X (DRX) qui permet l'identification des composés cristallisés. Les spectres obtenus ont été interprétés par identification avec les spectres des produits purs dont on peut à priori attendre la présence dans les échantillons étudiés, à savoir :  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  et  $\text{NaCl}$ .

Nous avons indiqué dans le Tableau III-5 la position du ou des pics les plus intenses, mesurée en terme de distance inter réticulaire pour chacune des références (dValue) et signalé la présence ou non d'un pic correspondant pour chaque échantillon analysé.

référence	dValue du pic le plus intense	zone lisse (L)	zone avec biofilm noir (N)	zone avec biofilm rouge (R)	zone alvéolée (A)	zone balustre rongé (B)
$\text{CaCO}_3$	3,02	3,01	3,03	3,03	3,04	3,03
$\text{CaSO}_4$	7,58 et 3,06	7,431 et 3,01	/	/	/	7,39 et 3,00
$\text{MgSO}_4$	4,308	/	/	/	/	/
$\text{CaCl}_2$	5,83 et 2,96	/	/	/	/	/
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	5,26	/	/	/	/	/
$\text{NaCl}$	2,77	2,76	/	2,78	/	/

**Tableau III-5** : Pics principaux des composés de référence dans les spectres DRX des échantillons analysés.

La marque de  $\text{CaCO}_3$  ( $d=3.02 \pm 0.02$ ) est évidemment présente dans le spectre de chaque échantillon. En accord avec les informations obtenues par ESCA et par DRIFT,  $\text{CaSO}_4$  est présent dans les échantillons prélevés sur zone lisse (L) et sur le balustre rongé. Des spectres réalisés sur des mélanges binaires ( $\text{CaCO}_3 + \text{CaSO}_4$ ) ont permis d'évaluer à près de 10% le pourcentage en poids de  $\text{CaSO}_4$  dans les échantillons prélevés sur la Villa Isabel.

L'analyse DRX indique par ailleurs que ni  $\text{MgSO}_4$ , ni  $\text{CaCl}_2$ , ni  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  ne sont présents sur l'un quelconque des échantillons ou alors dans de très faibles proportions.

Enfin l'analyse DRX laisse apparaître que du chlorure de sodium  $\text{NaCl}$  serait présent en faible quantité dans les échantillons prélevés sur la zone lisse (L) et celle présentant un biofilm rouge (R).

L'analyse DRX confirme les résultats obtenus par ESCA et DRIFT, notamment en ce qui concerne la présence de  $\text{CaSO}_4$ . Cette analyse permet également de détecter la présence de

NaCl dans certains échantillons et ce en accord avec la détection de l'élément chlore par ESCA.

#### 2.4- Mesure de la porosité au BET

La caractérisation de matériaux poreux peut être faite par la méthode BET (Brunauer-Emmet-Teller). Cette méthode permet de caractériser un échantillon, en atteignant plusieurs paramètres :

- la surface spécifique,
- la distribution de la taille des pores
- la forme des pores
- le volume mésoporeux.

Cette méthode permet de détecter la présence à la fois de micropores (diamètre des pores inférieur à 2 nm) mais aussi de méso pores (diamètre des pores compris entre 2 et 50 nm). Elle repose sur l'exploitation d'isothermes d'adsorption et de désorption d'un gaz inerte (en général l'azote, N<sub>2</sub>) sur l'échantillon étudié.

Les porosités mesurées pour les échantillons (L), (A), (N), (R) et (B) exprimées en terme de surface spécifique sont reportées dans le Tableau III-6.

échantillon	(L)	(A)	(N)	(R)	(B)
Surface spécifique (m <sup>2</sup> /g)	10,6	59	68	6,2	73,4

**Tableau III-6 :** Taille des pores en m<sup>2</sup>/g des échantillons de pierre d'Angoulême prélevés sur la Villa Isabel.

A la vue de ces résultats, il apparaît clairement que les échantillons analysés n'ont qu'une faible porosité en comparaison de ce que l'on peut rencontrer dans les silices (200m<sup>2</sup>/g) ou le charbon actif (600 à 1000 m<sup>2</sup>/g). Les résultats obtenus en terme de surface spécifique sont résumés dans le Tableau III-6.

On peut observer que la zone lisse (L) et la zone colonisée par un biofilm rouge (R), sont beaucoup moins poreuses que les autres zones. Cela s'explique par le fait que ces deux

zones sont peu ou pas détériorées, alors que les zones A, N et B sont davantage dégradées. En effet, la porosité d'une pierre augmente lorsqu'elle est détériorée (Cardell *et al.*, 2003).

## 2.5- Conclusion

Les analyses ESCA, DRIFT et DRX ont démontré la présence de  $\text{CaSO}_4$  en quantité non négligeable, sur certaines zones de la pierre calcaire d'Angoulême de la Villa Isabel, de même que la présence de  $\text{NaCl}$  en faible quantité. La présence de  $\text{NaCl}$  prouve si besoin est qu'il y a des dépôts de sels marins sur certaines zones ce qui ne signifie pas pour autant qu'il n'y en a pas eu sur les autres qui sont peut-être davantage exposées à la pluie et au lessivage. La présence de  $\text{CaSO}_4$  sur certains autres échantillons prouve qu'il y a eu attaque acide du  $\text{CaCO}_3$  vraisemblablement par l'acide carbonique formé à partir du  $\text{CO}_2$  atmosphérique et déplacement de l'équilibre calco-carbonique dans le sens de la dissociation du carbonate de calcium. Il y a eu ainsi dégradation de la matrice, du fait de la complexation des ions  $\text{Ca}^{2+}$  par les ions sulfates apportés par l'eau de mer. Par ailleurs, et même si elle est probable, la complexation par les ions chlorures vraisemblablement en abondance à un moment donné, ne peut pas être mise en évidence compte tenu du fait qu'à l'inverse du sulfate de calcium, les chlorures de calcium diversement hydratés sont des produits éminemment solubles qui seront éliminés à la première pluie et qui ne laisseront donc aucune trace de leur formation.

L'étude bibliographique a montré que la détérioration des pierres résulte de la conjonction de trois facteurs : chimique, physique et biologique. Dans la partie qui vient d'être exposée nous avons pu faire un bilan partiel de l'action chimique par les embruns marins sur les pierres. Toutefois, la détérioration importante du balustre de l'escalier d'accès à la Villa Isabel (cf photo Figure III-2D) est probablement due à d'autres facteurs que des facteurs chimiques notamment des facteurs physiques comme l'action abrasive des particules de l'air et notamment les particules de silice qui forment le sable, ou des cristaux de sels qui se sont formés dans les pores après évaporation (Cardell *et al.*, 2003).

Autant il paraît difficile de lutter contre les processus à l'origine des dégradations chimiques et physiques qui découlent de facteurs naturels (vent) ou anthropiques (pollution par  $\text{CO}_2$ ) autant il semble plus facile d'agir par des traitements préventifs et curatifs contre la colonisation biologique des pierres, et par voie de conséquence, contre les effets de dégradation induits. Pour cela il convient évidemment d'avoir une bonne connaissance des

microorganismes qui se développent en milieu marin. Dans la partie qui suit nous aborderons le problème de la colonisation biologique de la pierre d'Angoulême et de celle d'Igueldo, avec l'objectif d'identifier les microorganismes présents afin à plus long terme d'essayer de limiter les processus de dégradation induits ou accompagnés par les agents biologiques.

### **3- Etude des biofilms prélevés sur la façade de la Villa Isabel en calcaire et de la mairie de St-Sébastien en grès**

La biodétérioration de la pierre, processus d'altération dû à la présence de micro-organismes sous la forme de biofilms, intervient pour une large part dans le phénomène de vieillissement.

L'analyse des communautés microbiennes présentes à la surface de la pierre de construction est une étape incontournable pour définir des mesures de restauration et de conservation adaptées.

Jusqu'à récemment, la caractérisation des microorganismes se développant sur des façades en pierre se sont faites à partir des méthodes de microbiologie classique basées sur l'isolement d'espèces microbiennes après croissance sur des milieux synthétiques.

Bien qu'informatives, ces études conduisent inévitablement à sous-estimer la biodiversité. En effet, il est généralement admis que les micro-organismes cultivables ne représentent qu'une faible proportion (environ 1%) de la totalité des organismes présents au sein d'un échantillon environnemental (Ward *et al.*, 1990). Afin de contourner ce problème, des méthodes moléculaires basées sur l'analyse du polymorphisme de l'ADN ont été développées au cours des 20 dernières années (Head *et al.*, 1998 ; Nocker *et al.*, 2007) ; de nos jours, elles sont largement utilisées, notamment pour l'analyse de la biodiversité microbienne des sols (Kirk *et al.*, 2004). En ce qui concerne les biofilms microbiens responsables de la détérioration de la pierre de construction, très peu d'études moléculaires ont été décrites (González et Saiz-Jiménez, 2005), et parmi elles, aucune n'a concerné jusqu'à présent la totalité d'une communauté microbienne. Les travaux réalisés ont porté soit sur des communautés de bactéries (Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2001; McNamara *et al.*, 2006; Zimmermann *et al.*, 2006; Imperi *et al.*, 2007), soit sur des communautés de champignons (Möhlenhoff *et al.*, 2001).

Le premier objectif des travaux de thèse a donc été de mettre au point une méthode moléculaire basée sur l'analyse des molécules d'ADN de l'ensemble des microorganismes présents au sein de biofilms prélevés à la surface de pierres de construction.

Cette méthode a été appliquée sur des biofilms s'étant développés sur le grès d'Igueldo de la Mairie de St-Sébastien (Espagne) et le calcaire d'Angoulême de la Villa Isabel (Biarritz).

**3.1- Mise au point de la méthode ARDRA pour l'identification des  
microorganismes se développant sur des pierres de construction**

**Development of a molecular methodology to assess microbial diversity of epilithic  
biofilms: from DNA extraction to community composition**

Running title : A molecular method to reveal microbial diversity of epilithic biofilms

M. BERDOULAY and J.C. SALVADO\*

Equipe Environnement et Microbiologie, IPREM - UMR CNRS 5254

Université de Pau et des Pays de l'Adour

UFR Sciences et Techniques de la Côte Basque - 1, allée du parc Montaury - Anglet France.

\*To whom all correspondence should be addressed:

Jean-Claude Salvado

Equipe Environnement et Microbiologie, IPREM – UMR CNRS 5254

Université de Pau et des Pays de l'Adour – UFR Sciences et Techniques de la Côte Basque

1, allée du parc Montaury

64600 - Anglet France.

Tel : (33) 5 59574444 ; Fax : (33) 5 59574409 ; e-mail : [jean-claude.salvado@univ-pau.fr](mailto:jean-claude.salvado@univ-pau.fr)

### **3.1.1- Abstract**

Molecular analysis of microbial diversity is crucial for protection and restoration of building stone. Few works have been reported in this domain, and to our knowledge, none concerned the study of the entire microbial community living on stone surface. The present study describes the development of a DNA-based methodology designed to characterize microbial communities of epilithic biofilms. In a first step, a DNA extraction protocol was selected to obtain PCR-amplifiable metagenomic DNA from a limestone biofilm. DNA extracts derived from a limestone and a sandstone biofilm were separately used to amplify either 16S rRNA genes or Internal Transcribed Spacers (ITS) from prokaryotic and eukaryotic genomes, respectively. Four DNA libraries were constructed by cloning these amplified DNA sequences; clones were subsequently amplified by colony PCR and screened by restriction analysis (RFLP). Sequencing and comparison of DNA fragments representative of all ribotypes allowed to proceed to the phylogenetic identification of prokaryotic and eukaryotic microorganisms present in the two microbial biofilms analyzed. Statistical analysis showed that the specific richness evidenced in this study was representative from the original sampled biofilms. In conclusion, the molecular methodology developed here reached its objectives and was considered reliable to undertake any study on microbial diversity of building stone biofilms.

**Keywords:** Biodeterioration; Microbial diversity; Epilithic biofilm; ARDRA; 16S rDNA; ITS region; Phylogeny

### 3.1.2- Introduction

Stone monuments and buildings are continuously exposed to weathering agents such as air, sunlight and rain. Although ineluctable, evolution of stone decay depends on its mineral composition and environmental conditions, mainly influenced by climate and human activities (Papida *et al.*, 2000; Warscheid and Braams, 2000). Moreover, besides physical and chemical factors, biological agents also play an important role in deterioration of stone material. Studies on the impact of microorganisms on building stone has intensified during the last two decades and significant progress have been done in the understanding of biodeterioration processes. Knowledge of such processes is crucial to define strategies for restoration and conservation of historic monuments, and thus, is an economic issue (Wakefield and Jones, 1998; Gaylarde and Morton, 1999; Mottershead *et al.*, 2003).

Microorganisms classically found on building surfaces are autotrophic and heterotrophic bacteria, fungi, algae and lichens (Gaylarde and Gaylarde, 2005 ; Gorbushina, 2007). This consortium of heterogeneous microbial species forms a biofilm whose internal cohesion and adhesion to underlying surface are ensured by extracellular polymeric substances. Such biofilms are particularly adapted to resist to dessication and UV-light exposure. Due to their autotrophic nature, cyanobacteria and algae are considered to be the first colonizers. Heterotrophic microbes develop further using organic compounds provided by autotrophs and/or airborne pollutants (Zanardini *et al.*, 2000). Main detrimental effects of microbial biofilms are (1) discolouration of stone surface because of the presence of photosynthetic or protective pigments, (2) physical alteration of the material structure by penetration of bacterial and fungal hyphae and by differential mechanical pressure imposed by shrinking and swelling cycles of the adhesive biofilms, (3) chemical modification of the mineral support by acidolytic and oxidoreductive corrosion processes generated by products of the microbial metabolism (Warscheid and Braams, 2000).

The characterization of microbial communities colonizing stone surfaces is a prerequisite to monitor deteriogenic microorganisms and to set up suitable treatments to circumvent their undesirable effects. Although informative and still useful, classic microbiological studies based on the isolation of microbial species by growth on synthetic culture media have some limitations : since it is generally assumed that cultivable microorganisms represent only a small fraction (less than 1%) of the total microorganisms present in environmental samples, culture-dependent methods conduce inevitably to underestimate the microbial diversity (Ward *et al.*, 1990). This problem has been solved by



the development of DNA-based fingerprinting methods to study the microbial diversity of communities from various ecological niches (Head *et al.*, 1998; Nocker *et al.*, 2007). Although these molecular approaches have been widely used, notably for the analysis of microbial diversity of soil (Kirk *et al.*, 2004), few reports mentioned their use for the genotyping of biofilms present at the surface of building stones (González and Saiz-Jiménez, 2005). Moreover, all such molecular studies undertaken as yet focused on different main components of the microbial community from natural samples, e.g. bacteria (Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2001; McNamara *et al.*, 2006; Zimmermann *et al.*, 2006; Imperi *et al.*, 2007) or fungi (Möhlenhoff *et al.*, 2001), but none concerned the entire community.

The aim of this work was to develop a molecular methodology suitable to perform phylogenetic rDNA analyses of the overall community from building stone. The steps followed to conduct this work were (1) to select a DNA extraction protocol efficient to extract DNA from the whole community of epilithic biofilms, (2) to amplify rDNA sequences from prokaryotic and eukaryotic members of the microbial community, (3) to clone and screen the amplified rDNA sequences for DNA sequencing, (4) to analyze and compare sequenced DNAs for phylogenetic identification of microorganisms, (5) to verify that the microbial diversity revealed by DNA analysis is representative of the microbial community originally sampled.

### 3.1.3- Materials and Methods

#### a- Sampling

Samples were collected on a calcareous stone from the "Villa Isabel", a private house located in the city center of Biarritz (France), and on a sandstone from the town hall of San Sebastian (Spain). Sampled microbial biofilms appeared as rosy areas on the face-wall of "Villa Isabel" and as greenish-black ones at the surface of surrounding walls of San Sebastian's town hall. Samples were taken by scraping off material with a sterile scalpels and microtubes, maintained at 4°C during the transport to the laboratory and stored at –80°C until use.

b- DNA extraction and purification

DNA extractions were carried out using two commercial kits, the Easy-DNA™ kit (Invitrogen, Carlsbad, California) and the UltraClean™ Soil DNA Isolation kit (MoBio Laboratories Inc, Solana Beach, California), following furnishers instructions. In both cases, DNA extractions started by resuspending 100 mg of sample material in lysis solution.

The Easy-DNA™ kit is based on an enzymatic lysis of cells followed by a chloroform extraction and ethanol DNA precipitation. The UltraClean™ Soil DNA Isolation kit is designed for DNA extraction from soil. Cells are disrupted by bead beating for 15 min in a lysis solution containing beads. After precipitation of undesirable cellular material, DNA is purified by chromatography on spin columns. Alternatively, a soft condition of cell lysis was also used, consisting in submitting cells to four cycles of heating (65°C, 5 min) and brief (5 sec) bead beating.

c- rDNA amplification

The 16S rDNA was amplified by PCR using primers 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1489R (5'-TACCTTGTTACGACTTCA-3'). For PCR amplification of the ITS region, primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') were used. PCR reactions were carried out in 50 µl final volume containing 20-50 ng of extracted DNA, 20 pmol of each primer, 100 µM of each deoxyribonucleotide triphosphate, 5 µl of 10X buffer (500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris-HCl pH 8,3) and 2.5 U of Taq DNA polymerase (5 PRIME Inc., USA). PCR was performed in a robocycler (Themocycler PTC-100, MJ Research) with the following thermocycling program: 5 min denaturation at 94°C, followed by 35 cycles at 94°C for 1 min, 48°C for 1 min and 72°C for 1 min. 10 minutes at 72°C were used as a final extension step. Amplified DNA was separated by electrophoresis in TEA 1% agarose gel, cut out and purified on column using the GFX™ PCR and DNA Gel Band Purification kit (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden). 16S rDNA PCR amplifications gave an amplimer of 1500 pb. ITS rDNA PCR amplifications yielded two amplimers of 650 and 750 pb which were grouped before purification.

d- rDNA cloning

Four microliter of purified PCR products were cloned with the pCR 2.1-TOPO vector (Invitrogen), following the manufacturer's protocol. The ligation mixture was transformed into One Shot® TOP10 Electrocomp™ *E. coli* cells (Invitrogen) and recombinant clones were selected on LB solid medium containing ampicillin(100 µg/ml) and X-Gal (0.1 mM).

e- Inserts amplification and purification

White colonies randomly picked were screened for inserts by performing colony PCR with the vector specific primers M13 F (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') and M13 R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). PCR reactions were carried out in 25 µl final volume containing 20 pmol of each primer, 100 µM of each deoxyribonucleotide triphosphate, 2,5 µl of 10X buffer (500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris-HCl pH 8,3), 1.25 U of Taq DNA polymerase (5 PRIME Inc., USA). Thermal cycling conditions were as follows: 10 min denaturation at 94°C, followed by 35 cycles at 94°C for 45 sec, 56°C for 45 sec and 72°C for 1 min. A final extension step of 10 minutes at 72°C was applied. The amplimer of all clones containing inserts of the correct size was purified using GFX™ PCR and Gel Band Purification kit (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) following the manufacturer's protocol.

f- Restriction analyses of amplified ribosomal DNA (ARDRA)

Purified amplimers were separately digested with restriction enzymes *HinfI* and *HaeIII* (10U, New England Biolabs) for 4 h at 37°C. The restricted DNA fragments were separated on a 1.5 % agarose gel containing ethidium bromide (0.5 µg/ml). After migration in TBE buffer at 25V/h for 1 h 30 min, DNA fragments were visualized under UV illumination at 312 nm. The restriction profiles were captured as JPEG format with a CDD camera and were compared manually for grouping clones into ribotypes.

g- Sequencing and phylogenetic analysis

rDNA inserts representative of each distinct ARDRA pattern were selected and sequenced with Big Dye Terminator v1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems). Sequencing reactions were analysed with ABI 330X sequencer at the Genotyping and Sequencing facility of Bordeaux (France). The presence of possible chimeric DNA sequences was investigated by using the CHIMERA\_CHECK program of the Ribosomal Database Project II (Cole et al., 2003). Clones containing chimeric sequences were excluded from further analysis. All DNA sequences were compared with sequences in the Genbank/EMBL/DDBJ database using BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool, [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)). 16S or ITS rDNA clones were clustered into phylotypes at an overlap per cent identity cutoff of 97 using clustalw2 program (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html?>). Evolutionary distances were calculated by the Kimura-2-parameter algorithm and the phylogenetic trees were constructed by the neighbour-joining method, using MEGA3 program, version 3.0 (Kumar et al., 2004). Confidence in tree topology was determined by bootstrap analysis using 100 resamplings of the sequence. Sequences reported in this study can be accessed under numbers FJ028664-FJ028721.

h- Statistical analysis of phylotype richness from DNA clone libraries

To assess whether DNA clone libraries were large enough to be representative of phylotype richness from environmental samples, we used the web interface constructed by Kemp and Aller (2004) and located at <http://www.aslo.org/lomethods/free/2004/0114a.html>. Instructions of authors were followed for calculations using the abundance-based richness estimator  $S_{Chao1}$  and Good's C index of coverage (Kemp and Aller, 2004).

### **3.1.4- Results and discussion**

Considering the oligotrophic nature of building stone surface, the diversity of microbial communities living on it would be rather limited. Therefore, the molecular approach selected for assessing microbial genetic diversity was the Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA). This approach involve the development of an accurate DNA extraction

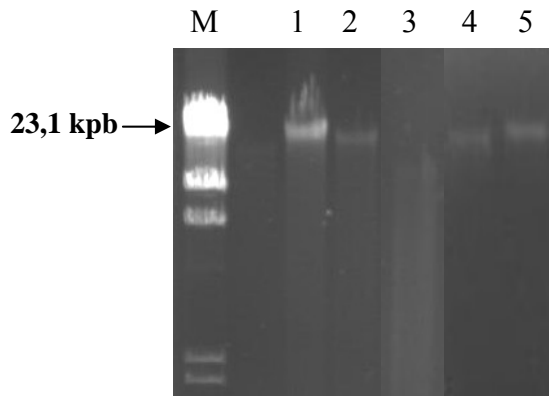
procedure, PCR amplification of rDNA, cloning of the amplified DNA, screening of the clone library by DNA restriction analysis and DNA sequencing of the selected clones to finally reveal the phylogenetic affiliation of the microbial community members.

a- Whole community DNA extraction from epilithic biofilms

In order to perform routine analyses of microbial diversity from epilithic biofilms, we attempted to select a fast and reproducible DNA extraction method that produces DNA of high molecular weight, free from inhibitors of subsequent treatments, and that is representative of all microbes within the biofilm sample. To do so, we addressed to two commercial DNA extraction kits, the Easy-DNA™ kit, which is applicable to various cell types, and the UltraClean™ Soil DNA Isolation kit, designed to extract DNA from soil.

Microbial biofilms sampled from the same limestone façade were used to extract DNA with the two methods. Absorbance measurements indicated that both methods successfully extracted pure DNA ( $A_{260}/A_{280}$  ratios of 1.7-1.8). Nevertheless DNA extracted with the Easy-DNA™ kit was more concentrated than that obtained with the UltraClean™ Soil DNA Isolation kit (45 against 8 ng/ $\mu$ l); this was confirmed by electrophoretic analysis (Figure III-5, tracks 1 and 2). Additionally, electrophoretic profiles showed that the two purified DNAs differed in length, the Easy-DNA™ kit giving the longest molecules (23 kpb against 20 kpb). To pursue the analysis, both DNA preparations were stored at 4°C for 6 days and submitted again to electrophoresis (Figure III-5, tracks 3 and 4). DNA extracted with the Easy-DNA™ kit appeared as a smear in the size range 10 000-500 pb attesting for its degradation by an unblocked DNase activity. On the other hand, DNA extracted with the UltraClean™ Soil DNA Isolation kit remained stable as 20 kpb fragments. This result conducted us to retain the UltraClean™ Soil DNA Isolation kit for DNA extraction from epilithic biofilms. But in order to further improve the DNA preparation, we tried to limit DNA fragmentation by using a softer lysis method (see Materials and Methods). This treatment yield DNA of 23 kpb in size without any change in recovery efficiency (Figure III-5, track 5).

So, DNA extraction with the UltraClean™ Soil DNA Isolation kit using a soft cell lysis procedure seems to be a good compromise to obtain pure and stable DNA of high molecular weight from microbial biofilms living on building stones.



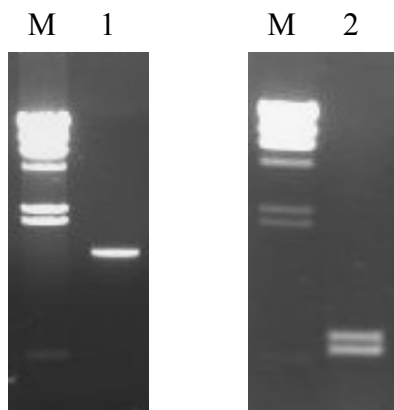
**Figure III-5 :** Agarose gel electrophoresis of total DNA extracted from a limestone microbial biofilm. Track M: Lambda/*Hind* III molecular weight DNA marker. Tracks 1 and 2 : Total DNA extracted with the Easy-DNA™ or the UltraClean™ Soil DNA Isolation kit, respectively. Tracks 3 and 4 : Same total DNA extracted as tracks 1 and 2 respectively, but stored at 4°C for 6 days before electrophoresis. Tracks 5 : Total DNA extracted with the UltraClean™ Soil DNA Isolation kit using a soft cell lysis method.

#### b- PCR amplification of microbial rDNA

Once having fixed conditions for DNA extraction, we tested the suitability of metagenomic DNA extracted from a limestone epilithic biofilm for PCR amplification of prokaryotic and eukaryotic rDNA. The pair of primers 8F/1489R was chosen for prokaryote genetics analysis because it allows amplification of 16S rRNA gene of most eubacteria (Weisburg *et al.*, 1991) and production of the quasi-totality of 16S rDNA sequence, a feature appropriate for rDNA clones fingerprinting by RFLP. As eukaryotic 18S rDNA is not enough polymorph to identify microbes to the species level (Anderson and Cairney, 2004), molecular identification of eukaryotes was performed using the ITS1 and ITS4 primers, previously designed by White *et al.* (1990) to target the internal transcribed spacer (ITS) region located between the 18S rRNA and 28S rRNA genes. Amplimers obtained with this pair of primers contain the 5.8S rRNA gene flanked by the two internal transcribed spacers ITS1 and ITS2 and are sufficiently long (around 700 nt) to be screened by RFLP.

As shown in Figure III-6, PCR amplification of either 16S rRNA gene (track1) or ITS region (track2) from total DNA extracted from a limestone following the procedure described above (see § 3.1.4 a) was conclusive. As expected, an amplimer of 1500 pb was obtained with 8F/1489R primers. Two amplimers of 650 and 750 pb were produced with ITS1/ITS4 primers, reflecting a variability not only to sequence level but also to size level among ITS regions from different eukaryote species. This result proved that the DNA extraction protocol

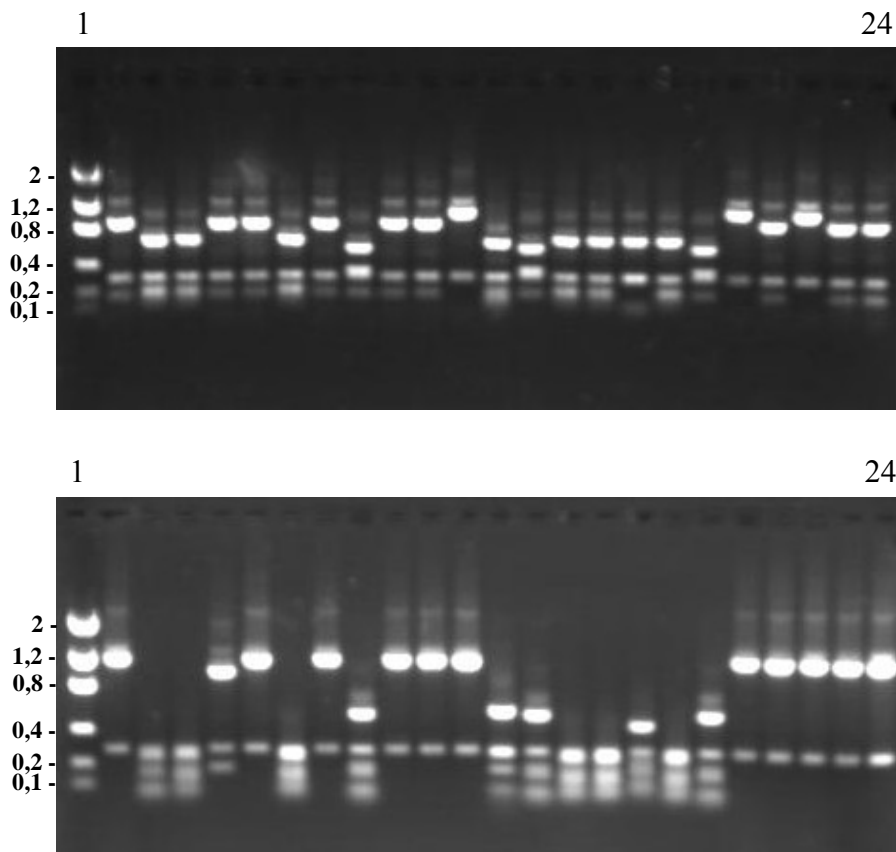
we selected yields DNA free from PCR inhibitors. Moreover, it attested that DNA from both prokaryotic and eukaryotic microorganisms were successfully extracted.



**Figure III-6 :** PCR amplification of rDNA from total DNA extracted from a limestone microbial biofilm. Track M: Lambda/*Hind* III molecular weight DNA marker (23130pb, 9416 pb, 6557 pb, 4361 pb, 2322 pb, 2027 pb, 564 pb). Track 1 : 16S rDNA amplified with the 8F/1489R primers. Track 2 : ITS DNA amplified with the ITS1/ITS4 primers.

#### c- Construction and screening of clone libraries

Total DNA was extracted as reported above (see § 3.1.4 a) from microbial biofilms sampled on two types of building stone, a limestone from a private villa in Biarritz (France) and a sandstone from the city-hall of San Sebastian (Spain). Bacterial 16S rRNA genes and ITS regions from eukaryotic microbes were then separately amplified by PCR from total DNA extracted either from limestone biofilm or sandstone one. Amplimers so produced were cloned to generate four ribosomal clone libraries. Clones designation was as follows: SLB and SSB clones make reference to 16S rDNA clones from limestone and sandstone biofilms, respectively; ILB and ISB clones designate ITS clones from limestone and sandstone biofilms, respectively. Clones from each library were randomly selected and used as template for colony PCR with primers specific to cloning vector. Only clones having an insert of correct size were retained for further analysis. Clone inserts were then purified, separately cut with *Hinf*I and *Hae*III and analysed on agarose gel electrophoresis (Figure III-7).



**Figure III-7 :** Restriction profiles of 16S rDNA clones from bacteria belonging to the microbial community of a limestone biofilm. Tracks 1: Low DNA mass ladder (100-2000 pb). Tracks 2 to 24 : Restriction profiles of 23 clones digested either by *Hae*III (top) or *Hinf*I restriction enzyme (bottom).

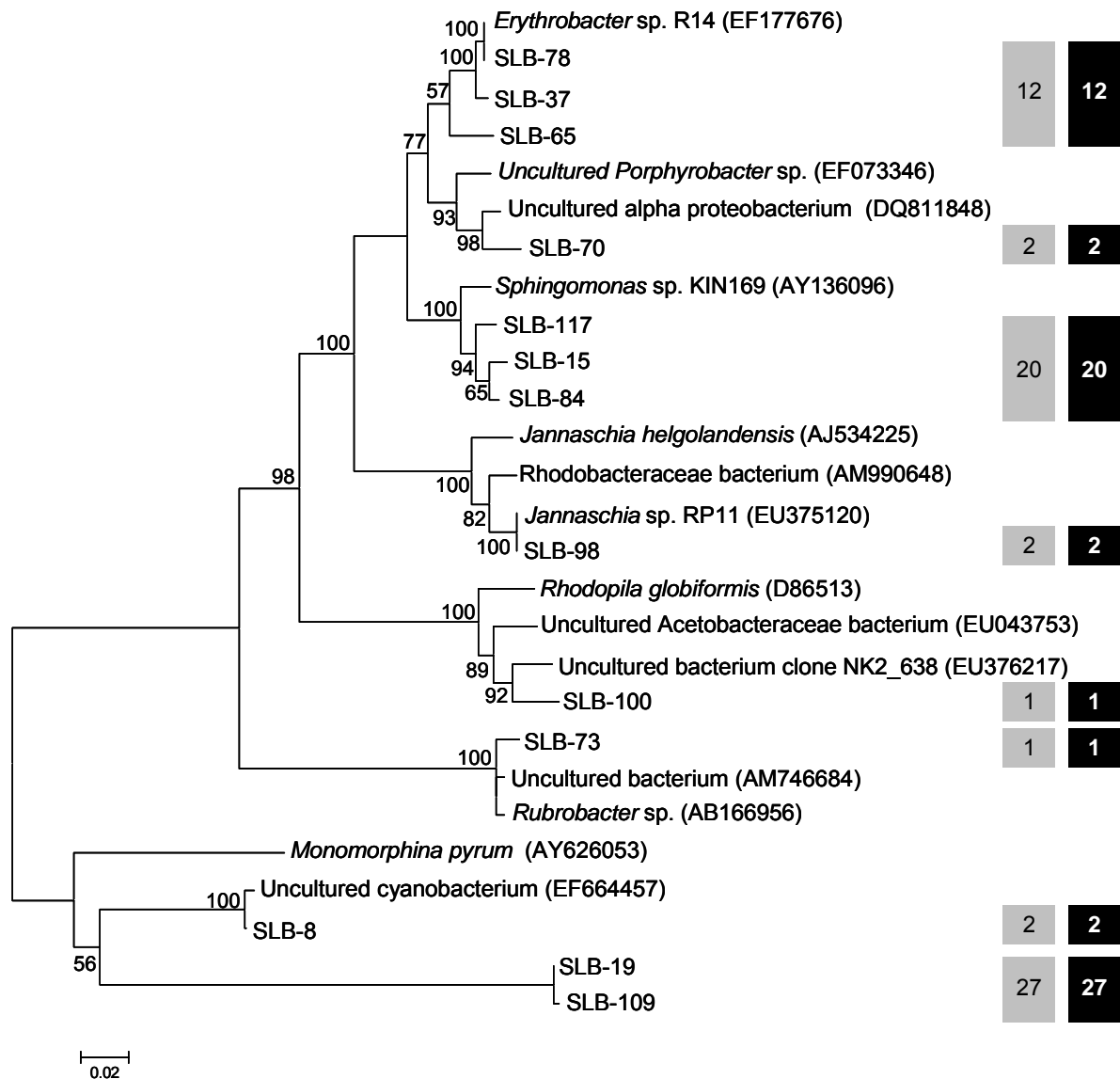
Globally, analysis of ARDRA patterns allowed to group 265 clones into 36 ribotypes. More precisely, SLB clones clustered into 8 ribotypes, SSB clones into 17 ribotypes, ILB clones into 3 ribotypes and ISB clones into 8 ribotypes (Figure III-8 to Figure III-11). These results indicate that community living on sandstone is more diverse than that living on limestone. Diversity inferred by 16S rRNA gene restriction profiles comparison in this study is comparable to that previously reported by Imperi *et al.* (2007) for microbial communities responsible of rosy discoloration on medieval frescoes



d- DNA sequencing and phylogenetic analysis

In order to characterize microbial communities from building stone biofilms under study, DNA clones with identical ARDRA patterns were randomly selected and sequenced. Concretely, one DNA clone was selected when the number of clones grouped under the same ARDRA pattern ranged between 1 and 3, two when it ranged between 4 and 10, three when it ranged between 10 and 20, four when it ranged between 20 and 30 and five when it encompassed 30. DNA sequence analysis showed that clones grouped under a same ARDRA pattern were effectively closely related to each other, and thus, confirmed that ARDRA profiling is a good screening tool to identify clones of interest for sequencing (Nocker *et al.*, 2007). A total of 63 clones were sequenced, five of them contained chimeric sequences and were discarded from phylogenetic analysis. Pairwise alignments of DNA clone sequences using 97 percent similarity as the cutoff allowed to discriminate 31 phylotypes : SLB clones clustered into 8 phylotypes, SSB clones into 15, ILB clones into 3 and ISB clones into 5 (Fig. III-8 to III-11).

Phylogenetic analysis of SLB clones (16S rRNA genes from limestone biofilm, Figure III-8) revealed that 40% of clones were affiliated with chloroplast rDNA sequences of an unknown alga (79% identity with chloroplastic rDNA sequence of *Monomorpha pyriformis*). Other clones belonged to *Alphaproteobacteria* division (55%), *Cyanobacteria* (3%) and *Actinobacteria* (2%). The two most important groups of sequences that fell into the *Alphaproteobacteria* division were related to *Sphingomonas sp. KIN169* (20 clones, 93-95% identity) and to *Erythrobacter sp. R14* (11 clones, 96-100% identity), two species of the *Sphingomonadaceae* family. Among minor groups of sequences also belonging to *Alphaproteobacteria* division, one is similar (97%) to an uncultured bacterium belonging to the genus *Porphyrobacter*, a second to an uncultured bacterium of the *Rhodospila* genus (95%) and a third to *Jannaschia sp. RP11* (99% identity). The clone SLB-73, affiliated to *Actinobacteria* (High GC gram-positive bacteria), is closely related (98% identity) to an uncultured bacterium of the genus *Rubrobacter* already identified on ancient wall paintings (Imperi *et al.*, 2004). The 16S rDNA sequences of two clones matched (98% identity) with that of an uncultured cyanobacterium.

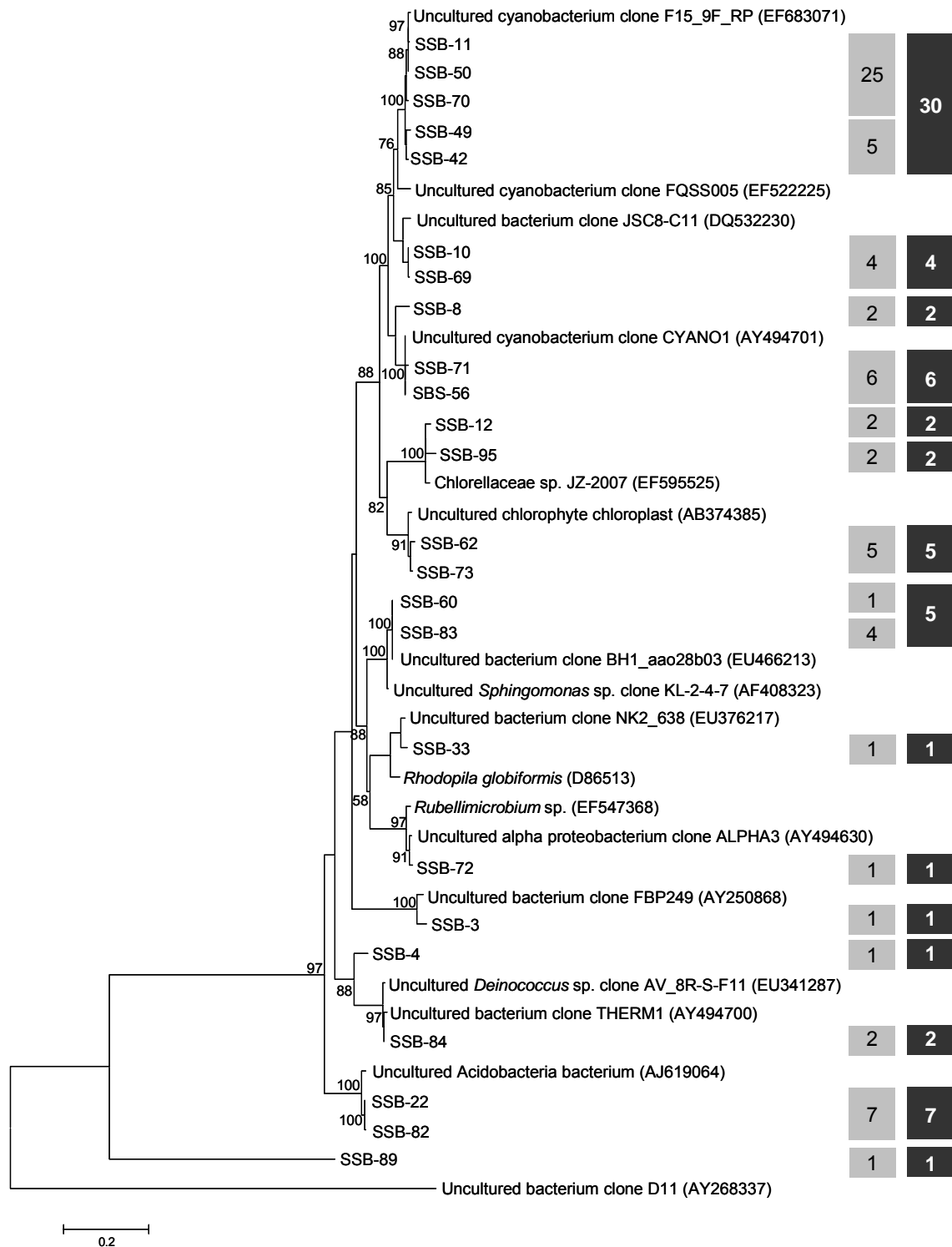


**Figure III-8 :** Phylogenetic tree of partial 16S rDNA gene sequences (613 pb) of SLB clones isolated from microbial community of a limestone biofilm. Percentages of 100 bootstraps re-samplings that support branching points above 50% confidence are indicated. GenBank accession numbers are given in parentheses. The number of clones having the same ribotype is indicated within grey boxes. The number of clones grouped into the same phylotype is given within black boxes. Scale bar represents 0.02 nucleotide changes per position.

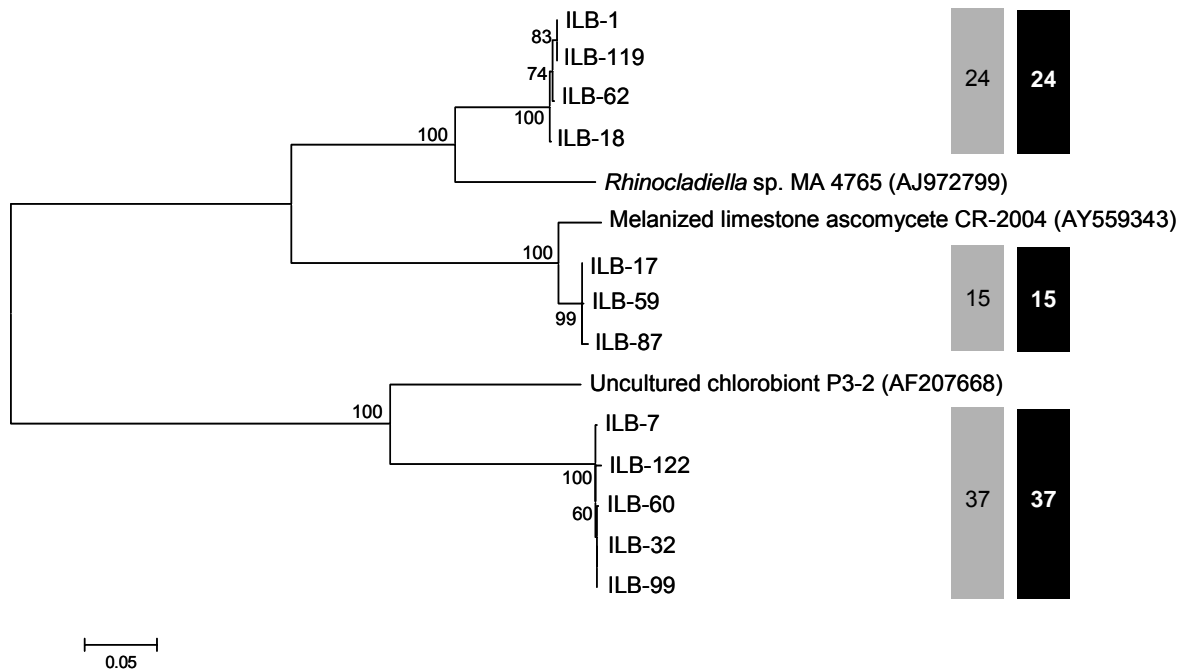
The quasi-totality of SSB clone sequences (16S rRNA genes from sandstone biofilm, Figure III-9) were related to uncultured bacteria. On the whole, 16S rRNA gene sequences were affiliated with the phyla *Cyanobacteria* (60%), *Proteobacteria* (10%), *Acidobacteria* (10%) and *Deinococcus* (3%). 13 % of sequences were identified as rRNA genes from algal chloroplasts. Three sequences corresponded to unknown taxa, two of which (SSB-84 and SSB-89) were distantly related to an uncultured *Deinococcus* (90% identity) and to chloroplasts of an alga (88% identity), respectively; the last one (SSB-3) presented 94%

identity with a bacterial clone already classified as an unknown bacteria, isolated from a cryptoendolithic community (de la Torre *et al.*, 2003). The cyanobacterial clade was diversified, it was divided into four phylotypes, all affiliated with uncultured cyanobacteria environmental clones (92% to 99% identity). The three phylotypes belonging to the phylum *Proteobacteria* are closely related (95% to 99% identity) to uncultured bacterial clones belonging to the genus *Sphingomonas* (5 clones), *Rhodopila* (1 clone) and *Rubellimicrobium* (1 clone). Clones SSB-22 and 82 were identified as an uncultured *Acidobacteria* bacterium (96 and 95 % identity, respectively). The phylotype represented by the SSB-84 clone is closely related (99% identity) to an uncultured *Deinococcus sp.* clone. The three phylotypes comprising the clones SSB-12, 62, 73 and 95 corresponded to chloroplast rRNA gene of chlorophytes belonging to the *Chlorellaceae* family.

