



HAL
open science

Etude de la lampenflora des bas-reliefs “ Fête de Bacchus ” et “ Silène ” de la cave VRANKEN-POMMERY à Reims

Stéphanie Eyssautier-Chuine, Maxime Gommeaux, Alexandre Brunet, Robin Perarnau, Sébastien Laratte

► To cite this version:

Stéphanie Eyssautier-Chuine, Maxime Gommeaux, Alexandre Brunet, Robin Perarnau, Sébastien Laratte. Etude de la lampenflora des bas-reliefs “ Fête de Bacchus ” et “ Silène ” de la cave VRANKEN-POMMERY à Reims. Université de reims Champagne-Ardenne. 2024. hal-04391110

HAL Id: hal-04391110

<https://hal.science/hal-04391110>

Submitted on 12 Jan 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Rapport d'étude

Etude de la lampenflora des bas-reliefs « Fête de Bacchus » et « Silène » de la cave VRANKEN-POMMERY à Reims

- ❖ Etude microbiologique de la lampenflora
- ❖ Etude de l'efficacité biocide de trois traitements sur les algues issues des bas-reliefs
- ❖ Etude photogrammétrique des bas-reliefs

Intervenants :

Etude microbiologique et tests biocides :

Stéphanie Eyssautier	Ingénieure d'études en Géologie
Maxime Gommeaux	Maitre de conférences en Géologie et Géomicrobiologie
Alexandre Brunet	Etudiant en Master 2 en Microbiologie

Etude photogrammétrique :

Robin Perarnau	Ingénieur d'études en Géographie et en Photogrammétrie
Sébastien Laratte	Doctorant spécialiste des Géomatériaux et de Photogrammétrie

Rédaction du rapport :

Stéphanie Eyssautier
Robin Perarnau (Photogrammétrie)

INTRODUCTION

Etat des lieux

Le Patrimoine en pierre traverse les siècles, il est le témoin de notre Histoire. La pierre a longtemps été un matériau de choix pour la construction des monuments en raison de sa durabilité et de sa beauté. Si elle nous paraît éternelle, elle n'en subit pas moins des dégradations qu'il faut prendre en compte et y remédier afin de la préserver. La détérioration des pierres des monuments est un phénomène naturel et irréversible qui est accentuée dans les pays industrialisés par la pollution urbaine et industrielle (Webb et al., 1992; Grossi et al., 2003; Prikryl and Smith, 2007). Il y a un phénomène d'encrassement qui modifie l'aspect visuel de la pierre mais aussi un vieillissement accéléré et aggravé par la pollution atmosphérique qui a un impact direct sur les pierres en réagissant à leur contact, et indirect en contribuant à l'acidité des pluies, celles-ci ensuite ruissellent, pénètrent dans la pierre et la dissolvent (H_2SO_4 et HNO_3) (Gibeaux, 2017). D'autres facteurs environnementaux tel que les climats tempérés humides, favorisent la prolifération d'organismes biologiques qui engendrent une gêne esthétique par l'apparition de zones de couleurs variées et hétérogènes. Les micro et macro-organismes peuvent détériorer la pierre chimiquement et mécaniquement, causant des dommages irréversibles (tels que la biocorrosion, piqûres, fissures, détachements) à la surface et à l'intérieur de la pierre (Urzi et al., 1993; Warscheid and Braams, 2000). On estime que la prolifération biologique sur le patrimoine culturel en pierre et de leur activité biologique est responsable de 20 à 30 % de la détérioration des pierres. La colonisation et la croissance de ces organismes dépendent des conditions environnementales (Crispim et al., 2003) et de la bioréceptivité (aptitude à être colonisé) du matériau, qui est liée à ses propriétés intrinsèques telles que sa porosité, capillarité, rugosité et composition minéralogique (Guillitte, 1995; Miller et al., 2012; Manso et al., 2014).

La lampenflora et ses conséquences

L'encrassement des façades extérieures des monuments est un phénomène récurrent, il est aussi fréquemment observé sur les murs intérieurs mais aussi sur les parois des grottes et monuments souterrains (hypogées) depuis leur ouverture au public. L'attractivité du patrimoine souterrain a nécessité un aménagement comprenant un éclairage artificiel. Cependant, l'introduction de lumière dans ce milieu constitue un changement environnemental important qui a induit l'installation et le développement de micro-organismes. Les zones éclairées se colonisent rapidement par des communautés d'organismes phototrophes que l'on appelle **lampenflora**. Ce terme est spécifique au milieu souterrain, il est apparu dans les années 60 et signifie « the flora of the lamps » (Dobat, 1969) ou encore en français « la maladie verte » (Lefèvre, 1974). Elle faisait elle-même partie de l'attraction touristique des grottes et elle était considérée comme une communauté d'organismes invasifs et opportunistes sans gravité. Toutefois, l'attractivité des grottes grandissant ainsi que leur éclairage, le phénomène s'amplifia et c'est dans ces années qu'il commença à être connu à travers les dégâts que la lampenflora causa aux peintures rupestres des grottes de Lascaux.

Dans cette communauté lampenflora, les algues, comprenant les algues vertes (Chlorophytes) et les algues rousses (Chrysophytes) ainsi que les cyanobactéries jouent généralement le rôle le plus important et sont les organismes pionniers, tandis que les mousses, les lichens et les fougères apparaissent plus tard dans l'évolution du biofilm (Mulec et al., 2012). Leur abondance est très variable d'une grotte à une autre et le nombre d'espèces d'algues et de cyanobactéries peut aller de 100 à 200 espèces. Toutefois, cette communauté vit en symbiose avec d'autres micro-organismes comme les bactéries, champignons et levures (Bastian et al., 2010). Ils forment ensemble un biofilm constitué principalement d'eau (70-90%) et des micro-organismes qui sécrètent des substances (EPS- substances polymères extracellulaires) qui elles-mêmes sécrètent des protéines, lipides, acides gras, enzymes... (Warscheid and Braams, 2000). C'est cette matrice qui est la clé de la survie de ces espèces dans un environnement aussi hostile et pauvre en nutriments (Simon et al., 2007), elle augmente leur résistance au stress et améliore la circulation des nutriments (Ragon, 2011). L'activité photosynthétique des phototrophes fixe l'azote et le CO_2 ce permet ensuite l'installation des mousses et fougères qui elles-mêmes enrichissent le substrat en matière organique (Scheerer et al., 2009). Les micro-organismes pionniers accèdent au milieu souterrain par leur propre mobilité, ils sont accidentellement entraînés par les courants d'air, les écoulements d'eau, la sédimentation gravitationnelle à travers les fissures et les petites cavités dans la

roche, ou par le transit de la faune des grottes et des visiteurs (Liñán and del Rosal, 2015; Liñán et al., 2018; Jurado et al., 2020). La prolifération de la lampenflora est considéré comme une menace significative dans la conservation du patrimoine souterrain (Albertano, 2012). Les problèmes générés par le développement de la lampenflora est d'abord d'ordre esthétique car elle change l'aspect du substrat par la formation de zones de différentes couleurs mais principalement verte. Elle colonise aussi l'intérieur de la roche à une profondeur de plusieurs millimètres (Nugari et al., 2009). La colonisation microbienne modifie considérablement les propriétés physiques et chimiques du substrat minéral qu'est la pierre pour améliorer sa bioceptivité et causer des détériorations. Celles-ci peuvent être d'ordre physique par la pénétration de filaments d'espèces endolithiques (certaines algues et cyanobactéries) dans les fissures de la roche, l'absorption d'eau et la croissance cellulaire exercent une pression sur la structure et provoquent des détachements et l'exfoliation des couches superficielles du matériau. L'action chimique des micro-organismes est liée à leur activité métabolique car ils produisent différents acides organiques (acides oxaliques, citriques, fumariques...) qui dissous le substrat particulièrement le calcaire (Herrera and Videla, 2004; Scheerer et al., 2009). Cette altération du substrat entraine des changements de ses propriétés intrinsèques comme sa porosité et sa perméabilité.

Objet d'étude

La cave de champagne Vranken-Pommery située à Reims est composée de plusieurs cavités souterraines et de galeries creusées dans la craie, roche calcaire qui prédomine le sous-sol de la ville et de la région. La craie a servi de matériau de construction à la ville de Reims et les cavités ainsi créées, appelées catiches, pouvaient atteindre une profondeur de 60 m. Etant donné leur forte stabilité climatique avec une température et une humidité proche de la constante, les catiches sont des espaces idéales pour le vieillissement du vin comme le champagne. Elles ont donc été remblayées pour atteindre une profondeur de 30 m et aménager pour développer cette activité au XIX^e siècle. La lumière naturelle ne pénètre que par des puits en surface toutefois c'est un milieu qui reste obscur dont les conditions environnementales sont proches des grottes souterraines naturelles et les organismes strictement photosynthétiques ne peuvent pas s'y développer sans l'intervention de l'Homme (Lismonde, 2002).

La cave Pommery est formée de 18 km de galeries et de salles dont certaines sont ornées de grands bas-reliefs. Ces œuvres ont été sculptées sur le thème de la mythologie et du vin par Gustave Navlet dans la craie tendre des Crayères de 1882 à 1885. Elles peuvent atteindre 6 m de haut pour 15 m de large et sont inscrites sur la liste du patrimoine mondial de l'UNESCO. Les bas-reliefs ont été mis en valeur par un éclairage, notamment pour l'œuvre appelée « Silène », par une rampe de dix lampes situées à 2 mètres sous le bord inférieur de l'œuvre. L'éclairage a évolué au cours du temps en étant ponctuel uniquement et plus léger. De plus, les lampes à incandescence ont été changées par des lampes à LED générant moins de chaleur. Depuis treize années, la cave Pommery expose aussi de nombreuses œuvres d'art contemporaines qui sont permanents ou ponctuelles, installées dans les galeries et les salles où se trouvent les bas-reliefs sculptés. Elles nécessitent un éclairage pour mettre les en valeur et certaines sont elles-mêmes des œuvres lumineuses. Cette évolution de la cave a modifié sensiblement son environnement et son équilibre par un éclairage permanent à semi-permanent et la présence du public régulière. Ceci a favorisé considérablement l'installation et le développement d'une lampenflora au fil du temps, qui a trouvé des conditions idéales : humidité de l'air proche de la saturation, température constante, lumière et un substrat minéral pauvre en nutriment mais très poreux et saturé en eau surtout en hiver.

Problématique

La problématique de cette étude est de lutter contre la lampenflora qui s'est largement installée sur les bas-reliefs malgré un nettoyage régulier de certaines œuvres et d'empêcher cette prolifération à longue terme. L'étude s'est focalisée sur deux bas-reliefs particulièrement colonisés, nommés « Fête de Bacchus » et « Silène » et localisés au Nord des galeries, dans deux salles à 30 m de profondeur.

Deux axes d'étude principaux ont été définis, le premier consistait à faire une étude microbiologique des différents biofilms observés sur les bas-reliefs. Deux approches scientifiques ont été utilisées :
- une mise en culture des biofilms prélevés pour pouvoir isoler et déterminer les espèces présentes par séquençage ADN (méthode Sanger).

- un séquençage total des biofilms par séquençage haut débit Illumina permet d'identifier la totalité des espèces qui composent les biofilms.

Le deuxième axe de l'étude était de tester l'efficacité de produits biocides par inoculation de souches d'algues et de cyanobactéries isolées et cultivées en laboratoire sur des pierres traitées par les produits. Nous avons choisi une utilisation préventive de ces produits c'est-à-dire qu'ils ont été appliqués sur pierre saine et non colonisée. A ce stade de cette étude, deux composés expérimentaux POM-IL1 et POM-IL2, des liquides polyoxométalate-ioniques qui sont déjà utilisés dans différents domaines pour limiter la corrosion, ont été testés pour leur action antimicrobienne. Ils ont été comparés à un produit commercial composé d'ammonium quaternaire, le Preventol RI80 de la société Lanxess.

En parallèle, une étude des bas-reliefs et des salles a été réalisée en photogrammétrie afin de quantifier l'extension des biofilms sur les bas-reliefs, de créer des modèles 3D des bas-reliefs et de reconstituer des plans des salles où se situent ces œuvres.

I. Caractérisation de la craie issue des crayères

La craie constitue la pierre du sous-sol de Reims, elle a donc été naturellement exploitée comme matériau de construction durant l'antiquité jusqu'au 15^{ème} siècle. Les niveaux de craie exploités pour fournir la pierre à bâtir ont été tous localisés dans des carrières souterraines à 30 m de profondeur voire 60 m en ce qui concerne la cave Pommery. C'est une craie moins fracturée que la craie localisée en surface néanmoins la cave de Pommery est fortement diaclasée ce qui entraîne des inondations récurrentes au cours des hivers. La cave Pommery a été comblée pour sa reconversion en cave de vieillissement pour le champagne. Les bas-reliefs se trouvent actuellement à 30 m de profondeur. Néanmoins l'échantillonnage de la pierre n'a pas pu se faire à ce niveau et des blocs ont été prélevés à 6 m de profondeur.

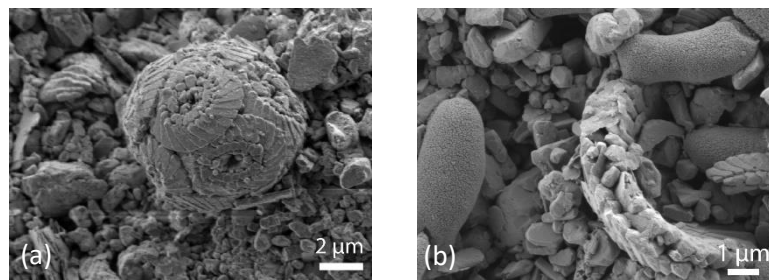


Figure 1 : Observations d'une sphère de coccolithe (a) et de débris (b) de coccolithe issue de microalgues unicellulaires à squelette calcaire composant la craie. Observations au microscope électronique à balayage.

La craie est une roche calcaire constituée à 95 % de calcite sous forme de micrite (cristaux de CaCO_3 entre 1 et 4 μm) ainsi que des insolubles. Cette boue micritique est issue de l'accumulation de débris de coccolithes, squelettes de microalgues unicellulaires en milieu pélagique de 4-5 μm de diamètre (Figure 1a-b). Quelques microfossiles de type Globigérines (foraminifères) peuvent être observés au microscope optique (Figures 2a-b).

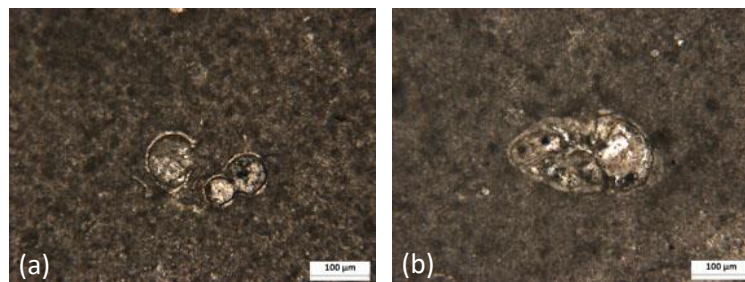


Figure 2 : Observations de Globigérines (Foraminifères pélagiques) au microscope optique en lumière naturelle polarisée.

Le réseau poreux de la craie a été analysé par des mesures pétrophysiques normalisées afin de déterminer sa porosité accessible à l'eau, sa porosité au mercure qui permet de déterminer la taille des pores de la pierre, les coefficients de capillarité et de saturation en eau de la pierre, les coefficients d'évaporation (European committee for Standardization, 2007; European Committee for Standardization, 2010a, 2010b). Ces données permettent de comprendre et d'estimer l'apport d'eau que peut fournir la pierre aux microorganismes.

La craie est un matériau très poreux dont la porosité s'élève à 40.4 %, elle est microporeuse car l'essentiel des pores (98.7 %) ont un diamètre inférieur à 1 μm avec une majorité à 0.25 μm (Figure 3 et Table 1). Etant donné son coefficient de capillarité très élevée (352.5 $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1/2}$), le réseau poreux est très bien connecté et la pierre peut être fortement saturée (94.4 %). D'après la faible saturation critique (0.49 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), la désaturation de la craie se fait essentiellement aussi par l'évaporation de l'eau par la

surface, ce qui veut dire que quasiment toute l'eau que peut emmagasiner la craie peut migrer vers l'extérieur par capillarité.

La craie est donc un matériau qui peut absorber et maintenir une grande quantité d'eau à l'intérieur de ses pores, elle est donc un excellent réservoir d'eau. De plus, sa très bonne connexion de ses pores facilite une migration de l'eau notamment vers la surface ce qui permet aux micro-organismes d'accéder à l'eau sans pénétrer la pierre et d'avoir une ressource inépuisable.

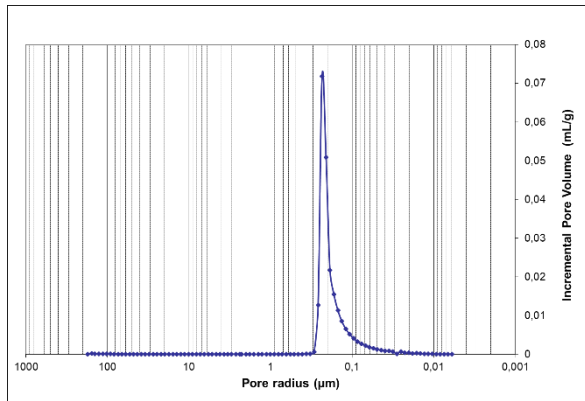


Figure 3 : Courbe d'intrusion de mercure. Distribution des accès aux pores de la craie par intrusion de volume de mercure cumulé (mL/g)

Paramètres pétrophysiques	Craie de Pommery
Porosité à l'eau (%)	40.4 ± 0.3
Coefficient de capillarité :	
C1 (g.m ⁻² .s ^{-1/2})	352.5 ± 6.5
Coefficient de pénétration de l'eau:	
B (cm.s ^{-1/2})	0,08 ± 0.03
Saturation (%)	94.4 ± 0.4
Saturation critique d'évaporation :	
Sc (g.cm ⁻²)	0.49 ± 0.05
Porosité mercure (%)	38.4
Rayon d'accès au pores majeur (μm) :	0.25
Pores (%) :	
> 1 μm	1.2
1 – 0.1 μm	88.4
0.1 – 0.01 μm	10.3

Table 1 : Paramètres pétrophysiques de la craie de Pommery.

II. Caractérisation des biofilms développés sur les bas-reliefs

A. Campagne de prélèvements

Trois campagnes sur site (3 juin, 27 juillet 2020 et 3 février 2021) ont permis d'échantillonner et de faire des mesures sur les biofilms et sur la pierre au niveau des bas-reliefs « Fêtes de Bacchus » et « Silène »

L'échantillonnage a consisté à prélever quatre échantillons pris en double par zone définie.

Sur « La fête de Bacchus », 17 échantillons ont été localisés sur 4 zones (Figure 1-Table 1).

- Une zone non ou peu colorée (BNC + BS)
- Une zone de biofilm vert (BV)
- Une zone de biofilm rouge (BR)
- Une zone de biofilm noir (BN)

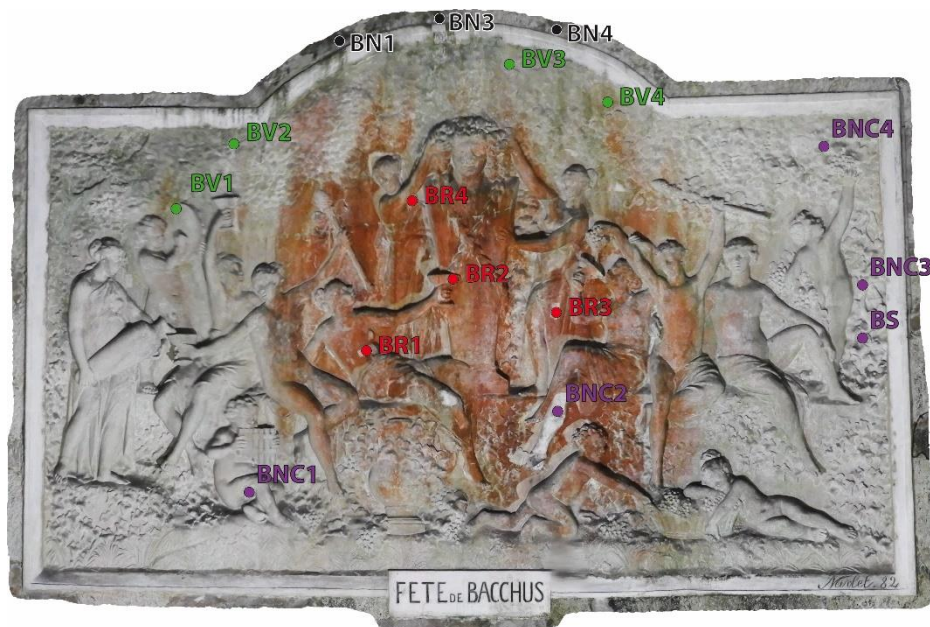


Figure 4 : Zones de prélèvements sur le bas-relief « Fête de Bacchus ».

Sur le bas-relief de « Silène », 12 échantillons répartis sur 3 zones ont été localisés (Figure 2-Table 1) :

- Une zone non ou peu colorée (SNC) + 1 prélèvement unique sur la zone de plâtre (SP),
- Une zone de biofilm vert (SV)
- Une zone de biofilm marron (SM)

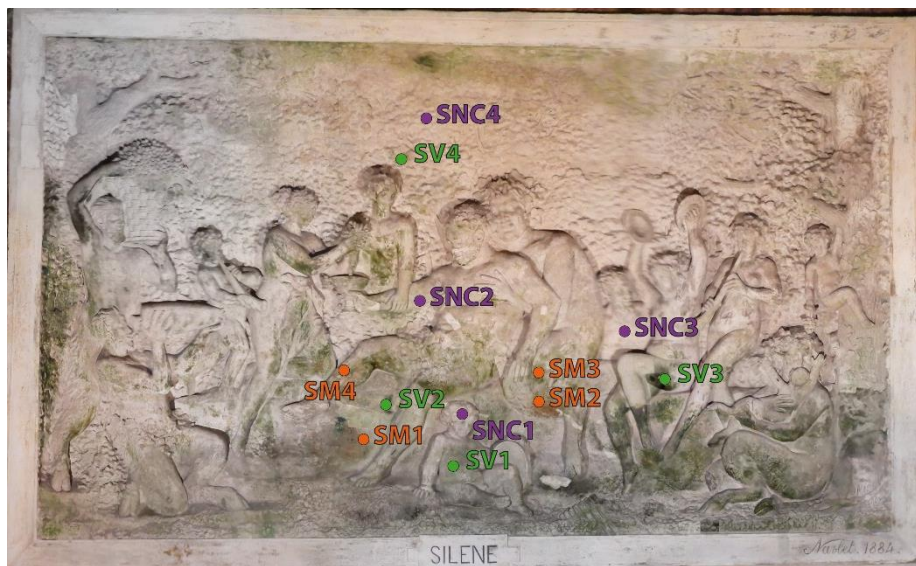


Figure 5 : Zones de prélèvements sur le bas-relief « Silène ».

Une grande partie de cet échantillonnage a été utilisée pour l'identification des micro-organismes présents dans les biofilms par un séquençage ADN à l'issue de culture sur gélose en boîte de pétri, et par séquençage ciblé, la métagénomique. Une autre partie a servi à la mise en culture des biofilms en milieu liquide et sur la pierre afin de caractériser les micro-organismes présents par des observations macro et microscopiques et par des analyses des pigments présents (chlorophylliens et phycobiliprotéines) (Table 2).

Zones	Prélèvements pour les cultures et les analyses				Prélèvements pour la métagénomique			
Fête de Bacchus								
non colorées	Bnc 1'	Bnc 2'	Bnc 3'	Bnc 4'	Bnc 1	Bnc 2	Bnc 3	Bnc 4
vertes	Bv 1'	Bv 2'	Bv 3'	Bv 4'	Bv 1	Bv 2	Bv 3	Bv 4
rouges	Br 1'	Br 2'	Br 3'	Br 4'	Br 1	Br 2	Br 3	Br 4
noires	Bn 1'	Bn 2'	Bn 3'	Bn 4'	Bn 1	Bn 2	Bn 3	Bn 4
noires supl.	Bs'				Bs			
Silène								
non colorées	Snc 1'	Snc 2'	Snc 3'	Snc 4'	Snc 1	Snc 2	Snc 3	Snc 4
plâtre	Sp'				Sp			
vertes	Sv 1'	Sv 2'	Sv 3'	Sv 4'	Sv 1	Sv 2	Sv 3	Sv 4
marrons	Sm 1'	Sm 2'	Sm 3'	Sm 4'	Sm 1	Sm 2	Sm 3	Sm 4

Table 2 : Résumé des prélèvements effectués pour les cultures, analyses et identification des biofilms.

B. Caractérisation des biofilms à travers leur activité photosynthétique

1. Protocoles des différents paramètres mesurés

a) *La fluorescence chlorophyllienne*

L'émission de fluorescence par les organismes chlorophylliens est directement liée au processus de photosynthèse. L'énergie lumineuse captée par les plantes est convertie et utilisée pour la création de biomasse végétale. Au cours de ce processus, il y a des pertes d'énergie qui se traduisent par une émission de fluorescence chlorophyllienne et un dégagement de chaleur.

La fluorescence de la chlorophylle *a* provient presque exclusivement du photosystème II (PSII) dans la chaîne photosynthétique des plantes. Un analyseur de rendement de photosynthèse, Junior PAM Chlorophyll Fluorometer (Walz, Effeltrich, Allemagne) a été utilisé avec l'impulsion modulée en amplitude (PAM) en combinaison avec une analyse par impulsions saturantes d'extinction de fluorescence. Le dispositif a été connecté à l'échantillon avec une fibre optique flexible de 1,5 mm de diamètre actif qui utilisait une LED de puissance bleue visible (460 nm) pour des impulsions modulées et saturantes. Cette technique est souvent appliquée sur les feuilles pour détecter le stress induit par les variations environnementales comme une maladie ou des effets toxiques (Bigot et al., 2007; Dewez et al., 2018). Elle a déjà été efficace pour mesurer la croissance des algues sur les pierres en condition de laboratoire (Baruffo and Tretiach, 2007; Eyssautier-Chuine et al., 2015). Ici, l'appareil portable a été testé in-situ pour enregistrer la fluorescence chlorophyllienne de la microflore se développant sur des pierres grâce au logiciel WinControl-3 (Walz). Deux paramètres ont été enregistrés : la fluorescence minimale du biofilm adapté à la lumière (F'_0) et la fluorescence maximale pendant la lumière saturante (F'_M). À partir de ces paramètres, le rendement quantique relatif du PSII, ϕ_{PSII} , a été calculé à partir de $F'_v/F'_M = (F'_M - F'_0)/F'_M$. Les mesures ont été effectuées sans phase préliminaire d'obscurité et d'humidité, donc ϕ_{PSII} reflète le rendement photosynthétique réel des micro-organismes dans des conditions naturelles.

b) *Quantification des pigments*

La coloration des biofilms correspond pour partie à la présence de pigments présents dans les microorganismes phototrophes. La quantification de ces pigments permet de « quantifier » l'activité photosynthétique des microorganismes qui constituent les différents biofilms et de les comparer. Des concentrations en chlorophylle *a* et *b* ainsi qu'en caroténoïdes ont été calculées grâce aux équations de (Wellburn, 1994) à partir des mesures d'absorbance par spectrophotométrie.

Le protocole consiste à extraire les pigments par ajout de 5 ml d'acétone à 80 % pour 100 mg de biofilm. Après avoir laissé macérer pendant 2 heures dans l'obscurité à 4°C, la solution est centrifugée à 4°C pendant 10 minutes à 1000 g (3000 rpm). La densité optique est ensuite mesurée au spectrophotomètre aux longueurs d'onde de 646, 663, 470 nm.

Les calculs des concentrations de chaque pigment se font grâce aux équations suivantes (Wellburn, 1994) :

- [Chlorophylle a] mg/L = $12,21 \times A_{663} - 2,81 \times A_{646} = Ca$
- [Chlorophylle b] mg/L = $20,13 \times A_{646} - 5,03 \times A_{663} = Cb$
- [Chlorophylles totales] mg/L = $7,18 \times A_{663} + 17,32 \times A_{646} = Ca + Cb$
- [Caroténoïdes] mg/L = $[1000 \times A_{470} - 3,27 \times Ca - 104 \times Cb] / 198$

c) *Quantification des phycobiliprotéines*

Les phycobiliprotéines sont des pigments hydrosolubles de la photosynthèse. On les trouve dans les cyanobactéries et les chloroplastes de certaines algues comme les rhodophytes (algues rouges) et les glaucocystophytes (algues bleu-vert). Une phycobiliprotéine est un pigment assimilateur qui capture l'énergie lumineuse qui sera ensuite transférée à la chlorophylle au cours du processus de photosynthèse. Le spectre d'absorption des phycobiliprotéines complète celui des autres pigments photosynthétiques.

Les phycobiliprotéines permettent aux cyanobactéries d'utiliser des longueurs d'onde du spectre électromagnétique (dans les bandes bleues et rouges de la région visible) que d'autres organismes contenant de la chlorophylle ne peuvent pas utiliser et peuvent même ajuster la teneur relative en phycocyanine et phycoérythrine en réponse à la qualité de la lumière. Par conséquent, ces pigments permettent aux biofilms de s'adapter aux variations lumineuses de leur environnement. Les micro-organismes augmentent leur taux de phycobiliprotéines pour bénéficier d'un plus grand panel de longueurs d'onde disponibles lorsque la lumière est de plus faible intensité ou de longueurs d'onde différentes (Albertano et al., 1991; Bruno and Valle, 2017).

Le protocole utilisé consiste à laver trois fois les biofilms dans 10 ml d'eau distillée puis de centrifuger à 1000 g (2073 rpm) pendant 5 minutes. Le surnageant est enlevé et 10 ml d'eau distillée est ajouté à nouveau puis 6 ml de solution tampon saline à une concentration de 0.01 M de phosphate de sodium et 0.15 M NaCl. On centrifuge ensuite à 1000 g (2073 rpm) pendant 5 minutes. Afin de casser les cellules, les échantillons subissent plusieurs chocs thermiques à savoir -80°C pendant 3 heures puis 90°C pendant 15 min, jusqu'à ce que les cellules cassées soient observées au microscope optique. Puis les échantillons sont centrifugés à 4 °C à 14000 g pdt 45 min. On prélève ensuite le surnageant qui contient les phycobiliprotéines. Le dosage est déterminé à partir des densités optiques de 3 longueurs d'onde : 615, 652 et 562 nm. Le dosage de trois phycobiliprotéines (allophycocyanine (APC), phycocyanine (PC) et phycoérythrine (PE)) est calculé grâce aux équations suivantes (Bennett and Bogorad, 1973) :

$$\begin{aligned}
 - \text{PC (mg/mL)} &= [A_{615} - 0.474 (A_{652})]/5.4 \\
 - \text{APC (mg/mL)} &= [A_{652} - 0.208 (A_{615})]/5.09 \\
 - \text{PE (mg/mL)} &= [A_{562} - 2.41 (PC) - 0.849 (APC)]/9.62
 \end{aligned}$$

2. Résultats

Sur la « Fête de bacchus », on remarque que les concentrations en pigments chlorophylliens *a* et *b* des sont assez proches pour les biofilms peu colorés (BNC) et noirs (BN) avec des valeurs allant de $3.10^E-04 \text{ mg.l}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ à $4.19^E-04 \text{ mg.l}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ (Table 3 et Figure 6). Ce sont les valeurs les plus élevées car sur les autres biofilms, notamment le biofilm vert (BV), les valeurs sont plus faibles ($[\text{Chloro.}a]$ de $1.79^E-04 \text{ mg.l}^{-1}.\text{cm}^{-2}$) et pour le biofilm rouge (BR) elles sont quasiment nulles (4.10^E-05 et $3.72^E-05 \text{ mg.l}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ respectivement pour les chlorophylles *a* et *b*. En revanche, BR a une des concentrations en caroténoïdes la plus élevée avec $4.55^E-04 \text{ mg.l}^{-1}.\text{cm}^{-2}$, ce qui est logique étant donné sa couleur. BN a la plus forte concentration avec $5.49^E-04 \text{ mg.l}^{-1}.\text{cm}^{-2}$, la couleur vert foncé voire noire de ce biofilm peut alors être expliquée par une plus forte concentration en caroténoïdes que les autres biofilms de la même couleur.

Biofilm	Échantillon	Pigments chlorophylliens ($\text{mg.L}^{-1}.\text{cm}^{-2}$)			Phycobiliprotéines (mg.mL^{-1})			ϕPSII
		[Chl. a]	[Chl. b]	[Caroténoïdes]	PC	APC	PE	
Bacchus non coloré	BNC	3,10E-04	4,19E-04	4,97E-05	9,74E-05	1,56E-04	6,58E-05	0,205
Bacchus vert	BV	1,79E-04	7,05E-05	9,94E-05	5,75E-04	8,19E-04	4,07E-04	0,288
Bacchus noir	BN	4,16E-04	3,52E-04	5,49E-04	6,63E-04	8,60E-04	5,90E-04	0,356
Bacchus rouge	BR	4,10E-05	3,62E-05	4,55E-04	2,42E-03	3,66E-03	2,29E-03	0,592
Silène non coloré	SNC	8,31E-05	6,44E-05	1,53E-05	5,84E-04	9,34E-04	6,03E-04	0,206
Silène vert	SV	5,97E-04	7,26E-05	1,28E-04	4,77E-04	6,63E-04	2,38E-04	0,371
Silène vert +	SV+	1,65E-03	6,77E-04	2,01E-04	1,67E-03	2,76E-03	1,31E-03	0,444
Silène marron	SM	4,37E-04	2,30E-04	1,02E-04	4,77E-04	6,63E-04	7,57E-04	0,344

Table 3 : Concentration des pigments chlorophylliens et des phycobiliprotéines contenus dans les biofilms : non coloré, vert, noir (vert foncé) et rouge du Bas-relief « Fête de Bacchus » et des biofilms : non coloré, vert et marron du bas-relief « Silène ».

Les concentrations en phycobiliprotéines (Figure 7) pour ces biofilms sont très faibles pour BNC pour les trois pigments tandis que BN et BV ont des valeurs plus élevées comprises entre $4.07^E-04 \text{ mg.l}^{-1}$ et $8.60^E-04 \text{ mg.l}^{-1}$. Pour BR, les valeurs PE et PC sont respectivement de $2.29^E-03 \text{ mg.l}^{-1}$ et $2.42^E-03 \text{ mg.l}^{-1}$ c'est-à-dire les plus élevées. De plus APC est encore plus élevée que les deux autres avec une

concentration de $3.66 \cdot 10^{-3} \text{ mg.l}^{-1}$. Ceci montre que les micro-organismes phototrophes de ce biofilm ont du augmenter la teneur en phycobiliprotéines et ont su donc s'adapter et profiter au maximum des faibles conditions de luminosité de la salle pour se développer et effectivement BR est le biofilm le plus développée sur le bas-relief. D'autre part, on remarque que la fluorescence chlorophyllienne (ϕPSII) pour ces quatre biofilms évolue de façon identique aux concentrations en phycobiliprotéines, ce qui montre que ces pigments sont des éléments dont dépend fortement la photosynthèse de ces micro-organismes. Plus les biofilms produisent de phycobiliprotéines, plus leur photosynthèse est importante et donc plus ils se développeront malgré les conditions environnementales drastiques des caves.

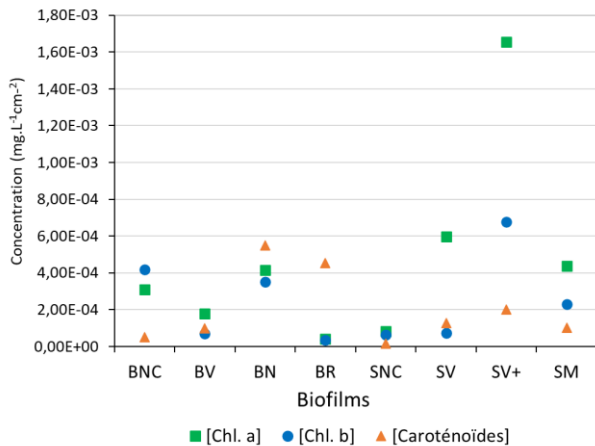


Figure 6 : Graphique des concentrations en Chlorophylles *a* et *b* et en caroténoïdes contenus dans les biofilms.

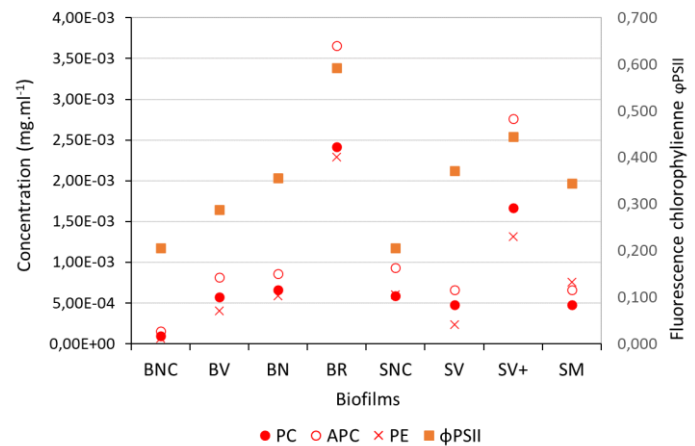


Figure 7 : Graphique des concentrations en phycobiliprotéines contenus dans les biofilms. Comparaison avec les valeurs de fluorescence chlorophyllienne ϕPSII .

Sur le bas-relief « Silène », les concentrations des Chlorophylles *a* et *b* sont très faibles, entre $1.53 \cdot 10^{-5} \text{ mg.l}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ et $8.31 \cdot 10^{-5} \text{ mg.l}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ (Figure 6). Pour le biofilm vert (SV), les concentrations en Chlorophylle *b* et en caroténoïdes sont aussi faibles tandis que celle de la Chlorophylle *a* est nettement plus élevée à savoir de $5.97 \cdot 10^{-4} \text{ mg.l}^{-1}.\text{cm}^{-2}$. Pour SV+ (biofilm vert foncé), la concentration en Chlorophylles *a* et *b* est la plus élevée (respectivement de $1.65 \cdot 10^{-3} \text{ mg.l}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ et de $6.77 \cdot 10^{-4} \text{ mg.l}^{-1}.\text{cm}^{-2}$) en comparaison avec celles de tous les autres biofilms. Ces fortes valeurs peuvent donc expliquer l'intensité de la couleur verte, contrairement à BN de Bacchus où la couleur noire-vert foncé s'expliquerait plutôt par la présence plus importante des caroténoïdes.

