

---

---

# MATÉRIELS ET MÉTHODES

## 1. La matrice cimentaire

### 1.1. Confection et conservation des éprouvettes

#### 1.1.1. Détermination du rapport Eau/Ciment (E/C)

La première étape dans la préparation des éprouvettes a été de déterminer le rapport E/C de travail. Ce premier point est important pour la suite de l'étude car le rapport E/C détermine la porosité capillaire de la pâte de ciment : plus ce rapport est élevé, plus la porosité capillaire est importante, mais aussi plus la pâte de ciment est liquide avec un ressuage\* important. Plusieurs éprouvettes de pâtes de ciment sont coulées avec différents rapports E/C dans des moules cylindriques en plastique transparent. Nous avons noté dans chaque cas le ressuage de l'eau, et la texture de la pâte (+/- liquide). Il est apparu que le meilleur compromis est obtenu pour un rapport E/C=0,55. C'est avec cette valeur que nous travaillerons par la suite.

#### 1.1.2. Confection des éprouvettes

Dans un premier temps, des éprouvettes de deux tailles différentes ont été confectionnées.



Les essais réalisés pour la mise au point de l'essai de carbonatation accélérée (cf. annexe F) ont montrés que la carbonatation était plus homogène et rapide pour les petites éprouvettes. L'étude est donc réalisée avec les petites éprouvettes.

---

\* Ressuage : remontée d'eau à la surface d'un coulis de ciment, d'un mortier ou d'un béton après la mise en place.

Le ciment est mélangé à l'eau dans un malaxeur 4 litres, 1 minute à petite vitesse, puis après homogénéisation de la pâte manuellement, 2 minutes à grande vitesse. Les moules sont ensuite remplis à moitié, placés sur table à vibrations pendant 30 secondes, puis complétés. Après arasage de la surface, un film plastique est placé sur les moules pour éviter les contacts avec l'air.

### 1.1.3. Conservation des éprouvettes

Les éprouvettes sont démoulées après 24 heures, puis conservées 28 jours à 100% d'humidité relative et à 21°C. Elles sont ensuite emballées individuellement sous film plastique de polyéthylène afin d'éviter les contacts avec l'air, avant leur utilisation.

## 1.2. Vieillessement accéléré

### 1.2.1. La carbonatation

Le dispositif expérimental est placé dans une pièce fermée où la température est réglée à  $21\pm 1^\circ\text{C}$ , l'humidité relative est de  $65\pm 5\%$ . Le montage se compose principalement de 3 parties (Figure 13) :

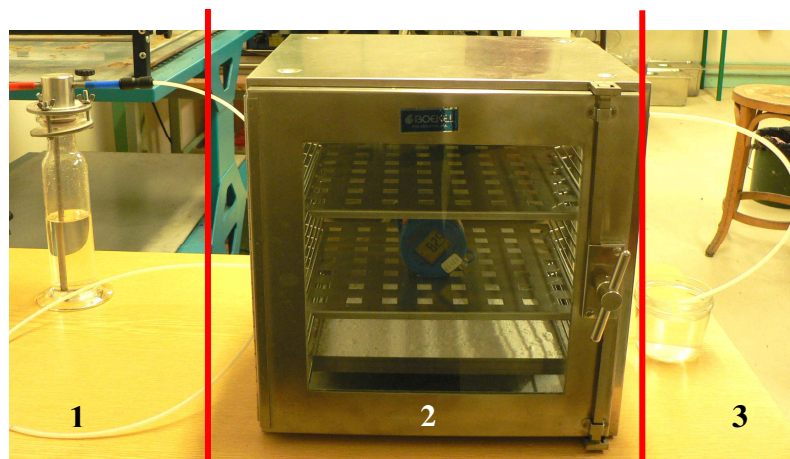


Figure 13 : Dispositif expérimental pour l'essai de carbonatation accélérée

- le premier compartiment est constitué par le barboteur : son rôle est de faire buller le gaz ( $\text{CO}_2$ ) dans l'eau avant l'entrée dans l'enceinte afin de pouvoir réguler le débit et amener une certaine humidité.

- l'enceinte compose la seconde partie du montage : c'est un dessiccateur (30 x 30 x 25 cm<sup>3</sup>), partagé en 3 étages. Les deux étagères supérieures sont destinées à recevoir les éprouvettes pendant l'essai, l'étagère inférieure constitue le réservoir de solution saline. Un hygromètre est placé à l'intérieur de l'enceinte, et permet d'obtenir un enregistrement de l'évolution de l'humidité relative et de la température au cours de l'essai.
- enfin, la dernière partie, constituée d'un tuyau plongeant dans l'eau, assure la sortie du gaz. Le bullage de sortie nous renseigne sur le balayage à l'intérieur de l'enceinte.

Le bullage de CO<sub>2</sub> dans l'eau provoque un apport en continu d'humidité dans l'enceinte. Une solution saline de carbonate de potassium : K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Normapur AR) est utilisée afin de réguler l'humidité relative à une valeur proche de 65% à l'intérieur de l'enceinte :

Les éprouvettes subissent un prétraitement et sont placées 24 heures dans une enceinte à 40°C avant l'essai de carbonatation accélérée.

La profondeur de carbonatation est mesurée au moyen d'un indicateur de pH, la phénolphthaléine, dont le pH de virage se situe autour de 9. La matrice cimentaire non carbonatée se colore en rose tandis que la partie carbonatée ne change pas de couleur.