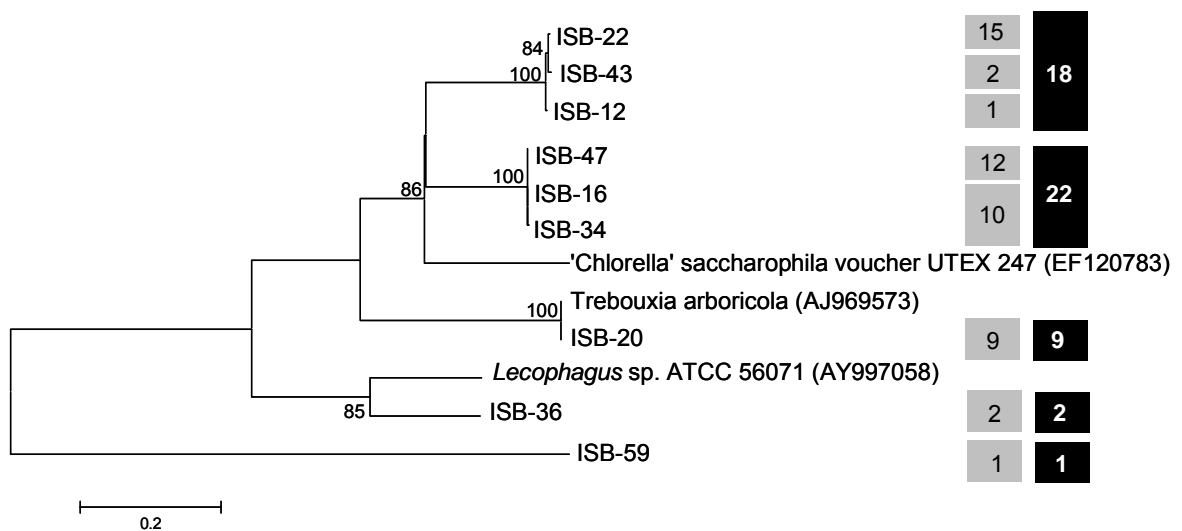
DNA sequencing of eukaryotic rDNA sequences (ITS regions) isolated from limestone biofilm allowed to separate ILB clones into three phylotypes (Figure III-10). The most abundant comprised 37 clones that were affiliated to an uncultured chlorobiont of the *Chlorophyceae* family (94% identity). The two other phylotypes contained fungal ITS sequences related either to *Rhinocladiella sp.* (24 clones, 86-95% identity) or to a melanized limestone ascomycete (15 clones, 95 % identity), two fungi previously described as typical inhabitants of stone surfaces (Chertov *et al.*, 2004; Sert *et al.*, 2007).



**Figure III-9 :** Phylogenetic tree of partial 16S rDNA gene sequences (637 pb) of SSB clones isolated from microbial community of a sandstone biofilm. Percentages of 100 bootstraps re-samplings that support branching points above 50% confidence are indicated. GenBank accession numbers are given in parentheses. The number of clones having the same ribotype is indicated within grey boxes. The number of clones grouped into the same phylotype is given within black boxes. Scale bar represents 0.2 nucleotide changes per position.



**Figure III-10 :** Phylogenetic tree of partial ITS region sequences (513 pb) of ILB clones isolated from microbial community of a limestone biofilm. Percentages of 100 bootstraps re-samplings that support branching points above 50% confidence are indicated. GenBank accession numbers are given in parentheses. The number of clones having the same ribotype is indicated within grey boxes. The number of clones grouped into the same phylotype is given within black boxes. Scale bar represents 0.05 nucleotide changes per position.



**Figure III-11 :** Phylogenetic tree of partial ITS region sequences (549 pb) of ISB clones isolated from microbial community of a sandstone biofilm. Percentages of 100 bootstraps re-samplings that support branching points above 50% confidence are indicated. GenBank accession numbers are given in parentheses. The number of clones having the same ribotype is indicated within grey boxes. The number of clones grouped into the same phylotype is given within black boxes. Scale bar represents 0.2 nucleotide changes per position.

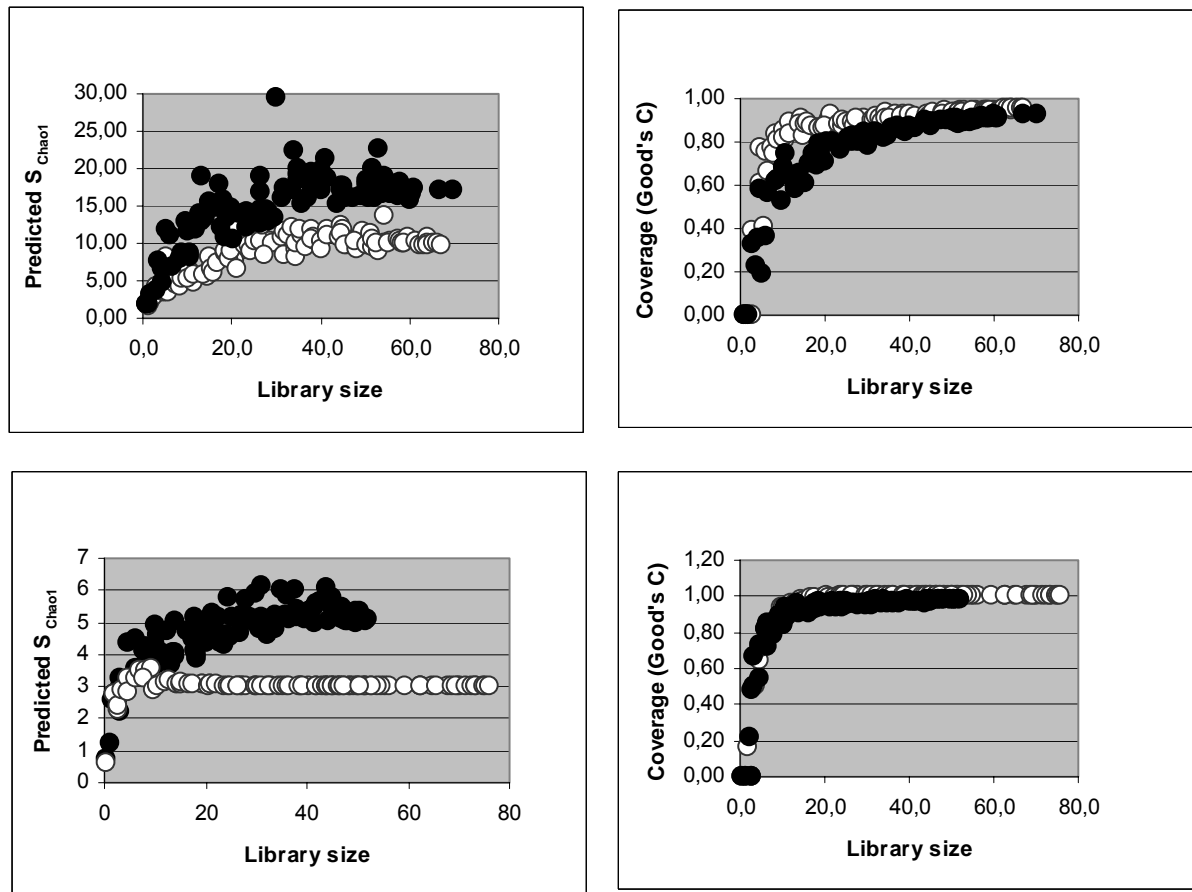
Taxonomic analysis of ISB clones allowed to discriminate five phylotypes (Figure III-11). The two most abundant phylotypes (77% of total clones) were represented by ITS sequences distantly related to the alga *Chlorella saccharophila* (88 to 93% identity), as the ISB-59 clone (88% identity) which is the only clone of a third phylotype. A fourth phylotype comprising 9 clones was affiliated to the alga *Trebouxia arboricola* (99% identity) on the basis of ITS sequence of the ISB-20 clone. *Chlorella* and *Trebouxia* algae are commonly found on wall surfaces (Ortega-Calvo, 1995; Rindi and Guiry, 2003, Gorbushina, 2007). The fifth phylotype (2 clones) corresponded to an unknown fungal taxa distantly related (86% identity) to the ascomycete *Lecophagus sp.*.

On the whole, phylogenetic analyses allowed to reveal notable differences between the two microbial biofilms sampled. Cyanobacterial 16S rDNA sequences are predominant (60%) within clones isolated from the sandstone biofilm whereas they represent only a minor fraction of clones (3%) derived from the limestone biofilm. Analysis of ITS sequences showed that algae are the predominant eukaryotic microbes in the sandstone biofilm (94%), but are as abundant (49%) as ascomycetous fungi (51%) in the limestone biofilm.

e- Reliability of phylotype richness

Numerous molecular studies dealing with diversity of microbial communities from various environments are based on the construction of 16S rDNA clone libraries, but as mentioned by Kemp and Aller (2004), “most published studies do not include an evaluation of how well the 16S rDNA library represents bacterial diversity in the source environment”. Proceeding to such an evaluation was crucial to validate the molecular methodology described in this paper. To do so, we used the free software tool developed by Kemp and Aller (2004)(see Materials and Methods). Calculations of phylotype richness ( $S_{Chao1}$  estimator) versus sampling effort (library size) were undertaken for the four DNA clone libraries constructed. The obtained curves (Figure III-12) showed that in all cases richness estimates reached a stable asymptotic value, indicating that the number of clones analyzed were sufficient to yield a fiable estimate of phylotype richness. Richness estimates (9.9, 17.1, 3 and 5.1 for SLB, SSB, ILB and ISB clone library, respectively) were identical or slightly greater than the actual number of phylotypes (9, 15, 3 and 5 for SLB, SSB, ILB and ISB clone library, respectively). Calculations of Good's C indexes (Figure III-12) confirmed that clone

libraries were large enough to capture most of the diversity of microbial biofilms sampled. Coverage was 0.91, 0.85, 1 and 0.99 for SLB, SSB, ILB and ISB clone library, respectively.



**Figure III-12 :** Estimated phylotype richness (left panels) and coverage (right panels) versus library size for the four libraries constructed from limestone and sandstone biofilms. The two top panels are related to 16S rDNA clone libraries from limestone (SLB clones, open symbols) and sandstone (SSB clones, filled symbols) biofilms. The two bottom panels concern ITS clone libraries from limestone (ILB clones, open symbols) and sandstone (ISB clones, filled symbols) biofilms.

### 3.1.5- Conclusion

The goal of this study was to develop a molecular methodology, based on a single DNA extraction procedure, to assess the genetic diversity of all members (prokaryotes and eukaryotes) of microbial communities living at the surface of building stones. The bead beating DNA extraction procedure we selected produced high quality DNA suitable for PCR amplification and cloning of either prokaryotic 16S rRNA genes or eukaryotic ITS regions.

ARDRA profiling of cloned DNAs was shown to be effective for screening clones to be sequenced. Phylogenetic analysis of selected sequences revealed a large diversity of bacteria belonging to *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Deinococcus* and *Acidobacteria*, and allowed also the identification of algal and fungal species. Isolation of sequences from organisms that are difficult to rupture, such as *Actinobacteria* and *Deinococcus*, attested for the good efficiency of the DNA extraction protocol for cell lysis. Moreover, statistical analysis of phylotype richness of clone libraries confirmed that extracted DNA sequences were representative of the microbial diversity from sampled building stone biofilms. All these results conducted us to validate the molecular methodology described here and to adopt it for further studies. Its use in preliminary studies designed to follow microbial colonization of building stone revealed that it was convenient to identify microorganisms even on poorly colonized stones (data not shown).

### **Acknowledgements**

This study was carried out with financial support from the Conseil des Elus du Pays Basque. MB thanks the Région Aquitaine and the Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie for PhD fellowship. The authors are grateful to J. Valero (Inasmet, Spain) for valuable discussions and help for sampling.

### **3.1.6- References**

Anderson, I.C., Cairney, J.W.G., 2004. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Envir. Microbiol.* 6 (8), 769-779.

Cole, J.R., Chai, B., Marsch, T.L., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam, S.A., Chandra, S., McGarrell, D.M., Schmidt, T.M., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., 2003. The ribosomal database project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res.* 31, 442-443.

Chertov, O., Gorbushina, A.A., Deventer, B., 2004. A model for microcolonial fungi growth on rock surfaces. *Ecol. Model.* 177, 415-426.

De la Torre, J.M., Goebel, B.M., Friedmann, E.I., Pace, N.R., 2003. Microbial diversity of cryptoendolithic communities from the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Appl. Envir. Microbiol.* 69 (7), 3858-3867.



Gaylarde, C.C., Gaylarde, P.M., 2005. A comparative study of the major microbial biomass of biofilms on exteriors of buildings in Europe and Latin America. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 55, 131–139.

Gaylarde, C.C., Morton, L.H.G., 1999. Deteriogenic biofilms on buildings and their control. *Biofouling* 14, 59–74.

González, J.M., Saiz-Jiménez, C., 2005. Application of molecular nucleic acid-based techniques for the study of microbial communities in monuments and artworks. *Int. Microbiol.* 8, 189–194.

Gorbushina, A., 2007. Life on rocks. *Envir. Microb.* 9, 1613–1631.

Head, I.M., Saunders, J.R., Pickup, R.W., 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology : a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb. Ecol.* 35, 1–21.

Imperi, F., Caneva, G., Cancellieri, L., Ricci, M.A., Sodo, A., Visca, P., 2007. The bacterial aetiology of rosy discolouration of ancient wall paintings. *Environ. Microbiol.* 9, 2894-2902.

Kemp, P.F., Aller, J.Y., 2004. Estimating prokaryotic diversity: When are 16S rDNA libraries large enough? *Limnol. Oceanogr. Methods* 2, 114-125.

Kirk, J.L., Beaudette, L.A., Hat, M., Moutoglis, P., Klironomos, J.N., Lee, H., Trevors, J.T., 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microb. Met.* 58, 169–188.

Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinf.* 5, 150-163.

McNamara, C.J., Perry IV, T.D., Bearce, K.A., Hernandez-Duque, G., Mitchell, R., 2006. Epilithic and endolithic bacterial communities in limestone from a Maya archaeological site. *Microbial Ecol.* 51, 51–64.

Mottershead, D., Gorbushina, A., Lucas, G., Wright, J., 2003. The influence of marine salts, aspect and microbes in the weathering of sandstone in two historic structures. *Building Envir.* 38, 1193–1204.

Möhlenhoff, P., Müller, L., Gorbushina, A., Petersen, K., 2001. Molecular approach to the characterisation of fungal communities : methods for DNA extraction, PCR amplification and DGGE analysis of painted art objects. *FEMS Microbiol. Lett.* 195, 169–173.

Nocker, A., Burr, M., Camper, A.K., 2007. Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microb. Ecol.* 54, 276–289.

Ortega-Calvo, J.J., Ariño, X., Hernandez-Marine, M., Saiz-Jimenez, C., 1995. Factors affecting the weathering and colonization of monuments by phototrophic microorganisms. *Sci. Tot. Envir.* 167, 329-341.

Papida, S., Murphy, W., May, E., 2000. Enhancement of physical weathering of building stones by microbial populations. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 46, 305– 317.

Rindi, F., Guiry, M.D., 2003. Composition and distribution of subaerial algal assemblages in Galway City, western Ireland. *Cryptog. Algal.* 24, 245-267.

Schabereiter-Gurtner, C., Piñar, G., Lubitz, W., Rölleke, S., 2001. An advanced molecular strategy to identify bacterial communities on art objects. *J. Microbiol. Met.* 45, 77-87.

Sert, H.B., Sumbul, H., Sterflinger, K., 2007. Microcolonial fungi from antique marbles in Perge/Side/Termessos (Antalya/Turkey). *Antonie Van Leeuwenhoek* 91 (3), 217-227.

Wakefield, R., Jones, M., 1998. An introduction to stone colonizing micro-organisms and biodeterioration of building stone. *Quarterly J. Engineering Geol.* 31, 301– 313.

Ward, D.M., Weller, R., Bateson, M.M., 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature (London)* 345, 63– 65.

Warscheid, T., Braams, J., 2000. Biodeterioration of stone: a review. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 46, 343– 363.

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173 (2), 697-703.

White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S., Taylor, J. (1990) Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes. In *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J., New York: Academic Press, pp. 315–322.

Zanardini, E., Abbruscato, P., Ghedini, N., Realini, M., Sorlini, C., 2000. Influence of atmospheric pollutants on the biodeterioration of stone. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 45, 35– 42.

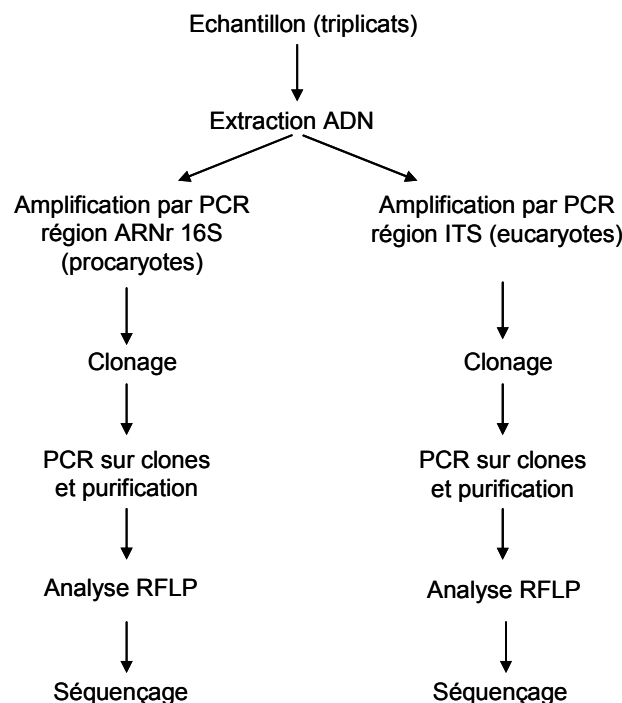
Zimmermann, J., González, J.M., Saiz-Jiménez, C., 2006. Epilithic biofilms in Saint Callixtus Catacombs (Rome) harbour a broad spectrum of *Acidobacteria*. *Antonie van Leeuwenhoek* 89, 203-208.

### 3.2- Conclusion du chapitre

En vue d'identifier les microorganismes se développant sur des façades en pierre, nous avons utilisé les outils de la biologie moléculaire. Nous avons choisi la méthode ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) pour réaliser les analyses. Elle présente l'avantage d'être une méthode relativement simple et adaptée pour révéler le polymorphisme d'une communauté microbienne dont la diversité n'est pas trop élevée, ce qui est généralement le cas dans un écosystème oligotrophe tel que la surface des pierres.

Afin d'adapter cette méthode à notre écosystème particulier, nous avons donc procédé à la mise au point des différentes étapes de cette méthode :

- Extraction d'ADN
- Amplification du gène codant pour l'ADN ribosomal microbien (procaryote et eucaryote)
- Clonage, analyse de la diversité génétique, sélection des ribotypes
- Séquençage et analyse phylogénétique (Figure III-13).



**Figure III-13** : Procédure de biologie moléculaire adoptée pour identifier les microorganismes se développant sur des façades en pierre.

Un soin particulier a été apporté à la mise au point de la méthode d'extraction de l'ADN. En effet, étant donné que nous voulons étudier tous les microorganismes eucaryotes et procaryotes présents dans des échantillons de pierre, il faut que l'ADN de tous ces organismes soit extrait.

Le choix de la méthode d'extraction s'est porté sur un kit commercial pour une répétabilité de la méthode. Après optimisation, il s'est avéré efficace puisque lorsque la méthode a été éprouvée sur deux biofilms microbiens provenant de deux types de façade en pierre situées sur le littoral du golfe de Gascogne : un biofilm prélevé sur la façade de la Villa Isabel à Biarritz, en calcaire d'Angoulême, et l'autre, sur la façade de la mairie de Saint-Sébastien en grès d'Igueldo, les ADN étaient de bonne qualité et l'ADN de microorganismes particulièrement difficiles à extraire, comme les bactéries gram +, a été récupéré.

Les étapes suivantes de la procédure mises au point se sont également avérées efficaces, puisque tous les types de microorganismes généralement présents à la surface de pierres de construction ont pu être détectés, à savoir, des bactéries, des algues, des champignons et des lichens. D'autre part, les analyses statistiques montrent que les banques de clones sont représentatives de la diversité des échantillons prélevés.

Les deux biofilms présentent des microorganismes parfaitement adaptés à la croissance sur les pierres en environnement marin.

Des clones proches de plusieurs espèces résistantes aux sels ont été identifiés. En effet, *Sphingomonas* sp. KIN169 a été pour la première fois trouvé dans de l'eau de mer (Pinhassi et Berman, 2003). Les bactéries phototrophes anoxygéniques comme *Erythrobacter*, *Jannaschia* et *Rhodopila* sont spécifiques des environnements marins (Yurkov et Beatty, 1998; Dworkin *et al.*, 2006) et ont probablement été apportées par les embruns.

La plupart des microorganismes identifiés sont parfaitement adaptés à une croissance en milieu oligotrophe : les phototrophes, algues et cyanobactéries, ne nécessitent que du CO<sub>2</sub> et de l'énergie lumineuse pour se développer. Le genre *Sphingomonas* possède une très bonne capacité d'adaptation physiologique pour croître dans des environnements pauvres en nutriments (Pinhassi et Berman, 2003).

Le genre *Deinococcus* est connu pour sa résistance à la dessiccation et aux fortes doses de radiations UV (Moissl *et al.*, 2007), car il possède des mécanismes très performants de réparation des lésions de l'ADN induites par les radiations. Cette bactérie est donc très bien adaptée à l'environnement exposé qu'est la pierre.

D'autres microorganismes particulièrement adaptés à une croissance sur des pierres sont les lichens. Ils ont été identifiés par le biais de l'identification d'algues. En effet, les genres *Trebouxia* et *Chlorella* sont les algues les plus fréquentes des associations lichéniques (de Reviere, 2003).

Tous les microorganismes identifiés possèdent des pigments qui leur permettent de résister aux radiations UV. Ces pigmentations vont provoquer les colorations des deux façades.

Le biofilm de la mairie de St-Sébastien (grès d'Igueldo) semble dominé par des cyanobactéries, qui sont responsables de la couleur vert-noire du biofilm, avec les champignons pigmentés de mélanine.

La coloration rosée du biofilm de la Villa Isabel (calcaire d'Angoulême) s'expliquerait par la présence de l'actinobactérie proche de *Rubrobacter*. La souche a été identifiée pour la première fois par Imperi *et al.* (2007) sur une ancienne peinture murale colonisée par un biofilm rose. *Rubrobacter*, ainsi que les bactéries phototrophes aérobies anoxygéniques possèdent une grande quantité de pigments de caroténoïdes dans leur paroi.

La méthode ARDRA a donc permis de distinguer parfaitement deux biofilms dissemblables s'étant développés sur deux supports différents et montre que les microorganismes colonisateurs sont pleinement adaptés à une croissance sur des pierres exposées aux embruns marins.

## Conclusion

En environnement marin, les pierres sont fortement dégradées. Cette détérioration est le résultat de deux processus : la décomposition chimique et l'action mécanique par cristallisation des sels dans les pores (Cardell *et al.*, 2003).

L'étude de la détérioration chimique de la pierre calcaire d'Angoulême de la Villa Isabel (Biarritz) a montré la présence de  $\text{CaSO}_4$  qui prouve qu'il y a eu dissolution de la calcite  $\text{CaCO}_3$  par action du sel  $\text{MgSO}_4$ .

La détérioration par les sels va avoir pour conséquence d'augmenter la porosité du matériau (Cardell *et al.*, 2003). La mesure des porosités des différentes pierres calcaires exposées confirme cette affirmation, puisque la zone qui semble non détériorée visuellement a une porosité moindre que les zones détériorées.

Par ailleurs, les pierres d'Igueldo de la mairie de St-Sébastien (Espagne) et les pierres calcaires d'Angoulême de la Villa Isabel présentent des colorations provoquées par la formation de biofilms.

Afin de caractériser les microorganismes présents sur ces biofilms, nous avons développé une méthode d'identification moléculaire adaptée à ce type de support, afin de pouvoir distinguer tous les microorganismes, cultivables et non cultivables.

Cette méthode s'est révélée fiable et adaptée, puisqu'elle nous a permis de différencier les deux biofilms et que tous les types de microorganismes généralement rencontrés sur des surfaces en pierre ont été identifiés.

La Villa Isabel et la mairie de St-Sébastien sont exposées depuis longtemps aux embruns marins. Plusieurs études de biofilms présents sur des pierres ont été réalisées (Tayler et May, 1991; Caneva *et al.*, 1995; Albertano et Urzi, 1999; Warscheid et Braams, 2000; Viles et Gorbushina, 2003; Crispim et Gaylarde, 2005; Sert *et al.*, 2007; Abdulla *et al.*, 2008), cependant aucune étude n'a visé à caractériser les premières étapes de la colonisation de la pierre en environnement marin. C'est pourquoi dans la deuxième partie de ce manuscrit nous avons cherché à caractériser les colonisateurs pionniers de la pierre calcaire d'Angoulême en environnement marin, à l'aide de la méthode développée dans cette partie, et en même temps nous nous sommes intéressés à l'évolution physique et chimique des pierres dans le temps.

## IV - Travaux expérimentaux :

### Processus de colonisation de la pierre calcaire d'Angoulême exposée aux embruns marins

---

#### Introduction

Toute interface peut être colonisée par les microorganismes qui vont y former un biofilm. Les premières étapes de la formation du biofilm sur la pierre sont des étapes clés dans l'étude de la biodétérioration des pierres, car ce sont les colonisateurs pionniers qui vont permettre de conditionner la surface pour la croissance future du biofilm.

Dans la littérature il est fréquemment émis l'hypothèse que la colonisation de la pierre se fait par succession biologique (Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2001b; Viles et Gorbushina, 2003). En effet, il est décrit que les microorganismes photo-autotrophes et litho-autotrophes vont coloniser en premier cet environnement défavorable, car ils n'ont besoin que de l'énergie lumineuse, du carbone minéral et des minéraux pour se développer. Ils vont ensuite permettre aux microorganismes chimio-hétérotrophes de s'installer. Les microorganismes chimio-hétérotrophes sont tout de même capables d'être pionniers dans des environnements pollués ou l'apport en composés organiques est suffisant pour leur croissance.

Des études sur les premières étapes de la colonisation de surfaces inertes ont déjà été réalisées dans les environnements aquatiques marins (Pinhassi *et al.*, 1997; Dang et Lovell, 2000; Grasland *et al.*, 2003; Dang *et al.*, 2008), cependant, le rôle et la spécificité de surface des premiers colonisateurs restent très largement inconnus pour la plupart des types de surfaces, en particulier les pierres de construction exposées aux embruns marins. La seule étude de suivi dans le temps réalisée sur des pierres, est une étude sur trois ans réalisée par Viles et Gorbushina (2003), mais elle a été menée dans un environnement urbain pollué. Suihko *et al.* (2007) et Mottershead *et al.* (2003) ont fait des études sur les microorganismes s'étant développés sur des façades en pierre en environnement marin, mais aucun suivi dans le temps n'a été réalisé.

Dans cette deuxième partie, nous nous sommes intéressés aux premières étapes de la colonisation de la pierre d'Angoulême et, en parallèle, de son évolution physico-chimique. Nous avons donc étudié le processus de colonisation de pierres calcaires d'Angoulême exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz pendant 22 mois.

Dans un premier temps, nous expliquerons le dispositif expérimental. Ensuite, l'évolution physico-chimique des pierres sera décrite. Dans un troisième temps, les microorganismes pionniers se développant à la surface des pierres seront identifiés par microbiologie classique et à l'aide de la technique de biologie moléculaire développée dans la première partie. Enfin, nous discuterons dans une dernière partie de l'ensemble de ces résultats.



## 1- Dispositif expérimental

Afin d'estimer les étapes clés de la colonisation de la pierre et d'identifier les colonisateurs pionniers qui ont permis l'élaboration d'un biofilm sur la côte Basque Française, 114 pierres calcaires d'Angoulême, fraîchement extraites d'une carrière et donc dépourvues de toute colonisation microbienne, ont été exposées sous un angle de 45°C, sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz en juin 2006 (Figure IV-1). Des pierres ont été prélevées au bout de 6 mois d'exposition, puis quatre mois plus tard, et enfin tous les trois mois. Au total 6 prélèvements ont été réalisés (T1 à T6), jusqu'en mars 2008.



**Figure IV-1** : Pierres calcaires d'Angoulême exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz, face à la mer.

Les microorganismes présents sur les pierres ont été identifiés à l'aide de la méthode moléculaire développée dans la « partie III », ainsi que par culture sur milieux riches.

A chaque prélèvement, 3 pierres ont été récupérées, les deux faces de chaque pierre grattées à l'aide d'un scalpel stérile, et la poudre des mêmes faces réunie dans un même tube. Nous avons donc deux échantillons par prélèvements, appelés « recto (R) » pour la face la plus exposée et « verso (V) » pour la face inverse, moins exposée.

Pour les études physico-chimiques, soit la poudre, soit la surface intacte de la pierre, ont été analysées

## **2- Suivi de l'évolution physico-chimique des pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz pendant les 22 mois d'exposition**

Lors des 22 mois d'exposition sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz, les pierres calcaires ont pu subir des modifications physiques, chimiques et esthétiques. Différentes analyses physico-chimiques ont été réalisées sur ces pierres, afin de détecter d'éventuelles modifications, comme par exemple l'apparition de  $\text{CaSO}_4$  à la surface de ces pierres, à l'image de ce qui a pu être observé sur certaines parties de la Villa Isabel (cf. Partie III-2).

### ***2.1- Les analyses ESCA, DRIFT et DRX***

Des analyses ESCA, DRIFT et DRX ont été réalisées sur une pierre d'Angoulême témoin n'ayant jamais été exposée aux embruns marins, et sur une pierre ayant été exposée 22 mois sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz. Les échantillons analysés sous forme de poudre sont obtenus par simple grattage de la pierre en surface. Deux échantillons ont été prélevés sur la pierre exposée : l'un sur la face directement exposée aux embruns et au soleil (face recto) l'autre sur la face opposée (face verso).

Les analyses ESCA, DRIFT et DRX ne montrent aucun changement chimique à la surface de la pierre, ou du moins ne permettent pas de déceler d'autres composés que  $\text{CaCO}_3$ . L'absence de  $\text{NaCl}$  et d'autres sels présents dans l'eau de mer peut facilement s'expliquer par le lessivage régulier par l'eau de pluie. Pour ce qui est de l'absence d'autres composés comme par exemple  $\text{CaSO}_4$  cela n'est peut-être pas étonnant compte tenu du fait que les processus de dégradation chimique des bâtiments en pierre sont heureusement des processus lents et qu'une période de 22 mois est certainement très insuffisante pour engendrer des dégradations conséquentes à l'image de ce que l'on a pu observer sur la Villa Isabel après plus d'un siècle d'exposition aux embruns marins.

## **2.2- Densité, capillarité et porosité des pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz**

Il a été démontré que la biodétérioration de la pierre s'accompagne le plus souvent d'une perte de densité, d'un changement de porosité et de capillarité (Prieto et Silva, 2005).

Nous avons donc procédé à un suivi de ces différents facteurs sur les pierres exposées pendant 22 mois sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz.

### **2.2.1- Densité**

La diminution de la densité d'une pierre ou masse volumique, est révélatrice d'une perte de masse par agrandissement de ses pores, sans variation de son volume externe. La méthode utilisée pour la détermination de la densité de la pierre est décrite dans la partie I *Matériel et Méthode*.

Pour une pierre calcaire la masse volumique est de l'ordre de 2,5 à 2,6.

Les mesures de densité ont été réalisées sur des pierres témoins non exposées et sur des pierres exposées sur des périodes différentes aux embruns marins. Pour chaque temps d'exposition 6 pierres ont été analysées.

Temps d'exposition	0	6 mois	10 mois	13 mois	16 mois	19 mois	22 mois
densité	2,53	2,57	2,52	2,51	2,54	2,54	2,52

**Tableau IV-1 :** Densité des pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer après différents temps d'exposition.

Aux erreurs de mesure près, nous pouvons constater que la densité des pierres ne varie pratiquement pas au cours du temps (Tableau IV-1). Elle est en moyenne de l'ordre de 2.53. Cela confirme donc que la pierre n'est pas dégradée après seulement 22 mois d'exposition.

### 2.2.2- Capillarité

La mesure de la capillarité d'une pierre se déduit de la mesure de la vitesse d'absorption d'un liquide, le plus souvent de l'eau, par cette pierre en fonction du temps. La méthode utilisée pour la détermination de la capillarité est décrite dans la partie I *Matériel et Méthode*.

Le coefficient de capillarité correspond à la pente de la droite d'absorption de l'eau en fonction du temps, avant d'atteindre un plateau. Plus le coefficient de capillarité est grand, plus la pierre absorbe rapidement le liquide. Le coefficient de capillarité est évidemment corrélé à la porosité de la pierre.

Tout comme les mesures de densité, les mesures de capillarité ont été réalisées sur des pierres témoins non exposées et des pierres exposées 6, 10, 13, 16, 19 et 22 mois. Comme précédemment 6 pierres ont été analysées pour chaque temps d'exposition.

Les graphiques représentant les courbes d'absorption par capillarité en fonction du temps sont donnés en annexe 5. Les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau IV-2 ci-dessous :

Temps d'exposition	0	6 mois	10 mois	13 mois	16 mois	19 mois	22 mois
Coefficient de capillarité (g.cm <sup>-2</sup> .s <sup>-1/2</sup> )	27.6	27.8	28.7	27.7	23.8	22.7	24.2

**Tableau IV-2 :** Coefficients d'absorption des pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer après différents temps d'exposition.

On observe que le coefficient de capillarité diminue de façon significative pour les trois derniers échantillons. En toute logique, si la pierre se détériorait dans le temps, non seulement sa densité diminuerait, mais sa vitesse d'absorption et donc son coefficient de capillarité augmenteraient. Dans notre cas la vitesse d'absorption et donc le coefficient de capillarité diminuent. Cela signifie que certains pores de la pierre se bouchent progressivement. Trois hypothèses peuvent expliquer cette diminution de la capillarité : un dépôt de sels, une carbonatation de la pierre, ou la formation d'un biofilm.

Les analyses ESCA, DRIFT et XPS montrent qu'il n'y a pas de dépôt de sels sur la pierre. Il reste donc les deux autres hypothèses, la plus probable étant la formation d'un biofilm.

### 2.2.3- Porosité

La porosité d'une pierre non exposé et de la face recto de pierres exposées 16 et 22 mois sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz a également été mesurée par la méthode BET décrite annexe dans la partie I *Matériel et Méthode*. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau ci-dessous

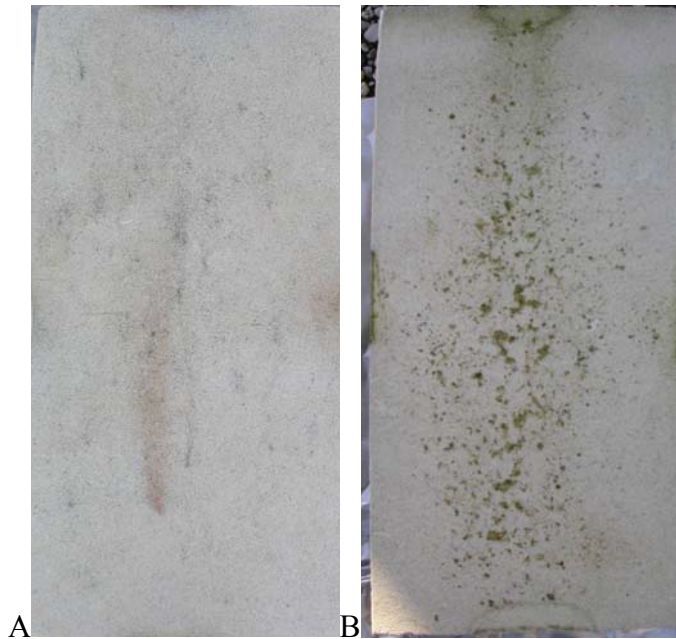
Temps d'exposition	0	6 mois	10 mois	13 mois	16 mois	19 mois	22 mois
Porosité (m <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup> )	30	-	-	-	14	-	11,4

**Tableau IV-3** : Porosités en termes de surface des pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer après différents temps d'exposition.

La diminution de la porosité est en accord avec la diminution de la capillarité.

### 2.3- Observations visuelles et microscopiques des surfaces des pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz

Il peut être observé à l'œil nu que les surfaces recto et verso ne sont pas colonisées de la même façon (Figure IV-2).

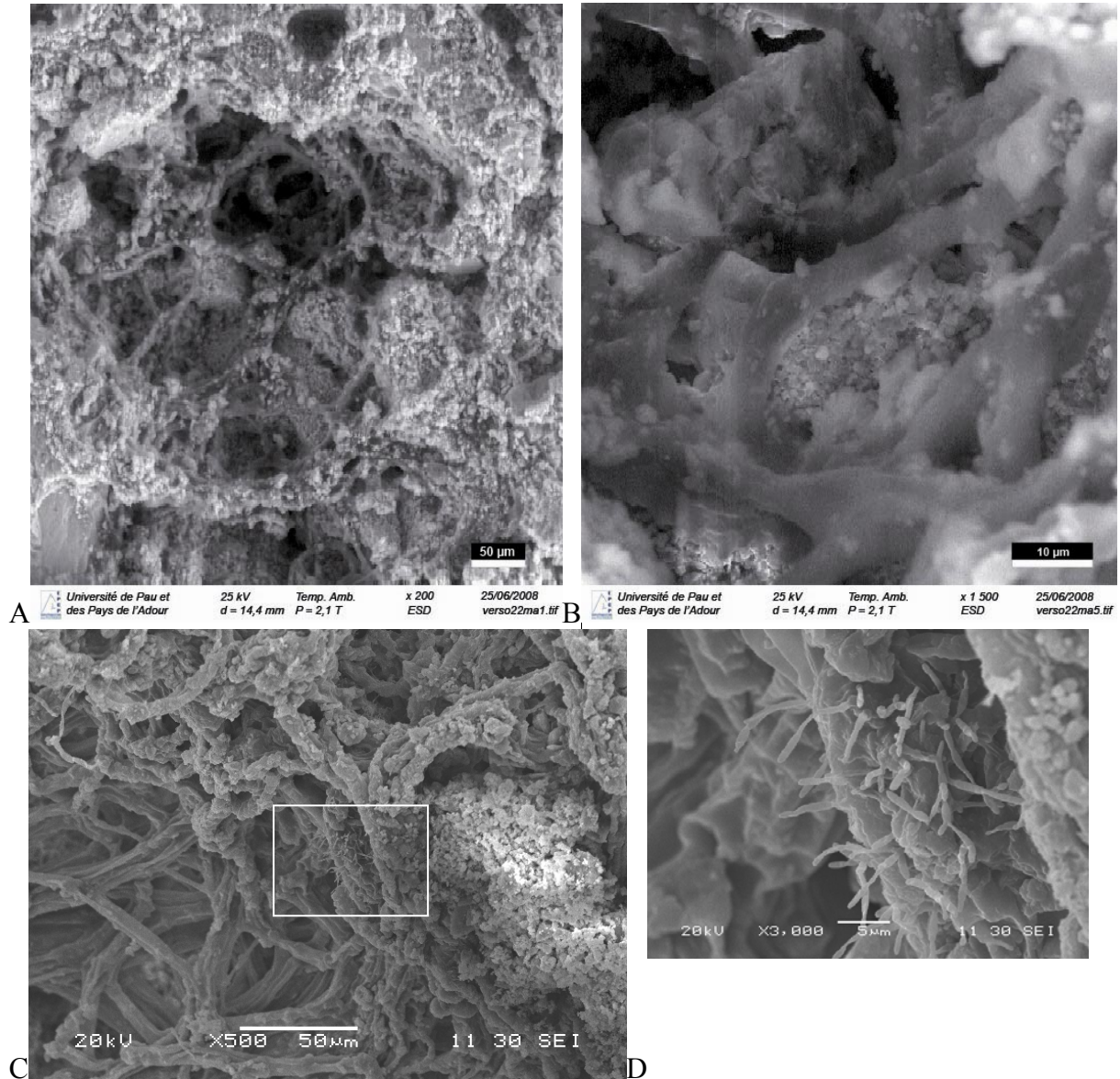


**Figure IV-2 :** Face recto (A) et face verso (B) d'une pierre calcaire d'Angoulême exposée pendant 22 mois sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz.

La surface recto montre un plus grand changement de coloration. Beige à l'origine, au bout de 6 mois déjà, elle prend une coloration grisée. De plus des zones colorées de rouge, noir ou vert vont apparaître. Par contre la face verso conserve sa couleur beige, et sa surface se couvre de « points » verts (Figure IV-2).

En observant les deux faces des pierres au microscope optique et au microscope électronique à balayage, nous avons constaté la présence de microorganismes filamenteux au niveau des points verts de la face verso et pas sur la face recto.





**Figure IV-3 :** Observations au Microscope Electronique à Balayage à basse pression (A et B) et haute pression (C) des « points » verts s'étant formés sur la face verso des pierres avec un agrandissement d'une zone des points verts (D).

Les observations au Microscope Electronique à Balayage (MEB) classique ou Environnemental (ESEM) (respectivement à haute et basse pression) montrent une surface très hétérogène des pierres. Il est difficile d'observer des microorganismes de taille inférieure à 1 µm, car ils peuvent être confondus avec la structure de la pierre. D'ailleurs, la microscopie électronique à balayage environnementale (Figure IV-3 A et B) possède une moins bonne résolution pour observer les surfaces des pierres que la microscopie électronique à balayage classique (Figure IV-3 C et D).

Nous distinguons néanmoins parfaitement les microorganismes eucaryotes filamenteux, probablement les algues (Figure IV-3 A, B et C). Lorsque nous regardons plus



en détail les points verts de la face verso au MEB classique, nous discernons en plus des microorganismes eucaryotes filamenteux de grande taille ( $<10\ \mu\text{m}$ ), des microorganismes de plus petite taille ( $>1\ \mu\text{m}$ ), qui sont des bactéries en cours de division (Figure IV-3 D). Les points verts abritent donc une communauté hétérogène d'eucaryotes et de procaryotes, avec une dominance des algues vertes filamenteuses.

Ces observations au microscope nous permettent de faire également une autre constatation : les microorganismes semblent avoir tendance à pénétrer dans la pierre (Figure IV-3A), probablement pour se protéger des conditions environnementales drastiques.

Nous ne constatons pas d'interaction entre les biofilms et les sels marins. Mottershead *et al.* (2003) avaient observé que la couche de microorganismes se formant à la surface de la pierre semblait empêcher tout contact entre les sels apportés par des embruns marins et la surface de la pierre. Dans notre cas, les biofilms se formant à la surface des pierres sont trop récents, et ce type d'observation n'est pas confirmé.

Les observations microscopiques montrent que les deux faces des pierres ne sont pas colonisées de la même façon par les microorganismes. La face recto est colonisée principalement par des eucaryotes et procaryotes unicellulaires qui semblent bien ancrés sur la pierre, alors que la face verso montre une colonisation par les algues essentiellement, facilement dissociables de la pierre. Cette différence de colonisation se comprend, puisque les deux faces des pierres n'offrent pas la même exposition vis-à-vis des embruns et des radiations solaires.

### 3- Etude des microorganismes s'étant développés sur les pierres exposées par microbiologie classique

A chaque prélèvement d'échantillons sur les pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz, les poudres provenant de 3 pierres et de chaque face sont étudiées. Cela fait 6 échantillons par prélèvements. Les microorganismes présents sur les échantillons sont mis en culture sur milieux nutritifs pour bactéries (Gélose Nutritive, GN) et pour champignons (Sabouraud, S) avec ou sans 30% de NaCl. Les UFC (Unités Formant des Colonies) ont été mesurées pour les bactéries et pour les champignons (Tableau IV-4 et Tableau IV-5).

Chaque microorganisme distinct s'étant développé est ensuite isolé et son ADN est extrait pour son identification moléculaire.

#### 3.1- Etude dans le temps des microorganismes cultivables

		28-nov-06		28-mars-07		29-juin-07		28-sept-07		08-janv-08		04-avr-08	
		Pétri	UFC/cm2	Pétri	UFC/cm2	Pétri	UFC/cm2	Pétri	UFC/cm2	Pétri	UFC/cm2	Pétri	UFC/cm2
face recto	0 g/L NaCl	GN 62R 10-2	776	GN 6R 10-1	81	GN 40R 10°	3	GN 22R 10-1	135	GN 2R 10-1	709	GN 3R 10-1	205
		GN 11R 10-2	639	GN 74R 10-1	106	GN 48R 10°	48	GN 63R 10-1	211	GN 49R 10-1	285	GN 58R 10-2	171
		GN 55R 10-2	3332	GN 111R 10-1	226	GN 91R 10°	69	GN 101R 10-1	1714	GN 95R 10-1	360	GN 98R 10-1	94
	30 g/L NaCl	GNS 62R 10-2	1738	GNS 6R 10-1	325	GNS 40R 10°	52	GNS 22R 10-1	0	GNS 2R 10-1	195	GNS 3R 10-1	0
		GNS 11R 10-2	5232	GNS 74R 10-1	213	GNS 48R 10°	49	GNS 63R 10-1	50	GNS 49R 10-1	337	GNS 58R 10-1	0
		GNS 55R 10-2	3360	GNS 111R 10-1	276	GNS 91R 10°	50	GNS 101R 10-1	82	GNS 95R 10-1	96	GNS 98R 10-1	47
face verso	0 g/L NaCl	GN 62V 10-2	4717	GN 6V 10-1	1383	GN 40V 10-1	325	GN 22V 10-1	2212	GN 2V 10-1	9426	GN 3V 10-1	1069
		GN 11V 10-2	9065	GN 74V 10-1	1968	GN 48V 10-1	452	GN 63V 10-1	4316	GN 49V 10-1	5002	GN 58V 10-1	721
		GN 55V 10-2	6663	GN 111V 10-2	1512	GN 91V 10-1	407	GN 101V 10-1	2584	GN 95V 10-1	3939	GN 98V 10-1	1915
	30 g/L NaCl	GNS 62V 10-2	4127	GNS 6V 10-2	7323	GNS 40V 10-1	108	GNS 22V 10-1	530	GNS 2V 10-1	7130	GNS 3V 10-1	980
		GNS 11V 10-2	10008	GNS 74V 10-2	12763	GNS 48V 10-1	532	GNS 63V 10-1	1443	GNS 49V 10-1	9059	GNS 58V 10-1	383
		GNS 55V 10-2	4480	GNS 111V 10-2	10698	GNS 91V 10-1	628	GNS 101V 10-1	1966	GNS 95V 10-1	5410	GNS 98V 10-1	415

**Tableau IV-4 :** Tableau montrant les résultats de culture des bactéries sur milieu nutritif obtenus à partir des pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz. Sur chaque face le nombre d'UFC/cm<sup>2</sup> des triplicats avec et sans présence de sels, ont été calculés.