Enfin, le biofilm marron SM a des concentrations en chlorophylles *a* et *b* moyennes, de $4.37 \cdot 10^{-4} \text{ mg.l}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ et $2.30 \cdot 10^{-4} \text{ mg.l}^{-1}.\text{cm}^{-2}$. Celle des caroténoïdes est encore plus faible, $1.02 \cdot 10^{-4} \text{ mg.l}^{-1}.\text{cm}^{-2}$, ce qui est étonnant avec une pigmentation marron.

Les concentrations en phycobiliprotéines pour SNC sont comprises $4.77 \cdot 10^{-4} \text{ mg.l}^{-1}$ et $7.57 \cdot 10^{-4} \text{ mg.l}^{-1}$, elles sont donc plus élevées que celles de BNC. Les micro-organismes phototrophes de SNC qui est faiblement coloré (en témoignent les faibles valeurs en Chlorophylle), ont augmenté leur teneur en phycobiliprotéines pour assurer leur survie. D'autre part, on remarque que ϕPSII est de 0.206 c'est-à-dire identique à BNC. Par conséquent, SNC une activité photosynthétique égale à celle de BNC, ces micro-organismes ont alors préférentiellement développé les phycobiliprotéines que les Chlorophylles *a* et *b* comme BNC.

SV a des concentrations en phycobiliprotéines entre $2.38 \cdot 10^{-4} \text{ mg.l}^{-1}$ et $6.63 \cdot 10^{-4} \text{ mg.l}^{-1}$, ce qui est curieusement plus faible que SNC alors que SV+ a des valeurs plus élevées, entre $1.31 \cdot 10^{-3} \text{ mg.l}^{-1}$ et $2.76 \cdot 10^{-3} \text{ mg.l}^{-1}$. D'autre part, ϕPSII est aussi plus élevé puisqu'il est 0.444 pour CV+ au lieu de 0.371 pour SV. SV+ qui a une pigmentation verte plus intense a donc des micro-organismes qui ont des teneurs plus grandes en pigments chlorophylliens et en phycobiliprotéines.

En conclusion, le biofilm rouge (BR) a développé des pigments caroténoïdes mais surtout des phycobiliprotéines qui lui permet d'avoir l'activité photosynthétique la plus élevée. Le biofilm SV+ a lui aussi une photosynthèse importante assurée grâce aux pigments chlorophylliens et aussi aux phycobiliprotéines.

C. Etude des micro-organismes présents dans les biofilms

1. Protocole de mise en culture

Nous nous sommes intéressés à trois groupes spécifiques de micro-organismes principalement présents dans les biofilms, à savoir les micro-organismes hétérotrophes, les bactéries et les champignons-levures, les micro-organismes autotrophes telles les algues, bryophytes et les cyanobactéries. Trois milieux de culture spécifiques à la culture de ces trois groupes ont été utilisés : le milieu Hoagland pour les micro-organismes autotrophes, le milieu Malt pour les champignons et levures et le milieu LB (Luria Bertani) pour les bactéries chimioorganohétérotrophes.

Les échantillons ont été mis en solution dans 10 mL d'eau distillée stérile puis 100 μ L de la solution a été ajoutée à 900 μ L d'eau distillée (dilution 0). 100 μ L de cette dernière solution est ensuite prélevée pour être à nouveau ajoutée à 900 μ L d'eau distillée ce qui correspond à une dilution 10^{-1} , cette démarche est faite quatre fois pour avoir des dilutions de 10^{-1} à 10^{-5} .

100 μ l de chaque dilution et de la solution initiale sont ensemencés dans les trois milieux de culture gélosés sur boîtes de pétri. Ces milieux correspondent à :

- milieu LB (Luria Bertani), dilué au dixième (LB/10). C'est un milieu utilisé pour la croissance des bactéries. Elle est composée de peptone, d'extrait de levure et de NaCl. Il permet une croissance rapide des bactéries (Ezraty et al., 2014). LB/10 est utilisé car le LB complet serait trop riche.
- milieu malt permet de cultiver les champignons, il cible les moisissures et les levures car son pH à 5,5 inhibe la croissance des bactéries communément impliquées dans les contaminations de milieu. Il est composé d'extrait de malt, qui fournit les types de protéines, de carbones et de nutriments essentiels pour la croissance microorganismes (Skaar and Stenwig, 1996).
- milieu Hoagland cible les cyanobactéries et les algues. Les concentrations riches en azote et en potassium sont adaptées au développement des organismes chlorophylliens (Salamah et al., 2019).

Deux duplicats techniques par échantillon ont été faits pour chaque milieu de culture, et pour chaque dilution. Après ensemencement, les boîtes de culture sont incubées dans une enceinte climatique sous conditions expérimentales de 20°C, 80 % d'humidité et éclairée par deux lampes fluorescentes de 15 W donnant un PAR de 25 μ mol de photons/m²/s, avec une alternance jour/nuit de 12h.

Le développement des micro-organismes est étudié par loupe binoculaire chaque semaine afin de procéder à des isoléments pour purifier les souches au cours du temps. Ces centaines de boîtes de pétri ont donc été nécessaires à la culture microbienne.

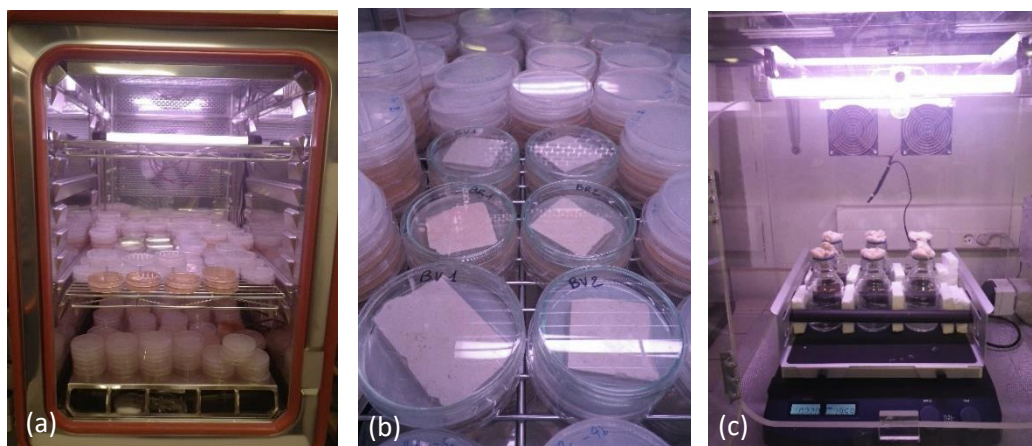


Figure 8: Culture sur les milieux gélosés en boîte de pétri et sur pierre en enceinte climatique (a-b), Culture en milieu Hoagland liquide (c).

2. Identification des souches cultivées

a) *Protocole*

Après dénombrement, les souches ont été isolées et caractérisées suivant leurs profils morphologiques (voir rapport Alexandre Brunet – juin 2020).

Leur ADN a ensuite été extrait par différents kits d'extraction :

- Bacterial Genomic DNA kit de GenElute™ pour l'extraction ADN des bactéries,
- Plant/funig DNA isolation kit de Norgen Biotek corp., pour l'extraction ADN des champignons et levures,
- DNeasy Power Biofilm Kit de Qiagen, pour l'extraction ADN des autotrophes principales des microalgues.

Des PCR (réaction de polymérisation en chaîne) ont été réalisées afin d'amplifier les fragments d'ADN extraits et d'obtenir un grand nombre de copies indispensable pour l'identification. Plusieurs étapes sont nécessaires et effectuées par un thermocycleur :

- la dénaturation qui sépare les deux brins d'ADN par chauffage à 95°C.
- l'hybridation se fait par abaissement de la température. Les amorces formées de fragments d'ADN vont s'hybrider aux brins d'ADN. Ces amorces sont spécifiques à l'ADN des micro-organismes ciblés. Pour les procaryotes comme les bactéries, où le séquençage se fait principalement par l'ARN ribosomique 16S, les amorces utilisées sont appelées 6F (début de brin) et 1391R (fin de brin). Pour les eucaryotes comme les champignons, levures et autotrophes, les amorces spécifiques pour un séquençage d'ARN ribosomique 18S sont appelées NS1F et NS8R. Toutefois, des amorces spécifiques rbcL ont été utilisées pour le séquençage d'ARN des algues.
- l'élongation grâce à la Taq polymérase, une enzyme qui complète la synthèse du brin d'ADN à partir de l'amorce grâce aux oligonucléotides présents dans le milieu de réaction.

Une fois l'étape d'amplification terminée, il est nécessaire de réaliser une électrophorèse afin de visualiser les résultats. L'amplification a permis d'obtenir des fragments d'ADN de taille déterminée qui seront révélés par migration sur gel d'agarose.

Lorsque cette vérification a été validée, les PCR sont envoyées à la société GENOSCREEN (Lille) afin de réaliser les séquençages à partir des fragments envoyés, par la méthode Sanger. Le principe consiste à initier la polymérisation de l'ADN à l'aide d'un petit oligonucléotide (amorce) complémentaire à une partie du fragment d'ADN à séquencer.

Une fois les séquençages terminés, l'analyse des données se fait d'abord avec le logiciel Mega X afin de visualiser chaque séquençage d'ADN et de corriger les bases manquantes. Enfin, la séquence est copiée dans la base de données NCBI-Blast (Basic Local Alignment and Search Tool) qui correspond à un algorithme permettant de quantifier la similitude entre 2 séquences et de faire des recherches de similarité à partir d'une séquence (protéine ou nucléique) sur toutes les séquences (ou un sous-ensemble de séquences) existantes dans la base de données. Grâce à cette base de données, on a pu déterminer au mieux les espèces dont l'ADN a été séquençé.

b) Résultats obtenus

Les espèces cultivables en laboratoire constituent une infime partie de la biodiversité qui constitue réellement les biofilms environnementaux. Le séquençage ADN des cultures a permis de déterminer différentes souches principalement de bactéries, champignons et algues, et plus secondairement des souches de levures, bryophytes et cyanobactéries (Table 4).

On remarque que les biofilms non ou peu colorés des deux bas-reliefs (BNC et SNC) ont autant de diversité microbienne que les biofilms colorés. Les bactéries sont assez diversifiées toutefois, le phylum *Mesorhizobium sp.* est présent dans plusieurs biofilms des deux bas-relief : BR, BV, SNC, SM. En ce qui concerne les champignons, il y a une prédominance pour les espèces *Penicillium sp.* et notamment *Penicillium roqueforti* (BNC, BR, BV). Deux levures de couleur rouge ont été identifiées à partir des biofilms BV et SM.

Pour les algues, il y a une prédominance de *Diplosphaera sp.* qui a été identifiée dans les biofilms BNC, BV, SNC, SV et SM. Toutefois, *Pseudostichococcus monallantoides* est une espèce aussi très présente. Seul le biofilm rouge BR se caractérise par l'algue *Chromochloris zofingiensis* qui donne la couleur rouge significative de ce biofilm. Cette algue a aussi été identifiée dans BV.

Une seule cyanobactérie a été séquencée dans le biofilm BV mais elle n'a pas été identifiée à partir de la base de données et une bryophyte (mousse) dans SM avec *Eucladium verticillatum*.

Fête de Bacchus

Biofilm non ou peu colorée (BNC)				
Taxon	Phylum	% similitude	Numéro d'accès*	Description
Bactéries	<i>Streptomycesnojiriensis</i> (2)	99.87%	MT081104.1	Colonies brillante, blanche, bords nettement définis, petites
	<i>Sphingopyxis chilensis</i> (2)	98.68%	MN421380.1	Colonies brillante, blanche, bords nettement définis, petites
	<i>Rhodospirillum sp.</i> (3)	97.05%	EU723158.1	Colonies petites, blanches
Champignons	<i>Aspergillus terreus</i>	99.85%	MT192569.1	Petit-moyenne transparent, filamenteux
	<i>Talaromyces leycettanus</i>	99.82%	MT328142.1	"boules"/Tapis vert, peu filamenteux
	<i>Verticillium leptobactum</i>	97.87%	AB214657.1	Mycélium très filamenteux blanc
	<i>Penicillium roqueforti</i>	100%	MT544459.1	Mycélium blanc avec fond épais noir
Algues	<i>Diplosphaera sp cort 12</i>	98.34%	HG793069.1	Cellules vertes rondes plus petites que bracteacoccus
Biofilm rouge (BR)				
Taxon	Phylum	% similitude	Numéro d'accès*	Description
Bactéries	<i>Mesorhizobium sp.</i> (4)	94.62%	JN863498.1	Colonies brillante, blanche, bords nettement définis, petites
	<i>Pseudomonas sp.</i> (2)	98.29%	KF233595.1	Vert, halo clair-foncé
	<i>Acinetobacter radioresistens</i> (2)	94.19%	MT367790.1	Petite colonies transparente-beige, légèrement rose, filamenteuses
Champignons	<i>Penicillium brevicompactum</i> (3)	97.77%	MH047201.1	Colonies très petites, vertes, semble rhizoïde, bords bien définies

	<i>Penicillium roqueforti</i> (4)	97.64%	MT544459.1	Petites colonies vertes, semble rhizoïde
Algues	<i>Chromochloris zofingiensis</i> (5)	100.00%	MT858358.1	Cellules rondes vertes
Biofilm vert (BV)				
Taxon	Phylum	% similitude	Numéro d'accès*	Description
Bactéries	<i>Mesorhizobium sp.</i> (3)	92.39%	JN863498.1	Colonies brillante, blanche, bords nettement définis, petites
Champignons	<i>[Talaromyces] leycettanus strain</i> (2)	100.00%	MT328142.1	Boules/Tapis vert, peu filamenteux
	<i>Penicillium roqueforti</i> (2)	99.59%	MT544459.1	Colonies moyennes, blanche, filamenteuse
	<i>Eurotiales sp. IK_Pi12</i>	100,00%	LR536745.1	Mycélium blanc avec fond épais noir
Levures	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (2)	99.25%	MT509560.1	Colonies rouges/roses non filamenteuses
Algues	<i>Diplosphaera sp cort 12</i>	98.34%	HG793069.1	Cellules vertes rondes plus petites que bracteacoccus
	<i>Bracteacoccus sp. KF-2011e strain HKN28</i>	98,64%	HM770957.1	Cellules en grosses boules vertes
	<i>Pseudostichococcus monallantoides</i>	93.89%	LR777828.1	Cellules cylindriques vertes plus ou moins allongées
	<i>Chromochloris zofingiensis</i> (5)	96.95%	HQ902940.1	Cellules rondes vertes
Cyanobactéries	<i>Uncultured cyanobacterium</i>	98.75%	JQ793239.1	Cellules filamenteuses fines bleu-vert
	<i>Timaviella circinata GR4</i>	97.50%	LT634149.1	
Biofilm vert foncé à noir (BN)				
Taxon	Phylum	% similitude	Numéro d'accès*	Description
Bactéries	<i>Lysobacter panacisoli</i> (2)	97.68%	MT415219.1	Colonie blanche, taille petite à moyenne, filamenteuse
Champignons	<i>Penicillium roqueforti</i> (5)	96.93%	MT544459.1	Tapis vert, rhizoïdes
	<i>Mortierella epicladia</i> (4)	91.08%	HQ667480.1	Colonies transparentes, de taille petites et moyennes, filamenteux
Silène				
Biofilm non ou peu colorée (SNC)				
Taxon	Phylum	% similitude	Numéro d'accès*	Description
Bactéries	<i>Mesorhizobium opportunistum</i> (7)	95.95%	KT337528.1	Colonies brillante, beige-transparente, bords nettement définis, petite
	<i>Dyadobacter sp.</i> (3)	93.37%	KM100582.1	Colonies Vert clair, très petites

Champignons	<i>Microbotryomycetes sp.</i> (2)	98.83%	LR536739.1	Colonies rhizoïde vert
Algues	<i>Diplosphaera sp cort 12</i>	98.11%	HG793069.1	Cellules sphériques vertes
	<i>Pseudostichococcus monallantoides</i>	98.42%	LR777828.1	Cellules cylindriques vertes plus ou moins allongées
Biofilm vert (SV)				
Taxon	Phyllum	% similitude	Numéro d'accès*	Description
Bactéries	<i>Sphingomonas sp. (2)</i>	99.73%	FJ434122.1	Petites colonies jaunes brillantes
	<i>Streptomyces cirratus (2)</i>	96.12%	MT415135.1	Très petites colonies très transparentes, nettes
Champignons	<i>Penicillium limosum (7)</i>	99.43%	MT328158.1	Moyenne, rouge, filamenteuse
Algues	<i>Diplosphaera sp cort 12</i>	98,47%	HG793069.1	Cellules sphériques vertes
	<i>Pseudostichococcus monallantoides</i>	98,54%	LR777828.1	Cellules cylindriques vertes plus ou moins allongées
Biofilm marron (SM)				
Taxon	Phyllum	% similitude	Numéro d'accès*	Description
Bactéries	<i>Mesorhizobium sp. (2)</i>	95.01%	LC040873.1	Colonies brillante, blanche-transparente, bords nettement définis, petite
	<i>Ochrobactrum pituitosum (2)</i>	93.70%	MG760434.1	Colonies brillantes, blanches, bords nettement définis, petites
Champignons	<i>Penicillium chrysogenum (12)</i>	99.60%	MN826497.1	Tapis vert foncé
	<i>Penicillium chrysogenum (5)</i>	95.38%	MN826497.1	Moyenne grande verte foncée filamenteuse avec de long filaments blancs
	<i>Penicillium roqueforti (5)</i>	99.63%	MT544459.1	Moyenne/grande, verte kaki/foncée, filamenteuse
Levures	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	99.04%	MG589007.1	Colonies rouges type rhodotorula
Algues	<i>Diplosphaera sp cort 12</i>			Cellules sphériques vertes
Bryophytes	<i>Eucladium verticillatum</i>	98.54%	LC176247.1	Cellules vertes épaisses filamenteuses
Zone de plâtre				
Taxon	Phyllum	% similitude	Numéro d'accès*	Description
Bactéries	<i>Sphingomonas sp. (2)</i>	99.21%	KF295210.1	Colonies brillante, jaune, bords nettement définis, petites

Table 4 : Identification des souches séquencées par la database GENBANK en open access NCBI, pourcentage de similitude avec les souches répertoriées dans la database, le numéro d'accès et description visuelle des souches.

3. Observations microscopiques des espèces phototrophes

La culture des espèces phototrophes essentiellement des algues, a été effectuée sous plusieurs forme : en majorité sur milieu solide sur une gélose d'agar dans des boites de pétri, en milieu liquide et sur des échantillons de craie. Ces cultures ont toutes été agrémentées d'une solution nutritive Hoagland, solution spécifique pour les plantes chlorophylliennes.

Les observations microscopiques ont été réalisées sur un microscope optique polarisant Olympus BX51 au grossissement x40 et x100, associé à une caméra haute résolution QICAM Fast1394.

a) Biofilms prélevés sur le bas-relief de Fête de Bacchus

(1) Biofilm non ou peu coloré

Les observations du biofilm BNC ont montrées qu'il y avait trois morphotypes de micro-organismes (Figure 9). De nombreuses cellules cylindriques vertes sont fortement présentes, ce qui laisse supposer qu'il s'agit de la souche *Pseudostichococcus monallantoides*.

D'autres cellules rondes et vertes parfois à plusieurs lobes sont aussi présentes en plus faible nombre. Leur morphotype est très proche de celui de *Diplosphaera sp.* Enfin, une autre espèce est sous forme de filaments très fins de couleur vert-bleu. Il s'agit d'une cyanobactérie qui n'a pas pu être déterminée à 98.75%, toutefois il pourrait s'agir de *Timaviella sp.* (Leptolyngbyaceae) déterminée avec un pourcentage de similitude de 97,50%. C'est une cyanobactérie découverte en 2017 dans la grotte de Giant en Italie (Sciuto et al., 2017).

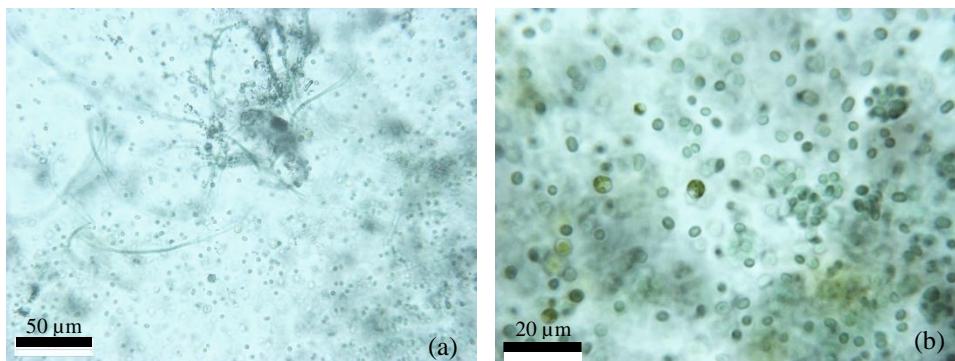


Figure 9 : Observations au microscope optique du biofilm BNC au grossissement x40 (a) et x100 (b).

Sur la craie, on retrouve les trois espèces citées précédemment alors que sur une gélose d'agar, *Pseudostichococcus monallantoides* semble être la seule espèce cultivée (Figure 10) mais lors du séquençage Sanger, nous avons séquencé *Diplosphaera sp.* qui doit alors être aussi présente.

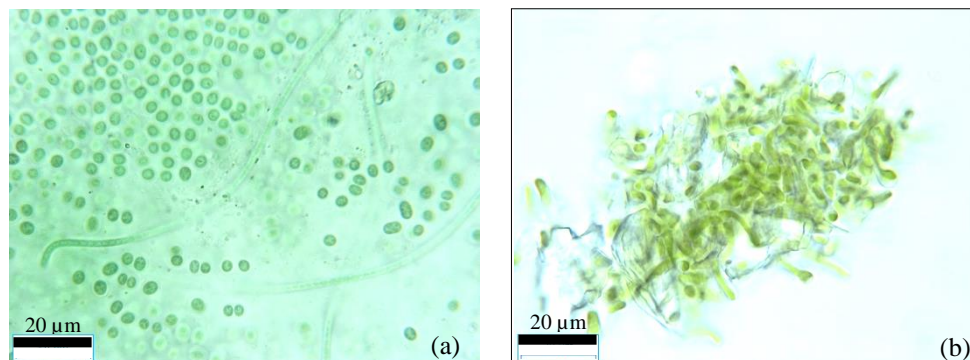


Figure 10 : Observations de BNC cultivé sur la craie avec les *Diplosphaera sp.* (a). Culture de *Pseudostichococcus monallantoides* sur gélose d'agar (b).

(2) Biofilm vert

Les observations de ce biofilm montrent la présence de cellules cylindriques vert-jaune de type *Pseudostichococcus monallantoides* qui ont été séquencées, toutefois une autre algue qui se trouve en nombre majoritaire, correspond à des cellules à 4 ou 2 lobes de couleur vert-bleu (Figure 11a). C'est une espèce dont l'ADN n'a pas pu être extrait pour être séquencé.

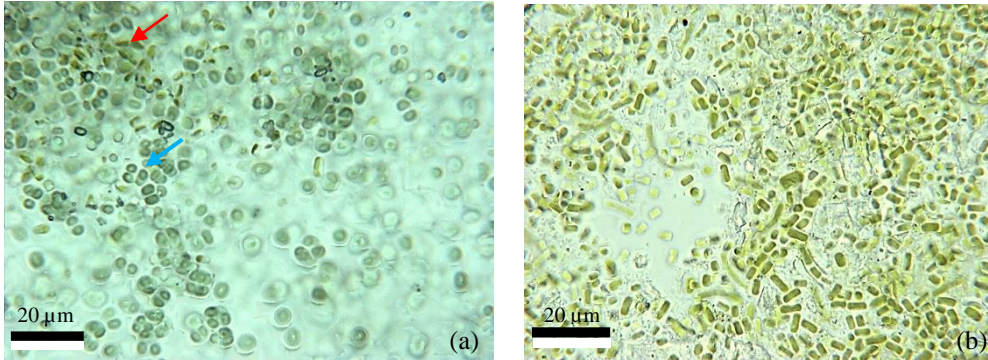


Figure 11 : Observations de BV prélevé sur le bas-relief, avec la présence de *Pseudostichococcus monallantoides* (flèche rouge) et d'une autre espèce bleu-vert à 2 ou 4 lobes (flèche bleue) (a). Culture du même biofilm BV sur une gélose d'agar enrichie de milieu Hoagland. Uniquement *Pseudostichococcus monallantoides* a été cultivée (b).

BV a ensuite été cultivé sur milieu solide composé d'une gélose d'agar additionné de milieu nutritif Hoagland. Une seule espèce a été cultivée, *Pseudostichococcus monallantoides* (Figure 11b).

Lorsque le biofilm est mis en culture liquide avec du milieu Hoagland, on remarque un fort développement de grosses cellules rondes de couleur vert-jaune à de nombreux chloroplastes pariétaux polygonaux (Barberousse et al., 2006). Ce sont des algues *Bracteacoccus sp.* On retrouve aussi le morphotype observé dans le biofilm avec des cellules bleu-vert à 4 lobes ainsi que des filaments que nous avons séquencés comme la cyanobactérie de phylum *Timaviella sp.* (Figure 12a et b).

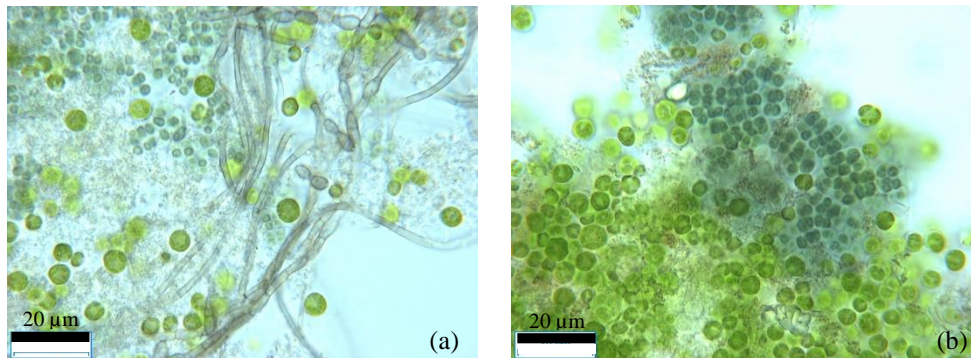


Figure 12 : Observations de BV cultivé en milieu liquide : présence de *Bracteacoccus sp.* (cellules vert-jeune), de l'espèce bleu-vert à 2 ou 4 lobes et de la cyanobactérie *Timaviella sp.*

(3) Biofilm vert foncé à noir

Dans le biofilm BN, on retrouve les cellules de morphotype rond, bleu-vert à 4 lobes (Figure 13), ainsi qu'un nouveau morphotype de couleur orange dont les cellules semblent être aussi à 2 et 4 lobes. Malheureusement ce phylum ne s'est pas développé en sur milieu de culture ni solide, ni liquide.

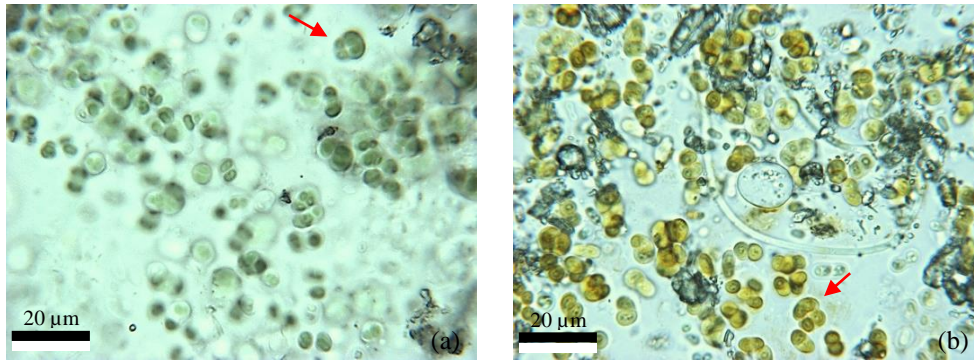


Figure 13 : Observations de BN avec la présence du morphotype rond à 2 ou 4 lobes de couleur bleu-vert (a) ou orange (b).

D'autre part, cette espèce inconnue s'est quand même développée sur des échantillons de craie (Figure 14a) ainsi que la cyanobactérie de phylum *Timaviella sp.* (Figure 14b).

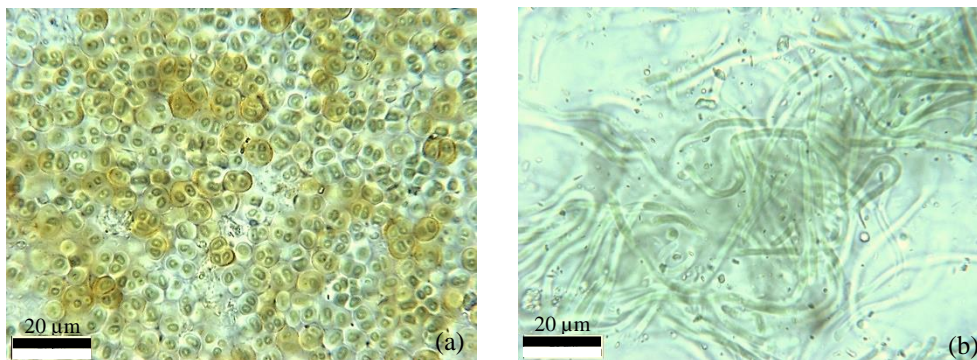


Figure 14 : Observations de BN inoculé sur la craie. Développement du morphotype rond à 2 ou 4 lobes de couleur bleu-vert et orange (a) et de *Timaviella sp.* (b).

(4) Biofilm rouge

Le biofilm rouge, qui est le biofilm le plus présent sur le bas-relief « Fête de Bacchus », doit sa couleur à une algue unicellulaire de la classe des Chlorophycées, la *Chromochloris zofingiensis* (Figure 15a). Cette algue a la particularité d'accumuler de grandes quantités de triacylglycérols dans les corps lipidiques cytoplasmiques. Une fois mise en culture, ces glycérolipides ne gardent pas leur pigmentation orange due probablement aux caroténoïdes et leur taille diminue (Figures 15b).

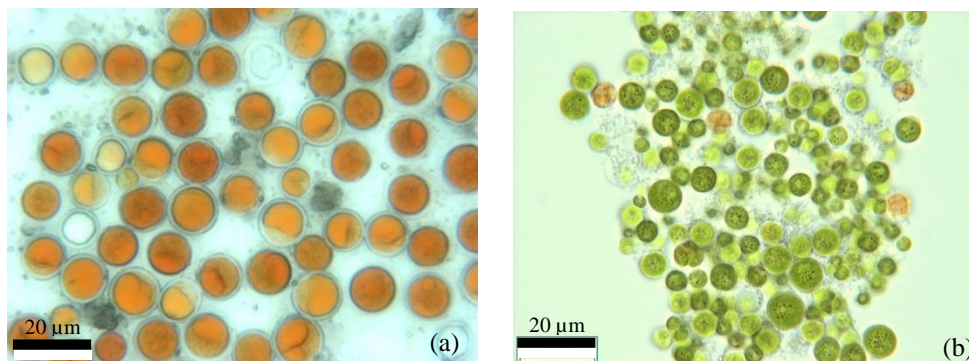


Figure 15 : Observations de BR prélevé sur le bas-relief. Présence de cellules très grosses rondes oranges de *Chromochloris zofingiensis* (a). BR a été cultivé en milieu liquide de Hoagland, la même algue a perdu sa pigmentation orange au profit du vert, les cellules deviennent plus petites (b).

Les cultures sur gélose ont des cellules vertes et petites aussi (Figure 16a) et les cellules développées sur la pierre sont vertes mais plus grosses et certaines ont gardées leur pigmentation légèrement orange (Figure 16b).

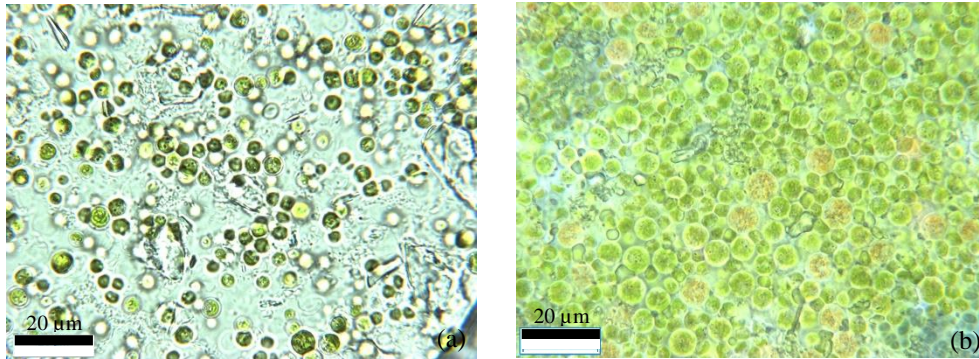


Figure 16 : BR cultivé sur gélose d'agar enrichie en milieu Hoagland montre des algues *Chromochloris zofigiensis* de morphotype rond, petit et vert (a). Ce même biofilm cultivé sur la craie a développé la même algue avec une évolution différente du morphotype que l'on retrouve en culture liquide (b).

b) Biofilms prélevés sur le bas-relief de Silène

(1) Biofilm non ou peu coloré

Après prélèvement sur site, les espèces phototrophes qui ont été observées au microscope optique, correspondent au morphotype cylindrique et vert des *Pseudostichococcus monallantoides* ainsi que le morphotype sphérique et vert des *Diplosphaera sp.* (Figure 17a).

Sur gélose d'agar, il ne reste qu'un morphotype correspondant à *Pseudostichococcus monallantoides* qui a pu se développer (Figure 17b) alors que sur la craie, ce phylum est présent moins en minorité car ce sont plutôt les *Diplosphaera sp.* qui sont en abondance.

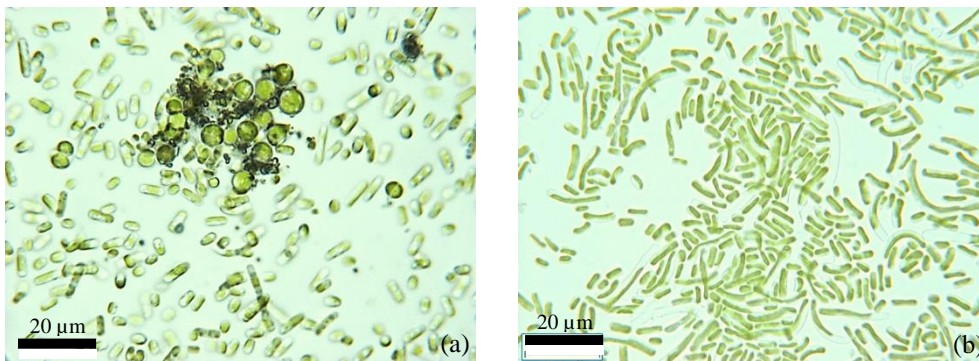


Figure 17 : Biofilm SNC prélevé sur le bas-relief. On remarque la présence *Pseudostichococcus monallantoides* et de *Diplosphaera sp.* (a), alors qu'en culture sur gélose, seul *Pseudostichococcus monallantoides* se sont développées (b).

(2) Biofilm vert

Le biofilm vert de Silène est formé d'algues *Diplosphaera sp.* et *Pseudostichococcus monallantoides* ainsi que des filaments bleu-vert de cyanobactéries *Timaviella sp.* Ces trois micro-organismes sont donc les mêmes qui se sont développées sur les autres biofilms verts du bas-relief « Fête de Bacchus ». Néanmoins, on trouve deux autres morphotypes qui n'ont pas encore été observés et qui n'ont pas pu être identifiés. Il s'agit d'un micro-organisme à filaments épais contenant des chloroplastes verts libres (Figure 18a) et de cellules sphériques entourées d'une gangue transparente à liseré orangé (Figures 18b).

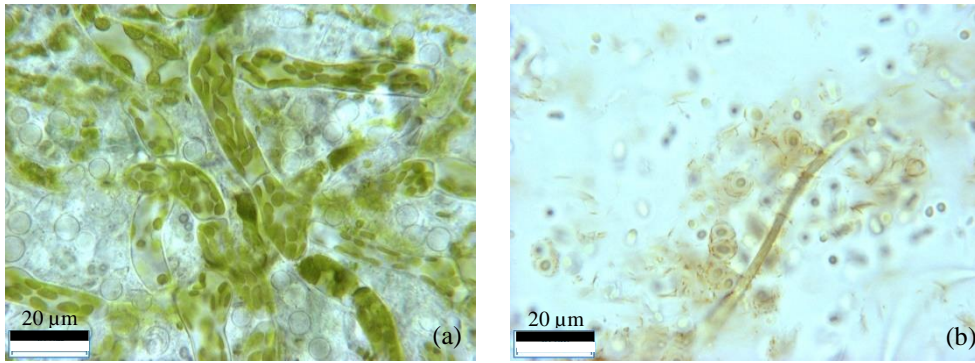


Figure 18 : Biofilm SV prélevé sur le bas-relief. Deux nouveaux morphotypes sont présents dans ce biofilm, le premier correspond à des filaments verts épais (a), et le second morphotype correspond à des cellules individuelles rondes à gangue (b).

Ces micro-organismes ne se sont pas développés en culture sur gélose ni en culture liquide. Avec ces deux modes de culture, il y a essentiellement *Diplosphaera sp.* et *Pseudostichococcus monallantoides* qui sont présents.

(3) Biofilm marron

Dans le biofilm SM, on retrouve les morphotypes trouvés dans les deux biofilms précédents, à savoir *Diplosphaera sp.*, *Pseudostichococcus monallantoides* et *Timaviella sp.* Néanmoins, ce biofilm se distingue des autres par la présence d'une Bryophyte proche de *Eucladium verticillatum*, à filaments ligneux riche marron qui explique la couleur du biofilm (Figure 19 a et b).

