



**HAL**  
open science

# Brunissement des vitraux médiévaux : approche biogéochimique pour la compréhension d'un phénomène d'altération complexe

Valentina Valbi

## ► To cite this version:

Valentina Valbi. Brunissement des vitraux médiévaux : approche biogéochimique pour la compréhension d'un phénomène d'altération complexe. Matériaux. Université Paris-Est, 2020. Français. NNT : 2020PESC2040 . tel-03337161

**HAL Id: tel-03337161**

**<https://theses.hal.science/tel-03337161>**

Submitted on 7 Sep 2021

**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.



UNIVERSITE PARIS-EST

*Ecole Doctorale*

*Sciences, Ingénierie et Environnement*

---

Thèse de doctorat en Géomatériaux

Présentée par

**Valentina VALBI**

le 09 décembre 2020

---

**Le brunissement des vitraux médiévaux:  
approche biogéochimique  
pour la compréhension d'un phénomène  
d'altération complexe**

---

#### COMPOSITION DU JURY

Céline Rommevaux.....Rapportrice  
Stéphane Gin.....Rapporteur  
Odile Majérus.....Examinatrice  
François Guyot.....Président du jury  
Bruno Lanson.....Examineur  
Claudine Loisel.....Examinatrice  
Stéphanie Rossano.....Directrice de thèse  
Aurélie Verney-Carron.....Co-encadrante



UNIVERSITÉ PARIS-EST

École doctorale Sciences, Ingénierie et Environnement

Thèse de doctorat en Géomatériaux

présentée par

**Valentina VALBI**

le 09 décembre 2020

**Le brunissement des vitraux médiévaux :  
approche biogéochimique pour la compréhension d'un  
phénomène d'altération complexe**

effectuée

au Laboratoire Géomatériaux et Environnement (LGE)

en collaboration avec

le Laboratoire Interuniversitaire des Systèmes Atmosphériques (LISA)

et le Laboratoire de Recherche des Monuments Historiques (LRMH)

**ÉCOLE DOCTORALE** UNIVERSITÉ PARIS-EST  
Sciences, Ingénierie et Environnement





# Remerciements

Mes remerciements vont d'abord aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon manuscrit et pour avoir rendu la soutenance un lieu d'échange scientifique si agréable et apprécié en ce moment de pandémie et isolement. Notamment merci aux rapporteurs Céline Rommevaux et Stéphane Gin, deux spécialistes qui ont dû évaluer le travail d'une non-spécialiste qui s'aventure dans leurs domaines. Merci à Odile Majérus pour son regard externe et son support à distance toujours présent. Enfin, merci à François Guyot et Bruno Lanson pour les discussions enrichissantes.

Un énorme merci va à mes directrices de thèse. Stéphanie Rossano et Aurélie Verney-Carron sont des superbes scientifiques et des merveilleux êtres humains. Ce que j'ai appris grâce à vous pendant ces années je vais le garder avec moi pour toute ma vie, que ça soit la rigueur scientifique ou la capacité de soutenir ses proches avec gentillesse et bienveillance. Vous êtes source de grande inspiration.

Je n'ai pas de mots pour remercier Anne Perez, une co-encadrante devenue amie qui a été une guide dans ma vie de tous les jours. Nos discussions scientifiques m'ont aidé à faire évoluer mes interprétations des données, nos interactions personnelles m'ont amené à évoluer en tant que personne. Merci pour ton accompagnement, ton support et tes relectures.

Je remercie Claudine Loisel et Barbara Trichereau du pôle vitrail du LRMH pour leur écoute, leur disponibilité et leur bonne humeur. Les souvenirs les plus aventureux de ma thèse seront liés à elles et aux excursions sur les échafaudages des chantiers de restauration d'églises et chapelles ornés de vitraux magnifiques, des activités courantes pour elles mais absolument extraordinaires pour moi.

Je tiens à remercier Johann Leplat, Alexandre François et Faisal Bousta du pôle microbiologie du LRMH, pour avoir accepté de travailler avec moi et pour m'avoir accompagné à la découverte de ce monde fascinant qui est la microbiologie. Avant eux, cette tâche ardue avait été initiée par Carolina pendant son passage au LGE, merci à elle également pour m'avoir lancée dans les cultures bactériennes.

Une pensée chaleureuse va à Chloé Ranchoux, stagiaire passionnée et super coéquipière.

Je tiens encore à remercier Chloé Fourdrin, Yoan Pechaud, Théo Isigkeit et tous les autres membres du LGE, qui rendent ce (pas si) petit laboratoire un endroit magnifique où travailler. Merci pour votre aide, pour les échanges scientifiques qu'on a pu avoir, et surtout merci pour la super ambiance. Vous me manquez déjà. D'ailleurs je remercie tous les doctorants et ATER avec qui j'ai partagé cette expérience et nombreux apéro. Qui en début et qui en fin de thèse, vous avez tous apporté une pièce importante au puzzle de souvenirs de ces trois belles années : Florian, Douglas, Jules, Hélène, Camille, Julie, Baptiste, Loryelle.

Un remerciement plein de gratitude va à Max Wilke pour m'avoir accueillie au Département de Sciences de la Terre de Potsdam, ainsi qu'à Christina Guenter pour m'avoir donné accès au MEB et à la microsonde pendant mon séjour, à Martin Ziemann pour le temps qu'il m'a dédié et son intérêt dans mon sujet. Je remercie également Anja Schreiber pour ses magnifiques coupes FIB et pour sa douceur, et Vladimir Roddatis pour les analyses MET et METB. Pour manque d'espace je ne vais pas nommer tous les doctorants de Potsdam mais je les remercie avec tout mon cœur de m'avoir accueillie comme une de famille pendant mes quelques mois de permanence.

Je souhaite remercier également les chercheurs avec qui j'ai croisé le chemin pendant ces années et grâce auxquels j'ai toujours appris quelque-chose : Nicolas Trcera pour les discussions enrichissantes et le support pendant notre passage au synchrotron, Michel Fialin et Nicolas Rividi pour les analyses microsonde, Cyril Vaultot pour les analyses BET.

Enfin, merci à l'équipe pédagogique de l'IFI pour m'avoir fait découvrir les joies et les peines de l'enseignement.

J'ai eu la chance pendant ces années de pouvoir travailler à un projet de communication scientifique pour la production d'une vidéo d'animation sur mon sujet de thèse (*lien ici*), merci à l'équipe du DIM-MAP et à Karim de BigBangScience Communication pour l'avoir rendu possible.

Je remercie ma petite famille parisienne de danseurs de cette drogue qu'on appelle le *balfolk* : Estelle, Alexandra, Anna, Romain, Maëlle, Arnaud, Stéphanie, Stéphanie, Ilaria et tous les autres, vous avez été étonnamment toujours très intéressés par l'avancée de mes recherches et vous m'avez soutenu au mieux grâce à nos soirées et nos escapades dansantes. Un grand merci aux *amici di sempre* Susanna, Fabio, Margherita, Enrica, Flavio, qui m'ont supporté à distance, parfois sans même s'en rendre compte. Je ne sais pas où mettre ces amis qui ont fait partie de différentes phases de ma vie autour de l'Europe, merci Fanny, Claudia, Marco pour m'avoir toujours inspirée et rassurée pendant ces dernières années.

Pour conclure, des remerciements profonds vont à mes parents, toujours très fiers de mes choix malgré la distance imposée par ces mêmes choix. Et puis je ne peux pas oublier Alessandro, capable d'être à mes côtés depuis des années, sans être géographiquement à côté de moi.

# Résumé

Le phénomène de brunissement est une pathologie affectant les vitraux du Moyen-Age de composition silico-calco-potassique contenant du Mn. Il se traduit par l'apparition, en surface du verre, de taches brunes riches en Mn, qui entraînent une perte de transmission de la lumière et de lisibilité de l'œuvre. Des travaux antérieurs ont montré que ce brunissement est lié à l'oxydation du Mn qui passe de la forme  $\text{Mn}^{2+}$ / $3+$  dans le verre sain à  $\text{Mn}^{3+}$ / $4+$  dans les zones altérées. Cependant, les différentes étapes qui conduisent à la formation localisée de phases brunes, ainsi que le rôle potentiel des microorganismes dans l'apparition de la pathologie restent encore à déterminer. Une compréhension plus poussée de ce phénomène permettrait en effet d'envisager des traitements de conservation plus adaptés.

Dans cette étude, l'identification par séquençage ADN des microorganismes cultivables présents sur trois sites de vitraux in situ a été réalisée. Les résultats indiquent que des populations riches et variées de microorganismes sont rencontrées sur ces vitraux.

Ensuite, afin d'étudier de manière ciblée la contribution microbiologique lors des différentes étapes de formation du brunissement, une approche mécanistique en deux étapes a été adoptée grâce à des expériences d'altération de deux verres modèles (verre VM avec Mn et verre VNM sans Mn).

Tout d'abord, la dissolution du verre et le relâchement du Mn en solution ont été étudiés de façon abiotique (dans une solution d'EUP tamponnée et en milieu de culture stérile), biotique indirecte (en présence d'exsudats microbiens) et biotique directe (en présence de la souche modèle *Pseudomonas putida*). Les analyses des solutions révèlent que les cinétiques et la stœchiométrie de dissolution du verre sont influencées par la présence des exsudats et des cellules bactériennes. Les deux exsudats testés (acide oxalique et sidérophore DFOB) ont des effets différents sur la dissolution du verre dépendant de leurs capacités complexantes. Le verre VM est plus durable que VNM en EUP, mais au contraire il est plus impacté par la présence de ces ligands à cause de la complexation du Mn. Le Mn semble donc revêtir un rôle clé dans l'interaction indirecte verre-bactérie. En présence de *P. putida*, la stœchiométrie de dissolution du verre est principalement affectée par la production d'un sidérophore, la pyoverdine (PVD) qui complexe le Mn et enclenche le processus d'oxydation menant à la formation d'un biofilm contenant des oxydes de Mn. Réciproquement, le comportement des bactéries (croissance bactérienne, production de PVD et oxydation de Mn) est impacté par l'accès aux éléments du verre.

Ensuite, la mobilité du Mn au sein de la couche d'altération et sa capacité de formation de phases brunes par voie abiotique (par expériences d'imbibition de verre altéré avec une solution riche en Mn) et biotique (par croissance de biofilm de *Pseudomonas putida* en surface du verre) a été étudiée. Des phases brunes ont été obtenues par voie abiotique et biotique et caractérisées par microscopie optique et électronique (MEB, MET) et par



microsonde électronique. Dans les deux cas, elles présentent des caractéristiques physico-chimiques (enrichissement en Mn, caractère amorphe) similaires aux phases identifiées sur des vitraux anciens.

La combinaison des résultats obtenus au cours de ces différentes tâches a finalement permis de formuler différentes hypothèses, impliquant ou non des microorganismes, sur les mécanismes responsables de l'apparition du brunissement.

**Mots clés :** vitraux, altération, manganèse, microorganismes

# Abstract

The browning phenomenon is a pathology typical of medieval stained-glass windows of potash-lime-silica composition containing Mn. It is caused by the formation of Mn-rich brown spots at the glass surface that prevent light transmission. Previous works showed that the browning is linked to the oxidation of Mn from  $\text{Mn}^{2+/3+}$  in the pristine glass to  $\text{Mn}^{3+/4+}$  in the altered brown phases. This phenomenon is not understood yet, some studies suggested that Mn migration to the surface, oxidation and/or precipitation might be linked to biological activity. A better understanding of the phenomenon could allow the development of more targeted conservation treatments.

In this study, microbiological samples were collected in situ on stained-glass windows and the cultivated microorganisms were identified. The DNA sequencing of the cultivable collected bacteria showed rich and diversified bacterial communities on in situ stained-glasses.

Then, in order to improve the understanding of this phenomenon and investigate the implication of microorganisms, a mechanistic approach based on two main research axis was chosen and weathering experiments of model glasses (VM for glass with Mn and VNM for glass without Mn) representative of medieval stained glasses were designed.

Firstly, glass dissolution and Mn leaching were studied in abiotic experiments (in buffered UPW solution and in sterile culture media), in biotic indirect (in presence of microbial exudates) and biotic direct (in presence of the model strain *Pseudomonas putida*) conditions. The analysis of the leachates showed that the stoichiometry and kinetics of glass dissolution were influenced by the presence of exudates and bacterial cells. The two studied exudates (oxalic acid and the siderophore DFOB) have different effects on glass dissolution, depending on their complexing abilities. The VM glass is more resistant to alteration in UPW when compared to VNM, but it is more significantly affected by the presence of organic ligands because of the complexation of Mn. Therefore, Mn seems to have a key role in the indirect interaction glass-bacteria. In presence of *P. putida*, the dissolution stoichiometry is mainly affected by the production of the pyoverdine (PVD) siderophore that forms a complex with Mn and starts the oxidation process that leads to the production of biofilm including Mn oxides. Bacterial behavior (bacterial growth, PVD production and Mn oxidation) is mutually affected by the access of the bacteria cells to the glass elements.

Secondly, Mn mobility through the alteration layer and its capability to form brown phases at the surface of the glass were investigated in abiotic (by imbibition experiments of Mn-rich solution on altered glass samples) and biotic (by biofilm growth of *Pseudomonas putida* on glass surface) conditions. Brown phases at the surface of the glass were obtained via abiotic and biotic experiments and were characterized by optical and electronic (SEM, TEM) microscopy, and microprobe analysis. Both the abiotic and the biotic brown phases

have common characteristics (Mn enrichment, amorphous state) with the brown phases identified on historical stained-glass samples.

The confrontation of the results obtained during the different steps allowed to formulate several hypotheses about abiotic and biotic mechanisms leading to the browning of medieval stained-glass windows.

**Keywords :** stained-glass, alteration, manganese, microorganisms

# Liste des abréviations

Au cours de ce manuscrit, plusieurs abréviations sont utilisées, d'origine française ou anglaise. Les plus importantes sont reportées par la suite en ordre alphabétique

ADN : acide désoxyribonucléique

AO : acide oxalique

BisTris : 2-[Bis(2-hydroxyethyl)amino]-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol

CFU : colony forming units

DFOB : desferrioxiamine B

DO : densité optique

EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique

FIB : focused ion beam

EUP : eau ultrapure

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HR : humidité relative

ICP-OES : inductively coupled plasma - optical emission spectroscopy

LB : Lisogen Broth

MEB : microscopie électronique à balayage

MET : microscopie électronique en transmission

METB : microscopie électronique en transmission à balayage

MO : microscopie optique

NBO/T : non bridging oxygens/tetrahedra

NLs : pertes de masse normalisées

PDA : potato dextrose agar

PVD : pyoverdine

XAS : X-ray absorption spectroscopy



# Table des matières

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Introduction générale</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1 État de l'art</b>  | <b>5</b>  |
| 1.1 Structure et composition du verre . . . . .   | 5         |
| 1.2 L'altération du verre . . . . .   | 8         |
| 1.2.1 Altération en conditions saturées . . . . .   | 8         |
| 1.2.2 Altération en conditions insaturées . . . . .   | 13        |
| 1.2.3 Le cas des vitraux . . . . .  | 15        |
| 1.3 Le brunissement . . . . .   | 16        |
| 1.4 La bioaltération . . . . .  | 18        |
| 1.5 Le manganèse . . . . .  | 21        |
| 1.6 Conclusions . . . . .   | 24        |
| <b>2 Matériels et Méthodes</b>  | <b>25</b> |
| 2.1 Prélèvement et identification de microorganismes sur vitraux . . . . .  | 25        |
| 2.1.1 Les sites et points de prélèvement . . . . .  | 26        |
| 2.1.2 Méthodes de prélèvement et mise en culture de microorganismes . .   | 32        |
| 2.1.3 Identification des bactéries par extraction et séquençage de l'ADN .  | 33        |
| 2.1.4 Identification des champignons par observations microscopiques . .  | 38        |
| 2.2 Synthèse et mise en forme du verre modèle . . . . .   | 39        |
| 2.2.1 Protocole de synthèse . . . . .   | 39        |
| 2.2.2 Contrôle des compositions et caractérisation du verre . . . . .   | 40        |
| 2.2.3 Mise en forme et caractérisation des échantillons . . . . .   | 43        |
| 2.3 Tests de dissolution . . . . .  | 48        |
| 2.3.1 Tests de dissolution biotique indirecte en solution d'eau ultrapure<br>(EUP) . . . . .                                | 48        |
| 2.3.2 Tests de dissolution biotique directe en milieu de culture . . . . .  | 50        |
| 2.3.3 Analyse des solutions . . . . .   | 52        |
| 2.4 Tests de reproduction des phases brunes . . . . .   | 55        |
| 2.4.1 Reproduction des phases brunes de façon abiotique : tests d'imbibition  | 55        |
| 2.4.2 Reproduction des phases brune de façon biotique : tests de crois-<br>sance de biofilm à la surface de verre . . . . . | 58        |
| <b>3 Identification de micro-organismes présents sur les vitraux</b>  | <b>61</b> |
| 3.1 Bactéries identifiées . . . . .   | 62        |
| 3.1.1 Analyse phylogénétique . . . . .  | 68        |
| 3.1.2 Étude de la diversité entre les échantillons . . . . .  | 70        |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 3.2      | Champignons identifiés . . . . .  | 73         |
| 3.3      | Discussion . . . . .  | 74         |
| 3.4      | Conclusions . . . . .   | 80         |
| <b>4</b> | <b>Cinétiques d'altération du verre en présence d'exsudats microbiens</b>                             | <b>83</b>  |
| 4.1      | Choix du tampon . . . . .   | 84         |
| 4.1.1    | Résultats . . . . .   | 84         |
| 4.1.2    | Discussion et conclusions sur le choix du tampon . . . . .  | 88         |
| 4.2      | Dissolution en présence d'acide oxalique et de DFOB . . . . .   | 90         |
| 4.2.1    | Résultats . . . . .   | 90         |
| 4.2.2    | Discussion . . . . .  | 106        |
| 4.3      | Tests complémentaires : dissolution en présence d'AO et de DFOB en tampon HEPES . . . . .             | 115        |
| 4.4      | Conclusions . . . . .   | 117        |
| <b>5</b> | <b>Cinétiques d'altération du verre en présence d'une bactérie modèle</b>                             | <b>119</b> |
| 5.1      | Variations chromatiques . . . . .   | 120        |
| 5.2      | Croissance bactérienne . . . . .  | 127        |
| 5.3      | Production de pyoverdine . . . . .  | 129        |
| 5.4      | Masse et composition des culots bactériens . . . . .  | 131        |
| 5.5      | Analyse des solutions altérantes . . . . .  | 136        |
| 5.6      | Discussion . . . . .  | 146        |
| 5.6.1    | Impact du verre sur le comportement bactérien . . . . .   | 146        |
| 5.6.2    | Impact des bactéries sur la dissolution du verre . . . . .  | 150        |
| 5.7      | Conclusions . . . . .   | 153        |
| <b>6</b> | <b>Formation des phases brunes</b>  | <b>155</b> |
| 6.1      | Formation de phases brunes d'origine abiotique : tests d'imbibition . . . . .                         | 155        |
| 6.1.1    | Observations en microscopie optique . . . . .   | 155        |
| 6.1.2    | Observations au MEB . . . . .   | 157        |
| 6.1.3    | Analyse à la microsonde électronique . . . . .  | 164        |
| 6.1.4    | Observations au METB et étude de cristallinité au MET . . . . .                                       | 167        |
| 6.1.5    | Discussion . . . . .  | 169        |
| 6.2      | Formation de phases brunes d'origine biotique : croissance de biofilm à la surface de verre . . . . . | 175        |
| 6.3      | Conclusions . . . . .   | 181        |
| <b>7</b> | <b>Discussion générale et perspectives</b>  | <b>183</b> |
| 7.1      | Résumé des résultats obtenus . . . . .  | 183        |
| 7.2      | Retour sur la méthodologie expérimentale . . . . .  | 187        |
| 7.3      | Effet de la présence de Mn sur la durabilité d'un verre silicaté calco-potassique                     | 190        |
| 7.4      | Compréhension du phénomène de brunissement des vitraux médiévaux ? . . . . .                          | 192        |
| 7.5      | Perspectives . . . . .  | 195        |
| 7.6      | Conclusions . . . . .   | 198        |

# Introduction générale

A la frontière entre l'objet d'art et l'architecture, le vitrail témoigne d'un savoir faire technologique complexe qui remonte au V<sup>e</sup> siècle (Sapin, 2010). Quelle que soit la signification de ce qui y est représenté, sa valeur artistique et historique est importante. Au Moyen-Âge, période à laquelle l'utilisation du vitrail a connu un essor important, la composition des pièces de verres change par rapport au passé à cause de l'interruption des routes commerciales avec l'orient, fournisseur de matières premières jusqu'alors (Shortland *et al.*, 2006). L'utilisation d'un fondant potassique à base de cendres végétales conduit à la fabrication de verres présentant une plus faible teneur en silice et une forte teneur en calcium et potassium, la composition des vitraux. Les verres potassiques sont néanmoins spécialement sensibles à l'effet de l'environnement. Ceux-ci peuvent développer des altérations causées par l'exposition du verre à l'action conjointe de l'eau, du climat, de la pollution et des microorganismes (Müller, 1999; Verità, 2006; Gentaz *et al.*, 2011; De Bardi *et al.*, 2013; De Ferri *et al.*, 2014).

L'altération du verre est principalement due à une attaque physicochimique de l'eau sur la surface du verre, qui subit des processus de transformation conduisant à la formation de couches d'altération. Les conditions d'expositions des vitraux sur verrière (utilisés dans les bâtiments historiques pour transmettre la lumière tout en illustrant des histoires) sont à l'origine de phénomènes d'altération spécifiques à ce type d'objets (Sterpenich, 1998; Libourel *et al.*, 2011; Gentaz, 2011; Sessegolo, 2018). En face externe, le milieu atmosphérique est caractérisé par l'alternance d'épisodes de pluies et de sécheresse et des variations fortes de l'humidité relative. La face interne est, quant à elle, soumise à des variations d'humidité relative et à des phénomènes de condensation et séchage. Ces deux différents types d'expositions vont engendrer diverses morphologies d'altération, en fonction notamment de la composition du verre.

La plupart des verres anciens contiennent des impuretés de fer présentes dans les matières premières et qui peuvent conduire à une coloration verdâtre non souhaitée (Green et Hart, 1987; Freestone, 2006; Arletti *et al.*, 2012; Ceglia *et al.*, 2015). Dès le I<sup>er</sup> millénaire AEC (avant ère commune), les verriers développèrent un procédé pour obtenir un verre dit « incolore » en utilisant des composés, ajoutés en petites quantités, pour contrebalancer l'effet colorant du Fe. Les décolorants les plus utilisés, appelés « savons des verriers », étaient les oxydes d'antimoine et les oxydes de manganèse (Jackson, 2005; Arletti *et al.*, 2012; Gliozzo, 2016; Bidegaray *et al.*, 2018). La réaction redox qui a lieu dans l'état fondu transforme les espèces colorées  $Mn^{3+}$  et  $Fe^{2+}$  en  $Mn^{2+}$  et  $Fe^{3+}$ , permettant d'obtenir des verres incolores ou faiblement colorés. Si les oxydes de Mn sont introduit en excès, une coloration pourpre est obtenue du fait de la présence de l'espèce  $Mn^{3+}$  (Mirti *et al.*, 2002;



Quartieri *et al.*, 2002; Arletti *et al.*, 2010; Bidegaray *et al.*, 2019). Le Mn, que l'on retrouve dans nombre de composition de verres, était donc utilisé soit pour colorer la pièce en violet/pourpre et obtenir des verres de couleur chair pour les visages et les mains, soit pour obtenir un verre incolore.

La pathologie d'altération des vitraux médiévaux qui fait l'objet de ce travail de recherche, le brunissement, concerne spécifiquement les verres de vitraux contenant du Mn. Le développement de cette pathologie se traduit par l'apparition de taches brunes, riches en Mn à un état d'oxydation élevé, en surface ou subsurface du verre entraînant une perte de transmission de la lumière et par conséquent de lisibilité de l'œuvre (Pilz, 1997; Müller, 1999; Weber *et al.*, 2007; Ferrand, 2013). Un exemple de ce phénomène est montré en Figure 1 pour un vitrail de l'Abbaye Notre-Dame-des-Près à Troye où le brunissement s'est développé sur les pièces de verre constituant les visages et la main des personnages représentés, car le Mn était souvent introduit, nous l'avons dit, pour obtenir des pièces couleur chair. Il a été rencontré sur plusieurs vitraux en Europe du Nord et sur de nombreux échantillons archéologiques, voir par exemple Sterpenich (1998); Müller (1999); Weber *et al.* (2007); Schalm *et al.* (2011); Ferrand (2013); Nuyts *et al.* (2015).



FIGURE 1 – L'Annonciation, vitrail du XV<sup>e</sup> siècle de l'église Notre-Dame, Les-Noës-Près-Troyes. Le brunissement s'exprime par la présence de taches brunes sur les visages et la main des personnages représentés. Image fournie par C. Loisel @LRMH

La connaissance détaillée des caractéristiques morphologiques et chimiques de ce phénomène est d'un grand intérêt pour les pratiques de conservation-restauration du patrimoine. Les traitements de restauration utilisés actuellement emploient des agents complexants ou plus ou moins faiblement réducteurs comme par exemple l'hydrazine hydroxide, l'acide citrique, l'hydroquinone, l'iodure de potassium, l'EDTA ou l'hydroxylamine hydrochlorure (Cagno *et al.*, 2011; Bourleuf *et al.*, 2013). Ces traitements permettent en général de décolorer les taches brunes. Cependant, le phénomène peut réapparaître après le traitement de restauration dans un temps plus ou moins court (Pilz, 1997; Müller, 1999), sans que le phénomène soit compris.

Par ailleurs, plusieurs travaux considèrent que la coloration brune est due à un effet microbiologique (Perez y Jorba *et al.*, 1980; Krumbein *et al.*, 1991; Drewello et Weissmann,

1997; Oriol *et al.*, 2007). Le Mn représente en effet un micronutriment pour certains microorganismes et plusieurs d'entre eux sont connus pour la production d'oxydes bruns ou noirs à partir du Mn présent dans l'environnement (Villalobos *et al.*, 2003; Tebo *et al.*, 2004; Webb *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2013; Yu et Leadbetter, 2020). De plus, le brunissement présente une morphologie de surface sous forme de cratères, ce qui est souvent associé à des altération d'origine microbiologique (Perez y Jorba *et al.*, 1980; Krumbein *et al.*, 1991; Drewello et Weissmann, 1997; Gorbushina et Palinska, 1999; Piñar *et al.*, 2013). Ces observations étayent l'hypothèse que la formation des phases brunes riches en Mn est liée à l'action de microorganismes. Pourtant, il n'existe pas de preuve expérimentale définitive qui montre une implication directe des microorganismes dans l'apparition du phénomène de brunissement des vitraux médiévaux.

Le phénomène de brunissement présente donc plusieurs enjeux liés à la protection et la restauration des vitraux. La compréhension des mécanismes de formation de ces phases brunes au sein de la couche altérée, leur caractérisation fine rendue compliquée par leur chimie et leur morphologie, et l'éventuel rôle joué par les microorganismes dans la mise en place du phénomène sont des thèmes de recherche importants pour l'avancée de la connaissance sur ce sujet dans le but d'améliorer les procédés de conservation et restauration.

Ce projet a pour objectif d'une part de reproduire la pathologie au laboratoire et d'autre part d'identifier les paramètres influents afin de pouvoir proposer des mécanismes de mise en place du phénomène de brunissement. La problématique scientifique a été décomposée en plusieurs étapes élémentaires afin de comprendre i) comment le Mn est mobilisé à partir du réseau vitreux et comment les bactéries peuvent intervenir dans ce procédé, ii) quel rôle joue le Mn dans l'altération du verre et dans quelle mesure il est possible de faire une comparaison avec le Fe, iii) quels sont les mécanismes abiotiques et/ou biotiques menant à la formation de ces phases brunes.

Dans le but de relier ce travail à la réalité du vitrail, des prélèvements microbiologiques sur des vitraux ont été réalisés sur plusieurs sites afin de mettre au point un protocole de prélèvement et de recenser les bactéries et champignons susceptibles de causer une altération. Les champignons ont été identifiés par observation microscopique, et les bactéries par séquençage ADN. Cette étude, réalisée en collaboration avec le LRMH, concerne le Chapitre 3 de ce manuscrit.

Deux axes de recherche ont été développés pour la compréhension des mécanismes d'altération. La méthodologie de recherche prévoit la production, au laboratoire, d'un verre modèle de composition représentative des vitraux médiévaux, et la réalisation de tests d'altération. La stratégie expérimentale adoptée a consisté à décomposer les systèmes réactionnels complexes verre/bactéries en situations expérimentales simplifiées ciblant de manière isolée différentes étapes de la mise en place du phénomène de brunissement.

L'axe 1 est dédié à l'étude des cinétiques d'altération par des tests de dissolution biotique indirecte et directe.

Une première partie du travail, dont les résultats sont reportés dans le Chapitre 4, a été

dédiée à l'étude de l'effet indirect que les microorganismes peuvent avoir sur la dissolution du verre à travers la production de métabolites. Des tests de dissolution du verre ont donc été réalisés en présence d'un acide organique et d'un sidérophore couramment produits par les microorganismes (*tests de dissolution biotique indirecte*).

Une deuxième partie de ce travail a porté sur l'étude de l'effet direct de l'activité bactérienne sur la dissolution du verre. Le Chapitre 5 concerne les tests de dissolution qui ont été réalisés en présence de la souche modèle *Pseudomonas putida* (*tests de dissolution biotique directe*).

L'axe 2 est dédié à la reproduction des phases brunes riches en Mn par voie abiotique et par voie biotique.

La capacité du Mn à former des phases brunes à l'intérieur de la couche d'altération du verre a été évaluée par des tests d'imbibition de monolithes de verre préaltérés dans des solutions riches en Mn (*tests de reproduction des phases brunes par voie abiotique*) qui sont reportés dans la première partie du Chapitre 6.

La deuxième partie du Chapitre 6 est dédiée à une étude sur la formation des phases brunes par voie biotique, *via* des expériences de croissance de biofilm de la souche modèle *Pseudomonas putida* sur la surface de monolithes de verre (*tests de reproduction des phases brunes par voie biotique*).

La mise au point et la réalisation de ce travail expérimental a reposé sur une documentation bibliographique concernant la structure et l'altération du verre, la bioaltération et la biogéochimie du Mn, dont une synthèse est proposée dans le Chapitre 1. Le Chapitre 2 reporte tous les protocoles expérimentaux utilisés au cours de ce travail. Enfin, le Chapitre 7 présente une discussion générale sur les mécanismes observés et sur la compréhension du phénomène de brunissement et donne des perspectives.

# Chapitre 1

## État de l'art

Nous avons vu que le brunissement causé par le manganèse affecte des verres de composition particulière et est un phénomène d'altération chimique qui pourrait faire intervenir des microorganismes. Ce chapitre a donc pour objectif de présenter les différents domaines qui seront abordés au cours de ce manuscrit.

La composition du verre ayant un rôle clé sur l'altération, des éléments sur la structure du verre et l'évolution de la composition d'un point de vue historique et technologique seront donnés en début de chapitre. Ensuite, les mécanismes mis en jeu dans l'altération du verre seront décrits de manière générale avec un focus sur les vitraux sur verrière. A la suite de cette partie, le phénomène de brunissement sera décrit avec plus de détail. Étant donnée l'hypothèse d'un apport biologique à la formation du phénomène de brunissement, le thème de la bioaltération sera également abordé. Le Mn étant l'élément causant le brunissement, un focus sur cet élément est présenté en fin de chapitre. Son rôle dans la composition du verre historique sera discuté, ainsi que sa biogéochimie.

### 1.1 Structure et composition du verre

Le verre est un solide amorphe qui se forme par solidification d'un mélange d'oxydes fondu. Dans les verres silicatés, la même unité structurale de base que pour les formes cristallines de la silice de basse pression est rencontrée : un tétraèdre de  $\text{SiO}_4$  (Henderson, 2005). La liaison Si–O est une liaison covalente forte, l'atome de Si est au centre du tétraèdre et les atomes d'O sont positionnés aux quatre coins et peuvent être communs à plusieurs tétraèdres. Cette structure constitue le réseau vitreux, et l'oxyde de silice  $\text{SiO}_2$  est par définition le *formateur de réseau* (liaisons Si–O–Si). Tous les éléments qui peuvent prendre partie à cette structure en partageant des sommets d'oxygène avec le réseau silicaté peuvent prendre dans la structure le rôle de formateurs de réseau, comme par exemple  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{PbO}$ ,  $\text{B}_2\text{O}_3$ .

Les oxydes d'alcalins, introduits comme fondants pour baisser la température de fusion de  $1700^\circ\text{C}$  de la silice pure à des températures plus faciles à obtenir ( $1100$ - $1500^\circ\text{C}$ ), cassent la continuité du réseau et des unités Si–O<sup>-</sup> sont formées, et sont pour cela définis comme *modificateurs de réseau*. Ainsi ces oxygènes sont liés uniquement à un atome de Si et sont appelés oxygènes non pontants (ONP), pour les distinguer des oxygènes pontants (OP).

Les cations des alcalins s'insèrent dans le réseau au voisinage des ONP avec lesquels

forment des liaisons ioniques. Les cations alcalino-terreux peuvent également être des modificateurs de réseau. Cependant, ils peuvent aussi avoir un effet stabilisateur car à cause de leur valence double, ces ions bivalents vont compenser la charge négative de deux ONP. Les alcalins et alcalino-terreux peuvent aussi s'insérer dans le réseau en proximité des sites où une charge négative est présente à cause de la présence d'un formateur de réseau trivalent, comme par exemple les sites  $\text{AlO}_4^-$ , dans ce cas, ces ions prennent le nom de *compensateurs de charge*.

En ce qui concerne les éléments de transition, leur rôle structural n'est pas toujours compris et peut varier d'une composition à une autre. Le Fe, le Ti, le Zn, le Co, sont des exemples d'éléments de transitions qui peuvent rentrer dans la structure vitreuse en tant que formateurs de réseau (Galoisy *et al.*, 2000; Hunault *et al.*, 2013). Le rôle structural des éléments du verre dépend pour certains de la composition globale (Galoisy *et al.*, 2000; Chalmin *et al.*, 2009). Ainsi les éléments dits intermédiaires peuvent à la fois être modificateurs ou formateurs de réseau, selon la composition du verre. Le Fe par exemple, est généralement considéré modificateur de réseau sous forme de  $\text{Fe}^{2+}$  et en coordinence 5 ou 6, et formateur de réseau  $\text{Fe}^{3+}$  en coordinence 4 (Farges *et al.*, 2004).

La structure du tétraèdre de  $\text{SiO}_4$  dans un verre est assez similaire à celle de son correspondant cristallin, c'est l'interconnexion entre les tétraèdres qui rend la structure du verre "désordonnée" par rapport à celle d'un matériau cristallin (Henderson, 2005).

La structure à courte distance d'un réseau silicaté peut être décrite en terme d'unités  $Q^n$ , où le  $n$  peut aller de 0 à 4 et représente le nombre d'OP par tétraèdre  $\text{SiO}_4$  (Figure 1.1). Cette notation est utilisée pour décrire l'état de polymérisation du verre. Un verre très polymérisé aura une majeure quantité de  $Q^4$  (un tétraèdre complètement polymérisé) et  $Q^3$  (un tétraèdre avec un seul ONP), au contraire un verre très dépolymérisé sera plus riche en  $Q^2$  et  $Q^1$ . Il s'agit donc d'une mesure de la connectivité du réseau. Les différents cations modificateurs peuvent déplacer l'équilibre existant entre ces différentes espèces de tétraèdres en se liant préférentiellement à certains types d'ONP.

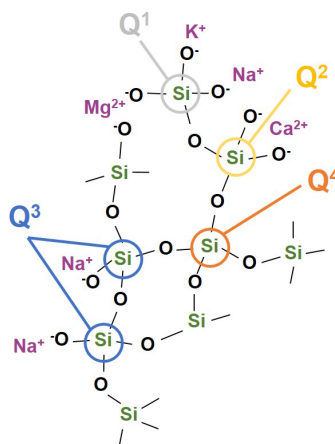


FIGURE 1.1 – Représentation schématique des unités  $Q^n$  d'un réseau vitreux silicaté. Tiré de Alloteau (2017)

Une paramètre largement utilisé pour décrire la polymérisation du réseau est le NBO/T, (*Non Bridging Oxygens/Tetrahedra*), c'est à dire le nombre d'ONP par tétraèdre. Il est possible

le calculer selon l'équation (1.1 suivante

$$\frac{NBO}{T} = \frac{1}{T} \sum_{i=1}^i nM_i^{n+} \quad (1.1)$$

avec  $M$  le pourcentage molaire de cations modificateurs/compensateurs de charge  $i$ ,  $n$  la charge des cations  $i$ , et  $T$  le pourcentage molaire atomique de cations formateurs en site tétraédrique. Ce rapport est  $>1$  pour les verres de vitraux qui sont très dépolymérisés à cause des pourcentages élevés d'éléments modificateurs de réseau et le faible pourcentage de  $\text{SiO}_2$  (environ 50%).

Un autre paramètre permet également de caractériser la structure du verre et d'en prévoir les propriétés : le nombre de contraintes de topologie chimique imposées dans le réseau (*Topological Constraint Theory TCT*). Ce nombre de contraintes par atome est calculé avec un modèle prenant en compte la composition du verre et des informations structurales. Si le nombre de contraintes topologiques  $n_c$  est inférieur à 3, le réseau est dit « flexible » (verres phosphates), et il est dit « sous contraintes » ou « rigide » si  $n_c$  est supérieur à 3 (verres aluminosilicatés), "isostatique" si  $n_c=3$ . Cette théorie a été capable de prédire certaines propriétés du verre dépendant de la composition.

La structure du verre dépend donc de sa composition et les compositions de verre ancien ont évolué au cours du temps selon la disponibilité de matières premières.

Le verre en tant qu'objet créé par l'homme est apparu pour la première fois au IIIème millénaire av. JC au Moyen-Orient, mais la production à grande échelle commence au XVIème siècle av. JC. (Verità, 2006; Tite *et al.*, 2002) La composition de verre dépend du type et de la quantité de matières premières utilisées. Jusqu'à la fin du XVIIIème siècle, ces facteurs étaient fortement liés à la tradition locale (recettes de production variables d'une région à une autre) et à la disponibilité des matières premières. Ainsi, des compositions caractéristiques ont été utilisées par les maîtres verriers au fil du temps.

Depuis l'Antiquité, le natron, un minéral naturel de carbonate de sodium, était utilisé comme fondant. Les verres résultants ont des faibles pourcentages de K et Mg et constituent la famille des verres silicatés sodo-calciques *low magnesia*. Le natron a été utilisé jusqu'au IX-XIème siècle, ensuite l'approvisionnement européen de natron provenant de l'Égypte a subi un arrêt à cause des changements géopolitiques de l'époque. Ainsi, en Europe le natron a été progressivement remplacé par des cendres de plantes. Dans la zone méditerranéenne les cendres étaient obtenues par combustion de plantes du littoral (la salicorne par exemple), conduisant à la familles de verres appelés silicatés sodo-calciques *high magnesia* (Shortland *et al.*, 2006; Verità, 2006). En Europe du Nord, les cendres utilisées comme fondant étaient obtenues par combustion de fougères et de hêtres, ce qui a donné la famille des verres silicatés calco-potassiques. Ces verres sont caractérisés par des pourcentages élevés en K et Ca, ainsi qu'en P (quelques pourcents). C'est une composition typique des vitraux médiévaux. Le vitrail était produit par deux techniques de soufflage du verre plat : le verre soufflé en cive (ou plateau) et le manchon (Blondel, 1993; Richet, 2007) (Figure 1.2. Les pièces de verre étaient découpées dans ces plaques de verre pour ensuite être inséré dans un réseau de plomb pour constituer les panneaux de vitraux.

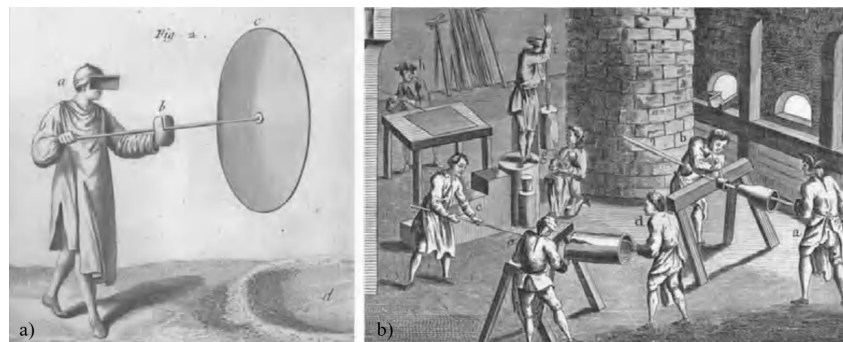


FIGURE 1.2 – Méthodes de production de verre plat au Moyen-Âge. a) le soufflage en couronne typique de la tradition normande : un vase à col court est soufflé puis élargi afin d'ouvrir le vase à la façon d'une corolle, ensuite une rotation rapide du pontil permet d'obtenir un verre plat circulaire ; b) le soufflage en manchon typiquement réalisé en Alsace et Lorraine : le verre est d'abord soufflé en cylindre, puis fendu dans sa longueur et étendu sur une table plane. Image tirée de l'Encyclopédie de Diderot et D'Alembert.

D'autres exemples de verres historiques sont les verres silicatés sodiques typiques du verre *façon de Venise* aux XVIème-XVIIème siècle (Verità, 2014), les verres silicatés alcalins mixtes typiques des émaux sur métal du Moyen-Âge au XIXème siècle (Biron, 2015), et les verres au plomb issus d'une production anglaise au XVIIème et XVIIIème siècle (Dungworth et Brain, 2009).

Parmi les verres modernes, des verres calco-sodiques sont utilisés pour les bouteilles et les fenêtres, des verres borosilicatés pour la verrerie de laboratoire et pour le verre de stockage des déchets nucléaires, des verres au plomb pour des verres optiques.

## 1.2 L'altération du verre

Il est possible de distinguer l'altération en solution, quand le verre est en contact avec de l'eau liquide (conditions saturées) et l'altération en contact avec l'eau sous phase vapeur (conditions insaturées, caractérisées par l'humidité relative). Les mécanismes connus en littérature pour ces deux conditions d'altération sont présentés, en se focalisant ensuite sur le cas des vitraux.

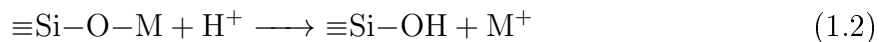
### 1.2.1 Altération en conditions saturées

Classiquement l'altération du verre a été étudiée en solution, principalement dans le cadre d'études environnementaux sur l'altération de verres volcaniques (Oelkers et Gislason, 2001, 2003; Wolff-Boenisch *et al.*, 2004) et dans le domaine des verres borosilicatés utilisés pour le stockage des déchets radioactifs (Cailleteau *et al.*, 2008a; Frugier *et al.*, 2008; Valle *et al.*, 2010; Guittonneau *et al.*, 2011; Gin *et al.*, 2013a).

#### *Mécanismes d'altération aqueuse*

Cette altération est décrite avec deux mécanismes principaux : l'interdiffusion (ou échange ionique) et la dissolution (Doremus, 1975; Bunker, 1994). L'interdiffusion se défi-

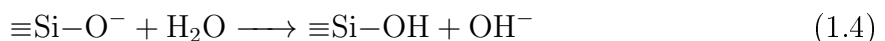
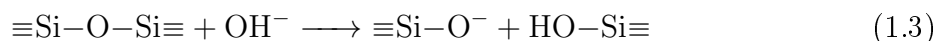
nit par l'échange d'ions alcalins et alcalino-terreux présents dans le verre avec des espèces hydratées (ici représentées par  $H^+$ ) de la solution altérante (lixiviation, ou dissolution non stœchiométrique), ce qui mène à la formation d'unités silanols  $Si-OH$  selon la réaction 1.2.



Avec  $M$  un alcalin modificateur/compensateur de charge. Ce mécanisme est prépondérant à pH acide et neutre. Le résultat de l'interdiffusion est la formation d'une couche altérée hydratée, désalcalinisée et poreuse.

De plus, le processus d'interdiffusion va consommer des  $H^+$  de la solution et le pH de la solution va ainsi augmenter au cours du temps.

La dissolution ou hydrolyse du réseau est due à la rupture de la liaison covalente  $Si-O$  à cause de l'attaque chimique des ions  $OH^-$  (Réactions 1.3 et 1.4).



Ces deux mécanismes, interdiffusion et hydrolyse, sont concomitants et leurs cinétiques sont dépendantes de plusieurs paramètres comme le pH et la température, mais ils sont également influencés par la formation de la couche altérée et le changement de la solution altérante au fur et à mesure que le verre s'altère en relâchant des éléments en solution.

### *Cinétiques d'altération*

Loin de la saturation, la dissolution du verre se produit à une vitesse de dissolution initiale  $v_0$ , qui est fortement dépendante de la composition du verre et d'autres paramètres comme pH, température, composition de la solution (Berger *et al.*, 1994; Wolff-Boenisch *et al.*, 2004; Conradt, 2008; Cailleteau *et al.*, 2008a; Gin *et al.*, 2012). La dissolution du verre en solution est un processus thermiquement activé qui suit la loi d'Arrhenius (Oelkers et Gislason, 2003; Verità, 2006; Conradt, 2008) et dépend également du pH. La vitesse de dissolution initiale ( $v_0$ ) s'exprime alors :

$$v_0 = k_0 [H^+]^n \exp\left(\frac{-Ea}{RT}\right) \quad (1.5)$$

avec  $k_0$  la constante de vitesse initiale,  $n$  le coefficient de dépendance au pH,  $Ea$  l'énergie d'activation,  $R$  la constante de gaz parfaits et  $T$  la température.

Quand la concentration de Si en solution augmente, une chute de vitesse est observée (Figure 1.3) qui peut être expliquée par un effet d'affinité chimique :

$$v = v_0 \left(1 - \frac{Q}{K}\right) \quad (1.6)$$



avec  $Q$  l'activité de Si et  $K$  la constante d'équilibre thermodynamique d'une phase silicatée contrôlant la dissolution du verre (par exemple quartz, silice amorphe...). Toutefois, la formation de la couche d'altération est également à prendre en compte car elle va ralentir la diffusion des ions (Gin *et al.*, 2008). De plus, pour certains types de verre, le gel d'altération peut avoir un rôle passivant.

Le rapport surface réactive/volume de solution (S/V) va déterminer la durée du régime de vitesse initiale de dissolution avant la chute de vitesse et la saturation.

Ensuite, en conditions statiques la vitesse de dissolution va se stabiliser et entrer dans un régime de vitesse résiduelle (Figure 1.3). Cette vitesse est faible mais non nulle, du fait de la poursuite de la diffusion et de la précipitation de phases secondaires qui consomment les éléments du gel protecteur (Frugier *et al.*, 2008). Enfin, dans certains cas, une reprise d'altération peut être observée (Frugier *et al.*, 2008; Gin *et al.*, 2012; Fournier *et al.*, 2014).

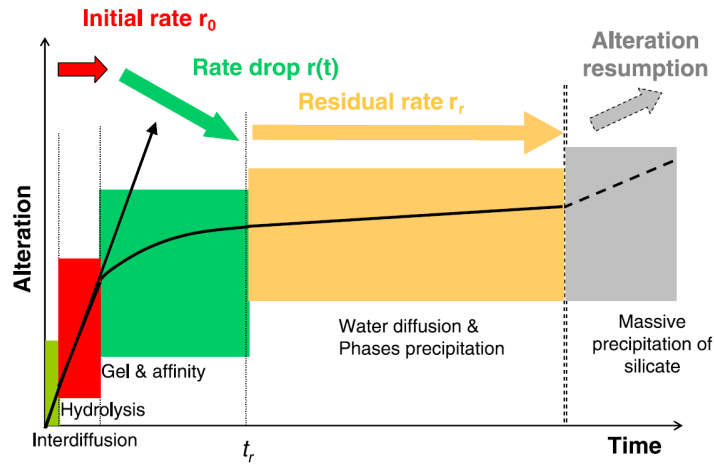


FIGURE 1.3 – Étapes de l'altération d'un verre nucléaire. La durée de chaque régime cinétique dépend de la composition du verre et des conditions d'altération. Tiré de Gin *et al.* (2012)

La loi de vitesse d'interdiffusion peut aussi être exprimée en fonction de  $T$  et  $pH$  (Verney-Carron *et al.*, 2010; Sessegolo *et al.*, 2020) :

$$D = D_0 [H^+]^n \exp\left(\frac{-Ea}{RT}\right) \quad (1.7)$$

avec  $D_0$  la constante de diffusion et  $n$  le coefficient de dépendance au  $pH$ ,  $Ea$  l'énergie d'activation,  $R$  la constante de gaz parfaits et  $T$  la température.

*Effet du pH sur l'altération*

La dépendance au  $pH$  est complexe et peut varier d'une composition à une autre. La plupart des études sur des verres silicatés (verre basaltique et verre nucléaire) mettent en évidence une dépendance de la vitesse de dissolution par rapport au  $pH$  en forme de U ou de V (Guy et Schott, 1989; Oelkers et Gislason, 2003; Conradt, 2008; Verney-Carron *et al.*, 2008; Inagaki, 2014). La vitesse de dissolution est la plus faible à  $pH$  neutre, augmente drastiquement quand le  $pH$  devient acide et plus légèrement quand le  $pH$  va vers des valeurs plus basiques (Figure 1.4a). Sessegolo *et al.* (2020) ont montré que cette dépendance

au pH présente une évolution différente pour les verres silicatés calco-potassiques typiques des vitraux du Moyen-Âge. En effet la dépendance au pH est faible à pH basique et la vitesse de dissolution reste constante ou tend à diminuer (Figure 1.4b).

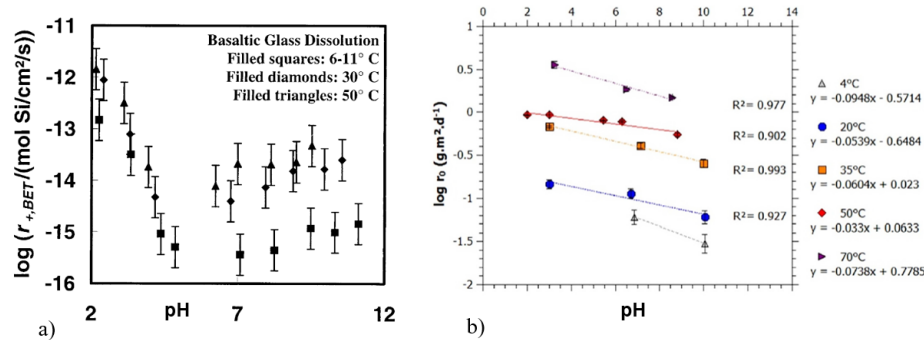


FIGURE 1.4 – Dépendance de la vitesse de dissolution au pH a) en U pour un verre basaltique (Tiré de Oelkers et Gislason (2003) et b) pour un verre silicaté calco-potassique (Tiré de Sessegolo *et al.* (2020))

#### *Effet de la composition du verre sur l'altération*

La dissolution du verre est donc influencée par des facteurs externes comme la température, le pH et la composition de la solution altérante (Berger *et al.*, 1994; Daux *et al.*, 1997; Oelkers et Gislason, 2001; Morin *et al.*, 2015), mais aussi par des facteurs internes comme la composition et la structure du verre (Wolff-Boenisch *et al.*, 2004; Cailleteau *et al.*, 2008b). Les verres peu durables sont caractérisés par un faible pourcentage d'oxydes formateurs de réseau ( $\text{SiO}_2 < 60\%$ ) et peuvent développer des couches altérées de plusieurs centaines de  $\mu\text{m}$  avec une structure ouverte, poreuse et fragile.

La nature des modificateurs de réseau a aussi un effet important pour la durabilité d'un verre silicaté. Il a été observé qu'un verre potassique est moins durable qu'un verre sodique (Verità, 2006). En général, plus l'intensité de champ du cation est faible, moins le verre est durable. On parle aussi d'un effet de taille car les ions  $\text{H}^+$  qui vont remplacer les alcalins et alcalino-terreux ont un rayon ionique plus faible qui ne leur permet pas de combler les espaces laissés par les cations. Ainsi, les espaces laissés par le K sont plus grands que ceux laissés par le Na et permettrait donc à un plus grand nombre d'espèces hydratées de pénétrer à l'intérieur du réseau et poursuivre l'altération (Bunker, 1994). La quantité de CaO a aussi une influence sur la durabilité car dans les verres historiques il a un effet stabilisateur quand il est présent à un pourcentages de poids d'oxydes  $< 12\%$  mais il rend le verre moins durable quand il est présent à un pourcentage plus élevé (Brill, 1975).

Berger *et al.* (1994); Oelkers et Gislason (2001) considèrent que la dissolution d'un verre est liée à la rupture des liaisons au sein du réseau vitreux. Les liaisons de nature ionique des éléments modificateurs de réseau sont ainsi plus facilement cassées, résultant dans le procédé de lixiviation de ces cations. Au contraire, les liaisons covalentes des atomes formateurs de réseau sont plus difficiles à casser, ainsi l'étape contrôlant cinétiquement la dissolution est celle de la destruction des liaisons Si-O, avec les liaisons des ONP étant

les premières à être cassées, mais aussi des liaisons des autres éléments formateurs comme Al–O et Fe–O pour les verres basaltiques.

Bunker (1994) affirme que la protonation des oxygènes non pontants se fait plus favorablement que la protonation des sites  $\text{AlO}^{4-}$ , indiquant que les cations compensateurs de charge sont plus résistant à la lixiviation par rapport aux cations modificateurs de réseau. Il y aurait donc une influence du site de protonation sur la réaction d'échange ionique. En effet, plusieurs auteurs ont montré que la présence d' $\text{Al}_2\text{O}_3$  rend les verres silicatés plus résistants et que la rupture des liaisons Al–O est l'étape de vitesse limitante (*rate limiting step*) pour la dissolution d'un verre aluminosilicaté (Oelkers et Gislason, 2001; Perez *et al.*, 2015; Narayanasamy *et al.*, 2019)

Beaucoup d'études de dissolution dans le passé se sont basées sur le degré de polymérisation du verre pour connecter la structure au comportement en altération. Un verre très dépolymérisé est peu durable car la présence d'un nombre élevé d'ONP rend le verre plus sensible à la dissolution, la connectivité des tétraèdres de  $\text{SiO}_4$  étant plus faible.

Mascaraque *et al.* (2017) ont souligné que pour beaucoup de compositions de verre, d'autres paramètres (autres que le nombre d'ONP) doivent être pris en compte pour évaluer la durabilité du verre, comme la présence oxydes intermédiaires ( $\text{B}_2\text{O}_3$  et  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) et le type d'ions modificateurs. Pignatelli *et al.* (2016); Mascaraque *et al.* (2017); Gin *et al.* (2020) ont donc appliqué la théorie TCT à l'étude de la durabilité chimique de minéraux et verres silicatés et ont démontré une corrélation entre la vitesse de dissolution et le nombre de contraintes topologiques des atomes du réseau silicaté.

Selon Mascaraque *et al.* (2017) la TCT peut être en outil puissant pour relier la structure du verre au comportement en altération. Pour les verres "flexibles", les modes internes de déformation facilitent l'hydratation du réseau, tandis que pour les verres "sous contraintes" le nombre élevé de contraintes inhibe l'hydratation à pH acide, neutre et basique. Les mécanismes cinétiques dépendent du pH et de la topologie du verre. La barrière d'énergie qu'il faut dépasser est la rupture d'une unité de contrainte atomique. Elle diminue à pH plus faibles, du fait du changement de mécanisme de l'hydrolyse à l'échange ionique.

### *Formation de la couche altérée*

Les mécanismes de formation de la couche d'altération en milieu immergé sont débattus dans la littérature et deux modèles principaux ont émergé : le modèle par hydrolyse/condensation et le modèle par dissolution/précipitation.

Selon le modèle d'hydrolyse/condensation, le modèle classiquement utilisé pour l'altération du verre, la couche d'altération, suite au processus d'interdiffusion et hydrolyse, subit dans un second temps des réactions de condensation des silanols qui conduit à de nouvelles liaisons Si–O–Si et à la repolymerisation du réseau. Cela mène à la formation d'une couche appelé "gel" et constituée principalement de silice amorphe (Figure 1.5 haut). Ce modèle est supporté par des observations expérimentales avec traceurs isotopiques ajoutés au milieu altérant de verres nucléaires (Valle *et al.*, 2010; Gin *et al.*, 2013b, 2015).

Le modèle par dissolution/précipitation *Coupled Interfacial Dissolution and Reprecipitation (CIDR)* visant à expliquer l'altération du verre a émergé dans les dernières années (Geisler *et al.*, 2010; Hellmann *et al.*, 2015). Ce modèle fait l'hypothèse d'une dissolution

congruente du verre dès les premiers instants avec une re-précipitation immédiate de la silice amorphe qui va former la couche d'altération dans un film d'eau interfacial avec le verre sain. Ce modèle découle de l'observation expérimentale à l'échelle nanométrique d'une interface nette entre le verre sain et la couche altérée, par opposition à un profil sigmoïde de l'altération par interdiffusion (Figure 1.5 bas).

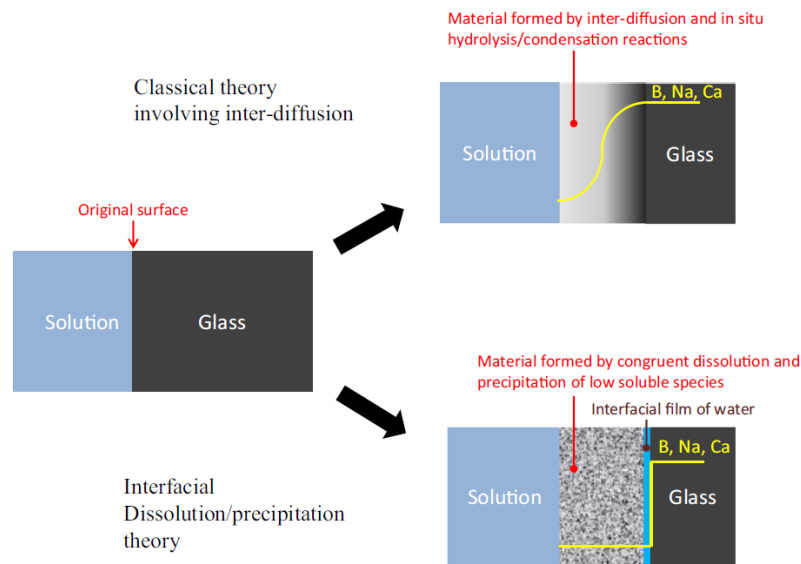


FIGURE 1.5 – Représentation schématique des différences entre la théorie classique d'interdiffusion/dissolution et la théorie de dissolution-oréprécipitation interfaciale. Les courbes jaunes représentent les profils de concentration élémentaire pour le verre sain et le verre altéré. Tiré de Gin *et al.* (2017)

Récemment, Lenting *et al.* (2018) ont proposé un modèle de corrosion pour les verres silicatés qui va réconcilier les deux modèles. Ils font l'hypothèse d'une première étape de dissolution congruente et de précipitation de silice amorphe qui va former la couche altérée selon le modèle CIDR, suivie par une étape d'interdiffusion qui peut se passer uniquement après la formation de la couche altérée et le ralentissement du CIDR. La seconde étape consiste en la diffusion des espèces à travers le verre sain et la couche altérée qui rend visible un profil d'interdiffusion à l'interface. Le relâchement à long terme d'éléments du verre dépendrait donc des propriétés de diffusion des espèces en solution dans la couche d'altération. Les propriétés de l'eau peuvent être fortement modifiées dans des pores de taille nanométrique à l'interface.

## 1.2.2 Altération en conditions insaturées

En ce qui concerne l'altération en milieu atmosphérique, moins d'études ont été effectuées et elle est donc moins connue que celle en milieu immergé.

Ces conditions sont d'intérêt par exemple pour les objets en verre conservés dans les musées (Fearn *et al.*, 2006; Kunicki-Goldfinger, 2009; Alloteau, 2017; Koob *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2018), mais aussi pour le stockage des déchets nucléaires, car l'altération pourrait démarrer en conditions insaturées causées par le relâchement d' $H_2$  lors de la

corrosion des conteneurs en acier (Bates *et al.*, 1984; Abrajano *et al.*, 1989; Neeway *et al.*, 2012; Abdelouas *et al.*, 2013; Narayanasamy *et al.*, 2019).

L'agent altérant est dans ce cas l'eau sous forme de vapeur qui va s'adsorber à la surface du verre en formant un film nanométrique en causant l'altération (Asay et Kim, 2005; Alloteau, 2017). Les paramètres qui vont avoir une influence sur cette altération sont la température, le taux d'humidité relative, la présence de gaz et d'autres particules dans l'atmosphère (Robinet *et al.*, 2007; Alloteau *et al.*, 2017, 2019; Sessegolo *et al.*, 2018). L'humidité relative aura notamment un effet sur le nombre de molécules d'eau adsorbées en surface.

En général, des couches d'altération plus épaisses sont observées en solution, mais une formation de sels en surface plus rapide est observée en phase vapeur (Abrajano *et al.*, 1989; Sessegolo, 2018). Cela est expliqué par le fait que les cations relâchés par le verre en conditions atmosphériques ne sont pas solvatés et lixiviés dans une solution comme en conditions immergées. Ils peuvent donc plus facilement réagir avec les gaz atmosphériques pour former des sels en surface (Figure 1.6).

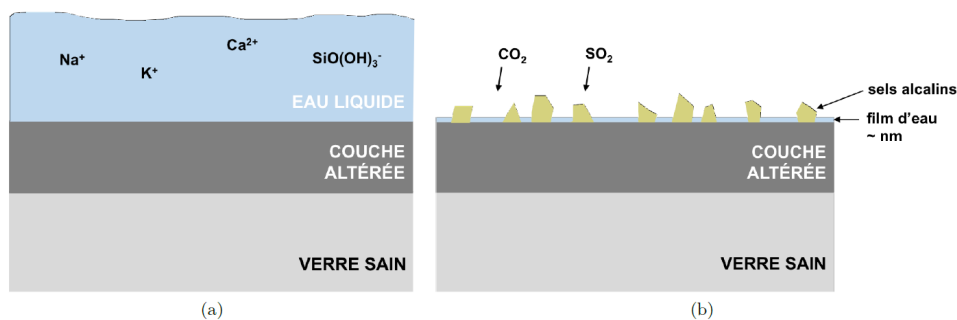


FIGURE 1.6 – Représentation schématique de la tranche d'un verre altéré a) en milieu immergé et b) en milieu atmosphérique. Tiré de Alloteau (2017)

L'étude de Alloteau *et al.* (2017) sur un verre silicaté alcalin mixte a montré que les couches altérées sont caractérisées par une forte hydratation sous forme de groupements Si-OH et d'eau moléculaire fortement liée et par une grande dépolymerisation. Différentes études ont mis en évidence une prépondérance de l'hydratation, non couplée en parallèle à l'échange ionique (Anovitz *et al.*, 1999; Abrajano *et al.*, 1989; Abdelouas *et al.*, 2013) qui se passerait dans certains cas seulement dans un second temps Alloteau *et al.* (2017). Cela pourrait être dû à la faible quantité de molécules d'eau présentes en surface (rapport S/V très élevé) qui limiterait la solvatation des alcalins et alcalino-terreux qui seraient donc plus retenus à l'intérieur de la couche altérée par comparaison aux conditions immergées (Anovitz *et al.*, 1999; Majérus *et al.*, 2020). Toutefois, il ne faut pas considérer l'altération en conditions atmosphériques simplement comme une altération en milieu immergé avec un S/V élevé, le fait que certains verres qui sont classifiés comme durables en phase aqueuse deviennent les moins durables en phase vapeur en est une évidence (Majérus *et al.*, 2020). Le milieu atmosphérique entretient une dynamique avec le renouvellement continu des molécules d'eau adsorbées.

### 1.2.3 Le cas des vitraux

Une étude complète visant à déterminer les paramètres des lois de vitesse de dissolution et d'interdiffusion pour un verre silicaté calco-potassique de composition typique d'un vitrail a été effectué par Sessegolo (2018). Ce travail a exploré les vitesses d'altération des vitraux à court et long terme en utilisant des traceurs isotopiques et a montré que pour un verre silicaté calco-potassique la formation de la couche altérée en milieu saturé se passe par interdiffusion et hydrolyse/condensation, tandis que en milieu insaturé et à température ambiante, l'hydratation par diffusion de l'espèce  $H^+$  est le mécanisme prépondérant.

En ce qui concerne les conditions spécifiques d'altération des vitraux, elles sont soumises à des variations d'humidité relative et à des cycles de mouillage/séchage. Certains auteurs ont émis l'hypothèse que le verre qui a été préalablement altéré en phase vapeur a une vitesse de dissolution initiale en solution aqueuse plus importante que si le même verre sain était soumis aux mêmes conditions en solution (Bates *et al.*, 1984; Abrajano *et al.*, 1989; Neeway *et al.*, 2012). Par ailleurs, des couches d'altération plus épaisses ont été observées par Sessegolo (2018) pour des échantillons soumis à des cycles d'HR différentes. Cet effet est attribué au renouvellement des molécules d'eau disponibles pour l'hydratation. Ces cycles de mouillage/séchage et donc d'alternance d'altération en phase vapeur et en phase aqueuse s'avèrent donc délétères pour les vitraux.

La face externe d'un vitrail peut présenter une épaisse couche altérée et une surface fracturée par les cycles de mouillage/séchage (desquamation de la couche altérée). Les épaisseurs observés par Sterpenich (1998) sur les vitraux anciens sur verrière en face externe datant du XIII<sup>ème</sup> et XIV<sup>ème</sup> siècle varient d'un minimum de 40  $\mu m$  à un maximum de 200-250  $\mu m$ . Toujours en face externe, des différences peuvent encore être rencontrées sur la base de l'exposition du vitrail. Lors du travail de Gentaz (2011), des échantillons de verre modèle des vitraux médiévaux ont été exposés sur site en conditions abritée ou non abritée de la pluie. Les verres ont développé après 3 ans d'exposition une couche d'altération moyenne de 13,8  $\mu m$  en milieu non abrité et de 1,2  $\mu m$  en milieu abrité.

La face interne présente une altération non homogène avec des cratères d'altération. En effet les défauts de surface et la rugosité provenant des méthodes de production du verre ancien peuvent être des promoteurs de condensation sous forme de gouttes et provoquer une altération localisée (Sterpenich, 1998; Sessegolo *et al.*, 2019), en créant des puits qui peuvent ensuite s'élargir et se rejoindre pour former une couche continue. En conditions statiques, la condensation et l'évaporation sans lessivage font que les produits d'altération restent en surface du verre. La formation de gouttes avec des conditions locales très agressives favorise ainsi des puits de corrosion (Sessegolo, 2018). Ces cratères de corrosion peuvent présenter des microfractures radiales avec des couches micrométriques centrées sur ces fractures. Ces lamines, qui se caractérisent par l'alternance de zones sombres et claires au MEB en électrons rétrodiffusés correspondent à une zonation chimique (Sterpenich, 1998).

L'altération des vitraux se manifeste également par la formation d'un réseau de microfractures perpendiculaires à la surface et la formation de phases secondaires en surface qui rendent le verre opaque et facilitent la propagation de microfractures qui permettent à l'eau de circuler facilement (Gentaz *et al.*, 2011, 2016). Les produits secondaires principalement rencontrés sont le gypse, la syngénite, la calcite, la polyhalite, mais également

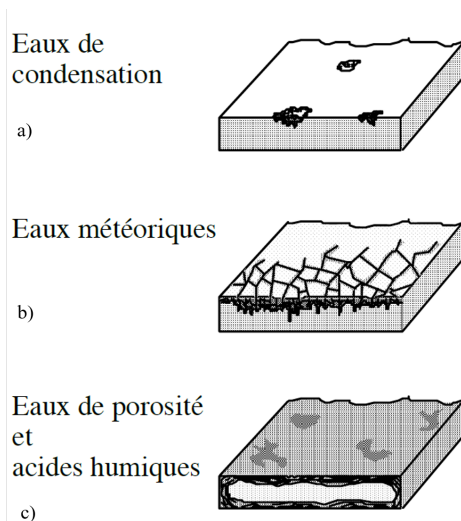


FIGURE 1.7 – Représentation schématique de l'altération d'un vitrail a) en face interne, b) en face externe et c) dans le sol. Tiré de Sterpenich (1998)

des phosphates et des phases argileuses.

Le caractère protecteur de la couche d'altération en milieu atmosphérique a été étudié et il apparaît que la vitesse de diffusion de la vapeur d'eau au sein de couches de vitraux est similaire à celle à court terme pour des verres non pré-altérés. Aucun ralentissement d'interdiffusion n'a donc été observé à cause de la présence de la couche altérée (Sessegolo *et al.*, 2018). Cependant, la présence de la couche d'altération impose un transport par diffusion au sein de la couche et limite le lessivage direct responsable d'une dissolution du matériau.

### 1.3 Le brunissement

L'altération par coloration brune de la surface des vitraux est souvent citée dans la littérature générale sur l'altération du verre du patrimoine (Müller, 1999; Gulmini *et al.*, 2009; Sterpenich, 1998; Cox et Ford, 1993; Cooper *et al.*, 1993; Silvestri *et al.*, 2005).

Plusieurs causes ont été identifiées comme étant à l'origine d'une coloration brune à la surface d'un vitrail, par exemple la formation de croûtes de sels incorporant des particules atmosphériques, ou le dépôt de matière organique (Weber *et al.*, 2007; Ferrand, 2013) que certains auteurs identifient comme mélanine (Müller, 1999).

Le brunissement qui va être l'objet de ce travail de recherche est uniquement celui caractérisé par la formation de taches brunes riches en Mn en surface ou subsurface du verre altéré (Figure 1.8). Le diagnostique de cette pathologie sur des nombreux échantillons de vitraux historiques a fait l'objet du travail de Ferrand (2013).

Ce phénomène est observé sur du verre de vitraux contenant dans le verre sain des concentrations même très faibles de Mn, il a été retrouvé par exemple sur des échantillons historiques contenant du Mn à partir de 0,1 % en poids d'oxyde. Des caractéristiques communes peuvent servir de premiers critères pour identifier le brunissement dû au manganèse : l'opacification du verre par des taches ou nodules bruns/noirs de forme circulaire, la présence très fréquente d'un cratère au centre de ces taches (Figure 1.9),

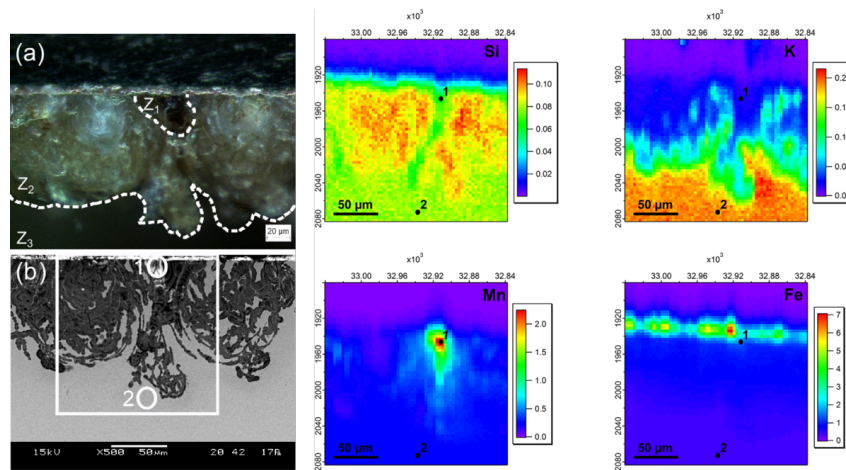


FIGURE 1.8 – Observation en microscopie optique, électronique et cartographies aux rayons X de la coupe transversale de l'échantillon brun EV3 (origine inconnue) tiré du travail de Ferrand *et al.* (2015). Un enrichissement localisé en Mn est observé à l'intérieur de la couche altérée.

taches ou nodules visibles en surface ou en sub-surface (Ferrand, 2013). Ce phénomène est principalement rencontré en face interne d'un vitrail.

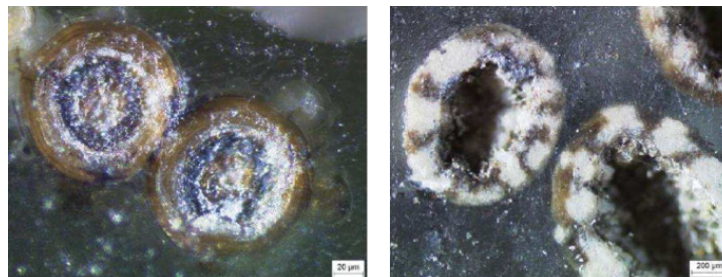


FIGURE 1.9 – Image en MO de la surface de deux échantillons de vitraux atteints du brunissement. Morphologie en forme de cratère. Image tiré de Ferrand (2013)

Les premières études dédiées à ce phénomène et à la compréhension des mécanismes sous-jacents datent de la fin des années 80 et s'intensifient entre 1990 et 1998 avec le programme de recherche Franco-Allemand (Pilz, 1997; Müller, 1999). Ces auteurs ont mis en évidence les difficultés rencontrées lors de la conservation des vitraux atteints par cette pathologie, qui pouvait réapparaître après le traitement de restauration.

Plusieurs équipes européennes ont depuis poursuivi les recherches sur le sujet et se sont attachées à la caractérisation physico-chimique de ces phases porteuses de Mn.

Schalm *et al.* (2011) et Cagno *et al.* (2011) affirment que dans les zones brunes l'état d'oxydation majoritaire est de 4+ dans tous les types de brunissement observés. Dans le travail de Nuyts *et al.* (2015), des cartographies obtenues par  $\mu$ -XANES à l'intérieur de l'échantillon ont déterminé l'état d'oxydation moyen de Mn : à l'intérieur des zones brunes, il a un état d'oxydation moyen de 3,5 alors qu'il est de 2,6 dans la couche d'altération non brunie et de 2,4 dans le bulk. Ces travaux identifient  $\text{MnO}_2$  comme étant la phase principale présente dans les zones brunies.



Doménech-Carbó *et al.* (2001) ont effectué une caractérisation électrochimique de phases brunes d'échantillons de verres archéologiques par voltammétrie. Ces mesures ont montré des réponses différentes correspondantes à  $\gamma$ -MnO et à la pyrolusite, en accord avec les résultats de Schalm *et al.* (2011) et Cagno *et al.* (2011).

Les travaux antérieurs conduits au LGE (Ferrand, 2013; Ferrand *et al.*, 2015) montrent toutefois que le Mn dans les phases brunes a un état d'oxydation plus proche de 3+ et que celui-ci peut varier d'un échantillon à un autre. Notamment ils ont mis en évidence une corrélation entre l'extension de la phase brune et son état d'oxydation, suggérant ainsi que plusieurs phases de brunissement au Mn existent selon l'avancement du degré d'altération.

Pour toutes ces études, l'identification et caractérisation de ces phases brunes s'avère complexe (Cagno *et al.*, 2011; Schalm *et al.*, 2011; Nuyts *et al.*, 2015; Ferrand *et al.*, 2015) et les mécanismes menant à son apparition restent mal compris.

Certaines études (Perez y Jorba *et al.*, 1980; Oriol *et al.*, 2007; Ferrand, 2013) ont supposé un apport microbiologique à la formation de ce phénomène *via* l'oxydation du Mn par voie biotique. Toutefois, aucune preuve expérimentale d'une origine microbiologique de ce phénomène est connue aujourd'hui. Toutefois, Drewello et Weissmann (1997) reportent un cas d'étude où une plus grande population microbienne a pu être rencontrée sur un verre pourpre contenant du Mn par rapport à d'autres pièces de verres sans Mn exposées aux mêmes conditions environnementales, ceci suggère un intérêt nutritif de cet élément pour certains microorganismes.

## 1.4 La bioaltération

La bioaltération consiste en l'interaction entre les microorganismes et la surface d'un solide inorganique (minéral ou verre) qui mène à une dégradation physico-chimique de ce dernier. Dans cette partie, nous présenterons les mécanismes connus de bioaltération pour des minéraux et verres naturels et artificiels.

Sterpenich (1998) reporte la présence de champignons, bactéries et algues sur les échantillons de vitraux sur verrière. Depuis, d'autres études ont identifié des microorganismes présents sur les vitraux, et ont pu mettre en évidence une large variété de champignons et bactéries (Marvasi *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2014; Rölleke *et al.*, 1999; Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2001a,b; Carmona *et al.*, 2006). Müller *et al.* (2001) ont caractérisé des biofilms de l'épaisseur entre 10 et 60  $\mu\text{m}$  en surface d'un vitrail.

L'interprétation des symptômes de la bioaltération du verre du patrimoine est discuté dans la littérature Krumbein *et al.* (1991); Drewello et Weissmann (1997); Gorbushina et Palinska (1999); Carmona *et al.* (2006); Rodrigues *et al.* (2014) mais il manque une description détaillée des mécanismes d'altération.

Dans l'environnement, les microorganismes peuvent influencer la dissolution d'oxydes, minéraux et verres par *voie directe*, i.e. par attachement direct des cellules à la surface en constituant des biofilms, ou par *voie indirecte* à travers le changement local des conditions de pH et redox ou à travers la production de métabolites qui vont interagir avec certains éléments présents à la surface des solides (Staudigel *et al.*, 1995; Ahmed et Holmström, 2014; Perez *et al.*, 2015, 2016).

Ces interactions sont généralement attribuées à un besoin en nutriments (Bennett *et al.*, 2001; Rogers et Bennett, 2004; Henri *et al.*, 2016). En effet, les roches sont des réservoirs d'éléments nutritifs pour les microorganismes (Uroz *et al.*, 2009; Dong, 2010; Ng *et al.*, 2016). La composition du substrat peut avoir un effet sur la nature et la distribution de la communauté microbiologique, cela a été notamment observé pour les sols et a donné origine au terme de "minéralosphère" pour indiquer que les minéraux favorisent le développement de certaines communautés microbiennes sur la base de leur minéralogie, contenu nutritif et capacité d'altération (Uroz *et al.*, 2015; Kelly *et al.*, 2016; Colin *et al.*, 2017). Certains éléments comme le K, P, Ca, Mg, Fe sont des macro et micro-nutriments qui peuvent être trouvés dans plusieurs minéraux, oxydes et verres naturels (Calvaruso *et al.*, 2013). Le K est nécessaire au fonctionnement de plusieurs enzymes, comme par exemple celles impliquées dans la synthèse protéique. Fe, Mg et Ca sont également des cofacteurs d'enzymes et protéines (Andreini *et al.*, 2008). Le P est lui-même un constituant des acides nucléiques et des phospholipides. Le manque de ces éléments peut donc compromettre d'importants processus nécessaires à la survie de l'organisme. D'autres éléments comme Mn, Co, Zn, Cu, Mo sont considérés des micro-nutriments et ont eux aussi des rôles de cofacteurs d'enzymes (Kehres et Maguire, 2003).

L'effet direct le plus facile à observer que les microorganismes peuvent avoir sur l'altération de verres et minéraux est l'effet mécanique que certains filaments fongiques ou exopolymères bactériens peuvent avoir sur les surfaces colonisées, endommageant la surface en créant des fractures et en laissant des empreintes (Brehm *et al.*, 2005; Thorseth *et al.*, 2003, 1995; Rodrigues *et al.*, 2014). Toutefois l'effet direct peut être aussi d'origine chimique. La surface cellulaire des bactéries contient en effet de larges quantités de groupes fonctionnels carboxyl, hydroxyl et phosphoryl, ainsi que des exométabolites composés de longues molécules de sucres, ou encore des morceaux de cellules bactériennes mortes ou lysées (Stockmann *et al.*, 2012) qui peuvent interagir avec la surface sur laquelle ces microorganismes vivent. La colonisation d'une surface et la formation d'un biofilm permettent aux microorganismes de mieux résister au stress environnemental.

En ce qui concerne la production de métabolites ayant des propriétés altérantes, les deux familles les plus importantes d'exsudats sont les sidérophores et les acides organiques. Dans l'environnement, la plupart des bactéries et des champignons produisent des sidérophores (Haselwandter, 1995; Renshaw *et al.*, 2002; Saha *et al.*, 2015) et des acides organiques (Gadd, 1999; Calvaruso *et al.*, 2013). Les sidérophores sont des ligands complexant préférentiellement le Fe(III) (Saha *et al.*, 2012; Ahmed et Holmström, 2014; Khan *et al.*, 2018). La biosynthèse des sidérophores permet aux bactéries d'accéder au Fe présent dans le système et d'augmenter sa solubilité et biodisponibilité (Kraemer, 2004).

Si le terme de sidérophore fait étymologiquement référence à la complexation du Fe, ces molécules sont capables de complexer d'autres éléments métalliques comme par exemple le Co ou le Mn et ces réactions de complexation peuvent être en compétition avec celles impliquant le Fe lorsque plusieurs cations coexistent (Kalinowski *et al.*, 2000b; Rogers et Bennett, 2004; Duckworth *et al.*, 2009; Braud *et al.*, 2009; Akafia *et al.*, 2014; Peña *et al.*, 2007).

Les sidérophores sont des molécules de masse moléculaire faible. Ils peuvent être divisés en plusieurs familles selon les groupes fonctionnels qui les caractérisent et qui interviennent

dans la formation des complexes métalliques. Les deux plus répandues sont les cathécolds et les hydroxamates (Kalinowski *et al.*, 2000b) 2000). La desferioxamine B (DFOB), un des sidérophores qu'on rencontrera dans ce travail, est abondamment décrite et utilisée dans la littérature en tant que sidérophore modèle de la famille des hydroxamates (Figure 1.10a). Un autre sidérophore qui sera rencontré au cours de cette thèse est la pyoverdine (PVD). Elle présente deux groupes hydroxamate et un groupe catécholate, mais aussi un dihydroxiquinoline faisant partie d'une portion de la molécule fluorochromophore (Figure 1.10b). Cette molécule montre des altérations de fluorescence suite à la complexation de Fe(III) ou Mn(III). Les sidérophores peuvent être dégradé après l'assimilation d'élément complexé par le microorganisme, ou fonctionner de façon catalytique en recommencent le procédé (Kalinowski *et al.*, 2000a).

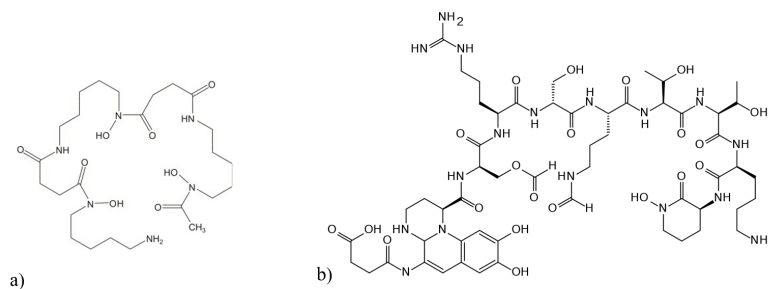


FIGURE 1.10 – Structure des sidérophores a) DFOB et b) PVD

Les acides organiques les plus couramment produits par les microorganismes sont les acides oxalique, citrique, acétique, fumarique et malique (Gadd, 1999; Neaman *et al.*, 2005; Calvaruso *et al.*, 2013). Ces acides sont eux aussi capables de former des complexes avec des cations métalliques, mais les constantes de complexation ( $\log K$  autour de 8-10) sont largement plus faibles que celles des sidérophores ( $\log K$  autour de 30-40) (Kalinowski *et al.*, 2000b; Perez *et al.*, 2015). Cette différence de constantes de complexation se reflète sur l'impact sur la dissolution des minéraux. Les sidérophores, malgré leurs très faibles concentrations dans les écosystèmes naturels (de l'ordre de quelques nM ou mM dans des microniches bactériennes), ont un effet beaucoup plus marqué que les acides organiques. Toutefois, il faut garder en tête que les systèmes réels sont très complexes et que plusieurs sidérophores et acides organiques peuvent agir simultanément (Cheah *et al.*, 2003; Akafia *et al.*, 2014; Saal et Duckworth, 2010).

En conclusion, 5 effets potentiels principaux de la bioaltération peuvent être identifiés.

*La biolixiviation* causée par la production de la part des microorganismes d'acides organiques et inorganiques, enzymes et métabolites qui peuvent agir comme ligands spécifiques pour les éléments du verre. Le travail de Perez (2015) a montré que les bactéries peuvent accélérer l'altération des verres basaltiques par la complexation du Fe.

*La biofracturation* par stress mécanique causée par des filaments de microorganismes (comme par exemple les hyphae des champignons). Gorbushina et Palinska (1999); Rodrigues *et al.* (2014); Corrêa Pinto *et al.* (2019), lors de tests de bioaltération de verres modèles au laboratoire, ont montré que les spores fongiques inoculées étaient capables de développer une grande quantité de mycélium et que les formes d'altération majeures observées étaient la formation de petits cristaux, des empreintes des hyphae fongiques,

des cratères, et une rugosité de surface. Brehm *et al.* (2005) ont montré que plusieurs bactéries peuvent également laisser des empreintes sur la surface du verre et de minéraux.

*La biocatalyse* causée par la rétention d'eau dans le biofilm composé de substances polymériques extracellulaires. Liermann *et al.* (2000a) ont par exemple montré que des gradients de pH peuvent être rencontrés au sein des biofilms.

*La biocoloration* par oxydation de métaux traces comme Fe et Mn ou par la présence de microorganismes pigmentés (Perez y Jorba *et al.*, 1980; Müller, 1999).

*La biominéralisation* car, en mobilisant les éléments/nutriments souvent présent sous une forme insoluble, les microorganismes peuvent induire des phénomènes de reprecipitation, de transformation de minéraux et de synthèse de minéraux biogéniques (Uroz *et al.*, 2009; Benzerara *et al.*, 2011) participant ainsi aux cycles biogéochimiques de plusieurs éléments.

Ces effets sont concomitants et donc complexe à identifier séparément.

## 1.5 Le manganèse

### *Le Mn dans le verre*

Comme anticipé dans l'introduction générale, le Mn était introduit par les verriers soit pour obtenir des verres incolores, soit pour produire des teintes pourpres et rosées. La couleur dans le verre est due à la présence de métaux de transition. La coloration est observée en raison de l'absorption de la lumière dans le domaine du visible par des transitions électroniques entre les niveaux  $3d$  de ces éléments. La valeur de l'énergie qui va être absorbée dépend de la nature de l'élément, de son degré d'oxydation, de la géométrie locale du site dans lequel le métal se trouve, et de son environnement chimique (Abuín *et al.*, 2013; Arletti *et al.*, 2012; Hunault, 2014).

Le ion  $\text{Fe}^{2+}$  présente 4 électrons  $3d$  ( $d^4$ ), ce qui lui permet d'avoir des transitions électroniques  $d-d$ , absorber de la lumière, et par conséquent donner une coloration verdâtre au verre. De la même façon  $\text{Mn}^{3+}$  est un  $d^4$  et il est capable d'absorber de l'énergie et donner une coloration pourpre au verre. Au contraire, les espèces  $\text{Fe}^{3+}$  et  $\text{Mn}^{2+}$  sont des  $d^5$ , et n'absorbent pas d'énergie (espèces incolores) car les transitions électroniques dans cette configuration ne sont pas permises par les règles de sélection. C'est en exploitant ces principes physiques qu'il est possible obtenir un verre incolore ou faiblement coloré. L'introduction du Mn dans la composition du verre (présentant des impureté de Fe) permet de déplacer l'équilibre redox vers le couple d'espèces incolores  $\text{Fe}^{3+} / \text{Mn}^{2+}$ .

Cela dit, des transitions non permises théoriquement peuvent malgré tout se passer, c'est pour cela qu'une coloration rose pâle peut être observée pour les sels de  $\text{Mn}^{2+}$  comme  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{MnCO}_3$  et  $\text{MnSO}_4$ .

L'étude de la couleur dans les verres est un sujet encore propice à de nombreuses explorations. Pour des mélanges Fe/Mn à des rapports différents, restent à déterminer avec précision les pourcentages de  $\text{Mn}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  et  $\text{Mn}^{3+}$  présents. L'influence, notamment, de la composition du verre, de la température de fusion, de l'atmosphère du four, de la réalisation d'un recuit ou pas, sur la distribution de ces espèces est à fouiller. Cette thématique de recherche est rendue compliquée par la difficulté de l'étude du redox du Mn dans le verre, qui subit des phénomènes de photoréduction sous faisceau lors des

analyses (Chalmin *et al.*, 2009; Ferrand *et al.*, 2015; Nuyts *et al.*, 2015).

### Biogéochimie du Mn

Dans l'environnement, le Mn est présent principalement sous trois de ses états d'oxydation : Mn(II) qui peut exister comme ion soluble, Mn(III) et Mn(IV) qui se trouvent typiquement sous forme de minéraux insolubles. Le Mn(III) soluble est considéré comme très rare, sauf s'il est stabilisé par complexation avec des ligands comme l'oxalate, le citrate ou le pyrophosphate.

Les oxydes et hydroxydes de manganèse sont un exemple remarquable de diversité d'états d'oxydation. Parmi les plus étudiés on trouve l'hausmannite ( $\text{Mn}_3\text{O}_4$ ), la pyrolusite ( $\text{MnO}_2$ ) la manganite ( $\text{MnOOH}$ ) et la birnessite (un fillomanganate de Na).

L'oxydation du manganèse en conditions abiotique est un processus qui peut se passer en plusieurs étapes. Sun *et al.* (2019) ont calculé que même à l'intérieur de la même région de stabilité du diagramme Eh-pH de Pourbaix, des faibles variations de pH et de potentiel redox peuvent redirectionner le chemin de cristallisation à travers plusieurs intermédiaires métastables. Le diagramme de Pourbaix en Figure 1.11 montre que le  $\text{Mn}^{2+}$  est stable en solution à pH acide et neutre, tandis que à pH basique sa précipitation est favorisée, ainsi que son oxydation.

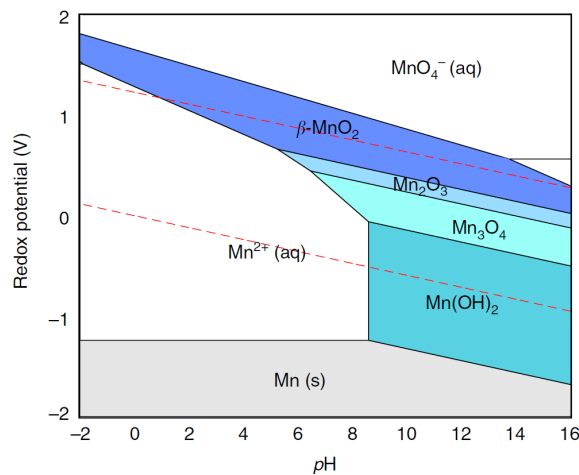


FIGURE 1.11 – Diagramme Eh-pH de Pourbaix reportant les régions de stabilité du système d'équilibre Mn-O-H. Les lignes pointillées en rouge indiquent la fenêtre de stabilité redox de l'eau. Tiré de Sun *et al.* (2019)

Sur la base d'expériences de laboratoire, l'oxydation abiotique de Mn(II) à Mn(IV) se passe à travers un processus en deux étapes, dans lequel une phase solide d'oxydes ou oxyhydroxydes de Mn(III) se forme pour ensuite former les oxydes de Mn(IV) par disproportion Tebo *et al.* (2004).

Webb *et al.* (2005) ont montré que l'oxydation bactérienne de Mn(II) à Mn(IV) passe également par une étape intermédiaire de Mn(III), en accord avec le mécanisme à un électron connu pour les enzymes 'multi-copper oxidase' et proposé pour cette transformation.

La production d'oxydes de Mn par voie biotique a été décrite et bien documentée principalement pour trois bactéries modèle : les souches MnB1 et GB-1 de *Pseudomonas*

*putida* (Villalobos *et al.*, 2003, 2006; Tebo *et al.*, 2004; Toner *et al.*, 2005), la souche SS-1 de *Leptothrix discophora* (Saratovsky *et al.*, 2006; Tebo *et al.*, 2004) et *Bacillus sp.* strain SG-1 (Mandernack *et al.*, 1995; Webb *et al.*, 2005; Tebo *et al.*, 2004).

