



HAL
open science

Interaction entre le matériau cimentaire et les micro-organismes marins

Marine Georges

► **To cite this version:**

Marine Georges. Interaction entre le matériau cimentaire et les micro-organismes marins. Génie civil. Normandie Université, 2021. Français. NNT : 2021NORMC255 . tel-03602744

HAL Id: tel-03602744

<https://theses.hal.science/tel-03602744>

Submitted on 9 Mar 2022

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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité GENIE CIVIL

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Interaction entre le matériau cimentaire et les micro-organismes marins

Présentée et soutenue par
MARINE GEORGES

Thèse soutenue le 22/11/2021
devant le jury composé de

M. THIERRY CHAUSSADENT	Directeur de recherche, Université Gustave Eiffel	Rapporteur du jury
MME FRANÇOISE FEUGEAS	Professeur des universités, Institut National Sciences Appliquées	Rapporteur du jury
MME AMEL BOURGUIBA	Enseignant chercheur, Ecole sup.d'ingénieurs ESITC Caen	Membre du jury
MME MARIE SALGUES	Maître de conférences, IMT Mines d'Alès	Membre du jury
M. MARTIN UBERTINI	Chercheur, POS3IDON	Membre du jury
M. PASCAL CLAQUIN	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Président du jury
M. MOHAMED BOUTOUIL	Directeur de recherche, Ecole sup.d'ingénieurs ESITC Caen	Directeur de thèse
M. DANIEL CHATEIGNER	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Co-directeur de thèse

Thèse dirigée par **MOHAMED BOUTOUIL** et **DANIEL CHATEIGNER**, Laboratoire de cristallographie et sciences des matériaux (Caen)





Normandie Université

THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité MATERIAUX

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Interaction entre le matériau cimentaire et les micro-organismes marins

Présentée et soutenue par
Marine GEORGES

Thèse soutenue publiquement le 22 novembre 2021
devant le jury composé de

M. Thierry CHAUSSADENT	Directeur de Recherche, Univ. Gustave Eiffel	Rapporteur
Mme. Françoise FEUGEAS	Professeur d'Université, INSA Strasbourg	Rapportrice
Mme. Marie SALGUES	Maître de Conférence C2MA IMT Mines Alès	Examinatrice
M. Martin UBERTINI	Dr, Président de POS3IDON, Saint-Malo	Examineur
M. Pascal CLAQUIN	Président du jury, Professeur d'Université, UMR BOREA, Univ. Caen	Membre du jury
M. Mohamed BOUTOUIL	Directeur de Recherche, ESITC Caen	Directeur de Thèse
M. Daniel CHATEIGNER	Professeur d'Université, CRISMAT, Univ. Caen	Co-Directeur de Thèse
Mme. Amel BOURGUIBA	Enseignante chercheuse, ESITC Caen	Membre du jury

Thèse dirigée par Mohamed BOUTOUIL (ESITC Caen) et Daniel CHATEIGNER (CRISMAT-Unicaen) et co-encadrée par Amel BOURGUIBA (ESITC CAEN)



A mes parents,
A ma sœur Mélanie,
A mes grands-parents,
A mon parrain et ma marraine,
A ma famille,

Remerciements

J'écris les dernières lignes de ce manuscrit avec beaucoup d'émotion. J'ai beaucoup progressé et évolué professionnellement comme personnellement. Cette aventure n'aurait pas été possible sans l'aide de nombreuses personnes que je tiens à remercier.

Je tiens tout d'abord à remercier **les membres de mon jury de thèse** qui ont accepté de juger la qualité de ce travail de recherche.

Je tiens à remercier Monsieur **Mohamed Boutouil**, mon directeur de thèse de m'avoir permis de travailler sur cette thématique et travailler au sein du laboratoire de l'ESITC de Caen. Merci pour son écoute et de tous les conseils apportés au cours de ces 3 années de thèse.

Merci également à **Daniel Chateigner**, mon co-directeur de thèse pour son écoute et sa disponibilité pour m'expliquer la minéralogie et la cristallographie. Un domaine qui m'était inconnu au début de ma thèse.

Un énorme merci à **Amal Bourguiba** mon encadrante, plus qu'une encadrante, elle est devenue une véritable amie sur laquelle je peux compter. Elle a toujours été là pour moi dans les bons comme dans les mauvais moments. Merci à elle d'avoir toujours été disponible lorsque j'avais des questions et pour son aide précieuse ! Merci pour toutes les corrections, remarques et conseils qu'elle a pu me faire tout au long de ma thèse. Je sais la chance que j'ai eu de l'avoir comme encadrante de thèse. Nous avons partagé tellement de bons moments que je ne pourrais pas tous les citer ici !!!

Encore merci à eux trois pour leur gentillesse, soutien, leurs remarques, conseils et corrections précieuses concernant ce manuscrit !!

Merci beaucoup à **Pascal Claquin** pour son écoute, sa disponibilité, sa gentillesse et son aide précieuse tout au long de ma thèse. J'ai pu m'appuyer sur ses nombreux conseils et son expertise sur le microphytobenthos. Je n'oublie pas que c'est grâce à lui que je me suis épanouie dans ce domaine notamment grâce à mon stage de Master 2 réalisé sous sa supervision.

J'ai pu réaliser l'ensemble de ces analyses grâce à de nombreux collaborateurs que je tiens vraiment à remercier pour leur professionnalisme et leur disponibilité :

Un grand merci à l'équipe du CREC de Luc-sur-Mer, j'ai eu la chance de recroiser leur chemin après mon stage de Master 2 et de retravailler avec eux pendant cette thèse. Merci à **Jean-Paul** pour son aide à l'installation des mésocosmes sous la serre.

Merci beaucoup à **Maxime** pour sa disponibilité et sa gentillesse.

Merci à **Léo** pour son aide sur des manipulations.

Merci à **Orianne** pour sa disponibilité, sa gentillesse et son aide précieuse pour l'analyse d'échantillons.

A **Baptiste**, merci pour sa gentillesse à qui je donne pleins de bonnes ondes pour sa soutenance de thèse.

J'ai été ravie de travailler avec eux, tous partenaires du projet Marineff.

Merci beaucoup à **Barbara** et **Stéphanie Gascoin** du CRISMAT pour leur disponibilité et leur aide précieuse lors de l'analyse de mes échantillons par DRX.

Merci à **Jérôme Lecourt** du CRISMAT/ENSICAEN pour sa gentillesse et son aide pour toutes les découpes de mortier.

Merci beaucoup à **Didier Goux** et **Nicolas Elie** du CMabio pour leur disponibilité et leur aide pour les longues heures de travail passées à la réalisation des images au microscope ZEISS et les analyses MEB/EDS. Merci merci à eux deux !

Merci beaucoup à **Yassine** pour sa disponibilité, son aide ainsi que les nombreux conseils lors des analyses RAMAN.

Merci à **Martin Ubertini** et **Pauline Bazin** de l'entreprise POS3IDON de Saint-Malo de m'avoir accueilli au sein de leur équipe pendant 1 mois pour la découverte de leur entreprise dans le cadre du parcours CPE. Merci pour leur disponibilité, leur gentillesse et tous leurs précieux conseils !!

Merci à **Abdel** pour sa gentillesse, à tous ces moments de rire, sa bonne humeur, la découverte du Mont Saint-Abdel, les pauses « blablabla » de bureau (ravie d'avoir pu partager son bureau ces derniers mois de thèse).

Merci à **Faraj** pour sa grande gentillesse, sa bonne humeur, son sens de l'entraide, ces discussions foot et pleins d'autres...

Merci à eux deux de m'avoir fait découvrir leurs délicieuses recettes, danses et musiques libanaises !

Merci à **Manal** pour sa gentillesse et sa bonne humeur. Merci pour tous les moments partagés, que je ne suis pas prête d'oublier !

Pleins de réussites à vous mes اصحاب, vous allez tout « déchirer » pour votre soutenance !

Merci à **Aurélié** pour son aide précieuse et pour sa gentillesse. Merci à elle d'avoir sauvé mes petites diatomées pendant le confinement et d'avoir été mon « doc » à tous mes bobos !

Ils ont tous contribué à tous mes bons souvenirs de ces 3 années de thèse... Je n'oublierais jamais tous nos délires et nos moments de partages (repas spécial Ramandan, galettes, anniversaires, jeux de sociétés, balades, activités plages, visio confinement, délire en tout genre...), il y en a tellement ! On a tellement bien rigolé, j'en suis déjà nostalgique ! Je suis ravie de leur avoir fait

découvrir mon pays 😊). J'espère qu'il y en aura encore pleins d'autres mais dans tous les cas ceux-là resteront gravés. Bien plus que des collègues ils sont devenus de réels **Amis**.