### 1.2.2. La lixiviation

Le dispositif expérimental est composé d'un bac en polypropylène d'une contenance de 10 litres (Figure 14). Le bac est alimenté en continu par de l'eau distillée par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique (Ismatec labortechnik analytik ISM 834), le débit est réglé à 7 ml/min ce qui représente un renouvellement total de la solution lixiviante du bac en 24 heures. Trois éprouvettes 1 x 2,5 x 8,5 cm<sup>3</sup> sont placées dans le bac, elles sont retournées à intervalle de temps régulier, afin d'homogénéiser la lixiviation. La solution lixiviante est agitée en permanence avec un agitateur magnétique placé au fond du bac. Une électrode pH mesure le pH de la solution lixiviante en continu. Toutes les semaines, les éprouvettes sont retirées du bac, et le pH de surface est mesuré avec une électrode de contact Sentix Sur, pour avoir des données plus précises sur l'évolution du pH de la matrice.

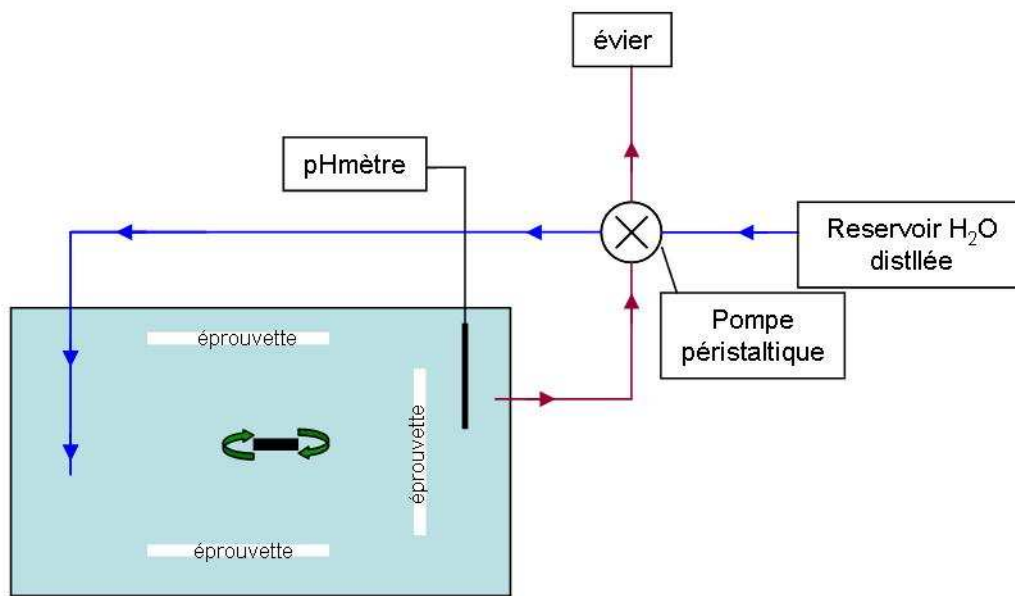


Figure 14 : Dispositif expérimental pour l'essai de lixiviation

### 1.3. Techniques analytiques

#### 1.3.1. Diffractométrie des rayons X (DRX)

La diffraction des rayons X permet l'analyse non destructive d'échantillons cristallisés. L'interaction d'un faisceau de rayons X avec la matière donne naissance à une émission dans toutes les directions d'un rayonnement de même longueur d'onde et de phase cohérente. La diffusion d'un ensemble d'atomes, entraîne une interférence des ondes cohérentes diffusées par chaque atome (Broll, 1996). Cette onde, dite diffractée, dépend de la structure atomique de la matière. La direction du faisceau diffracté est donnée par la loi de Bragg :

$$n\lambda = 2.d.\sin\theta$$

$n$  = ordre de diffraction

$\lambda$  = longueur d'onde du rayonnement diffracté

$d$  = distance interréticulaire séparant deux plans de même famille (h, k, l)

La diffractométrie des rayons X est réalisée sur un appareil Bruker D8 advance. On utilise la raie K $\alpha$ 1 du cuivre ( $\lambda = 0,15406$  nm). Le dispositif comprend une anticathode de cuivre et un détecteur ponctuel. L'analyse se fait sur une plage  $2\theta$  allant de 5 à 59°. Les analyses sont

effectuées sur les échantillons massifs de ciment hydraté après une cure de conservation de 28 jours à 100% HR, les éprouvettes carbonatées, les éprouvettes carbonatées et lixiviées.

### 1.3.2. Spectrométrie InfraRouge à Transformée de Fourier (IRTF)

En spectrométrie infrarouge, les rotations et les vibrations moléculaires sont le résultat de l'absorption d'un rayonnement électromagnétique dans le domaine de l'infrarouge. La position d'une bande d'absorption est donnée par la longueur d'onde  $\lambda$ .

La longueur d'onde  $\lambda$  peut être convertie en nombre d'onde  $\bar{\nu}$  par la formule :

$$\bar{\nu} (\text{cm}^{-1}) = 1/\lambda (\mu\text{m})$$

La région normale d'un spectre infrarouge s'étend de 4000 à 400  $\text{cm}^{-1}$ .

Energie et nombre d'onde sont liés par la loi de Planck :

$$\Delta E = h.c. \bar{\nu}$$

$h$  = constante de Planck ;

$\Delta E$  = différence entre deux niveaux d'énergie (électronique, vibrationnels ou rotationnels) caractérisés par des nombres quantiques différents.