		28-nov-06		28-mars-07		29-juin-07		28-sept-07		08-janv-08		04-avr-08	
		Pétri	UFC/cm2	Pétri	UFC/cm2	Pétri	UFC/cm2	Pétri	UFC/cm2	Pétri	UFC/cm2	Pétri	UFC/cm2
face recto	0 g/L NaCl	S 62R	0,35	S6R	0,4	S40R	0,25	S22R	0,2	S2R	0,25	S3R	0,06
		S11R	0,425	S74R	0,225	S48R	0,17	S63R	0,7	S49R	0,34	S58R	0,14
		S55R	0,425	S111R	0,05	S91R	0,05	S101R	0,05	S95R	0,19	S98R	0,23
	30 g/L NaCl	SS11R	0,25	SS6R	0,35	SS40R	0,35	SS22R	0,5	SS2R	0,35	SS3R	0,25
				SS74R	0	SS48R	0,15	SS63R	0,7	SS49R	0,13	SS58R	0,10
				SS111R	0,4	SS91R	0,05	SS101R	0,05	SS95R	0,29	SS98R	0,09
face verso	0 g/L NaCl	S11V	0,425	S6V	0,15	S40V	0,02	S22V	0,05	S2V	0,37	S3V	0,03
		S55V	0,58	S74V	0,1	S48V	0,05	S63V	0,05	S49V	0,16	S58V	0,19
				S111V	0,02	S91V	0,07	S101V	0,6	S95V	0,19	S98V	0,38
	30 g/L NaCl			SS74V	0,17	SS40V	0,07	SS22V	0,05	SS2V	0,12	SS3V	0,04
				SS111V	0,07	SS48V	0,02	SS63V	0,02	SS49V	0,12	SS58V	0,05
						SS91V	0,05	SS101V	0,6	SS95V	0,19	SS98V	0,14

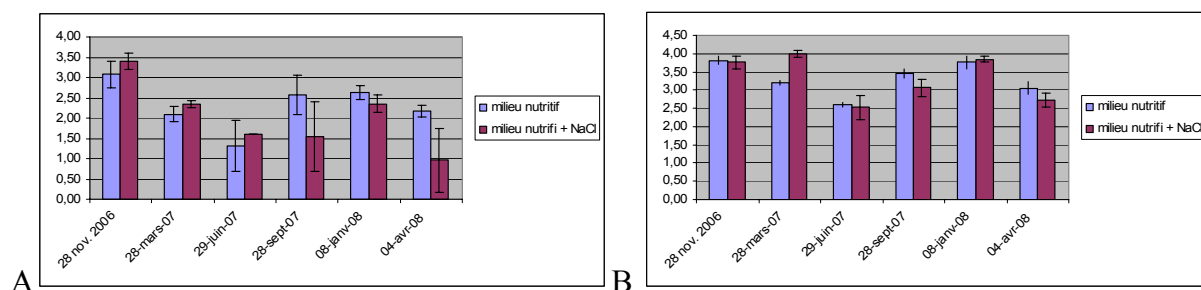
**Tableau IV-5 :** Tableau montrant les résultats de culture des champignons sur milieu Sabouraud, obtenus à partir des pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz. Sur chaque face le nombre d'UFC/cm<sup>2</sup> des triplicats avec et sans présence de sels, ont été calculés.

La concentration en bactéries peut varier de 40 UFC/cm<sup>2</sup> à 10000 UFC/cm<sup>2</sup> (Tableau IV-4). Afin de visualiser les variations d'UFC/cm<sup>2</sup> au cours du temps, des graphiques en log d'UFC/cm<sup>2</sup> on été dressés (Figure IV-4).

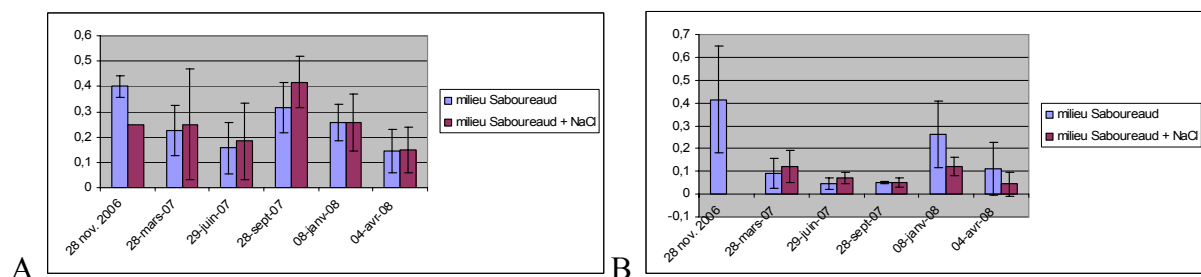
Le premier prélèvement de novembre 2006 présente un nombre d'UFC/cm<sup>2</sup> de l'ordre de 3-3,5 log pour les deux faces. Ensuite la population ne dépasse pas les 3 log d'UFC/cm<sup>2</sup> pour la face recto et les 4 log d'UFC/cm<sup>2</sup> pour la face verso.

La face verso présente plus d'UFC/cm<sup>2</sup> que la face recto ; de plus, la concentration en sels ne semble pas vraiment influencer la croissance des microorganismes.

Au niveau des champignons, la population ne dépasse pas les 0,5 UFC/cm<sup>2</sup> (Tableau IV-5).



**Figure IV-4** : Graphiques représentant le nombre de bactéries en log d'UFC/cm<sup>2</sup> détectées sur milieu nutritif avec et sans ajout de sels, en fonction des prélèvements sur les faces recto (A) et verso (B) des pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz.



**Figure IV-5** : Graphiques représentant le nombre de champignons en UFC/cm<sup>2</sup> détectés sur milieu Saboureaud avec et sans ajout de sels, en fonction des prélèvements sur les faces recto (A) et verso (B) des pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz.

Lorsque nous regardons les Figure IV-4 et Figure IV-5, une certaine tendance est observée au cours du temps. En effet, on observe une plus forte concentration en microorganismes lors du premier prélèvement et lors des prélèvements de septembre 2007 et janvier 2008, quel que soit la face et quel que soit le microorganisme. Les plus fortes concentrations en microorganismes sont donc en été-automne, alors que les moins grandes

concentrations sont en hiver. Cela montre que les microorganismes colonisant la pierre et cultivables sont sensibles à la saison.

Trois paramètres peuvent influencer ces variations : la température, la pluie et le dépôt des sels.

En observant le graphique sur les données météorologiques (Figure IV-6), le taux de précipitations ne semble pas influencer le nombre de microorganismes sur les pierres. La baisse des températures pourraient expliquer cette baisse d'UFC.

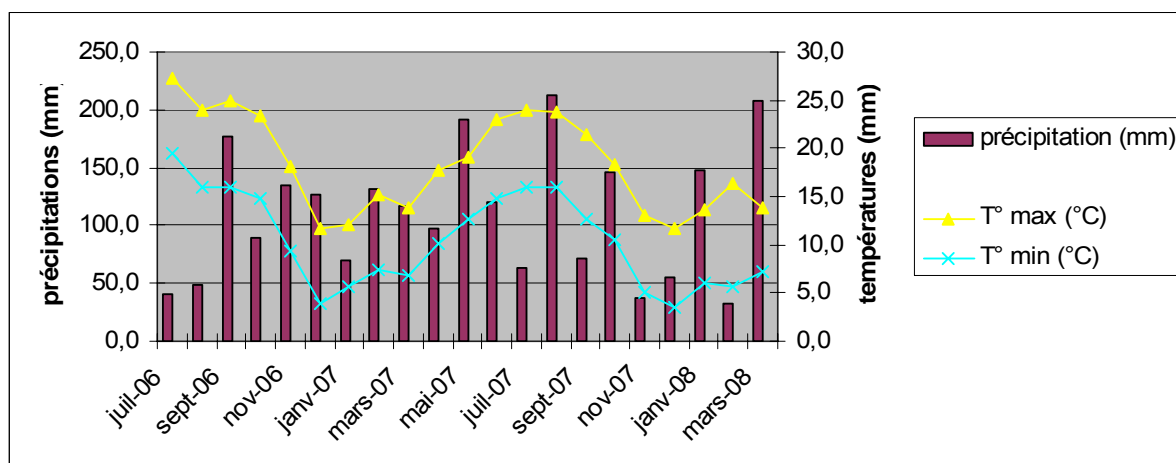


Figure IV-6 : Précipitations et températures moyennes de la ville de Biarritz, durant les mois de juin 2006 à mars 2008 (MétéoCiel, [www.meteociel.fr](http://www.meteociel.fr)).

En regardant les concentrations en sels déposés par les embruns entre 2000 et 2005 (Figure IV-7), il est clair que les plus fortes concentrations sont apportées en hiver. Cet apport est lié aux tempêtes, ce paramètre a donc pu influencer la croissance des microorganismes sur la pierre.

Pour conclure, les microorganismes capables de croître en milieu nutritif sont des microorganismes résistants à la concentration en sels d'eau de mer. De plus, il y a plus de microorganismes viables sur la face verso que sur la face recto.

Enfin, la saison hivernale semble avoir une influence négative sur la croissance des microorganismes, à cause des températures mais aussi peut-être par l'apport en sels marins nettement plus fort (Figure IV-7).

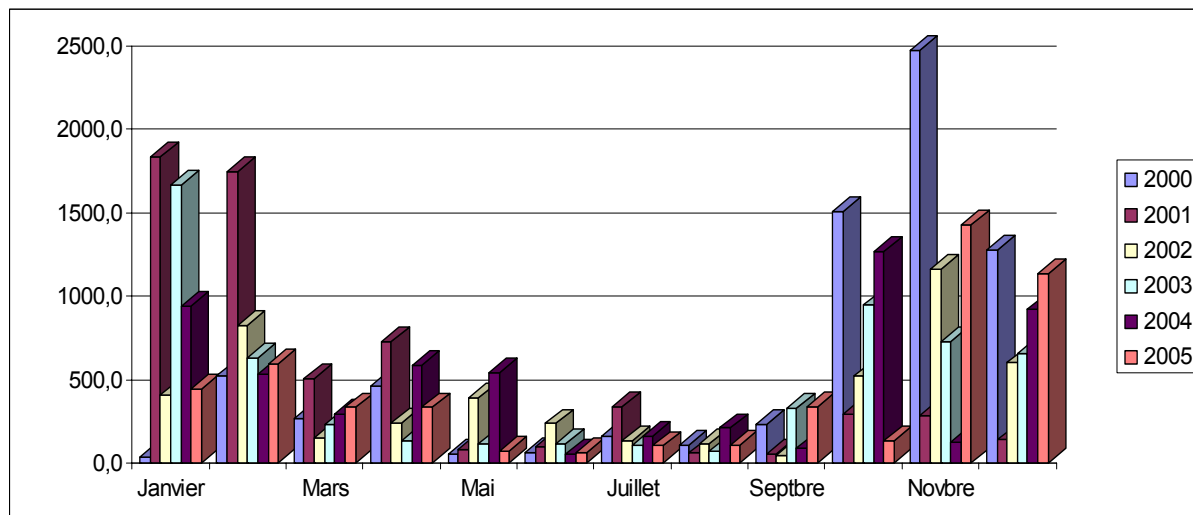


Figure IV-7 : Concentrations en ions chlorures ( $\text{Cl}^-/\text{cm}^2/\text{j.}$ ) déposés entre 2000 et 2005 sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz (Musée de la Mer de Biarritz, communication personnelle).

### 3.2- Identification des microorganismes cultivables

Après isolement des souches distinctes s'étant développées sur milieux nutritifs avec et sans présence de sel, puis extraction de leur ADN, amplification par PCR du gène codant pour l'ARNr 16S pour les bactéries et les régions ITS pour les champignons, ces séquences ont été comparées dans les bases de données et nous ont permis d'identifier différents types de microorganismes.

Ces microorganismes sont trouvés sur les deux faces à tous les prélèvements (Tableau IV-6). Nous avons essentiellement isolé des bactéries appartenant aux embranchements des *Firmicutes* et des *Proteobacteria* (classe alpha et gamma).

Parmi les *Firmicutes*, les genres *Bacillus* et *Staphylococcus* ont été isolés, dont plusieurs espèces de *Bacillus* et une seule espèce de *Staphylococcus*.

La souche isolée proche de *Staphylococcus epidermis* (max. ident. 99%) est probablement une contamination, comme son nom l'indique. Nous ne nous y intéresserons pas par la suite.

Parmi les *Proteobacteria*, nous avons identifié les genres *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Sphingomonas*, *Skermanella* et une nouvelle souche appartenant à la famille des *Burkholderiaceae*. Les espèces appartenant au genre *Bacillus* sont des bactéries gram+ aérobies ubiquistes. Les espèces appartenant au genre *Pseudomonas* sont des bactéries gram-

aérobies, anaérobies facultatives, ubiquistes. Ces deux genres sont capables de former des spores et donc de résister à de longues périodes de sécheresse.

Les bactéries *Halomonas* sont des bacilles gram-, aérobies (mais quelques souches sont capables de croître en anaérobiose en présence de nitrates), modérément halophiles (croissance optimale entre 0,3 à 2 M de NaCl). Ils sont généralement trouvés dans les eaux marines, mais peuvent croître sans présence de sels. Ils sont capables de se développer dans une grande variété d'habitats.

Ces trois genres sont les microorganismes cultivables communément rencontrés sur les pierres. Ils ont été pendant longtemps considérés comme les microorganismes hétérotrophes les plus fréquents des pierres (Flores *et al.*, 1997; Heyrman *et al.*, 1999; Gurtner *et al.*, 2000; Herrera *et al.*, 2004; Kiel et Gaylarde, 2006). (Radaelli *et al.*, 2004).

L'isolement des microorganismes a permis d'isoler une souche de *Sphingomonas*, et une souche proche à 98% de *Skermanella*. Ces bactéries ont été peu identifiées sur les façades en pierre, néanmoins leur présence n'est pas étonnante, car ce sont des microorganismes présents dans l'air.

La présence de la nouvelle souche isolée, appartenant à la famille des *Burkholderiaceae* est plus étrange, car cette famille est connue soit pour être pathogène, soit communément rencontrée dans la rhizosphère des plantes (Dworkin *et al.*, 2006).

L'isolement de champignons a permis d'identifier des Ascomycètes appartenant aux genres *Alternaria*, *Epicoccum* et *Cladosporium*. Un Basidiomycète a été également isolé, appartenant au genre *Aureobasidium*. Ces champignons, en particulier les Ascomycètes sont communément rencontrés sur les pierres (de la Torre *et al.*, 1993; Flores *et al.*, 1997; Heyrman *et al.*, 1999; Kurakov *et al.*, 1999; Radaelli *et al.*, 2004).

*IV – Travaux expérimentaux : Processus de colonisation de la pierre calcaire d'Angoulême  
exposée aux embruns marins*

sous-règne	Embranchement	classe	ordre	genre		accession number	max. ident.
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	<i>Bacillus Licheniformis</i>	2R-2V-3V-4V-5R-6V	EU650317.1	99%
				<i>Staphylococcus epidermis</i>	1R-2R-2V-3R-3V-4R	EU306604.1	99%
				<i>Bacillus cereus</i>	2R-3V-3R-4V-5R-5V-6V	EU326488.1	99%
				<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	6V	CP000903.1	95%
	Proteobacteria	Gamma-proteobacteria	Pseudomonadales	<i>Pseudomonas abietaniphila</i>	1R-1V-2V-3R-5R	EF471231.1 AJ011504.1	99%
				<i>Pseudomonas</i> sp. BE07	1R-1V-3V-4R-5R	AY162144.1 AY456700.1	99%
			Oceanospirillales	<i>Halomonas marisflava</i>	2R-2V-5V-6V	AF251143.1	99%
				<i>Halomonas marisflava</i>	tous	AF251143.1	99%
				uncultured <i>Burkholderiaceae</i> bacterium	1R-3R-1V-2V-3V-4V-5V-6V	AM420125.1	98%
		Alpha-proteobacteria	Sphingomonadales	<i>Sphingomonas</i> sp. BAC302	3V-4V-5R-5V-6R-6V	EU131000.1	91%
Rhodospirillales	<i>Skermanella</i> sp.		2R-2V-3V-5R	DQ672568.1	98%		
Eucarya	Ascomycota	Cystobasidiomycetes	Erythrobasidiales	<i>Rhodotorula slooffiae</i>	tous	AF444589.1	97%
		Dothideomycetes	Pleosporales	<i>Alternaria</i> sp. B22	tous	EF432287.1	100%
				<i>Epicoccum nigrum</i>	2V	EU530001.1	99%
			Capnodiales	<i>Cladosporium</i> sp. IBL 03145	tous	DQ682569.1	100%
	Basidiomycota		<i>Aureobasidium pullulans</i>	6V	EU529999.1	95%	

**Tableau IV-6 :** Microorganismes cultivables isolés des différentes pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz.

## 4- Identification des microorganismes par biologie moléculaire

Afin de s'affranchir du problème des microorganismes non cultivables, les microorganismes présents sur les pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer ont été identifiés à l'aide de la méthode moléculaire développée durant la thèse et détaillée dans la « partie III-3 » de ce manuscrit.

6 prélèvements ont été réalisés. Pour chaque prélèvement, nous avons 2 échantillons de poudre, recto et verso. Donc au total 12 échantillons ont été analysés par biologie moléculaire.

### ***4.1- Extraction de l'ADN total de la communauté microbienne présent dans chaque échantillon et amplification par PCR***

L'ADN total des communautés microbiennes de chaque échantillon a été extrait selon la méthode de lyse « douce » mise au point avec le kit « UltraClean™ Soil DNA Isolation » de Mobio, puisqu'elle s'est avérée efficace pour extraire l'ADN des biofilms colonisant la façade de la Villa Isabel et de la mairie de St-Sébastien (cf. Partie III, chapitre 3).

L'observation des ADN extraits sur gel d'électrophorèse montre des bandes d'ADN à 23 kpb non dégradés, prouvant qu'ils ont été bien conservés durant le processus d'extraction (données non montrées). Pour les 12 extractions, l'ADN extrait s'est avéré en quantité suffisante pour réaliser les étapes suivantes de la méthode.

La méthode moléculaire développée permet d'identifier les microorganismes eucaryotes et procaryotes. Ces microorganismes ne possédant pas le même opéron ribosomique, il faut amplifier le gène codant pour l'ARNr 16S des procaryotes, et les régions ITS de l'ARNr des eucaryotes séparément. Lorsque les amplifications par PCR ont été vérifiées sur gel d'électrophorèse, comme attendu, une bande d'ADN à 1500 pb est révélée pour l'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S et deux bandes vers 650 pb et 750 pb sont révélées pour l'amplification des régions ITS.

Bien que les microorganismes présents sur les pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer sont en très faible quantité, la méthode d'extraction de l'ADN et d'amplification par PCR du gène codant pour l'ARNr 16S et des régions ITS de ces



microorganismes, développée dans la « partie III-3 » de ce manuscrit, s'avère toujours efficace.

#### **4.2- Clonage et construction de banques de clones**

Les ADNr 16S totaux et les régions ITS amplifiés à partir des 12 extraits sont clonés afin de séparer les ADN provenant des différents individus présents dans l'échantillon de départ. A chaque clonage, entre 39 et 88 clones sont sélectionnés pour réaliser les étapes suivantes de l'analyse ARDRA. Le Tableau IV- 7 suivant résume les différentes banques de clones ainsi créées.

Prélèvement	Face	ADN amplifié	nombre de clones	nom	nombre de ribotypes	chimères
1	R	16S	40	1RS	1	0
2	R	16S	39	2RS	7	1
3	R	16S	81	3RS	7	1
4	R	16S	58	4RS	10	6
5	R	16S	81	5RS	12	2
6	R	16S	76	6RS	12	0
1	V	16S	58	1VS	11	2
2	V	16S	46	2VS	5	1
3	V	16S	68	3VS	7	2
4	V	16S	68	4VS	10	4
5	V	16S	77	5VS	19	2
6	V	16S	81	6VS	12	0
1	R	ITS	64	1RI	14	/
2	R	ITS	66	2RI	8	/
3	R	ITS	76	3RI	9	/
4	R	ITS	74	4RI	10	/
5	R	ITS	70	5RI	16	/
6	R	ITS	72	6RI	6	/
1	V	ITS	39	1VI	10	/
2	V	ITS	56	2VI	9	/
3	V	ITS	69	3VI	8	/
4	V	ITS	62	4VI	6	/
5	V	ITS	83	5VI	10	/
6	V	ITS	88	6VI	6	/

**Tableau IV- 7 :** Banques de clones des différents prélèvements réalisés sur les pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz, ainsi que le nombre de ribotypes obtenus par ARDRA et le nombre de chimères identifiées après séquençage.

Au total 24 banques de clones ont été construites.

### **4.3- Analyse ARDRA des différents prélèvements et séquençage**

Après amplification individuelle de l'ADN ribosomique 16S ou des régions ITS présents dans chaque clone et provenant d'un individu, l'analyse ARDRA à proprement parler est réalisée.

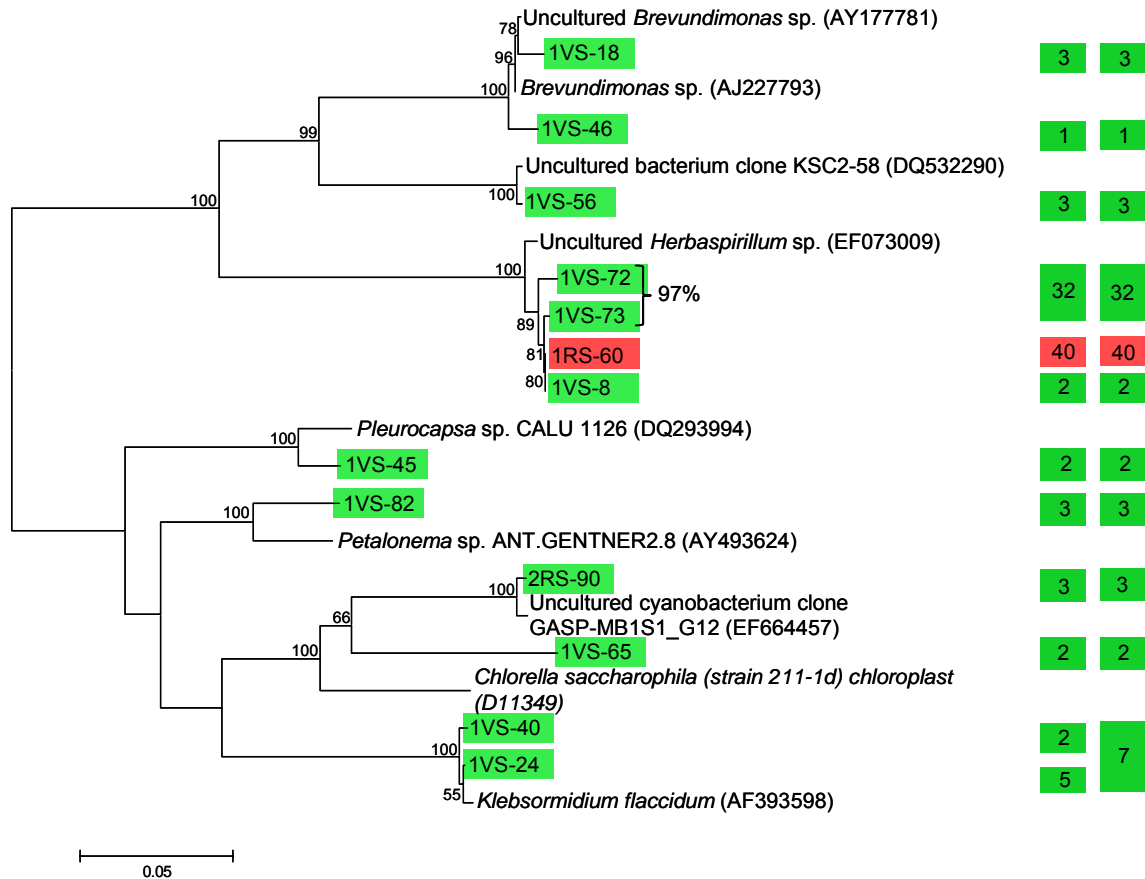
Les ADN amplifiés sont soumis à deux restrictions enzymatiques, permettant après migration sur gel d'électrophorèse de comparer les différents profils de digestion produits.

Un profil de digestion distinct est un ribotype. Tous les individus ayant le même ribotype sont regroupés ensembles. Tableau IV- 7 montre le nombre de ribotypes observés par banques de clones. Sauf pour l'échantillon 1RS, toutes les banques de clones possèdent entre 6 et 21 ribotypes différents. Ce faible nombre de ribotype par échantillon s'explique par le fait que les échantillons ont été prélevés en début de colonisation des pierres et qui vraisemblablement sont peu peuplées de microorganismes.

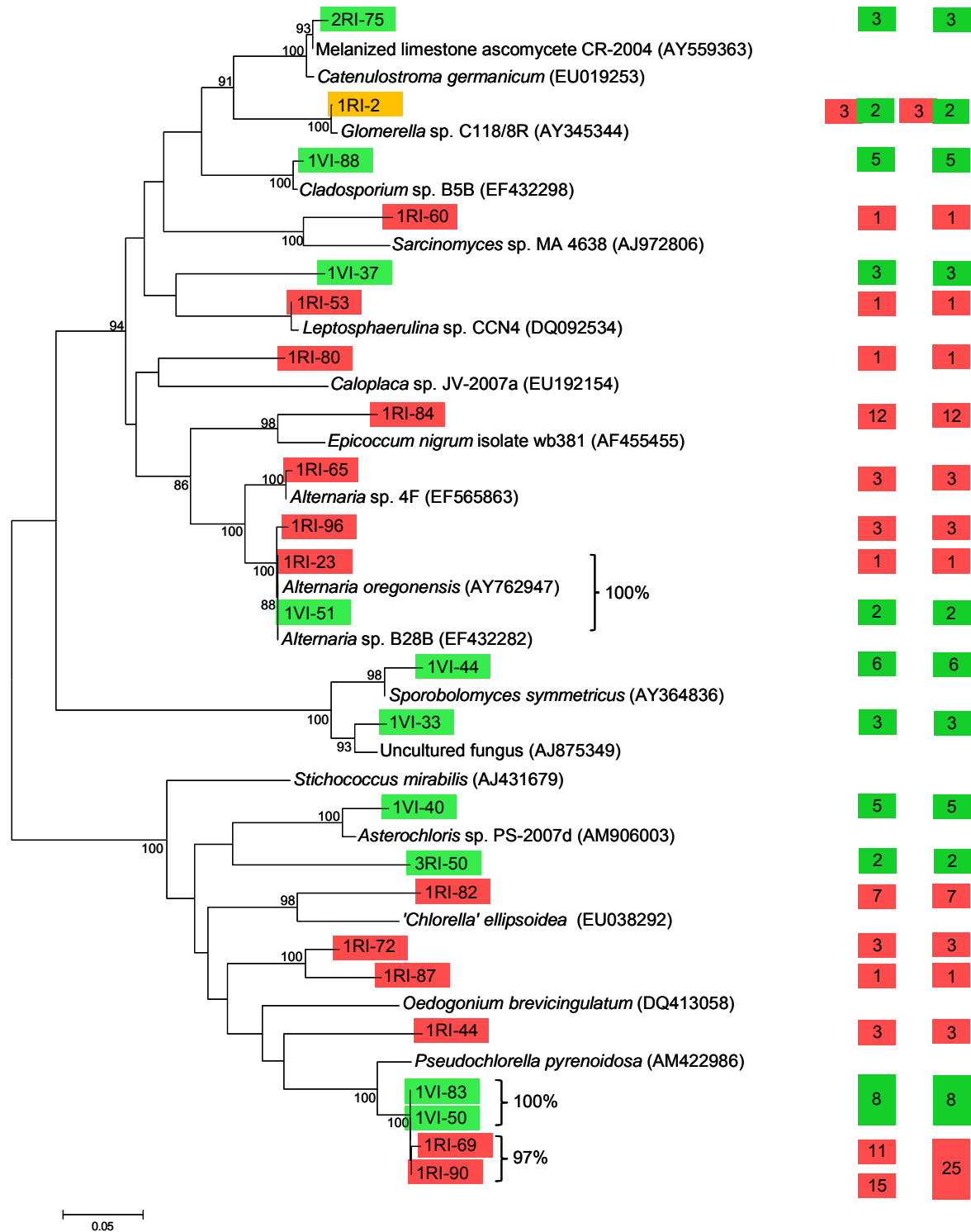
Ces regroupements ont permis de ne séquencer que quelques clones appartenant à chaque ribotype. Après séquençage des clones sélectionnés, une recherche des chimères pour les séquences d'ADNr 16S a été réalisée (Tableau IV- 7). Au total, 116 clones contenant les inserts eucaryotes et 108 clones contenant les inserts procaryotes ont été séquencés, dont 21 inserts procaryotes s'avèrent être des chimères. Au fur et à mesure que l'ARDRA est réalisée sur chaque échantillon, une base de données de profils est construite. Le nombre de clones à séquencer par échantillon est ainsi réduit, puisque certains profils de digestion identiques se retrouvent dans les différents échantillons.

#### **4.3.1- Analyse phylogénétique des microorganismes présents sur les pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer**

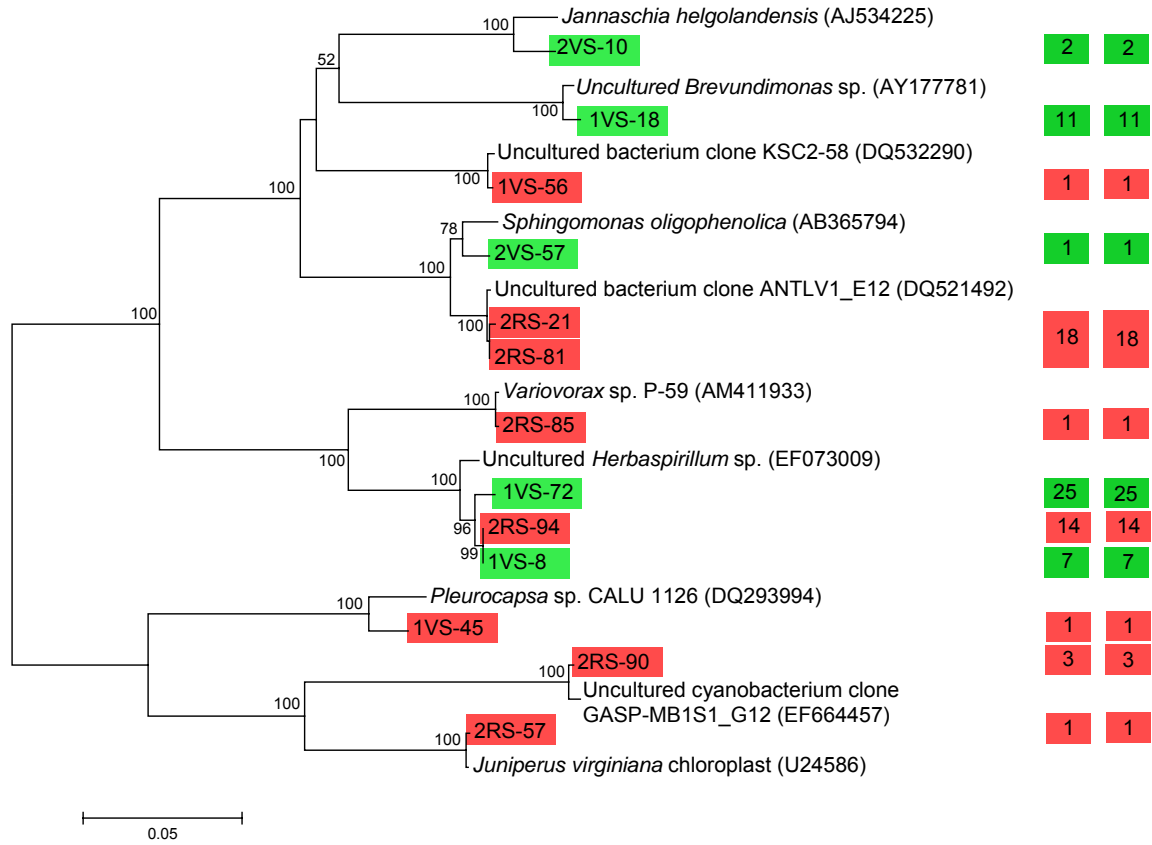
Après suppression des séquences chimères, l'identification phylogénétique des clones par comparaison des séquences avec les bases de données du BLAST sont réalisées. Les arbres phylogénétiques de chaque banque de clones ont été construits et sont montrés dans les figures Figure IV-8 à Figure IV-19. Les arbres représentant les banques de clones d'ADNr 16S et ITS ont été construits séparément. Un arbre représente un prélèvement, les clones représentant les ribotypes des faces recto et verso sont différenciés par des couleurs.



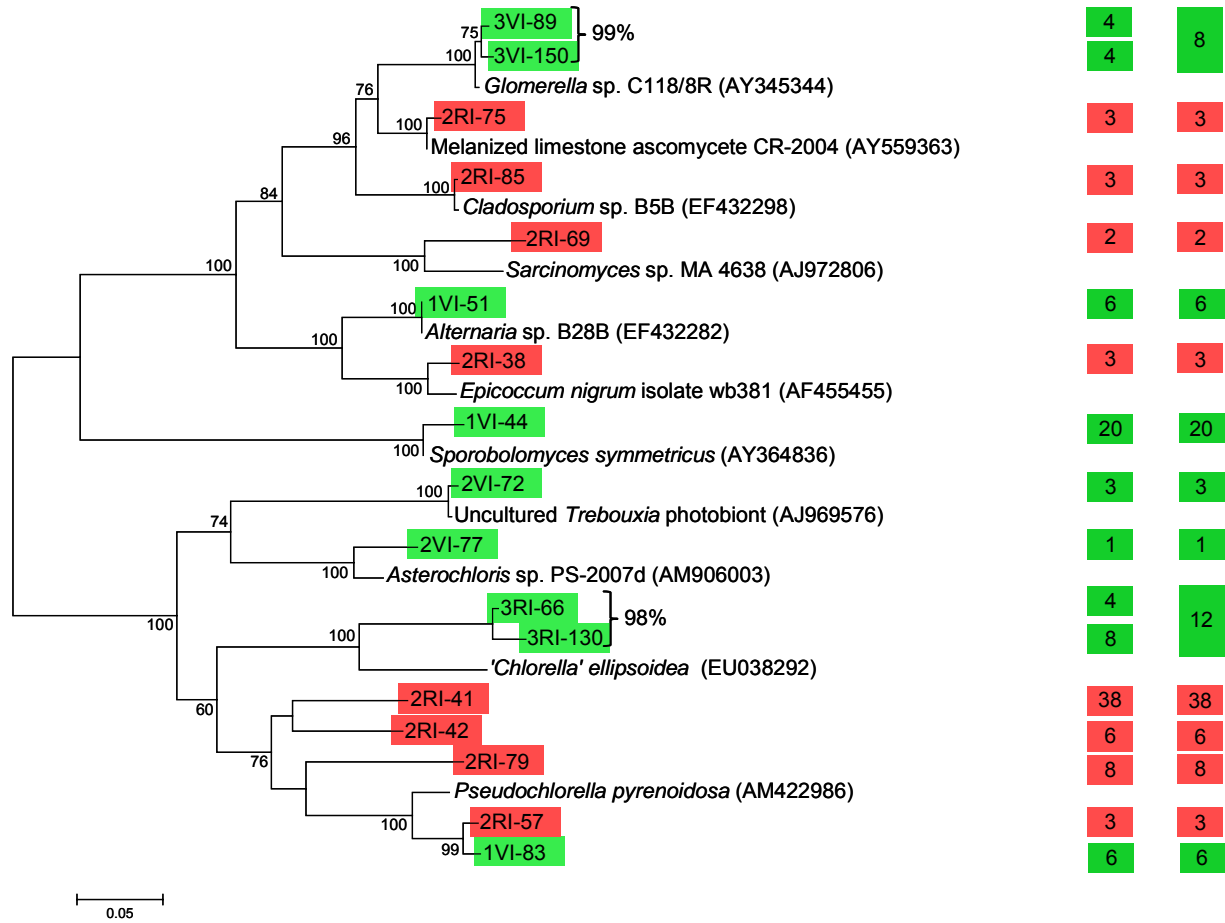
**Figure IV-8 :** Arbre phylogénétique représentant les séquences partielles d'ADNr 16S des clones provenant du premier prélèvement. En rouge les clones isolés de la face recto, en vert les clones isolés de la face verso. La colonne de gauche représente le nombre de clones par ribotypes et la colonne de droite représente le nombre de clones par phylotype.



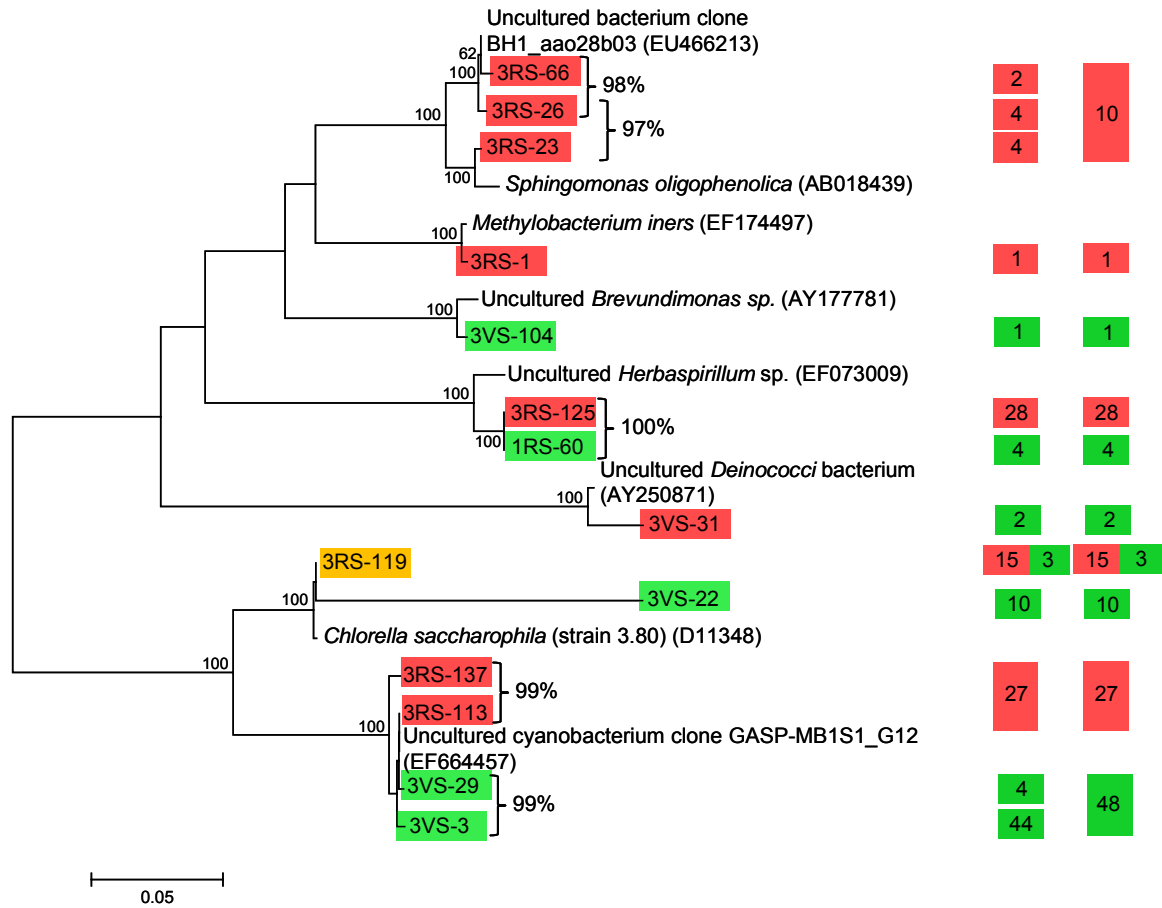
**Figure IV-9** : Arbre phylogénétique représentant les séquences partielles ITS des clones provenant du **premier prélèvement**. En rouge les clones isolés de la face recto, en vert les clones isolés de la face verso et en jaune les clones isolés à la fois sur la face recto et la face verso. La colonne de gauche représente le nombre de clones par ribotypes et la colonne de droite représente le nombre de clones par phylotype.



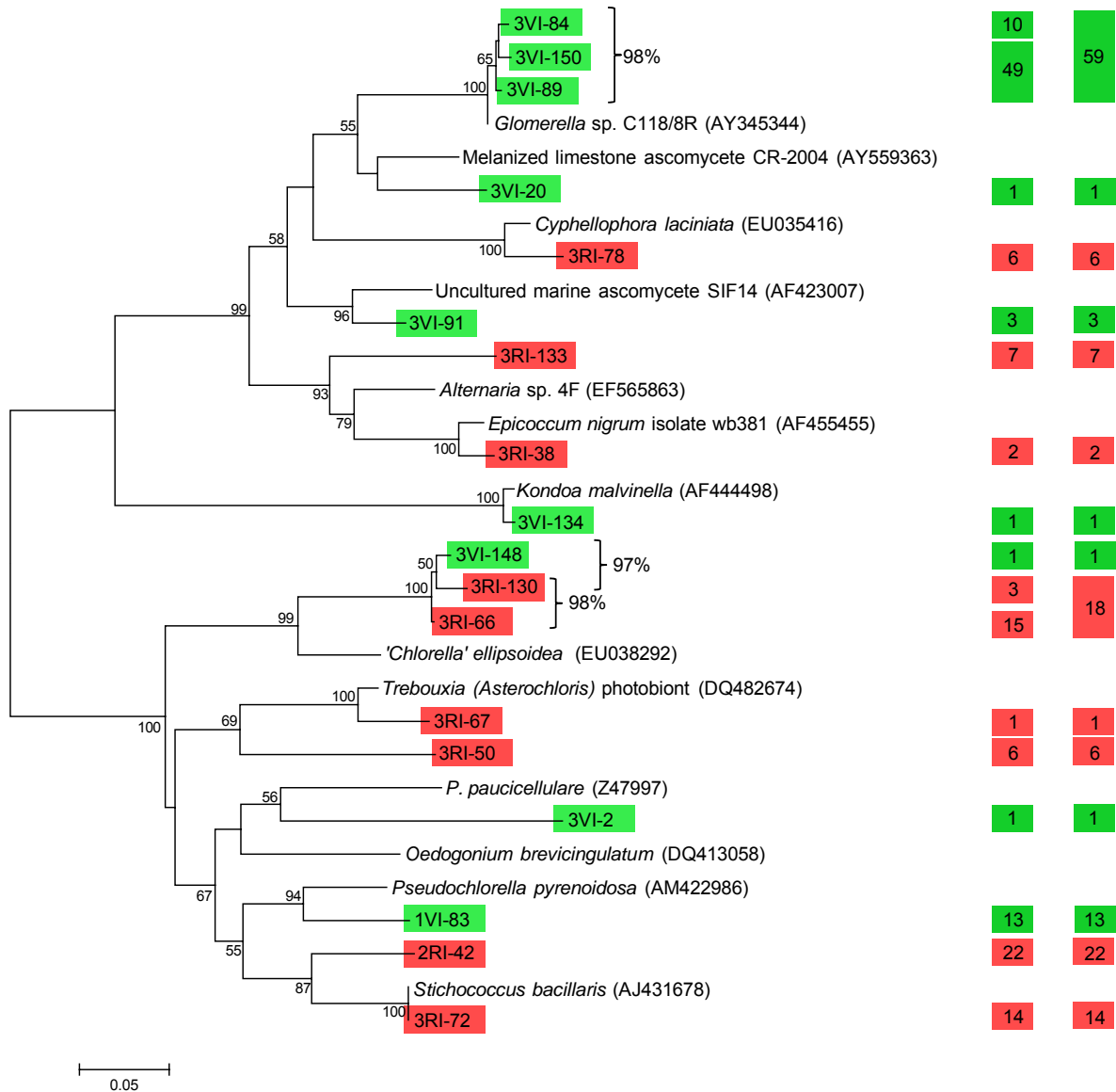
**Figure IV-10** : Arbre phylogénétique représentant les séquences partielles d'ADNr 16S des clones provenant du deuxième prélèvement. En rouge les clones isolés de la face recto, en vert les clones isolés de la face verso. La colonne de gauche représente le nombre de clones par ribotypes et la colonne de droite représente le nombre de clones par phylotype.



**Figure IV-11** : Arbre phylogénétique représentant les séquences partielles ITS des clones provenant du deuxième prélèvement. En rouge les clones isolés de la face recto, en vert les clones isolés de la face verso. La colonne de gauche représente le nombre de clones par ribotypes et la colonne de droite représente le nombre de clones par phylotype.