Mais comment ne pas remercier chaleureusement toute l'équipe du laboratoire de l'ESITC CAEN !! Merci pour tous ces moments de détente et de rigolades entre collègues. Les repas improvisés tous ensemble, les moments de partage lors des anniversaires, les papotages entre deux « manips » et pause rédaction. Un Merci particulier à **Fouzia, Hicham, Karim, Yassine, Malo, Nassim, Matthieu et Aurélie** !!

Merci aussi à **Abdou, Bechara, Aziz, Manon, Océane, Fatima, Hamzé, Ilyas, Sylvain, Mad, Valentin, Samuel, Mohamed Ali, Walid, Huy** pour tous les bons moments passés avec eux dans la bonne humeur. Je reste frustrée de ne pas avoir pu aller voir un match Caen-EAG avec vous (à suivre...).

Merci aussi à tous les collègues de l'ESITC pour les discussions et moments de partages que j'ai pu avoir avec eux pendant ces trois années.

Merci à tous les **partenaires du projet INTERREG Marineff** avec qui j'ai pu échanger et collaborer au cours de ces trois années de thèse.

Je voudrais également remercier tous **mes professeurs, enseignants-chercheurs de l'UCO de Guingamp, de l'UBS de Vannes et de l'Université de Caen** car si je suis arrivée jusque-là c'est aussi grâce à eux !

Je ne souhaite pas remercier le COVID-19 pour avoir gâché une partie de cette thèse.

Pour terminer, j'aimerais remercier toute **ma famille** d'avoir toujours été là pour moi et d'avoir fait la personne que je suis aujourd'hui.

A mes parents, merci de m'avoir soutenu dans mes choix et dans mes moments de doutes. Merci d'avoir toujours été présents pour moi.

A ma sœur Mélanie, ma confidente mille mercis pour tout.

A mon cousin Quentin (Mushu), j'ai été ravie de te faire partager ma vie Caennaise et mon travail au sein de l'ESITC Caen lors de ton stage de 3^{ème}.

A mon parrain et ma marraine, merci d'avoir toujours été là pour moi.

Merci à la **famille Colani**, pour m'avoir accueilli pendant 1 mois lors de mon stage réalisé pour le CPE. J'ai passé de superbes moments avec eux !

A mes amis, merci merci pour avoir été là de près ou de loin.

Table des matières

Introduction générale	1
Chapitre 1 : Etude bibliographique.....	5
Introduction :	6
I. Les matériaux cimentaires utilisés pour la mise en œuvre des infrastructures maritimes	6
1. Les ciments.....	6
1.1. Définition.....	6
1.2. Phénomène d'hydratation.....	7
2. Les matériaux cimentaires : mortier et béton	8
II. Effet de l'immersion en milieu marin sur les propriétés d'un matériau cimentaire	10
1. Attaques chimiques de l'eau de mer	10
1.1. Les ions chlorure.....	11
1.2. Les ions sulfates.....	15
1.3. La carbonatation	16
2. Effet de la zone d'immersion	17
3. Effet de la bio-colonisation.....	17
3.1. Le biofilm, premier colonisateur	17
3.2. Les micro-organismes photosynthétiques constituant le biofilm	18
3.2.1. Les diatomées	18
3.2.1.1. EPS chez les diatomées	19
3.2.1.2. Morphologie des diatomées.....	19
3.2.1.3. Formation du frustule	20
3.2.1.4. Les facteurs de contrôle de la croissance des diatomées	23
a) Les nutriments, éléments essentiels à leur métabolisme.....	23
b) La lumière : Production primaire de ces organismes photosynthétiques	25
c) La température	27
3.3. Espèce de diatomée étudiée : <i>Cylindrotheca closterium</i>	27

3.4.	Formation d'un biofilm et attaques biologiques sur un matériau cimentaire.....	28
3.5.	Effet protecteur de la bio-colonisation	34
	Conclusion.....	36
	Chapitre 2 : Matériels et Méthodes.....	37
	Introduction :.....	38
I.	Matériaux cimentaires étudiés	38
1.	Caractérisation des matériaux de fabrication.....	38
1.1.	Ciment.....	38
1.2.	Sable	38
1.3.	Eau.....	39
1.4.	Granulats	39
2.	Confection des éprouvettes.....	40
2.1.	Mortier.....	40
2.2.	Béton	41
II.	Caractérisation du matériau cimentaire et du milieu d'immersion	44
1.	Caractérisation chimique	44
1.1.	Profils d'ions chlorure : analyse par chromatographie en phase ionique.....	45
1.2.	Mesure du pH.....	46
2.	Evaluation de l'évolution de la microstructure et de la composition du matériau cimentaire	46
2.1.	Analyse thermogravimétrique (ATG/DTG)	46
2.1.1.	Détermination de la quantité de Portlandite $\text{Ca}(\text{OH})_2$	48
2.1.2.	Détermination de la quantité de Carbonate de calcium (CaCO_3)	49
2.2.	La diffraction des rayons X (DRX).....	49
2.3.	La Microspectrométrie Raman (MSR).....	50
2.4.	Microscope Electronique à Balayage (MEB) couplé à un spectroscope à rayon X (EDS)	52
3.	Caractérisation mécanique : Résistance à la compression.....	53
III.	Culture de la souche de diatomée sélectionnée : <i>C. closterium</i>	55

1. Milieu de culture : milieu de Conway	55
2. Dispositif expérimental des cultures de micro-algues (milieu d'immersion contrôlé en laboratoire)	56
3. Caractérisation biologique suite à la colonisation du matériau	57
3.1. Suivi de la colonisation	57
3.1.1. Evaluation de la biomasse et des paramètres photosynthétiques : Mesure PAM... 57	
3.1.2. Le taux d'encrassement	60
3.1.3. Suivi photographique	61
3.1.3.1. Observation par microscopie numérique et par macroscopie optique et par fluorescence	61
Chapitre 3 : Interaction entre un mortier siliceux et <i>Cylindrotheca closterium</i> dans un milieu carencé en silice	65
Introduction	66
I. Dispositif expérimental	66
1. Echantillons de mortier	66
2. Mise en place du dispositif expérimental	66
2.1. Milieux d'immersion	68
3. Suivi de la dissolution de la Silice du mortier	69
4. Estimation de la Silice Biogène (bSi)	69
5. Mesure du pH	70
6. Mesure de la surface cellulaire et du biovolume	70
7. Extractions de la chlorophylle <i>a</i>	71
8. Analyse des données	71
II. Etude de l'interaction entre le mortier et la diatomée étudiée	72
1. Cinétique de dissolution de la silice du mortier sans et avec la présence de micro-algues dans le milieu	72
2. Influence de la disponibilité de la DSi sur la croissance de la diatomée	76
2.1. Densité cellulaire et silice biogène (bSi)	76
2.2. Biovolume	82

3. Influence de la disponibilité de la DSi sur la formation de biofilm à la surface du mortier.	85
Conclusion.....	89
Chapitre 4 : Effet du biofilm microphytobenthique sur le mortier en milieu marin.....	91
Introduction	92
I. Dispositif expérimental.....	92
1. En laboratoire	94
1.1. Matériels et milieu d’immersion des mortiers	94
2. Mésocosme : Eau de mer Naturelle (EN).....	96
2.1. Matériels et installation du milieu d’immersion	96
II. Suivi de la colonisation des éprouvettes de mortiers.....	97
1. Evolution des facteurs environnementaux des milieux d’immersion	97
2. Fluorescence par mesure PAM : Junior PAM.....	98
3. Taux d’encrassement	101
4. Observation par macroscopie optique et par fluorescence	102
5. Observation au MEB.....	105
III. Effet du biofilm sur la couche superficielle du mortier	109
1. Caractérisation chimique du mortier	109
1.1. Diffusion des ions chlorure : mesure par chromatographie en phase ionique	109
1.2. Variation du pH.....	111
2. Evolution de la microstructure et de la composition de la couche superficielle du mortier	113
2.1. Analyse thermogravimétrique (ATG/DTG)	114
2.1.1. Evolution de la quantité de portlandite.....	116
2.1.2. Evolution de la quantité de Carbonate de calcium.....	118
2.2. Observation au MEB-EDS	121
2.3. Analyses DRX.....	128
2.4. Microspectrométrie Raman (MSR).....	138
Conclusion.....	140