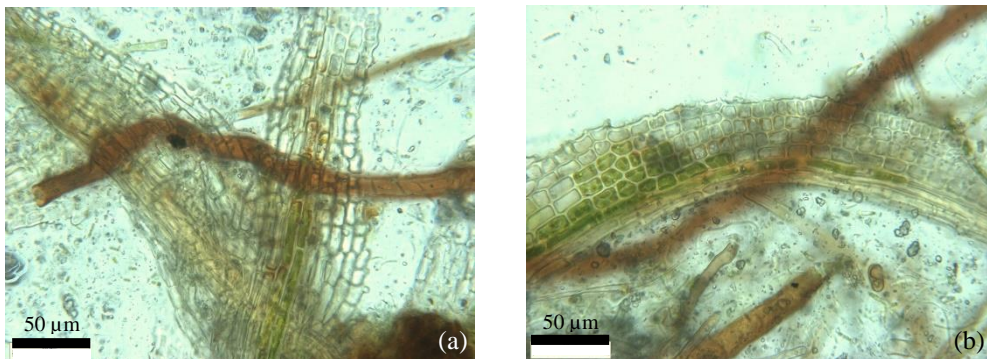


Figure 19 : Biofilm SM prélevé sur le bas-relief. Des filaments ligneux marrons et de cellules à chloroplastes verts correspondent au phylum *Eucladium verticillatum* (a) et (b).

On retrouve ces micro-organismes en culture liquide même si la Bryophyte est beaucoup moins présente (Figure 20a), ainsi que les filaments épais à chloroplastes (Figure 20b). *Diplosphaera sp.*, *Pseudostichococcus monallantoides* sont beaucoup plus abondants. Par contre, la culture sur gélose ne développe que l'algue *Pseudostichococcus monallantoides*.

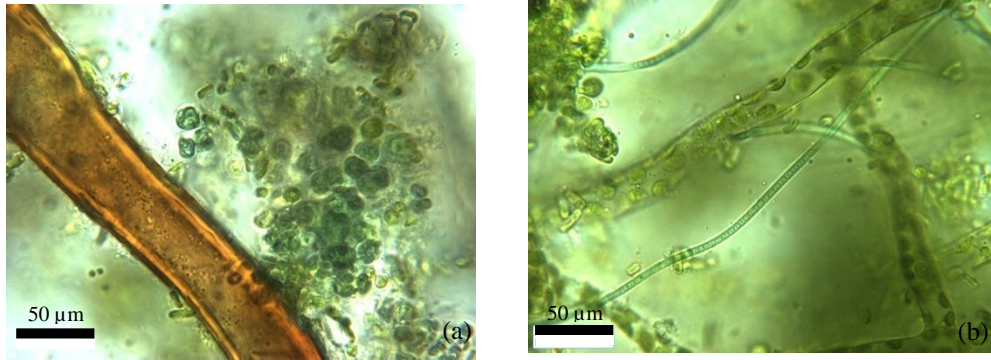


Figure 20 : Biofilm SM en culture liquide. On peut observer encore *Eucladium verticillatum* (a) ainsi que le morphotype observé dans SV, à filaments épais et chloroplastes libres (b).

En conclusion, tous les biofilms possèdent une diversité de micro-organismes phototrophes dont certains n'ont pas pu être identifiés et d'autres sont communs aux biofilms peu colorés et verts sur les deux bas-reliefs, tels que les algues *Diplosphaera sp.*, *Pseudostichococcus monallantoides* et la cyanobactérie de type *Timaviella sp.* Le biofilm rouge est caractérisé par une algue proche du phylum *Chlorella sp.* telle que *Chromochloris zofingiensis*. Néanmoins ce micro-organisme change de couleur et de taille en milieu de culture. Le changement de couleur et de taille serait lié au changement de milieu et notamment à l'intensité lumineuse (Azaman et al., 2017). En conditions de culture autotrophe avec une intensité lumineuse de $150 \mu\text{mol photon.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$, les algues sont petites et vertes alors qu'elles deviennent grosses et oranges en conditions mixotrophiques à savoir à plus faible intensité lumineuse de $150 \mu\text{mol photon.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$ et par l'ajout de glucose.

4. La métagénomique ciblée

a) *Protocole*

La métagénomique ciblée permet d'établir un inventaire d'une communauté microbienne et de connaître les espèces présentes au sein de la communauté étudiée et leur abondance. Elle est basée sur l'analyse de l'ADN environnemental par séquençage haut débit (NGS) à partir de régions d'ADN ciblées, préalablement amplifiées par PCR. C'est une analyse plus complète que celle issue de cultures microbiennes puisqu'elle détermine la totalité des espèces présentes et pas seulement celles qui sont cultivables en laboratoire.

L'ADN total est extrait de l'échantillon de biofilm prélevé sur site grâce au DNeasy Power Biofilm Kit de Qiagen. Ces extraits d'ADN ont été envoyés à la société IMR-bio (Integrated Microbiome Resource) localisée à Halifax au Canada. Nous avons envoyé 3 échantillons d'ADN pour chaque zone de biofilm des bas-reliefs. Sur « Fête de Bacchus », pour le biofilm non coloré nous avons utilisé les échantillons BNC1, BNC3, BNC4 ; pour le biofilm vert les échantillons BV1, BV3, BV4, pour le biofilm noir, les échantillons BN1, BN2 et BN4 et pour le biofilm rouge, les échantillons BR1, BR3 et BR4. Sur « Silène », pour le biofilm non coloré nous avons pris les échantillons SNC1, SNC2, SNC4, pour le biofilm vert, les échantillons SV1, SV3, SV4 et pour le biofilm marron, les échantillons SM1, SM2 et SM4 (localisation des échantillons au paragraphe III.1.).

Un gène en particulier est amplifié par PCR, en général un marqueur phylogénétique comme le gène codant pour l'ARN 16S pour les procaryotes (bactéries et cyanobactéries) ou 18S pour les eucaryotes (champignons, levures, algues et microfaune).

Les amplicons obtenus sont ensuite purifiés, dosés et « poolés » puis séquencés par une méthode de séquençage à haut débit Illumina MiSeq et finalement analysés par bioinformatique. Les séquences de mauvaise qualité ne sont pas retenues, les séquences de bonne qualité sont alignées avec des bases de données et enfin regroupées en OTU (Operational Taxonomic Unit) pour les amplicons 16S ou 18S. Les OTU consistent à regrouper des organismes phylogénétiquement proches et ils sont calculés grâce au logiciel open source Mothur. La taxonomie des OTUs est ensuite assignée grâce à des bases de données reconnues (SILVA, Greengenes) et il est possible ainsi d'observer la distribution de ces OTUs en fonction des échantillons. Des tests statistiques vont permettre de comparer plusieurs échantillons, et des indices de diversité vont permettre de connaître la richesse spécifique d'un échantillon (alpha diversity), et de comparer la diversité présente entre les échantillons (beta diversity), voir la diversité de l'écosystème au total (gamma diversity) (Cennamo et al., 2016; Li et al., 2018; S. Pfendler et al., 2018). Pour nos données, nous avons utilisé la méthode de Bray-Curtis pour évaluer la dissimilarité entre deux échantillons donnés, en termes d'abondance de taxons présents dans chacun des échantillons. A partir des distances calculées de Bray-Curtis, on a calculé une NMDS (Non-Metric Multidimensional Scaling) pour les données issues du séquençage ARN 16 S et celles issues séquençage ARN 18 S. Le Multidimensional Scaling (MDS) permet de passer d'une matrice de proximité (similarité ou dissimilarité) entre une série de N objets aux coordonnées de ces mêmes objets dans un espace à p dimensions. Une NMDS ne tient compte que l'ordre des dissimilarités.

b) *Résultats*

Les résultats du séquençage total des biofilms montrent une faible quantité de micro-organismes séquencés ainsi qu'une faible biodiversité, ce qui va dans le sens des autres études menées où la lampenflora est caractérisée par une faible biodiversité par rapport à la flore qui se trouve à l'entrée d'une grotte et qui reçoit plus de lumière (Mulec and Kosi, 2009). En effet, le faible apport en nutriments issu de la pierre implique une faible abondance et diversité d'organismes qui est observée dans la plupart des sites souterrains colonisés par la lampenflora (Mulec et al., 2008).

(1) Les micro-organismes eucaryotes

Les eucaryotes sont des organismes unicellulaires ou pluricellulaires qui possèdent un noyau et des organites spécialisés. Ils rassemblent les animaux, les champignons, les plantes et les protistes. Dans les séquences ADN obtenues par Illumina, nous avons principalement des micro-organismes issus du règne végétal avec les chlorophytes et les Phragmoplastophytes (mousses), les champignons avec Mucoromycota, Ascomycota et Basidiomycota. Plus secondairement, les micro-organismes du règne animal sont présents tels que les vers (annélides, nématodes), les arthropodes, les protistes (rotifères, ciliophora (cils), cercozoa).

La séquences des eucaryotes sont en plus faible quantité que celles des procaryotes puisqu'il n'y a que 39700 séquences alors qu'il y a 1.2 millions pour les procaryotes. On remarque qu'une grande partie de ces séquences (31%) sont issues du biofilm SP prélevé sur une zone en plâtre de « Silène » (Figure 21). Puis SM possède 21% de la totalité des séquences, SNC a 14% et SV a 3%. Le bas-relief « Silène » contient beaucoup plus de séquences que « Fête de Bacchus » qui n'a en fait que 31.2% des séquences. On remarque que BR a très peu de séquences (0.04%). De plus, on remarque que la répartition entre les différents échantillons au sein d'un même biofilm est inégale. Pour BN, quasiment toutes les séquences appartiennent à BN4 ; pour BNC, elles viennent de BNC4 et BS ; pour BV, elles viennent de BV4 et SNC, elles appartiennent à SNC1.

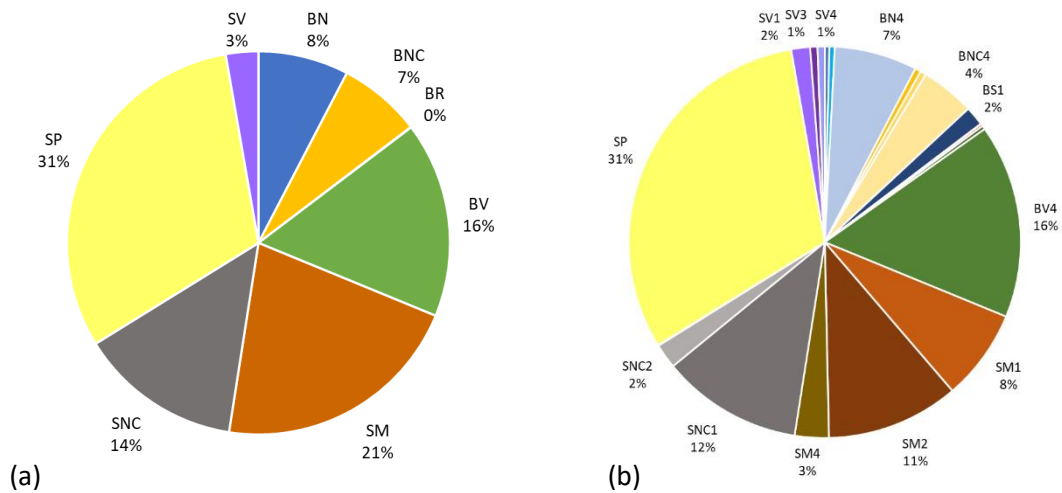


Figure 21 : Pourcentage de séquences analysées par biofilm (a) et par échantillon (b) sur la totalité des séquences obtenues pour l'ARN 18S.

L'arbre phylogénétique (Figure 22) et la matrice de corrélation NMDS (Figure 23) permet de déterminer les similitudes qu'il existe ou pas entre les différents échantillons prélevés de façon arbitraire sur les bas-reliefs puisque nous avons uniquement tenu compte que de la couleur du biofilm. Les échantillons issus du même bas-relief sont globalement regroupés ensemble dans la NMDS. Pour « Silène », les échantillons sont plutôt rassemblés dans le haut du graphique alors que ceux de « Fête de Bacchus » sont dans le bas du graphique. A part l'échantillon BV4 qui n'est pas associé à BV1 et BV3 et BR1 qui a trop peu de séquences, tous les autres échantillons issus des biofilms colorés et non colorés ont des compositions proches. Les biofilms ont donc des micro-organismes qui les caractérisent.

Pour le biofilm BNC (Figure 25), peu à non coloré, la majorité des micro-organismes séquencés appartiennent à la classe des Chlorophytes avec un nombre plus important pour BNC4 que BNC1 et 3. Il s'agit des espèces de l'ordre des Trebouxiophycées avec les *Coccomyxa*, les *Sphaeropleales* avec les *Chromochloris* et les Prasiodales avec *Sticococcus* alors que nous n'avons cultivé que *Diplosphaera* comme algue verte pour ce biofilm. Toutefois il s'agit aussi d'une algue qui appartient à l'ordre des Prasiodales. Pour les champignons, il y a un nombre élevé de Mucoromycètes avec l'espèce *Mortierella* aussi pour BNC4, les Ascomycètes avec *Plectosphaerella* sont aussi présents.

BS est un biofilm très différent des trois autres avec une répartition équilibrée des différents taxons avec un nombre important d'Ascomycètes telle que l'espèce *Penicillium*. Les Basidiomycètes sont présents aussi avec les Agaricales ainsi que les Embryophytes qui ne sont pas présents dans les autres échantillons.

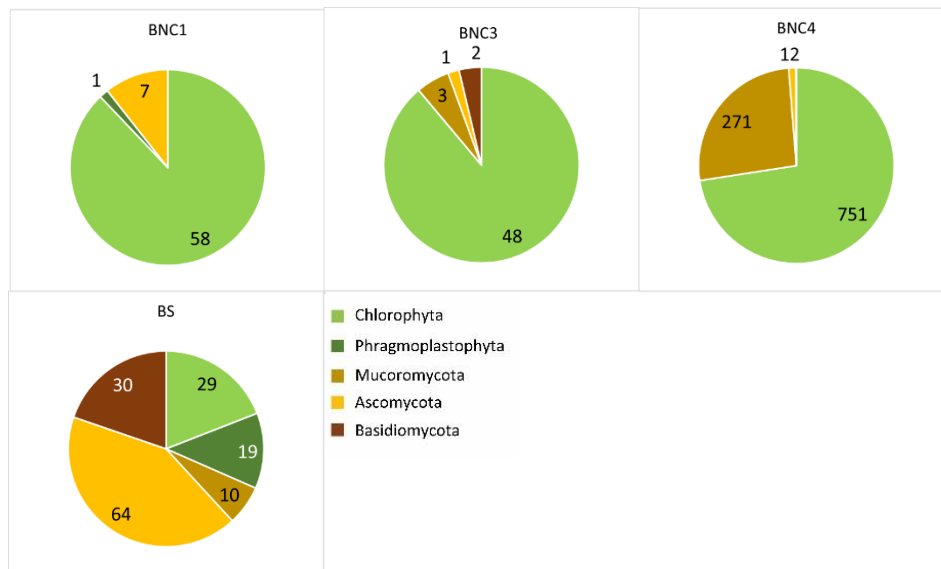


Figure 25 : Répartition des algues (Chlorophytes), mousses (Phragmoplastophytes) et champignons (Mucoromycètes, Ascomycètes, Basidiomycètes) dans les échantillons du biofilm **BNC**.

Pour le biofilm BV (Figure 26), de couleur verte, les trois échantillons ont une répartition des micro-organismes très différents surtout pour BV4 qui possède 5815 séquences d'Embryophytes donc il a une composition proche du biofilm BN avec beaucoup plus d'organismes. Les champignons Ascomycètes sont aussi fortement présents (228) avec *Plectosphaerella*, *Hypocreales*, *Microascales* et *Chaetothyriales*. Ce sont ces familles de champignons que nous avons cultivés et séquencés.

Les deux autres échantillons ont eu peu d'organismes séquencés. Il s'agit en majorité de champignons Ascomycètes, il y a aussi des Mucoromycètes avec les Glomerales et des Glomeromycètes. D'autre part, nous avons cultivé des levures de type *Rhodotorula* que nous ne retrouvons pas dans le séquençage total.

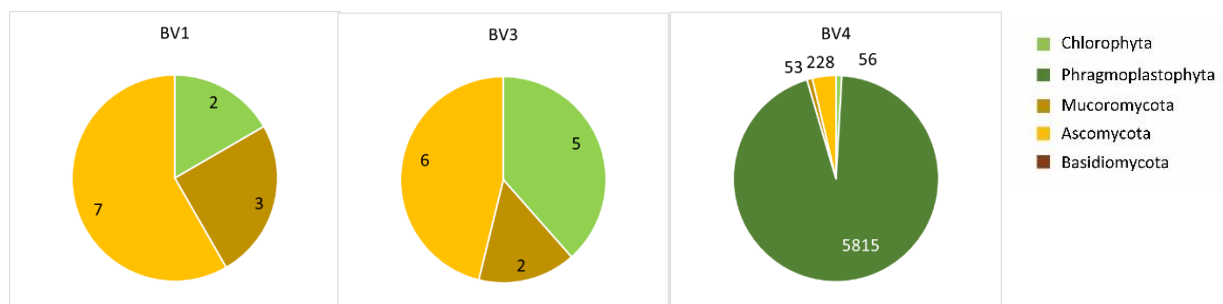


Figure 26 : Répartition des algues (Chlorophytes), mousses (Phragmoplastophytes) et champignons (Mucoromycètes, Ascomycètes) dans les échantillons du biofilm **BV**.

Sur le bas-relief « Silène », le biofilm non coloré SNC, a une micro-flore de proportion différente dans les deux échantillons SNC1 et SNC2 (Figure 27) (SNC4 a trop peu de séquences pour être analysé). Dans SNC1, 3954 Chlorophytes ont été séquencés avec une présence importante des algues *Stichococcus*, quelques *Pseudostichococcus* et *Chromochloris* qui ont été cultivées en laboratoire, il y a d'autres Chlorophytes que les séquences ADN n'ont pas permis de déterminer. Pour SNC2, il n'y a que 87 Chlorophytes avec la présence de *Stichococcus*. Cet échantillon est surtout caractérisé essentiellement par des champignons de la division des Ascomycètes avec l'espèce *Plectosphaerella* ainsi que des champignons de l'ordre des Hypocreales.

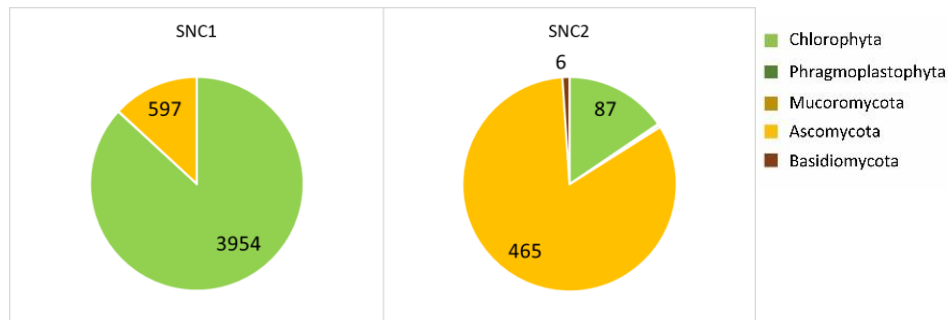


Figure 27 : Répartition des algues (Chlorophytes), et champignons (Ascomycètes, Basidiomycètes) dans les échantillons du biofilm SNC.

Le biofilm vert SV, a deux échantillons dont la composition est similaire, SV3 et SV4 même si SV3 a plus d'organismes séquencés. Ils ont une micro-flore composée de Chlorophytes avec les espèces *Chromochloris* et *Stichococcus* et une faible proportion de champignons et de Phragmoplastophytes (Figure 28). SV1 est très différent et a beaucoup plus d'organismes séquencés avec une majorité de Phragmoplastophytes (264) avec le taxon des Embryophytes (mousses), les Chlorophytes sont plus faibles avec 43 organismes avec *Stichococcus*. Par contre les champignons Ascomycètes avec les Hypocreales et les Chaetothyriales sont beaucoup plus présents (149).

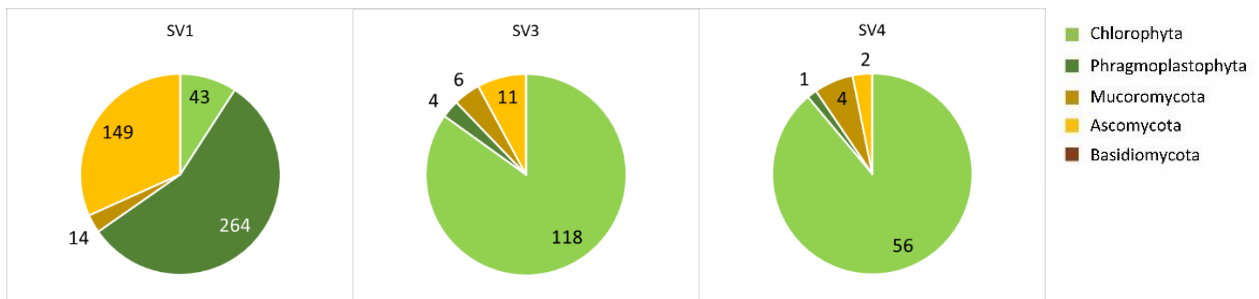


Figure 28 : Répartition des algues (Chlorophytes), mousses (Phragmoplastophytes) et champignons (Mucoromycètes, Ascomycètes) dans les échantillons du biofilm SV.

Le biofilm marron SM possède une large proportion de Phragmoplastophytes avec la sous-division des Embryophytes (Figure 29), ce qui correspond à l'espèce *Eucladium verticillatum* qui a été cultivée en milieu liquide même si le séquençage n'a pas été au-delà de la sous-division. SM1 contient aussi beaucoup de Chlorophytes (636) avec la présence de *Stichococcus*. Les champignons représentent aussi une partie non négligeable de ce biofilm avec 195 à 1542 organismes d'Ascomycètes avec l'espèce *Plectosphaerella* et une autre espèce de l'ordre des Hypocreales.

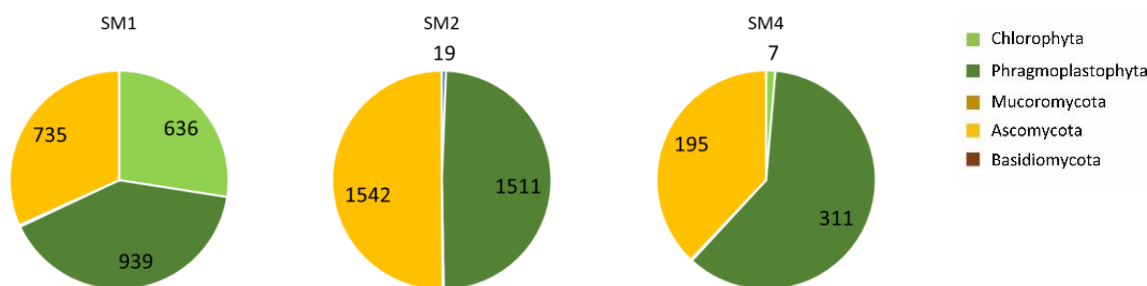


Figure 29 : Répartition des algues (Chlorophytes), mousses (Phragmoplastophytes) et champignons (Ascomycètes) dans les échantillons du biofilm SM.

Enfin, de façon plus marginale, l'échantillon SP issu d'une zone de réparation en plâtre possède que des champignons d'une diversité importante, principalement des Ascomycètes avec *Cladospirium*, *Pleosporaceae*, *Chaetothyriales*, *Eurotiales* (dont fait partie l'espèce *Penicillium*), *Plectosphaerella*, *Hypocreales*, *Parengyodontium* et *Microascales* et les *Agaricales* pour les *Basidiomycètes*.

(2) Les micro-organismes procaryotes

Il s'agit de micro-organismes unicellulaires qui ne possèdent pas de noyau ni d'organites membranés. Ce sont les bactéries, les archées et cyanobactéries. Plus de 1.2 millions de séquences 16S ont été répertoriées lors du séquençage. La répartition entre les différents biofilms est assez équitable sauf pour le biofilm rouge de « Fête de Bacchus », BR, qui n'a que 3% de séquences sur la totalité alors qu'il y a trois échantillons. C'est SM qui a le plus de séquences avec 23%, puis SV avec 18%, BV avec 16%, BNC avec 14%, BN avec 13% et SNC avec 12%. SP n'a que 1% mais il n'y avait qu'un seul échantillon (Figure 30). Lorsqu'on regarde en détail la répartition pour chaque type de biofilm, le pourcentage de séquences par échantillon, montre une assez bonne répartition sauf le biofilm SNC où il y a 9% de séquences dans SNC2 alors qu'il y a 4% dans SNC1 et 0.1% dans SNC4.

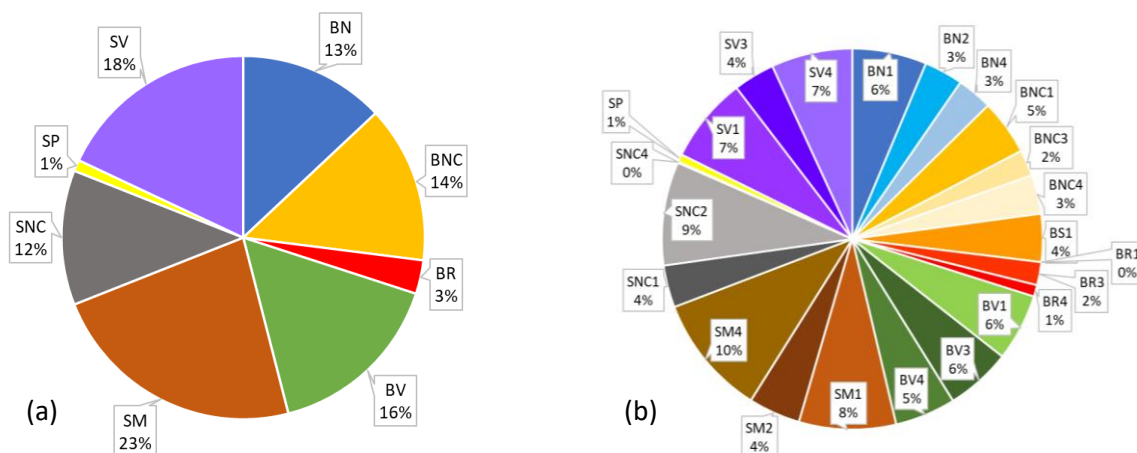


Figure 30 : Pourcentage de séquences analysées par biofilm (a) et par échantillon (b) sur la totalité des séquences obtenues pour l'ARN 16S.

L'arbre phylogénétique obtenu par l'analyse des distances entre les OTU préalablement calculés ainsi que la matrice de distance NMDS permet de définir des similarités entre les échantillons et de les visualiser (Figures 31-32). On remarque dans l'arbre phylogénétique, que les échantillons attribués à un même biofilm en fonction de sa couleur sont quasiment tous assez bien associés donc corrélés entre eux, ce qui suppose que les OTU de ces échantillons ont un nombre d'espèces en commun qui les caractérisent. Dans la NMDS, les échantillons issus du bas-relief « Fête de Bacchus » sont rassemblés à

gauche du graphique et sont bien distincts de ceux issus de « Silène ». Chaque bas-relief semble donc avoir des espèces caractéristiques qui les différencient l'un de l'autre.

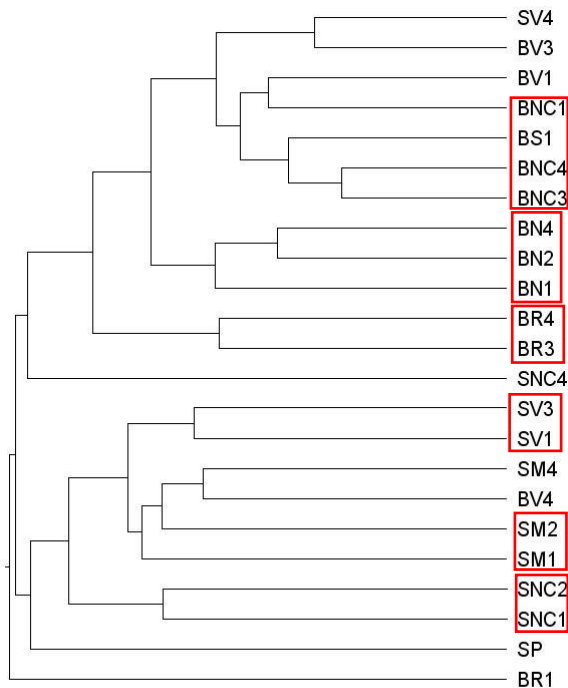


Figure 31 : Arbre phylogénétique des **ARN 16S** des échantillons prélevés sur « Fête de Bacchus » et « Silène ».

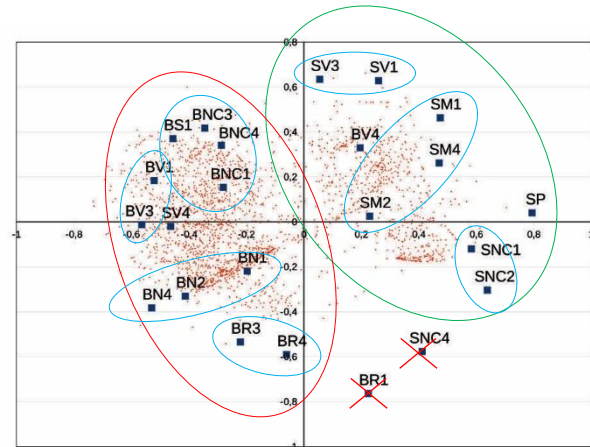


Figure 32 : Projection du nuage de points représentant les OTU et de la matrice de distance NMSD, d'un espace de n dimensions à un espace à 2 dimensions.

La répartition des taxons dans chaque biofilm est assez proche d'un échantillon à un autre. Dans tous les biofilms, il y a principalement une majorité de Protéobactéries puis il y a les Bacteroidetes, les Acidobactéries et les Actinobactéries.

Sur le bas-relief « Bacchus », c'est ce que l'on retrouve dans le biofilm BN, les trois échantillons sont assez semblables en quantité d'individus et en biodiversité où on a les quatre principaux taxons cités précédemment (Figure 33). Les Protéobactéries sont présentes avec l'espèce majoritaire Hyphomonadaceae. En culture, nous avons isolé la souche *Lysobacter* où un faible nombre a été séquencé ici. Bacteroidetes sont représentées par Microscillaceae, Acidobactéries par *Bryobacter* et Solibacteraceae et enfin Actinobactéries par *Crossiella*.

La classe des Chloroflexes est assez présente dans BN1 avec les espèces *Ardenticatenaceae*, *Thermomicrobiales*. Les Chloroflexes appartiennent à la classe de Chlorobactéria et sont composées de filaments verts car elles produisent de l'énergie par photosynthèse mais ne produisent pas de O₂ et ne fixent pas le CO₂ comme les cyanobactéries. Etant donné la quantité non négligeable de ces bactéries, les fins filaments verts qui ont été observés au microscope optique pourraient donc être soit des Chloroflexes soit des cyanobactéries qui sont en plus faibles quantités.

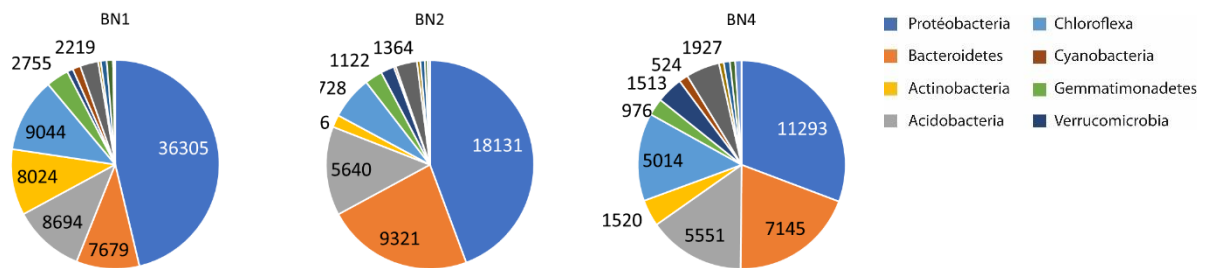


Figure 33 : Répartition des bactéries séquencées dans les échantillons du biofilm **BN**.

Le biofilm BNC ressemble beaucoup à BN, les taxons majoritairement présents sont les mêmes avec toutefois plus de Gemmatimonadetes pour BNC1 (Figure 34).

Les Protéobactéries sont présentes avec les Rhizobiales, Dongiales et Hyphomicrobiaceae (Hyphomicrobium, Pedomicrobium et Nordella) en majorité alors que les espèces qui ont été cultivées sont moins nombreuses (Sphingopyris et Rhodospirillum). Les Acidobactéries sont représentées par Bryobacter et Solibacteraceae. Les Actinobactéries sont en nombre important surtout dans BNC4 et BS1 avec Pseudonocardia, Acidimicrobiia, Solirubrobacterales. Les Bacteroidetes sont moins présentes que dans BN mais elles sont représentées par les espèces Microscillaceae et Chitinophagaceae. Les Chloroflexes sont aussi bien développées dans BNC1 avec Ardenticatenaceae, Thermomicrobiales. On remarque aussi dans BNC4, la présence des cyanobactéries avec le taxon Oxyphotobacteria.

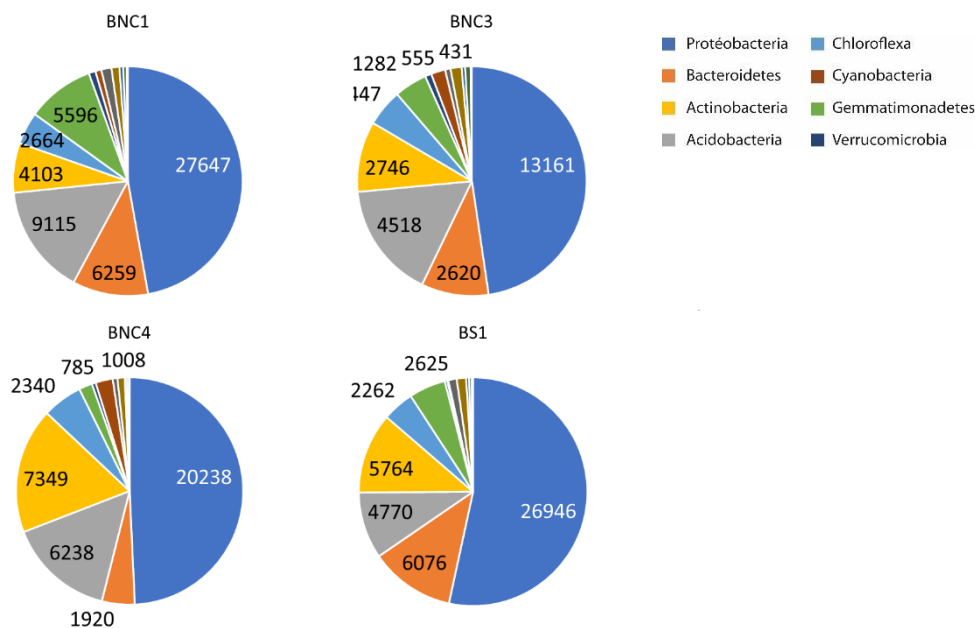


Figure 34 : Répartition des bactéries séquencées dans les échantillons du biofilm **BNC et BS**.

Les échantillons du biofilm BV sont moins homogènes entre eux (Figure 35), il y a toujours une forte proportion de Protéobactéries qui représentent presque les trois quarts des espèces pour BV4 et plus de la moitié pour BV2 avec les taxons Caulobacterales (Hyphomonadaceae), les Rhizobiales (Hyphomicrobium, Pedomicrobium). Toutefois les Bacteroidetes sont en majorité dans BV1 avec la présence de Niastella et Pseudoflavitalea. Il y a ensuite Acidobactéries avec Blastocatellia puis les Chloroflexes fortement présentes avec Ardenticatenaceae dans BV3. Les Actinobactéries sont présentes avec Microtrichales mais nettement plus secondaires que dans le biofilm BNC.

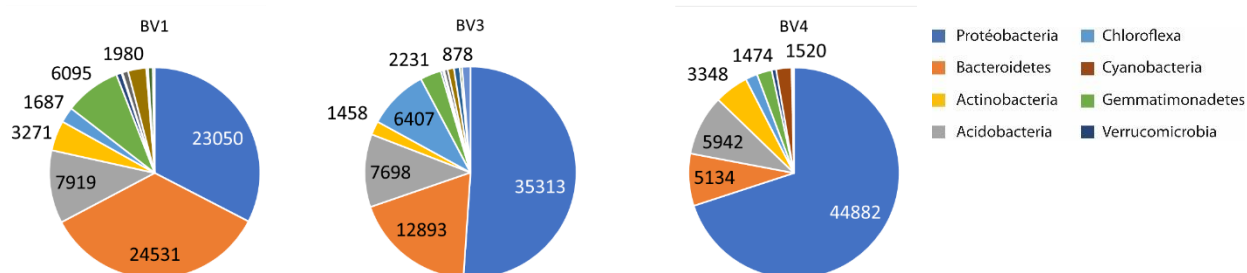


Figure 35 : Répartition des bactéries séquencées dans les échantillons du biofilm **BV**.

Enfin dans le biofilm rouge BR, les bactéries sont moindres que dans les autres biofilms (Figure 36). Néanmoins les Protéobactéries sont toujours le taxon le plus important surtout dans BR4 et sont représentées par *Hirschia* et *Hyphomicrobiaceae*. Puis les Acidobactéries sont aussi bien représentées avec le taxon *Blastocatellia*, Bacteroidetes avec *Niastella* et *Microscillaceae*. La famille de bactéries Verrucomicrobia est beaucoup plus présente dans ce biofilm surtout dans BR3 que dans les autres biofilms notamment avec les taxons *Luteolibacter* et *Cthoniobacter*. Enfin on retrouve aussi en nombre non négligeable les Chloroflexes avec *Ardenticatenaceae*.

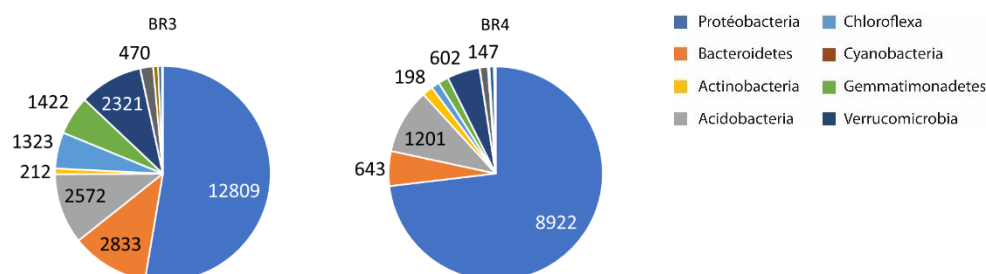


Figure 36 : Répartition des bactéries séquencées dans les échantillons du biofilm **BR**.