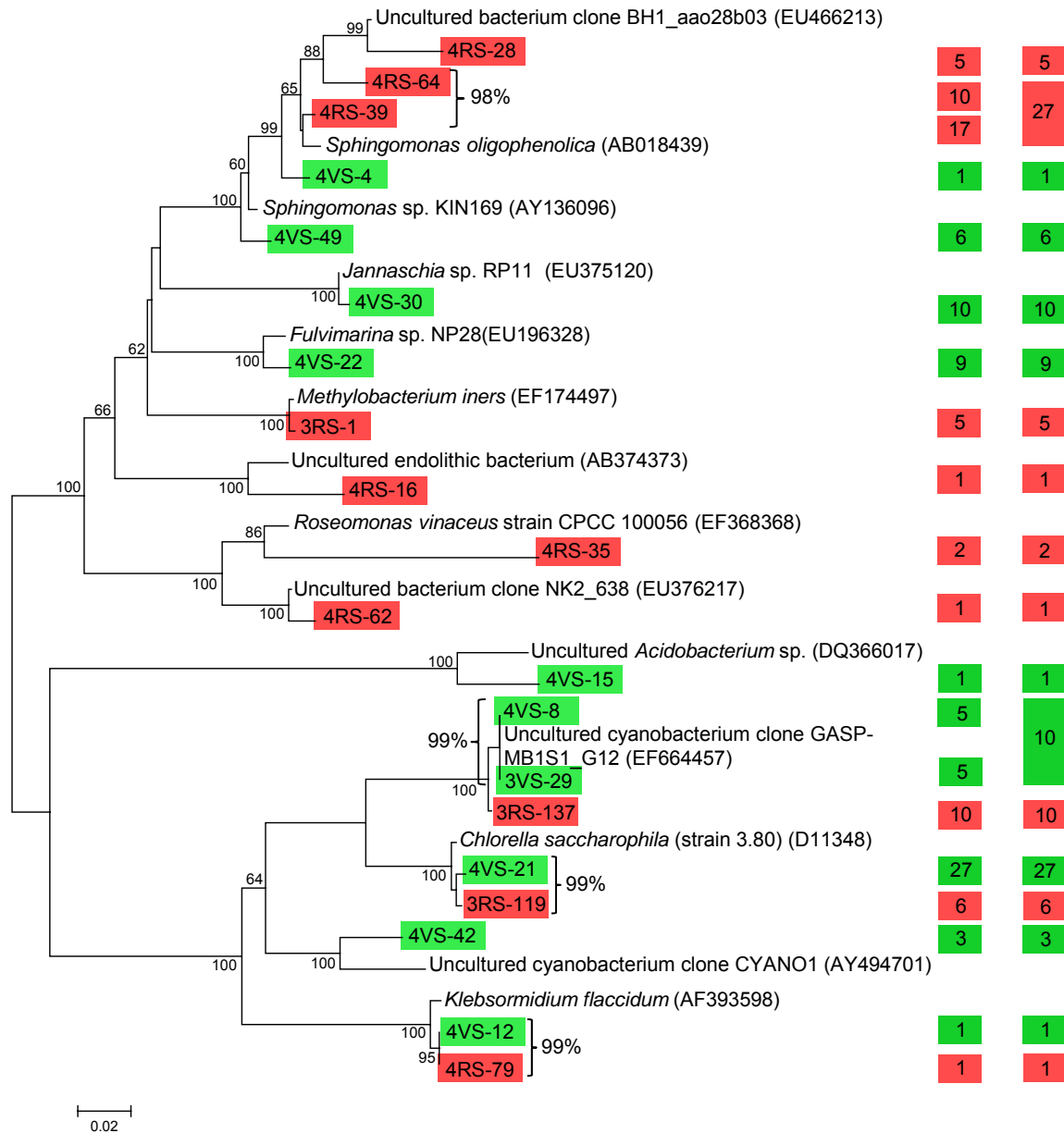


**Figure IV-12 :** Arbre phylogénétique représentant les séquences partielles d'ADNr 16S des clones provenant du troisième prélèvement. En rouge les clones isolés de la face recto, en vert les clones isolés de la face verso et en jaune les clones isolés à la fois sur la face recto et la face verso. La colonne de droite représente le nombre de clones par ribotypes et la colonne de gauche représente le nombre de clones par phylotype.

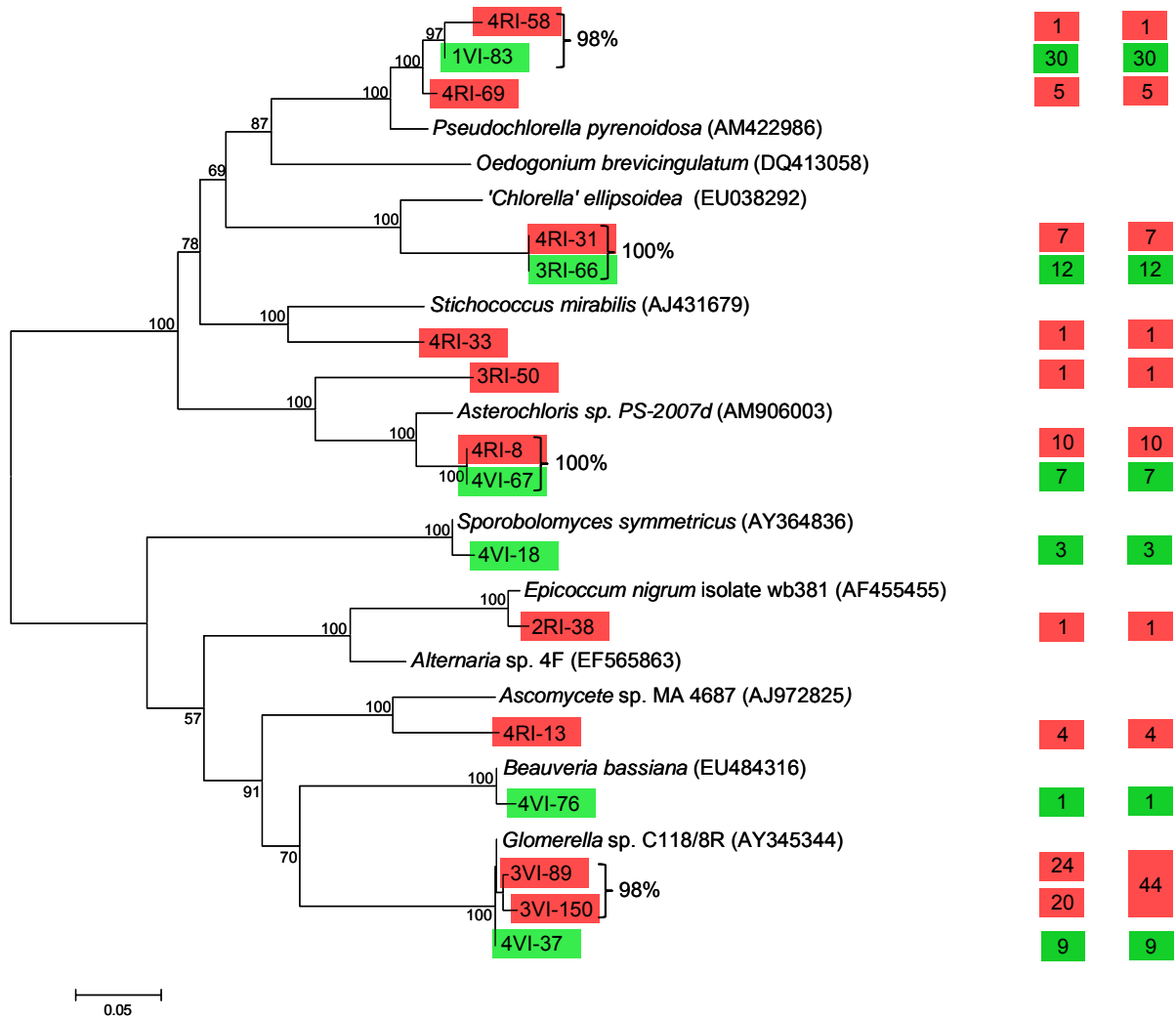


**Figure IV-13** : Arbre phylogénétique représentant les séquences partielles ITS des clones provenant du troisième prélèvement. En rouge les clones isolés de la face recto, en vert les clones isolés de la face verso. La colonne de gauche représente le nombre de clones par ribotypes et la colonne de droite représente le nombre de clones par phylotype.

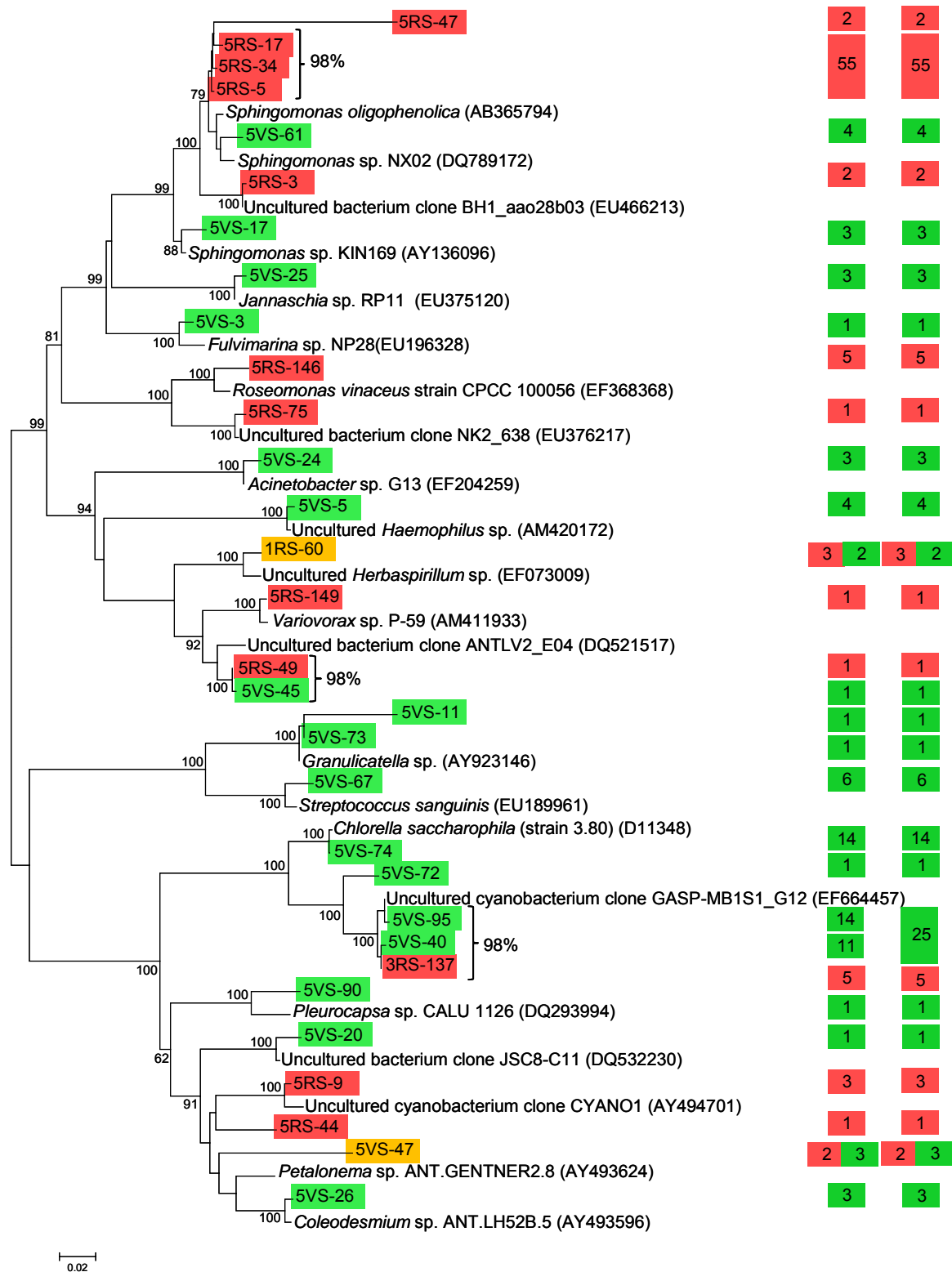




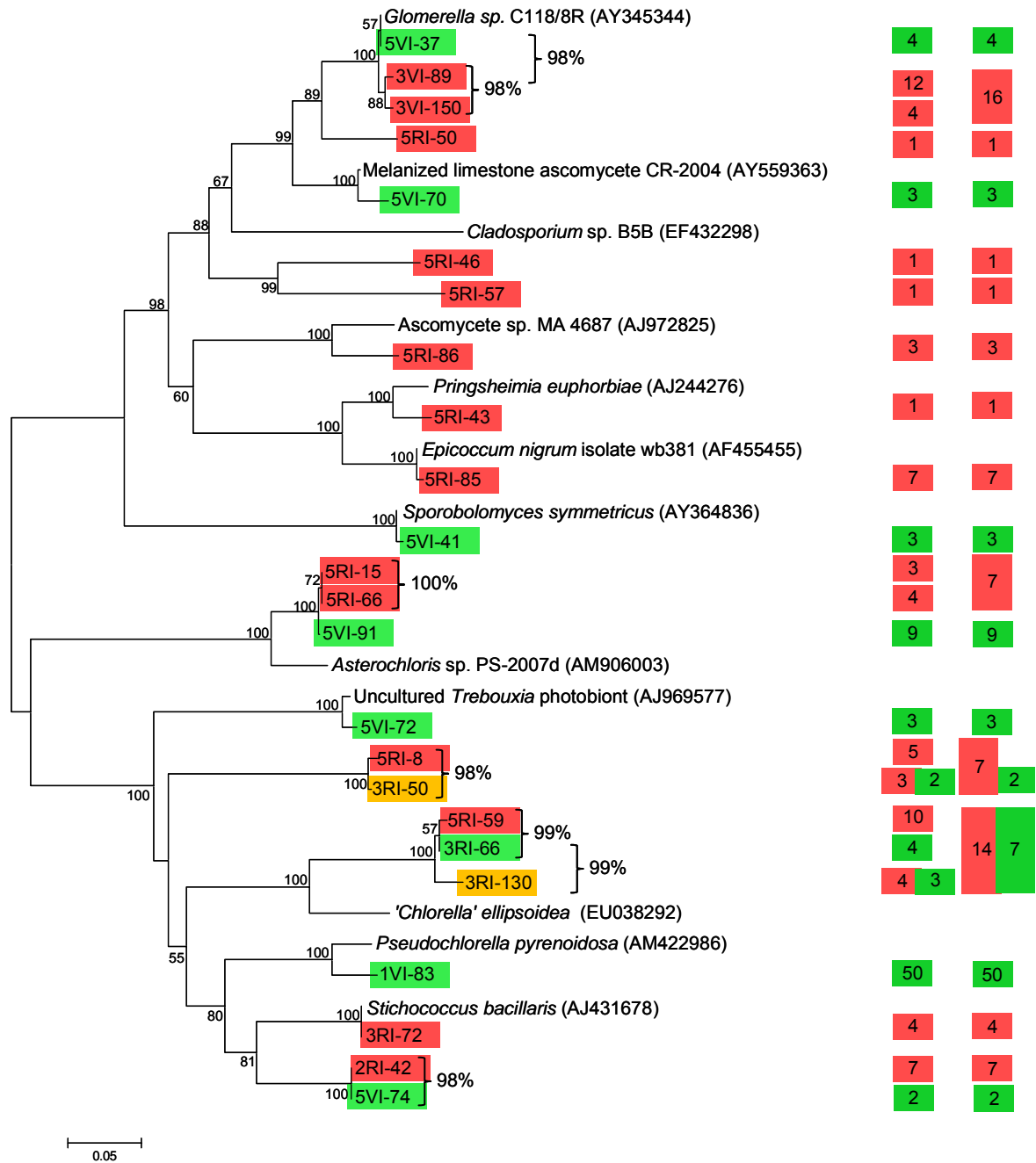
**Figure IV-14** : Arbre phylogénétique représentant les séquences partielles d'ADNr 16S des clones provenant du quatrième prélèvement. En rouge les clones isolés de la face Recto, en vert les clones isolés de la face verso. La colonne de gauche représente le nombre de clones par ribotypes et la colonne de droite représente le nombre de clones par phylotype.



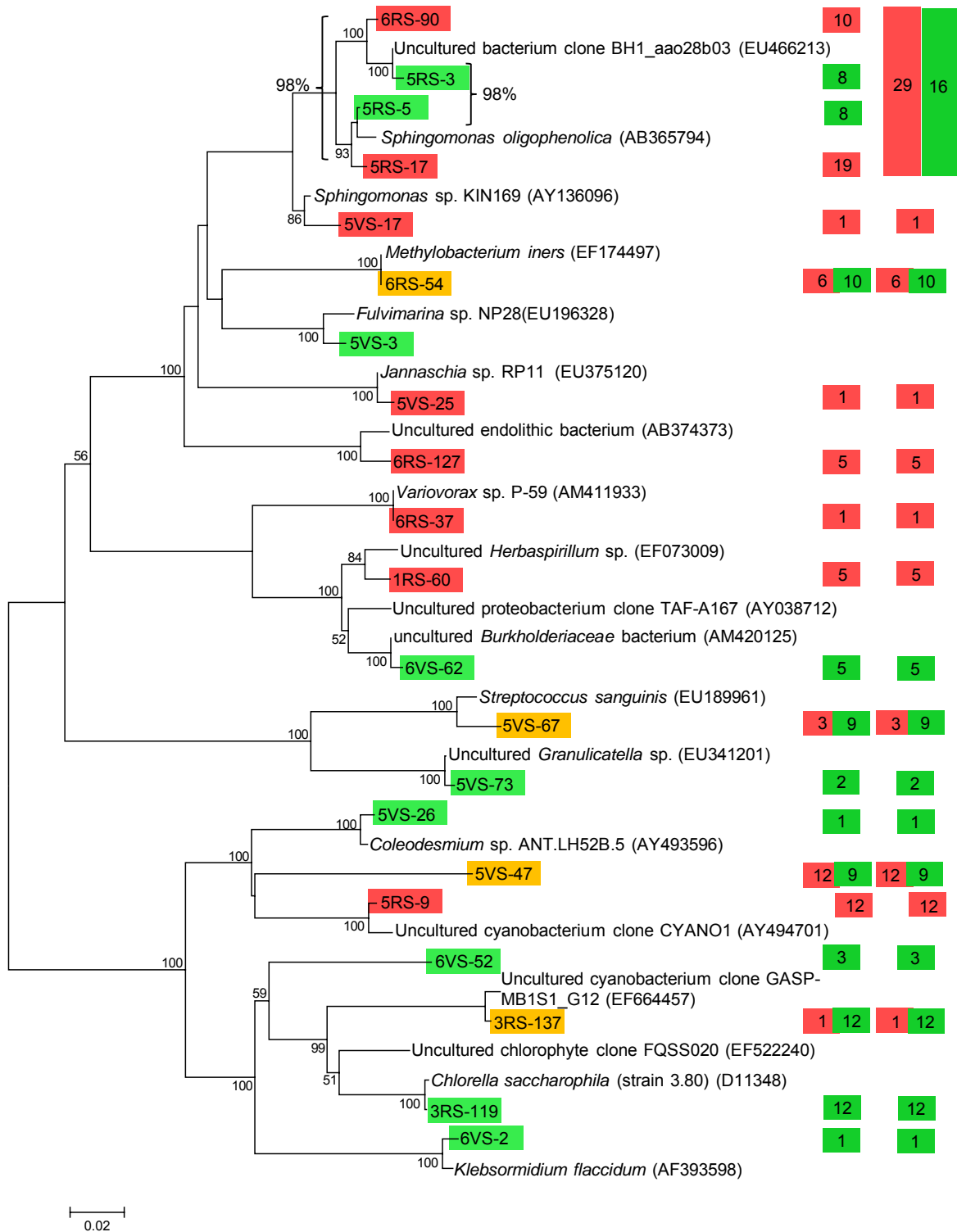
**Figure IV-15** : Arbre phylogénétique représentant les séquences partielles ITS des clones provenant du quatrième prélèvement. En rouge les clones isolés de la face recto, en vert les clones isolés de la face verso. La colonne de gauche représente le nombre de clones par ribotypes et la colonne de droite représente le nombre de clones par phylotype.



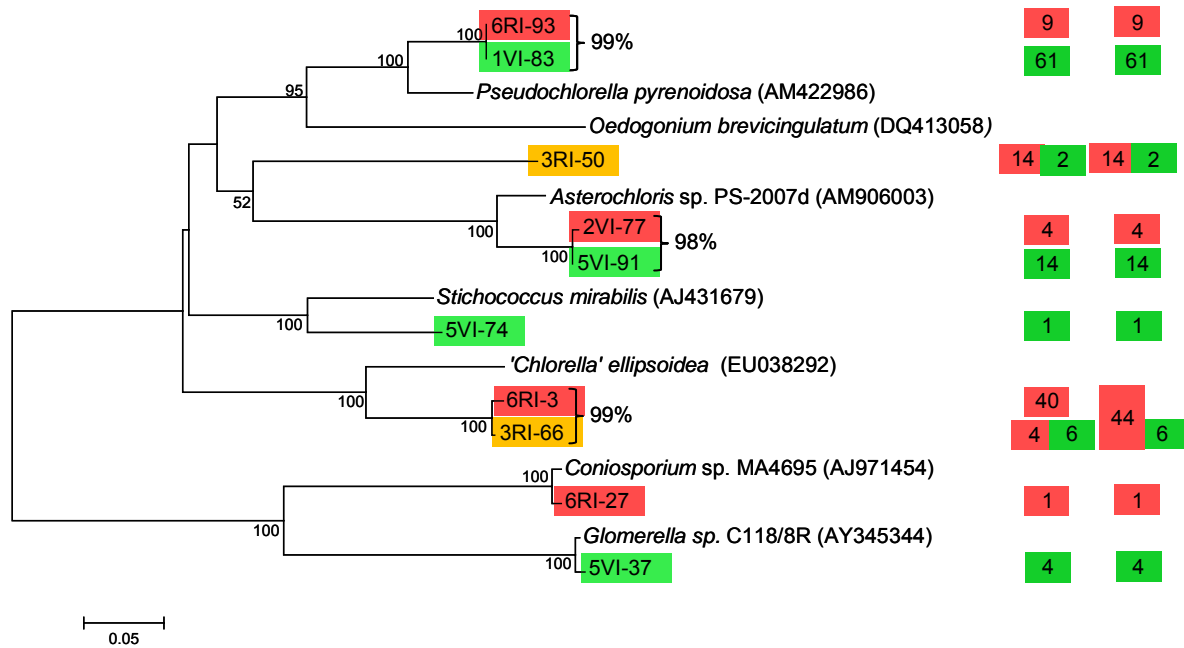
**Figure IV-16** : Arbre phylogénétique représentant les séquences partielles d'ADNr 16S des clones provenant du cinquième prélèvement. En rouge les clones isolés de la face recto, en vert les clones isolés de la face verso et en jaune les clones isolés à la fois sur la face recto et la face verso. La colonne de gauche représente le nombre de clones par ribotypes et la colonne de droite représente le nombre de clones par phylotype.



**Figure IV-17** : Arbre phylogénétique représentant les séquences partielles ITS des clones provenant du cinquième prélèvement. En rouge les clones isolés de la face recto, en vert les clones isolés de la face verso et en jaune les clones isolés à la fois sur la face recto et la face verso. La colonne de gauche représente le nombre de clones par ribotypes et la colonne de droite représente le nombre de clones par phylotype.



**Figure IV-18 :** Arbre phylogénétique représentant les séquences partielles d'ADNr 16S des clones provenant du sixième prélèvement. En rouge les clones isolés de la face Recto, en vert les clones isolés de la face verso et en jaune les clones isolés sur la face recto et la face verso. La colonne de gauche représente le nombre de clones par ribotypes et la colonne de droite représente le nombre de clones par phylotype.



**Figure IV-19** : Arbre phylogénétique représentant les séquences partielles ITS des clones provenant du **sixième prélèvement**. En rouge les clones isolés de la face recto, en vert les clones isolés de la face verso et en jaune les clones isolés sur la face recto et la face verso. La colonne de gauche représente le nombre de clones par ribotypes et la colonne de droite représente le nombre de clones par phylotype.

52 espèces différentes au total ont été identifiées. L'embranchement des protéobactéries est majoritaire (50% des espèces bactériennes) avec une prédominance pour les alpha-protéobactéries (37% des espèces bactériennes identifiées). 30% des espèces bactériennes trouvées sont des cyanobactéries.

Sur chaque arbre phylogénétique et donc à chaque prélèvement, nous constatons que les mêmes classes de microorganismes sont présents : pour les bactéries nous observons la présence d'alpha-protéobactéries, en particulier le genre *Sphingomonas*, de bêta-protéobactéries avec le genre *Herbaspirillum*, de cyanobactéries dont l'espèce non cultivée « GASP-MB1S1\_G12 » est très présente. Chez les algues, les chlorophytes *Chlorella*, *Pseudochlorella* et *Trebouxia* ou *Asterochloris* sont presque toujours identifiés, et chez les champignons deux genres sont fréquemment trouvés, *Glomerella* et *Epicoccum*.

Les séquences qui ont un pourcentage d'homologie supérieur ou égal à 97% sont considérées comme faisant partie d'un même phylotype. Nous remarquons ainsi que certains phylotypes sont représentés par plusieurs ribotypes. Les ribotypes des clones d'ADNr 16S, 3RS-66, 3RS-26, 3RS-21 font partie d'un même phylotype, ainsi que 3VS-29 et 3VS-3 (Figure IV-12), 4VS-8 et 3VS-29 qui sont identiques à 99% (Figure IV-14), de même que

5VS-95 et 5VS-40 (Figure IV-16), 5RS-3, 5RS-5, 6RS-90 et 5RS-17 (Figure IV-18). Cela révèle une diversité intra-espèce et nous remarquons qu'elle est particulière à la cyanobactérie non cultivée « GASP-MB1S1\_G12 » et aux bactéries non cultivées proches du genre *Sphingomonas*.

Les séquences ITS aussi montrent des ribotypes faisant partie d'un même phylotype : 1VI-50, 1RI-69 et 1RI-90 font partie du même phylotype (Figure IV-9), 3VI-89 et 3VI-150 sont identiques à 99%, 3RI-66 et 3RI-130 sont identiques à 98% (Figure IV-11, Figure IV-13, Figure IV-15, Figure IV-17), les ribotypes correspondant aux clones 5RI-15 et 5RI-66, ainsi que 5RI-8 et 3RI-50 se révèlent être également les mêmes phylotypes. Cette diversité de ribotypes dans un phylotype révèle une diversité intra-espèce au niveau des ITS, en particulier pour les algues (*Chlorella*, *Pseudochlorella*, *Stichococcus*, *Trebouxia*, *Asterochloris*), mais aussi pour le champignon *Glomerella* sp. C118/8R. Cela est parfaitement compréhensible, étant donné que les régions ITS montrent des régions très variables, et cette constatation a déjà été faite par Gomes *et al.* (2002).

Pour une meilleure clarté des résultats, tous les genres des microorganismes identifiés sont répertoriés dans les tableaux IV-8, IV-9 et IV-10 suivants, en fonction de la face sur laquelle ils ont été trouvés.

*IV – Travaux expérimentaux : Processus de colonisation de la pierre calcaire d'Angoulême  
exposée aux embruns marins*

classe - sous classe	genre	1R	2R	3R	4R	5R	6R	1V	2V	3V	4V	5V	6V
alpha- proteobacteria	<i>Sphingomonas</i> sp.			■	■	■	■		■		■	■	■
	<i>Jannaschia</i> sp.						■		■		■	■	
	<i>Roseomonas</i> sp.				■	■							
	<i>Methylobacterium</i> sp.			■	■		■						■
	<i>Fulvimarina</i> sp.										■	■	■
	<i>Brevundimonas</i> sp.							■	■	■			
	Uncultured bacterium clone NK2 638				■	■							
	Uncultured bacterium clone KSC2-58		■					■					
	Uncultured bacterium ANTLV1		■				■						■
	Uncultured endolithic bacterium				■		■						
beta- proteobacterie	<i>Herbaspirillum</i> sp.	■	■	■		■	■	■	■	■		■	
	<i>Variovorax</i> sp.		■				■						
	Uncultured Burkholderiaceae bacterium												■
gamma- proteobacteria	<i>Acinetobacter</i> sp.											■	
	<i>Haemophilus</i> sp.											■	
	<i>Petalonema</i> sp.					■		■				■	
	<i>Coleodesmidium</i> sp.											■	■
	<i>Pleurocapsa</i> sp.		■					■				■	
	uncultured cyanobacterium GASP-MBS1_G12		■	■	■	■	■	■		■	■	■	■
	uncultured cyanobacterium JSC8-C11											■	
	uncultured cyanobacterium CYANO1					■	■				■		■
Firmicutes	<i>Streptococcus</i> sp.						■						■
	<i>Granulicatella</i> sp.												■
<i>Deinococcus-Thermus</i>	<i>Deinococci</i> bacterium									■			
<i>Acidobacteria</i>	uncultured acidobacteria bacterium										■		

**Tableau IV-8 :** Présence ou absence des différentes bactéries identifiées sur les pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz. Les cases coloriées correspondent aux prélèvements (1 à 6) et à la face (R=recto, V=verso) sur lesquels le microorganisme a été identifié.

Après observation du Tableau IV-8, nous constatons une certaine évolution de la diversité des bactéries colonisant les pierres. Tout d'abord la face recto n'est colonisée au bout de 6 mois (premier prélèvement) que par des bactéries proches à 94% du genre *Herbaspirillum*. Ce n'est donc qu'au bout de 10 mois que les autres bactéries font leur apparition. Les cyanobactéries, en particulier la cyanobactérie non cultivée GASP-MBS1\_G12, semblent s'installer sur la pierre et la coloniser durablement. Les bactéries



appartenant au genre *Sphingomonas* ainsi que des bactéries apparentées à *Roseomonas*, et *Methylobacterium* colonisent la pierre au bout de 13 et 16 mois d'exposition.

En procédant par classes, les cyanobactéries sont présentes au bout de 10 mois, les alpha-protéobactéries colonisent la surface des pierres exposées au bout de 13 mois, et les beta-protéobactéries sont présentes dès le début.

Pour la face verso, la colonisation est plus précoce. *Herbaspirillum* est toujours présente dans les premiers temps d'exposition, mais également des cyanobactéries dont la cyanobactérie proche de « uncultured cyanobacterium GASP-MBS1\_G12 », et l'alpha-protéobactérie proche de *Brevundimonas*. La diversité en cyanobactéries augmente particulièrement au bout de 19 mois (5<sup>ème</sup> prélèvement). Tout comme sur la face recto, les *sphingomonas* sont présentes au bout de 10 mois d'exposition. Nous constatons l'apparition plus tardive de *Fulvimarina*. Des Gamma-protéobactéries ainsi que des *Firmicutes*, des *Deinococci* et des Acidobactéries font leur apparition ponctuellement, plutôt vers les derniers prélèvements.

Embranchement	genre	1R	2R	3R	4R	5R	6R	1V	2V	3V	4V	5V	6V
Chlorophyta	<i>Asterochloris</i> sp.												
	Uncultured <i>Trebouxia</i> photobiont												
	<i>Trebouxia</i> ( <i>Asterochloris</i> ) photobiont												
	<i>Chlorella</i> sp. chloroplast												
	<i>Chlorella</i> sp.												
	<i>Pseudochlorella</i> sp.												
	<i>Oedogonium</i> sp.												
Streptophyta	<i>Klebsormidium</i> sp. chloroplast												
	<i>Stichococcus</i> sp.												
	<i>Juniperus</i> sp. chloroplast												

**Tableau IV-9 :** Présence ou absence des différentes algues identifiées sur les pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz. Les cases coloriées correspondent aux prélèvements (1 à 6) et à la face (R=recto, V=verso) sur lesquels le microorganisme a été identifié.

Deux algues pionnières sont présentes constamment sur la pierre quelque soit la face (Tableau IV-9). Elles appartiennent au genre *Chlorella* et au genre *Pseudochlorella*.

*Stichococcus* et *Asterochloris* font leur apparition plus tardivement sur la face recto. Astérochloris est par contre présente dès le premier prélèvement sur la face verso. D'autres algues comme *Oedogonium* et *Stichococcus* sont présentes ponctuellement.

*Juniperus* n'est probablement pas un colonisateur de la pierre, mais plutôt une contamination par le pollen, car c'est un genévrier.

division	genre	1R	2R	3R	4R	5R	6R	1V	2V	3V	4V	5V	6V
Ascomycota	<i>Cladsporium</i> sp.	■	■					■					
	<i>Sarcinomyces</i> sp.	■	■										
	<i>Epicoccum</i> sp.	■	■	■	■	■							
	<i>Leptosphaerulina</i> sp.	■						■					
	<i>Altemaria</i> sp.	■		■				■	■				
	<i>Glomerella</i> sp.				■	■		■	■	■	■	■	■
	<i>Cyphellophora</i> sp.			■									
	<i>Beauveria</i> sp.											■	
	<i>Pringsheimia</i> sp.					■							
	<i>Caloplaca</i> sp.	■											
	Melanized limestone ascomycete CR-2004		■				■	■		■			
	<i>Coniosporium</i> sp.							■					
	Ascomycete sp.				■	■							
	Uncultured marine ascomycete LIF 17										■		
Basidiomycota	<i>Sporobolomyces</i> sp.							■	■		■	■	
	<i>Kandoa</i> sp.									■			

**Tableau IV-10 :** Présence ou absence des différents champignons identifiés sur les pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz. Les cases colorées correspondent aux prélèvements (1 à 6) et à la face (R=recto, V=verso) sur lesquels le microorganisme a été identifié.

Les champignons de type ascomycète sont largement détectés à la surface des pierres (Tableau IV-10). *Epicoccum* prédomine sur la face recto alors que *Glomerella* prédomine sur la face verso. Il faut également remarquer la colonisation de la face verso par des champignons Basidiomycètes qui ne se fait pas sur la face recto.

### 4.3.2- Représentativité des banques de clones

Dans cette partie, nous allons vérifier si les banques de clones sont représentatives de la diversité de chaque échantillon prélevé sur les pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz.

Ces vérifications se font à l'aide des indices de Chao1 et de recouvrement, ainsi qu'avec les courbes de raréfaction.

Les courbes de raréfaction permettent d'évaluer la qualité de l'échantillonnage par rapport à la diversité réelle présente dans l'environnement considéré et représentent le nombre de profils identiques regroupés (UTOs = unités taxonomiques opérationnelles) ou espèces identifiées en fonction du nombre de séquences d'ADNr analysés. En principe, lorsque celles-ci arrivent à une asymptote horizontale, le nombre d'espèces ou UTOs maximum est atteint et aucune information supplémentaire ne peut être tirée d'un échantillonnage supérieur.

Ces méthodes de quantification de la diversité spécifique des communautés bactériennes se basent en complément sur des estimations à partir des données d'échantillonnage. Nous avons décidé d'appliquer les méthodes non-paramétriques car elles estiment la richesse spécifique (nombre d'UTO total) d'un échantillon environnemental de petite taille sans supposer de modèles d'abondance particuliers (Hughes *et al.*, 2001). Ces approches considèrent la proportion des UTOs observés plus d'une fois par rapport à celle des UTOs observés une seule fois. Ainsi, dans un échantillon présentant une grande richesse spécifique (nombre élevé d'UTOs), la probabilité de détecter une UTO plus d'une fois sera faible. Actuellement les deux méthodes non-paramétriques les plus utilisées sont l'estimateur de Chao1 et ACE (Abundance-based Coverage Estimators) (Chao, 1984; Hughes *et al.*, 2001).

Pour chaque pierre et chaque face, le nombre de clone par phylotypes est relevé, afin ensuite de calculer l'indice de Chao1 et de construire les courbes de raréfaction. L'indice de recouvrement est également calculé. Le Tableau IV-11 suivant et les annexes 6 à 17 regroupent ces analyses.

*IV – Travaux expérimentaux : Processus de colonisation de la pierre calcaire d'Angoulême  
exposée aux embruns marins*

	Face	Recto						Verso					
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T1	T2	T3	T4	T5	T6
ADNr 16S	Echantillon prélevé	1	7	5	9	12	11	10	5	6	10	18	13
	Nombre d'espèces	1	7	5	9	12	11	10	5	6	10	18	13
	Indice de Chao1	/	10	5	11	13,6	18,3	10,1	5,2	6,1	13,3	29,8	16
	Recouvrement (Good's C)	/	0,80	0,97	0,86	0,89	0,72	0,99	0,90	0,94	0,83	0,73	0,74
ITS	Nombre d'espèces	13	8	8	9	12	5	11	8	7	6	9	6
	Indice de Chao1	9	8	8	13,1	20,3	5	11	8,1	14	6,4	9	6
	Recouvrement (Good's C)	1	0,99	0,93	0,74	0,75	1	0,99	0,96	0,54	0,99	1	1

**Tableau IV-11** : Diversité et indices de Chao1 de chaque banques de clones pour les ADNr 16S et ITS de chaque prélèvement et chaque face des pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz.

Dans l'ensemble, les courbes de raréfaction approchent ou atteignent le plateau, de plus les indices de Chao1 sont avoisinants des nombres d'espèces identifiées. Cela montre que le nombre de clones analysé est suffisant pour estimer la diversité de chaque échantillon.

## 5- Discussion

### 5.1- Processus de colonisation

Le biofouling, ou la colonisation et la formation d'un biofilm sur une interface, va suivre une succession ordonnée d'étapes. Tout d'abord les bactéries pionnières vont interagir avec la surface pour ensuite y adhérer de façon irréversible. Cette adhésion irréversible va permettre la croissance et la maturation du biofilm, ainsi que l'arrivée de nouveaux microorganismes. Les microorganismes pionniers sont donc très importants dans l'étude de la colonisation de surfaces.

Au cours des 22 mois d'exposition des pierres calcaires d'Angoulême sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz, nous avons observé une colonisation de celle-ci par des microorganismes divers.

Bien que le nombre d'espèces présentes sur les pierres ait augmenté au cours du temps, le nombre de microorganismes présent est faible (entre  $10^1$  et  $10^4$  UFC/cm<sup>2</sup> pour les microorganismes cultivables, alors que pour une canalisation d'eau potable la colonisation de la surface peut atteindre en quelques jours  $10^6$ - $10^8$  UFC/cm<sup>2</sup>). Cependant cette observation se comprend, car la surface de la pierre est un environnement défavorable à la croissance des microorganismes. Pitzurra *et al.* (2003) ont étudié la croissance microbienne sur des plaques de verre dans un environnement pollué, et ils observent une contamination significative au bout de 5 mois d'exposition, avec 5 UFC/cm<sup>2</sup>, et 150 UFC/cm<sup>2</sup> au bout de 12 mois. Les plaques de verre sont des surfaces plus difficiles à coloniser par les microorganismes que les pierres, c'est pourquoi nous comptabilisons plus d'UFC/cm<sup>2</sup> sur nos pierres.

Comme nous pouvions nous y attendre, une certaine variabilité du nombre de microorganismes est observée en fonction des saisons, en particulier une baisse du nombre d'individus mais aussi des espèces en hiver (prélèvements 2, 3 et 6). Tayler et May (1991) avaient également observé une variation saisonnière du nombre et du type de microorganismes sur des pierres en grès au Sud de l'Angleterre. Cette variation était due aux variations de températures et d'humidité durant l'année. Dans notre cas, deux facteurs peuvent influencer cette variation, le plus probable est la température, mais l'apport en sels par les embruns plus fort en hiver (jusqu'à 2400 Cl/cm<sup>2</sup>/j.) peut également avoir une influence.

Lorsque nous observons l'état physico-chimique de la pierre, nous ne constatons aucun changement significatif, à part la diminution de la porosité et une coloration. Pitzura *et al.* (2003) n'avaient également observé aucun changement des lames de verres après 1 an d'exposition dans un environnement pollué. 22 mois d'exposition s'avère trop court pour qu'il puisse y avoir une détérioration ou biodétérioration physique ou chimique de la pierre. La baisse de la porosité pourrait s'expliquer par la présence des microorganismes qui boucheraient les capillaires et micro-pores lors de la formation du biofilm.

Tout comme il est suggéré dans la littérature (Warscheid et Braams, 2000), les microorganismes semblent coloniser la pierre d'Angoulême exposée sur la terrasse du musée de la mer suivant une succession biologique. Dans un environnement peu pollué, les microorganismes pionniers seraient les phototrophes, puis ensuite viendraient les hétérotrophes.

Dans notre cas, les colonisateurs pionniers semblent effectivement les phototrophes. Les algues sont présentes dès les 6 premiers mois d'exposition, en particulier *Chlorella* sp. et *Pseudochlorella* sp., qui probablement forment des lichens par association symbiotique avec les champignons, identifiés également en début de colonisation. D'autres algues comme *Asterochloris* et *Stichococcus* vont venir coloniser la pierre plus tardivement.

Les cyanobactéries sont les seconds colonisateurs phototrophes. Ils sont présents au bout de 10 mois d'exposition sur la face recto et dès six mois sur la face verso.

La colonisation des pierres par les microorganismes non phototrophes est plus tardive, en particulier sur la face recto. Seule la bactérie proche du genre *Herbaspirillum* est rencontrée dès les 6 mois d'exposition sur la face recto des pierres exposées. Les bactéries non phototrophes sont majoritairement représentées par le genre *Sphingomonas* appartenant à la sous-classe des alpha-protéobactéries. Ces microorganismes colonisent les pierres au bout de 13 mois d'exposition pour la face recto, et 10 mois pour la face verso. *Methylobacterium* et *Roseomonas* vont également coloniser les pierres à partir du 13<sup>ème</sup> mois, et les *gamma-proteobacteria*, *Deinococci* et *Bacilli* vont faire leur apparition plus tardivement.

Des champignons sont également détectés. L'espèce *Epicoccum nigrum* est le colonisateur champignon majeur détecté sur la face recto, et *Glomerella* sp. est le champignon majeur de la face verso.

Quant aux microorganismes observés ponctuellement, ils ont soit été déposés par les embruns ou l'air (comme *Juniperus*), mais ne colonisent pas réellement la pierre, soit ils sont

colonisateurs que d'une seule pierre exposée et prélevée, et donc ne sont détectés qu'une seule fois.

Aucune étude sur le suivi de la colonisation des pierres en environnement marin dans les premières années d'exposition n'a été réalisée. Cependant le suivi de la colonisation bactérienne de surfaces inertes immergées dans l'eau de mer a déjà été réalisé. Il a été observé que les premiers colonisateurs sont des protéobactéries appartenant aux sous-classes alpha, bêta et gamma, avec une majorité de gamma au tout début de la colonisation. Les gamma-protéobactéries sont ensuite rapidement remplacées par les alpha-protéobactéries qui deviennent ainsi le groupe majoritaire (Dang et Lovell, 2000; Grasland *et al.*, 2003). La division des *Cytophaga-Flexibacter* et les *Firmicutes* sont présents dans une moindre mesure.

D'autre part, Shresta *et al.* (2007), dans une étude sur 70 jours de la colonisation par des microorganismes du sol de rhizosphère montre que les beta-protéobactéries et les gamma-protéobactéries sont présents au début de la colonisation, alors que les alpha-protéobactéries et les actinomycètes ne colonisent que plus tard le sol.

Nos résultats adhèrent partiellement à ces observations. En effet, nous avons observé un nombre de clones et d'espèces d'alpha-protéobactéries par prélèvements de plus en plus grand, en particulier sur la face recto. Les alpha-protéobactéries ne seraient pas les colonisateurs pionniers, cependant ils sont présents tôt lors de la colonisation de la pierre et sembleraient devenir le groupe bactérien majoritaire.

Il est établi que l'orientation et/ou l'exposition d'une pierre influence la colonisation de celle-ci (Warscheid et Braams, 2000). Mottershead *et al.* (2003) ont étudié deux façades d'un château en Ecosse, l'une exposée aux embruns marins mais orientée au nord, et l'autre à l'opposé, orientée au sud. Visuellement, il est clair que la façade sud très exposée à l'ensoleillement est moins colonisée que la façade nord, plus ombragée, où un biofilm homogène majoritairement constitué d'algues est installé.

Nos résultats sont en accord avec ces observations puisque la face verso moins exposée abrite des microorganismes moins résistants comme les champignons basidiomycètes. Nous constatons également d'autres différences de colonisation entre les deux faces. Les espèces de *gamma-proteobacteria*, *Deinococci*, et *Baccilli* ne sont détectées que sur la face verso. D'autre part nous observons que le nombre d'espèces sur la face recto montre une plus grande variabilité que sur la face verso. Cela s'explique par le fait que la face

verso est moins balayée par le vent, la pluie et les embruns et donc les microorganismes se détachent moins facilement que sur la face recto.

## 5.2- Considérations sur les microorganismes identifiés

Les pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz subissent des dépôts de sels apportés par les embruns marins. Nous pouvons donc supposer que certains microorganismes qui vont se développer à la surface sont spécifiques des environnements marins.

C'est le cas, les bactéries phototrophes aérobies anoxygéniques (*Jannashia*), « uncultured marine ascomycete » et *Halomonas* sont connues pour se développer dans ce type d'environnement. Paradoxalement, ces microorganismes spécifiques de l'environnement marin sont peut nombreux à la surface des pierres. Cela peut s'expliquer par le fait que les pierres ne sont pas immergées dans l'eau et ne sont qu'exposées aux embruns. Ceux-ci déposent des sels à la surface des pierres qui sont rapidement lessivés par les pluies ; en effet nous n'identifions pas de sels à la surface des pierres. Cependant la majorité des microorganismes présents sont capables de résister à certaines concentrations en sels, en particulier les cyanobactéries.

Les résultats offrent également d'autres observations. En effet, tous les microorganismes présents sont capables de se développer dans des milieux oligotrophes et sont donc adaptés au support qu'est la pierre.

La majorité des microorganismes isolés et identifiés par microbiologie classique des pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz, a déjà été abondamment identifiée sur d'autres façades en pierre, des peintures murales et des vitraux d'églises (de la Torre *et al.*, 1993; Flores *et al.*, 1997; Heyrman *et al.*, 1999; Kurakov *et al.*, 1999; Gurtner *et al.*, 2000; Gaylarde *et al.*, 2001; Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2001b; Gorbushina *et al.*, 2004; Herrera et Videla, 2004; Radaelli *et al.*, 2004; Kiel et Gaylarde, 2006). Cela s'explique par le fait que ces microorganismes sont en majorité ubiquistes et que la microbiologie classique a été abondamment utilisée jusqu'à présent pour identifier les microorganismes présents sur les façades de monuments. D'ailleurs ces microorganismes (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Alternaria*..) ont été souvent décrits comme microorganismes majeurs des surfaces en pierre. Cependant, le



développement des techniques de biologie moléculaire qui ne sont que récemment employées sur la pierre, change ces observations, et il n'est plus sûr que ces microorganismes cultivables soient prédominants dans les biofilms se développant sur des pierres.