Chapitre 5 : Effet du biofilm microphytobenthique sur les propriétés du béton en milieu marin	143
Introduction	144
I. Dispositif expérimental et immersion des échantillons de béton <i>in situ</i> et en mésocosmes semi-fermés.....	144
1. Expériences <i>in situ</i>	145
II. Suivi de la bio-colonisation des éprouvettes de béton.....	146
1. Suivi des facteurs environnementaux des différents milieux.....	146
2. Identification des espèces marines fixées sur le béton.....	147
3. Evaluation de la biomasse et des paramètres photosynthétiques : Mesure PAM	150
III. Effet de l'immersion sur la durabilité et les résistances mécaniques du matériau.....	153
1. Propriétés mécaniques.....	153
2. Profils d'ions chlorure	157
3. Variation du pH	161
Conclusion :	163
Conclusion générale et perspectives.....	164
Bibliographie	167
Annexe 1a : Suivi photographique de la colonisation des éprouvettes de mortier Ø110 mm × H50 mm	188
Annexe 1b : Suivi photographique de la colonisation des éprouvettes de mortier Ø110 mm × H50 mm	189
Annexe 2a: Courbes DTG obtenues des mortiers par analyse thermogravimétrique après immersion dans de l'eau de mer artificielle en fonction de la profondeur	190
Annexe 2b: Courbes DTG obtenues des mortiers par analyse thermogravimétrique après immersion dans l'eau de mer naturelle et dans l'eau de mer artificielle avec <i>C. closterium</i> en fonction de la profondeur.....	191
Glossaire	192

Liste des Figures

Figure 1. Schéma représentant les différents types d'agressions (modifié d'après Mehta, 1991)	10
Figure 2. Changements de phases induits par l'attaque de l'eau de mer (Jakobsen et al., 2016).11	
Figure 3. Schéma de la pénétration des ions chlorure dans le béton (Wang, 2012)	12
Figure 4. Processus de corrosion induit par les ions chlorure des structures en béton (Wang et al., 2018).....	13
Figure 5. Principales phases impliquées dans le phénomène de carbonatation (Morandea, 2013)	17
Figure 6. Vue d'ensemble schématique des composants siliceux des parois cellulaires de diatomées (Zurzolo and Bowler, 2001).....	20
Figure 7. Représentation schématique du transport du silicium au sein d'une diatomée (d'après Javaheri et al., 2014). D'après ces auteurs, le compartiment 1 correspond à l'environnement où la diatomée va absorber l'acide orthosilicique. Les SITs sont situées sur la membrane cellulaire et vont permettre le transport du silicium du cytoplasme vers le SDV (compartiment 3). Dans le SDV, le silicium soluble se dépose entraînant la formation du frustule (compartiment 4). Les flèches vertes correspondent à la régulation cellulaire sur la quantité de SIT. Le noyau de la cellule peut modifier le niveau des SITs en fonction du flux silicium entrant dans la cellule.....	21
Figure 8. Schématisation de la division cellulaire des diatomées et de la formation des nouvelles valves et bandes cingulaires par les Vésicules de Dépôt de Silicium (SDV) (Redessiné par Kale and Karthick, (2015) à partir de Zurzolo and Bowler, (2001)).....	22
Figure 9. Différentes formes de Silicium dissous en fonction du pH de la solution	24
Figure 10. Représentation graphique de la détermination du K_s ou du K_{μ}	25
Figure 11. Schéma simplifié du système de transport des électrons lors de la photosynthèse : PSII : photosystème II, PSI : photosystème I, PQ : plastoquinone, Cyt b6-f : Cytochrome b6-f, Fd : ferrédoxine, PC : plastocyanine, NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate, éclair jaune : excitation par un photon. Les photosystèmes des thylakoides absorbent l'énergie pour produire ATP et NADPH. Les électrons perdus par les photosystèmes sont remplacés par oxydation d'H ₂ O. L'ATP et le NADPH par une suite d'évènement en cascade servent à la fixation du carbone par le cycle de Calvin (modifié d'après Behrenfeld et al., 2016)	26
Figure 12. Observation microscopique de l'espèce <i>C. closterium</i> (Ehrenberg) Reimann & J.C. Lewin 1964.....	28
Figure 13. Principales étapes de la formation d'un biofilm sur un matériau cimentaire. Les micro-organismes planctoniques isolés évoluant librement dans la colonne d'eau (1), se fixent de manière réversible sur la surface du matériau (2). Ensuite ils se fixent de façon irréversible (3) et	

s'organisent en amas de cellules en synthétisant une grande quantité d'EPS (4). Le biofilm est arrivé à maturation et correspond au biofilm primaire. Certains micro-organismes peuvent se détacher du biofilm et retourner dans la colonne d'eau (5). Un biofilm secondaire va se former suite à la colonisation par des macro-organismes (6).....	31
Figure 14. Processus de bio-détérioration du béton (Bastidas-Arteaga et al., 2008).....	32
Figure 15. (a) Béton avec croissance d'huîtres ; (b) variations de la résistance à la flexion (d'après Risinger, 2012).....	35
Figure 16 : Les différents types de granulats utilisés pour élaborer les matériaux cimentaires : Sable 0/2mm (a) ; Granulats 4/10 mm (b) et 10/20mm (c) ; Granulats coquilliers 6/12,5 mm (d)	40
Figure 17. Malaxeurs (a) 10L et (b) 30L pour l'élaboration d'éprouvettes de mortier ; (c) table à choc et éprouvettes de mortiers (d) parallélépipédiques 40 mm × 40 mm ×160 mm et cylindriques Ø=110 mm et h=50mm.....	41
Figure 18. Mesure au cône d'Abrams (a) ; Mesure de l'air occlus (b)	42
Figure 19. Préparation des constituants du béton (a) ; Malaxage du béton (b) ; Préparation du coulage (c)	43
Figure 20. Démoulage des éprouvettes de bétons (a) ; Cure de 90 jours des éprouvettes dans de l'eau douce (pH =7,7) (b)	43
Figure 21. Grignoteuse (a) , éprouvette de mortier (Ø110 mm× H50 mm) après grignotage à 10 mm de profondeur (b) , perceuse à colonne (c)	45
Figure 22. Chromatographe en phase ionique et son schéma de fonctionnement	46
Figure 23. Thermo gravimètre de type STA 449 F5.....	47
Figure 24. Courbes type ATG et DTG d'un béton coquillier après 90 jours de cure, dans les 2 premiers mm.....	48
Figure 25. Spectromètre Raman.....	51
Figure 26. MEB-EDS Jeol 7200 LV.....	53
Figure 27. Essai de compression sur éprouvette de béton (Ø 110 mm × 220 mm) après 3 mois d'immersion <i>in situ</i>	54
Figure 28. Dispositif expérimental de la culture de la diatomée « <i>C. closterium</i> »	56
Figure 29. Mesure PAM à la surface du matériau.....	57
Figure 30. Schéma d'irradiation appliqué en mesure PAM (avec F_0 : rendement de fluorescence minimale après acclimatation à l'obscurité ; F_m : rendement de fluorescence maximale, d'un échantillon acclimaté à l'obscurité atteint durant un flash de lumière saturant ; $F_{m,i}$: rendement maximal de fluorescence d'un échantillon acclimaté à une certaine intensité lumineuse atteint durant un flash saturant ; $F_{s,i}$: fluorescence de base stable ; ML : Lumière de mesure de faible intensité ; LAi : Lumière actinique)	59

Figure 31. Courbe de réponse à la lumière rETR vs E permettant de connaître les paramètres photosynthétiques. Sur la courbe on peut observer une région limitée par la lumière, notée (1). On peut ainsi observer une région de saturation par la lumière sous forme de plateau noté (2).	60
Figure 32. Spectrocolorimètre utilisé (Ci60 (X-Rite)) (a) ; disposition de l'emplacement des mesures au spectromètre réalisées (ronds noirs) (b)	60
Figure 33. Observation au microscope Keyence des éprouvettes après colonisation (a) ;.....	62
Figure 34. Observation macroscopique de mortier colonisé par diverses micro-algues après fluorescence (a) et une fois binarisée en noir et blanc (b)	63
Figure 35. Taille des échantillons de mortier étudiés (10 mm × 10 mm × 5 mm).	66
Figure 36. Dispositif expérimental	67
Figure 37. Dispositif expérimental de la dissolution du mortier immergé dans la condition 1 (a) et condition 2 (b).....	68
Figure 38. Cellule de Malassez	69
Figure 39. Protocole expérimentale réalisé à X jours.....	70
Figure 40. Concentration en silice dissoute et pH mesurés dans la condition 1 (M+/Si-/Cc-) et condition 2 (M+/Si-/Cc+) (a) dans les conditions de contrôle (condition 3 (M-/Si+/Cc+) et condition 4 (M-/Si-/Cc+)) (b) . Les moyennes ± la plage de trois répétitions sont indiquées.....	73
Figure 41. Si assimilé par jour par <i>C. closterium</i> en condition 2 (M+/Si-/Cc+).	76
Figure 42. Concentration de silice biogène (bSi), i.e. le taux de formation des frustules ($\mu\text{mol.L}^{-1}$), et densité cellulaire (cellule.L^{-1}) de <i>C. closterium</i> en fonction du temps (a) ; teneur en bSi par cellule ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{cellule}^{-1}$) (b) ; Schéma simplifié du cycle cellulaire des diatomées cultivées dans la condition 2 au cours du temps (c).	78
Figure 43. Observation microscopique (Objectif × 20 – grossissement ×150) de <i>C. closterium</i> au jour 1 (a) , jour 3 (b) , jour 9 (c) , jour 15 (d) en condition 2 (M+/Si-/Cc+) et au jour 15, condition 3 (M-/Si+/Cc+) (e) , condition 4 (M-/Si-/Cc+) (f)	80
Figure 44. Observation microscopique (Objectif × 200- grossissement ×1000) des chloroplastes de <i>C. closterium</i> dans la solution initiale au jour 0 (a) et au jour 15 (b) dans la condition 2 (M+/Si-/Cc+).....	81
Figure 45. Taux de production de la silice par les diatomées i.e. degré de silicification (bSi par surface cellulaire) (a) et rapport S/V dans la condition 2 (M+/Si-/Cc+) et 3 (M-/Si+/Cc+) (b) ... 84	84
Figure 46. Exemples d'observations microscopiques (Objectif x 20 - grossissement x150) du mortier au jour 0, 1, 2, 3, 6, 9, 12 et jour 15 après immersion (exemple d'un des triplicatas).....	86
Figure 47. Dynamique de la colonisation du biofilm microphytobenthique sur le mortier en fonction du temps : Biomasse chlorophyllienne par unité de surface (a) ; Moyenne de l'indice F_v/F_m de l'efficacité de la quantité maximale de PSII (c'est-à-dire l'indice de l'état physiologique) et capacité photosynthétique du biofilm (ETR_{max}) (b)	87