$c$  = vitesse de propagation de la lumière

L'appareil est un spectromètre à transformée de Fourier BIORAD FTS 185 (digilab). Les échantillons de ciment non vieillis, carbonatés, et carbonatés puis lixiviés sont analysés en mode Réflexion Totale Atténuée (ATR) (cf. Annexe G). Les spectres sont enregistrés avec une résolution de 2  $\text{cm}^{-1}$  et avec 32 scans.

### 1.3.3. Fluorescence X

L'analyse par fluorescence X permet de déterminer quantitativement la teneur en éléments exprimée en équivalent d'oxydes du ciment de l'étude (Tableau 3).

Oxydes	Teneur
%SiO <sub>2</sub>	21,84
% Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	4,13
% Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,28
% CaO	65,82
% MgO	0,61
%SO <sub>3</sub> Leco	2,56
% MnO	0,001
% TiO <sub>2</sub>	0,2
% K <sub>2</sub> O	0,11
% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,07
% Na <sub>2</sub> O	0,04

**Tableau 3 : Composition chimique en équivalent d'oxydes du ciment anhydre utilisé pour l'étude**

A partir de la teneur en oxydes, la formule de Bogue est une approximation qui permet de remonter avec précision aux concentrations relatives des phases en présence. Toutefois, cette approximation parfaitement exacte dans le cas du clinker nécessite une correction pour être valable dans le cas du ciment. En effet, il faut tenir compte du CaO présent dans la chaux libre et le gypse. Ainsi, un facteur correctif est appliqué à la teneur en CaO expérimentale, en déduisant 0,7 fois la teneur en SO<sub>3</sub> pour obtenir la teneur en CaO corrigée (Tableau 4).

$$C_3S = 4,0710 C - 7,6024 S - 1,4297 F - 6,7181 A$$

$$C_2S = -3,0710 C + 8,6024 S + 1,0785 F + 5,0683 A$$

$$C_3A = -1,6920 F + 2,6504 A$$

$$C_4AF = 3,0432 F$$

Phases	teneur après correction
% C <sub>3</sub> S	66,47
% C <sub>2</sub> S	12,48
% C <sub>3</sub> A	10,47
% C <sub>4</sub> AF	0,85

**Tableau 4 : Formule de Bogue et teneur des phases du ciment anhydre utilisé pour l'étude**

### 1.3.4. Pycnométrie à hélium

La densité d'éprouvettes non-vieilles, carbonatées, et carbonatées puis lixiviées est déterminée par pycnométrie à hélium. L'appareil utilisé est un AccuPyc 1330 Micromeritics. Le pycnomètre permet de déterminer le volume d'un matériau donné. Connaissant sa masse, on en déduit sa masse volumique. Le principe du pycnomètre à hélium repose sur la loi de Mariotte. Un échantillon de volume  $V_s$  est placé dans une cellule de mesure de volume  $V_1$  connu (Figure 15).

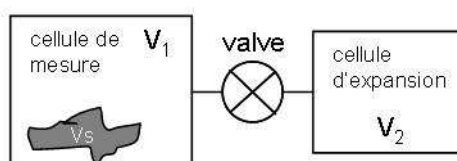


Figure 15 : Schéma simplifié du pycnomètre

Après avoir purgé l'air de cette cellule, on la remplit de gaz (hélium). Lorsque la pression est stabilisée à la valeur  $P_1$ , on opère alors une détente, par l'ouverture d'une vanne, dans une deuxième cellule de volume  $V_2$  initialement vide puis on attend l'équilibre. Lorsque celui-ci est atteint, on mesure la nouvelle valeur  $P_2$  de la pression. En considérant le gaz comme un gaz parfait, il est facile de montrer que le volume  $V_s$  du solide que l'on a introduit dans la cellule est donné par (1) :

$$V_s = V_1 - \frac{V_2 \cdot P_2}{P_1 - P_2} \quad (1)$$

### 1.3.5. Porosimétrie par intrusion de mercure

Cette technique repose sur le principe que tout liquide non mouillant peut pénétrer dans les pores d'un corps poreux sous l'effet d'une pression  $p$  sur ce liquide ; la pression doit être d'autant plus élevée que le rayon de pore  $r$  est petit, obéissant à l'équation de Washburn et Jurin (2) :

$$p = \frac{-2 \gamma \cos \theta}{r} \quad (2)$$

$\gamma$  = tension superficielle du liquide (480 dynes/cm pour le mercure)

$\theta$  = angle de mouillage du liquide avec le matériau (130° pour le mercure)

Parmi les liquides non mouillants, le plus utilisé est le mercure. L'intérêt de cette méthode est de pouvoir établir un histogramme de distribution des diamètres d'accès des pores (Charpin et Rasneur, 1983 ; Girodet, 1996).

### **1.3.6. Microscopie Electronique à Balayage (MEB)**

#### ***1.3.6.1. Observation des éprouvettes en ciment***

Des éprouvettes non-veillées, carbonatées, et carbonatées puis lixiviées sont cassées. Après une métallisation à l'or, les échantillons correspondant à la surface des éprouvettes sont observés au MEB conventionnel JEOL 840 à l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne.