Certains des microorganismes identifiés par biologie moléculaire ont déjà été identifiés sur des façades en pierre. La cyanobactérie *Pleurocapsa* a été distinguée comme colonisateur abondant des zones de pierres calcaires de la côte soumises aux stress thermiques et de dessiccation (Ortega-Morales *et al.*, 2005). De plus *Pleurocapsa* est l'ordre principal isolé de la façade de l'église de Porto Alegre (Crispim *et al.*, 2004), qui est soumise à un climat sub-tropical (fortes chaleurs en été et forte humidité toute l'année).

*Chlorella* est une algue fréquemment rencontrée sur des façades (Gaylarde et Gaylarde, 2000; Tomaselli *et al.*, 2000; Crispim *et al.*, 2004; Uher *et al.*, 2005), artificielles (peintures, plastique), calcaires et siliceuses (Tomaselli *et al.*, 2000). *Chlorella* et *Trebouxia* sont les uniques algues trouvées sur des surfaces peintes en Inde (Gaylarde et Morton, 1999). Il faut savoir que les chlorophytes identifiés, *Chlorella*, *Trebouxia* et *Asterochloris* sont connus pour former des associations lichéneuses (de Reviers, 2003). D'ailleurs, les algues identifiées proches de « uncultured *Trebouxia* photobiont » et « *Trebouxia* (*Asterochloris*) photobiont » confirment que la majorité des algues identifiées sur les pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer sont probablement des lichens.

Les champignons ascomycètes sont connus pour être colonisateurs des pierres (Warscheid et Braams, 2000). La plupart des genres identifiés sur les pierres exposées ont déjà été identifiés sur des supports en pierres, des peintures murales et autres (Spatafora *et al.*, 1995; Gaylarde *et al.*, 2001; Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2001b; Suihko *et al.*, 2007).

La présence de basidiomycètes est moins fréquente sur les pierres. Ces champignons sont connus pour se développer uniquement dans des environnements favorables, c'est pourquoi nous ne les identifions que sur la face verso des pierres, qui sont plus abritées que la face recto.

La présence des alpha-protéobactéries n'est pas étonnante sur la pierre. D'ailleurs cette sous-classe est la sous-classe dominante identifiée lors de la colonisation de surfaces immergées dans l'eau de mer (Dang *et al.*, 2008). Le genre *Sphingomonas* qui est l'alpha-protéobactérie la plus rencontrée sur les pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de

Biarritz, est parfaitement capable de croître dans des milieux pauvres en nutriments (Pinhassi *et al.*, 1997; Moissl *et al.*, 2007).

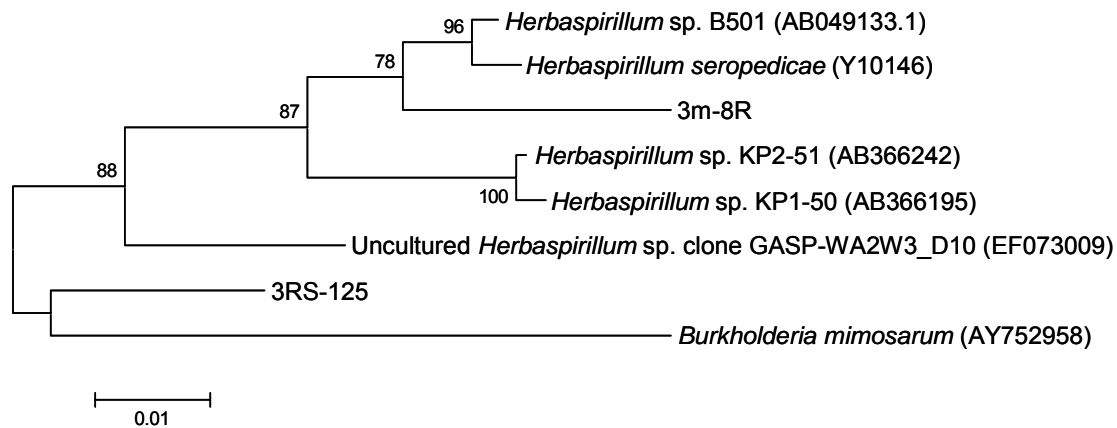
Certaines pierres présentaient des colorations rosées. Cela peut provenir des bactéries identifiées proches de *Methylobacterium*, *Roseomonas* et de la bactérie phototrophe anoxygénique *Jannaschia*, qui sont pigmentées de rose. Ces genres sont fréquemment rencontrés dans des environnements oligotrophes, et sont communs dans l'environnement (Dworkin *et al.*, 2006; Moissl *et al.*, 2007).

La présence de gamma-protéobactérie et de *Firmicutes* plus tardive se comprend, car ces microorganismes sont des hétérotrophes stricts et nécessitent des sources de carbone organique pour leur croissance, qui probablement est apporté par les microorganismes phototrophes.

La présence de *Deinococci* se comprend parfaitement, en effet il est connu pour résister à la dessiccation et aux fortes radiations ionisantes (Dworkin *et al.*, 2006; Moissl *et al.*, 2007).

*Herbaspirillum* est une bactérie fixatrice d'azote, connue pour se développer dans la rhizosphère de graminées (Baldani *et al.*, 1986; Dworkin *et al.*, 2006). Le genre *Herbaspirillum* s'est récemment agrandi avec l'apparition de nouvelles espèces non dépendantes des plantes et notamment très récemment il a été découvert par Lu *et al.* (2008) des espèces d'*Herbaspirillum* capables de se développer sur de la roche volcanique jeune, dépourvue de matière organique. Cette souche d'*Herbaspirillum* chimio-litho-autotrophe facultative semblerait tirer son énergie de l'oxydation du dihydrogène.

En construisant un arbre phylogénétique (Figure IV-20) et en comparant la séquence de notre clone proche du genre *Herbaspirillum* (3RS-125) avec les séquences des deux souches découvertes par Lu *et al.* (2008) (*Herbaspirillum* sp. KP2-50 et KP2-51), nous constatons que ces espèces sont différentes, mais relativement proches, car elles présentent 94% d'homologie de séquence au niveau de leurs gènes codant pour l'ARNr 16S. Notre clone est également différent des autres souches d'*Herbaspirillum* existant dans la base de donnée du BLAST. Nous pouvons donc supposer que notre ce proche d'*Herbaspirillum* identifié par biologie moléculaire à partir de pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz est probablement une nouvelle espèce d'*Herbaspirillum* chimio-litho-autotrophe facultative.



**Figure IV-20 :** Arbre montrant les affiliations phylogénétiques du gène codant pour l'ARNr 16S partiel (608 pb) du clone et de la souche proches du genre *Herbaspirillum*. La barre d'échelle représente 0,01 substitutions par sites.

Nous avons également isolé une souche proche d'*Herbaspirillum* par microbiologie classique nommée 3m-8R (cf. chapitre IV-3). Cette souche est différente du clone identifié par biologie moléculaire (Figure IV-20), cependant elle est également relativement proche des souches isolées par Lu *et al.* (2008) (94% d'identité de séquence). Cette souche va nous permettre de vérifier si cette nouvelle espèce est autotrophe, en s'assurant de la présence du gène codant pour la Rubisco dans son génome, comme il a été décrit pour la souche isolée par Lu *et al.* (2008).

Lorsque nous regardons dans la littérature les études réalisées sur les oxydateurs de dihydrogène, nous constatons que la croissance de ces microorganismes est toujours réalisée sous des conditions atmosphériques synthétiques contenant au minimum 80% de dihydrogène (Drobner *et al.*, 1990; Beffa *et al.*, 1995; Yoon *et al.*, 2008). Il faut aussi noter que le dihydrogène est sous forme de trace dans l'air (0,5 ppm) (Rahn *et al.*, 2002). Ces observations nous ont amené à nous poser la question : comment fait notre espèce d'*Herbaspirillum* pour coloniser la pierre si précocement ?

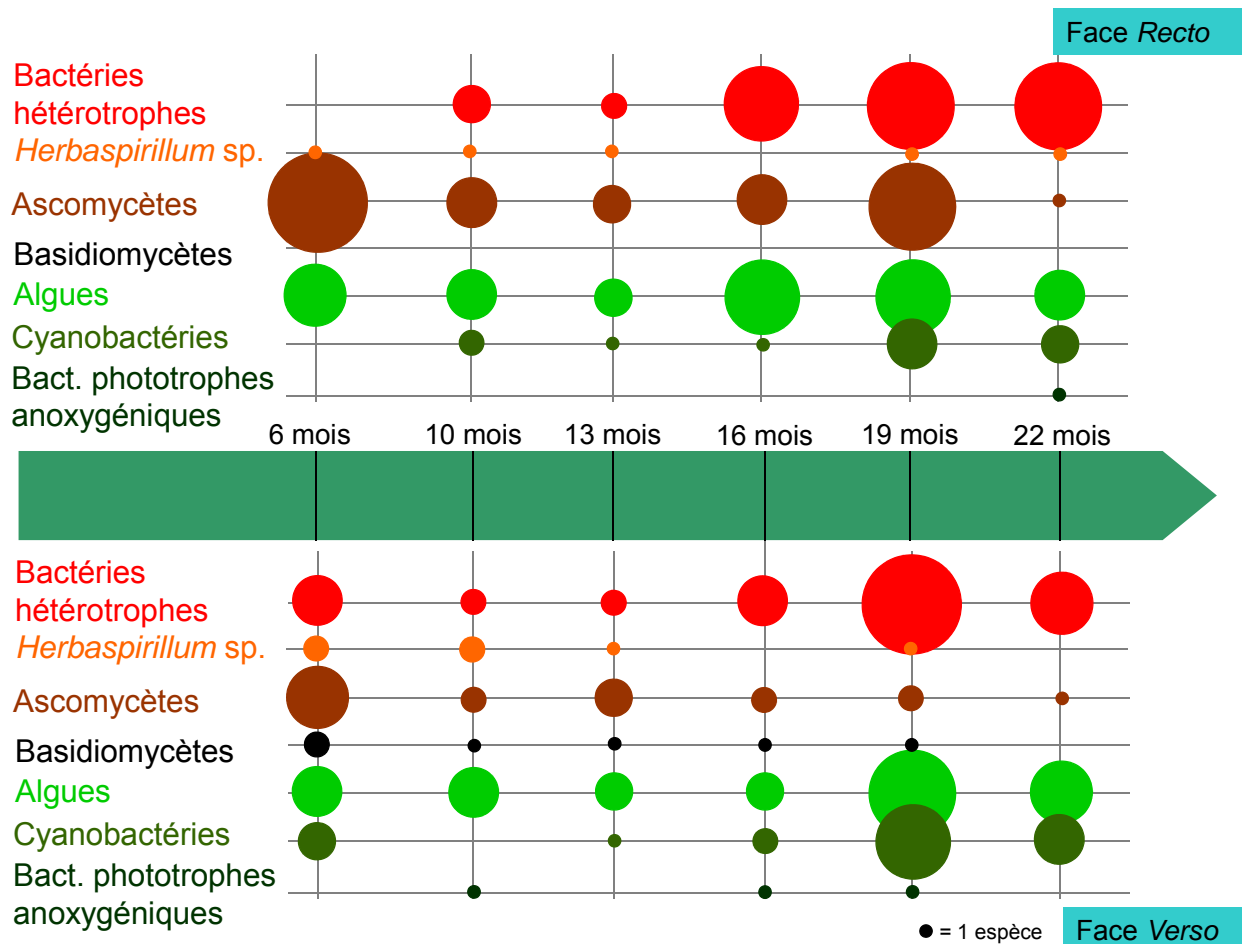
Trois hypothèses peuvent répondre à cette question : 1) la souche d'*Herbaspirillum* isolée utilise effectivement l'hydrogène de l'air comme source d'énergie. Dans ce cas, sa croissance serait très faible voire nulle, mais l'énergie récupérée par oxydation du dihydrogène assurerait son maintien (Morita, 2000) ; 2) notre souche étant chimio-litho-autotrophe facultative, elle pourrait adopter un mode de croissance hétérotrophe. Se pose alors la question de l'origine des composés carbonés. Soit ils seraient apportés par l'air ou l'eau de mer, et dans ce cas le microorganisme, tout comme dans l'hypothèse 1, aurait une croissance

ralentie voire nulle, soit sa colonisation de la pierre se fait en même temps que d'autres microorganismes comme les algues, et il bénéficierait de composés carbonés produits par ces microorganismes ; 3) notre souche utilise sa faculté de développement chimio-litho-autotrophes et utilise l'hydrogène produit par d'autres microorganismes présents sur la pierre. Parmi les microorganismes présents aux premiers stades de colonisation des pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer, seuls les algues sont capables de produire du dihydrogène (Asada et Miyake, 1999; Melis, 2007; Jeong *et al.*, 2008).

## Conclusion

Les pierres d'Angoulême exposées sur la terrasse du musée de la mer semblent être colonisées par une succession biologique (Figure IV-21). Cette succession biologique est plus marquée sur la face recto des pierres.

Les premiers colonisateurs sont des algues et des champignons probablement associés sous forme de lichen, et qui utilisent l'énergie lumineuse pour leur croissance. Une espèce d'*Herbaspirillum* dotée d'un métabolisme chimio-litho-autotrophe facultatif est également colonisatrice pionnière. Les cyanobactéries ne s'installent que plus tard et les bactéries chimio-hétérotrophes, en particulier les alpha-protéobactéries, colonisent en dernier les pierres.



**Figure IV-21** : Evolution de la biodiversité microbienne à la surface des pierres calcaires d'Angoulême exposées 22 mois aux embruns marins de Biarritz.

L'orientation des pierres va influencer la colonisation des deux faces. En effet, nous constatons une différence du processus de colonisation, en fonction de l'exposition des pierres. Un tel effet a déjà été observé par Mottershead *et al.* (2003) et Suihko *et al.* (2007). D'autre part, nous observons spécifiquement des microorganismes adaptés aux conditions drastiques sur la face recto des pierres, alors que des microorganismes ne tolérant que des conditions favorables sont identifiés uniquement sur la face verso.

Cette colonisation ne semble pas avoir de conséquence sur la structure physico-chimique des pierres, sauf une baisse de la porosité. Une pierre peu poreuse permet une moins grande rétention d'eau. Or l'eau est le facteur le plus important dans les processus de détérioration, car il véhicule au sein des pores de la pierre les réactions chimiques de dissolution, ou permet la cristallisation des sels plus ou moins profondément dans la pierre, entraînant sa destruction. La réduction de la porosité par l'installation des microorganismes sur la pierre pourrait ainsi réduire ces phénomènes et avoir une action protectrice. Cependant, les microorganismes ne sont pas inertes et peuvent eux-mêmes détériorer la pierre. Le rapport entre la protection et la destruction de la pierre par les microorganismes n'est pas connu. Il a été néanmoins observé que dans des environnements où la détérioration non biologique est très intense, les processus de biodétérioration sont bien plus lents, et ainsi, les microorganismes réduiraient, en formant un biofilm à la surface de la pierre, la vitesse de détérioration de la pierre et auraient donc un effet protecteur sur la pierre (Adamo et Violante, 2000; Carballal *et al.*, 2001; Mottershead *et al.*, 2003).

## Conclusion générale et perspectives

---

### ***Etude de biofilms s'étant développés sur deux supports en pierre différents en environnement marin***

Sur le littoral du golfe de Gascogne, plusieurs types de pierres ont été employés pour la construction. Nous avons choisi deux types de pierre les plus fréquentes sur le littoral et présentant une fragilité et une forte dégradation dans cet environnement. Ce sont la pierre calcaire d'Angoulême et le grès d'Igueldo.

Dans la première partie de cette thèse, nous avons cherché à comprendre quels processus de dégradation interviennent sur ces pierres, et également à déterminer les microorganismes qui se sont développés sous forme de biofilm à la surface de ces pierres.

Nous avons pu déterminer un type de détérioration chimique dont l'environnement marin est responsable. La pierre calcaire d'Angoulême peut avoir toute sa matrice affectée par les sels, entraînant sa dissolution progressive, alors que dans le cas du grès d'Igueldo, ce sont les différents oxydes métalliques présents en faible quantité dans la matrice qui seront dissous, entraînant la dislocation de la pierre.

Afin de comprendre les processus de biodétérioration, il faut en premier lieu commencer par connaître les microorganismes responsables. La recherche des microorganismes présents sur les pierres est récente, et les méthodes de microbiologie classique ont été les méthodes les plus employées jusqu'à ce jour. Cependant la croissance des microorganismes sur des milieux synthétiques ne permet d'identifier que les microorganismes cultivables. Pour s'affranchir de ce problème, les techniques de biologie moléculaire se sont récemment développées, mais ont été peu employées sur la pierre, et jamais pour détecter à la fois les microorganismes eucaryotes et procaryotes (bactéries, champignons et algues).

C'est pourquoi dans la première partie de cette thèse, nous avons développé une méthode répétable et efficace pour identifier tous les microorganismes se développant sur des façades en pierre. Cette technique est basée sur l'étude du polymorphisme de la communauté grâce aux techniques de clonage et RFLP. Elle a été éprouvée sur deux biofilms s'étant développés sur une façade en pierre calcaire d'Angoulême présente à Biarritz, et la façade de la mairie de St-Sébastien (Espagne) qui elle, est en grès d'Igueldo. La méthode s'est montrée parfaitement adaptée et efficace. Elle nous a permis de bien différencier les deux biofilms étudiés, montrant une présence dominante des cyanobactéries dans le biofilm développé sur le

grès d'Igueldo et une majorité d'alpha-protéobactéries présentes dans le biofilm développé sur le calcaire d'Angoulême. Elle nous a également permis de révéler tous les types de microorganismes connus pour se développer sur des façades en pierre, même ceux connus pour être difficiles à détecter par biologie moléculaire, comme les bactéries gram+ qui ont leur paroi épaisse qui ne se lysent pas facilement lors de l'étape de l'extraction de l'ADN.

Nous avons pu constater que tous les microorganismes présents à la surface des pierres sont parfaitement adaptés aux conditions environnementales (embruns, exposition aux UV). D'autre part, les deux biofilms sont différents visuellement, le biofilm de la Villa Isabel présente une coloration rouge, alors que le biofilm de la mairie de St-Sébastien présente une coloration vert-noire. Nous avons pu conclure que la coloration rouge du biofilm de la Villa Isabel provient vraisemblablement d'une bactérie connue pour provoquer des colorations rouges sur des peintures murales, *Rubrobacter* (Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2001c; Imperi *et al.*, 2007), alors que la coloration vert-noire du biofilm de St-Sébastien provient des cyanobactéries présentes en grande quantité ainsi que des champignons possédant des pigments de mélanine noirs.

L'identification phylogénétique des microorganismes ayant colonisé le grès d'Igueldo et le calcaire d'Angoulême auraient pu nous renseigner sur une éventuelle influence du support sur la colonisation. Cependant cette influence n'est pas évidente à établir. En effet, plusieurs paramètres entrent en compte lors de la colonisation d'une pierre : l'environnement, l'exposition, la composition chimique du support, la porosité du support....

La pierre d'Angoulême est calcaire et donc est essentiellement composée de  $\text{CaCO}_3$  et le grès d'Igueldo est siliceux avec 94% de  $\text{SiO}_2$ . Une étude de Tomaselli *et al.* (2000) a montré une préférence des cyanobactéries filamenteuses pour les supports siliceux et des cyanobactéries unicellulaires pour les supports calcaires. Dans notre cas il est difficile d'établir si les cyanobactéries sont filamenteuses ou non, la plupart étant non cultivées, donc nous ne connaissons pas leur morphologie. Des observations au microscope des biofilms pourraient confirmer ou non cette hypothèse. D'autre part, le biofilm présent sur la Villa Isabel est essentiellement composé d'alpha-protéobactéries. Nous pouvons émettre l'hypothèse que le substrat calcaire favorise la colonisation des alpha-protéobactéries. D'ailleurs, MacNamara *et al.* (2006) observent que les biofilms épilitiques de monuments Mayas en calcaire sont composés de plus de 50% de bactéries alpha-protéobactéries. Pour réellement déterminer si le support a une influence sur la colonisation, il faudrait réaliser des analyses sur les deux pierres, mais présentes au même endroit et exposées de la même façon.



En effet nous ne pouvons pas établir si c'est la distance géographique ou la composition chimique des pierres qui a influencé la colonisation des deux supports.

### ***Etude des premiers stades de la colonisation de la pierre calcaire d'Angoulême exposée aux embruns***

Avant d'arriver à leur stade de développement actuel, les biofilms de la Villa Isabel et de St-Sébastien ont suivi une succession d'étapes de colonisation. En effet, au tout début de la colonisation des pierres, des microorganismes pionniers ont dû adhérer au support, se développer puis permettre la venue de nouveaux microorganismes et la croissance du biofilm. La connaissance des microorganismes pionniers est donc primordiale si nous voulons lutter contre la formation de biofilms à la surface des pierres.

Nous nous sommes intéressés aux premiers stades de la colonisation de la pierre d'Angoulême exposée sur la terrasse du musée de la mer à Biarritz. A chaque prélèvement, la détection des microorganismes s'est faite à l'aide de la méthode moléculaire développée dans la première partie, ainsi que par culture sur milieux sélectifs. Cependant cette deuxième méthode ne permet pas d'identifier les microorganismes non cultivables et offre sûrement une représentation faussée de la communauté microbienne, avec probablement la mise en évidence de microorganismes présents en très faible quantité dans le biofilm et ne jouant probablement pas de rôle dans la communauté (par exemple *Bacillus* et *Pseudomonas* sont capables de former des spores et peuvent être présents en état de dormance).

Dès les premiers prélèvements, au bout de 6 mois d'exposition, nous avons constaté que les faces des pierres étaient colonisées différemment. Nous nous sommes intéressés à ces différences. Nous avons constaté que la face verso est plus vite colonisée que la face recto, et que certains microorganismes ont une préférence pour croître sur une face plutôt que sur l'autre. Ces résultats sont parfaitement compréhensibles puisque la face verso des pierres est plus abritée, en particulier vis-à-vis du vent et des radiations solaires, et représente un environnement moins drastique que celui de la face recto.

Lorsque nous regardons la colonisation dans le temps, nous constatons qu'elle se fait suivant les étapes classiques de colonisation d'une pierre en environnement peu pollué (Warscheid et Braams, 2000) : les phototrophes sont les pionniers et conditionnent la surface pour l'arrivée dans une deuxième phase des hétérotrophes. La présence des lichens, confirme

d'ailleurs que l'air est relativement pur, car ils sont connus pour être incapables de se développer dans des environnements pollués (Gorbushina, 2007).

Parmi les microorganismes pionniers, nous avons identifié des algues et des champignons qui forment probablement des lichens, des cyanobactéries et une espèce bactérienne appartenant au genre *Herbaspirillum*. Nous constatons par ailleurs que la sous-classe des *alpha-proteobacteria* devient le groupe de microorganismes hétérotrophes majoritaire.

La nouveauté apportée par ces études est la découverte d'une nouvelle espèce pionnière. En effet, dès le premier prélèvement, sur la face recto, nous avons identifié une espèce proche du genre *Herbaspirillum*. Ce genre, habituellement connu pour se développer dans la rhizosphère de plante a été également identifiée par Lu *et al.* (2008) sur de la roche volcanique. Ils ont montré que leur souche est capable de croître en chimio-litho-autotrophie. Le clone que nous avons identifié et la souche bactérienne que nous avons isolée sont tous deux relativement proches phylogénétiquement des souches isolées par Lu *et al.* (2008). Nous avons donc supposé que l'espèce proche d'*Herbaspirillum* que nous avons identifiée a elle aussi une croissance chimio-litho-autotrophe facultative, permettant sa présence en début de colonisation des pierres. Cependant, nous ne savons toujours pas quel type de métabolisme elle utilise pour s'installer sur la pierre.

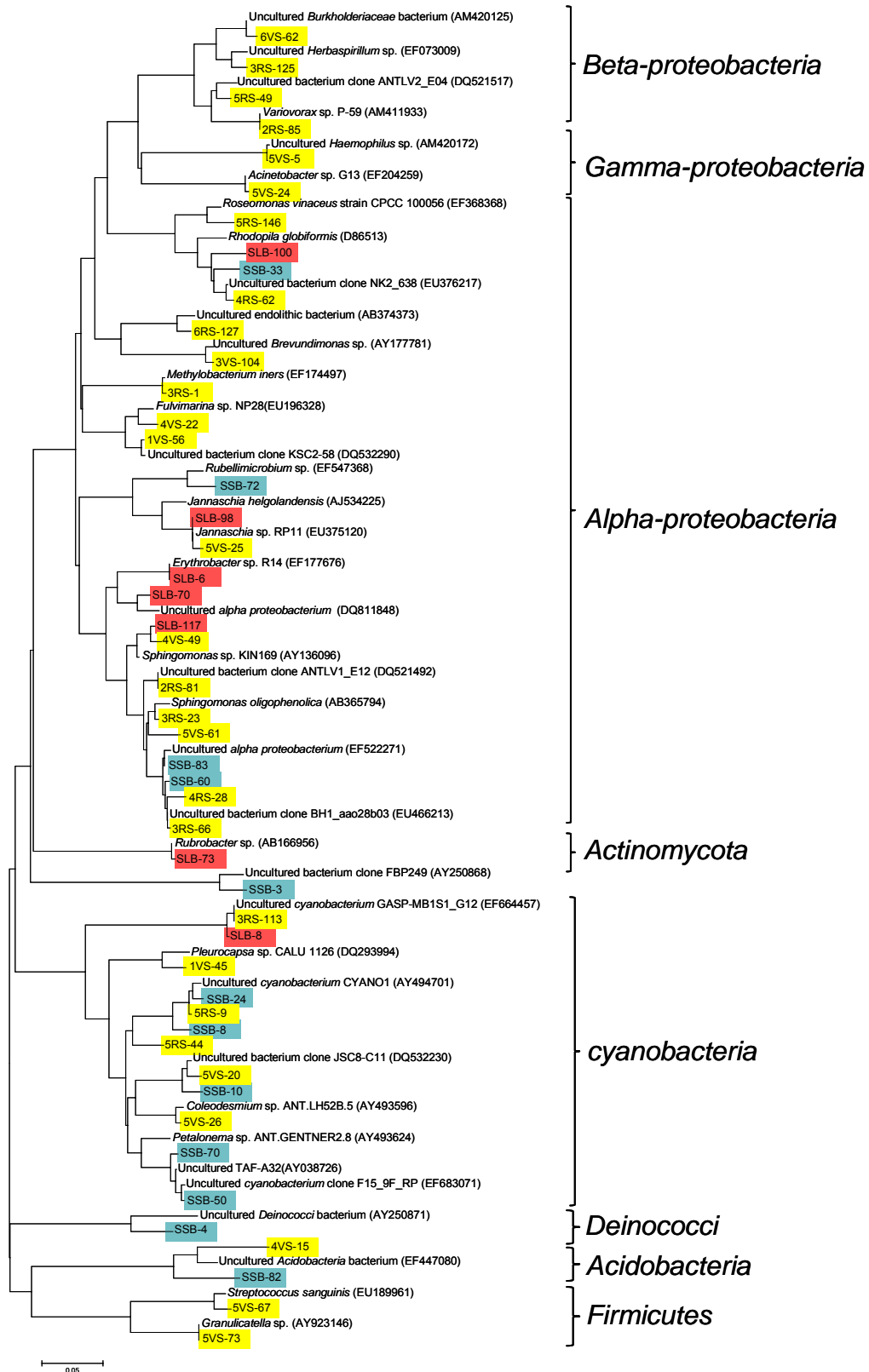
Lorsque nous regardons en détail la structure et la composition physico-chimique des pierres exposées, nous constatons qu'aucune modification due au phénomène de détérioration ou biodétérioration ne fait son apparition lors des 22 mois d'exposition, sauf esthétique (coloration de la pierre). Presque deux ans d'exposition de pierres calcaires d'Angoulême aux embruns est une échelle de temps trop courte pour qu'il y ait détérioration. Par contre nous constatons une baisse de la porosité de surface. Ce phénomène est probablement dû à la présence des microorganismes qui colonisent les pierres, et qui, en formant les biofilms, vont boucher les micropores et les capillaires.

### ***Comparaison phylogénétique des trois biofilms étudiés***

L'utilisation de la méthode de biologie moléculaire mise au point pendant la thèse pour identifier les microorganismes se développant sur des pierres s'est montrée efficace pour identifier des microorganismes présents dans les premières années de la colonisation de la pierre. Afin de mettre en évidence des relations phylogénétiques qui pourraient avoir lieu entre les bactéries présentes sur les trois sites, un arbre phylogénétique contenant les différentes séquences des microorganismes identifiés ainsi que les séquences des microorganismes les plus proches fournies par le BLAST, a été construit (Figure A). Pour une meilleure visualisation, les clones appartenant à chaque site sont représentés par des couleurs différentes.

L'observation de l'arbre confirme les premières déductions, le biofilm de la Villa Isabel est essentiellement composé d'alpha-protéobactéries, alors que le biofilm s'étant développé sur la façade de la mairie de St-Sébastien a pour bactéries dominantes les cyanobactéries.

La comparaison des trois sites montre que le biofilm de la Villa Isabel est totalement différent du biofilm de la mairie de St-Sébastien, cependant tous deux présentent des ressemblances avec les microorganismes présents sur les pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz. Le biofilm de la mairie de St-Sébastien présente des similarités parmi les cyanobactéries alors que le biofilm de la Villa Isabel présente certaines ressemblances au niveau des alpha-protéobactéries. Les différences et homologies entre les trois sites peuvent s'expliquer par plusieurs hypothèses : 1) l'emplacement géographique entre St-Sébastien et Biarritz. Ils sont distants de 50 km, ce qui expliquerait les différences entre les deux biofilms, mais tous deux sont exposés aux embruns de l'océan Atlantique qui peuvent déposer sur les pierres les mêmes types de microorganismes ; 2) les supports sont différents et peut-être existe-t-il une préférence de certains microorganismes pour un substrat particulier ; 3) les trois sites étudiés sont colonisés par des biofilms d'âges différents et démontrent une relation entre la diversité et l'âge du biofilm. Il semble que les bactéries hétérotrophes sont présentes majoritairement dans des biofilms âgés (Gorbushina, 2007). Le biofilm présent sur la Villa Isabel est le plus vieux et confirme cette observation, puisqu'il est dominé par des bactéries hétérotrophes. Etablir une relation entre diversité et maturité du biofilm n'est pas dénué d'intérêt pratique, puisque cela va permettre de dresser un diagnostic des biofilms colonisant les pierres. En effet, l'identification des microorganismes permet d'évaluer l'âge du biofilm, ce qui constitue un atout essentiel pour définir les traitements à appliquer.



**Figure A :** Arbre montrant les affiliations phylogénétique de tous les clones procaryotes provenant des trois sites (Villa Isabel en rouge, mairie de St-Sébastien en bleu, et terrasse du musée de la mer de Biarritz en jaune). La barre d'échelle représente 0,05 substitutions par sites.

## **Perspectives**

La caractérisation des microorganismes se développant sur des façades en pierres exposées aux embruns marins, réalisée durant cette thèse, n'est qu'un prélude à l'étude de la biodétérioration des pierres en environnement marin. En effet, nous connaissons maintenant les colonisateurs, mais nous n'avons aucune information sur leur quantité ni leurs fonctions dans le biofilm, et notamment lesquels sont acteurs de la biodétérioration de la pierre.

Les premières perspectives que nous pouvons apporter à cette thèse sont donc de compléter les analyses de la diversité de la communauté microbienne en vérifiant dans un premier temps les microorganismes viables des non viables, ou en état de dormance et en les quantifiant. Plusieurs techniques sont applicables. L'étude de l'ARNr, nous permettrait de déterminer les microorganismes actifs (Prosser, 2002). La méthode FISH (Fluorescence In Situ Hybridation) pourrait nous permettre de détecter et de quantifier, tout comme la PCR quantitative, certains groupes microbiens spécifiques (Prosser, 2002; Urzì *et al.*, 2004; Gonzalez et Saitz-Jimenez, 2005).

Dans un deuxième temps, la diversité fonctionnelle de la communauté pourrait être explorée afin de compléter les analyses sur la diversité de la communauté microbienne. Les techniques telles que la construction de banques métagénomiques ou encore la technique des puces à ADN nous apportent ces informations (Rondon *et al.*, 2000; Anderson et Cairney, 2004; Herrera, 2006). En effet, ces techniques permettent d'analyser la diversité des communautés sur la base d'une batterie de gènes « fonctionnels » dont l'expression renseigne sur les voies métaboliques en action. D'autres méthodes qui ne sont pas basées sur la biologie moléculaire existent également pour étudier la diversité fonctionnelle d'une communauté microbienne. La SIP (Stable Isotope Probing) permet de visualiser l'absorption de certains substrats par les microorganismes (Prosser, 2002; Gonzalez et Saitz-Jimenez, 2005). Dans le même principe, l'utilisation de fluorochromes spécifiques de certains substrats permettent de mesurer leur absorption par les microorganismes. Par exemple, McNamara *et al.* (2005) se sont servis du fluorochrome Rhod-5N lié à  $\text{Ca}^{2+}$ . Ils ont pu visualiser la consommation de  $\text{Ca}^{2+}$  par les microorganismes, et par conséquent mesurer la biodétérioration du calcaire.

La présence d'une espèce d'*Herbaspirillum* dès les 6 premiers mois d'exposition de la pierre nous a fortement intrigué. Il serait intéressant de pousser les études sur ce microorganisme afin de comprendre sa présence parmi les colonisateurs pionniers. Tout

d'abord, il faudrait déterminer si ce microorganisme est le premier à apparaître sur la pierre ou s'il la colonise conjointement avec les algues et/ou les champignons. Pour cela une étude des 6 premiers mois d'exposition pourrait être refaite. Ensuite, il faudrait vérifier quel est son métabolisme en action, la litho-autotrophie ou l'hétérotrophie. Pour cela, une étude en temps réel des ARN codant pour la Rubisco (fixation du CO<sub>2</sub>), pour l'hydrogénase (fixation de l'hydrogène) et de la nitrogénase (fixation de l'azote) pourrait être réalisée.

L'effet de la présence du biofilm vis-à-vis de l'action des sels marins sur la pierre pourrait être approfondi. Il serait intéressant de savoir si le phénomène de biodétérioration des microorganismes s'ajoute au phénomène de détérioration par les sels, ou au contraire, si la présence du biofilm freine cette action en recouvrant la pierre d'une couche protectrice. Afin de vérifier cela, une pierre colonisée ainsi qu'une pierre non colonisée pourraient être soumises à des attaques accélérées par les sels *in vitro* et l'évolution de leurs caractéristiques physico-chimiques observée.

Pour conclure, cette thèse nous a permis de caractériser, grâce à la mise au point d'une méthode d'identification moléculaire, les microorganismes présents sur deux supports en pierres différentes du Golfe de Gascogne, ainsi que de déterminer quelles sont les étapes de la colonisation de la pierre calcaire d'Angoulême. Elle nous a montré que la colonisation se fait suivant une succession biologique et semblerait-il, une spécialisation pour les alpha-protéobactéries, que l'orientation du support par rapport aux radiations solaires a une influence significative sur la colonisation et que les embruns n'ont pas une grande influence sur les colonisateurs. D'autre part, l'étude sur 22 mois de la colonisation de la pierre s'étend sur une échelle de temps relativement courte, ce qui explique que bien que des microorganismes se soient installés, le support « pierre » n'a pas encore subi de modifications physico-chimiques. Cette étude s'est ainsi montrée originale car nous nous sommes intéressés à tous les microorganismes présents sur les pierres et en même temps au support.

## Références bibliographiques

### Sites Internet :

<[http://www.culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/preventi/tuffeau/chapitre\\_032.htm](http://www.culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/preventi/tuffeau/chapitre_032.htm)>  
« *Tendres comme la pierre* » *Monuments en tuffeau - Guide pour la restauration et l'entretien*  
(consulté en mars 2007).

<[www.qub.ac.uk/geog/documents/research/weathering/](http://www.qub.ac.uk/geog/documents/research/weathering/)> *Weathering Research Group*  
(consulté en septembre 2004).

### Publications :

**Abdulla H., Morshedy H. and Dewedar A.** *Characterization of actinomycetes isolated from the indoor air of the church of Saint Katherine Monastery, Egypt.* *Aerobiologia*, 2008, **24** (1): 35-41.

**Adamo P. and Violante P.** *Review: weathering of rocks and neogenesis of minerals associated with lichen activity.* *Applied Clay Science*, 2000, **16**: 229-256.

**Aghamiri R. and Schwartzman D. W.** *Weathering rates of bedrock by lichens: A mini watershed study.* *Chemical Geology*, 2002, **188** (3-4): 249-259.

**Albertano P. and Urzì C.** *Structural Interactions among Epilithic Cyanobacteria and Heterotrophic Microorganisms in Roman Hypogea.* *Microbial Ecology*, 1999, **38** (3): 244-252.

**Anderson I. C. and Cairney J. W. G.** *Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques.* *Environmental Microbiology*, 2004, **6** (8): 769-779.

**Anderson I. C., Campbell C. D. and Prosser J. L.** *Potential bias of fungal 18S rDNA and Internal Transcribed Spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil.* *Environmental Microbiology*, 2003, **5** (1): 36-47.

**ANDRA.** *Les matériaux cimentaires - tome 2. Référentiel des matériaux d'un stockage de déchets à haute activité et à vie longue* 2004: 448p.

**Asada Y. and Miyake J.** *Photobiological hydrogen production.* *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1999, **88** (1): 1-6.

**Ascaso C., Wierzchos J., Souza-Egipsy V., de los Rios A. and Rodrigues J. D.** *In situ evaluation of the biodeteriorating action of microorganisms and the effects of biocides on carbonate rock of the Jeronimos Monastery (Lisbon).* *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2002, **49** (1): 1-12.

**Baldani J. I., Baldani V. L. D., Seldin L. and Dobereiner J.** *Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium.* *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1986, **36** (1): 86-93.

**Beck K.** *Etude des propriétés hydriques et des mécanismes d'altération de pierres calcaires à forte porosité.* *Science des Matériaux*, 2006, **Phd**, Université d'Orléans, France : 226p.

- Beffa T., Blanc M., Marilley L., Fisher J. L., Lyon P.-F. and Aragno M.** *Taxonomic and metabolic microbial diversity during composting.* Blackies Academic and Professional, Glasgow, Scotland, 1995, 8p.
- Bertron A.** *Durabilité des matériaux cimentaires soumis aux acides organiques, cas particulier des effluents d'élevage.* 2004, **Phd**, INSA Toulouse, France : 256p.
- Bridge P. D., Roberts P. J., Spooner B. M. and Panchal G.** *On the unreliability of published DNA sequences.* New Phytologist, 2003, **160** (1): 43-48.
- Bürgmann H., Pesaro M., Widmer F. and Zeyer J.** *A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil.* Journal of Microbiological Methods, 2001, **45**: 7-20.
- Caneva G., Gori E. and Montefinale T.** *Biodeterioration of monuments in relation to climatic changes in Rome between 19-20th centuries.* Science of the Total Environment, 1995, **167**: 205-214.
- Carballal R., Paz-Bermudez G., Sanchez-Biezma M. J. and Prieto B.** *Lichen colonization of coastal churches in Galicia: Biodeterioration implications.* International Biodeterioration and Biodegradation, 2001, **47** (3): 157-163.
- Cardell C., Delalieux F., Roumpopoulos K., Moropoulou A., Auger F. and Van Grieken R.** *Salt-induced decay in calcareous stone monuments and buildings in a marine environment in SW France.* Construction and Building Materials, 2003, **17** (3): 165-179.
- Carrigg C., Rice O., Kavanagh S., Collins G. and O'Flaherty V.** *DNA extraction method affects microbial community profiles from soils and sediment.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, **77** (4): 955-964.
- Chabas A.** *Rôle de l'environnement atmosphérique marin dans la dégradation des marbres et du granite de Delos (Cyclades - Grèce).* Sciences et Techniques de l'Environnement, 1997, **Phd**, Université de Paris XII, Paris : 204p.
- Chao A.** *Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population.* Scandinavian J. Stat., 1984, **11**: 265-270.
- Chertov O., Gorbushina A. and Deventer B.** *A model for microcolonial fungi growth on rock surfaces.* Ecological Modelling, 2004, **177**: 415-426.
- COALITION workshop.** EVK4-CT-1999-2001. Newsletter n°4: COALITION, Belgium, 14pp
- Crispim C. A. and Gaylarde C. C.** *Cyanobacteria and Biodeterioration of Cultural Heritage: A Review.* Microbial Ecology, 2005, **49**: 1-9.
- Crispim C. A., Gaylarde C. C. and Gaylarde P. M.** *Biofilms on church walls in Porto Alegre, RS, Brazil, with special attention to cyanobacteria.* International Biodeterioration & Biodegradation, 2004, **54**: 121-124.
- Curtis C. P., Sloan W. T. and Scannell J. W.** *Estimating prokaryotic diversity and its limits.* PNAS, 2002, **99** (16): 10494-10499.
- Dang H., Li T., Chen M. and Huang G.** *Cross-ocean distribution of Rhodobacterales bacteria as primary surface colonizers in temperate coastal marine waters.* Applied and Environmental Microbiology, 2008, **74** (1): 52-60.
- Dang H. and Lovell C. R.** *Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence*



- analysis of 16S rRNA genes. Applied and Environmental Microbiology, 2000, **66** (2): 467-475.*
- De la Torre M. A., Gomez-Alarcon G., Vizcaino C. and Garcia M. T.** *Biochemical mechanisms of stone alteration carried out by filamentous fungi living in monuments. Biogeochemistry, 1993, **19** (3): 129-147.*
- De Muynck W., Cox K., Belie N. D. and Verstraete W.** *Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete. Construction and Building Materials, 2008, **22** (5): 875-885.*
- De Reviere B.** *Biologie et Phylogénie des algues. Belin, Paris, 2003, 255p.*
- Drobner E., Huber H. and Stetter K. O.** *Thiobacillus ferrooxidans, a facultative hydrogen oxidizer. Applied and Environmental Microbiology, 1990, **56** (9): 2922-2923.*
- Dunbar J., Barns S. M., Ticknor L. O. and Kuske C. R.** *Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. Applied and Environmental Microbiology, 2002, **68** (6): 3035-3045.*
- Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E. and Stackebrandt K.-H.** *The Prokaryotes. 3ème Edition. Springer, New York, 2006*
- Farrelly V., Rainey F. A. and Stackebrandt E.** *Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. Applied and Environmental Microbiology, 1995, **61** (7): 2798-2801.*
- Fernandes P.** *Applied microbiology and biotechnology in the conservation of stone cultural heritage materials. Applied Microbiol Biotechnol, 2006, **73**: 291-296.*
- Flemming H.-C., Neu T. R. and Wozniak D. J.** *Guest Commentary - The EPS Matrix : the "House of Biofilm Cells". Journal of Bacteriology, 2007, **189** (22): 7945-7947.*
- Flores M., Lorenzo J. and Gomez-Alarcon G.** *Algae and bacteria on historic monuments at Alcala de Henares, Spain. International Biodeterioration and Biodegradation, 1997, **40** (2-4): 241-246.*
- Gaylarde C. C. and Morton L. H. G.** *Deteriogenic Biofilms on Buildings and their Control: a Review. Biofouling, 1999, **14** (1): 59-74.*
- Gaylarde P. M. and Gaylarde C. C.** *Algae and cyanobacteria on painted buildings in Latin America. International Biodeterioration and Biodegradation, 2000, **46** (2): 93-97.*
- Gaylarde P. M., Gaylarde C. C., Guiamet P. S., Gomez De Saravia S. G. and Videla H. A.** *Biodeterioration of Mayan Buildings at Uxmal and Tulum, Mexico. Biofouling, 2001, **17** (1): 41-45.*
- Gomes E. A., Kasuya M. C. M., de Barros E. G., Borges A. C. and Fernandes de Araujo E.** *Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. Genetics and Molecular Biology, 2002, **25** (4): 477-483.*
- Gonzales J.-M. and Saitz-Jimenez C.** *Application of molecular nucleic acid-based techniques for the study of microbial communities in monuments and artworks. International Microbiology, 2005, **8**: 189-194.*
- Gonzalez J.-M. and Saitz-Jimenez C.** *Application of molecular nucleic acid-based techniques for the study of microbial communities in monuments and artworks. International Microbiology, 2005, **8**: 189-194.*

- Gorbushina A., Heyrman J., Dornieden T., Gonzalez-Delvalle M., Krumbein W. E., Laiz L., Petersen K., Saitz-Jimenez C. and Swings J.** *Bacterial and fungal diversity and biodeterioration problems in mural painting environments of St. Martins church (Greene-Kreiensen, Germany).* International Biodeterioration & Biodegradation, 2004, **53**: 13-24.
- Gorbushina A. A.** *Life on the rocks.* Environmental Microbiology, 2007, **9** (7): 1613-1631.
- Grasland B., Mitalane J., Briandet R., Quemener E., Meylheuc T., Linossier I., Vallee-Rehel K. and Haras D.** *Bacterial Biofilm in Seawater: Cell Surface Properties of Early-attached Marine Bacteria.* Biofouling, 2003, **19** (5): 307-313.
- Guillitte O.** *Bioreceptivity: a new concept for building ecology studies.* The Science of the Total Environment, 1995, **167**: 215-220.
- Gurtner C., Heyrman J., Piñar G., Lubitz W., Swings J. and Rölleke S.** *Comparative analyses of the bacterial diversity on two different biodeteriorated wall paintings by DGGE and 16S rDNA sequence analysis.* International Biodeterioration & Biodegradation, 2000, **46**: 229-239.
- Haugland R. A., Brinkman N. and Vesper S. J.** *Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungi using real-time PCR analysis.* Journal of Microbiological Methods, 2002, **50**: 319-323.
- Head I. M., Saunders J. R. and Pickup R. W.** *Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms.* Microbial Ecology, 1998, **35** (1): 1-21.
- Herrera A.** *Adaptation génétique et fonctionnelle des communautés bactériennes dans les sols extrêmes de Nouvelle-Calédonie.* 2006, **Phd**, Université Claude Bernard, Lyon 1, France: 178p.
- Herrera L. K., Arroyave C., Guiamet P., Gomez de Saravia S. and Videla H. A.** *Biodeterioration of peridotite and other constructional materials in a building of the Colombian cultural heritage.* International Biodeterioration & Biodegradation, 2004, **54**: 135-141.
- Herrera L. K. and Videla H. A.** *The importance of atmospheric effects on biodeterioration of cultural heritage constructional materials.* International Biodeterioration & Biodegradation, 2004, **54**: 125-134.
- Heyrman J., Mergaert J., Denys R. and Swings J.** *The use of fatty acid methyl ester analysis (FAME) for the identification of heterotrophic bacteria present on three mural paintings showing severe damage by microorganisms.* FEMS Microbiology Letters, 1999, **181**: 55-62.
- Hirsch P., Eckhardt F. E. W. and Palmer Jr. R. J.** *Review Article : Methods for the study of rock-inhabiting microorganisms - A mini review.* Journal of Microbiological Methods, 1995, **23**: 143-167.
- Hughes J. B., Hellmann J. J., Ricketts T. H. and Bohannon B. J. M.** *Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity.* Applied and Environmental Microbiology, 2001, **67** (10): 4399-4406.
- Imperi F., Caneva G., Cancellieri L., Ricci M. A., Sodo A. and Visca P.** *The bacterial aetiology of rosy discoloration of ancient wall paintings.* Environmental Microbiology, 2007, **9** (11): 2894-2902.