Le bas-relief « Silène » possède les mêmes classes majeures de bactéries à savoir Protéobactéries, Bacteroidetes, Acidobactéries et Actinobactéries.

Dans le biofilm SNC, SNC4 a vraiment peu d'individus qui ont été séquencés par rapport aux deux autres échantillons (Figure 37). Cependant, il y a beaucoup de diversité des espèces. SNC2 a le plus grand nombre de séquences avec une large majorité de Protéobactéries avec *Hyphomicrobium* et *Rhizobiaceae*. Les Bacteroidetes sont très nombreuses uniquement dans SNC2 avec les taxons *Cyclobacteriaceae*. Les Actinobactéries sont bien développées dans SNC1 et SNC2 avec des taxons *Micromonosporaceae* (SNC1), *Pseudonocardiaceae* (*Pseudonocardia*) (SNC2)

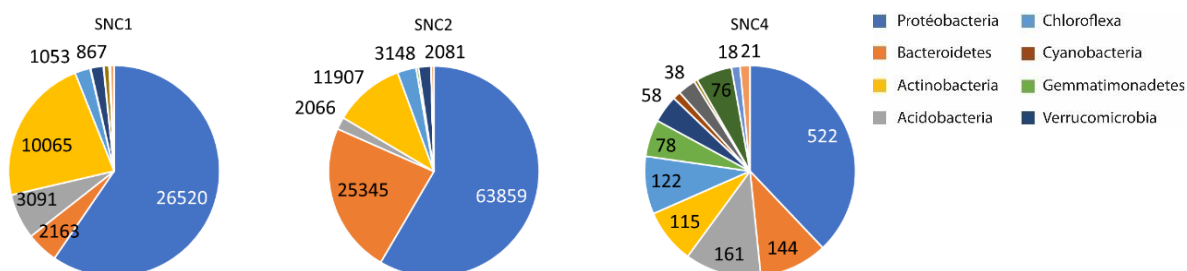


Figure 37 : Répartition des bactéries séquencées dans les échantillons du biofilm **SNC**.

Dans le biofilm SV (Figure 38), les échantillons SV1 et SV4 ont le plus d'individus séquencés avec toujours une majorité de Protéobactéries avec une diversité importante de taxons dont les majeurs sont Alphaproteobacteria, Dongiales (*Dongia*), Rhizobiales (*Hyphomicrobiaceae*, *Nordella*), Sphingomonadaceae (*Sphingopyxis*), Gammaproteobacteria (*Steroidobacter*), Xanthomonadales.

Les Bacteroidetes présents correspondent à Chitinophagaceae (Chitinophaga, Flavitalea), Cytophagales (Microscillaceae) et Flavobacteriaceae. Les Acidobactéries sont aussi très développées avec le taxon Blastocatellales (Stenotrophobacter) puis plus secondairement avec Solibacterales (Bryobacter, Solibacteraceae).

Dans l'échantillon SV1, les Cyanobactéries est le 4^{ème} groupe le plus important. Dans le détail, c'est la classe des Oxyphotobacteria avec les Leptolyngbya dont font partie les *Timaviella circinata* séquencées à partir des cultures liquides. Il y a aussi la classe des Nostocales avec les Chalicogloea qui sont bien représentées.

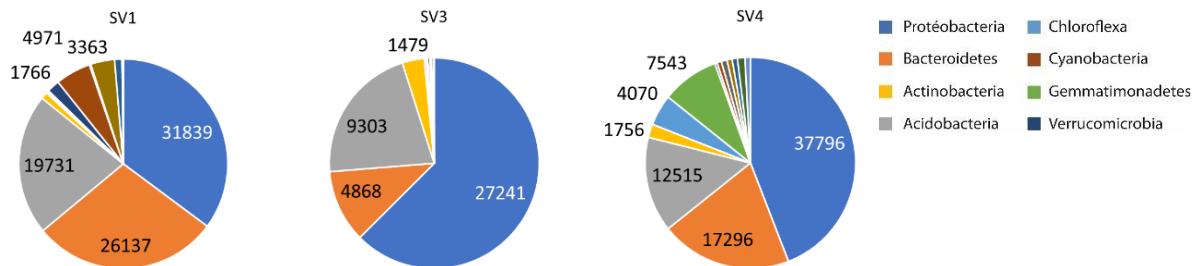


Figure 38 : Répartition des bactéries séquencées dans les échantillons du biofilm **SV**.

Dans le biofilm marron SM, les trois échantillons ont un nombre important de séquences avec toujours les Protéobactéries en large majorité (Figure 39). Les taxons les plus représentés sont les Rhizobiales (Pseudaminobacter, Phyllobacterium, Hyphomicrobium, Pedomicrobium) et les Gammaproteobacteria. Dans SM1 et SM2, les Bacteroidetes sont très présents aussi avec les taxons Microscillaceae, Dyadobacter et Taibaiella. Puis il y a les Acidobactéries qui sont présentes avec le taxon Bryobacter dans les trois échantillons et surtout dans SM4. Dans cet échantillon, il y a aussi beaucoup de Actinobactéries avec les taxons Microtrichales et les Micromonosporales (Catellatospora) alors qu'elles sont en plus faible nombre dans SM1 et SM2.

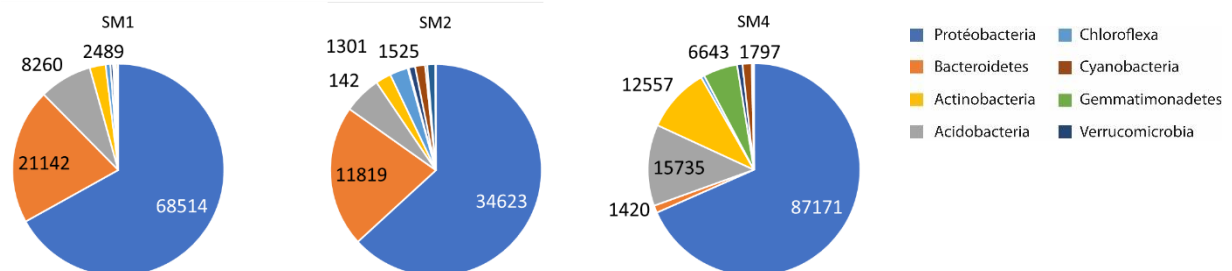


Figure 39 : Répartition des bactéries séquencées dans les échantillons du biofilm **SM**.

Enfin, l'échantillon SP, prélevé sur une zone de plâtre, contient une faible quantité d'espèces et il a une répartition complètement différente des autres échantillons (Figure 40). Il possède en grande majorité de Actinobactéries avec le taxon Pseudonocardia. Les Protéobactéries sont les deuxièmes groupes de bactéries les plus importantes. Elles sont représentées par les Rhizobiaceae (Aliihoeflea) et les Sphingomonadales (Sphingomonas).

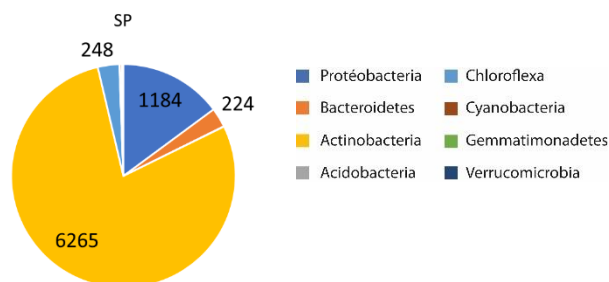


Figure 40 : Répartition des bactéries séquencées dans les échantillons du biofilm **SP**.

III. Evaluation de l'efficacité de produits biocides sur la craie

A. Méthodes utilisées pour contrôler la lampenflora

1. Méthodes curatives

a) *Le brossage et le lavage à l'eau pressurisé*

Ce sont des méthodes physiques d'élimination de biomasse qui peut être utilisée pour les monuments en pierre. Ils ont l'avantage d'être simple à mettre en place et de ne pas générer de produits toxiques, contrairement aux approches chimiques. Cependant, ils ne sont pas efficaces à long terme, et ils peuvent également à terme endommager les pierres fragiles (Baquedano Estévez et al., 2019)

b) *L'hypochlorite de sodium*

L'hypochlorite de sodium, NaClO, ou simplement l'eau de javel dilué est un composant fortement oxydant, et souvent utilisé comme désinfectant. Il est utilisé, pour des solutions de concentration d'environ 5% dans la désinfection de pierres, et y a démontré son efficacité. Cependant il est totalement proscrit pour les monuments classés en France par le laboratoire des monuments historiques (LRMH) car il contient du chlore et du sodium et génère des sels qui peuvent impliquer des dégâts irréversibles pour la pierre (Oriol et al., 2011). D'autre part, l'utilisation d'hypochlorite de sodium peut également provoquer une coloration rougeâtre des substrats carbonatés en raison de l'oxydation de Fe^{2+} en Fe^{3+} , qui précipite sous forme d'hydroxyde de fer amorphe $Fe(OH)_3$. Il est donc important de rincer abondamment le support à l'eau déionisée (Iliopoulou-Georgoudaki et al., 1993).

c) *Le peroxyde d'hydrogène*

Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 est un composé miscible dans l'eau qui est utilisé depuis longtemps comme agent antibactérien, agissant comme un oxydant fort et allant oxyder la matière organique : $(CH_2O)_n + 2nH_2O_2 \rightarrow nCO_2 + 3nH_2O$. Il présente cependant des risques corrosifs pour la pierre s'il est mal dilué, s'attaquant aux carbonates. Il est cependant peu impactant pour les pierres à une concentration de 15 % (Perez, 2018; Trinh et al., 2018).

d) *Les ammoniums quaternaires*

Les biocides à base de sels d'ammonium quaternaire sont très utilisés sur les monuments, leur efficacité et leur innocuité sur la pierre sont reconnues ((Blazquez et al., 2000; Barberousse et al., 2007; Nugari et al., 2009; Favero-Longo et al., 2017). Leur efficacité dépend des recommandations d'application. Néanmoins, lorsqu'ils sont utilisés en traitement curatif pour nettoyer les pierres, un rinçage important est nécessaire car les résidus d'ammonium quaternaire empêche l'action d'autres produits appliqués par la suite comme les hydrofuges ((Moreau et al., 2008). D'autre part, en milieu souterrains, comme dans les grottes de Lascaux, les bactéries gram négatives de type *Pseudomonas sp.*, ont montrés une résistance en utilisant ces biocides au cours du temps (Bastian et al., 2009).

e) *Les nanoparticules*

Les nanoparticules métalliques sont actuellement très utilisées et fournissent une alternative aux autres biocides. Elles induisent un stress oxydatif qui altère la paroi cellulaire ou casse la membrane et la chaîne d'ADN. Les métaux les plus couramment utilisés sont : Ag, Cu, Zn et Ti (Eyssautier-Chuine et al., 2014, 2015; Goffredo et al., 2017; Becerra et al., 2018). Les nanoparticules d'oxyde de Titane sont très utilisées dans de nombreux domaines et dans le patrimoine en pierre. Elles agissent par photocatalyse comme accélérateur de réaction chimique. Leur action nécessite les rayons ultraviolets

pour engendrer une photolyse des molécules d'eau et un stress oxydant (La Russa et al., 2014). Par conséquent, dans les milieux souterrains la photocatalyse n'est pas réalisable à moins d'une installation de lampes UV pour que le type de composé soit efficace.

f) Le rayonnement ultraviolet germicide

Il s'agit d'un rayonnement électromagnétique non ionisant excepté pour les ondes d'onde courtes (< à 150 nm). Les UV sont émis par la lumière du soleil dont ils représentent environ 5%. Les UV-C (200-280 nm) sont considérés comme hautement énergétiques et les plus nocifs pour les organismes vivants, ils sont qualifiés de germicides. Ils sont actuellement utilisés dans de nombreux domaines comme désinfectants.

Plusieurs études ont été réalisées avec les UV-C en tant que biocide dans le patrimoine en pierre, et notamment dans les grottes à raison de 14h d'irradiation à 30 kJ.m² ont été nécessaires pour dégrader la chlorophylle *a* et *b* (Stéphane Pfendler et al., 2018).

2. Méthodes préventives

a) Modification de l'éclairage

La quantité de lumière, les longueurs d'onde émises, la fréquence d'allumage vont conditionner le développement de la lampenflora (Muñoz-Fernández et al., 2021). Le passage des lampes à incandescence au LED (Light Emitting Diodes) a beaucoup aidé à limiter la profifération des micro-organismes phototrophes notamment par l'absence de l'élévation de la température mais aussi en ciblant des longueurs d'onde qui ne stimulent pas ou le moins possible les pigments chlorophylliens. Les LED à longueur d'onde de 595 nm correspondent au spectre lumineuse le moins actif pour la photosynthèse est préconisé avec une intensité de 49.5 Lux (Olson, 2006). Il faut éviter les longueurs d'onde qui stimulent la photosynthèse telles que les longueurs d'onde qui émettent dans le rouge (620-630 nm), dans le vert (585-530 nm) et dans le orange-rouge (585-595 nm) (D'Agostino et al., 2015). Une lumière « test » d'apparence blanche pour l'œil humain, a montré des résultats très satisfaisants. Elle est caractérisée par des longueurs d'onde de faible émission entre 420 et 470 nm et entre 500 et 670 nm, et possède de faibles valeurs de radiation (3-5 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (Bruno and Valle, 2017).

B. Présentation des biocides testés dans cette étude

Actuellement trois biocides ont été évalués pour empêcher la prolifération des micro-organismes sur les bas-reliefs :

- Deux nouveaux composés appelés POM-IL 1 et POM-IL 2.
- Un biocide commercial, Preventol RI 80.

1. Les liquides ioniques polyoxométalate (POM-ILs)

Les POM-ILs sont des liquides ioniques polyoxométalates. Ce sont des composés expérimentaux antimicrobiens développés par l'ICMA, Institut des Sciences des Matériaux d'Aragon de l'Université de Saragosse et l'Institut de Chimie Inorganique de l'Université d'Ulm (Misra et al., 2018).

L'activité antimicrobienne des POM-ILs provient principalement des cations, mais leur association avec des POM fournit une fonctionnalité synergique et réglable. De plus, les POM-ILs sont généralement des matériaux moléculaires nanométriques hydrophobes incolores qui limitent l'ancrage des microbes de sur les surfaces.

Les liquides polyoxométalate ionique (POM-IL) ont récemment suscité un intérêt significatif en raison de leur polyvalence et de leur réactivité chimique exceptionnelle. Les liquides ioniques (ILs, sels à point de fusion $< 100^{\circ}\text{C}$) ont une bonne efficacité en matière de protection contre la corrosion par la formation de revêtement. Dans les POM-ILs, les anions d'oxyde métallique (POMs) sont associés à des cations organiques (par ex : des cations d'ammonium ou phosphonium), résultant souvent en des liquides ioniques à la température ambiante. Certains POM-ILs ont des résultats efficaces qui limitent la corrosion des métaux (Herrmann et al., 2014).

Dans les produits proposés dans cette étude, il s'agit de composés associant des cations d'alkylammonium quaternaire à longue chaîne avec des anions polyoxotungstate stables. Ces produits sont appliqués à température ambiante, ce qui facilite leur utilisation et donne une bonne adhésion aux substrats notamment pour les pierres poreuses. La synthèse s'est faite par métathèse cationique établie pour combiner l'anion polytungstate stable aux acides $[\alpha\text{-SiW}_{11}\text{O}_{39}]^{8-}$ avec deux cations alkylammonium quaternaires antimicrobiens, tétraheptylammonium ($= (n\text{-C}_7\text{H}_{15})_4\text{N}^+$) et trihexyl tétradécyle ammonium ($= (n\text{-C}_6\text{H}_{13})_3(\text{C}_{14}\text{H}_{29})\text{N}^+$), pour donner les POM-IL respectifs 1 et 2 (Misra et al., 2018) (Figure 41).

Les POM-ILs ont déjà prouvés leur effet antimicrobien sur les bactéries *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli* (Misra et al., 2018) ainsi que sur les champignons *Engyodontium album*, *Cladosporium cladosporioides*, *Alternaria alternata* and *Aspergillus fumigatus* (Rajkowska et al., 2020).

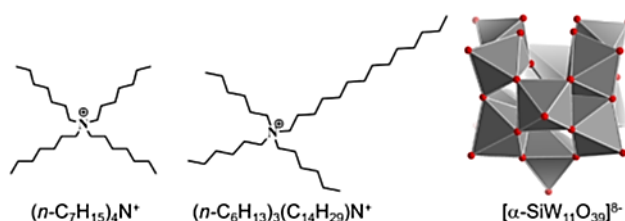


Figure 41 : Illustration des cations et anions utilisées comme composants des POM-IL 1 et 2.

2. Preventol RI80

Preventol RI80 est une préparation liquide concentrée de sels d'ammonium quaternaire (Chlorure d'alkylbenzyl-dimethyl-ammonium) avec un large spectre d'activité couvrant les champignons, les bactéries et les algues. Il est utilisé pour être appliqué sur des matériaux en pierre, enduits, bois, céramiques ..., en solutions aqueuses avec des concentrations allant de 2 à 10%. Il est produit par la société LANXESS et vendu par une société portugaise (<http://www.restaurarconservar.com/>).

Sa formulation contient un tensioactif avec 80% de matière active qui garantit une pénétration importante dans le support et améliore ses performances.

Ce biocide commercial a été choisi car il a déjà été testé dans de nombreuses publications, en tant que biocide pour nettoyer les murs des monuments et les parois de grottes. Il a été souvent testé en laboratoire avec des tests similaires à notre étude ou des tests de diffusion en boîte de pétri par la méthode Kirby-Bauer. Son efficacité a été avérée pour les champignons (Blazquez et al., 2000; Maxim et al., 2012), pour les algues et les cyanobactéries (Genova et al., 2020). Il a aussi été testé in-situ, dans une crypte en Italie où il a été efficace sur toutes les patines (Nugari et al., 2009) et notamment sur les chlorophytes et les algues lichénisées où il avait la meilleure efficacité (Vannini et al., 2018; Sanmartín et al., 2020). La concentration utilisée a toujours été de 2%, la solution est appliquée au pinceau ou mélangé à un hydrogel.

3. Application des traitements sur la pierre

Les échantillons de craie d'une dimension de 5 x 5 x 1 cm ont été sciés à partir de blocs prélevés une galerie de la cave située à 6 mètres de profondeur. Ils sont séchés à 70°C dans une étuve puis les traitements sont appliqués au pinceau à température ambiante sous hotte aspirante.

Le Preventol RI80 a été dilué dans l'eau distillée à 2 % pour rester à la même concentration qui a été utilisée dans les différentes publications citées précédemment.

Les POM-IL 1 et 2 sont dilués dans l'acétone à raison de 100 mg de composé pour 1 ml d'acétone.

Actuellement quatre tests ont été effectués. L'application a été faite au pinceau par pesée progressive de chaque échantillon jusqu'à la quantité prévue. La face supérieure a uniquement été traitée. Pour les tests 1 et 2, les produits ont été appliqués sur pierre sèche, ce qui correspond à une application que l'on peut faire classiquement sur un mur d'un monument dans un environnement extérieur.

Le test 1 a consisté à appliquer approximativement 0.2 g de produit liquide sur pierre sèche.

TEST 1 (application sur pierres sèches)		
	Poids de produit liquide sur échantillon (g)	Poids sec de produit sur échantillon (g)
POM-IL1 :		
SV-POM1	0,23	0,05
BV-POM1	0,23	0,03
POM-IL2 :		
SV-POM2	0,22	0,03
BV-POM2	0,20	0,04
PREVENTOL RI80 :		
SV-PR	0,32	0,17
BV-PR	0,27	0,15

Pour le test 2, 0.4 g de produit liquide ont été appliqués :

TEST 2 (application sur pierres sèches)		
	Poids de produit liquide sur échantillon (g)	Poids sec de produit sur échantillon (g)
POM-IL1 :		
POM1-1	0,43	0,07
POM1-2	0,43	0,11
POM1-3	0,40	0,07
POM-IL2 :		
POM2-1	0,41	0,10
POM2-2	0,40	0,09
POM2-3	0,48	0,09
PREVENTOL RI80 :		
PR2-1	0,44	0,02
PR2-2	0,49	-0,01
PR2-3	0,48	0,03

Pour les tests 3 et 4, les échantillons ont été saturés de 9 ml d'eau distillée au préalable, pour se rapprocher des conditions d'application des produits sur les murs de la cave Pommery qui sont proches de la saturation en eau en hiver pour le bas-relief des « Fêtes de Bacchus » ou fortement humide pour le bas-relief « Silène ». L'application des produits sur des échantillons saturés d'eau correspond à une situation la moins favorable pour l'efficacité des produits étant donné que la pierre ne peut pas ou très peu absorber celui-ci. La pénétration du produit est donc très faible voire inexistante.

Les produits POM-IL 1 et 2 ont été appliqués à une quantité de 0.4 g, 0.2 g et 0.1 g sur des triplicats ; pour le Preventol RI80, 0.4 g et 0.2 g ont été appliqués.

4. Modification de la couleur de la pierre par les produits

La colorimétrie est une technique non-destructive fréquemment utilisée dans le patrimoine culturel et notamment pour la pierre (Durán-Suárez et al., 1995; Fort et al., 2000; Prieto et al., 2010) dans le but de suivre la croissance des microorganismes qui induisent une coloration de la pierre (Vázquez-Nion et al., 2013; Eyssautier-Chuine et al., 2020) mais aussi pour évaluer l'encrassement par les polluants urbains (Grossi et al., 2003, 2007).

Cette technique est aussi utilisée pour évaluer l'impact visuel des produits sur la pierre après application. L'exigence généralement acceptée est qu'aucun changement de couleur ne peut être remarqué visuellement (Sasse and Snethlage, 1996). Cela dépend de la pierre et peut varier entre $\Delta E^*_{ab} < 3$ (Moreau et al., 2008; Burgos-Cara et al., 2017) à $\Delta E^*_{ab} < 6$ (De Muynck et al., 2009). Dans notre étude, après chaque application de produit, la couleur a été mesurée par le colorimètre CR-400 de Konica-Minolta muni d'un tube de projection de lumière CR-A33c de 11 mm de diamètre (correspondant à la zone de mesure). La calibration est effectuée avec une plaque en céramique blanche CR-A43. Les valeurs sont données dans l'espace colorimétrique CIELAB (European committee for Standardization, 2008). Trois paramètres déterminent la couleur dans l'espace colorimétrique: L* indique la clarté qui va de 0 pour noir absolu au 100 pour le blanc absolu); a* et b* sont les coordonnées chromatiques. a* est la position entre le vert (a* <0) et le rouge/magenta (a* > 0); b* est la position entre le bleu (b* <0) et le jaune (b* > 0) (Figure 42).

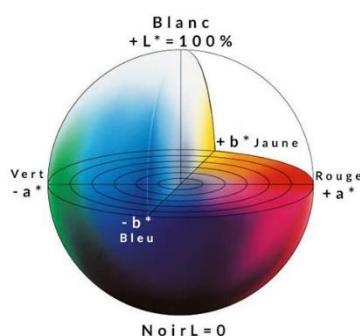


Figure 42 : Sphère colorimétrie de l'espace Lab.

Pour chaque analyse de couleur, dix mesures ont été effectuées à la surface de chaque échantillon. La variation de couleur globale ΔE^*_{ab} a été calculée à partir des trois paramètres suivant la formule (1).

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}} \quad (1)$$

ΔE^*_{ab} correspond à la différence entre la couleur de la pierre traitée par un produit et la pierre naturelle avant traitement. Dans les graphiques ci-dessous (Figure 43), ΔE^*_{ab} a été calculée pour la pierre naturelle sans traitement, on remarque qu'il y a une variation de couleur naturelle de la craie qui est de 1.5 avec un écart type important de 0.9. Chaque produit est appliqué sur les échantillons avec la même quantité de 0,2 g. Les mesures sont faites après 24h de séchage à température ambiante. Après l'application de POM-IL1, ΔE^*_{ab} est de 2.6, ce qui dénote une variation de couleur liée au produit acceptable. Pour POM-IL2, ΔE^*_{ab} est de 0.9, ce produit ne change donc quasiment pas la couleur initiale de la craie. Pour le Preventol RI80, ΔE^*_{ab} est de 1.6, ce qui montre une faible variation aussi.

Lorsque les quantités de produit ont été doublées et atteignent 0.4g, on remarque une légère augmentation du changement de couleur pour les pierres traitées par POM-IL1 avec ΔE^*_{ab} égal à 2.9 ainsi qu'avec POM-IL2 où ΔE^*_{ab} est de 1.4. Avec Preventol RI80, ΔE^*_{ab} reste à 1.6. On peut donc conclure que les trois produits ont une faible incidence visuelle sur la couleur naturelle de la pierre.

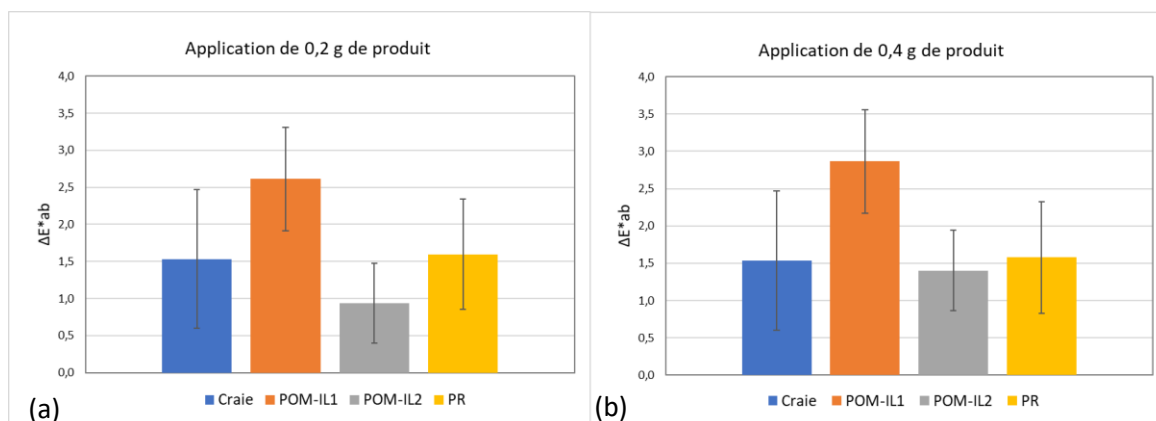


Figure 43 : Variation de la couleur globale de la pierre liée à l'application des produits POM-IL1, POM-IL2 et Preventol RI80, avec une application de 0.2 g (a) et 0.4 g de solution liquide (b).

C. Tests d'efficacité des biocides sur la craie

1. Protocoles des tests

Les cultures des différents biofilms ont permis d'isoler et d'identifier des espèces d'algues cultivables. A partir de cultures liquides dans le milieu Hoagland, les échantillons de pierre traités par les produits biocides ont été inoculés. Tous les tests ont suivi un protocole commun qui consistait d'abord à évaluer le nombre de cellules d'algues pour inoculer la même quantité sur chaque échantillon. Les pierres ont été préalablement mise dans des coupelles de plexiglas afin d'alimenter les pierres de 20 ml de milieu Hoagland dans le fond de chaque coupelle. Cette solution liquide a été ajoutée tout au long des tests afin de maintenir un milieu favorable pour le développement des algues. Chaque coupelle est recouverte d'un couvercle transparent en plexiglas pour limiter l'évaporation.

Les tests ont duré cinq semaines sauf le premier test qui a duré sept semaines. Ils ont été effectués en enceinte climatique (Vötsch VT3) avec une température constante de 20°C et une humidité relative dans l'enceinte de 80 %. Deux lampes fluorescente (Sylvania Gro-Lux) de 15 W simule la lumière de la cave Pommery, ce qui correspond à un PAR (rayonnement photosynthétique actif) de 30 mmol (photons).m⁻². s⁻¹) (Figure 44).

Le suivi de la croissance des algues s'est fait chaque semaine d'incubation, par prise de photos ainsi que par des mesures de couleur et de fluorescence chlorophyllienne à raison de 10 mesures par échantillon. Ces mesures ont été moyennées. Pour la couleur, la variation du paramètre a^* (correspondant à l'axe vert-rouge dans la sphère colorimétrique) a été calculée (Δa^*). Il s'agit de la différence entre a^* mesuré sur la pierre après chaque semaine de test et la valeur initiale de la pierre après inoculation des algues. Les algues étant vertes, Δa^* est le paramètre adéquat pour quantifier le développement des algues car plus elles seront nombreuses, plus la pierre sera verte et plus Δa^* sera négatif.

2. Test biocide 1

a) Protocole

Dans ce test, l'efficacité des produits POM-IL 1, POM-IL 2 et Preventol RI80 a été évaluée à partir de 0.2 g de produit liquide sur chaque échantillon. Deux algues vertes ont été utilisées pour estimer leur rapidité de croissance. Il s'agit de *Chromochloris zofingiensis* et *Pseudostichococcus monallantoides*. Le comptage des cellules d'algue a été fait grâce à une cellule de Thoma au microscope optique, on a dénombré 325 cellules /0.1 μ l de culture liquide de *Pseudostichococcus monallantoides* et 450 cellules /0.1 μ l pour la culture de *Chromochloris zofingiensis*. Ceci nous a permis de diluer au 5^{ème} chaque culture à inoculer sur les pierres pour avoir une solution faiblement concentrée et une concentration similaire pour les deux espèces, ce qui correspond à une densité optique de 0.066 pour la solution de *Pseudostichococcus monallantoides* et de 0.044 pour *Chromochloris zofingiensis*. Puis 2 ml de chaque culture a été inoculé sur les pierres. Celles-ci ont été préalablement mise dans des coupelles de plexiglas afin de les alimenter de 20 ml de milieu Hoagland dans le fond de chaque coupelle. Cette solution liquide a été ajoutée tout au long du test afin de maintenir un milieu favorable pour le développement des algues. Chaque coupelle est recouverte d'un couvercle transparent en plexiglas pour limiter l'évaporation. Pour chaque espèce d'algue, nous avons utilisé un échantillon témoin sans traitement, une pierre traitée par POM-IL1, une autre par POM-IL2 et une autre pierre par Preventol RI80.



Figure 44 : Mise en place des tests biocides dans l'enceinte.

b) Résultats

Après la 1^{ère} semaine de test, on remarque que les pierres témoins ne sont pas au même stade de colonisation (Figure 45), l'algue *Pseudostichococcus* est déjà bien installée sur la pierre, en témoigne Δa^* qui est déjà à -14 alors que Δa^* est de -3.3 pour *Chromochloris* qui met donc plus de temps à se développer (Figure X et X). Au cours des sept semaines de test, *Pseudostichococcus* va coloniser fortement la surface de la pierre dès la 2^{ème} semaine avec un Δa^* de 20.2 donc encore plus négatif, il restera aussi faible jusqu'à la fin pour atteindre -21.1. Pour *Chromochloris*, Δa^* est de plus en plus

négatif au cours du temps pour atteindre -17.6 sauf à la 7^{ème} semaine où il remonte à -14.6. La croissance de Chromochloris est donc plus lente que celle de Pseudostichococcus. Le paramètre de fluorescence chlorophyllienne F_V/F_M commence à 0.28 pour Pseudostichococcus alors qu'il est de 0.47 pour Chromochloris donc plus élevé. Curieusement, Chromochloris a donc une activité photosynthétique nettement plus élevée que Pseudostichococcus. Au cours du temps, on remarque que Chromochloris atteint une valeur de F_V/F_M de 0.61, qui sera sa valeur maximum, déjà après une semaine d'incubation, tandis que Pseudostichococcus atteint une valeur maximum de F_V/F_M , quasiment identique à celle de Chromochloris mais qu'après deux semaines d'incubation. Ceci se marque d'ailleurs par une chute de Δa^* .

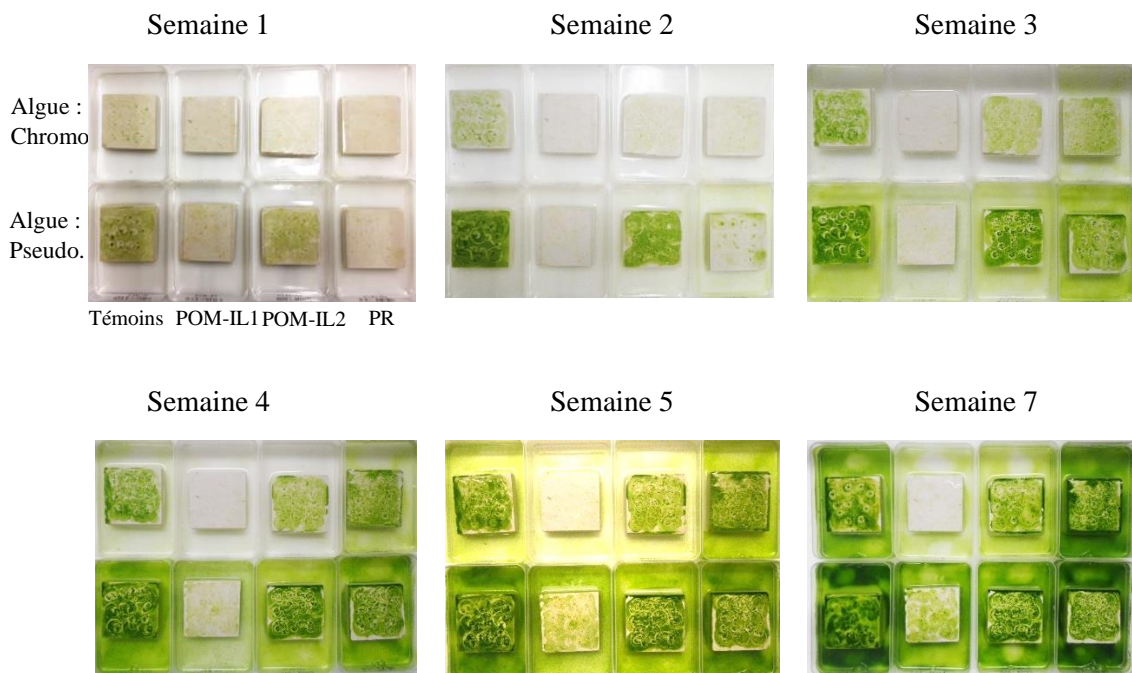


Figure 45 : Photos des pierres inoculées par Chromochloris (en haut) et Pseudostichococcus (en bas) et incubées pendant 7 semaines.

Les pierres traitées inoculées par l'algue Pseudostichococcus montrent aussi une colonisation progressive. A ce stade de l'étude, soit la quantité appliquée n'est pas suffisante soit les produits manquent d'efficacité (Figure 46a et b).

Pour POM-IL2, on voit que la courbe de Δa^* est presque parallèle à la courbe du témoin avec une chute nette aussi à la 2^{ème} semaine. Toutefois, Δa^* va de -9.6 à -18.5 ce qui montre un verdissement moins prononcé tout au long du test. De même le paramètre F_V/F_M va de 0.30 à 0.57, il est toujours moins élevé que celui du témoin. Après la première semaine, F_V/F_M est de 0.30 donc similaire à la valeur de commencement du test mais il augmente très vite ensuite. La photosynthèse est donc moins active que sur le témoin, ce qui montre une action de POM-IL2 sur la photosynthèse donc sur la santé des algues mais cet effet biocide est trop faible. Pour le Preventol RI80, son évolution est proche de celle de POM-IL2. Δa^* va de -1.2 à -14.4 entre 0 et 3 semaines puis il stagne entre -16.3 et -17.1. Ces données montrent donc un verdissement plus intense à partir de 3 semaines d'incubation puis jusqu'à la fin du test, le verdissement ne s'intensifie plus. F_V/F_M va de 0.34 à 0.46 qui est le maximum atteint, entre 0 et 3 semaines, il y a donc une augmentation de l'intensité photosynthétique. Puis F_V/F_M diminue progressivement jusqu'à une valeur de 0.31 à la fin du test, la photosynthèse est donc moins active, ce qui laisse à penser que les algues ne se développent plus et meurent par l'action tardive du Preventol. Les pierres traitées par POM-IL1 ont des valeurs de Δa^* de 0.3 à -10.0, ce qui montre un verdissement progressif au cours du temps mais nettement moins prononcé qu'avec les autres traitements. D'autre part, F_V/F_M va de 0.28 à 0.14 entre 0 et 3 semaines. Il y a donc une diminution de l'activité photosynthétique, ce qui suppose la mort progressive des algues et une action biocide de POM-IL1. Cependant, à 4 semaines d'incubation jusqu'à 7 semaines, F_V/F_M augmente, l'activité photosynthétique

reprend ce qui suggère une reprise d'activité des algues. Les algues arrivent donc à survivre et même à se développer à partir de 4 semaines d'incubation. L'effet du POM-IL1 n'est alors pas suffisant.

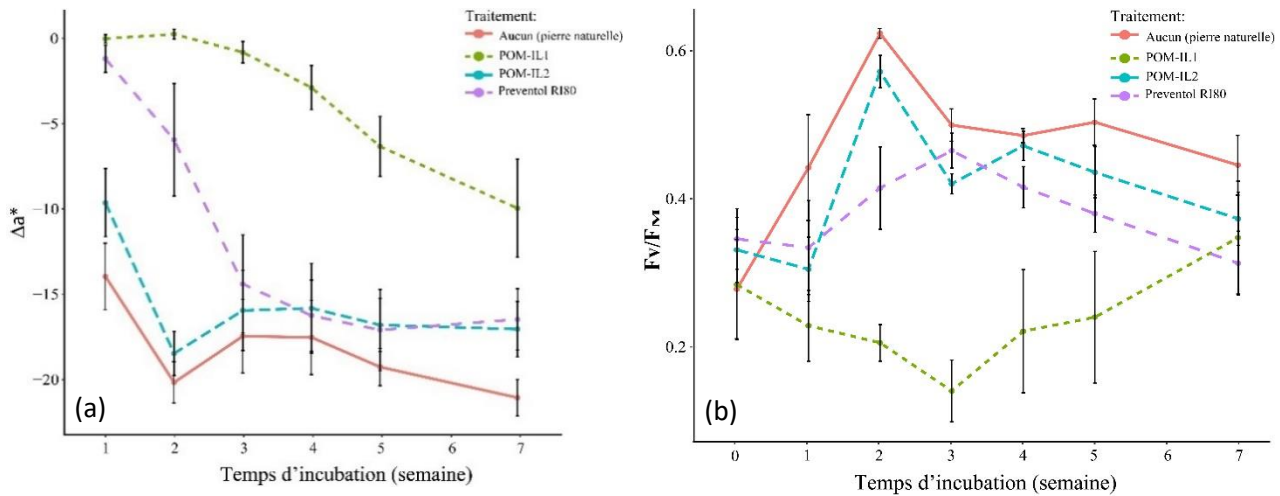


Figure 46 : Développement des algues *Pseudostichococcus* sur pierre témoin et pierres traitées pendant 7 semaines d'incubation. Evolution du paramètre de couleur Δa^* (a). Evolution de l'activité photosynthétique maximale des algues F_v/F_M , (b).