#### ***1.3.6.2. Observations de sections polies***

Les sections polies d'éprouvettes non-veillées, carbonatées, et carbonatées puis lixiviées sont préparées par imprégnation sous vide dans une résine époxy. Elles sont réalisées par Patrick Dégrugilliers au Département Génie Civil de l'Ecole des Mines de Douai. Après métallisation par une couche d'or/palladium, les sections polies sont observées au MEB JEOL 840 couplé à une sonde d'analyse X à dispersion d'énergie (EDS). La microanalyse X permet une analyse élémentaire, par détection des raies caractéristiques des éléments en présence. Elle permet des analyses ponctuelles avec une résolution spatiale de l'ordre de  $1 \mu\text{m}^3$ . Elle est qualitative et quantitative. Nous dosons les éléments suivants : le silicium, le calcium, l'aluminium et le soufre au cœur et en surface de nos échantillons. Les observations MEB couplées à l'analyse EDS nous permettent de suivre l'évolution de la microstructure et de la composition chimique de la matrice avec le vieillissement accéléré.



### ***1.3.6.3. Préparation des échantillons biologiques***

Les échantillons biologiques contiennent beaucoup d'eau ainsi que d'autres liquides. Dans le vide du microscope, cette eau va s'évaporer violemment et la structure de l'échantillon va s'effondrer. Pour remédier à cet inconvénient, les échantillons hydratés doivent subir un traitement de fixation suivi d'une étape de déshydratation. Nos échantillons sont préparés selon le protocole proposé par Urzì et Albertano (2001) : les échantillons sont fixés chimiquement dans une solution de paraformaldéhyde 2% (m/v) toute la nuit à 4°C. Ils sont ensuite rincés trois fois dans un tampon phosphate 0,01M pendant 10 minutes. La déshydratation est réalisée en plongeant les échantillons dans des solutions d'éthanol de plus en plus concentrées : 70%, 85%, et 95% (v/v) puis dans l'éthanol anhydre (100%), 15 minutes dans chaque. Les échantillons sont ensuite séchés à l'air avant la métallisation à l'or/palladium. Les observations sont réalisées au MEB conventionnel, et pour certains échantillons, au MEB équipé d'un canon à émission de champ (FEG : Field Emission Gun).

### **1.3.7. Microscopie optique, et stéréoscopique**

Pendant le test de biodétérioration, les éprouvettes sont directement observées au stéréomicroscope Wild Heerbrugg M8 à l'École des Mines de Saint-Etienne, et avec un Leica Wild M10 à l'Université de Messine, avec des grossissements compris entre 6 et 80.

Des montages entre lame et lamelle de prélèvements de culture fongique sont réalisés afin d'observer la morphologie des souches, durant leur développement sur milieu de culture, au microscope optique (Olympus - BH<sub>2</sub>).

## **1.4. La stérilisation des éprouvettes**

La manipulation de micro-organismes nécessite certaines mesures de sécurité, comme le travail sous hotte à flux laminaire, ou encore à proximité d'une flamme, ayant pour but d'éviter toutes sources de contamination de la culture, mais également de l'environnement de travail. Il est donc nécessaire de stériliser tout matériel et objet faisant partie de l'expérimentation.

Le but de la stérilisation d'un objet est la destruction ou l'inactivation irréversible de tous les micro-organismes qui se trouvent dans ou sur cet objet. Etant donné qu'un objet stérile peut être contaminé par contact avec le milieu extérieur, une première exigence est de conditionner l'objet avant la stérilisation. Ce n'est qu'au moment de son utilisation qu'il peut être déballé

de manière aseptique. Le conditionnement et le mode de conservation du matériel stérile font intégralement partie de la stérilisation.

L'efficacité de la stérilisation dépend de trois facteurs : (i) le temps d'exposition à l'agent létal, (ii) la dimension de la population microbienne, (iii) le taux de mortalité des micro-organismes à détruire. Ce dernier facteur est lui-même influencé par la nature du micro-organisme, ainsi que par la nature et l'intensité de l'agent létal (Regnault, 1990).

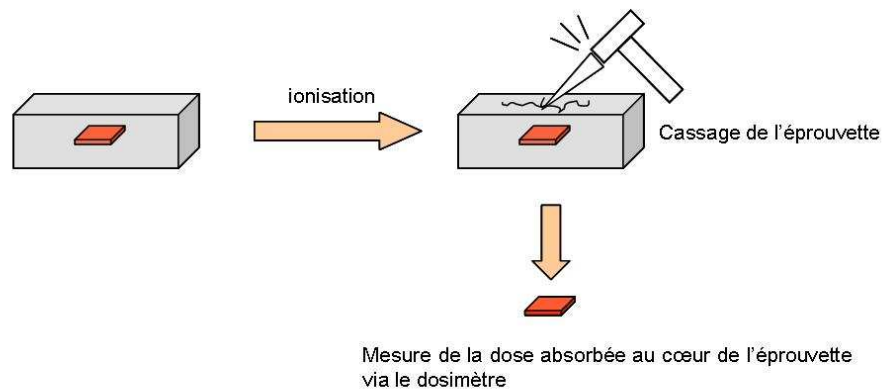
Différentes méthodes de stérilisation existent (stérilisation à la chaleur humide, à l'oxyde d'éthylène, expositions aux UV, ionisation...). Le choix se fait selon les contraintes imposées par l'objet à stériliser, sa résistance ou non aux températures et pressions élevées, par exemple.

Les éprouvettes sont stérilisées après 28 jours de conservation à 100% HR, ou après l'étape de vieillissement accéléré.