Ces trois bactéries sont phylogénétiquement différentes et représentent respectivement les beta-proteobacteria, les gamma-proteobacteria et les low-GC Gram-positive bacteria (Tebo *et al.*, 2004). Toutes les trois oxydent Mn(II) par voie enzymatique sur une matrice exopolymérique entourant la cellule. Du point de vue génétique, les trois bactéries partagent des gènes qui sont impliqués dans l'oxydation du Mn à travers les enzymes *multicopper oxidase*, mais le rôle direct de cet enzyme dans le processus d'oxydation de Mn(II) reste une hypothèse (Tebo *et al.*, 2004).

L'oxyde produit par *P. putida* a été caractérisé par Villalobos *et al.* (2003) et il a été décrit comme un oxyde de Mn(IV) (état d'oxydation moyen 3,9) faiblement cristallin de type birnessite.

De nombreuses autres bactéries sont connues pour être capables d'oxyder le Mn (Yang *et al.*, 2013), mais également d'autres organismes, comme des champignons et des plantes sont capables de produire des minéraux de Mn (Lanson *et al.*, 2008; Grangeon *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2013). Grangeon *et al.* (2010) ont étudié par spectroscopie XANES et EXAFS des oxydes de Mn produits par une souche de champignon. L'oxydation favorisée par le champignon du Mn<sup>2+</sup> aqueux produit des oxydes de Mn en couche analogues de la vernadite, une version nanostructurée de la birnessite. Des oxydes mixtes de Mn et Zn produits par des racines de plantes ont également été décrits par Lanson *et al.* (2008).

## 1.6 Conclusions

Le phénomène de brunissement a origine dans le cadre déjà complexe de l'altération du verre décrit dans ce chapitre, dans des conditions d'exposition du vitrail variables et discontinues caractérisées par des cycles de séchage et mouillage/condensation.

L'hypothèse microbiologique de son origine apporte une richesse de mécanismes possibles d'interaction entre les microorganismes et le substrat verre. Enfin, l'implication du Mn dans ce phénomène fait également rentrer en jeu la biogéochimie de cet élément et son rôle dans le verre.

L'étude du brunissement des vitraux est donc un sujet clé pour la préservation de ce patrimoine, qui donne l'opportunité de mieux comprendre la relation entre la composition/structure du verre et le comportement en altération, car il implique le Mn d'une part et le rôle des microorganismes sur les mécanismes et cinétiques d'altération d'autre part.

# Chapitre 2

## Matériels et Méthodes

Ce chapitre regroupe l'ensemble des protocoles d'étude et d'analyse mis en œuvre au cours de cette thèse.

La première partie présente les sites et les méthodes de prélèvement et d'identification de bactéries et champignons microscopiques sur des vitraux en place ou en atelier de restauration. Ces prélèvements ont été possibles grâce à Claudine Loisel du LRMH qui m'a permis de venir prélever lors de visites sur des chantiers de restauration.

La deuxième partie décrit les protocoles de synthèse et de mise en forme des échantillons de verre utilisés dans les expériences d'altération, aussi que les résultats de caractérisation du verre et des échantillons obtenus.

La troisième partie présente les protocoles suivis pour la réalisation des expériences d'altération. Sont reportés d'abord les protocoles d'altération et de caractérisation des solutions utilisées lors des tests de dissolution du verre en conditions abiotiques et biotiques indirectes et directes (axe de recherche 1). Ensuite les protocoles d'altération et de caractérisation des échantillons utilisés pour la reproduction des phases brunes de façon abiotique et biotique (axe de recherche 2) sont reportés.

Pour la plupart des techniques rencontrées, un encadré intitulé "en quelques mots..." a été inséré avec un résumé des principes théoriques pour la technique en question.

### 2.1 Prélèvement et identification de microorganismes sur vitraux

La méthode classique de prélèvement et d'identification est celle de la mise en culture des microorganismes prélevés sur le terrain et de leur identification à l'aide de galeries d'identification. Une étude de ce type a été menée par Oriol *et al.* (2007) sur des échantillons de vitraux anciens stockés dans le dépôt du LRMH. Les échantillons de verre ont été placés en chambre humide sur un lit d'argile pendant 6 semaines à T ambiante, sans additif nutritif, afin de réactiver la flore microbienne. Les bactéries ont été identifiées sur la galerie API 20 NE, qui permet une identification limitée de la flore bactérienne. Une limite de cette méthode est aussi le fait qu'elle permet d'étudier seulement les souches qui sont adaptés aux conditions de laboratoires. En général, seul 1 % des microorganismes environ est cultivable *in vitro* (Rölleke *et al.*, 1999).

Avec l'évolution des techniques, l'identification des microorganismes est effectuée au-



jourd'hui principalement à l'aide des méthodes moléculaires de séquençage de l'ADN. L'ADNr 16S, c'est à dire le gène de l'ADN codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomique (les ribosomes étant des structures cellulaires impliquées dans la synthèse protéique) est typiquement utilisé dans le cas des bactéries. Celui-ci est couramment utilisé lors des études d'identification et de phylogénétique parce-que il présente des régions dites conservées et des régions variables et hypervariables qui permettent de construire des arbres phylogénétiques sur la base des similarités entre les bactéries et d'en déduire des distances évolutives.

En outre, les techniques modernes de génomique essaient désormais de ne pas passer par l'étape de mise en culture, grâce à la métagénomique qui permet de séquencer le génome de plusieurs individus d'espèces différents en même temps. Une analyse typique de métagénomique donne des informations sur les espèces présentes, leurs abondances relatives et leurs diversités. Toutefois, la métagénomique peut également présenter des biais, notamment l'impossibilité de différencier si l'ADN prélevé est associé à des espèces vivantes ou mortes.

Dans cette étude, des méthodes moléculaires ont été utilisées pour une identification fiable et précise des souches bactériennes présentes, mais le passage par la mise en culture a tout de même été nécessaire. La quantité et la variété des microorganismes réellement présentes sur les vitraux ont donc certainement été sous-estimées. Toutefois, ayant comme objectif à long terme d'identifier des souches utilisables pour des tests de bioaltération, il était nécessaire de pouvoir isoler ces microorganismes et que les souches identifiées soient facilement cultivables en conditions de laboratoire.

### 2.1.1 Les sites et points de prélèvement

Au cours de cette thèse, trois campagnes d'échantillonnage ont été réalisées sur des vitraux. Le vitraux de La Chapelle Royale du Château de Versailles et de l'église Saint-Etienne à Bar-sur-Seine dans l'Aube ont été échantillonnés *in situ* (sites en restauration et accessibles par échafaudage). Des prélèvements ont été effectués en atelier de restauration (Atelier Parot, Dijon) sur les vitraux déposés de l'Abbaye de Lachalade (Lorraine) et de l'Église abbatiale de Wissembourg (Alsace).

Différentes stratégies de prélèvement ont été adoptées afin de mettre en évidence d'éventuelles diversités de population microbienne en faisant varier les conditions d'exposition et de substrats de croissance. On peut en effet se demander s'il existe des différences de communautés microbiennes en face externe ou en face interne d'un vitrail *in situ* par exemple, ou si l'exposition Nord-Est-Sud-Ouest peut avoir une influence sur la distribution des communautés microbiennes. Enfin, une des questions était de savoir si on pouvait cibler dès les prélèvements les microorganismes aptes à l'utilisation du Mn.

Ces stratégies devaient bien entendu être compatibles avec les limitations imposées par l'accès aux vitraux et varient donc selon les sites de prélèvement.

La Chapelle Royale fait partie du Château de Versailles et a été réalisée entre 1700 et 1710 à la fin du règne de Louis XIV. Pour ce site, qui ne présente pas de phénomène de brunissement, cinq prélèvements ont été effectués à l'extérieur avec différentes expositions (Nord, Est, Sud, Ouest) et uniquement sur des endroits incolores du vitrail, en absence de

peinture ou grisaille. Seuls trois endroits ont été échantillonnés à l'intérieur, dont deux sur verres incolores et un sur un verre avec émail de couleur bleu. En Figure 2.1 sont montrées des photos des vitraux échantillonnés sur site et le plan de l'église avec le positionnement des panneaux échantillonnés.

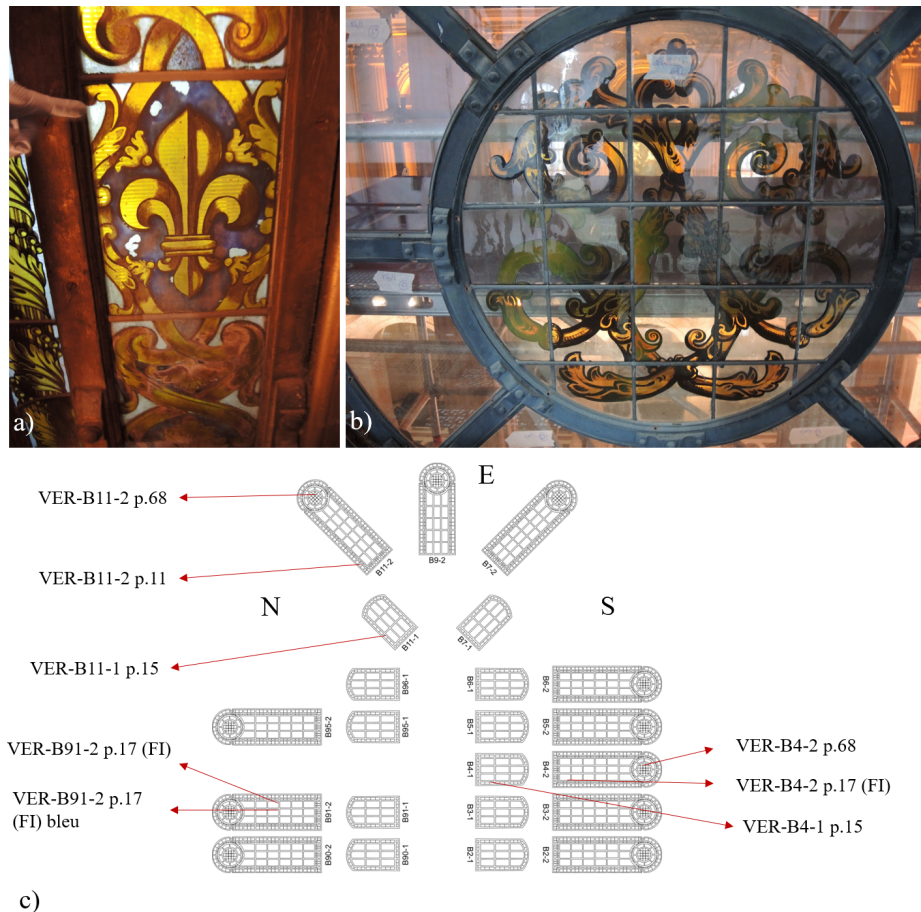


FIGURE 2.1 – Site de Versailles. Photos des vitraux échantillonnés en a) face interne et b) face externe. c) Prélèvements de la Chapelle Royale de Versailles indiqués sur un plan tiré de Didier (2017).

Le deuxième site de prélèvement est situé à Bar-sur-Seine dans l'Aube sur l'Église Saint Étienne. Réalisée entre 1505 et 1616, cette église mêle des éléments d'architecture classique à une architecture d'un gothique flamboyant. Les verrières hagiographiques à grisaille décorative sont pour la plupart datées du XVI<sup>e</sup> siècle et ne présentent pas de phénomène de brunissement. Les prélèvements ont été réalisés selon différentes expositions, sept en face externe et sept en face interne. Ce sont des vitraux peints, les échantillons ont donc été collectés, quand possible, à des endroits absents de peinture. En Figure 2.2, des photos des vitraux échantillonnés sur site et le plan de l'église avec le positionnement des panneaux échantillonnés.

Pour les vitraux de l'atelier de restauration, un panneau a été choisi pour le site de Wissembourg et trois panneaux pour le site de Lachalade. Les vitraux de ces deux sites sont atteints par la pathologie du brunissement et les prélèvements ont donc été effectués

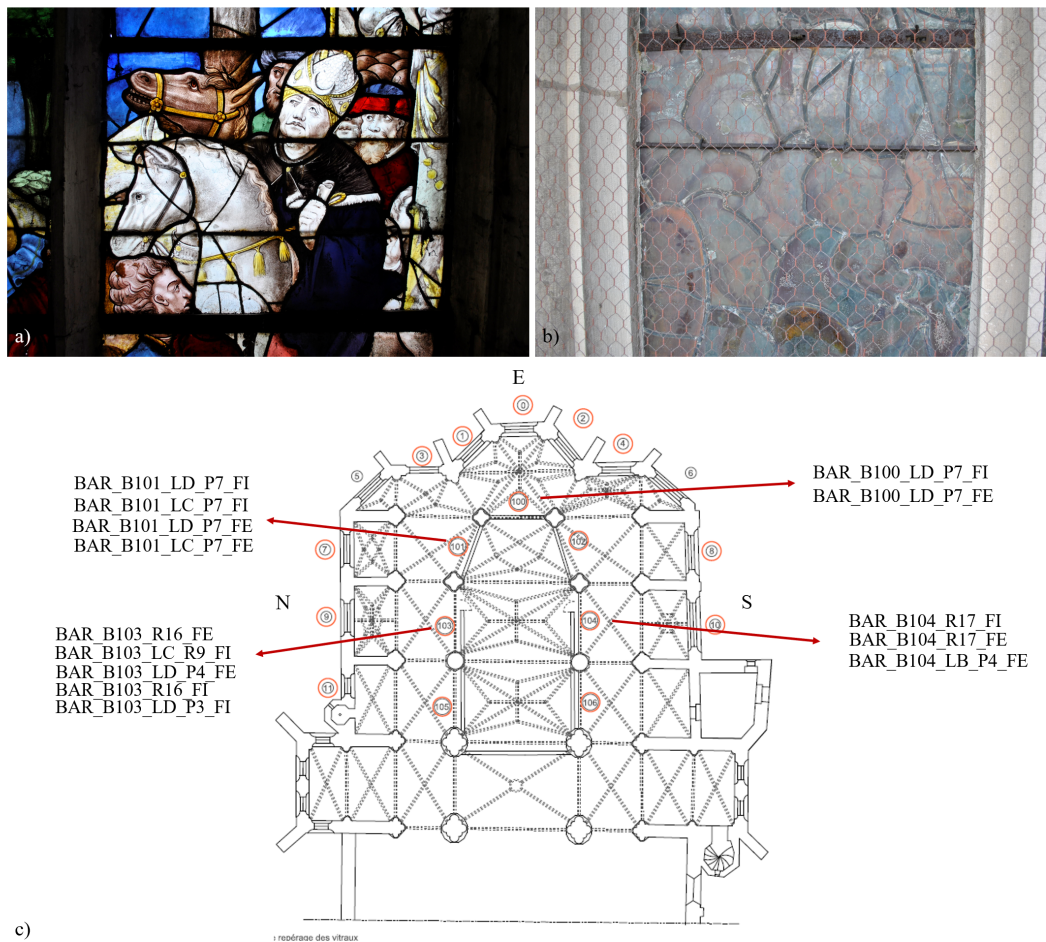


FIGURE 2.2 – Site de Bar-sur-Seine. Photos des vitraux échantillonnés en a) face interne et b) face externe. c) Prélèvements de l’église Saint-Etienne à Bar-sur-Seine indiqués sur un plan tiré de Prache *et al.* (1992).

en correspondance des taches brunes caractéristiques de ce phénomène.

L’Église abbatiale Saint-Pierre et Saint-Paul de Wissembourg est une importante église gothique d’Alsace. La première partie date du XI<sup>e</sup> siècle avec la construction d’une abbatale de style roman. La réalisation des vitraux du chœur date du XII<sup>e</sup> siècle. Quatre points ont été échantillonnés sur le panneau choisi, deux en face interne et deux en face externe. Il faut souligner que ce panneau était entièrement recouvert d’une patine brune probablement appliquée au XIX<sup>e</sup> siècle pour assombrir les panneaux (Figure 2.3). En Figure 2.3 sont reportées des photos du vitrail échantillonné et le plan de l’église avec le positionnement original du panneau.

L’abbaye de Lachalade est une abbaye cistercienne dont la construction est entreprise vers 1127, mais elle est reprise et terminée vers 1340 sous l’influence de l’art gothique. Les vitraux du chœur comportent des parties en grisaille datant du XIII<sup>e</sup> siècle - début du XIV<sup>e</sup>. Deux prélèvements en face interne ont été effectués pour chacun des trois panneaux choisis, pour un total de six prélèvements. En Figure 2.4 sont visibles des photos des vitraux échantillonnés et le plan de l’église avec le positionnement original des panneaux.

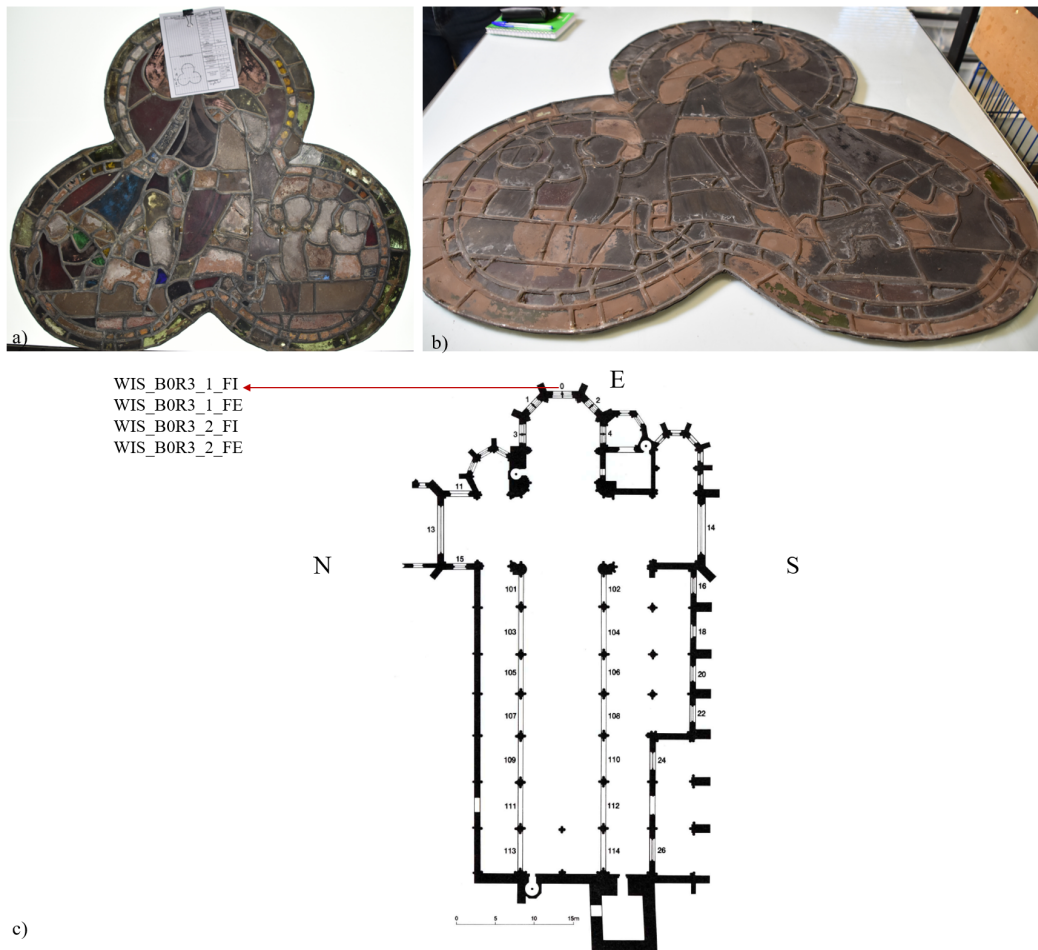


FIGURE 2.3 – Site de Wissembourg. Photos prises à l’Atelier Parot du panneau B0R3 échantillonné en a) face interne et b) face externe. c) Prélèvements de l’église abbatiale Saint-Pierre et Saint-Paul indiqués sur un plan tiré de Hérold et Gatouillat (1994).

La liste totale des prélèvements effectués est disponible dans le Tableau 2.1.

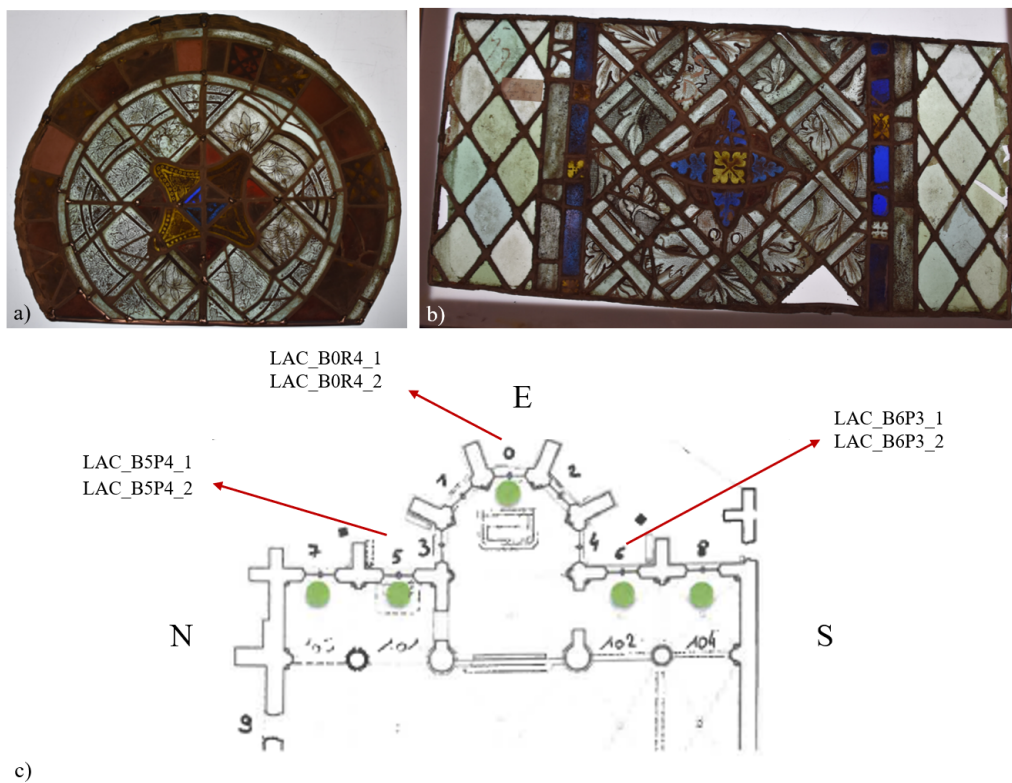


FIGURE 2.4 – Site de Lachalade. Photos prises à l’Atelier Parot de deux des panneaux échantillonnés : a) B0R4, et b) B5P4. c) Prélèvements de l’Abbaye de Lachalade indiqués sur un plan tiré de Vincent-Petit (2016).

| Site          | Nom du prélèvement    |
|---------------|-----------------------|
| Lachalade     | LAC_B5P4_1            |
|               | LAC_B5P4_2            |
|               | LAC_B6P3_1            |
|               | LAC_B6P3_2            |
|               | LAC_B0R4_1            |
|               | LAC_B0R4_2            |
| Wissembourg   | WIS_B0R3_1_FI         |
|               | WIS_B0R3_1_FE         |
|               | WIS_B0R3_2_FI         |
|               | WIS_B0R3_2_FE         |
| Versailles    | VER_B11-2_P68         |
|               | VER_B11-2_P11         |
|               | VER_B11-1_P15         |
|               | VER_B91-2_P17_FI      |
|               | VER_B91-2_P17_FI_bleu |
|               | VER_B4-2_P68          |
|               | VER_B4-2_P17_FI       |
|               | VER_B4-1_P15          |
| Bar sur Seine | BAR_B100_LD_P7_FI     |
|               | BAR_B100_LD_P7_FE     |
|               | BAR_B101_LD_P7_FI     |
|               | BAR_B101_LC_P7_FI     |
|               | BAR_B101_LD_P7_FE     |
|               | BAR_B101_LC_P7_FE     |
|               | BAR_B103_R16_FE       |
|               | BAR_B103_R16_FI       |
|               | BAR_B103_LC_R9_FI     |
|               | BAR_B103_LD_P4_FE     |
|               | BAR_B103_LD_P3_FI     |
|               | BAR_B104_LB_P4_FE     |
|               | BAR_B104_R17_FE       |
|               | BAR_B104_R17_FI       |

TABLEAU 2.1 – Liste des prélèvements effectués pour chaque site. Nomenclature : baie (B), panneau (P), réseau (R), face interne (FI), face externe (FE).

### 2.1.2 Méthodes de prélèvement et mise en culture de microorganismes

Les prélèvements ont été effectués par frottage du vitrail avec l'extrémité d'un écouvillon stérile humidifié avec une solution de KCl 9 g/l stérile. Les microorganismes prélevés sur chaque écouvillon ont été ensemencés sur quatre milieux de culture gélosés différents préalablement préparés au laboratoire. Le milieu pauvre MMV a été préparé en modifiant le milieu minimum MM9 (Liermann *et al.*, 2000b; Perez *et al.*, 2016, 2019) en ajustant les proportions des différents éléments afin de reproduire les proportions des éléments du verre (BisTris 50 mM, NH<sub>4</sub>Cl 1g/l, NaCl 0,5 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,3 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,02 g/l, CaCl<sub>2</sub> 0,2 g/l, MgSO<sub>4</sub> 0,1 g/l, glucose 1 g/l, pH 6,5). Le but de l'utilisation d'un milieu pauvre ayant les mêmes éléments nutritifs que ceux présents dans un vitrail était de cibler les microorganismes adaptés à la vie sur un environnement de "type vitrail". Un milieu riche LB (Lisogen Broth) de composition NaCl 10 g/l, peptone 10 g/l, extrait de levure 5 g/l a également été préparé afin de s'assurer de la croissance de microorganismes. Pour les deux milieux LB et MMV, des boîtes de Petri avec 0,1 g/l de MnSO<sub>4</sub> ont également été préparées (LB-Mn et MMV-Mn) dans le but de cibler les microorganismes aptes à l'utilisation du Mn.

Les boîtes de Petri inoculées ont été incubées à 25°C pour des durées de temps variables. Les moisissures et bactéries qui se sont développés sur les milieux de culture ont ensuite été isolées. Ces nouveaux isolements ont été faits dans certains cas par repiquage direct avec anse stérile et ensemencement sur boîte de Petri fraîche de milieu LB pour les bactéries et de milieu Potato Dextrose Agar (PDA) de composition 20 g/l de dextrose, 4 g/l de extrait de pommes de terre, 15 g/l d'agar à pH 5,6 pour les champignons. Dans certains cas, quand le repicage direct ne suffisait pas à faire développer la bactérie sur le nouveau milieu, une étape de mise en culture liquide (dans un milieu LB) a été nécessaire avant de passer à une culture sur boîte de Petri fraîche. Ces différentes étapes sont illustrées en Figure 2.5.

Une fois les souches isolées sur boîte, les bactéries ont été identifiées par extraction et séquençage d'ADN à partir d'isolats bactériens. L'identification des champignons a été effectuée par Chloé Ranchoux pendant son stage de M2 par observation microscopique des champignons sur lames microbiologiques.

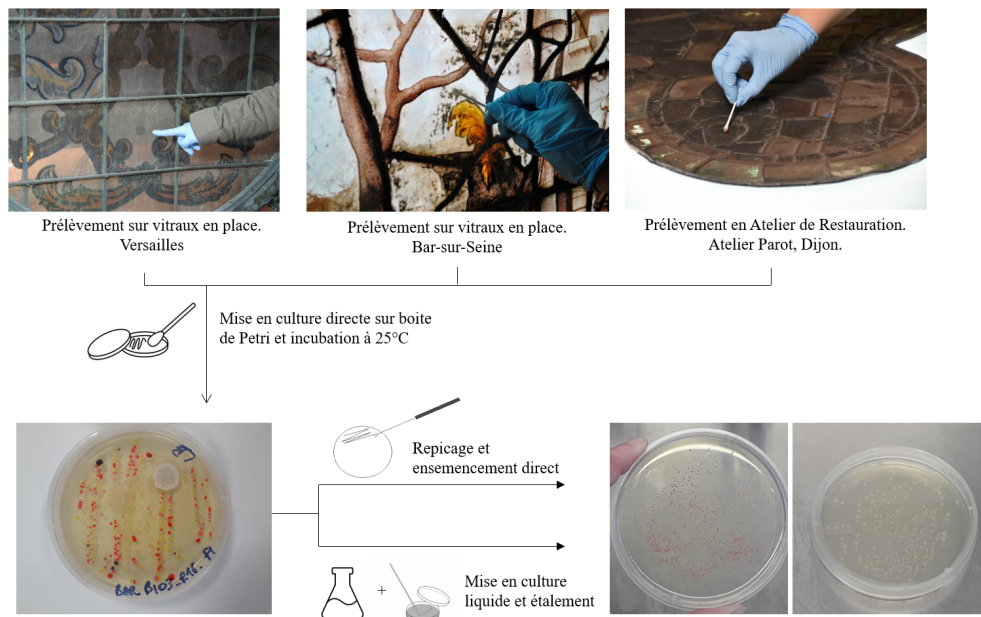


FIGURE 2.5 – Schéma de la méthodologie expérimentale de prélèvement et d'isolement des microorganismes.

### 2.1.3 Identification des bactéries par extraction et séquençage de l'ADN

L'identification des bactéries nécessite plusieurs étapes : une étape d'extraction d'ADN à partir des cellules bactériennes présentes sur les boîtes de Petri, une étape d'amplification du gène codant pour l'ARNr 16s par réaction en chaîne par polymérase (*Polymerase Chain Reaction PCR*), puis une étape de séquençage réalisée par une société extérieure. Les résultats des séquences de bases azotées qui composent l'ADN sont enfin utilisés pour effectuer une recherche par similarité avec une base de données en ligne appelée GenBank par l'intermédiaire du programme d'alignement BLASTn.

#### Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN a été adapté du protocole développé par Edel *et al.* (2001) et prévoit une première étape de lyse cellulaire afin de casser les cellules par lyse mécanique et lyse chimique. Pour cela, 500 µl de tampon de lyse (préparé à partir de 5ml de TrisHCl 1M pH8, 4 ml de EDTA 0,5 M pH8, 10 ml de NaCl 1M, 5 ml de SDS 20 % et 76 ml d'EUP) sont injectés sur la gélose et la surface des colonies est grattée. 500 µl de tampon de lyse sont encore ajoutés pour bien mélanger et pouvoir prélever 500 µl de ce lysat et le placer dans des tubes de 1,5 ml. Ces tubes sont vortexés puis placés au bain-marie pendant 20 minutes à 70°C (lyse thermique). Suit une étape de centrifugation pendant 10 minutes à 4°C et 12000g (10629 rpm). 400 µl de surnageant sont pipetés et introduits dans d'autres tubes de 1,5 ml, alors que le culot composé des parois cellulaires et d'autres composés insolubles est jeté.

L'échantillon est ensuite purifié par précipitation des protéines en ajoutant 40 µl (10



% v/v) de solution d'acétate de potassium. Le mélange est laissé à réagir pendant 15 minutes dans un bain de glace. Suit une étape de centrifugation de 10 minutes à 4°C et 14000 g (11481 rpm).

Le surnageant est alors récupéré et un volume équivalent d'isopropanol conservé à -20°C est ajouté pour précipiter l'ADN présent en solution. Ce mélange est placé à -20°C pendant au moins 15 minutes. Suite à la centrifugation de 20 minutes à 4°C et 15000 g (11884 rpm), le surnageant est jeté et 300 µl d'éthanol à 70 % conservé à -20°C sont ajoutés pour le lavage. Une centrifugation de 5 minutes à 4°C et 15000 g est effectuée et le surnageant est éliminé. Les tubes sont mis à sécher à l'étuve à 37°C pendant 15 minutes jusqu'à élimination complète de l'alcool. Enfin l'ADN présent au fond du tube est mis en suspension dans 100 µl d'EUP.

### Amplification de l'ADN par PCR

Un mélange des réactifs suivants est préparé : 15,05 µl d'H<sub>2</sub>O, 2,5 µl de tampon pour Taq polymérase 10x, 0,75 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 2,5 µl de dNTPs (nucléotides, dNTP Set, Thermo Scientific) 2 mM, 1,5 µl de fD1 10 µM, 1,5 µl de rP2 10 µM (primers/amorces, Eurogentec, cf. encadré PCR pour plus de détails), et en dernier 0,2 µl de Taq polymérase (Taq DNA Polymerase, Native, Invitrogen) 5 U/µl pour un total de 24 µl. Les quantités données sont relatives à un échantillon.

A ce mélange, 1 µl d'extrait d'ADN est ajouté, pour obtenir un volume final de 25 µl. Ce mélange est donc préparé à chaque session en différentes quantités en fonction du nombre d'échantillons extraits à amplifier et est aliquoté dans des tubes de 0,2 ml. Les petits tubes de 0,2 ml avec le mélange de 25 µl sont placés à l'intérieur du thermocycleur PrimeG (Bibby Scientific) et le programme d'amplification de l'ADN 16S (Tableau 2.2) est utilisé.

| étape | température (°C) | temps |
|-------|------------------|-------|
| 1     | 94               | 5'    |
| 2     | 94               | 30"   |
| 3     | 56               | 45"   |
| 4     | 72               | 1'30" |
| 5     | 72               | 10'   |
| 6     | 10               | hold  |

TABLEAU 2.2 – Programme PCR. Les étapes 2,3,4 sont répétées pendant 35 cycles.

A la fin de la PCR, une électrophorèse sur gel est réalisée pour visualiser les résultats et évaluer la quantité d'ADN obtenue afin de vérifier qu'elle est suffisante pour le séquençage. Pendant l'électrophorèse sur gel, les fragments d'ADN se déplacent à travers une matrice de gel grâce à un courant électrique. Les fragments d'ADN sont ainsi séparés selon leur taille. Les fragments d'ADN de la même dimension forment une "bande" sur le gel.

Le gel d'agarose 1,5% (m/V) est préparé par dissolution de poudre d'agarose dans une solution de tampon TAE (tampon Tris 40 mM, acide acétique 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Le mélange est ensuite coulé dans le moule pour électrophorèse muni d'un peigne qui permet la création de puits pour l'introduction des échantillons. Le gel est placé dans une

cuve à électrophorèse (Fisherbrand Système sur gel horizontal Midi Plus, Fisher Scientific) remplie de tampon TAE.

3  $\mu\text{l}$  d'échantillon amplifié sont mélangés avec 3  $\mu\text{l}$  de "loading buffer", de composition 10mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM EDTA, 0,005% bleu de bromohénol et 10% glycérol, et introduits dans les puits. Ce composé permet de déposer les extraits d'ADN au fond des puits et de visualiser la migration des bandes d'ADN.

Dans un des puits, 5  $\mu\text{l}$  de marqueur Thermo Scientific MassRuler Low Range DNA Ladder ready-to-use avec bandes de référence de 80 à 1031 paires de bases, de concentration 60,8 ng/ $\mu\text{l}$  et fourni avec 10mM Tris-HCl (pH 7.6), 60 mM EDTA, 0,03% bleu de bromohénol et 60% glycérol, est ajouté comme référence pour la dimension et la concentration des fragments. L'électrophorèse est alors lancée avec une tension de 100 V pendant 1 heure.

A la fin de l'électrophorèse, le gel est plongé pendant 15 minutes dans une solution de bromure d'éthidium (BET) pour le marquage de l'ADN (visualisation sous UV). Ensuite, le gel est trempé 15 minutes dans l'eau pour laver le BET résiduel, qui est un composé très toxique. Le gel est introduit dans un instrument Quantum - Vilber pour obtenir des images du gel avec la fluorescence donnée par l'ADN lié au BET. Ce composé émet une fluorescence maximale à 330 nm lorsqu'il est lié à l'ADN et est excité par des rayonnements ultravioles.

Le pourcentage de réussite est en général autour de 50%. L'absence de fluorescence en correspondance de certains puits (Figure 2.6) peut être due à une présence trop faible d'ADN ou à la présence d'inhibiteurs de PCR dans les échantillons extraits. Pour vérifier cela, les échantillons qui ne présentent pas de fluorescence sont dilués à partir des échantillons d'extraits d'ADN et la PCR est re-faite, ainsi que le gel. Ceux qui ne présentent pas d'ADN suite à la deuxième PCR après dilution, sont ceux pour lesquels la procédure d'extraction d'ADN n'a pas fonctionné. Pour les autres, la dilution suffit à diminuer la présence d'inhibiteurs tout en gardant une quantité suffisante d'ADN pour l'amplification.

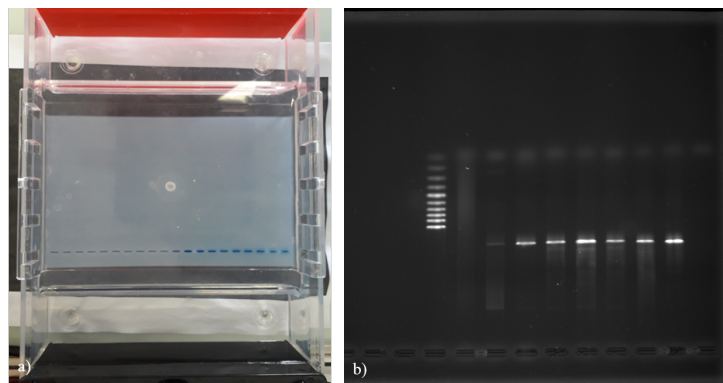


FIGURE 2.6 – Exemple d'un gel d'électrophorèse. a) Avant électrophorèse, les puits où les échantillons (en bleu) ont été déposés sont visibles. b) Après électrophorèse, les bandes fluorescentes observables après migration sur gel correspondent aux échantillons pour lesquels une quantité d'ADN suffisante a été extraite. A gauche, les bandes de fluorescence du ladder sont observables.

L'amplification en chaîne par polymérase (PCR) en quelques mots...

L'amplification en chaîne par polymérase est une méthode de biologie moléculaire d'amplification génique. Elle permet de dupliquer avec un facteur de multiplication de l'ordre du milliard une séquence d'ADN connue, à partir d'une faible quantité (de l'ordre de quelques picogrammes) d'acide nucléique et d'amorces spécifiques. Elle exploite ainsi un processus naturel de duplication de l'ADN. Comme chez les organismes vivants, la PCR nécessite une enzyme ADN polymérase qui produit des nouveaux brins d'ADN à partir de templates existants. La polymérase couramment utilisée est la Taq polymérase (d'après la bactérie thermophile dont elle est extraite *Thermus aquaticus* qui est capable de résister à des températures élevées). Le fonctionnement de la Taq polymérase nécessite des primers (ou amorces), des petites séquences d'environ vingt nucléotides qui représentent un point de départ pour la synthèse, indiquant à la polymérase quelle partie du génome dupliquer. Ces primers sont choisis sur la base de la région d'ADN que l'on souhaite dupliquer. Pour chaque réaction de PCR, deux primers (forward et reverse) sont nécessaires, un pour chaque brin d'ADN, et ils se couplent au template d'ADN à dupliquer par complémentarité des bases. Ainsi ils sont étendus par la polymérase en utilisant des nucléotides libres, les "building blocks", nécessaires pour construire le duplicat d'ADN.

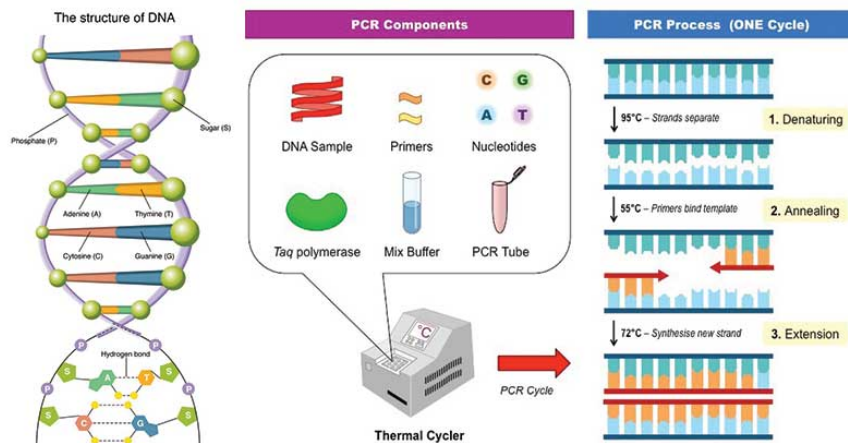


Schéma de l'ADN double brin et des étapes de la PCR avec les réactifs nécessaires. Image tiré de @thebiologynotes.com

La PCR est un processus en trois étapes. L'étape initiale est la dénaturation (séparation) des deux brins d'ADN obtenue en chauffant à une température d'environ 95°C. Chaque brin d'ADN devient un template pour la construction d'un nouveau brin. Lors de la deuxième étape (annealing) la température est diminuée à une température généralement comprise entre 50 et 60 °C, spécifique au couple d'amorces utilisé, pour que les primers puissent se fixer sur chaque brin d'ADN. Pour la troisième étape (extension), la température est augmentée à 72°C, température de fonctionnemnet de l'ADN polymérase pour l'élongation des brins d'ADN. Ce processus dure à peine quelques minutes et recommence plusieurs fois, ainsi le nombre de copies d'ADN est doublé à chaque cycle. En général 25-30 cycles sont nécessaires pour obtenir une quantité suffisante d'ADN.

## Séquençage ADN et comparaison des séquences avec base de données

A partir des images UV du gel d'électrophorèse, l'ADN présent dans chaque échantillon a été quantifié grâce à l'utilisation du logiciel Biovision (Vilber). Cette étape est nécessaire pour évaluer si la concentration obtenue est optimale pour le séquençage. A partir de ces résultats, les échantillons ont été dilués afin d'obtenir une concentration d'ADN d'environ 5 ng/ $\mu$ l dans un volume de 20  $\mu$ l qui est ensuite envoyé pour le séquençage (séquençage Sanger) à l'entreprise privée GenoScreen. Les résultats reçus consistent en des séquences de bases azotées (entre 800 et 1000 paires de bases) identifiées par chromatographie. A titre d'exemple, voici un extrait de séquence obtenu :

```
GAANGNNCTCCCGCANCTCTGCANGATTCTAGATATGTCAA
```

Les lettres représentent des bases azotés C = cytosine, A = adénine G = guanine, T = thymine. Les N sont les bases qui n'ont pas pu être identifiées. Ces séquences de bases azotées ont été utilisées pour effectuer une recherche dans une base de données en ligne GenBank (NCBI), via l'outil informatique BLASTn, qui permet de comparer la séquence de bases azotés avec les séquences enregistrées dans la base de donnée. Un score est donné pour le pourcentage de similarité afin d'estimer le degré de certitude entre la séquence de l'échantillon et les séquences présentes dans la base. Les séquences ont été nettoyées manuellement pour obtenir des valeurs de pourcentage de recouvrement et de similarité élevées en identifiant, quand cela était possible, les bases azotées N qui n'avaient pas été identifiées automatiquement par le séquenceur.

## Analyse phylogénétique et traitement statistique

Le traitement des données concernant les bactéries identifiées a été effectué par J. Leplat. En premier lieu, une analyse phylogénétique a été réalisée, le but étant de construire un arbre phylogénétique montrant la relation de parenté existant entre les souches identifiées et les souches bactériennes connues pour leur capacité à oxyder le Mn (Yang *et al.*, 2013). Seules les séquences pour lesquelles la similarité était supérieure à 95 % ont été gardées, les similarités plus faibles n'étant pas dues à de réelles différences phylogénétiques mais à des séquences de faible qualité. L'alignement multiple des séquences a été réalisé sur le server web MAFFT v. 7 (protocole FFT-NS-2). Un nettoyage de l'alignement multiple a été fait avec le logiciel Gblocks v. 0.91.1 afin d'éliminer les gaps non-informatifs ainsi que les régions ambiguës. La construction de l'arbre phylogénétique par la technique « Maximum-Likelihood » a été réalisé avec le logiciel PhyML avec un modèle de substitution des nucléotides « GTR ». La robustesse des branches de l'arbre a été testée par Bootstrap (100 répétitions). Enfin, le travail de présentation graphique de l'arbre a été fait avec les logiciels MEGA X et Inkscape.

Des analyses statistiques sous R 4.0.1 ont été également effectuées, notamment une analyse en coordonnées principales (PCoA), afin d'étudier la diversité- $\beta$ , c'est-à-dire les différences de communautés bactériennes entre les différents échantillons. Cette procédure est proche d'une analyse en composantes principales, mais est basée sur la construction d'une matrice de dissimilarité (méthode de Bray-Curtis) entre les échantillons et non

sur une matrice de similarité. Le résultat est un graphique en 2D des coordonnées des échantillons sur les 2 premiers axes de l'analyse. La seconde technique utilisée est un hierarchical clustering basé sur la construction d'une matrice de dissimilarité (méthode de Bray-Curtis) à la fois sur les espèces rencontrées et sur les points de prélèvement. Une représentation en Heatmap des résultats permet ainsi de visualiser à la fois les relations de proximité entre les échantillons, les relations entre espèces isolées, et les proportions de chaque espèce retrouvées dans les différents échantillons

### 2.1.4 Identification des champignons par observations microscopiques

Les repiquages de champignons ont été effectués sur milieu PDA. Ce milieu a été choisi car il favorise la production de structures fongiques reconnaissables chez un grand nombre de moisissures, il est couramment utilisé en microbiologie pour l'identification des champignons.

L'observation macroscopique de l'aspect du champignon sur boîte de Petri (couleur et texture), couplée à l'observation microscopique des structures de reproduction, permet d'identifier le genre des champignons avec un pourcentage élevé de certitude.

Pour l'observation microscopique, des lames minces ont été préparées. Une goutte de colorant bleu de lactophénol (Pro-Lab Diagnostics) est déposée sur la lame de verre, ensuite un morceau de scotch cristal transparent est utilisé pour prélever les structures fongiques et est déposé sur le colorant. Une seconde goutte de colorant est ajoutée avant de sceller la préparation en plaçant une lamelle au dessus. Le colorant pénètre dans les structures du champignon permettant de faciliter leur visualisation. L'identification est effectuée par comparaison morphologique avec différents ouvrages de référence mis à disposition et en collaboration avec les microbiologistes du LRMH.

Une partie des champignons n'a pas pu être identifiée : soit ils ne se sont pas développés sur le PDA, soit ils ont produit uniquement du mycélium stérile, sans structures spécifiques nécessaire à l'identification.

## 2.2 Synthèse et mise en forme du verre modèle

Afin d'effectuer des tests en laboratoire, un verre modèle de composition représentative des vitraux les plus courants au Moyen-Âge a été synthétisé. La composition choisie est basée sur celle utilisée pour les études sur l'altération des vitraux menées par le Laboratoire Interuniversitaire des Systèmes Atmosphériques (LISA) (Sessegolo, 2018; Verney-Carron *et al.*, 2017) qui a été déterminée en calculant la moyenne de la composition à cœur de vingt-trois verres de vitraux datant du Moyen-Âge provenant de différentes études (Carmona *et al.*, 2006; Sterpenich et Libourel, 2001; Gentaz, 2011). Le choix d'une composition similaire a été fait afin de pouvoir comparer les résultats obtenus à ceux de la littérature en s'affranchissant du paramètre composition qui joue fortement sur les cinétiques d'altération.

Habituellement les verres contiennent du Fe et du Mn simultanément (voire introduction). Dans le cadre de cette thèse, la composition modèle a été légèrement modifiée pour obtenir un verre avec Mn et sans Fe, qui sera appelé VM dans la suite de ce mémoire (Tableau 2.3). Le Fe (en moles d'éléments) a été remplacé par le Mn (moles d'éléments équivalentes rajoutés), puis la composition a été normalisée à un total de 100 % de poids d'oxydes. Cette composition est légèrement plus riche en Mn (2 % MnO) que ce que l'on peut trouver habituellement dans un verre de vitraux (environ 1 %). Cela permet de s'affranchir des problèmes d'interaction du Fe avec ou à la place du Mn lors des expériences de bioaltération et également de mieux détecter le Mn en solution dès les premiers temps des expériences de dissolution.

Pour comparaison, une seconde composition ne contenant aucun élément chromophore (ni Fe, ni Mn) a été étudiée. Elle sera appelée VNM dans la suite du document. Les compositions VM et VNM sont données dans le Tableau 2.3.

### 2.2.1 Protocole de synthèse

La synthèse du verre a été effectuée dans un four à moufle Carbolite 1700 à partir de poudres d'oxydes ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{MgO}$ ,  $\text{MnO}$ ), de carbonates ( $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) et phosphates ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) dont la pureté est supérieure ou égale à 99,5%. Ces produits ont été séchés dans une étuve à 100°C pour éliminer l'éventuelle humidité adsorbée et assurer ainsi les bonnes quantités lors de la pesée. Les matières premières ont été broyées et mélangées dans un mortier d'agate, puis introduites dans un creuset en Pt-Au et mises au four.

La synthèse consiste en deux étapes. La première étape consiste en un palier de 40 minutes à 600°C pour démarrer la décarbonatation des poudres et un second à 1500°C pendant 2 heures pour homogénéiser le liquide fondu (Figure 2.7a). Le liquide est trempé en plongeant le fond du creuset dans l'eau. Le verre est récupéré et cassé en petits morceaux pour la deuxième étape et il est remis au four à 1500°C (Figure 2.7b) pour améliorer l'homogénéisation du liquide en fusion. Le creuset est alors trempé une deuxième fois, puis le verre est récupéré et recuit à 530°C pendant 2 heures pour relâcher les tensions mécaniques dues au choc thermique lors de la synthèse.

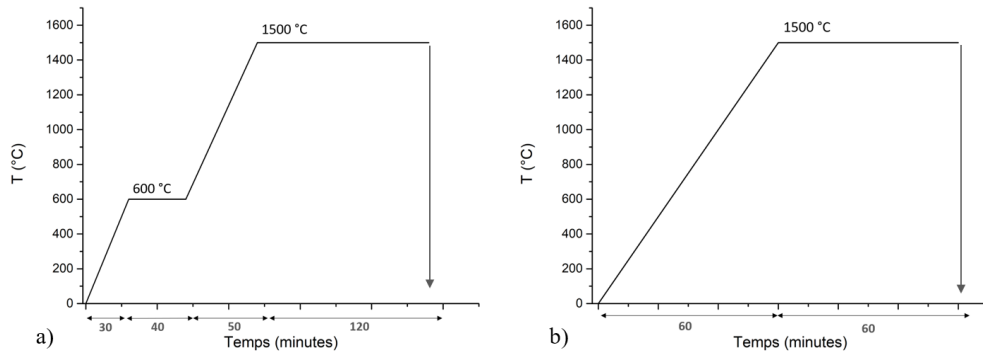


FIGURE 2.7 – Traitement thermique pour a) la première et b) la deuxième étape de synthèse du verre.

### 2.2.2 Contrôle des compositions et caractérisation du verre

Les compositions de verre obtenues ont été caractérisées à la microsonde électronique. Pour ce faire, les échantillons ont été enrobés en résine époxydique et polis avec des disques de polissage en carbure de silicium Struers® (500, 800, 1200). Le polissage a été terminé avec des pâtes diamantées 6, 3,  $\frac{1}{4}$   $\mu\text{m}$  sur des disques de polissage en tissu satiné de la marque Escil®. Une couche de carbone a été déposée sur les plots afin de les rendre conducteurs. Ces analyses ont été effectuées à la plateforme Camparis sur le campus de Jussieu à Paris, grâce à un appareil SX-Five. Une tension d'accélération de 15 keV avec un courant de 10 nA ont été utilisés. Le diamètre du point d'analyse était de 5  $\mu\text{m}$  en mode défocalisé pour réduire la volatilisation des alcalins, avec un temps d'analyse de 10 secondes. Des phases minérales ont été utilisées pour la calibration selon la méthode d'analyse utilisée lors d'études précédentes (Trcera, 2010; Perez, 2015).

#### La Microsonde Electronique en quelques mots...

La Microsonde électronique est une technique d'analyse quantitative qui utilise la détection de rayons X. Des électrons sont accélérés dans la colonne d'électrons pour bombarder l'échantillon. Lorsque le faisceau d'électrons interagit avec un échantillon, des rayons X sont réémis par le matériau. L'énergie et la longueur d'onde de ces rayons X réémis sont caractéristiques de l'atome bombardé et vont être utilisés pour l'identification des éléments dont le matériau est constitué. L'identification des rayons X émis par l'échantillon-cible est obtenue par dispersion de longueur d'onde (wavelength dispersive X-ray spectroscopy WDS) en utilisant plusieurs détecteurs à cristaux pour la mesure simultanée de différents éléments. Cela permet d'avoir une meilleure résolution des pics des éléments pour une mesure quantitative fiable et une meilleure sensibilité pour les éléments traces par rapport au système de détection EDX couramment présent dans les microscopes électroniques à balayage.

Les valeurs mesurées, en pourcentages de poids d'oxydes, ainsi que la dispersion pour chaque série de dix mesures (évaluation de l'homogénéité des verres synthétisés), les va-

leurs théoriques et la variation relative à la composition attendue (évaluation du protocole de synthèse) sont reportées dans le Tableau 2.3 pour les deux verres.

Les écarts par rapport à la composition nominale sont en général très faibles pour les éléments principaux comme Si (< 1%), Ca (< 1%) et K (< 3%). Des valeurs de variation plus élevées sont rencontrés pour des éléments mineurs car une petite variation en poids d'oxyde peut correspondre à un pourcentage de variation élevée quand la valeur de référence est faible. La variation la plus élevée (jusqu'à 10%) est rencontrée sur le P et peut être expliquée par une volatilisation du P en phase de fusion.

De ce fait, les compositions nominales sont très proches des résultats des analyses à la microsonde. Lors de la thèse, plusieurs lots de verre ont été synthétisés. En conséquence, dans la suite du manuscrit uniquement les compositions nominales seront prises en considération.

|                                | VM       |            |             | VNM      |            |             |
|--------------------------------|----------|------------|-------------|----------|------------|-------------|
|                                | nominale | mesurée    | % variation | nominale | mesurée    | % variation |
| SiO <sub>2</sub>               | 51,1     | 51,5 ± 0,4 | 0,8         | 52,2     | 52,4 ± 0,5 | 0,5         |
| Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 1,8      | 1,8 ± 0,0  | 2,4         | 1,8      | 1,9 ± 0,1  | 4,1         |
| Na <sub>2</sub> O              | 1,2      | 1,2 ± 0,0  | 0,5         | 1,2      | 1,2 ± 0,0  | 0,5         |
| K <sub>2</sub> O               | 18,8     | 18,1 ± 0,1 | 2,6         | 19,2     | 18,8 ± 0,3 | 2,1         |
| CaO                            | 17,2     | 17,3 ± 0,2 | 0,3         | 17,6     | 17,6 ± 0,2 | 0,2         |
| MgO                            | 4,2      | 4,3 ± 0,1  | 2,9         | 4,3      | 4,3 ± 0,1  | 0,6         |
| P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>  | 3,6      | 3,2 ± 0,2  | 9,9         | 3,7      | 3,4 ± 0,3  | 7,6         |
| MnO                            | 2,1      | 2,0 ± 0,1  | 5,9         | 0,0      | 0,0 ± 0,1  | -           |
| Total                          | 100      | 99,8 ± 0,3 | 0,2         | 100      | 99,7 ± 0,4 | 0,3         |

TABLEAU 2.3 – Composition nominale et analysée en % de poids d'oxydes des verres VM et VNM. La composition nominale est donnée au moment de la pesée, la composition analysée est obtenue par microsonde électronique. Les écarts-types sont calculés sur 10 mesures. Le % de variation représente l'écart entre la composition nominale et la composition analysée.

La spectroscopie Raman a été utilisée pour aborder la caractérisation structurale du verre synthétisé. Deux systèmes différents ont été utilisés : un RENISHAW InVia au LGE, équipé de deux lasers de longueurs d'onde 532 et 785 nm et un HORIBA Jobin Yvon LabRAM HR800 au département de science de la terre de l'Université de Potsdam pendant un séjour de mobilité internationale en Allemagne, équipé des longueurs d'onde 473, 532, 633 nm.

Les deux spectromètres sont couplés à un microscope, ce qui permet de faire des mesures à des endroits spécifiques de l'échantillon repérés en microscopie optique. La résolution spatiale est d'environ 1  $\mu\text{m}$ .

En Raman, le verre VM présente un fort signal de fluorescence avec les deux longueurs d'onde présentes au LGE (532 et 785 nm). Lors du séjour en Allemagne, une étude a été effectuée pour mieux comprendre cette problématique qui peut gêner fortement l'interprétation des spectres Raman et intéresse donc fortement le LGE. En collaboration avec Dr Martin Ziemann, le spectre total de fluorescence (jusqu'à 11000  $\text{cm}^{-1}$ ) de VM a été enregistré avec le laser bleu 473 nm. Les résultats en Figure 2.8a mettent en évidence que le maximum du pic principal de fluorescence est localisé exactement à l'énergie du laser



vert 532 nm et que le laser IR 785 nm est localisé sur la queue de la fluorescence. Le laser 633 est dans une zone intermédiaire.

La spectroscopie Raman en quelques mots...

La spectroscopie Raman est une spectroscopie vibrationnelle qui est utilisée en science des matériaux pour l'identification et l'étude structurale de minéraux et composés organiques. Cette technique se base sur l'effet Raman qui a pour origine la diffusion inélastique (avec perte d'énergie) de la lumière par un matériau irradié avec un laser.

Elle exploite une partie de la lumière diffusée qui a perdu en énergie (par rapport à l'énergie incidente du laser). La valeur de cette perte d'énergie dépend de la liaison chimique qui l'a absorbée sous forme de vibrations moléculaires. Ce déplacement de l'énergie entre la valeur de l'énergie incidente et celle diffusée est donc caractéristique des liaisons chimiques présentes dans le matériau et c'est ce qui permet d'identifier les espèces présentes dans les matériaux (carbonates, phosphates, oxydes...). Le résultat est affiché sous forme de pics dans un spectre qui montre l'intensité et le déplacement d'énergie (*Raman shift*).

La Figure 2.8b montre le spectre Raman du verre VM acquis avec les quatre longueurs d'ondes de lasers. Le spectre obtenu avec le laser vert a une fluorescence très intense et le signal du verre peut à peine être deviné. Le spectre obtenu avec le laser bleu a aussi une forte fluorescence avec un faible signal du verre. Avec le laser IR, un bon signal du verre est obtenu mais, le signal Raman diminuant en fonction de l'énergie excitatrice (efficacité  $\propto 1/\lambda^4$ ), le signal du verre reste assez faible par rapport au signal de fluorescence. Le laser 633 nm est finalement celui avec lequel un meilleur rapport signal/fluorescence est obtenu. Il a donc été choisi et un spectre a été acquis pour chacune des deux compositions de verre avec une puissance du laser à 50 % et 30 accumulations de 10 secondes.

Les spectres des deux verres présentant une ligne de base très différente, il a été nécessaire d'un soustraire une manuellement. Ensuite, les spectres ont été normalisés à l'aire de la région des  $Q^n$  entre 800 et 1200  $\text{cm}^{-1}$  pour pouvoir être comparés (Figure 2.9).

Les deux verres ont des spectres Raman qui sont très proches entre eux et qui sont en accord avec la littérature sur les verres silicatés calco-potassiques (Colomban *et al.*, 2006; Tournié *et al.*, 2008). Des différences peuvent être observées au niveau des intensités des différentes bandes, ainsi que des petits épaulements pour le VM autour de 880  $\text{cm}^{-1}$  et 1180  $\text{cm}^{-1}$ .

Selon la littérature (Matson *et al.*, 1983; Robinet *et al.*, 2006; Trcera *et al.*, 2011), la région à faibles nombres d'onde (entre 200 et 700  $\text{cm}^{-1}$ ) est attribuée aux vibrations de flexion (*bending*) des liaisons Si-O et à la respiration des anneaux à 3 et 4 membres. La région à hauts nombres d'onde (entre 800 et 1200  $\text{cm}^{-1}$ ) est attribuée aux étirements (*stretching*) des liaisons Si-O dans les tétraèdres de  $\text{SiO}_4$ . C'est cette région qui donne des informations sur la connectivité du réseau silicaté (état de polymérisation).

Compte-tenu des incertitudes liées à la normalisation et à la soustraction de la ligne de base, les spectres sont très similaires, indiquant que la présence de Mn modifie très peu la connectivité du réseau silicaté.

Concernant l'état d'oxydation du Mn, il n'a pas été possible de le déterminer au cours de ce travail. Selon Nelson et White (1980) et Ferrand *et al.* (2015) la forme réduite du

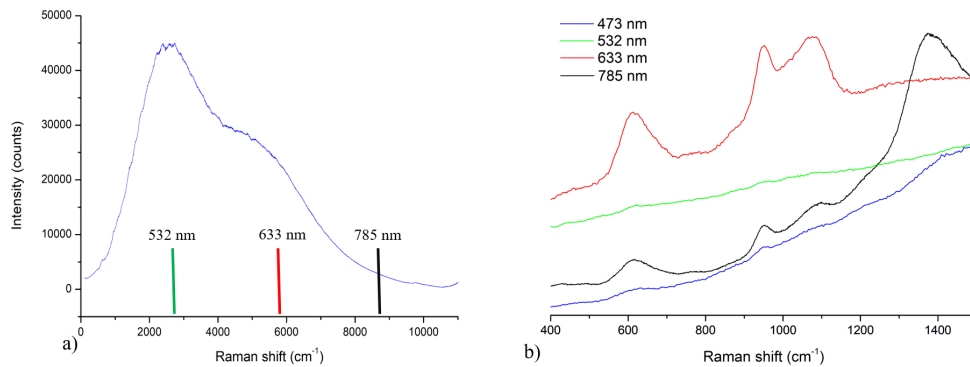


FIGURE 2.8 – Choix du laser. a) spectre complet de fluorescence ( $0 - 11000 \text{ cm}^{-1}$ ) du verre VM avec le laser bleu 473 nm, les valeurs d'énergie des autres lasers testés sont reportés. b) spectres Raman de la région d'intérêt du verre ( $400 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ ) du verre VM obtenus avec les différentes longueurs d'onde.

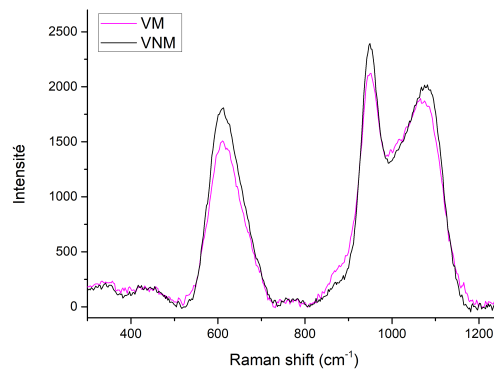


FIGURE 2.9 – Spectres Raman des deux verres obtenus avec le laser à 633 nm. Une ligne de base a été soustraite manuellement et les spectres ont été normalisés à l'aire de la région des  $Q^n$  entre  $800$  et  $1200 \text{ cm}^{-1}$ .

Mn ( $\text{Mn}^{2+}$ ) est celle plus stable à haute température de fusion. Notre verre VM étant produit à  $1500^\circ\text{C}$ , nous pouvons estimer que le Mn réduit est certainement présent dans le VM. Toutefois, la coloration pourpre du verre est un indice de la présence de  $\text{Mn}^{3+}$  (Arletti *et al.*, 2012; Ferrand, 2013; Bidegaray *et al.*, 2018). Nous pouvons donc estimer un mélange de  $\text{Mn}^{2+}$  et  $\text{Mn}^{3+}$ , mais nous ne pouvons pas savoir dans quelles proportions ces deux espèces sont présentes.

### 2.2.3 Mise en forme et caractérisation des échantillons

En prévision des expériences d'altération, les échantillons ont été préparés sous forme de poudres et de monolithes.

Les échantillons sous forme de poudre ont été utilisés pour les tests de dissolution afin

d'augmenter la surface réactive lors de la mesure de la cinétique d'altération.

Le recours à des monolithes de verre permettait d'observer les mécanismes d'altération en surface et subsurface du verre et d'utiliser des techniques de caractérisation du solide.

## Poudres

Les poudres ont été obtenues par broyage de morceaux de verre à la main dans un mortier en agate. Elles ont ensuite été tamisées avec des tamis en inox controlab® pour obtenir la fraction de poudre de granulométrie comprise entre 100 et 200  $\mu\text{m}$ . Ces poudres ont été lavées par sédimentation dans l'acétone pour enlever les éventuels résidus de particules fines suivant la loi de Stokes.

En effet, en introduisant les poudres dans un liquide ayant une densité connue, dans un récipient de hauteur connue, il est possible d'estimer le temps de sédimentation des particules en fonction de leur taille. Dans ce cas, il est donc possible d'éliminer la fraction fine en recueillant le liquide surnageant et en conservant la fraction lourde sédimentée au fond du récipient. Les différentes étapes sont résumées en Figure 2.10.

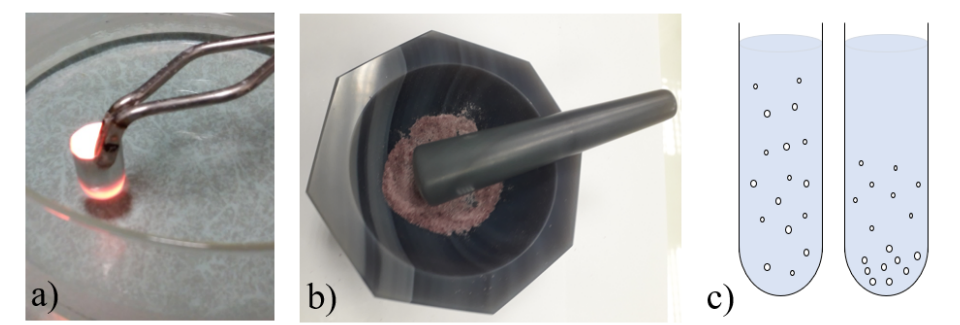


FIGURE 2.10 – Production de poudres par a) trempe verre, b) broyage, c) lavage

Les poudres broyées et lavées ont été observées par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) avec un MEB de table (TM3000) au Laboratoire Interuniversitaire des Systèmes Atmosphériques (LISA).

### La microscopie électronique à balayage en quelques mots

La microscopie électronique à balayage (MEB) utilise un faisceau d'électrons pour balayer la surface d'un échantillon et obtenir ainsi des images à des très forts grossissements grâce à la taille des électrons qui est plus petite que celle de la lumière. Il existe différentes modalités d'utilisation d'un MEB. Pour ce qui concerne l'imagerie, on peut exploiter les électrons retrodiffusés (BSE pour 'backscattered electron') ou les électrons secondaires (SE pour 'secondary electron'). Les électrons rétrodiffusés sont très affectés par le numéro atomique  $Z$  des atomes atteints par le faisceau, on obtient donc des images à fort contraste, qui donnent des informations sur la composition de l'échantillon et son hétérogénéité. Les électrons secondaires proviennent principalement de la surface, sont très sensibles aux irrégularités de surface et sont donc utilisés pour étudier la morphologie des échantillons. La modalité EDX exploite les rayons X réémis par l'échantillon pour des analyses chimiques élémentaires de l'échantillon.

Les poudres ont été déposées directement sur un scotch carbone sans métallisation. Les images en mode BSE à 15kV (Figure 2.11) montrent des poudres de granulométrie homogène et exemptes de particules fines.

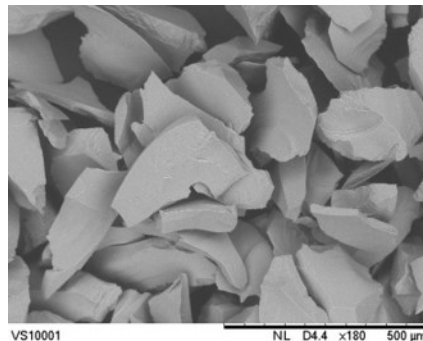


FIGURE 2.11 – Image MEB en mode électrons retrodiffusés des poudres de verre sain de granulométrie 100-200  $\mu\text{m}$  après lavage.

La surface spécifique des poudres a été mesurée par BET par absorption de krypton par Cyril Vaulot à l'Institut de Science des Matériaux de Mulhouse (IS2M). Les deux verres ont une surface spécifique de  $0,0266 \pm 0,0003 \text{ m}^2/\text{g}$  pour VM et de  $0,0299 \pm 0,0003 \text{ m}^2/\text{g}$  pour VNM. La légère différence observée dans les valeurs de surface spécifique s'explique par la variabilité induite par la procédure expérimentale (non par la nature du verre). Pour tous les lots de verre utilisés, une valeur moyenne de  $0,0285 \pm 0,002 \text{ m}^2/\text{g}$  a été considérée.

L'analyse de surface spécifique Brunauer, Emmett et Teller (BET) en quelques mots...

L'absorption BET est une technique qui permet d'évaluer la surface spécifique d'échantillons sous forme de poudre par un procédé d'adsorption de gaz à la surface. Cette technique de mesure est basée sur la théorie Brunauer, Emmett et Teller qui explique l'adsorption physique de molécules de gaz (ici le krypton) à la surface d'un solide. Cette technique consiste en la mesure d'isothermes d'adsorption/désorption de gaz point par point, par introductions successives (ou pompage) de krypton. Les molécules de krypton vont alors former une monocouche à la surface de la poudre et lorsque on arrive à saturation un palier est observé. Le traitement des isothermes d'adsorption-désorption de krypton permet de déduire la surface spécifique, qui définit la surface totale par unité de masse accessible aux atomes et aux molécules.

## Monolithes

Pour la production de monolithes de verre, à la fin de la deuxième étape de synthèse décrite précédemment (Figure 2.7b), le verre est coulé dans un moule en graphite cylindrique (diamètre 1 cm et hauteur variable selon la quantité de verre synthétisée).

Le cylindre de verre obtenu par démoulage a été coupé avec une scie diamantée Struers® pour obtenir des disques de verre d'épaisseur proche de 2 mm. Ces monolithes ont été polis sur une des deux faces suivant le protocole présenté dans le paragraphe 1.2.2. Les différentes étapes de mise en forme sont présentées en Figure 2.12. Les échantillons ont été lavés à l'éthanol aux ultrasons à plusieurs reprises pendant le polissage pour enlever d'éventuels résidus provenant des disques de polissage précédents.

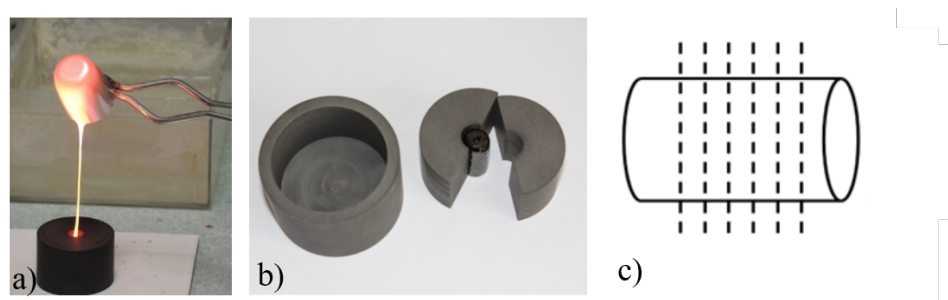


FIGURE 2.12 – Préparation des monolithes par a) coulée du verre, b) démoulage, c) découpe du cylindre. Images b) et c) tirées de Perez (2015)

Le polissage a été choisi pour assurer un état initial similaire pour les différents monolithes, en vue de les comparer. Il a été possible d'obtenir un « poli miroir » même si souvent des rayures sont visibles, surtout sur les bords des échantillons. Au total, environ 60 monolithes ont été produits pendant ce travail.

Les monolithes polis ont été observés au microscope optique numérique. Le microscope numérique KEYENCE VHX-6000 équipé de deux objectifs avec grossissements de x20 à

x1000, présent au Laboratoire de Recherche des Monuments Historiques (LRMH) a été utilisé pour des observations microscopiques en lumière visible avec différentes modalités. Pour des échantillons plats, le mode lumière annulaire permet d'observer l'état de surface et les différences de couleur; le mode en lumière mixte (annulaire + coaxiale) permet d'avoir un éclairage uniforme et d'observer les défauts de surfaces comme par exemple les rayures de polissage ou la présence de cristaux. Ce microscope permet notamment d'obtenir des images nettes d'échantillons rugueux, grâce au programme de "Visualisation 2D/3D", capable de prendre plusieurs images de l'échantillon à différentes valeurs de  $z$ .

En Figure 2.13 sont reportées les images des monolithes de VM et VNM en lumière annulaire et en lumière mixte. En lumière annulaire, le verre VM a une couleur pourpre foncée, alors que le verre VNM est incolore. En lumière mixte, il n'y a pas de différence de couleur entre les deux et donc seule l'image de VNM est reportée pour montrer la surface polie.

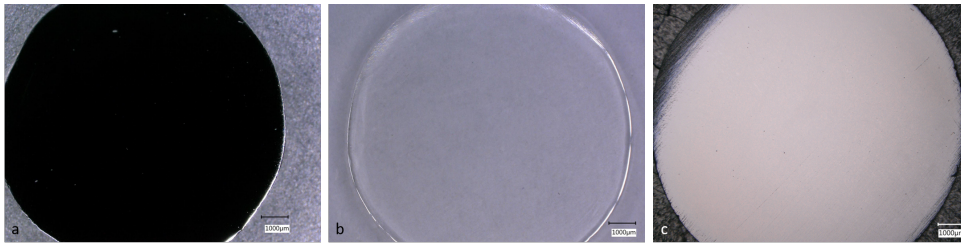


FIGURE 2.13 – Images au microscope optique numérique à un grandissement 30x, de a) VM en lumière annulaire, b) VNM en lumière annulaire, c) VNM en lumière mixte.

## 2.3 Tests de dissolution

Une des étapes initiales et indispensables de ce travail a été de choisir les conditions de dissolution et de dimensionner les expériences. Ceci a été fait sur la base des valeurs de vitesse de dissolution connues pour des verres de composition proche (Sessegolo, 2018).

Pour les tests de dissolution, il a été choisi de travailler en conditions statiques (sans renouvellement de la solution) dans des réacteurs en PFA (Savillex) ou en verre. Ces réacteurs ont préalablement été nettoyés dans un bain d'acide ( $\text{HNO}_3$  5%), puis rincés avec eau ultrapure (EUP) 18,2  $M\Omega$  pour réduire les pollutions environnementales. De la poudre de verre est plongée dans une solution altérante. Des aliquotes de la solution sont prélevées à différents temps d'altération pour analyse.

Afin de comparer les vitesses initiales de dissolution, des conditions loin de la saturation ont été adoptées. Un rapport surface réactive/volume (S/V) de référence a été gardé fixe et utilisé pour toutes les expériences de dissolution biotique indirecte. Pour les expériences de dissolution biotiques directe, des rapports S/V supplémentaires ont été rajoutés.

### 2.3.1 Tests de dissolution biotique indirecte en solution d'eau ultrapure (EUP)

Le comportement du verre a été étudié dans un système simple verre/EUP. Ces premiers tests ont mis en évidence une augmentation rapide du pH à cause du phénomène d'interdiffusion intrinsèque à l'altération du verre. Cette évolution du pH n'était pas reproductible d'une expérience à l'autre. Il a donc été choisi d'utiliser un tampon pour pouvoir stabiliser cette évolution et rendre possible la comparaison des expériences.

Des premiers tests ont été effectués avec un tampon carbonate et le tampon BisTris, tous deux utilisés au LGE dans des études précédentes. Des tests ont été réalisés en utilisant le tampon HEPES pendant le stage de Chloé Ranchoux. Pour les trois tampons, deux concentrations (1 mM et 10 mM) ont été testées au moins une fois, certaines conditions ont pu être dupliquées. Les résultats détaillés de cette étude sont reportés dans le Chapitre 4. Le tampon carbonate  $\text{NaHCO}_3$  1 mM a finalement été choisi pour réaliser les tests de dissolution.

Dans ces expériences nous avons testé l'influence de deux ligands différents (acide oxalique et sidérophore DFOB) sur la dissolution du verre. Les solutions altérantes ont été préparées avec EUP tamponnée avec  $\text{NaHCO}_3$  1 mM. Cette solution représente la condition de Contrôle. Les deux ligands ont été rajoutés, séparément (systèmes à un ligand) ou ensemble (systèmes à deux ligands), afin d'obtenir les solutions altérantes. Pour les systèmes à un ligand, plusieurs concentrations (50, 100, 250, 500 et 1000  $\mu\text{M}$ ) du sidérophore desferrioxamine B (DFOB) et une seule concentration (1000  $\mu\text{M}$ ) d'acide oxalique (AO) ont été testées. Pour les systèmes à deux ligands, la concentration d'AO a été gardée fixe à 1000  $\mu\text{M}$ , et la DFOB a été introduite à différentes concentrations (0, 100, 250 et 500  $\mu\text{M}$ ).

Pour le verre VNM, uniquement trois conditions ont été menées pour comparaison avec le verre VM : la condition de Contrôle, le système à un ligand AO 1000  $\mu\text{M}$  et le système à un ligand DFOB 500  $\mu\text{M}$ .

L'ensemble des conditions testées est résumé dans le Tableau 2.4. Le pH initial de toutes les solutions a été ajusté à  $6,8 \pm 0,1$ .

| Conditions                       | VM | VNM |
|----------------------------------|----|-----|
| Contrôle                         | ✓  | ✓   |
| DFOB 50 $\mu\text{M}$            | ✓  | ×   |
| DFOB 100 $\mu\text{M}$           | ✓  | ×   |
| DFOB 250 $\mu\text{M}$           | ✓  | ×   |
| DFOB 500 $\mu\text{M}$           | ✓  | ✓   |
| DFOB 1000 $\mu\text{M}$          | ✓  | ×   |
| AO 1 mM                          | ✓  | ✓   |
| AO 1 mM + DFOB 50 $\mu\text{M}$  | ✓  | ×   |
| AO 1 mM + DFOB 100 $\mu\text{M}$ | ✓  | ×   |
| AO 1 mM + DFOB 250 $\mu\text{M}$ | ✓  | ×   |
| AO 1 mM + DFOB 500 $\mu\text{M}$ | ✓  | ×   |

TABLEAU 2.4 – Concentrations en AO et DFOB testées dans les expériences de dissolution des verres VM et VNM. Le ✓ indique les conditions qui ont été réalisées, la × indique que l'expérience n'a pas été menée.

Un échantillon "blanc" de solution a toujours été prélevé avant l'introduction du verre en solution.

Suite au prélèvement du blanc, 100 mg de poudre de verre de granulométrie 100-200  $\mu\text{m}$  ont été immergés dans un volume de 200 ml de solution dans des réacteurs en PFA ( $S/V = 0,14 \pm 0,01 \text{ cm}^{-1}$ ).

Les solutions contenant le verre ont été agitées à 160 rpm (tours par minutes) à une température constante de 25°C pendant 3 jours. Des mesures de pH et des prélèvements de 3 ml ont été effectués à différents temps d'altération (0, 3, 6 heures et 1, 2, 3 jours). Chaque prélèvement a été effectué avec une seringue et filtré avec un filtre-seringue de 0,45  $\mu\text{m}$  en cellulose-acétate. Le total de volume prélevé correspond à une variation de moins du 10% du volume initial, pour assurer un rapport S/V quasi-constant.

Les aliquotes de solution prélevées ont d'abord été analysés par UV-VIS, puis par ICP-OES. Les différentes étapes sont illustrées en Figure 2.14.

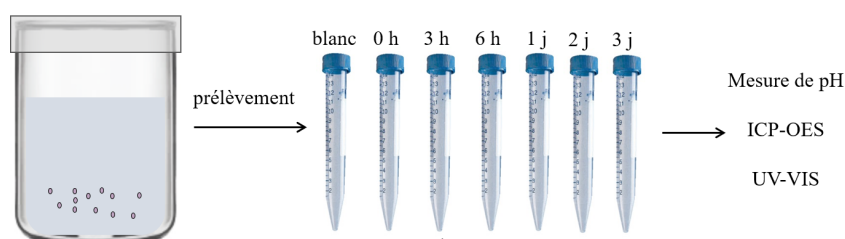


FIGURE 2.14 – Schéma du protocole des tests de dissolution biotique indirecte. La poudre de verre est introduite dans la solution altérante. Des aliquotes de 3 ml de solution sont prélevés à différents temps d'altération et analysés.



### 2.3.2 Tests de dissolution biotique directe en milieu de culture

Une souche bactérienne modèle a été choisie pour étudier l'effet direct que cette bactérie peut avoir sur la dissolution du verre. *Pseudomonas putida* a été privilégiée parcequ'elle est facile à cultiver et que son comportement est connu et bien décrit dans la littérature, notamment pour ses propriétés d'oxydation du Mn et de production de sidérophores (Vilalobos *et al.*, 2006; Parker *et al.*, 2004). Elle n'est pas pathogène et elle fait partie des bactéries du genre *Pseudomonas* qui, en plus d'être omniprésentes, souvent prévalent dans les environnements naturels aqueux et terrestres et sont fréquemment utilisées pour des études de dissolution biotique de minéraux et verres naturels (Patricia A. Maurice, 2001; Aouad *et al.*, 2006; Stockmann *et al.*, 2012; Ferret *et al.*, 2014; Perez *et al.*, 2016, 2019).

La souche de *Pseudomonas putida* MnB1 (ATC23483) a été fournie sous forme de culture liquide dans le milieu de culture Lisogen Broth (LB) par Laura Galezowski - docteurante à Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie (IMPMC). Cette solution mère a été gardée à 5°C et au début de chaque série d'expériences, 1 ml a été prélevé et introduit dans un erlenmeyer avec 200 ml de milieu Lisogen Brith (LB) de composition 10 g/l de peptone, 5 g/l d'extrait de levure, 5 g/l de NaCl. La solution a été agitée à 160 rpm à une température de 25°C pendant 24h et la croissance bactérienne a été estimée par mesure de la densité optique (DO) (turbidité) de la solution à 600 nm. Quand la valeur de de DO est comprise entre 1,0 et 1,2 , 1 ml de cette solution a été utilisé pour l'inoculation dans un deuxième milieu pour les tests d'altération. Ce milieu est composé d'HEPES à 10 mM, de glucose à 1g/l, de NH<sub>4</sub>Cl à 1g/l, de NaCl à 0,5 g/l, avec un pH initial de 6,5. Ce milieu a été conçu dans le but de fournir uniquement C et N comme éléments nutritifs à la souche à partir du milieu de culture, éléments non inclus dans la composition de verre. Le tampon HEPES a été choisi dans ce cas afin de mieux contrôler le pH en présence de bactéries. Il fait partie du groupe de tampons de Good (Good *et al.*, 1966) souvent utilisés en biochimie. Ces tampons sont imperméables aux membranes biologiques, ont des faible capacités de complexation des ions métalliques, ils sont non toxiques et ils participent très peu aux réactions biochimiques (Kalinowski *et al.*, 2000b).

La même granulométrie de verre (100-200  $\mu\text{m}$ ) que dans les tests de dissolution biotique indirecte a été utilisée, dans un même volume de 200 ml de solution mais dans des erlenmeyers en verre pyrex de 500 ml. L'éventuel apport de la dissolution du verre des erlenmeyers est négligeable car le verre pyrex s'altère à des vitesses de dissolution beaucoup plus faibles que celle de notre verre de composition silicaté calco-potassique (Perera et Doremus, 1991). De plus, l'analyses du blanc montre qu'aucune contamination n'est présente.

Plusieurs rapports S/V ont été testés en changeant la quantité de verre introduite dans le système. Un résumé des conditions étudiées est reproduit dans le tableau 2.5. Toute la verrerie a été au préalable lavée dans un bain d'acide nitrique, puis stérilisée à l'autoclave avec les milieux de culture.

Les solutions contenant la poudre de verre ont été agitées à 160 rpm et à une température constante de 25°C pendant 8 jours. A chaque temps d'altération, 1 ml a été prélevé sans le filtrer et utilisé pour des mesures de Densité Optique (DO) à 600 nm. 100  $\mu\text{l}$  ont été dilués de manière séquentielle avec une solution de NaCl 9 g/l (facteur de dilution jusqu'à  $10^{-7}$ ). 50  $\mu\text{l}$  de ces solutions diluées ont été étalés sur un milieu gélosé Plate Count Agar

| Conditions  | VM | VNM |
|---|----|-----|
| 1 : Milieu + 100 mg de verre ( $S/V = 0,14 \text{ cm}^{-1}$ ) + <i>p.putida</i> | ✓  | ✓   |
| 2 : Milieu + 50 mg de verre ( $S/V = 0,07 \text{ cm}^{-1}$ ) + <i>p.putida</i>  | ✓  | ×   |
| 3 : Milieu + 25 mg de verre ( $S/V = 0,035 \text{ cm}^{-1}$ ) + <i>p.putida</i> | ✓  | ×   |
| 4 : Contrôle <i>p.putida</i> : milieu + <i>p.putida</i>                         | ✓  | ✓   |
| 5 : Contrôle verre : milieu + 100 mg de verre ( $S/V = 0,14 \text{ cm}^{-1}$ )  | ✓  | ✓   |

TABLEAU 2.5 – Conditions de dissolution biotique testées pour les verres VM et VNM. Le ✓ indique les conditions qui ont été réalisées, la × indique que l’expérience n’a pas été menée.

pour un dénombrement bactérien sur boîtes de Petri. Après incubation à 25°C pendant au moins 24 heures, les *Colony Forming Units* (CFU) ont été dénombrées sur boîte de Petri et le nombre N de bactéries par mL de solution a été déterminé selon l’équation 2.1.

$$N = \frac{x \times 10^n}{50 \times 10^{-3}} \quad (2.1)$$

avec  $x$  le nombre de CFU et  $n$  le nombre de dilutions décimales. La corrélation entre les valeurs de DO mesurées et le nombre de bactéries comptée peut être évaluée pour attester de la fiabilité des courbes obtenues. Pour cela, les valeurs de DO sont tracées en fonction du logarithme de CFU et le coefficient de corrélation indique la qualité des données obtenues. Ce coefficient sera donné dans les légendes des graphes de croissance bactérienne dans le Chapitre 5.

Des prélèvements de 3 ml ont été effectués avec une seringue de 5 ml et filtrés sur un filtre 0,2  $\mu\text{m}$  à différents temps d’altération. Les prélèvements filtrés ont été analysés par UV-VIS à la longueur d’onde de 402 nm pour la détection de molécules de pyoverdine et ensuite dilués avec de l’EUP acidifié pour être analysés par ICP-OES. Un schéma des expériences est donné en Figure 2.15.

En fin d’expérience, les milieux de culture ont été récupérés et centrifugés pendant 1 heure à 4500 rpm. Le surnageant a été jeté et le culot bactérien a été resuspendu dans une solution de lavage (EDTA 2mM, BisTris 20 mM, pH 8). Ces solutions ont été à nouveau centrifugées pendant 20 minutes à 4500 rpm, 3 mL de surnageant ont été prélevés et filtrés pour analyse ICP-OES, le reste a été jeté et le culot bactérien récupéré. Le culot bactérien a été séché dans une étuve à 50°C pendant au moins une nuit. Le culot sec a ensuite été minéralisé, il a été dissout dans 10 ml de  $\text{HNO}_3$  65% et chauffé à 95°C jusqu’à réduction de la solution à 2 ml. Le volume final a été introduit et complété jusqu’à 20 ml dans une fiole jaugée, filtrés et analysés par ICP. Le verre a également été récupéré et observé par microscopie optique et électronique.

Toutes les expériences ont été effectués deux fois pour vérifier la reproductibilité des résultats.

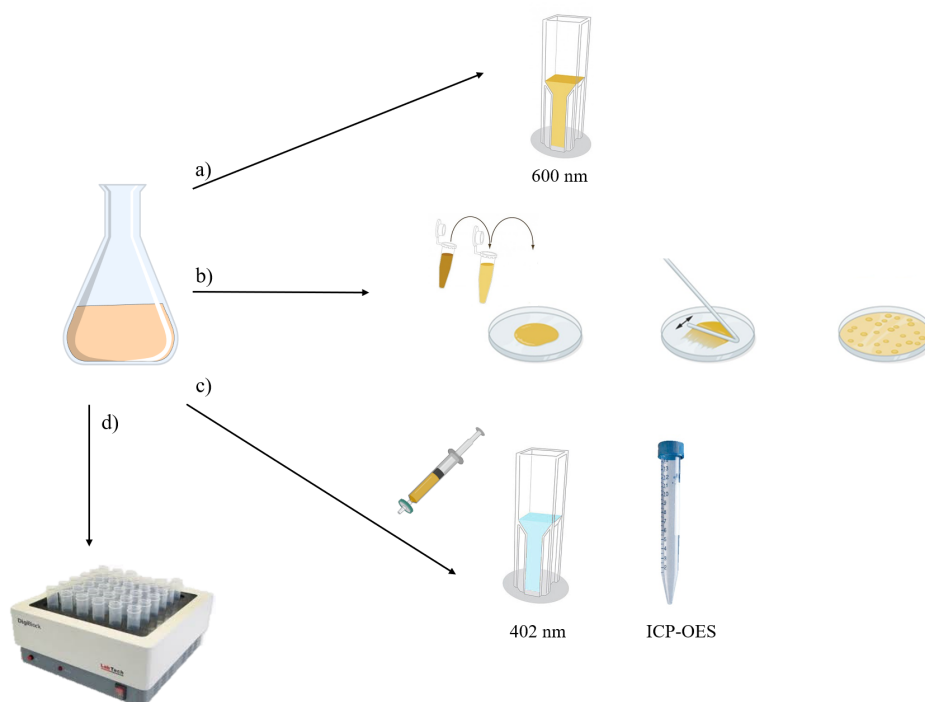


FIGURE 2.15 – Schéma du protocole des tests de dissolution biotique directe. Prélèvements et analyses effectués à chaque temps d'altération : a) 1 ml pour une mesure de DO à 600 nm, b) 100  $\mu$ l pour une dilution séquentielle et un dénombrement bactérien, c) 3 ml prélevés et filtrés pour une analyse en UV-VIS à 402 nm et une analyse en ICP-OES. d) En fin d'expérience, récupération de la masse bactérienne, lavage par centrifugation et minéralisation

### 2.3.3 Analyse des solutions

#### UV-VIS

La spectroscopie d'absorption UV-VIS a été utilisée pour détecter la formation de complexes sidérophore-Mn et pour suivre la croissance bactérienne.

Dans les tests de dissolution biotique indirecte, la formation du complexe DFOB-Mn a été suivie par absorption à la longueur d'onde de 310 nm (Faulkner *et al.*, 1994; Duckworth et Sposito, 2005b,a).

Dans les tests de dissolution biotique directe, la croissance bactérienne a été suivie par densité optique à 600 nm. La production de pyoverdine a été suivie par absorption à 402 nm et l'évolution de son spectre a été suivie en enregistrant des spectres entre 300 et 500 nm (Parker *et al.*, 2007).

Les échantillons des tests de dissolution ont été analysés avec un spectromètre Shimadzu UV-1800 présent au LGE. 1 ml d'échantillon est analysé dans une cuve en quartz d'épaisseur 1 cm. Pour certaines expériences, des cuves en plastique à usage unique ont été utilisées.

La spectroscopie UV-VIS en quelques mots...

La spectroscopie UV-VIS est une méthode qui permet de déterminer la concentration d'un analyte en solution. Un faisceau avec une longueur d'onde  $\lambda$  qui peut aller de 180 à 1100 nm passe à travers une cuvette. L'échantillon en solution dans la cuve absorbera le rayonnement UV-VIS. En mesurant l'intensité du faisceau avant et après le passage par l'échantillon, il est possible d'en déduire la quantité d'énergie absorbée. L'absorbance  $A$  dépend du chemin optique de la lumière  $l$ , de la concentration de l'analyte  $c$  et de sa capacité à absorber la lumière à une certaine longueur d'onde exprimée par son coefficient d'absorption molaire  $\varepsilon$ . La relation entre ces paramètres est donnée par la loi de Beer-Lambert :

$$A = \varepsilon lc$$

Il est aussi possible d'enregistrer un spectre complet d'absorbance sur toute la gamme de longueur d'onde afin d'observer la variation de l'absorbance de l'analyte en fonction de  $\lambda$ .