- Jeong T. Y., Cha G. C., Yeom S. H. and Choi S. S.** *Comparison of hydrogen production by four representative hydrogen-producing bacteria.* Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2008, **14** (3): 333-337.
- Kemp P. F. and Aller J. Y.** *Estimating prokaryotic diversity: When are 16S rDNA libraries large enough?* Limnology and Oceanography: Methods, 2004, **2**: 114-125.
- Kiel G. and Gaylarde C.** *Bacterial diversity in biofilms on external surfaces of historic buildings in Porto Alegre.* World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006, **22** (3): 293-297.
- Kirk J. L., Beaudette L. A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J. N., Lee H. and T. T. J.** *Methods of studying soil microbial diversity.* Journal of Microbiological Methods, 2004, **58**: 169-188.
- Kozdroj J. and Van Elsas J. D.** *Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches.* Journal of Microbiological Methods, 2001, **43** (décembre): 197-212.
- Krsek M. and Wellington E. M. H.** *Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil.* Journal of Microbiological Methods, 1999, **39**: 1-6.
- Krumbein W. E.** *Patina and cultural heritage - a geomicrobiologist's perspective.* BIODAM, 2004: 9pp.
- Kumar Saha S., Uma L. and Subramanian G.** *An improved method for marine cyanobacterial DNA isolation.* World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, **21**: 877-881.
- Kurakov A. V., Somova N. G. and Ivanovskii R. N.** *Micromycetes populating limestone and red brick surfaces of the novodevichii convent masonry.* Mikrobiologiya, 1999, **68** (2): 273-282.
- Kussmaul M., Wilimzig M. and Bock E.** *Methanotrophs and methanogens in masonry.* Applied and Environmental Microbiology, 1998, **64** (11): 4530-4532.
- Lazzarini L., Borrelli E., Bouabdelli M. and Antonelli F.** *Insight into the conservation problems of the stone building "Bab Agnaou", a XII cent. monumental gate in Marrakech (Morocco).* Journal of Cultural Heritage, 2007, **8** (3): 315-322.
- Legendre L. and Legendre P.** *Ecologie numérique: le traitement multiple des données écologiques.* Paris et les Presses de l'Université du Québec, Paris, 1984, 260p.
- Ling H., Maiqian N. and Guozheng L.** *Preparation and feasibility analysis of fluoropolymer to the sandstone protection.* Progress in Organic Coatings, 2008, **62** (2): 206-213.
- Liu Z., Yuan D. and Dreybrodt W.** *Comparative study of dissolution rate-determining mechanisms of limestone and dolomite.* Environmental Geology, 2005, **49** (2): 274-279.
- LRMH.** *Pôle Microbiologie : bilan 2004-2005*, 2006, 14p.
- Lu H., Fujimura R., Sato Y., Nanba K., Kamijo T. and Ohta H.** *Characterization of Herbaspirillum- and Limnobacter-related strains isolated from young volcanic deposits in Miyake-Jima island, Japan.* Micobes and Environment, 2008, **23** (1): 66-72.
- May E.** *Microbes on building stone - for good or ill?* Culture, 2003, **24** (2): 5-8.

- McNamara C. J., Perry Iv T. D., Bearce K., Hernandez-Duque G. and Mitchell R.** *Measurement of limestone biodeterioration using the Ca<sup>2+</sup> binding fluorochrome Rhod-5N.* Journal of Microbiological Methods, 2005, **61** (2): 245-250.
- McNamara C. J., Perry Iv T. D., Bearce K., Hernandez-Duque G. and Mitchell R.** *Epilithic and Endolithic Bacterial Communities in Limestone from Maya Archeological Site.* microbial Ecology, 2006, **51**: 51-64.
- Melis A.** *Photosynthetic H<sub>2</sub> metabolism in Chlamydomonas reinhardtii (unicellular green algae).* Planta, 2007, **226** (5): 1075-1086.
- Meylheuc T., Renault M. and Bellon-Fontaine M. N.** *Adsorption of a biosurfactant on surfaces to enhance the disinfection of surfaces contaminated with Listeria monocytogenes.* International Journal of Food Microbiology, 2006, **109** (1-2): 71-78.
- Miller A., Dionisio A. and Macedo M. F.** *Primary bioreceptivity: A comparative study of different Portuguese lithotypes.* International Biodeterioration & Biodegradation, 2006, **57** (2): 136-142.
- Mitchell J. I. and Zuccaro A.** *Sequences, the environment and fungi.* Mycologist, 2006, **20** (2): 62-74.
- Möhlenhoff P., Müller L., Gorbushina A. and Petersen K.** *Molecular approach to the characterisation of fungal communities: methods for DNA extraction, PCR amplification and DGGE analysis of painted art objects.* FEMS Microbiology Letters, 2001, **195**: 169-173.
- Moissl C., Osman S., La Duc M. T., Dekas A., Brodie E., DeSantis T. and Venkateswaran K.** *Molecular bacterial community analysis of clean rooms where spacecraft are assembled.* FEMS Microbiology Ecology, 2007, **61** (3): 509-521.
- Morita R. Y.** *Is H<sub>2</sub> the universal energy source for long-term survival?* Microbial Ecology, 2000, **38** (4): 307-320.
- Mottershead D., Gorbushina A., Gerald L. and Wright J.** *The influence of marine salts, aspect and microbes in the weathering of sandstone in two historic structures.* Building and Environment, 2003, **38**: 1193-1204.
- Nocker A., Burr M. and Camper A. K.** *Genotypic microbial community profiling: A critical technical review.* Microbial Ecology, 2007, **54** (2): 276-289.
- Orgaz B., Kives J., Pedregosa A. M., Monistrol I. F., Laborda F. and SanJose C.** *Bacterial biofilm removal using fungal enzymes.* Enzyme and Microbial Technology, 2006, **40** (1): 51-56.
- Ortega-Morales B. O., Santiago-Garcia J. L. and Loopez-Cortes A.** *Biomass and taxonomic richness of epilithic cyanobacteria in a tropical intertidal rocky habitat.* Botanica Marina, 2005, **48** (2): 116-121.
- Papida S., Murphy W. and May E.** *Enhancement of physical weathering of building stones by microbial populations.* International Biodeterioration & Biodegradation, 2000, **46**: 305-317.
- Pinhassi J. and Berman T.** *Differential growth response of colony-forming alpha- and gamma-proteobacteria in dilution culture and nutrient addition experiments from Lake Kinneret (Israel), the Eastern Mediterranean Sea, and the Gulf of Eilat.* Applied and Environmental Microbiology, 2003, **69** (1): 199-211.

- Pinhassi J., Zweifel U. L. and Hagström A.** *Dominant marine bacterioplankton species found among colony-forming bacteria.* Applied and Environmental Microbiology, 1997, **63** (9): 3359-3366.
- Pitzurra L., Moroni B., Nocentini A., Sbaraglia G., Poli G. and Bistoni F.** *Microbial growth and air pollution in carbonate rock weathering.* International Biodeterioration & Biodegradation, 2003, **52**: 63-68.
- Prieto B. and Silva B.** *Estimation of the potential bioreceptivity of granitic rocks from their intrinsic properties.* International Biodeterioration & Biodegradation, 2005, **56** (4): 206-215.
- Prosser J. I.** *Molecular and functional diversity in soil micro-organisms.* Plant and Soil, 2002, **244** (1-2): 9-17.
- Radaelli A., Paganini M., Basavecchia V., Elli V., Neri M., Zanotto C., Pontieri E. and De Giuli Morghen C.** *Identification, molecular biotyping and ultrastructural studies of bacterial communities isolated from two damaged frescoes of St Damian's Monastery in Assisi.* Letters in Applied Microbiology, 2004, **38** (6): 447-453.
- Rahn T., Kitchen N. and Eiler J.** *D/H ratios of atmospheric H<sub>2</sub> in urban air: Results using new methods for analysis of nano-molar H<sub>2</sub> samples.* Geochimica et Cosmochimica Acta, 2002, **66** (14): 2475-2481.
- Rodriguez-Navarro C., Rodriguez-Gallego M., Ben Chekroun K. and Gonzalez-Munoz M. T.** *Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus* - Induced carbonate biomineralization.* Applied and Environmental Microbiology, 2003, **69** (4): 2182-2193.
- Rölleke S., Muyzer G., Wawer C., Wanner G. and Lubitz W.** *Identification of bacteria in a biodegraded wall painting by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA.* Applied and Environmental Microbiology, 1996, **62** (6): 2059-2065.
- Rölleke S., Witte A., Wanner G. and Lubitz W.** *Medieval wall paintings - a habitat for archaea : identification of archaea by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA in a medieval wall painting.* International Biodeterioration & Biodegradation, 1998, **41**: 85-92.
- Rondon M. R., August P. R., Bettermann A. D., Brady S. F., Grossman T. H., Liles M. R., Loiacono K. A., Lynch B. A., MacNeil I. A., Minor C., Tiong C. L., Gilman M., Osburne M. S., Clardy J., Handelsman J. and Goodman R. M.** *Cloning the soil metagenome: A strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms.* Applied and Environmental Microbiology, 2000, **66** (6): 2541-2547.
- Saitz-Jimenez C.** *Biodeterioration : An Overview of the State-of-the-Art and Assessment of Future Directions* [en ligne]. Disponible sur: <[http://www.arcchip.cz/w08/w08\\_saiz\\_jimenez.pdf](http://www.arcchip.cz/w08/w08_saiz_jimenez.pdf)> (consulté en septembre 2006).
- Sarro M. I., Garcia A. M., Rivalta V. M., Moreno D. A. and Arroyo I.** *Biodeterioration of the Lions Fountain at the Alhambra Palace, Granada (Spain).* Building and Environment, 2006, **41** (12): 1811-1820.
- Schabereiter-Gurtner C., Piñar G., Lubitz W. and Rölleke S.** *An advanced molecular strategy to identify bacterial communities on art objects.* Journal of Microbiological Methods, 2001a, **45**: 77-87.
- Schabereiter-Gurtner C., Piñar G., Lubitz W. and Rölleke S.** *Analysis of fungal communities on historical church window glass by denaturing gradient gel electrophoresis*

and phylogenetic 18S rDNA sequence analysis. Journal of Microbiological Methods, 2001b, **47**: 345-354.

**Schabereiter-Gurtner C., Piñar G., Vybiral D., Lubitz W. and Rölleke S.** *Rubrobacter-related bacteria associated with rosy discolouration of masonry and lime wall paintings.* Arch Microbiol, 2001c, **176**: 347-354.

**Sert H., Sümbül H. and Sterflinger K.** *Microcolonial fungi from antique marbles in Perge/Side/Termessos (Antalya/Turkey).* Antonie van Leeuwenhoek, 2007, **91**: 217-227.

**Shirakawa M. A., Beech I. B., Tapper R., Cincotto M. A. and Gambale W.** *The development of a method to evaluate bioreceptivity of indoor mortar plastering to fungal growth.* International Biodeterioration & Biodegradation, 2003, **51**: 83-92.

**Shrestha P. M., Noll M. and Liesack W.** *Phylogenetic identity, growth-response time and rRNA operon copy number of soil bacteria indicate different stages of community succession.* Environmental Microbiology, 2007, **9** (10): 2464-2474.

**Spatafora J. W., Mitchell T. G. and Vilgalys R.** *Analysis of genes coding for small-subunit rRNA sequences in studying phylogenetics of dematiaceous fungal pathogens.* Journal of Clinical Microbiology, 1995, **33** (5): 1322-1326.

**Sterflinger K. and Gorbushina A. A.** *Morphological and molecular characterization of a rock inhabiting and rock decaying dematiaceous Fungus isolated from antique monuments of Delos (Cyclades, Greece) and Chersonesus (Crimea, Ukraine).* System. Appl. Microbiol., 1997, **20**: 329-335.

**Suihko M. L., Alakomi H. L., Gorbushina A., Fortune I., Marquardt J. and Saarela M.** *Characterization of aerobic bacterial and fungal microbiota on surfaces of historic Scottish monuments.* Systematic and Applied Microbiology, 2007, **30** (6): 494-508.

**Tayler S. and May E.** *The seasonality of heterotrophic bacteria on sandstones of ancient monuments.* International Biodeterioration, 1991, **28**: 49-64.

**Tomaselli L., Lamenti G., Bosco M. and Tiano P.** *Biodiversity of photosynthetic microorganisms dwelling on stone monuments.* International Biodeterioration & Biodegradation, 2000, **46**: 251-258.

**Torsvik V., Goksoyr J. and Daae F. L.** *High diversity in DNA of soil bacteria.* Applied and Environmental Microbiology, 1990, **56** (3): 782-787.

**Uher B., Aboal M. and Kovacik L.** *Epilithic and chasmoendolithic phycoflora of monuments and buildings in South-Eastern Spain.* Cryptogamie, Algologie, 2005, **26** (3): 275-308.

**Urzí C., La Cono V. and Stackebrandt E.** *Design and application of two oligonucleotide probes for the identification of Geodermatophilaceae strains using fluorescence in situ hybridization (FISH).* Environmental Microbiology, 2004, **6** (7): 678-685.

**Vazquez-Calvo C., Buergo M. A. d., Fort R. and Varas M. J.** *Characterization of patinas by means of microscopic techniques.* Materials Characterization, 2007, **58**: 1119-1132.

**Viaud M., Pasquier A. and Brygoo Y.** *Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS.* Mycological Research, 2000, **104** (9): 1027-1032.

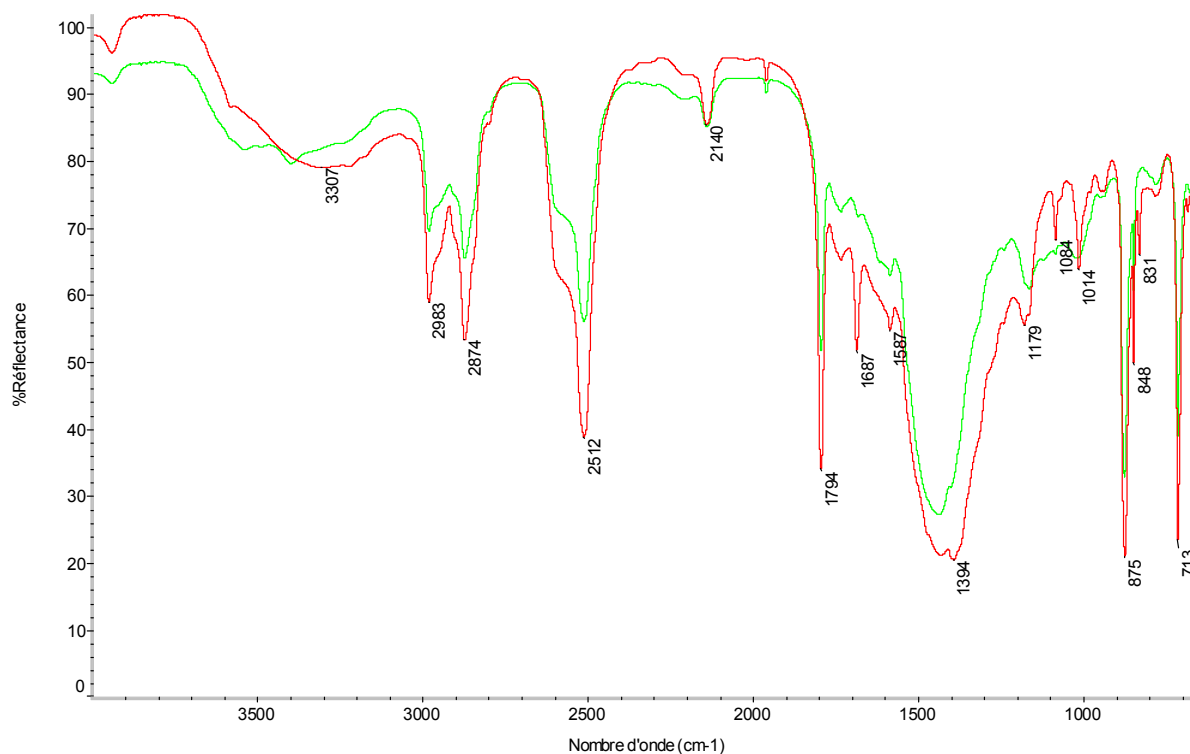
**Videla H. A., Guiamet P. S. and Gomez de Saravia S.** *Biodeterioration of Mayan archaeological sites in the Yucatan Peninsula, Mexico.* International Biodeterioration & Biodegradation, 2000, **46**: 335-341.

- Viles H. and Gorbushina A. A.** *Soiling and microbial colonisation on urban roadside limestone: a three year study in Oxford, England.* Building and Environment, 2003, **38**: 1217-1224.
- Wakefield R. D. and Jones M. S.** *An introduction to stone colonizing micro-organisms and biodeterioration of building stone.* Quarterly Journal of Engineering Geology, 1998, **31**: 301-313.
- Warscheid T. and Braams J.** *Biodeterioration of stone : a review.* International Biodeterioration & Biodegradation, 2000, **46**: 343-368.
- Watanabe K., Takihana N., Aoyagi H., Hanada S., Watanabe Y., Ohmura N., Saiki H. and Tanaka H.** *Symbiotic association in Chlorella culture.* FEMS Microbiology Ecology, 2005, **51**: 187-196.
- Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A. and Lane D. L.** *16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study.* Journal of Bacteriology, 1991, **173** (2): 697-703.
- White T. J., Bruns T., Lee S. and Taylor J.** *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.* PCR Protocols : A guide to methods and applications, 1990: 315-322.
- Wintzingerode F. V., Göbel U. B. and Stackebrandt E.** *Determination of microbial diversity in environmental samples : pitfalls of PCR-based rRNA analysis.* FEMS Microbiology Reviews, 1997, **21**: 213-229.
- Yang Z., Xiao Y., Zeng G., Xu Z. and Liu Y.** *Comparison of methods for total community DNA extraction and purification from compost.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, **74** (4): 918-925.
- Yoon K. S., Tsukada N., Sakai Y., Ishii M., Igarashi Y. and Nishihara H.** *Isolation and characterization of a new facultatively autotrophic hydrogen-oxidizing Betaproteobacterium, Hydrogenophaga sp. AH-24.* FEMS Microbiology Letters, 2008, **278** (1): 94-100.
- Yurkov V. V. and Beatty T. J.** *Aerobic Anoxygenic Phototrophic Bacteria.* Micrbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, **62** (3): 695-724.
- Zhou G., Whong W.-Z., Ong T. and Chen B.** *Development of a fungus-specific PCR assay for detecting low-level fungi in an indoor environment.* Molecular and Cellular Probes, 2000, **14**: 339-348.

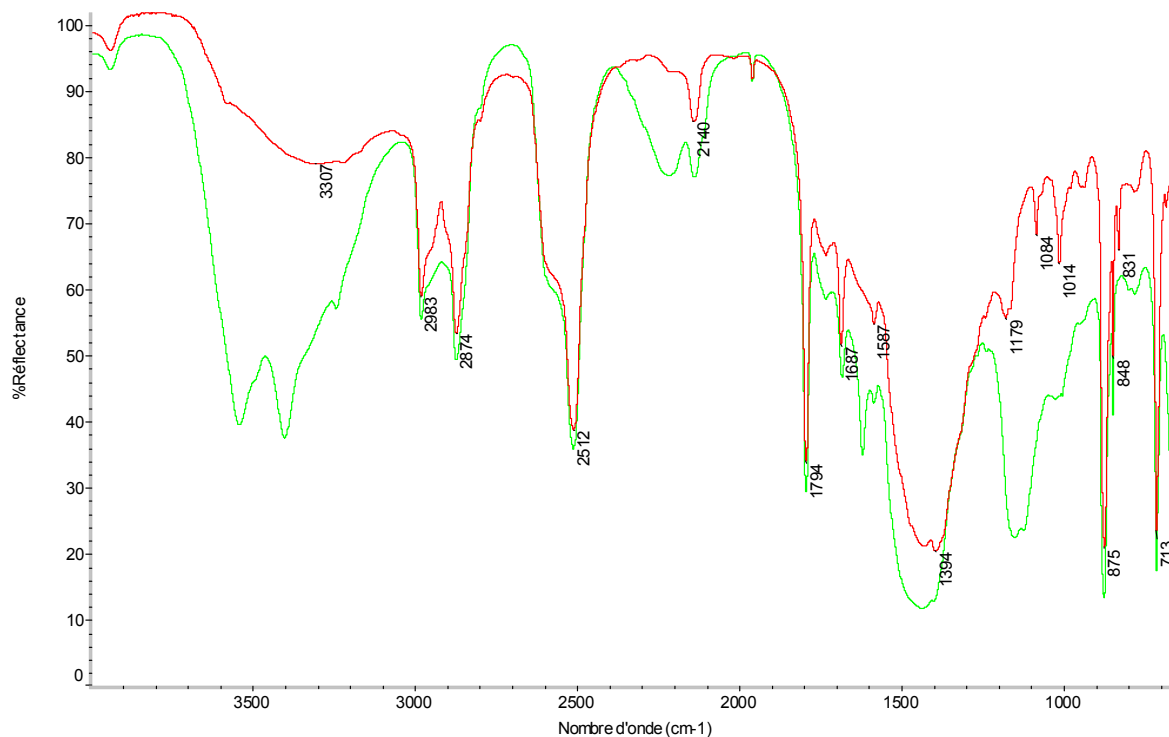




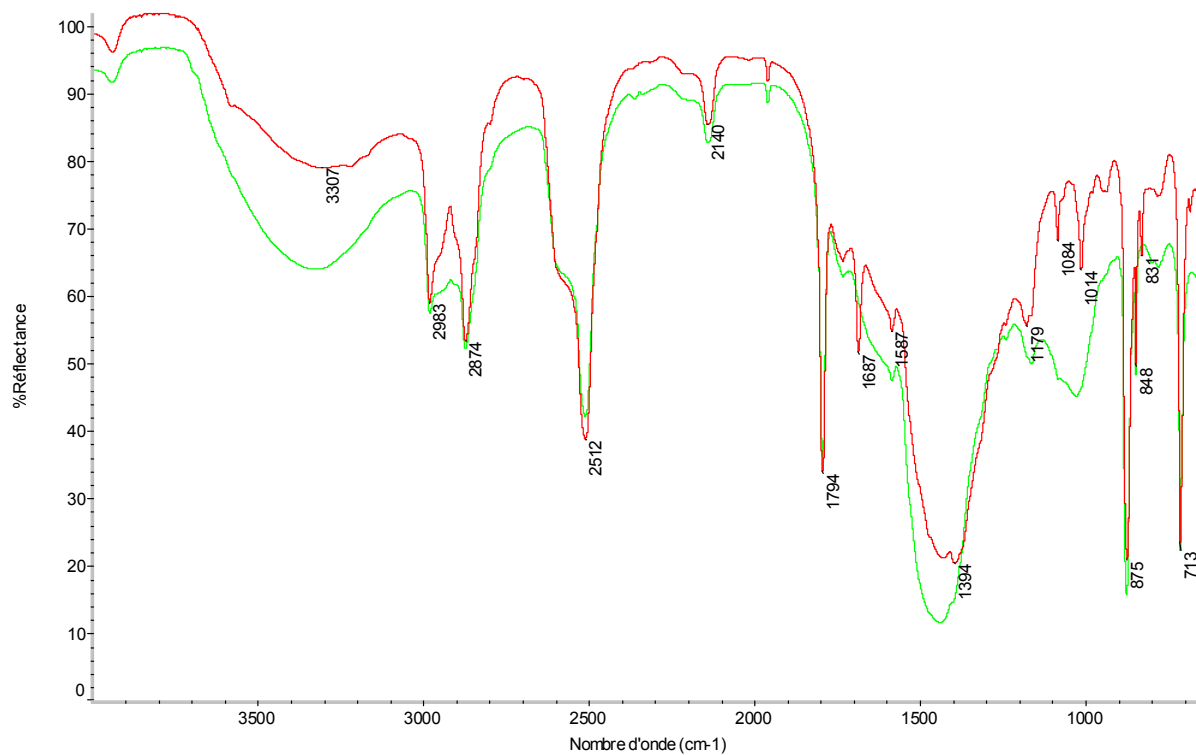
**Annexe 1 :** Spectres DRIFT des échantillons A (pierre altérée), L (pierre d'aspect lisse), N (pierre colonisée par un biofilm de couleur noir), R (pierre colonisée par un biofilm de couleur rouge) et B (balustre rongé), superposés avec les spectres DRIFT de  $\text{CaCO}_3$ .



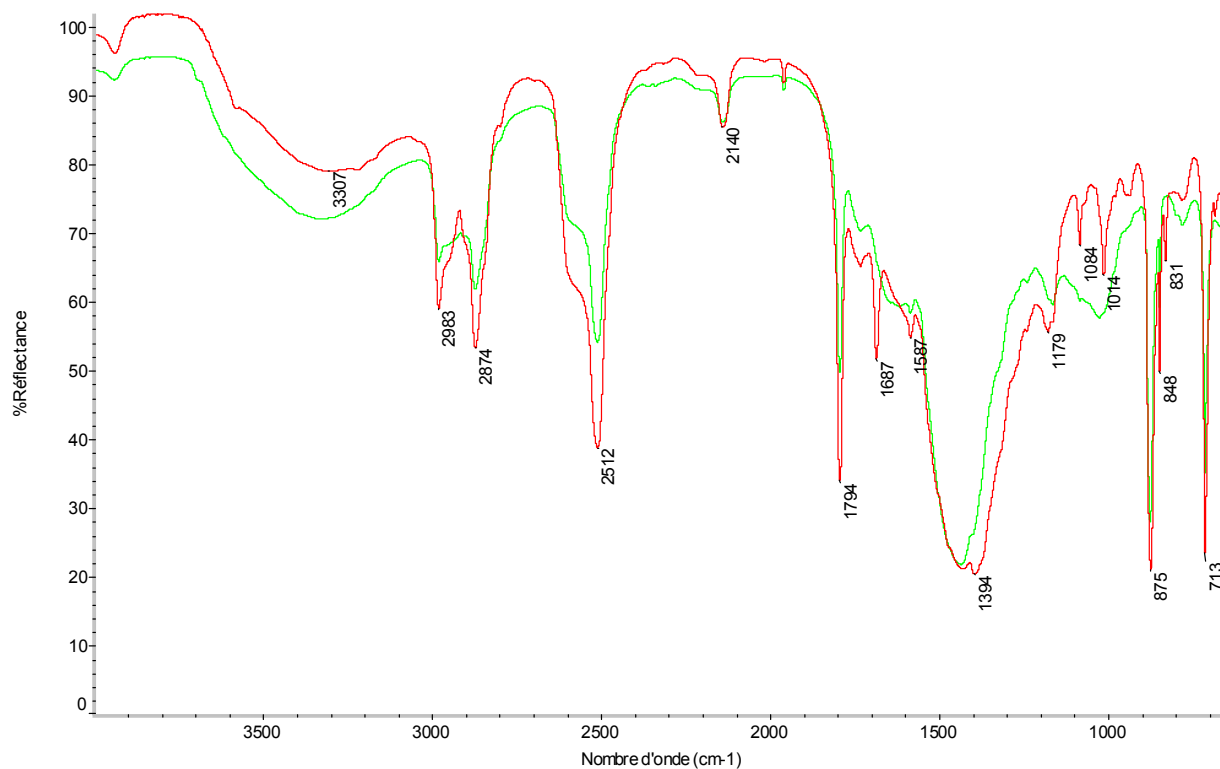
Spectres 1.1 : échantillon A (spectre vert) et  $\text{CaCO}_3$  (spectre rouge)



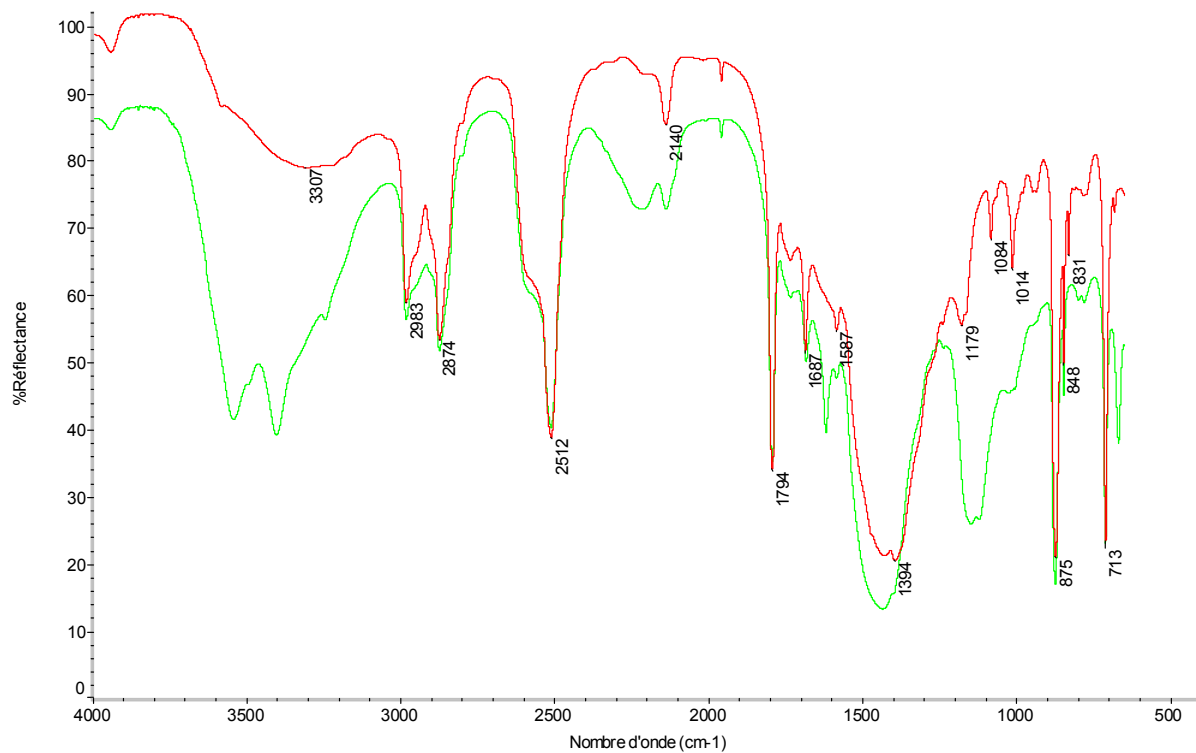
Spectres 1.2 : échantillon L (spectre vert) et  $\text{CaCO}_3$  (spectre rouge)



Spectres 1.3 : échantillon N (spectre vert) et CaCO<sub>3</sub> (spectre rouge)

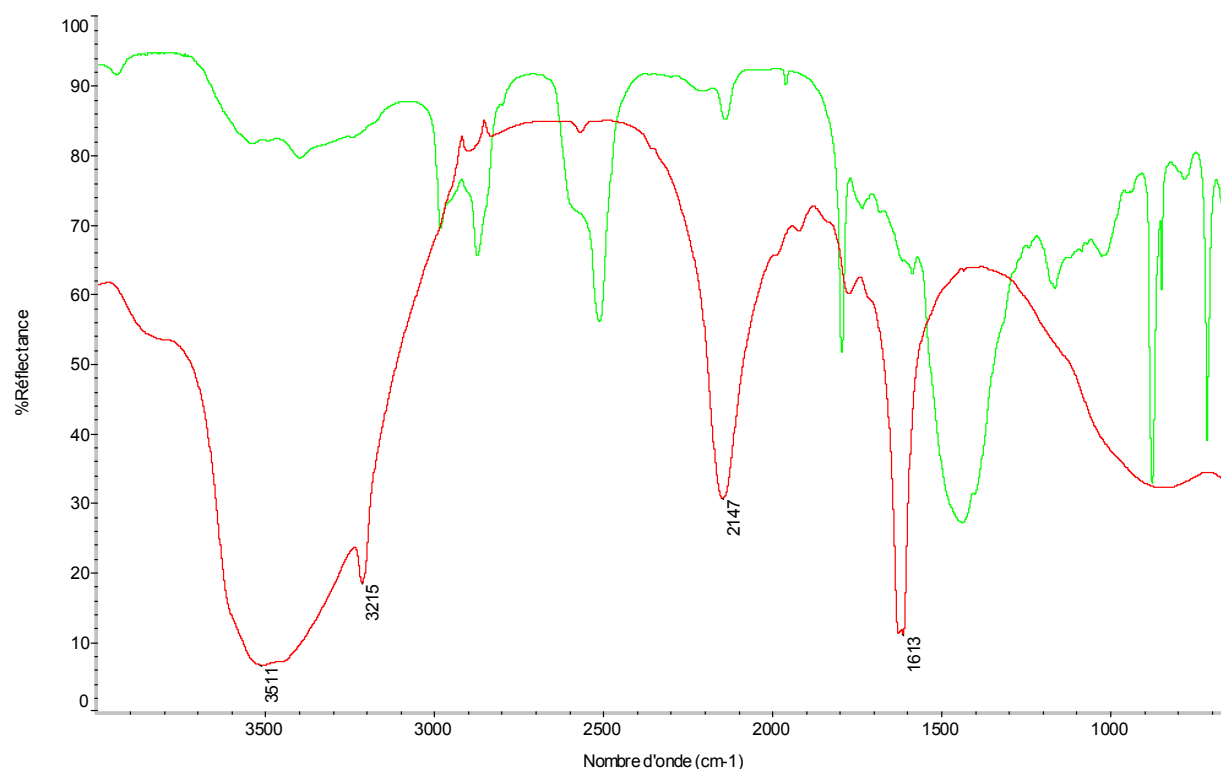


Spectres 1.4 : échantillon R (spectre vert) et CaCO<sub>3</sub> (spectre rouge)

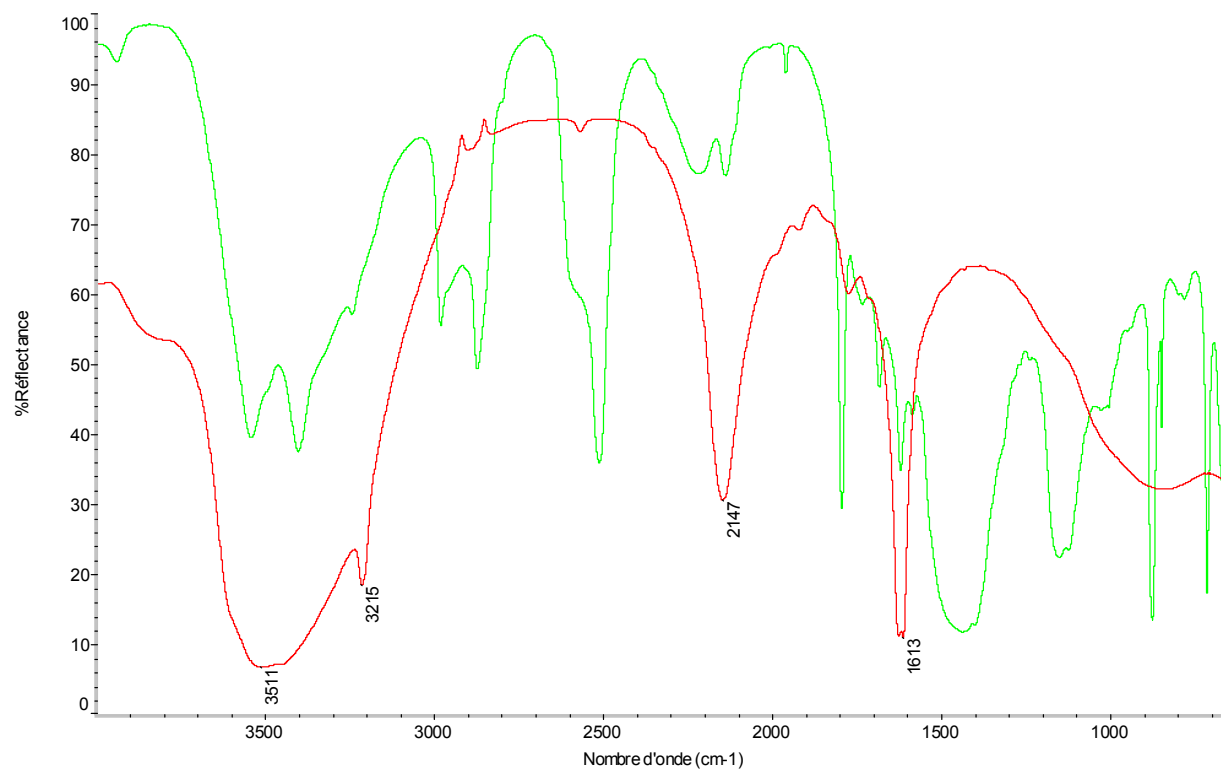


Spectres 1.5 : échantillon B (spectre vert) et CaCO<sub>3</sub> (spectre rouge)

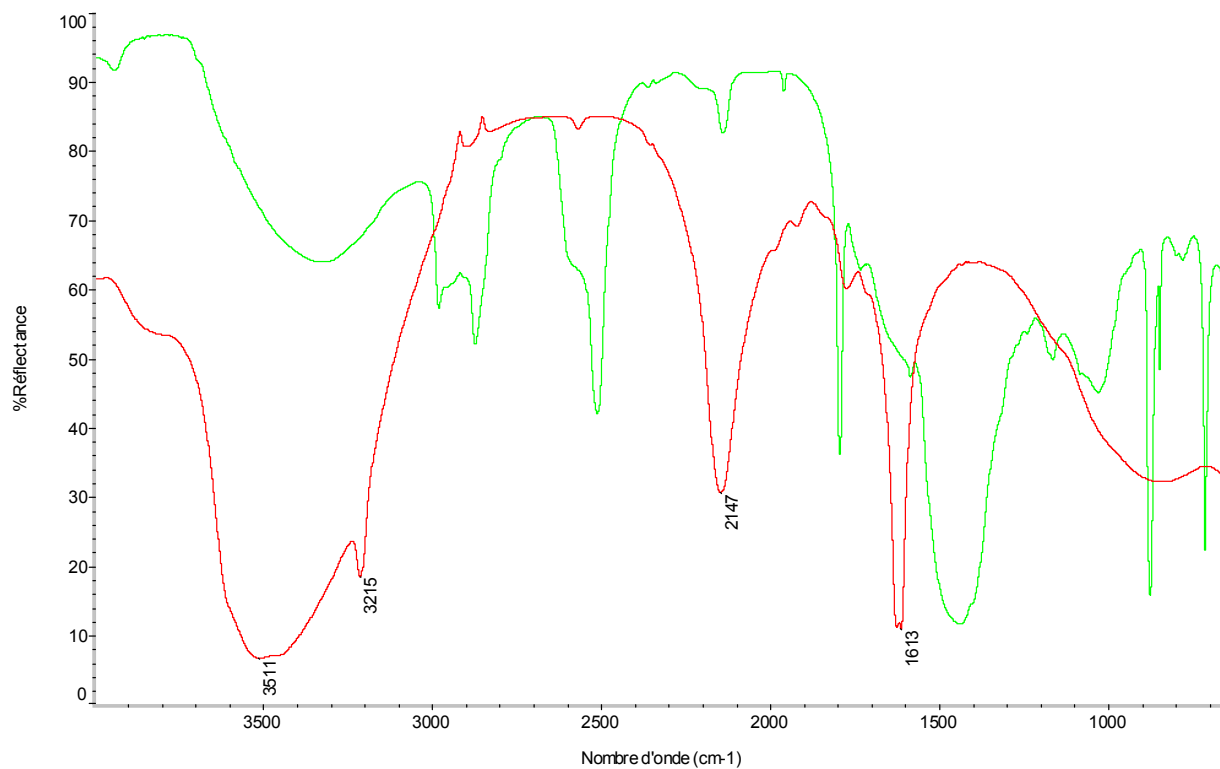
**Annexe 2 :** Spectres DRIFT des échantillons A (pierre altérée), L (pierre d'aspect lisse), N (pierre colonisée par un biofilm de couleur noir), R (pierre colonisée par un biofilm de couleur rouge) et B (balustre rongé), superposés avec les spectres DRIFT de  $\text{CaCl}_2$ .