#### **1.4.1. Stérilisation par rayonnements ionisants**

L'ionisation des éprouvettes par rayonnement gamma est réalisée au centre du Commissariat à l'Energie Atomique de Cadarache. Les éprouvettes sont emballées sous film de polyéthylène et déposées à l'intérieur d'un cylindre ( $\varnothing=12$  cm,  $h=30$  cm). Le cylindre descend dans la chambre d'ionisation, où il est proche de la source. Pendant l'ionisation, le cylindre tourne sur lui-même, ce qui permet une ionisation homogène de toutes les éprouvettes. La dose délivrée est calculée à partir de la densité du matériau à ioniser, par l'intermédiaire d'un logiciel de calcul. Ce logiciel est paramétré pour des densités  $\leq 1$  (densité de l'eau), il détermine en fonction de la densité le temps d'ionisation nécessaire. Plus la densité est élevée, plus le temps d'ionisation est élevé. Pour des matériaux ayant une densité  $\geq 1$ , l'expérimentateur estime le temps nécessaire et vérifie la dose réellement délivrée à l'aide d'un dosimètre.

Dans notre cas (ionisation d'éprouvettes en ciment), on peut estimer la dose absorbée par l'éprouvette, à partir de la densité. Pour avoir une valeur précise de la dose absorbée au cœur de l'éprouvette, nous avons préparé quelques éprouvettes contenant un dosimètre à l'intérieur. Après l'irradiation, il suffit de mesurer la dose absorbée par le dosimètre pour connaître avec certitude la dose absorbée au cœur de l'éprouvette (Figure 16). Une dose de 30kGy assure la stérilité de l'échantillon.



**Figure 16 : Mesure de la dose absorbée au cœur de l'éprouvette**

### 1.4.2. Stérilisation aux UV

Les éprouvettes sont exposées une nuit à la lumière UV de la hotte à flux laminaire, puis placées dans des boîtes stériles jusqu'à l'inoculation.

## 2. Techniques microbiologiques

Toutes les manipulations avec les micro-organismes sont effectuées en environnement stérile, sous hotte à flux laminaire.

### 2.1. Cultures fongiques

#### 2.1.1. Souches fongiques utilisées

La souche *Alternaria* utilisée pour la première partie de l'étude, *Alternaria alternata* Fries von keissler DSM 62006, provient de la collection allemande de micro-organismes DSMZ. Dans la phase finale de la mise au point du test de biodétérioration, nous travaillons avec une souche *Alternaria alternata* issue d'un prélèvement sur un monument en Inde (données non publiées).

*Aspergillus niger* DSM 823 provient de la collection DSMZ.

*Coniosporium uncinatum* – MC557 – a été isolée à partir d'un prélèvement sur une statue en marbre située dans le jardin du musée de Messine (Sicile) (De Leo et al, 1999).

*Exophiala* sp. a été isolée à partir d'un prélèvement sur un monument en Inde (données non publiées).

*Alternaria alternata*, *Coniosporium uncinatum*, *Exophiala* sp. sont conservées dans la collection du département des Sciences Microbiologiques, Génétiques et Moléculaires de l'Université de Messine.

### 2.1.2. Conditions de culture des souches fongiques

Les cultures sont réalisées en plusieurs étapes : dans la première partie de l'étude, nous travaillons uniquement avec *Alternaria alternata*. Plusieurs facteurs jouent un rôle sur la croissance du champignon tels que la température, l'humidité relative, le pH, la composition du milieu. Il est reporté dans la littérature que toutes les espèces d'*Alternaria* sporulent mieux dans des milieux pauvres en sucre tels que jus V<sub>8</sub> agar (J. Rotem, 1994). De plus, la lumière aurait un impact positif sur la sporulation de certaines souches d'*Alternaria*, bien que son rôle ne soit pas complètement élucidé. Nous avons donc choisi d'étudier l'influence du milieu de culture et de la lumière sur la sporulation.

Trois milieux solides de culture sont testés : Agar Jus V<sub>8</sub>, Agar jus V<sub>8</sub> modifié (le jus de légumes est remplacé par de la purée de tomates) et Czapeck-Dox modifié (le saccharose est remplacé par la cellulose en poudre), dont les compositions sont détaillées en annexes. Le pH des milieux est ajusté à 7,2 par ajout de NaOH 0,1M ou HCl 0,1M avant stérilisation à l'autoclave (20 minutes à 120°C). La souche est cultivée en boîte de Pétri et en tube. Les cultures sont incubées à 90±5% HR et 24±1°C. Une partie des cultures est placée sous néons horticoles, ayant un rayonnement spectral accentué dans le bleu (450 nm) et le rouge (650 nm), avec des photopériodes de 10h/jour. Les cultures exposées à la lumière reçoivent une intensité lumineuse de 560 Lux contre 3,5 Lux pour les cultures non exposées.

La deuxième partie de l'étude est menée avec *Aspergillus niger*. La souche est cultivée en boîte de Pétri et en tubes, sur milieu solide Potatoes Dextrose Agar (PDA - Sigma). Le pH du milieu est ajusté à 7,2 par ajout de NaOH 0,1M avant stérilisation à l'autoclave. Les cultures sont incubées à 75±5% HR et 24±1°C.

La dernière phase de l'étude se déroule au département des Sciences Microbiologiques, Génétiques et Moléculaires de l'Université de Messine. Nous travaillons dans cette partie avec les quatre souches sélectionnées : *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Exophiala* sp., *Coniosporium uncinatum*. Ces souches sont cultivées en milieu solide PDA (Oxoid) en boîtes

de Pétri, et en milieu liquide Malt Extract Broth (MEB - Oxoid). Les cultures sont incubées à 26°C.