## ICP-OES

Les solutions prélevées des lixiviats des tests d'altération sont acidifiées à 5% avec  $\text{HNO}_3$  et analysées avec un spectromètre ICP-OES Perkin Elmer Optima 8300 localisé au LGE.

Une gamme étalon est préparée à partir de solutions standards multi-éléments 1000 ppm et Si 1000 ppm (Merck Chemicals) et de l'eau ultra pure acidifiée à 5%  $\text{HNO}_3$ . Dix mesures ont été effectuées pour chaque étalon afin d'évaluer les barres d'erreurs analytiques pour chaque élément. La longueur d'onde avec la meilleure précision et dont la mesure est la plus stable au cours du temps a été choisie pour chaque élément analysé. Les pourcentages d'erreur analytique (différence entre la valeur théorique et la valeur mesurée) sont reportés pour chaque élément et pour chaque gamme de concentration dans le Tableau 2.6. En général, des écarts de l'ordre de 10% sont observés entre la valeur théorique et la valeur mesurée sauf pour K et Si à des valeurs de concentrations  $\leq 100$  ppb. Dans ce cas là, l'erreur peut atteindre 50%. Cette incertitude sur la mesure de K et Si à des faibles concentrations n'impactera pas les résultats de dissolution car ces deux éléments ont rarement été détectés dans cette gamme de concentration.

| Etalon | concentration (ppb) | Al 237 | Ca 317 | Mg 285 | K 766 | Mn 259 | Si 251 | P 213 |
|--------|---------------------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|
| 1      | $\leq 100$          | 6      | 6      | 1      | 57    | 11     | 46     | 10    |
| 2      | 100-500             | 0,1    | 5      | 1      | 3     | 4      | 9      | 3     |
| 3      | 500-1000            | 8      | 11     | 6      | 8     | 9      | 5      | 1     |
| 4      | 1000-2500           | 9      | 15     | 12     | 3     | 12     | 8      | 2     |
| 5      | 2500-5000           | 6      | 0,4    | 2      | 8     | 4      | 6      | 1     |
| 6      | 5000-1000           | 2      | 8      | 6      | 11    | 1      | 1      | 0,3   |

TABLEAU 2.6 – Précision sur la mesure des concentrations par ICP-OES. Pourcentages d'erreur analytique représentant l'écart de la valeur mesurée par rapport à valeur théorique, calculée sur la moyenne de 10 mesures pour chaque étalon.

L'ICP-OES en quelques mots...

La Spectrométrie Optique d'Emission à Plasma Induit (ICP-OES) est une technique qui permet de quantifier la concentration des éléments chimiques présents dans un échantillon aqueux. La solution à analyser est pompée à travers un nébuliseur dans une chambre à nébulisation et l'aérosol obtenu est injecté dans un plasma d'argon. Les éléments chimiques de l'échantillon dans le plasma sont atomisés et ionisés. Les électrons des atomes ionisés par le plasma passent donc à un état excité et pour revenir à l'état fondamental, ils vont émettre de l'énergie sous forme de lumière. Chaque élément possède une longueur d'onde ( $\lambda$ ) d'émission caractéristique et l'intensité de la lumière à cette  $\lambda$  est proportionnelle à la concentration de l'élément en solution. Une calibration préalable permet donc d'avoir une quantification élémentaire précise.

### *Traitement des données*

Afin de pouvoir comparer le comportement des éléments entre eux, les valeurs de concentrations obtenues suite aux analyses ICP-OES sont converties en pertes de masse normalisées  $NL_i$  (equation 2.2) pour chaque élément. Cela est fait en normalisant la concentration de l'élément  $c_i$  à sa teneur dans le verre  $x_i$  (fraction massique de l'élément  $i$  dans la composition du verre), et au rapport S/V (surface réactive de verre / volume de solution) :

$$NL_i = \frac{c_i V}{S x_i} \quad (2.2)$$

Les  $NL_i$  ont été tracées en fonction du temps. Les vitesses initiales de dissolution  $v_i$  (equation 2.3) ont été déterminées par régression linéaire sur la partie linéaire de la courbe de dissolution. En général, 4 à 6 points ont été pris pour la régression linéaire en choisissant le maximum de points pour obtenir un fit linéaire avec  $R^2 \geq 0,99$ .

$$v_i = \frac{dNL_i}{dt} \quad (2.3)$$

Les  $NL_K$  ont également été tracées en fonction de la racine carré du temps  $\sqrt{t}$  afin de calculer le coefficient de diffusion grâce à la seconde loi de Fick :

$$NL_K = 2\rho\sqrt{\frac{Dt}{\pi}} \quad (2.4)$$

avec  $\rho$  la masse volumique du verre,  $D$  le coefficient de diffusion, et  $t$  le temps.

L'erreur absolue sur les  $NL_i$  a été calculée avec la loi de propagation des incertitudes prenant en considération l'erreur analytique de l'ICP-OES (10%), l'incertitude sur la mesure de la surface réactive (8%) et l'erreur expérimentale  $\pm\sigma$  pour les deux replicats expérimentaux pour chaque point de prélèvement. Les erreurs sur  $V$  et  $x_i$  ont été considérées comme négligeables. L'incertitude sur la mesure de la surface réactive influence

de la même manière tous les éléments du verre et elle ne sera pas prise en compte pour les barres d'erreur sur les graphes des résultats des  $NL_i$  qui vont permettre de comparer le comportement des différents éléments du verre. L'erreur absolue sera prise en compte pour le calcul des vitesses de dissolution, afin de comparer les données à la littérature.

## 2.4 Tests de reproduction des phases brunes

Deux types d'expériences ont été mis au point pour reproduire le brunissement sur les verres modèles de façon abiotique et de façon biotique.

Les tests de reproduction des phases brunes par voie abiotique ont consisté en des tests d'imbibition avec une solution riche en Mn sur des échantillons de verre préaltérés. Cela a été fait afin d'évaluer la capacité du Mn à diffuser à l'intérieur de la couche altérée et de former des phases brunes, selon un protocole adapté de la littérature (Watkinson *et al.*, 2005; Nuyts *et al.*, 2013).

Les tests de reproduction des phases brune par voie biotique ont été réalisés par croissance de biofilm à la surface de monolithes de verre VM. Cela a été fait afin d'évaluer la capacité de *Pseudomonas putida* à créer des phases brunes d'origine biotique en surface du verre à partir du Mn relâché par le verre. Le protocole a été adapté à partir du protocole de croissance de biofilm développé par Laura Galezowski, doctorante de l'IMPIC sur la suggestion de François Guyot.

### 2.4.1 Reproduction des phases brunes de façon abiotique : tests d'imbibition

Pour ces expériences, des monolithes de verres VNM et VM ont été utilisés. Une première étape a consisté à préparer des verres altérés par immersion de monolithes de verre en solution à pH acide afin d'obtenir en un temps raisonnable à l'échelle d'une thèse des couches d'altération hydratées épaisses, poreuses et desalcalinisées pour simuler les couches altérées des vitraux.

Avant l'introduction dans les réacteurs, les monolithes ont été nettoyés aux ultrasons avec de l'éthanol. Les solutions altérantes de 40 mL ont été préparées dans des réacteurs en Teflon de 90 mL avec EUP (18,2 M $\Omega$ ). Le pH a été ajusté avec de l'acide nitrique afin d'obtenir un pH initial de 3 ou de 6. Deux pH différents ont été choisis dans le but d'observer d'éventuelles différences dans le comportement du Mn sur une couche d'altération plus ou moins desalcalinisée.

Pour ces expériences, aucun tampon n'a été utilisé, le pH a été manuellement ajusté par ajout d'acide nitrique 1 à 3 fois par semaine pour maintenir le pH initial. Les réacteurs ont été gardés en conditions statiques dans une étuve à 30°C pendant 3,5 mois. A la fin de cette étape, les monolithes ont été rincés avec EUP et laissés à sécher.

Dans une seconde étape, des échantillons de VNM ont été ensuite mis dans une solution de MnCl<sub>2</sub> 0,5 M (pH EUP environ 5,5) pendant 1,5 mois à 30°C. La même concentration de MnCl<sub>2</sub> que dans l'étude de (Nuyts *et al.*, 2013) a été choisie. Les deux étapes de cette expérience sont illustrées en Figure 2.16.

Dans le Tableau 2.7 sont recensés les noms des échantillons avec le détail des conditions expérimentales correspondantes. Pour chaque condition, deux échantillons répliques ont

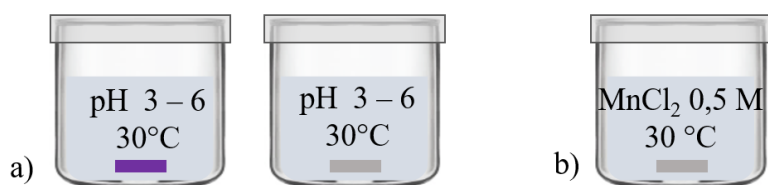


FIGURE 2.16 – Protocole des a) tests de préaltération à pH acide et b) imbibition avec une solution de manganèse. Le VM est représenté en violet et le VNM est représenté en gris.

été produits. Un échantillon a été utilisé pour observer la surface et l'échantillon réplique a été enrobé pour observer les échantillons en coupe transversale par MO, MEB et MET.

| Echantillon | conditions de (pre-)altération | Imbibition en $\text{MnCl}_2$ 0,5 M |
|-------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| VM-pH3      | pH 3 - 3,5 mois 30°C           | ×                                   |
| VM-pH6      | pH 6 - 3,5 mois 30°C           | ×                                   |
| VNM-pH 3    | pH 3 - 3,5 mois 30°C           | ×                                   |
| VNM-pH6     | pH 6 - 3,5 mois 30°C           | ×                                   |
| VNM-pH3-Mn  | pH 3 - 3,5 mois 30°C           | 1,5 mois                            |
| VNM-pH6-Mn  | pH 6 - 3,5 mois 30°C           | 1,5 mois                            |

TABLEAU 2.7 – Récapitulatif des conditions expérimentales effectuées et nomenclature des échantillons. La × indique que l'imbibition n'a pas été réalisée

## Caractérisation

Les échantillons altérés ont été observés en surface et/ou enrobés en résine afin d'être observés en coupe transversale. Le procédé de polissage des échantillons enrobés a été décrit dans le paragraphe 1.2.2.

Les observations en MO ont été effectuées avec le microscope KEYENCE VHX-6000 localisé au LRMH. Les observations MEB ont été effectuées avec deux instruments, le MEB de table du LISA, et le SEM-EDX JEOL JSM-6510 du département de Sciences de la terre de l'Université de Potsdam.

Des mesures à la microsonde ont également été effectuées au département de Sciences de la Terre de l'Université de Potsdam en collaboration avec Christina Günter, sur un instrument JXA-8200. Une tension de 15 kV a été utilisée, avec un courant de 3,5 nA. Le diamètre du point d'analyse était de 2  $\mu\text{m}$  et le temps d'analyse était de 6 secondes pour les alcalins et de 10 secondes pour les autres éléments. Du verre basaltique a été utilisé pour la calibration.

Pour observer les couches d'altération à plus fort grandissement, des analyses par microscopie électronique à transmission ont été réalisées. Pour cela, les échantillons ont été préparés en lames très fines (d'épaisseur submicrométrique) avec un instrument Thermo Fischer Helios G4 UC Dual Beam Focused Ion Beam (FIB) au GeoForschungsZentrum (GFZ) de Potsdam. En premier lieu, un dépôt en ligne de Pt d'épaisseur de 2  $\mu\text{m}$  a été fait sur la surface de l'échantillon pour protéger l'échantillon de la pulvérisation. Ensuite la surface des deux côtés de la ligne de Pt a été bombardée avec des ions  $\text{Ga}^+$  à 30 kV pour

obtenir deux larges cavités. L'échantillon est ensuite tourné de  $45^\circ$  par rapport au faisceau d'ions et la lame est libérée des deux extrémités qui étaient encore fixées. L'échantillon obtenu est installé sur une grille porte-échantillon en cuivre et poli avec un courant entre 230 et 30 pA avec une tension de 16, 8 ou 5 kV jusqu'à obtention de transparence aux électrons (Wirth, 2009). Pour cette étude, des lames  $15 \times 10 \times 0.15 \mu\text{m}$  ont été obtenues. Les différentes étapes sont résumées en Figure 2.17.

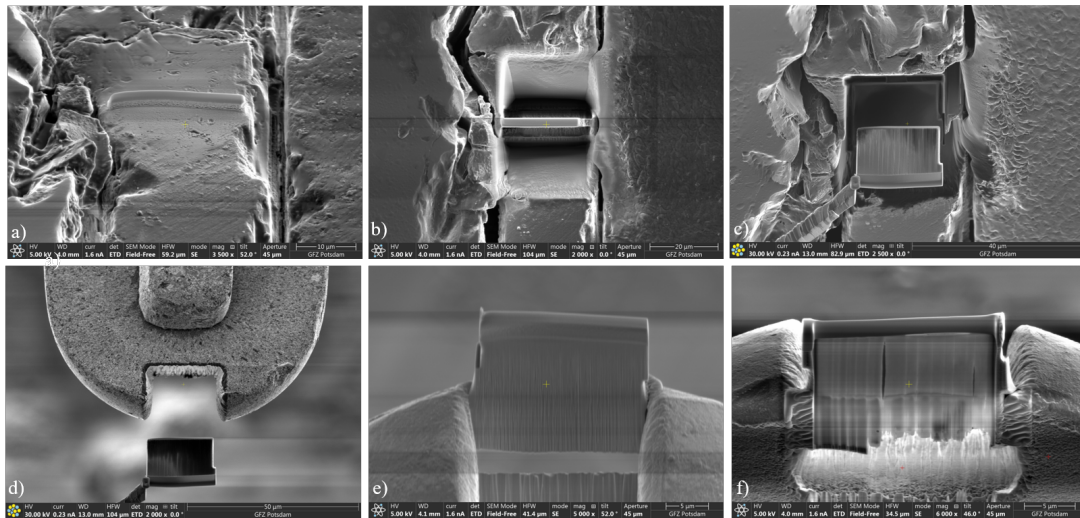


FIGURE 2.17 – Différentes étapes de préparation de lames FIB. a) dépôt de Pt sur l'échantillon b) cavités obtenues suite à un premier bombardement grossier c) prélèvement de la lame d) dépôt de la lame sur le porte-échantillon en cuivre e) lame sur le porte-échantillon avant polissage f) lame après polissage final. Images effectués par © Anja Schreiber (GFZ Potsdam).

La microscopie électronique à transmission en quelques mots...

La microscopie électronique à transmission (MET) utilise un faisceau d'électrons à forte énergie qui va frapper l'échantillon et passer à travers. Cette technique donne donc des informations sur la structure interne de l'échantillon, comme sur la structure cristalline et la morphologie. Les électrons transmis vont être collectés et une image de l'échantillon à haute résolution est obtenue (1 - 100 nm). La transmission des électrons va dépendre de la "transparence aux électrons" de l'échantillon. Les zones les plus foncées de l'échantillon seront celles où le moins d'électrons auront été transmis et inversement.

En modalité de microscopie électronique en transmission à balayage METB (STEM), le faisceau d'électrons est finement focalisé, il balaye la surface de l'échantillon et l'image est générée par les électrons transmis. Cette modalité permet de profiter des capacités des deux techniques d'imagerie électronique car il est possible d'avoir des informations sur la structure interne des échantillons avec une haute résolution mais aussi d'exploiter les informations obtenues par EDX.



La composition chimique des lames FIB a été mesurée avec un spectromètre EDAX energy-dispersive X-ray sur un FEI Quanta 3D FIB opéré à 10, 15, et 20 kV en modalité STEM.

Un MET FEI Tecnai G2 F20 X-Twin a été utilisé avec une tension de 200 kV pour effectuer des mesures de diffraction électronique sur des zones sélectionnées des lames FIB.

### 2.4.2 Reproduction des phases brune de façon biotique : tests de croissance de biofilm à la surface de verre

Le protocole de croissance de biofilm sur les monolithes de verre prévoit deux étapes. D'abord une étape de croissance bactérienne est réalisée dans 150 ml de milieu riche Lisogen Broth (LB) avec 300  $\mu$ l d'une solution de  $\text{MnSO}_4$  0,1 M, inoculé avec 1 ml de solution mère de *Pseudomonas putida*. Ce milieu de culture est mis sous agitation pendant une nuit à 25°C et 160 rpm. Le jour suivant, le milieu de culture est centrifugé à 4500 rpm pendant 15 minutes. Le surnageant est jeté et les bactéries sont resuspendues dans le même volume de solution de lavage (tampon HEPES 10 mM, NaCl 10 mM, pH 7,4). Ensuite l'étape de centrifugation est répétée et les bactéries sont resuspendues dans le milieu de minéralisation (glucose 1 mM,  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  2 mM, HEPES 10 mM, NaCl 0,7 mM,  $\text{MnSO}_4$  0,2 mM, pH 7,4). A ce milieu, tous les jours 300  $\mu$ L d'une solution de  $\text{MnSO}_4$  0.1 M sont ajoutés.

Dans un premier temps, la production de biofilm a été vérifiée en reproduisant les conditions de L. Galezowski sans échantillon de verre et en rajoutant tous les jours la solution de Mn. Du biofilm avec une forte coloration noire a été obtenu à l'interface entre la solution et l'air.

Par la suite, des monolithes de verre ont été introduits pour l'expérience A : un monolithe de VM sain (VM-s-biofilm-A) et un monolithe de VM pré-altéré à pH 3 pendant 1 mois à 30°C (VM-pH3-biofilm-A), en gardant l'ajout quotidien de la solution de Mn. Cette expérience a duré une semaine.

Cette étape d'ajout de Mn a ensuite été éliminée pour que le seul Mn présent en solution soit celui provenant du verre.

L'expérience B a été réalisée avec des monolithes de verre sans rajouter de Mn dans la solution de minéralisation. Le seul Mn disponible est donc celui provenant de l'altération du verre. Un échantillon sain (VM-s-biofilm-B) et un échantillon altéré à pH 3 pendant 1 mois à 30°C ont été utilisés (VM-pH3-biofilm-B). Cette expérience a duré un mois.

Le biofilm de *Pseudomonas putida* se développe à l'interface entre la solution et l'air. Ainsi, pour le faire pousser sur une surface, il faut que cette surface se trouve à l'interface solution/air. Dans le cas de cette étude, les monolithes ont été posés sur un petit bûcher retourné qui sert de support, à l'intérieur du réacteur (Figure 2.18). Un bouchon en coton a été utilisé pour permettre le passage de l'oxygène, puis le réacteur est gardé immobile et dans l'obscurité.

### Caractérisation

Les échantillons ont été observés en surface et/ou enrobés en résine afin d'être observés en coupe transversale. Le procédé de polissage des échantillons enrobés a été décrit

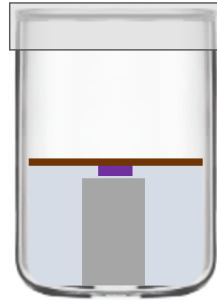


FIGURE 2.18 – Schéma des tests de croissance bactérienne à la surface de verre. Le monolithe de verre VM (en violet) est posé sur un support (en gris), à la hauteur de l'interface solution/air, à l'intérieur du réacteur. Le biofilm (en marron) se développe à l'interface solution/air et va recouvrir l'échantillon de verre.

dans le paragraphe 1.2.2. Les observations en MO ont été effectuées avec un microscope KEYENCE VHX-6000 localisé au LISA et équipé d'un objectif avec grandissement de 20x à 200x. Les observations MEB ont été effectuées avec le MEB de paillasse TM3000 du LISA.

Dans la Figure 2.19 est reporté un schéma récapitulatif des conditions d'altération les plus importantes effectuées au cours de ce travail.

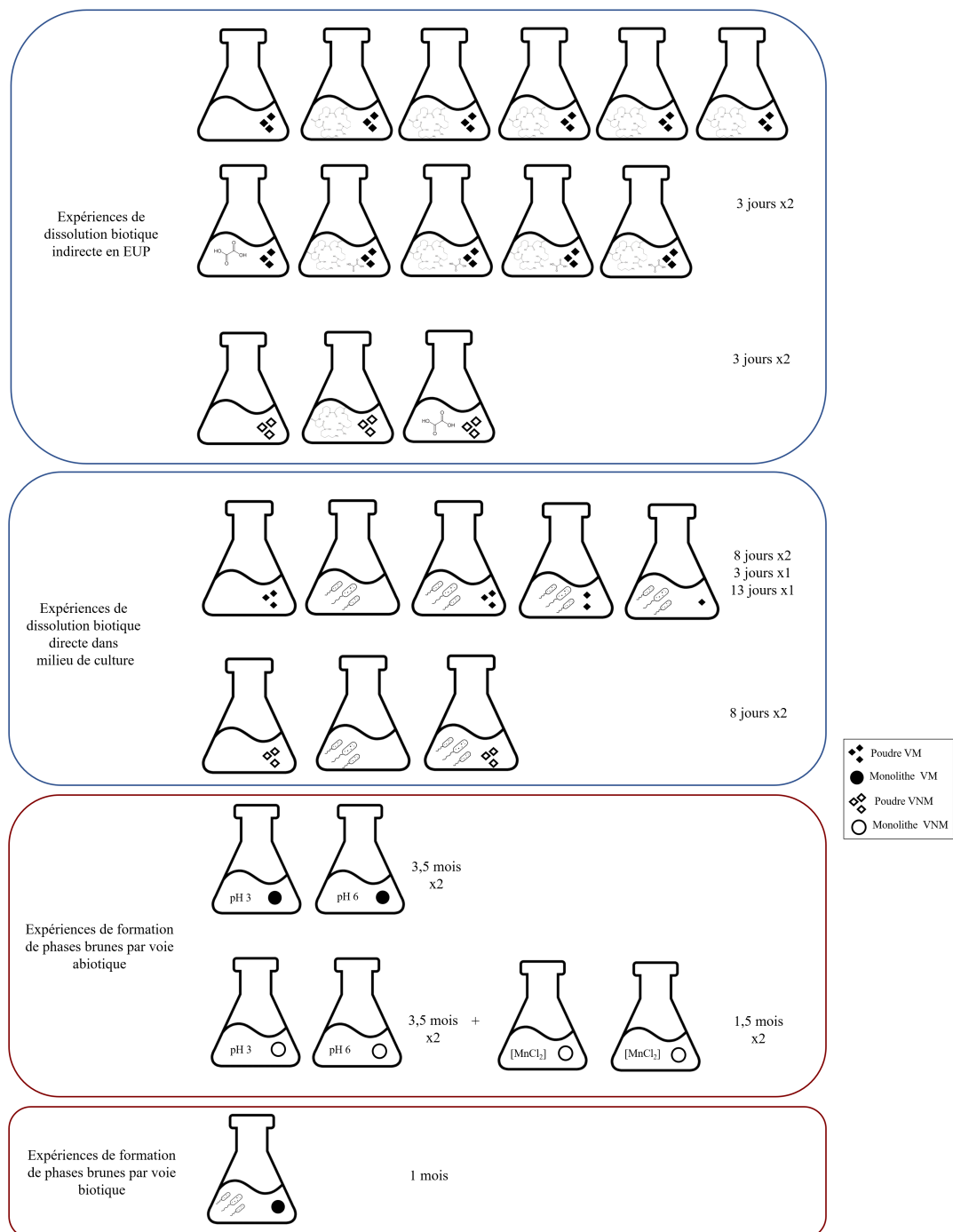


FIGURE 2.19 – Schéma récapitulatif des expériences d'altération les plus importantes réalisées au cours de ce travail, avec la durée temporelle associée et le nombre de réplicats.

# Chapitre 3

## Identification de micro-organismes présents sur les vitraux

Afin d'identifier les microorganismes, bactéries et champignons, présents sur les vitraux, et notamment ceux qui pourraient potentiellement contribuer à leur altération et à l'apparition du brunissement, des prélèvements sur site ont été réalisés.

Quelques études précédentes ont mis en évidence une large variété de champignons et bactéries sur des vitraux (Marvasi *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2014; Rölleke *et al.*, 1999; Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2001a,b; Carmona *et al.*, 2006). Cependant, aucune de ces études n'a été réalisée sur des vitraux en France. De plus, ces études ont souvent recours à des méthodes de prélèvement destructives pour le verre, ce qui décourage ce type de campagnes de recensement de microorganismes sur le patrimoine culturel. Enfin, l'accès à des vitraux *in situ* n'est possible que lors de chantiers de restauration qui permettent de se rapprocher du vitrail grâce à la présence d'échafaudages.

Le but de cette partie de mon travail est d'une part d'entamer un recensement des bactéries susceptibles d'altérer un vitrail, et d'autre part d'essayer de cibler l'identification de souches capables d'oxyder le Mn. Le focus de cette étude était donc sur les bactéries, mais des champignons ont également été rencontrés et donc recensés.

Ces thèmes présentent un intérêt pour le LGE afin de poursuivre les recherches sur la bioaltération des vitraux, mais aussi pour le *Laboratoire de Recherche pour les Monuments Historiques* (LRMH) qui a en charge, entre autres, le suivi de l'état de conservation des monuments historiques. Au cours de ces trois années de thèse, j'ai eu l'opportunité de pouvoir accéder à deux sites en cours de restauration et à un atelier de restauration, le prélèvement et l'identification de micro-organismes sur des vitraux a été possible grâce à une collaboration avec le pôle vitrail et le pôle microbiologie du LRMH.

Les points de prélèvement sur site ont été choisis en collaboration avec Barbara Trichereau et Claudine Loisel du pôle vitrail du LRMH. Ces deux spécialistes, ou l'une des deux, étaient présentes sur site au moment des prélèvements afin de me guider dans le choix des points de prélèvement. Je me suis occupée de la mise en culture des prélèvements sur boîte de Petri et de l'isolement des souches bactériennes, tâches qui ont été menés au LGE. Le même travail d'isolement pour les souches de champignons a été effectué par C. Ranchoux lors de son stage de M2. L'identification des champignons sur lame microscopique a été faite avec l'aide d'Alexandre François et de Johann Leplat du pôle microbiologie du LRMH. Je me suis ensuite dédiée à l'extraction, l'amplification et l'envoi de l'ADN des

bactéries. Après séquençage, les séquences obtenues ont été nettoyées manuellement, puis ont été comparées aux séquences de référence de la base GenBank par alignement avec l'outil BLASTn. Ces résultats ont été affinés par J. Leplat, qui s'est enfin occupé du traitement statistique des données et des analyses de phylogénétique.

### 3.1 Bactéries identifiées

102 échantillons d'ADN bactérien ont été identifiés par séquençage : 23 pour Versailles, 47 pour Bar sur Seine, 17 pour Wissembourg et 15 pour Lachalade. Les résultats sont reportés dans les Tableaux 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6. Le taux de recouvrement donne le pourcentage de la séquence de l'échantillon effectivement alignée avec celle de la base de données. Le taux d'identité donne le pourcentage de similarité entre la séquence de l'échantillon et les séquences présentes dans la base. Le code "S" reporté dans la dernière colonne des tableaux fait référence au code assigné pour chaque isolat pour le traitement des données.

La plupart des séquences présentent au moins 99 % de similarité avec les séquences de la base de données GenBank et ont pu être identifiées de manière univoque. D'autres séquences présentent des taux de similarité plus faibles, permettent néanmoins d'avoir une idée du type de bactérie, sans permettre une identification de manière certaine. Certaines bactéries ont été regroupées en « clusters » pour les traitements statistiques. Par exemple, on peut citer le cluster *Paenibacillus* pour lequel la séquence ne permettait pas de faire la différence entre 6 espèces.

Les sites de Bar-sur-Seine et Lachalade présentent des communautés similaires en termes de Phyla bactérien, avec une prépondérance d'Actinobacteria et des pourcentages plus faibles de Proteobacteria et Firmicutes. Des proportions inversées pour ces deux Phyla sur les deux sites sont observées. Pour le site de Bar-sur-Seine, 66 % des bactéries sont des Actinobacteria, 19 % Firmicutes et 15 % de Proteobacteria. Pour le site de Lachalade, les Actinobacteria représentent 67 % de la communauté bactérienne, les Proteobacteria 20 %, et les Firmicutes 13%.

Les sites de Versailles et de Wissembourg se différencient nettement des autres sites. Pour le site de Versailles, 87 % des bactéries appartiennent au Phylum des Firmicutes, 9 % aux Actinobacteria et 4 % aux Proteobacteria. Pour le vitrail de Wissembourg, on trouve 100 % d'Actinobacteria. Ces résultats sont résumés en Figure 3.1.

En ce qui concerne le site de Bar-sur-Seine, pour lequel sept prélèvements ont été effectués en face interne (FI) et sept en face externe (FE), la majorité des bactéries qui se sont développées et ont été isolées proviennent des prélèvements réalisés en face externe des vitraux (31 en FE contre 16 en FI). La comparaison est plus difficile pour le site de Versailles, car uniquement deux prélèvements avaient été réalisés en intérieur. Pour le site de Wissembourg, les bactéries se sont développées indifféremment de la provenance (face interne ou face externe). Ce résultat pourrait être attribué au stockage des panneaux de vitrail à l'intérieur de l'atelier de restauration qui rend le facteur face interne/face externe difficilement exploitable.

Enfin, en général, il n'a pas été possible d'observer de différence ou de préférence de croissance en fonction du milieu de culture gélosé utilisé. La plupart des bactéries semble

IDENTIFICATION DE MICRO-ORGANISMES PRÉSENTS SUR LES VITRAUX

| Echantillon         | Code  | Identification                    | Recouvrement | Identité | Phylum            | S  |
|---------------------|-------|-----------------------------------|--------------|----------|-------------------|----|
| VER_B11-2 p.68_MMV  | V2_2  | <i>Paenibacillus tundrae</i>      | 100%         | 99,78%   | Firmicutes        | 13 |
|                     |       | <i>amylolyticus</i>               |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>rylanexedens</i>               |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>agaridevorans</i>              |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>mobilis</i>                    |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>pabuli</i>                     |              |          |                   |    |
| VER_B11-2 p.68_LB   | V4b   | <i>Paenibacillus amylolyticus</i> | 100%         | 99,68%   | Firmicutes        | 13 |
|                     |       | <i>rylanexedens</i>               |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>tundrae</i>                    |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>pabuli</i>                     |              |          |                   |    |
| VER_B11-2 p.68_LB   | V4J   | <i>Micrococcus aloeverae</i>      | 99%          | 100,00%  | Actinobacteria    | 13 |
|                     |       | <i>yunnanensis</i>                |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>luteus</i>                     |              |          |                   |    |
| VER_B4-1 p.15_MMV   | V6    | <i>Paenibacillus amylolyticus</i> | 100%         | 99,78%   | Firmicutes        | 14 |
|                     |       | <i>rylanexedens</i>               |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>pabuli</i>                     |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>tundrae</i>                    |              |          |                   |    |
| VER_B4-1 p.15_MMV   | V13_1 | <i>Staphylococcus aureus</i>      | 99%          | 97,78%   | Firmicutes        | 14 |
| VER_B4-1 p.15_MMV   | V13_2 | <i>Paenibacillus tundrae</i>      | 100%         | 99,89%   | Firmicutes        | 14 |
|                     |       | <i>amylolyticus</i>               |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>rylanexedens</i>               |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>agaridevorans</i>              |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>mobilis</i>                    |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>pabuli</i>                     |              |          |                   |    |
| VER_B4-1 p.15_MMV   | V14_2 | <i>Micrococcus luteus</i>         | 100%         | 99,90%   | Actinobacteria    | 14 |
|                     |       | <i>yunnanensis</i>                |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>aloeverae</i>                  |              |          |                   |    |
| VER_B4-1 p.15_MMV   | V16   | <i>Paenibacillus tundrae</i>      | 100%         | 99,67%   | Firmicutes        | 14 |
|                     |       | <i>amylolyticus</i>               |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>rylanexedens</i>               |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>agaridevorans</i>              |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>mobilis</i>                    |              |          |                   |    |
| VER_B4-2 p.15_MMV   | V5    | <i>Bacillus nealsonii</i>         | 45%          | 75,65%   | Firmicutes        | 15 |
|                     |       | <i>Planococcus sp.</i>            | 60%          | 72,78%   | Firmicutes        |    |
| VER_B4-2 p.68_MMV   | V1A   | <i>Pantoea septica</i>            | 100%         | 100,00%  | Proteobacteria(γ) | 17 |
| VER_B4-2 p.68_MMVMn | V8_1  | <i>Paenibacillus barengoltzii</i> | 100%         | 100,00%  | Firmicutes        | 17 |
| VER_B4-2 p.68_MMVMn | V8_2  | <i>Paenibacillus barengoltzii</i> | 100%         | 100,00%  | Firmicutes        | 17 |
| VER_B4-2 p.68_MMV   | V9_1  | <i>Paenibacillus tundrae</i>      | 100%         | 99,78%   | Firmicutes        | 17 |
|                     |       | <i>rylanexedens</i>               |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>pabuli</i>                     |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>amylolyticus</i>               |              |          |                   |    |
| VER_B4-2 p.68_MMV   | V9_2  | <i>Paenibacillus amylolyticus</i> | 99%          | 99,52%   | Firmicutes        | 17 |
|                     |       | <i>rylanexedens</i>               |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>pabuli</i>                     |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>tundrae</i>                    |              |          |                   |    |
| VER_B4-2 p.68_LB    | V11_1 | <i>Paenibacillus tundrae</i>      | 100%         | 99,89%   | Firmicutes        | 17 |
|                     |       | <i>amylolyticus</i>               |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>rylanexedens</i>               |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>agaridevorans</i>              |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>mobilis</i>                    |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>pabuli</i>                     |              |          |                   |    |
| VER_B4-2 p.68_LB    | V11_2 | <i>Paenibacillus tundrae</i>      | 100%         | 99,67%   | Firmicutes        | 17 |
|                     |       | <i>amylolyticus</i>               |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>rylanexedens</i>               |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>agaridevorans</i>              |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>mobilis</i>                    |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>pabuli</i>                     |              |          |                   |    |
| VER_B4-2 p.68_LB    | V12_1 | <i>Paenibacillus tundrae</i>      | 99%          | 99,89%   | Firmicutes        | 17 |
|                     |       | <i>amylolyticus</i>               |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>rylanexedens</i>               |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>agaridevorans</i>              |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>mobilis</i>                    |              |          |                   |    |
|                     |       | <i>pabuli</i>                     |              |          |                   |    |
| VER_B4-2 p.68_LB    | V12_2 | <i>Paenibacillus rylanexedens</i> | 99%          | 100,00%  | Firmicutes        | 17 |
|                     |       | <i>amylolyticus</i>               |              |          |                   |    |

TABLEAU 3.1 – Résultats d'identification des bactéries sur les vitraux du site de Versailles en face externe.

## CHAPITRE 3

| Echantillon            | Code | Identification  | Recouvrement | Identité | Phylum     | S  |
|------------------------|------|---|--------------|----------|------------|----|
| VER_B4-2 p.17-FI_LBMn  | V1_1 | <i>Paenibacillus</i><br><i>tundrae</i><br><i>amylolyticus</i><br><i>xylanexedens</i><br><i>agaridevorans</i><br><i>mobilis</i><br><i>pabuli</i> | 99%          | 99,78%   | Firmicutes | 16 |
| VER_B4-2 p.17-FI_LB_Mn | V1_2 | <i>Paenibacillus</i><br><i>tundrae</i><br><i>amylolyticus</i><br><i>xylanexedens</i><br><i>agaridevorans</i><br><i>mobilis</i><br><i>pabuli</i> | 100%         | 99,89%   | Firmicutes | 16 |
| VER_B91-2 p.17-FI_LBMn | V3J  | <i>Staphylococcus</i><br><i>warneri</i><br><i>pasteuri</i>  | 100%         | 100%     | Firmicutes | 18 |
| VER_B91-2 p.17-FI_LBMn | V3b  | <i>Paenibacillus</i><br><i>amylolyticus</i><br><i>xylanexedens</i><br><i>tundrae</i><br><i>pabuli</i>   | 100%         | 99,48%   | Firmicutes | 18 |
| VER_B91-2 p.17-FI_LB   | V7   | <i>Paenibacillus</i><br><i>amylolyticus</i><br><i>xylanexedens</i><br><i>pabuli</i><br><i>tundrae</i>   | 100%         | 99,89%   | Firmicutes | 18 |

TABLEAU 3.2 – Résultats d'identification des bactéries sur les vitraux du site de Versailles en face interne.

capable de pousser sur le milieu riche LB et sur le milieu pauvre MMV, avec ou sans Mn.

IDENTIFICATION DE MICRO-ORGANISMES PRÉSENTS SUR LES VITRAUX

| Echantillon             | Code   | Identification   | Recouvrement | Identité | Phylum             | S |
|-------------------------|--------|--|--------------|----------|--------------------|---|
| BAR_B100_LD_P7_FE_LB    | B37    | <i>Arthrobacter parietis</i>   | 100%         | 100,00%  | Actinobacteria     | 1 |
| BAR_B101_LC_P7_FE_LBMn  | B42    | <i>Bacillus aryabhatai</i>   | 100%         | 100,00%  | Firmicutes         | 2 |
| BAR_B101_LC_P7_FE       | B43    | <i>Bacillus megaterium aryabhatai</i>  | 100%         | 100,00%  | Firmicutes         | 2 |
| BAR_B103_LD_P4_FE_LBMn  | B34    | <i>Brachybacterium tyrofermentans</i>  | 100%         | 100,00%  | Actinobacteria     | 5 |
| BAR_B103_LD_P4_FE_LBMn  | B35    | <i>Staphylococcus epidermidis</i>  | 100%         | 99,87%   | Firmicutes         | 5 |
| BAR_B103_LD_P4_FE_MMV   | B36_B2 | <i>Micrococcus luteus yunnanensis aloeverae</i>  | 100%         | 99,89%   | Actinobacteria     | 5 |
| BAR_B103_LD_P4_FE_MMV   | B36J   | <i>Microbacterium kitamiense tumbae</i>  | 100%         | 99,88%   | Actinobacteria     | 5 |
| BAR_B103_LD_P4_FE_LB    | B52_1  | <i>Kocuria rhizophila</i>  | 100%         | 100,00%  | Actinobacteria     | 5 |
| BAR_B103_LD_P4_FE_LB    | B52_2  | <i>Kocuria rhizophila</i>  | 100%         | 100,00%  | Actinobacteria     | 5 |
| BAR_B103_LD_P4_FE_LB    | B53    | <i>Brachybacterium arcticum</i>  | 100%         | 100,00%  | Actinobacteria     | 5 |
| BAR_B103_LD_P4_FE_LB    | B54    | <i>Terracoccus luteus</i>  | 100%         | 100,00%  | Actinobacteria     | 5 |
| BAR_B103_LD_P4_FE_MMVMn | B65    | <i>Sanguibacter inulinus</i>   | 100%         | 100,00%  | Actinobacteria     | 5 |
| BAR_B103_LD_P4_FE_MMVMn | B66t   | <i>Sanguibacter inulinus</i>   | 100%         | 100,00%  | Actinobacteria     | 5 |
| BAR_B103_R16_FE_LB      | B38    | <i>Paenibacillus macquariensis</i>   | 100%         | 99,62%   | Firmicutes         | 6 |
| BAR_B103_R16_FE_LBMn    | B44    | <i>Bacillus galactosidilyticus</i>   | 99%          | 100,00%  | Firmicutes         | 6 |
| BAR_B104_LB_P4_FE_LBMn  | B46    | <i>Agreia pratensis</i>  | 100%         | 100,00%  | Actinobacteria     | 8 |
| BAR_B104_LB_P4_FE_LBMn  | B49    | <i>Clavibacter michiganensis</i>   | 100%         | 100,00%  | Actinobacteria     | 8 |
| BAR_B104_R17_FE_LB      | B1     | <i>Psychrobacter luti glacincola</i>   | 100%         | 98,85%   | Proteobacteria(γ)  | 9 |
| BAR_B104_R17_FE_LB      | B2     | <i>Pseudoclavibacter helvolus terrae</i>   | 100%         | 99,42%   | Actinobacteria     | 9 |
| BAR_B104_R17_FE_LB      | B3     | <i>Sanguibacter inulinus</i>   | 100%         | 99,39%   | Actinobacteria     | 9 |
| BAR_B104_R17_FE_LBMn    | B4     | <i>Pseudoclavibacter helvolus terrae</i>   | 100%         | 96,60%   | Actinobacteria     | 9 |
| BAR_B104_R17_FE_LBMn    | B5     | <i>Arthrobacter agilis ruber pityocampae</i>   | 100%         | 99,88%   | Actinobacteria     | 9 |
| BAR_B104_R17_FE_LBMn    | B6     | <i>Plantibacter flavus cousiniaie</i>  | 100%         | 100,00%  | Actinobacteria     | 9 |
| BAR_B104_R17_FE_LBMn    | B6PR1  | <i>Sanguibacter inulinus</i>   | 100%         | 99,89%   | Actinobacteria     | 9 |
| BAR_B104_R17_FE_MMV     | B7     | <i>Clavibacter michiganensis</i>   | 100%         | 100,00%  | Actinobacteria     | 9 |
| BAR_B104_R17_FE_MMVMn   | B9_1   | <i>Arthrobacter sp.</i>  | 99%          | 87,37%   | Actinobacteria     | 9 |
| BAR_B104_R17_FE_MMVMn   | B9_2   | <i>Microbacterium foliorum phyllosphaerae oleivorans maritypicum saperdae oxydans natoriense</i> | 100%         | 99,88%   | Actinobacteria     | 9 |
| BAR_B104_R17_FE_MMVMn   | B10    | <i>Plantibacter flavus cousiniaie</i>  | 100%         | 100,00%  | Actinobacteria     | 9 |
| BAR_B104_R17_FE_MMVMn   | B11    | <i>Agreia pratensis</i>  | 100%         | 100,00%  | Actinobacteria     | 9 |
| BAR_B104_R17_FE_MMVMn   | B12J   | <i>Plantibacter flavus cousiniaie</i>  | 100%         | 100,00%  | Actinobacteria     | 9 |
| BAR_B104_R17_FE_MMVMn   | B12B   | <i>Agrobacterium tumefaciens</i>   | 100%         | 99,78%   | Proteobacteria (α) | 9 |

TABLEAU 3.3 – Résultats d'identification des bactéries sur les vitraux du site de Bar-sur-Seine en face externe.



| Echantillon             | Code  | Identification                                  | Recouvr.t | Identité | Phylum            | S |
|-------------------------|-------|---|-----------|----------|-------------------|---|
| BAR_B101_LC_P7_FI_MMVMn | B30   | <i>Sphingomonas mucosissima</i>                 | 97%       | 81,20%   | Proteobacteria    | 3 |
| BAR_B101_LC_P7_FI_MMVMn | B31M  | <i>Sphingomonas sp.</i>                         | 97%       | 81,42%   | Proteobacteria    | 3 |
| BAR_B101_LC_P7_FI_MMV   | B62   | <i>Sphingomonas aerolata</i>                    | 91%       | 82,01%   | Proteobacteria    | 3 |
| BAR_B101_LC_P7_FI_MMV   | B63   | <i>Azospirillum oryzae</i>                      | 80%       | 75,09%   | Proteobacteria    | 3 |
| BAR_B101_LD_P7_FI_MMV   | B16   | <i>Sphingomonas sp.</i>                         | 100%      | 100,00%  | Proteobacteria(α) | 4 |
| BAR_B101_LD_P7_FI_MMVMn | B17J  | <i>Micrococcus yunnanensis luteus aloeverae</i> | 100%      | 100,00%  | Actinobacteria    | 4 |
| BAR_B101_LD_P7_FI_MMVMn | B17B  | <i>Staphylococcus epidermidis</i>               | 100%      | 99,89%   | Firmicutes        | 4 |
| BAR_B103_R16_FI_LB      | B18   | <i>Arthrobacter ruber agilis</i>                | 99%       | 99,88%   | Actinobacteria    | 7 |
| BAR_B103_R16_FI_LB      | B19   | <i>Frigoribacterium faeni</i>                   | 100%      | 100,00%  | Actinobacteria    | 7 |
| BAR_B103_R16_FI_LB      | B19A  | <i>Frigoribacterium faeni</i>                   | 100%      | 99,89%   | Actinobacteria    | 7 |
| BAR_B103_R16_FI_LB      | B20   | <i>Arthrobacter luteolus</i>                    | 95%       | 91,95%   | Actinobacteria    | 7 |
| BAR_B103_R16_FI_LBMn    | B21   | <i>Arthrobacter ruber agilis pityocampae</i>    | 100%      | 100,00%  | Actinobacteria    | 7 |
| BAR_B103_R16_FI_LBMn    | B23J  | <i>Staphylococcus warneri pasteuri</i>          | 100%      | 100%     | Firmicutes        | 7 |
| BAR_B103_R16_FI_LBMn    | B23B  | <i>Staphylococcus epidermidis</i>               | 100%      | 100,00%  | Firmicutes        | 7 |
| BAR_B103_R16_FI_LBMn    | B27_2 | <i>Staphylococcus hominis</i>                   | 100%      | 100,00%  | Firmicutes        | 7 |
| BAR_B103_R16_FI_MMVMn   | B29   | <i>Frigoribacterium faeni</i>                   | 100%      | 99,76%   | Actinobacteria    | 7 |

TABLEAU 3.4 – Résultats d’identification des bactéries sur les vitraux du site de Bar-sur-Seine en face interne.

| Echantillon         | Code  | Identification                       | Recouvrement | Identité | Phylum         | S  |
|---------------------|-------|--------------------------------------|--------------|----------|----------------|----|
| WIS_B0R3_1_FE_LB    | W1_B  | <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> | 100%         | 100,00%  | Actinobacteria | 19 |
| WIS_B0R3_1_FE_LB    | W1_J  | <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> | 100%         | 100,00%  | Actinobacteria | 19 |
| WIS_B0R3_1_FE_LB    | W2_1  | <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> | 100%         | 100,00%  | Actinobacteria | 19 |
| WIS_B0R3_1_FE_LB    | W2_2G | <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> | 99%          | 100,00%  | Actinobacteria | 19 |
| WIS_B0R3_1_FE_LB    | W2_2P | <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> | 100%         | 100,00%  | Actinobacteria | 19 |
| WIS_B0R3_1_FE_LB    | W2A   | <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> | 100%         | 100,00%  | Actinobacteria | 19 |
| WIS_B0R3_1_FE_LB    | W3    | <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> | 100%         | 100,00%  | Actinobacteria | 19 |
| WIS_B0R3_1_FE_LB    | W5_2  | <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> | 100%         | 100,00%  | Actinobacteria | 19 |
| WIS_B0R3_1_FI_LB    | W6    | <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> | 100%         | 100,00%  | Actinobacteria | 20 |
| WIS_B0R3_1_FI_MMVMn | W4    | <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> | 100%         | 99,78%   | Actinobacteria | 20 |
| WIS_B0R3_1_FI_LB    | W11   | <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> | 100%         | 99,89%   | Actinobacteria | 20 |
| WIS_B0R3_1_FI_MMVMn | W7    | <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> | 100%         | 100,00%  | Actinobacteria | 20 |
| WIS_B0R3_2_FE_MMV   | W9    | <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> | 100%         | 100,00%  | Actinobacteria | 21 |
| WIS_B0R3_2_FE_LB    | W10   | <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> | 100%         | 100,00%  | Actinobacteria | 21 |
| WIS_B0R3_2_FI_LB    | W5_1P | <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> | 100%         | 100,00%  | Actinobacteria | 22 |
| WIS_B0R3_2_FI_LB    | W12_1 | <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> | 100%         | 100,00%  | Actinobacteria | 22 |
| WIS_B0R3_2_FI_LB    | W12_2 | <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> | 100%         | 100,00%  | Actinobacteria | 22 |

TABLEAU 3.5 – Résultats d’identification des bactéries sur le vitrail du site de Wissembourg en face interne et externe en atelier de restauration.

IDENTIFICATION DE MICRO-ORGANISMES PRÉSENTS SUR LES VITRAUX

---

| Echantillon      | Code  | Identification  | Recouvr.t | Identité | Phylum   | S  |
|------------------|-------|---|-----------|----------|--|----|
| LAC_B0R4_1_MMV   | L1A   | <i>Arthrobacter agilis</i><br><i>ruber</i>  | 100%      | 100,00%  | Actinobacteria   | 10 |
| LAC_B0R4_1_MMV   | L1X   | <i>Arthrobacter agilis</i><br><i>ruber</i><br><i>pityocampae</i>  | 100%      | 99,06%   | Actinobacteria   | 10 |
| LAC_B0R4_1_MMV   | L3    | <i>Acinetobacter lwoffii</i>  | 100%      | 100,00%  | Proteobacteria( $\gamma$ )   | 10 |
| LAC_B0R4_1_LBMn  | L4_1  | <i>Micrococcus luteus</i><br><i>yunnanensis</i><br><i>aloeverae</i>   | 100%      | 100,00%  | Actinobacteria   | 10 |
| LAC_B0R4_1_LBMn  | L4_2  | <i>Micrococcus luteus</i><br><i>yunnanensis</i><br><i>aloeverae</i>   | 100%      | 100,00%  | Actinobacteria   | 10 |
| LAC_B0R4_1_LBMn  | L11   | <i>Micrococcus luteus</i><br><i>yunnanensis</i>   | 100%      | 100,00%  | Actinobacteria   | 10 |
| LAC_B0R4_1_LB    | L13   | <i>Micrococcus luteus</i><br><i>aloeverae</i><br><i>yunnanensis</i>   | 100%      | 99,90%   | Actinobacteria   | 10 |
| LAC_B0R4_1_LB    | L8    | <i>Agrobacterium fabrum</i><br><i>tumejaciens</i><br><i>salinitolerans</i><br><br><i>Rhizobium</i><br><i>/Agrobacterium</i> | 100%      | 99,90%   | Proteobacteria( $\alpha$ )<br><br><br><br>Proteobacteria( $\alpha$ ) | 10 |
| LAC_B5P4_1_LB    | L2    | <i>Micrococcus luteus</i><br><i>yunnanensis</i><br><i>aloeverae</i>   | 100%      | 100,00%  | Actinobacteria   | 11 |
| LAC_B5P4_1_MMVMn | L6    | <i>Renibacterium salmoninarum</i>   | 51%       | 93,24%   | Actinobacteria   | 11 |
| LAC_B5P4_1_MMVMn | L6_2b | <i>Acinetobacter lwoffii</i>  | 100%      | 99,88%   | Proteobacteria( $\gamma$ )   | 11 |
| LAC_B5P4_1_MMVMn | L6_2j | <i>Arthrobacter tumbae</i><br><i>tecti</i><br><i>subterraneus</i><br><i>parietis</i>  | 100%      | 100,00%  | Actinobacteria   | 11 |
| LAC_B6P3_2_LB    | L9    | <i>Bacillus thuringiensis</i><br><i>simplex</i><br><i>muralis</i><br><i>oryzaecorticis</i><br><i>huizhouensis</i>           | 100%      | 100,00%  | Firmicutes   | 12 |
| LAC_B6P3_2_LB    | L10   | <i>Brevibacterium frigoritolerans</i><br><i>Micrococcus luteus</i><br><i>yunnanensis</i><br><i>aloeverae</i>                | 100%      | 100,00%  | Actinobacteria<br>Actinobacteria                                     | 12 |
| LAC_B6P3_2_LBMn  | L12   | <i>Bacillus muralis</i>   | 99%       | 100,00%  | Firmicutes   | 12 |

TABLEAU 3.6 – Résultats d'identification des bactéries sur les vitraux du site de La-chalade en face interne en atelier de restauration.

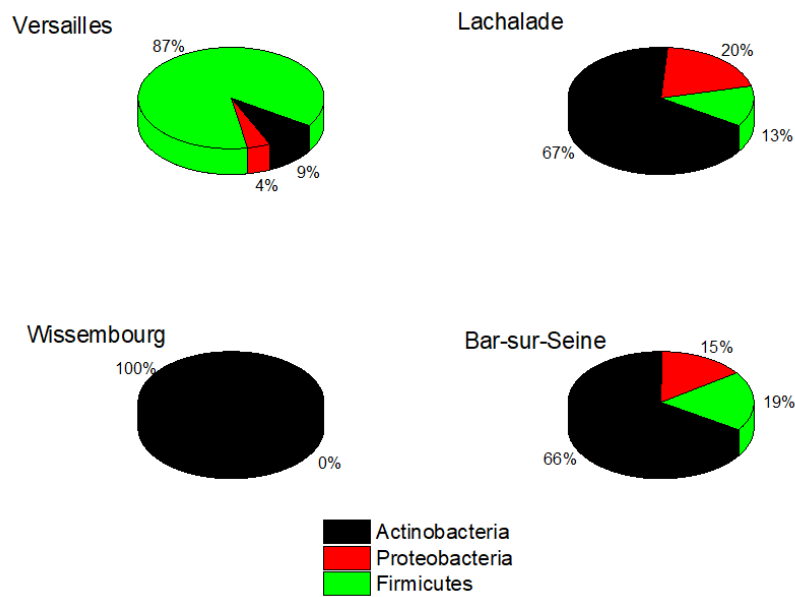


FIGURE 3.1 – Schéma de la répartition en pourcentage des différents phyla de bactéries (Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria) par site d'échantillonnage.

### 3.1.1 Analyse phylogénétique

L'arbre phylogénétique des bactéries identifiées est représenté sur la Figure 3.2. Les phyla principaux rencontrés sont les Actinobacteria (*Arthrobacter sp.*, *Micrococcus sp.*, etc.) et les Firmicutes (*Paenibacillus sp.*, *Bacillus sp.*, *Staphylococcus sp.*) ainsi que quelques bactéries parmi les alpha et gamma-proteobacteria.

La comparaison avec les espèces bactériennes connues dans la littérature permet de montrer que seuls les *A. crystallopoietes* isolés sur les vitraux de Wissembourg ont une séquence similaire à celles de bactéries connues pour oxyder le manganèse. Notamment, les souches de *Bacillus* isolées dans l'étude semble différentes des souches de *Bacillus* d'espèce indéfinie connues pour oxyder cet élément.



### 3.1.2 Étude de la diversité entre les échantillons

La Figure 3.3 reporte les résultats de l'analyse en Coordonnées Principales (PCoA). Le graphe montre que les échantillons sont généralement bien regroupés en fonction de la provenance des vitraux, résultat statistiquement confirmé par le test adonis associé à la PCoA. Les groupes de bactéries trouvées sur les vitraux de Bar-sur-Seine (en rose) et de Lachalade (en vert), bien qu'assez distincts les uns des autres, se trouvent dans la même zone du graphe, montrant ainsi une certaine similarité. Cette similarité avait déjà été constatée au moment de l'étude des Phyla majoritaires en fonction de la provenance des vitraux échantillonnés. Les échantillons de Versailles (en bleu clair) et les échantillons de Wissembourg (en violet) forment deux groupes clairement isolés des autres, bien que l'un des échantillon provenant de Versailles soit positionné à proximité du groupe Lachalade - Bar-sur-Seine.

Il n'a pas été possible de mettre en évidence des différences significatives entre les échantillons prélevés en face interne ou face externe. Deux échantillons externes sont dissociés des autres pour le site de Versailles (13 et 14), en raison de la présence du *Micrococcus luteus cluster* dans ces deux échantillons en plus de *Paenibacillus amylolyticus cluster*, mais ce résultat n'est pas statistiquement significatif.

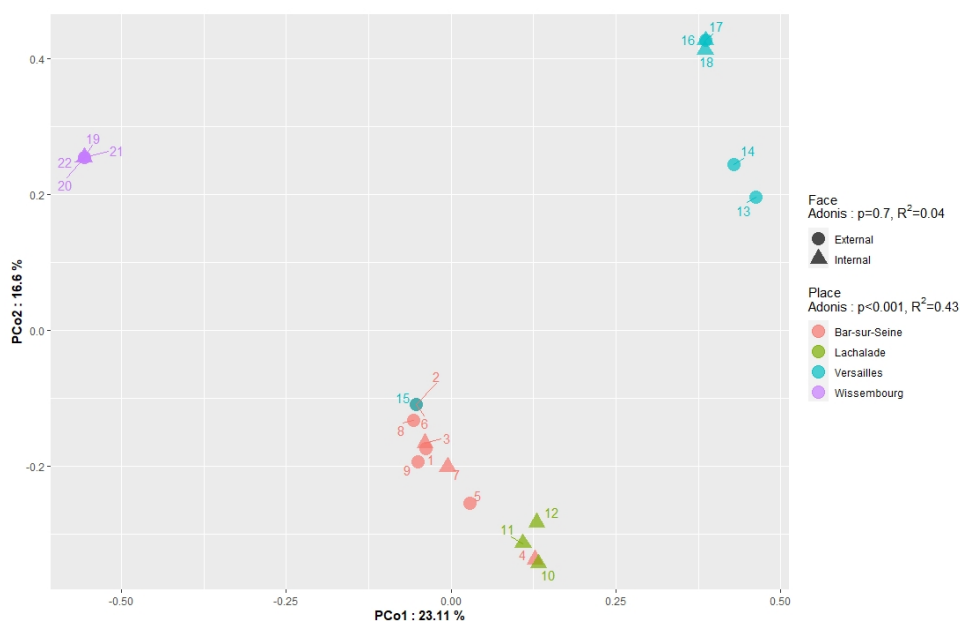


FIGURE 3.3 – Résultats de l'analyse par coordonnées principales (PCoA) qui montrent le regroupement des échantillons par similarité des communautés bactériennes. Des ressemblances sont rencontrées entre la communauté bactérienne de Bar-sur-Seine et celle de Lachalade, tandis que les communautés bactériennes des sites de Versailles et de Wissembourg sont éloignées entre elles et également éloignées du groupe formé par Lachalade et Bar-sur-Seine.

En Figure 3.4, la représentation des résultats sous forme de "heatmap" permet de présenter les proportions de chaque cluster bactérien en fonction de chaque échantillon. Le dendrogramme sur les lignes donne la proximité entre les échantillons. Cela permet de retrouver le facteur en « provenance des vitraux » obtenus avec la PCoA. En effet les

bactéries du site de Wissembourg et celles du site de Versailles se séparent nettement par rapport aux sites de Lachalade et Bar-sur-Seine.

En ce qui concerne le site de Versailles, une prédominance du « *Paenibacillus amylophilus* cluster » est rencontrée. Tous les isolats concernés apparaissent sous le nom de « *Paenibacillus amylophilus* cluster » parce que c'est l'identification la plus probable par rapport à la bibliographie sans que l'on puisse en être sûr à 100 %.

Pour le site de Wissembourg, *Arthrobacter cristallopoietes* a été la seule espèce bactérienne isolée. La "heatmap" montre donc une diversité interne faible pour ces deux sites (nulle pour Wissembourg). Les sites de Bar sur Seine et de Lachalade présentent au contraire une diversité interne plus importante.

Le dendrogramme sur les colonnes donne la proximité entre les différents clusters bactériens. La Figure 3.4 montre que beaucoup de clusters sont spécifiques à certains sites, les *Arthrobacter cristallopoietes* ont été isolés uniquement à Wissembourg, et les « *Paenibacillus amylophilus* cluster » ont tous été isolés à Versailles. Au contraire, d'autres bactéries sont distribuées plus transversalement, comme celles du cluster "*Micrococcus luteus* cluster" qui sont ont été isolées sur les sites de Versailles, Lachalade et Bar-sur-Seine : l'échantillon atypique de Versailles identifié lors de l'analyse par PCoA, qui était placé à proximité du groupe Lachalade - Bar-sur-Seine, s'explique par la prépondérance de ce cluster *Micrococcus luteus*.

En croisant les informations obtenues grâce aux différentes représentations des résultats, il est possible de dire que l'analyse PCoA a permis de mettre en évidence les différences de communautés bactériennes d'un site à l'autre à une échelle fine. Des ressemblances entre les sites de Lachalade et de Bar-sur-Seine avaient déjà été observées en Figure 3.1 sur la base des phyla de bactéries rencontrées. La PCoA prend en considération l'information de l'espèce et permet donc de séparer à un niveau plus fin les communautés de Lachalade et de Bar-sur-Seine. La similarité entre les sites de Lachalade et Bar-sur-Seine est due aux genres bactériens de *Arthrobacter* et *Micrococcus* qui se retrouvent sur les deux sites.

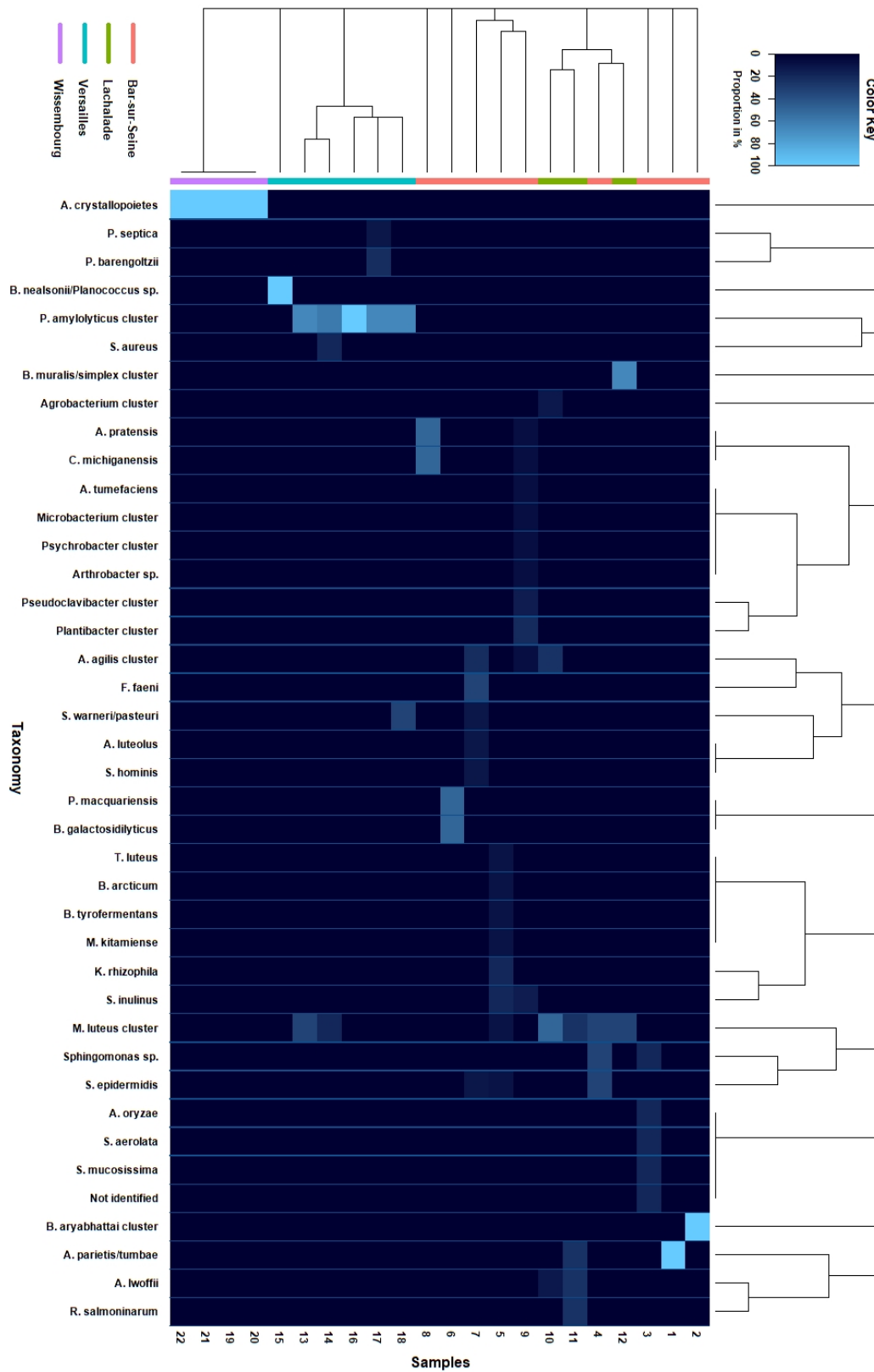


FIGURE 3.4 – Résultats heatmap présentant la distribution de chaque cluster bactérien en fonction de chaque échantillon divisé par site de prélèvement.

## 3.2 Champignons identifiés

L'identification des champignons a uniquement été faite sur des critères morphologiques (macroscopiques et microscopiques). Les souches isolées ont donc uniquement été identifiées jusqu'au genre.

La Figure 3.5 montre une sélection d'observations microscopiques utilisées pour l'identification des champignons lors du stage de C. Ranchoux. Les champignons identifiés appartiennent aux genres *Cladosporium*, *Penicillium*, *Beauveria*, *Acremonium*, *Phoma*, *Mucor*, *Scopulariopsis*, *Rhizopus* et *Aspergillus*.

Sur l'ensemble des prélèvements effectués, les champignons principalement isolés appartiennent aux genres *Cladosporium* et *Penicillium*, représentant à eux deux 52 % des isolats. Ces deux champignons ont indifféremment été isolés sur des vitraux *in situ* et en atelier de restauration. Ils sont aussi bien présents en face interne qu'en face externe. Ces genres fongiques, comme le genre *Aspergillus*, sont naturellement présents dans l'air dans des environnements intérieurs ou extérieurs. Le site de Versailles présente des champignons tels que *Epicoccum* ou *Scopulariopsis* qui sont généralement associés aux végétaux et à de la matière végétale en décomposition.

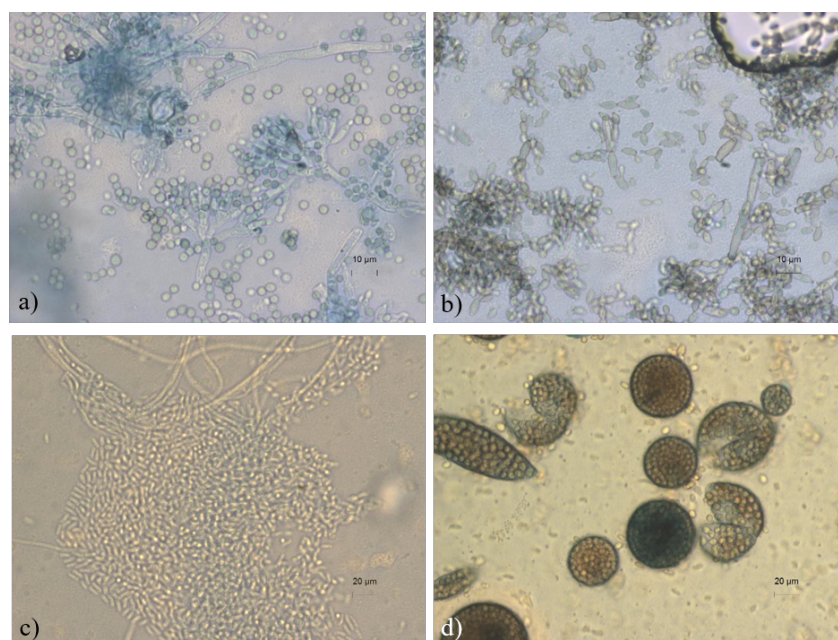


FIGURE 3.5 – Quelques exemples d'images de champignons observés sur lame au microscope optique : a) *Penicillium*, b) *Cladosporium*, c) *Acremonium*, d) *Mucor*. La coloration bleu est donnée par le bleu de lactophénol. Images tirées de Ranchoux (2019)



### 3.3 Discussion

La méthode de prélèvement est un point important à discuter en cas d'étude d'objets patrimoniaux car le matériel d'étude est limité et précieux. Certaines études ont en effet utilisé des méthodes de prélèvement destructives qui permettaient de récupérer des quantités de biomasse importantes (cf. Tableaux 3.7 et 3.8). De plus, le passage par la mise en culture est une autre étape qui conduit à une perte d'informations (pour rappel, seul 1% des microorganismes est cultivable).

Dans cette étude, une méthode de prélèvement non destructive et non invasive a été choisie, permettant de récupérer une quantité de biomasse limitée, mais compatible avec la difficulté à accéder aux œuvres : un tel protocole est facilement applicable et pourrait permettre, dans le futur, de prélever sans contrainte et de, pourquoi pas, démarrer un recensement plus exhaustif de microorganismes présents sur les vitraux.

Cette limite est cependant à garder en tête, et une amélioration du protocole de prélèvement est envisageable. A l'avenir, il pourrait être intéressant d'extraire l'ADN directement à partir des écouvillons, pour s'affranchir de la culture sur boîte de Petri, et ainsi d'utiliser des techniques de métagénomique.

Les résultats montrent que les communautés de bactéries sont différentes en fonction de la provenance des vitraux. En ce qui concerne la différence entre face interne et face externe, il a été montré que pour le site de Bar-sur-Seine, à nombre de prélèvements réalisés sur face interne/externe égaux, une plus grande quantité de bactéries s'est développée à partir des prélèvements en face externe. Ceci pourrait montrer que la face extérieure d'un vitrail *in situ* est plus facilement soumise à une contamination microbiologique à cause du transport de microorganismes par les agents atmosphériques. Cette explication est toujours à prendre avec précaution car il se peut qu'en intérieur le même nombre de microorganismes soit présent, mais qu'en proportion les organismes non cultivables soient majoritaires.

Un autre point à prendre en considération est l'évolution des communautés microbiennes qui peuvent changer au fil du temps. La question doit être posée surtout dans le cas de vitraux déposés et conservés en atelier de restauration, la dépose constituant un changement d'environnement pour les microorganismes présents sur ces vitraux.

Les résultats d'identification bactérienne de Lachalade (vitraux déposés et conservés en atelier) très proches des résultats obtenus pour le site de Bar-sur-Seine (vitraux en place), laissent penser que la communauté bactérienne change peu à la suite du dépôt des verrières. Les études de populations microbiennes présentes à la surface des vitraux pourraient donc être faites après la dépose des vitraux, sans risque de changements importants des communautés microbiennes, ce qui permettrait d'éviter les difficultés liées aux prélèvements *in situ*. Des études ultérieures (avec des prélèvements sur un corpus de vitraux avant et après le dépôt) sont nécessaires pour éventuellement valider cette hypothèse.

La pertinence des sites de prélèvement doit également être discutée. Les vitraux des deux sites de prélèvement *in situ* (Versailles et Bar-sur-Seine) ont été réalisés après le Moyen-Age et ne sont pas affectés par le phénomène de brunissement. Au contraire, les vitraux de Lachalade et Wissembourg datent du Moyen-Age et présentent le phénomène

de brunissement. Dans le futur, l'idéal serait donc de pouvoir réaliser des prélèvements sur des vitraux atteints de brunissement datant du Moyen-Age et toujours en place, ou venant d'être déposés, afin de pouvoir cibler au mieux l'étude relative à ce phénomène d'altération. Cela n'a malheureusement pas été possible au cours de cette thèse car les prélèvements *in situ* étaient conditionnés par les chantiers de restauration en cours.

Malgré ces quelques limites venant d'être reportés, les résultats ont pu apporter des informations intéressantes. Parmi les bactéries identifiées, il est possible de distinguer différents groupes selon leur habitat naturel d'origine.

Indifféremment du site, certaines bactéries proviennent de la flore normale de la peau (*Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus epidemidis*, *Acinetobacter lwoffii*) et leur présence est probablement due au fait que les vitraux ont été manipulés, par exemple lors de déplacements pour leur restauration, ou plus simplement à cause de la présence de "public" dans leur environnement direct.

Le second groupe de bactéries est celui des bactéries associées au sol et aux végétaux, comme par exemple le genre des *Paenibacillus*, *Agrobacterium*, *Agreia*, *Koccuria*. Ces types de bactéries ont été rencontrés le plus souvent en face externe. Certaines de ces bactéries sont halotolérantes, c'est-à-dire qu'elles tolèrent la présence de sels. Ainsi elles ont pu être retrouvées sur des murs archéologiques et hypogées (Carrillo-González *et al.*, 2016; Grottoli *et al.*, 2020). Cette caractéristique est compatible avec le système vitrail qui est sujet à la présence de sels provenant de l'altération du verre.

D'autres bactéries identifiées sont souvent associées à des environnements froids, comme par exemple les bactéries du genre *Frigobacterium* ou encore le *Brachybacterium arcticum* qui sont psychrophiles, c'est-à-dire capable de croître à basses températures. Cette caractéristique est cohérente avec l'environnement d'un vitrail exposé à des températures basses en hiver et exposé aux intempéries. Ces bactéries ont en effet été identifiées sur le site de Bar-sur-Seine en face interne et face externe (le plus souvent en exposition Nord) mais elles étaient absentes sur les vitraux échantillonnées en atelier de restauration.

Nombre d'espèces identifiées dans cette étude ont déjà précédemment été identifiées sur d'autres sites culturels. Par exemple *Bacillus muralis* a été décrit pour la première fois sur des peintures murales (Heyrman et Swings, 2001) et a depuis souvent été retrouvé sur d'autres peintures murales mais aussi sur des matériaux organiques (Pepe *et al.*, 2010; Pangallo *et al.*, 2013). De la même façon, *Arthrobacter partietis*, *Arthrobacter tumbae*, *Arthrobacter crystallopoietes*, *Bacillus simplex*, *Micrococcus luteus* et *Arthrobacter agilis* et différents *Paenibacillus* ont précédemment été identifiés sur des peintures murales, de la pierre et des vitraux (Gorbushina *et al.*, 2004; Marvasi *et al.*, 2009; Heyrman *et al.*, 2000; Piñar *et al.*, 2019; Urzì *et al.*, 2010; Heyrman *et al.*, 2005; Pangallo *et al.*, 2009; Heyrman *et al.*, 1999; Gurtner *et al.*, 2000; Heyrman et Swings, 2001; Tescari *et al.*, 2018).

Le Tableau 3.7 montre un résumé des résultats des identifications des bactéries de cette étude ainsi que ceux des études similaires disponibles dans la littérature. Les méthodes de prélèvements ont également été reportées dans le tableau. Les résultats obtenus sont

en accord avec la littérature disponible : les bactéries les plus fréquemment identifiées sur les vitraux semblent appartenir aux genres *Bacillus*, *Arthrobacter* et *Paenibacillus*.

En ce qui concerne les champignons, *Penicillium*, *Cladosporium* et *Aspergillus* sont les trois genres naturellement les plus abondants dans l'air, intérieur comme extérieur. *Penicillium* et *Aspergillus* sont cosmopolites, tandis que *Cladosporium* est souvent abondant sur les végétaux en général. *Phoma*, *Scopulariopsis*, *Acremonium* *Mucor* et *Rhizopus* sont souvent associés au sol et aux plantes, bien qu'ils puissent aussi se trouver sur de nombreux supports. *Beauveria* est certainement associé à la présence d'insectes.

Le Tableau 3.8 est une synthèse des moisissures inventoriées dans cette étude, ainsi que de celles identifiées dans la littérature. Les genres fongiques les plus couramment observés dans cette étude, notamment *Cladosporium*, *Penicilium* et *Aspergillus* sont en accord avec ceux habituellement observés dans la littérature. Toutefois, la comparaison complète n'est pas possible car nos données d'identification se limitent à l'identification du genre d'appartenance des champignons, alors que les données publiées sont le résultats d'analyses d'ADN 18s et qui ont permis l'identification des moisissures jusqu'à l'espèce.

L'étude de l'influence microbienne sur l'altération des verres faite par Drewello et Weissmann (1997) cite, entre autres, les genres *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicilium*, *Phoma*, *Scopulariopsis* et *Rhizopus*.

| Étude                 | Site  | Méthode de prélèvement  | Bactéries identifiées   |
|-----------------------|---|---|---|
| Cé travail            | Versailles,<br>Bar-sur-Seine,<br>Lachalade,<br>Wissembourg<br>(France)      | Frottage avec un écouvillon stérile et ensemencement sur boîte de Petri. Les colonies de bactéries ont été re-isolées plusieurs fois pour obtenir des cultures pures. | Communautés bactériennes complexes de phylum Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria, par exemple <i>Paenibacillus sp.</i> , <i>Frigoribacterium sp.</i> , <i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Micrococcus sp.</i> , <i>Plantibacter sp.</i> , <i>Agrobacterium sp.</i> , <i>Microbacterium sp.</i> , <i>Pseudoclavibacter sp.</i> , <i>Psychrobacter sp.</i> , <i>Microbacterium sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Clavibacter sp.</i> , <i>Kocuria sp.</i> , <i>Brachybacterium sp.</i> , <i>Terracoccus sp.</i> , <i>Sphingomonas sp.</i> , <i>Staphylococcus sp.</i> , <i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Agrobacterium sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> |
| Rölleke et al. (1999) | église de Stockkampen (Allemagne)   | Grattage mécanique de la surface de verre solide (5-10 mg). Dissolution, centrifugation, surnageant utilisé directement pour PCR                                      | <i>Flexibacter</i> , <i>Nitrosospira</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Frankiaceae</i> , <i>Geodermatophilus</i>  |
| Orial et al. (2007)   | cathédrales de Tours, d'Évreux, église de Sainte-Opportune du Bosc (France) | ensemencement direct sur gélose avec un morceau de verre, ou rinçage minutieux de l'échantillon   | Sur l'ensemble des colonies visibles (non spécifiées), dix souches de l'espèce <i>Burkholderia cepacia</i> et une de <i>Chryseomonas lateola</i> potentiellement capables d'oxyder le Mn  |
| Marvasi et al. (2009) | cathédrale de Florence (Italie)   | Plaques de contact avec Agar et glucose incubées pour trois jours. Les colonies de bactéries ont été re-isolées plusieurs fois pour obtenir des cultures pures.       | <i>Bacillus mojavensis</i> , <i>Bacillus vallismortis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Paenibacillus pabuli</i> , <i>Paenibacillus amylolyticus</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Arthrobacter agilis</i> , <i>Paenibacillus amylolyticus</i> , <i>Leucobacter albus</i> , <i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Paenibacillus polymyxa</i> , <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i>   |
| Piñar et al. (2013)   | Cathédrale de Tarragona, église Santa Maria del Mar de Barcelone (Espagne)  | Un morceau de verre (0,2 g) broyé avec mortier et ajouté à la matrice de lyse, avec le tampon de lyse.  | Communautés bactériennes complexes de phylum : Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Firmicutes. Par exemple <i>Methylobacterium sp.</i> , <i>Ralstonia sp.</i> , <i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Micrococcus sp.</i> , <i>Prevotella sp.</i> , <i>Kocuria sp.</i> , <i>Delftia sp.</i> , <i>Arthrobacter sp.</i>  |

TABLEAU 3.7 – Bactéries identifiées dans cette étude et dans la littérature relative aux vitraux.

| étude                                       | Site  | Méthode de prélèvement   | Champignons identifiés  |
|---|---|--|---|
| Stage Ranchoux dans le cadre de cette thèse | C. Versailles, Bar-sur-Seine, Lachalade, Wissembourg                          | Frottage avec coton-tige stérile et ensemencement sur boîte de Petri. Les champignons ont été re-isolés plusieurs fois pour obtenir des cultures pures.                | Champignons des genres <i>Cladosporium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Beauveria</i> , <i>Acremonium</i> , <i>Phoma</i> , <i>Mucor</i> , <i>Scopulariopsis</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Aspergillus</i>   |
| Schabereiter-Gürtner (2001b)                | églises de Stockkampen et de St. Michael et Johann Baptist Brakel (Allemagne) | Grattage mécanique du biofilm sur la surface de verre solide avec scalpel stérile. La poudre obtenue a été ajoutée à la matrice de lyse pour l'extraction de l'ADN.    | Champignons des phyla Ascomycota et Basidiomycota : <i>Enyodontium album</i> , <i>Verticillium lecanii</i> , <i>Verticillium psalliotae</i> , <i>Stamemonium ochroroseum</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Geomyces asperulatus</i> , <i>Kirschteiniothelia elaterascus</i> , <i>Lep-tosphaeria maculans</i> , <i>Ustilago</i> spp., <i>Geomyces pannorum</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Coniosporium perforans</i> , <i>Capnobotryella renispora</i> , <i>Rhodotorula minuta</i> |
| Carmona et al. (2006)                       | Cartuja de Miraflores (Espagne)   | Les Biofilms recouvrant le verre ont été traités avec tampon TE et SDS. La suspension a été précipitée avec éthanol, dissoute en eau et utilisée pour la PCR           | Champignons du phylum Aspergillus : <i>A. fumigatus</i> , <i>A. restrictus</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>A. penicilloides</i> ; <i>Labyrinthula stramenopile</i>   |
| Rodrigues et al. (2014)                     | Salle de stockage au Palais National de Pena (Portugal)                       | prélèvement sur le verre avec un écouvillon stérile imbibé d'eau et mise en culture. Les champignons ont été re-isolés plusieurs fois pour obtenir des cultures pures. | Champignons des phyla Ascomycota et Basidiomycota : <i>Alternaria tenuissima</i> , <i>Chaetomium coarctatum</i> , <i>Cladosporium langeronii</i> , <i>Cladosporium sphaerospermum</i> , <i>Cladosporium sphaerospermum</i> , <i>Cladosporium sphaerospermum</i> , <i>Didymella phacae</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>Penicillium brevicompactum</i> , <i>Penicillium brevicompactum</i> , <i>Penicillium citreonigrum</i> , <i>Penicillium citreonigrum</i> , <i>Penicillium roseopurpureum</i> , <i>Sistotrema</i> sp.           |
| Corréa Pinto et al. (2019)                  | Monuments historiques à Belém do Pará (Brasil)                                | prélèvement avec écouvillon stérile imbibé d'eau et mise en culture  | Champignons du phylum Ascomycota : <i>Hortea werneckii</i> , <i>Mycrothecium inundatum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Aspergillus arc-narioides</i> , <i>trichoderma longibrachiatum</i>  |

TABLEAU 3.8 – Moisissures identifiées dans cette étude et dans la littérature relative aux vitraux.

Les différents types de microorganismes identifiés sur les vitraux échantillonnés ne sont pas forcément impliqués dans des phénomènes d'altération.

Les bactéries peuvent agir par voie directe, par le contact des cellules avec le substrat, ou par voie indirecte par la production de métabolites comme les acides organiques et les sidérophores.

Selon la littérature, les bactéries qui peuvent produire des sidérophores appartiennent, entre autres, aux genres *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Erwinia*, *Vibrio*, *Altermona*, *Anthrobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus* et notamment des sidérophores appartenant aux familles des hydroxamates et catecholates (Kalinowski *et al.*, 2000b; Perez *et al.*, 2015; Peña *et al.*, 2007; Saha *et al.*, 2015; Challaraj-Emmanuel *et al.*, 2012). Des genres fongiques sont également connus pour leur capacité à produire ce type de molécules, comme *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Rhodotorula*, *Neurospora*, *Rhizopus* (Saha *et al.*, 2015; Renshaw *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2018).

Parmi ces genres de microorganismes capables de produire des sidérophores, des espèces de bactéries *Arthrobacter*, *Micrococcus* et *Bacillus* et de champignons *Aspergillus*, *Penicillium*, et *Mucor* ont été identifiées dans cette étude sur les vitraux et pourrait donc avoir une capacité altérante.

Par ailleurs, en ce qui concerne les bactéries, des espèces de *Agrobacterium*, *Sphingomonas*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus* et *Paenibacillus* ont également déjà été étudiées, dans un contexte non patrimonial, pour leur capacité à altérer divers substrats minéraux. Les souches et les matériaux en question sont listées dans le Tableau 3.9.

| Bactérie (genre)     | phase altérée  | Référence   |
|----------------------|--|---|
| <i>Agrobacterium</i> | phosphate, phlogopite  | Leyval et Berthelin (1989)  |
| <i>Sphingomonas</i>  | biotite, phosphate (production de sidérophores)                | Uroz <i>et al.</i> (2007)   |
| <i>Acinetobacter</i> | phosphate  | Vassilev <i>et al.</i> (2006)   |
| <i>Arthrobacter</i>  | hornblende (production d'acides organiques et de sidérophores) | Kalinowski <i>et al.</i> (2000a)  |
| <i>Arthrobacter</i>  | bytownite, feldspath   | Barker <i>et al.</i> (1998)   |
| <i>Arthrobacter</i>  | granite (production d'acide oxalique)                          | Frey <i>et al.</i> (2010)   |
| <i>Arthrobacter</i>  | feldspath, quartz (catalyse acide proton/gloconate)            | Ullman <i>et al.</i> (1996)   |
| <i>Arthrobacter</i>  | hornblende, verre contenant du Fe                              | Liermann <i>et al.</i> (2000a)  |
| <i>Bacillus</i>      | granite  | Song <i>et al.</i> (2007)   |
| <i>Bacillus</i>      | Serpentine   | Yao <i>et al.</i> (2013)  |
| <i>Paenibacillus</i> | biotite  | Uroz <i>et al.</i> (2009)   |
| <i>Paenibacillus</i> | bauxite  | Modak <i>et al.</i> (1999); Vasan <i>et al.</i> (2001); Zhou <i>et al.</i> (2010) |
| <i>Paenibacillus</i> | roche  | Liu <i>et al.</i> (2012)  |

TABLEAU 3.9 – Sélection de travaux qui reportent des genres bactériens (en commun avec ceux identifiées dans cette étude) présentant une activité d'altération sur divers substrats. Recensement fait d'après Wild (2017) et implémenté d'autres références.

Parmi le genre *Arthrobacter*, la présence de l'espèce *Arthrobacter crystallopoietes* doit

être soulignée. Cette espèce est reportée par Tebo *et al.* (2004) parmi les bactéries capables d'oxyder le Mn (Figure 3.6). Ces bactéries ont été identifiées à partir du panneau des vitraux de Wissembourg, qui était recouvert d'un dépôt brun en surface. Il s'agit probablement d'une patine appliquée au XIX<sup>e</sup> siècle pour assombrir les panneaux, et qui a constitué un support idéal pour la croissance de ces bactéries. Il est intéressant que cette bactérie ait été trouvée sur un des panneaux atteints par le brunissement. Toutefois, encore une fois, il faut prendre ces résultats avec précaution. Des tests d'altération du verre avec cette bactérie pourraient être envisagés afin d'en évaluer le pouvoir altérant.

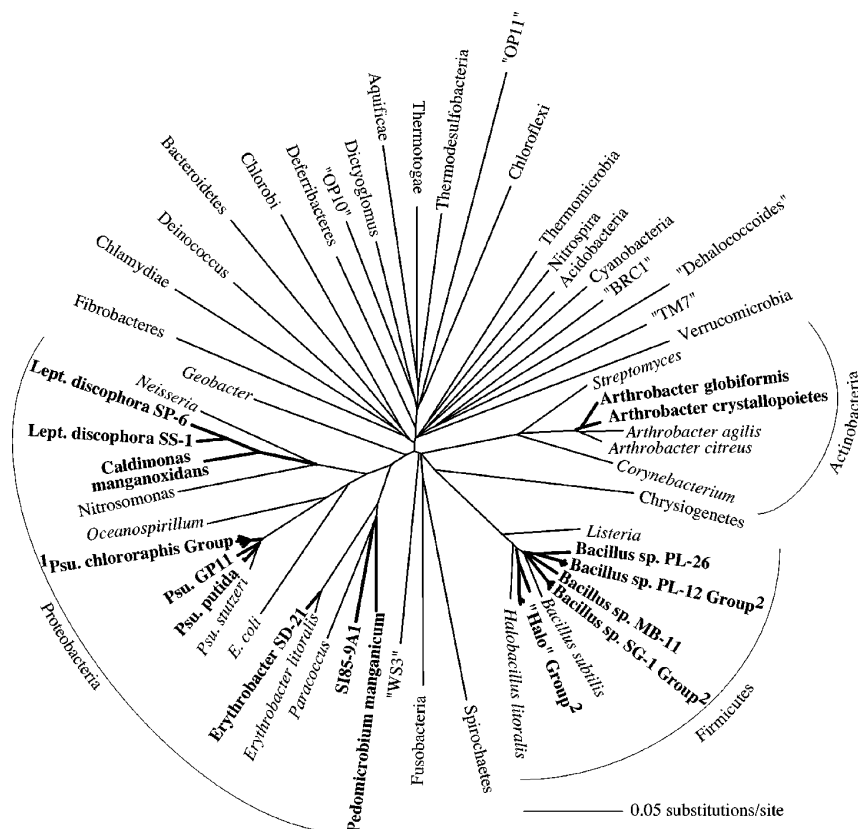


FIGURE 3.6 – Localisation des bactéries capables d'oxyder le Mn(II) sur un arbre phylogénétique circulaire obtenu à partir d'analyse des séquences d'ADNr 16s du Ribosomal Database Project (RDP). La similarité des séquence est une estimation de la relation évolutive et est exprimée ici comme la distance entre deux branches. Image tirée de Tebo *et al.* (2004)

### 3.4 Conclusions

Cette étude portant sur l'identification de microorganismes à la surface des vitraux n'entend pas être exhaustive, mais elle représente un premier recensement en France des bactéries et champignons présents *in situ* et potentiellement capables d'altérer un vitrail. Elle a permis d'initier une étude plus approfondie des communautés microbiennes présentes sur des vitraux dans le cadre d'une collaboration entre le LGE et le LRMH. Ce

travail pourra servir de base pour continuer l'identification des microorganismes présents sur les vitraux en ciblant les sites de prélèvements sur des vitraux avec brunissement et *in situ*.

Les différences rencontrées parmi les sites de prélèvement montrent que la méthode de prélèvement utilisée permet d'effectuer une étude de la diversité microbienne de différents sites sans recourir à des prélèvements destructifs. Afin d'être complètement exhaustif, il serait conseillé de développer un protocole sans étape de mise en culture. Cependant, cette méthode a l'avantage de permettre de recenser les bactéries cultivables et utilisables pour des expériences de laboratoire.

La comparaison des résultats obtenus avec la littérature a permis de reconnaître parmi les microorganismes identifiés pendant cette étude, nombre de genres qui sont connus dans la littérature pour leurs pouvoirs altérants. De plus, ce la a permis de mettre en avant les bactéries du genre *Arthrobacter* et notamment *A. crystallopoietes*.





# Chapitre 4

## Cinétiques d'altération du verre en présence d'exsudats microbiens

Afin d'évaluer l'effet indirect que les microorganismes pouvaient avoir sur l'altération d'un verre du Moyen-Âge, des tests de dissolution d'un verre modèle ont été menés en présence d'exsudats microbiens, c'est à dire de molécules produites par les microorganismes. La présence de molécules organiques ayant une forte affinité pour les cations métalliques peut en effet affecter la dissolution via la formation de complexes avec des éléments du substrat, entraînant un effet sur l'étape d'hydrolyse et déstabilisant potentiellement la structure. L'augmentation de la dissolution de plusieurs phases minérales et de verres basaltiques a pu être observée en présence de ces composés. Elle est expliquée par l'extraction préférentielle de cations dont le rôle structural va induire la rupture de liaisons chimiques du fait de ces mécanismes de complexation (Oelkers et Gislason, 2001; Kraemer, 2004; Cheah *et al.*, 2003; Cama et Ganor, 2006; Wolff-Boenisch *et al.*, 2011; Perez *et al.*, 2015).

Les deux exsudats qui ont été utilisés pour ces tests sont l'acide oxalique et le sidérophore desferrioxamine B (DFOB). L'acide oxalique est un des acides les plus couramment produits par les bactéries et les champignons. La DFOB est un sidérophore modèle souvent utilisé pour étudier la dissolution des minéraux dans l'environnement (Kraemer *et al.*, 1999; Cheah *et al.*, 2003; Duckworth et Sposito, 2005b; Peña *et al.*, 2007), disponible commercialement et dont les propriétés sont bien connues.

La première partie de ce chapitre est dédiée aux résultats obtenus lors des premiers tests de dissolution du verre VM et qui ont mené au choix du tampon (type et concentration du tampon utilisé).

Ensuite, le corps principal du chapitre concerne l'évaluation de l'effet de l'acide oxalique (AO) et du sidérophore DFOB sur la dissolution des verres VM. L'effet des deux ligands sur la dissolution du verre sera examiné séparément et simultanément. Le comportement des deux verres en solution en conditions de contrôle et vis-à-vis des ligands sera également comparé.

La troisième partie du chapitre est dédiée à des tests complémentaires de dissolution effectués dans le cadre du stage de Master 2 de Chloé Ranchoux dans un tampon différent afin de comparer les résultats obtenus.