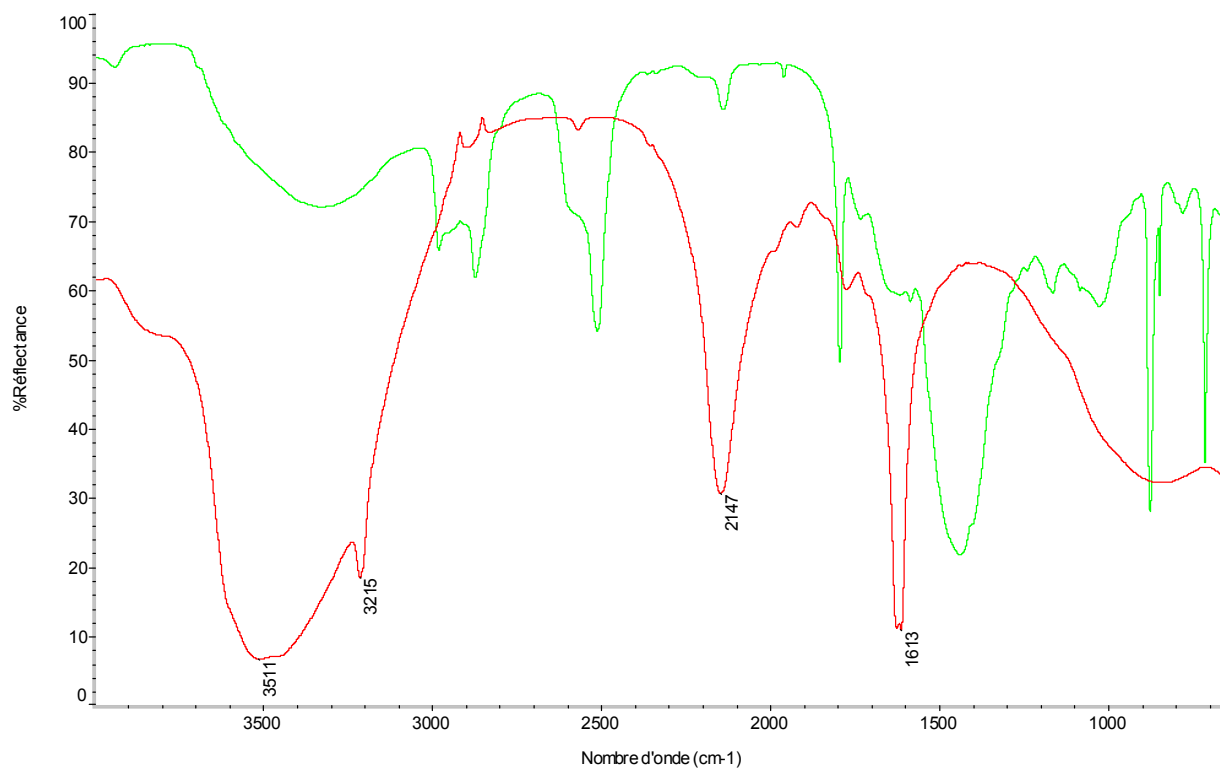
Spectres 2.1 : échantillon A (spectre vert) et  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (spectre rouge)



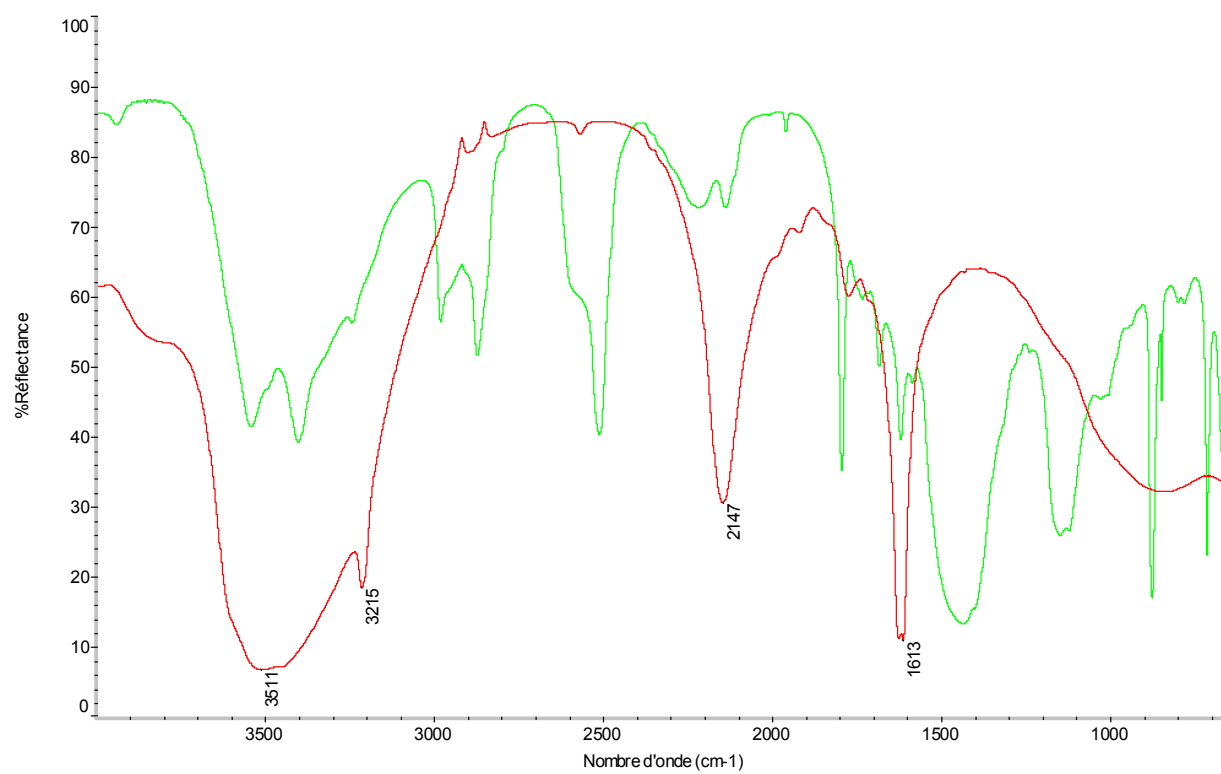
Spectres 2.2 : échantillon L (spectre vert) et  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (spectre rouge)



Spectres 2.3 : échantillon N (spectre vert) et CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (spectre rouge)

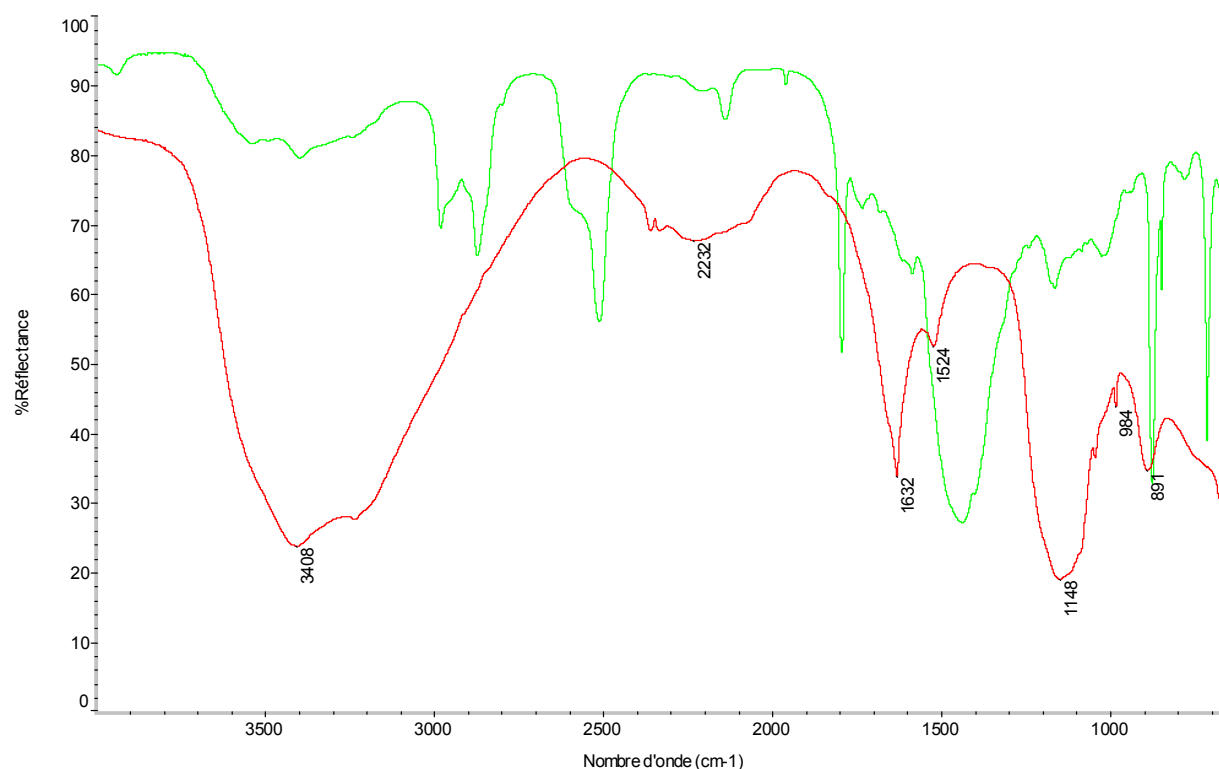


Spectres 2.4 : échantillon R (spectre vert) et CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (spectre rouge)

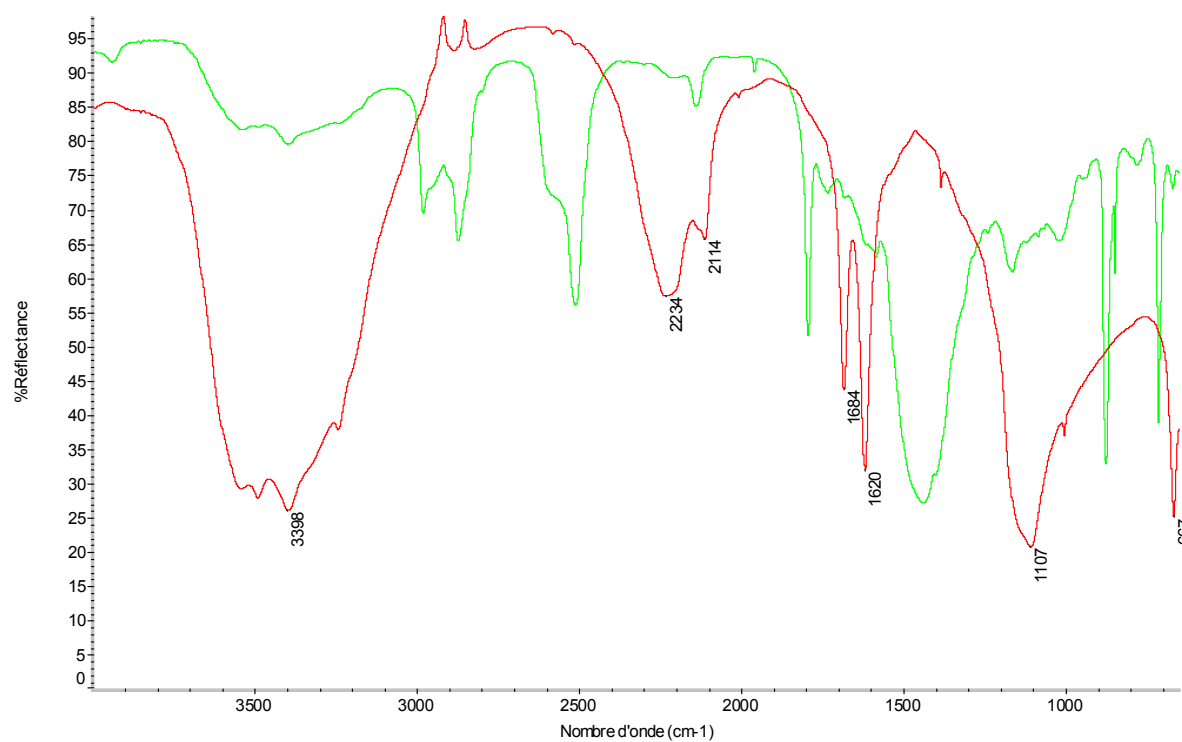


Spectres 2.5 : échantillon B (spectre vert) et CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (spectre rouge)

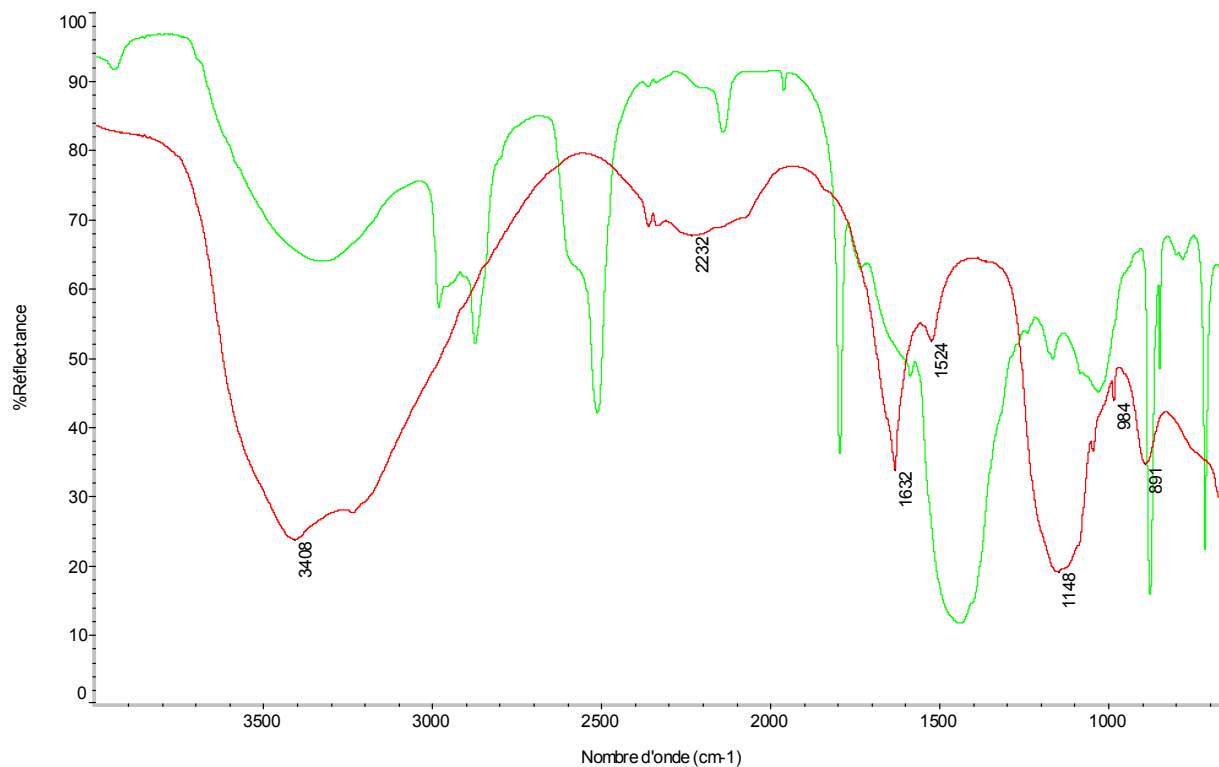
**Annexe 3 :** Spectres DRIFT des échantillons A (pierre altérée), N (pierre colonisée par un biofilm de couleur noir), et R (pierre colonisée par un biofilm de couleur rouge) superposés avec les spectres DRIFT de  $MgSO_4$  et  $CaSO_4$ .



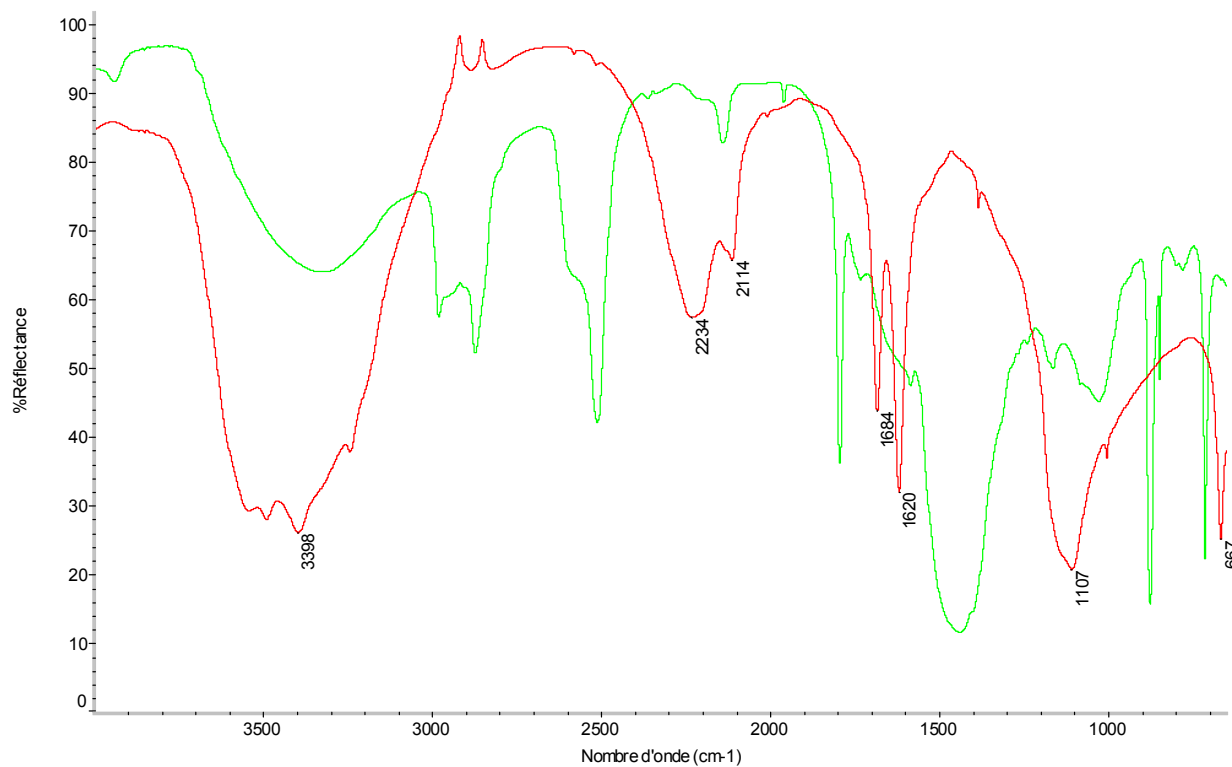
Spectres 3.1 : échantillon A (spectre vert) et  $MgSO_4 \cdot 8H_2O$  (spectre rouge)



Spectres 3.2 : échantillon A (spectre vert) et  $CaSO_4$  (spectre rouge)

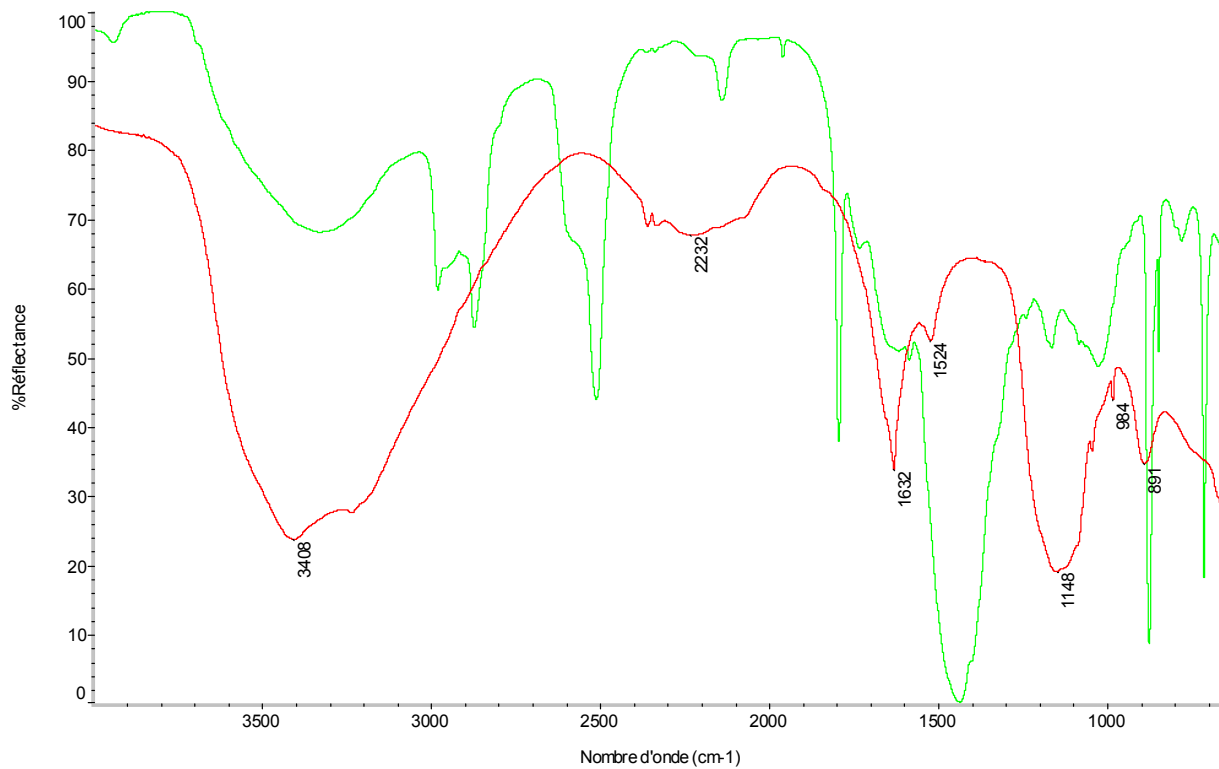


Spectres 3.3 : échantillon N (spectre vert) et MgSO<sub>4</sub>, 8H<sub>2</sub>O (spectre rouge)

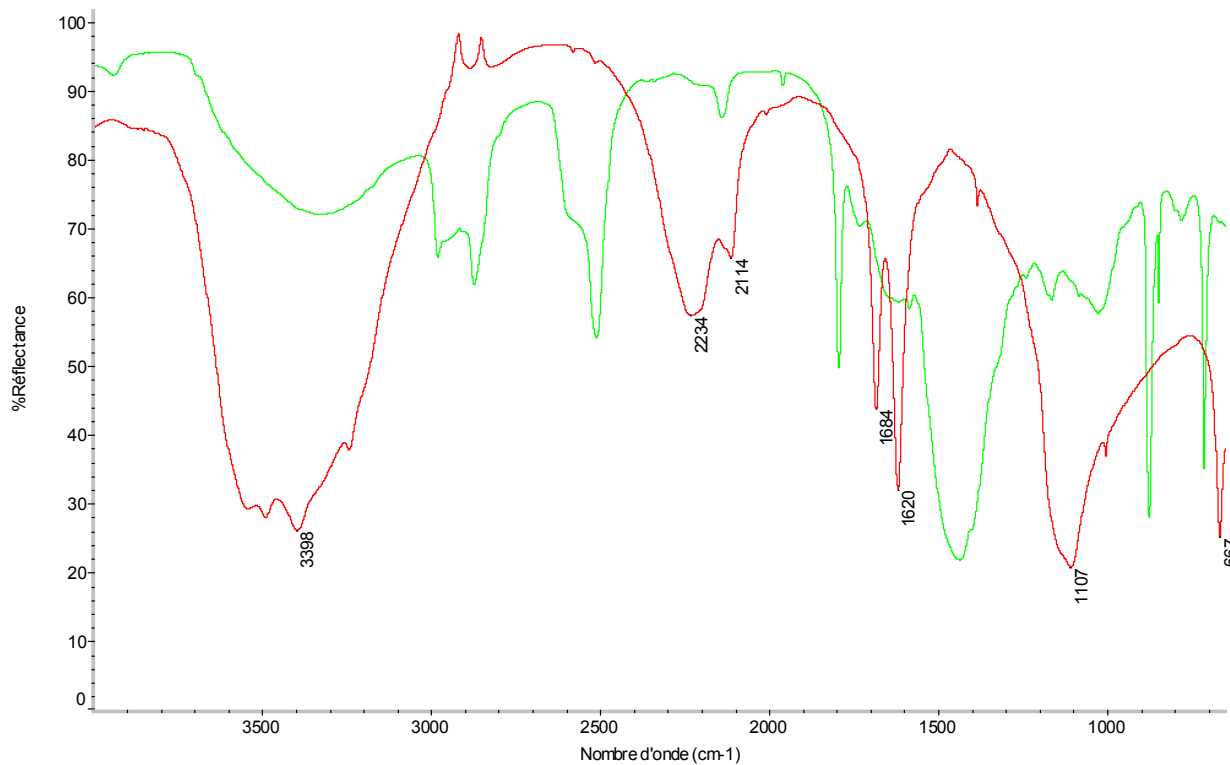


Spectres 3.4 : échantillon N (spectre vert) et CaSO<sub>4</sub> (spectre rouge)

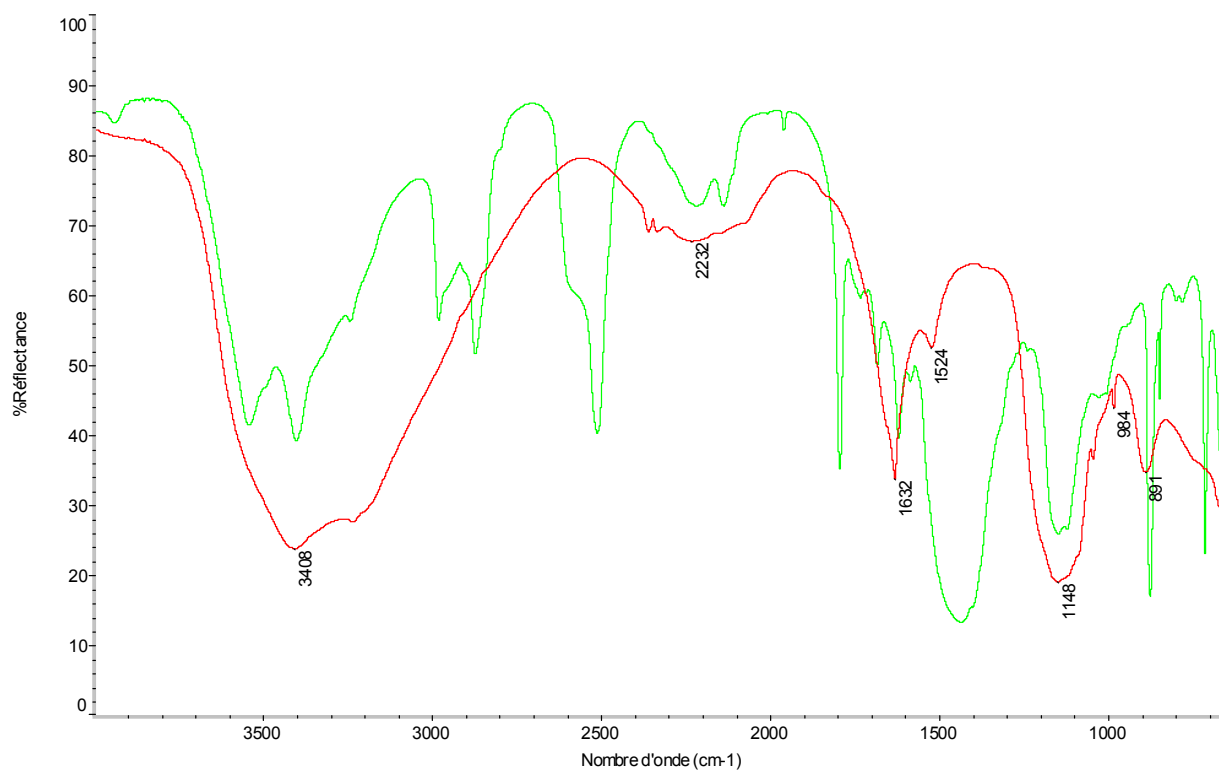
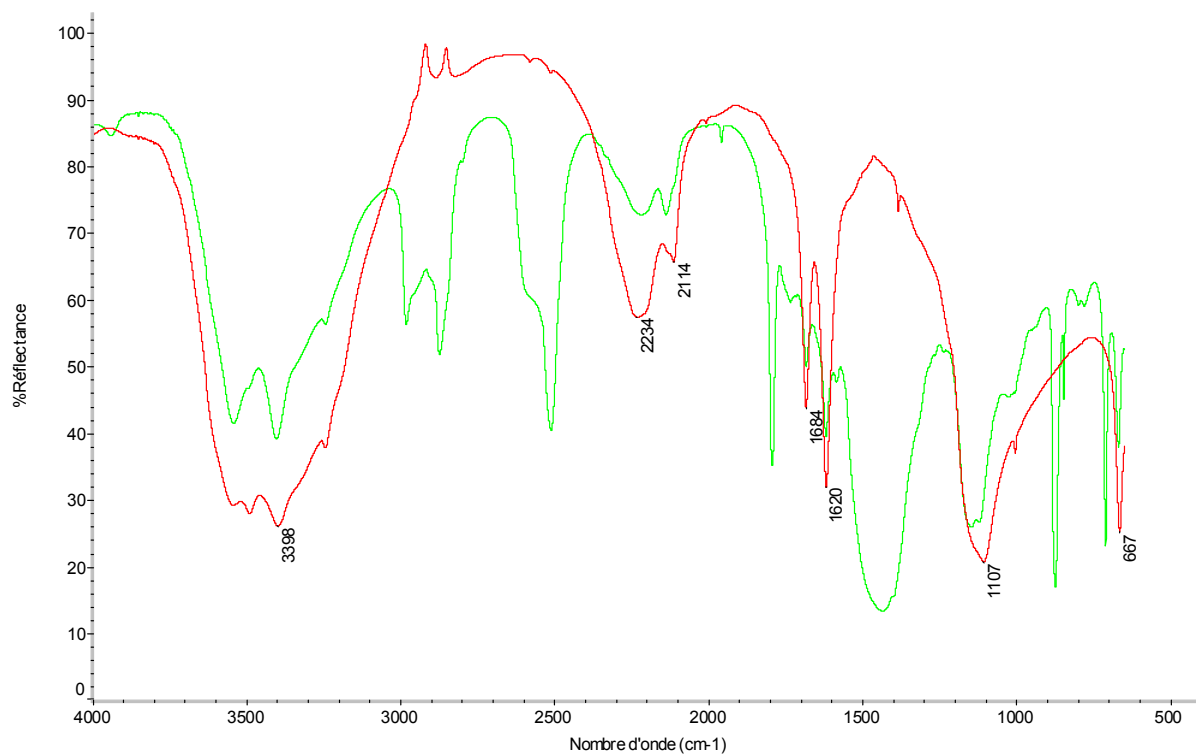




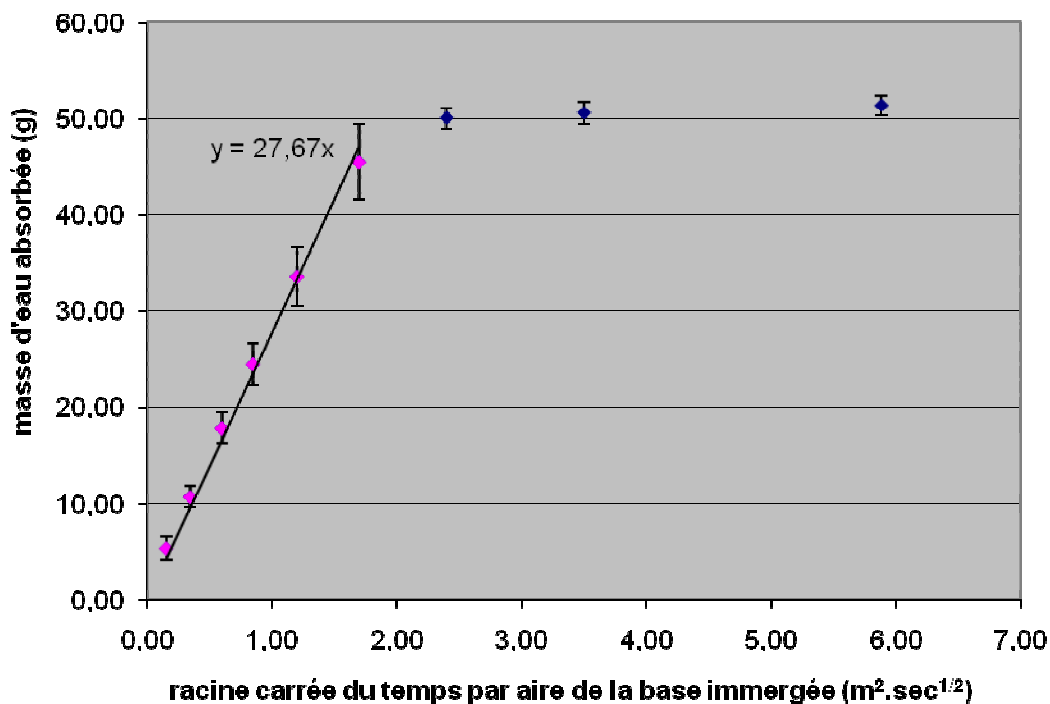
Spectres 3.5 : échantillon R(spectre vert) et MgSO<sub>4</sub>, 8H<sub>2</sub>O (spectre rouge)



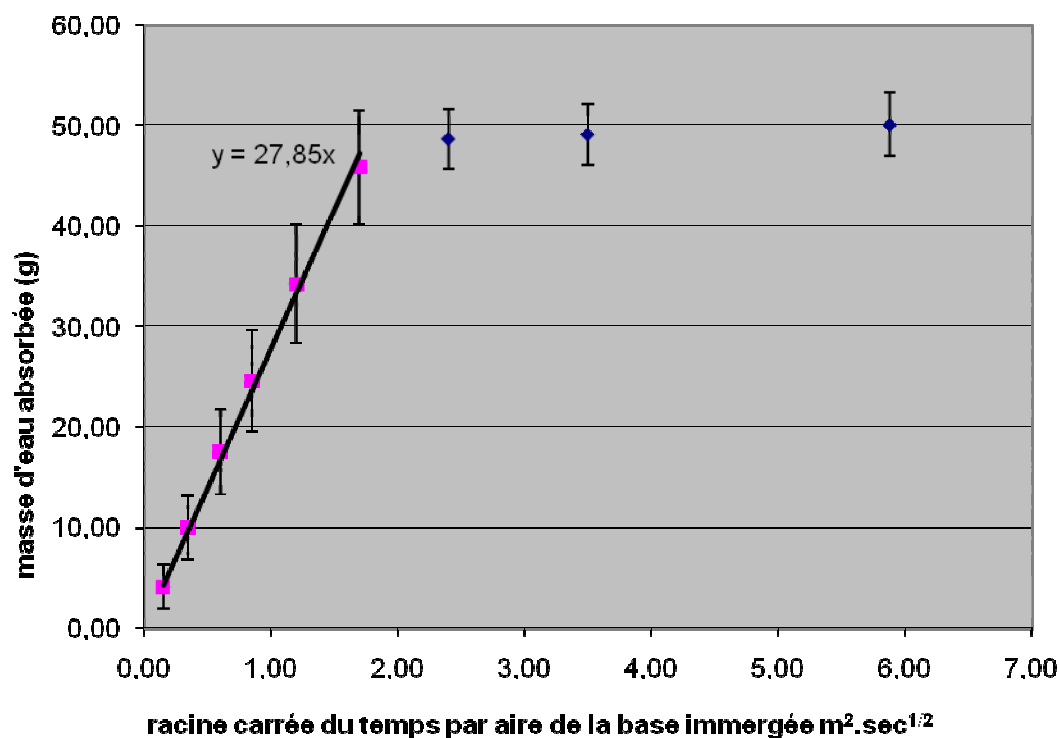
Spectres 3.6 : échantillon R(spectre vert) et CaSO<sub>4</sub> (spectre rouge)

**Annexe 4 : Spectres DRIFT de l'échantillon B (balustre rongé) superposés avec les spectres DRIFT de  $MgSO_4$  et  $CaSO_4$ .****Spectres 4.1 : échantillon B (spectre vert) et  $MgSO_4 \cdot 8H_2O$  (spectre rouge)****Spectres 4.2 : échantillon B (spectre vert) et  $CaSO_4$  (spectre rouge)**

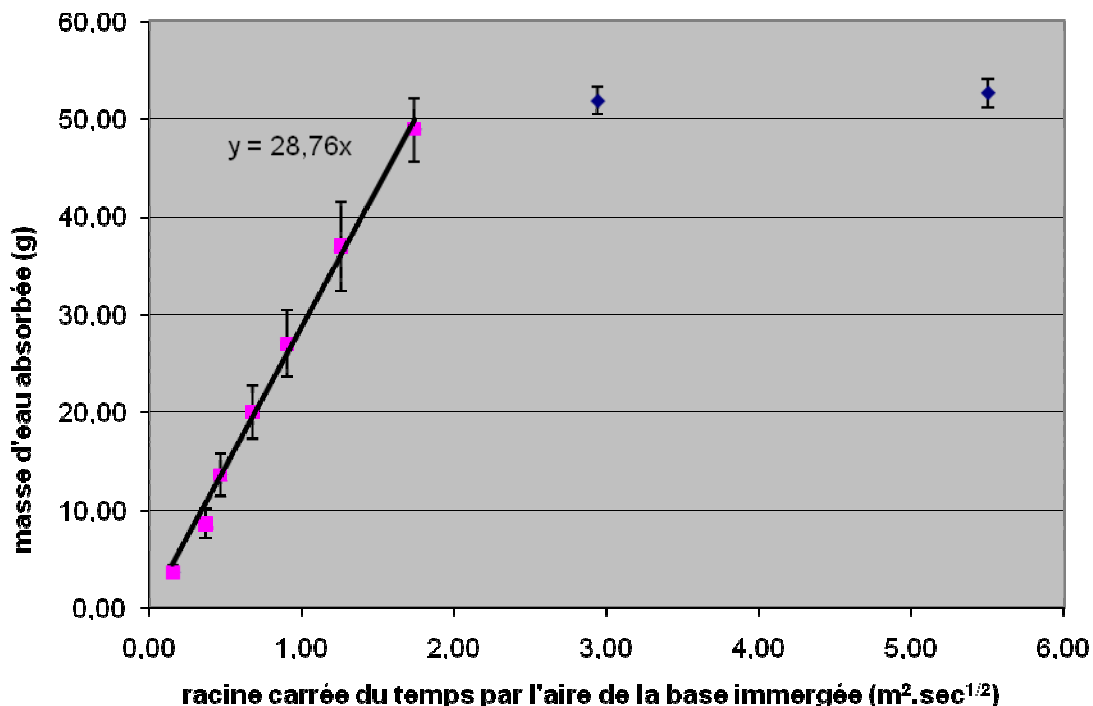
**Annexe 5 : Capillarités des pierres d'Angoulême exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz.**



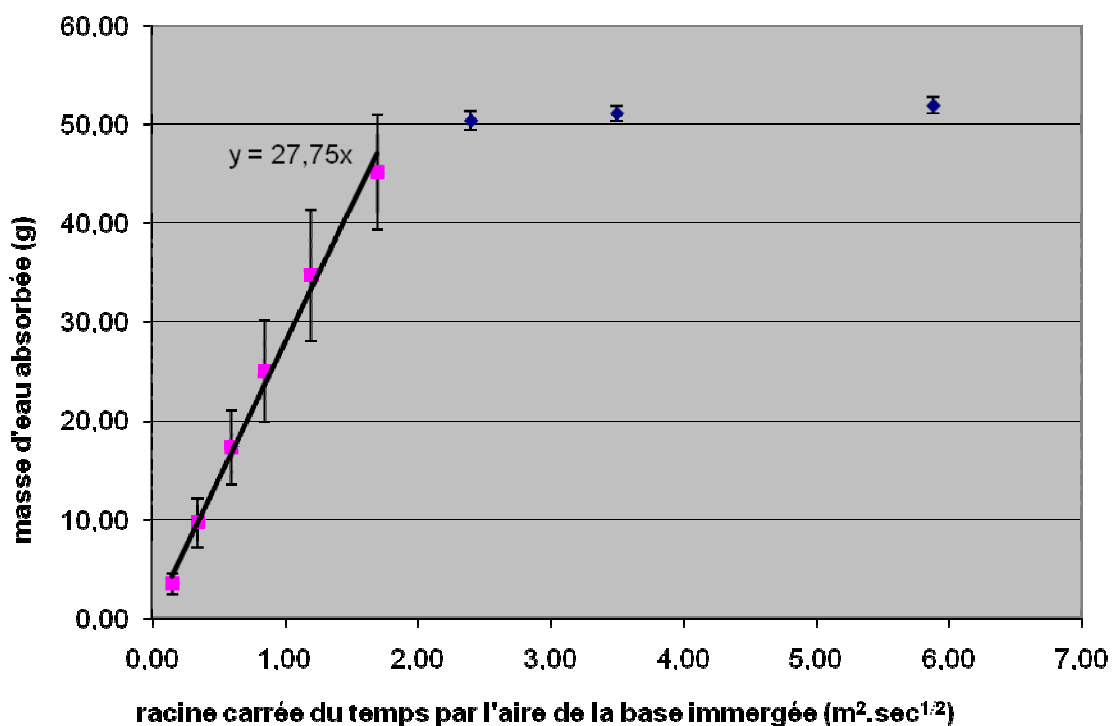
**Graphique 1 :** Courbe d'absorption de l'eau par capillarité en fonction de la racine carrée du temps, de la pierre d'Angoulême n'ayant jamais été exposée aux embruns.



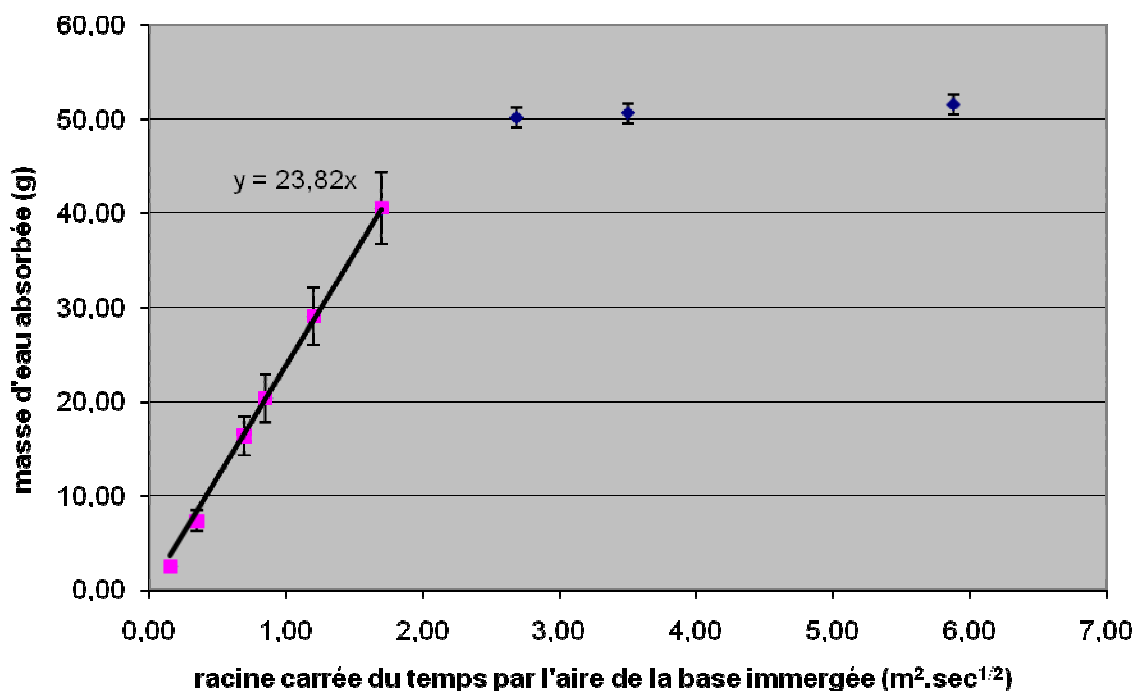
**Graphique 2 :** Courbe d'absorption de l'eau par capillarité en fonction de la racine carrée du temps, de la pierre d'Angoulême exposée aux embruns marins, prélevée au temps 1 (6 mois d'exposition).



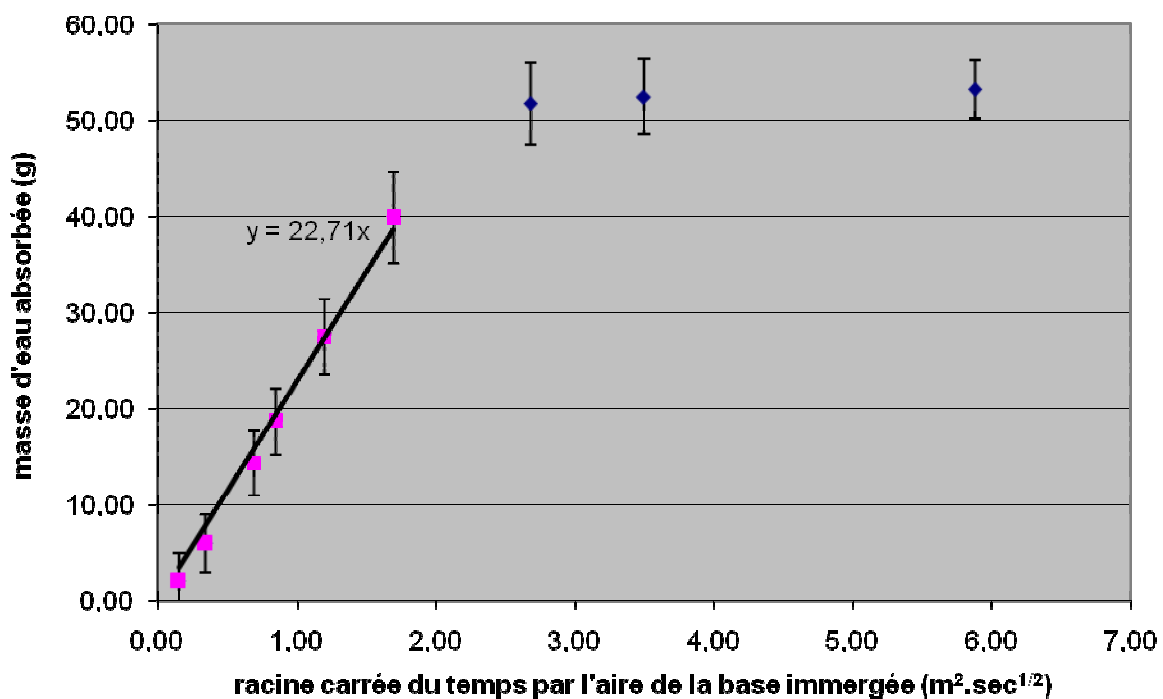
Graphique 3 : Courbe d'absorption de l'eau par capillarité en fonction de la racine carrée du temps, de la pierre d'Angoulême exposée aux embruns marins, prélevée au temps 2 (10 mois d'exposition).



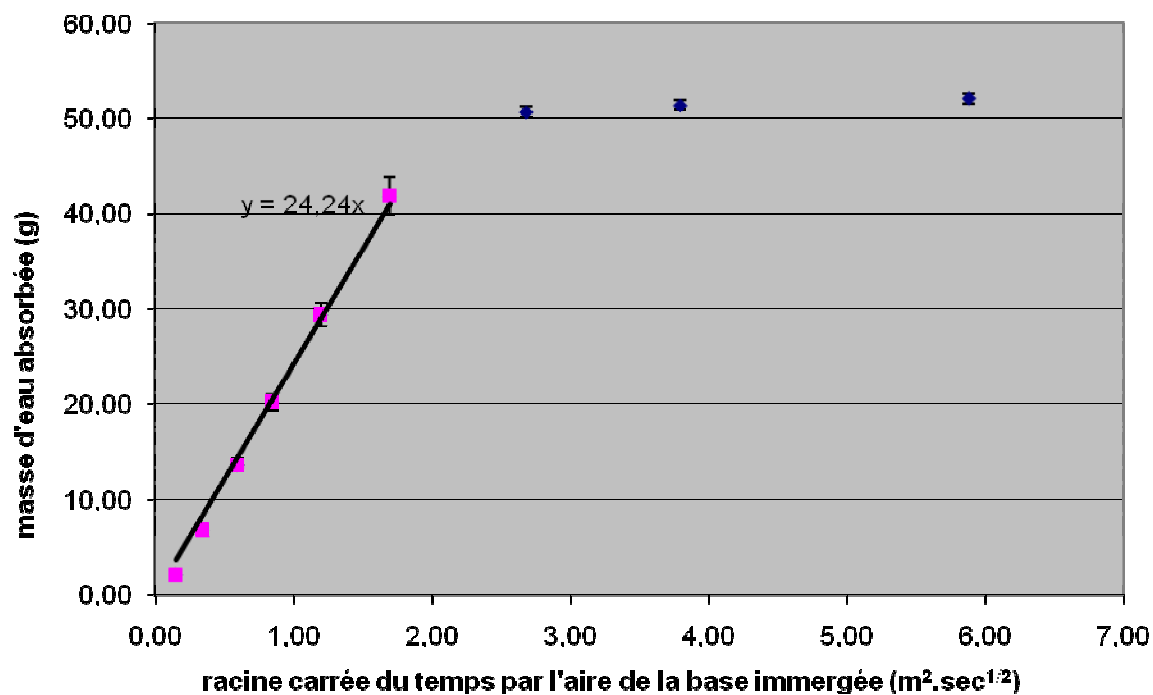
Graphique 4 : Courbe d'absorption de l'eau par capillarité en fonction de la racine carrée du temps, de la pierre d'Angoulême exposée aux embruns marins, prélevée au temps 3 (13 mois d'exposition).



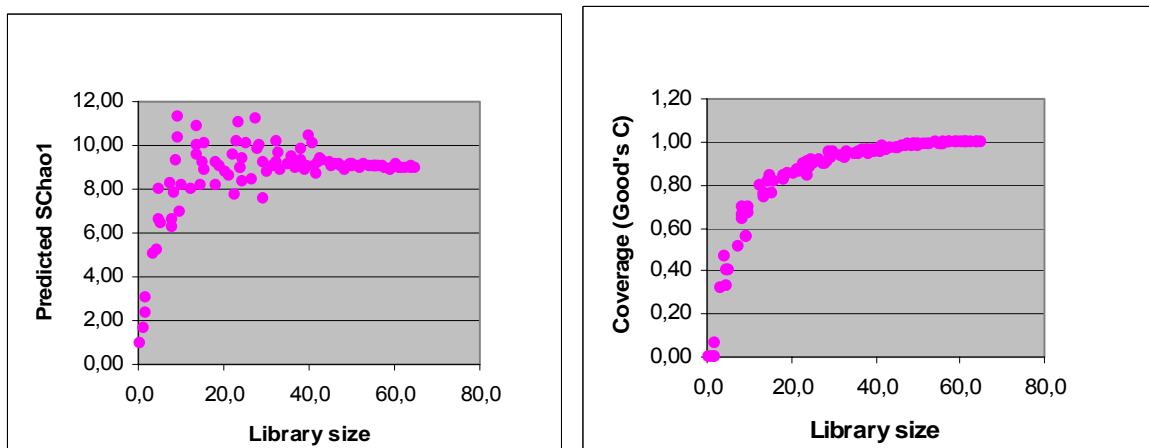
Graphique 5 : Courbe d'absorption de l'eau par capillarité en fonction de la racine carrée du temps, de la pierre d'Angoulême exposée aux embruns marins, prélevée au temps 4 (16 mois d'exposition).