## 2.2. Préparation d'une suspension de spores

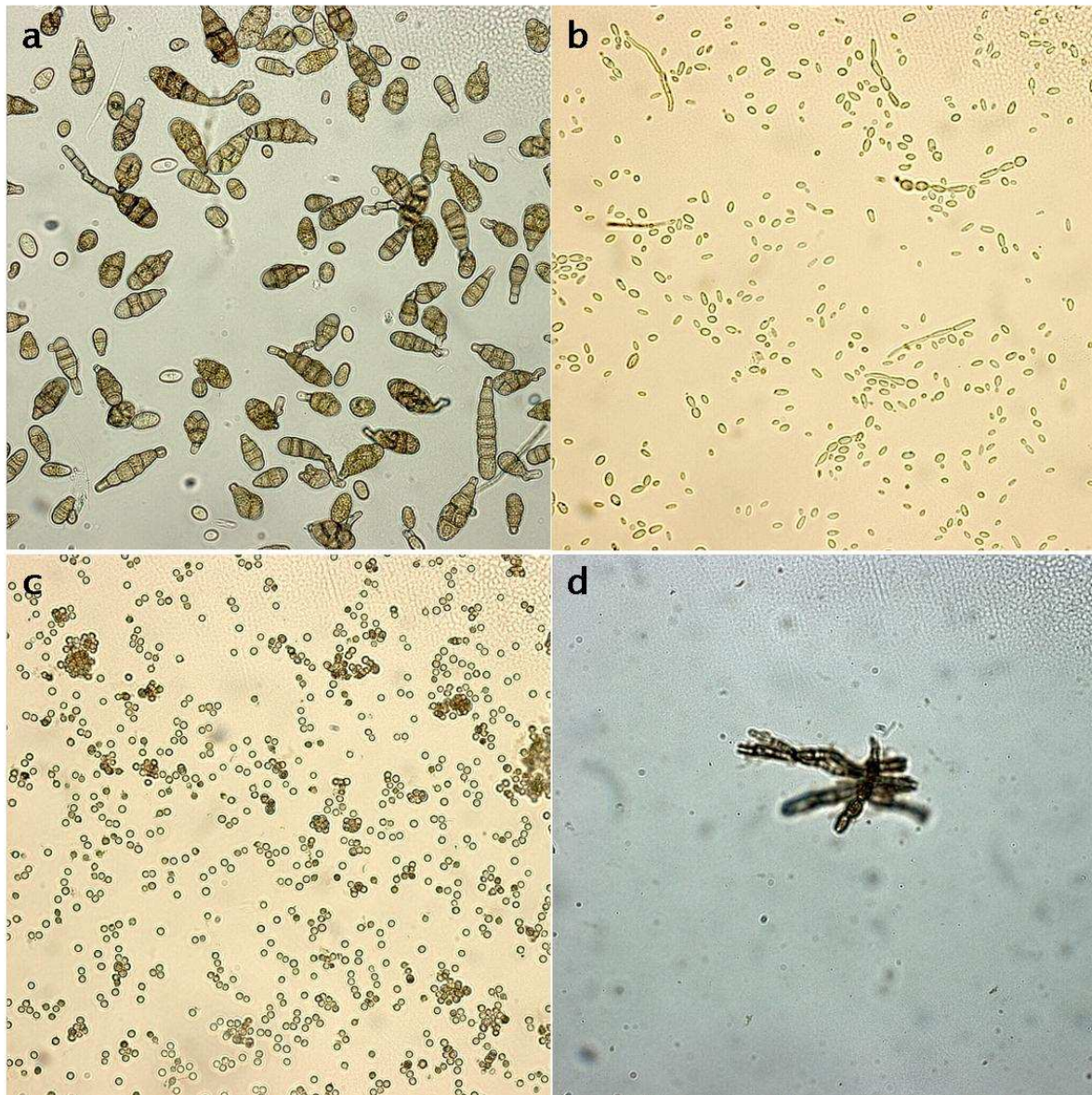
La suspension de spores est préparée dans une solution physiologique (0,9% NaCl). Deux millilitres de solution physiologique sont répartis sur la surface de la boîte de Pétri. La surface de la culture est raclée avec une anse d'ensemencement pour récupérer les spores. La suspension obtenue est filtrée sur de la gaze. L'opération est répétée 2 fois mais avec 1 ml de solution physiologique. Le comptage des spores se fait sur une cellule de Malassez\* (W. Schreck Hofheim/Ts, Allemagne) au microscope optique. La concentration de la suspension ajustée à la valeur désirée par ajout de solution physiologique. La suspension est utilisée dans les 6h qui suivent sa préparation.

## 2.3. Préparation d'une suspension de cellules fongiques

La suspension est préparée après une semaine de culture des différentes souches, à l'exception de *Coniosporium uncinatum* qui nécessite trois semaines de cultures. Les cellules sont collectées en raclant la surface de la boîte de Pétri contenant du milieu PDA, puis sont transférées dans un tube de centrifugation contenant 1 ml de solution physiologique (0,9% NaCl). Les cultures en milieu liquide MEB sont directement transvasées dans les tubes de centrifugation. Les suspensions sont centrifugées 15 minutes à 2095 g (3000 rpm avec une centrifugeuse Allegra X-12R Beckman and coulter – rotor SX 4750A). Les culots sont suspendus dans un volume minimum de solution physiologique. La concentration de chaque suspension fongique est déterminée par comptage des cellules sur une cellule de Bürcker\* (ProSci Tech, Australie) au microscope optique. La concentration finale est ajustée à la valeur désirée par dilution dans le milieu nutritif composé de Yeast Nitrogen Broth (YNB) 1x + Glucose 0,01%. La Figure 17 présente les spores et cellules fongiques pour chaque suspension préparée.