Figure 48. Protocole expérimental de cette étude	93
Figure 49. Dispositif expérimental des 2 environnements étudiés en laboratoire, mortiers immergés (a) ; dans le milieu EA ; (b) : dans le milieu EAC.....	95
Figure 50. Dispositif expérimental installé en laboratoire pour le milieu EAC	95
Figure 51. Dispositif expérimental des mortiers immergés dans le milieu EN.....	96
Figure 52. Evolution du pH (ligne en gras) et de la température (ligne en pointillé) en fonction de la durée et du milieu d'immersion (EA, EAC et EN).....	98
Figure 53. Dynamique de la colonisation par le biofilm microphytobenthique sur du mortier en fonction du temps dans les deux milieux étudiés (en Eau de mer Artificielle + biofilm de <i>C. closterium</i> + nutriments (EAC) (ligne en gras) et en Eau de mer naturelle + biofilm naturel (EN) (ligne en pointillée)) : (a) Biomasse chlorophyllienne F_0 du microphytobenthos et indice F_v/F_m Rendement quantique maximum du PSII (ie. Indice d'état physiologique) ; (b) Capacité photosynthétique maximale du biofilm ($rETR_{max}$, $\mu\text{mol. e}^- \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	100
Figure 54. Taux d'encrassement (%) du mortier au cours du temps dans l'environnement EAC et EN	102
Figure 55. Observations macroscopiques (X80) de mortiers (10 mm × 10 mm × 5 mm) immergés à 10 et 360 jours (à gauche) ; Observations macroscopiques par fluorescence EGFP (à droite) en EN et EAC, la couleur verte est spécifique au pigment chlorophyllien du microphytobenthos fixé sur les échantillons, le noir représente la zone du mortier non colonisé.....	104
Figure 56. Exemple d'observations au microscope électronique à balayage, à différents grossissements, de biofilms de <i>C. closterium</i> fixés sur le mortier après 360 jours d'immersion (a, b, c et d) (b : bactéries ; EPS : Substances Polymères Extracellulaires sécrétées par les micro-organismes).....	105
Figure 57. Exemple d'observations au microscope électronique à balayage de biofilms avec EPS (Substances Polymères Extracellulaires) sur le mortier après 360 jours d'immersion en eau de mer naturelle.	106
Figure 58. Observations au microscope électronique à balayage de biofilms avec EPS (Substances Polymères Extracellulaires) et bactéries (b).....	107
Figure 59. Exemple d'observations au Microscope Electronique à Balayage de biofilms microphytobenthiques à la surface du mortier après 360 jours d'immersion en eau de mer naturelle. Le biofilm est composé de diatomées pennales avec ou dépourvues de raphé (1), de diatomées centriques (2), de bactéries (b).	108
Figure 60. Diffusion des ions chlorure libres dans le mortier jusqu'à 10 mm de profondeur, au cours de l'immersion dans de (a) l'eau de mer artificielle ; (b) l'eau de mer artificielle + <i>C. closterium</i> ; (c) l'eau de mer naturelle.....	110

Figure 61. Evolution du pH du mortier en fonction de la durée d'immersion et de la profondeur dans différents milieux en : (a) eau de mer artificielle ; (b) eau de mer artificielle + <i>C. closterium</i> ; (c) eau de mer naturelle.....	112
Figure 62. Evolution du pH du mortier référence et du mortier immergé après 30 et 360 jours d'immersion dans les trois milieux étudiés (EA, EAC et EN)	113
Figure 63. Courbes DTG (%/min) des mortiers référence et immergées, dans les trois milieux étudiés après 10 -30-90-180-260-360 jours d'immersion (profondeur étudiée : 0-2 mm).....	115
Figure 64. Evolution de la portlandite (% massique) dans les mortiers immergés en Eau de mer Naturelle + Biofilm naturel (EN) (a) et en Eau de mer Artificielle avec <i>C. closterium</i> (EAC) (b) comparé au mortier référence et immergé en Eau de mer Artificielle (EA) à différentes profondeurs après 10, 90 et 360 jours d'immersion	117
Figure 65. Evolution du Carbonate de Calcium (% massique) dans les mortiers immergés en Eau de mer Naturelle + Biofilm naturel (EN) (a) et en Eau de mer Artificielle avec <i>C. closterium</i> (EAC) (b) comparé au mortier référence et immergé en Eau de mer Artificielle (EA) à différentes profondeurs après 10, 90 et 360 jours d'immersion	120
Figure 66. Observations MEB du mortier référence (avant immersion) en surface (a,b). C-S-H : gel de Calcium de Silicate Hydrate.....	121
Figure 67. Observations MEB du mortier immergé en Eau de mer Artificielle après 90 (a-b) et 360 jours (c-d) d'immersion (Ar : Aragonite)	122
Figure 68. Observations MEB du mortier immergé en Eau de mer Naturelle après 360 jours d'immersion (a-b) (P : Portlandite, C-S-H, Ar : Aragonite, Ca-Mg : Calcite magnésienne).....	123
Figure 69. Observations MEB du mortier immergé en Eau de mer Artificielle avec <i>C. closterium</i> après 90 (a et b) et 360 jours d'immersion (c et d)	124
Figure 70. Images MEB (×500) réalisées après 90 (colonne de gauche) et 360 jours (colonne de droite) d'immersion en Eau de mer Artificielle (a-b) ; en Eau de mer Artificielle + <i>C. closterium</i> (c-d) ; en Eau de mer Naturelle (e-f) . La surface de ces images correspond à la surface sondée pour les analyses EDS.....	125
Figure 71. Spectre DRX de la surface d'un mortier référence (avant immersion)	129
Figure 72. Spectres DRX de la surface des mortiers immergés 90 jours dans les trois conditions étudiées (EA, EAC et EN).....	132
Figure 73. Spectres DRX de la surface des mortiers immergés 360 jours dans les trois conditions étudiées (EA, EAC et EN).....	133
Figure 74. Spectre DRX de poudre (sur 2mm de profondeur) de mortier référence (avant immersion)	134
Figure 75. Spectres DRX de poudre de mortier immergé après 90 jours d'immersion dans les trois conditions étudiées (EA, EAC et EN).....	136