## 4.1 Choix du tampon

### 4.1.1 Résultats

Les valeurs de pH des tests de dissolution en EUP, en tampon carbonate, tampon BisTris et tampon HEPES (chaque tampon aux concentrations de 1 et 10 mM) sont reportées dans le Tableau 4.1. Pour toutes les conditions testées, une évolution du pH vers des valeurs de pH plus élevées est observée au cours de la dissolution du verre VM (Figure 4.1). Les tests en EUP montrent une évolution du pH qui monte de presque deux unités en 3 heures et avec des barres d'erreurs très élevées pour tous les points. Au contraire, l'évolution du pH est plus lente et reproductible en présence de tous les tampons. Augmenter les concentrations en BisTris et en HEPES renforce l'effet tampon. Cet effet n'a pas été observé pour le tampon carbonate.

Les valeurs finales de pH après 3 jours sont autour de 8,4 pour EUP, tampon carbonate 1 mM et 10 mM, et BisTris 1 mM, et autour de 7,5 pour BisTris 10 mM, HEPES 1mM et 10 mM.

| jours | EUP       | C 1 mM    | C 10 mM   | BisTris 1 mM | BisTris 10 mM | HEPES 1 mM | HEPES 10 mM |
|-------|-----------|-----------|-----------|--------------|---------------|------------|-------------|
| 0     | 5,8 ± 0,3 | 6,8 ± 0,0 | 6,8 ± 0,1 | 6,6          | 6,9           | 6,7 ± 0,0  | 6,7         |
| 0,01  | 7,4 ± 0,3 | 6,8 ± 0,0 | 6,9 ± 0,2 | 6,6          | 7,0           | 6,9 ± 0,2  | 6,7         |
| 0,125 | 7,9 ± 0,3 | 7,1 ± 0,1 | 7,3 ± 0,1 | 7,1          | 7,0           | 7,0 ± 0,1  | 6,8         |
| 0,25  | 8,2 ± 0,3 | 7,4 ± 0,1 | 7,5 ± 0,1 | 7,3          | 7,0           | 7,2 ± 0,2  | 6,8         |
| 1     | 8,5 ± 0,2 | 7,9 ± 0,1 | 8,2 ± 0,2 | 8,0          | 7,2           | 7,3 ± 0,2  | 6,9         |
| 2     | 8,4 ± 0,2 | 8,2 ± 0,1 | 8,5 ± 0,0 | 8,1          | 7,4           | 7,4 ± 0,1  | 7,0         |
| 3     | 8,4 ± 0,2 | 8,4 ± 0,0 | 8,6 ± 0,0 | 8,3          | 7,4           | 7,7 ± 0,2  | 7,2         |

TABLEAU 4.1 – Valeurs de pH en fonction du temps d'expérience de dissolution pour les expériences de dissolution du verre VM en présence de tampon carbonate (c) 1 mM et 10 mM, tampon BisTris 1 et 10 mM, tampon HEPES 1 et 10 mM. Les erreurs reportées correspondent aux écart-types sur deux réplicats.

Les concentrations élémentaires obtenues par les analyses ICP-OES sont reportées dans le Tableau 4.2. Les valeurs des concentrations en solution augmentent avec le temps pour tous les éléments, signe d'une altération du verre. Les concentrations d'Al vont de 0 à 50 ppb, celles de Ca de 10 ppb à 11 ppm, celle de Mg de 0 à 2 ppm, celles de Mn de 0 à 1 ppm, le Si va de 10 ppb à 10 ppm et le K de 10 ppb à 13 ppm. Les valeurs de concentration les plus élevées sont rencontrées pour la condition avec HEPES 10 mM.

En Figure 4.2 sont tracées les pertes de masse normalisées (NLs) en fonction du temps pour tous les éléments du verre pour toutes les conditions étudiées. On peut regrouper les expériences donnant lieu à des NLs du même ordre de grandeur. Les expériences conduites dans l'EUP, C 1mM et BisTris 1 mM présentent des NLs à 3 jours inférieures à 1 g/m<sup>2</sup>. Les expériences menées dans C 10 mM, BisTris 10 mM et HEPES 1 mM présentent des NLs à 3 jours entre 2 et 3 g/m<sup>2</sup>. L'expérience HEPES 10 mM est caractérisée par des NL encore plus élevées (NLs = 6 g/m<sup>2</sup> à 3 jours).

En EUP, l'Al est moins relâchés que Si, alors que Ca, Mg, sont relâchés préférentiellement à cet élément. En ce qui concerne le Mn, il semble avoir un comportement intermédiaire entre Al et Si, en étant plus proche de l'Al en début d'expérience et en se

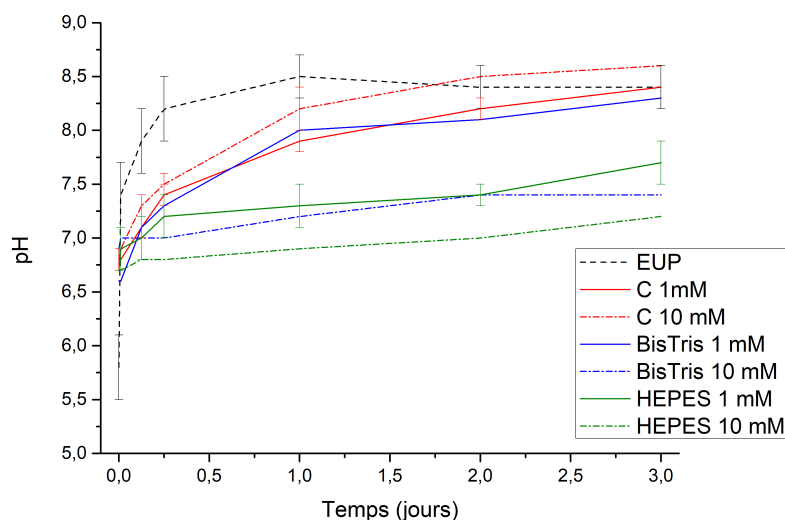


FIGURE 4.1 – Valeurs de pH tracées en fonction du temps en EUP et pour tampon carbonate, tampon BisTris et tampon HEPES 1 et 10 mM.

rapprochant au Si au cours du temps, ainsi que pour le dernier point les NLs de Mn et de Si sont équivalentes.

En solution de tampon carbonate 1 mM et 10 mM, l'Al garde le même comportement qu'en EUP en étant relâché moins que le Si et en gardant des NLs basses. Ca et Mg gardent également le même comportement qu'en EUP et, avec le K, sont relâchés préférentiellement au Si. Le Mn est dans ces cas relâché en solution de manière similaire au Si.

En solution de tampon BisTris 1 mM, la plus grande différence observée est sur la stœchiométrie de dissolution de l'Al qui arrive à des NLs plus élevées par rapport aux autres conditions décrites. Le Mn est relâché de manière similaire au Si. Ca et Mg sont relâchés préférentiellement au Si. Curieusement, en présence de tampon BisTris 10 mM on n'observe pas le même effet sur l'Al qui a été observé pour le même tampon à 1 mM. En revanche, le Mn est ici relâché préférentiellement au Si et il sort en même temps que les alcalins et les alcalino-terreux, qui se démarquent nettement du Si.

En tampon HEPES 1 mM et 10 mM, la même stœchiométrie de dissolution qu'en présence de HEPES 10 mM est observée.

Les vitesses initiales de dissolution du Si ( $v_{Si}$ ) sont couramment utilisées dans les études de dissolution du verre pour comparer différentes conditions d'altération. Elles sont reportées dans le Tableau 4.3 pour toutes les conditions testées dans cette étude. La vitesse de dissolution en EUP est doublée en tampon carbonate 1 mM et triplée en tampon carbonate 10 mM. Des valeurs similaires sont rencontrées pour le tampon BisTris 1 mM et 10 mM. Au tampon HEPES correspondent en général les vitesses de dissolution les plus élevées. En général, plus la concentration de tampon est élevée, plus la vitesse de dissolution l'est aussi. Notamment la vitesse de dissolution la plus élevée est observée pour HEPES 10 mM.

|                | jours | Al   |      | Ca      |        | Mg     |       | Mn     |       | Si      |        | K      |        |
|----------------|-------|------|------|---------|--------|--------|-------|--------|-------|---------|--------|--------|--------|
|                |       | (i)  | (ii) | (i)     | (ii)   | (i)    | (ii)  | (i)    | (ii)  | (i)     | (ii)   | (i)    | (ii)   |
| EUP            | 0     | 0    | 0    | 0       | 0      | 0      | 0     | 0      | 0     | 0       | 0      | -      | -      |
|                | 0,01  | 0    | 0    | 104,6   | 170,1  | 0,2    | 45,7  | 0      | 0     | 17,8    | 125,8  | -      | -      |
|                | 0,125 | 0    | 0    | 179,1   | 275,3  | 16,6   | 67,6  | 0      | 0     | 135     | 262,5  | -      | -      |
|                | 0,25  | 0    | 0    | 276     | 356,9  | 35,2   | 81,5  | 0      | 1     | 299,1   | 370    | -      | -      |
|                | 1     | 4    | 1,7  | 468,1   | 561,3  | 71,9   | 124,1 | 20,9   | 22    | 722,4   | 720,1  | -      | -      |
|                | 2     | 13,6 | 6,2  | 628,8   | 867,1  | 101,6  | 185,1 | 38,7   | 48,3  | 948,3   | 1157,5 | -      | -      |
|                | 3     | 30,5 | 23,1 | 1144,9  | 1167,6 | 201,1  | 241,2 | 97,1   | 81,2  | 1264,1  | 1654,8 | -      | -      |
| Carbonate 1 mM | 0     | 0    | 0    | 0       | 0      | 0      | 0     | 0      | 0     | 0       | 0      | -      | 0      |
|                | 0,01  | 0,1  | 0    | 125,6   | 69,5   | 18,1   | 1,2   | 1,9    | 5,6   | 11,5    | 17,2   | -      | 61,5   |
|                | 0,125 | 1    | 0    | 331,3   | 194,8  | 54,2   | 34,6  | 16,2   | 6,5   | 144,9   | 227,7  | -      | 353,4  |
|                | 0,25  | 1,6  | 0    | 517,3   | 301,1  | 94,7   | 53,5  | 41,6   | 16,8  | 413,8   | 469,3  | -      | 650,3  |
|                | 1     | 17,9 | 10,8 | 1061,5  | 772    | 202,3  | 148,6 | 101,7  | 59,5  | 1356,1  | 1450,5 | -      | 1489,7 |
|                | 2     | 18,2 | 8,89 | 1367,1  | 1197,5 | 271,19 | 227,7 | 135,6  | 96,7  | 2024,8  | 2101,6 | -      | 1998,6 |
|                | 3     | 36,7 | 25,1 | 1620,7  | 1669,8 | 315,9  | 319,8 | 158,1  | 139,9 | 2374,9  | 2787,7 | -      | 4022,7 |
| Carbonate 10mM | 0     | 0    | 0    | 0       | 0      | 0      | 0     | 0      | 0     | 0       | 0      | -      | 0      |
|                | 0,01  | 3,2  | 0,6  | 88,7    | 19,8   | 11,3   | 0,8   | 0      | 0,1   | 21,5    | 6,3    | -      | 4      |
|                | 0,125 | 0,5  | 0    | 506,6   | 437,6  | 102,9  | 88,9  | 45,9   | 40,3  | 145,9   | 278    | -      | 916,7  |
|                | 0,25  | 0,6  | 3,2  | 1024,8  | 691,2  | 212,8  | 135,2 | 108,4  | 62,8  | 789,1   | 559,7  | -      | 1471,7 |
|                | 1     | 2,7  | 3    | 2070,3  | 1481,3 | 424,4  | 280,6 | 221,2  | 138,5 | 2836,9  | 1715,7 | -      | 2943   |
|                | 2     | 19,2 | 3,3  | 2614,1  | 2181,2 | 548,70 | 405,4 | 279,9  | 198,3 | 3954,2  | 2629,7 | -      | 4136,1 |
|                | 3     | 38,6 | 8,8  | 2789,8  | 2522,5 | 582,8  | 466,4 | 297,4  | 226,1 | 4398,4  | 3170,7 | -      | 4641,4 |
| Bistris 1mM    | 0     | 0    | -    | 0       | -      | 0      | -     | 0      | -     | 0       | -      | -      | -      |
|                | 0,01  | 5,6  | -    | 250,4   | -      | 41,7   | -     | 11,4   | -     | 123,7   | -      | -      | -      |
|                | 0,125 | 2,6  | -    | 137,8   | -      | 17,8   | -     | 0,1    | -     | 18,9    | -      | -      | -      |
|                | 0,25  | 2,1  | -    | 413,6   | -      | 70,1   | -     | 27,4   | -     | 328,1   | -      | -      | -      |
|                | 1     | 9,6  | -    | 941,3   | -      | 168,2  | -     | 88,8   | -     | 1197,6  | -      | -      | -      |
|                | 2     | 43,9 | -    | 1301,9  | -      | 243,8  | -     | 133,5  | -     | 1687,4  | -      | -      | -      |
|                | 3     | 52,6 | -    | 1327,4  | -      | 248,8  | -     | 137,9  | -     | 2019    | -      | -      | -      |
| Bistris 10mM   | 0     | 0    | -    | 0       | -      | 0      | -     | 0      | -     | 0       | -      | -      | -      |
|                | 0,01  | 1,5  | -    | 143,7   | -      | 20,3   | -     | 0,5    | -     | 237,9   | -      | -      | -      |
|                | 0,125 | 2,1  | -    | 360,7   | -      | 49,4   | -     | 16,1   | -     | 290,7   | -      | -      | -      |
|                | 0,25  | 1,4  | -    | 527     | -      | 98,1   | -     | 44,9   | -     | 416,3   | -      | -      | -      |
|                | 1     | 2,8  | -    | 2109,2  | -      | 419,7  | -     | 248,5  | -     | 1915,4  | -      | -      | -      |
|                | 2     | 4,3  | -    | 3686,4  | -      | 729,3  | -     | 447,2  | -     | 4346,4  | -      | -      | -      |
|                | 3     | 10,2 | -    | 4584,1  | -      | 923,3  | -     | 573,6  | -     | 5752,4  | -      | -      | -      |
| HEPES 1 mM     | 0     | 0    | 0    | 0       | 0      | 0      | 0     | 0      | 0     | 0       | 0      | 0      | 0      |
|                | 0,01  | 0,4  | 3,5  | 12,4    | 20,2   | 2,3    | 4     | 0,2    | 1,4   | 7,2     | 7,1    | 4,2    | 23,9   |
|                | 0,125 | 3,4  | 2    | 261,3   | 246,6  | 56     | 49    | 22,2   | 21,4  | 178,2   | 195,3  | 265,9  | 230,8  |
|                | 0,25  | 5    | 4,6  | 529,3   | 823,4  | 101,5  | 103,7 | 45,7   | 47,4  | 438     | 416,9  | 488,8  | 548,3  |
|                | 1     | 6,9  | 4,7  | 1518,1  | 1677,3 | 291,8  | 330,1 | 140,9  | 183,5 | 1652,4  | 1933   | 1299,5 | 2434,4 |
|                | 2     | 12,4 | 8,2  | 2788,1  | 2786,1 | 560,6  | 566,3 | 279,4  | 323,6 | 3385,8  | 3694,8 | 2433,2 | 4290,1 |
|                | 3     | 5,9  | 9,6  | 3963,8  | 3724   | 784,5  | 778,8 | 388,3  | 438   | 4912,4  | 5201,3 | 3425,8 | 5234   |
| HEPES 10 mM    | 0     | 0    | -    | 0       | -      | 0      | -     | 0      | -     | 0       | -      | 0      | -      |
|                | 0,01  | 0,7  | -    | 37,8    | -      | 5,6    | -     | 0,7    | -     | 52,6    | -      | 30,3   | -      |
|                | 0,125 | 1,2  | -    | 854,5   | -      | 164,4  | -     | 76,4   | -     | 318,6   | -      | 1058,2 | -      |
|                | 0,25  | 6,3  | -    | 1308,7  | -      | 245,2  | -     | 122,1  | -     | 579,5   | -      | 1670,1 | -      |
|                | 1     | 17,7 | -    | 4005,9  | -      | 789,6  | -     | 410,1  | -     | 3120,9  | -      | 4922,3 | -      |
|                | 2     | 29,7 | -    | 7762,3  | -      | 1418,2 | -     | 822,9  | -     | 7169,4  | -      | 9576,7 | -      |
|                | 3     | 40,5 | -    | 11046,8 | -      | 1937,4 | -     | 1097,9 | -     | 10126,3 | -      | 12912  | -      |

TABLEAU 4.2 – Valeurs des concentrations en  $\mu\text{g L}^{-1}$  avec soustraction du blanc pour les tests de dissolution de VM en EUP ou en solution de tampon carbonate, BisTris, HEPES. Les valeurs pour la première(i) et la deuxième (ii) répétition sont données lorsqu'une deuxième répétition a été effectuée. Les valeurs de K sont données pour les tests qui ont été effectués après la réparation du détecteur de l'ICP-OES présent au LGE. Les erreurs analytiques de l'ICP-OES sont reportées dans le Chapitre 2 et varient entre 2 et 10 %.

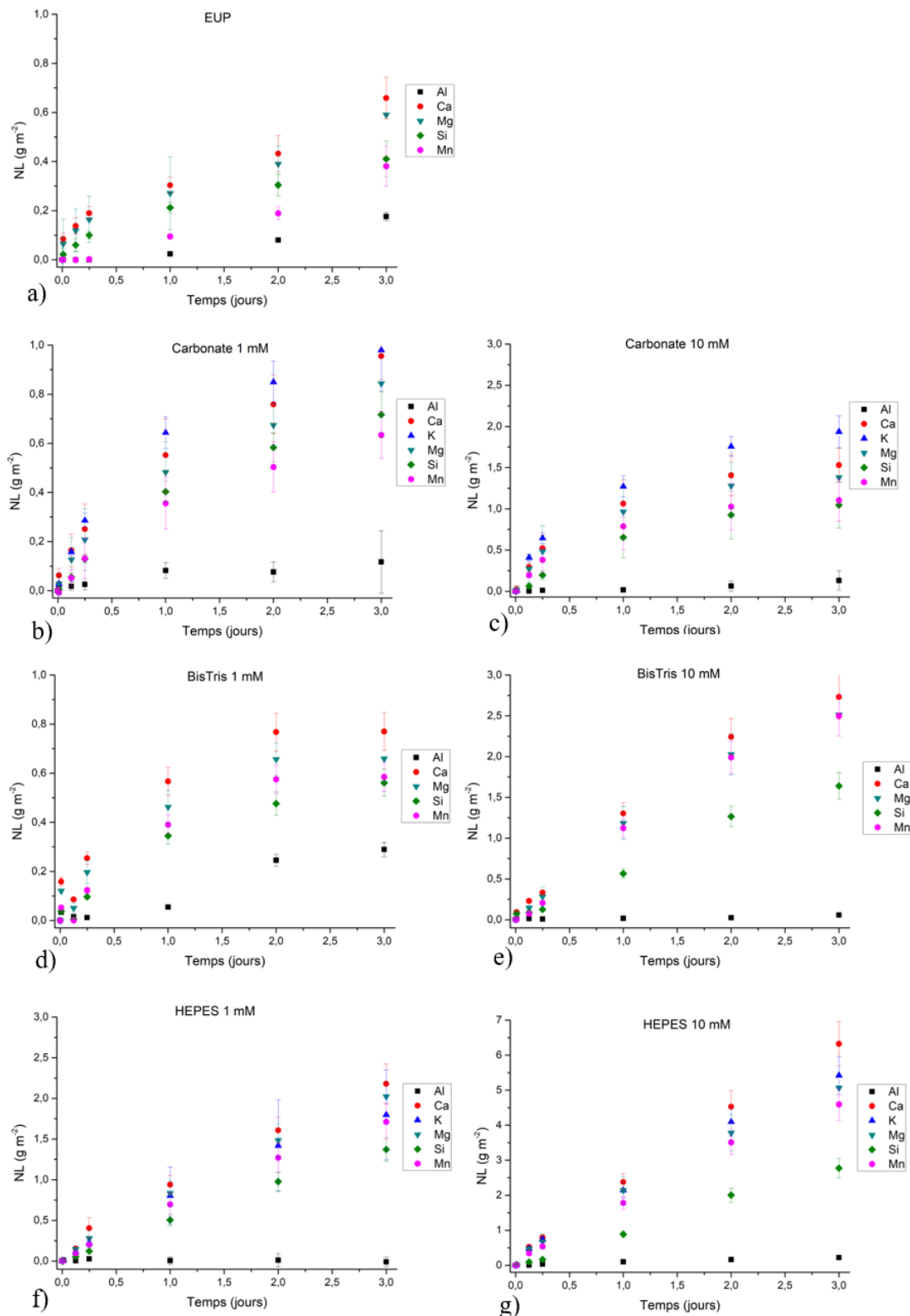


FIGURE 4.2 – Pertes de masse normalisées (NLs) de Al, Ca, Mg, Mn, Si et K en fonction du temps, calculées à partir des concentrations mesurées dans les tests de dissolution en a) EUP seule, ou en solution de tampon carbonate b) 1 mM et c) 10 mM, tampon BisTris d) 1 mM et e) 10 mM, tampon HEPES f) 1 mM et g) 10 mM. Les barres d'erreur sont calculées en prenant en compte les incertitudes sur la mesure de la concentration par ICP-OES et les écart-types ( $\pm\sigma$ ) pour chaque point quand un réplicat a été effectué.

|               | $v_{Si}$ (g m <sup>-2</sup> j <sup>-1</sup> ) | pH final |
|---------------|---|----------|
| EUP           | 0,18 ± 0,02                                   | 8,4      |
| C 1 mM        | 0,40 ± 0,04                                   | 8,4      |
| C 10 mM       | 0,66 ± 0,17                                   | 8,6      |
| BisTris 1 mM  | 0,34  | 8,3      |
| BisTris 10 mM | 0,56  | 7,4      |
| HEPES 1 mM    | 0,49 ± 0,05                                   | 7,7      |
| HEPES 10 mM   | 0,95  | 7,2      |

TABLEAU 4.3 – Vitesses initiales de dissolution du Si ( $v_{Si}$ ) en g/m<sup>2</sup>/j calculées lors des tests de dissolution du verre VM en EUP et en présence de tampon carbonate (C), tampon BisTris et tampon HEPES aux concentrations de 1 et 10 mM. Les erreurs reportées représentent l'écart-types lorsque les expériences on pu être répétées deux fois. Le pH final pour chaque expérience est également reporté.

### 4.1.2 Discussion et conclusions sur le choix du tampon

Les conditions qui permettent de garder le pH le plus proche du pH initial sont celles auxquelles correspondent des vitesses de dissolution les plus élevées.

Les résultats mettent en évidence également une influence du type de tampon sur la dissolution (et non seulement un effet du à l'effet du pH), car pour des évolutions de pH similaires, les valeurs de vitesse sont différents. C'est le cas par exemple si on compare BisTris 10 mM et HEPES 10 mM, ils ont des évolutions de pH à peu près similaires mais des vitesses de dissolution très différentes. Un effet complexant des molécules choisies sur le relâchement de certains éléments du verre est à prendre en compte dans l'interprétation de ces résultats, notamment pour les tampons BisTris et HEPES qui ont montré un changement de la stœchiométrie de dissolution du verre par rapport à l'EUP.

Le problème de l'interférence des tampons des études environnementales à cause de leurs propriétés de complexation des ions métalliques est connu dans la littérature (Ferreira *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 1997). Le HEPES est généralement considéré comme un tampon non complexant et adapté à tout type d'étude comme montré en Figure 4.3. Aucune donnée n'est reportée sur ses capacité complexantes vis-à-vis du Mn. Toutefois il semblerait que des données contrastantes existent sur d'autres métaux de transition comme le Cu et le Zn.

Ce type de problème a déjà été rencontré dans des études de dissolution du verre, par exemple Tournié *et al.* (2013) ont observé que le tampon Tris augmente la vitesse de dissolution d'un verre borosilicaté à cause de la complexation du B. Notamment la complexation du bore s'opère via les deux groupement -OH du Tris qui sont également présents dans la structure du BisTris (Figure 4.4). Il faut souligner que pour le BisTris, le tableau tiré de Ferreira *et al.* (2015) reporte une faible complexation pour le Mn, mais également pour d'autres éléments du verre comme Ca et Mg.

Suite à ces observations, nous ne pouvons pas exclure un effet complexant de BisTris et de HEPES sur les éléments du verre.

Le tampon carbonate à 1 mM, quant à lui, stabilise l'évolution du pH permettant de rendre les expériences répétables, sans trop affecter la vitesse et la stœchiométrie de dissolution du verre. Pour ces raisons, et dans le souci d'avoir le système le plus simple possible et plus proche des conditions en EUP, ce dernier tampon a été choisi pour la poursuite de l'étude.

| Group    | 2                    |        | 6                | 7      | 8       | 9      | 10     | 11     | 12     | 14     |        |                    |
|----------|----------------------|--------|------------------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------------------|
| Type     | Alkaline earth metal |        | Transition metal |        |         |        |        |        |        |        |        |                    |
| Buffer   | Mg(II)               | Ca(II) | Cr(III)          | Mn(II) | Fe(III) | Co(II) | Ni(II) | Cu(II) | Zn(II) | Cd(II) | Pb(II) | Final <sup>a</sup> |
| MES      |                      |        |                  |        |         |        |        |        |        |        |        | (+)                |
| Bis-Tris |                      |        |                  |        |         |        |        |        |        |        |        | (-)                |
| ADA      |                      |        |                  |        |         |        |        |        |        |        |        | (-)                |
| ACES     |                      |        |                  |        |         |        |        |        |        |        |        | (-)                |
| PIPES    |                      |        |                  |        |         |        |        |        |        |        |        | (+)                |
| MOPSO    |                      |        |                  |        |         |        |        |        |        |        |        | (+)                |
| BTP      |                      |        |                  |        |         |        |        |        |        |        |        | (-)                |
| BES      |                      |        |                  |        |         |        |        |        |        |        |        | (-)                |
| MOPS     |                      |        |                  |        |         |        |        |        |        |        |        | (+)                |
| TES      |                      |        |                  |        |         |        |        |        |        |        |        | (-)                |
| HEPES    |                      |        |                  |        |         |        |        |        |        |        |        | (+)                |
| DIPSO    |                      |        |                  |        |         |        |        |        |        |        |        | (-)                |
| MOBS     |                      |        |                  |        |         |        |        |        |        |        |        | (+)                |
| TAPSO    |                      |        |                  |        |         |        |        |        |        |        |        | (-)                |
| Tris     |                      |        |                  |        |         |        |        |        |        |        |        | (-)                |

FIGURE 4.3 – Schéma tiré de Ferreira *et al.* (2015) des capacités complexantes de plusieurs tampons avec différents métaux. Pour chaque binôme métal-tampon la couleur rouge indique une forte complexation, le jaune indique une faible complexation, le vert indique aucune complexation, le bleu indique que les données publiées ne sont pas en accord. La case "Final" indique si le tampon est adapté (+) ou pas (-) pour des études environnementales et de biochimie et géochimie.

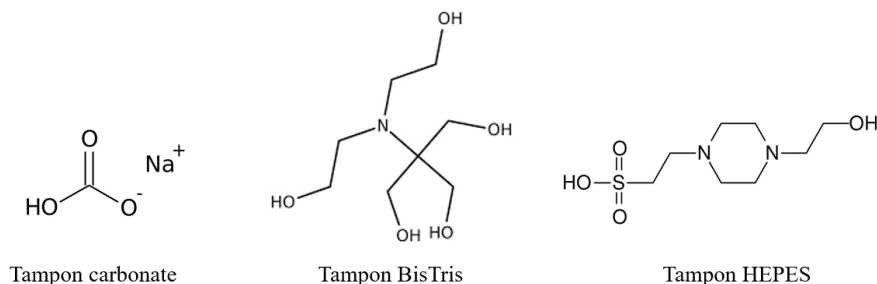


FIGURE 4.4 – Structure chimique des tampons utilisés pour cette étude.

Dans la partie suivante de ce chapitre, la condition contrôle correspond donc à une solution de tampon carbonate 1 mM.



## 4.2 Dissolution en présence d'acide oxalique et de DFOB

### 4.2.1 Résultats

#### pH et concentrations

Les expériences de dissolution ont été effectuées avec un pH initial de  $6,8 \pm 0,1$ . Les mesures de pH au cours du temps sont reportées dans le Tableau 4.4 et montrent une évolution du pH au cours du temps avec un pH final qui varie entre 8,3 et 9,3 selon les conditions. Cette évolution de pH est due aux phénomènes d'interdiffusion typiques de l'altération du verre, comme discuté précédemment.

L'évolution du pH est similaire pour toutes les conditions, c'est à dire que le pH augmente graduellement au cours du temps avec la même allure (Figure 4.5), mais il est possible d'identifier des comportements spécifiques à certaines conditions. Par exemple les valeurs de pH les plus élevées sont rencontrées pour les expériences en présence d'acide oxalique (8,9 - 9,3), tandis que les expériences en présence de DFOB ont des valeurs finales de pH plus faibles (8,3 - 8,9). Une différence significative de pH peut également être observée pour la condition de contrôle entre le verre VM (pH final 8,4) et le verre VNM (pH final de 8,9).

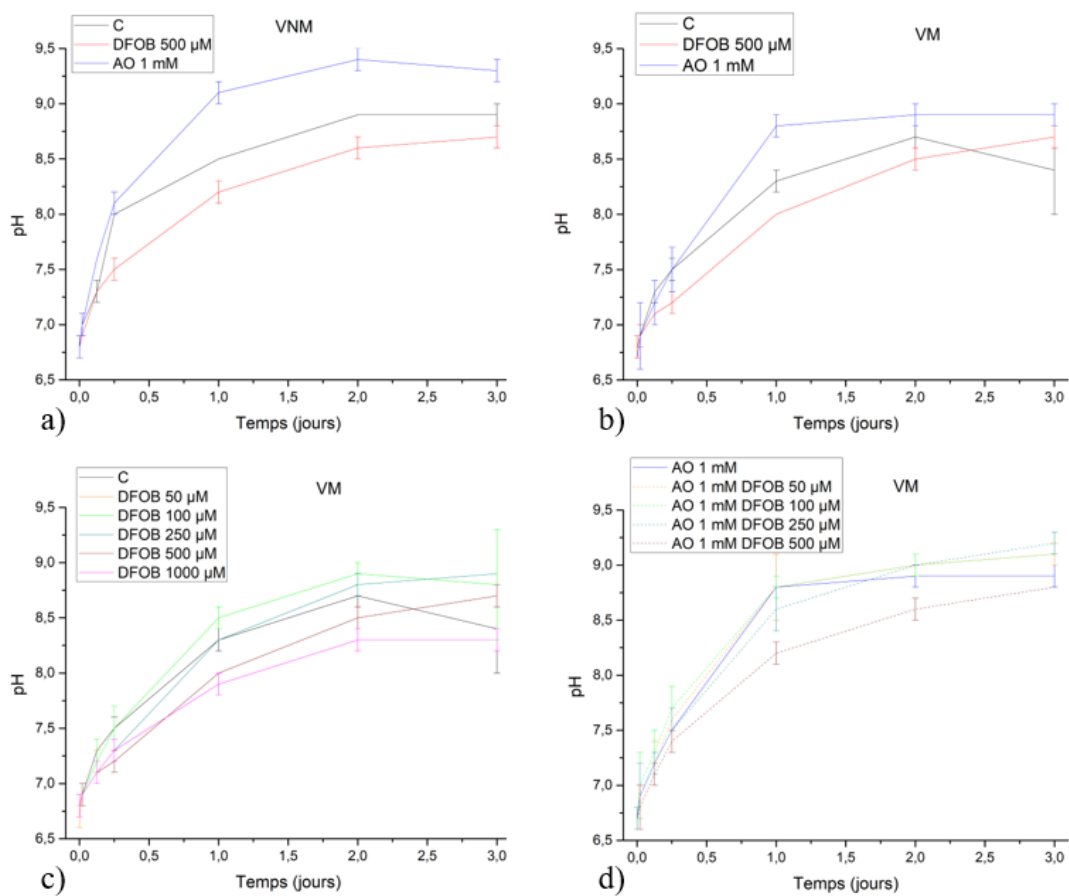


FIGURE 4.5 – Valeurs de pH tracées en fonction du temps pour les conditions de Contrôle, DFOB 500 µM et AO 1 mM pour a) VNM et b) VM. Pour VM en présence de c) DFOB 50, 100, 250 et 500 µM et d) en présence d'AO 1 mM et DFOB 50, 100, 250 et 500 µM.

| jours | C       | DFOB 50µM  | DFOB 100µM | DFOB 250µM | DFOB 500µM | DFOB 1000µM | OA 1mM  | OA-DFOB 50µM | OA-DFOB 100µM | OA-DFOB 250µM | OA-DFOB 500µM |  |
|-------|---------|------------|------------|------------|------------|-------------|---------|--------------|---------------|---------------|---------------|--|
| 0     | 6,7±0,0 | 6,7±0,1    | 6,8±0,1    | 6,8±0,0    | 6,8±0,1    | 6,8±0,1     | 6,7±0,0 | 6,7±0,1      | 6,7±0,1       | 6,7±0,1       | 6,7±0,0       |  |
| 0,01  | 6,9±0,0 | 6,9±0,0    | 6,9±0,1    | 6,9±0,0    | 6,9±0,1    | 6,9±0,0     | 6,9±0,3 | 6,9±0,3      | 7,0±0,3       | 6,9±0,3       | 6,8±0,2       |  |
| 0,125 | 7,3±0,1 | 7,2±0,1    | 7,2±0,2    | 7,1±0,0    | 7,1±0,0    | 7,1±0,1     | 7,2±0,2 | 7,2±0,2      | 7,3±0,2       | 7,2±0,1       | 7,1±0,1       |  |
| VM    | 0,25    | 7,5±0,1    | 7,5±0,2    | 7,3±0,1    | 7,2±0,1    | 7,3±0,1     | 7,5±0,2 | 7,6±0,3      | 7,7±0,2       | 7,5±0,2       | 7,4±0,1       |  |
| 1     | 8,3±0,1 | 8,5±0,1    | 8,5±0,1    | 8,3±0,0    | 8,0±0,0    | 7,9±0,1     | 8,8±0,1 | 8,8±0,3      | 8,8±0,1       | 8,6±0,2       | 8,2±0,1       |  |
| 2     | 8,7±0,1 | 8,9±0,1    | 8,9±0,1    | 8,8±0,1    | 8,5±0,1    | 8,3±0,1     | 8,9±0,1 | 9,0±0,1      | 9,2±0,1       | 9,0±0,0       | 8,6±0,1       |  |
| 3     | 8,4±0,4 | 8,8±0,5    | 8,8±0,5    | 8,9±0,0    | 8,7±0,1    | 8,3±0,1     | 8,9±0,1 | 9,1±0,1      | 9,3±0,0       | 9,2±0,1       | 8,8±0,0       |  |
| Days  | C       | DFOB 500µM |            |            |            |             |         |              |               |               |               |  |
| 0     | 6,8±0,1 | 6,8±0,1    |            |            |            |             |         |              |               |               |               |  |
| 0,01  | 7,0±0,0 | 6,9±0,0    |            |            |            |             |         |              |               |               |               |  |
| 0,125 | 7,3±0,1 | 7,3±0,0    |            |            |            |             |         |              |               |               |               |  |
| VNM   | 0,25    | 8,0±0,0    | 7,5±0,1    |            |            |             |         |              |               |               |               |  |
| 1     | 8,5±0,0 | 8,2±0,1    |            |            |            |             |         |              |               |               |               |  |
| 2     | 8,9±0,0 | 8,6±0,1    |            |            |            |             |         |              |               |               |               |  |
| 3     | 8,9±0,1 | 9,4±0,2    |            |            |            |             |         |              |               |               |               |  |
|       |         | 9,3±0,1    |            |            |            |             |         |              |               |               |               |  |
|       |         | OA 1mM     |            |            |            |             |         |              |               |               |               |  |
|       |         | 6,8±0,1    |            |            |            |             |         |              |               |               |               |  |
|       |         | 7,0±0,1    |            |            |            |             |         |              |               |               |               |  |
|       |         | 7,6±0,0    |            |            |            |             |         |              |               |               |               |  |
|       |         | 8,1±0,1    |            |            |            |             |         |              |               |               |               |  |
|       |         | 9,1±0,1    |            |            |            |             |         |              |               |               |               |  |
|       |         | 9,4±0,2    |            |            |            |             |         |              |               |               |               |  |
|       |         | 9,3±0,1    |            |            |            |             |         |              |               |               |               |  |

TABLEAU 4.4 – Valeurs de pH en fonction du temps d'expérience de dissolution pour les expériences de dissolution des verres VM et VNM en présence de tampon carbonate pour toutes les conditions testées. Les erreurs reportées représentent les écart-types ( $\pm\sigma$ ) pour les conditions qui ont été répétées deux fois.

Les concentrations obtenues par ICP-OES des éléments relâchés en solution par VNM et VNM pendant les tests de dissolution sont reportés respectivement dans les Tableaux 4.5 et 4.6.

Les valeurs des concentrations pour le premier (i) et le deuxième (ii) réplicat montrent la reproductibilité des résultats. Pour les expériences de dissolution de VM, le K a été mesuré uniquement lors du deuxième réplicat car en début de thèse le détecteur pour les longueurs d'onde du visible de l'ICP-OES présent au LGE ne fonctionnait pas. Les expériences avec le verre VNM ont été réalisées dans un second temps et le K a donc été mesuré pour les deux réplicats, les valeurs pour le K montrent une bonne reproductibilité (Tableau 4.5). On peut faire l'hypothèse que le comportement du K est également reproductible pour le VM.

Il faut souligner que les concentrations données dans les tableaux 4.5 et 4.6 sont les concentrations retraitées par soustraction du blanc propre à chaque condition. Les concentrations mesurées sont légèrement plus élevées (à cause d'éléments polluants dérivés des composés utilisés pour la préparation des solutions) et ne tombent pas donc dans le domaine de concentrations à forte incertitude de mesure de l'ICP-OES (incertitude qui peut arriver jusqu'à 50% pour concentrations < 100 ppb pour K et Si, cf. chapitre 2). Le choix de soustraire le blanc a été fait pour montrer uniquement les quantités d'éléments effectivement relâchés par les verres en solution.

Pour tous les éléments présents dans le système, les concentrations augmentent généralement avec le temps. Les concentrations d'Al varient entre 0 et 900 ppb, Ca entre 100 ppb et 9 ppm, Mg entre 10 ppb et 2 ppm, K entre 10 ppb et 12 ppm, Mn entre 0 et 1 ppm. Les concentrations de Si varient entre 10 ppb et 17 ppm.

Dans les conditions des tests de dissolution effectués, la solubilité est contrôlée par la silice amorphe, dont la constante d'équilibre est  $[Si] = 54$  ppm à 20°C. En conséquence, les expériences sont réalisées en conditions loin de la saturation en Si.

|             | Jours | Al    |       | Ca     |        | Mg     |        | Si      |         | K      |         |
|-------------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|--------|---------|
|             |       | (i)   | (ii)  | (i)    | (ii)   | (i)    | (ii)   | (i)     | (ii)    | (i)    | (ii)    |
| Control     | 0     | 2,5   | 1,3   | 161,1  | 141,8  | 23,7   | 13     | 16,3    | 112,3   | 105,8  | 13,6    |
|             | 0,125 | 4,7   | 1,1   | 479    | 528,8  | 97,8   | 120,2  | 544,9   | 653,2   | 505,3  | 739,8   |
|             | 0,25  | 1,9   | 2,6   | 932,5  | 915,8  | 184,2  | 187,5  | 1145,1  | 1176,6  | 945,3  | 1302,8  |
|             | 1     | 15    | 16,2  | 1964   | 2308,2 | 389,3  | 476,2  | 2804,3  | 3415,4  | 2203,3 | 3254,7  |
|             | 2     | 33,1  | 23,6  | 2910,2 | 3411,4 | 619,8  | 736,1  | 4643,7  | 5590,7  | 3199   | 4748,6  |
|             | 3     | 37,1  | 31,8  | 3708   | 4362,6 | 802,3  | 977,1  | 6127,3  | 7483,4  | 4676,1 | 6197,7  |
| OA 1 mM     | 0     | 0,4   | 0     | 214,6  | 104,3  | 28,1   | 11,2   | 8,3     | 19,5    | 56,3   | 39,6    |
|             | 0,125 | 0,5   | 2,4   | 619,3  | 706,7  | 127,3  | 140,4  | 630,6   | 719,4   | 738,9  | 1038,2  |
|             | 0,25  | 0,5   | 2,4   | 855,2  | 1031,9 | 208,6  | 222,6  | 1296,7  | 1422,1  | 1546,1 | 1703,4  |
|             | 1     | 4     | 15,1  | 1360,6 | 1502,7 | 540    | 535,8  | 3983,6  | 4097,6  | 3510,5 | 4056    |
|             | 2     | 15,3  | 29,2  | 1271,6 | 652,8  | 850,5  | 764,6  | 6489    | 6174,4  | 5425,3 | 5740,1  |
|             | 3     | 24,4  | 43,9  | 1077,4 | 682,3  | 1122,4 | 945,3  | 8656,1  | 7720    | 7006,1 | 7162,9  |
| DFOB 500 µM | 0     | 2,5   | 0,7   | 208,3  | 150,4  | 24,7   | 11,2   | 12      | 22,5    | 190,6  | 35,1    |
|             | 0,125 | 10,1  | 8,8   | 603,3  | 804,8  | 110,3  | 157,2  | 400,9   | 444,7   | 587,3  | 893,9   |
|             | 0,25  | 28    | 28,8  | 1039,6 | 1413,9 | 199,9  | 277,5  | 1050,7  | 1206,8  | 1022,3 | 1677,8  |
|             | 1     | 212,2 | 214,4 | 3025,9 | 4023,8 | 650,3  | 831    | 5163,8  | 6764,9  | 3281,4 | 4791,7  |
|             | 2     | 415,2 | 442,3 | 5237,2 | 6507,4 | 1147,8 | 1362,9 | 9634,6  | 11907,6 | 5702,4 | 7913,6  |
|             | 3     | 589,2 | 604,8 | 7073,8 | 8106,6 | 1535,2 | 1784,4 | 13207,6 | 15730   | 7689,4 | 10432,9 |

TABLEAU 4.5 – Concentrations en ppb de tous les éléments du verre VNM pour toutes les conditions testées. Les annotations (i) et (ii) font référence aux deux replicats réalisés pour chaque condition expérimentale. Les incertitudes sur ces mesures ne sont pas reportées, les erreurs analytiques de l'ICP-OES pour chaque élément et chaque gamme de concentration sont reportées dans le Chapitre 2 et varient entre 2 et 10 %.

CINÉTIQUES D'ALTÉRATION DU VERRE EN PRÉSENCE D'EXSUDATS MICROBIENS

|                        | Jours | Al    |        | Ca     |        | Mg     |        | Mn     |         | Si      |         | K       |      |
|------------------------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|------|
|                        |       | (i)   | (ii)   | (i)    | (ii)   | (i)    | (ii)   | (i)    | (ii)    | (i)     | (ii)    | (i)     | (ii) |
| C                      | 0     | 0,1   | 0      | 125,6  | 221,6  | 18,1   | 23,4   | 1,9    | 0       | 11,5    | 18      | 56,3    |      |
|                        | 0,125 | 1     | 0      | 331,3  | 317,8  | 54,2   | 48,1   | 16,2   | 10,3    | 144,9   | 147,5   | 331,4   |      |
|                        | 0,25  | 1,6   | 0      | 517,3  | 459,6  | 94,7   | 80,9   | 41,6   | 25,2    | 413,8   | 393,2   | 655,2   |      |
|                        | 1     | 17,9  | 1,1    | 1061,5 | 984    | 202,3  | 185,1  | 101,7  | 84,4    | 1356,1  | 1196,7  | 1268,6  |      |
|                        | 2     | 18,2  | 15,9   | 1367,1 | 1343,9 | 271,1  | 265,6  | 135,6  | 127,7   | 2024,8  | 1895,6  | 1792,1  |      |
| 3                      | 36,7  | 15,6  | 1620,7 | 1956,1 | 315,9  | 388    | 158,1  | 189,1  | 2374,9  | 2720,7  | 2520,1  |         |      |
| DFOB 50 µM             | 0     | 1,6   | 0      | 96,3   | 163,2  | 6,7    | 10,5   | 1,7    | 2       | 20,7    | 36      | 87,2    |      |
|                        | 0,125 | 4,8   | 2,5    | 393,8  | 347,2  | 68,4   | 55,4   | 27,7   | 21,5    | 232,4   | 254,1   | 327,8   |      |
|                        | 0,25  | 18,9  | 12,5   | 717,1  | 676,6  | 129,9  | 122,9  | 62,7   | 58,5    | 659,9   | 675,5   | 629,7   |      |
|                        | 1     | 161,6 | 123,3  | 2143,5 | 2010,4 | 426,1  | 408,1  | 249,8  | 245,3   | 3175    | 3378,6  | 2200    |      |
|                        | 2     | 316,4 | 265,7  | 3635,4 | 3485,5 | 744,6  | 697,8  | 439,9  | 418,5   | 5791,9  | 6051,2  | 3608,6  |      |
| 3                      | 391,7 | 398,9 | 4425,9 | 4979,3 | 906,8  | 1024,2 | 538    | 608,7  | 7145,3  | 9037,9  | 5522,5  |         |      |
| DFOB 100 µM            | 0     | 0,4   | 6,9    | 110    | 103,6  | 16     | 18,9   | 0,6    | 10,1    | 29,7    | 89,9    | 95,8    |      |
|                        | 0,125 | 3,9   | 1,3    | 443,7  | 411,8  | 83,2   | 77,7   | 37,7   | 37,8    | 244,9   | 310,1   | 412,2   |      |
|                        | 0,25  | 20,6  | 21,9   | 766,2  | 785,4  | 152,1  | 160,4  | 80,9   | 89,3    | 739,2   | 874,6   | 835,4   |      |
|                        | 1     | 212,6 | 176,7  | 2628   | 2533,4 | 545,7  | 517,3  | 316,2  | 314,7   | 4079,9  | 4380,7  | 2737,3  |      |
|                        | 2     | 392,6 | 365,8  | 4278   | 4278,5 | 893    | 878,7  | 530,3  | 537,7   | 7013,5  | 7928,1  | 4717,2  |      |
| 3                      | 523,8 | 556,3 | 5695,9 | 6113,5 | 1196,4 | 1277,9 | 698,9  | 773,5  | 9367,4  | 11645,9 | 7061,5  |         |      |
| DFOB 250 µM            | 0     | 1,1   | 0      | 145    | 85,7   | 21     | 11,6   | 1,2    | 1,9     | 31,8    | 36      | 57,2    |      |
|                        | 0,125 | 2,5   | 2,7    | 461,1  | 491,9  | 82,9   | 84,8   | 38,4   | 40,3    | 194,8   | 293,7   | 471,2   |      |
|                        | 0,25  | 21,9  | 22,1   | 797,5  | 828,3  | 159,9  | 166,3  | 88,7   | 93      | 753,1   | 808,7   | 1023,9  |      |
|                        | 1     | 247,1 | 217    | 3092,2 | 3280,2 | 639,5  | 657,1  | 375,6  | 390,1   | 4628,2  | 5280,5  | 3429,8  |      |
|                        | 2     | 490,7 | 475,1  | 5202,2 | 5353,2 | 1087,3 | 1121,8 | 638,2  | 673,9   | 8417,5  | 9902,2  | 6161    |      |
| 3                      | 668,8 | 684,1 | 7067,7 | 7413,5 | 1490,5 | 1545   | 866,2  | 928,1  | 11609,2 | 13819,2 | 8539    |         |      |
| DFOB 500 µM            | 0     | 2,5   | 0,6    | 87,9   | 123,2  | 11,9   | 12,7   | 0,9    | 0       | 29,8    | 20,3    | 58,8    |      |
|                        | 0,125 | 2,6   | 1      | 349,5  | 525,8  | 63,4   | 92,2   | 30,2   | 44,3    | 136,4   | 192,3   | 506,4   |      |
|                        | 0,25  | 1,3   | 11,4   | 706,5  | 966,4  | 142,3  | 184,8  | 78,6   | 105,2   | 565,4   | 628,5   | 1034,3  |      |
|                        | 1     | 233,5 | 184,1  | 3271,5 | 3346,1 | 678,5  | 661,7  | 394,9  | 399,6   | 4614    | 5084,5  | 3627,5  |      |
|                        | 2     | 553,5 | 502,2  | 6115,3 | 5936,6 | 1277,7 | 1250,7 | 748,6  | 750,3   | 9805,3  | 10987,8 | 7034,8  |      |
| 3                      | 796,4 | 795,5 | 8403,5 | 8808,6 | 1763,6 | 1824,2 | 1024,7 | 1095,2 | 13665,3 | 16439,6 | 10231,2 |         |      |
| DFOB 1000 µM           | 0     | 0     | 0,5    | 100,5  | 117,2  | 0,8    | 17,3   | 0      | 0,8     | 0,5     | 25      | 64,3    |      |
|                        | 0,125 | 4,3   | 1,8    | 449,5  | 420,3  | 128,2  | 82,7   | 71,9   | 41,2    | 207,7   | 138,1   | 468,2   |      |
|                        | 0,25  | 11,9  | 3,1    | 959,6  | 819,6  | 248,1  | 169,5  | 126,1  | 92      | 621,4   | 416,2   | 947,5   |      |
|                        | 1     | 173,1 | 149,8  | 3063,2 | 2945,4 | 696,1  | 607,4  | 405,2  | 370,3   | 4249,1  | 3773,7  | 3432,5  |      |
|                        | 2     | 512   | 443,4  | 5824,2 | 5736,8 | 1271,6 | 1207,9 | 744,9  | 725     | 10082,1 | 10229,4 | 6909,3  |      |
| 30.625                 | 912,2 | 812,6 | 8354,3 | 9015,3 | 1844,1 | 1905,1 | 1067,9 | 1140,2 | 15274,4 | 16953,8 | 11110,6 |         |      |
| OA 1 mM                | 0     | 2,7   | 0      | 138,5  | 43,2   | 21,9   | 14,4   | 4,2    | 1,8     | 65,8    | 37,5    | 357,5   |      |
|                        | 0,125 | 3,6   | 0      | 343,3  | 294,7  | 69,1   | 68     | 29,2   | 27,8    | 290,3   | 220,4   | 608     |      |
|                        | 0,25  | -2,7  | 0      | 591,2  | 565,5  | 118,4  | 127,8  | 59,2   | 60,2    | 679,2   | 654,2   | 1100,3  |      |
|                        | 1     | 2,6   | 0      | 1278,4 | 1440,8 | 288    | 329,4  | 153,1  | 169,6   | 2164,1  | 2349,7  | 2865,2  |      |
|                        | 2     | 25    | 5,3    | 1225,6 | 941    | 385,3  | 441,6  | 201,2  | 223,3   | 3070,3  | 3369,4  | 3959,8  |      |
| 3                      | 40,5  | 13,9  | 929,5  | 575,1  | 453,8  | 520,8  | 236,3  | 265,3  | 3715,9  | 4065    | 5094,9  |         |      |
| OA 1 mM<br>DFOB 50 µM  | 0     | 5,3   | 1,9    | 108,6  | 63,6   | 14,5   | 15,5   | 0,5    | 2       | 27,4    | 38      | 121,6   |      |
|                        | 0,125 | 2,9   | 9      | 421,6  | 428,3  | 87,4   | 92,9   | 40,8   | 44,9    | 321,5   | 346,5   | 711     |      |
|                        | 0,25  | 20,1  | 27,3   | 747    | 738,1  | 154,1  | 163,6  | 80,2   | 85,7    | 833,1   | 872     | 1254,2  |      |
|                        | 1     | 159,9 | 155,3  | 1948,2 | 1919,8 | 433,8  | 490,1  | 240,4  | 275,4   | 3281,2  | 3956,2  | 3684,6  |      |
|                        | 2     | 274,7 | 285,7  | 740,1  | 661,6  | 706    | 800,2  | 396,7  | 461     | 5549,3  | 6679,3  | 5944,1  |      |
| 3                      | 350   | 396,7 | 749,4  | 721,1  | 894,5  | 1085,9 | 509,4  | 626    | 7099,5  | 9216    | 8314,5  |         |      |
| OA 1 mM<br>DFOB 100 µM | 0     | 1,2   | 0      | 59,9   | 73,3   | 13,7   | 15,3   | 0,1    | 2       | 26,8    | 24,9    | 113,6   |      |
|                        | 0,125 | 2,4   | 2,2    | 395,6  | 475,1  | 91,4   | 89,5   | 43,3   | 46,6    | 305,5   | 287,5   | 744,1   |      |
|                        | 0,25  | 22,9  | 25,7   | 740,7  | 754,5  | 164,6  | 169,7  | 87,3   | 91,5    | 854,4   | 1026,1  | 1285,5  |      |
|                        | 1     | 226,4 | 180,2  | 1391,7 | 1391,9 | 611,6  | 569,2  | 342,6  | 324,5   | 4580,5  | 4645,4  | 4563,3  |      |
|                        | 2     | 396,7 | 363,2  | 812,2  | 853,9  | 983,7  | 961,3  | 556,6  | 555,6   | 7721,6  | 8103,5  | 7282,3  |      |
| 3                      | 505,2 | 480,5 | 748,8  | 849,4  | 1211,3 | 1239   | 687,8  | 714,3  | 9556,7  | 11289   | 9325,4  |         |      |
| OA 1 mM<br>DFOB 250 µM | 0     | 7,1   | -0,7   | 149    | 108,8  | 23,7   | 13,4   | 6,7    | 0,6     | 14,5    | 36,6    | 119,9   |      |
|                        | 0,125 | 3     | 2,7    | 561,8  | 566,4  | 108    | 117    | 57,7   | 55,4    | 422,3   | 296,9   | 1250,8  |      |
|                        | 0,25  | 29,8  | 20,8   | 1027,6 | 995,5  | 206,4  | 221,2  | 120    | 121,7   | 1136,5  | 1050,1  | 2020,3  |      |
|                        | 1     | 234,8 | 236,6  | 1103,6 | 1132,3 | 675,5  | 822,5  | 408    | 474,6   | 5653,9  | 6555,3  | 6396,1  |      |
|                        | 2     | 461,8 | 516,5  | 881    | 877,4  | 1126,4 | 1332,1 | 678,3  | 770,2   | 10089,8 | 11839,2 | 10315,4 |      |
| 3                      | 607,2 | 683,6 | 845,8  | 862,7  | 1433,1 | 1668   | 854,7  | 968    | 12957,1 | 15129,3 | 12679,5 |         |      |
| OA 1 mM<br>DFOB 500 µM | 0     | 0     | 0,3    | 121,1  | 151,8  | 15,5   | 16,6   | 1,1    | 0,4     | 52,3    | 8,2     | 140,2   |      |
|                        | 0,125 | 1,4   | 6,9    | 480,5  | 468,2  | 95     | 99,2   | 50,5   | 49,9    | 293,9   | 162,8   | 754     |      |
|                        | 0,25  | 14,3  | 8,8    | 996,1  | 906,1  | 207,9  | 212,1  | 117,8  | 111,2   | 740,7   | 633,5   | 1526,4  |      |
|                        | 1     | 202,5 | 157,6  | 1796,9 | 1499,3 | 699,5  | 689,9  | 421,6  | 392,7   | 5210,8  | 4529,7  | 5043,8  |      |
|                        | 2     | 456,2 | 404,8  | 1052,7 | 876,4  | 1204,2 | 1185,8 | 727,7  | 687,2   | 10338,3 | 9664,4  | 8596,5  |      |
| 3                      | 660,9 | 620,5 | 1019,1 | 769,3  | 1608,2 | 1610,1 | 980    | 930,6  | 14328,8 | 13904,6 | 11751,7 |         |      |

TABLEAU 4.6 – Concentrations en ppb de tous les éléments du verre VM pour toutes les conditions testées. Les annotations (i) et (ii) font référence aux deux replicats réalisés pour chaque condition expérimentale. Les incertitudes sur ces mesures ne sont pas reportés, les erreurs analytiques de l'ICP-OES pour chaque élément et chaque gamme de concentration sont reportées dans le Chapitre 2 et varient entre 2 et 10 %.

### Pertes de masse normalisées et stœchiométrie

Les pertes de masse normalisées (NLs) pour Si, Al, Ca, Mg, Mn, K sont tracées en fonction du temps pour l'expérience de contrôle (tampon carbonate 1 mM), l'expérience AO 1 mM et l'expérience DFOB 500  $\mu$ M en Figure 4.6 pour les deux verres. A cause de la présence du Na dans le tampon la concentration en Na ne peut pas être mesurée, le P n'a pas été mesuré pour ces tests.

En conditions de contrôle, les valeurs des NLs montrent une dissolution incongruente pour VM et VNM. Pour les deux verres, l'Al est moins relâché en solution que le Si, alors que Ca, Mg et K sont préférentiellement relâchés par rapport à Si. Pour le verre VM, le Mn est relâché en même temps que le Si. Une différence significative entre les deux verres en conditions de contrôle est observée en terme d'intensité de NLs. En effet le verre VM a des valeurs finales de NLs plus basses (autour de 1  $g/m^2$ ) que le verre VNM (autour de 2  $g/m^2$ ).

En présence d'acide oxalique les NLs sont en général légèrement plus élevées que pour l'expérience de contrôle, sauf pour le K. En effet, pour les deux verres, le même effet de l'AO est observé sur la stœchiométrie de dissolution de K et Ca qui est différente par rapport au contrôle. Le K est relâché préférentiellement par rapport à tous les autres éléments et les NLs du Ca montrent une chute entre 1 et 2 jours.

En présence de DFOB, les deux verres ont une dissolution congruente. Tous les éléments sont relâchés de manière quasi linéaire. Les NLs continuent d'augmenter pour tous les éléments.

En Figure 4.7 sont tracées les NLs du Si pour les deux verres pour les trois conditions (contrôle, AO 1 mM et DFOB 500 $\mu$ M) dont le comportement total a été décrit en Figure 4.6. Cette représentation permet de mettre en évidence les différents effets que les deux ligands ont sur la dissolution. La courbe de l'AO reste assez proche de la courbe du contrôle en terme de NLs et en terme de allure. En effet pour ces deux conditions, une chute de vitesse est observée après 1 jour d'expérience. La courbe du Si en présence de DFOB se démarque nettement de celles pour le contrôle et pour l'AO. Elle a des NLs finales quatre fois plus intenses pour le VM par rapport au contrôle et deux fois plus intenses pour le VNM. De plus, les NLs continuent d'augmenter et la chute de vitesse présente en conditions de contrôle et en AO n'est pas observée.

En Figure 4.8, l'évolution des NLs en fonction du temps est tracée pour chaque élément du verre VM séparément pour les différentes conditions de DFOB. Une augmentation des NLs corrélée à la concentration de DFOB en solution est observée pour tous les éléments. L'augmentation est plus importante aux faibles concentrations de sidérophore (50  $\mu$ M).

Les valeurs de NLs pour le verre VM dans le système à deux ligands (OA 1mM + DFOB 50, 100, 250 et 500  $\mu$ M) sont tracées en Figure 4.9. Une dissolution incongruente est observée, similaire en ce qui concerne le comportement de K et Ca à celle observée dans le système à un ligand AO 1 mM. Les valeurs de NLs sont élevées et identiques à celles des systèmes à un ligand DFOB pour la concentration de DFOB équivalente.

Les NLs du K, élément traceur du mécanisme d'interdiffusion, ont été tracées en fonction de la racine carré du temps ( $\sqrt{t}$ ) afin de calculer son coefficient de diffusion

(en  $\text{m}^2/\text{s}$ ). A titre d'exemple, les NLs du K en fonction de  $\sqrt{t}$  pour VM en condition de contrôle, en AO 1mM et en DFOB 1mM sont reportées en Figure 4.10. Les NLs du K varient de façon linéaire en fonction de  $\sqrt{t}$  en conditions de contrôle et en présence d'AO, avec un  $R^2$  de 0,99, en accord avec un mécanisme diffusif (Doremus, 1975). Au contraire, l'évolution du K en fonction de la  $\sqrt{t}$  en présence de DFOB n'est pas linéaire, avec un  $R^2$  de 0,93.

Il a été possible de calculer un coefficient de diffusion en  $\text{m}^2/\text{s}$  pour les conditions présentant un  $R^2 = 0,99$ , ces valeurs sont reportées dans le Tableau 4.7 et sont en accord avec les valeurs calculées par Sessegolo (2018) pour un verre modèle de vitraux de composition silicaté calco-potassique très similaire.

|          | VM                    | VNM                   |
|----------|-----------------------|-----------------------|
| Contrôle | $1,5 \times 10^{-18}$ | $1,0 \times 10^{-17}$ |
| AO 1 mM  | $6,4 \times 10^{-18}$ | $1,8 \times 10^{-17}$ |

TABLEAU 4.7 – Coefficients de diffusion  $D$  du K en  $\text{m}^2/\text{s}$  calculés pour VM et VNM en conditions de contrôle et en AO 1 mM.



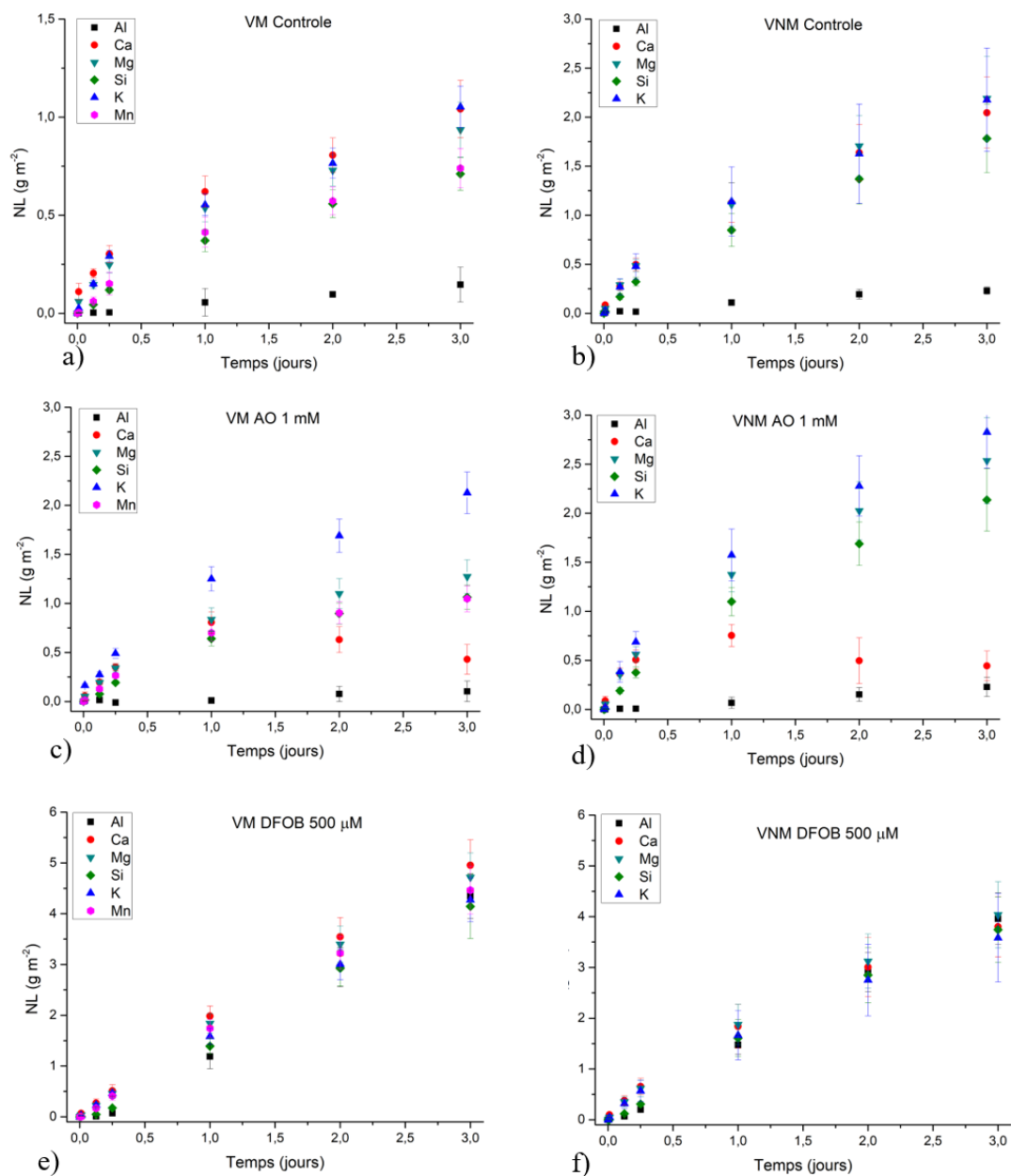


FIGURE 4.6 – Pertes de masse normalisées (NLs) en  $\text{g/m}^2$  de Al, Ca, Mg, Mn, Si et K en fonction du temps, calculées à partir des concentrations mesurées dans les tests de dissolution pour a) VM contrôle (échelle jusqu'à 1,5) c) VM AO 1 mM (échelle jusqu'à 3) e) VM DFOB 500  $\mu\text{M}$  (échelle jusqu'à 6), et b) VNM contrôle (échelle jusqu'à 3) d) VNM AO 1mM (échelle jusqu'à 3) f) VNM DFOB 500  $\mu\text{M}$  (échelle jusqu'à 6). Les barres d'erreur sont calculées en prenant en compte les incertitudes sur la mesure de la concentration par ICP-OES et les écart-types ( $\pm\sigma$ ) sur les deux répliquats pour chaque point.

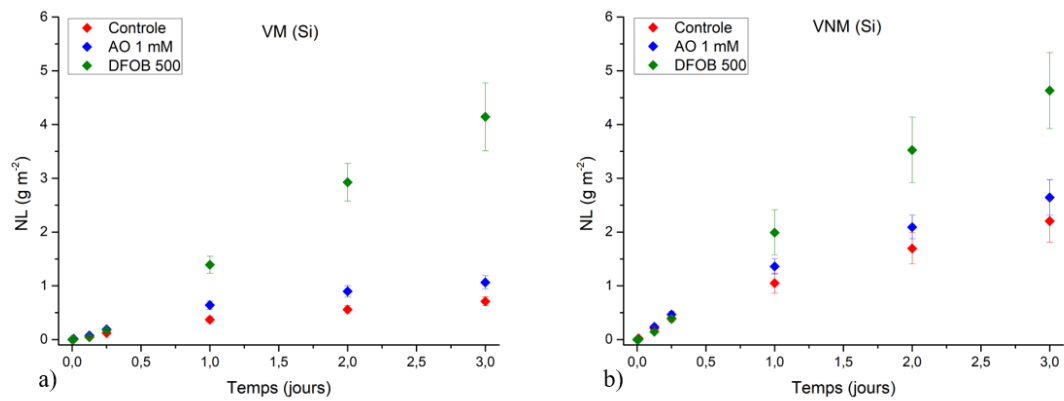


FIGURE 4.7 – Pertes de masse normalisées (NLs) du Si pour les conditions de Contrôle, AO 1 mM et DFOB  $500\mu\text{M}$  en fonction du temps pour les verres a) VM et b) VNM, calculées à partir des concentrations mesurées dans les tests de dissolution. Les barres d'erreur sont calculées en prenant en compte les incertitudes sur la mesure de la concentration par ICP-OES et les écart-types ( $\pm\sigma$ ) sur les deux réplicats pour chaque point.

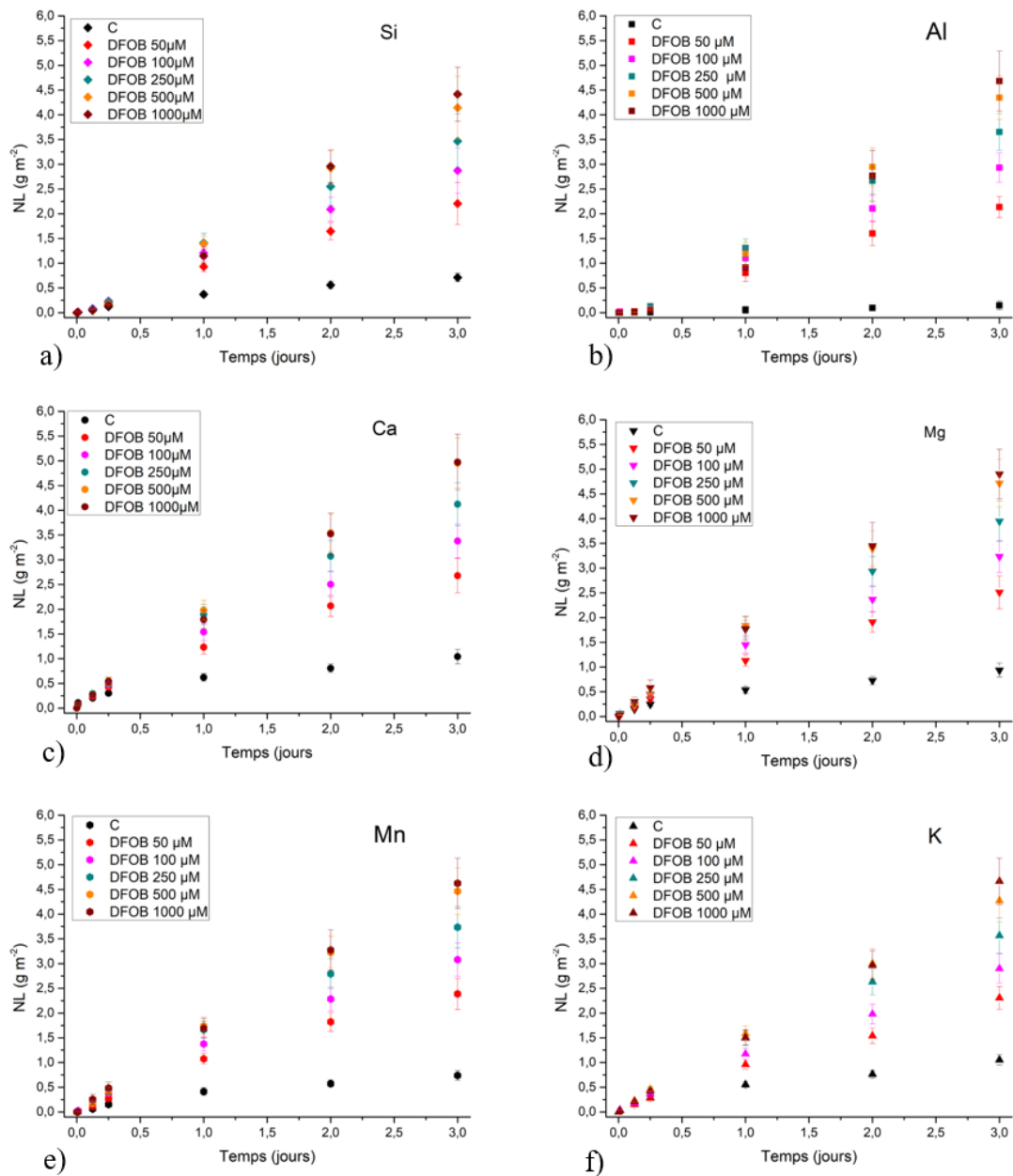


FIGURE 4.8 – Pertes de masse normalisées (NLs) en fonction du temps de a) Si, b) Al, c) Ca, d) Mg, e) Mn, f) K pour les différentes concentrations (50, 100, 250, 500, 1000  $\mu\text{M}$ ) de DFOB testées, calculées à partir des concentrations mesurées dans les tests de dissolution. Les barres d'erreur sont calculées en prenant en compte les incertitudes sur la mesure de la concentration par ICP-OES et les écart-types ( $\pm\sigma$ ) sur les deux réplicats pour chaque point.

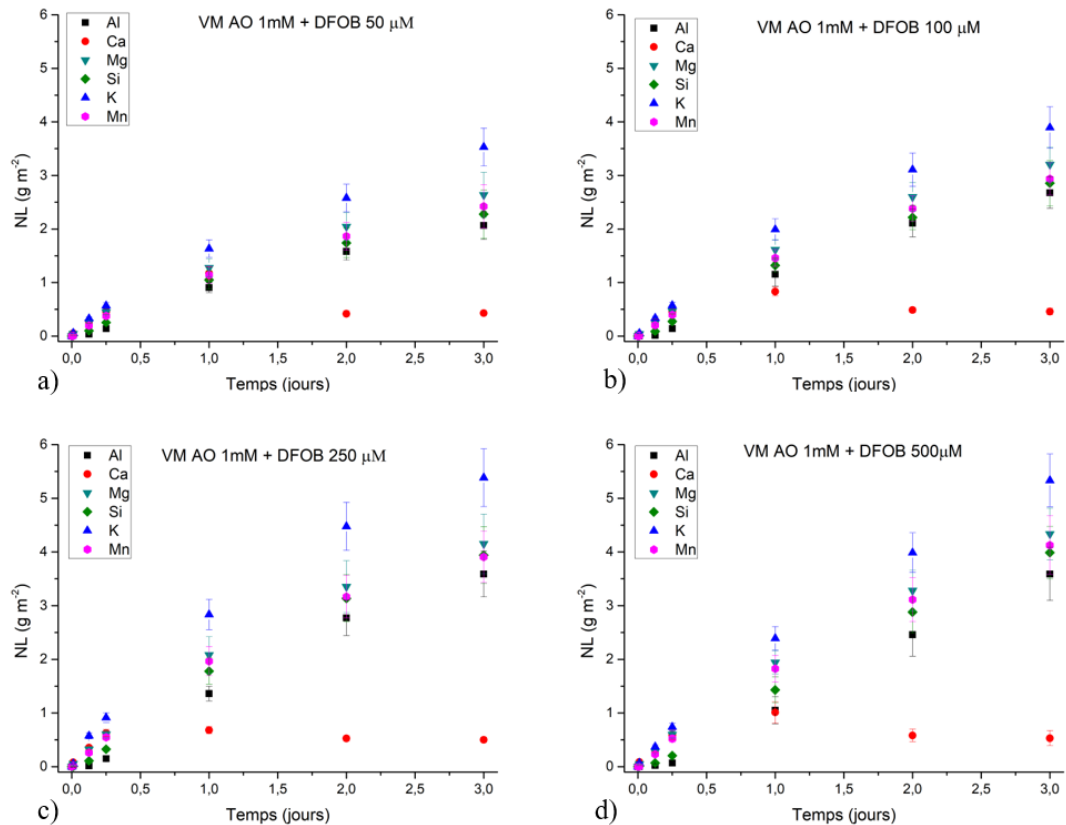


FIGURE 4.9 – Pertes de masse normalisées (NLs) en fonction du temps du verre VM pour les systèmes à deux ligands OA 1 mM + DFOB a)  $50 \mu\text{M}$  b)  $100 \mu\text{M}$  c)  $250 \mu\text{M}$  d)  $500 \mu\text{M}$ , calculées à partir des concentrations mesurées dans les tests de dissolution. Les barres d'erreur sont calculées en prenant en compte les incertitudes sur la mesure de la concentration par ICP-OES et les écart-types ( $\pm\sigma$ ) sur les deux répliquats pour chaque point.

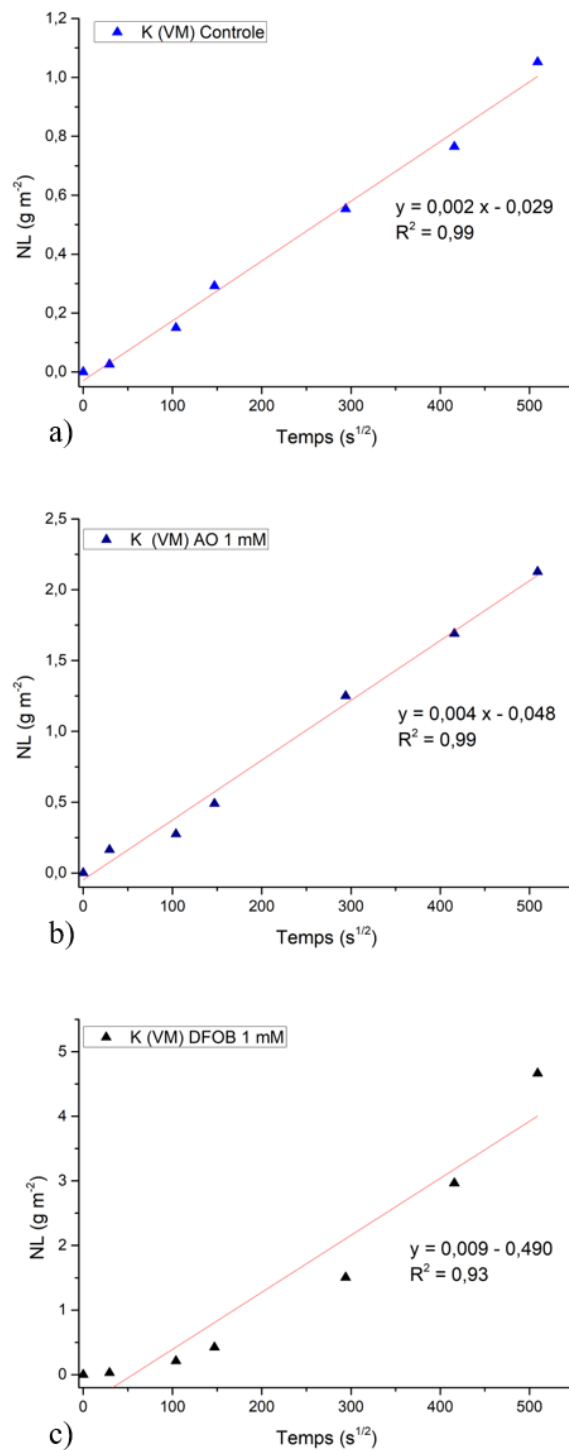


FIGURE 4.10 – Pertes de masse normalisées (NLs) du K en fonction de  $\sqrt{t}$  pour VM en conditions de a) contrôle, b) AO 1 mM et c) DFOB 1 mM. La droite de régression linéaire et les  $R^2$  sont également reportés.

## UV-VIS

Les mesures UV-VIS d'absorption permettant de détecter la présence du complexe  $\text{Mn(III)DFOB}^+$  à 310 nm sont tracées en Figure 4.11. L'absorbance augmente avec le temps avec la concentration de DFOB, en accord avec les résultats des NLs.

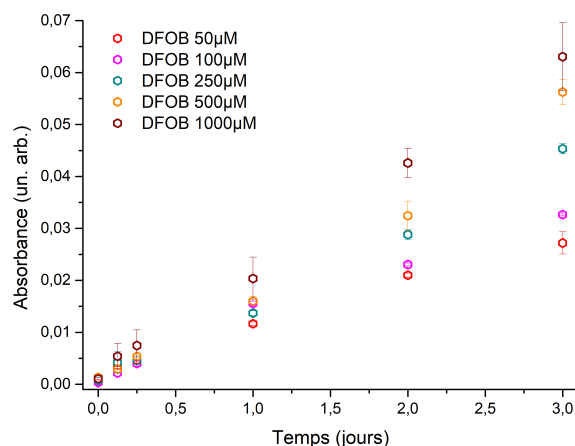


FIGURE 4.11 – Absorbance UV-VIS à 310 nm en fonction du temps pour le complexe  $\text{Mn(III)DFOB}^+$  lors des tests de dissolution du verre VM avec différentes concentrations de DFOB. Les barres d'erreur représentent les écart-types ( $\pm\sigma$ ) sur les deux réplicats.

La concentration ( $\mu\text{M}$ ) en solution du complexe a été calculée grâce à la loi de Beer-Lambert (cf. Chapitre 2) en utilisant un coefficient d'extinction molaire de  $\varepsilon = 2060 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Duckworth et Sposito, 2005b,a) et les mesures expérimentales d'absorbance (Tableau 4.8). Pour comparaison, la concentration ( $\mu\text{M}$ ) du Mn en solution calculée à partir des résultats ICP-OES est également reportée. Les valeurs obtenues montrent que les concentrations du complexe et de Mn en solution peuvent être considérées comme équivalentes compte tenu des incertitudes (valeurs légèrement sur-estimées en UV-VIS ou sous-estimées en ICP-OES). Tout le Mn en solution est vraisemblablement complexé par la DFOB.

|                         | Jours | [Mn] $\mu\text{M}$ | [Mn(III)-HDFOB <sup>+</sup> ] $\mu\text{M}$ |
|-------------------------|-------|--------------------|---|
| DFOB 50 $\mu\text{M}$   | 0     | 0 $\pm$ 0,1        | 0,5 $\pm$ 0,1                               |
|                         | 0,125 | 0,4 $\pm$ 0,1      | 1,6 $\pm$ 0,2                               |
|                         | 0,25  | 1,1 $\pm$ 0,1      | 1,9 $\pm$ 0,2                               |
|                         | 1     | 4,5 $\pm$ 0,6      | 5,7 $\pm$ 0,6                               |
|                         | 2     | 7,8 $\pm$ 1,0      | 10,2 $\pm$ 1,0                              |
|                         | 3     | 10,4 $\pm$ 1,6     | 13,2 $\pm$ 1,7                              |
| DFOB 100 $\mu\text{M}$  | 0     | 0,1 $\pm$ 0,1      | 0,2 $\pm$ 0,1                               |
|                         | 0,125 | 0,7 $\pm$ 0,1      | 1 $\pm$ 0,1                                 |
|                         | 0,25  | 1,5 $\pm$ 0,2      | 1,9 $\pm$ 0,2                               |
|                         | 1     | 5,7 $\pm$ 0,7      | 7,5 $\pm$ 0,8                               |
|                         | 2     | 9,7 $\pm$ 1,3      | 11,2 $\pm$ 1,1                              |
|                         | 3     | 13,4 $\pm$ 1,8     | 15,8 $\pm$ 1,6                              |
| DFOB 250 $\mu\text{M}$  | 0     | 0 $\pm$ 0,1        | 0,4 $\pm$ 0,3                               |
|                         | 0,125 | 0,7 $\pm$ 0,1      | 2 $\pm$ 0,2                                 |
|                         | 0,25  | 1,7 $\pm$ 0,2      | 2,2 $\pm$ 0,2                               |
|                         | 1     | 7 $\pm$ 0,9        | 6,7 $\pm$ 0,7                               |
|                         | 2     | 11,9 $\pm$ 1,6     | 14 $\pm$ 1,5                                |
|                         | 3     | 16,3 $\pm$ 2,2     | 22 $\pm$ 2,3                                |
| DFOB 500 $\mu\text{M}$  | 0     | 0 $\pm$ 0,1        | 0,6 $\pm$ 0,2                               |
|                         | 0,125 | 0,7 $\pm$ 0,2      | 1,4 $\pm$ 0,2                               |
|                         | 0,25  | 1,7 $\pm$ 0,4      | 2,6 $\pm$ 0,3                               |
|                         | 1     | 7,2 $\pm$ 0,9      | 7,8 $\pm$ 0,9                               |
|                         | 2     | 13,6 $\pm$ 1,8     | 14,5 $\pm$ 1,9                              |
|                         | 3     | 19,3 $\pm$ 2,5     | 27,3 $\pm$ 3,0                              |
| DFOB 1000 $\mu\text{M}$ | 0     | 0 $\pm$ 0,1        | 0,5 $\pm$ 0,1                               |
|                         | 0,125 | 1 $\pm$ 0,4        | 2,6 $\pm$ 1,2                               |
|                         | 0,25  | 2 $\pm$ 0,5        | 6 $\pm$ 2,5                                 |
|                         | 1     | 7,1 $\pm$ 1,0      | 12,3 $\pm$ 2,8                              |
|                         | 2     | 13,4 $\pm$ 2,0     | 22,4 $\pm$ 2,7                              |
|                         | 3     | 20,1 $\pm$ 2,7     | 42,9 $\pm$ 6,2                              |

TABLEAU 4.8 – Concentrations en  $\mu\text{mol/l}$  en fonction du temps du complexe Mn(III)DFOB<sup>+</sup> calculées à partir des mesures d’absorbance, et du Mn calculées à partir des résultats ICP-OES pour les conditions de dissolution du verre VM en présence de DFOB 50, 100, 250, 500  $\mu\text{M}$ . Les barres d’erreur reportées sont calculées en prenant en considération l’incertitude sur la mesure ICP-OES et UV-VIS (10%) et l’écart-type ( $\pm\sigma$ ) pour les deux expérience répliqués pour chaque point.

### Vitesses de dissolution

Les vitesses de dissolution initiale du Si ( $v_i$ ) sont reportées dans le Tableau 4.9 pour les deux verres dans toutes les conditions testées.

En conditions de contrôle, le verre VNM a une vitesse de dissolution significativement plus élevée (0,88 g/m<sup>2</sup>/j) que le VM (0,37 g/m<sup>2</sup>/j).

En présence de DFOB, la vitesse de dissolution de VM est fortement augmentée dès les faibles concentrations. Avec 50 µM de sidérophore en solution, la vitesse de dissolution est plus que doublée (×2,2) par rapport au contrôle. Pour DFOB 500 µM et 1000 µM, la vitesse de dissolution est quadruplée (× 3,9 et ×4,1 respectivement). L'augmentation de vitesse de dissolution de VM en présence de DFOB n'est donc pas linéaire avec l'augmentation de la concentration de DFOB en solution. La vitesse de dissolution de VNM est également augmentée en présence de DFOB 500 µM (×1,5) mais en mesure moins important par rapport à VM en présence de la même concentration de sidérophore.

L'AO (1 mM) a un impact modéré sur la vitesse de dissolution, qui augmente de ×1,3 pour le VNM et de ×1,7 pour le VM par rapport aux conditions de contrôle.

Dans les systèmes à deux ligands, une augmentation de la vitesse de dissolution est également observée en fonction de la concentration de DFOB. Les valeurs de vitesse pour les systèmes à deux ligands sont généralement légèrement plus grandes que le système correspondant à un ligand de DFOB. Une exception est rencontrée pour AO + DFOB 500 µM car la vitesse de dissolution pour cette condition (1,38 g/m<sup>2</sup>/j) est quasi identique à celle pour la condition correspondante de DFOB 500 µM (1,43 g/m<sup>2</sup>/j) et plus faible que AO 1 mM + DFOB 250 µM (1,62 g/m<sup>2</sup>/j). Toutefois ces deux valeurs sont celles ayant les barres d'erreur les plus élevées, cette exception ne peut pas donc être considérée significative.

|                     | VM          | VNM         |
|---------------------|-------------|-------------|
| C                   | 0,37 ± 0,06 | 0,88 ± 0,17 |
| DFOB 50 µM          | 0,83 ± 0,11 |             |
| DFOB 100 µM         | 0,99 ± 0,16 |             |
| DFOB 250 µM         | 1,20 ± 0,21 |             |
| DFOB 500 µM         | 1,43 ± 0,23 | 1,32 ± 0,24 |
| DFOB 1000 µM        | 1,50 ± 0,20 |             |
| OA 1 mM             | 0,64 ± 0,09 | 1,13 ± 0,15 |
| OA 1 mM DFOB 50 µM  | 0,89 ± 0,16 |             |
| OA 1 mM DFOB 100 µM | 1,15 ± 0,15 |             |
| OA 1 mM DFOB 250 µM | 1,62 ± 0,27 |             |
| OA 1 mM DFOB 500 µM | 1,38 ± 0,20 |             |

TABLEAU 4.9 – Vitesses initiales de dissolution du Si ( $v_{Si}$ ) en g/m<sup>2</sup>/j calculées lors des tests de dissolution des verres VM et VNM pour toutes les conditions testées. Les erreurs reportées sont calculées en prenant en considération l'incertitude sur la mesure de la surface spécifique (8 %), l'erreur sur la mesure ICP-OES (10 %), et l'écart-type ( $\pm\sigma$ ) pour les deux expériences répliqués.

### Caractérisation des poudres de verre altérées

La Figure 4.12 reporte une cartographie MEB-EDX du verre altéré en AO, récupéré en fin d'expérience et enrobé dans la résine. Aucune couche d'altération n'est observée (épaisseur estimée trop faible pour être observée en imagerie MEB), toutefois un précipité



riche en Ca et C est visible sur la surface du grain, en accord avec les résultats des NLs qui montrent une chute du Ca en solution entre 1 et 2 jours pour les conditions de dissolution en présence d'AO.

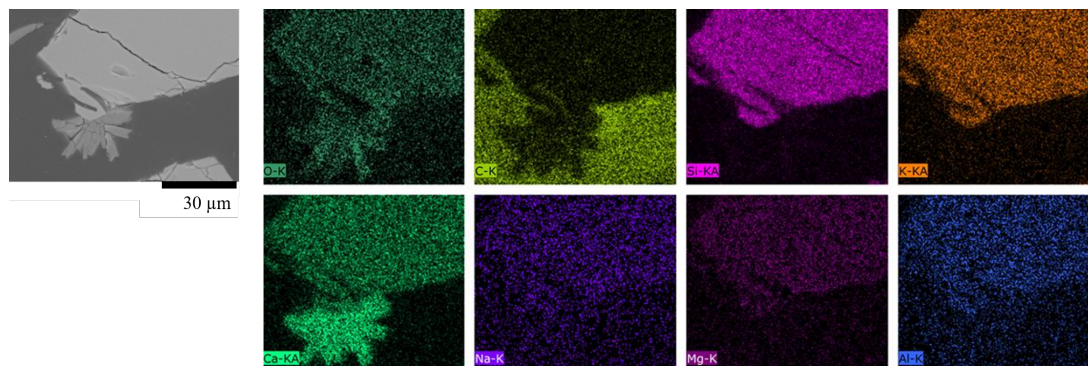


FIGURE 4.12 – Cartographie MEB-EDX de la poudre de verre altérée (VM) en présence d'AO, récupérée en fin d'expérience et enrobée en résine. Un précipité riche en Ca et C est identifié déposé sur la surface du grain de poudre. Image réalisée par C. Ranchoux

## 4.2.2 Discussion

Les résultats montrent des fortes corrélations entre le comportement en dissolution et i) la nature et concentration du ligand introduit en solution et ii) la composition du verre. Ces effets seront donc discutés séparément.

### Mécanismes de dissolution dans les systèmes à un ligand

#### *Acide oxalique*

Une augmentation de la vitesse de dissolution du verre est observée en présence d'AO par rapport au contrôle (Tableau 4.3). Cela est en accord avec des observations qui ont été reportées pour le quartz et d'autres minéraux silicatés comme la kaolinite ou des feldspaths (Cama et Ganor, 2006; Bennett *et al.*, 1988; Drever et Stillings, 1997; Oelkers et Gislason, 2001).

Cette augmentation de la vitesse de dissolution en présence d'acides organiques est généralement attribuée à deux mécanismes de dissolution possibles : la dissolution "*proton-promoted*" où le moteur de la dissolution est l'échange ionique avec les protons en solution relâchés par l'acide, et la dissolution "*ligand-promoted*" contrôlée par la complexation des éléments du substrat par un groupe fonctionnel complexant présent dans la structure de l'acide (Cama et Ganor, 2006; Salek *et al.*, 2013).

Nous avons vu que pour toutes les expériences contenant de l'AO, les valeurs finales de pH sont supérieures à 9 (Tableau 4.4). De plus, un relâchement préférentiel du K a été observé pour les expériences en présence d'AO (Figure 4.9). Ces observations peuvent être interprétées comme un signe de la présence d'une réaction d'interdiffusion plus intense dans ces conditions par rapport aux autres conditions testées. Un mécanisme de dissolution "*ligand-promoted*" est donc certainement présent lors de la dissolution du verre modèle en présence d'AO.

En ce qui concerne le mécanisme de dissolution "*ligand-promoted*", l'effet de complexation est généralement négligeable pour des éléments normalement très solubles comme Na, K, Ca, Mg (Drever et Stillings, 1997; Huang et Keller, 1972; Poulson *et al.*, 1997).