---

\* Cellule de Malassez ou de Bürcker: cellule de numération, c'est une lame porte-objet dans laquelle est creusée une chambre de comptage de volume connu. Ce dernier est déterminé par (i) la surface du quadrillage gravé sur la lame, (ii) la profondeur de la chambre. ( $V_{\text{cellule Malassez}} = 1 \text{ mm}^3$ ,  $V_{\text{cellule Burker}} = 0,9 \text{ mm}^3$ ).



**Figure 17 : Observation au microscope optique des suspensions de cellules fongiques, grossissement x40 – (a) *Alternaria alternata*, (b) *Exophiala* sp., (c) *Aspergillus niger*, (d) *Coniosporium uncinatum***

## 2.4. Dosages biochimiques

Plusieurs méthodes de quantification de la biomasse existent, certaines étant spécifiques à un type de micro-organismes. Parmi ces méthodes nous avons choisi de développer pour notre étude un dosage spécifique de la biomasse fongique : celui de l'ergostérol, et un plus global : le dosage des protéines qui permet l'estimation de la biomasse microbienne totale.

## 2.4.1. Dosage de l'ergostérol

### 2.4.1.1. Principe du dosage

Les techniques de dosage de l'ergostérol s'appuient sur une caractéristique de cette molécule : son absorbance U.V à 282 nm. Le dosage est réalisé par chromatographie liquide haute performance (CLHP). Le système est étalonné avec une solution d'ergostérol préparée à partir d'ergostérol standard (SIGMA) dans du méthanol. Le système WATERS utilisé 616 LC est équipé d'une colonne Novapack C<sub>18</sub> de 60Å. L'ensemble de l'appareillage est piloté par le logiciel Millennium 32.

### 2.4.1.2. Paramètres testés

Pour la mise au point du dosage, nous faisons varier la composition de la phase mobile. Les mélanges suivant sont testés : (i) eau/acétonitrile 50:50 v/v, et (ii) acétonitrile/méthanol 80:20 v/v. Le dosage est réalisé avec un débit de 0,5ml/min et 1 ml/min. Enfin, le volume d'échantillon injecté est ajusté pour optimiser le dosage, 20 et 100µL.

## 2.4.2. Dosage des protéines

### 2.4.2.1. Principe du dosage

Le dosage des protéines est réalisé par la méthode de Bradford. Le dosage est basé sur la formation d'un complexe entre le réactif de Bradford et les protéines en solution. Le complexe protéine-colorant crée un changement du maximum d'absorbance du colorant entre 465 nm et 595 nm. L'absorption est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans le milieu.

### 2.4.2.2. Paramètres testés

Cette méthode de dosage nécessite que les protéines soient en solution. Il faut donc extraire les protéines du matériel biologique pour les solubiliser dans une solution de composition adaptée.

Les paramètres suivants ont été étudiés :

- **protocoles de dosage** : le dosage 1,55 ml (1,5 ml de réactif de Bradford sont ajoutés à 50 µl d'échantillon) et le micro-dosage (1ml de réactif de Bradford sont ajoutés à 1 ml d'échantillon).
- **Solution d'extraction** : eau UHQ, méthanol, solution NaCl 0,9%, PBS (Phosphate Buffered Saline).
  - H<sub>2</sub>O ultra-pure : Solution de référence, afin d'éviter les interférences avec les protéines, et avec le réactif de Bradford.
  - Solution NaCl 0,9% : Les protéines sont plus stables dans une solution saline, de plus le serum bovin albumine est conservé dans une solution saline.
  - PBS : C'est un tampon salin (NaCl 8g/l), donc favorable à la stabilité des protéines en solution. De plus, l'acide ascorbique joue le rôle d'agent réducteur, et évite l'oxydation des protéines.
  - Méthanol : Nous souhaitons associer le dosage des protéines au dosage d'ergostérol. L'extraction de l'ergostérol doit obligatoirement se faire dans le méthanol. Il serait intéressant de procéder à une extraction globale du matériel biologique (ergostérol et protéines), et d'effectuer les dosages spécifiques sur une partie de l'extrait.
- **Nombre de cycles de sonication pour l'extraction.**

#### 2.4.2.3. *Extraction des protéines*

Les échantillons sont préparés à partir de cultures âgées de 10 jours sur boîtes de Pétri. Le mycélium est gratté de la surface de la boîte avec une spatule, et inséré dans 10 ml de PBS. La suspension est soniquée avec un sonicateur Vibracell à microprocesseur Vibracell (Bioblock scientifique) équipé d'une micro-sonde. Un cycle de sonication comprend 3 secondes de pulsations et 1 seconde d'arrêt pendant 30 secondes avec une amplitude de 10 %. Ce cycle est répété plusieurs fois avec un temps de pause de 30 secondes entre chaque cycle, pour éviter l'échauffement de l'échantillon. La suspension est maintenue dans un cristallisateur contenant des glaçons pour conserver une température basse, et ne pas dénaturer les protéines. Nous avons testé l'extraction avec 7, 10, et 12 cycles de sonication.

La suspension est centrifugée 10 min à 2000 tour/min à 4°C. Le dosage est effectué sur le surnageant. L'absorbance est mesurée à 595 nm après 12 min d'incubation avec un spectrophotomètre UV-vis VARIAN Cary 300 Scan.