Les pierres traitées inoculées par l'algue *Chromochloris* montrent aussi un verdissement (Figure 47a et b). Pour POM-IL2, Δa^* est de -1.4 après une semaine d'incubation. Les algues commencent donc déjà à se développer. Puis Δa^* continue à décroître progressivement jusqu'à la fin du test pour atteindre -15.7. Il y a un net verdissement qui se fait toutefois les valeurs de Δa^* ne sont pas aussi négatives que celles du témoin. F_v/F_M passe de 0.38 au début du test à 0.57 après une semaine, il y a donc une augmentation de l'activité photosynthétique ce qui suppose un développement des algues, ce qui corrobore les données de Δa^* qui montraient le début du verdissement. Toutefois, après 2 et 3 semaines, F_v/F_M diminue à 0.35 et 0.31, la photosynthèse est donc plus faible, POM-IL2 agit donc sur l'activité des algues mais pas assez car F_v/F_M augmente à nouveau. A la fin du test, F_v/F_M est de 0.40 donc très proche des valeurs de la pierre témoin. POM-IL2 n'est donc pas efficace pour empêcher la prolifération de *Chromochloris*.

Les pierres traitées par le Preventol ont des valeurs de Δa^* de -1.4 au début du test qui diminue fortement jusqu'à -17.9 à la fin. L'évolution de ce paramètre est donc similaire à celle observée pour POM-IL2. De plus, F_v/F_M suit aussi la même évolution que pour POM-IL2, avec des valeurs qui passent de 0.41 au début de test à 0.50 après la 1^{ère} semaine. Puis F_v/F_M diminue jusqu'à 0.32, ce qui laisse supposer une action biocide mais qui a été de courte durée car à 4 semaines de test, les valeurs remontent à 0.42 puis 0.46 pour finir très proches de la valeur de la pierre témoin. Par conséquent, POM-IL2 et Preventol ont eu une action biocide faible et limitée à 2 et 3 semaines d'incubation, ce qui n'est pas suffisant.

Pour POM-IL1, Δa^* a des valeurs entre 0.3 et -0.9, donc proche de 0, il n'y a donc pas eu de verdissement significatif sur cette pierre. Le paramètre F_v/F_M passe de 0.44 à 0.56 entre 0 et 1 semaine de test. Comme avec tous les autres échantillons, il y a donc eu une augmentation de l'activité photosynthétique. Néanmoins, à partir de 2 semaines, F_v/F_M est de 0.08 donc il chute fortement pour rester entre 0.05 et 0.17. L'activité photosynthétique est donc restée faible jusqu'à la fin du test, POM-IL1 a donc une bonne efficacité biocide sur les algues *Chromochloris*, néanmoins on remarque que F_v/F_M augmente à 7 semaines de test, son efficacité commence alors à décroître.

En conclusion, *Chromochloris* a un développement plus lent et progressif que *Pseudostichococcus* qui a envahi la surface de la pierre en une seule semaine. Les traitements POM-IL2 et Preventol R180 ont eu un très faible effet biocide qui a été détecté sur une courte durée à 2 et 3 semaines d'incubation. On peut donc supposer que la quantité de 0.2 g de solution liquide appliquée sur les pierres n'est donc pas suffisante pour être efficace. En revanche, POM-IL1 a fortement limité le développement de *Pseudostichococcus* jusqu'à 3 semaines de test tandis qu'il a eu un effet biocide encore plus efficace pendant tout le test donc 7 semaines avec *Chromochloris*. Cependant, étant donné que cette algue a une

croissance plus lente et qu'à 7 semaines, la fluorescence chlorophyllienne était en augmentation, il faut être prudent quant à son efficacité au-delà cette période de test.

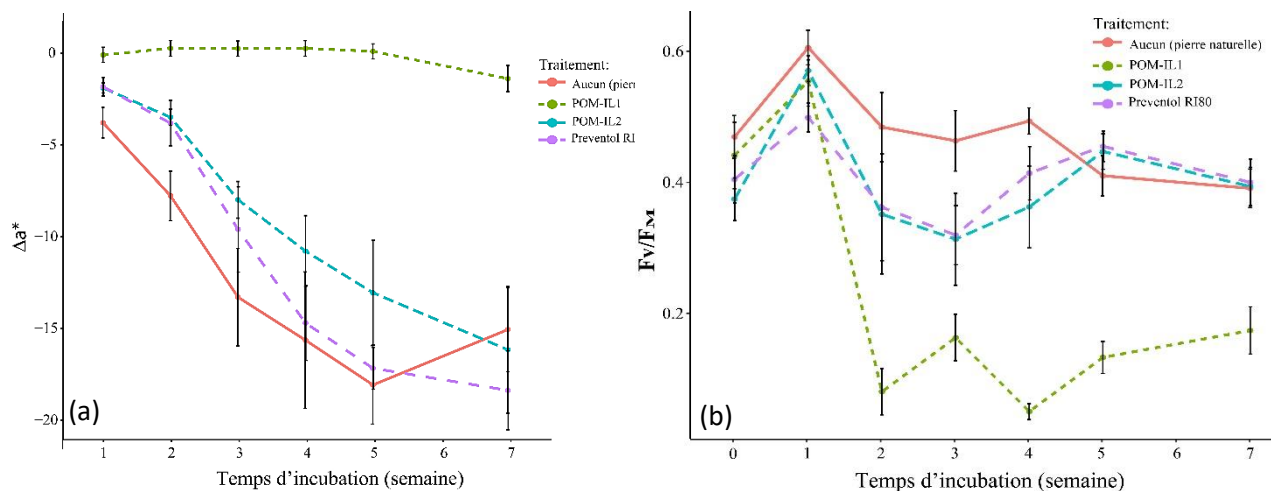


Figure 47 : Développement des algues Chromochloris sur pierre témoin et pierres traitées pendant 7 semaines d'incubation. Evolution du paramètre de couleur Δa^* (a). Evolution de l'activité photosynthétique maximale des algues F_v/F_m , (b).

3. Test biocide 2

a) Protocole

Après les résultats obtenus au premier test, la quantité de produit appliquée a été doublée pour être alors de 0.4 g de solution liquide par échantillon. Des triplicats ont été utilisés à savoir trois échantillons pour chaque produit testé ainsi qu'un triplicat témoin. Une seule espèce d'algue a été inoculée sur toute les échantillons, la Pseudostichococcus, qui a une croissance plus rapide que la Chromochloris. Afin d'inoculer une quantité similaire de cellules pour chaque échantillon, celles-ci ont été dénombrées au microscope optique, 200 cellules/0.1 μ l de culture liquide. Afin d'avoir une quantité de cellules proche de celle utilisée dans le test précédent, la culture a été diluée au 5^{ème}, ce qui correspond à une densité optique de 0.076. Ensuite 2 ml de la suspension d'algues a été inoculée sur chaque échantillon et 20 ml de milieu de culture Hoagland a été ajouté dans le fond des coupelles en début de test ainsi qu'au cours de l'expérience pour favoriser le développement des algues et maintenir l'humidité des pierres. Chaque coupelle est recouverte d'un couvercle transparent en plexiglas pour limiter l'évaporation. Ce test a duré 5 semaines en enceinte climatique.

b) Résultats

La Figure 48 montre l'évolution de la colonisation biologique des pierres pendant les 5 semaines de test. La variation de la couleur a été analysée par le calcul de Δa^* après chaque semaine d'incubation (Figure 49a). Pour les pierres témoins, Δa^* est de -2.1 donc déjà négatif après la 1^{ère} semaine d'incubation, la croissance des algues a donc commencé. Dès 2 semaines de test, Δa^* est à -15.7 donc il a fortement chuté ce qui témoigne d'un développement intensif des algues sur toute la surface des échantillons.

Δa^* des pierres traitées par les produits POM-IL1 et 2 évoluent peu et vont de 0.4 à 0.6, c'est-à-dire que qu'il n'y a aucun verdissement des pierres. Pour les pierres traitées avec Preventol, Δa^* est entre 0.2 et 0.4 pendant 3 semaines donc il n'y a aucun verdissement. Puis il est de -0.1 et -3.3 à 4 et 5 semaines de test, les algues commencent donc à se développer.

En début de test, l'activité photosynthétique mesurée grâce à F_v/F_m est entre 0.12 et 0.15 pour toutes les pierres (Figure 49b). Pour les pierres témoins, il montre ensuite à 0.32 puis 0.47 où il atteint son maximum après 2 semaines d'incubation. Ces résultats corroborent les mesures de Δa^* qui chutent à

partir de 2 semaines et qui montrent l'intense développement des algues. Puis il reste élevé à 0.42 et 0.46 à 3 et 4 semaines, enfin il diminue à 0.33 après 5 semaines.

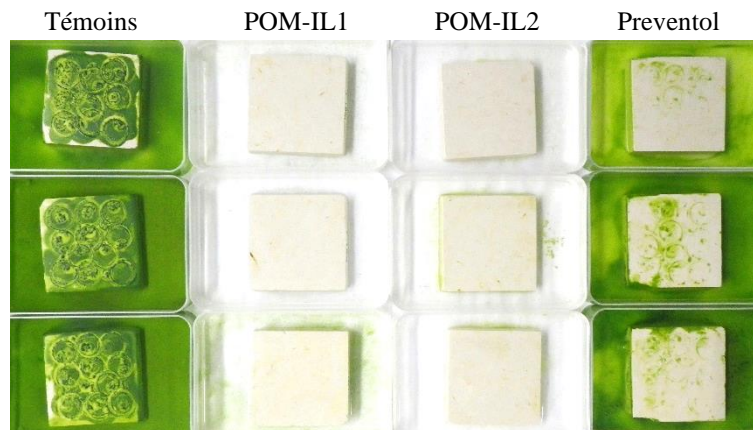


Figure 48 : Photos des pierres inoculées par *Pseudostichococcus* et incubées après 5 semaines de test.

Pour les pierres traitées avec POM-IL2 et Preventol, F_v/F_M diminue à 0.01 et 0.02. Il y a donc une diminution de la photosynthèse, ce qui suppose que les algues ont des difficultés à survivre voir même que leur nombre décroît. Pour POM-IL2, F_v/F_M reste aussi faible, les algues ne sont pas développées donc le produit a été efficace. Pour Preventol, F_v/F_M augmente, il est de 0.08 et 0.17 à 4 et 5 semaines. Donc l'activité photosynthétique augmente, ce qui signifie que les algues sont en bonne santé et se développent. Preventol n'a pas été suffisamment efficace jusqu'à la fin du test.

Les pierres traitées par POM-IL1 ont des valeurs de F_v/F_M entre 0.03 et 0.08 donc très faibles entre 1 et 5 semaines de test. Il y a donc eu qu'une très faible activité photosynthétique et donc pas de croissance des algues. L'efficacité biocide de POM-IL1 est donc avérée.

En conclusion, avec une quantité de 0.4 g de solutions appliquées sur les pierres, les produits sont nettement plus efficaces que dans le 1^{er} test. POM-IL1 et 2 ont inhibés la croissance des algues jusqu'à la fin du test tandis que Preventol a une efficacité limitée jusqu'à 3 semaines, ensuite l'activité photosynthétique reprend avec la croissance des algues, ce qui explique le début du verdissement à la fin du test.

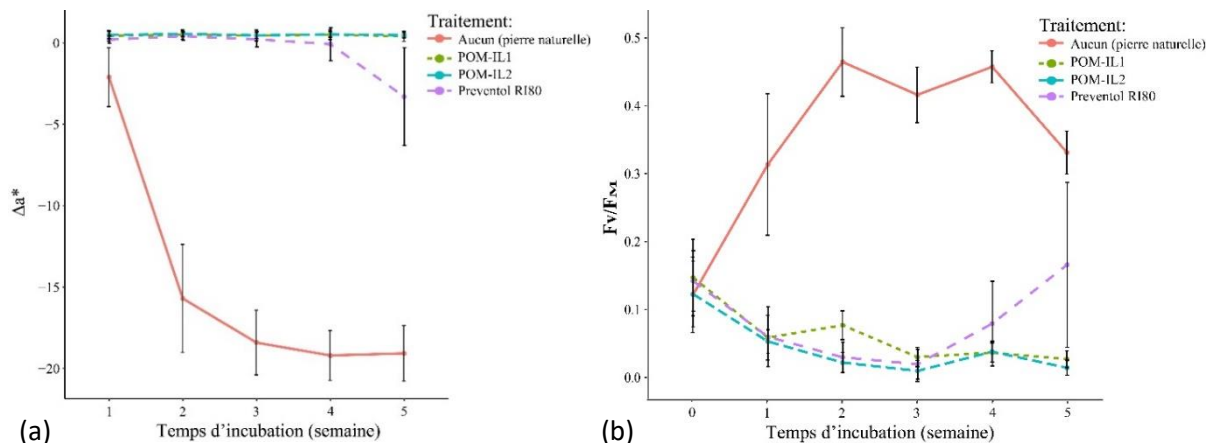


Figure 49 : Développement des algues *Pseudostichococcus* sur pierres témoins et pierres traitées pendant 5 semaines d'incubation. Evolution du paramètre de couleur Δa^* (a). Evolution de l'activité photosynthétique maximale des algues F_v/F_M , (b).

4. Test biocide 3

a) Protocole

Le test biocide 2 a montré que les produits biocides avaient une bonne efficacité avec une quantité de 0.4 g de solution diluée. Toutefois ces produits ont été appliqués sur pierres sèches alors que les conditions environnementales de la cave se caractérisent par une forte humidité à la fois de l'air mais aussi des parois, notamment pour le bas-relief « Les fêtes de Bacchus » en hiver, la pierre est saturée d'eau. Pour que le test reflète mieux les conditions réelles, peu communes et drastiques, les produits ont été appliqués sur des échantillons préalablement saturés par 10 ml d'eau distillée. Par conséquent, le réseau poreux étant saturé d'eau, il ne peut pas ou très peu absorber les produits, il n'y a donc pas de pénétration des produits, ceux-ci restent alors en surface. Nous avons voulu rester sur les mêmes quantités appliquées sur pierre sèche pour un souci de comparaison, donc 0.4 g et 0.2 g de produit a été appliqués au pinceau sur des triplicats pour les produits POM-IL1, POM-IL2 et Preventol RI80. Néanmoins, comme il n'y a aucune pénétration du produit dans la pierre, il s'est avéré que ces quantités étaient trop élevées, nous avons alors appliqué une quantité plus faible de 0.1 g de POM-IL1 et POM-IL2 uniquement car le Preventol étant déjà moins efficace que les autres produits sur pierres sèches, son efficacité à une quantité plus faible sur pierre humide serait encore plus limitée. Pour le test 3, le protocole d'inoculation reste le même que pour le test 2, à savoir qu'une suspension d'algues *Pseudostichococcus* a été inoculée à raison de 2 ml sur chaque pierre. La suspension initiale est caractérisée par un nombre de cellules de 340 / 0.1 μ l et elle a été diluée 2.5 fois pour arriver à une densité optique de 0.065 assez proche de celle utilisée au test 1 et 2.

b) Résultats

Les mesures de couleur montrent qu'après une seule semaine d'incubation, les triplicats témoins ont une valeur de Δa^* de -7.0 ce qui correspond déjà au verdissement de la pierre (Figure 50a). Puis c'est après 2 semaines de test que Δa^* a fortement chuté puisqu'il est de -17.2 puis les semaines suivantes les valeurs sont entre -19.0 et -19.7, donc Δa^* se stabilise au cours du temps.

F_V/F_M commence après l'inoculation à une valeur de 0.21 puis augmente pour atteindre un maximum après 2 semaines de test avec 0.51 (Figure 50b). Puis les valeurs baissent à 0.40 et 0.41 pour finir à 0.33 après 5 semaines. On remarque donc que le développement des algues *Pseudostichococcus* est semblable au test 2, c'est toujours au cours des 2 premières semaines que l'activité photosynthétique des algues est très active et que le développement est rapide. Puis après 2 semaines, il y a un ralentissement probablement dû à une saturation de l'espace disponible.

POM-IL1 et 2 ainsi que Preventol RI80 ont été testés avec 0.4 g de produit appliqué sur les pierres humides (Figure 50). Pour les trois produits, Δa^* va de 0.7 à 1.0, il n'y a donc eu aucun verdissement des pierres pendant tout le test. Le paramètre de fluorescence chlorophyllienne F_V/F_M reste très faible au cours du test aussi, toutefois, on remarque qu'il évolue en dent de scie pour tous les produits et passent de valeurs de l'ordre de 0.10 à des valeurs inférieures à 0.10.

On remarque donc que la photosynthèse des algues est très faible mais ces légères augmentations à 2 et 4 semaines, montrent qu'elles essayent de survivre malgré l'effet biocide des produits, alors que dans le test 2, le paramètre de fluorescence chlorophyllienne restait faible et constant. L'application sur pierre humide n'optimise donc pas l'efficacité des produits. Leur pénétration dans la pierre est donc importante pour optimiser leur action.

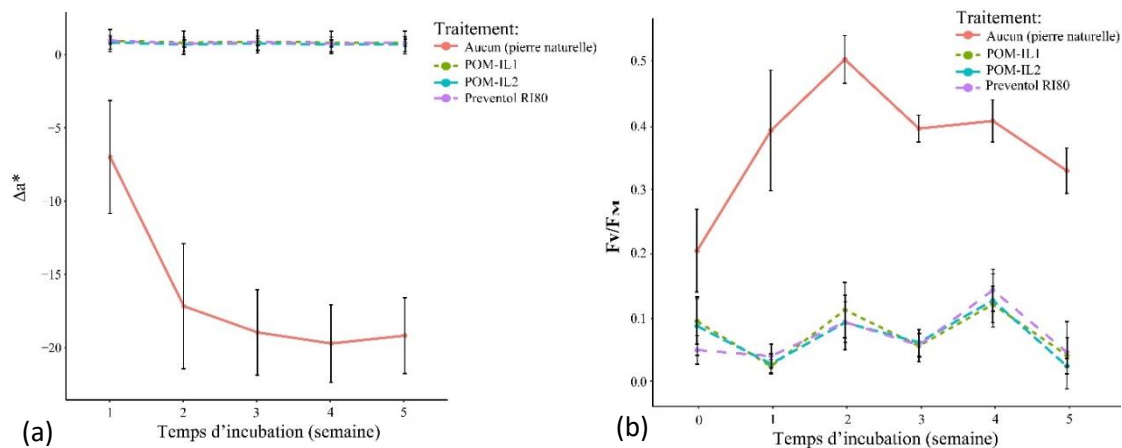


Figure 50 : Développement des algues *Pseudostichococcus* sur pierres témoins et pierres saturées d'eau et traitées par **0.4 g** de solution diluée de POM-IL1 et POM-IL2, pendant 5 semaines d'incubation. Evolution du paramètre de couleur Δa^* (a). Evolution de l'activité photosynthétique maximale des algues F_v/F_m , (b).

A 0.2 g de produit appliqué sur les pierres, POM-IL1 et 2 ainsi que Preventol RI80 ont été testés (Figure 51). La variation de la couleur Δa^* pour POM-IL1 et 2 est comprise entre 1.0 au début du test et 0.9 et 0.8 à la fin du test. Il n'y a donc aucun verdissement pendant tout le test. Pour le Preventol, Δa^* commence à 0.6 et reste à 0.4 jusqu'à 3 semaines d'incubation. Il n'y a donc pas de verdissement pendant ces 3 premières semaines. Puis à partir de 4 semaines, Δa^* est de -0.8 puis de -2.7 à la fin du test. Un verdissement de la pierre est donc détecté.

Pour le paramètre F_v/F_m , les valeurs sont aussi en dent de scie comme pour les données obtenues avec 0.4 g de produit. Elles sont de 0.04 à 0.06 pour les 3 produits et elles stagnent la première semaine. A deux semaines de test, F_v/F_m augmentent légèrement à 0.11 pour les POM-ILs et 0.19 pour le Preventol mais elles restent très faibles par rapport aux témoins. A 3 semaines, toutes les valeurs chutent entre 0.05 et 0.08 puis augmentent à nouveau à 4 semaines de test à 0.17 et 0.19 pour POM-IL1 et POM-IL2 et 0.16 pour le Preventol. A la dernière semaine de test, l'activité photosynthétique chute à nouveau pour les deux POM-ILs à 0.04 et 0.06 donc on retrouve les valeurs de début de test alors que pour le Preventol, F_v/F_m continue de monter à 0.20, ce qui signifie que la photosynthèse est de plus en plus active et donc que les algues arrivent non seulement à survivre mais aussi à se développer, ce qui corrobore la valeur négative de Δa^* à la fin du test. Le Preventol à 0.2g de solution sur pierre humide a donc 3 semaines d'efficacité alors que les pierres traitées avec POM-IL1 et POM-IL2 ne montrent aucun verdissement malgré une activité photosynthétique faible mais quand même existante.

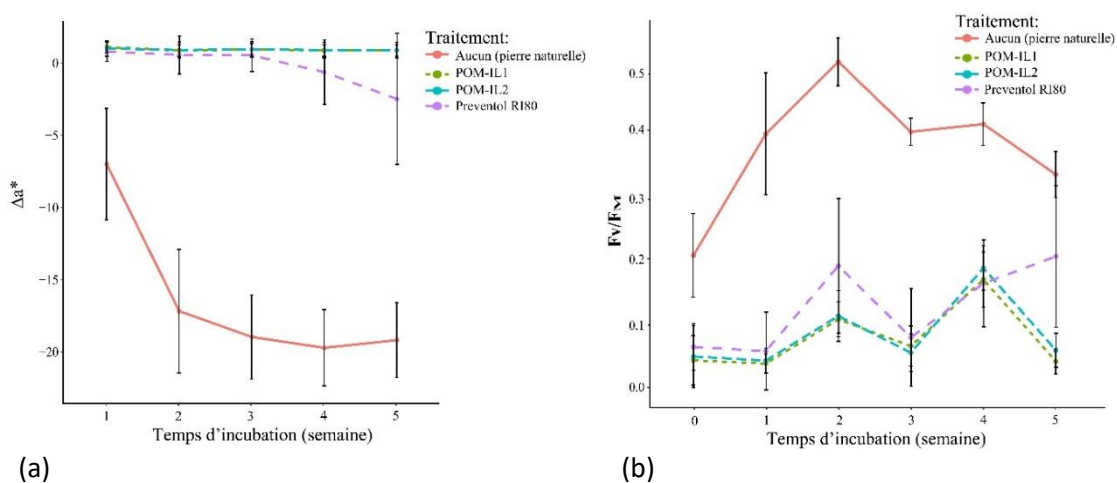


Figure 51 : Développement des algues *Pseudostichococcus* sur pierres témoins et pierres saturées d'eau et traitées par **0.2 g** de solution diluée de POM-IL1, POM-IL2 et Preventol RI80, pendant 5 semaines d'incubation. Evolution du paramètre de couleur Δa^* (a). Evolution de l'activité photosynthétique maximale des algues F_v/F_m , (b).

Les données concernant les pierres traitées avec 0.1 g de produit, montrent des valeurs de Δa^* allant de 0.7 en début de test à 0.5 à la fin pour POM-IL1 et de 1.0 après la 1^{ère} semaine jusqu'à 0.7 à la dernière semaine pour POM-IL2 (Figure 52a). Il n'y a donc pas eu de verdissement des pierres tout au long de ce test. La fluorescence chlorophyllienne mesurée par F_v/F_M est de 0.06 et 0.05 à 0 et 1 semaine de test pour POM-IL 1 et 0.04 pour POM-IL2, ce signal très faible témoigne d'une photosynthèse peu active. A 2 semaines de test, F_v/F_M est de 0.16 et 0.12 respectivement pour POM-IL1 et POM-IL2, il y a donc une petite augmentation de l'activité des algues mais celle-ci chute à 3 semaines avec des valeurs de 0.06 et 0.07 pour remonter encore à 0.18 et 0.14 à 4 semaines puis rechutent à nouveau à 5 semaines (Figure Xb).

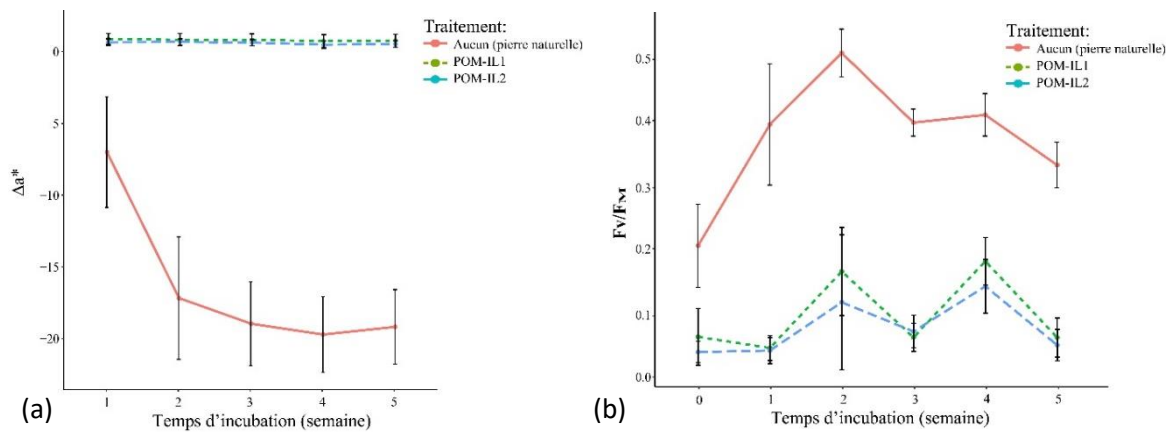


Figure 52 : Développement des algues *Pseudostichococcus* sur pierres témoins et pierres saturées d'eau et traitées par 0.1 g de solution diluée de POM-IL1, POM-IL2, pendant 5 semaines d'incubation. Evolution du paramètre de couleur Δa^* (a). Evolution de l'activité photosynthétique maximale des algues F_v/F_M , (b).

En conclusion, l'application de 0.1g de produit sur des pierres saturées en eau n'a pas entravée l'effet biocide de POM-IL1 et POM-IL2 sur le développement des algues *Pseudostichococcus* (Figure 53). Toutefois, même s'il n'y a pas eu de verdissement, on remarque que ces conditions d'application n'optimisent pas leur efficacité car une faible photosynthèse a été détectée pendant le test à 0.4g, 0.2 g et 0.1g, ce qui suppose que les algues n'ont pas été totalement éliminées. Preventol RI80 a aussi de bons résultats à 0.4g de produit, toutefois son effet biocide commence à être limité après 3 semaines d'incubation avec 0.2g de produit.

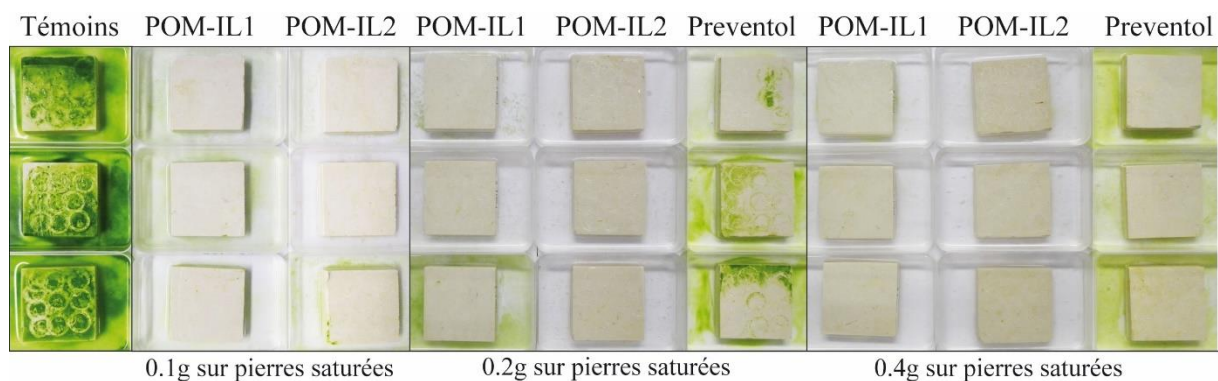


Figure 53 : Photos des pierres inoculées par *Pseudostichococcus* à la fin des 5 semaines de test.

5. Test biocide 4

a) Protocole

Malgré les bons résultats du test 3, nous avons voulu tester un peu plus l'efficacité des produits en reprenant les pierres traitées dont l'efficacité a été prouvée par les trois tests précédents et en les inoculant à nouveau pour simuler l'ensemencement régulier que subissent les pierres des bas-reliefs. Cette fois, il s'agit plus d'inoculer les pierres avec l'algue *Pseudostichococcus*, mais avec une culture liquide issue du biofilm SNC comprenant de *Diplosphaera sp.* et *Pseudostichococcus monallantoides* ainsi que des filaments bleu-vert de cyanobactéries *Timaviella sp.* issus du biofilm SM. Le comptage des cellules pour la suspension contenant les deux algues était de 292 cellules / 0.1 μ l, ce qui correspond à une densité optique de 0.070. Un volume de 1 ml de cette suspension a été appliqué sur chaque pierre humide. Pour la suspension de cyanobactéries, 100 cellules / 0.1 μ l a été dénombrées, ce qui correspond à une densité optique de 0.163. Cette fois 400 μ l de suspension a été inoculée sur les pierres en plus de la suspension d'algues.

Les pierres à nouveau inoculées sont les pierres traitées par 0.1g et 0.2g de POM-IL1 et POM-IL2 et par 0.4 g de Preventol, tous appliqués sur pierres saturées d'eau. Nous avons aussi repris les pierres traitées de 0.4 g de POM-IL1 et POM-IL2 appliqués sur pierres sèches. Seuls les triplicats témoins sont des pierres vierges qui n'ont jamais été inoculées.

Le test s'est déroulé dans les mêmes conditions que les tests précédents à savoir que les pierres incubent dans ces coupelles toujours humides, en enceinte climatique pendant 5 semaines à 20°C et 80 % d'humidité avec 12h de luminosité.

b) Résultats

Les pierres témoins commencent avec des valeurs de Δa^* de -4.8, donc elles commencent à verdir dès la première semaine de test. Comme pour les tests précédents, Δa^* est de -18.5 après 2 semaines de test donc il chute brutalement. Les semaines suivantes, Δa^* est de -20.1 à 3 semaines et termine à -18.7 à la fin du test, donc il reste proche des valeurs déjà atteinte après 2 semaines (Figure 54 et 55).

F_V/F_M commence avec une valeur basse de 0.14 en début d'incubation puis augmente fortement jusqu'à 3 semaines de test pour atteindre 0.58. Puis il diminue fortement à 4 semaines avec 0.32 mais remonte à 0.45 en fin de test (Figure 55b).

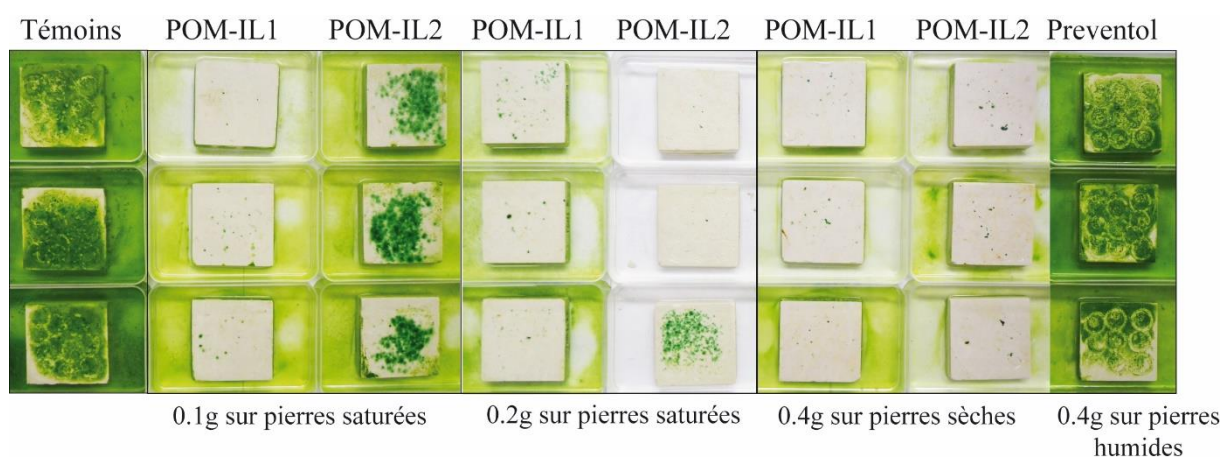


Figure 54 : Photos des pierres inoculées par les algues et les cyanobactéries à la fin des 5 semaines de test.

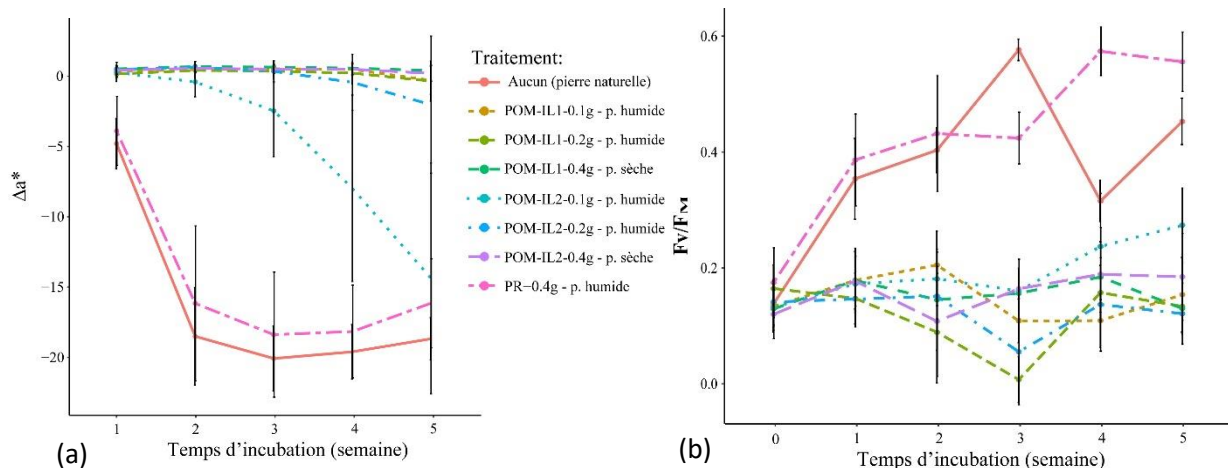


Figure 55 : Développement des algues et cyanobactéries sur pierres témoins et pierres traitées à différentes quantités de solution diluée de POM-IL1, POM-IL2 et Preventol, pendant 5 semaines d'incubation. Evolution du paramètre de couleur Δa^* (a). Evolution de l'activité photosynthétique maximale des algues F_v/F_m , (b).

Pour les pierres traitées avec le Preventol (Figure 55), Δa^* commence à -3.9 puis diminue fortement à 2 semaines de test avec -16.2 puis continue à décroître jusqu'à la fin du test avec une valeur de -18.2. Il y a donc un verdissement important au cours du temps, Δa^* a suivi la même évolution que celui des témoins. De plus, les données de F_v/F_m ne font qu'augmenter avec une valeur de 0.17 jusqu'à 0.56 à 5 semaines de test. Cette augmentation de la fluorescence chlorophyllienne et donc de la photosynthèse identique à celle des témoins montre le développement des algues sans aucune perturbation liée au Preventol. Celui-ci n'a donc plus d'effet biocide sur cette deuxième inoculation.

En ce qui concerne les pierres traitées avec POM-IL1 (Figure 56), Δa^* a des valeurs légèrement positives avec les trois traitements. Il n'y a donc pas eu de verdissement pendant le test. On peut distinguer quand même des valeurs plus faibles pour POM-IL1 à 0.2g de produit appliqué sur pierre humide puis des valeurs un peu plus élevées avec POM-IL1 à 0.1g de produit sur pierre humide et POM-IL1 à 0.4g sur pierre sèche a des valeurs encore plus grandes que les autres.

La fluorescence chlorophyllienne montre des valeurs de F_v/F_m qui restent assez faibles avec des évolutions très différentes entre les triplicats. Pour les pierres traitées avec 0.1g de produit, F_v/F_m augmente de 0.13 au début de test à 0.20 pendant les 2 semaines de test. Puis le paramètre chute à 0.11 puis remonte un peu à 0.15.

Pour les pierres traitées avec 0.2g, F_v/F_m commence à 0.16 et diminue régulièrement jusqu'à 0.01 donc il est quasiment nul à 3 semaines de test. L'activité photosynthétique diminue et donc les algues meurent progressivement. Puis F_v/F_m remonte brutalement à 0.16 et termine à 0.5 il a donc la même valeur qu'au début du test. Enfin, les pierres traitées avec POM-IL1 à 0.4g ont des valeurs entre 0.13 et 0.18 donc qui restent assez similaires pendant tout le test ce qui montre une activité photosynthétique qui a peu évolué.

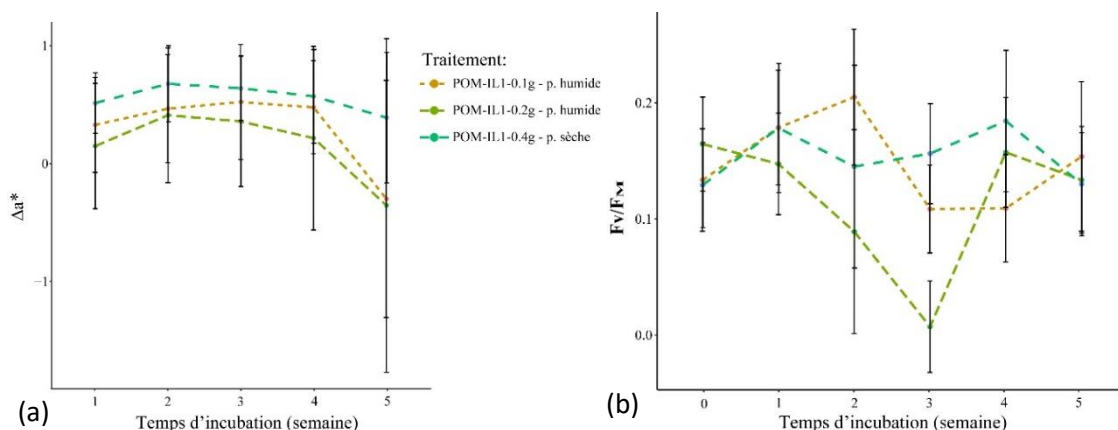


Figure 56 : Développement des algues et cyanobactéries sur pierres traitées à différentes quantités de solution diluée de **POM-IL1**, pendant 5 semaines d'incubation. Evolution du paramètre de couleur Δa^* (a). Evolution de l'activité photosynthétique maximale des algues F_v/F_m , (b).