Dans le cas du Si, Bennett *et al.* (1988) et Bennett (1991) affirment que l'AO est capable d'augmenter la vitesse de dissolution du quartz par interaction avec le Si de surface à travers un transfert de charge qui causerait un affaiblissement des liaisons Si-O-Si en les rendant plus facilement hydrolysables. Au contraire, Fein et Hestrin (1994) et Poulson *et al.* (1997) affirment que l'adsorption de l'oxalate sur le quartz et son influence sur la dissolution sont négligeables. En accord avec Fein et Hestrin (1994); Poulson *et al.* (1997), Huang et Keller (1972) attribuent l'augmentation de la vitesse de dissolution des minéraux alumino-silicatés en présence d'acides organiques à la complexation de l'Al en site tétraédrique, et non à la complexation du Si. Ainsi, la complexation du Si par l'AO n'est généralement pas prise en compte lors des études de dissolution du verre (Perez *et al.*, 2015).

En ce qui concerne le Mn, peu d'études ont été dédiées à la dissolution de minéraux manganésiens en présence d'acides organiques (Xyla *et al.*, 1992; Wang et Stone, 2006; Li et Schwartz, 2004; Klewicki et Morgan, 1999). Wang et Stone (2006) et Li et Schwartz (2004) identifient la complexation du Mn par l'acide oxalique comme l'un des possibles mécanismes responsables de la dissolution de MnO<sub>2</sub> et MnOOH. Wang et Stone (2006) ont aussi montré que l'effet sur la dissolution est dépendant de la nature de l'acide organique étudié. Hausrath *et al.* (2009) ont observé que pendant la dissolution de basaltes et granites, certains éléments comme Zr, Sc, Mn montraient un enrichissement en solution en présence de citrate, ce qui suggère une corrélation entre la présence de ces éléments et les propriétés complexantes du citrate. Ces études montrent qu'une complexation du Mn par des acides organiques peut jouer un rôle dans la dissolution de phases minérales en phase aqueuse.

Dans le cas de notre verre modèle, l'augmentation de la vitesse de dissolution en présence d'acide oxalique peut donc également être attribuée en partie (couplé au mécanisme de dissolution "*proton-promoted*") à un mécanisme de dissolution "*ligand-promoted*" lié à la complexation de Al et Mn. En effet, quelques études (Salek *et al.*, 2013; Calvaruso *et al.*, 2013) ont été dédiées à la comparaison de l'effet sur la dissolution de divers minéraux entre acides organiques et acides inorganiques et ont montré que les acides organiques sont plus efficaces dans la favorisation de la dissolution de phases minérales par rapport aux acides inorganiques, confirmant ainsi le rôle du mécanisme de complexation joué par les acides organiques (en addition au mécanisme d'échange de protons en commun avec les acides inorganiques).

Un autre effet de l'acide organique a été observé sur la stœchiométrie de dissolution, c'est à dire la chute du Ca entre 1 et 2 jours, en accord avec l'observation d'un précipité riche en Ca sur la poudre de verre altéré, attribuable à la formation d'oxalate de calcium (Welch et Ullman, 1993; Perez *et al.*, 2015; Wolff-Boenisch et Traina, 2007).

Wolff-Boenisch et Traina (2007) affirment que la précipitation de l'oxalate de calcium rend moins efficace la dissolution *ligand-promoted* parce que moins de molécules sont présentes en solution. Cela serait une explication du pourquoi l'acide oxalique n'est pas trouvé à des concentrations élevées dans les sols, la faible constante de solubilité de l'oxalate de calcium ( $K_{sp} = - 8,75$ ) en limiterait la disponibilité sous sa forme solubilisée (Cromack

*et al.*, 1979). Par conséquent, en appliquant ce raisonnement aux résultats obtenus, il faut prendre en considération que le mécanisme de dissolution *ligand-promoted* agissant sur la complexation d'Al et Mn en présence d'AO pourrait être limitée par la présence de Ca.

En conclusion, les résultats montrent que l'AO intervient sur la dissolution du verre par plusieurs mécanismes qui œuvrent en même temps : l'intensification de l'interdiffusion entre  $H^+$  et  $K^+$ , la complexation d'Al et de Mn, et la précipitation de phases secondaires.

### *Desferrioxamine B*

Pour la dissolution des minéraux de Mn en présence de DFOB, trois mécanismes sont envisageables : la dissolution *ligand-promoted*, la dissolution *proton-promoted*, et la dissolution réductive.

Pour les expériences en présence de DFOB, le pH initial (6,8) évolue jusqu'à un pH final d'environ 8,7. Selon la littérature, les mécanismes *proton-promoted* et de dissolution réductive sont négligeables dans cette gamme de pH pour les expériences de dissolution en présence de DFOB (Duckworth et Sposito, 2005b; Peña *et al.*, 2007). L'augmentation du pH observée dans ces conditions est donc due aux mécanismes d'interdiffusion typiques de l'altération du verre en contact avec l'eau, qui ne sont pas influencés par la présence du sidérophore.

En revanche, la dissolution *ligand-promoted* reste invariée sur une large gamme de pH (au dessus de 6) lors de la dissolution des oxides de Fe et Mn par la DFOB (Peña *et al.*, 2007; Cheah *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2018; Duckworth et Sposito, 2005b). Par conséquent, nous discuterons uniquement de l'effet complexant du sidérophore.

Nous avons vu que le sidérophore DFOB a un effet marqué sur la dissolution du verre. D'une part, une augmentation de la vitesse de dissolution corrélée à la concentration de DFOB est observée (Figure 4.8). D'autre part, la dissolution du verre modèle devient congruente (Figure 4.6).

Une dissolution congruente est signe d'une déstabilisation du réseau vitreux qui mène au relâchement en solution de tous les éléments du verre, y compris les formateurs de réseau.

Le Si est le principal élément formateur de réseau du verre et la rupture de la liaison Si–O est considérée comme l'étape limitante de la dissolution (Oelkers et Gislason, 2001). La complexation du Si par la DFOB n'a pas été reportée dans la littérature et elle est donc considérée comme négligeable dans la dissolution du verre (Perez *et al.*, 2015). En conséquence, l'augmentation de la présence de Si en solution peut être attribuée à la complexation de cations métalliques à la surface du verre, qui cause une déstabilisation du réseau vitreux et en favorise la dissolution. Neaman *et al.* (2005) ont montré que la complexation du Fe dans des roches basaltiques peut déstabiliser la structure silicatée et causer une dissolution plus poussée. Le même effet a été démontré par Perez (2015) pour des verres basaltiques en présence de sidérophores ; dans ce cas, la complexation de  $Fe^{3+}$  et  $Al^{3+}$  est la cause de la déstabilisation du réseau vitreux.

Un parallèle peut être fait avec notre verre modèle et la complexation de l'Al par la DFOB est certainement liée à la déstabilisation du réseau. Cependant, la complexation de l'Al pourrait ne pas être la seule cause, car la complexation du Mn a été observée dans

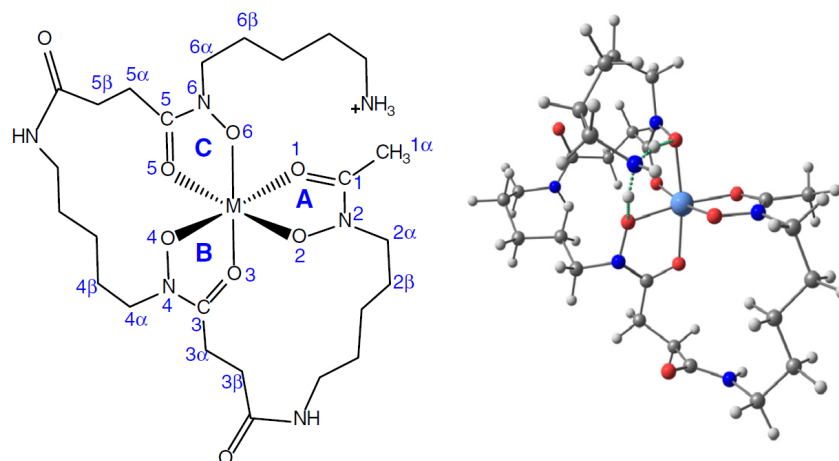


FIGURE 4.13 – Structure du complexe métal-DFOB selon Krufft *et al.* (2013). Le métal est en coordination octaédrique, complexé par les trois groupes fonctionnels hydroxamate (A, B, C).

ce travail. La formation du complexe Mn(III)-HDFOB<sup>+</sup> (Figure 4.13) a été détectée par mesure UV-VIS pour toutes les conditions de dissolution en présence de DFOB (Figure 4.11). Selon la littérature, ce complexe peut être formé par deux mécanismes : la formation directe par complexation du Mn<sup>3+</sup> présent dans le verre, ou la formation par oxydation d'un complexe intermédiaire de Mn<sup>2+</sup> (Duckworth et Sposito, 2005b,a). En ce qui concerne le verre VM, nous avons vu dans le Chapitre 2 que l'état d'oxydation précis du Mn dans ce verre n'est pas connu, mais il est possible de supposer sur la base de la littérature qu'il soit présent sous-forme d'un mélange de Mn<sup>2+</sup> et Mn<sup>3+</sup> (Nelson et White, 1980; Ferrand *et al.*, 2015; Nuyts *et al.*, 2015). En conséquence, cela suggère que dans le cas du verre VM le complexe Mn(III)-HDFOB<sup>+</sup> détecté en solution peut être formé par les deux mécanismes précédemment décrit. De plus, la comparaison des concentrations de Mn et de complexe Mn(III)-HDFOB<sup>+</sup> en solution a montré que tout le Mn présent en solution est présent sous la forme complexée avec le sidérophore.

Une augmentation de la vitesse de dissolution de VM en fonction de la concentration de DFOB a été observée, en accord avec les résultats de Duckworth et Sposito (2005b) pour la dissolution de l'haussmanite. Notamment pour l'haussmannite et la goethite, la vitesse de dissolution est directement proportionnelle à la concentration de DFOB adsorbée en surface (Cheah *et al.*, 2003; Duckworth et Sposito, 2005b). Nous avons observé que l'augmentation de la vitesse de dissolution n'est pas directement proportionnelle à la concentration de DFOB et une stagnation des vitesses de dissolution est observée avec un effet de seuil probable entre les conditions en présence de DFOB 250 et 500  $\mu\text{M}$ . Ces observations suggèrent un mécanisme de dissolution contrôlé par la complexation avec ligand. En effet, les molécules qui ne sont pas dans la première couche d'adsorption n'interagissent pas directement avec les cations en surface et n'influencent pas la dissolution (Kraemer, 2004; Wolff-Boenisch et Traina, 2006). De plus, Kalinowski *et al.* (2000b) ont montré par XPS sur des cristaux d'hornblende en solution avec DFOB, que la dissolution est inhibée par des contraintes stéréochimiques lors d'une présence excessive de molécules de sidérophore. Un effet de seuil a également été observé par Fischer *et al.* (2018) lors de tests de dissolution de la birnessite avec DFOB. Le chemin que les sidérophores prennent pour

|                  | DFOB               | OA                |
|------------------|--------------------|-------------------|
| Mn <sup>3+</sup> | 29,9 <sup>a</sup>  | 9,9 <sup>b</sup>  |
| Fe <sup>3+</sup> | 32,02 <sup>c</sup> | 9,33 <sup>c</sup> |
| Al <sup>3+</sup> | 24,1 <sup>d</sup>  | 7,1 <sup>e</sup>  |
| Ca <sup>2+</sup> | 2.6 <sup>d</sup>   | 3.0 <sup>d</sup>  |
| Mg <sup>2+</sup> | 2.8 <sup>d</sup>   | 3.4 <sup>f</sup>  |

TABLEAU 4.10 – Log des constantes de formation ( $K_f$ ) des complexes pour DFOB et AO avec différents éléments. Valeurs tirées de a) Duckworth et Sposito (2005b) b) Wang et Stone (2006) c) Kraemer (2004) d) Perez *et al.* (2015) e) Cama et Ganor (2006) f) citeGrases1989

le relâchement des métaux de la surface a été étudié, mais beaucoup de détails, comme par exemple l'influence de la structure du minéral, restent inconnus. La chemisorption des sidérophores avec des sites métalliques des surfaces des minéraux a été étudiée par différents auteurs (Kendall et Hochella, 2003; Holmén et Casey, 1996; Kalinowski *et al.*, 2000a; Fischer *et al.*, 2018). Fischer *et al.* (2018) ont montré que l'occupation de Mn dans les sites octaédriques de la birnessite diminue de manière continue pendant la dissolution en présence de DFOB. Selon Duckworth et Sposito (2005b), l'augmentation de la vitesse de dissolution de la manganite en présence de DFOB est due à la polarisation de la liaison Mn–O dans la structure minérale qui mènerait à une augmentation de la vitesse d'hydrolyse de cette liaison.

Il est intéressant de remarquer que la forte augmentation de la vitesse de dissolution se produit déjà à des faibles concentrations de DFOB, qui se rapprochent plus des concentrations réelles qui peuvent être rencontrées dans l'environnement (Cheah *et al.*, 2003). Cela montre le rôle important que les sidérophore peuvent avoir sur les cycles biogéochimiques. De plus, dans la nature, ces molécules peuvent être dégradées ou réutilisées de façon catalytique car une fois que le métal est assimilé par l'organisme, le sidérophore peut de nouveau jouer son rôle. Ainsi des petites concentrations sont très efficaces (Kalinowski *et al.*, 2000b).

#### *Comparaison entre AO et DFOB*

Dans ce travail, il est possible de comparer les systèmes à un ligand pour la même concentration, DFOB 1 mM et AO 1 mM.

Une augmentation de la vitesse de dissolution par rapport à la condition de contrôle d'environ 70 % est observée pour VM en présence d'AO 1 mM ( $v_{Si}$  passe de 0,37 à 0,64 g/m<sup>2</sup>/j), et d'environ 300 % en présence de DFOB 1 mM ( $v_{Si}$  passe de 0,37 à 1,43 g/m<sup>2</sup>/j). Cette différence entre les deux ligands pourrait être expliquée en comparant les constantes de formation des complexes avec différents éléments dans le Tableau 4.10.

En effet, la réaction de dissolution favorisée par complexation est strictement liée aux valeurs des constantes de complexation des molécules avec les éléments du substrat. Les ligands qui ont des constantes plus élevées sont plus efficaces dans l'augmentation des vitesses de dissolution. L'AO a des constantes de formation des complexes avec le Mn et l'Al plus faibles que la DFOB, ce qui est en accord avec les résultats qui montrent que

l'AO a un effet plus faible sur la dissolution du verre.

Les espèces ayant plusieurs groupes fonctionnels complexant sont celles ayant un effet plus marqué (Neaman *et al.*, 2005; Hausrath *et al.*, 2009; Perez *et al.*, 2015). En effet une molécule de DFOB est capable de complexer un cation trivalent, alors que deux ou trois molécules d'AO sont nécessaires pour adsorber sur deux sites aluminols voisins et former un complexe stable selon Cama et Ganor (2006).

Pour un verre basaltique, Perez *et al.* (2016) ont suggéré qu'au moins trois fois plus d'AO serait nécessaire pour favoriser le relâchement en solution de  $\text{Fe}^{3+}$  de la même manière que la DFOB. Dans cette étude, des concentrations de DFOB vingt fois plus faibles que la concentration d'AO ont été testées, et les résultats montrent que la DFOB à  $50 \mu\text{M}$  est toujours plus efficace que l'AO 1 mM. Ceci montre qu'il va falloir plus que le facteur 2 ou 3 suggéré dans la littérature pour observer un même effet entre ces ligands. Cela peut être expliqué par le fait que ces observations sont basées uniquement sur les propriétés complexantes de ces ligands et sont donc relatives uniquement au mécanisme *ligand-promoted*, tandis que, nous l'avons dit, pour l'AO plusieurs mécanismes interviennent. Par ailleurs, l'allure de la courbe des NLs du K tracées en fonction de  $\sqrt{t}$  (Figure 4.10) confirme qu'en conditions de contrôle et en présence d'AO, l'altération du verre est caractérisée par des mécanismes diffusifs, ce qui n'est pas le cas en présence de DFOB car la complexation est le mécanisme de dissolution prévalent et induit une dissolution congruente du réseau.

### Systèmes à deux ligands : effet synergique ?

Dans des systèmes naturels, la production de sidérophores est souvent associée à la production d'acides organiques à faible masse moléculaire. Kalinowski *et al.* (2000a) ont isolé un *Arthrobacet* capable de produire un sidérophore catécholate et aussi des petits acides organiques, et capable d'extraire le Fe à partir du minéral hornblende. Quelques études ont été dédiées à l'étude de l'effet conjoint de l'AO avec des sidérophores sur la dissolution de phases minérales. L'effet synergique serait attribué à un "effet navette" de l'acide oxalique qui délivrerait les ions métalliques aux sidérophores en solution et il a été étudié par différents auteurs sur différents substrats (Cheah *et al.*, 2003; Akafia *et al.*, 2014; Reichard *et al.*, 2005; Saal et Duckworth, 2010).

La vitesse de dissolution dans un système à deux ligands peut être le résultat de la somme des deux vitesses de dissolution dans les systèmes à un ligand (Akafia *et al.*, 2014). Cela n'est pas le cas dans ce travail. La faible augmentation de la vitesse dans les systèmes à deux ligands par rapport au système à un ligand DFOB, n'est pas significative compte tenu de l'erreur expérimentale.

Dans les systèmes où AO et DFOB sont présents en même temps, les valeurs de NLs sont similaires aux valeurs pour le système correspondant à un ligand pour la DFOB (Figure 4.9). Toutefois, l'effet de l'AO sur la stœchiométrie de dissolution de K et Ca est également visible. Les résultats suggèrent donc que la cinétique de dissolution est principalement contrôlée par la DFOB par le mécanisme *ligand-promoted*, l'AO contribue (faiblement) à la dissolution en favorisant la réaction d'interdiffusion. Les propriétés complexantes de l'AO semblent être masquées par le fort pouvoir complexant de la DFOB. Un effet synergique entre l'AO et la DFOB sur la dissolution d'oxydes de Mn a néanmoins été observé par Saal et Duckworth (2010). L'effet synergique AO-DFOB pourrait donc être dépendant du substrat étudié, et notamment être moins significatif dans le cas d'un verre,

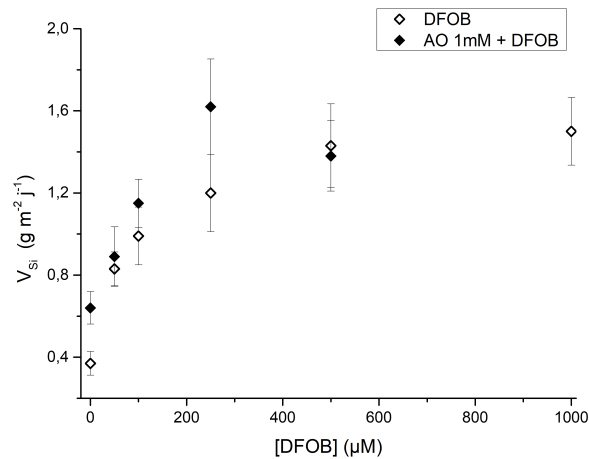


FIGURE 4.14 – Vitesses de dissolution du Si ( $V_{Si}$ ) tracées en fonction de la concentration de DFOB ( $\mu\text{M}$ ) pour le système à un ligand (DFOB) et pour le système à deux ligands (OA 1mM + DFOB). L'effet de seuil est visible par l'inflection de la courbe et la stagnation des vitesses de dissolution à partir de DFOB 250  $\mu\text{M}$  pour les deux systèmes. Les barres d'erreur ont été calculées en prenant en considération l'incertitude de la mesure de la surface spécifique (8 %), l'erreur de la mesure ICP (10 %) et l'écart-type ( $\pm\sigma$ ) pour les deux répliquats correspondant à chaque condition.

quand comparé aux études effectuées sur les minéraux où l'effet synergique a souvent un impact considérable.

Une exception pourrait être représentée par la conditions AO 1mM + DFOB 250  $\mu\text{M}$  qui présente une vitesse de dissolution significativement plus élevée que la conditions avec DFOB 500  $\mu\text{M}$ . Cependant, à ces conditions correspondent aussi les valeurs les plus élevées d'erreurs expérimentales et il n'est donc pas possible d'interpréter cette donnée comme un signe de la présence d'un effet synergique des deux ligands.

L'absence d'un effet synergique pourrait aussi être attribuée à un effet de saturation lié à la présence d'une quantité élevée de molécules en solution. Un effet de seuil marqué peut être observé en Figure 4.14 à partir de la concentration de DFOB 250  $\mu\text{M}$  pour les deux types de système (à un ou à deux ligands). A titre d'exemple, une diminution de la vitesse de dissolution pour des concentrations élevées d'acides organiques a déjà été reportée par Neaman *et al.* (2005) pour des verres basaltiques et par Cheah *et al.* (2003) pour la goethite.

### Effet de la composition du verre : comparaison avec le verre VNM

Les deux verres ont des compositions très similaires (Tableau 2.3), avec comme différence principale la présence ou non de Mn. Dans les conditions de contrôle, les deux verres ont des vitesses de dissolution assez différentes, la valeur la plus faible est obtenue pour le verre VM (0,37 g/m<sup>2</sup>/j) et la valeur la plus haute pour le verre VNM (0,88 g/m<sup>2</sup>/j). Une autre différence significative entre les deux contrôles est le pH final, qui est plus élevé pour VNM (8,9) que pour VM (8,4). Cette différence de pH est aussi cohérente avec une dissolution plus rapide du verre VNM, car, nous l'avons vu, l'augmentation du pH est

|      | Sessegolo (exp) | Sessegolo (calc) | VM (exp)    | VNM (exp)   |
|------|-----------------|------------------|-------------|-------------|
| 20°C | 0,11            | 0,18             | -           | -           |
| 25°C | -               | 0,23             | 0,37 ± 0.06 | 0,88 ± 0,17 |
| 35°C | 0,41            | 0,27             | -           | -           |

TABLEAU 4.11 – Vitesses de dissolution du Si ( $v_{Si}$ ) en  $g/m^2/j$  obtenues pour VM et VNM en conditions de contrôle (25°C et pH proche de la neutralité), avec les  $v_{Si}$  expérimentales (exp) et calculées (calc) tirées du travail de Sessegolo *et al.* (2020) et obtenues à pH proche de la neutralité.

corrélée au mécanisme d'interdiffusion.

Cailleteau *et al.* (2008b) ont montré que pour trois séries de verres (borosilicatés, aluminosilicatés et verres au plomb), la vitesse de dissolution augmente avec la diminution de la silice dans la composition du verre. La petite différence en quantité de silice entre les deux verres (51,5 pour VM et 52,4 % pour VNM en % poids d'oxyde) ne peut pas expliquer la différence de vitesse de dissolution, car sur la base de la présence de  $SiO_2$ , la vitesse de dissolution devrait au contraire être plus élevée pour VM, qui est moins riche en Si. Il faut aussi prendre en compte la quantité de  $K_2O$  présent dans les verres (18,3 pour VM et 18,8 pour VNM en % poids d'oxyde) car la présence de cet élément en quantités élevées est aussi corrélée à des compositions de verres moins durables. Les deux verres présentent une plus faible différence en quantité de K qu'en quantité de Si. De plus, la quantité de  $K_2O$  est directement corrélée à la quantité de  $SiO_2$  : le verre avec le plus de Si et aussi celui avec le plus de K (VNM), donc les deux effets peuvent être considérés de quelque façon "balancés". La plus grande différence en terme de composition de verre reste donc la présence, ou non, de  $MnO$ , et c'est à cela que la différence de vitesses de dissolution entre VM et VNM est attribuée. Les résultats suggèrent que l'introduction d'environ 2% en poids d'oxyde de  $MnO$  change le comportement du verre pendant les premiers stades de l'altération.

Si les vitesses de dissolution obtenues pour VM et VNM sont comparées avec leur verre "frère" (avec comme seule différence la présence du Fe) étudié lors du travail de Sessegolo (2018) en conditions similaires (Tableau 4.11), il est possible de remarquer qu'elles sont du même ordre de grandeur (si comparées par exemple aux vitesses de dissolution plus faibles des verres basaltiques ou des verres nucléaires) mais présentent néanmoins quelques différences.

La vitesse calculée pour le verre de Sessegolo *et al.* (2020) à 25°C est de 0,23  $g/m^2/j$ , ce verre serait donc plus durable que VM (0,37  $g/m^2/j$ ). Cette différence peut être attribuée à la présence du Fe dans la composition de Sessegolo *et al.* (2020), qui pourrait avoir rôle stabilisant de la structure du verre en tant que formateur de réseau.

En ce qui concerne l'effet des exsudats sur ces deux verres, les pourcentages d'augmentation de la vitesse de dissolution pour VM et VNM en présence d'AO 1mM et en présence de DFOB 500  $\mu M$  sont reportées en Figure 4.15.

L'augmentation de la vitesse de dissolution pour les deux verres en présence des deux ligands peut être attribuée (en partie) à la complexation de  $Al^{3+}$ , ce qui a déjà été observé par Perez *et al.* (2015) et Perez *et al.* (2016) pour des verres basaltiques. En



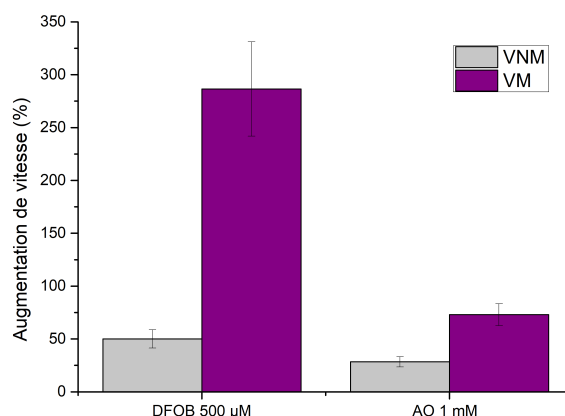


FIGURE 4.15 – Pourcentages d’augmentation de la vitesse de dissolution (par rapport à la condition de contrôle en tampon carbonate) pour VM (violet) et VNM (gris) en présence d’AO 1 mM et de DFOB 500  $\mu\text{M}$ . Les erreurs reportées sont calculées en prenant en considération l’incertitude sur la mesure de la surface spécifique (8 %), l’erreur sur la mesure ICP-OES (10 %), et l’erreur expérimentale ( $\pm\sigma$ ) pour les deux expérience répliqués.

effet l’hydrolyse des éléments formateurs de réseau (Si et Al) est l’étape limitante de la dissolution.

Toutefois, il est évident en Figure 4.15 que le verre VM est plus fortement affecté par la présence de ces molécules en solution, avec un pourcentage d’augmentation de la vitesse en présence de DFOB d’environ 300%. Cela pourrait être expliqué par la complexation du Mn par les ligands, ce qui favoriserait encore plus la déstabilisation du réseau.

En présence de DFOB, la vitesse de dissolution de VM est augmentée d’environ 300%, tandis que la vitesse de dissolution de VNM est augmenté d’environ 50%. Pour le verre VM, la complexation de l’Al pourrait donc représenter 1/6 de l’effet observé sur la vitesse de dissolution par la DFOB. Le restant pourrait être attribuable à la complexation du Mn.

Le même type de raisonnement peut être effectué pour l’AO, pour lequel l’augmentation de la vitesse de dissolution est de 70% pour le VM et de 30% pour le VNM. Dans ce cas, la complexation de Al pourrait donc représenter environ la moitié de l’effet de dissolution *ligand-promoted* de l’AO. Cela montre en effet que la complexation du Mn par l’AO est présente et contribue, avec le mécanisme de favorisation de l’interdiffusion et la complexation de l’Al, à l’augmentation de la vitesse de dissolution.

En conclusion, ces résultats mettent en évidence un rôle clé du Mn (même s’il est présent en faible pourcentage) dans les mécanismes de dissolution du verre, et notamment dans l’interaction avec des molécules complexantes comme les exsudats microbiens.

### 4.3 Tests complémentaires : dissolution en présence d'AO et de DFOB en tampon HEPES

Lors des tests de dissolution avec le tampon carbonate, des petites différences dans l'évolution du pH ont été observées d'une condition à une autre. Ces variations ont été considérées comme négligeables parce que i) toutes les expériences présentent une évolution du pH très similaire et ii) des études précédentes (Peña *et al.*, 2007; Duckworth et Sposito, 2005b) ont montré qu'à pH proche de la neutralité, l'effet de la DFOB est indépendant du pH. Toutefois, ce raisonnement a été questionné au moment de l'interprétation des résultats :

Peut-on vraiment comparer des résultats de tests de dissolution qui diffèrent par des légères variations de pH connaissant l'importance de l'effet du pH sur la dissolution du verre ?

Cette question a fait l'objet du stage de C. Ranchoux, qui s'est attachée à répéter certaines des expériences de dissolution de VM avec DFOB, mais en substituant le tampon carbonate par un tampon HEPES 1 mM. Ce tampon, nous l'avons vu dans la première partie de ce Chapitre (Tableau 4.1), a la capacité de limiter énormément l'évolution du pH et il est souvent utilisé dans la littérature scientifique pour des tests de dissolution en biogéochimie environnementale.

Dans le Tableau 4.12 sont reportées les valeurs de pH mesurées lors des tests de dissolution du verre VM pour la condition de contrôle (uniquement le tampon HEPES 1 mM), AO 1mM, DFOB 500  $\mu$ M et AO 1mM + DFOB 500  $\mu$ M. Dans ces expériences, toutes les conditions testées ont la même évolution de pH, avec un pH final de  $7,8 \pm 0,1$ .

| jours | Contrôle | AO 1 mM | DFOB 500 $\mu$ M | AO 1mM + DFOB 500 $\mu$ M |
|-------|----------|---------|------------------|---------------------------|
| 0     | 6,75     | 6,84    | 6,74             | 6,74                      |
| 0,01  | 6,98     | 6,99    | 6,85             | 6,75                      |
| 0,125 | 7,01     | 6,93    | 6,92             | 6,89                      |
| 0,25  | 7,42     | 7,29    | 7,42             | 7,28                      |
| 1     | 7,49     | 7,39    | 7,43             | 7,44                      |
| 2     | 7,42     | 7,43    | 7,49             | 7,52                      |
| 3     | 7,85     | 7,79    | 7,88             | 7,77                      |

TABLEAU 4.12 – Valeurs de pH en fonction du temps d'expérience de dissolution pour les expériences de dissolution du verre VM en solutions tamponnées avec HEPES 1 mM, pour la condition de contrôle HEPES, AO 1mM, DFOB 500  $\mu$ M et AO 1mM + DFOB 500  $\mu$ M.

En ce qui concerne les NLs, nous montrons ici uniquement le graphe en Figure 4.16 qui trace les NLs du Si pour les quatre conditions testées, afin de les comparer. Dans les systèmes à un ligand, la DFOB est plus efficace que l'AO dans l'accélération de la dissolution. Dans le système à deux ligands, on observe, comme pour les tests en solution de tampon carbonate, que la vitesse de dissolution est contrôlée par la DFOB. Ces observations sont donc en accord avec les résultats obtenus en présence d'un tampon carbonate.

Dans le Tableau 4.13 sont reportés les pourcentages d'augmentation des vitesses de dissolution pour chaque condition testée, calculés par rapport à la valeur de vitesse de la condition de contrôle HEPES. L'effet de l'AO est le même pour les tests de dissolution

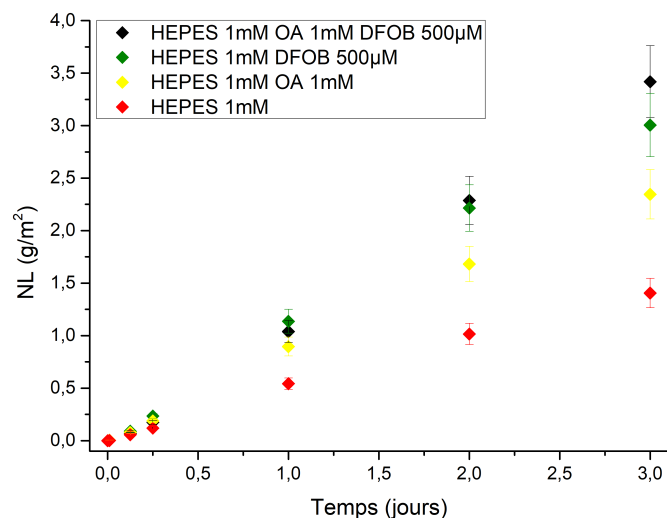


FIGURE 4.16 – NLs du Si en fonction du temps, calculées à partir des concentrations mesurées pour les expériences de dissolution du verre VM en solutions tamponnées avec HEPES 1 mM, pour la condition de contrôle, AO 1mM, DFOB 500  $\mu$ M et AO 1mM + DFOB 500  $\mu$ M

en présence d'HEPES ou de tampon carbonate, avec une augmentation de la vitesse de dissolution d'environ 70%. En ce qui concerne la DFOB 500  $\mu$ M, l'effet d'augmentation de la vitesse de dissolution est moins important dans les tests en présence d'HEPES (augmentation d'environ 100% contre environ 300% en présence du tampon carbonate). Nous avons vu en Figure 4.2 l'effet que l'HEPES a sur la stœchiométrie de dissolution du Mn. Cet effet moins important sur la dissolution de la DFOB en présence d'HEPES pourrait donc être expliqué par une compétition dans la complexation du Mn par ces deux molécules, réaction de complexation qui pourrait impliquer également d'autres éléments du verre.

Puisque la dissolution du verre est déjà favorisée par l'HEPES, l'effet de la DFOB, bien que présent, est moins important qu'en solution de tampon carbonate. Le tampon HEPES permet donc de s'affranchir des problèmes de variation de pH mais il peut introduire un biais sur la compréhension de la modification de la stœchiométrie de dissolution en présence de sidérophore.

Pour conclure sur le choix des bonnes molécules tampon en tests de dissolution, il serait mieux, quand il est possible de laisser évoluer le pH, d'utiliser un tampon qui influence le moins possible la stœchiométrie de dissolution du verre.

|                           | HEPES $v_{Si}$  | Carbonate $v_{Si}$ | % augmentation H | % augmentation C |
|---------------------------|-----------------|--------------------|------------------|------------------|
| Contrôle                  | $0,48 \pm 0,06$ | $0,37 \pm 0,06$    | -                | -                |
| AO 1 mM                   | $0,80 \pm 0,10$ | $0,64 \pm 0,09$    | 67               | 73               |
| DFOB 500 $\mu$ M          | $1,04 \pm 0,13$ | $1,43 \pm 0,23$    | 116              | 286              |
| AO 1mM + DFOB 500 $\mu$ M | $1,16 \pm 0,15$ | $1,38 \pm 0,20$    | 142              | 273              |

TABLEAU 4.13 – Vitesses initiales de dissolution  $v_{Si}$  ( $\text{g m}^{-2} \text{j}^{-1}$ ) calculées lors des tests de dissolution en solution de tampon HEPES 1 mM et comparaison avec les mêmes conditions en solution de tampon carbonate 1 mM. Les pourcentages d'augmentation de la vitesse pour HEPES (H) et pour le tampon carbonate (C) pour chaque condition de dissolution avec ligands par rapport à son "contrôle" sont également reportées. Les barres d'erreurs ont été calculées en prenant en compte l'incertitude sur la mesure de la surface réactive, l'erreur sur la mesure des concentrations par ICP-OES, et l'erreur expérimentale ( $\pm\sigma$ ) pour les conditions qui ont été répétées deux fois.

## 4.4 Conclusions

Les trois parties de ce chapitre ont montré que la composition de la solution altérant ont une influence sur la dissolution du verre. La présence de tampons avec des propriétés complexantes a certes un impact sur l'évolution du pH, mais également sur la vitesse et la stœchiométrie de dissolution. Par conséquent, le choix du tampon pour des tests de dissolution doit être fait avec attention car il peut interférer avec les mécanismes que l'on souhaite observer.

En ce qui concerne le corps du chapitre, les résultats ont montré que l'acide oxalique cause une augmentation de la vitesse de dissolution pour les deux verres par la favorisation de l'interdiffusion et la complexation d'Al et de Mn. Les effets de la DFOB sur la dissolution montrent une dissolution majoritairement contrôlée par un mécanisme *ligand-promoted*. Les fortes propriétés complexantes de ce sidérophore avec l'Al et le Mn causent une destabilisation du réseau qui engendre une dissolution congruente du verre. La DFOB a un effet plus important que l'AO sur la dissolution du verre, et dans un système à deux ligands c'est la DFOB qui contrôle les cinétiques de dissolution, mais l'effet de l'AO sur la stœchiométrie de dissolution de K et Ca est également visible.

Les résultats ont aussi mis en avant un comportement différent de dissolution des deux verres VM et VNM, attribué à la présence de Mn. Cet élément rend le verre "plus stable" en conditions de contrôle, mais le rend aussi plus sensible aux mécanismes de complexation en présence de molécules capables de complexer le Mn, causant ainsi une destabilisation du verre.



# Chapitre 5

## Cinétiques d'altération du verre en présence d'une bactérie modèle

Dans la continuité des expériences présentées dans le Chapitre 4, après avoir testé l'effet de la présence d'exsudats microbiens, l'objectif de cette partie est d'étudier l'effet direct qu'une bactérie modèle *P. putida* peut avoir sur la dissolution du verre et l'effet de la présence du verre sur la croissance bactérienne.

La souche modèle choisie pour ces tests de dissolution biotique directe appartient au genre *Pseudomonas*, un genre très répandu dans l'environnement. Le choix de cette souche n'a pas été fait en relation avec les quelques référencements de souches bactériennes présentes en surface de verre de vitraux donnés dans la littérature, mais plutôt en se basant sur la connaissance étendue du comportement de *P. putida* via des études détaillées (Parker *et al.*, 2004, 2007) et sa disponibilité et sa facilité à être cultivée. D'un point de vue mécanistique, le but de ce travail était de cibler l'étude d'une bactérie pouvant oxyder le Mn et d'évaluer son impact sur le destin du Mn mobilisé à partir d'une composition de verre de vitrail. L'objectif était de pouvoir interpréter au mieux les mécanismes observés (production de sidérophore, oxydation du Mn...) et évaluer les différents paramètres d'influence.

Des expériences de dissolution des verres VM et VNM ont donc été mises en place à 25°C dans un milieu minimum et en contact avec la souche *P. putida*. Un schéma représentatif des conditions testées est présenté en Figure 5.1. La croissance bactérienne en fonction de la quantité de verre, les changements chromatiques des solutions, la production de sidérophore et le comportement des éléments en solution ont été suivis au cours du temps.

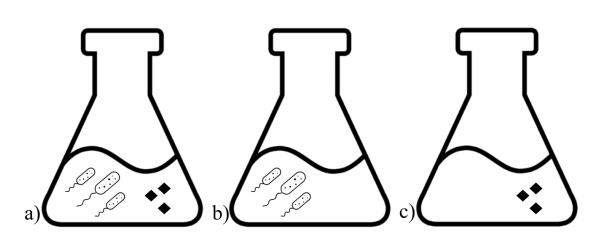


FIGURE 5.1 – Schéma représentatif des expériences de dissolution biotique directe. a) Le verre (VM ou VNM) sous forme de poudre (en différentes quantités) est introduit dans un milieu de culture avec la souche modèle *P. putida*, b) la souche modèle est introduite dans le milieu de culture sans verre (contrôle *P. putida*), c) le verre est introduit dans le milieu de culture sans bactéries (contrôle verre).

## 5.1 Variations chromatiques

Au cours du temps plusieurs variations chromatiques ont été observées dans les erlenmeyers dédiés aux expériences d'altération.

Ces variations chromatiques ont été photographiées au cours du temps et peuvent être observées sur la Figure 5.2 pour VNM et sur les Figures 5.3 et 5.4 pour les deux réplicats de VM.

En ce qui concerne les expériences d'altération de VNM, en Figure 5.2 un seul réplicat de l'expérience VNM 100 mg est reporté (sur la gauche de la figure), avec le contrôle verre VNM et le contrôle *P. putida*. La solution avec verre + bactéries est caractérisée par une augmentation de la turbidité avec le verre. Cette turbidité est associée à une coloration verte à partir de 2 jours d'expérience. Celle-ci semble s'intensifier de façon constante jusqu'à la fin de l'expérience. La solution sans bactérie reste dans le même état initial. La solution avec bactéries et garde également son état initial de turbidité. Les deux séries de réplicats pour le verre VNM attestent des mêmes résultats.

La Figure 5.3 montre l'évolution de la coloration des solutions lors de la première expérience en présence de verre VM. Après 2 jours une coloration verte pour la solution avec 100 mg de VM est observée, suivie par une coloration marron le jour suivant. La solution avec 50 mg de VM devient marron après 6 jours, la coloration verte a probablement eu lieu entre 3 et 6 jours et elle n'a pas été observée à cause de l'impossibilité d'accéder au laboratoire. Après 7 jours, une légère coloration verte est observée pour l'expérience avec 25 mg de VM, suivie par la coloration marron le jour suivant. Le même phénomène a donc été observé, avec des temps différents dépendant de la quantité de verre originellement introduite, pour les trois conditions mises en place. En ce qui concerne le contrôle bactéries et le contrôle verre VM qui sont également reportés en Figure 5.3, ils ont gardé leur état initial.

La Figure 5.4 montre l'évolution de la coloration des solutions lors de la deuxième expérience en présence de verre VM. La coloration verte pour la condition avec 100 mg de VM est encore observée après 2 jours mais avec une intensité plus basse, elle devient plus intense après 3 jours, suivie par la coloration marron après 6 jours, moins intense que pour le premier réplicat. Pour l'expérience avec 50 mg de verre, une faible coloration marron est observée après 6 jours. Pour l'expérience avec 25 mg de verre il est possible d'apercevoir

une faible coloration verte après 8 jours. L'expérience a ensuite dû être arrêtée et il n'a pas été possible d'observer dans ce cas la coloration marron pour cette dernière condition.

Pour les deux répliqués d'expérience d'altération de VM, les mêmes phénomènes sont donc observés mais avec un délai d'environ un jour malgré l'effort effectué de reproduire l'expérience dans les mêmes conditions.

Pour les expériences en présence de verre (indifféremment VM et VNM), la coloration verte observée est attribuée à la production du sidérophore pyoverdine par *P. putida* comme reporté dans la littérature (Parker *et al.*, 2004, 2007; Perez *et al.*, 2016). Plus de détails sur la production de PVD seront donnés dans les sections suivantes.

En ce qui concerne la coloration brune, la Figure 5.5a, b, c, d, reporte des images en MO de la poudre de verre VM récupérée en fin d'expérience. La poudre de verre VM de l'expérience de contrôle verre reste teintée d'une coloration rose, la poudre de verre VM altérée en présence de *P. putida* apparaît partiellement brunie.

En MEB (Figure 5.5 e, f, g, h) la poudre de verre altérée en présence ou non de bactéries apparaît fracturée et écaillée à cause de la formation d'une épaisse couche altérée. Le verre altéré en présence de *P. putida* est partiellement recouvert par un dépôt de biofilm. En Figure 5.6 un détail au MEB avec cartographie EDX montre un enrichissement en Mn associé à ce biofilm. *P. putida* étant une souche bactérienne connue pour sa capacité à produire des oxydes de Mn (Villalobos *et al.*, 2006; Tebo *et al.*, 2004; Parker *et al.*, 2007), cette coloration brune peut être attribuée à la production d'un biofilm avec oxydes de Mn.

Sur les poudres de verre VNM altéré en présence de bactéries, le biofilm n'a pas été observé.

En conclusion, plusieurs variations chromatiques des solutions ont été observées et attribuées à différents phénomènes. La coloration verte est cohérente avec la production de PVD, l'évolution vers la couleur marron en présence de verre VM est cohérente avec la production d'oxydes de Mn. Les variations chromatiques sont plus marquées en fonction de la quantité de verre introduit en solution.





FIGURE 5.2 – Évolution de l'aspect des milieux de culture au cours du temps pendant l'expérience d'altération de VNM. En photo de gauche à droite : condition avec 100 mg VNM + *P. putida*, contrôle verre VNM 100 mg, contrôle *P. putida*.

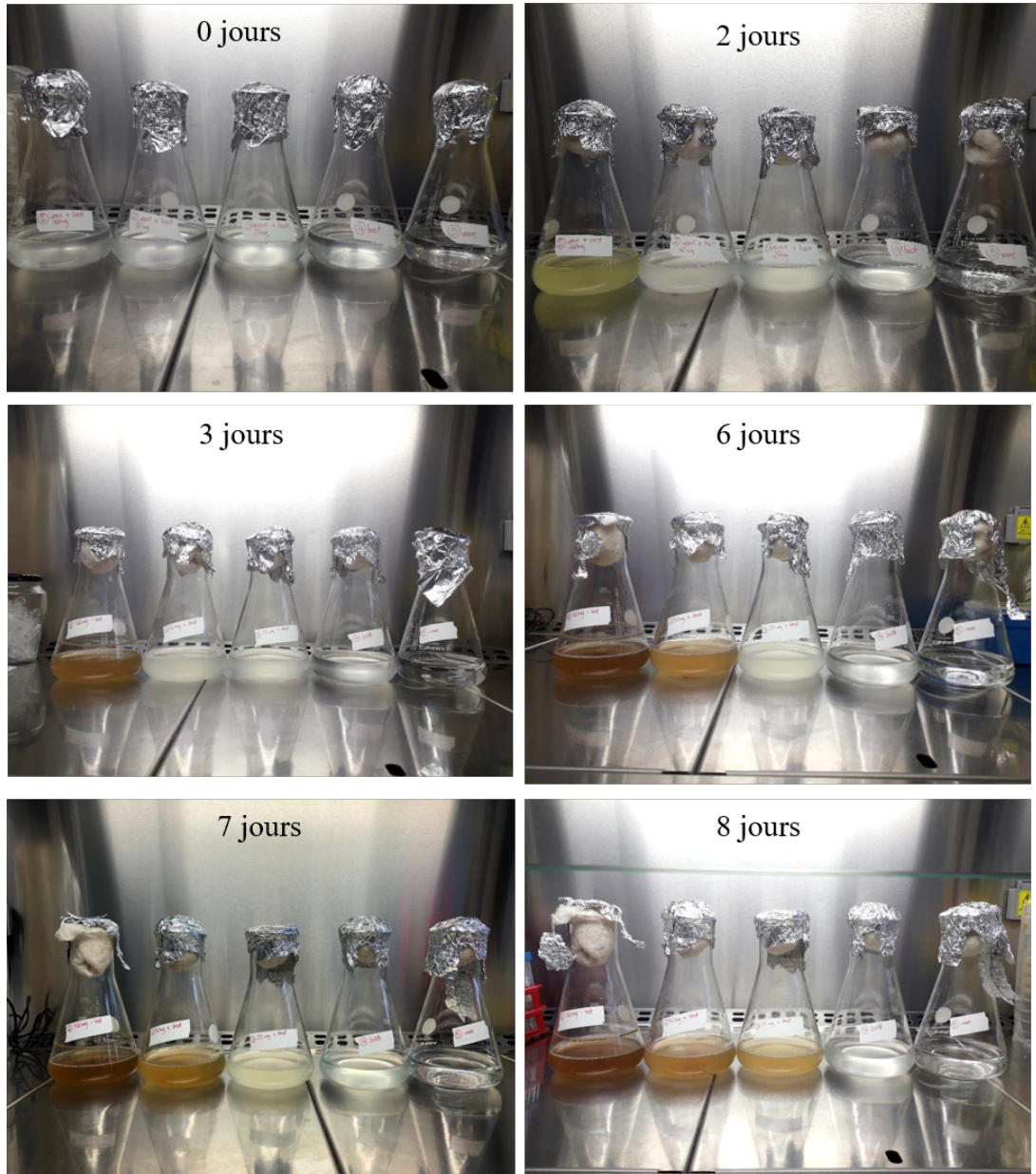


FIGURE 5.3 – Évolution de l'aspect des milieux de culture au cours du temps pendant l'expérience d'altération (i) de VM. En photo de gauche à droite : condition avec 100 mg VM + *P.putida*, 50 mg VM + *P. putida*, 25 mg VM + *P. putida*, contrôle *P. putida*, contrôle verre VM 100 mg.

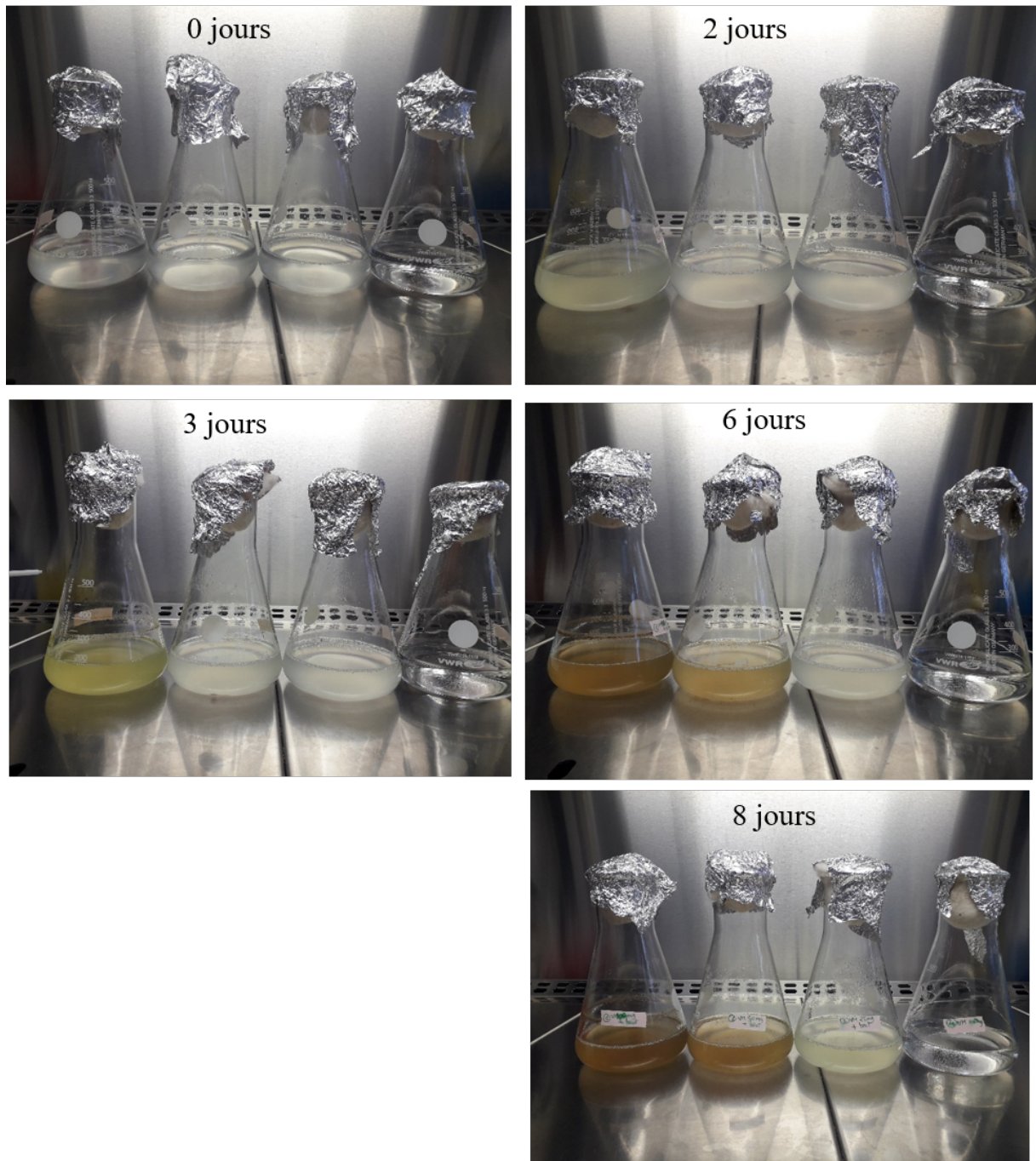


FIGURE 5.4 – Évolution de l'aspect des milieux de culture au cours du temps pendant l'expérience d'altération (ii) de VM. En photo de gauche à droite : condition avec 100 mg VM + *P. putida*, 50 mg VM + *P. putida*, 25 mg VM + *P. putida*, contrôle verre VM 100 mg.

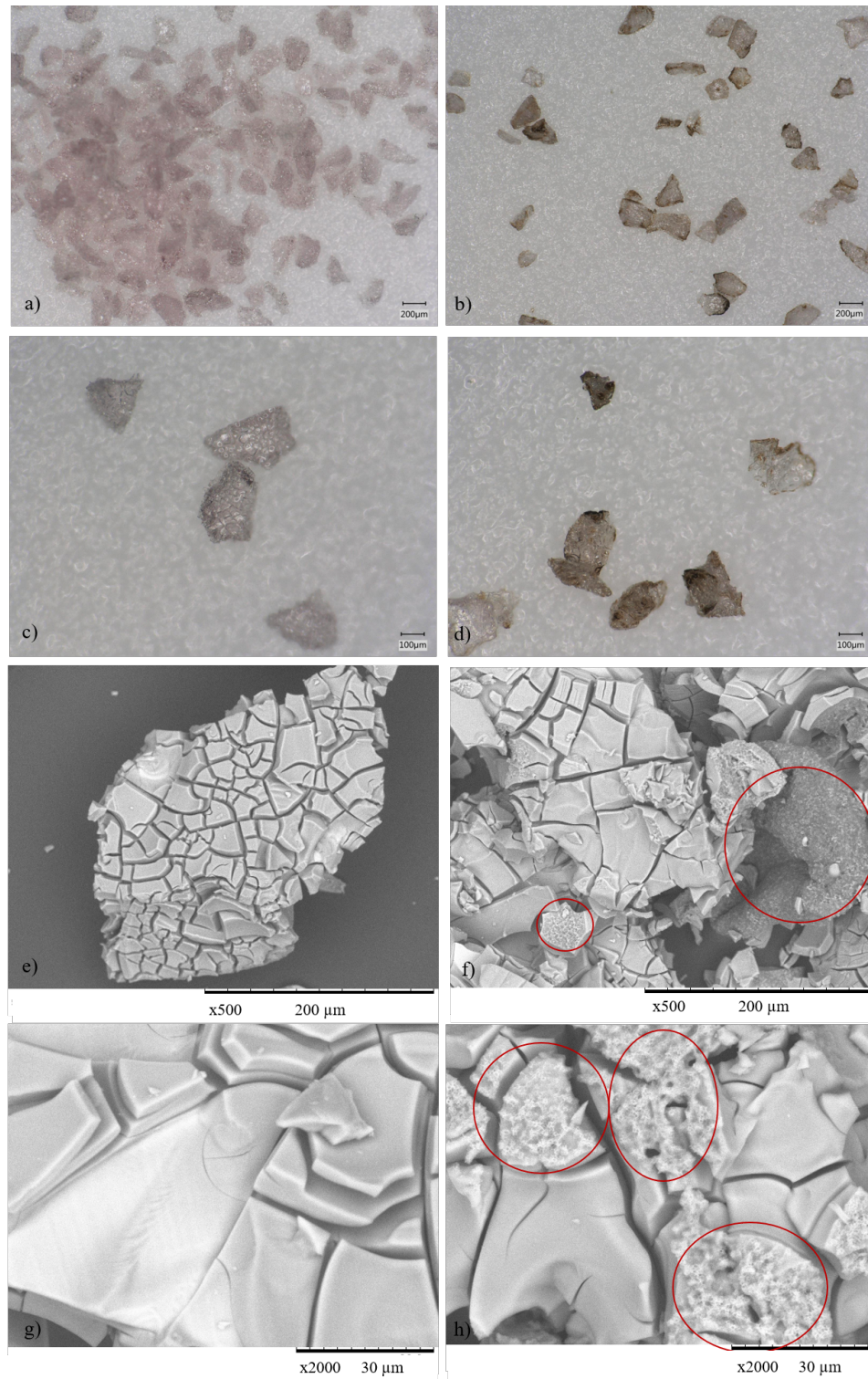


FIGURE 5.5 – Images des poudres de verre VM altéré pendant 8 jours en conditions de *contrôle verre* sans bactéries a) MO x100, c) MO x200, e) MEB x500, g) MEB x2000 . Poudres de verre VM altéré en présence de *P. putida* b) MO x100, d) MO x200, f) MEB x500, h) MEB x2000. Les cercles en rouge mettent en évidence la localisation du biofilm.

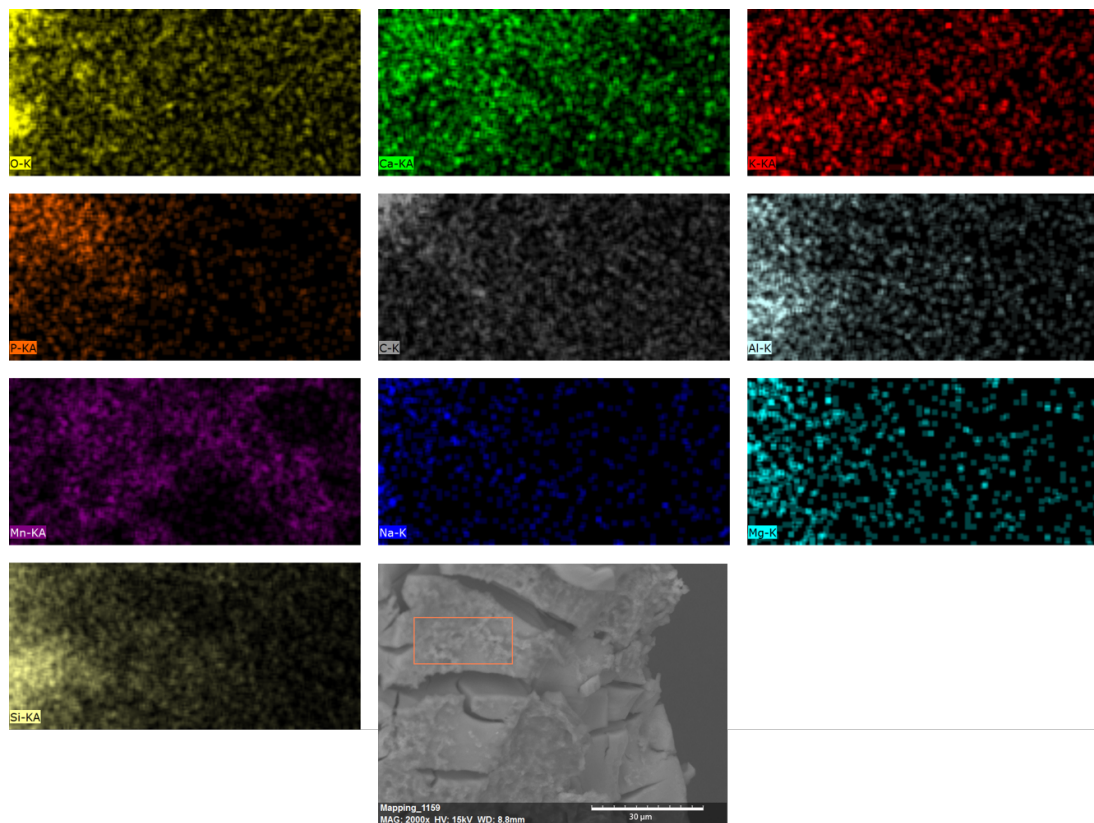


FIGURE 5.6 – Cartographie MEB-EDX de la poudre de verre VM altéré en présence de *P. putida* pendant 8 jours. Le biofilm présente un enrichissement en Mn.

## 5.2 Croissance bactérienne

Les courbes de croissance de *P. putida* sont obtenues par des mesures de Densité Optique (DO) à 600 nm et par des mesures de comptage de colonies sur boîtes de Petri. Elles sont tracées en fonction du temps d'expérience en Figure 5.7 et 5.8. Les mesures par comptage sur boîtes de Petri sont caractérisées par des barres d'erreurs très élevées (résultantes de l'incertitude de la mesure introduite par l'étape de dilution séquentielle, cf. Chapitre 2) qui rendent difficile la distinction des tendances mais dont l'allure permet de valider les résultats des mesures de DO. Par ailleurs, afin d'attester de la fiabilité des courbes de DO obtenues, il est intéressant d'évaluer la corrélation entre les valeurs de DO mesurées et le nombre de bactéries comptée sur boîtes de Petri. Le coefficient de corrélation, obtenu en effectuant une régression linéaire des points représentés (graphes non reportés), est indiqué dans les légendes des figures correspondantes .

La Figure 5.7 permet de comparer la croissance bactérienne pour les différentes conditions d'altération de VM (100, 50 et 25 mg de verre introduits pour le même volume de solution) et pour l'expérience de contrôle *P. putida* dans le milieu de culture en absence de verre. Pour l'expérience de contrôle *P. putida* la DO n'augmente pas avec le temps. Pour les conditions en présence de verre, une croissance est observée au fil du temps d'expérience. Toutes les courbes présentent une tendance similaire de croissance exponentielle dans les premiers temps jusqu'à 3 jours d'expérience. Les bactéries étant inoculées à partir d'une culture fraîche, la croissance exponentielle est atteinte tout de suite sans passer par une étape de latence, ou, si elle est présente, elle se déroule dans les premiers instants entre le temps 0 et le premier prélèvement et n'est pas détectée. Après 3 jours, un plateau est observé et la concentration de bactéries en solution n'augmente plus de manière significative.

La croissance bactérienne est plus prononcée pour l'expérience avec le rapport S/V le plus élevé (100 mg de VM pour 200 ml de solution). Les expériences avec 50 mg et 25 mg ont la même allure jusqu'à 1 jour, ensuite une augmentation de DO plus marquée est observée pour l'expérience avec 50 mg par rapport à l'expérience avec 25 mg de verre.

La Figure 5.8 représente la croissance bactérienne en présence de 100 mg de VM/VNM, les résultats pour le contrôle *P. putida* sont également reportés. La croissance bactérienne en présence de VNM atteint les mêmes valeurs de DO qu'en présence de VM mais semble légèrement ralentie entre 1 et 2 jours d'expérience.

Cette différence n'est toutefois pas confirmée par les mesures de comptage bactérien qui montrent des valeurs quasi-identiques pour les deux verres et impossibles à différencier à cause de l'erreur expérimentale. Les deux techniques permettent malgré tout de confirmer l'allure de croissance bactérienne au fil du temps et la stagnation de l'expérience de contrôle *P. putida* sans verre.

La croissance bactérienne augmente donc en présence de verre et en fonction de la quantité introduite de ce dernier, tandis qu'en absence de verre les bactéries ne se développent pas.

Une importante quantité de biofilm est produite pendant ces expériences en présence de VM, mais elle est difficile à quantifier car il n'est pas possible de récupérer la totalité du biofilm pour faire un bilan de masse, le biofilm se trouvant en effet en fin d'expérience, collé sur la poudre de verre (Figure 5.5) et sur les parois des réacteurs utilisés.

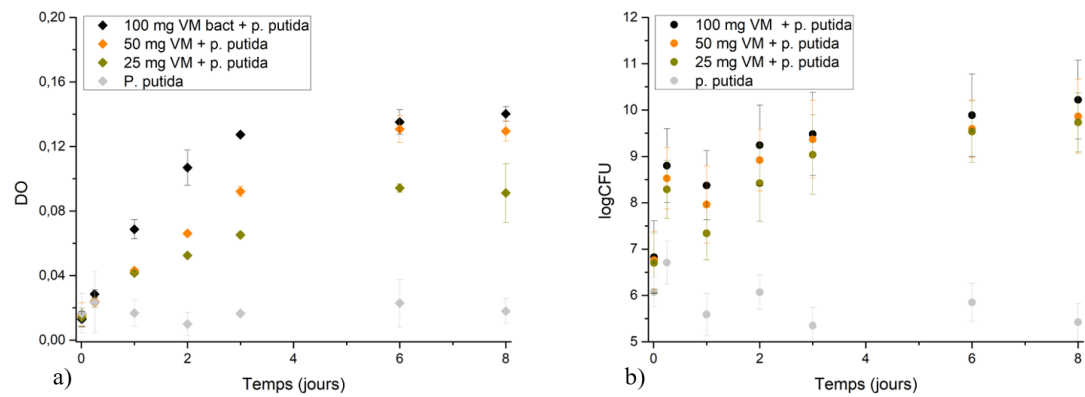


FIGURE 5.7 – Courbes de croissance pour le contrôle *P. putida* dans le milieu seul, et en présence de 100, 50 ou 25 mg de verre VM. La croissance est déterminée par a) densité optique à 600 nm et b) dénombrement bactérien sur boîtes de Petri. Les barres d'erreur pour les mesures de DO représentent l'erreur expérimentale  $\pm\sigma$  entre deux expériences répliquées, l'erreur analytique sur la mesure à l'UV-VIS est négligeable. Les barres d'erreur pour les valeurs d'unité de colonies (CFU) regroupe l'erreur expérimentale  $\pm\sigma$  et l'erreur de la mesure de dénombrement donné par la dilution séquentielle. Les coefficients de corrélation entre les valeurs de DO et de CFU sont de 0,8 pour VM 100 mg, 0,77 pour VM 50 mg, et 0,8 pour VM 25 mg.

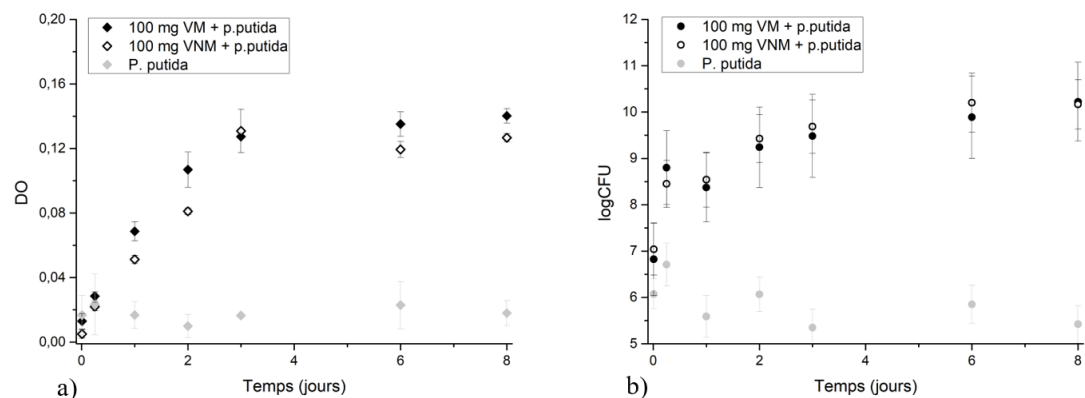


FIGURE 5.8 – Courbes de croissance pour le contrôle *P. putida* dans le milieu seul, et en présence de 100 mg de verre VM ou 100 mg de verre VNM. La croissance est déterminée par a) densité optique à 600 nm et b) dénombrement bactérien sur boîtes de Petri. Les barres d'erreur pour les mesures de DO représentent l'erreur expérimentale  $\pm\sigma$  entre deux expériences répliquées, l'erreur analytique sur la mesure à l'UV-VIS est négligeable. Les barres d'erreur pour les valeurs d'unité de colonies (CFU) regroupe l'erreur expérimentale  $\pm\sigma$  et l'erreur de la mesure de dénombrement donné par la dilution séquentielle. Les coefficients de corrélation entre les valeurs de DO et de CFU sont de 0,8 pour VM et de 0,86 pour VNM.

### 5.3 Production de pyoverdine

La Figure 5.9 retrace l'évolution de la production de PVD par la souche bactérienne en suivant l'absorbance des solutions à 402 nm pour les différentes conditions d'altération de VM (100, 50 et 25 mg).

Pour l'expérience avec 100 mg de verre VM, la production de PVD commence lors du premier jour d'expérience et monte rapidement pour arriver à un pic après 3 jours, suivi par une diminution d'absorbance. Cette courbe d'absorbance présente des larges barres d'erreur car les deux expériences répliques ont certes montré le même comportement, mais avec des petites variations temporelles. En effet, le pic de production de PVD pour l'expérience (i) de VM se trouve entre 2 et 3 jours, alors qu'il se trouve entre 3 et 4 jours pour l'expérience (ii).

La production de PVD commence entre 1 et 2 jours pour l'expérience avec 50 mg de verre et continue de croître doucement jusqu'à la fin de l'expérience. Pour l'expérience avec 25 mg de verre, la production de PVD commence entre 6 et 8 jours d'expérience. Une corrélation est donc observée entre la quantité de verre, la croissance bactérienne et la production de sidérophore. Plus on a de verre dans le même volume de solution, plus la croissance bactérienne est forte et plus la production de pryoverdine augmente.

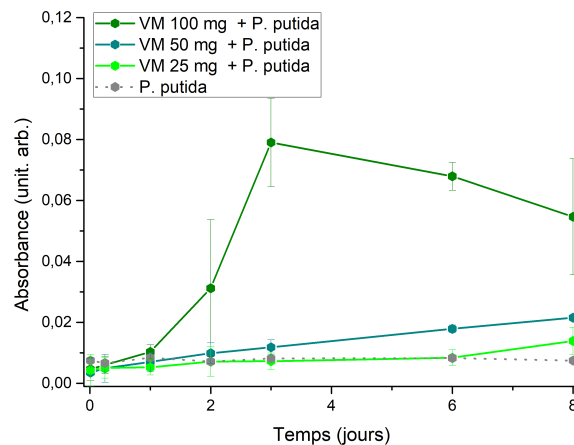


FIGURE 5.9 – Courbes d'absorption de la PVD à 402 nm en fonction du temps d'expérience pour VM 100, 50, 25 mg + *P. putida*. Les barres d'erreur représentent l'erreur expérimentale  $\pm\sigma$  pour les deux séries de répliques.

La Figure 5.10 montre l'évolution de la production de PVD pour VM et VNM (100 mg). La courbe d'absorbance de VM a été décrite dans le paragraphe précédent. En ce qui concerne VNM, la production de PVD est légèrement ralentie en début d'expérience et on n'observe pas une chute d'absorbance marquée en fin d'expérience.

Afin de mieux comprendre l'évolution de la PVD au cours du temps en présence du verre VM, une expérience supplémentaire a été réalisée pour la conditions VM 100 mg + *P. putida*. Des prélèvements supplémentaires ont été effectués à 2,3 3,3 et 13 jours et des mesures du spectre complet d'absorbance de la PVD ont été effectuées entre 300 et 500 nm.



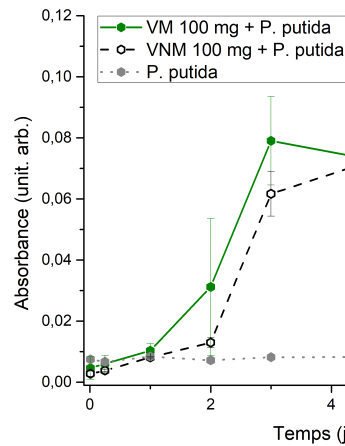


FIGURE 5.10 – Courbes d’absorption de la PVD à 402 nm en fonction du temps d’expérience pour VM et VNM 100 mg + *P. putida*. Les barres d’erreur représentent l’erreur expérimentale  $\pm\sigma$  pour les deux séries de réplicats.

Les résultats en Figure 5.11 montrent que le spectre d’absorption de la PVD (300-500 nm) change au cours de l’expérience. En début d’expérience il présente deux épaulements autour de 380 (A) et 410 nm (B). Au fur et à mesure que l’expérience avance, l’absorbance totale augmente mais le rapport d’intensité entre les deux épaulements change avec l’épaulement à 380 nm (A) qui finit par disparaître. Une fois atteint le maximum d’absorbance après 3 jours d’expérience, le pic autour de 410 nm (B) se déplace vers des  $\lambda$  plus élevées et une baisse en absorbance est observée dans un laps de temps de 8 heures (courbe 3,3 jours). Ce déplacement du pic associé à une baisse d’intensité sur un temps si court est attribuable à la complexation du Mn par la PVD. Le complexe PVD-Mn(III) présente en effet un pic d’intensité à une  $\lambda$  plus élevée et a un coefficient d’absorption molaire  $\varepsilon$  plus faible que la PVD libre (Parker *et al.*, 2004, 2007)). Ensuite, l’intensité de ce pic (B) continue à baisser et une nouvelle bande est observée autour de 335 nm (C), dont l’intensité augmente avec le temps. Cette bande est attribuable selon Parker *et al.* (2007) à une forme dégradée de la PVD.

Il est possible d’estimer la quantité de PVD produite grâce à l’utilisation de la loi de Beer-Lambert. Le coefficient d’absorption molaire ( $\varepsilon$ ) de la PVD libre est égal à  $19000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , celui de la PVD complexée est  $17000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Parker *et al.*, 2004, 2007)). Il a été choisi d’utiliser l’ $\varepsilon$  de la PVD libre, l’estimation peut donc être biaisée par la présence d’un mélange de PVD libre et PVD complexée, mais cette estimation est utile pour avoir une idée de l’ordre de grandeur de la concentration de PVD naturellement produite par une bactérie. La valeur maximale de PVD rencontrée en solution est autour de  $10 \mu\text{M}$  pour l’expérience avec 100 mg de VM après 3 jours et pour l’expérience avec 100 mg de VNM après 6 jours. En présence de 50 et de 25 mg de verre VM, la concentration maximale de PVD détectée en solution est autour de  $2 \mu\text{M}$ .

En conclusion, une production nette de PVD a été observée en présence de 100 mg de verre. La production de PVD est comparable pour les deux verre VM et VNM en terme de

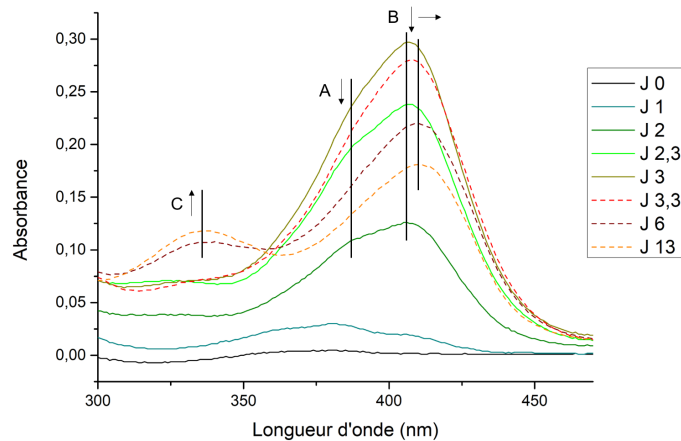


FIGURE 5.11 – Spectres d’absorption de la PVD pour un balayage de  $\lambda$  de 300 à 500 nm pour VM 100 mg + *P. putida* à différents temps d’altération. La zone A du spectre montre un épaulement à environ 380 nm qui disparaît au fil du temps. La zone B montre le déplacement du pic d’absorption vers des  $\lambda$  plus élevées et une baisse d’intensité. La zone C montre l’apparition et la montée d’une bande d’absorption autour de 335 nm. Pour aider la lecture, les courbes en trait plein et nuances du bleu/vert correspondent au début de l’expérience, les courbes en pointillé et nuances du rouge correspondent à la deuxième partie de l’expérience après le déplacement du pic B.

concentration maximale de PVD atteinte en solution ( $10 \mu\text{M}$ ), mais la production est un peu retardée en présence de VNM par rapport à VM (5.10). De plus, un comportement différent de la PVD en solution est observé en présence de VM, car la formation du complexe PVD-Mn est observée, suivie par la dégradation de la PVD.

## 5.4 Masse et composition des culots bactériens

En fin de chaque expérience, le milieu surnageant a été récupéré et centrifugé pour récupérer la masse bactérienne. Ces culots bactériens ont été soumis à une première étape de lavage et ensuite à une minéralisation. Les résultats des analyses des solutions de lavage et de minéralisation sont reportés dans cette section pour chaque élément en pourcentage massique, résultant de la normalisation des concentrations analysées en ICP-OES par rapport à la masse sèche de bactéries récupérée. On analyse ainsi la composition chimique des culots bactériens et donc potentiellement les éléments relâchés par le verre qui ont été incorporés par les bactéries (minéralisation), ou adsorbés en surface des cellules (lavage), par comparaison à l’expérience contrôle *P. putida* sans verre.

### Minéralisation

En Figure 5.12a sont représentés les pourcentages massiques des culots bactériens minéralisés pour les expériences de dissolution de VM après 8 jours d’expérience. Les culots bactériens récupérés lors des expériences en présence de verre sont enrichis avec tous les éléments dissouts du verre (Al, Ca, K, Mg, Mn, P, Si). Au contraire, le culot bactérien de

l'expérience de contrôle *P. putida* présente uniquement des faibles pourcentages massiques de Ca, K et P.

En général, pour toutes les conditions en présence de verre VM après 8 jours d'expérience, les éléments qui présentent des pourcentages massiques plus élevés sont le Ca, K, Mn, et P, alors que Al, Mg et Si ont des pourcentages massiques très faibles.

Des valeurs plus élevées de pourcentage massique sont rencontrées pour l'expérience avec 100 mg de verre (pourcentages massiques jusqu'à 1,2 %) par rapport aux expériences avec 50 et 25 mg. De la même façon, l'expérience avec 50 mg de verre présente des pourcentages massiques d'éléments du verre plus élevés (jusqu'à 1 %) que l'expérience avec 25 mg de verre (jusqu'à 0,7 %). Le rapport entre les éléments reste le même, à l'exception du Mn. En effet les pourcentages massiques de Mn pour les deux expériences avec 50 et 25 mg ont des valeurs équivalentes à ceux de Ca et K (rapport Mn/Ca et Mn/K entre 0,92 et 1,00) et plus faibles par rapport au P (rapport Mn/P entre 0,44 et 0,56), alors que pour l'expérience avec 100 mg, cet élément a des valeurs plus élevées que Ca et K (rapport Mn/Ca et Mn/K respectivement de 1,21 et 1,22), et il se rapproche du P (rapport Mn/P = 0,9).

En Figure 5.12b sont représentés les pourcentages massiques des culots bactériens minéralisés pour les expériences de dissolution de VM après 3 jours d'expérience, c'est à dire avant le début de la production du biofilm avec les oxydes de Mn. Pour l'expérience avec 100 mg de verre, les éléments présentent des pourcentages massiques similaires entre eux entre 0,4 et 0,6 %, à l'exception uniquement d'Al et Mg. Pour les expériences en présence de 50 ou 25 mg de verre, le rapport entre les éléments est différent par rapport à l'expérience avec 100 mg de verre. Ces culots bactériens sont plus enrichis en Ca, K et P et moins en Mn et Si.

La Figure 5.13 permet la comparaison entre VM et VNM pour les résultats de minéralisation des bactéries des expériences avec 100 mg de verre. Le pourcentages massiques d'éléments assimilés par les bactéries sont comparables entre les deux verres.

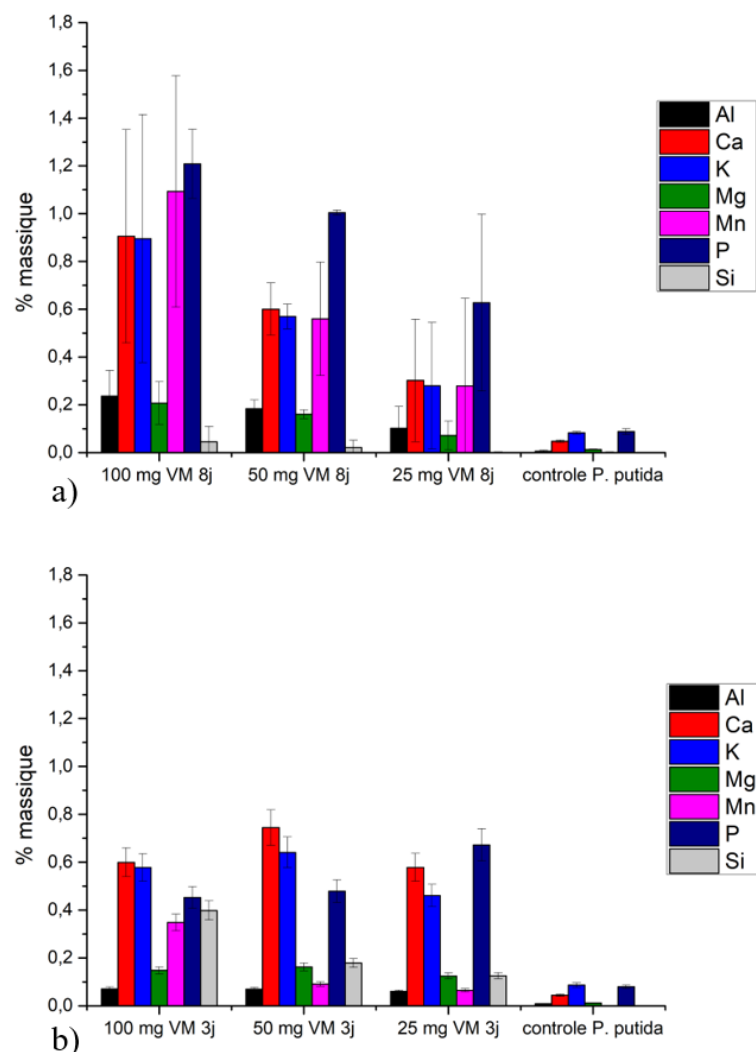


FIGURE 5.12 – Pourcentages massiques de la masse sèche du culot bactérien dans les solutions de minéralisation pour les éléments du verre pour a) VM après 8 jours avec valeurs moyennes issues des deux séries de réplicats et barres d'erreur représentant l'écart-type calculé ( $\pm\sigma$ ), b) VM après 3 jours, les barres d'erreur représentent l'incertitude sur les mesures d'ICP-OES.

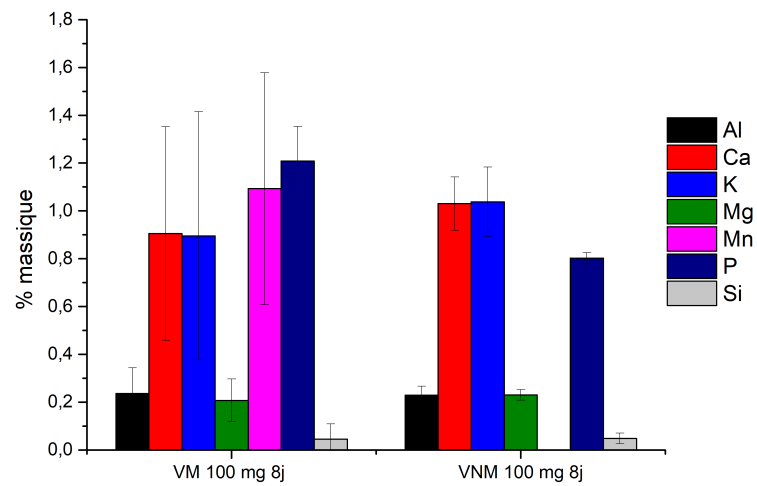


FIGURE 5.13 – Pourcentages massiques de la masse sèche du culot bactérien dans les solutions de minéralisation pour les éléments du verre après 8 jours d’expérience pour VM et VNM (100 mg). Les valeurs représentées sont la moyenne des valeurs issues des deux séries de réplicats et les barres d’erreur représentent l’écart-type calculé ( $\pm\sigma$ ).

## Lavage

Les solutions de lavage ont été analysées par ICP-OES pour estimer la quantité d'éléments qui était potentiellement adsorbée en surface des cellules bactériennes. Les résultats en pourcentages massiques sont reportés en Figure 5.14.

La valeur moyenne de Mn pour l'expérience d'altération de VM 100 mg à 8 jours d'expérience présente une forte variabilité entre les deux réplicats et une valeur de pourcentage massique très élevée. Il faut tenir en compte que a) dans la solution du milieu de culture récupérée en fin d'expérience il peut y avoir des morceaux de biofilm sous forme de floc contenant des oxydes de Mn, et b) dans la solution de lavage est présent l'EDTA, un fort complexant. Le Mn détecté dans la solution de lavage pourrait donc être le résultat de la complexation de cet élément par l'EDTA non seulement à la surface des cellules bactériennes mais aussi à la surface des oxydes de Mn présents dans le biofilm suspendu en solution.

Ceci dit, pour tous les éléments des solutions de lavage des expériences d'altération de VM arrêtées à 8 jours une relation entre la quantité d'éléments détectés et la quantité de verre introduite en solution est observée. Plus on a de verre, plus on a d'éléments adsorbés. Notamment les pourcentages massiques moyennes pour l'expérience avec 25 mg de verre après 8 jours sont deux, voir trois fois plus faibles que les valeurs pour les expériences avec 100 ou 50 mg de verre.

L'expérience d'altération de VM coupée après 3 jours, avant la formation des oxydes, a d'ailleurs des valeurs en Mn plus basses et en général des pourcentages massiques plus basses qu'après 8 jours, en accord avec les résultats de minéralisation.

En ce qui concerne la comparaison entre VM et VNM après 8 jours d'expérience, ils présentent une distribution d'éléments très similaire sauf pour le Si. La condition VNM est caractérisée par un pourcentage massique de Si très élevé, sûrement dû à des résidus de poudre de verre qui n'ont pas bien été séparés de la masse bactérienne en fin d'expérience, et pouvant avoir faussé la quantité de Si récupéré lors de l'étape de lavage.

En conclusion, au sein des bactéries, les pourcentages massiques des éléments dans les solutions de lavage sont en général plus faibles (entre 0,1 et 0,3 % massique) que ceux mesurés dans les solutions de minéralisation (jusqu'à 1,4 % massique). La majeure partie des éléments dissous du verre ont donc été intégrés par les bactéries (minéralisation), mais une partie peut avoir été toutefois simplement adsorbée en surface (solubles, récupérés par lavage).

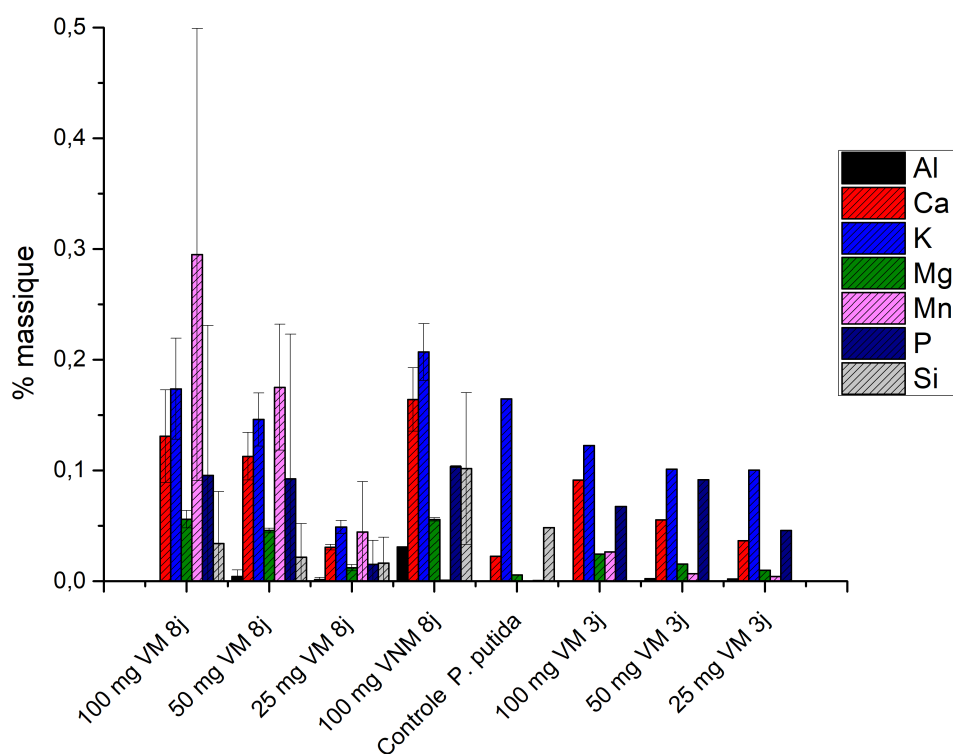


FIGURE 5.14 – Pourcentages massiques de la masse sèche du culot bactérien des éléments du verre dans les solutions de lavage. Les valeurs représentées sont la moyenne des valeurs issues des deux séries de réplicats et les barres d’erreur représentent l’écart-type calculé.

## 5.5 Analyse des solutions altérantes

### pH et concentrations

Le pH initial des solutions était de  $6,5 \pm 0,1$  et le pH final a été contrôlé en fin d’expérience, ces valeurs sont reportées dans le Tableau 5.1. Les deux réplicats sont très reproductibles en termes de pH pour toutes les conditions testées.

Malgré la présence du tampon HEPES 10 mM, le pH a évolué au fil des expériences. La valeur la plus élevée de pH (environ 7,4) est enregistrée pour les deux verres en conditions stériles. Au contraire, les valeurs de pH les plus faibles (autour de 5,5 - 6) sont mesurées pour la condition de *contrôle P. putida* sans verre.

Des valeurs intermédiaires de pH finaux sont rencontrées pour les expériences de dissolution du verre en présence de bactéries. Le pH est notamment plus élevé quand une grande quantité de verre est présente en solution. Cela est expliqué par les mécanismes d’interdiffusion typiques de l’altération du verre qui font monter le pH, son augmentation est donc corrélée à la quantité de verre introduite. Le pH augmente donc avec la quantité de verre mais la présence des bactéries tend à limiter cette augmentation en acidifiant au contraire la solution.

Les concentrations en Al, Ca, K, Mg, Mn, Si, P relâchés en solution par les verres VM et VNM sont reportées respectivement dans les tableaux 5.2 et 5.3. Il faut remarquer qu’ici le temps zéro présente déjà des valeurs élevées pour plusieurs éléments provenant du milieu de culture. Il a été décidé pour ces expériences de ne pas soustraire les valeurs du

|                              | (i) | (ii) |
|------------------------------|-----|------|
| VM 100 mg                    | 7,4 | 7,4  |
| VM 100 mg + <i>P. putida</i> | 7,1 | 7,2  |
| VM 50 mg <i>P. putida</i>    | 6,7 | 6,8  |
| VM 25 mg <i>P. putida</i>    | 6,3 | 6,4  |
| VNM 100 mg                   | 7,4 | 7,3  |
| VNM 100 mg <i>P. putida</i>  | 7,0 | 7,0  |
| p.putida                     | 6,0 | 5,6  |

TABLEAU 5.1 – Valeurs finales de pH pour le premier (i) et le deuxième (ii) réplicat pour toutes les conditions expérimentales.

milieu de culture et de reporter les valeurs brutes afin de montrer quels éléments nutritifs sont déjà présents en solution provenant d'impuretés lors de la préparation du milieu de culture.

Les valeurs de concentration atteignent un maximum de 180 ppb pour Al, 48 ppm pour Ca, 67 ppm pour K, 9 ppm pour Mg, 5 ppm pour Mn, 6 ppm pour P. Les concentrations en Si atteignent un maximum de 36 ppm, ce qui reste en dessous des valeurs d'équilibre en solution avec la silice amorphe (54 ppm). Les valeurs les plus élevées pour le Si sont rencontrés pour VM en conditions stériles. Les valeurs des concentrations de K, Mg, Ca, Si augmentent avec le temps pour toutes les conditions expérimentales. Les valeurs des concentration de Mn et P augmentent avec le temps et continuent d'augmenter en conditions stériles, tandis que en présence de bactéries, elles subissent une inversion de tendance et commencent à diminuer à partir d'un certain temps (variable selon l'expérience). Les concentrations de Mn tendent vers zéro lors de la première série d'expériences pour la condition d'altération en présence de 100 mg de verre VM + *P. putida*, ce qui est en accord avec la coloration brune (associée à la production d'oxydes de Mn) de la solution plus intense pour le premier réplicat. Tout le Mn présent en solution a été transformé en oxydes ou incorporé par les bactéries, alors que pour la deuxième série d'expériences la diminution du Mn en solution commence en retard et une partie du Mn est resté en solution.