Figure 76. Spectres DRX de poudre de mortier immergé après 360 jours d'immersion dans les trois conditions étudiées (EA, EAC et EN)	137
Figure 77. Analyse par spectroscopie Raman pour le mortier référence (a) et les mortiers immergés pendant 90 jours (a) et 360 jours (b) dans les trois conditions étudiées (EA, EAC et EN)	139
Figure 78. Étapes expérimentales.....	145
Figure 79. Immersion des éprouvettes de béton dans des cages pendant 3 mois dans la Rance de Dinard (a) ; immersion des éprouvettes en mésocosmes semi-fermés (b).....	146
Figure 80. Photographie d'éprouvettes de béton coquiller après 90 jours d'immersion <i>in situ</i>	148
Figure 81. Photographie d'éprouvettes de béton CEMII +0%C et CEMII +20%C (Ø110 mm × H220 mm) après 90, 180 et 360 jours d'immersion en eau de mer naturelle.....	148
Figure 82. Photographie d'une huitre après 3 mois de fixation sur le béton.....	149
Figure 83. Photographie d'éprouvettes résinées (Ø110 mm × H50 mm) de type CEMII +20%C (a) et CEMII +0%C après 180 jours d'immersion en eau de mer naturelle (b).....	150
Figure 84. Dynamique de la colonisation par le biofilm microphytobenthique en fonction du type de béton. (a) Biomasse chlorophyllienne F_0 du microphytobenthos ; (b) Indice F_v/F_m Rendement quantique maximum du PSII (ie. Indice d'état physiologique).....	151
Figure 85. Capacité photosynthétique maximale $rETR_{max}$ du microphytobenthos des éprouvettes de bétons immergés.....	152
Figure 86. Résistance à la compression des bétons après 90 jours de durcissement et après 90, 180 et 360 jours d'immersion dans l'EA et l'EN.....	154
Figure 87. Courbes DTG (%/min) de bétons CEMII +0%C et CEMII +20%C référence et immergés dans les 2 environnements étudiés (EN et EA) à 90 -180 et 360 jours à une profondeur de 0 - 2 mm	156
Figure 88. Profils de pénétration des ions chlorure libres des échantillons jusqu'à 10 mm de profondeur, par rapport aux temps d'immersion dans de l'eau de mer artificielle (EA) (ligne pleine) dans de l'eau de mer naturelle (EN) (ligne pointillée) pour le béton CEM II +0%C (a) et le béton CEMII +20%C (b).....	160
Figure 89. Variation du pH du béton CEMII +0%C (a) et CEMII +20%C (b) obtenu à partir du lixiviat de la matrice cimentaire à différentes profondeurs dans l'eau de mer naturelle (EN) et l'eau de mer artificielle (EA) après 90, 180 et 360 jours d'immersion.....	162

Liste des tableaux

Tableau 1. Types et usages des ouvrages maritimes les plus répandus.....	9
Tableau 2. Pourcentage des principaux sels dissous pour une eau de mer de salinité 35 g.L ⁻¹	11
Tableau 3 : Teneurs en oxydes chimiques en % du ciment CEMII/A-LL étudié (Calcia)	38
Tableau 4 : Caractéristiques physiques des granulats utilisés	39
Tableau 5. Constituants des éprouvettes de béton coquillier ou non en kg/m ³	42
Tableau 6. Températures de changement d'état type pour une pâte de ciment jusqu'à 1000°C	48
Tableau 7. Mise en œuvre du milieu de culture d'une diatomée.....	55
Tableau 8. Valeurs moyennes des mesures linéaires, n =10. Biovolume (V), surface cellulaire (S) et rapport surface/volume (S/V) des espèces de <i>C. closterium</i>	83
Tableau 9. Constituant des milieux d'immersions des éprouvettes de mortiers installés en laboratoire	94
Tableau 10. Taux de recouvrement des mortiers après immersion en Eau de mer Artificielle + <i>C. closterium</i> (EAC) et en Eau de mer Naturelle (EN) à différentes échéances.....	103
Tableau 11. Analyses EDS de la surface d'un mortier référence et de mortiers immergés après 90 jours d'immersion en Eau de mer artificielle (EA), Eau de mer Artificielle + <i>C. closterium</i> (EAC), Eau de mer Naturelle (EN).....	126
Tableau 12. Analyses EDS de la surface d'un mortier référence et de mortiers immergés après 360 jours d'immersion en Eau de mer artificielle (EA), Eau de mer Artificielle + <i>C. closterium</i> (EAC), Eau de mer Naturelle (EN).....	127
Tableau 13. Pourcentage (%) des phases minérales cristallisées en surface d'un mortier référence et après 90 et 360 jours d'immersion en Eau de mer Artificielle (EA), en Eau de mer Artificielle + <i>C. closterium</i> (EAC), en Eau de mer Naturelle (EN)	130
Tableau 14. Pourcentage (%) des phases minérales cristallisées de la poudre (0-2mm de profondeur) de mortier référence et après 90 et 360 jours d'immersion en Eau de mer Artificielle (EA), en Eau de mer Artificielle + <i>C. closterium</i> (EAC), en Eau de mer Naturelle (EN)	135
Tableau 15. Position des modes de vibration Raman pour chaque phase identifiée dans nos mortiers après 90 et 360 jours d'immersion dans les 3 conditions étudiées.....	138
Tableau 16. Evolution des paramètres physico-chimiques des environnements étudiés, (1 PSU = 1 g de sel (Na ⁺ Cl ⁻) par kg d'eau de mer).....	147

Abréviations

ADP : Adénosine-diphosphate	DTG : Dérivée de l'analyse thermogravimétrique
ATP : Adénosine triphosphate	EA : Eau de mer Artificielle
ATG : Analyse thermogravimétrique	EAC : Eau de mer Artificielle avec <i>C. closterium</i>
bSi : Silice Biogénique	EN : Eau de mer Naturelle
Ca(OH) ₂ ou CH : Portlandite	E/C : Rapport Eau sur Ciment
Cl ⁻ : Ion chlorure	EDS : Spectroscopie X à dispersion d'énergie
C ₂ S : Silicate bi-calcique (2CaO.SiO ₂)	EPS : Extracellular Polymeric Substance
C ₃ S : Silicate tri-calcique (3CaO.SiO ₂)	ETR _{max} : maximum Electron transport rate
C ₃ A : Aluminate tri-calcique (3CaO.Al ₂ O ₃)	F ₀ : indicateur de biomasse chlorophyllienne
C ₄ AF : Aluminoferrite tétra-calcique (4CaO.Al ₂ O ₃ Fe ₂ O ₃)	F _v /F _m : Indice de l'Etat physiologique du phytoplancton/microphytobenthos
Ca ²⁺ : Ion calcium	HR : Humidité Relative
CaCO ₃ : Carbonate de calcium	K _s : Constante de demi-saturation des taux d'absorption du silicium
Ca-Mg : Calcite magnésienne	K _μ : Constantes de demi-saturation des taux de division (μ)
<i>C. closterium</i> : <i>Cylindrotheca closterium</i>	MEB : Microscopie électronique à balayage
CEMII +0%C : Béton avec ciment CEMII non coquillier	Mg ²⁺ : Ion magnésium
CEMII +20%C : Béton avec ciment CEMII avec substitution de 20% de granulats minéraux par des granulats coquilliers	Mg(OH) ₂ : Brucite
Chl _a : Chlorophylle <i>a</i>	M-S-H : Silicates de magnésium hydratés
CO ₂ : dioxyde de carbone	NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
CR _I : Centre réactionnel du PS _I	PAM : Pulse Amplitude Modulation
CR _{II} : Centre réactionnel du PS _{II}	PC : Plastocyanine
C-S-H : Silicate de calcium hydraté	
DRX : Diffraction de Rayons X	

Abréviations

pH : Potentiel hydrogène

PM : Prise mer (ciment)

P_{SII} Photosystème II

PS_I : Photosystème I

Q_A : Quinone A

Q_B : Quinone B

R_c : Résistance en compression uni-axiale
(MPa)

SITs : Protéines transporteuses d'acide
orthosilicique (Silicic acid Transporter
proteins)

Si(OH)₄ : Acide orthosilicique (Silice
dissoute)

SDV : Vésicule de Dépôt de Silice (Silica
Deposition Vesicle)

V : Taux d'absorption

V_{max} et μ_{max} : les taux d'absorption et de
croissance potentiels maximums aux
concentrations infinies

Introduction générale

En milieu marin, les matériaux cimentaires sont habituellement utilisés pour la mise en œuvre d'infrastructures maritimes et de récifs artificiels. Ces derniers ont plusieurs intérêts pour les activités humaines à savoir la protection côtière, l'aménagement du littoral (infrastructures portuaires), etc. Ils sont même aujourd'hui utilisés afin de créer de nouvelles structures dites « biomimétiques » (qui imitent la nature) visant à créer de nouveaux habitats pour la faune et la flore marine. En France, le contexte réglementaire, particulièrement la loi « Grenelle 2 » impose, lors de nouveaux projets d'aménagements touchant potentiellement à la biodiversité ou aux milieux naturels, de mettre en œuvre la hiérarchie de la mitigation « Éviter, Réduire, Compenser ». L'objectif étant d'éviter au maximum les impacts sur la biodiversité et de minimiser ceux qui ne peuvent pas être évités. Ainsi, de nouvelles approches d'éco-ingénierie ont émergé dans le but d'atténuer les impacts environnementaux et bénéficier des services écosystémiques négligés en intégrant les processus et fonctions écosystémiques dans les pratiques de conception des infrastructures (Dyson and Yocom, 2015). Par conséquent, ces nouvelles approches (Bergen et al., 2001; Dennis et al., 2018; Firth et al., 2014, 2016; Mitsch, 2012; Pioch et al., 2018; Strain et al., 2018) permettent de favoriser les interactions positives entre le compartiment biologique et les matériaux cimentaires.