Les pierres traitées avec POM-IL2 montrent des évolutions différentes pour les trois lots de pierres (Figure 57). Pour les pierres traitées par POM-IL2 à 0.1g sur pierres humides, Δa^* commence à 0.3 à une semaine de test puis il devient de plus en plus négatif jusqu'à atteindre -14.4. Il y a donc un verdissement des pierres pendant la durée du test même s'il n'est pas aussi fort que les pierres témoins. D'autre part, F_v/F_M a des valeurs qui augmentent de 0.13 à 0.27, ce qui reste assez faible mais cela montre une activité photosynthétique des micro-organismes qui sont donc en survie.

Les pierres traitées avec POM-IL2 à 0.2g ont des variations de couleur de Δa^* proches de 0 du début jusqu'à la fin du test. A partir de 4 semaines, Δa^* est de -0.4, puis -2.0 à la fin du test ce qui suppose un léger verdissement, toutefois, F_v/F_M reste faible pendant toute la durée du test, la photosynthèse des algues n'est donc pas très active.

Pour les pierres traitées par POM-IL2 à 0.4 g appliqué sur pierre sèche, Δa^* reste très faible, entre 0.2 et 0.6, il n'y a donc pas de verdissement des pierres. F_v/F_M est compris entre 0.11 et 0.18 ce qui reste des valeurs faibles, il y n'a donc pas de développement des micro-organismes.

En conclusion, le deuxième ensemencement des pierres a montré que le Preventol RI80 n'a plus d'efficacité, les pierres traitées par ce produit sont quasiment aussi vertes que les pierres témoins.

Le produit POM-IL1 est efficace même sans pénétration du produit dans la pierre, toutefois son efficacité est quand même optimale lorsque la pierre est sèche et peut absorber une quantité de produit plus grande, puisque c'est à 0.4g sur pierre sèche qu'il est très performant.

POM-IL2 a lui aussi une efficacité optimale sur pierre sèche à 0.4g, néanmoins il est quand même efficace à 0.2g sur pierre humide et à 0.1g, il est moins efficace. Lorsqu'on regarde les photos des pierres, on remarque que les micro-organismes qui ont colonisés les pierres témoins sont différentes de celles qui ont colonisées les pierres traitées avec POM-IL2 à 0.1g. En effet, sur les pierres témoins, ce sont les algues *Pseudostichococcus monallantoides* et *Diplosphaera sp.* qui se sont développées tandis que sur les pierres traitées par POM-IL2, ce sont les cyanobactéries qui ont colonisées les pierres. POM-IL2 est donc très efficace pour empêcher la croissance des algues mais pas celle des cyanobactéries car une fois les algues éliminées, il n'y avait plus de concurrence pour les cyanobactéries pour se développer. Néanmoins, celles-ci se sont développées avec la quantité de POM-IL2 la plus faible à l'exception d'une pierre traitée avec 0.2g où les cyanobactéries se sont aussi développées.

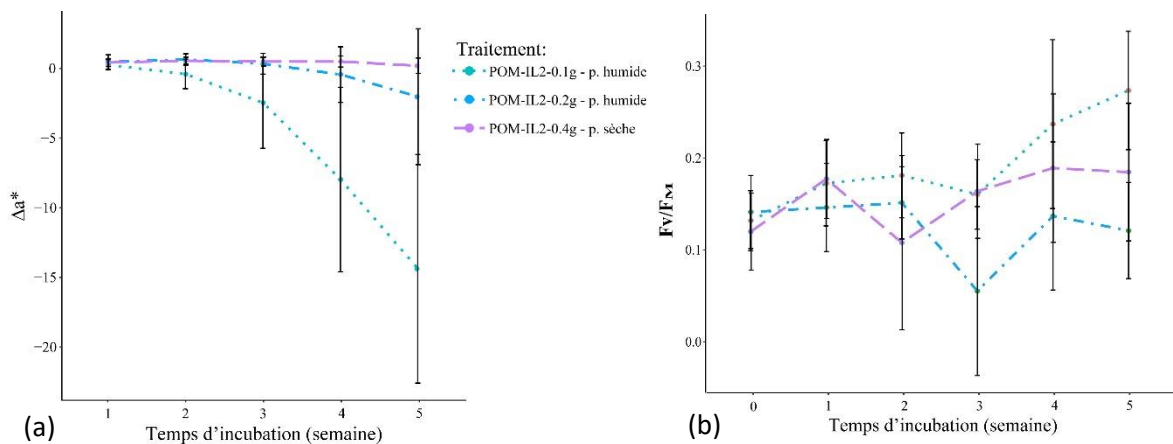


Figure 57 : Développement des algues et cyanobactéries pierres traitées à différentes quantités de solution diluée de **POM-IL2**, pendant 5 semaines d'incubation. Evolution du paramètre de couleur Δa^* (a). Evolution de l'activité photosynthétique maximale des algues F_v/F_M , (b).

6. Suite des tests à venir

Actuellement, il y a un engouement important pour l'utilisation des huiles essentielles qui sont utilisées dans de nombreux domaines et notamment dans l'agriculture où des centaines d'huiles essentielles ont déjà fait l'objet d'études scientifiques pour leur effet biocide dans le but de remplacer les produits phytosanitaires issus de l'industrie chimique par des produits naturels. Dans le domaine du patrimoine culturel, les huiles essentielles sont actuellement testées pour éliminer la biocolonisation des murs des monuments et des cryptes (Veneranda et al., 2018; Bruno et al., 2019; Fidanza and Caneva, 2019; Gagliano Candela et al., 2019; Genova et al., 2020; Marco et al., 2020; Rugnini et al., 2020). L'ICMA sont en train de créer de nouvelles formulations pour encapsuler de l'Eugenol (composé antimicrobien issu des clous de girofle) (Xie et al., 2020) et augmenter l'effet biocide des liquides polyoxométalateioniques.

De plus, nous avons alors contacté deux chercheurs : Sandrine Bouquillon du laboratoire de chimie de l'URCA (ICMR) et Marie Laure Fauconnier de Gembloux Agro-Bio Tech (Belgique) et qui travaille depuis 20 ans sur l'utilisation des huiles essentielles dans l'agriculture. Nous avons choisi de tester l'huile essentielle d'écorce de cannelle de Ceylan, de thym thymol, de clou de girofle et d'eucalyptus radié. Ces huiles seront mélangées à un tensioactif Tween 80 qui a aussi des propriétés biocides afin de pouvoir diluer l'huile essentielle dans l'eau. De plus, trois surfactants biosourcés vont être aussi testés seuls pour leur propriété biocide puis associés à une huile essentielle.

CONCLUSION

Les bas-reliefs étudiés sont fortement colonisés par la lampenflora qui s'est développée il y a plusieurs années avec l'aménagement des caves afin de les rendant accessibles au public mais aussi afin d'y installer des œuvres contemporaines qui parfois étaient elles-mêmes lumineuses. Malgré l'évolution de l'éclairage au cours du temps qui a été fortement réduit et devenu ponctuel, la lampenflora persiste et a trouvé un environnement adéquat pour s'y développer.

Le bas-relief « Fête de Bacchus » est colonisé par une lampenflora constituée de deux voire trois biofilms de couleur : le biofilm rouge (BR), le biofilm vert (BV) et plus secondairement le biofilm noir-vert foncé (BN). Les zones non ou peu colorées ont aussi été étudiées afin de les comparer aux zones colorées. La quantification des pigments photosynthétiques (chlorophylles *a* et *b*, caroténoïdes et phycobiliprotéines) a montré que le biofilm rouge et le biofilm noir ont les concentrations les plus élevées en caroténoïdes. Le biofilm rouge a la teneur la plus élevée en phycobiliprotéines ce qui montre une adaptation importante des micro-organismes de ce biofilm à savoir une algue *Chromochloris zofingiensis*. Le développement des phycobiliprotéines notamment des allophycocyanines, a permis de capter un maximum de lumière et de longueurs d'onde que ne captent pas les autres pigments. La lampenflora a donc su s'adapter à la faible luminosité de la cave. De plus, les données de fluorescence chlorophyllienne sont fortement corrélées à la teneur en phycobiliprotéines ce qui montre que ces pigments jouent un rôle important dans le processus de photosynthèse en captant une quantité de photons supérieure à ce que peuvent faire la chlorophylle *a*, *b* et les caroténoïdes.

Le bas-relief « Silène » a une lampenflora caractérisée par un biofilm essentiellement vert (SV) et un biofilm marron (SM). Les zones faiblement colorées ont aussi été étudiées. La concentration des pigments dans chaque biofilm est très élevée dans le biofilm vert (SV+) tandis que les caroténoïdes sont peu concentrés. Les phycobiliprotéines ont des valeurs importantes aussi pour ce biofilm notamment en allophycocyanines, ce qui suppose une adaptation du biofilm en développant des pigments pour augmenter son rendement photosynthétique malgré la diminution de la luminosité.

Parmi les espèces qui ont pu être cultivées en laboratoire, certaines ont été identifiées à l'issue d'un séquençage ADN spécifique. En parallèle, les biofilms ont fait l'objet d'un séquençage total avec trois échantillons par biofilm.

Pour les bactéries, les cultures ont permis de déterminer de trois à onze souches par biofilm. Le groupe de bactéries le plus important correspond aux protéobactéries. L'espèce issue de ce groupe présente dans la plupart des biofilms est *Mesorhizobium sp.*, puis il y a *Sphingomonas sp.* et *Streptomyces sp.* qui est une actinobactérie. Les espèces qui ont pu être identifiées ne correspondent pas aux espèces majoritairement identifiées par séquençage total même si elles appartiennent au groupe des protéobactéries. La famille des Rhizobiales, Dongiales ainsi que les espèces *Hyphomicrobium*, *Pseudaminobacter*, *Phyllobacterium*, *Hyphomicrobium*, *Pedomicrobium* sont prépondérantes dans les biofilms. Puis les Bacteroidetes sont le second groupe le plus important et sont présentes avec les espèces *Niastella*, *Microscillaceae*, *Cyclobacteriaceae* et *Chitinophagaceae*. Nous avons pu identifier à l'issue des cultures, l'espèce *Dyadobacter* appartenant aux Bacteroidetes dans le biofilm peu coloré de Silène (SNC). Le biofilm SP est très différents des autres biofilms, où il y essentiellement que des actinobactéries avec le taxon *Pseudonocardia*.

Les cyanobactéries ont été cultivées à partir du biofilm vert (BV) de « Fête de Bacchus » et du biofilm marron (SM) de « Silène ». Toutefois nous l'avons observé en culture liquide et sur les échantillons de craie sur d'autres biofilms. Une seule espèce a pu être déterminée, *Timaviella sp.* qui correspond à la famille des Leptolyngbya que l'on retrouve aussi dans le séquençage total pour le biofilm vert (SV) de « Silène ».

Les eucaryotes sont nettement moins nombreux que les procaryotes. Les champignons sont représentés par les Ascomycètes avec le taxon *Penicillium sp.* qui a été souvent aussi cultivé sur gélose. Ils forment

la totalité de l'échantillon prélevé sur plâtre SP et possèdent de nombreuses espèces (Eurotiales). Les Actinomycètes sont très présents aussi dans le biofilm marron SM.

Les algues qui ont été cultivées sur gélose sont essentiellement des Chlorophytes avec les espèces *Diplosphaera sp.* et *Pseudostichococcus monallantoides*. Elles sont présentes dans les biofilms peu colorés et verts dans les deux bas-reliefs et sont probablement à l'origine de la couleur verte de ces biofilms. Toutefois le séquençage total n'a pas répertorié *Diplosphaera sp.* et l'espèce qui a été séquencée en grande majorité est *Stichococcus sp.*, espèce très proche de *Pseudostichococcus*.

Le biofilm rouge de « Fête de Bacchus » contient exclusivement l'espèce *Chromochloris zofingiensis* est orange-rouge dans la cave mais devient verte en culture. Le biofilm marron de « Silène » contient de nombreuses mousses (Phragmoplastophytes) dont une espèce qui a pu être cultivée (*Eucladium verticillatum*) et qui donne probablement la couleur marron au biofilm.

La détermination et la culture de certaines espèces ont servi à l'ensemencement des pierres traités par différents biocides afin de tester leur efficacité. Deux espèces d'algues : *Chromochloris zofingiensis* et *Pseudostichococcus monallantoides* et une cyanobactérie *Timaviella sp.*

Les résultats des tests ont montré que les produits POM-IL 1 et 2 sont des composés à fort potentiel antimicrobien. Les tests biocides classiques correspondant à une application des produits sur pierre sèche, ont montré que POM-IL1 et 2 avec 0.4g de produit à une concentration de 100mg/ml dilué dans l'acétone, ont une efficacité optimale contre le développement de l'algue *Pseudostichococcus monallantoides*, Le Préventol RI80, utilisé à 2% dans l'eau distillée avec 0.4g appliqué sur pierre, a une efficacité plus limitée.

Le test plus drastique où les produits sont appliqués sur pierre saturée d'eau donc sans pénétration, pour simuler une application sur les murs de la cave, ont des résultats optimum pour POM-IL1 et 2 pour une application de 0.1g, 0.2g et 0.4g alors que le Preventol RI80 a de bons résultats uniquement à 0.4g.

Enfin, le test encore plus drastique, à savoir qu'un deuxième ensemencement avec des algues *Diplosphaera sp.* et *Pseudostichococcus monallantoides* et les cyanobactéries *Timaviella sp.*, a été réalisé sur les pierres dont l'efficacité avait été optimale. Les résultats ont montré que POM-IL1 est le produit le plus efficace à la fois avec une application du produit sur pierre humide et sèche alors que POM-IL2 a empêché les algues de se développer mais pas les cyanobactéries à une quantité de produit appliqué de 0.1g et 0.2g sur pierres humides. Néanmoins, ces nouveaux composés POM-IL1 et POM-IL2 ont donc des résultats nettement meilleurs que ceux obtenus avec Preventol RI80 dans les mêmes conditions.

Références

- Albertano, P., 2012. Cyanobacterial biofilms in monuments and caves, in: *Ecology of Cyanobacteria II*. Springer, pp. 317–343.
- Albertano, P., Luongo, L., Grilli Caiola, M., 1991. Influence of different lights of mixed cultures of microalgae from ancient frescoes. *International Biodeterioration* 27, 27–38. [https://doi.org/10.1016/0265-3036\(91\)90021-I](https://doi.org/10.1016/0265-3036(91)90021-I)
- Azaman, S.N.A., Nagao, N., Yusoff, F.M., Tan, S.W., Yeap, S.K., 2017. A comparison of the morphological and biochemical characteristics of *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella zofingiensis* cultured under photoautotrophic and mixotrophic conditions. *PeerJ* 5, e3473. <https://doi.org/10.7717/peerj.3473>
- Baquedano Estévez, C., Merino, L.M., Román, A. de la L., Valsero, J.D., 2019. The lampenflora in show caves and its treatment: an emerging ecological problem. *International Journal of Speleology* 48. <https://doi.org/10.5038/1827-806X.48.3.2263>
- Barberousse, H., Ruot, B., Yéprémian, C., Boulon, G., 2007. An assessment of façade coatings against colonisation by aerial algae and cyanobacteria. *Building and Environment* 42, 2555–2561. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2006.07.031>
- Barberousse, H., Tell, G., Yéprémian, C., Couté, A., 2006. Diversity of algae and cyanobacteria growing on building façades in France. *Algological Studies* 120, 81–105. <https://doi.org/10.1127/1864-1318/2006/0120-0081>
- Baruffo, L., Tretlach, M., 2007. Seasonal variations of F o, F m, and F v/F m in an epiphytic population of the lichen *Punctelia subrudecta* (Nyl.) Krog. *The Lichenologist* 39, 555–565.
- Bastian, F., Alabouvette, C., Jurado, V., Saiz-Jimenez, C., 2009. Impact of biocide treatments on the bacterial communities of the Lascaux Cave. *Naturwissenschaften* 96, 863–868. <https://doi.org/10.1007/s00114-009-0540-y>
- Bastian, F., Jurado, V., Nováková, A., Alabouvette, C., Sáiz-Jiménez, C., 2010. The microbiology of Lascaux cave. *Microbiology* 156, 644–652.
- Becerra, J., Zaderenko, A.P., Sayagués, M.J., Ortiz, R., Ortiz, P., 2018. Synergy achieved in silver-TiO₂ nanocomposites for the inhibition of biofouling on limestone. *Building and Environment* 141, 80–90. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2018.05.020>
- Bennett, A., Bogorad, L., 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *J Cell Biol* 58, 419–435. <https://doi.org/10.1083/jcb.58.2.419>
- Bigot, A., Fontaine, F., Clément, C., Vaillant-Gaveau, N., 2007. Effect of the herbicide flumioxazin on photosynthetic performance of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Chemosphere* 67, 1243–1251. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.10.079>
- Blazquez, A.B., Lorenzo, J., Flores, M., Gomez-Alarcon, G., 2000. Evaluation of the effect of some biocides against organisms isolated from historic monuments. *Aerobiologia* 16, 423–428.
- Bruno, L., Rugnini, L., Spizzichino, V., Caneve, L., Canini, A., Ellwood, N.T.W., 2019. Biodeterioration of Roman hypogea: the case study of the Catacombs of SS. Marcellino and Pietro (Rome, Italy). *Annals of Microbiology* 69, 1023–1032.
- Bruno, L., Valle, V., 2017. Effect of white and monochromatic lights on cyanobacteria and biofilms from Roman Catacombs. *International Biodeterioration & Biodegradation* 123, 286–295. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.07.013>
- Burgos-Cara, A., Ruiz-Agudo, E., Rodriguez-Navarro, C., 2017. Effectiveness of oxalic acid treatments for the protection of marble surfaces. *Materials & Design* 115, 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2016.11.037>
- Cennamo, P., Montuori, N., Trojsi, G., Fatigati, G., Moretti, A., 2016. Biofilms in churches built in grottoes. *Science of The Total Environment* 543, 727–738. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.048>
- Crispim, C.A., Gaylarde, P.M., Gaylarde, C.C., 2003. Algal and cyanobacterial biofilms on calcareous historic buildings. *Current microbiology* 46, 0079–0082.
- D’Agostino, D., Beccarisi, L., Camassa, M., Febroriello, P., 2015. Microclimate and microbial characterization in the Zinzulusa show cave (South Italy) after switching to led lighting. *Journal of Cave and Karst Studies* 77, 133–144. <https://doi.org/10.4311/2014EX0123>

- De Muynck, W., De Belie, N., Verstraete, W., 2009. Effectiveness of admixtures, surface treatments and antimicrobial compounds against biogenic sulfuric acid corrosion of concrete. *Cement and Concrete Composites* 31, 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.cemconcomp.2008.12.004>
- Dewez, D., Goltsev, V., Kalaji, H.M., Oukarroum, A., 2018. Inhibitory effects of silver nanoparticles on photosystem II performance in *Lemna gibba* probed by chlorophyll fluorescence. *Current Plant Biology* 16, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2018.11.006>
- Dobat, K., 1969. Die Lampenflora der Barenhöhle., in: Die Barenhöhle von Erpfingen. Gemeinde Erpfingen, Germany, pp. 29–35.
- Durán-Suárez, J., García-Beltrán, A., Rodríguez-Gordillo, J., 1995. Colorimetric cataloguing of stone materials (biocalcarene) and evaluation of the chromatic effects of different restoring agents. *Science of The Total Environment, The Deterioration of Monuments* 167, 171–180. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(95\)04578-0](https://doi.org/10.1016/0048-9697(95)04578-0)
- European Committee for Standardization, 2010a. NF EN 15801 - Conservation of cultural property – test methods – determination of water absorption by capillarity. La Plaine Saint-Denis.
- European Committee for Standardization, 2010b. NF EN 15803 - Mars 2010 - Conservation of cultural properties. Test methods. Determination of water vapour permeability. La Plaine Saint-Denis.
- European committee for Standardization, 2008. CSN EN ISO 11664-4 - Colorimetry - Part 4: CIE 1976 L*a*b* Colour space (ISO 11664- 4:2008), Category: 0117 Optics, in: <https://www.en-standard.eu>. La Plaine Saint-Denis.
- European committee for Standardization, 2007. NF EN 1936 - Natural stone test method - Determination of real density and apparent density, and of total and open porosity, in: AFNOR Edition. La Plaine Saint-Denis.
- Eyssautier-Chuine, S., Gommeaux, M., Moreau, C., Thomachot-Schneider, C., Fronteau, G., Pleck, J., Kartheuser, B., 2014. Assessment of new protective treatments for porous limestone combining water-repellency and anti-colonization properties. *Quarterly Journal of Engineering Geology and Hydrogeology* 47, 177–187. <https://doi.org/10.1144/qjegh2013-026>
- Eyssautier-Chuine, S., Mouhoubi, K., Reffuveille, F., Bodnar, J.-L., 2020. Thermographic imaging for early detection of biocolonization on buildings. *Building Research and Information*. <https://doi.org/10.1080/09613218.2020.1730740>
- Eyssautier-Chuine, S., Vaillant-Gaveau, N., Gommeaux, M., Thomachot-Schneider, C., Pleck, J., Fronteau, G., 2015. Efficacy of different chemical mixtures against green algal growth on limestone: A case study with *Chlorella vulgaris*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 103, 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.02.021>
- Favero-Longo, S.E., Benesperi, R., Bertuzzi, S., Bianchi, E., Buffa, G., Giordani, P., Loppi, S., Malaspina, P., Matteucci, E., Paoli, L., Ravera, S., Roccardi, A., Segimiro, A., Vannini, A., 2017. Species- and site-specific efficacy of commercial biocides and application solvents against lichens. *International Biodeterioration & Biodegradation* 123, 127–137. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.06.009>
- Fidanza, M.R., Caneva, G., 2019. Natural biocides for the conservation of stone cultural heritage: A review. *Journal of Cultural Heritage* 38, 271–286. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2019.01.005>
- Fort, R., Mingarro, F., López de Azcona, M.C., Rodriguez Blanco, J., 2000. Chromatic parameters as performance indicators for stone cleaning techniques. *Color Res. Appl.* 25, 442–446. [https://doi.org/10.1002/1520-6378\(200012\)25:6<442::AID-COL9>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/1520-6378(200012)25:6<442::AID-COL9>3.0.CO;2-O)
- Gagliano Candela, R., Maggi, F., Lazzara, G., Rosselli, S., Bruno, M., 2019. The essential Oil of *Thymbra capitata* and its application as a biocide on stone and derived surfaces. *Plants* 8, 300.
- Genova, C., Fuentes, E., Sanmartín, P., Favero, G., Prieto, B., 2020. Phytochemical Compounds as Cleaning Agents on Granite Colonized by Phototrophic Subaerial Biofilms. *Coatings* 10, 295. <https://doi.org/10.3390/coatings10030295>
- Gibeaux, S., 2017. IFEPAR-Impact des Facteurs Environnementaux sur le Patrimoine Restauré (PhD Thesis). Reims.
- Goffredo, G.B., Accoroni, S., Totti, C., Romagnoli, T., Valentini, L., Munafò, P., 2017. Titanium dioxide based nanotreatments to inhibit microalgal fouling on building stone surfaces. *Building and Environment* 112, 209–222. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2016.11.034>

- Grossi, C.M., Brimblecombe, P., Esbert, R.M., Alonso, F.J., 2007. Color changes in architectural limestones from pollution and cleaning. *Color Res. Appl.* 32, 320–331. <https://doi.org/10.1002/col.20322>
- Grossi, C.M., Esbert, R.M., Díaz-Pache, F., Alonso, F.J., 2003. Soiling of building stones in urban environments. *Building and Environment* 38, 147–159. [https://doi.org/10.1016/S0360-1323\(02\)00017-3](https://doi.org/10.1016/S0360-1323(02)00017-3)
- Guillitte, O., 1995. Bioreceptivity: a new concept for building ecology studies. *Science of The Total Environment, The Deterioration of Monuments* 167, 215–220. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(95\)04582-L](https://doi.org/10.1016/0048-9697(95)04582-L)
- Herrera, L.K., Videla, H.A., 2004. The importance of atmospheric effects on biodeterioration of cultural heritage constructional materials. *International Biodeterioration & Biodegradation, 12th International Biodeterioration and Biodegradation Symposium (Biosorption and Bioremediation III)* 54, 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.06.002>
- Herrmann, S., Kostrzewa, M., Wierschem, A., Streb, C., 2014. Polyoxometalate Ionic Liquids as Self-Repairing Acid-Resistant Corrosion Protection. *Angewandte Chemie International Edition* 53, 13596–13599.
- Iliopoulou-Georgoudaki, J., Pantazidou, A., Theoulakis, P., 1993. An assessment of cleaning photoautotrophic microflora: the case of Perama cave, Ioannina Greece. *Mémoires de Biospéologie* 20, 117–120.
- Jurado, V., del Rosal, Y., Gonzalez-Pimentel, J.L., Hermosin, B., Saiz-Jimenez, C., 2020. Biological control of phototrophic biofilms in a show cave: The case of Nerja Cave. *Applied Sciences* 10, 3448.
- La Russa, M.F., Macchia, A., Ruffolo, S.A., De Leo, F., Barberio, M., Barone, P., Crisci, G.M., Urzì, C., 2014. Testing the antibacterial activity of doped TiO₂ for preventing biodeterioration of cultural heritage building materials. *International Biodeterioration & Biodegradation* 96, 87–96.
- Lefèvre, M., 1974. La “Maladie Verte” de Lascaux. *Studies in Conservation* 19, 126–156. <https://doi.org/10.2307/1505660>
- Li, Q., Zhang, B., Yang, X., Ge, Q., 2018. Deterioration-associated microbiome of stone monuments: structure, variation, and assembly. *Applied and environmental microbiology* 84.
- Liñán, C., del Rosal, Y., 2015. Natural ventilation of karstic caves: new data on the Nerja Cave (Malaga, S of Spain), in: *Hydrogeological and Environmental Investigations in Karst Systems*. Springer, pp. 505–511.
- Liñán, C., Del Rosal, Y., Carrasco, F., Vadillo, I., Benavente, J., Ojeda, L., 2018. Highlighting the importance of transitional ventilation regimes in the management of Mediterranean show caves (Nerja-Pintada system, southern Spain). *Science of the Total Environment* 631, 1268–1278.
- Lismonde, B., 2002. *Climatologie du monde souterrain*. Comité départemental de spéléologie de l’Isère.
- Manso, S., De Muynck, W., Segura, I., Aguado, A., Steppe, K., Boon, N., De Belie, N., 2014. Bioreceptivity evaluation of cementitious materials designed to stimulate biological growth. *Science of the Total Environment* 481, 232–241. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.059>
- Marco, A., Santos, S., Caetano, J., Pintado, M., Vieira, E., Moreira, P.R., 2020. Basil essential oil as an alternative to commercial biocides against fungi associated with black stains in mural painting. *Building and Environment* 167, 106459. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2019.106459>
- Maxim, D., Bucşa, L., Moza, M.I., Chachula, O., 2012. Preliminary antifungal investigation of ten biocides against moulds from two different church frescoes. *Ann RSCB* 17, 139–146.
- Miller, A.Z., Sanmartín, P., Pereira-Pardo, L., Dionísio, A., Saiz-Jimenez, C., Macedo, M.F., Prieto, B., 2012. Bioreceptivity of building stones: A review. *Science of The Total Environment* 426, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.03.026>
- Misra, A., Franco Castillo, I., Müller, D.P., González, C., Eyssautier-Chuine, S., Ziegler, A., de la Fuente, J.M., Mitchell, S.G., Streb, C., 2018. Polyoxometalate-Ionic Liquids (POM-ILs) as Anticorrosion and Antibacterial Coatings for Natural Stones. *Angewandte Chemie International Edition* 57, 14926–14931.
- Moreau, C., Vergès-Belmin, V., Leroux, L., Oriol, G., Fronteau, G., Barbin, V., 2008. Water-repellent and biocide treatments: Assessment of the potential combinations. *Journal of Cultural Heritage* 9, 394–400. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2008.02.002>

- Mulec, J., Kosi, G., 2009. Lampenflora algae and methods of growth control. *Journal of cave and karst studies* 71, 109–115.
- Mulec, J., Kosi, G., Vrhovšek, D., 2008. Characterization of cave aerophytic algal communities and effects of irradiance levels on production of pigments. *Journal of Cave and Karst Studies* 70, 3–12.
- Mulec, J., Vaupotič, J., Walochnik, J., 2012. Prokaryotic and Eukaryotic Airborne Microorganisms as Tracers of Microclimatic Changes in the Underground (Postojna Cave, Slovenia). *Microb Ecol* 64, 654–667. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0059-1>
- Muñoz-Fernández, J., Del Rosal, Y., Álvarez-Gómez, F., Hernández-Mariné, M., Guzmán-Sepúlveda, R., Korbee, N., Figueroa, F.L., 2021. Selection of LED lighting systems for the reduction of the biodeterioration of speleothems induced by photosynthetic biofilms in the Nerja Cave (Malaga, Spain). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 217, 112155.
- Nugari, M.P., Pietrini, A.M., Caneva, G., Imperi, F., Visca, P., 2009. Biodeterioration of mural paintings in a rocky habitat: The Crypt of the Original Sin (Matera, Italy). *International Biodeterioration & Biodegradation* 63, 705–711. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.03.013>
- Olson, R., 2006. Control of lamp flora in developed caves. *Cave conservation and restoration*, Huntsville, National Speleological Society 343–348.
- Orial, G., Vergès-Belmin, V., Texier, A., Loisel, C., Bozellec, J.-P., De Bazellec, H., Groud, G., 2011. Quelques conseils pratiques pour l'entretien des monuments funéraires., in: *Jardins de Pierres*. Presented at the Jardins de pierres, SFIIC, Véronique Vergès-Belmin, Institut national du patrimoine, Paris, p. 386.
- Perez, R.E., 2018. Study and remediation of environmental problems caused due to the growth of algae in speleothems of calcareous caves adapted for tourism- a case of success in Spain. *J Environ Geol* 02. <https://doi.org/10.4172/2591-7641.1000013>
- Pfendler, Stéphane, Borderie, F., Bousta, F., Alaoui-Sosse, L., Alaoui-Sosse, B., Aleya, L., 2018. Comparison of biocides, allelopathic substances and UV-C as treatments for biofilm proliferation on heritage monuments. *Journal of Cultural Heritage, Cultural heritage in times of armed conflicts in the Middle East: Much more than material damage?* 33, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2018.03.016>
- Pfendler, S., Karimi, B., Maron, P.-A., Ciadamidaro, L., Valot, B., Bousta, F., Alaoui-Sosse, L., Alaoui-Sosse, B., Aleya, L., 2018. Biofilm biodiversity in French and Swiss show caves using the metabarcoding approach: First data. *Science of the Total Environment* 615, 1207–1217. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.054>
- Prieto, B., Sanmartín, P., Silva, B., Martínez-Verdú, F., 2010. Measuring the color of granite rocks: A proposed procedure. *Color Res. Appl.* 35, 368–375. <https://doi.org/10.1002/col.20579>
- Příkryl, R., Smith, B.J., 2007. *Building stone decay: from diagnosis to conservation*. Geological Society of London.
- Ragon, M., 2011. *Diversité et processus de colonisation microbienne sur des substrats minéraux (phdthesis)*. Université Paris Sud - Paris XI.
- Rajkowska, K., Koziróg, A., Otlewska, A., Piotrowska, M., Atrián-Blasco, E., Franco-Castillo, I., Mitchell, S.G., 2020. Antifungal Activity of Polyoxometalate-Ionic Liquids on Historical Brick. *Molecules* 25, 5663. <https://doi.org/10.3390/molecules25235663>
- Rugnini, L., Migliore, G., Tasso, F., Ellwood, N.T.W., Sprocati, A.R., Bruno, L., 2020. Biocidal Activity of Phyto-Derivative Products Used on Phototrophic Biofilms Growing on Stone Surfaces of the Domus Aurea in Rome (Italy). *Applied Sciences* 10, 6584. <https://doi.org/10.3390/app10186584>
- Sanmartín, P., Rodríguez, A., Aguiar, U., 2020. Medium-term field evaluation of several widely used cleaning-restoration techniques applied to algal biofilm formed on a granite-built historical monument. *International Biodeterioration & Biodegradation* 147, 104870. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104870>
- Sasse, H.R., Sneathlge, R., 1996. Methods for evaluation of stone conservation treatments., in: *Report of the Dahlem Workshop: Saving Our Heritage: The Conservation of Historic Stone Structures*. Baer, N.S., Sneathlge, R., Berlin, pp. 223–243.
- Scheerer, S., Ortega-Morales, O., Gaylarde, C., 2009. Microbial deterioration of stone monuments—an updated overview. *Advances in applied microbiology* 66, 97–139.

- Sciuto, K., Moschin, E., Moro, I., 2017. Cryptic Cyanobacterial Diversity in the Giant Cave (Trieste, Italy): The New Genus *Timaviella* (Leptolyngbyaceae). *crya* 38, 285–323. <https://doi.org/10.7872/crya/v38.iss4.2017.285>
- Simon, K.S., Pipan, T., Culver, D.C., 2007. A conceptual model of the flow and distribution of organic carbon in caves. *Journal of Cave and Karst Studies* 69, 279–284.
- Trinh, D.A., Trinh, Q.H., Tran, N., Guinea, J.G., Matthey, D., 2018. Eco-friendly remediation of lampenflora on speleothems in tropical karst caves. *Journal of Cave and Karst Studies* 80, 1–12. <https://doi.org/10.4311/2017ES0101>
- Urzi, C.E., Criseo, G., Krumbein, W.E., Wollenzien, U., Gorbushina, A.A., 1993. Are colour changes of rocks caused by climate, pollution, biological growth, or by interactions of the three?, in: *Conservation of Stone and Other Materials. Vol. One: Causes of Disorders and Diagnosis. Vol. Two: Prevention and Treatments. Proceedings of the International RILEM/UNESCO Congress...* Paris, June 29-July 1, 1993. E. & F. N. Spon, pp. 279–286.
- Vannini, A., Contardo, T., Paoli, L., Scattoni, M., Favero-Longo, S.E., Loppi, S., 2018. Application of commercial biocides to lichens: Does a physiological recovery occur over time? *International Biodeterioration & Biodegradation* 129, 189–194.
- Vázquez-Nion, D., Sanmartín, P., Silva, B., Prieto, B., 2013. Reliability of color measurements for monitoring pigment content in a biofilm-forming cyanobacterium. *International Biodeterioration & Biodegradation* 84, 220–226. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.05.037>
- Veneranda, M., Blanco-Zubiaguirre, L., Roselli, G., Di Girolami, G., Castro, K., Madariaga, J.M., 2018. Evaluating the exploitability of several essential oils constituents as a novel biological treatment against cultural heritage biocolonization. *Microchemical Journal* 138, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.12.019>
- Warscheid, Th., Braams, J., 2000. Biodeterioration of stone: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation, Biodeterioration of Cultural Property* 2, Part 2 46, 343–368. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00109-8](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00109-8)
- Webb, A.H., Bawden, R.J., Busby, A.K., Hopkins, J.N., 1992. Studies on the effects of air pollution on limestone degradation in Great Britain. *Atmospheric Environment. Part B. Urban Atmosphere* 26, 165–181. [https://doi.org/10.1016/0957-1272\(92\)90020-S](https://doi.org/10.1016/0957-1272(92)90020-S)
- Wellburn, R.W., 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of plant physiology* 144, 307–313.
- Xie, C., Guo, H., Zhao, W., Zhang, L., 2020. Environmentally friendly marine antifouling coating based on a synergistic strategy. *Langmuir* 36, 2396–2402.

Légende des tables et figures

Tables

Table 1 : Paramètres pétrophysiques de la craie de Pommery.

Table 2 : Résumé des prélèvements effectués pour les cultures, analyses et identification des biofilms.

Table 3 : Concentration des pigments chlorophylliens et des phycobiliprotéines contenus dans les biofilms : non coloré, vert, noir (vert foncé) et rouge du Bas-relief « Fête de Bacchus » et des biofilms : non coloré, vert et marron du bas-relief « Silène ».

Table 4 : Identification des souches séquencées par la database GENBANK en open access NCBI, pourcentage de similitude avec les souches répertoriées dans la database, le numéro d'accès et description visuelle des souches.

Figures

Figure 1 : Observations d'une sphère de coccolithe (a) et de débris (b) de coccolithe issue de microalgues unicellulaires à squelette calcaire composant la craie. Observations au microscope électronique à balayage.

Figure 2 : Observations de Globigérines (Foraminifères pélagiques) au microscope optique en lumière naturelle polarisée.

Figure 3 : Courbe d'intrusion de mercure. Distribution des accès aux pores de la craie par intrusion de volume de mercure cumulé (mL/g)

Figure 4 : Zones de prélèvements sur le bas-relief « Fête de Bacchus ».

Figure 5 : Zones de prélèvements sur le bas-relief « Silène ».

Figure 6 : Graphique des concentrations en Chlorophylles *a* et *b* et en caroténoïdes contenus dans les biofilms.

Figure 7 : Graphique des concentrations en phycobiliprotéines contenus dans les biofilms. Comparaison avec les valeurs de fluorescence chlorophyllienne ϕ PSII.

Figure 8: Culture sur les milieux gélosés en boîte de pétri et sur pierre en enceinte climatique (a-b), Culture en milieu Hoagland liquide (c).

Figure 9 : Observations au microscope optique du biofilm BNC au grossissement X40 (a) et X100 (b).

Figure 10 : Observations de BNC cultivé sur la craie avec les *Diplosphaera sp.* (a). Culture de *Pseudostichococcus monallantoides* sur gélose d'agar (b).

Figure 11 : Observations de BV prélevé sur le bas-relief, avec la présence de *Pseudostichococcus monallantoides* (flèche rouge) et d'une autre espèce bleu-vert à 2 ou 4 lobes (flèche bleue) (a). Culture du même biofilm BV sur une gélose d'agar enrichie de milieu Hoagland. Uniquement *Pseudostichococcus monallantoides* a été cultivée (b).