En ce qui concerne la condition de contrôle *P. putida* (avec bactéries mais sans verre), les concentration de tous les éléments en solution restent constantes, avec des petites fluctuations.



|                                      |       | Al   |        | Ca      |         | K       |         | Mg     |        | Mn     |        | Si      |         | P      |        |
|--------------------------------------|-------|------|--------|---------|---------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|--------|--------|
|                                      |       | (i)  | (ii)   | (i)     | (ii)    | (i)     | (ii)    | (i)    | (ii)   | (i)    | (ii)   | (i)     | (ii)    | (i)    | (ii)   |
| <b>VM 100 mg</b>                     | jours | 0    | 0      | 239,4   | 49,2    | 587,5   | 365,7   | 40,0   | 16,9   | 5,1    | 4,1    | 0,0     | 0,0     | 32,2   | 43,9   |
|                                      | 0,01  | 0    | 0      | 4287,9  | 5233,0  | 8554,3  | 8326,1  | 817,2  | 1138,0 | 373,9  | 621,8  | 916,0   | 250,0   | 637,5  | 761,2  |
|                                      | 0,25  | 0    | 0      | 13593,5 | 14870,8 | 23271,6 | 21271,1 | 2586,7 | 3067,8 | 1249,2 | 1707,5 | 6558,3  | 4428,4  | 1512,9 | 2015,9 |
|                                      | 1     | 0    | 0      | 23195,0 | 23372,5 | 36535,0 | 32528,5 | 4322,6 | 4855,1 | 2140,2 | 2720,8 | 17156,1 | 12089,5 | 2731,0 | 3245,4 |
|                                      | 2     | 0    | 0      | 28912,3 | 29811,3 | 45670,9 | 40421,3 | 5578,3 | 6246,2 | 2914,1 | 3476,1 | 24761,3 | 17837,4 | 3609,9 | 4136,5 |
|                                      | 3     | 0    | 0      | 41079,0 | 41470,2 | 59639,8 | 54588,2 | 7775,6 | 8622,1 | 4199,4 | 4800,5 | 34009,5 | 24594,3 | 5430,1 | 5831,2 |
|                                      | 6     | 0    | 0      | 45430,9 | 45737,0 | 63840,9 | 58815,0 | 8520,4 | 9565,9 | 4612,4 | 5286,2 | 35976,4 | 26232,1 | 5978,1 | 6387,0 |
|                                      | 8     | 0    | 0      | 322,7   | 168,1   | 1901,8  | 1415,8  | 86,8   | 35,0   | 0,0    | 7,0    | 0,0     | 0,0     | 314,6  | 308,2  |
| <b>VM 100 mg</b><br><i>P. putida</i> | jours | 0,01 | 0,0    | 4082,7  | 5205,7  | 8132,3  | 9141,7  | 960,1  | 1095,7 | 423,3  | 589,9  | 811,9   | 349,7   | 114,6  | 182,4  |
|                                      | 0,25  | 0,0  | 0,0    | 19388,7 | 18940,0 | 30167,1 | 27836,8 | 3510,4 | 3673,7 | 1891,8 | 2121,0 | 2071,0  | 1404,2  | 746,2  | 572,8  |
|                                      | 1     | 0,0  | 0,0    | 27151,5 | 28087,0 | 40085,7 | 38219,6 | 5123,5 | 5675,7 | 2267,1 | 2980,8 | 5852,8  | 3022,7  | 616,5  | 423,9  |
|                                      | 2     | 0,0  | 0,0    | 29905,7 | 32148,0 | 45511,7 | 44101,2 | 5692,0 | 6397,8 | 0,0    | 3244,0 | 14471,7 | 10021,7 | 216,5  | 241,8  |
|                                      | 3     | 24,4 | 0,0    | 40206,2 | 44154,0 | 56852,5 | 58408,6 | 7424,2 | 8769,1 | 0,0    | 2653,6 | 27124,8 | 21299,7 | 1185,1 | 1218,0 |
|                                      | 6     | 47,9 | 0,0    | 45815,9 | 48271,0 | 63561,3 | 64916,8 | 8553,5 | 9721,5 | 0,0    | 2169,0 | 31281,2 | 24110,0 | 1850,1 | 1966,2 |
|                                      | 8     | 53,6 | 4,2    | 162,3   | 162,3   | 2133,2  | 1664,5  | 37,9   | 31,4   | 0,0    | 2,7    | 0,0     | 0,0     | 206,1  | 384,5  |
|                                      | jours | 0,01 | 0,0    | 2406,0  | 2458,1  | 5712,3  | 4870,6  | 424,3  | 475,5  | 169,7  | 244,4  | 476,9   | 0,0     | 113,5  | 196,4  |
| 0,25                                 | 0,0   | 0,0  | 7692,7 | 7728,4  | 14843,6 | 12809,4 | 1331,1  | 1563,2 | 659,6  | 887,2  | 1256,0 | 469,0   | 345,7   | 403,6  |        |
| <b>VM 50 mg</b><br><i>P. putida</i>  | 1     | 0,0  | 0,0    | 14163,9 | 14417,2 | 24718,4 | 21509,6 | 2477,7 | 2780,8 | 1215,7 | 1585,2 | 1542,0  | 620,2   | 546,9  | 549,3  |
|                                      | 2     | 0,0  | 0,0    | 17372,7 | 17896,4 | 29644,2 | 26113,6 | 3156,5 | 3511,9 | 1506,4 | 1986,8 | 1807,2  | 760,0   | 606,0  | 641,1  |
|                                      | 3     | 0,0  | 0,0    | 21435,7 | 22441,9 | 36448,8 | 33100,2 | 3929,1 | 4514,0 | 0,0    | 1261,6 | 12367,7 | 8492,5  | 250,3  | 300,0  |
|                                      | 6     | 21,1 | 0,0    | 24424,5 | 25264,8 | 40643,3 | 37260,9 | 4360,6 | 5041,2 | 0,0    | 330,4  | 19044,8 | 13235,4 | 320,4  | 361,6  |
|                                      | 8     | 25,7 | 0,0    | 255,1   | 168,0   | 1974,8  | 1743,4  | 31,0   | 30,6   | 0,0    | 4,6    | 0,0     | 0,0     | 421,7  | 424,7  |
|                                      | jours | 0,01 | 0,0    | 1339,7  | 1529,3  | 3845,5  | 3550,2  | 231,1  | 284,2  | 82,3   | 143,8  | 422,4   | 0,0     | 140,1  | 189,0  |
|                                      | 0,25  | 0,0  | 0,0    | 4441,0  | 4762,3  | 9206,3  | 8414,2  | 760,7  | 943,2  | 367,3  | 538,3  | 533,8   | 0,0     | 263,1  | 320,2  |
|                                      | 1     | 0,0  | 0,0    | 7651,9  | 7490,5  | 14727,9 | 12640,2 | 1325,8 | 1524,3 | 610,4  | 860,6  | 544,8   | 0,0     | 329,8  | 397,5  |
| <b>VM 25 mg</b><br><i>P. putida</i>  | 2     | 0,0  | 0,0    | 9525,6  | 9428,1  | 18047,9 | 15222,5 | 1673,2 | 1958,1 | 794,2  | 1104,8 | 627,2   | 8,7     | 379,9  | 460,4  |
|                                      | 3     | 0,0  | 0,0    | 9571,4  | 13618,2 | 17896,0 | 20776,4 | 1682,8 | 2709,5 | 763,0  | 1511,3 | 626,8   | 91,7    | 540,3  | 638,8  |
|                                      | 6     | 0,0  | 0,0    | 12429,2 | 14613,9 | 22070,1 | 22197,0 | 2280,7 | 2948,9 | 0,0    | 1464,1 | 3649,3  | 1621,4  | 332,1  | 424,8  |
|                                      | 8     | 7,8  | 0,0    |         |         |         |         |        |        |        |        |         |         |        |        |

TABLEAU 5.2 – Concentrations en ppb de tous les éléments du verre VM pour toutes les conditions testées. Les annotations (i) et (ii) font référence aux deux réplicats réalisés pour chaque condition expérimentale. Les incertitudes sur ces mesures ne sont pas reportés, les erreurs analytiques de l'ICP-OES pour chaque élément et chaque gamme de concentration sont reportées dans le Chapitre 2.

|                   | Al    |       | Ca      |         | K       |         | Mg      |        | Mn     |      | Si      |         | P       |        |        |
|-------------------|-------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|--------|------|---------|---------|---------|--------|--------|
|                   | (i)   | (ii)  | (i)     | (ii)    | (i)     | (ii)    | (i)     | (ii)   | (i)    | (ii) | (i)     | (ii)    | (i)     | (ii)   |        |
| <b>VNM 100 mg</b> | 0,01  | 0,0   | 180,9   | 255,0   | 1525,8  | 2032,4  | 40,4    | 53,7   | 0      | 0    | 0,0     | 0,0     | 235,1   | 270,3  |        |
| <i>P. putida</i>  | 0,25  | 0,0   | 5227,8  | 5595,3  | 10573,4 | 11437,5 | 1064,1  | 1097,2 | 0      | 0    | 488,4   | 318,2   | 120,2   | 129,8  |        |
|                   | 1     | 0,0   | 17766,0 | 19038,0 | 29537,2 | 31690,0 | 3549,1  | 3603,8 | 0      | 0    | 1421,4  | 607,2   | 478,8   | 483,8  |        |
|                   | 2     | 0,0   | 27453,7 | 27697,4 | 41604,0 | 43531,6 | 5676,9  | 5589,6 | 0      | 0    | 2673,9  | 1304,7  | 424,5   | 504,6  |        |
|                   | 3     | 126,6 | 84,2    | 31539,5 | 31775,1 | 47786,8 | 48332,4 | 6566,2 | 6387,0 | 0    | 11033,5 | 9087,5  | 220,6   | 237,8  |        |
|                   | 6     | 178,8 | 157,6   | 39935,1 | 39261,2 | 59597,9 | 55210,8 | 8707,5 | 7710,5 | 0    | 24838,6 | 22583,1 | 899,7   | 824,4  |        |
|                   | 8     | 184,3 | 0,0     | 46936,9 | 42469,2 | 67727,1 | 58243,5 | 9796,3 | 9025,5 | 0    | 28101,7 | 28203,3 | 1469,6  | 1025,5 |        |
| <b>VNM 100 mg</b> | jours | (i)   | (ii)    | (i)     | (ii)    | (i)     | (ii)    | (i)    | (ii)   | (i)  | (ii)    | (i)     | (ii)    | (i)    | (ii)   |
|                   | 0,01  | 0,0   | 9,4     | 173,7   | 332,2   | 621,2   | 716,2   | 53,8   | 61,1   | 0    | 0       | 0       | 0,0     | 39,9   | 151,8  |
|                   | 0,25  | 0,0   | 0,0     | 5178,7  | 5651,6  | 9949,9  | 8676,4  | 1112,3 | 1172,2 | 0    | 0       | 371,3   | 132,3   | 646,9  | 848,4  |
|                   | 1     | 0,0   | 2,8     | 14308,6 | 14699,2 | 24338,0 | 21364,8 | 3057,1 | 3058,4 | 0    | 0       | 4839,2  | 3674,3  | 1809,4 | 2143,0 |
|                   | 2     | 0,0   | 0,0     | 22358,8 | 23045,4 | 35749,0 | 31910,1 | 4791,6 | 4828,0 | 0    | 0       | 12887,2 | 11165,9 | 2890,1 | 3286,9 |
|                   | 3     | 0,0   | 0,0     | 27595,6 | 29860,1 | 40113,0 | 40226,8 | 5723,8 | 6215,7 | 0    | 0       | 18565,3 | 16299,3 | 3457,2 | 4199,3 |
|                   | 6     | 0,0   | 0,0     | 42343,8 | 41158,4 | 58270,9 | 53412,9 | 8804,7 | 8550,9 | 0    | 0       | 28523,6 | 23255,1 | 5337,6 | 4424,6 |
|                   | 8     | 179,1 | 13,5    | 44741,4 | 46048,0 | 64738,1 | 58717,2 | 9553,7 | 9210,1 | 0    | 0       | 27969,0 | 24752,5 | 5447,0 | 4619,6 |
| <b>P. putida</b>  | jours | (i)   | (ii)    | (i)     | (ii)    | (i)     | (ii)    | (i)    | (ii)   | (i)  | (ii)    | (i)     | (ii)    | (i)    | (ii)   |
|                   | 0,01  | 9,2   | 0,0     | 268,4   | 108,9   | 1965,7  | 1879,3  | 33,1   | 22,1   | 0    | 0       | 0,0     | 0,0     | 288,3  | 320,7  |
|                   | 0,25  | 0,4   | 0,0     | 181,9   | 104,3   | 1548,2  | 1508,5  | 14,3   | 17,5   | 0    | 0       | 296,7   | 0,0     | 163,1  | 171,8  |
|                   | 1     | 28,2  | 0,0     | 582,0   | 101,1   | 2277,5  | 1429,9  | 87,3   | 17,4   | 0    | 0       | 263,2   | 0,0     | 157,4  | 177,2  |
|                   | 2     | 35,9  | 0,0     | 487,1   | 97,1    | 2288,1  | 1471,2  | 79,3   | 17,8   | 0    | 0       | 258,5   | 0,0     | 168,1  | 192,2  |
|                   | 3     | 1,6   | 0,0     | 221,3   | 51,3    | 1720,9  | 1494,1  | 24,7   | 12,5   | 0    | 0       | 269,4   | 40,5    | 172,3  | 193,9  |
|                   | 6     | 1,8   | 0,0     | 185,7   | 58,3    | 1735,4  | 1627,3  | 17,9   | 15,7   | 0    | 0       | 330,7   | 71,3    | 183,7  | 200,1  |
|                   | 8     | 2,8   | 0,0     | 675,0   | 131,0   | 1805,3  | 1758,5  | 14,7   | 29,2   | 0    | 0       | 245,5   | 110,8   | 183,7  | 195,3  |

TABLEAU 5.3 – Concentrations en ppb de tous les éléments du verre VNM pour toutes les conditions testées et de la condition de contrôle *P. putida*. Les annotations (i) et (ii) font référence aux deux réplicats réalisés pour chaque condition expérimentale. Les incertitudes sur ces mesures ne sont pas reportées, les erreurs analytiques de l'ICP-OES pour chaque élément et chaque gamme de concentrations sont reportées dans le Chapitre 2.

### Pertes de masse normalisées

Les NLs moyennes (pour les deux réplicats) en fonction du temps sont représentées en Figure 5.15 pour VM et VNM en conditions de *contrôle verre* sans bactérie et avec bactéries, et en Figure 5.16 pour les différentes conditions effectuées pour le verre VM. Pour le Mn, les NLs des deux séries de réplicats sont reportés séparément à cause de petites différences entre le premier et le deuxième réplicat uniquement en ce qui concerne cet élément.

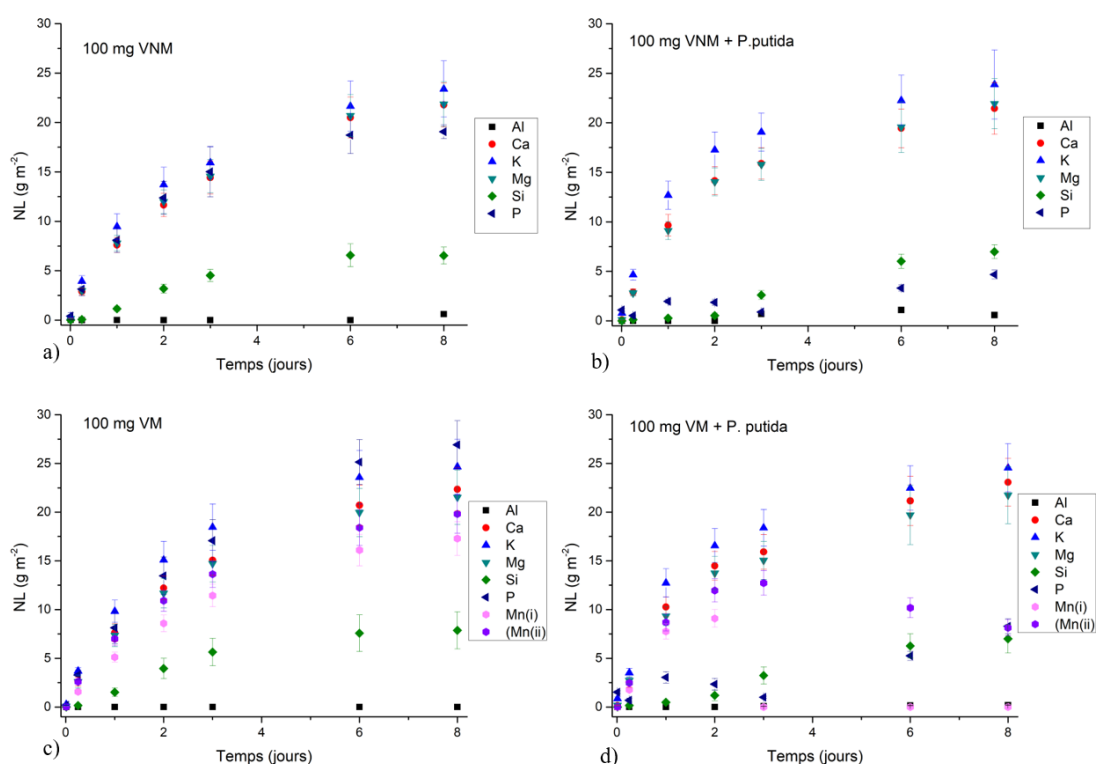


FIGURE 5.15 – Pertes de masse normalisées moyennes (NLs) en fonction du temps pour a) VNM 100 mg, b) VNM 100 mg + *P. putida*, c) VM 100 mg d) VM 100 mg + *P. putida*. Les barres d'erreur sont calculées en prenant en compte les incertitudes sur la mesure de la concentration par ICP-OES et les erreurs expérimentales ( $\pm\sigma$ ) pour chaque point. Les valeurs pour le Mn sont reportées séparément pour le premier (i) et deuxième (ii) réplicat avec les barres d'erreur représentant uniquement l'incertitude sur la mesure de concentration.

En conditions de *contrôle verre* (100 mg de verre sans bactéries) (Figure 5.15a,c), les deux verres ont des comportements similaires et des NLs du même ordre de grandeur, VM présente en moyenne des NLs un peu plus élevées. Les deux verres présentent une dissolution incongruente où K, Ca, Mg, P sont tous relâchés préférentiellement et suivent la même évolution. L'Al reste à zéro ou proche de zéro. Pour VM, le Mn est relâché préférentiellement au Si, mais sa courbe de dissolution est en dessous de celles de K, Ca, Mg,

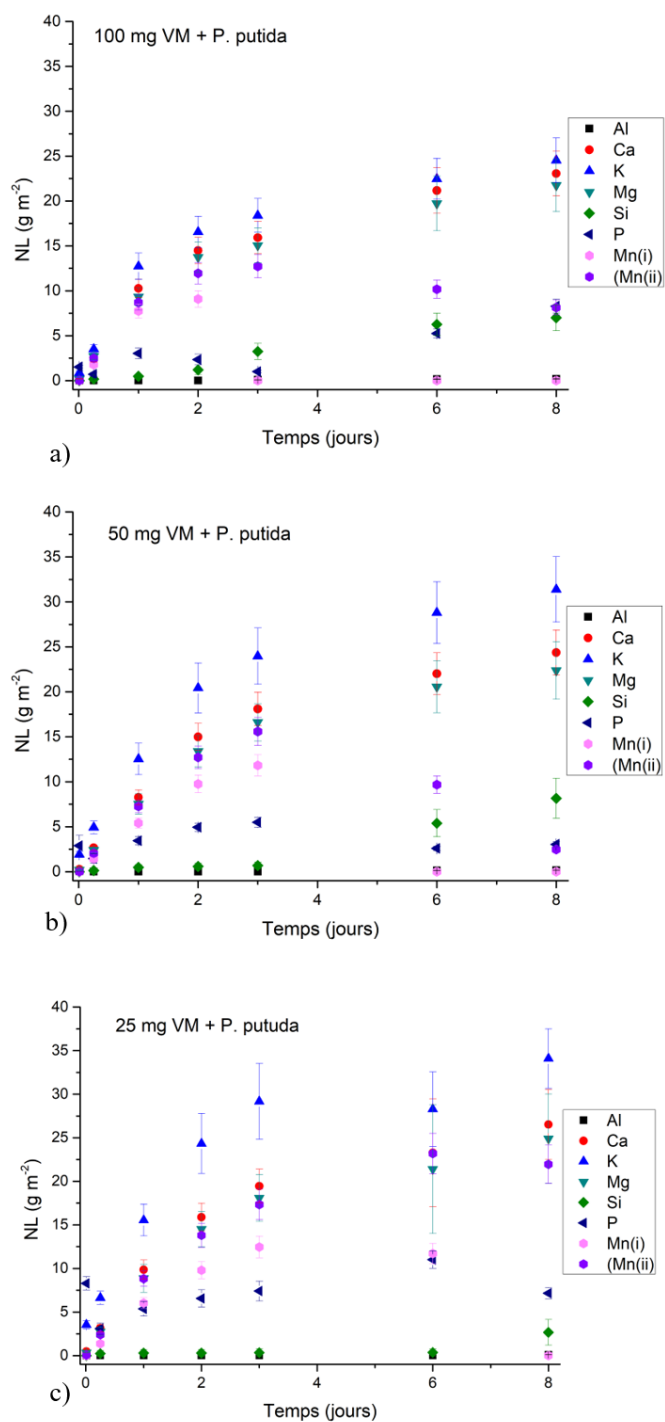


FIGURE 5.16 – Pertes de masse normalisées moyennes (NLs) en fonction du temps pour a) VM 100 mg + *P. putida*, b) VM 50 mg + *P. putida*, c) VM 25 mg + *P. putida*. Les barres d'erreur sont calculées en prenant en compte les incertitudes sur la mesure de la concentration par ICP-OES et les erreurs expérimentales ( $\pm\sigma$ ) pour chaque point.

P, tout en ayant la même allure (Figure 5.15c).

En présence de *P. putida* avec 100 mg de verre (Figure 5.15b,d), les deux verres montrent un changement de stœchiométrie de dissolution pour Si, P et Mn (quand le verre en contient) par rapport à l'expérience de *contrôle verre* sans bactéries.

Les NLs du Si restent proche de zéro jusqu'à 2 jours pour VNM et jusqu'à 1 jour pour VM, puis elles montent doucement.

Les NLs du P sont ici très faibles (entre 5 et 10 g m<sup>-2</sup>) par rapport à l'expérience stérile (jusqu'à 25 g m<sup>-2</sup>), pour les deux verres la concentration en P monte légèrement en début d'expérience, pour après chuter et ensuite remonter en fin d'expérience.

La courbe du Mn suit la même évolution qu'en conditions de *contrôle verre* pendant les premiers temps d'expérience, ensuite les NLs chutent. Pour le premier réplicat, la chute commence après 2 jours et les NLs tombent rapidement à zéro. Pour le deuxième réplicat la chute commence après 3 jours et les NLs descendent mais sans devenir nulles. Ces différences sont en accord avec les observations précédentes sur la production de PVD et d'oxydes de Mn. En effet, au cours de la première expérience de réplicat, la production de PVD commence après 2 jours et ensuite la production d'oxyde de Mn mène à une coloration brune très intense de la solution. Au cours de la deuxième expérience de réplicat le pic de production de PVD est observé après 2 jours et la coloration brune de la solution est moins intense, en accord avec les résultats ICP qui montrent que du Mn reste encore en solution. Ici encore le même phénomène d'un réplicat à un autre est observé mais avec un délai d'un jour, et une intensité différente.

En ce qui concerne les expériences de dissolution de VM avec un rapport S/V différent (Figure 5.16), K, Ca, Mg se comportent de manière différente à celle constatée dans l'expérience de *contrôle verre*, un démarquement significatif de la courbe du K est observé, avec des NLs plus élevées que les autres éléments. Les NLs du Si restent proches de zéro jusqu'à 3 jours pour VM 50 mg et jusqu'à 6 jours pour VM 25 mg. L'évolution du P est la même pour tous les S/V testés, mais il atteint des NLs plus élevées dans les 3 premiers jours d'altération pour 50 et 25 mg de verre. L'évolution du Mn est aussi similaire pour tous les S/V mais la chute des NLs du Mn (après 3 jours pour VM 50 mg et entre 4 et 6 jours pour VM 25 mg) est moins marquée pour les expériences avec 50 et 25 mg de verre car les valeurs de NLs initiales sont moins élevées.

Pour mieux visualiser les différents comportement des éléments d'une condition à l'autre, les NLs de P et Si ont été tracées en Figure 5.17 pour comparer VM et VNM en conditions de *contrôle verre* et avec *P. putida*. cela permet de mettre en évidence que les NLs des deux verres ont des valeurs et des évolutions presque équivalents en conditions de contrôle et en présence de *P. putida*. Les valeurs de NL du Si en présence de bactéries restent à des valeurs plus basses jusqu'à 2 jours, alors qu'en conditions de *contrôle verre*, le Si en solution commence à monter dès le premier jour. Un plateau est atteint après 6 jours. Ces observations sont en accord avec les résultats de minéralisation qui montrent qu'en début d'expérience le Mn est incorporé par les bactéries. Le P en condition de *contrôle verre* a une courbe de dissolution croissante jusqu'à l'atteinte d'un plateau après 6 jours. En présence de bactéries, les NLs de P montent en début d'expérience pour ensuite chuter entre 1 et 2 jours et enfin recommencer à monter. Cet élément est donc rapidement pris

par les bactéries dès qu'il est relâché en solution par le verre, puis le P relâché par le verre est en excès et il est à nouveau détecté en solution.

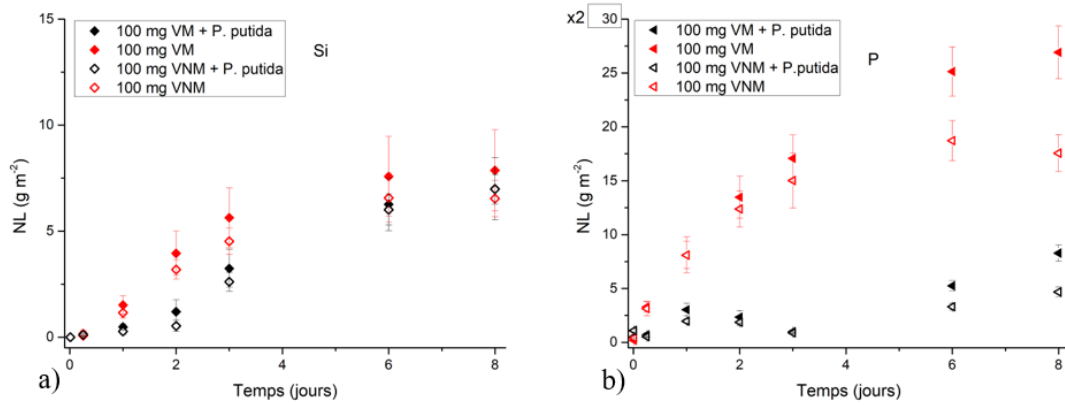


FIGURE 5.17 – Pertes de masse normalisées en fonction du temps pour a) Si et b) P pour les verres VM et VNM (100 mg) en absence ou présence de *P. putida*. Les barres d'erreur sont calculées en prenant en compte les incertitudes sur la mesure de la concentration par ICP-OES et les erreurs expérimentales ( $\pm\sigma$ ) pour chaque point.

La Figure 5.18 trace l'évolution des NLs de Si et P pour comparer le comportement de ces éléments pour les expériences de dissolution de VM à différents rapports S/V. Cela permet de mettre en évidence que la croissance des NLs du Si en solution est retardée d'un jour pour l'expérience avec 50 mg de verre et de 4 jours pour l'expérience avec 25 mg de verre, par rapport à celle avec 100 mg. Pour le P, on observe également un délai du phénomène de décroissance des NLs du phosphore qui est lié à la quantité de verre introduit en solution. Moins il y a de verre et plus tard ce phénomène est observé.

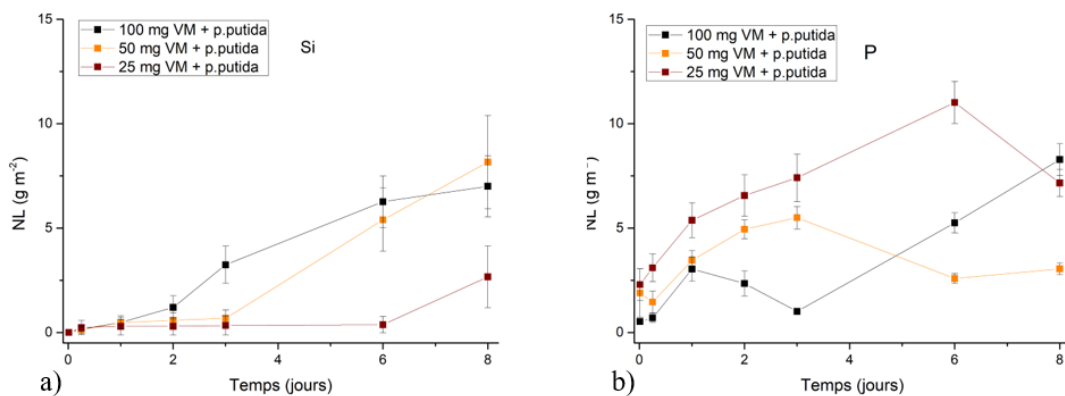


FIGURE 5.18 – Pertes de masse normalisées en fonction du temps pour a) Si et b) P pour le verre VM en différentes conditions d'altération (100, 50, 25 mg de verre introduits en solution) en présence de *P. putida*. Les barres d'erreur sont calculées en prenant en compte les incertitudes sur la mesure de la concentration par ICP-OES et les erreurs expérimentales ( $\pm\sigma$ ) pour chaque point.

Les NLs pour Mn(i) et Mn(ii) sont reportées en Figure 5.19 pour la condition de *contrôle verre* et toutes les conditions biotiques à différents S/V. Une chute des NLs est observée pour toutes les conditions biotiques. Elle se passe à différents temps d'altération selon la quantité de verre initialement introduite en solution. Elle est observée d'abord pour 100 mg VM, puis pour 50 mg VM et en fin pour 25 mg VM. Cela est observé pour les deux répliquats, malgré les différences d'intensité et le délai d'un répliquat à l'autre.

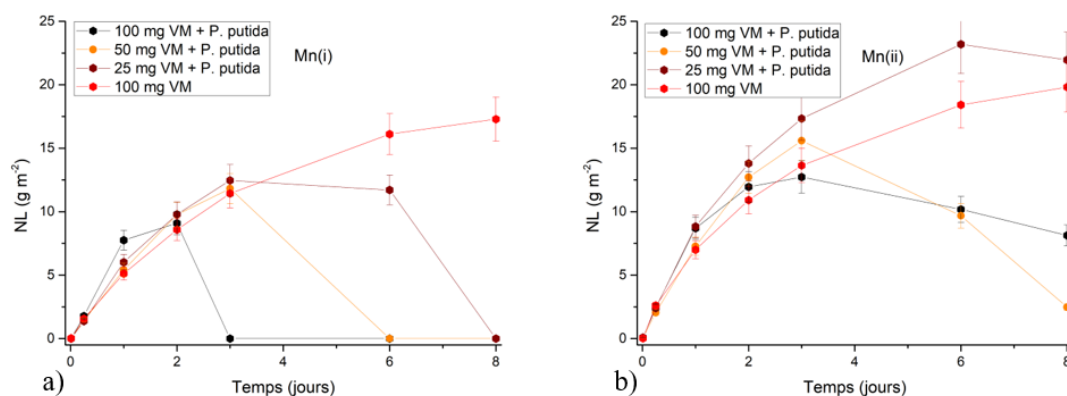


FIGURE 5.19 – Pertes de masse normalisées de Mn en fonction du temps pour a) le premier et b) le deuxième répliquat pour la condition de *contrôle verre* et toutes les conditions biotiques testées (100, 50, 25 mg de verre introduits en solution) en présence de *P. putida*. Les barres d'erreur représentent les incertitudes sur la mesure de la concentration par ICP-OES.

### Vitesses initiales de dissolution

Dans ce travail de thèse, les vitesses de dissolution du Si ont été utilisées dans le chapitre précédent pour comparer entre eux les résultats des différentes conditions expérimentales. Malheureusement, dans ce chapitre, il ne sera pas possible d'en faire la même utilisation avec autant de confiance. Les courbes de dissolution du Si montrent, en conditions biotiques, un "ralentissement" initial qui ne permet pas d'obtenir une bonne régression linéaire pour toutes les conditions. Des valeurs de vitesse ont toutefois été calculées par régression linéaire sur les points des 3 premiers jours d'expérience pour les deux verres en conditions stériles ( $R^2 > 0,99$ ) et en conditions biotiques ( $0,8 < R^2 < 0,95$ ) et sont reporté dans le Tableau 5.4. Il faut toutefois prendre ces valeurs avec précaution car plusieurs mécanismes influencent la présence du Si en solution et donc l'évaluation des vitesses de dissolution initiales.

|                           | VM              | VNM             |
|---------------------------|-----------------|-----------------|
| 100 mg                    | $1,87 \pm 0,49$ | $1,50 \pm 0,15$ |
| 100 mg + <i>P. putida</i> | $0,90 \pm 0,29$ | $0,89 \pm 0,12$ |

TABEAU 5.4 – Vitesses initiales de dissolution moyennes pour le Si en g/ m<sub>2</sub>/ j.

Ces valeurs permettent de comparer avec une bonne confiance au moins le comportement des deux verres en conditions de contrôle. Ces résultats montrent que dans le

milieu de culture le VM a une vitesse de dissolution plus élevée que le VNM. De plus, ces valeurs de  $v_{Si}$  pourront être comparées avec avec celles obtenues en solution d'EUP dans le chapitre précédent.



## 5.6 Discussion

Les résultats décrits précédemment montrent que la présence de bactéries a un impact sur la stœchiométrie et les cinétiques de dissolution du verre. Réciproquement, la quantité et la composition du verre ont un impact sur le comportement bactérien.

Dans un premier temps on discutera de l'impact du verre sur le comportement bactérien (croissance bactérienne, production de PVD, production d'oxydes de Mn). Ensuite, on s'attachera à discuter les effets de la présence bactérienne sur l'altération du verre.

### 5.6.1 Impact du verre sur le comportement bactérien

#### Croissance bactérienne et rôle de Mn

Pour ces expériences de dissolution biotique, le milieu de culture ne contient que le tampon HEPES et des sources de carbone et d'azote comme éléments nutritifs nécessaires au développement bactérien. Le verre introduit en solution s'altère en relâchant en solution ses éléments (Figure 5.15). La population bactérienne inoculée dans le milieu de culture sans verre ne croît pas (Figure 5.8), les bactéries présentent donc une incapacité à se développer dans ce milieu de culture en absence d'autres éléments nutritifs. Au contraire, une intense croissance bactérienne est observée en présence des deux verres (Figure 5.8). Les éléments relâchés par le verre sont donc nécessaires et suffisants à la croissance bactérienne ; les éléments comme K, Ca, Mg, P sont d'ailleurs des macro-nutriments fondamentaux pour les microorganismes.

Il n'a pas été possible d'observer une différence significative de croissance bactérienne en fonction du type de verre. Les résultats de DO (Figure 5.8) montrent une croissance légèrement retardée en présence de VNM si comparé à la croissance en présence de VM, ce qui pourrait être attribuable à l'effet de la présence de Mn en solution, puisque c'est la seule différence entre les deux verres. Cet élément pourrait aider le développement des bactéries sur les premiers temps d'altération. Toutefois, les valeurs finales de DO sont équivalents pour les deux verres (Figure 5.8), cela suggère que *P. putida* n'a pas besoin du Mn pour se développer.

Plusieurs études (Liermann *et al.*, 2000b; Patricia A. Maurice, 2001; Aouad *et al.*, 2006; Ferret *et al.*, 2014; Perez *et al.*, 2016) ont montré que la croissance bactérienne pour des bactéries hétérotrophes était plus intense en présence d'un substrat contenant du Fe. Le Fe est un élément fondamental en tant que cofacteur d'enzymes intervenant dans plusieurs mécanismes enzymatiques cellulaires essentiels à la vie des bactéries. La valeur nutritive du Mn est moins connue et généralement moins importante que celle du Fe. Le rôle du Mn en tant que micro-nutriment est aussi celui de cofacteur pour certains mécanismes enzymatiques mais peu d'importance lui est attribuée (si comparé au Fe) car il n'intervient que lors de mécanismes de détoxification de radicaux libres ou dans certains types de photo-synthèses en tant que cofacteur (Kehres et Maguire, 2003).

L'oxydation du Mn par de nombreuses souches bactériennes a été documentée (Tebo *et al.*, 2004, 2005; Villalobos *et al.*, 2006; Parker *et al.*, 2007) mais son rôle physiologique reste mal connu. Une étude récente de Yu et Leadbetter (2020) a montré que certaines souches bactériennes présentent une croissance exponentielle corrélée à l'oxydation du Mn, liée à un procédé de fixation du CO<sub>2</sub>. Le Mn pourrait donc dans certains cas participer

au cycle du carbone et donc au cycle énergétique de certaines bactéries. Cette découverte représente un tournant pour la géomicrobiologie du Mn et montre que le rôle du Mn dans le cycle de vie des bactéries est encore à approfondir.

Dans l'étude présente, les résultats montrent que la productions d'oxydes de Mn à partir d'un certain temps d'expérience n'est pas associée à une accentuation de la croissance bactérienne si on prend en considération les résultats de DO et CFU (Figure 5.7). L'oxydation de Mn ne semble donc pas être fondamentale pour la reproduction cellulaire de *P. putida*. Il faut garder en tête que ces résultats se basent sur des mesures de DO et de CFU qui sont obtenues suite à des prélèvements des milieux de culture, elles ne caractérisent donc que les bactéries sous forme planctonique. Le biofilm produit lors des expériences d'altération en présence de VM n'est pas pris en compte par ces mesures. L'absence de biofilm observée sur les poudres de verre VNM altéré en présence de *P. putida* semblerait montrer que la présence de Mn n'augmente pas significativement la croissance bactérienne planctonique, mais induit la formation d'un biofilm plus important.

Une corrélation a été observée entre les courbes de croissance bactérienne et la quantité de verre introduite en solution (Figure 5.7). Il semblerait que la croissance bactérienne soit limitée par le relâchement d'éléments du verre en solution, raison pour laquelle la croissance est moins intense et moins rapide pour les expériences avec une plus faible quantité de verre. Ceci confirme que le verre représente une source de nutriments pour les bactéries.

Notamment, les résultats des expériences de minéralisation des culots bactériens récupérés en fin d'expérience pour l'expérience coupée à 3 jours et pour les expériences coupées à 8 jours, mettent en évidence une incorporation par les bactéries des éléments relâchés par le verre.

En premier les bactéries incorporent principalement Ca, K et P (résultats pour expériences d'altération de VM 25 et 50 mg à 3 jours d'expérience en Figure 5.12), et, en plus faibles quantités, du Mn et du Si. Ensuite elles continuent à incorporer du Si et du Mn (expérience avec 100 mg de VM à 3 jours d'expérience). Ces observations confirment que une partie du Mn est sans doute incorporé par les cellules et non transformé en oxydes.

Ensuite elles continuent à incorporer Ca, K, Mn et P, mais elles arrêtent l'incorporation du Si (résultats des expériences d'altération de VM après 8 jours d'expérience en Figure 5.12). En effet, la valeur en pourcentage massique du Si pour les expériences arrêtées à 3 jours est plus élevée (pourcentages massiques autour de 0,2 - 0,4 %) que pour les expériences coupées à 8 jours (pourcentages massiques inférieures à 0,1 %, Figure 5.12). Cela pourrait indiquer que le Si a uniquement été incorporé en début d'expérience, cette quantité représente une pourcentage plus élevée sur le total de bactéries développées après 3 jours, la même quantité représente un pourcentage plus faible sur le total de bactéries récupérées après 8 jours.

Jusqu'à 3 jours d'expérience, les bactéries des trois conditions d'altération en présence de VM ont assimilé en proportion les mêmes pourcentage massique d'éléments (entre 0,4 et 0,6 % pour toutes les conditions avec S/V différents). Après 8 jours d'expérience, les bactéries qui se sont développées en présence de 100 mg de verre semblent avoir assimilé une quantité majeure d'éléments provenant du verre (en pourcentage massique) et sont particulièrement enrichies en P et Mn, par rapport aux résultats des culots bactériens des

expériences arrêtées à 3 jours. Il pourrait sembler donc qu'à partir d'un certain moment, les bactéries incorporent d'avantage P et Mn. Ceci pourrait correspondre au moment où l'oxydation du Mn commence et le Mn est cumulé par les bactéries sous forme d'oxydes dans le glycocalix, la matrice organique extracellulaire (Tebo *et al.*, 2004). En effet, sur la base des résultats d'analyse des solutions altérantes qui montrent une diminution en solution de Mn et P (Figures 5.19 et 5.18) en même temps que l'apparition de la coloration brune liée à la formation de biofilm avec oxydes de Mn (Figures 5.3), il est possible de faire l'hypothèse que l'enrichissement en P et Mn observé dans les culots bactériens après 8 jours soit lié à la présence du biofilm (riche en P et Mn).

Enfin, les proportions des éléments changent entre les solutions de lavage et les solutions de minéralisation. Dans les solutions de minéralisation, des quantités élevées de P sont rencontrées, alors que dans les solutions de lavage beaucoup de K est présent. Cela pourrait être une indication du fait que la quantité de K relarguée par le verre est suffisante et en excès par rapport à ce dont la bactérie a besoin.

### Production de PVD et de $MnO_2$

En ce qui concerne la PVD, les résultats montrent que les bactéries commencent à produire cette molécule quand elles se trouvent à un stade de développement assez avancé. Nous avons vu en effet la coloration verte apparaître (Figure 5.16) et l'absorbance à 402 nm augmenter (Figure 5.9) en correspondance d'une croissance déjà assez avancée après 2 jours pour l'expérience en présence de 100 mg de VM.

Ainsi, aucune production de PVD n'est observée dans l'expérience de *contrôle P. putida* sans verre, les bactéries n'étant pas parvenues à se développer assez pour produire le sidérophore. Au contraire, la production de PVD est détectée en présence de VNM et VM pour toutes les conditions de dissolution testées mais avec un délai temporel lié à la quantité de verre introduit en solution, et donc d'éléments nutritifs relâchés.

La PVD en solution atteint un état stationnaire en présence de VNM (Figure 5.10), probablement corrélé à l'atteinte d'un état stationnaire de croissance bactérienne, déjà observé dans d'autres systèmes en littérature (Liermann *et al.*, 2000b; Perez *et al.*, 2016).

En ce qui concerne VM, l'absorbance de PVD à 402 nm diminue en fin d'expérience et la coloration verte due à la PVD est remplacée par une coloration brune. Ce phénomène est observé pour toutes les expériences en présence de VM, avec un délai temporel lié à la quantité de verre introduit en solution. Un délai est également observé entre la première série de répliquat et la deuxième série. Pour plus de clarté, les étapes de coloration verte/marron sont représentées par les deux séries de répliquats de VM et VNM sur un schéma en Figure 5.20.

En présence de VM 100 mg, l'évolution de l'absorbance de la PVD montre que la PVD en solution est d'abord dans son état libre et son intensité augmente avec le temps, ensuite le pic d'absorbance présente une baisse d'absorbance et un shift vers des longueurs d'onde plus élevées, ce qui indique la formation du complexe avec le Mn(III) (Figure 5.11). Ce phénomène est appelé en littérature "quenching" de fluorescence de la pyoverdine car la PVD libre est fluorescente, alors que le complexe PVD-Mn ne l'est pas. La formation de ce complexe a été rapportée par Parker *et al.* (2004, 2007) dans des cultures de *P. putida* à un pH entre 7,1 et 7,5. La constante de stabilité de ce complexe est très élevée ( $\log K$

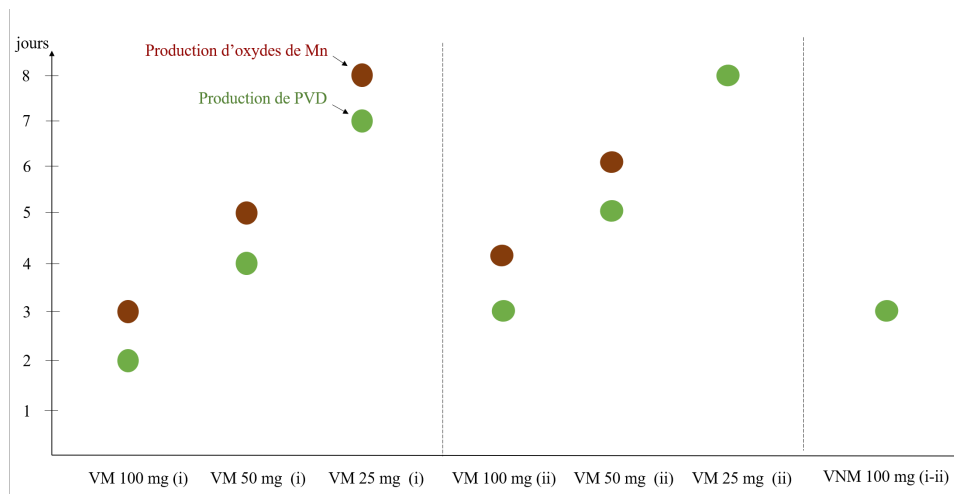


FIGURE 5.20 – Représentation schématique des évolutions de coloration observées ou estimées pour les solutions des expériences avec 100, 50 et 25 mg de verre VM + *P. putida*. Le point vert représente la production de PVD, le point marron représente la production d'oxydes de Mn.

= 47,5) et Parker *et al.* (2004) ont montré que, lorsque les deux éléments coexistent, le Mn peut entrer en compétition avec le Fe ( $\log K = 44,6$ ) pour la complexation avec la PVD.

La formation du complexe PVD-Mn(III) est couplée à une diminution de l'absorbance de ce pic à 410 nm et à l'apparition d'une bande à 335 nm, attribuée à la PVD dégradée (Figure 5.11). Ce phénomène est associé à la baisse de Mn en solution et à l'apparition de la coloration marron due à la formation d'oxydes de Mn.

Ces observations sont en accord avec les résultats de Parker *et al.* (2007) qui montrent que la complexation du Mn par la PVD est l'un des chemins possibles qui mènent à l'oxydation du Mn.

Cependant, Parker *et al.* (2007) affirment que la présence de Mn ne cause pas l'arrêt de la production de PVD, tandis que nos résultats semblent montrer que la production de PVD ne reprend pas (la bande entre 400 et 410 nm continue de perdre en intensité après 13 jours) après sa participation aux mécanismes qui viennent d'être décrits.

Selon Parker *et al.* (2007), *P. putida* GB-1 peut soit oxyder Mn(II) soluble par voie enzymatique à former  $MnO_2$  insoluble, soit l'oxyder par interaction avec le ligand et former le complexe PVD-Mn(III) soluble.

Toutefois ils montrent l'existence d'un troisième chemin qui passe par la dégradation du complexe PVD-Mn, le relâchement de Mn(III) et l'oxydation à  $MnO_2$  par voie enzymatique. Cela est vraisemblablement ce qui se passe dans nos expériences d'altération de VM car la formation du complexe PVD-Mn(III) est observée par UV-VIS et elle est suivie par l'apparition de la bande à 335 nm attribuée à la PVD dégradée suite à la formation des oxydes de Mn. Ce mécanisme n'a pas encore été décrit en détail mais il pourrait être dû à une interaction entre le complexe et l'enzyme CumA (multicopper-oxydase), considérée comme responsable de l'oxydation du Mn, ou à l'interaction entre le complexe et la surface des oxydes déjà formés par le chemin parallèle d'oxydation enzymatique (Parker *et al.*, 2007).

L'absence apparente d'une reprise de la production de PVD semble montrer qu'à partir d'un certain état de croissance bactérienne, la formation directe de  $\text{MnO}_2$  est favorisée par rapport à la production de PVD.

La coloration brune observée en MO en Figure 5.5 est due à l'accumulation d'oxydes de Mn dans le biofilm, qui se trouvent dans la matrice extracellulaire environnant les cellules, comme montré par cartographie EDX en Figure 5.6. Ces oxydes ont été largement étudiés dans la littérature, Toner *et al.* (2005); Villalobos *et al.* (2003, 2006) ont montré que des nanoparticules de type birnessite sont formées, avec un état d'oxydation de Mn entre 3 et 4 mais plus proche de 4. Cette efficacité microbienne pour la formation d'oxydes de Mn a d'ailleurs mené certains auteurs à dire que la majorité des oxydes de Mn rencontrés dans la nature pourraient être d'origine biotique ou dérivés de l'altération de ces oxydes biogéniques (Tebo *et al.*, 2004).

Les résultats de minéralisation pour l'expérience de dissolution de VM coupée après 3 jours ont montré qu'une partie du Mn est adsorbée par les cellules bactériennes. Toutefois cette quantité est très faible et il est donc possible de conclure que la plupart du Mn est oxydé et reste piégé sous forme d'oxydes dans le biofilm.

En conclusion, le Mn est relâché en solution par le verre, il est complexé par la PVD, qui déclenche l'oxydation du Mn et est dégradée. Les oxydes de Mn produits s'accumulent dans la matrice extracellulaire composant le biofilm, qui va adhérer à la poudre de verre altérée.

## 5.6.2 Impact des bactéries sur la dissolution du verre

### Effet du milieu de culture

Une comparaison entre les deux *contrôles verre* (Figure 5.15a,c) est d'abord nécessaire pour discuter du comportement de dissolution de VM et VNM dans le milieu de culture et la comparaison avec le comportement en EUP + tampon carbonate du chapitre précédent. En termes de NLs et de vitesses de dissolution, les deux verres se dissolvent beaucoup plus rapidement dans le milieu de culture qu'en solution d'EUP. La vitesse de dissolution de VM passe de  $0,37 \text{ g/m}^2/\text{j}$  en EUP + tampon carbonate à  $1,87 \text{ g/m}^2/\text{j}$  en milieu de culture, et celle de VNM passe de  $0,88$  à  $1,50 \text{ g/m}^2/\text{j}$  (Tableaux 5.4).

Le changement de tampon peut affecter les cinétiques de dissolution. Une vitesse de dissolution plus élevée avait d'ailleurs déjà été observée pour VM en EUP + tampon HEPES 10 mM ( $1,0 \text{ g/m}^2/\text{j}$ ) par rapport à l'EUP + tampon carbonate ( $0,4 \text{ g/m}^2/\text{j}$ ) dans la partie du chapitre précédent dédiée au choix du tampon. La vitesse de dissolution de VM dans le milieu de culture est plus élevée qu'en solution d'EUP + tampon HEPES 10 mM. En effet le milieu de culture est riche en ions et composés qui peuvent avoir un effet supplémentaire sur la dissolution du verre (changement de la force ionique de la solution, changement de pH, effets de complexation...). Notamment le glucose introduit dans le milieu de culture en tant que source de carbone pour les bactéries pourrait être responsable d'une augmentation de la dissolution du verre, comme il a été démontré pour des feldspaths en présence de gluconates par Vandevivere *et al.* (1994).

Cela est vrai pour les deux verres, mais en les comparant il faut souligner que le VM

se dissout plus rapidement que le VNM, ce qui n'était pas le cas pour les deux contrôles en EUP + tampon carbonate. Dans le Chapitre 4, nous avons vu que la présence de DFOB entraînait une augmentation de la vitesse de dissolution plus importante pour le verre VM que pour le verre VNM. Cela a mené à la conclusion que la complexation du Mn par la DFOB constituait une étape fondamentale dans le processus de dissolution du verre. Ce même raisonnement pourrait être invoqué pour expliquer cette différence de comportement des deux verres dans le milieu de culture. Le VM présente ici une vitesse de dissolution plus élevée que VNM car il est plus sensible aux changements de composition de la solution à cause du rôle clé du Mn dans le processus de dissolution.

### Effet des bactéries sur le Si

Pour les deux verres, les NLs du Si en présence de bactéries restent proches de zéro et augmentent après quelques jours d'expérience (Figure 5.15b,d). Différentes possibilités peuvent être prises en considération pour expliquer ce comportement.

Les bactéries pourraient causer un ralentissement de la vitesse de dissolution du Si. Dans la littérature, des observations contrastantes ont été reportées. Dans l'étude de Perez *et al.* (2016) sur la dissolution des verres basaltiques en présence de *Pseudomonas aeruginosa*, il avait été possible d'observer un relâchement de Si, Fe et Al plus important en conditions biotiques par rapport à l'expérience abiotique. Le même type d'observation a été fait par Bennett *et al.* (2001) et Vandevivere *et al.* (1994) qui affirment que l'attachement microbien produit un microenvironnement à la surface minérale qui accélère la dissolution des silicates, notamment en relâchant des éléments comme P et Fe. Les biofilms sont en général considérés comme accélérateurs de la dissolution par rétention d'eau et par production localisée d'exsudats (Brehm *et al.*, 2005). En effet, au sein d'un biofilm il est possible de trouver des gradients de concentration d'éléments ou des gradients de pH et de potentiel redox (Liermann *et al.*, 2000a).

Un effet d'inhibition des bactéries a toutefois été observé dans la littérature. Dans le travail de Stockmann *et al.* (2012) sur la dissolution du verre basaltique en présence de *Pseudomonas reactans* par exemple, ils ont observé dans des réacteurs en continu des vitesses de dissolution de Si généralement plus faibles en ajoutant des cellules bactériennes mortes ou vivantes. Shirokova *et al.* (2012) ont observé un effet négligeable de la présence de *P. reactans* sur la dissolution de l'olivine. D'autres études ont aussi montré l'effet inhibiteur de dissolution de l'attachement du biofilm et sa capacité de retenir la plupart des éléments présents dans le système (Ullman *et al.*, 1996; Welch *et al.*, 1999; Aouad *et al.*, 2006). Ces différences de comportement montrent à quel point les propriétés d'altération varient d'une espèce à l'autre (même à l'intérieur du même genre *Pseudomonas*) et du substrat étudié.

Dans cette étude il semblerait que le biofilm soit produit dans un moment plus avancé de l'expérience de dissolution et il est donc difficile d'estimer si il est lié au "ralentissement" de la dissolution du Si qui est observé sur les premiers temps de dissolution. De plus, l'effet inhibiteur devrait être observé sur le relâchement de tous les éléments, ce qui n'est pas le cas dans les résultats décrits.

Autrement, le relâchement du Si pourrait commencer après quelques jours à cause de la production de PVD. Le moment à partir duquel les NLs de Si commencent à monter correspond en général au moment de production de la PVD. En effet les propriétés com-

plexantes de la PVD pourraient être la force motrice qui donne origine à la dissolution du verre. La PVD pourrait par exemple agir sur la complexation du Mn et cela pourrait engendrer une destabilisation majeure du réseau silicaté comme montré dans le chapitre précédent avec la DFOB. Les NLs du Mn (Figure 5.19) montrent que la chute en Mn coïncide aussi avec la montée des NLs du Si (Figure 5.18) et la production de la PVD (Figure 5.9). La PVD donc pourrait complexer le Mn en solution (en engendrant en même temps le processus d'oxydation de Mn), et ensuite aller complexer le Mn à la surface du verre, ce qui engendrerait la dissolution du verre. Par contre, en faisant le parallèle avec l'effet de la DFOB, une dissolution congruente du verre à partir du moment de la production de PVD aurait du être observée. A plus forte raison, cela devrait être le cas car la constante de formation du complexe PVD–Mn est encore plus élevée ( $\log K=47,5$ ) que celle du complexe DFOB–Mn ( $\log K=29,9$ ) (Parker *et al.*, 2004; Duckworth et Sposito, 2005b). Cet effet n'est pas observé en présence de PVD, mais il faut aussi se rappeler que la PVD produite par les bactéries de façon naturelle est produite en concentrations plus faibles (autour de  $10 \mu\text{M}$ ) que celles de la DFOB introduite artificiellement en solution dans le chapitre précédent (minimum  $50 \mu\text{M}$ ).

Enfin, une capture du Si par les bactéries est possible. Le fait que la stœchiométrie d'autres éléments comme K, Ca, P reste inchangée en présence de bactéries peut faire pencher pour ce scénario : le Si est relargué de manière "normale" en solution, puis incorporé à l'intérieur des cellules. Dans ce cas, le Si serait immédiatement assimilé par les bactéries, ce qui concorde avec les résultats de l'analyse des culots bactériens et comme discuté dans la section précédente. Pour rappel, en regardant les résultats des expériences de minéralisation des bactéries (Figure 5.12), en fin d'expérience après 8 jours le pourcentage massique de Si est très faible (autour de 0,1), alors qu'après 3 jours le pourcentage massique relatif à cet éléments est plus élevé (0,4). Il semblerait donc que les bactéries aient incorporé le Si pendant les 3 premiers jours pour ne plus en adsorber après, d'où la différence en terme de pourcentages massique. Cette dernière option est donc la plus vraisemblable. Le Si n'est toutefois pas un élément connu pour être utilisé dans les métabolismes cellulaires. L'intérêt bactérien de l'incorporation de cet élément reste donc inconnu et à investiguer.

### **Effet des bactéries sur les autres éléments du verre**

Dans le travail de Perez *et al.* (2016), l'accélération de la dissolution du verre en présence de *P. aeruginosa* est attribuée à la complexation du Fe(III) et de l'Al(III) en tant qu'éléments structuraux du verre. Les mêmes types de résultats ont été obtenus dans ce travail en présence du sidérophore DFOB dans le chapitre 3 suite à la complexation de l'Al(III) et du Mn(II/III), mais cela ne semble pas être le cas dans les tests de dissolution biotique directe faisant l'objet de ce chapitre. Il semblerait que la PVD produite naturellement par *P. putida* ne complexe pas le Mn et l'Al à la surface du verre, au contraire elle complexe le Mn relâché de façon abiotique par le verre dans le milieu de culture. Ceci amoindrit ou annule l'effet de destabilisation du réseau silicaté causé par la complexation de ces éléments à la surface du verre.

En ce qui concerne le K, en Figure 5.16 un changement de stœchiométrie de la disso-

lution du K pour les deux conditions de dissolution de VM à faibles S/V est observé. En effet en présence de VM 50 mg et VM 25 mg + *P. putida*, les NLs du K sont significativement plus élevées par rapport aux autres éléments qu'en présence de VM 100 mg. Il est intéressant faire ici un parallèle avec les mesures de pH reportées dans le Tableau 5.1 qui montrent que la présence de bactéries acidifie la solution, cela est probablement dû à la production d'acides ou de protons. Ainsi, le pH final est plus bas pour les expériences d'altération avec une plus petite quantité de verre, ce qui pourrait intensifier le mécanisme d'interdiffusion, comme observé en présence d'acide organique dans le chapitre 4.

## 5.7 Conclusions

Dans ce chapitre, la corrélation entre le comportement bactérien et la présence, la nature et la quantité de verre avec lequel les bactéries sont en contact a été mise en évidence. Plus il y a de verre en solution, plus la croissance bactérienne est rapide et plus tôt et avec une plus grande intensité les mécanismes de production de PVD et d'oxydation du Mn sont observés.

Ces comportements différents ont réciproquement un effet sur les éléments relâchés par la dissolution du verre.

Les mécanismes de dissolution d'un verre VM ou VNM en contact direct avec les bactéries sont différents par rapport aux conditions simplifiées présentées dans le Chapitre 4. Nous avons observé que la présence de *P. putida* et la production du sidérophore PVD ne semble pas augmenter la vitesse de dissolution du verre. Il semblerait que les éléments nutritifs relâchés par le verre sont suffisant à la croissance bactérienne et que les bactéries n'ont donc pas besoin d'aller puiser des éléments à la surface du verre.

Des informations plus détaillées sur l'incorporation des éléments par les microorganismes à différents moment de leur développement ont pu être obtenues. Notamment il a pu être mis en évidence qu'une partie du Mn est incorporée par les bactéries, mais la plupart de cet élément relâché par le verre est piégé dans le biofilm sous forme d'oxydes de Mn.





# Chapitre 6

## Formation des phases brunes

Un objectif de cette thèse était de former des phases brunes pour les caractériser. Dans ce chapitre, deux voies de synthèse ont été explorées, une voie abiotique et une voie biotique.

Dans la première partie du chapitre, la voie abiotique de production des phases brunes concerne des expériences d'imbibition de monolithes de verre préaltérés avec une solution riche en Mn (cf. Chapitre 2.4.1).

Dans la seconde partie du chapitre, une voie biotique est explorée par des expériences de croissance de biofilm de la souche modèle *P. putida* sur la surface de monolithes de verre (cf. Chapitre 2.4.2) selon le protocole développé par la doctorante Laura Galezowski de l'IMP MC et adapté pour cette étude.

### 6.1 Formation de phases brunes d'origine abiotique : tests d'imbibition

#### 6.1.1 Observations en microscopie optique

Les surfaces de deux échantillons préaltérés à pH 3 et pH 6 sont montrées en microscopie optique en lumière coaxiale en Figure 6.1. VM et VNM présentent la même morphologie de surface suite à la préaltération, ainsi uniquement un échantillon par pH a été choisi comme représentatif et reproduit sur la figure. Cette modalité d'éclairage, la lumière coaxiale, permet de mettre en valeur les caractéristiques de surface. Les échantillons altérés à pH 3 (Figure 6.1a) présentent une surface fracturée, avec la formation d'écailles partiellement ou complètement détachées. Les échantillons altérés à pH 6 (Figure 6.1b) ont une surface lisse mais présentent des figures d'interférence bien visibles, indice de la présence d'une couche d'altération avec un indice de réfraction différent par rapport au verre sain.

L'aspect de la surface des échantillons suite à l'expérience d'imbibition du manganèse est montrée en Figure 6.2 en lumière annulaire. Cette modalité d'éclairage permet d'observer les couleurs réelles des échantillons. La surface polie (haut) présente une légère coloration marron, alors que la surface du bas, non polie et en contact avec le fond du bécher, présente une forte coloration marron. Cette même observation a été faite par Watkinson *et al.* (2005) suite à leur expérience de reproduction du brunissement.

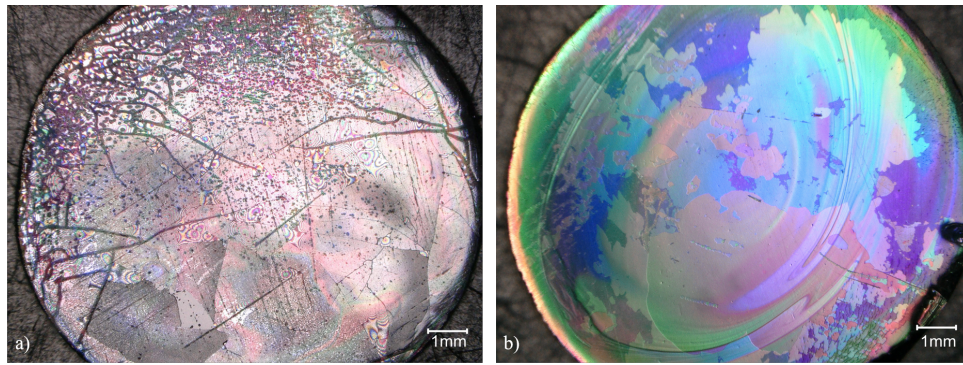


FIGURE 6.1 – Images au microscope optique numérique en lumière coaxiale des surfaces des échantillons de VNM altérés à 30°C pendant 3,5 mois a) à pH3 et b) à pH6.

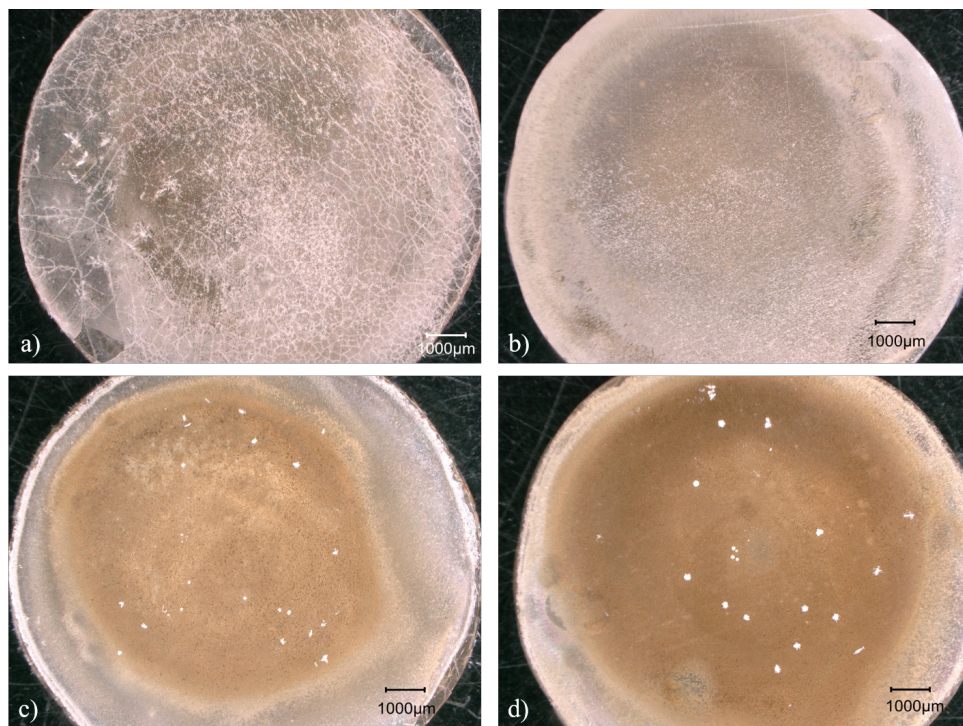


FIGURE 6.2 – Images au microscope optique numérique en lumière annulaire de la surface des échantillons suite à l'expérience d'imbibition d'une solution de  $MnCl_2$  à 30°C pendant 1,5 mois. Échantillon VNM-pH3-Mn a) surface polie exposée à la solution et c) surface non polie posée sur le fond du réacteur. Échantillon VNM-pH6-Mn b) surface polie exposée à la solution et d) surface non polie posée sur le fond du réacteur.

En Figure 6.3 sont montrées en coupe transversale les couches d'altération de la face polie et exposée à la solution des échantillons VM-pH3, VNM-pH3 et VNM-pH3-Mn. L'épaisseur des couches d'altération à pH3 est de l'ordre de  $30\mu m$  pour les trois échantillons. Il est possible de voir une coloration marron très intense pour l'échantillon VNM-pH3-Mn, alors que le bulk du même échantillon est incolore. Les couches d'altération à pH6 sont plus petites que celles à pH3 et ne sont pas observables en microscopie optique.

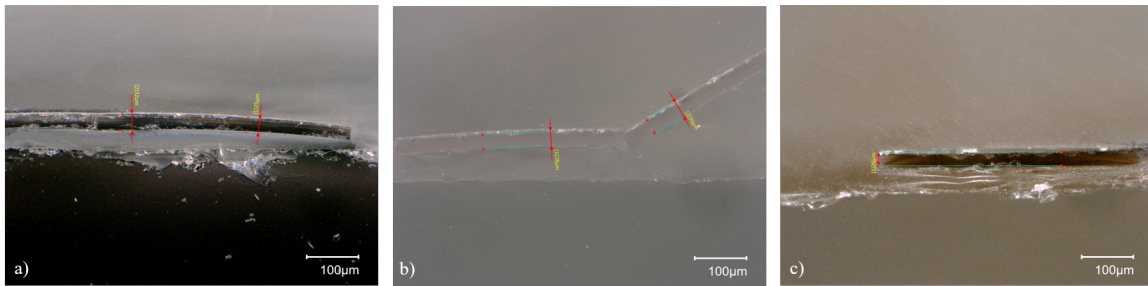


FIGURE 6.3 – Images au microscope optique numérique en lumière annulaire de la coupe transversale de la couche d’altération de la face polie et exposée à la solution des échantillons a) VM-pH3 b) VNM-pH3 et c) VNM-pH3-Mn

### 6.1.2 Observations au MEB

Les échantillons présentés en Figure 6.3 ont été observés à un plus fort grossissement en imagerie électronique et sont montrés en Figure 6.4. Sur ces images les couches d’altération pour les trois échantillons apparaissent constituées de plusieurs petites sous-couches d’épaisseur entre  $0,3$  et  $2 \mu\text{m}$  (sur une épaisseur totale de  $30 \mu\text{m}$ ), avec les couches plus externes partiellement détachées.

Les petites sous-couches (lamelles) de l’échantillon VNM-pH3-Mn présentent une alternance de zones claires et foncées. Ce fort contraste n’a pas été observé pour les échantillons VNM-pH3 et VM-pH3. Cette différence de contraste en électrons retrodiffusés (BSE) peut suggérer une distribution différentielle d’éléments parmi les différentes lamelles. Le Mn étant un métal plus lourd que les autres éléments du verre, il apparaît plus clair en BSE. Un enrichissement en Mn dans certaines lamelles pourrait donc être la cause de ces contrastes dans les lamelles de l’échantillon VNM-pH3-Mn, comme cela a été observé par exemple par Schalm *et al.* (2011) sur des échantillons de vitraux archéologiques. Ces auteurs trouvent pour certains échantillons une correspondance entre la présence de nodules riches en Mn et des lamelles moins denses.

En Figure 6.5 une cartographie élémentaire de la couche d’altération de l’échantillon VNM-pH3-Mn est montrée. Comme attendu, la couche est appauvrie en alcalins et alcalino-terreux et enrichie en Si, Al, O et partiellement en P. Il est également possible d’observer l’enrichissement en Mn dans toute la couche altérée causé par l’expérience d’imbibition.

Pour comparaison, la cartographie de la couche d’altération de l’échantillon VM-pH3 en Figure 6.6 montre que la couche est enrichie en Si, Al et O et appauvrie en alcalins et alcalino-terreux. En ce qui concerne le Mn, il n’est observé ni enrichissement, ni appauvrissement.

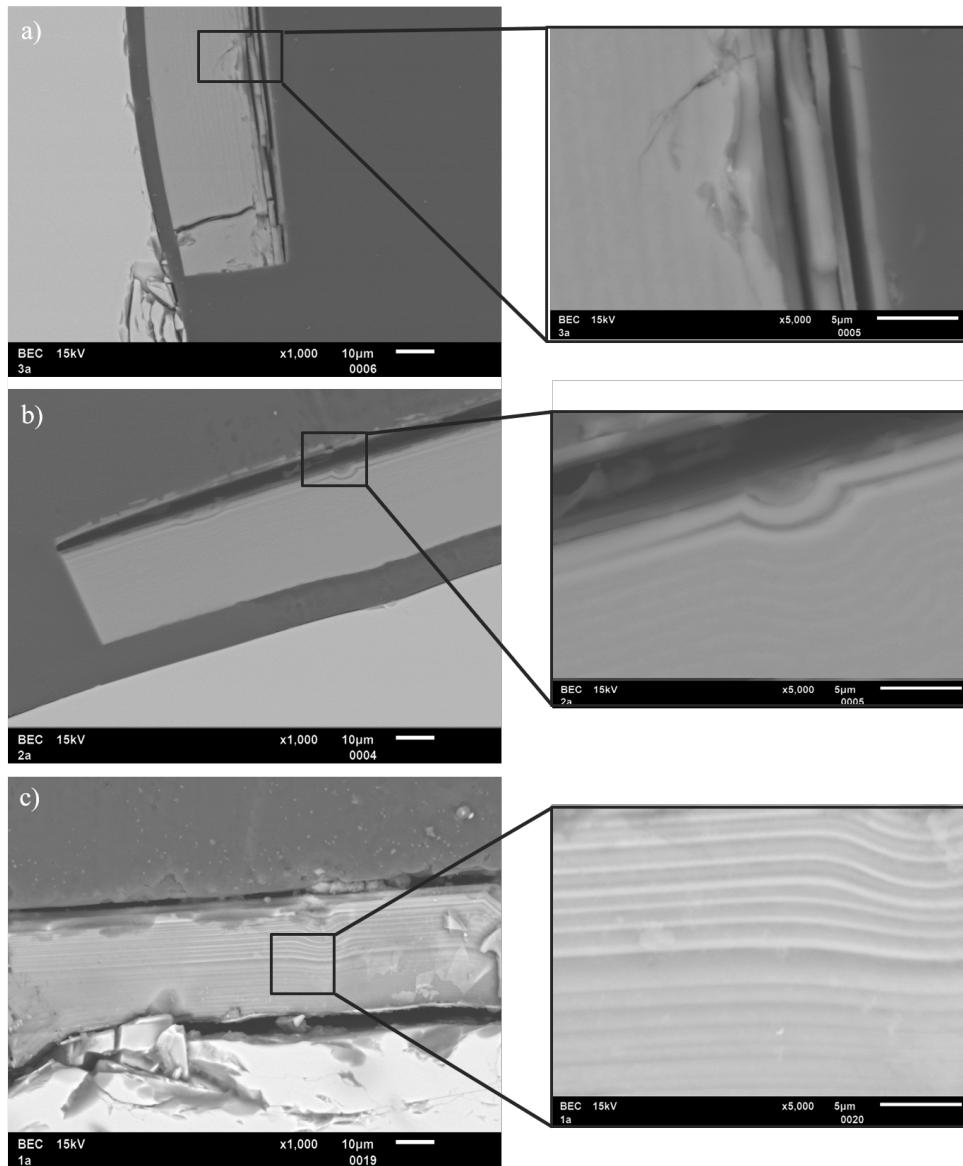


FIGURE 6.4 – Détails au MEB en mode électrons retrodiffusés des couches altérée de la face polie et exposée à la solution des échantillons a) VM-pH3, b) VNM-pH3, c) VNM-pH3-Mn. Des lamelles sont présentes dans la couche d'altération pour les trois échantillons.

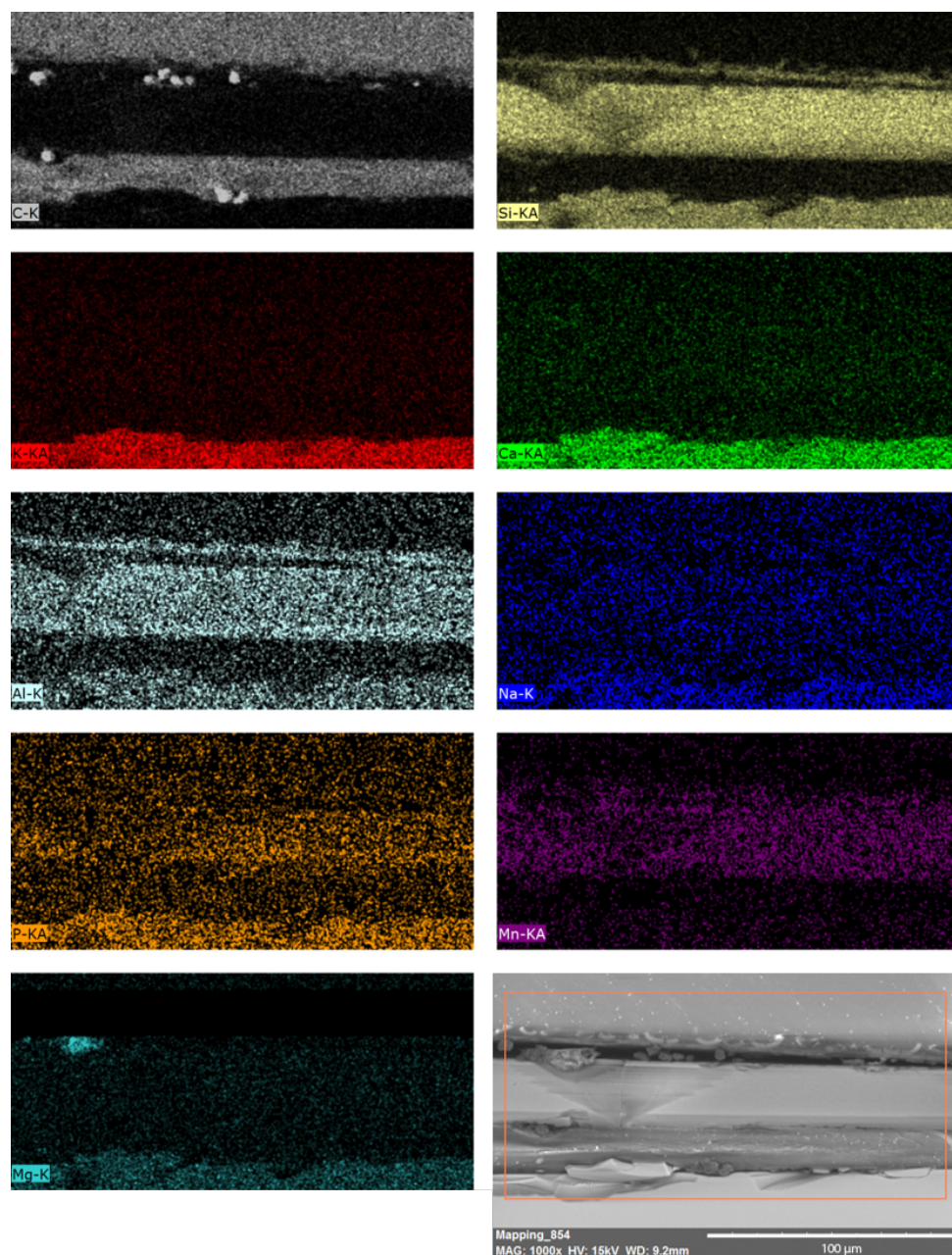


FIGURE 6.5 – Cartographie MEB de la couche d'altération de la face polie et exposée à la solution de l'échantillon VNM-pH3-Mn. La couche altérée est enrichie en Mn.

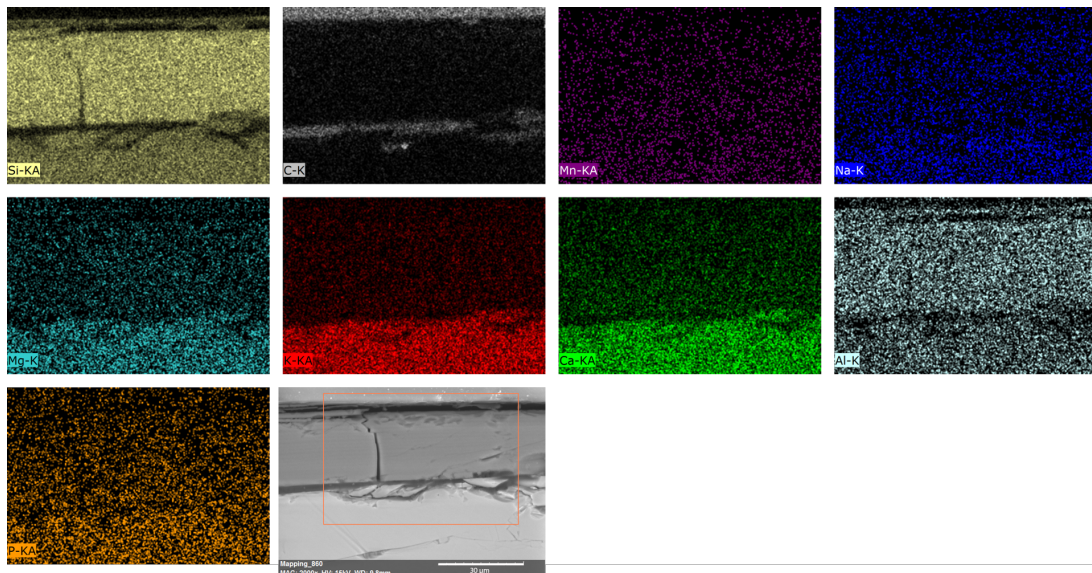


FIGURE 6.6 – Cartographie MEB de la couche d’altération de la face polie et exposée à la solution de l’échantillon VM-pH3

En examinant les surfaces non polies des échantillons posés sur le fond du réacteur en MEB en Figure 6.7, un épais dépôt d'une phase riche en Ca et P a été observé. Ce même dépôt a aussi été retrouvé à l'intérieur de fractures sur la face du haut de certains échantillons. Le même phénomène est reporté par Sessegolo *et al.* (2018) et Müller (1999) et il est probablement dû à des conditions spécifiques de type fissure sur le fond du réacteur et dans les fractures, où des gradients de concentrations de ces éléments peuvent résulter en une précipitation de phases cristallines. Cette phase riche en Ca et P a également été trouvée sur la surface du bas des échantillons brunis, mais dans ces cas là elle présente aussi un enrichissement en Mn, comme montré en Figure 6.8. A d'autres endroits sur le fond de l'échantillon il est aussi possible d'observer un fin dépôt riche en Mn comme en Figure 6.9. Il apparait donc que sur le fond du réacteur le Mn a soit été incorporé dans le phosphate de Ca, soit il a formé un dépôt plus externe, constituant ainsi le dépôt brun visible à œil nu. L'objectif de ce chapitre étant d'observer la diffusion du Mn à l'intérieur de la couche d'altération du verre, par la suite nous discuterons uniquement des résultats et des phénomènes qui se passent sur la face polie de l'échantillon en contact avec la solution, où un enrichissement en Mn a été observé à l'intérieur de la couche d'altération (Figure 6.5).

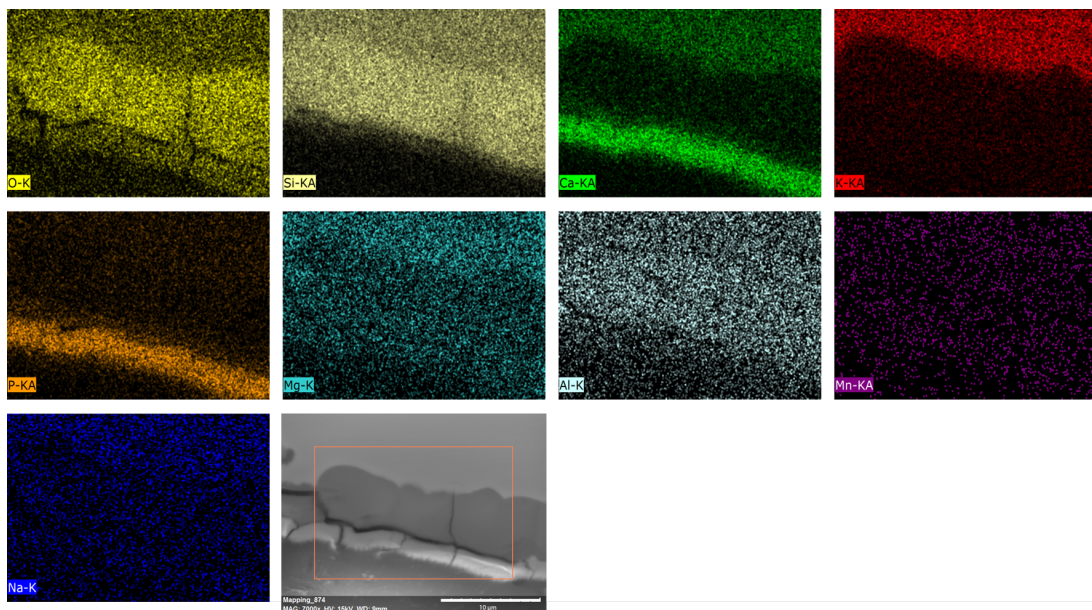


FIGURE 6.7 – Cartographie MEB de la coupe transversale de la couche d'altération de la surface non polie et en contact avec le fond du réacteur de l'échantillon VNM-pH3 avec dépôt de phase riche en Ca et P.



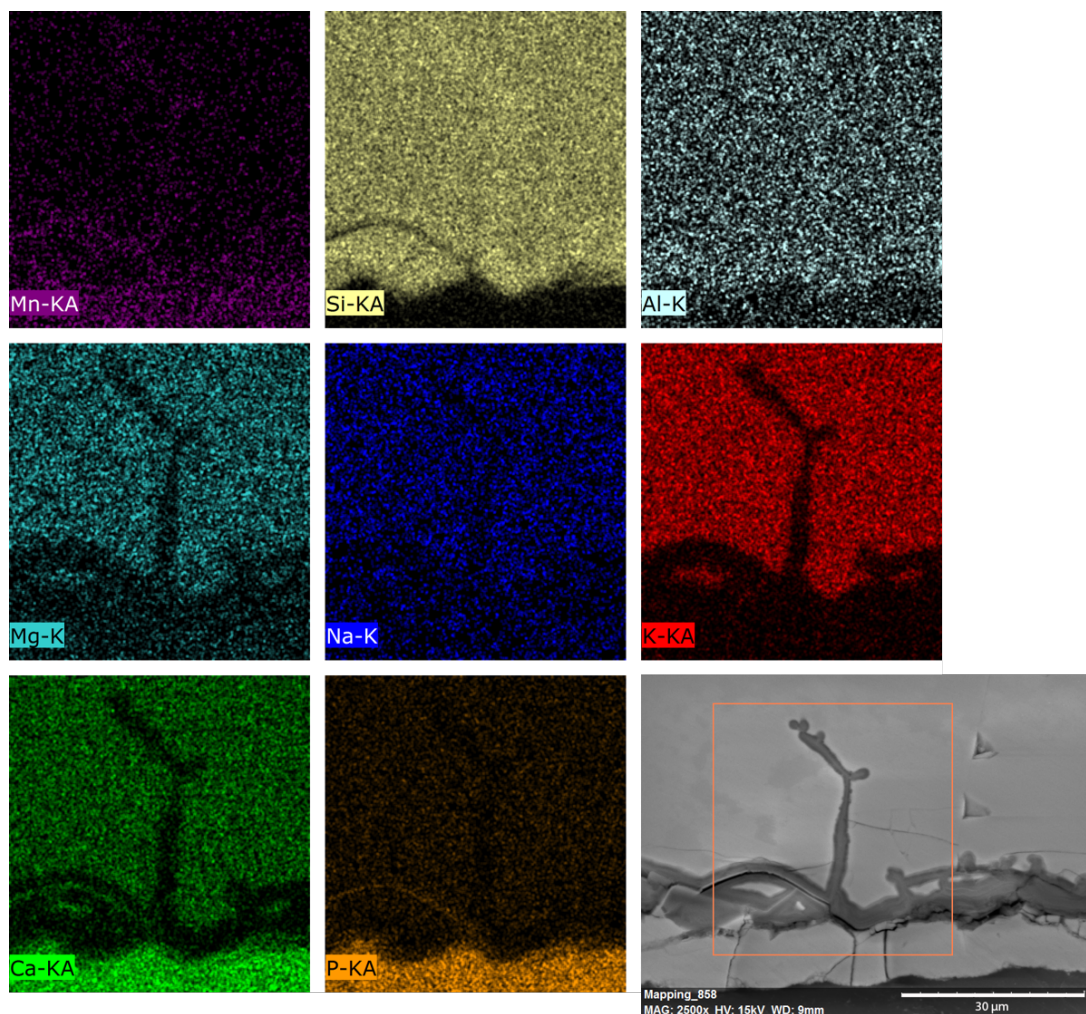


FIGURE 6.8 – Cartographie MEB de la coupe transversale de la couche d’altération de la surface non polie et en contact avec le fond du réacteur de l’échantillon VNM-pH3-Mn avec dépôt de phase riche en Ca, P et Mn.

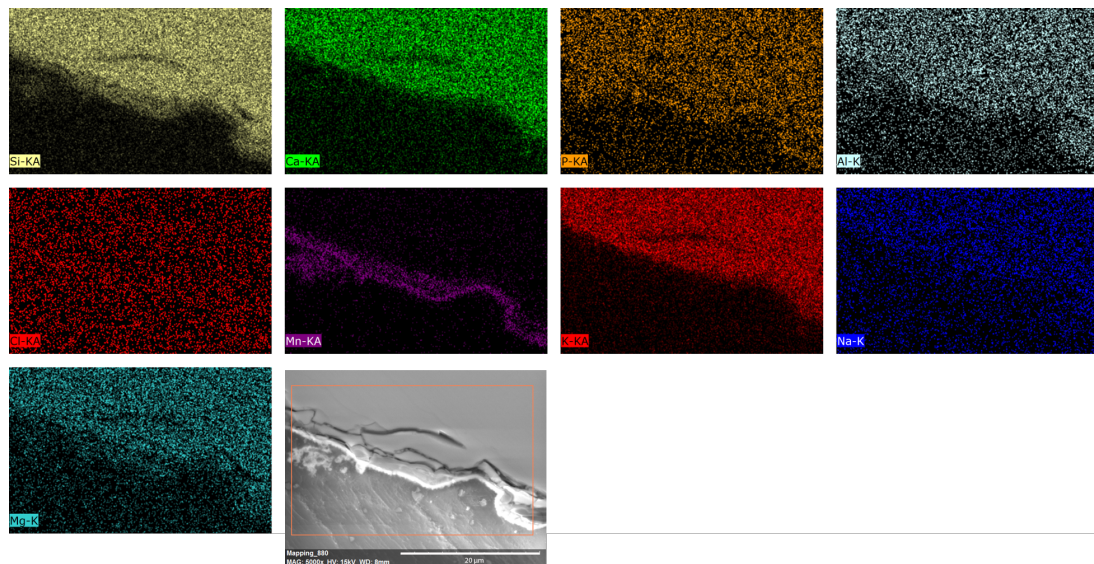


FIGURE 6.9 – Cartographie MEB de la coupe transversale la couche d'altération de la surface non polie et en contact avec le fond du réacteur de l'échantillon VNM-pH3-Mn avec dépôt riche en Mn.

### 6.1.3 Analyse à la microsonde électronique

Dans le Tableau 6.1, les résultats obtenus par analyse à la microsonde électronique pour les échantillons pré altérés et les échantillons brunis, ainsi que les résultats pour certains échantillons analysés lors du travail de Ferrand (2013) sont reportés.

Plusieurs problèmes ont été rencontrés lors de l'analyse des couches d'altération. D'une part, les couches d'altération peuvent être assez petites et discontinues, ce qui rend les bonnes zones d'analyse rares. D'autre part, pour tous les échantillons des vides entre la couche d'altération et le verre sain et/ou entre la couche et la résine ont été observés, compliquant d'autant plus le choix des zones. Ceci est probablement dû à un retrait de la résine ou de la couche lors du durcissement de la résine. Pour ces raisons, et du fait de sa faible épaisseur, il a été impossible d'analyser la couche altérée de l'échantillon VM-pH6 lors des mesures effectuées avec la microsonde de Potsdam et d'obtenir une meilleure statistique pour d'autres couches d'altération.

Suite aux difficultés rencontrées, une session complémentaire de microsonde a été effectuée à la plateforme Camparis, sur le campus de Jussieu à Paris. Des échantillons répliques pour VM-pH6 et VNM-pH6-Mn ont été enrobés, en tentant de perfectionner la technique d'enrobage, mais la même problématique a été rencontrée. Les résultats de ces analyses sont montrés aussi dans le Tableau 6.1. Pour les deux échantillons analysés, on observe des valeurs plus élevées en alcalins et plus basses en Si par rapport aux valeurs moyennes obtenues pour les autres couches d'altération lors des analyses avec la microsonde de Potsdam.

Il est important ici de souligner que les conditions d'analyse dans les deux cas étaient un peu différentes. Un problème classique d'analyse de verre et minéraux à la microsonde est la volatilisation des éléments alcalins, qui peut fausser les résultats finaux. A cause de ce problème, plusieurs solutions peuvent être adoptées. Pour la microsonde de Potsdam, l'analyse a été effectuée avec une tension de 15kV, un faible courant (3,5 nA) et en réduisant le temps d'analyse des alcalins (6 secondes au lieu de 10) en gardant le diamètre du faisceau de 2  $\mu\text{m}$ . A la microsonde de la plateforme de Camparis, la même tension de 15kV a été utilisée mais il a été choisi de garder un courant de 10 nA et un temps d'analyse de 10 secondes pour tous les éléments mais en défocalisant le faisceau à 5  $\mu\text{m}$ . Ces différentes conditions d'analyses pourraient expliquer les différents résultats entre les résultats obtenus avec la microsonde de Potsdam et celle de Paris. En effet, le plus grand diamètre du faisceau lors des analyses à la plateforme Camparis pourrait de la résine ou du verre sain.

Les difficultés rencontrées lors de l'analyse de ces phases d'altération sont donc données par leur forte réactivité et leur faible dimension. Pour être en confiance avec les résultats obtenus, uniquement les résultats obtenus avec la microsonde de Potsdam seront pris en compte. Dans la limite des barres d'erreurs il est en effet possible dégager des tendances en regardant les enrichissement relatifs des éléments.

Aucune composition des couches altérées, une fois sommée, n'arrive à un total de 100 en poids% d'oxyde, avec un total moyen autour de 85% pour la plupart des échantillons mesurés avec la microsonde de Potsdam. Ceci est dû au taux d'hydratation élevé, car les éléments hydratants (H et O) ne sont pas détectés en microsonde. Cette valeur assez constante du total pourrait donc indiquer un niveau d'hydratation équivalent à pH 3 et pH 6.