## 2.5. Coloration au réactif de Schiff (PAS)

La coloration PAS (Periodic Acid Schiff) est une coloration couramment utilisée en histologie\* pour mettre en évidence les polysaccharides présents dans certains tissus. C'est l'acide périodique qui agit le premier en révélant les fonctions des aldéhydes et cétones qui constituent des groupements réducteurs. Intervient ensuite le réactif de Schiff qui, incolore à l'origine, apparaît rouge-fuchsia au contact de ces groupements réducteurs.

Cette technique a été proposée pour les matériaux de construction par Warscheid et appliquée avec succès pour l'estimation de la colonisation microbienne sur et dans les pierres. La coloration PAS permet dans ce cas, de colorer en rose-rouge les composés tels les substances polymériques extracellulaire (EPS), le glycogène, l'amidon, la cellulose, les complexes protéines-carbohydrates, et les glycolipides. Nous suivons le protocole de coloration proposé par Urzì et Albertano (2001).

A la fin du test de biodétérioration, les éprouvettes sont cassées en petits morceaux (Figure 18).



Figure 18 : échantillonnage des éprouvettes pour la coloration PAS

Les échantillons sont fixés 2h dans l'éthanol 70% (v/v), puis transférés dans l'acide périodique 1% (m/v) et agités pendant 5-8 min. Ils sont ensuite placés 5 min dans l'éthanol 70% (v/v). Les échantillons sont rincés 5 min dans H<sub>2</sub>O distillée et placés 10 min dans le réactif de Schiff, puis introduits dans une solution de sodium métabisulfite 0,6% (m/v),

---

\* Histologie : est la branche de la biologie qui étudie les tissus. Elle a pour but d'explorer la composition, la structure, le renouvellement des tissus ainsi que les échanges cellulaires en leur sein.

2x3min. Ils sont rincés 2 fois dans H<sub>2</sub>O distillée (5 min chaque fois) et introduits dans l'éthanol 70% (v/v) pendant 35 min.

### 3. Test de biodétérioration

Différents dispositifs expérimentaux sont testés, en faisant varier notamment le mode d'inoculation, et l'apport d'éléments nutritifs. Le Tableau 5 présente les conditions expérimentales des différents tests réalisés.

Dans tous les cas nous utilisons des boîtes en polypropylène 9,5 x 9,5 x 9,5 cm<sup>3</sup>. Les boîtes, les milieux de culture, la vermiculite, les feuilles de papier sont stérilisées à l'autoclave 20 minutes à 120°C avant le test.

Les inoculations sont réalisées en duplicat. Ainsi pour chaque souche fongique étudiée, nous inoculons deux éprouvettes ayant subi le même vieillissement. Les témoins sont inoculés avec une solution physiologique (NaCl 0,8 g/L).

Les quatre premiers tests concernent le développement de la méthodologie en termes de dispositif expérimental, mode d'inoculation, apport de milieu nutritif. Seules les observations au stéréomicroscope et dans certains cas au MEB ont été effectuées. Lors du cinquième test, la préparation spécifique des échantillons pour le MEB et la coloration au réactif de Schiff ont pu être réalisées.

Tableau 5 : Comparaison des dispositifs expérimentaux des différents tests réalisés

		Essai A	Essai B	Essai C	Essai D	Essai E
<b>Souche</b>		<i>A. alternata</i> DSM 62006	<i>A. alternata</i> DSM 62006	<i>A. alternata</i> DSM 62006 <i>A. niger</i> DSM 823	<i>A. alternata</i> DSM 62006 <i>A. niger</i> DSM 823	<i>A. alternata</i>  <i>A. niger</i> DSM 823 <i>Exophiala sp.</i>  <i>C. uncinatum</i> MC 557
<b>Milieu de culture</b>		jus V <sub>8</sub>	jus V <sub>8</sub>	jus V <sub>8</sub> , PDA	jus V <sub>8</sub> , PDA	PDA
<b>Eprouvettes inoculées</b>		non vieilles carbonatées	non vieilles carbonatées	non vieilles carbonatées carbonatées + lixiviées	non vieilles carbonatées carbonatées + lixiviées	non vieilles carbonatées carbonatées + lixiviées
<b>Stérilisation éprouvette</b>		ionisation rayons $\gamma$	ionisation rayons $\gamma$	ionisation rayons $\gamma$	ionisation rayons $\gamma$	rayons UV
<b>Inoculation</b>	<b>mode</b>	suspension spores	suspension spores	suspension spores	suspension spores	suspension cellules
	<b>volume</b> <b>concentration</b>	1 mL 6,5.10 <sup>5</sup> spores/mL	1 mL 6,5.10 <sup>5</sup> spores/mL	1 mL 12.10 <sup>5</sup> spores/mL	1 mL 12.10 <sup>5</sup> spores/mL	1,5 mL 8,7.10 <sup>5</sup> cell/mL
<b>Incubation</b>		24±1°C et 90±5% HR	24±1°C et 90±5% HR	24±1°C et 90±5% HR 24±1°C et 75±5% HR	24±1°C et 90±5% HR 24±1°C et 75±5% HR	26±1°C
<b>Ajout nutriments</b>		non	1 ml jus V <sub>8</sub> liq / semaine	1,5 ml jus V <sub>8</sub> liq / semaine	1,5 ml jus V <sub>8</sub> liq / semaine	non
<b>Dispositif expérimental</b>		