L'importance des maîtres d'œuvres et scientifiques est d'avoir un matériau cimentaire résistant et durable dans le temps en fonction de ces conditions d'expositions. Le béton peut se détériorer dans le temps en fonction des conditions environnementales auxquelles il est soumis. De plus, les matériaux cimentaires (mortier et béton) sont rapidement colonisés dans le milieu marin. En effet, ceux-ci sont rapidement recouverts par un biofilm principalement composé de micro-organismes tels que des bactéries, archées et le microphytobenthos (principalement constitués de diatomées). L'activité biologique liée au métabolisme des espèces marines fixées, en plus de la composition chimique de l'eau de mer peuvent avoir des répercussions négatives sur l'intégrité et la durabilité du matériau.

L'étude de la matrice cimentaire immergée dans le milieu marin permet d'observer les nombreux changements pouvant avoir lieu dans les couches externes (surface) et interne. En effet, les agents agressifs de l'eau de mer et l'activité biologique vont provoquer la dissolution de certaines phases

hydratées de la matrice cimentaire ainsi que la formation de nouveaux composés. Notre étude s'est principalement focalisée sur l'évolution des équilibres physico-chimiques opérés lors d'attaques chimiques et biologiques et de la durabilité du matériau immergé en mer et, à l'échelle de la microstructure et de la composition du matériau cimentaire dans la couche superficielle. L'intérêt sera porté sur les premiers colonisateurs de la matrice en milieu marin et en particulier sur le microphytobenthos.

Cette thèse vise à comprendre et suivre les interactions entre les micro-organismes marins et les matériaux cimentaires. Les matériaux cimentaires étudiés pendant cette thèse sont le mortier et le béton. Pour ce faire, des études accélérées en laboratoire (milieu contrôlé) sont réalisées. Ces essais en laboratoire sont basés sur des environnements reproduisant les conditions environnementales du milieu marin. L'effet d'une espèce de diatomée *Cylindrotheca closterium* sur le mortier a été particulièrement étudié.

Des études en mésocosmes semi-fermés ont également été réalisées pour s'accorder aux conditions environnementales *in situ*.

Dans ce contexte, les principaux objectifs de ce travail de recherche portent sur la capacité des micro-algues à assimiler certains nutriments provenant de la matrice cimentaire. L'autre intérêt est aussi d'étudier l'effet du biofilm sur la couche superficielle du matériau en fonction du temps en suivant l'évolution de la composition, la microstructure et la durabilité (diffusion des ions chlorure) de ce dernier.

Ce manuscrit s'articule autour de cinq chapitres.

Le premier chapitre présente l'état de l'art des matériaux cimentaires étudiés : le mortier et le béton. Une synthèse bibliographique de l'effet de l'immersion sur les propriétés de ces matériaux en milieu marin sera présentée. Ensuite, un intérêt particulier s'est porté sur les mécanismes de bio-colonisation et de bio-détérioration de la matrice cimentaire par les micro-organismes marins. Une description de la diatomée étudiée en laboratoire (*C. closterium*) est également présentée dans ce chapitre.

Le chapitre 2 présente les différents matériaux cimentaires étudiés. Les différents outils permettant de suivre la cinétique de bio-colonisation des matériaux cimentaires sont présentés. Les techniques expérimentales utilisées pour suivre la durabilité, l'évolution de la microstructure et de la composition chimique du matériau sont également exposés dans ce chapitre. Le protocole de la mise en culture de la souche de diatomée étudiée est également détaillé dans ce chapitre.

L'étude réalisée et présentée dans le chapitre 3 vise à évaluer la capacité de l'espèce *C. closterium* à utiliser le mortier comme source de silicium pour sa croissance. En effet, ces diatomées ont

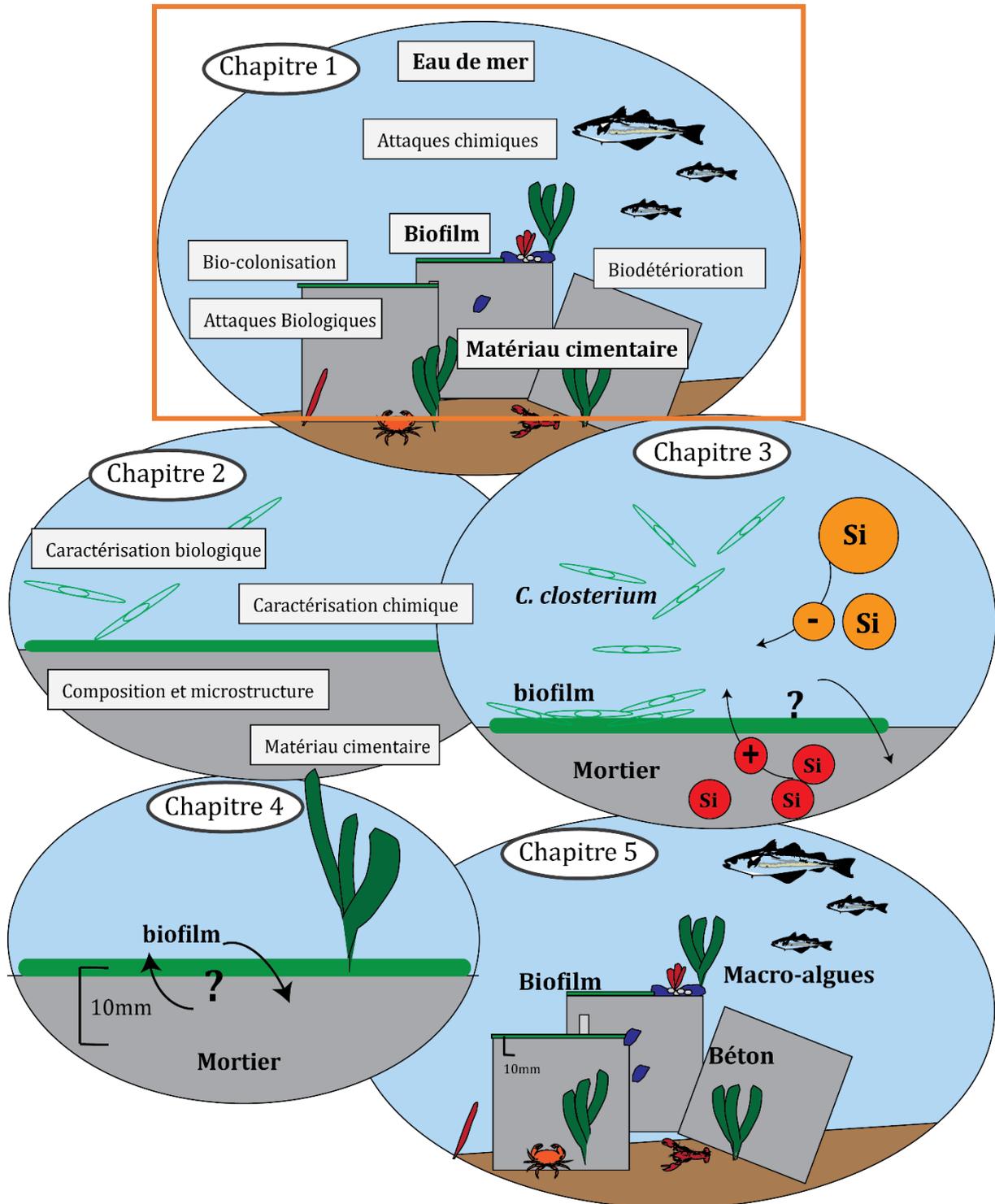
besoin de silice sous forme dissoute pour synthétiser leur frustule. Pour ce faire, un dispositif expérimental a été mis en place. Des cultures de type batch de *C. closterium* ont été réalisées dans un milieu limité en silicium avec ou sans présence de mortier. Dans un premier temps, la cinétique de dissolution de la silice du mortier a été suivie. Dans un second temps, nous avons étudié la cinétique de croissance des diatomées ainsi que plusieurs de leurs performances physiologiques (traits morphologiques, activité photosynthétique etc.).

Le chapitre 4 porte tout d'abord sur le suivi de la bio-colonisation du matériau cimentaire immergée à long terme dans différents milieux d'immersions. Ces milieux d'immersions sont également détaillés dans ce chapitre. Le travail a ensuite été focalisé sur les modifications qualitatives et quantitatives de la couche superficielle (en surface et à dix millimètres de profondeur) de la matrice cimentaire opérées à la suite de sa bio-colonisation. Pour ce faire, différents essais (MEB/EDS, DRX, ATG/DTG, etc.) sont réalisés pour répondre à cet objectif.