Toutes les couches d'altération présentent une forte désalcalinisation. En effet, le  $\text{Na}_2\text{O}$  est à 0 % alors qu'il est à 1,20% dans le verre sain. Le  $\text{K}_2\text{O}$  se situe aussi à des valeurs inférieures à 1% alors qu'il est autour de 18-19% dans le verre sain. Les couches d'altération sont également appauvries en  $\text{CaO}$  (3-4% au lieu de 17-18%),  $\text{MgO}$  (moins de 1% au lieu de 4%),  $\text{P}$  (1 - 2 % au lieu de 3%),  $\text{MnO}$  (0,5% au lieu de 2%) et enrichies en formateurs de réseau  $\text{SiO}_2$  et  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (autour de 70% et de 3-4% dans les couche altérées au lieu de 51-52% et 1,8%, respectivement, dans le verre sain).

Concernant les échantillons brunis, les résultats de l'analyse de VNM-pH6-Mn effectuée avec les deux instruments de microsonde ne semblent pas fiables car dans le cas de la microsonde de Potsdam le total est trop faible, et dans le cas de la microsonde Camparis les valeurs s'éloignent énormément des valeurs attendues et obtenues pour les autres couches d'altération. Toutefois, un enrichissement en Mn est certainement observé, mais avec une énorme variabilité ( $10,6 \pm 5,6$ ). Pour l'échantillon VNM-pH3-Mn, un enrichissement en MnO de  $5,8 \pm 0,3$  est obtenu. Cet enrichissement est comparable aux pourcentages d'enrichissement trouvées pour les échantillons PLOG et ROSC de la thèse de J. Ferrand. Il serait intéressant de pouvoir trancher sur une différence perméabilité au Mn de la couche altérée à pH 3 ou à pH 6, mais cela n'est pas possible car les totaux de l'analyse de ces deux échantillons sont trop différents pour interpréter de façon fiable les différences de pourcentages de MnO.

|             | échantillon   | Na <sub>2</sub> O | Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | K <sub>2</sub> O | SiO <sub>2</sub> | MgO       | P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | MnO        | Cl        | CaO        | Total      | pts |
|-------------|---------------|-------------------|--------------------------------|------------------|------------------|-----------|-------------------------------|------------|-----------|------------|------------|-----|
| verre sain  | VNM sain **   | 1,2 ± 0,0         | 1,9 ± 0,1                      | 18,8 ± 0,3       | 52,4 ± 0,5       | 4,3 ± 0,1 | 3,4 ± 0,3                     | 0,0 ± 0,1  |           | 17,6 ± 0,2 | 99,7 ± 0,4 | 10  |
|             | VM sain **    | 1,2 ± 0,0         | 1,8 ± 0,0                      | 18,3 ± 0,1       | 51,5 ± 0,4       | 4,3 ± 0,1 | 3,2 ± 0,2                     | 2,0 ± 0,1  |           | 17,3 ± 0,2 | 99,8 ± 0,3 | 10  |
| pre-altérés | VNM pH 3      | 0,1 ± 0,1         | 2,6 ± 0,2                      | 0,9 ± 0,4        | 71,8 ± 2,2       | 0,5 ± 0,0 | 2,5 ± 0,7                     | 0,0 ± 0,0  | 0,0 ± 0,0 | 3,2 ± 0,3  | 81,7 ± 1,3 | 10  |
|             | VNM pH 6      | 0,0 ± 0,0         | 3,1 ± 0,2                      | 0,6 ± 0,3        | 70,1 ± 4,9       | 1,1 ± 0,2 | 2,2 ± 1,1                     | 0,0 ± 0,0  | 0,0 ± 0,0 | 4,4 ± 1,4  | 81,7 ± 4,6 | 10  |
| imbibition  | VM pH 3       | 0,0 ± 0,0         | 3,7 ± 0,1                      | 0,8 ± 0,1        | 78,3 ± 1,6       | 0,2 ± 0,0 | 0,7 ± 0,5                     | 0,4 ± 0,1  | 0,0 ± 0,0 | 1,4 ± 0,3  | 85,6 ± 2,1 | 10  |
|             | VM pH 6 **    | 0,3 ± 0,1         | 2,4 ± 0,8                      | 2,1 ± 0,9        | 45,8 ± 2,7       | 0,8 ± 0,3 | 1,2 ± 0,5                     | 1,1 ± 0,2  |           | 3,5 ± 1,3  | 57,3 ± 2,7 | 7   |
|             | VNM-pH3-Mn    | 0,0 ± 0,0         | 2,8 ± 0,1                      | 0,1 ± 0,0        | 75,0 ± 1,6       | 0,1 ± 0,0 | 1,5 ± 0,4                     | 5,8 ± 0,3  | 0,4 ± 0,0 | 0,4 ± 0,1  | 86,0 ± 1,5 | 10  |
|             | VNM-pH6-Mn    | 0,0 ± 0,0         | 3,7 ± 3,5                      | 0,8 ± 0,1        | 44,1 ± 10,0      | 0,3 ± 0,2 | 2,1 ± 1,8                     | 10,6 ± 5,6 | 3,7 ± 3,8 | 2,1 ± 1,7  | 66,6 ± 1,6 | 2   |
| J. Ferrand  | VNM-pH6-Mn ** | 0,3 ± 0,1         | 3,6 ± 0,6                      | 4,6 ± 2,2        | 59,3 ± 6,0       | 1,2 ± 0,6 | 1,9 ± 0,6                     | 6,6 ± 0,7  |           | 4,6 ± 2,0  | 82,2 ± 9,1 | 7   |
|             | PLOG Sain     | 3,2±0,1           | 1,3±0,1                        | 10,6±0,3         | 55,6±0,5         | 7,5±0,1   | 3,8±0,1                       | 0,8±0,1    | 0,5±0,1   | 15,9±0,2   | 99,8±0,4   | 10  |
|             | PLOG Altéré   | 0,7               | 1,8                            | 0,3              | 41,5             | 0,8       | 8,6                           | 9,7        | 0         | 15,3       | 79,3       | 1   |
|             | LANN Sain     | 3,8±0,1           | 1,1±0,1                        | 14,7±0,1         | 52,7±0,3         | 7,4±0,1   | 4,0±0,1                       | 1,1±0,1    | 0,5±0,1   | 13,0±0,2   | 99,9±0,4   | 10  |
|             | LANN Altéré   | 0,3               | 1,5                            | 2,5              | 60,3             | 0,4       | 1,9                           | 3,1        | 1         | 1,6        | 74,1       | 1   |
|             | ROSC Sain     | 3,9±0,1           | 1,2±0,1                        | 12,9±0,2         | 53,4±0,5         | 7,9±0,1   | 4,1±0,1                       | 1,0±0,1    | 0,5±0,1   | 14,2±0,1   | 99,8±0,6   | 10  |
|             | ROSC Altéré   | 0,4               | 1,4                            | 1                | 45,7             | 0,5       | 2,6                           | 7,5        | 0,2       | 2          | 62,2       | 1   |
|             | EV1 Sain      | 0,7±0,1           | 2,5±0,1                        | 16,9±0,5         | 52,5±0,4         | 4,3±0,2   | 3,2±0,1                       | 1,1±0,1    | 0,3±0,0   | 15,4±0,2   | 98,1±1,0   | 10  |
|             | EV1 Altéré    | 0,2               | 3,9                            | 1,9              | 69,8             | 0,4       | 1,8                           | 1,5        | 0,3       | 1,2        | 82,6       | 1   |
|             | ED1 Sain      | 0,3±0,1           | 2,7±0,1                        | 17,3±0,4         | 47,2±0,4         | 4,4±0,1   | 2,5±0,1                       | 1,0±0,1    | 0,1±0,0   | 19,1±0,3   | 95,4±0,8   | 10  |
|             | ED1 Altéré    | 0,1               | 4,2                            | 2,4              | 63,1             | 0,6       | 1,4                           | 2,2        | 0,2       | 2,8        | 78         | 1   |

TABLEAU 6.1 – Pourcentage de poids d'oxyde de la composition des couches d'altération mesurés en microsonde. Les échantillons avec \*\* ont été mesurés à la microsonde de la plateforme Camparis, les autres à la microsonde de Potsdam. Les valeurs de certains échantillons de la thèse de J. Ferrand sont également reportées pour comparaison. Les erreurs sont calculées sur la moyenne de plusieurs mesures sur le même échantillon, le nombre de points d'analyse est indiqué dans la dernière colonne de tableau (pts).

### 6.1.4 Observations au METB et étude de cristallinité au MET

Des lames FIB des couches d'altération ont été effectuées et observées au GFZ de Potsdam. Les échantillons étant très réactifs sous le faisceau du MET, suite à des premières tentatives qui se sont conclues par la destruction partielle des échantillons (problème déjà reporté dans la littérature par Denatale et Howitt (1984); Jiang *et al.* (2003); Kutzschbach *et al.* (2018)), les observations ont donc été faites dans un MEB en modalité en transmission à balayage. Cet instrument est un MEB qui dispose d'un porte-échantillon pour lames FIB qui permet d'observer des échantillons en transmission électronique à des énergies plus faibles qu'un MET et en balayant le faisceau électronique sur tout l'échantillon. Avec cet instrument, il a été possible d'obtenir des cartographies élémentaires en METB des lames FIB d'un grand nombre d'échantillons.

Les couches d'altération obtenues à pH 3 étant très réactives sous le faisceau, des problèmes ont aussi été rencontrés lors de la préparation des lames FIB. En conséquence, ces échantillons présentent souvent des trous et des hétérogénéités d'épaisseur. A titre d'exemple, la cartographie METB pour l'échantillon VNM-pH3-Mn est donnée en Figure 6.10. Ces observations n'ont pas permis de mettre en évidence des éventuelles différences de composition des différentes lamelles.

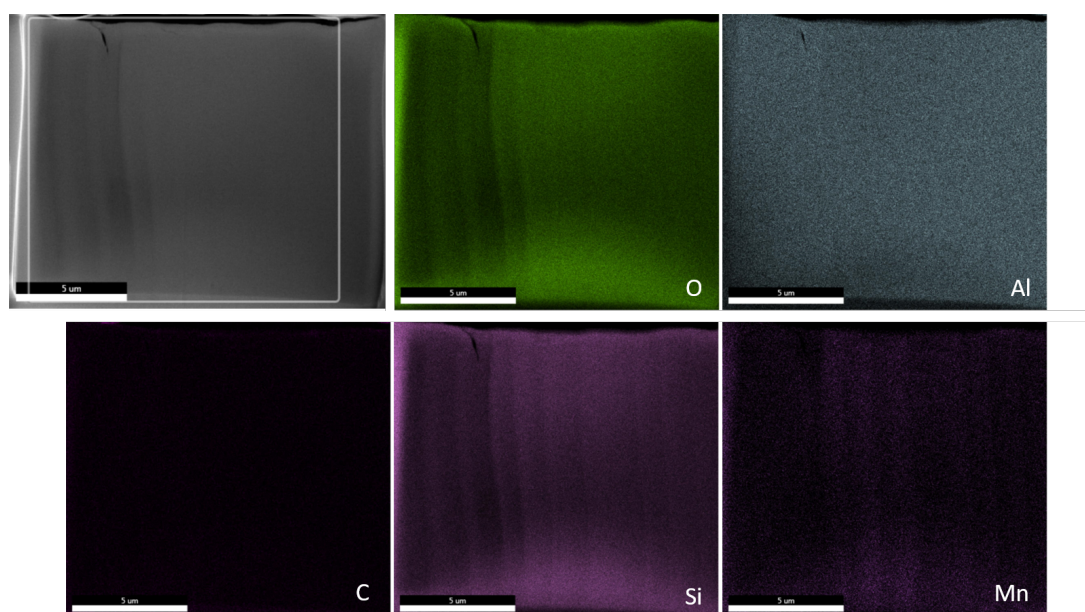


FIGURE 6.10 – Cartographie de la lamelle FIB de l'échantillon VNM-pH3-Mn au microscope électronique en transmission à balayage. Lamelle FIB effectuée à partir d'un échantillon enrobé.

En ce qui concerne les échantillons à pH 6, cette technique a permis d'observer les couches d'altération et d'en mesurer l'épaisseur. Pour VM-pH6 (Figure 6.11) la couche altérée a une épaisseur entre 1,5 et 2  $\mu\text{m}$ , alors que pour VNM-pH6 (Figure 6.12), elle mesure entre 5 et 7  $\mu\text{m}$ .

Ces couches présentent des lamelles de dimension sub-micrométrique ayant des distributions élémentaires parfois différentes. En général, l'appauvrissement en alcalins et

alcalino-terreux est observé. En ce qui concerne Mn, la couche d'altération pour l'échantillon VM-pH6 (Figure 6.11) présente différentes lamelles identifiables grâce à la distribution de Si, Al et O qui sont les éléments constituant principalement la couche d'altération. La distribution de Mn à l'intérieur de la couche suit plutôt celle de K et Ca, il apparaît donc que cet élément a plutôt été lixivié.

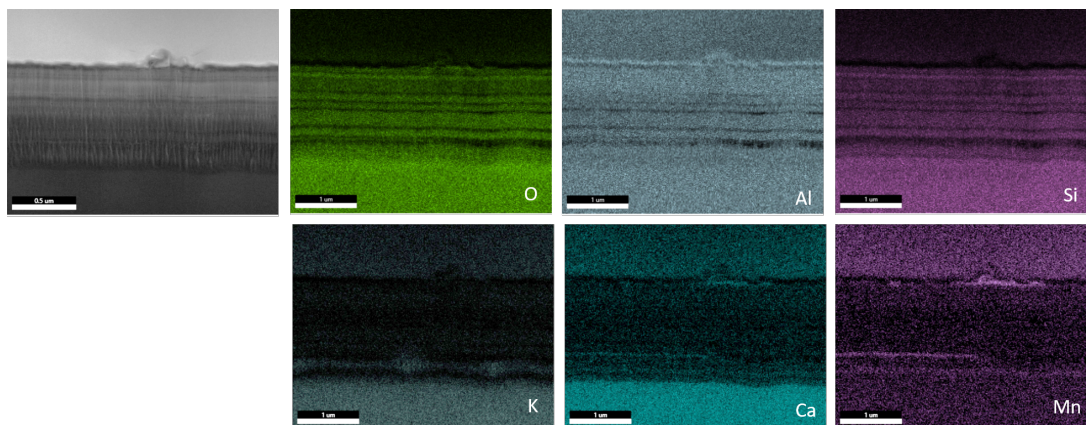


FIGURE 6.11 – Cartographie de la lamelle FIB de l'échantillon VM-pH6 au microscope électronique en transmission à balayage. Lamelle FIB effectuée à partir d'un échantillon non enrobé.

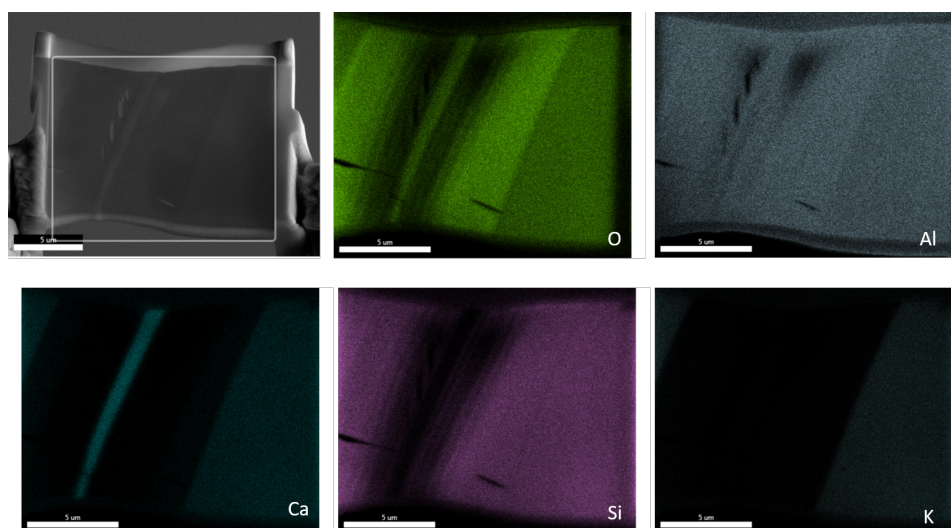


FIGURE 6.12 – Cartographie de la lamelle FIB de l'échantillon VM-pH6 au microscope électronique en transmission à balayage. Lamelle FIB effectuée à partir d'un échantillon enrobé, au niveau d'une fracture du verre perpendiculaire à la surface. La couche altérée suit la fracture et une phase riche en Ca remplit la fracture.

En Figure 6.13 la cartographie METB de l'échantillon VNM-pH6-Mn est reportée. Une distribution du Mn préférentielle dans certaines lamelles est observée. Une lamelle riche en Mn et O a été choisie pour effectuer de la diffraction électronique au MET afin d'étudier l'état de cristallinité de cette phase. Aucune figure de diffraction n'a été détectée (Figure 6.14), suggérant que cette phase est plutôt amorphe ou mal organisée.

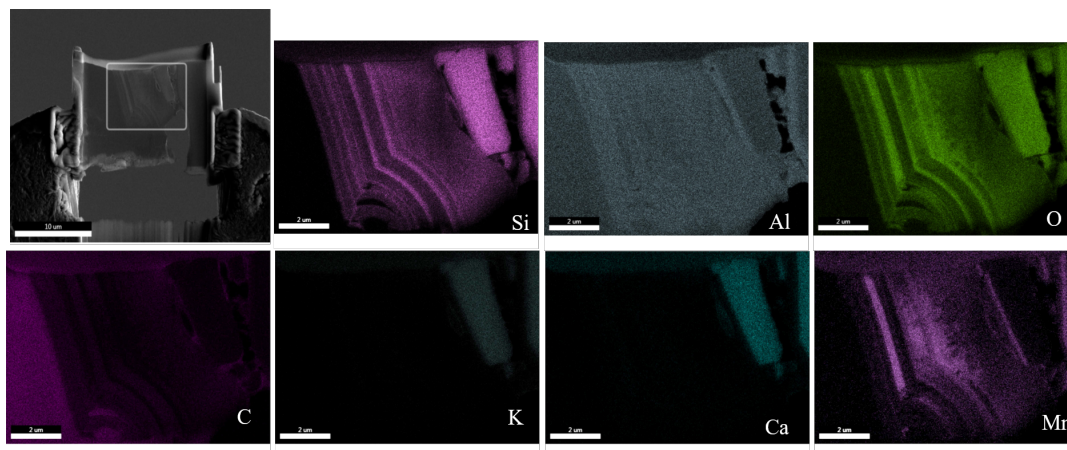


FIGURE 6.13 – Cartographie de la lamelle FIB de l'échantillon VNM-pH6-Mn au microscope électronique à balayage-transmission. Lamelle FIB effectuée à partir d'un échantillon enrobé.

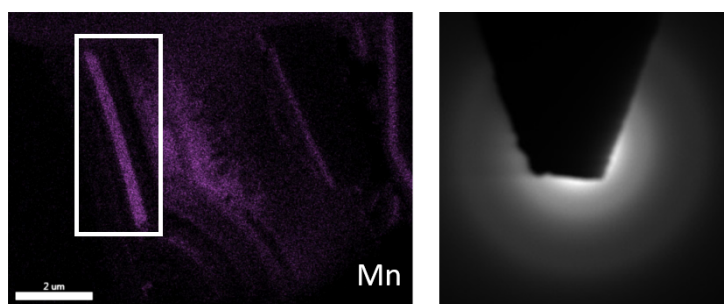


FIGURE 6.14 – Diffraction électronique au MET effectuée sur la lamelle riche en Mn et O de l'échantillon VNM-pH6-Mn

### 6.1.5 Discussion

La comparaison entre le verre VM et VNM à pH 6 montre que le VM a une couche d'altération sensiblement plus fine (environ  $2\ \mu\text{m}$ ) que le VNM (environ  $6\ \mu\text{m}$ ). Ces observations sont cohérentes avec les résultats du Chapitre 4 sur les cinétiques de dissolution de VM et VNM qui ont montré que VM s'altère moins rapidement que VNM (facteur 2,4) en solution d'EUP à pH proche de la neutralité.

#### La formation de la couche d'altération

Nous avons vu que le résultat de l'altération est la formation d'une couche altérée poreuse, hydratée et desalcalinisée avec des sous-couches, dont la formation est débattue.

Cela a déjà été observé sur des échantillons de vitraux historiques (Sterpenich, 1998; Schalm *et al.*, 2011; Gentaz, 2011; Lombardo *et al.*, 2013). Lombardo *et al.* (2013) distinguent deux sub-unités d'altération. Les *laminae* ont une épaisseur de 20-50 nm, et les *laminations* qui sont des clusters de *laminae* ayant la même orientation et une épaisseur variable entre 0,5 et  $4\ \mu\text{m}$ . À l'intérieur de ces laminations il est possible de distinguer des zones à contraste différent, attribués à des hétérogénéités en densité et porosité. La formation des lamelles est attribuée à l'avancée de fronts d'altération selon Lombardo *et al.*



(2013). La première étape de l'altération serait l'interdiffusion qui, à un certain point est limitée par la présence d'une discontinuité (hétérogénéité du verre ou épaisseur de la couche altérée) qui va causer la formation d'une sub-unité d'altération, la lamination. La reprise de l'altération crée la formation de nouvelles laminations. Suivant ce modèle, dans nos expériences la formation des lamelles pourrait être due au front d'altération causé par la montée du pH à cause de l'interdiffusion qui cause un ralentissement de l'altération, avec une reprise d'altération régulière donnée par l'ajustement du pH au pH initial de façon cyclique.

Une autre hypothèse est avancée par Schalm et Anaf (2016). Ces auteurs suggèrent que la formation de lamelles pourrait être due à l'entassement plus ou moins dense de nanoparticules de  $\text{SiO}_2$  amorphe. Dans ce cas, le Mn en solution (relâché lors de la dissolution) resterait donc piégé dans la formation de ces lamelles par la précipitation et/ou entassement de nanoparticules de  $\text{SiO}_2$  amorphe.

### La reproduction du brunissement

L'observation macroscopique de la coloration brune des échantillons suite aux tests d'imbibition est déjà un premier signe que le Mn présent en solution a réagi au sein du verre altéré.

Ensuite, l'observation en coupe transversale en MO (Figure 6.3) et MEB-EDX (Figure 6.5) a montré que la couche d'altération est entièrement brunie et riche en Mn. Cela montre que le Mn est capable de diffuser à l'intérieur de la porosité de la couche d'altération. Les études sur la caractérisation de la porosité des couches altérées évaluent la taille des pores entre 2 and 50 nm pour un verre silicaté calco-potassique (Sessegolo *et al.*, 2018) avec une porosité ouverte. Cela est en accord avec nos résultats car l'intégralité de la couche altérée est brunie à cause de la présence de Mn qui a pu diffuser jusqu'à l'interface verre sain-verre altéré.

Le pourcentage d'enrichissement en Mn obtenu par microsonde électronique dans les zones brunes est autour de 5-10 % en poids d'oxyde, ce qui est comparable aux pourcentages d'enrichissement en Mn rencontrés sur certains échantillons (PLOG et ROSC) du travail de Ferrand (2013) (Tableau 6.1).

Pendant le travail de Ferrand (2013), plusieurs échantillons de vitraux ont été décrits et analysés en détail. Parmi les échantillons dont le brunissement était lié à la présence de Mn, différents types de faciès ont mis en évidence la diversité morphologique du phénomène. Ce travail a mené à l'identification de deux morphologies de brunissement (Type I et Type II) par observation en microscopie optique, électronique et analyses chimiques (Figure 6.15).

- Le Type I représente un état d'altération moins étendue, avec des zone brunes avec une épaisseur de l'ordre de 10  $\mu\text{m}$ . Cette morphologie est caractérisée par une couche brune continue et assez homogène qui présente des lamelles visibles en microscopie électronique en transmission
- Le Type II est un stade d'altération plus avancé, qui peut faire plusieurs centaines de  $\mu\text{m}$  d'épaisseur et qui correspond à un faciès d'altération très étendu avec des taches brunes ou des dendrites. Ces "nodules" riches en Mn sont situés à des endroits localisés à l'intérieur de la couche altérée, qui est au contraire appauvrie en

Mn. Ces échantillons ne présentent pas de lamelles en MET et les résultats XANES ont montré pour certains échantillons des similarités avec le spectre de la purpurite, un phosphate de manganèse, en accord avec la caractérisation chimique

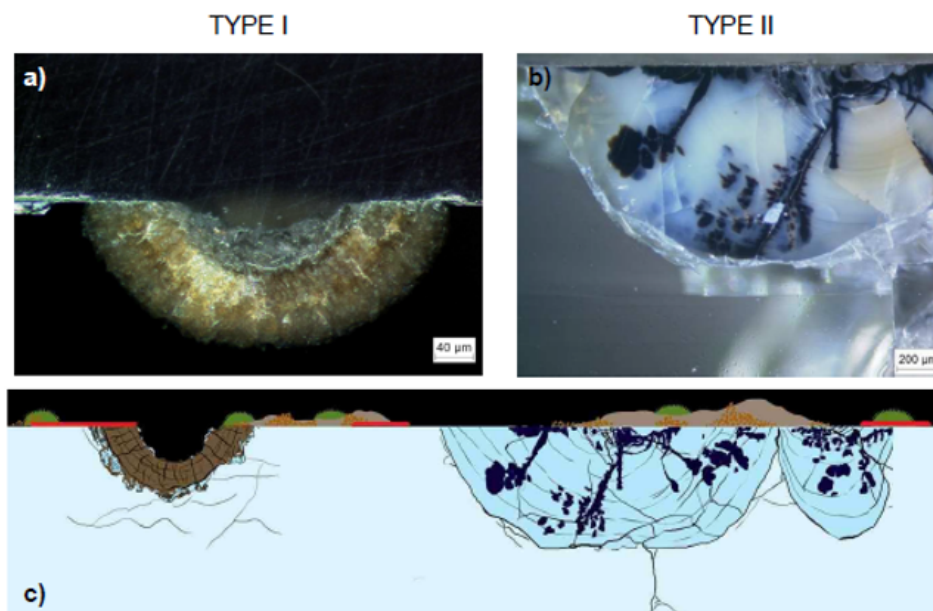


FIGURE 6.15 – Schéma des deux types de faciès caractéristiques du phénomène de brunissement identifiés. a) Image en MO de l'échantillon EV3 (d'origine inconnue). b) Image en MO de l'échantillon PLOG (provenant de l'église Saint Thurien de Plogonnec dans le Finistère et datant du début du XVI<sup>e</sup> siècle). c) Schéma de synthèse tiré de Bourleuf *et al.* (2013); Ferrand (2013).

En Belgique, Schalm *et al.* (2011) ont analysé des échantillons de vitraux provenant de fouilles archéologiques par MEB-EDX,  $\mu$ -XANES et tomographie X. Eux aussi identifient deux types principaux de morphologies 3D, qui pourraient correspondre aux deux types déterminés par Ferrand (2013) : une morphologie dendritiques (Type II) et une morphologie qu'ils définissent comme planaire ou lamellaire (Type I), où les phases brunes vont se former en suivant des lamelles d'altération (Figure 6.16). Il est possible d'observer des lamelles avec un contraste plus clair en images d'électrons rétrodiffusés qui correspondent aux lamelles brunes en image optique et aux lamelles riches en Mn en cartographie X.

Les couches d'altération brunies obtenues au laboratoire pendant ce travail ont un aspect homogène, toute la couche est brunie, et des lamelles sont visibles en MET avec une alternance de zones claires et zones sombres. Ces lamelles présentent parfois des zones d'enrichissement préférentiel en Mn, mais qui sont amorphes en diffraction électronique. Cette morphologie est assimilable aux échantillons de Type I déterminés par Ferrand (2013). Il serait intéressant de mesurer la porosité de ces couches altérée et notamment des différentes lamelles pour évaluer si une corrélation existe entre la porosité et la répartition différentielle de Mn.

Nous avons donc pu reproduire au laboratoire un phénomène de brunissement assez proche de celui observé sur les vitraux pour le Type I de brunissement lamellaire. Ceci était un des objectifs de la thèse, car il permettrait d'avoir des échantillons sacrificiels

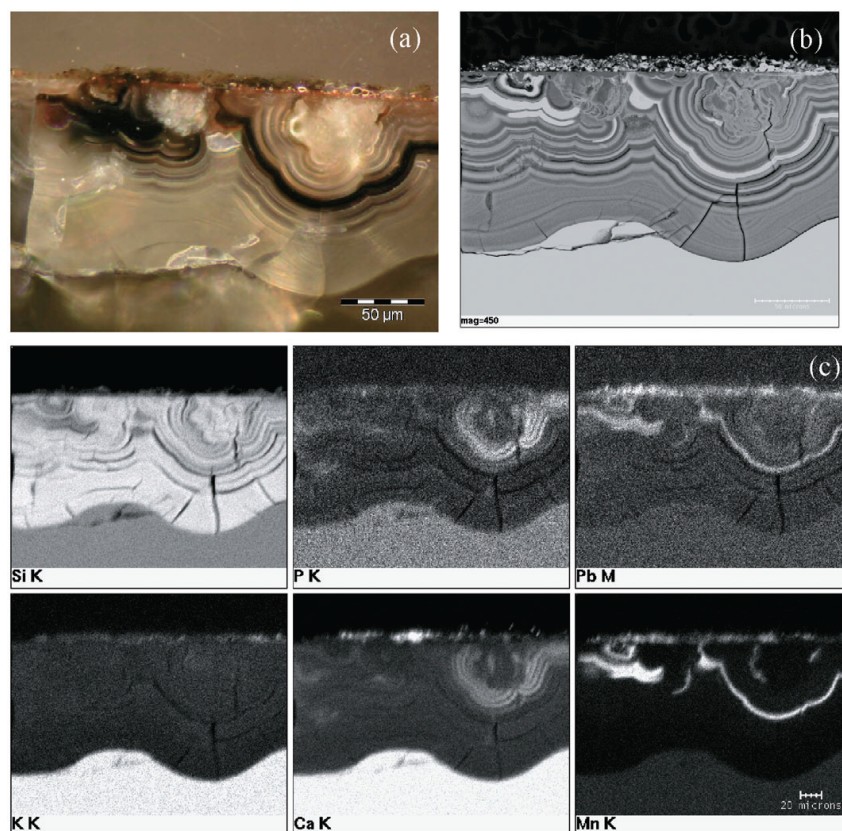


FIGURE 6.16 – Couche d’altération avec brunissement d’un échantillon de vitrail du XV<sup>e</sup> siècle. a) image en MO, b) images en électrons retrodiffusés, c) cartographies rayons X. Tiré de Schalm et al. 2011

pour pouvoir étudier ce phénomène avec des techniques plus poussées et potentiellement destructives, ainsi que de les utiliser pour l’étude de nouveaux traitements de restauration.

En revanche, ces phases brunes obtenues au laboratoire présentent une forte réactivité. Cette même caractéristique avait été observée pour les phases observées sur des échantillons de vitraux. Pour les phases brunes retrouvées sur les échantillons historiques de Ferrand (2013), il n’avait pas été possible d’obtenir des informations sur la chimie et la cristallographie par EELS à cause de la réactivité des échantillons sous le faisceau. Une campagne XANES au seuil  $K$  du Mn lors du travail de Ferrand *et al.* (2015) avait également mis en évidence un fort phénomène de photo-réduction (décalage des spectres XANES vers des basses énergies) sous faisceau synchrotron, phénomène reporté aussi par Schalm *et al.* (2011); Cagno *et al.* (2011); Nuyts *et al.* (2015).

### Les mécanismes de brunissement

La reproduction du phénomène de brunissement au laboratoire sous des conditions contrôlées permet de discuter et de mieux comprendre les mécanismes en jeu lors de la formation de ces phases brunes. Cela a été fait au cours de ce travail, et sur la base des résultats obtenus, nous allons discuter deux mécanismes possibles (Figure 6.17) :

- Un mécanisme où le brunissement se passe en deux étapes, c’est à dire (i) solubi-

lisation de Mn et (ii) pénétration dans la couche altérée et oxydation.

- Un mécanisme en une étape avec la formation des phases brunes qui se passerait directement *in situ* à l'intérieur de la couche altérée par migration et oxydation sans passer par une étape de solubilisation.

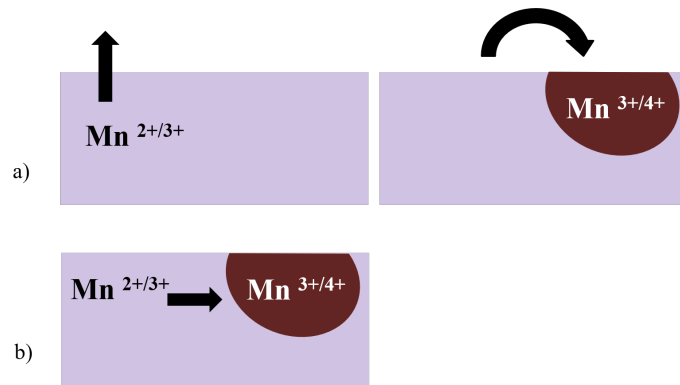


FIGURE 6.17 – Schéma des deux différents mécanismes de formation du phénomène de brunissement. a) Processus en deux étapes b) processus en une étape

Les résultats de microsonde et de microscopie électronique de l'échantillon VM-pH3 montrent que la plupart du Mn initialement présent dans le VM est lixivié pendant le processus d'altération. Les observations en MEB et MET montrent que le Mn restant dans la couche altérée de VM est distribué de façon homogène dans la couche avec un faible pourcentage en poids d'oxyde constant. Aucune zone d'enrichissement en Mn comparable au phénomène de brunissement a été observée donc dans les échantillons de VM. Toutefois, ces observations sont effectuées à un temps  $t$  d'expérience de 3,5 mois et nous ne pouvons pas exclure la possibilité qu'une distribution différentielle du Mn dans la couche puisse se passer sur des temps plus longs ou en laissant évoluer les échantillons en conditions environnementales.

Au contraire, les couches d'altération des échantillons ayant subi l'expérience d'imbibition d'une solution riche en Mn ont plusieurs caractéristiques en commun avec le phénomène de brunissement des vitraux. Ces observations montrent qu'un processus en deux étapes est possible. En excluant ici l'apport de Mn de l'extérieur, les résultats semblent pencher pour une première étape de lixiviation du Mn pendant la formation de la couche d'altération, et une deuxième étape de pénétration du Mn en solution dans la couche. Il faut souligner qu'il est probable que dans le cas des conditions réelles d'exposition d'un vitrail à l'environnement, ces deux étapes ne sont pas nettement distinguées et se passent en même temps. Les résultats de la face au fond du réacteur, et dans les fissures en surface, montrent aussi que des conditions de concentrations particulières sont nécessaires pour que ce phénomène se vérifie à l'intérieur de la couche d'altération.

Aussi, l'oxydation et le brunissement se passent assez naturellement une fois le Mn pénétré dans la couche altérée, ce qui pourrait être en accord avec l'hypothèse avancée par Watkinson *et al.* (2005) à propos d'une oxydation engendrée par la basicité de l'environnement de la couche d'altération et la tendance de Mn à être oxydé en conditions basiques.

Il reste à comprendre sous quelle forme ce Mn se trouve dans le verre bruni. Une hypothèse est celle de la formation de nanocristaux amorphes d'oxydes de Mn comme dans les travaux de Doménech-Carbó *et al.* (2001); Schalm *et al.* (2011); Cagno *et al.* (2011).

Une approche similaire à celle mise en place lors de ce travail a été utilisée dans les travaux de Watkinson *et al.* (2005) et Nuyts *et al.* (2013).

Watkinson *et al.* (2005) ont utilisé un verre de composition médiévale sans Mn et l'ont immergé pendant 3 mois dans une solution de  $\text{MnSO}_4$  10% W/v (0,448 M). Avant d'immerger le verre dans la solution, ils l'ont abîmé physiquement en grattant la surface et l'ont préaltéré dans une solution de NaOH 20% poids/volume à 40°C pendant 8 jours. Ces auteurs parlent de précipitation préférentielle du Mn de la solution dans les fissures du verre causées par les endommagements physiques. Ces phénomènes sont expliqués par la concentration des alcalins lixiviés par le verre dans les fissures et capillaires et l'augmentation du pH de l'eau confinée dans ces espaces. Des échanges lents entre cette solution et le bulk de la solution se produisent, favorisant ainsi l'oxydation et la précipitation du Mn en conditions basiques.

Une étude plus récente de Nuyts *et al.* (2013) a employé un protocole similaire pour reproduire le phénomène de brunissement au laboratoire. Des échantillons de verre modèle calcopotassique (54,2%  $\text{SiO}_2$ , 28,8%  $\text{K}_2\text{O}$ , 17%  $\text{CaO}$ ) ont été préaltérés en conditions acides et neutres et puis immergés dans une solution de  $\text{MnCl}_2$  0,5 M. Le Mn a été retrouvé en faibles quantités à l'intérieur de la totalité de la couche d'altération mais principalement précipité en surface. Certains échantillons ont ensuite été traités avec  $\text{H}_2\text{O}_2$  1% afin d'oxyder le Mn et des mesures XANES ont montré une phase homogène identifiée comme  $\text{Mn}^{2+}\text{Mn}_2^{3+}\text{O}_4$  pour les échantillons traités et non traités avec le peroxyde d'hydrogène. Au cours de travaux précédents, la même équipe avait identifié la phase brune comme du  $\text{MnO}_2$  (Schalm *et al.*, 2011; Cagno *et al.*, 2011). Selon eux, d'abord le  $\text{Mn}_3\text{O}_4$  se forme car cinétiquement favorable, et une oxydation successive sur des temps longs mène à la formation de  $\text{MnO}_2$ .

Ces deux études se sont focalisés sur un phénomène de brunissement lié à une source externe de Mn. Notre étude permet quant à elle d'évaluer si le Mn interne au verre pourrait migrer et causer le brunissement. Elle apporte des connaissances en plus à la littérature sur le sujet grâce à l'étude en parallèle d'échantillons de verre contenant du Mn et grâce à une caractérisation morphologique plus poussée des phases brunes obtenues par METB. Cela a permis de mettre en évidence que le Mn présent dans un verre VM peut subir le processus de lixiviation pendant l'altération du verre, et que du Mn présent en solution peut pénétrer à l'intérieur d'une couche altérée.

Pour conclure sur cet ensemble d'expérimentations, il n'existe pas qu'une seule condition d'altération pouvant mener à la formation de ces phases brunes, et ces phases sont caractérisées par des faciès différents. De la même façon, le brunissement observé sur des échantillons de vitraux présente des phases brunes différentes d'un échantillon à un autre (Ferrand *et al.*, 2015). Par conséquent, la reproduction du phénomène au laboratoire et la comparaison avec les échantillons de vitraux est autant plus compliquée.

Il faut également souligner que toutes les études évoquées ci-dessus citent, en ne l'excluant pas, la possibilité d'une intervention biologique dans le processus d'oxydation de Mn.

## 6.2 Formation de phases brunes d'origine biotique : croissance de biofilm à la surface de verre

La Figure 6.18 montre le biofilm obtenu dans l'expérience A (avec ajout de Mn en solution), de coloration marron avec des zones plus ou moins foncées, déposé en surface des monolithes VM-s-biofilm-A et VM-pH3-biofilm-A.

Le biofilm est très adhérent à la surface de l'échantillon VM-s-biofilm-A et il va la recouvrir entièrement. Le verre a subi une forte altération en contact avec la solution de minéralisation, qui se manifeste par la fracturation de la surface due à la formation de la couche altérée. L'observation en MEB permet de voir que le détachement du biofilm à certains endroits entraîne avec lui la couche d'altération, ce qui laisse apparaître le verre sain sous-jacent. En coupe transversale, un biofilm d'une épaisseur de plusieurs centaines de micromètres est observé.

Pour l'échantillon VM-pH3-biofilm-A, le biofilm suit les modifications de surface en recouvrant les écailles de verre (Figure 6.18b). A plus fort grandissement en MO et MEB, le biofilm apparaît plus discontinu et moins épais en coupe transversale. Grâce à un trou dans la résine, il a été possible d'observer en Figure 6.18j qu'une fine couche de biofilm se trouve déposée au-dessus de la couche altérée. Le biofilm est principalement constitué de C, P, Ca, Mn (Figure 6.19).

La caractérisation des échantillons de l'expérience B (sans ajout de Mn) montre qu'un biofilm marron est également observable sur ces échantillons mais d'une couleur marron moins intense (Figure 6.20). Pour l'échantillon VM-s-biofilm-B, des cristaux riches en Ca (en analyses MEB-EDS) sont déposés en surface. Pour VM-pH3-biofilm-B, le biofilm est principalement constitué de C, Ca, Mg et P (Figure 6.21). Il est moins évident pour ces échantillons de distinguer un enrichissement en Mn du biofilm mais, malgré le faible contraste, des zones riches en Mn qui correspondent au biofilm sont visibles.

Une caractérisation plus poussée des phases d'origine biotique obtenues n'a pas été possible pendant ce travail, toutefois les cartographies MEB ont montré que l'enrichissement en Mn dans le biofilm est associé au P, en accord avec les résultats du chapitre 5. Cet élément est en effet souvent associé à l'activité microbologique et a été aussi trouvé associé au Mn dans un des échantillons brunis (échantillon PLOG, Tableau 6.1) lors du travail de Ferrand (2013).

Villalobos *et al.* (2003); Tebo *et al.* (2004) ont étudiée les oxydes de Mn produits par *Pseudomonas putida*, il s'agit d'un oxyde faiblement cristallin de type birnessite et relativement pur, avec un état d'oxydation moyen du Mn de 3,9.

Il serait donc intéressant étudier la structure de ces phases et voir par exemple si elles ont incorporé d'autres éléments relâchés par le verre.

Des études précédentes (Müller, 1999; Oriol *et al.*, 2007; Ferrand, 2013) avaient tenté de reproduire le phénomène de brunissement par voie biotique, sans y réussir. Le brunissement observé par Müller (1999) a été attribué simplement à la présence de composés organiques produits par les microorganismes. Oriol *et al.* (2007) et Ferrand (2013) ont utilisé deux souches de *Burkholderia cepacia* et de *Pseudomonas putida* pour des tests de bioaltération en déposant les souches directement sur des morceaux de verre, mais ils n'ont pas observé de brunissement du verre.

En conclusion, nous avons réussi à faire pousser un biofilm à la surface du verre, qui présente une coloration marron donnée par la présence de Mn, uniquement à partir du Mn relâché en solution par le verre. Ce biofilm reste déposé en surface et il suit l'allure des fractures, mais la morphologie de ces phases brunes, qui sont étroitement liés au biofilm, ne ressemble pas à la morphologie du brunissement trouvé sur les vitraux médiévaux. Cependant, les conditions réelles sont différentes et le biofilm peut être présent à des endroits localisés du vitrail et la morphologie de ces phases pourrait évoluer avec le temps.

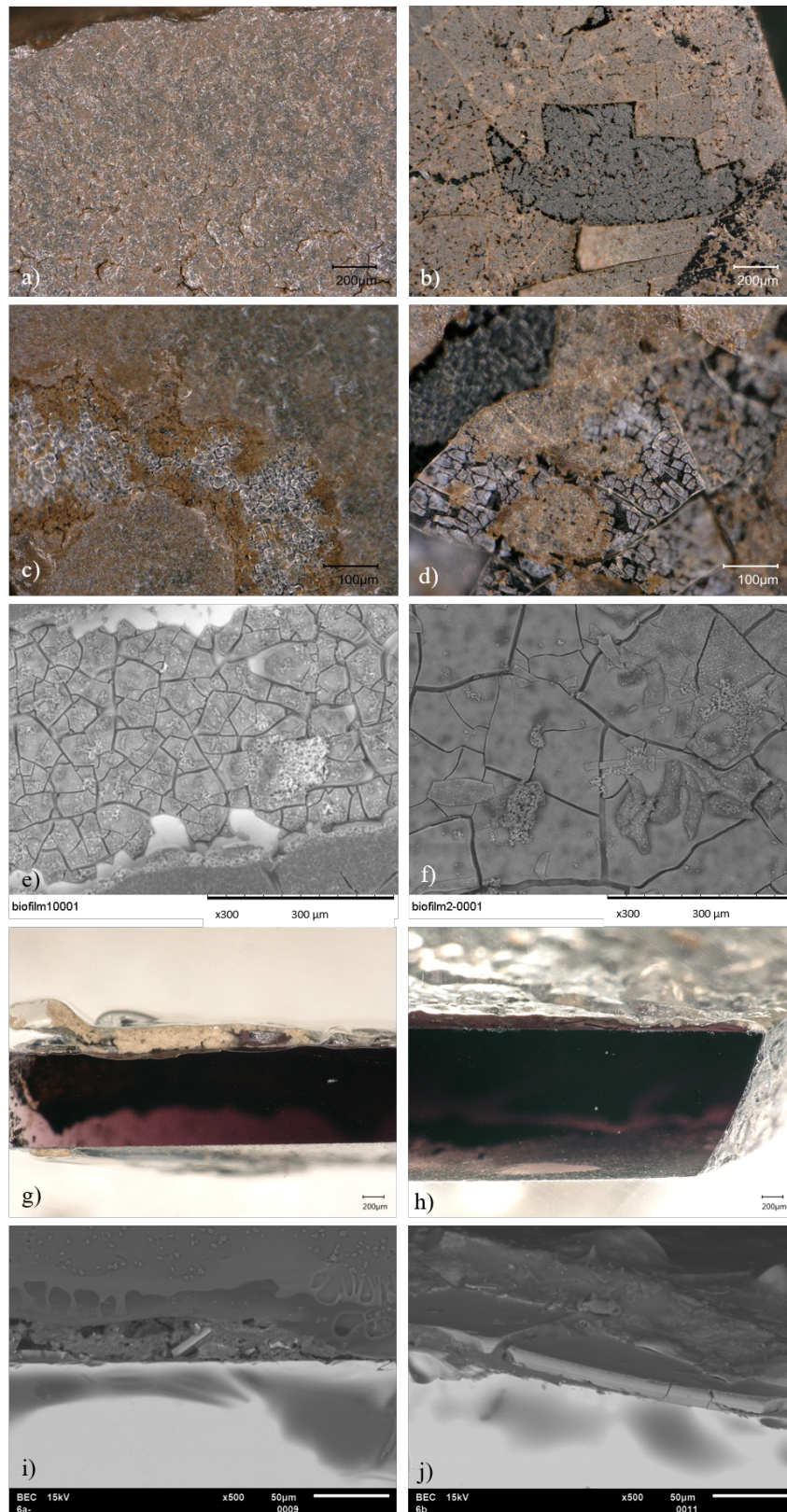


FIGURE 6.18 – Images en MO et MEB modalité électrons retrodiffusés des échantillons VM-s-biofilm-A (images a,c,e,g,i) et VM-pH3-biofilm-A (images b,d,f,h,j) avec biofilm observés en surface et en coupe transversale.



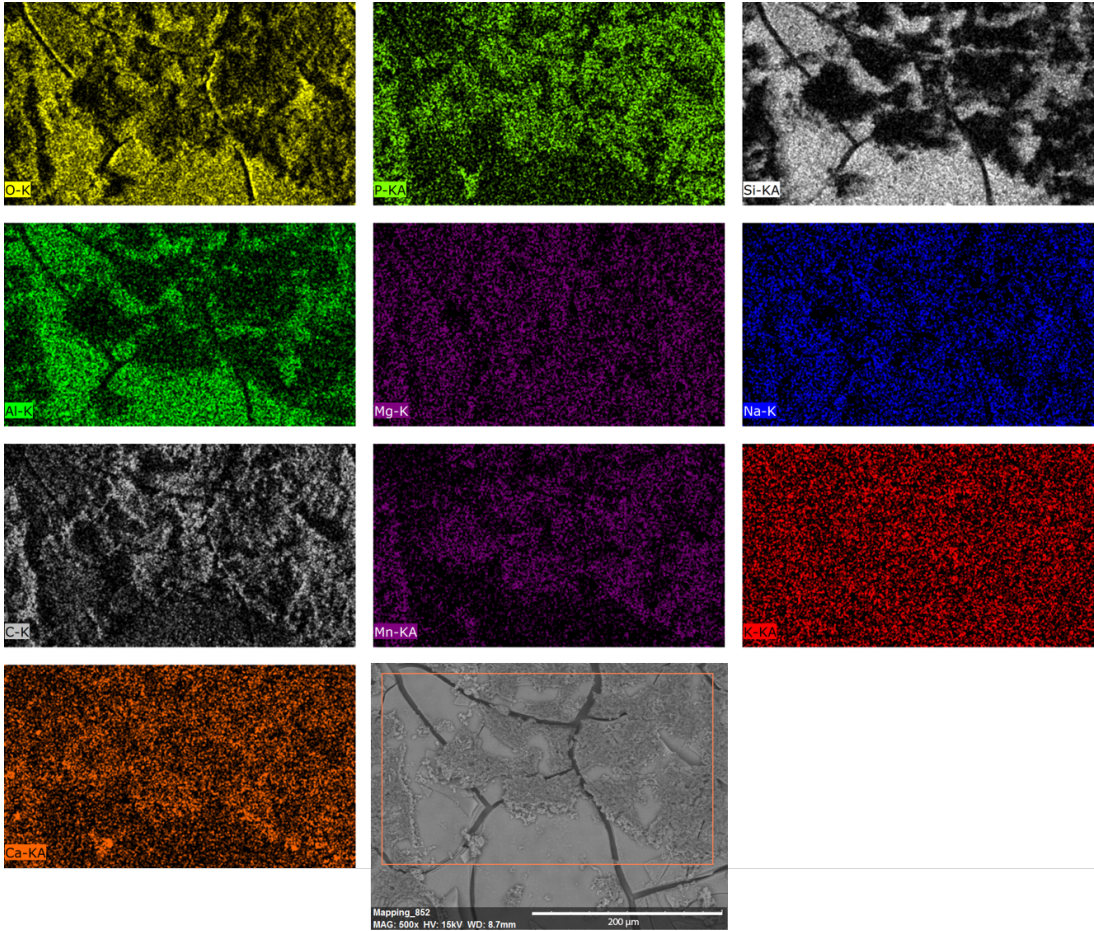


FIGURE 6.19 – Cartographie MEB de la surface avec biofilm de l'échantillon VM-pH3-biofilm-A. Biofilm riche en C, Ca, P, Mn

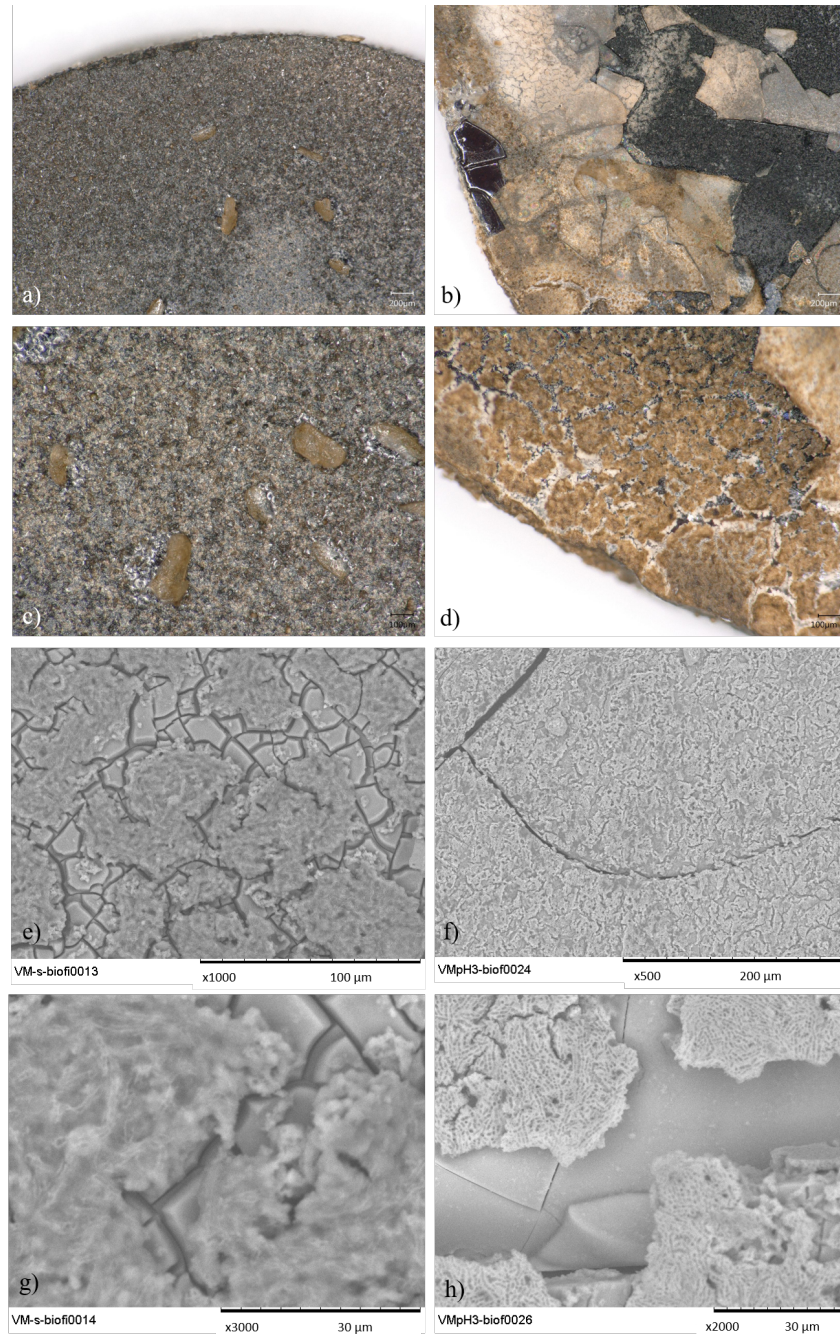


FIGURE 6.20 – Images en MO et MEB (en mode BSE) des échantillons VM-s-biofilm-B (images a,c,e,g,i) et VM-pH3-biofilm-B (images b,d,f,h,j) avec biofilms observés en surface.

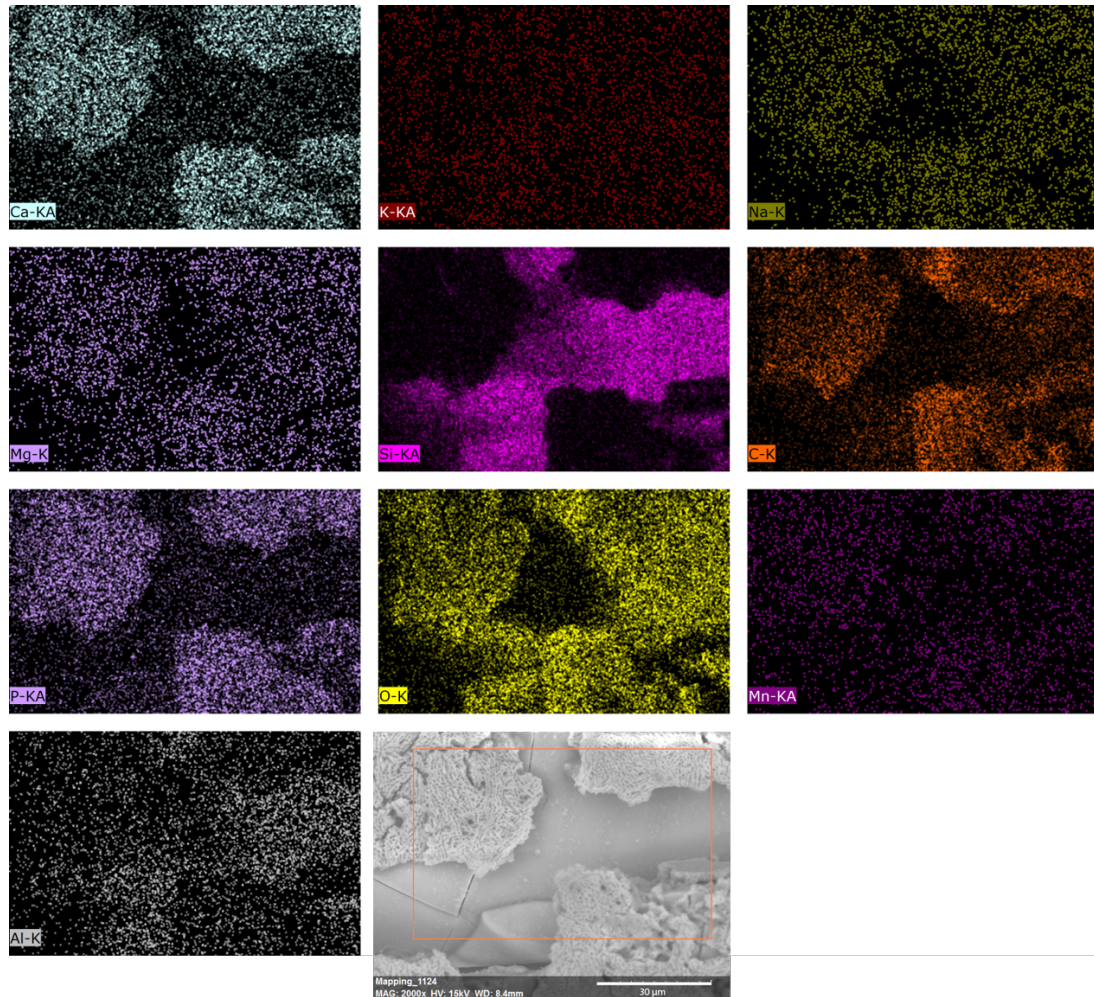


FIGURE 6.21 – Cartographie MEB de la surface avec biofilm de l'échantillon VM-pH3-biofilm-B. Biofilm riche en C, Ca, P, faiblement enrichi en Mn.

## 6.3 Conclusions

Cette partie représente une étude préliminaire où il a été possible d'obtenir des phases brunes au laboratoire de façon abiotique et biotique.

Des couches d'altération du verre brunies et riches en Mn ont été obtenues par voie abiotique. Caractérisées par METB et MET, elles ont montré une morphologie lamellaire similaire à celle observée sur des échantillons de vitraux, ainsi qu'un caractère amorphe.

Les phases brunes obtenues par voie biotique se trouvent déposées en surface du verre piégées dans un biofilm bactérien et non à l'intérieur de la couche d'altération.



# Chapitre 7

## Discussion générale et perspectives

La méthodologie choisie pour cette thèse a été de décomposer le phénomène de brunissement en plusieurs étapes afin d'étudier le processus d'altération du verre et de solubilisation du Mn en conditions abiotiques et biotiques (en présence d'exsudats seulement, puis d'une souche), puis les mécanismes de formation des phases brunes, également en conditions abiotiques et biotiques. Des prélèvements de microorganismes sur des vitraux ont également été réalisés afin de relier ce travail au système vitrail.

Dans ce chapitre les résultats principaux obtenus au cours de ce travail seront rappelés, puis l'approche expérimentale utilisée sera analysée. Enfin, les mécanismes observés seront utilisés pour discuter i) du rôle du Mn dans un verre silicaté calco-potassique et ii) de la formation du phénomène de brunissement. Pour clôturer le chapitre, des perspectives expérimentales sont envisagées.

### 7.1 Résumé des résultats obtenus

L'étude d'identification de bactéries et champignons présents sur des vitraux provenant de quatre sites français (deux sites échantillonnés *in situ* et deux en atelier de restauration) a permis de mettre en évidence une diversité des communautés bactériennes dépendant du site de provenance du vitrail. Les phyla de bactéries les plus représentés sont les Actinobacteria, les Proteobacteria et les Firmicutes, avec des distributions différentes selon les sites. Les sites de Bar-sur-Seine et de Lachalade peuvent être regroupés selon la distribution de phyla bactériens. Notamment, un sous-groupe peut-être formé par les sites de Bar-sur-Seine et Lachalade présentant une diversité interne plus élevée. Les sites de Versailles et de Wissembourg se différencient par la présence prépondérante d'espèces de *Paenibacillus* et de *Arthrobacter* respectivement. Ces résultats ont notamment permis de mettre en avant la présence de certains genres bactériens (notamment *Arthrobacter* et *Bacillus*) connus dans la littérature pour leurs pouvoir altérant vis-à-vis de différents substrats et leur capacité de production de métabolites comme les acides organiques et les sidérophores, qui font d'eux des candidats idéaux pour des futures études sur la bio-altération des vitraux. Une espèce d'*Arthrobacter* (*A. crystallopoietes*) connue pour sa capacité à oxyder le Mn a également été identifiée pour la première fois sur un panneau de vitrail. Cette étude représente ainsi un premier recensement des bactéries présentes sur des vitraux en France et susceptibles de causer une altération et a permis d'initier une collaboration entre le LGE et le LRMH a ce sujet.

L'effet indirect des microorganismes sur la dissolution a été simulé au moyen de tests de dissolution en présence d'exsudats microbiens. Nous avons vu que le sidérophore DFOB était capable d'augmenter d'environ 300% la vitesse de dissolution du verre VM et de rendre la dissolution congruente. Cet effet a été attribué à la complexation du Mn et de l'Al par la DFOB, qui entraîne une déstabilisation du réseau silicaté. Ces résultats ont confirmé la forte affinité de Mn avec le sidérophore DFOB. La présence de l'acide oxalique participe également à la dissolution du verre via plusieurs mécanismes, la solubilisation de Mn et Al par complexation, la favorisation du mécanisme d'interdiffusion, et la précipitation de phases secondaires. Dans le système à deux ligands, nous n'avons pas observé un effet synergique des deux molécules sur la vitesse de dissolution du verre. La DFOB contrôle la cinétique de dissolution à travers des mécanismes de dissolution *ligand-promoted*. La capacité complexante de l'AO est masquée par l'effet complexant de la DFOB dans le système à deux ligands, son effet est toutefois observé à travers la favorisation de l'interdiffusion et la précipitation d'oxalate de calcium. Concernant la comparaison entre les deux verres VM et VNM, nous avons pu mettre en évidence un comportement de dissolution différent de ces deux verres en solution de contrôle et en présence d'agents complexants. En conditions de contrôle, le verre VM a une vitesse de dissolution plus faible que le verre VNM. En présence d'AO et de DFOB, l'augmentation de vitesse de dissolution est en pourcentage plus importante pour le verre VM que pour le VNM. Ces différences de comportement parmi les deux verres sont attribuées à la présence de Mn et à la complexation de cet élément. Des tests complémentaires de dissolution de VM en présence de différents tampons ont d'ailleurs mis en évidence un éventuel effet complexant des tampons BisTris et HEPES sur le Mn qui n'a pas souvent été décrit avant.

L'effet direct des microorganismes sur la dissolution a été exploré avec des tests de dissolution en présence de la souche modèle *Pseudomonas putida*.

Pour rappel, les éléments relâchés par le verre peuvent (i) rester libres sous forme d'ions aqueux, (ii) être complexés par les métabolites, (iii) être adsorbés à la surface des bactéries, (iv) être consommés et assimilés par les cellules bactériennes, (v) être mobilisés par les phases secondaires.

Nous avons vu que cette bactérie avait besoin des éléments relâchés par le verre pour pouvoir se développer. Une partie des éléments relâchés par le verre sont assimilés par la bactérie, principalement le K, le Ca, le P et en partie le Mn. La croissance bactérienne est donc retardée par la disponibilité d'éléments nutritifs et est corrélée à la quantité de verre introduit dans le milieu de culture. Ces éléments étaient aussi en partie adsorbés sur les parois cellulaires. La plupart du Mn relâché par le verre est piégé sous forme d'oxydes à l'intérieur d'un biofilm qui est produit à partir d'un certain temps d'expérience dépendant de la quantité de verre introduit en solution. La réalisation d'expériences avec différents rapports S/V et d'une expérience arrêtée avant le début de la production du biofilm a permis de mettre en évidence que l'incorporation de ces éléments se passe à différents stades du développement bactérien.

La production du sidérophore PVD est également retardée en fonction de la quantité de verre introduite et donc de l'état de croissance bactérienne. La PVD en solution atteint un plateau en présence de VNM. En présence de VM, la PVD complexe le Mn et est ensuite dégradée en parallèle de la diminution de concentration de Mn de la solution et

du changement de coloration de la solution vers le brun, dû à la production d'oxydes de Mn. Un comportement différent de la bactérie selon le substrat avec lequel elle est en contact a donc pu être mis en évidence. Nous n'avons pas observé une augmentation de la vitesse de dissolution en présence de *Pseudomonas putida* et de son sidérophore PVD, malgré le fait que plusieurs études dans la littérature observent une accélération des processus de dissolution sous l'influence bactérienne pour certaines phases minérales et verres naturels (Staudigel *et al.*, 1995; Ullman *et al.*, 1996; Kalinowski *et al.*, 2000b; Bennett *et al.*, 2001; Perez *et al.*, 2016). Au contraire, dans ces conditions, la vitesse de dissolution du Si est "réduite" à cause de la rétention de cet élément.

Malgré l'absence d'un effet catalytique sur la dissolution du verre, il faut donc souligner que la souche modèle a un effet sur le comportement de Si, Mn et de P. Le Si est en partie retenu dans les cellules bactériennes en début d'expérience. Le Mn et le P au contraire sont relâchés en solution en début d'expérience et ils disparaissent de la solution après un certain temps, le Mn est notamment retrouvé sous forme d'oxydes dans le biofilm adhérent aux grains de verre. Un effet sur le relâchement du K a toutefois été observé pour les expériences de dissolution en présence de *P. putida* quand le verre est introduit en faibles quantités, cet effet est attribué à l'acidification de la solution par la bactéries, qui va favoriser les mécanismes d'interdiffusion.

La Figure 7.1 résume l'ensemble des résultats des expériences de dissolution biotique.

Dans un second temps, nous avons étudié la formation des phases brunes de manière abiotique et biotique.

Les expériences de préaltération de monolithes de verre à 30 °C pendant 3,5 mois ont montré que des couches d'altération de l'ordre de 30  $\mu\text{m}$  sont obtenues à pH 3 pour les deux verres, tandis qu'à pH 6 une couche altérée de l'ordre de 2  $\mu\text{m}$  est obtenue pour VM, et de l'ordre de 6  $\mu\text{m}$  pour VNM. Les expériences d'imbibition de ces couches de verre altéré avec des solutions riches en Mn ont montré que le  $\text{Mn}^{2+}$  aqueux est capable de diffuser à l'intérieur de la couche d'altération et de lui donner une coloration brune. Des couches d'altération complètement brunies ont été observées et caractérisées. Elles présentent une composition (appauvrissement en éléments alcalins et alcalino-terreux et enrichissement en Mn) et une morphologie (lamelles d'altération, caractère amorphe) comparables à celles des échantillons historiques de vitraux brunis étudiés précédemment (Ferrand, 2013).

Lors des expériences biotiques de formation des phases brunes, la croissance d'un biofilm brun de *Pseudomonas putida* adhérent à la surface du verre a été observée, riche en Mn et en P, à partir du Mn relâché par le verre.



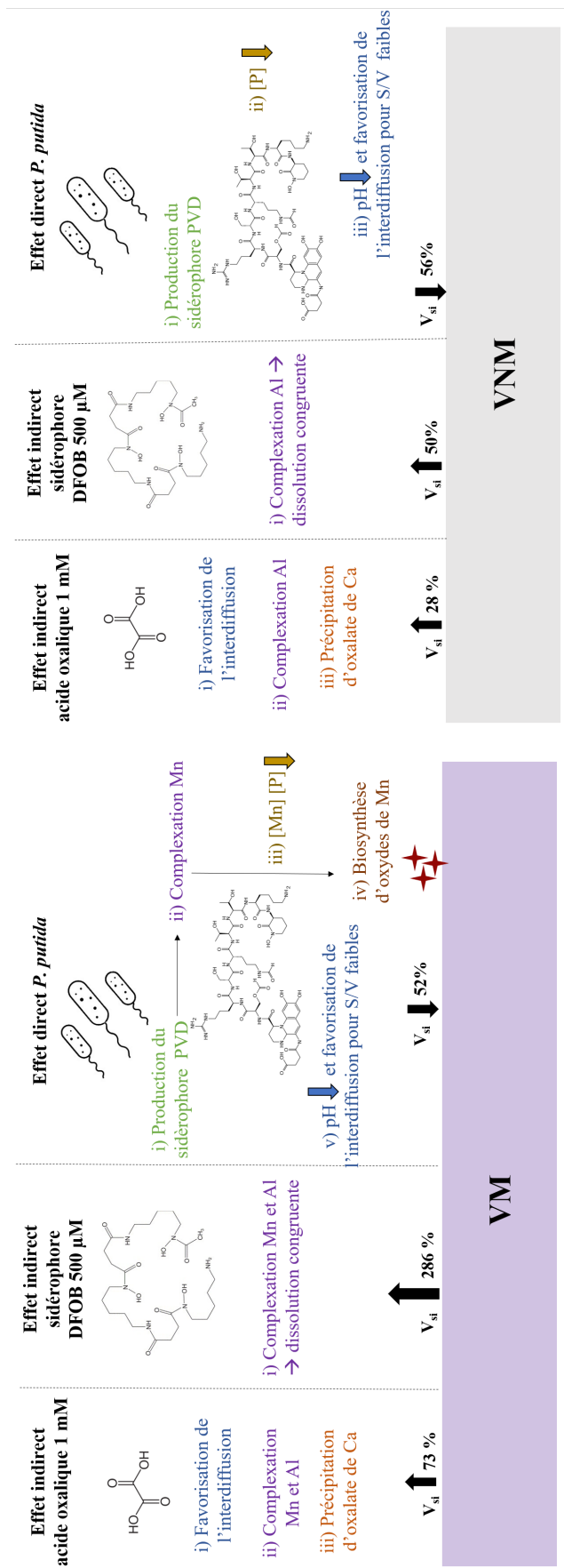


FIGURE 7.1 – Schéma représentatif des différents mécanismes identifiés lors de la dissolution des verres VM et VNM en conditions de dissolution biotique directe et indirecte. Pour rappel, la vitesse de dissolution de référence pour les tests de dissolution biotique indirecte en solution d'EUP + tampon carbonate est de 0,37 g/m<sup>2</sup>/j pour VM et de 0,88 pour VNM. La vitesse de dissolution de référence pour les tests de dissolution biotique directe dans le milieu de culture est de 1,87 g/m<sup>2</sup>/j pour VM et de 1,50 pour VNM. Pour le verre VM, l'AO fait augmenter la vitesse de dissolution de 73 % en favorisant l'interdiffusion et via la complexation d'Al et Mn. La présence du sidérophore DFOB cause une forte déstabilisation du réseau silicaté à cause de la complexation d'Al et de Mn, qui induit une augmentation de la vitesse de dissolution de 283 % et une dissolution congruente du verre. En présence de *P. putida*, le sidérophore PVD complexe le Mn et déclenche le processus d'oxydation de ce dernier, mais à cela n'est pas couplée une augmentation de la vitesse de dissolution. Au contraire une diminution apparente de la  $v_{si}$  est observée à cause de la rétention du Si en début d'expérience. En revanche, la présence de *P. putida* a un effet sur le destin du Mn et du P relâchés en solution, notamment à travers la production de biofilm avec oxydes de Mn adhérent au verre altéré. Pour le verre VNM, l'AO fait augmenter la vitesse de dissolution du 28 % en favorisant l'interdiffusion et via la complexation d'Al. La complexation de l'Al par la DFOB cause également la déstabilisation du réseau et une dissolution congruente, mais avec une augmentation de la vitesse de dissolution de seulement 50 %. En présence de *P. putida*, la production de PVD n'engendre aucun effet sur les éléments du verre. La diminution du P en solution est également observée. Pour les deux verres, l'acidification de la solution par les bactéries en présence de faibles quantités de verre favorise le mécanisme d'interdiffusion (relâchement de K en solution).

## 7.2 Retour sur la méthodologie expérimentale

La méthodologie choisie a permis d'étudier le comportement de dissolution d'un verre silicaté calco-potassique en conditions abiotiques simples (EUP tamponnée). Les modifications cinétiques et stœchiométriques de dissolution ont ensuite été étudiées en utilisant des systèmes de plus en plus complexes afin de se rapprocher de la réalité. D'abord en présence d'exsudats susceptibles d'être produits par des bactéries et des champignons, et ensuite en présence d'une bactérie modèle.

Le choix d'avoir décomposé en deux sous-parties cette partie de l'étude sur la dissolution a permis de mettre en évidence l'importance de plusieurs paramètres à prendre en compte lors de la mise en place de tests de biodissolution par effet direct, représentant un système bien plus complexe à étudier en comparaison avec un système simplifié ciblant uniquement l'action des exsudats. Par exemple, le milieu de culture choisi peut également modifier le comportement de dissolution du verre, masquant la mise en évidence de certains effets bactériens d'intérêt pour cette étude. De plus, ce sont cette fois les besoins nutritifs de la souche qui vont réguler la production de sidérophores et leur action, à la différence d'un système simplifié verre/eau/ligand. Dans ces expériences en milieu de culture, on voit aussi coexister plusieurs agents altérant, notamment couplé à l'action des sidérophores, un abaissement du pH au fur et à mesure de l'expérience. Cet effet du pH n'a par exemple pas été simulé en conditions de dissolution biotique indirecte.

Cette étude a permis d'acquérir de nouvelles données sur les cinétiques de dissolution d'un verre contenant du Mn (et sans Fe), à comparer avec la littérature existante sur la dissolution d'oxydes et hydroxydes de Mn, notamment en présence d'acide oxalique et de DFOB. Nous avons pu mettre en évidence que des mêmes mécanismes de dissolution *ligand-promoted* précédemment identifiés pour des minéraux comme l'haussmannite ou la manganite (Duckworth et Sposito, 2005b; Peña *et al.*, 2007) sont également observés lors de la dissolution d'un verre contenant Mn en présence de DFOB. Toutefois l'effet synergique entre AO et DFOB sur l'augmentation de la vitesse de dissolution n'a pas été observé dans ce travail et pourrait donc être dépendant du substrat.

Ce travail a vu l'application sur un verre caractéristique d'un vitrail du Moyen-Age de la méthodologie expérimentale développée pendant le travail de Perez (2015) au LGE sur la dissolution biotique de verres basaltiques. Cela a permis de rajouter des informations sur les mécanismes de dissolution en conditions biotiques d'un verre silicaté calco-potassique dont les cinétiques et mécanismes de dissolution en conditions abiotiques avaient été déterminés lors du travail de Sessegolo (2018) au LISA. Cette étude s'inscrit donc dans un filon de recherche qui vise à affiner l'identification de la relation entre structure et altération du verre.

Concernant la formation des phases brunes, nous avons pu adapter un protocole de la littérature pour la formation de phases brunes par voie abiotique, en travaillant également avec un verre contenant du Mn pour une étude plus complète du comportement de cet élément lors de l'altération et de la formation de la couche altérée.

Nous avons également utilisé pour la première fois dans une étude de bioaltération, un protocole développé à l'IMPMC pour la croissance de biofilm de *P. putida* qui a permis

d'observer la production de phases brunes par voie biotique à partir du Mn relâché par le verre.

Cette méthodologie a permis encore une fois de pouvoir séparer l'effet abiotique et biotique en observant deux systèmes différents. Cela a permis de mettre en évidence que des phases brunes peuvent être obtenues par les deux voies investiguées.

Bien évidemment les conditions réelles dans lesquelles se manifeste l'altération des vitraux sont très différentes de celles des tests d'altération conduits au laboratoire, qui restent des reproductions simplifiées. Mais bien que simplifiées, ces conditions ne permettent pas une élucidation totale des interactions verre/microorganismes mises en jeu.

En ce qui concerne les tests de dissolution biotique indirecte, la bibliographie sur les sidérophores concerne principalement des environnements marins ou les sols et aucune étude n'a jamais identifié ou cherché à identifier ces molécules dans des biofilms ou des solutions en contact avec des pierres ou verres du patrimoine. Toutefois, ces molécules sont produites par une large quantité d'espèces faisant partie, entre autres, des genres bactériens *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Erwinia*, *Vibrio*, *Altermona*, *Anthrobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus* et des genres fongiques *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Rhodotorula*, *Neurospora*, *Rhizopus* (Kalinowski *et al.*, 2000b; Challaraj-Emmanuel *et al.*, 2012; Saha *et al.*, 2015; Renshaw *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2018). Certains de ces genres de bactéries et de champignons ont été trouvés sur des vitraux pendant ce travail ou dans la littérature. Il est donc raisonnable de postuler qu'en cas de nécessité nutritive, les bactéries et les champignons produisent ce type de molécules aussi dans ce type d'environnements.

Il faut bien évidemment encore prendre en considération les concentrations de ces ligands qui peuvent être rencontrées dans des systèmes naturels. L'oxalate est un acide carboxylique simple qui est relativement abondant dans les sols et dans les eaux souterraines, avec des concentrations qui peuvent atteindre 1 mM (Fox et Comerford, 1990; Cama et Ganor, 2006). En ce qui concerne les sidérophores dans les systèmes marins ou dans les eaux souterraines, les concentrations reportées varient, en fonction des auteurs, entre 0,3 et 7 nM (Kraemer, 2004) ou encore de l'ordre des centaines de micromoles (Hersman *et al.*, 1995). Toutefois, en proximité de l'interface microorganismes-substrat, la concentration locale de ligands organiques peut augmenter de plusieurs ordre de grandeur (Ahmed et Holmström, 2014). Pour une microniche bactérienne, les concentrations attendues de sidérophores sont entre 10  $\mu$ M et quelques mM (Hersman *et al.*, 1995). Ces microniches bactériennes peuvent être comparées aux conditions locales de la surface des vitraux où un microfilm d'eau peut se former et engendrer des phénomènes d'altération localisés (Asay et Kim, 2005; Bernardi *et al.*, 2006; Gentaz, 2011). La production de sidérophores et d'acides organiques dans ces conditions pourrait donc favoriser la dissolution localisée du verre. De plus, comme souligné par Peña *et al.* (2007), la complexation du Mn par les sidérophores comme la DFOB et la PVD peut rentrer en forte compétition avec la complexation du Fe, ces résultats sont donc d'intérêt également pour d'autres types de verre naturels et artificiels contenant du Mn et du Fe.

En ce qui concerne les expériences de dissolution biotique directe, l'utilisation d'un verre sous forme de poudre plongé dans un milieu de culture spécifique avec une souche modèle unique, sont des conditions très éloignées de la réalité, où plusieurs types de microorganismes sont présents sur une surface de verre et peuvent ainsi vivre en *consortium*,

où chaque souche peut éventuellement jouer un rôle différent.

Concernant les tests sur monolithes de reproduction des phases brunes, là aussi les conditions utilisées (pH acide et imbibition de solutions riches en Mn en conditions abiotiques, croissance d'un biofilm d'une espèce unique en conditions biotique) entendent représenter une modélisation d'un système vitrail, dans le but d'observer des mécanismes dans des échelles de temps compatibles avec la durée d'une thèse et le parallèle avec le système réel doit être fait avec précaution.

La représentativité des expériences en laboratoire pour des systèmes réels est une problématique bien connue dans plusieurs domaines de recherche.

Dans le domaine des matériaux de stockage pour les déchets nucléaires, la littérature est riche d'études qui essaient de se rapprocher des conditions réelles d'altération du verre sur le long terme en étudiant des analogues naturels (verres basaltiques) ou artificiels (verres archéologiques) qui ont été altérés naturellement pendant des centaines d'années (Grambow *et al.*, 1985; Sterpenich et Libourel, 2001; Verney-Carron *et al.*, 2008; Libourel *et al.*, 2011; Parruzot *et al.*, 2015; Weaver *et al.*, 2018).

Concernant l'étude de l'altération des minéraux et verres en milieu naturel contribuant aux cycles biogéochimiques des éléments, le travail de revue de Wild (2017) a mis en évidence qu'un fossé de 2 à 6 ordres de grandeurs est observé entre des vitesses de dissolution de minéraux estimées au laboratoire et celles observées dans les systèmes réels. Perez (2015) a néanmoins montré qu'il est possible, à partir de résultats de laboratoire, d'extrapoler des valeurs de vitesses d'altération des verres basaltiques à long terme en adéquation aux observations en milieu naturel.

Dans le domaine de l'altération des matériaux du patrimoine, des exemples récents sont les travaux de Gatuingt (2017) pour l'étude de la formation de patines manganésifères sur les grès du Château de Lunéville, et de Alloteau (2017) pour l'étude de l'altération en conditions atmosphériques des verres de composition typique des émaux de Limoges. Ces deux travaux ont souligné comment la reproduction des altérations au laboratoire présente certes des traits en communs avec les altérations observées sur les objets du patrimoine qui permettent d'étudier des mécanismes d'altération, mais présente également des différences qui doivent être tenues en compte dans la transposition des mécanismes aux systèmes réels.

Il existe donc souvent un écart entre les études de terrain et de laboratoire, mais ces deux approches sont considérées complémentaires.

Les résultats obtenus n'entendent pas être parfaitement transposables aux milieux naturels. La nécessité de cibler l'effet des microorganismes sur le comportement du Mn et la formation de phases brunes, qui leur était souvent attribuées (Orlial *et al.* (2007); Perez y Jorba *et al.* (1980), etc.) est née de l'absence d'informations claires sur ce sujet. L'effet des microorganismes est en effet souvent invoqué sans que les mécanismes soient discutés, et souvent utilisé pour justifier des phénomènes étranges et difficiles à expliquer, comme le brunissement des vitraux médiévaux. Outre le manque d'informations, élucider l'origine de tels phénomènes nécessite des compétences pluridisciplinaires. Les physico-chimistes qui travaillent sur les matériaux du patrimoine vont rarement explorer les mécanismes microbiologiques (à cause probablement de la grande quantité de paramètres à prendre en compte), alors que les microbiologistes sont plus tournés vers l'identification des microorganismes présents et vers une description de la phénoménologie d'altération associée

sans rentrer dans les mécanismes qui ont mené à une certaine forme de dégradation.

La stratégie expérimentale que nous avons retenue vise donc à combiner ces deux approches. Il y aurait bien sûr tant d'autres paramètres à cibler ou expériences à développer (voir paragraphe perspectives de ce chapitre) pour se retrouver plus près encore des conditions d'altération réelles, mais c'est un travail qui se situe dans une temporalité plus étendue que trois années de thèse.

### 7.3 Effet de la présence de Mn sur la durabilité d'un verre silicaté calco-potassique

Les résultats permettent de mettre en relation la compréhension des mécanismes d'altération avec la structure du verre (silicaté calco-potassique) grâce à l'étude de deux verres ayant comme différence principale la présence ou l'absence de Mn (2% en poids d'oxyde). Nous avons montré que la présence de Mn dans la composition joue un rôle sur la durabilité du verre selon les conditions d'altération. En effet, le verre VM est plus durable que le VNM en solution de contrôle lors des tests de dissolution biotique indirecte (pH neutre et tampon carbonate 1mM), et il développe une plus petite couche d'altération que VNM lors des tests de préaltération de monolithes de verre altérés en solution à pH 6. En revanche, en présence d'agents complexants comme le sidérophore DFOB ou dans des solutions complexes comme le milieu de culture, VM est plus sujet à l'altération que le VNM.

Le comportement du Mn pourrait être lié à son rôle structural dans le réseau vitreux. Par exemple, le comportement du Mn dans le verre VM, relâché presque en même temps que le Si en conditions de contrôle en tampon carbonate, suggère que le Mn puisse avoir, au moins partiellement, un rôle de formateur de réseau. L'introduction du Mn dans la structure en tant que formateur de réseau porterait vers une augmentation du pourcentage d'alcalins et alcalino-terreux en site de compensation de charge (et moins donc en modificateur de réseau), en ayant ainsi un double effet de stabilisation du réseau.

Nous avons dit que le Mn dans le verre VM est probablement un mélange de  $Mn^{2+}$  et de  $Mn^{3+}$ , car l'espèce réduite est la plus stable à haute température de fusion (Nelson et White, 1980), mais la coloration pourpre du verre montre que du  $Mn^{3+}$  est également présent (Arletti *et al.*, 2010; Bidegaray *et al.*, 2018). Parmi ces deux espèces, le  $Mn^{2+}$ , avec une configuration électronique  $d^5$  est plus compatible avec un rôle de formateur de réseau. Il est possible de faire un parallèle avec le  $Fe^{3+}$  ( $d^5$ ) qui a un rôle de formateur de réseau dans la structure vitreuse (Galoisy *et al.*, 2001). Le travail de Perez (2015) a montré que, à cause du rôle de formateur de réseau du Fe dans les verres basaltiques, sa complexation, et donc la rupture des liaisons Fe–O, cause une dissolution plus rapide du verre. Le parallèle peut être fait avec Mn dans nos systèmes, car nous l'avons vu, le rôle joué sur la dissolution du verre par des molécules complexantes est significativement plus important en présence de Mn dans le verre.

Le Mn pourrait donc également avoir un rôle structural de formateur de réseau et faire partie de la famille des éléments intermédiaires qui peuvent avoir un rôle de modificateurs de réseau ou de formateurs de réseau selon l'environnement chimique dans lequel ils se trouvent (Henderson, 2005). Le verre silicaté calco-potassique des vitraux médiévaux étant un verre fortement dépolymérisé, avec une faible teneur en Si et Al, le Mn pourrait dans

ce cas être impliqué dans des liaisons covalentes avec l'O en tant que formateur de réseau. Pour cette raison, la rupture des liaisons Mn–O par complexation de Mn engendrerait une déstabilisation du réseau et donc des vitesses de dissolution plus élevées. En effet, Chalmin *et al.* (2009) ont montré que la spéciation du Mn est largement influencée par la composition du verre, et notamment par la nature et quantité de modificateurs de réseau. Cela est vrai pour d'autres éléments de transition (Galoisy *et al.*, 2001). Chalmin *et al.* (2009) affirment que dans des verres avec un fort contenu en alcalins, le  $\text{Mn}^{2+}$  est plus probablement situé dans des sites tétraédriques ou à bipyramide trigonale. Toutefois, une coordination tétraédrique pourrait ne pas être une indication d'une position de formateur de réseau (Galoisy *et al.*, 2000). En revanche le Mn pourrait occuper des sites différents dans le verre et être en partie formateur et en partie modificateur de réseau.

Malheureusement, il n'a pas été possible de caractériser l'environnement chimique ni l'état redox du Mn dans le verre et il faudrait donc venir conforter ces hypothèses avec investigation structurale plus poussée. Cependant, lors de l'étape de coulée pendant la synthèse du verre, le verre VM a présenté une plus grande viscosité (plus difficile à couler) que le verre VNM. Cette observation empirique pourrait être un signe d'un rôle de formateur du Mn, car l'introduction de formateurs de réseau rend le liquide fondu plus visqueux (Mysen et Richet, 2019). Cette observation devrait bien évidemment dans le futur être supportée par des mesures de viscosité.

Le rôle structural du Mn est important à connaître pour calculer par exemple le NBO/T (cf. Chapitre 1) pour les verres VNM et VM. Une valeur de NBO/T de 1,68 est obtenue pour VNM et une valeur de 1,74 pour VM si uniquement Si et Al sont considérés en site tétraédrique/formateur de réseau. Si l'on considère tout le Mn dans le verre sous forme de  $\text{Mn}^{2+}$  et en site de formateur de réseau, une valeur de 1,68 est obtenue pour VM. Selon la littérature, un verre avec un NBO/T plus élevé est censé être moins durable. Si Mn est considéré entièrement comme formateur de réseau, on obtient une valeur de NBO/T identique pour les deux verres (1,68). Cela devrait donc correspondre à un comportement d'altération identique, mais ce n'est pas ce qui est observé expérimentalement. Toutefois ces différences de NBO/T sont trop faibles pour pouvoir les associer à des différences de comportement, si par exemple on arrondit à un chiffre décimal on obtient dans tous les cas la même valeur de 1,7. De plus, les analyses Raman reportées dans le Chapitre 2 pour les verres VM et VNM ont montré que l'introduction du Mn ne change pas significativement la distribution des espèces  $Q^n$ . Le paramètre NBO/T ne s'avère donc pas très adapté dans ce cas de verres de composition très similaire, surtout si le rôle de tous les éléments en jeu n'est pas bien défini.

De la même façon, il est nécessaire d'avoir une connaissance précise du nombre de coordination de chaque espèce faisant partie du réseau atomique pour pouvoir calculer le nombre de contraintes atomiques selon la théorie TCT (Mascaraque *et al.*, 2017).

En conclusion, en l'absence d'informations précises sur la spéciation du Mn et son rôle structural, il n'est pas possible de discuter plus dans le détail la relation entre la structure et la dissolution. Cependant, ces observations sont intéressantes car elles sous-entendent que le comportement d'un verre lors de son altération pourrait donner des indices sur sa structure.

## 7.4 Compréhension du phénomène de brunissement des vitraux médiévaux ?

L'apparition du phénomène de brunissement (phases brunes enrichies en Mn) sur les vitraux médiévaux est liée à la présence d'une source de Mn interne ou externe au vitrail et à la capacité de cet élément à se concentrer à certains endroits de la couche altérée et à s'oxyder pour former les phases brunes.

Nous allons analyser le cas d'un vitrail sur verrière, où la source de Mn est forcément une source interne. En effet ce phénomène est observé principalement sur les pièces de verre incolores ou pourpres, à cause de la présence de Mn dans la composition du verre en tant que colorant ou décolorant. Des études précédentes ont étudié le brunissement causé par le Mn principalement sur des échantillons de vitraux archéologiques, qui ont été enfouis dans le sol, et qui sont donc en contact avec des sources externes de Mn (Watkinson *et al.*, 2005; Cagno *et al.*, 2011; Schalm *et al.*, 2011).

Les résultats décrits précédemment permettent désormais de faire un point sur les mécanismes possibles d'apparition du brunissement sur les vitraux sur verrière.

Plusieurs chemins peuvent être identifiés en divisant le phénomène en deux : l'étape de solubilisation du Mn, et l'étape de formation des phases brunes. Les deux étapes peuvent se produire via un chemin abiotique ou un chemin biotique.

En ce qui concerne l'étape de solubilisation, nous avons vu que le Mn est abiotiquement relâché par le verre en solution, cela a été montré lors des expériences de dissolution, mais aussi lors des expériences de préaltération des monolithes de verre qui ont montré que la couche altérée est appauvrie en Mn.

Cela est en accord avec les données de littérature qui montrent que lorsque le brunissement est localisé à un seul endroit de la couche altérée (Type II selon la classification de Ferrand (2013)), la couche altérée autour des phases brunes est appauvrie en Mn par rapport au verre sain.

Le Mn peut aussi être relâché de façon biotique par complexation avec des exsudats produits par les microorganismes. L'interaction avec ces exsudats cause en général une vitesse de dissolution plus élevée et donc une plus rapide augmentation de la concentration des éléments du verre dissous en solution. Notamment, nous avons vu que certains sidérophores (DFOB) peuvent causer une dissolution congruente du verre.

Le Mn est donc dans un premier moment mobilisé du réseau vitreux et solubilisé.

Reste à comprendre sous quelle forme se trouve le Mn dans le verre initial car l'état d'oxydation de départ peut influencer sa mobilité. Le  $\text{Mn}^{2+}$  est très soluble et relâché en solution de façon abiotique, alors que  $\text{Mn}^{3+}$  est stable en solution uniquement si complexé. Un état d'oxydation initial de  $\text{Mn}^{3+}$  impliquerait forcément l'intervention des microorganismes pour en favoriser la solubilisation (Figure 7.2). Le travail de Ferrand *et al.* (2015) a montré que pour deux échantillons de verre de vitrail incolore, le Mn dans le verre sain est principalement sous forme de  $\text{Mn}^{2+}$ . Sur d'autres échantillons, Nuyts *et al.* (2015) estiment un état d'oxydation moyen de 2,4. Le Mn dans un vitrail semble donc être le plus souvent dans sa forme réduite et pourrait donc être mobilisé facilement par voie abiotique.