Figure 12 : Observations de BV cultivé en milieu liquide : présence de *Bracteacoccus sp.* (cellules vert-jeune), de l'espèce bleu-vert à 2 ou 4 lobes et de la cyanobactérie *Timaviella sp.*

Figure 13 : Observations de BN avec la présence du morphotype rond à 2 ou 4 lobes de couleur bleu-vert (a) ou orange (b).

Figure 14 : Observations de BN inoculé sur la craie. Développement du morphotype rond à 2 ou 4 lobes de couleur bleu-vert et orange (a) et de *Timaviella sp.*(b).

Figure 15 : Observations de BR prélevé sur le bas-relief. Présence de cellules très grosses rondes oranges de *Chromochloris zoefingiensis* (a). BR a été cultivé en milieu liquide de Hoagland, la même algue a perdu sa pigmentation orange au profit du vert, les cellules deviennent plus petites (b).

Figure 16 : BR cultivé sur gélose d'agar enrichie en milieu Hoagland montre des algues *Chromochloris zoefingiensis* de morphotype rond, petit et vert (a). Ce même biofilm cultivé sur la craie a développé la même algue avec une évolution différente du morphotype que l'on retrouve en culture liquide (b).

Figure 17 : Biofilm SNC prélevé sur le bas-relief. On remarque la présence *Pseudostichococcus monallantoides* et de *Diplosphaera sp.* (a), alors qu'en culture sur gélose, seul *Pseudostichococcus monallantoides* se sont développées (b).

Figure 18 : Biofilm SV prélevé sur le bas-relief. Deux nouveaux morphotypes sont présents dans ce biofilm, le premier correspond à des filaments verts épais (a), et le second morphotype correspond à des cellules individuelles rondes à gangue (b).

Figure 19 : Biofilm SM prélevé sur le bas-relief. Des filaments ligneux marrons et de cellules à chloroplastes verts correspondent au phylлум *Eucladium verticillatum* (a) et (b).

Figure 20 : Biofilm SM en culture liquide. On peut observer encore *Eucladium verticillatum* (a) ainsi que le morphotype observé dans SV, à filaments épais et chloroplastes libres (b).

Figure 21 : Pourcentage de séquences analysées par biofilm (a) et par échantillon (b) sur la totalité des séquences obtenues pour l'ARN 18S.

Figure 22 : Arbre phylogénétique des ARN 18S des échantillons prélevés sur « Fête de Bacchus » et « Silène ».

Figure 23 : Graphique de la matrice de distance NMDS montrant les corrélations entre les différents échantillons en fonction de leurs séquences ADN.

Figure 24 : Répartition des algues (Chlorophytes), mousses Phragmoplastophytes et champignons (Mucoromycètes, Ascomycètes, Basidiomycètes) dans les échantillons du biofilm BN.

Figure 25 : Répartition des algues (Chlorophytes), mousses Phragmoplastophytes et champignons (Mucoromycètes, Ascomycètes, Basidiomycètes) dans les échantillons du biofilm BNC.

Figure 26 : Répartition des algues (Chlorophytes), mousses (Phragmoplastophytes) et champignons (Mucoromycètes, Ascomycètes) dans les échantillons du biofilm BV.

Figure 27 : Répartition des algues (Chlorophytes), et champignons (Ascomycètes, Basidiomycètes) dans les échantillons du biofilm SNC.

Figure 28 : Répartition des algues (Chlorophytes), mousses (Phragmoplastophytes) et champignons (Mucoromycètes, Ascomycètes) dans les échantillons du biofilm SV.

Figure 29 : Répartition des algues (Chlorophytes), mousses (Phragmoplastophytes) et champignons (Ascomycètes) dans les échantillons du biofilm SM.

Figure 30 : Pourcentage de séquences analysées par biofilm (a) et par échantillon (b) sur la totalité des séquences obtenues pour l'ARN 16S.

Figure 31 : Arbre phylogénétique des ARN 16S des échantillons prélevés sur « Fête de Bacchus » et « Silène ».

Figure 32 : Projection du nuage de points représentant les OTU et de la matrice de distance NMSD, d'un espace de n dimensions à un espace à 2 dimensions.

Figure 33 : Répartition des bactéries séquencées dans les échantillons du biofilm BN.

Figure 34 : Répartition des bactéries séquencées dans les échantillons du biofilm BNC et BS.

Figure 35 : Répartition des bactéries séquencées dans les échantillons du biofilm BV.

Figure 36 : Répartition des bactéries séquencées dans les échantillons du biofilm BR.

Figure 37 : Répartition des bactéries séquencées dans les échantillons du biofilm SNC.

Figure 38 : Répartition des bactéries séquencées dans les échantillons du biofilm SV.

Figure 39 : Répartition des bactéries séquencées dans les échantillons du biofilm SM.

Figure 40 : Répartition des bactéries séquencées dans les échantillons du biofilm SP.

Figure 41 : Illustration des cations et anions utilisées comme composants des POM-IL 1 et 2.

Figure 42 : Sphère colorimétrie de l'espace Lab.

Figure 43 : Variation de la couleur globale de la pierre liée à l'application des produits POM-IL1, POM-IL2 et Preventol RI80, avec une application de 0.2 g (a) et 0.4 g de solution liquide (b).

Figure 44 : Mise en place des tests biocides dans l'enceinte.

Figure 45 : Photos des pierres inoculées par *Chromochloris* (en haut) et *Pseudostichococcus* (en bas) et incubées pendant 7 semaines.

Figure 46 : Développement des algues *Pseudostichococcus* sur pierre témoin et pierres traitées pendant 7 semaines d'incubation. Evolution du paramètre de couleur Δa^* (a). Evolution de l'activité photosynthétique maximale des algues FV/FM, (b).

Figure 47 : Développement des algues *Chromochloris* sur pierre témoin et pierres traitées pendant 7 semaines d'incubation. Evolution du paramètre de couleur Δa^* (a). Evolution de l'activité photosynthétique maximale des algues FV/FM, (b).

Figure 48 : Photos des pierres inoculées par *Pseudostichococcus* et incubées après 5 semaines de test.

Figure 49 : Développement des algues *Pseudostichococcus* sur pierres témoins et pierres traitées pendant 5 semaines d'incubation. Evolution du paramètre de couleur Δa^* (a). Evolution de l'activité photosynthétique maximale des algues FV/FM, (b).

Figure 50 : Développement des algues *Pseudostichococcus* sur pierres témoins et pierres saturées d'eau et traitées par 0.4 g de solution diluée de POM-IL1 et POM-IL2, pendant 5 semaines d'incubation.

Evolution du paramètre de couleur Δa^* (a). Evolution de l'activité photosynthétique maximale des algues FV/FM, (b).

Figure 51 : Développement des algues *Pseudostichococcus* sur pierres témoins et pierres saturées d'eau et traitées par 0.2 g de solution diluée de POM-IL1, POM-IL2 et Preventol RI80, pendant 5 semaines d'incubation. Evolution du paramètre de couleur Δa^* (a). Evolution de l'activité photosynthétique maximale des algues FV/FM, (b).

Figure 52 : Développement des algues *Pseudostichococcus* sur pierres témoins et pierres saturées d'eau et traitées par 0.1 g de solution diluée de POM-IL1, POM-IL2, pendant 5 semaines d'incubation. Evolution du paramètre de couleur Δa^* (a). Evolution de l'activité photosynthétique maximale des algues FV/FM, (b).

Figure 53 : Photos des pierres inoculées par *Pseudostichococcus* à la fin des 5 semaines de test.

Figure 54 : Photos des pierres inoculées par les algues et les cyanobactéries à la fin des 5 semaines de test.

Figure 55 : Développement des algues et cyanobactéries sur pierres témoins et pierres traitées à différentes quantités de solution diluée de POM-IL1, POM-IL2 et Preventol, pendant 5 semaines d'incubation. Evolution du paramètre de couleur Δa^* (a). Evolution de l'activité photosynthétique maximale des algues FV/FM, (b).

Figure 56 : Développement des algues et cyanobactéries pierres traitées à différentes quantités de solution diluée de POM-IL1, pendant 5 semaines d'incubation. Evolution du paramètre de couleur Δa^* (a). Evolution de l'activité photosynthétique maximale des algues FV/FM, (b).

Figure 57 : Développement des algues et cyanobactéries pierres traitées à différentes quantités de solution diluée de POM-IL2, pendant 5 semaines d'incubation. Evolution du paramètre de couleur Δa^* (a). Evolution de l'activité photosynthétique maximale des algues FV/FM, (b).

Photogrammétrie des salles et des bas-reliefs Fête de Bacchus et Silène de la cave Pommery

Par Robin PERARNAU

Introduction

En appui des méthodes d'analyses utilisées pour l'étude des biofilms, l'acquisition d'un modèle photogrammétrique 3D permet d'obtenir une sauvegarde numérique des bas-reliefs dans un souci de conservation patrimoniale. La méthode utilisée, la photogrammétrie, est selon Arles et al. (2011), une "technique permettant de reconstituer une scène en trois dimensions à partir d'une série de photos". Connue dès le XIXème siècle, c'est seulement ces dix dernières années que l'utilisation de cette technique prend de l'ampleur grâce à l'automatisation des protocoles de traitement d'image, au développement de la photographie numérique et à l'augmentation de la puissance des ordinateurs (*ibid.*).

Problématique

L'obtention de modèles tridimensionnels numériques des bas-reliefs et des caves doit permettre de renseigner la surface des bas-reliefs impactée par les biofilms, ainsi que d'indiquer la source des lumières responsables du développement de ces biofilms.

Méthodologie

Acquisition

L'acquisition des photographies nécessaires à la construction des modèles photogrammétriques a été réalisée en deux fois, le 28 juillet 2020 pour les bas-reliefs, selon la procédure décrite en Figure 1-A ; et le 03 février 2021 pour les caves, selon la procédure décrite en Figure 1-B.

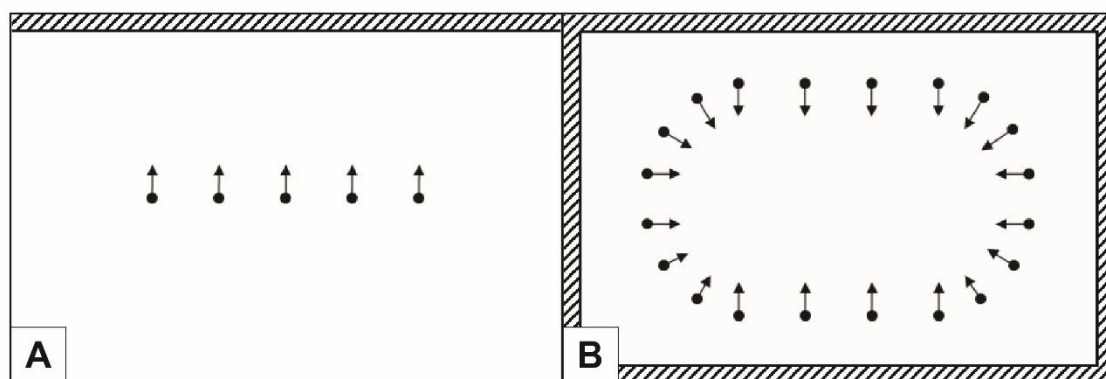


Figure 1 : Vue zénithale d'une procédure d'acquisition photogrammétrique. Le point représente la position du photographe, la flèche l'orientation de la prise de vue. A. Pour une façade ; B. Pour un intérieur. D'après Agisoft, 2021.

Les appareils photographiques utilisés sont un modèle CANON EOS 5D Mark II pour l'acquisition des bas-reliefs et un COOLPIX B700 pour l'acquisition des caves.

Contraintes liées à l'acquisition

De nombreuses contraintes sur place viennent entraver le bon déroulement du protocole d'étude. Ainsi, la faible luminosité à l'intérieur des caves crée un contexte défavorable à une acquisition photogrammétrique. Cette obscurité a été compensée par l'ajout de deux lumières sur trépied, situés chacune d'un côté du photographe, résultant en la création d'ombres supplémentaires. Par ailleurs,

l'humidité peut rendre les surfaces réfléchissantes, causant des erreurs sur les modèles 3D. Enfin, la présence d'un certain nombre d'éléments extérieurs, tels que des câbles ou encore des éléments d'exposition, viennent gêner la prise de vue (Figure 2).



Figure 2 : Photo d'acquisition du modèle photogrammétrique de la cave de Bacchus. Un certain nombre d'éléments remarquables viennent gêner l'acquisition : A. Câbles aériens. B & C. Panneau d'exposition lumineux. D. Nacelle élévatrice. E. Réflexion de la lumière sur une flaque d'eau au sol.

Traitement

Le traitement des données de photogrammétrie a été effectué avec le logiciel Agisoft Metashape v.1.7.2. La procédure de traitement utilisée suit le protocole recommandé par Agisoft (2021), en quatre étapes principales : l'alignement des photographies, la création d'un nuage de points dense, puis d'un maillage et enfin de la texture. Après l'alignement des photographies et la création d'un nuage de points dense, la mise à l'échelle et le nettoyage des nuages de points est indispensable pour obtenir des modèles de bonne qualité.

Traitement : Tri des photos et masquage

Il convient avant le début de protocole de trier les photographies et de masquer les éléments remarquables cités précédemment. Sur 561 photographies, 527 ont été gardées pour le traitement photogrammétrique. Les photographies retirées l'ont été soit en raison d'un obstacle visuel, soit d'une estimation de qualité par le logiciel inférieure à 0,5 sur 1, comme recommandée par Agisoft. Les éléments remarquables précédemment cités, tels que les panneaux d'expositions, ont été masqués des photographies afin de les retirer du traitement (Figure 3).



Figure 3 : Les éléments remarquables gênant la prise de vue sont systématiquement masqués.

Traitement : Alignement et Création d'un nuage de points dense

L'opération d'alignement permet de trouver des points de comparaison entre les différentes photographies et de générer un premier nuage de points correspondants aux points d'alignements. La construction d'un nuage de points dense consiste en une reconstruction de la profondeur de chaque photographie, à partir de l'estimation de la position des photographies. Elle permet de construire un modèle précis et proche de la réalité (Figure 4). Ces étapes sont particulièrement longues et nécessitent des ordinateurs avec une puissance de calcul importante.

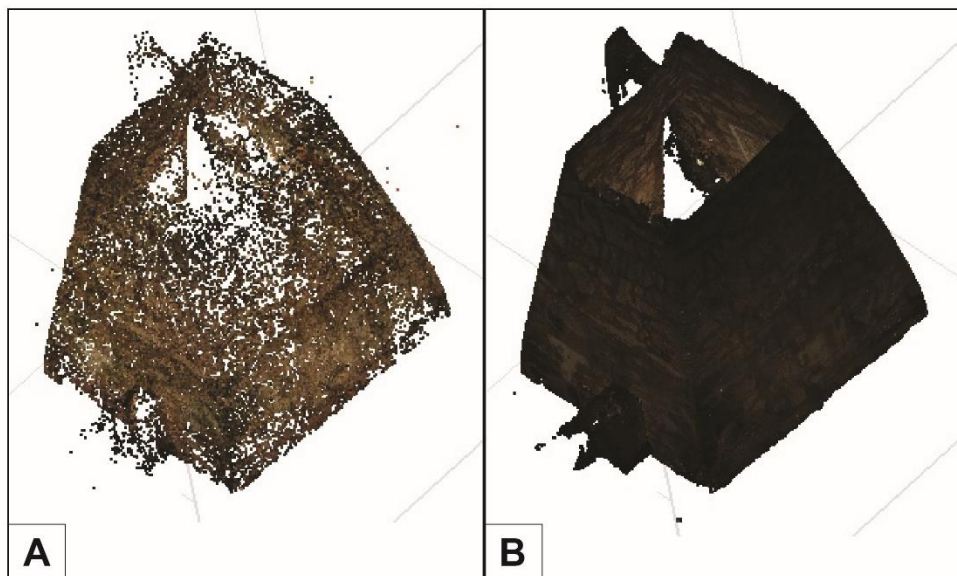


Figure 4 : Alignement (A) et création d'un nuage de points dense (B) de la cave de Bacchus.

Traitement : Mise à l'échelle

Grâce aux données de terrain acquises au télémètre laser, les modèles 3D ont pu être mis à l'échelle, avec une erreur estimée à environ 13 cm pour la cave de Bacchus et approximativement 33 cm pour la cave de Silène, ce qui est satisfaisant par rapport à la dimension des salles. Les modèles des bas-reliefs ont été mis à l'échelle de manière relative, en les alignant aux modèles des caves.

Traitement : Nettoyage des modèles

Les nuages de points denses doivent être nettoyés afin d'éviter des erreurs dans les étapes suivantes. Les points particulièrement distants des autres sont ainsi supprimés, c'est le cas des points aux limites de l'acquisition, tels que dans les zones d'ouvertures (couloirs, fenêtres), au sol, ou sur la limite haute des modèles (Figure 5).



Figure 5 : Afin de nettoyer les nuages de points, les zones aux limites de l'acquisition sont filtrées le plus possible. Ici, la zone rouge correspond à un couloir qui ne figure pas dans les objectifs de l'étude. Cette zone comporte ainsi des manques particulièrement visibles, elle est donc supprimée.

Traitement : Construction d'un maillage

Le maillage est une reconstruction de la surface de l'objet, il est défini à partir de triangles dont les sommets sont constitués par les points construits précédemment. La texture, matériau constituant le visuel de l'objet tridimensionnel, sera ensuite élaborée par le logiciel (Figure 6).

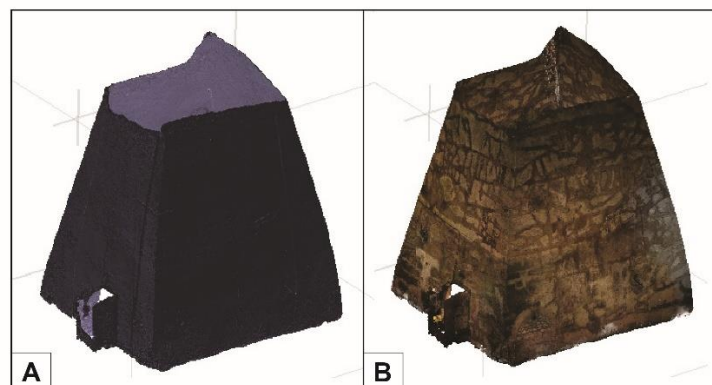


Figure 6 : Maillage (A) et maillage texturé (B) de la cave de Bacchus.

Les métadonnées liées au traitement des modèles 3D sont détaillées dans le tableau suivant (Tableau 1).

	<u>Bacchus (Bas-Relief)</u>	<u>Bacchus (Cave)</u>	<u>Silène (Bas-Relief)</u>	<u>Silène (Cave)</u>
<u>Appareil photo</u>	COOLPIX B700	CANON EOS 5D Mark II	COOLPIX B700	CANON EOS 5D Mark II
<u>Longueur de focale</u>	4,3 mm	25 mm	4,3 mm	25 mm
<u>Taille du pixel</u>	1,2 μm^2	6,55 μm^2	1,2 μm^2	6,55 μm^2
<u>Résolution au sol</u>	0,532 mm/pix	1,28 mm/pix	2,16 mm/pix	3,01 mm/pix
<u>Erreur moyenne par rapport aux mesures d'échelles au sol</u>	/	0,13 m	/	0,33 m
<u>Nombre de photos alignées</u> (Haute précision)	94	100	153	180
<u>Nombre de tie points</u>	20 967	48 175	46 909	79 804
<u>Nombre de carte de profondeurs</u> (Haute qualité)	94	97	153	180
<u>Nombre de points du nuage dense</u> (Haute qualité)	4 726 311	28 040 056	7 317 208	33 288 961
<u>Nombre de faces du modèle 3D</u> (Haute qualité)	2 499 999	5 608 007	1 056 461	2 500 000

Tableau 1 : Métadonnées liées au traitement des modèles photogrammétriques.

Résultats

A l'issue des traitements de toutes les images acquises sur le terrain (94 photos pour « Fête de Bacchus » et 153 pour « Silène ») et traitées par photogrammétrie, des modèles 3D ont été créés pour reconstituer les bas-reliefs sans la colonisation biologique donc dans leur état d'origine.



Figure 7 : Reconstitution 3D du bas-relief « Fête de Bacchus » par **S. Laratte**.



Figure 8 : Reconstitution 3D du bas-relief « Silène » par **S. Laratte**.

Les données acquises par photogrammétrie ont permis de reconstituer des plans des salles où se situent les bas-reliefs « Bacchus » (Figure 7) et « Silène » (Figure 8) permettant ainsi de contextualiser ces œuvres¹. Différentes vues des façades simulées à partir des modèles 3D, sous forme d'orthomosaïques, ont été réalisées (Figure 9 et 10). Les caves ont une forme pyramidale avec une base rectangulaire. La hauteur importante des salles (30 m environ) ne permet pas d'acquérir un modèle photogrammétrique complet sans l'utilisation d'un drone et d'un lasergrammètre terrestre. L'acquisition a donc été effectuée sur une hauteur limitée à environ 13 m pour « Bacchus », et d'environ 17 m pour « Silène ».

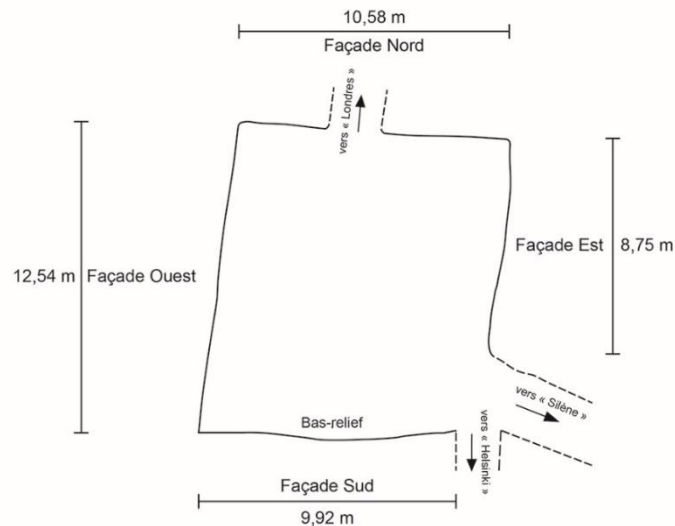


Figure 9 : Plan de la cave 14 dite « Bacchus »

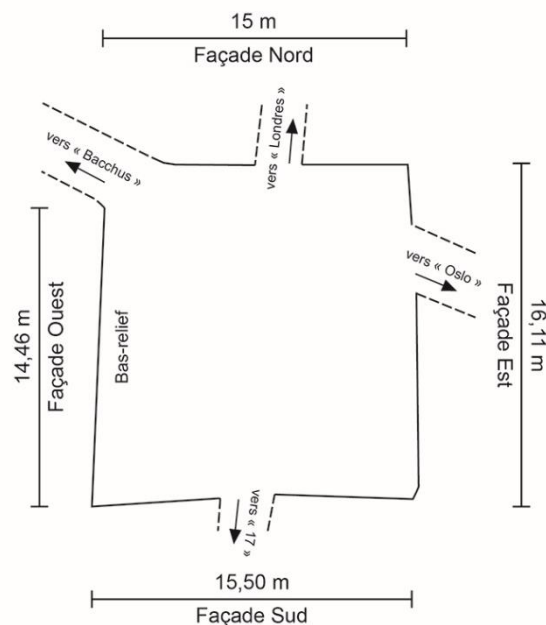


Figure 10 : Plan au sol de la cave 16 dite « Silène »

Plan des façades

¹ Ces plans sont schématiques et ne servent qu'à la contextualisation de cette étude, ils n'ont pas vocation à restituer de manière fidèle et précise l'architecture des salles, ils ne doivent ainsi pas être réutilisés en dehors de cette étude.

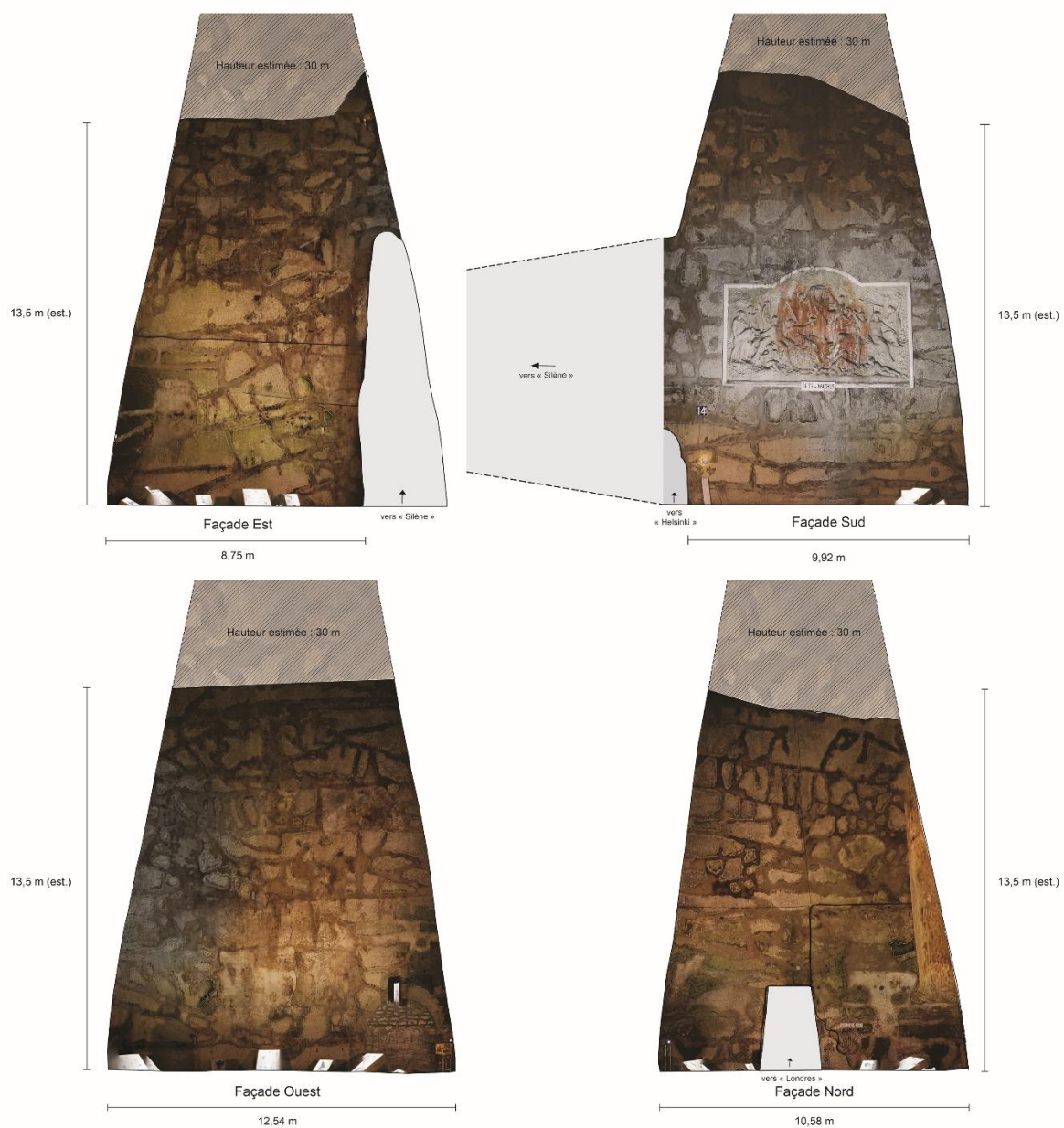


Figure 11 : Vue des façades de la cave 14 dite « Bacchus ».

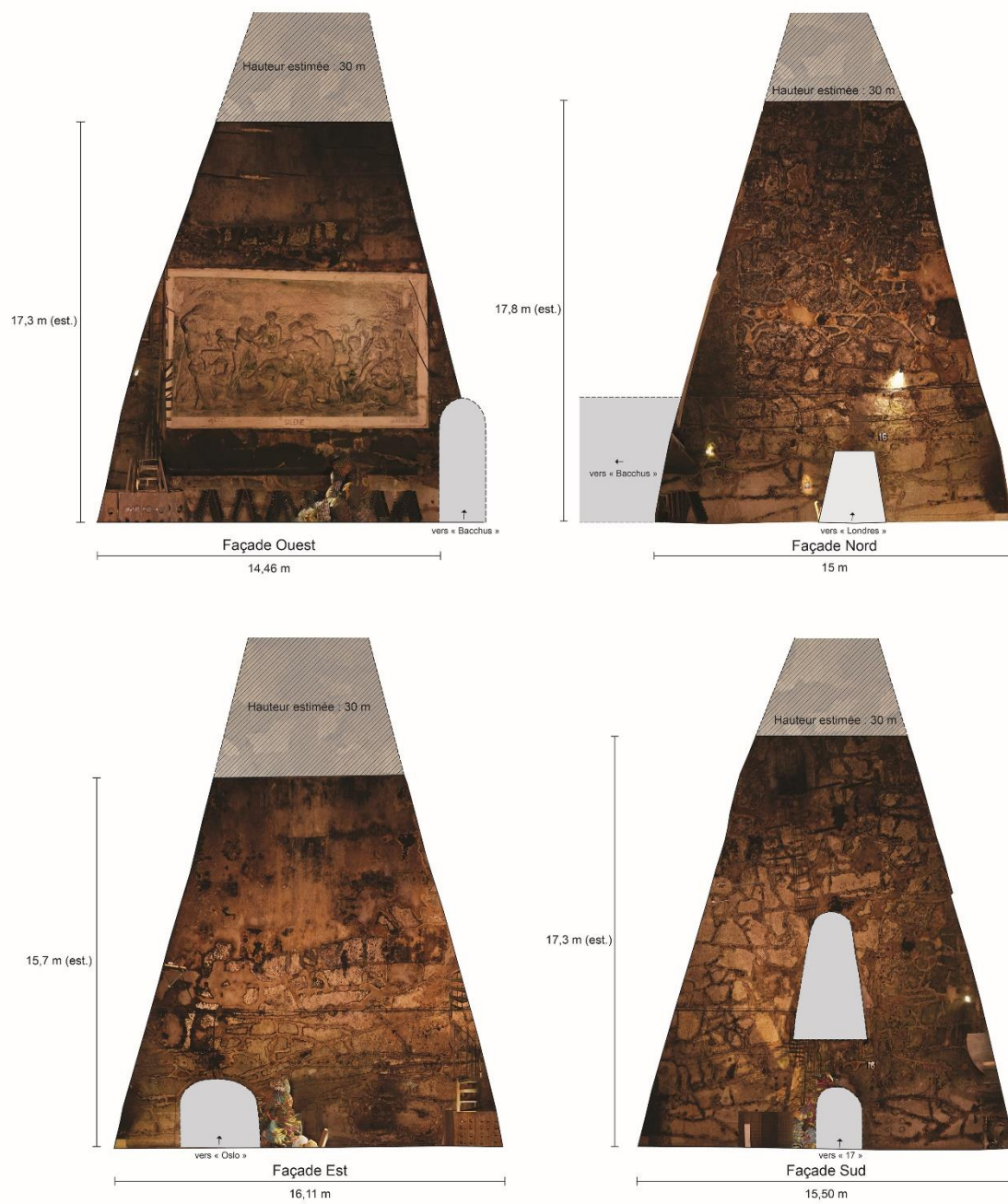


Figure 12 : Plan des façades de la cave 16 dite « Silène »

Cartographie des bas-reliefs et des biofilms

A partir des images orthomosaïques, les bas-reliefs peuvent être numérisés et mis à l'échelle (Figures 11 et 15). Un traitement d'image permettant de filtrer les couleurs permet ensuite de révéler le développement des biofilms sur ces œuvres (Figures 12 et 16), et de séparer les biofilms teintés de nuances de rouge (Figures 13 et 17), de ceux teintés de nuances de vert et de noir (Figures 14 et 18).

Ce travail permet de mettre en évidence la forte colonisation du biofilm rouge sur le bas-relief de Bacchus, tandis que le bas-relief de Silène est impacté principalement par les biofilms vert et noir.

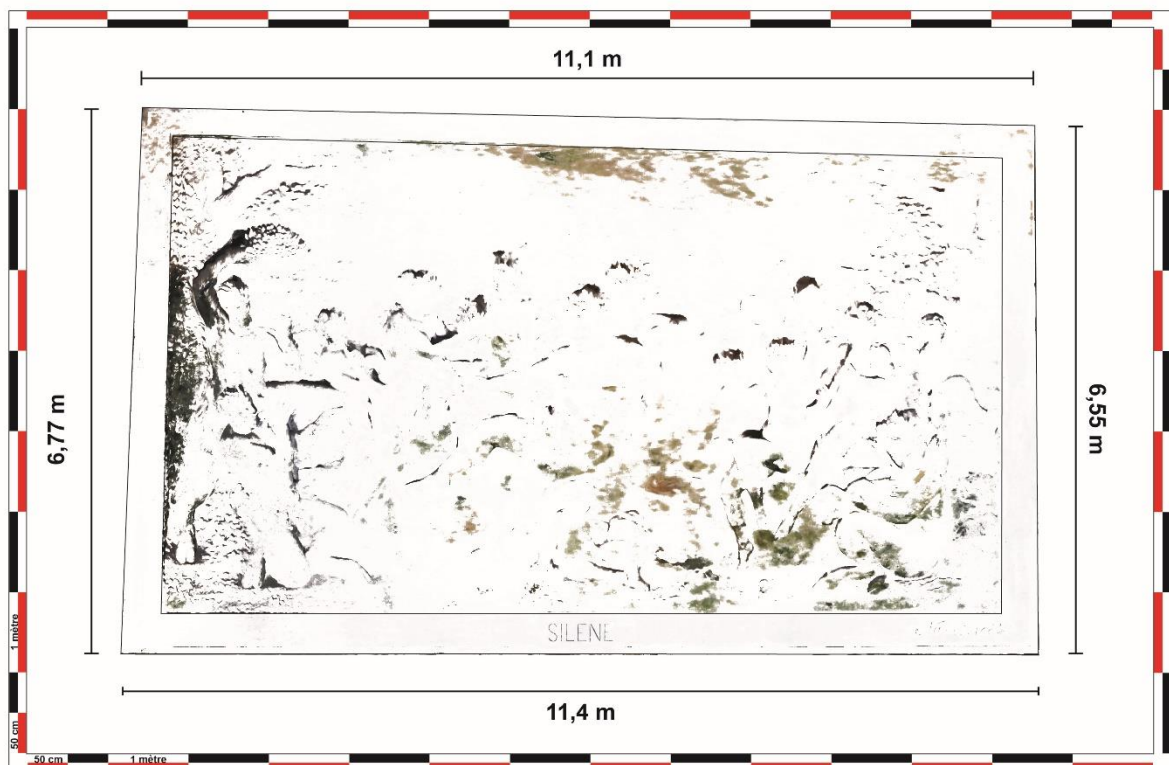
Dans l'ordre :

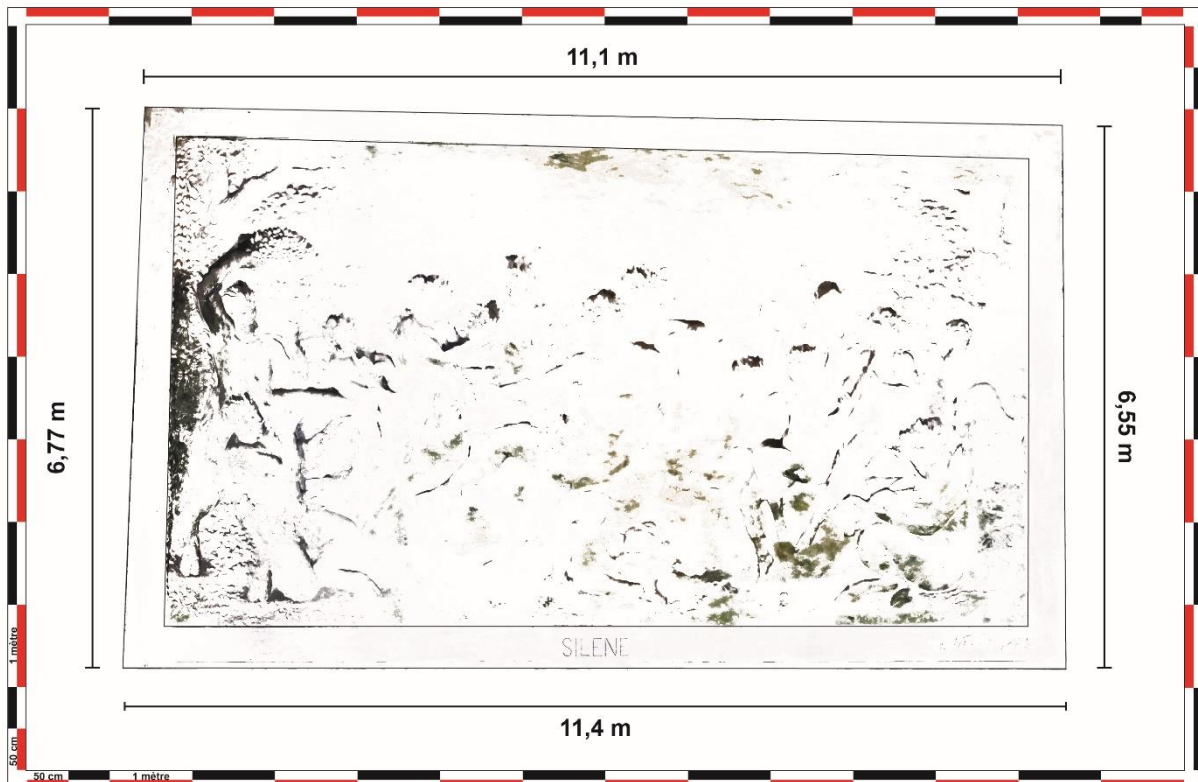
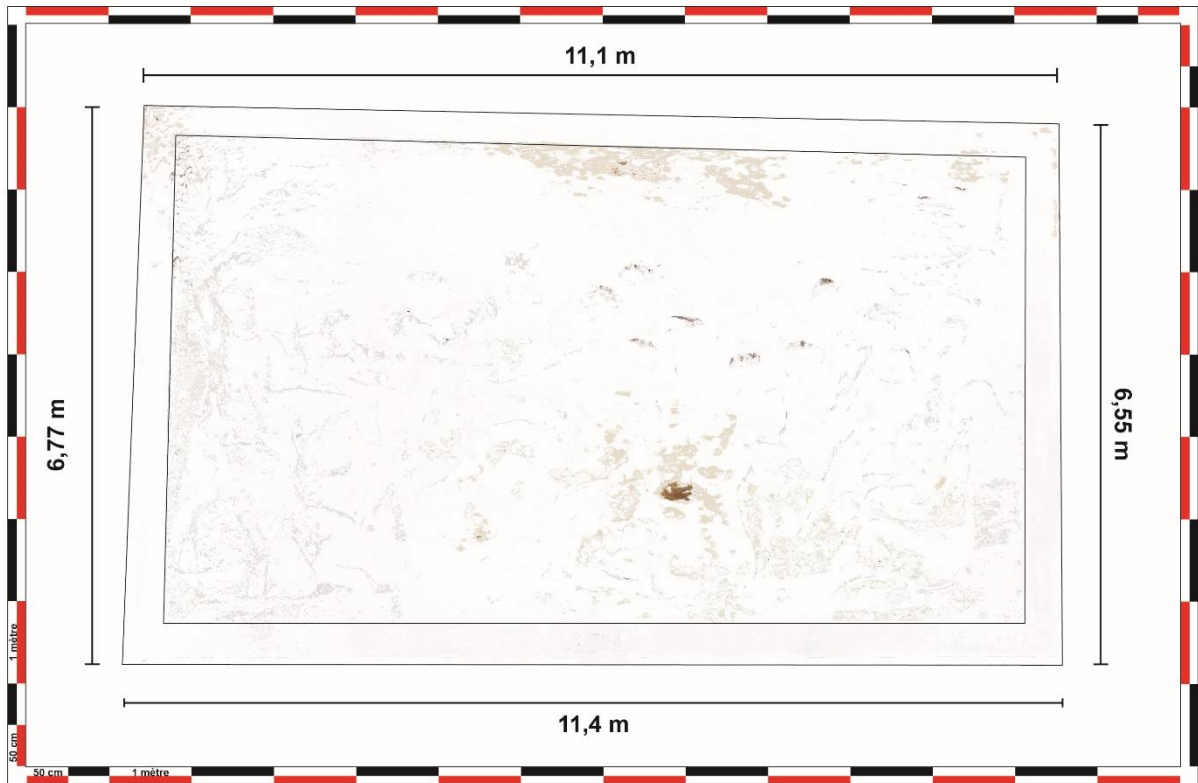
- *Bas-relief « Fête de Bacchus » :*
 - *Figure 13 : Orthomosaïque*
 - *Figure 14 : Orthomosaïque, carte des biofilms*
 - *Figure 15 : Orthomosaïque, carte des biofilms rouge*
 - *Figure 16 : Orthomosaïque, carte des biofilms vert et noir*

- *Bas-relief « Silène » :*
 - *Figure 17 : Orthomosaïque*
 - *Figure 18 : Orthomosaïque, carte des biofilms*
 - *Figure 19 : Orthomosaïque, carte des biofilms rouge*
 - *Figure 20 : Orthomosaïque, carte des biofilms vert et noir*









Codification des couleurs

Afin de quantifier la présence des biofilms sur les bas-reliefs, les couleurs des images des œuvres sont codifiées en 32 couleurs, permettant de distinguer les nuances de rouge, de vert ou de noir. Ce procédé implique une simplification de l'image, mais l'expérience montre qu'elle est toutefois d'une qualité satisfaisante pour le but recherché. Pour chaque couleur, un numéro de 0 à 31 est attribué (du plus sombre au plus clair), et le nombre de pixels est compté.