Graphique 6 : Courbe d'absorption de l'eau par capillarité en fonction de la racine carrée du temps, de la pierre d'Angoulême exposée aux embruns marins, prélevée au temps 5 (19 mois d'exposition).

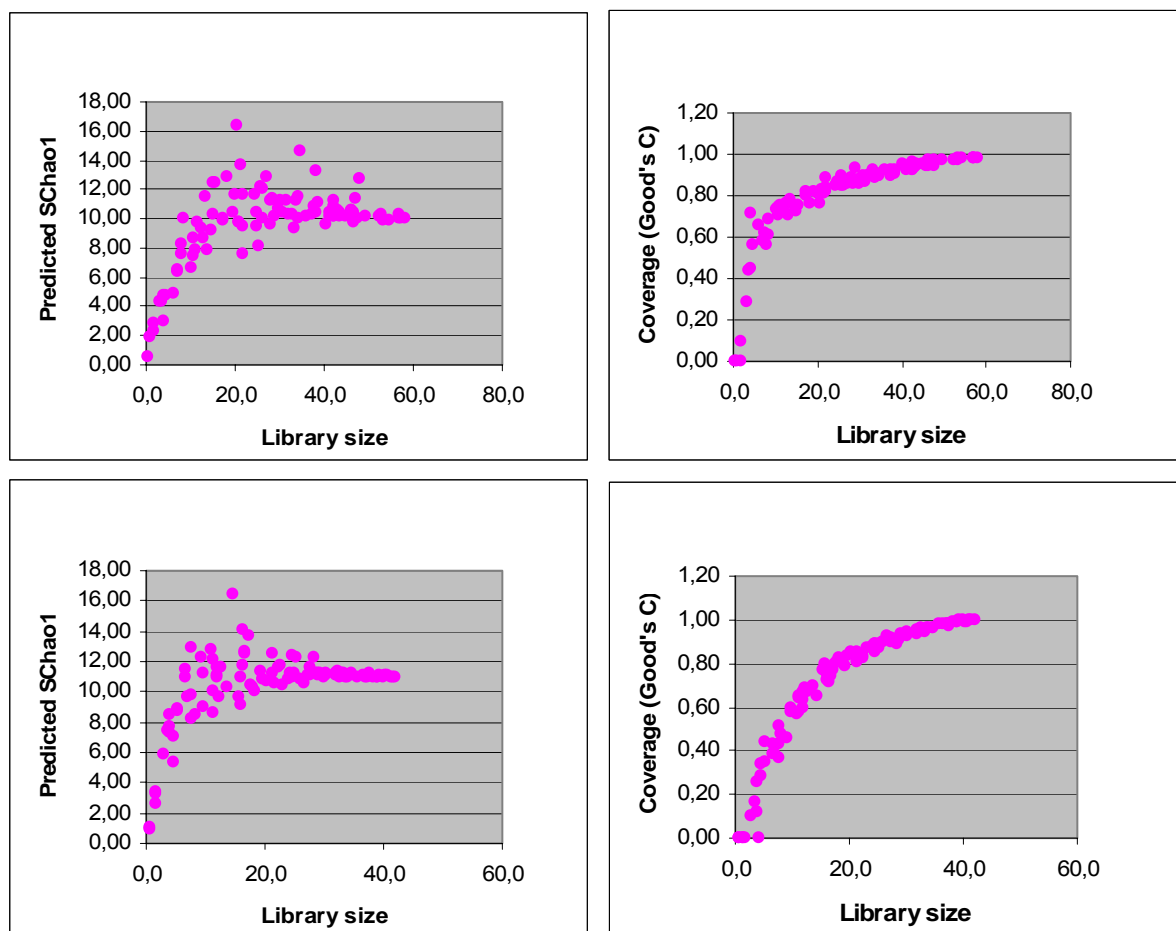


Graphique 7 : Courbe d'absorption de l'eau par capillarité en fonction de la racine carrée du temps, de la pierre d'Angoulême exposée aux embruns marins, prélevée au temps 6 (22 mois d'exposition).

**Annexe 6** : Courbes de raréfaction et de recouvrement de l'échantillon 1R

Estimation de la richesse des phylotypes (graphique de gauche) et du recouvrement (graphique de droite) en fonction de la taille de la banque de clones de l'échantillon provenant de la face recto du premier prélèvement de pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz.

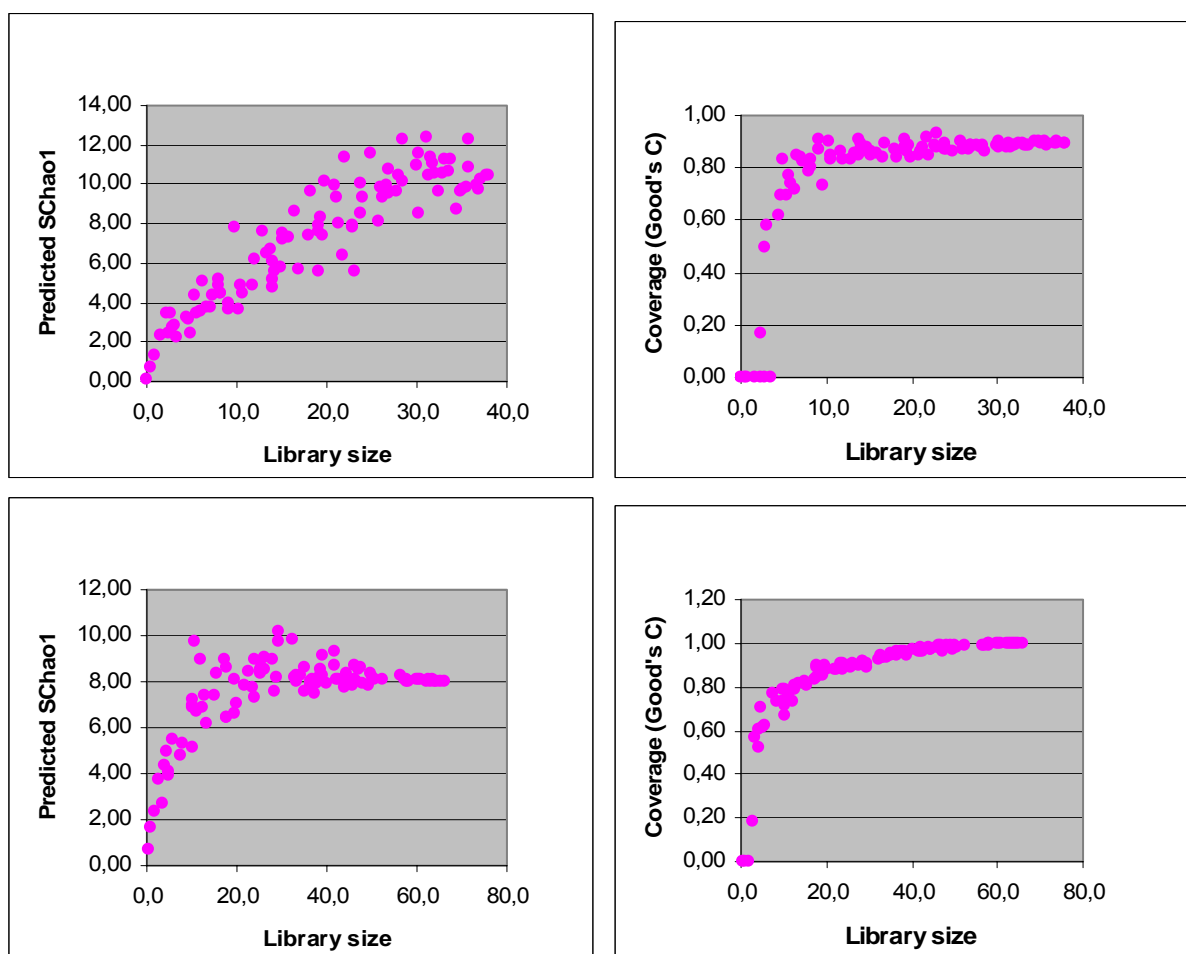
Ces graphiques représentent la banque de clones des ITS.

**Annexe 7 : Courbes de raréfaction et de recouvrement de l'échantillon 1V**


Estimation de la richesse des phylotypes (colonne de gauche) et du recouvrement (colonne de droite) en fonction de la taille de la banque de clones de l'échantillon provenant de la face verso du premier prélèvement de pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz.

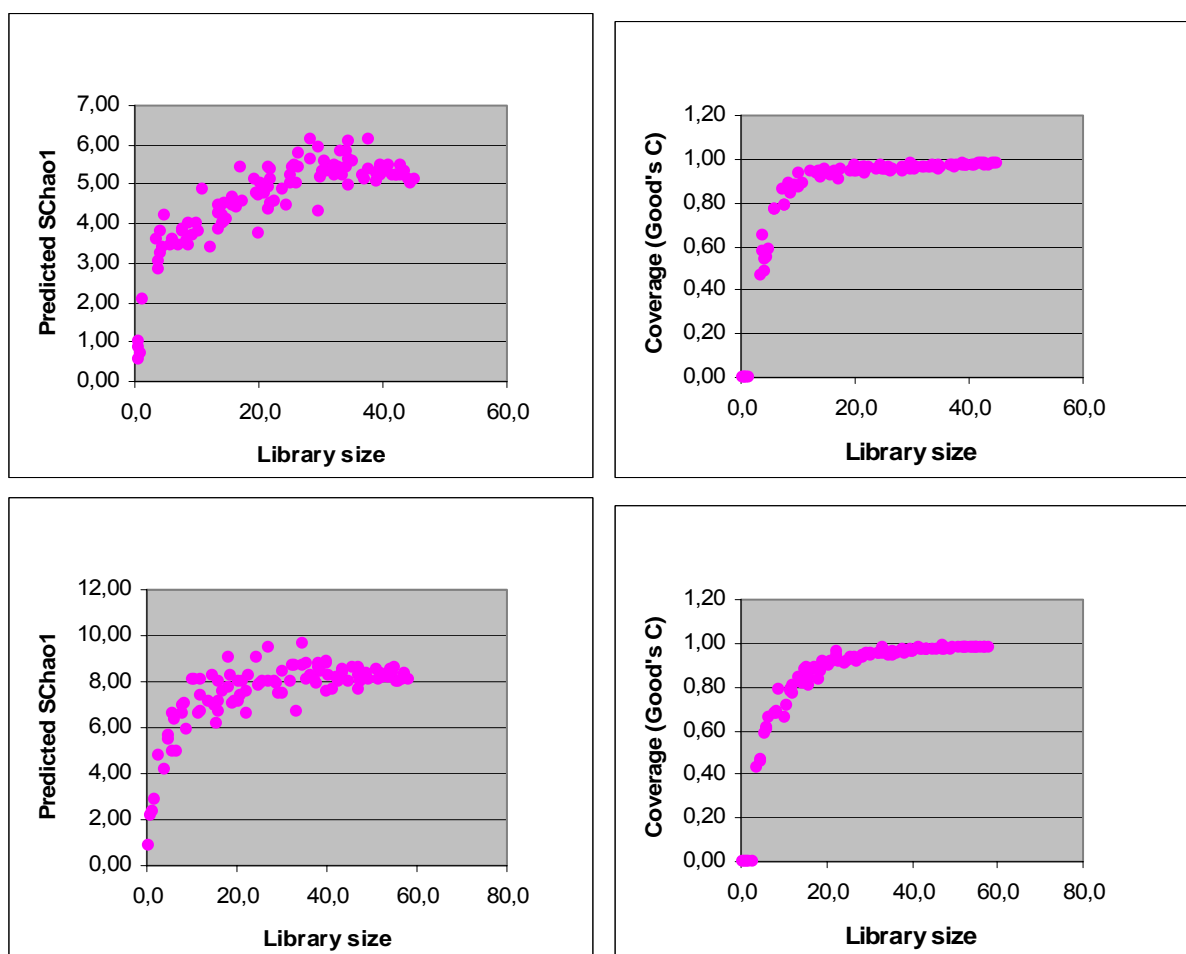
Les graphiques du haut représentent la banque de clones de l'ADNr 16S, les graphiques du bas représentent la banque de clones des ITS.



**Annexe 8 : Courbes de raréfaction et de recouvrement de l'échantillon 2R**


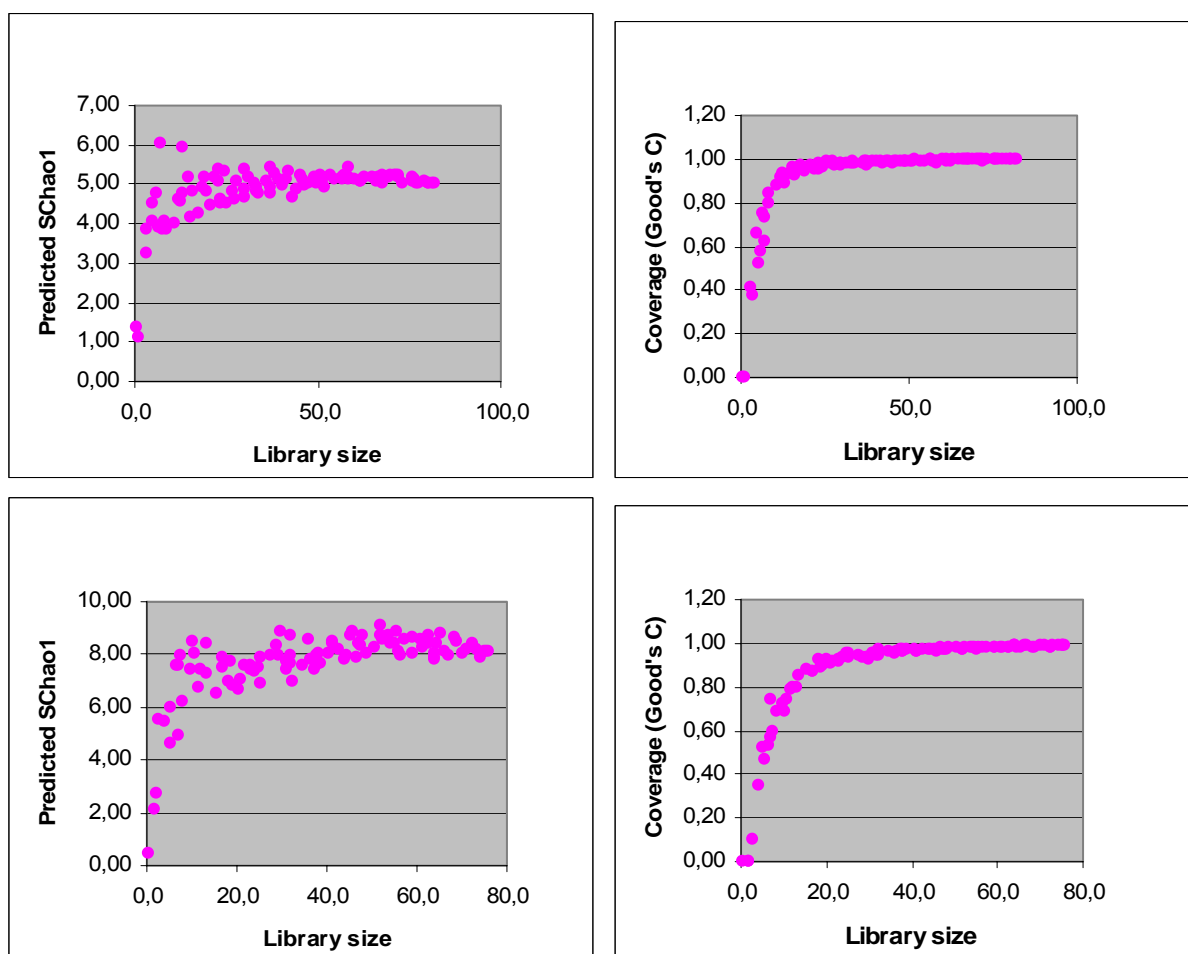
Estimation de la richesse des phylotypes (colonne de gauche) et du recouvrement (colonne de droite) en fonction de la taille de la banque de clones de l'échantillon provenant de la face recto du deuxième prélèvement de pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz.

Les graphiques du haut représentent la banque de clones de l'ADNr 16S, les graphiques du bas représentent la banque de clones des ITS.

**Annexe 9 : Courbes de raréfaction et de recouvrement de l'échantillon 2V**


Estimation de la richesse des phylotypes (colonne de gauche) et du recouvrement (colonne de droite) en fonction de la taille de la banque de clones de l'échantillon provenant de la face verso du deuxième prélèvement.

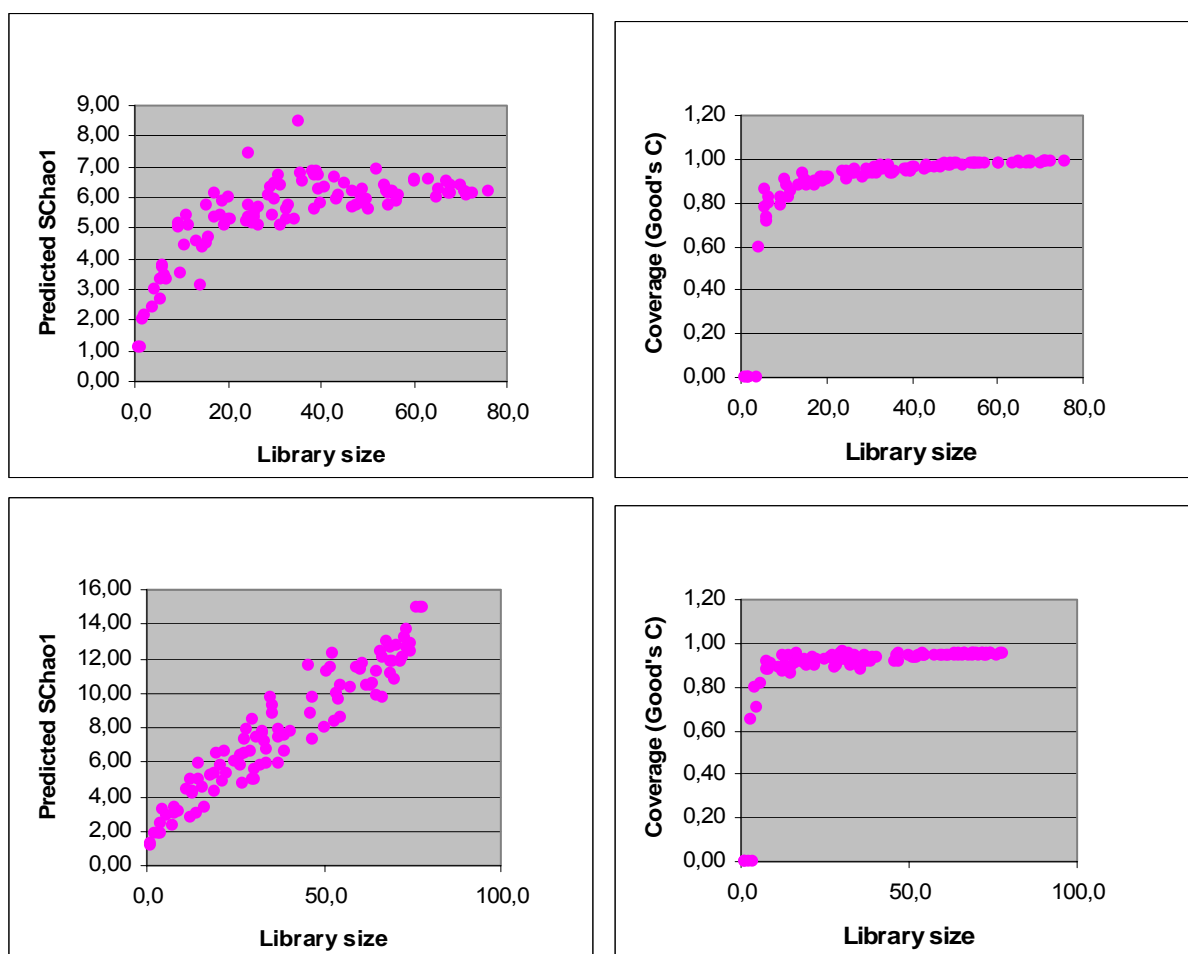
Les graphiques du haut représentent la banque de clones de l'ADNr 16S, les graphiques du bas représentent la banque de clones des ITS de pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz.

**Annexe 10 : Courbes de raréfaction et de recouvrement de l'échantillon 3R**


Estimation de la richesse des phylotypes (colonne de gauche) et du recouvrement (colonne de droite) en fonction de la taille de la banque de clones de l'échantillon provenant de la face recto du troisième prélèvement de pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz.

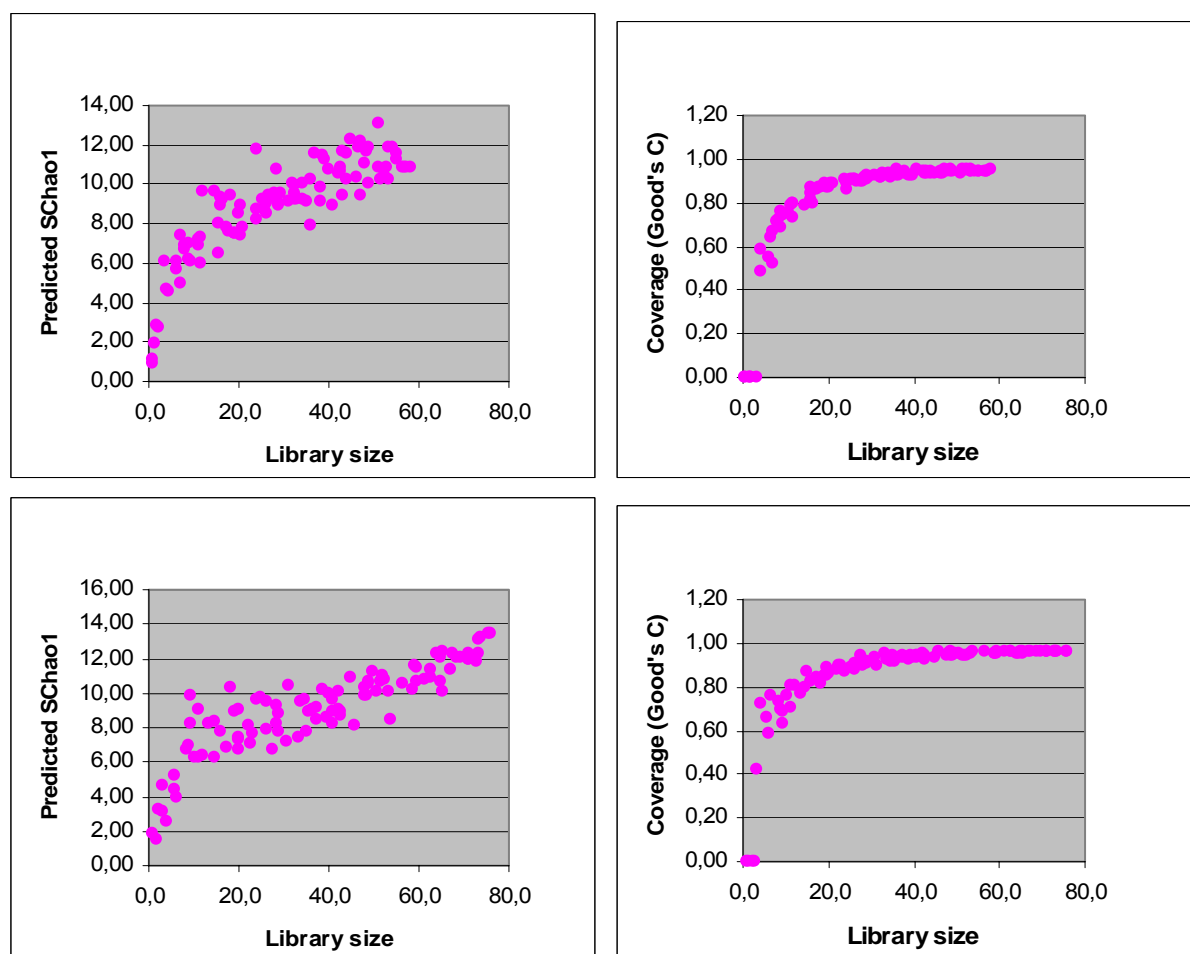
Les graphiques du haut représentent la banque de clones de l'ADNr 16S, les graphiques du bas représentent la banque de clones des ITS.

## Annexe 11 : Courbes de raréfaction et de recouvrement de l'échantillon 3V



Estimation de la richesse des phylotypes (colonne de gauche) et du recouvrement (colonne de droite) en fonction de la taille de la banque de clones de l'échantillon provenant de la face verso du troisième prélèvement de pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz.

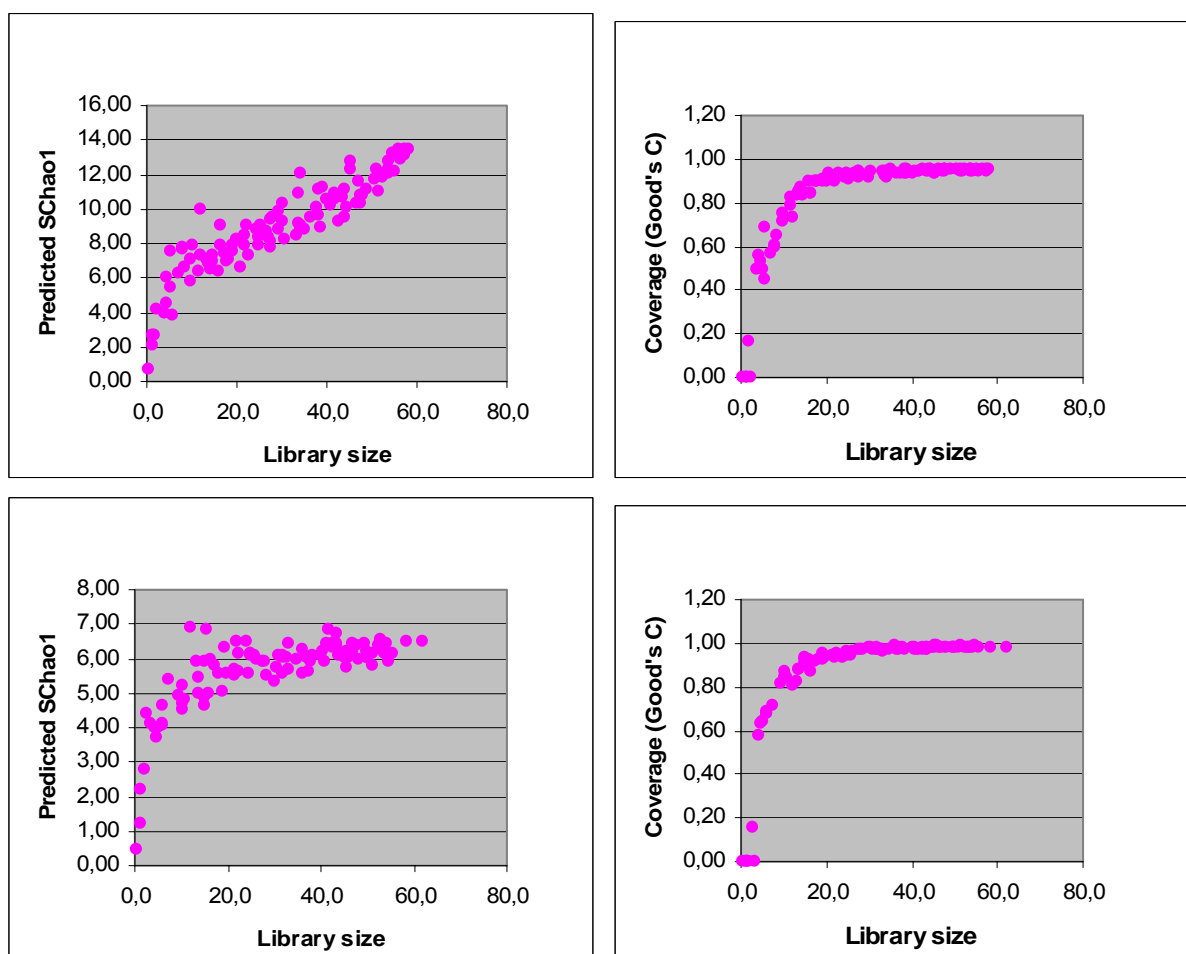
Les graphiques du haut représentent la banque de clones de l'ADNr 16S, les graphiques du bas représentent la banque de clones des ITS.

**Annexe 12 : Courbes de raréfaction et de recouvrement de l'échantillon 4R**


Estimation de la richesse des phylotypes (colonne de gauche) et du recouvrement (colonne de droite) en fonction de la taille de la banque de clones de l'échantillon provenant de la face recto du quatrième prélèvement de pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz.

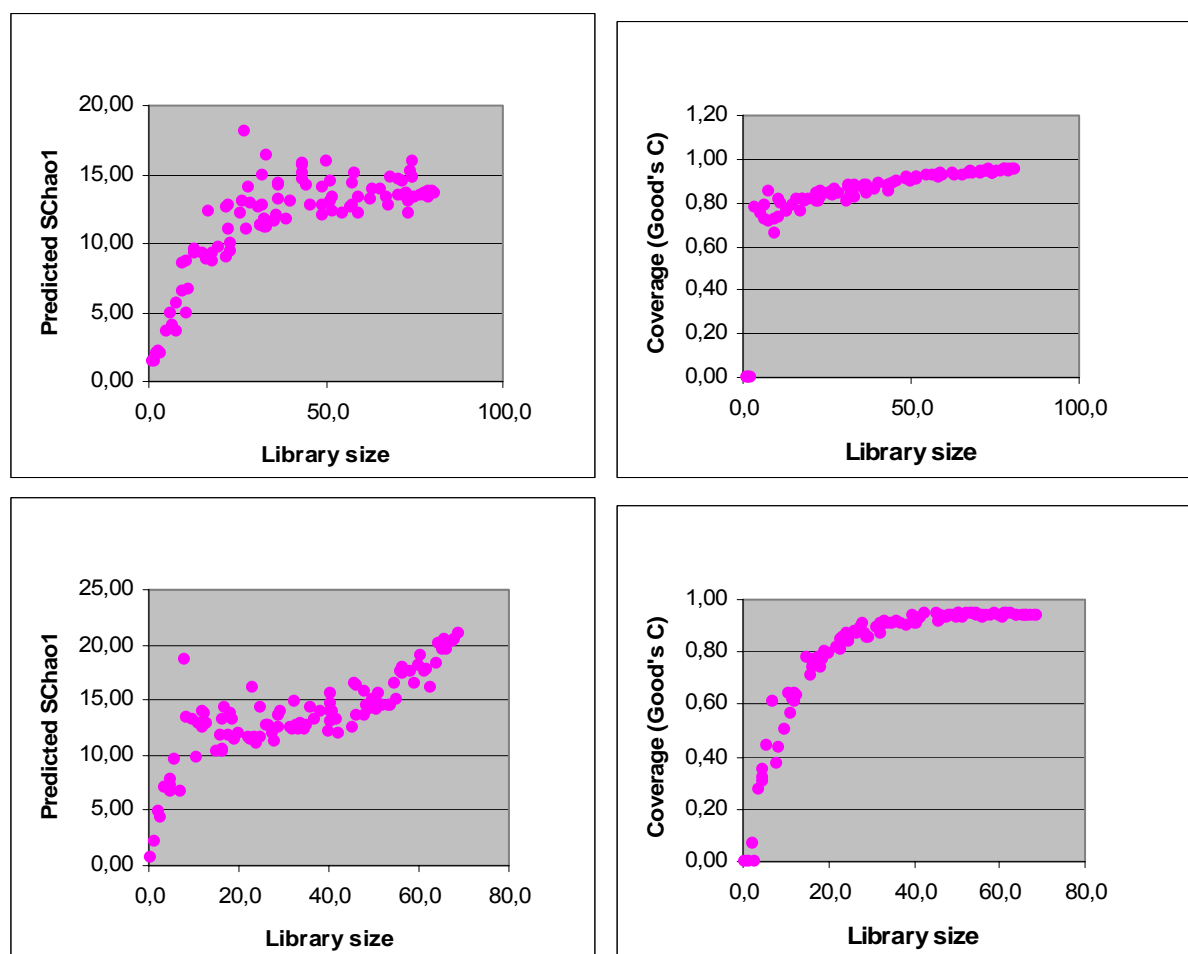
Les graphiques du haut représentent la banque de clones de l'ADNr 16S, les graphiques du bas représentent la banque de clones des ITS.

## Annexe 13 : Courbes de raréfaction et de recouvrement de l'échantillon 4V



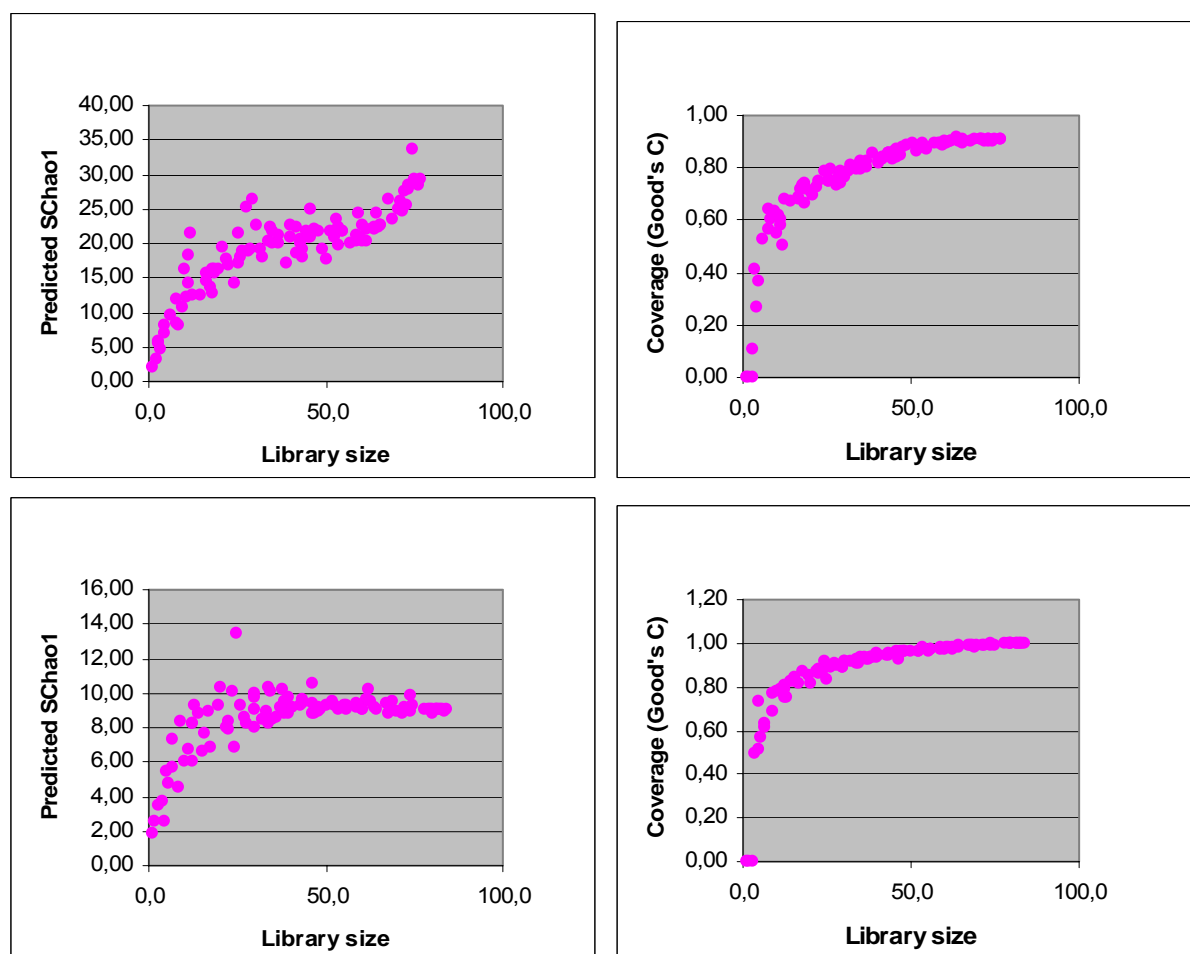
Estimation de la richesse des phylotypes (colonne de gauche) et du recouvrement (colonne de droite) en fonction de la taille de la banque de clones de l'échantillon provenant de la face verso du quatrième prélèvement de pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz.

Les graphiques du haut représentent la banque de clones de l'ADNr 16S, les graphiques du bas représentent la banque de clones des ITS.

**Annexe 14** : Courbes de raréfaction et de recouvrement de l'échantillon 5R

Estimation de la richesse des phylotypes (colonne de gauche) et du recouvrement (colonne de droite) en fonction de la taille de la banque de clones de l'échantillon provenant de la face recto du cinquième prélèvement de pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz.

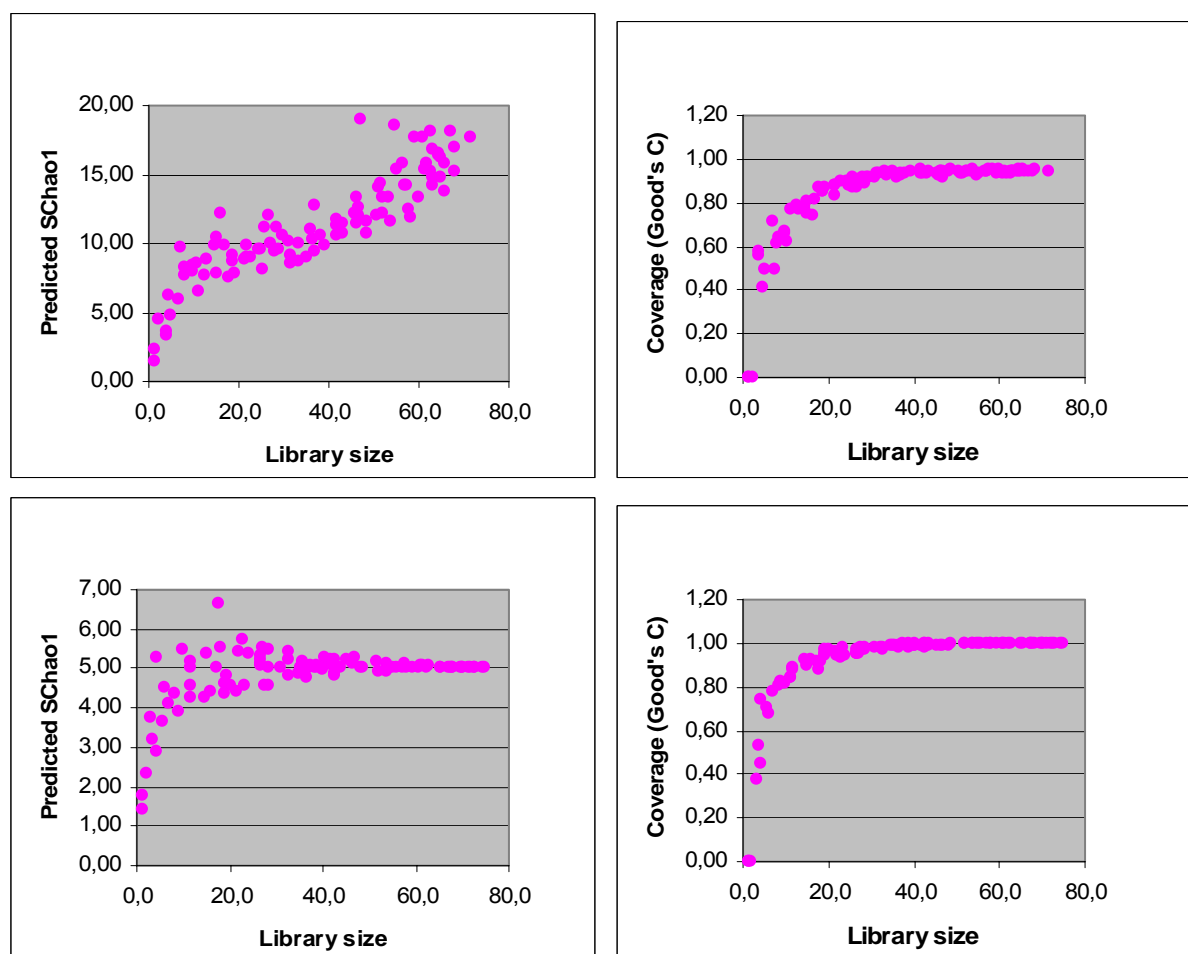
Les graphiques du haut représentent la banque de clones de l'ADNr 16S, les graphiques du bas représentent la banque de clones des ITS.

**Annexe 15** : Courbes de raréfaction et de recouvrement de l'échantillon 5V

Estimation de la richesse des phylotypes (colonne de gauche) et du recouvrement (colonne de droite) en fonction de la taille de la banque de clones de l'échantillon provenant de la face verso du cinquième prélèvement de pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz.

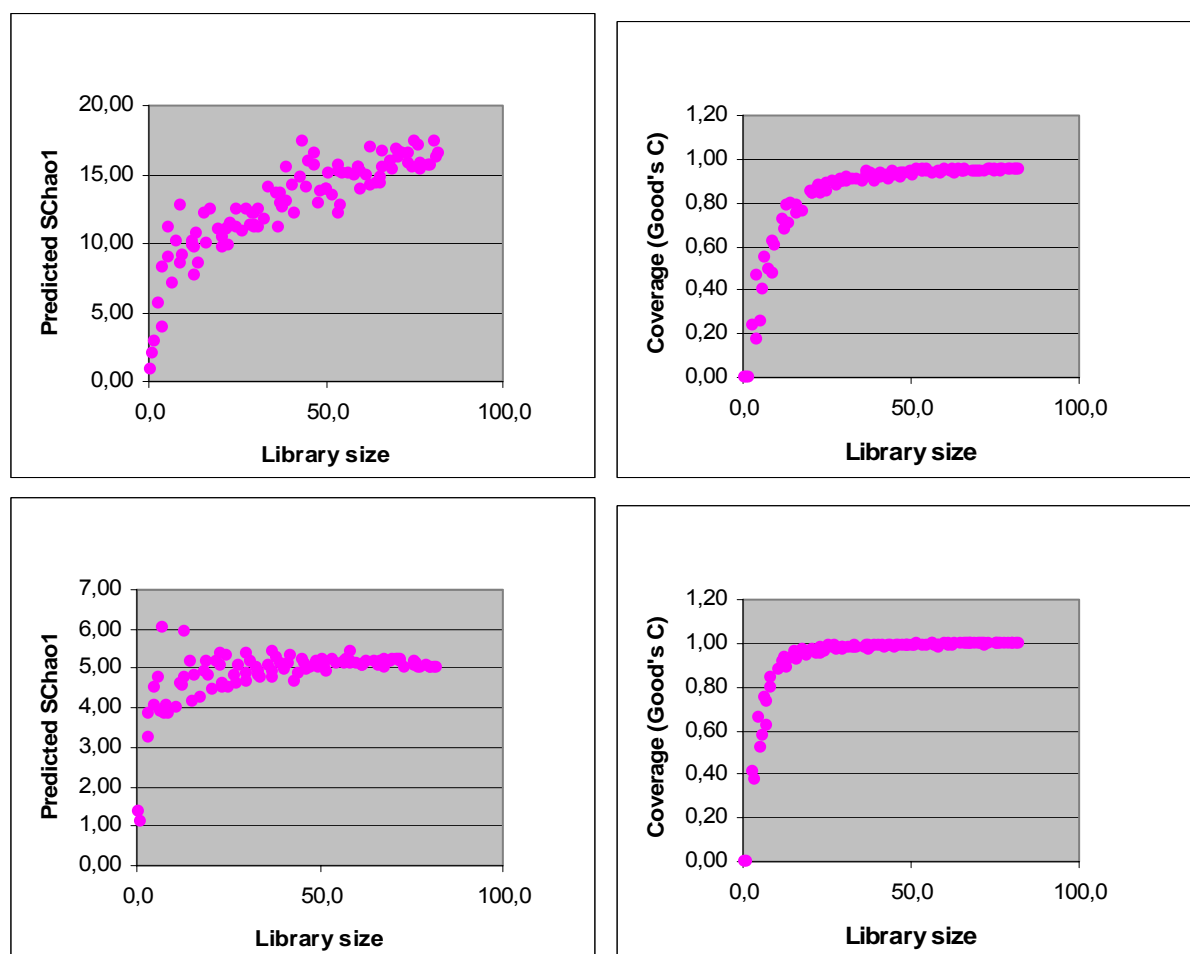
Les graphiques du haut représentent la banque de clones de l'ADNr 16S, les graphiques du bas représentent la banque de clones des ITS.



**Annexe 16 : Courbes de raréfaction et de recouvrement de l'échantillon 6R**


Estimation de la richesse des phylotypes (colonne de gauche) et du recouvrement (colonne de droite) en fonction de la taille de la banque de clones de l'échantillon provenant de la face recto du sixième prélèvement de pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz.

Les graphiques du haut représentent la banque de clones de l'ADNr 16S, les graphiques du bas représentent la banque de clones des ITS.

**Annexe 17** : Courbes de raréfaction et de recouvrement de l'échantillon 6V

Estimation de la richesse des phylotypes (colonne de gauche) et du recouvrement (colonne de droite) en fonction de la taille de la banque de clones de l'échantillon provenant de la face verso du sixième prélèvement de pierres exposées sur la terrasse du musée de la mer de Biarritz.

Les graphiques du haut représentent la banque de clones de l'ADNr 16S, les graphiques du bas représentent la banque de clones des ITS.