Pour l'étape de formation des phases brunes, le chemin abiotique a montré que le Mn solubilisé en solution est capable de diffuser dans la couche altérée et causer un brunis-

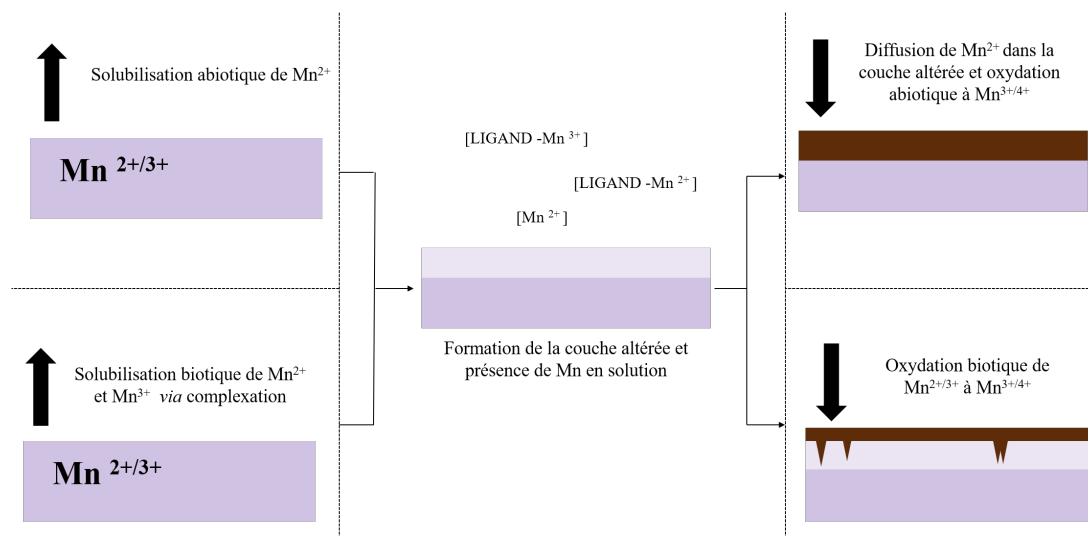


FIGURE 7.2 – Représentation schématique des possibles étapes de formation du brunissement. Solubilisation du Mn par voie abiotique ou biotique. Formation des phases brunes par voie abiotique ou biotique.

sement. Ces phases brunes obtenues ont des caractéristiques en commun avec certains échantillons observés par Ferrand (2013), par exemple l'enrichissement en Mn, le caractère amorphe et la forte réactivité sous faisceau. Sur les vitraux, une première étape de solubilisation du Mn pourrait donc se passer avec relâchement du Mn, suivie par une rediffusion de cet élément à l'intérieur de la couche. Dans nos tests, ce brunissement s'est produit sur l'intégralité de la couche altérée. Il resterait à expliquer dans ce cas l'apparition du brunissement à des endroits localisés de la couche d'altération.

Un chemin biotique a aussi été envisagé, dans ce cas l'oxydation est effectuée par des bactéries. Bien que la morphologie de cette phase brune biotique soit différente de celle observées sur les vitraux, nous avons vu que la présence de *P. putida* a un effet sur le devenir du Mn et du P présents en solution. Ceci est intéressant si l'on considère que la phase brune trouvée sur les vitraux pour certains échantillons présentés dans le travail de Ferrand (2013) présente des correspondances chimiques et structurales avec la purpurite (Figure 7.3), un phosphate de Mn. Il n'est donc pas possible d'exclure une évolution de la phase brune issue d'un processus microbien vers une phase phosphatée similaire à celle identifiée par Ferrand (2013). Une distribution non homogène des bactéries sur la surface du verre pourrait, dans ce cas, expliquer un phénomène de brunissement localisé.

Pour rappel, le brunissement est principalement observé en face interne d'un vitrail. L'hypothèse qui semble la plus vraisemblable pour sa formation est que e i) la solubilisation du Mn par voie abiotique ou biotique indirecte et ii) la formation de gouttes de condensation à des endroits localisés de la surface du verre causent une concentration de Mn en solution très élevée qui, couplée à la formation de puits de corrosion, pourrait être suivie par la pénétration de Mn dans la couche et la formation du brunissement par oxydation par voie chimique. En effet l'oxydation du Mn<sup>2+</sup> est thermodynamiquement favorable en environnements basiques (diagramme de Pourbaix Chapitre 1), comme c'est le cas exemple dans le verre altéré, en accord avec l'hypothèse avancée par Watkinson *et al.* (2005). Cette explication est aussi en accord avec l'observation de ce phénomène



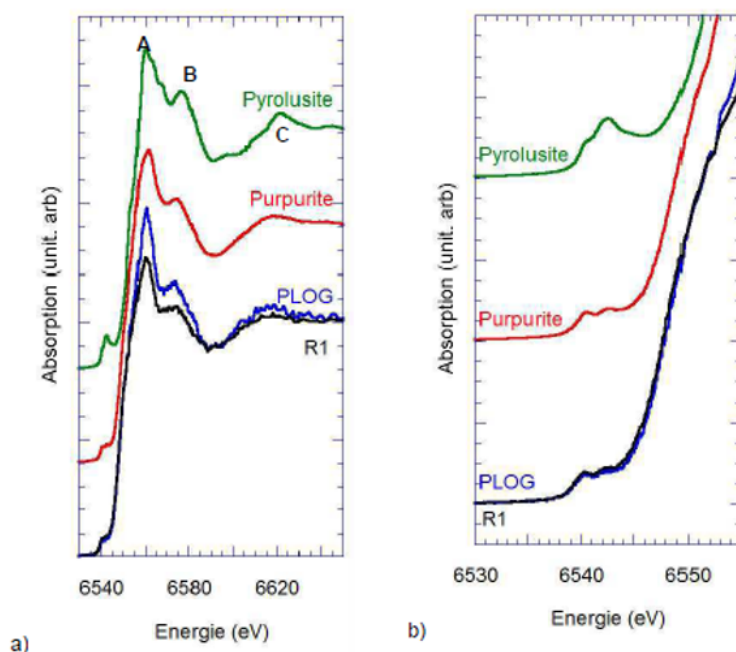


FIGURE 7.3 – Spectres XANES au seuil  $K$  du Mn des échantillons brunis de vitraux PLOG et R1 analysés lors du travail de Ferrand (2013), comparés avec les spectres de la pyrolusite ( $\text{MnO}_2$ ) et de la purpurite ( $\text{MnPO}_4$ ). a) vue globale des spectres et b) zoom sur la région des pré-pics.

majoritairement en face interne du vitrail et donc sujet à des cycles de condensation et d’humidité relative variable qui pourraient favoriser la formation de gouttes au niveau des défauts de surface. Les phases brunes restent toutefois à mieux comprendre : s’agit-il de nanocristaux amorphes d’oxydes de Mn à l’intérieur de la porosité de la couche d’altération ?

Les mécanismes sont probablement différents pour les vitraux archéologiques enfouis dans des sols, riches en matière organique et siège d’une intense activité biologique.

Une question qui n’a pas été traitée au cours de ce manuscrit est celle du traitement de cette pathologie, mais surtout de la prévention de sa re-apparition suite aux traitements réducteurs actuellement utilisés (Pilz, 1997; Bourleuf *et al.*, 2013).

Si on estime que la formation du brunissement est liée au moins en partie à la présence de microorganismes qui peuvent accentuer la solubilisation du verre et du Mn, une option serait de réaliser des traitements biocides. Toutefois, l’application de produits chimiques représente toujours un risque car ces substances peuvent interagir avec le verre et avoir des effets secondaires indésirables et irréversibles.

Une solution plus élégante serait, si l’on considère que cette pathologie est liée à des phénomènes de condensation qui causent un enrichissement en Mn dans des gouttes de solution, celle de prévenir l’apparition de ce phénomène en empêchant la condensation sur la surface du verre. Un contrôle de l’humidité relative est envisageable pour les vitraux déposés et exposés par exemple dans un contexte muséal. Cependant cela n’est pas possible dans un contexte de vitrail *in situ*. Pour obtenir un résultat similaire, l’utilisation de verrières de protection pourrait être une solution. Une nouvelle verrière est positionnée à l’ouverture de la baie, ainsi le vitrail est installé à l’intérieur de l’édifice, à quelques

centimètres de la barrière de protection. Cela protège le vitrail des forts changements de température qui peuvent causer la condensation (Bernardi *et al.*, 2013).

## 7.5 Perspectives

Plusieurs perspectives expérimentales peuvent être envisagées à la suite de ce travail de thèse pour i) consolider les résultats obtenus et ii) progressivement mener le système vers des conditions de plus en plus réalistes afin de corrélérer les résultats obtenus au cours de ce travail aux observations menées sur les vitraux anciens. Dans les paragraphes suivants, des perspectives expérimentales possibles ainsi que des tests préliminaires qui ont été entamés sont présentés.

### *Dissolution biotique*

Plusieurs pistes peuvent être explorées pour la poursuite des tests de dissolution du verre en présence de bactéries.

Il semblerait que les éléments nutritifs relâchés par le verre sont suffisants à la croissance bactérienne et que les bactéries n'ont donc pas besoin d'aller puiser des éléments à la surface du verre. Une possibilité, pour vérifier cette hypothèse, serait d'effectuer des expériences en réduisant encore le rapport S/V pour que les éléments relargués par les verres soient véritablement limitants. Toutefois il est aussi possible que les conditions expérimentales ne soient pas adaptées à l'observation d'éventuels mécanismes d'intensification de la dissolution opérés par les bactéries à cause de la (déjà élevée) vitesse de dissolution du verre dans le milieu de culture. Un milieu de culture encore plus simplifié serait donc à tester, mais avec le risque que les bactéries n'arrivent pas à s'y développer.

Aussi, pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes de dissolution par complexation, il faudrait faire des expériences de dissolution biotique indirecte comme celles du Chapitre 4 mais en présence de PVD aux mêmes concentrations testées pour la DFOB. Cela permettrait de comparer l'effet de ces deux sidérophores dans les mêmes conditions simplifiées.

Afin d'élucider le rôle du contact direct des bactéries/du biofilm avec le verre (notamment l'assimilation du Si), il serait envisageable d'effectuer des expériences de dissolution en présence de *Pseudomonas putida* mais avec une membrane de dialyse (Perez *et al.*, 2019) pour empêcher le contact direct des bactéries avec la surface de verre.

Enfin, certaines observations effectuées en présence de *P. putida*, comme par exemple l'absence d'une reprise de production de la PVD, peuvent aussi être liées à la croissance bactérienne qui est limitée en conditions de batch. Un autre objectif pour le futur serait celui d'avancer dans la mise en place d'un réacteur biotique afin de garder les bactéries dans un état de croissance exponentielle. Cela permettrait également d'observer l'impact de la formation de la couche altérée sur l'accessibilité aux éléments nutritifs.

Concernant les bactéries identifiées à partir des vitraux, un *screening* du potentiel altérant des souches les plus prometteuses, comme par exemples les bactéries appartenant au genre *Arthrobacter* (Kalinowski *et al.*, 2000a), serait envisageable. Des tests préliminaires de bioaltération systématique sur des microplaques (Figure 7.4) ont été mis en place lors de la visite de la chercheuse invitée C. Agnello au LGE dans le but de tester l'effet sur la

dissolution du verre de plusieurs souches bactériennes et plusieurs conditions d'altération en même temps.

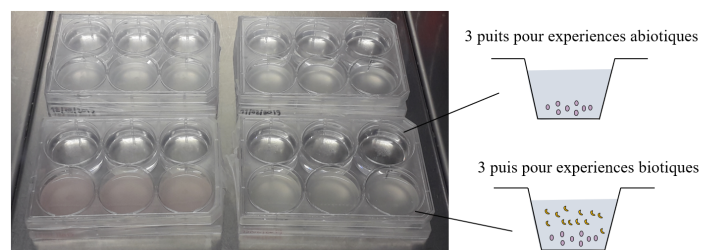


FIGURE 7.4 – Photo et représentation schématique des tests préliminaires de *screening* du potentiel altérant des bactéries prélevées sur les vitraux. Des plaques à micropuits permettent de réaliser plusieurs conditions altérantes en même temps.

### *Reproduction et caractérisation des phases brunes*

En ce qui concerne les tests de reproduction des phases brunes par voie abiotique, il serait intéressant de comparer des résultats d'expériences d'imbibition de durées différentes pour évaluer à partir de quel temps d'altération le changement de coloration est observé.

L'étape suivante de l'étude serait de remplacer la solution de  $\text{MnCl}_2$  par une solution résultant d'un test d'altération de VM, contenant donc tous les éléments lixiviés du verre dans les bonnes proportions et observer quel type d'enrichissement en Mn il est possible d'obtenir dans ces conditions.

Enfin, afin de poursuivre l'étude de la corrélation entre altération et composition/structure du verre, il serait intéressant de reproduire les expériences d'imbibition avec une composition de verre silicaté sodocalcique par exemple, ou avec plusieurs compositions en faisant varier les pourcentages d'alcalins, pour voir si le brunissement peut être obtenu pour toutes les compositions de verres anciens ou uniquement sur le verre silicaté calco-potassique.

Du point de vue analytique, il faudrait rechercher des méthodes d'analyses adaptées à ces échantillons très réactifs.

La caractérisation de l'état redox du Mn dans les phases brunes obtenues par voie abiotique a été entamée par spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS), afin de les comparer à une plus fine échelle aux résultats obtenus sur phases brunes présent sur les vitraux. Lors d'une campagne XAS dédiée à la coloration du verre par la présence de Fe et Mn sur la ligne TEMPO du synchrotron SOLEIL, des échantillons de couches brunies ont été analysés. Ces mesures ont été effectuées au seuil *L* du Mn car des phénomènes de photo-réduction sous faisceau sont souvent rencontrés au seuil *K* de Mn (Chalmin *et al.*, 2009; Ferrand *et al.*, 2015; Nuyts *et al.*, 2015). Le seuil *L* se trouve à une énergie plus faible et donc moins susceptible d'engendrer des phénomènes de photoreduction et selon le travail de Schofield *et al.* (1995), le seuil *L* du Mn peut aussi être utilisé pour obtenir des informations sur l'environnement chimique et l'état d'oxydation de cet élément. Les couches d'altération brunies obtenues par voie abiotique ont été étudiées, ainsi que les couches d'altération du verre VM altéré à pH 3 et pH 6, la surface a été grattée pour collecter assez de matériel et broyée. L'intensité du signal XANES étant proportionnelle à la concentration de l'élément sondé dans l'échantillon, le signal XANES pour le verre

sain est faible à cause de la faible quantité de Mn (2 poids % d'oxyde) dans le verre (Figure 7.5. La même remarque est valide pour les couches d'altération de VM-pH3 et VM-pH6. Au contraire, le signal est très intense pour les couches d'altération enrichies en Mn des échantillons VNM-pH3-Mn et VNM-pH6-Mn. Le traitement des données a présenté plusieurs difficultés à cause de problèmes techniques lors de l'enregistrement des spectres et la comparaison reste donc complexe. Toutefois, des différences peuvent être observées, il s'agit donc d'une direction envisageable, il serait nécessaire effectuer une campagne XAS dédiée à ces échantillons et mettre au point un protocole d'analyse adapté.

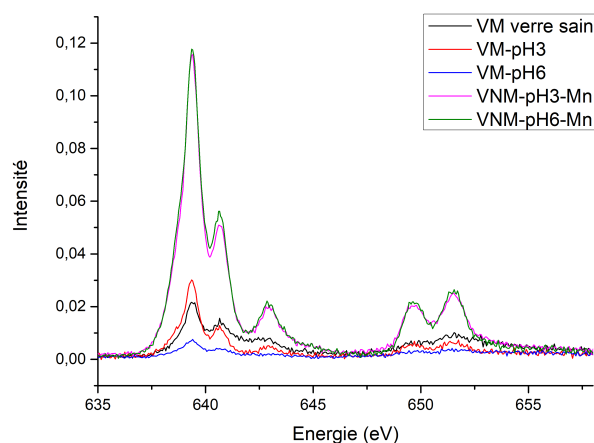


FIGURE 7.5 – Spectres d'absorption des rayons X au seuil  $L$  du Mn pour le verre VM sain, les couches de verre VM altéré à pH 3 et pH 6, et les couches de verre VNM altérées à pH 3 et pH 6 et brunies par imbibition d'une solution de  $\text{MnCl}_2$ . Une ligne de base a été soustraite manuellement pour comparaison.

De la même façon, il serait intéressant de mieux caractériser les phases brunes obtenues par voie biotique. Une meilleure caractérisation morphologique et chimique de ce biofilm est nécessaire afin d'avancer dans la comparaison avec les phases brunes trouvées sur les vitraux historiques et qui, dans certains cas, ont montré des ressemblances avec des phases phosphatées de Mn (Ferrand *et al.*, 2015).

#### *Altération en conditions insaturées abiotiques et biotiques*

Étant donnée la différence de comportement des verres VM et VNM en conditions d'altération en solution, il est intéressant de comparer le comportement de ces deux verres en conditions d'altération en milieu insaturé en eau. Des différences de comportement d'altération des verres selon les milieux (saturés ou insaturés en eau) ont déjà été observées (Narayanasamy *et al.*, 2019). Des tests préliminaires ont été lancés afin de comparer le comportement des verres VM et VNM en conditions atmosphériques. Ces tests sont réalisés au sein d'une chambre d'incubation où le contrôle hygrométrique (HR 95%) est effectué par une solution saturée en sel ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) ajouté en large excès à un bain d'EUP. Des capteurs hygrométriques ont été introduits dans l'enceinte pour vérifier le taux d'humidité relative. Cette enceinte est placée dans une étuve à 30°C.

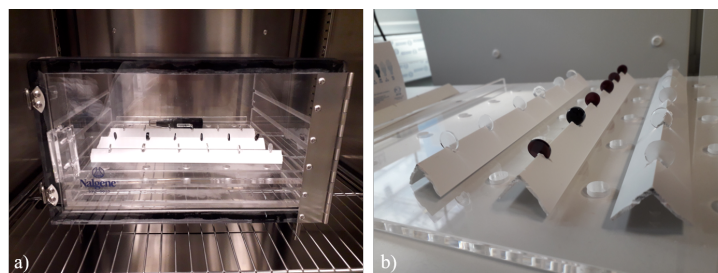


FIGURE 7.6 – a) Boite hermétique pour les tests d’altération de monolithes en conditions atmosphériques et b) Porte-échantillon fabriqué pour l’expérience

Afin de se rapprocher des conditions réelles, des tests de bioaltération du verre en conditions atmosphériques en présence de microorganismes sont également en cours de développement. Des premières expériences ont été lancés au LGE dans une chambre d’incubation comme celle décrite ci-dessus. Les monolithes de verre VM ont été stérilisés par UV-VIS sous hotte, puis trempés dans du milieu géosolé : PDA pour le champignon *Penicillium* choisi parmi ceux identifiés sur les vitraux, LB pour la bactérie modèle *Pseudomonas putida*. Une fine couche de gélose autour du verre est ainsi obtenue, qui servira de source de carbone pour les microorganismes. Les microorganismes ont été suspendus dans de l’eau stérile gélosée (Agar à 0,1%) et déposés sur les monolithes de verre.

## 7.6 Conclusions

Ce travail de thèse ouvre donc plusieurs perspectives expérimentales afin d’améliorer la compréhension des mécanismes observés et de se rapprocher de plus en plus des conditions réelles, mais il a aussi éclairci des aspects de l’apport microbien à l’altération des vitraux contenant du Mn. Plus en général il a apporté des nouvelles informations concernant l’interaction bactéries/substrat porteur de Mn, d’intérêt également dans d’autres domaines de biogéochimie environnementale (étude du cycle du Mn et dissolution des minéraux contenant du Mn).

Des méthodes de biogéochimie ont été appliquées à l’étude du phénomène de brunissement des vitraux médiévaux. Cette approche a permis d’étudier différents mécanismes de façon ciblée. Les résultats apportent des éléments de réponse aux interrogations posées lors de l’introduction de ce manuscrit. La mobilisation du Mn a été mise en évidence par voie abiotique et par voie biotique (*via* complexation). Dans ce sens, un parallèle avec le Fe peut être établi en tant qu’élément clé dans l’interaction verre/bactérie.

Ce travail a également permis d’obtenir un brunissement de la couche d’altération, ce qui était un des objectifs de cette thèse. Il faudra mieux caractériser ces échantillons afin de valider ou pas la possibilité de les utiliser en tant qu’analogues des phases brunes observées sur les vitraux dans le cadre par exemple de la mise au point de nouveaux traitements de restauration.

# Bibliographie

- ABDELOUAS, A., MENDILI, Y. E., CHAOU, A. A., KARAKURT, G., HARTNACK, C., BARDEAU, J.-F., SAITO, T. et MATSUZAKI, H. (2013). A preliminary investigation of the ISG glass vapor hydration. *International Journal of Applied Glass Science*, 4(4):307–316.
- ABRAJANO, T. A., BATES, J. K. et MAZER, J. J. (1989). Aqueous corrosion of natural and nuclear waste glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 108:269–288.
- ABUÍN, M., SERRANO, A., CHABOY, J., GARCÍA, M. A. et CARMONA, N. (2013). Xas study of mn, fe and cu as indicators of historical glass decay. *J. Anal. At. Spectrom.*, 28:1118–1124.
- AHMED, E. et HOLMSTRÖM, S. J. (2014). Siderophores in environmental research : Roles and applications. *Microbial Biotechnology*, 7(3):196–208.
- AKAFIA, M. M., HARRINGTON, J. M., BARGAR, J. R. et DUCKWORTH, O. W. (2014). Metal oxyhydroxide dissolution as promoted by structurally diverse siderophores and oxalate. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 141:258–269.
- ALLOTEAU, F. (2017). *Contribution à la compréhension des mécanismes de l'altération atmosphérique des verres et étude d'un traitement de protection à base de sels de zinc*. Thèse de doctorat, Paris Science et Lettres - PSL.
- ALLOTEAU, F., LEHUÉDÉ, P., MAJÉRUS, O., BIRON, I., DERVANIAN, A., CHARPENTIER, T. et CAURANT, D. (2017). New insight into atmospheric alteration of alkali-lime silicate glasses. *Corrosion Science*, 122(November 2016):12–25.
- ALLOTEAU, F., MAJÉRUS, O., BIRON, I., LEHUÉDÉ, P., CAURANT, D., CHARPENTIER, T. et SEYEUX, A. (2019). Temperature-dependent mechanisms of the atmospheric alteration of amixed-alkali lime silicate glass. *Corrosion Science*, (159):108–129.
- ANDREINI, C., BERTINI, I., CAVALLARO, G., HOLLIDAY, G. L. et THORNTON, J. M. (2008). Metal ions in biological catalysis : from enzyme databases to general principles. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 13(8):1205–1218.
- ANOVITZ, L. M., ELAM, J. M., RICIPUTI, L. R. et COLE, D. R. (1999). The failure of obsidian hydration dating : Sources, implications, and new directions. *Journal of Archaeological Sciences*, 26:735–752.

- AOUAD, G., CROVISIER, J. L., GEOFFROY, V. A., MEYER, J. M. et STILLE, P. (2006). Microbially-mediated glass dissolution and sorption of metals by *Pseudomonas aeruginosa* cells and biofilm. *Journal of Hazardous Materials*, 136(3):889–895.
- ARLETTI, R., GIACOBBE, C., QUARTIERI, S., SABATINO, G., TIGANO, G., TRISCARI, M. et VEZZALINI, G. (2010). Archaeometrical investigation of sicilian early byzantine glass : chemical and spectroscopic data. *Archaeometry*, 52,1:99–114.
- ARLETTI, R., QUARTIERI, S. et FREESTONE, I. C. (2012). A XANES study of chromophores in archaeological glass. *Applied Physics A*, 111(1):99–108.
- ASAY, D. B. et KIM, S. H. (2005). Evolution of the adsorbed water layer structure on silicon oxide at room temperature. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(35): 16760–16763.
- BARKER, W. W., WELCH, S. A., CHU, S. et BANFIELD, J. F. (1998). Experimental observations of the effects of bacteria on aluminosilicate weathering. *American Mineralogist*, 83(11-12 Part 2):1551–1563.
- BATES, J., SEITZ, M. et STEINDLER, M. (1984). The relevance of vapor phase hydration aging to nuclear waste isolation. *Nuclear and Chemical Waste Management*, 5(1):63–73.
- BENNETT, P., MELCER, M., SIEGEL, D. et HASSETT, J. (1988). The dissolution of quartz in dilute aqueous solutions of organic acids at 25°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 52(6):1521–1530.
- BENNETT, P. C. (1991). Quartz dissolution in organic-rich aqueous systems. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 55(7):1781–1797.
- BENNETT, P. C., ROGERS, J. R., CHOI, W. J. et HIEBERT, F. K. (2001). Silicates, silicate weathering, and microbial ecology. *Geomicrobiology Journal*, 18(1):3–19.
- BENZERARA, K., MIOT, J., MORIN, G., ONA-NGUEMA, G., SKOURI-PANET, F. et FÉRRARD, C. (2011). Significance, mechanisms and environmental implications of microbial biomineralization. *Comptes Rendus Geoscience*, 343(2-3):160–167.
- BERGER, G., CLAPAROLS, C., GUY, C. et DAUX, V. (1994). Dissolution rate of a basalt glass in silica-rich solutions : Implications for long-term alteration. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 58(22):4875–4886.
- BERNARDI, A., BECHERINI, F., BASSATO, G. et BELLIO, M. (2006). Condensation on ancient stained glass windows and efficiency of protective glazing systems : two french case studies, sainte-chapelle (paris) and saint-urbain basilica (troyes). *Journal of Cultural Heritage*, 7(1):71–78.
- BERNARDI, A., BECHERINI, F., VERITÀ, M., AUSSET, P., BELLIO, M., BRINKMANN, U., CACHIER, H., CHABAS, A., DEUTSCH, F., ETCHEVERRY, M.-P., BIANCHINI, F. G., GODOI, R. H., KONTOZOVA-DEUTSCH, V., LEFÈVRE, R., LOMBARDO, T., MOTTNER, P., NICOLA, C., PALLOT-FROSSARD, I., RÖLLEKE, S., RÖMICH, H., SOMMARIVA, G., VALLOTTO, M. et GRIEKEN, R. V. (2013). Conservation of stained glass windows

- with protective glazing : Main results from the european VIDRIO research programme. *Journal of Cultural Heritage*, 14(6):527–536.
- BIDEGARAY, A.-I., CEGLIA, A., CICONI, M. R., PHAM, V.-T., CRABBÉ, A., CHERIGUI, E. A. M., NYS, K., TERRY, H., NEUVILLE, D. R. et GODET, S. (2018). An in-situ XANES investigation of the interactions between iron, manganese and antimony in silicate melts. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 502:227–235.
- BIDEGARAY, A.-I., GODET, S., BOGAERTS, M., COSYNS, P., NYS, K., TERRY, H. et CEGLIA, A. (2019). To be purple or not to be purple ? how different production parameters influence colour and redox in manganese containing glass. *Journal of Archaeological Science : Reports*, 27:101975.
- BIRON, I. (2015). *Emaux sur métal du IXe au XIXe siècle : Histoire, technique et matériaux*. éditions Faton.
- BLONDEL, N. (1993). *Le vitrail : vocabulaire typologique et technique*. Paris : Imprimerie nationale.
- BOURLEUF, É. V. D., FERRAND, J., ROSSANO, S., LOISEL, C., BAUCHAU, F., BOUSTA, F., ORIAL, G., FRANÇOIS, A., HULLEBUSCH, E. V., TRCERA, N. et PALLOT-FROSSARD, I. (2013). Étude du phénomène de brunissement de vitraux médiévaux. In *Recent advances in glasses, stained-glass, and ceramics conservation 2013. ICOM-CC Glass and Ceramics Working Group Interim Meeting and Forum of the International Scientific Committee for the Conservation of Stained Glass (Corpus Vitrearum-ICOMOS)*, pages 117–121.
- BRAUD, A., HOEGY, F., JEZEQUEL, K., LEBEAU, T. et SCHALK, I. J. (2009). New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. *Environmental Microbiology*, 11(5):1079–1091.
- BREHM, U., GORBUSHINA, A. et MOTTERSHEAD, D. (2005). The role of microorganisms and biofilms in the breakdown and dissolution of quartz and glass. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 219(1-2):117–129.
- BRILL, R. H. (1975). Crizzling - a problem in glass conservation. *Conservation in Archaeology and the Applied Arts, Stockholm Congress*, pages 121 – 134.
- BUNKER, B. C. (1994). Molecular mechanisms for corrosion of silica and silicate glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 179:300–308.
- CAGNO, S., NUYTS, G., BUGANI, S., DE VIS, K., SCHALM, O., CAEN, J., HELFEN, L., COTTE, M., REISCHIG, P. et JANSSENS, K. (2011). Evaluation of manganese-bodies removal in historical stained glass windows via SR- $\mu$ -XANES/XRF and SR- $\mu$ -CT. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 26(12):2442–2451.
- CAILLETEAU, C., ANGELI, F., DEVREUX, F., GIN, S., JESTIN, J., JOLLIVET, P. et SPALLA, O. (2008a). Insight into silicate-glass corrosion mechanisms. *Nature Materials*, 7(12):978–983.



- CAILLETEAU, C., WEIGEL, C., LEDIEU, A., BARBOUX, P. et DEVREUX, F. (2008b). On the effect of glass composition in the dissolution of glasses by water. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 354(2-9):117–123.
- CALVARUSO, C., TURPAULT, M. P., FREY-KLETT, P., UROZ, S., PIERRET, M. C., TOSHEVA, Z. et KIES, A. (2013). Increase of apatite dissolution rate by scots pine roots associated or not with burkholderia glathei PML1(12)Rp in open-system flow microcosms. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 106:287–306.
- CAMA, J. et GANOR, J. (2006). The effects of organic acids on the dissolution of silicate minerals : A case study of oxalate catalysis of kaolinite dissolution. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70(9):2191–2209.
- CARMONA, N., LAIZ, L., GONZALEZ, J. M., GARCIA-HERAS, M. H., VILLEGAS, M. A. et SAIZ-JIMENEZ, C. (2006). Biodeterioration of historic stained glasses from the Cartuja de Miraflores (Spain). *International Biodeterioration and Biodegradation*, 58(3-4):155–161.
- CARRILLO-GONZÁLEZ, R., MARTÍNEZ-GÓMEZ, M. A., del CARMEN A. GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M. et HERNÁNDEZ, J. C. M. (2016). Inhibition of microorganisms involved in deterioration of an archaeological site by silver nanoparticles produced by a green synthesis method. *Science of The Total Environment*, 565:872–881.
- CEGLIA, A., NUYTS, G., MEULEBROECK, W., CAGNO, S., SILVESTRI, A., ZOLEO, A., NYS, K., JANSSENS, K., THIENPONT, H. et TERRY, H. (2015). Iron speciation in soda-lime-silica glass : a comparison of xanes and uv-vis-nir spectroscopy. *J. Anal. At. Spectrom.*, 30:1552–1561.
- CHALLARAJ-EMMANUEL, E., ANANTHI, T., ANANDKUMAR, B. et MARUTHAMUTHU, S. (2012). Accumulation of rare earth elements by siderophore-forming arthrobacter luteolus isolated from rare earth environment of chavara, india. *Journal of Biosciences*, 37(1):25–31.
- CHALMIN, E., FARGES, F. et BROWN, G. E. (2009). A pre-edge analysis of Mn K-edge XANES spectra to help determine the speciation of manganese in minerals and glasses. *Contributions to Mineralogy and Petrology*, 157(1):111–126.
- CHEAH, S. F., KRAEMER, S. M., CERVINI-SILVA, J. et SPOSITO, G. (2003). Steady-state dissolution kinetics of goethite in the presence of desferrioxamine B and oxalate ligands : Implications for the microbial acquisition of iron. *Chemical Geology*, 198(1-2):63–75.
- COLIN, Y., NICOLITCH, O., TURPAULT, M. P. et UROZ, S. (2017). Mineral types and tree species determine the functional and taxonomic structures of forest soil bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(5):1–23.
- COLOMBAN, P., ETCHEVERRY, M. P., ASQUIER, M., BOUNICHOU, M. et TOURNIÉ, A. (2006). Raman identification of ancient stained glasses and their degree of deterioration. *Journal of Raman Spectroscopy*, 37(5):614–626.

- CONRADT, R. (2008). Chemical durability of oxide glasses in aqueous solutions : A review. *Journal of the American Ceramic Society*, 91(3):728–735.
- COOPER, G. I., COX, G. A. et PERUTZ, R. N. (1993). Infra-red microspectroscopy as a complementary technique to electron-probe microanalysis for the investigation of natural corrosion on potash glasses. *Journal of Microscopy*, 170(2):111–118.
- CORRÊA PINTO, A. M., PALOMAR, T., ALVES, L. C., da SILVA, S. H., MONTEIRO, R. C., MACEDO, M. F. et VILARIGUES, M. G. (2019). Fungal biodeterioration of stained-glass windows in monuments from Belém do Pará (Brazil). *International Biodeterioration and Biodegradation*, 138(September 2018):106–113.
- COX, G. A. et FORD, B. A. (1993). The long-term corrosion of glass by ground- water. *Journal of Materials Science*, 28:5637–5647.
- CROMACK, K., SOLLINS, P., GRAUSTEIN, W. C., SPEIDEL, K., TODD, A. W., SPYCHER, G., LI, C. Y. et TODD, R. L. (1979). Calcium oxalate accumulation and soil weathering in mats of the hypogeous fungus *hysterangium crassum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 11(5):463–468.
- DAUX, V., GUY, C., ADVOCAT, T., CROVISIER, J.-L. et STILLE, P. (1997). Kinetic aspects of basaltic glass dissolution at 90°C : role of aqueous silicon and aluminium. *Chemical Geology*, 142(1-2):109–126.
- DE BARDI, M., HUTTER, H. et SCHREINER, M. (2013). ToF-SIMS analysis for leaching studies of potash-lime-silica glass. *Applied Surface Science*, 282:195–201.
- DE FERRI, L., LOTTICI, P. P. et VEZZALINI, G. (2014). Characterization of alteration phases on Potash-Lime-Silica glass. *Corrosion Science*, 80:434–441.
- DENATALE, J. et HOWITT, D. (1984). A mechanism for radiation damage in silicate glasses. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B : Beam Interactions with Materials and Atoms*, 1(2-3):489–497.
- DIDIER, F. (2017). Plan des vitraux de la chapelle royale de versailles d’après l’architecte en chef des monuments historiques. Rapport technique, Agence 2BDM Architecture et Patrimoine, Versailles.
- DOMÉNECH-CARBÓ, A., DOMÉNECH-CARBÓ, M. T. et OSETE-CORTINA, L. (2001). Identification of manganese(IV) centers in archaeological glass using microsample coatings attached to polymer film electrodes. *Electroanalysis*, 13(11):927–935.
- DONG, H. (2010). Mineral-microbe interactions : A review. *Frontiers of Earth Science in China*, 4(2):127–147.
- DOREMUS, R. (1975). Interdiffusion of hydrogen and alkali ions in a glass surface. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 19:137–144.
- DREVER, J. et STILLINGS, L. (1997). The role of organic acids in mineral weathering. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 120(1-3):167–181.

- DREWELLO, R. et WEISSMANN, R. (1997). Microbially influenced corrosion of glass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47(4):337–346.
- DUCKWORTH, O. W., BARGAR, J. R. et SPOSITO, G. (2009). Coupled biogeochemical cycling of iron and manganese as mediated by microbial siderophores. *BioMetals*, 22(4): 605–613.
- DUCKWORTH, O. W. et SPOSITO, G. (2005a). Siderophore-manganese (III) interactions. I. Air-oxidation of manganese(II) promoted by desferrioxamine B. *Environmental Science and Technology*, 39(16):6037–6044.
- DUCKWORTH, O. W. et SPOSITO, G. (2005b). Siderophore-Manganese(III) interactions II. Manganite dissolution promoted by desferrioxamine B. *Environmental Science and Technology*, 39(16):6045–6051.
- DUNGWORTH, D. et BRAIN, C. (2009). Late 17th-century crystal glass : An analytical investigation. *Journal of Glass Studies*, 51:111–137.
- EDEL, V., STEINBERG, C., GAUTHERON, N., RECORBET, G. et ALABOUVETTE, C. (2001). Genetic diversity of fusarium oxysporum populations isolated from different soils in france. *FEMS Microbiology Ecology*, 36(1):61–71.
- FARGES, F., LEFRÈRE, Y., ROSSANO, S., BERTHEREAU, A., CALAS, G. et BROWN, G. E. (2004). The effect of redox state on the local structural environment of iron in silicate glasses : a combined XAFS spectroscopy, molecular dynamics, and bond valence study. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 344(3):176–188.
- FAULKNER, K. M., STEVENS, R. D. et FRIDOVICH, I. (1994). Characterization of Mn(III) complexes of linear and cyclic desferrioxamines as mimics of superoxide dismutase activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 310(2):341–346.
- FEARN, S., MCPHAIL, D. S., HAGENHOFF, B. et TALLAREK, E. (2006). TOF-SIMS analysis of corroding museum glass. *Applied Surface Science*, 252(19):7136–7139.
- FEIN, J. B. et HESTRIN, J. E. (1994). Experimental studies of oxalate complexation at 80 °c : Gibbsite, amorphous silica, and quartz solubilities in oxalate-bearing fluids. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 58(22):4817–4829.
- FERRAND, J. (2013). *Le phénomène de brunissement des vitraux médiévaux : critères d'identification et nature de la phase d'altération*. Thèse de doctorat, Université Paris Est Marne la Vallée.
- FERRAND, J., ROSSANO, S., LOISEL, C., TRCERA, N., VAN HULLEBUSCH, E. D., BOUSTA, F. et PALLOT-FROSSARD, I. (2015). Browning Phenomenon of Medieval Stained Glass Windows. *Analytical Chemistry*, 87(7):3662–3669.
- FERREIRA, C. M. H., PINTO, I. S. S., SOARES, E. V. et SOARES, H. M. V. M. (2015). (un)suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions – a review. *RSC Advances*, 5(39):30989–31003.

- FERRET, C., STERCKEMAN, T., CORNU, J.-Y., GANGLOFF, S., SCHALK, I. J. et GEOFFROY, V. A. (2014). Siderophore-promoted dissolution of smectite by fluorescent *Pseudomonas*. *Environmental Microbiology Reports*, 6(5):459–467.
- FISCHER, T. B., HEANEY, P. J. et POST, J. E. (2018). Changes in the structure of birnessite during siderophore-promoted dissolution : A time-resolved synchrotron X-ray diffraction study. *Chemical Geology*, 476(July 2017):46–58.
- FOURNIER, M., GIN, S. et FRUGIER, P. (2014). Resumption of nuclear glass alteration : State of the art. *Journal of Nuclear Materials*, 448(1-3):348–363.
- FOX, T. et COMERFORD, N. (1990). Low-Molecular-Weight Organic Acids in Selected Forest Soils of the Southeastern USA. *Soil Science Society of America Journal*, 54(4): NP–NP.
- FREESTONE, I. C. (2006). Glass production in late antiquity and the early islamic period : a geochemical perspective. *Geological Society, London, Special Publications*, 257(1):201–216.
- FREY, B., RIEDER, S. R., BRUNNER, I., PLOTZE, M., KOETZSCH, S., LAPANJE, A., BRANDL, H. et FURRER, G. (2010). Weathering-associated bacteria from the damma glacier forefield : Physiological capabilities and impact on granite dissolution. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(14):4788–4796.
- FRUGIER, P., GIN, S., MINET, Y., CHAVE, T., BONIN, B., GODON, N., LARTIGUE, J. E., JOLLIVET, P., AYRAL, A., DE WINDT, L. et SANTARINI, G. (2008). SON68 nuclear glass dissolution kinetics : Current state of knowledge and basis of the new GRAAL model. *Journal of Nuclear Materials*, 380(1-3):8–21.
- GADD, G. M. (1999). Fungal production of citric and oxalic acid : Importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes. *Advances in Microbial Physiology*, 41:47–92.
- GALOISY, L., CALAS, G. et ARRIO, M. A. (2001). High-resolution xanes spectra of iron in minerals and glasses : structural information from the pre-edge region. *Chemical Geology*, (174):307–319.
- GALOISY, L., CORMIER, L., ROSSANO, S., RAMOS, A., CALAS, G., GASKELL, P. et GRAND, M. L. (2000). Cationic ordering in oxide glasses : the example of transition elements. *Mineralogical Magazine*, 64(3):409–424.
- GATUINGT, L. (2017). *Etude des mécanismes de formation des patines manganésifères des grès du château de Lunéville*. Thèse de doctorat, Université Paris Est.
- GEISLER, T., JANSSEN, A., SCHEITER, D., STEPHAN, T., BERNDT, J. et PUTNIS, A. (2010). Aqueous corrosion of borosilicate glass under acidic conditions : A new corrosion mechanism. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 356(28-30):1458–1465.
- GENTAZ, L. (2011). *Simulation Et Modelisation De L'Alteration Des Verres De Composition Medievale Dans L'Atmosphere Urbaine*. Thèse de doctorat, University Paris-Est Créteil.

- GENTAZ, L., LOMBARDO, T., CHABAS, A., LOISEL, C., NEFF, D. et VERNEY-CARRON, A. (2016). Role of secondary phases in the scaling of stained glass windows exposed to rain. *Corrosion Science*, 109:206–216.
- GENTAZ, L., LOMBARDO, T., LOISEL, C., CHABAS, A. et VALLOTTO, M. (2011). Early stage of weathering of medieval-like potash-lime model glass : Evaluation of key factors. *Environmental Science and Pollution Research*, 18(2):291–300.
- GIN, S., ABDELOUAS, A., CRISCENTI, L. J., EBERT, W. L., FERRAND, K., GEISLER, T., HARRISON, M. T., INAGAKI, Y., MITSUI, S., MUELLER, K. T., MARRA, J. C., PANTANO, C. G., PIERCE, E. M., RYAN, J. V., SCHOFIELD, J. M., STEEFEL, C. I. et VIENNA, J. D. (2013a). An international initiative on long-term behavior of high-level nuclear waste glass. *Materials Today*, 16(6):243–248.
- GIN, S., BEAUDOUX, X., ANGÉLI, F., JÉGOU, C. et GODON, N. (2012). Effect of composition on the short-term and long-term dissolution rates of ten borosilicate glasses of increasing complexity from 3 to 30 oxides. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 358(18-19):2559–2570.
- GIN, S., JÉGOU, C., FRUGIER, P. et MINET, Y. (2008). Theoretical consideration on the application of the aagaard–helgeson rate law to the dissolution of silicate minerals and glasses. *Chemical Geology*, 255(1-2):14–24.
- GIN, S., JOLLIVET, P., BARBA ROSSA, G., TRIBET, M., MOUGNAUD, S., COLLIN, M., FOURNIER, M., CADEL, E., CABIE, M. et DUPUY, L. (2017). Atom-Probe Tomography, TEM and ToF-SIMS study of borosilicate glass alteration rim : A multiscale approach to investigating rate-limiting mechanisms. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 202:57–76.
- GIN, S., JOLLIVET, P., FOURNIER, M., BERTHON, C., WANG, Z., MITROSHKOV, A., ZHU, Z. et RYAN, J. V. (2015). The fate of silicon during glass corrosion under alkaline conditions : A mechanistic and kinetic study with the International Simple Glass. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 151:68–85.
- GIN, S., RYAN, J. V., SCHREIBER, D. K., NEEWAY, J. et CABIÉ, M. (2013b). Contribution of atom-probe tomography to a better understanding of glass alteration mechanisms : Application to a nuclear glass specimen altered 25 years in a granitic environment. *Chemical Geology*, 349-350:99–109.
- GIN, S., WANG, M., BISBROUCK, N., TARON, M., LU, X., DENG, L., ANGELI, F., CHARPENTIER, T., DELAYE, J.-M., DU, J. et BAUCHY, M. (2020). Can a simple topological-constraints-based model predict the initial dissolution rate of borosilicate and aluminosilicate glasses ? *npj Materials Degradation*, 4(1).
- GLIOZZO, E. (2016). The composition of colourless glass : a review. *Archaeological and Anthropological Sciences*, 9(4):455–483.
- GOOD, N. E., WINGET, G. D., WINTER, W., CONNOLLY, T. N., IZAWA, S. et SINGH, R. M. M. (1966). Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry*, 5(2):467–477.

- GORBUSHINA, A. A., HEYRMAN, J., DORNIEDEN, T., GONZALEZ-DELVALLE, M., KRUMBEIN, W. E., LAIZ, L., PETERSEN, K., SAIZ-JIMENEZ, C. et SWINGS, J. (2004). Bacterial and fungal diversity and biodeterioration problems in mural painting environments of st. martins church (greene–kreiensen, germany). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 53(1):13–24.
- GORBUSHINA, A. A. et PALINSKA, K. A. (1999). Biodeteriorative processes on glass : experimental proof of the role of fungi and cyanobacteria. *Aerobiologia*, 15:183–191.
- GRAMBOW, B., JERCINOVIC, M. J., EWING, R. C. et BYERS, C. D. (1985). Weathered basalt glass : A natural analogue for the effects of REACTION progress on nuclear waste glass alteration. *MRS Proceedings*, 50.
- GRANGEON, S., LANSON, B., MIYATA, N., TANI, Y. et MANCEAU, A. (2010). Structure of nanocrystalline phyllophanates produced by freshwater fungi. *American Mineralogist*, 95(11-12):1608–1616.
- GREEN, L. R. et HART, F. A. (1987). Colour and chemical composition in ancient glass : An examination of some roman and wealden glass by means of ultraviolet-visible-infrared spectrometry and electron microprobe analysis. *Journal of Archaeological Science*, 14(3):271–282.
- GROTTOLI, A., BECCACCIOLI, M., ZOPPI, E., FRATINI, R. S., SCHIFANO, E., SANTARELLI, M. L., UCCELLETTI, D. et REVERBERI, M. (2020). Nanopore sequencing and bioinformatics for rapidly identifying cultural heritage spoilage microorganisms. *Frontiers in Materials*, 7.
- GUITTONNEAU, C., GIN, S., GODON, N., MESTRE, J. P., DUGNE, O. et ALLEGRI, P. (2011). A 25-year laboratory experiment on French SON68 nuclear glass leached in a granitic environment - First investigations. *Journal of Nuclear Materials*, 408(1):73–89.
- GULMINI, M., PACE, M., IVALDI, G., PONZI, M. N. et MIRTI, P. (2009). Morphological and chemical characterization of weathering products on buried Sasanian glass from central Iraq. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 355(31-33):1613–1621.
- GURTNER, C., HEYRMAN, J., PIÑAR, G., LUBITZ, W., SWINGS, J. et RÖLLEKE, S. (2000). Comparative analyses of the bacterial diversity on two different biodeteriorated wall paintings by DGGE and 16s rDNA sequence analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46(3):229–239.
- GUY, C. et SCHOTT, J. (1989). Multisite surface reaction versus transport control during hydrolysis of a complex oxide. *Chemical Geology*, 78:181–204.
- HASELWANDTER, K. (1995). Mycorrhizal fungi : Siderophore production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 15(3-4):287–291.
- HAUSRATH, E. M., NEAMAN, A. et BRANTLEY, S. L. (2009). Elemental release rates from dissolving basalt and granite with and without organic ligands. *American Journal of Science*, 309(8):633–660.

- HELLMANN, R., COTTE, S., CADEL, E., MALLADI, S., KARLSSON, L. S., LOZANO-PEREZ, S., CABIÉ, M. et SEYEUX, A. (2015). Nanometre-scale evidence for interfacial dissolution-precipitation control of silicate glass corrosion. *Nature Materials*, 14(3):307–311.
- HENDERSON, G. S. (2005). The structure of silicate melts : a glass perspective. *The Canadian Mineralogist*, 43(6):1921–1958.
- HENRI, P. A., ROMMEVAUX-JESTIN, C., LESONGEUR, F., MUMFORD, A., EMERSON, D., GODFROY, A. et MÉNEZ, B. (2016). Structural iron (II) of basaltic glass as an energy source for zetaproteobacteria in an abyssal plain environment, off the mid atlantic ridge. *Frontiers in Microbiology*, 6.
- HERSMAN, L., LLOYD, T. et SPOSITO, G. (1995). Siderophore-promoted dissolution of hematite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59(16):3327–3330.
- HEYRMAN, J., MERGAERT, J., DENYS, R. et SWINGS, J. (1999). The use of fatty acid methyl ester analysis (fame) for the identification of heterotrophic bacteria present on three mural paintings showing severe damage by microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 181:55–62.
- HEYRMAN, J., MERGAERT, J. et SWINGS, J. (2000). Diversity of heterotrophic bacteria isolated from three european mural paintings. In *9th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone, Venice 19-24 June 2000*.
- HEYRMAN, J. et SWINGS, J. (2001). 16s rDNA sequence analysis of bacterial isolates from biodeteriorated mural paintings in the servilia tomb (Necropolis of Carmona, Seville, Spain). *Systematic and Applied Microbiology*, 24(3):417–422.
- HEYRMAN, J., VERBEEREN, J., SCHUMANN, P., SWINGS, J. et VOS, P. D. (2005). Six novel arthrobacter species isolated from deteriorated mural paintings. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(4):1457–1464.
- HOLMÉN, B. A. et CASEY, W. H. (1996). Hydroxamate ligands, surface chemistry, and the mechanism of ligand-promoted dissolution of goethite [ $\alpha$ -FeOOH(s)]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 60(22):4403–4416.
- HÉROLD, M. et GATOULLAT, F. (1994). "les vitraux de lorraine et d'alsace". inventaire général des monuments et des richesses artistiques de la france, recensement des vitraux anciens de la france, volume v. ouvrage publié sous la direction scientifique du comité français du corpus vitrearum et du laboratoire de recherche sur le patrimoine français avec le concours de la région alsace. Rapport technique, CNRS.
- HUANG, W. H. et KELLER, W. D. (1972). Organic acids as agents of chemical weathering of silicate minerals. *Nature Physical Science*, 239(96):149–151.
- HUNAULT, M. (2014). *Rôle des éléments de transition (Co, Cu) dans la coloration des verres : application aux vitraux du moyen âge*. Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie.

- HUNAUULT, M., CALAS, G., GALOISY, L., LELONG, G. et NEWVILLE, M. (2013). Local ordering around tetrahedral  $\text{CO}_2^+$  in silicate glasses. *Journal of the American Ceramic Society*, 97(1):60–62.
- INAGAKI, Y. (2014). Micro-channel as a new tool to investigate glass dissolution kinetics. *Procedia Materials Science*, 7:172–178.
- JACKSON, C. M. (2005). Making colourless glass in the Roman period. *Archaeometry*, 47(4):763–780.
- JIANG, N., QIU, J., ELLISON, A. et SILCOX, J. (2003). Fundamentals of high-energy electron-irradiation-induced modifications of silicate glasses. *Physical Review B*, 68(6).
- KALINOWSKI, B., LIERMANN, L., BRANTLEY, S., BARNES, A. et PANTANO, C. (2000a). X-ray photoelectron evidence for bacteria-enhanced dissolution of hornblende. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64(8):1331–1343.
- KALINOWSKI, B. E., LIERMANN, L. J., GIVENS, S. et BRANTLEY, S. L. (2000b). Rates of bacteria-promoted solubilization of Fe from minerals : a review of problems and approaches. *Chemical Geology*, 169:357–370.
- KEHRES, D. G. et MAGUIRE, M. E. (2003). Emerging themes in manganese transport, biochemistry and pathogenesis in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3):263–290.
- KELLY, L. C., COLIN, Y., TURPAULT, M. P. et UROZ, S. (2016). Mineral Type and Solution Chemistry Affect the Structure and Composition of Actively Growing Bacterial Communities as Revealed by Bromodeoxyuridine Immunocapture and 16S rRNA Pyrosequencing. *Microbial Ecology*, 72(2):428–442.
- KENDALL, T. A. et HOHELLA, M. F. (2003). Measurement and interpretation of molecular-level forces of interaction between the siderophore azotobactin and mineral surfaces. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67(19):3537–3546.
- KHAN, A., SINGH, P. et SRIVASTAVA, A. (2018). Synthesis, nature and utility of universal iron chelator – siderophore : A review. *Microbiological Research*, 212-213:103–111.
- KLEWICKI, J. et MORGAN, J. (1999). Dissolution of  $\beta$ - $\text{MnOOH}$  particles by ligands : pyrophosphate, ethylenediaminetetraacetate, and citrate. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 63(19-20):3017–3024.
- KOOB, S. P., van GIFFEN, N. A. R., KUNICKI-GOLDFINGER, J. J. et BRILL, R. H. (2018). Caring for Glass Collections : The Importance of Maintaining Environmental Controls. *Studies in Conservation*, 63(sup1):146–150.
- KRAEMER, S. M. (2004). Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquatic Sciences*, 66(1):3–18.
- KRAEMER, S. M., CHEAH, S. F., ZAPF, R., XU, J., RAYMOND, K. N. et SPOSITO, G. (1999). Effect of hydroxamate siderophores on Fe release and Pb(II) adsorption by goethite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 63(19-20):3003–3008.



- KRUFT, B. I., HARRINGTON, J. M., DUCKWORTH, O. W. et JARZECKI, A. A. (2013). Quantum mechanical investigation of aqueous desferrioxamine B metal complexes : Trends in structure, binding, and infrared spectroscopy. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 129:150–161.
- KRUMBEIN, W. E., URZÌ, C. E. et GEHRMANN, C. (1991). Biocorrosion and biodeterioration of antique and medieval glass. *Geomicrobiology Journal*, 9:139–160.
- KUNICKI-GOLDFINGER, J. J. (2009). Unstable historic glass : symptoms, causes, mechanisms and conservation. *Studies in Conservation*, 54:47–60.
- KUTZSCHBACH, M., , GUTTMANN, P., MARQUARDT, K., WERNER, S., HENZLER, K. D. et WILKE, M. (2018). A transmission x-ray microscopy and NEXAFS approach for studying corroded silicate glasses at the nanometre scale. *Physics and Chemistry of Glasses : European Journal of Glass Science and Technology Part B*, 59(1):11–26.
- LANSON, B., MARCUS, M. A., FAKRA, S., PANFILI, F., GEOFFROY, N. et MANCEAU, A. (2008). Formation of zn–ca phyllomanganate nanoparticles in grass roots. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72(10):2478–2490.
- LENTING, C., PLÜMPER, O., KILBURN, M., GUAGLIARDO, P., KLINKENBERG, M. et GEISLER, T. (2018). Towards a unifying mechanistic model for silicate glass corrosion. *npj Materials Degradation*, 2(1).
- LEYVAL, C. et BERTHELIN, J. (1989). Interactions between *Laccaria laccata*, agrobacterium radiobacter and beech roots : Influence on p, k, mg, and fe mobilization from minerals and plant growth. *Plant and Soil*, 117(1):103–110.
- LI, X. et SCHWARTZ, F. W. (2004). DNAPL remediation with in situ chemical oxidation using potassium permanganate. *Journal of Contaminant Hydrology*, 68(1-2):39–53.
- LIBOUREL, G., VERNEY-CARRON, A., MORLOK, A., GIN, S., STERPENICH, J., MICHELIN, A., NEFF, D. et DILLMANN, P. (2011). The use of natural and archeological analogues for understanding the long-term behavior of nuclear glasses. *Comptes Rendus - Geoscience*, 343(2-3):237–245.
- LIERMANN, L. J., BARNES, A. S., KALINOWSKI, B. E., ZHOU, X. et BRANTLEY, S. L. (2000a). Microenvironments of pH in biofilms grown on dissolving silicate surfaces. *Chemical Geology*, 171(1-2):1–16.
- LIERMANN, L. J., KALINOWSKI, B. E., BRANTLEY, S. L. et FERRY, J. G. (2000b). Role of bacterial siderophores in dissolution of hornblende. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64(4):587–602.
- LIU, D., LIAN, B. et DONG, H. (2012). Isolation of *Paenibacillus* sp. and assessment of its potential for enhancing mineral weathering. *Geomicrobiology Journal*, 29(5):413–421.
- LOMBARDO, T., GENTAZ, L., VERNEY-CARRON, A., CHABAS, A., LOISEL, C., NEFF, D. et LEROY, E. (2013). Characterisation of complex alteration layers in medieval glasses. *Corrosion Science*, 72:10–19.

- MAJÉRUS, O., LEHUÉDÉ, P., BIRON, I., ALLOTEAU, F., NARAYANASAMY, S. et CAURANT, D. (2020). Glass alteration in atmospheric conditions : crossing perspectives from cultural heritage, glass industry, and nuclear waste management. *npj Materials Degradation*, 4(1).
- MANDERNACK, K. W., POST, J. et TEBO, B. M. (1995). Manganese mineral formation by bacterial spores of the marine bacillus, strain SG-1 : Evidence for the direct oxidation of mn(II) to mn(IV). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59(21):4393–4408.
- MARVASI, M., VEDOVATO, E., BALSAMO, C., MACHERELLI, A., DEI, L., MASTROMEI, G. et PERITO, B. (2009). Bacterial community analysis on the Mediaeval stained glass window "Natività" in the Florence Cathedral. *Journal of Cultural Heritage*, 10:124–133.
- MASCARAQUE, N., BAUCHY, M. et SMEDSKJAER, M. M. (2017). Correlating the network topology of oxideglasses with their chemical durability. *The Journal of Physical Chemistry B*, 121:1139–1147.
- MATSON, D. W., SHARMA, S. K. et PHILPOTTS, J. A. (1983). The structure of high-silica alkali-silicate glasses. a raman spectroscopic investigation. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 58(2-3):323–352.
- MIRTI, P., DAVIT, P. et GULMINI, M. (2002). Colourants and opacifiers in seventh and eighth century glass investigated by spectroscopic techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372(1):221–229.
- MÜLLER, W. (1999). Altérations des vitraux du moyen age. *In Monuments historiques et environnement : recherches franco-allemandes sur la conservation de la pierre et du vitrail 1988–1996 : programme francoallemand de recherche pour la conservation des monuments historiques.*
- MODAK, J. M., VASAN, S. S. et NATARAJAN, K. A. (1999). Calcium removal from bauxite using paenibacillus polymyxa. *Mining, Metallurgy & Exploration*, 16(4):6–12.
- MORIN, G. P., VIGIER, N. et VERNEY-CARRON, A. (2015). Enhanced dissolution of basaltic glass in brackish waters : Impact on biogeochemical cycles. *Earth and Planetary Science Letters*, 417:1–8.
- MÜLLER, E., DREWELLO, U., DREWELLO, R., WEISSMANN, R. et WUERTZ, S. (2001). In situ analysis of biofilms on historic window glass using confocal laser scanning microscopy. *Journal of Cultural Heritage*, 2(1):31–42.
- MYSEN, B. et RICHET, P. (2019). *Silicate Glasses and Melts*. Elsevier.
- NARAYANASAMY, S., JOLLIVET, P., GODON, N., ANGELI, F., GIN, S., CABIÉ, M., CAMBEDOUZOU, J., GUILLOU, C. L. et ABDELOUAS, A. (2019). Influence of composition of nuclear waste glasses on vapor phase hydration. *Journal of Nuclear Materials*, 525:53–71.
- NEAMAN, A., CHOROVER, J. et BRANTLEY, S. L. (2005). Implications of the evolution of organic acid moieties for basalt weathering over geological time. *American Journal of Science*, 305(2):147–185.

- NEEWAY, J., ABDELOUAS, A., GRAMBOW, B., SCHUMACHER, S., MARTIN, C., KOGAWA, M., UTSUNOMIYA, S., GIN, S. et FRUGIER, P. (2012). Vapor hydration of son68 glass from 90°C to 20°C : A kinetic study and corrosion products investigation. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 358(21):2894–2905.
- NELSON, C. et WHITE, W. B. (1980). Transition metal ions in silicate melts—i. manganese in sodium silicate melts. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 44(6):887–893.
- NG, D. H., KUMAR, A. et CAO, B. (2016). Microorganisms meet solid minerals : interactions and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(16):6935–6946.
- NUYTS, G., CAGNO, S., BUGANI, S. et JANSSENS, K. (2015). Micro-XANES study on Mn browning : Use of quantitative valence state maps. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 30(3):642–650.
- NUYTS, G., CAGNO, S., HELLEMANS, K., VERONESI, G., COTTE, M. et JANSSENS, K. (2013). Study of the Early Stages of Mn Intrusion in Corroded Glass by Means of Combined SR FTIR/ $\mu$ XRF Imaging and XANES Spectroscopy. *Procedia Chemistry*, 8:239–247.
- OELKERS, E. H. et GISLASON, S. R. (2001). The mechanism, rates and consequences of basaltic glass dissolution : I. an experimental study of the dissolution rates of basaltic glass as a function of aqueous al, si and oxalic acid concentration at 25°C and pH 3 and 11. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65(21):3671–3681.
- OELKERS, E. H. et GISLASON, S. R. (2003). Mechanism, rates, and consequences of basaltic glass dissolution : II. An experimental study of the dissolution rates of basaltic glass as a function of pH and temperature. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67(20):3817–3832.
- ORIAL, G., WARSCHIED, T., BOUSTA, F. et LOISEL, C. (2007). Incidence bactérienne dans les phénomènes de brunissement des vitraux anciens TT - Microbial impact in the browning of old stained glass windows. *L'Actualité chimique*, 312-313:34–39.
- PANGALLO, D., CHOVANOVÁ, K., ŠIMONOVICHOVÁ, A. et FERIANC, P. (2009). Investigation of microbial community isolated from indoor artworks and air environment : identification, biodegradative abilities, and DNA typing. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(3):277–287.
- PANGALLO, D., KRAKOVÁ, L., CHOVANOVÁ, K., BUČKOVÁ, M., PUŠKAROVÁ, A. et ŠIMONOVICHOVÁ, A. (2013). Disclosing a crypt : Microbial diversity and degradation activity of the microflora isolated from funeral clothes of cardinal peter pázmány. *Microbiological Research*, 168(5):289–299.
- PARKER, D. L., MORITA, T., MOZAFARZADEH, M. L., VERITY, R., MCCARTHY, J. K. et TEBO, B. M. (2007). Inter-relationships of MnO<sub>2</sub> precipitation, siderophore–mn(III) complex formation, siderophore degradation, and iron limitation in mn(II)-oxidizing bacterial cultures. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71(23):5672–5683.

- PARKER, D. L., SPOSITO, G. et TEBO, B. M. (2004). Manganese(III) binding to a pyoverdine siderophore produced by a manganese(II)-oxidizing bacterium. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68(23):4809–4820.
- PARRUZOT, B., JOLLIVET, P., BISCOUL, D. et GIN, S. (2015). Long-term alteration of basaltic glass : Mechanisms and rates. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 154.
- PATRICIA A. MAURICE, M. A. V. (2001). Enhancement of kaolinite dissolution by an Aerobic *Pseudomonas mendocina* Bacterium. *Geomicrobiology Journal*, 18(1):21–35.
- PEÑA, J., DUCKWORTH, O. W., BARGAR, J. R. et SPOSITO, G. (2007). Dissolution of hausmannite (Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) in the presence of the trihydroxamate siderophore desferrioxamine B. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71(23):5661–5671.
- PEPE, O., SANNINO, L., PALOMBA, S., ANASTASIO, M., BLAIOTTA, G., VILLANI, F. et MOSCHETTI, G. (2010). Heterotrophic microorganisms in deteriorated medieval wall paintings in southern italian churches. *Microbiological Research*, 165(1):21–32.
- PERERA, G. et DOREMUS, R. H. (1991). Dissolution rates of commercial soda-lime and pyrex borosilicate glasses : Influence of solution pH. *Journal of the American Ceramic Society*, 74(7):1554–1558.
- PEREZ, A. (2015). *Bioaltération de verres basaltiques modèles : impact des sidérophores et role du fer*. Thèse de doctorat, Université Paris-Est.
- PEREZ, A., ROSSANO, S., TRCERA, N., HUGUENOT, D., FOURDRIN, C., VERNEY-CARRON, A., van HULLEBUSCH, E. D. et GUYOT, F. (2016). Bioalteration of synthetic Fe(III)-, Fe(II)-bearing basaltic glasses and Fe-free glass in the presence of the heterotrophic bacteria strain *Pseudomonas aeruginosa* : Impact of siderophores. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 188(May):147–162.
- PEREZ, A., ROSSANO, S., TRCERA, N., VERNEY-CARRON, A., HUGUENOT, D., van HULLEBUSCH, E. D., CATILLON, G., RAZAFITIANAMAHARAVO, A. et GUYOT, F. (2015). Impact of iron chelators on short-term dissolution of basaltic glass. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 162.
- PEREZ, A., ROSSANO, S., TRCERA, N., VERNEY-CARRON, A., ROMMEVAUX, C., FOURDRIN, C., AGNELLO, A. C., HUGUENOT, D. et GUYOT, F. (2019). Direct and indirect impact of the bacterial strain *pseudomonas aeruginosa* on the dissolution of synthetic fe(III)- and fe(II)-bearing basaltic glasses. *Chemical Geology*, 523:9–18.
- PEREZ Y JORBA, M., DALLAS, J. P., BAUER, C., BAHEZRE, C. et MARTIN, J. C. (1980). Deterioration of stained glass by atmospheric corrosion and micro-organisms. *Journal of Materials Science*, 15(7):1640–1647.
- PIGNATELLI, I., KUMAR, A., BAUCHY, M. et SANT, G. (2016). Topological control on silicates' dissolution kinetics. *Langmuir*, 32(18):4434–4439.
- PILZ, M. (1997). Traitements de conservation pour les vitraux altérés et brunis. *Programme franco-allemand de recherche pour la conservation des monuments historiques 1995-1996*, pages 330–346.

- PIÑAR, G., GARCIA-VALLES, M., GIMENO-TORRENTE, D., FERNANDEZ-TURIEL, J. L., ETTENAUER, J. et STERFLINGER, K. (2013). Microscopic, chemical, and molecular-biological investigation of the decayed medieval stained window glasses of two Catalan churches. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 84:388–400.
- PIÑAR, G., POYNTNER, C., TAHER, H. et STERFLINGER, K. (2019). A time travel story : metagenomic analyses decipher the unknown geographical shift and the storage history of possibly smuggled antique marble statues. *Annals of Microbiology*, 69(10):1001–1021.
- POULSON, S. R., DREVER, J. I. et STILLINGS, L. L. (1997). Aqueous si-oxalate complexing, oxalate adsorption onto quartz, and the effect of oxalate upon quartz dissolution rates. *Chemical Geology*, 140(1-2):1–7.
- PRACHE, A., BLONDE, N., CHAUSSÉ, V., FINANCE, L., LAUTIER, C. et CALLIAS BEY, M. (1992). *Les vitraux de Champagne-Ardenne*.
- QUARTIERI, S., TRISCARI, M., SABATINO, G., BOSCHERINI, F. et SANI, A. (2002). Fe and Mn K-edge XANES study of ancient Roman glasses. *European Journal of Mineralogy*, 14(4):749–756.
- RANCHOUX, C. (2019). Comprendre le phénomène de brunissement des vitraux médiévaux. Mémoire de D.E.A., Université Paris Est Créteil.
- REICHARD, P. U., KRAEMER, S. M., FRAZIER, S. W. et KRETZSCHMAR, R. (2005). Goethite dissolution in the presence of phytosiderophores : Rates, mechanisms, and the synergistic effect of oxalate. *Plant and Soil*, 276(1-2):115–132.
- RENSHAW, J. C., ROBSON, G. D., TRINCI, A. P., WIEBE, M. G., LIVENS, F. R., COLLISON, D. et TAYLOR, R. J. (2002). Fungal siderophores : Structures, functions and applications. *Mycological Research*, 106(10):1123–1142.
- RICHEL, P. (2007). Une brève histoire du verre : li. du moyen-âge au monde contemporain. *Une petite encyclopédie du verre*, 13(4):4–8.
- ROBINET, L., COUPRY, C., EREMIN, K. et HALL, C. (2006). The use of Raman spectroscopy to predict the stability of historic glasses. *Journal of Raman Spectroscopy*, 37(7):789–797.
- ROBINET, L., EREMIN, K., COUPRY, C., HALL, C. et LACOME, N. (2007). Effect of organic acid vapors on the alteration of soda silicate glass. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 353(16-17):1546–1559.
- RODRIGUES, A., FEARN, S., PALOMAR, T. et VILARIGUES, M. (2018). Early stages of surface alteration of soda-rich-silicate glasses in the museum environment. *Corrosion Science*, 143(September):362–375.
- RODRIGUES, A., GUTIERREZ-PATRICIO, S., MILLER, A. Z., SAIZ-JIMENEZ, C., WILEY, R., NUNES, D., VILARIGUES, M. et MACEDO, M. F. (2014). Fungal biodeterioration of stained-glass windows. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 90(September):152–160.

- ROGERS, J. R. et BENNETT, P. C. (2004). Mineral stimulation of subsurface microorganisms : Release of limiting nutrients from silicates. *Chemical Geology*, 203(1-2):91–108.
- RÖLLEKE, S., GURTNER, C., DREWELLO, U., DREWELLO, R., LUBITZ, W. et WEISSMANN, R. (1999). Analysis of bacterial communities on historical glass by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Journal of Microbiological Methods*, 36(1-2):107–114.
- SAAL, L. B. et DUCKWORTH, O. W. (2010). Synergistic dissolution of manganese oxides as promoted by siderophores and small organic acids. *Soil Science Society of America Journal*, 74(6):2021–2031.
- SAHA, M., SARKAR, S., SARKAR, B., SHARMA, B. K., BHATTACHARJEE, S. et TRIBEDI, P. (2015). Microbial siderophores and their potential applications : a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(5):3984–3999.
- SAHA, R., SAHA, N., DONOFRIO, R. S. et BESTERVELT, L. L. (2012). Microbial siderophores : a mini review. *Journal of Basic Microbiology*, 53(4):303–317.
- SALEK, S. S., KLEEREBEZEM, R., JONKERS, H. M., VONCKEN, J. H. et VAN LOOSDRECHT, M. C. (2013). Determining the impacts of fermentative bacteria on wollastonite dissolution kinetics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(6):2743–2752.
- SAPIN, C. (2010). Vitrail, verre et archéologie entre le ve et le xiie siècle. *Bulletin du Centre d'études médiévales d'Auxerre*, (14).
- SARATOVSKY, I., WIGHTMAN, P. G., PASTÉN, P. A., GAILLARD, J.-F. et POEPELMEIER, K. R. (2006). Manganese oxides : parallels between abiotic and biotic structures. *Journal of the American Chemical Society*, 128(34):11188–11198.
- SCHABEREITER-GURTNER, C., PIAR, G., LUBITZ, W. et RÖLLEKE, S. (2001a). An advanced molecular strategy to identify bacterial communities on art objects. *Journal of Microbiological Methods*, 45(2):77–87.
- SCHABEREITER-GURTNER, C., PIÑAR, G., LUBITZ, W. et RÖLLEKE, S. (2001b). Analysis of fungal communities on historical church window glass by denaturing gradient gel electrophoresis and phylogenetic 18S rDNA sequence analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 47(3):345–354.
- SCHALM, O. et ANAF, W. (2016). Laminated altered layers in historical glass : Density variations of silica nanoparticle random packings as explanation for the observed lamellae. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 442(2016):1–16.
- SCHALM, O., PROOST, K., DE VIS, K., CAGNO, S., JANSSENS, K., MEES, F., JACOBS, P. et CAEN, J. (2011). Manganese staining of archaeological glass : The characterization of mn-rich inclusions in leached layers and a hypothesis of its formation. *Archaeometry*, 53(1):103–122.
- SCHOFIELD, P. F., CRESSEY, G., HOWARD, P. W. et HENDERSON, C. M. B. (1995). Origin of colour in iron and manganese containing glasses investigated by synchrotron radiation. *Glass Technology*, 36(3):89–94.

- SESSEGOLO, L. (2018). *Utilisation de traceurs isotopiques pour l'étude des mécanismes et des cinétiques d'altération des verres de vitraux en milieu atmosphérique*. Thèse de doctorat, Université Paris-Est Créteil.
- SESSEGOLO, L., VERNEY-CARRON, A., AUSSET, P., NOWAK, S., TRIQUET, S., SAHEB, M. et CHABAS, A. (2020). Alteration rate of medieval potash-lime silicate glass as a function of pH and temperature : A low pH-dependent dissolution. *Chemical Geology*, 550:119704.
- SESSEGOLO, L., VERNEY-CARRON, A., AUSSET, P., SAHEB, M. et CHABAS, A. (2019). Effect of surface roughness on medieval-type glass alteration in aqueous medium. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 505:260–271.
- SESSEGOLO, L., VERNEY-CARRON, A., SAHEB, M., REMUSAT, L., GONZALEZ-CANO, A., NUNS, N., MERTZ, J.-D., LOISEL, C. et CHABAS, A. (2018). Long-term weathering rate of stained-glass windows using H and O isotopes. *npj Materials Degradation*, 2(1).
- SHIROKOVA, L., BÉNÉZETH, P., POKROVSKY, O., GERARD, E., MÉNEZ, B. et ALFREDSSON, H. (2012). Effect of the heterotrophic bacterium *pseudomonas reactans* on olivine dissolution kinetics and implications for CO<sub>2</sub> storage in basalts. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 80:30–50.
- SHORTLAND, A., SCHACHNER, L., FREESTONE, I. et TITE, M. (2006). Natron as a flux in the early vitreous materials industry : sources, beginnings and reasons for decline. *Journal of Archaeological Science*, 33:521–530.
- SILVESTRI, A., MOLIN, G. et SALVIULO, G. (2005). Archaeological glass alteration products in marine and land-based environments : morphological, chemical and microtextural characterization. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 351:16–17.
- SONG, W., OGAWA, N., OGUCHI, C., HATTA, T. et MATSUKURA, Y. (2007). Effect of *bacillus subtilis* on granite weathering : A laboratory experiment. *CATENA*, 70(3):275–281.
- STAUDIGEL, H., CHASTAIN, R., YAYANOS, A. et BOURCIER, W. (1995). Biologically mediated dissolution of glass. *Chemical Geology*, 126(2):147–154.
- STERPENICH, J. (1998). *Altération des vitraux médiévaux. Contribution de l'étude du comportement à long terme des verres de confinement*. Thèse de doctorat, Université Henry Poincaré, Nancy 1.
- STERPENICH, J. et LIBOUREL, G. (2001). Using stained glass windows to understand the durability of toxic waste matrices. *Chemical Geology*, 174(1-3):181–193.
- STOCKMANN, G. J., SHIROKOVA, L. S., POKROVSKY, O. S., BÉNÉZETH, P., BOVET, N., GISLASON, S. R. et OELKERS, E. H. (2012). Does the presence of heterotrophic bacterium *pseudomonas reactans* affect basaltic glass dissolution rates ? *Chemical Geology*, 296-297:1–18.

- SUN, W., KITCHAEV, D. A., KRAMER, D. et CEDER, G. (2019). Non-equilibrium crystallization pathways of manganese oxides in aqueous solution. *Nature Communications*, 10(1).
- TANG, Y., ZEINER, C. A., SANTELLI, C. M. et HANSEL, C. M. (2013). Fungal oxidative dissolution of the Mn(II)-bearing mineral rhodochrosite and the role of metabolites in manganese oxide formation. *Environmental Microbiology*, 15(4):1063–1077.
- TEBO, B. M., BARGAR, J. R., CLEMENT, B. G., DICK, G. J., MURRAY, K. J., PARKER, D., VERITY, R. et WEBB, S. M. (2004). Biogenic Manganese Oxides : Properties and Mechanisms of Formation. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 32(1):287–328.
- TEBO, B. M., JOHNSON, H. A., MCCARTHY, J. K. et TEMPLETON, A. S. (2005). Geomicrobiology of manganese(II) oxidation. *Trends in Microbiology*, 13(9):421–428.
- TESCARI, M., FRANGIPANI, E., CANEVA, G., MUNICCHIA, A. C., SODO, A. et VISCA, P. (2018). *Arthrobacter agilis* and rosy discoloration in “terme del foro” (pompeii, italy). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 130:48–54.
- THORSETH, I. H., FURNES, H. et TUMYR, O. (1995). Textural and chemical effects if bacterial activity on basaltic glass : an experimental approach. *Chemical geology*, 119:139–160.
- THORSETH, I. H., PEDERSEN, R. B. et CHRISTIE, D. M. (2003). Microbial alteration of 0-30-Ma seafloor and sub-seafloor basaltic glasses from the Australian Antarctic Discordance. *Earth and Planetary Science Letters*, 215(1-2):237–247.
- TITE, M., SHORTLAND, A. et PAYNTER, S. (2002). The beginnings of vitreous materials in the Near East and Egypt. *Accounts of Chemical Research*, 35(8):585–593.
- TONER, B., FAKRA, S., VILLALOBOS, M., WARWICK, T. et SPOSITO, G. (2005). Spatially resolved characterization of biogenic manganese oxide production within a bacterial biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3):1300–1310.
- TOURNIÉ, A., MAJÉRUS, O., LEFÈVRE, G., RAGER, M. N., WALMÉ, S., CAURANT, D. et BARBOUX, P. (2013). Impact of boron complexation by Tris buffer on the initial dissolution rate of borosilicate glasses. *Journal of Colloid and Interface Science*, 400:161–167.
- TOURNIÉ, A., RICCIARDI, P. et COLOMBAN, P. (2008). Glass corrosion mechanisms : A multiscale analysis. *Solid State Ionics*, 179(38):2142–2154.
- TRCERA, N. (2010). *Etude de la structure de verres magnésio-silicatés : approche expérimentale et modélisation*. Thèse de doctorat, Université Paris Est Marne la Vallée.
- TRCERA, N., ROSSANO, S. et TARRIDA, M. (2011). Structural study of mg-bearing sodosilicate glasses by raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 42(4):765–772.



- ULLMAN, W. J., KIRCHMAN, D. L., WELCH, S. A. et VANDEVIVERE, P. (1996). Laboratory evidence for microbially mediated silicate mineral dissolution nature. *Chemical Geology*, 132:11–17.
- UROZ, S., CALVARUSO, C., TURPAULT, M. P. et FREY-KLETT, P. (2009). Mineral weathering by bacteria : ecology, actors and mechanisms. *Trends in Microbiology*, 17(8):378–387.
- UROZ, S., CALVARUSO, C., TURPAULT, M. P., PIERRAT, J. C., MUSTIN, C. et FREY-KLETT, P. (2007). Effect of the mycorrhizosphere on the genotypic and metabolic diversity of the bacterial communities involved in mineral weathering in a forest soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(9):3019–3027.
- UROZ, S., KELLY, L. C., TURPAULT, M. P., LEPLEUX, C. et FREY-KLETT, P. (2015). The Mineralosphere Concept : Mineralogical Control of the Distribution and Function of Mineral-associated Bacterial Communities. *Trends in Microbiology*, 23(12):751–762.
- URZÌ, C., LEO, F. D., BRUNO, L. et ALBERTANO, P. (2010). Microbial diversity in paleolithic caves : A study case on the phototrophic biofilms of the cave of bats (zuheros, spain). *Microbial Ecology*, 60(1):116–129.
- VALLE, N., VERNEY-CARRON, A., STERPENICH, J., LIBOUREL, G., DELOULE, E. et JOLLIVET, P. (2010). Elemental and isotopic (29Si and 18O) tracing of glass alteration mechanisms. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74(12):3412–3431.
- VANDEVIVERE, P., WELCH, S., ULLMAN, W. et KIRCHMAN, D. (1994). Enhanced dissolution of silicate minerals by bacteria at near-neutral pH. *Microbial Ecology*, 27(3).
- VASAN, S., MODAK, J. M. et NATARAJAN, K. (2001). Some recent advances in the bioprocessing of bauxite. *International Journal of Mineral Processing*, 62(1-4):173–186.
- VASSILEV, N., VASSILEVA, M. et NIKOLAEVA, I. (2006). Simultaneous p-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms : potentials and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(2):137–144.
- VERITÀ, M. (2006). Modern and ancient glass : nature, composition and deterioration mechanisms. *The materials of cultural Heritage in their Environment*.
- VERITÀ, M. (2014). *Secrets and Innovations of Venetian Glass between the 15th and the 17th Centuries : Raw Materials, Glass Melting and Artefacts*, pages 53–68. Numéro 172. Istituto Veneto di scienze, lettere ed arti.
- VERNEY-CARRON, A., GIN, S., FRUGIER, P. et LIBOUREL, G. (2010). Long-term modeling of alteration-transport coupling : Application to a fractured Roman glass. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74(8):2291–2315.
- VERNEY-CARRON, A., GIN, S. et LIBOUREL, G. (2008). A fractured roman glass block altered for 1800 years in seawater : Analogy with nuclear waste glass in a deep geological repository. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72(22):5372–5385.

- VERNEY-CARRON, A., SESSEGOLO, L., SAHEB, M., VALLE, N., AUSSET, P., LOSNO, R., MANGIN, D., LOMBARDO, T., CHABAS, A. et LOISEL, C. (2017). Understanding the mechanisms of Si-K-Ca glass alteration using silicon isotopes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*.
- VILLALOBOS, M., LANSON, B., MANCEAU, A., TONER, B. et SPOSITO, G. (2006). Structural model for the biogenic Mn oxide produced by *Pseudomonas putida*. *American Mineralogist*, 91(4):489–502.
- VILLALOBOS, M., TONER, B., BARGAR, J. et SPOSITO, G. (2003). Characterization of the manganese oxide produced by *pseudomonas putida* strain MnB1. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67(14):2649–2662.
- VINCENT-PETIT, F. (2016). Les vitraux de lachalade pathologies et préconisations. etude réalisée pour l'agence pierre-yves caillault acmh. Rapport technique, agence Pierre-Yves Caillault ACMH.
- WANG, Y. et STONE, A. T. (2006). Reaction of MnIII,IV (hydr)oxides with oxalic acid, glyoxylic acid, phosphonoformic acid, and structurally-related organic compounds. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70(17):4477–4490.
- WATKINSON, D., WEBER, L. et ANHEUSER, K. (2005). Staining of archaeological glass from manganese-rich environments. *Archaeometry*, 47(1):69–82.
- WEAVER, J. L., PEARCE, C. I., SJÖBLUM, R., MCCLOY, J. S., MILLER, M., VARGA, T., AREY, B. W., CONROY, M. A., PEELER, D. K., KOESTLER, R. J., DEPRIEST, P. T., VICENZI, E. P., HJÄRTHNER-HOLDAR, E., OGENHALL, E. et KRUGER, A. A. (2018). Pre-Viking Swedish hillfort glass : A prospective long-term alteration analogue for vitrified nuclear waste. *International Journal of Applied Glass Science*, 9(4):540–554.
- WEBB, S. M., DICK, G. J., BARGAR, J. R. et TEBO, B. M. (2005). Evidence for the presence of mn(III) intermediates in the bacterial oxidation of mn(II). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(15):5558–5563.
- WEBER, L. G., EGGERT, G. . et WATKINSON, D. (2007). A closer look at brown staining on archaeological glass. *Glass and ceramics conservation 2007 : interim meeting of the ICOM-CC Working Group*, pages 35–45.
- WELCH, S., BARKER, W. et BANFIELD, J. (1999). Microbial extracellular polysaccharides and plagioclase dissolution. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 63(9):1405–1419.
- WELCH, S. A. et ULLMAN, W. J. (1993). The effect of organic acids on plagioclase dissolution rates and stoichiometry. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 51:2125–2136.
- WILD, B. (2017). *Changements microstructuraux et diversité microbienne associés à l'altération des silicates : influence sur les cinétiques de dissolution du laboratoire au terrain*. Thèse de doctorat, Université de Strasbourg.
- WIRTH, R. (2009). Focused ion beam (FIB) combined with SEM and TEM : Advanced analytical tools for studies of chemical composition, microstructure and crystal structure in geomaterials on a nanometre scale. *Chemical Geology*, 261(3-4):217–229.

- WOLFF-BOENISCH, D., GISLASON, S. R., OELKERS, E. H. et PUTNIS, C. V. (2004). The dissolution rates of natural glasses as a function of their composition at pH 4 and 10.6, and temperatures from 25 to 74°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68(23):4843–4858.
- WOLFF-BOENISCH, D. et TRAINA, S. J. (2006). A comparative study of the effect of desferrioxamine b, oxalic acid, and na-alginate on the desorption of u(VI) from goethite at pH 6 and 25°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70(17):4356–4366.
- WOLFF-BOENISCH, D. et TRAINA, S. J. (2007). The effect of desferrioxamine b, enterobactin, oxalic acid, and na-alginate on the dissolution of uranyl-treated goethite at pH 6 and 25 °c. *Chemical Geology*, 243(3-4):357–368.
- WOLFF-BOENISCH, D., WENAU, S., GISLASON, S. R. et OELKERS, E. H. (2011). Dissolution of basalts and peridotite in seawater, in the presence of ligands, and CO<sub>2</sub> : Implications for mineral sequestration of carbon dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75(19):5510–5525.
- XYLA, A. G., SULZBERGER, B., LUTHER, G. W., HERING, J. G., CAPPELLEN, P. V. et STUMM, W. (1992). Reductive dissolution of manganese(III, IV) (hydr)oxides by oxalate : the effect of pH and light. *Langmuir*, 8(1):95–103.
- YANG, W., ZHANG, Z., ZHANG, Z., CHEN, H., LIU, J., ALI, M., LIU, F. et LI, L. (2013). Population Structure of Manganese-Oxidizing Bacteria in Stratified Soils and Properties of Manganese Oxide Aggregates under Manganese-Complex Medium Enrichment. *PLoS ONE*, 8(9).
- YAO, M., LIAN, B., TENG, H. H., TIAN, Y. et YANG, X. (2013). Serpentine dissolution in the presence of Bacteria *Bacillus mucilaginosus*. *Geomicrobiology Journal*, 30(1):72–80.
- YU, H. et LEADBETTER, J. R. (2020). Bacterial chemolithoautotrophy via manganese oxidation. *Nature*, 583(7816):453–458.
- YU, Q., KANDEGEDARA, A., XU, Y. et RORABACHER, D. (1997). Avoiding interferences from good's buffers : A contiguous series of noncomplexing tertiary amine buffers covering the entire range of pH 3–11. *Analytical Biochemistry*, 253(1):50–56.
- ZHOU, Y., WANG, R., LU, X. et CHEN, T. (2010). Roles of adhered *paenibacillus polymyxa* in the dissolution and flotation of bauxite : a dialytic investigation. *Frontiers of Earth Science in China*, 4(2):167–173.

**Le brunissement des vitraux médiévaux :  
approche biogéochimique pour la compréhension d'un phénomène d'altération complexe**

Le phénomène de brunissement est une pathologie affectant les vitraux du Moyen-Age de composition silico-calco-potassique contenant du Mn. Il se traduit par l'apparition, en surface du verre, de taches brunes riches en Mn, qui entraînent une perte de transmission de la lumière et de lisibilité de l'œuvre.

Des travaux antérieurs ont montré que ce brunissement est lié à l'oxydation du Mn qui passe de la forme  $Mn^{2+/3+}$  dans le verre sain à  $Mn^{3+/4+}$  dans les zones altérées. Cependant, les différentes étapes qui conduisent à la formation localisée de phases brunes, ainsi que le rôle potentiel des microorganismes dans l'apparition de la pathologie restent encore à déterminer. Une compréhension plus poussée de ce phénomène permettrait en effet d'envisager des traitements de conservation plus adaptés. Dans cette étude, l'identification par séquençage ADN des microorganismes cultivables présents sur trois sites de vitraux *in situ* a été réalisée. Les résultats indiquent que des populations riches et variées de microorganismes sont rencontrées sur ces vitraux. Afin d'étudier de manière ciblée la contribution microbiologique lors des différentes étapes de formation du brunissement, une approche mécanistique en deux étapes a été adoptée grâce à des expériences d'altération de deux verres modèles (verre VM avec Mn et verre VNM sans Mn). Tout d'abord, la dissolution du verre et le relâchement du Mn en solution ont été étudiés de façon abiotique (dans une solution d'EUP tamponnée et en milieu de culture stérile), biotique indirecte (en présence d'exsudats microbiens) et biotique directe (en présence de la souche modèle *Pseudomonas putida*). Les analyses des solutions révèlent que les cinétiques et la stœchiométrie de dissolution du verre sont influencées par la présence des exsudats et des cellules bactériennes. Les deux exsudats testés (acide oxalique et sidérophore DFOB) ont des effets différents sur la dissolution du verre dépendant de leurs capacités complexantes. Le verre VM est plus durable que VNM en EUP, mais au contraire il est plus impacté par la présence de ces ligands à cause de la complexation du Mn. Le Mn semble donc revêtir un rôle clé dans l'interaction indirecte verre-bactérie. En présence de *P. putida*, la stœchiométrie de dissolution du verre est principalement impactée par la production d'un sidérophore, la pyoverdine (PVD) qui complexe le Mn et enclenche le processus d'oxydation menant à la formation d'un biofilm contenant des oxydes de Mn. Réciproquement, le comportement des bactéries (croissance bactérienne, production de PVD et oxydation de Mn) est impacté par l'accès aux éléments du verre. Ensuite, la mobilité du Mn au sein de la couche d'altération et sa capacité de formation de phases brunes par voie abiotique (par expériences d'imbibition de verre altéré avec une solution riche en Mn) et biotique (par croissance de biofilm de *P. putida* en surface du verre) a été étudiée. Des phases brunes ont été obtenues par voie abiotique et biotique et caractérisées par microscopie optique et électronique (MEB, MET) et par microsonde électronique. Dans les deux cas, elles présentent des caractéristiques physico-chimiques (enrichissement en Mn, caractères amorphe) similaires aux phases identifiées sur des vitraux anciens. La combinaison des résultats obtenus au cours de ces différentes tâches a finalement permis de formuler différentes hypothèses, impliquant ou non des microorganismes, sur les mécanismes responsables de l'apparition du brunissement.

**Mots clés :** vitraux, altération, manganèse, microorganismes

**The browning phenomenon of medieval stained-glass windows:  
a biogeochemical approach for the understanding of a complex alteration phenomenon**

The browning phenomenon is a pathology typical of medieval stained-glass windows of potash-lime-silica composition containing Mn. It is caused by the formation of Mn-rich brown spots at the glass surface that prevent light transmission.

Previous works showed that the browning is linked to the oxidation of Mn from  $Mn^{2+/3+}$  in the pristine glass to  $Mn^{3+/4+}$  in the altered brown phases. This phenomenon is not understood yet, some studies suggested that Mn migration to the surface, oxidation and/or precipitation might be linked to biological activity. A better understanding of the phenomenon could allow the development of more targeted conservation treatments. In this study, microbiological samples were collected *in situ* on stained-glass windows and the cultivated microorganisms were identified. The DNA sequencing of the cultivable collected bacteria showed rich and diversified bacterial communities on *in situ* stained-glasses. Then, in order to improve the understanding of this phenomenon and investigate the implication of microorganisms, a mechanistic approach based on two main research axis was chosen and weathering experiments of model glasses (VM for glass with Mn and VNM for glass without Mn) representative of medieval stained glasses were designed.

Firstly, glass dissolution and Mn leaching were studied in abiotic experiments (in buffered UPW solution and in sterile culture media), in biotic indirect (in presence of microbial exudates) and biotic direct (in presence of the model strain *Pseudomonas putida*) conditions. The analysis of the leachates showed that the stoichiometry and kinetics of glass dissolution were influenced by the presence of exudates and bacterial cells. The two studied exudates (oxalic acid and the siderophore DFOB) have different effects on glass dissolution, depending on their complexing abilities. The VM glass is more resistant to alteration in UPW when compared to VNM, but it is more significantly affected by the presence of organic ligands because of the complexation of Mn. Therefore, Mn seems to have a key role in the indirect interaction glass-bacteria. In presence of *P. putida*, the dissolution stoichiometry is mainly affected by the production of the pyoverdine (PVD) siderophore that forms a complex with Mn and starts the oxidation process that leads to the production of biofilm including Mn oxides. Bacterial behavior (bacterial growth, PVD production and Mn oxidation) is mutually affected by the access of the bacterial cells to the glass elements. Then, Mn mobility through the alteration layer and its capability to form brown phases at the surface of the glass were investigated in abiotic (by imbibition experiments of Mn-rich solution on altered glass samples) and biotic (by biofilm growth of *P. putida* on glass surface) conditions. Brown phases at the surface of the glass were obtained via abiotic and biotic experiments and were characterized by optical and electronic (SEM, TEM) microscopy, and microprobe analysis. Both the abiotic and the biotic brown phases have common characteristics (Mn enrichment, amorphous state) with the brown phases identified on historical stained-glass samples. The confrontation of the results obtained during the different steps allowed to formulate several hypotheses about abiotic and biotic mechanisms leading to the browning of medieval stained-glass windows.

**Keywords:** stained-glass, alteration, manganese, microorganisms