Le chapitre 5 apportera des réponses quant à l'effet de l'immersion en milieu marin, à long terme, de deux types de bétons (coquillier et non coquillier) sur leur durabilité (diffusion des ions chlorure) et leur résistance mécanique en vue de développer des infrastructures maritimes.

Pour terminer, des conclusions et des perspectives clôturent ce mémoire en synthétisant les principaux résultats obtenus.

Chapitre 1 : Etude bibliographique



Introduction :

Le but de ce chapitre est de faire un rappel des connaissances nécessaires à la compréhension des différentes thématiques abordées dans ce manuscrit.

Tout d'abord, nous allons nous intéresser aux constituants des matériaux cimentaires et principalement ceux pouvant être utilisés dans la mise en œuvre des infrastructures maritimes : le mortier et le béton. Un accent particulier sera mis sur le ciment et son phénomène d'hydratation.

La deuxième partie est consacrée à la compréhension des effets de l'immersion en milieu marin sur les propriétés d'un matériau cimentaire. Le but étant d'analyser les conditions chimiques, physiques et biologiques de l'eau de mer pouvant impacter la microstructure et la composition du matériau. Le processus de bio-colonisation d'un matériau et son effet sur la matrice cimentaire seront abordés. Un focus sera mis sur le microphytobenthos et en particulier sur les diatomées, un des premiers colonisateurs du substrat en milieu marin.

I. Les matériaux cimentaires utilisés pour la mise en œuvre des infrastructures maritimes

1. Les ciments

1.1. Définition

Le ciment est un liant hydraulique qui une fois mélangé à de l'eau va former une pâte de ciment qui va progressivement durcir au cours de la prise à l'air libre ou dans de l'eau. Il existe de nombreux types de ciments qui se différencient par leurs compositions et leurs modes de fabrications. Ces différents ciments vont ainsi avoir certaines propriétés qui vont influencer sur son utilisation. Pour une application en mer, plusieurs types de ciments sont utilisés.

Le ciment Portland est le plus couramment utilisé, il représente plus de 50% des infrastructures maritimes (Anderson and Underwood, 1994). Celui-ci est principalement composé de silicates de calcium. En effet, le ciment Portland est fabriqué à partir d'un cru de ciment (mélange issu d'un premier broyage) contenant du calcaire ainsi que de l'argile. Ce cru est ensuite porté à haute température (1450 °C) dans un four. Après refroidissement, le clinker Portland est obtenu. A ce clinker est rajouté du gypse (jouant un rôle de régulateur de prise) et des additions minérales en fonction du type de ciment souhaité. Deux silicates et deux aluminates vont être produits suite à la réaction de clinkérisation (Bullard et al., 2011). On retrouve le silicate tricalcique ou alite ($C_3S = 3CaO.SiO_2$), considéré comme le constituant majoritaire du clinker et le silicate bicalcique ou bélite ($C_2S = 2CaO.SiO_2$). En ce qui concerne les aluminates, constituants en plus faibles quantités

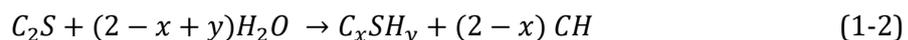
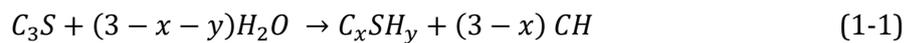
(autour des 5-10%), on a la formation d'aluminate tricalcique ($C_3A = 3CaO \cdot Al_2O_3$) et d'alumino-ferrite ($C_4AF = 4CaO \cdot Al_2O_3 \cdot Fe_2O_3$).

Certains types de ciments ont des propriétés spécifiques pour une utilisation en mer. Il en existe différentes variétés obtenues à partir de ciment Portland (CEMI), de ciment Portland composé (CEMII), de ciment de haut fourneau (CEMIII), ou de ciment au laitier et aux cendres volantes (CEMV). En effet, ces ciments ont des teneurs limitées en aluminate tricalcique (C_3A) permettant l'augmentation de la résistance du matériau face aux agressions chimiques de l'eau de mer. Ils sont ainsi adaptés aux conceptions de structures complexes servant d'habitats pour les organismes marins (Firth et al., 2014).

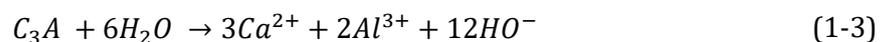
1.2. Phénomène d'hydratation

La cinétique d'hydratation est influencée par la composition chimique du ciment. De plus, l'eau de gâchage a un rôle majeur dans le processus d'hydratation. Le phénomène d'hydratation modifie la microstructure de la matrice cimentaire. Elle se réalise en plusieurs étapes (Bullard et al., 2011) et dépend des adjuvants utilisés.

Les phases solides qui commencent à se dissoudre progressivement dans l'eau sont les phases anhydres C_3S et C_2S libérant les ions Ca^{2+} et $H_2SiO_4^{2-}$ qui vont interagir entre eux pour former des silicates de calcium hydratés (C_xS-H_y ou en terme générique les C-S-H) et de la portlandite ($Ca(OH)_2$ ou CH). Les C-S-H sont dépendant des rapports massiques $x = C/S$ (Calcium/Silicium) (proche de 1,7) et y correspondant au ratio S/H (Silicium/Eau). Le bilan est présenté par les équations 1-1 et 1-2 :

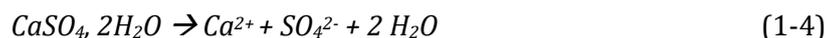


L'hydratation du C_3A avec l'eau se produit ensuite (équation 1-3) :

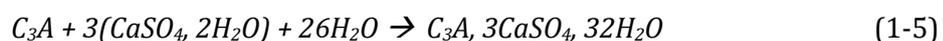


Plusieurs phases d'aluminates de calcium hydratés (C_2AH_8 , C_4AH_{13}) vont alors se former.

Du sulfate de calcium peut être ajouté au clinker sous forme de gypse. Il va ralentir l'hydratation du C_3A . Le gypse possède également des propriétés hydrauliques (équation 1-4) :



Les aluminates (C_3A) réagissent avec les ions sulfate du gypse pour former du trisulfoaluminate de calcium hydraté (AF_t) ou plus couramment appelé ettringite de formule chimique $(CaO)_6 (Al_2O_3)(SO_3)_3, 32H_2O$ (équation 1-5).



Suite à ces réactions le gypse va progressivement s'épuiser tout comme la quantité de sulfate. L'ettringite va alors se dissoudre libérant des ions sulfate qui vont réagir avec l'excédent de C_3A pour former du monosulfoaluminate de calcium hydraté (appelé AF_m), de formule chimique $(CaO)_3(Al_2O_3)(CaSO_4),12H_2O$. L'ettringite remplace ici le gypse en fournissant des ions sulfate.

Le C_4AF va également s'hydrater pour former de l'aluminoferrite de calcium hydraté.

Ainsi à la fin du processus d'hydratation, la pâte de ciment est composée de phases solides (principalement des hydrates (CSH (60 à 70%), aluminates hydratés (10 à 20%), portlandite (15 à 20%)) et de pores remplis d'eau constituant la solution interstitielle. Au cours de l'hydratation, l'eau de gâchage se charge en ions dû à la dissolution des anhydres. Ainsi la composition chimique de la solution interstitielle est modifiée et est constituée de plusieurs ions alcalins (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) et hydroxyles (OH^-) donnant à cette solution un caractère basique (pH d'environ 13).

2. Les matériaux cimentaires : mortier et béton

Le mortier est constitué d'une pâte cimentaire comme liant (eau, ciment) et de granulats de type sable. Deux principaux sables sont utilisés dans la conception de mortier, le sable calcaire ou siliceux. Le mortier est très souvent étudié car il est facilement reproductible. De plus, il a plusieurs autres avantages car il possède une bonne maniabilité, une bonne homogénéité, une bonne résistance ainsi qu'une porosité relativement faible.

La porosité d'un matériau cimentaire dépend du rapport E/C (Eau/Ciment) définie lors de l'hydratation du ciment. Il existe plusieurs types de pores. La porosité capillaire est formée de pores de gros diamètres (ordre des micromètres) variant suivant le rapport E/C. Les pores de gels sont liés au C-S-H formant des pores de petits diamètres (ordre des nanomètres). De plus, la taille des pores et les vides ouverts interconnectés vont agir sur les propriétés de transfert (perméabilité, diffusion des ions) du matériau cimentaire. La porosité du matériau cimentaire varie en fonction de sa composition et va influencer sa durabilité. En effet suivant la porosité du matériau cimentaire les agressions chimiques externes (voir partie II.1) peuvent plus facilement pénétrer au sein du matériau et modifier par des phénomènes de dissolutions ou de précipitations sa composition chimique. Celles-ci se réalisent dans le but de rétablir un équilibre chimique entre les phases solides de la pâte cimentaire et la solution interstitielle (Guillon, 2004).