Bacchus

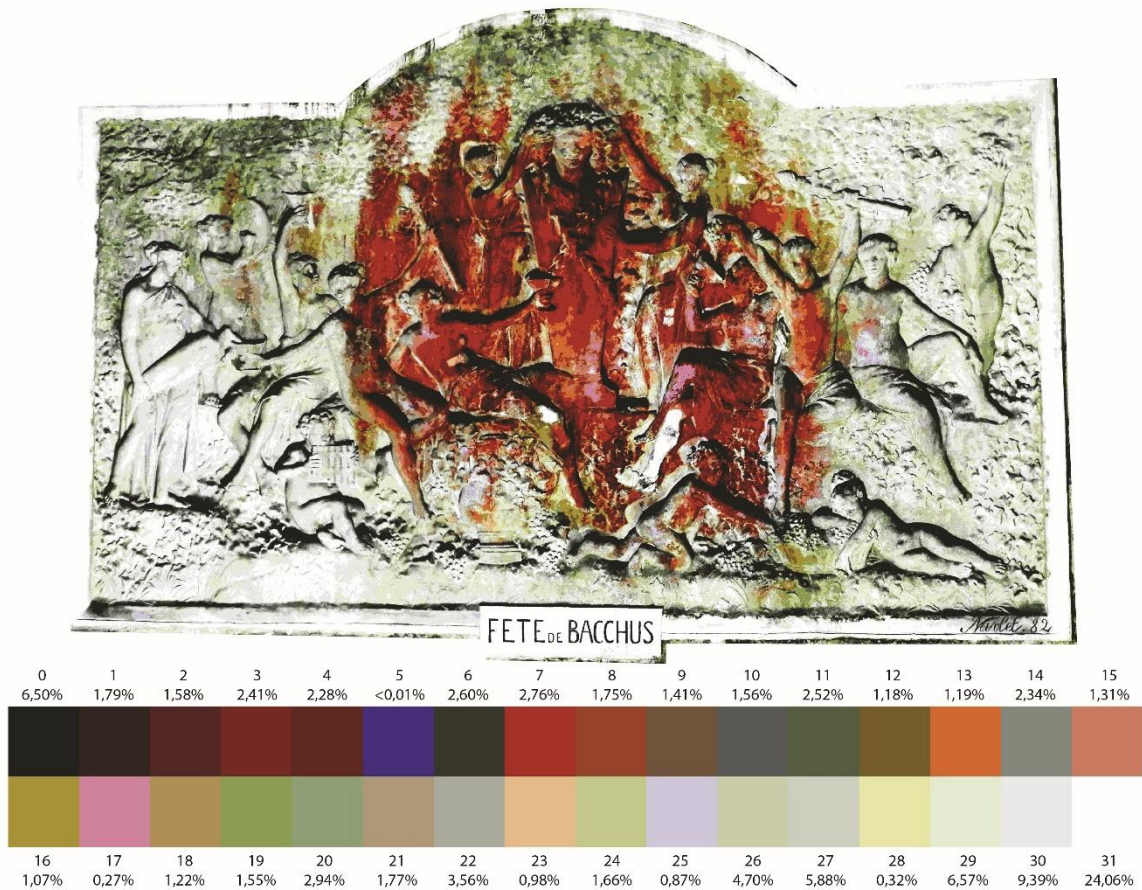


Figure 1 : Synthèse des couleurs

#	Code HTML	Nombre de pixels	Nombre de pixels/Nombre total de pixels de l'image (en %)	Nombre de pixels/Nombre total de pixels de l'image à l'exclusion des pixels extérieurs au cadre du bas-relief (en %)
Nombre total de pixels de l'image	/	15116352	/	/
Nombre de pixels extérieurs au cadre du bas-relief	/	2065568	/	/
Nombre total de pixels de l'image à l'exclusion des pixels extérieurs au cadre du bas-relief	/	13050784	/	/
Couleur 0	0f1210	982705	6,50%	7,53%
Couleur 1	301712	271170	1,79%	2,08%
Couleur 2	551717	238828	1,58%	1,83%
Couleur 3	810c00	364218	2,41%	2,79%
Couleur 4	661805	344301	2,28%	2,64%
Couleur 5	2522aa	271	<0,01%	0,00%
Couleur 6	2c3328	393771	2,60%	3,02%
Couleur 7	b41902	417208	2,76%	3,20%
Couleur 8	a34018	263976	1,75%	2,02%
Couleur 9	71543a	212608	1,41%	1,63%
Couleur 10	515c5f	236340	1,56%	1,81%
Couleur 11	506244	380180	2,52%	2,91%
Couleur 12	7a6017	178216	1,18%	1,37%
Couleur 13	d86a2d	179283	1,19%	1,37%
Couleur 14	818e88	354280	2,34%	2,71%
Couleur 15	d07d66	198687	1,31%	1,52%
Couleur 16	ab9836	162275	1,07%	1,24%
Couleur 17	ce85a6	40473	0,27%	0,31%
Couleur 18	b19558	184512	1,22%	1,41%
Couleur 19	8ba55b	233985	1,55%	1,79%
Couleur 20	8ca67f	443754	2,94%	3,40%
Couleur 21	ae9e80	267928	1,77%	2,05%
Couleur 22	a5b0a9	538070	3,56%	4,12%
Couleur 23	e5c191	147911	0,98%	1,13%
Couleur 24	c2ce93	251430	1,66%	1,93%
Couleur 25	c8cbdf	132069	0,87%	1,01%
Couleur 26	c8d0b3	710434	4,70%	5,44%
Couleur 27	c8d2c9	888710	5,88%	6,81%
Couleur 28	e6e7ae	48948	0,32%	0,38%
Couleur 29	e1e9d7	993443	6,57%	7,61%
Couleur 30	e4e9e9	1419811	9,39%	10,88%
Couleur 31	ffffff	3636557	24,06%	
Couleur 31 à l'exclusion des pixels extérieurs au cadre du bas-relief		1570989	10,39%	12%

Tableau 1 : Données de l'image

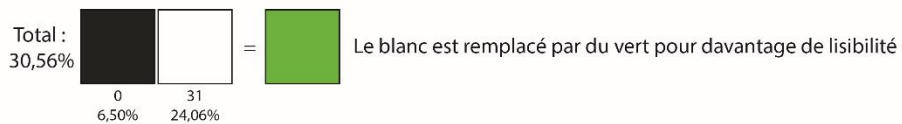
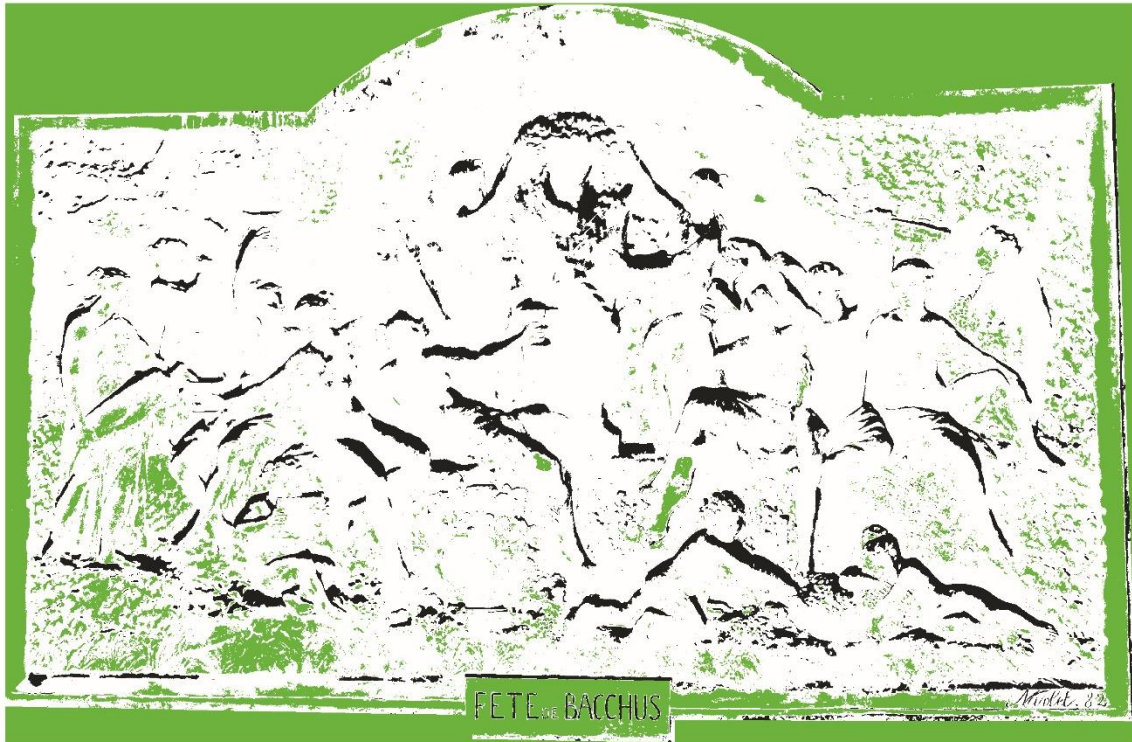


Figure 2 : Présence du Noir (0f1210) et du Blanc (ffffff) dans l'image.

Le noir comporte les zones d'ombre de l'image, tandis que le blanc englobe des zones non impactées par les biofilms, de la roche surexposée à la lumière, ou extérieures au bas-relief. Il est possible qu'une partie du noir comporte des zones impactées par les biofilms (biofilm BN), notamment dans la partie centrale de l'œuvre, aussi les calculs suivants prendront en compte ce noir dans la marge d'erreur.

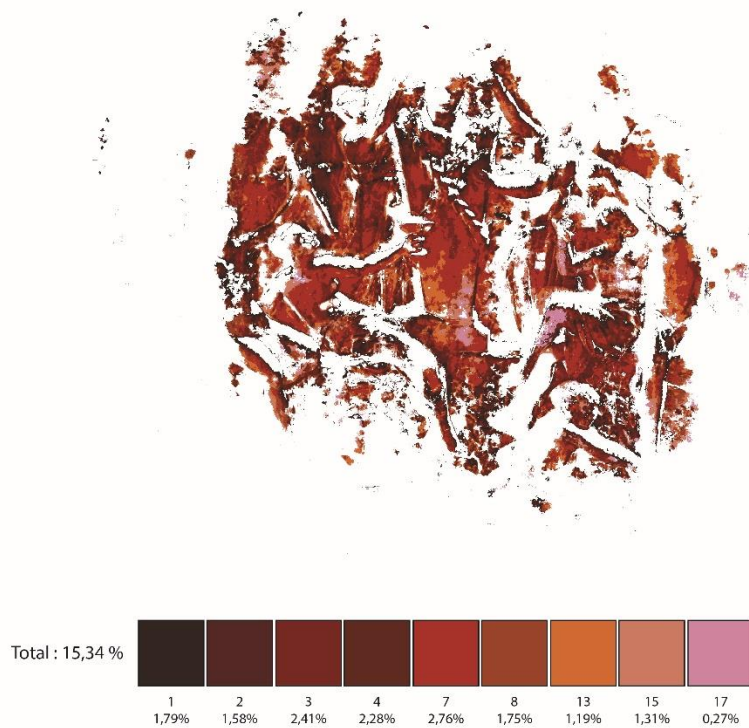


Figure 3 : Présence des nuances de rouge dans l'image.

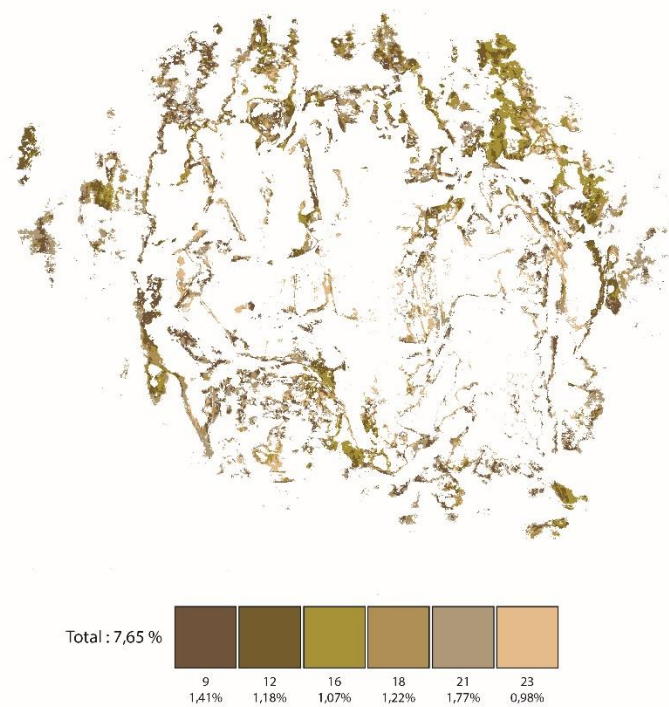


Figure 4 : Présence des nuances de marron dans l'image.

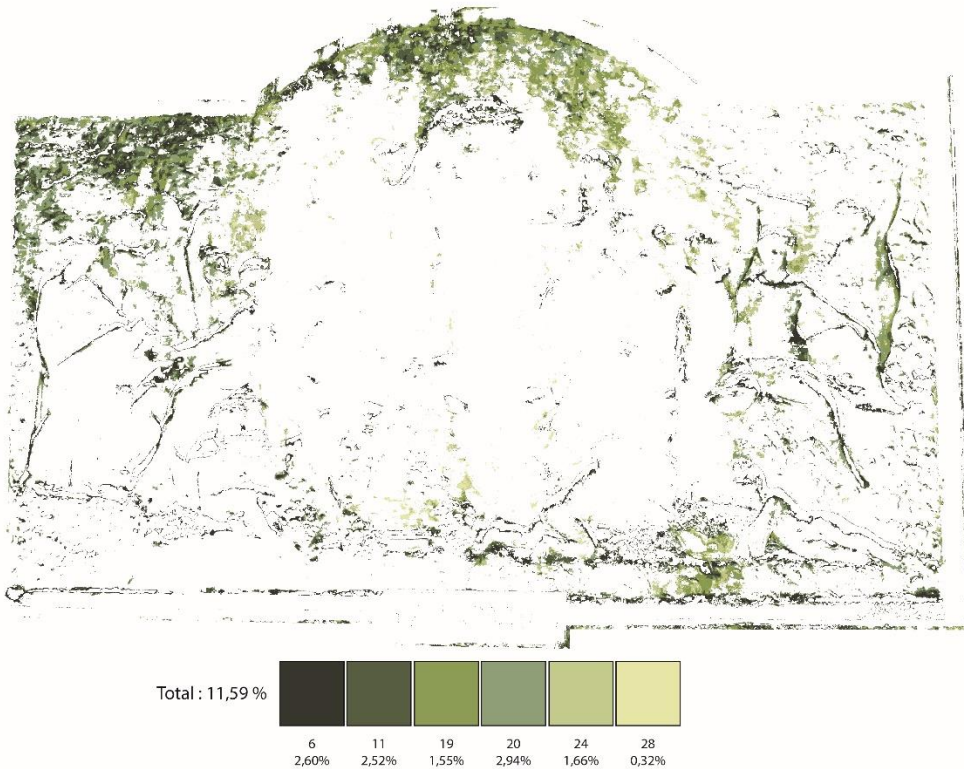


Figure 5 : Présence des nuances de vert dans l'image



Figure 6 : Présence des nuances restantes dans l'image.

	Nombre de pixels/Nombre total de pixels de l'image (en %)	Nombre de pixels/Nombre total de pixels de l'image à l'exclusion des pixels extérieurs au cadre du bas-relief (en %)
Noir	6,50%	7,53%
Blanc	24,06%	12,04%
Nuances de rouge	15,34%	17,76%
Nuances de marron	7,65%	8,84%
Nuances de vert	11,59%	13,43%
Nuances exclues	34,87%	40,41%
Nuances de rouge+marron	22,99%	26,60%
Nuances de rouge+noir	21,84%	25,29%
Nuances de rouge+marron+noir	29,49%	34,13%
Total rouge	[15,34% - 29,49%]	[17,76% - 34,13%]
Nuances de vert+marron	19,24%	22,27%
Nuances de vert+noir	18,09%	20,96%
Nuances de vert+marron+noir	25,74%	29,80%
Total vert	[11,59% - 25,74%]	[13,43% - 29,80%]
Total biofilms Hypothèse A (vert+rouge+marron)	34,58%	40,03%
Total biofilms Hypothèse B (vert+rouge+marron+noir)	41,08%	47,56%
Total biofilms	[34,58%-41,08%]	[40,03% - 47,56%]
<i>Hypothèse 1A : Dominance du rouge (marron associé, sans noir)</i>	22,99%R + 11,59%V	26,60%R + 13,43%V
<i>Hypothèse 1B : Dominance du rouge (marron et noir associés)</i>	29,49%R + 11,59%V	34,13%R + 13,43%V
<i>Hypothèse 1C : Dominance du rouge (marron associé, noir associé au vert)</i>	22,99%R + 18,09%V	26,60%R + 20,96%V
<i>Hypothèse 2A : Dominance du vert (marron associé)</i>	15,34%R + 19,24%V	17,76%R + 22,27%V
<i>Hypothèse 2B : Dominance du vert (marron et noir associés)</i>	15,34%R + 25,74%V	17,76%R + 29,80%V
<i>Hypothèse 2C : Marron associé au vert, noir associé au rouge</i>	21,84%R + 19,24%V	25,29%R + 22,27%V
<i>Hypothèse 3A : Equilibre (sans noir)</i>	17,29%R + 17,29%V	20,02%R + 20,02%V
<i>Hypothèse 3B : Equilibre</i>	20,54%R + 20,54%V	23,78%R + 23,78%V

Tableau 2 : tableau de synthèse

Afin d'émettre une analyse pertinente, il faut considérer que les zones en noir peuvent comprendre des zones impactées par des biofilms rouge ou vert (Hypothèses 1B, 1C, 2B, 2C, 3B), et des zones non impactées (Hypothèses 1A, 2A, 3A). Par ailleurs, les zones en marron sont bien associées à la présence de biofilms, mais doivent être attribuées soit à un biofilm rouge (Hypothèses 1), soit vert (Hypothèses 2), soit les deux (Hypothèse 3). D'autre part, seule l'exclusion des pixels blancs en dehors du cadre du bas-relief nous permet d'émettre une estimation de la surface des biofilms par rapport au bas-relief, et non par rapport à l'image.

Cette analyse permet d'émettre une hypothèse d'une surface du bas-relief impactée par les biofilms à 43,8% (+/- 3,77). Le biofilm rouge est présent à 25,95% (+/- 8,19) et le vert à 21,62% (+/- 8,19). L'hypothèse d'une dominance du rouge (Hypothèse 1) est crédible visuellement, ce qui indiquerait une surface impactée par le rouge à 30,37% (+/- 3,77), et par le biofilm vert à 17,2% (+/- 3,77).

Silène

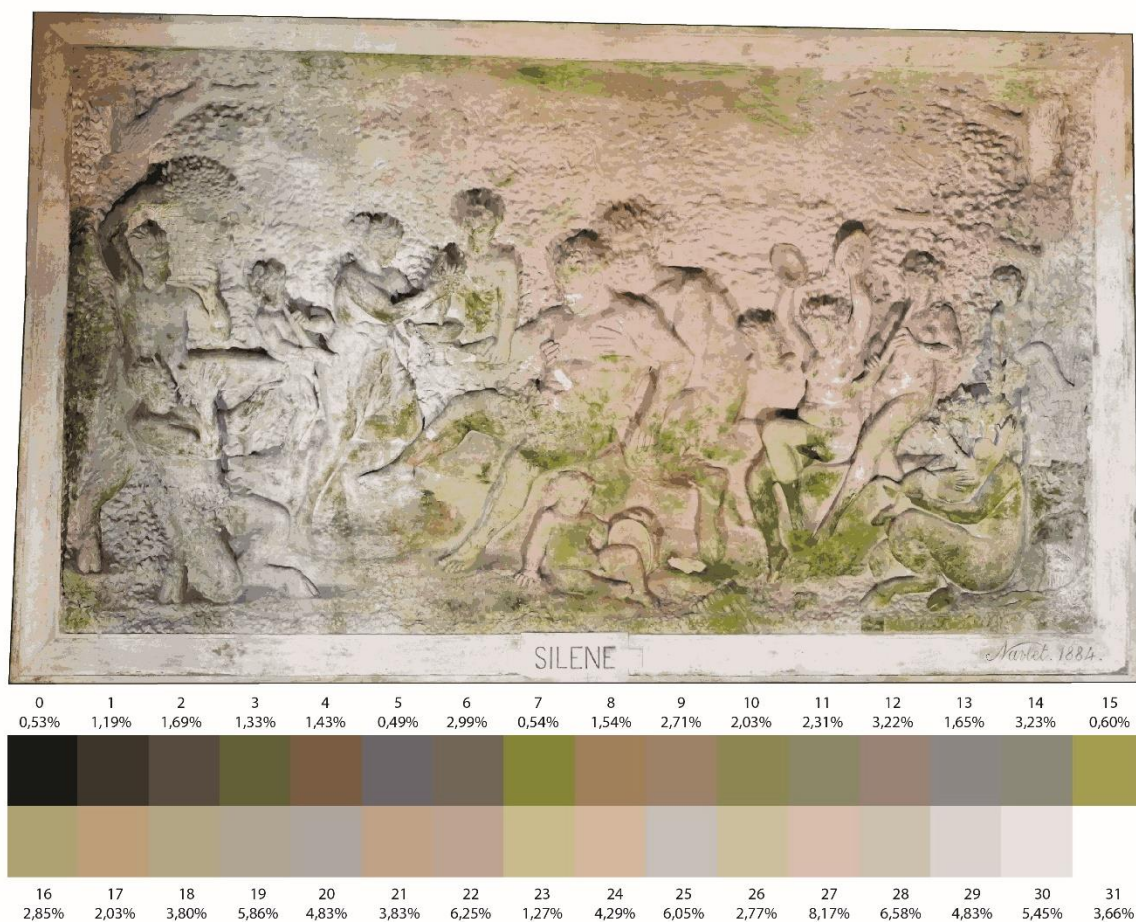


Figure 7 : Synthèse des couleurs

			Nombre de pixels/Nombre total de pixels de l'image (en %)	Nombre de pixels/Nombre total de pixels de l'image à l'exclusion des pixels extérieurs au cadre du bas-relief (en %)
Nombre total de pixels de l'image		3638784		
Nombre de pixels extérieurs au cadre du bas-relief		136933		
Nombre total de pixels de l'image à l'exclusion des pixels extérieurs au cadre du bas-relief		3501851		
Couleur 0	000000	19329	0,53%	0,55%
Couleur 1	352f25	43344	1,19%	1,24%
Couleur 2	514b42	61424	1,69%	1,75%
Couleur 3	626537	48500	1,33%	1,38%
Couleur 4	7d6043	51940	1,43%	1,48%
Couleur 5	666a75	17881	0,49%	0,51%
Couleur 6	716a5f	108968	2,99%	3,11%
Couleur 7	878ef37	19739	0,54%	0,56%
Couleur 8	a0855f	56069	1,54%	1,60%
Couleur 9	9d8770	98580	2,71%	2,82%
Couleur 10	8e8c58	74024	2,03%	2,11%
Couleur 11	8b8d6f	83960	2,31%	2,40%
Couleur 12	97887f	117298	3,22%	3,35%
Couleur 13	878c90	60041	1,65%	1,71%
Couleur 14	888e82	117403	3,23%	3,35%
Couleur 15	a6a555	21928	0,60%	0,63%
Couleur 16	afa979	103817	2,85%	2,96%
Couleur 17	bea480	73787	2,03%	2,11%
Couleur 18	b1ab8f	138205	3,80%	3,95%
Couleur 19	abac9e	213166	5,86%	6,09%
Couleur 20	a8acab	175747	4,83%	5,02%
Couleur 21	c0a890	139224	3,83%	3,98%
Couleur 22	bda89c	227248	6,25%	6,49%
Couleur 23	cac297	46283	1,27%	1,32%
Couleur 24	d5bea7	156227	4,29%	4,46%
Couleur 25	c1c4c3	220314	6,05%	6,29%
Couleur 26	ccc5a8	100749	2,77%	2,88%
Couleur 27	d8c2b7	297107	8,17%	8,48%
Couleur 28	c9c7ba	239396	6,58%	6,84%
Couleur 29	d4d5d5	175591	4,83%	5,01%
Couleur 30	e3e2e3	198425	5,45%	5,67%
Couleur 31	ffffff	133070	3,66%	/

Tableau 3 : Données de l'image

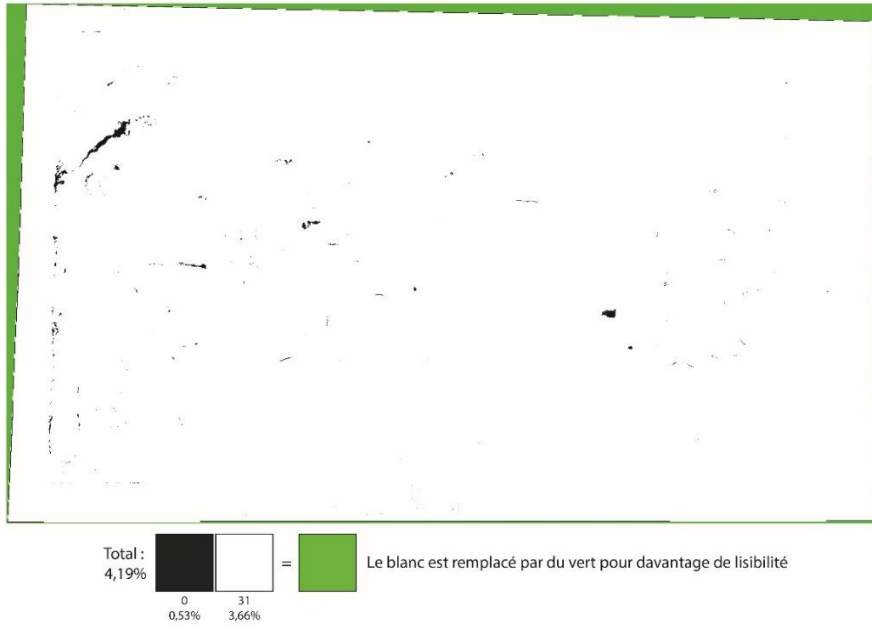


Figure 8 : Présence de noir et du blanc dans l'image.

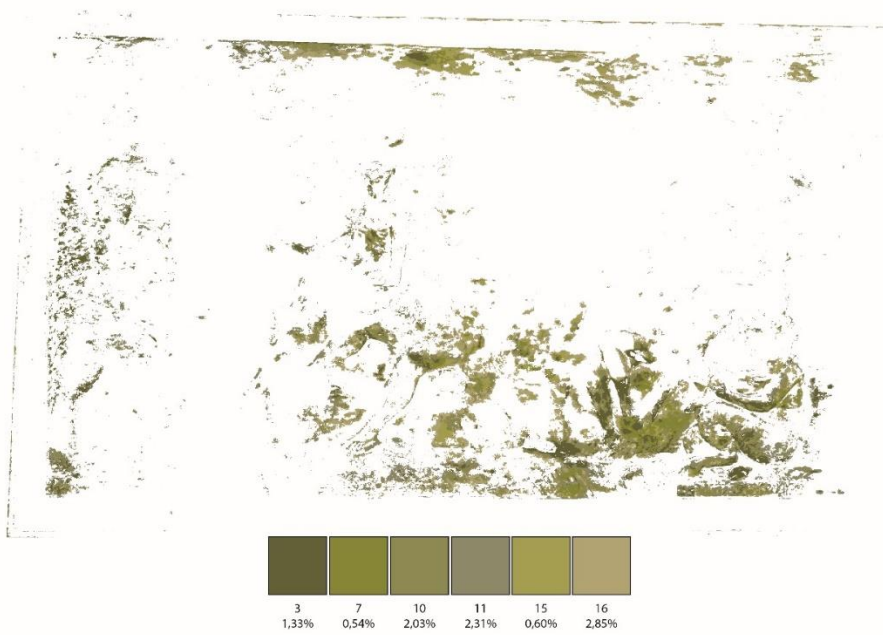


Figure 9 : Présence des nuances de vert dans l'image

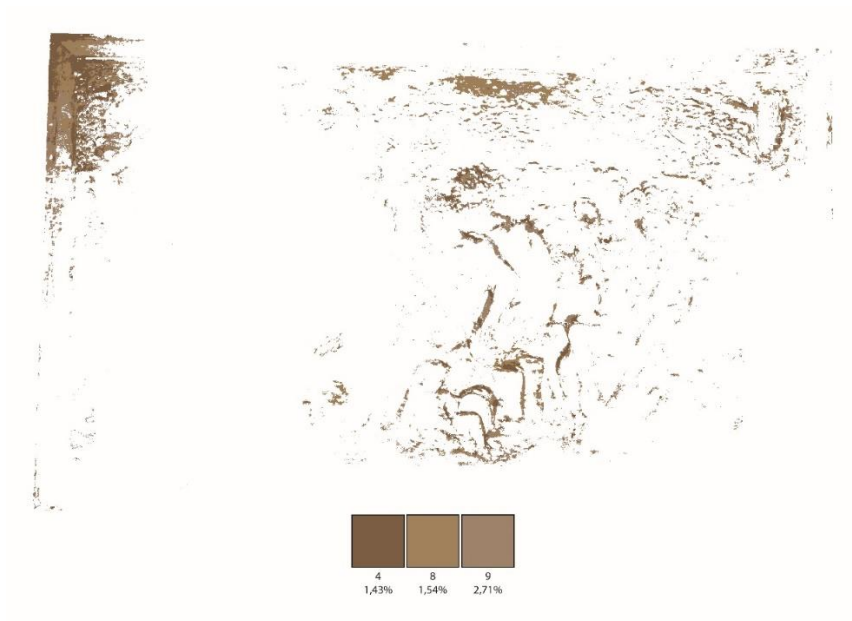


Figure 10 : Présence des nuances de rouge dans l'image

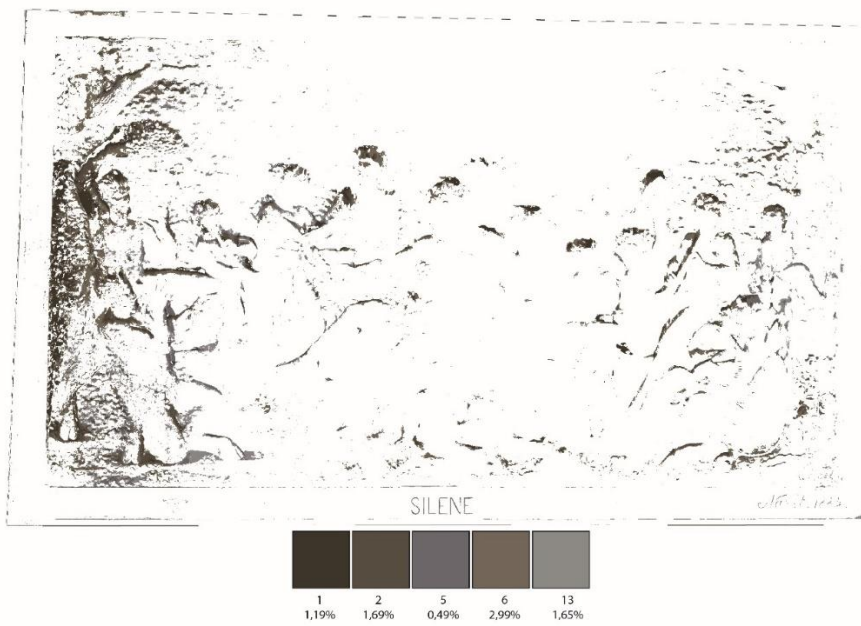


Figure 11 : Présence des nuances de gris dans l'image.

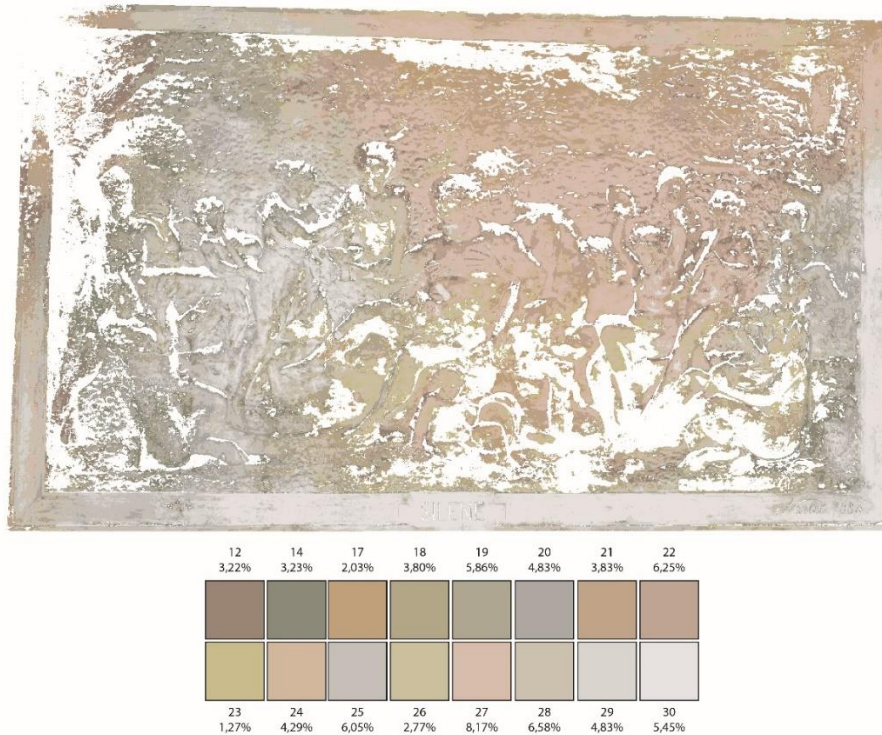


Figure 12 : Présence des nuances restantes dans l'image.

	Nombre de pixels/Nombre total de pixels de l'image (en %)	Nombre de pixels/Nombre total de pixels de l'image à l'exclusion des pixels extérieurs au cadre du bas-relief (en %)
Noir	0,53%	0,55%
Blanc	3,66%	3,80%
Nuances de rouge	5,68%	5,9%
Nuances de vert	9,66%	10,05%
Nuances de gris	8,01%	8,33%
Nuances exclues	72,46%	75,28%
Nuances de gris+noir	8,54%	8,88%
Total gris	[8,01% - 8,54%]	[8,33% - 8,88%]
Total biofilms Hypothèse A (rouge+vert+gris)	23,35%	24,28%
Total biofilms Hypothèse B (rouge+vert+gris+noir)	23,88%	24,83%
Total biofilms	[23,35% - 23,88%]	[24,28% - 24,83%]

Le bas-relief de Silène est impacté à 24,56 % (+/- 0,27) par les biofilms, à 5,9% par le biofilm marron, à 10,05% par le biofilm vert et à 8,61% (+/- 0,27) par le biofilm noir (vert foncé).

Bibliographie

Arles A., Busdraghi F., Guyot J. et Heckes J. (2011), *La photogrammétrie appliquée à l'archéologie minière : premiers essais*, Centre Ernest Babelon, Orléans, 25 p.

Agisoft (2021), *Agisoft Metashape User Manual: Professional Edition, Version 1.7*