L'autre intérêt du mortier est de travailler sur des échantillons de laboratoire (40 mm × 40 mm × 160 mm ou Ø110 mm × H50 mm) pour la compréhension des transformations chimiques ayant lieu au sein de la pâte cimentaire. Le suivi de l'évolution de la microstructure et de la composition de la matrice peut ainsi être facilement réalisé par différents essais en laboratoire.

Pour des études à plus grande échelle, le béton est le matériau cimentaire le plus intéressant à utiliser. Le béton est formé à partir d'un mélange de granulats (fin : sable et grossier : gravier) liés

entre eux par une pâte cimentaire (ciment, eau et adjuvants). Le squelette granulaire va influencer sur la microstructure de la matrice cimentaire selon les caractéristiques des granulats (absorption d'eau, porosité, liaison avec la pâte de ciment). Ainsi, ceux-ci peuvent modifier les propriétés du béton (résistance à la compression, porosité etc.).

Il existe plusieurs types de bétons comme le béton ordinaire, autoplaçant ou poreux. Dans cette thèse, le béton ordinaire a été utilisé (voir Chapitre 2 et 5). Les bétons se différencient en fonction de leur composition, leur application et leur classe d'exposition. En effet, le béton possède des propriétés spécifiques lui permettant de garder une résistance et une durabilité contre les agents agressifs notamment de l'eau de mer. La norme NF EN 206-1 donne des spécifications générales sur les paramètres de formulation des bétons (constituants et dosages) en fonction des principaux risques de dégradations. Dans le milieu marin, le risque de corrosion induite par des ions Cl⁻ présents dans l'eau de mer est pris en compte grâce à la définition des classes d'exposition XS.

Le béton est très répandu lors de l'élaboration d'infrastructures maritimes (Pioch et al., 2018). Sur les côtes et en mer, il existe plusieurs types ouvrages maritimes fabriqués en béton ayant des fonctionnalités différentes en fonction de leur usage (aménagement portuaires, défenses côtières...) (Hayek et al., 2020). Le Tableau 1 présente ainsi les principaux types d'ouvrages maritimes et côtiers.

Tableau 1. Types et usages des ouvrages maritimes les plus répandus

Types d'ouvrages	Usage	Matériau	Durée de vie (estimation)
<i>Ouvrages portuaires</i>			
Appontement, quais	Structure servant d'accostage et d'amarrage pour les navires (chargements, déchargements)	Béton armé	Plus de 50 ans
Ponton flottant	Amarrage et accostage des bateaux	Béton	
<i>Ouvrages de défenses côtières</i>			
Brise-lames	Structure de défense côtière (action des vagues, limiter les inondations et recul du trait de côte)	Bois, enrochement, Blocs en béton	Plus de 100 ans
Epis			
Digues, jetée			
<i>Ouvrages totalement immergés</i>			
Récifs artificiels	Amélioration de la biodiversité marine (faunistique et floristique)	Béton armé, autres matériaux	Plus de 50 ans
Mouillages (corps morts)	Ancrage des bateaux	Bloc de béton (pouvant être armé)	

Ces différentes structures artificielles peuvent servir à des fins d'amélioration de la biodiversité marine. En effet, elle va dépendre de la composition des ouvrages maritimes et des agressions qu'ils vont subir au cours du temps.

II. Effet de l'immersion en milieu marin sur les propriétés d'un matériau cimentaire

En milieu marin, le matériau est soumis à plusieurs types d'agressions (chimiques, physiques et biologiques) (Figure 1) qui peuvent avoir des conséquences sur son intégrité (Qu et al., 2021). Suivant la composition du matériau, le milieu et la durée d'immersion, ces agressions vont avoir différents effets.

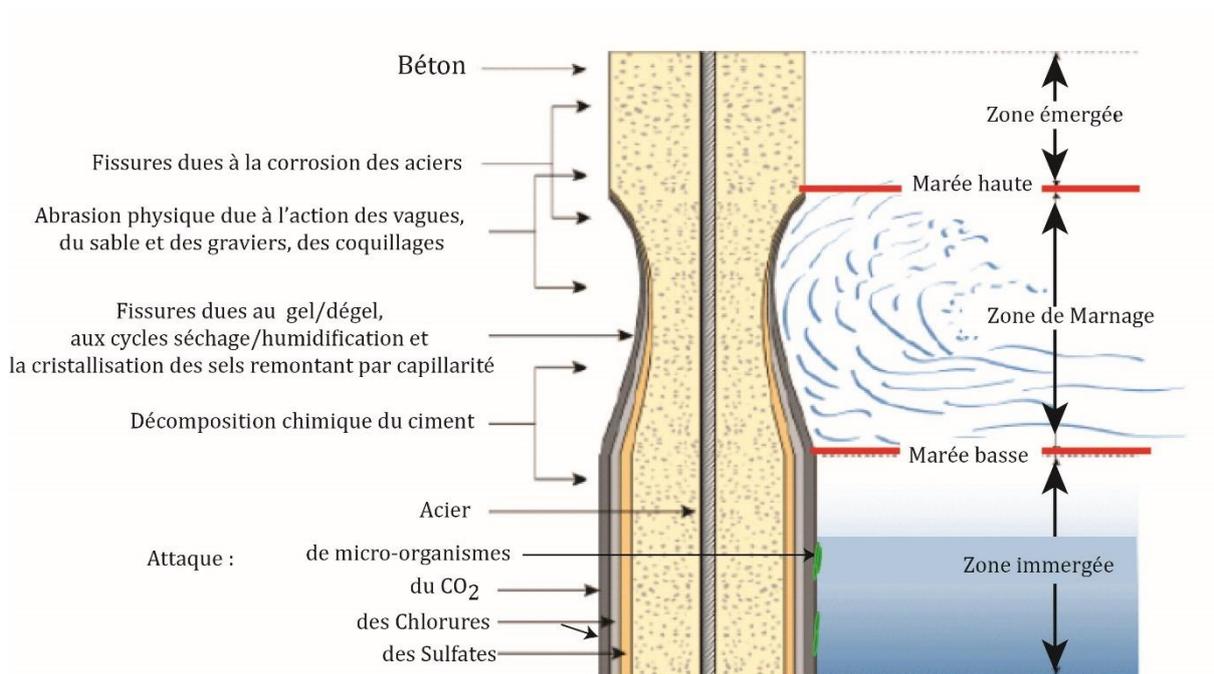


Figure 1. Schéma représentant les différents types d'agressions (modifié d'après Mehta, 1991)

1. Attaques chimiques de l'eau de mer

L'eau de mer est considérée comme agressive pour un matériau cimentaire. En effet, des échanges ioniques peuvent ainsi avoir lieu lors de leur contact.

Les sels dissous qui composent l'eau de mer sont généralement :

- le chlorure de sodium (NaCl),
- le chlorure de magnésium (MgCl₂),
- le sulfate de magnésium (MgSO₄),
- le sulfate de calcium (CaSO₄),

- le chlorure de calcium (CaCl_2),
- le carbonate de potassium (KHCO_3).

La concentration totale des espèces présentes dans l'eau de mer conduit à un pH qui varie entre 7,5 et 8,4 (Mehta, 1991). La concentration de ces sels dissous varie d'un océan à un autre mais la proportion des sels reste constante (loi de Dittmar) (Tableau 1).

Tableau 2. Pourcentage des principaux sels dissous pour une eau de mer de salinité 35 g.L^{-1}

Ions	Cl^-	Na^+	SO_4^{2-}	Mg^{2+}	Ca^{2+}	K^+	CO_3^{2-}
%	55,2	30,7	7,7	3,7	1,2	1,1	0,4

La pénétration d'ions agressifs (ions chlorure, magnésium et sulfate) peut affecter l'équilibre entre les hydrates du matériau cimentaire et la solution interstitielle. La pénétration de ces ions varie en fonction de leurs actions avec les constituants de la matrice cimentaire. Les ions magnésium ne pénètrent que la surface du béton (généralement moins de 1 mm), tandis que les ions sulfate peuvent traverser jusqu'à quelques millimètres la couche externe du béton. Et enfin, les ions chlorure sont ceux qui diffusent dans la couche interne du béton (Figure 2) (De Weerd et al., 2019; Jakobsen et al., 2016; Yi et al., 2020). Ces différents ions peuvent entraîner la dissolution ou la formation de différentes phases modifiant la microstructure et la composition du matériau cimentaire (Figure 2). Ces changements de phases peuvent impacter le matériau en le fragilisant.

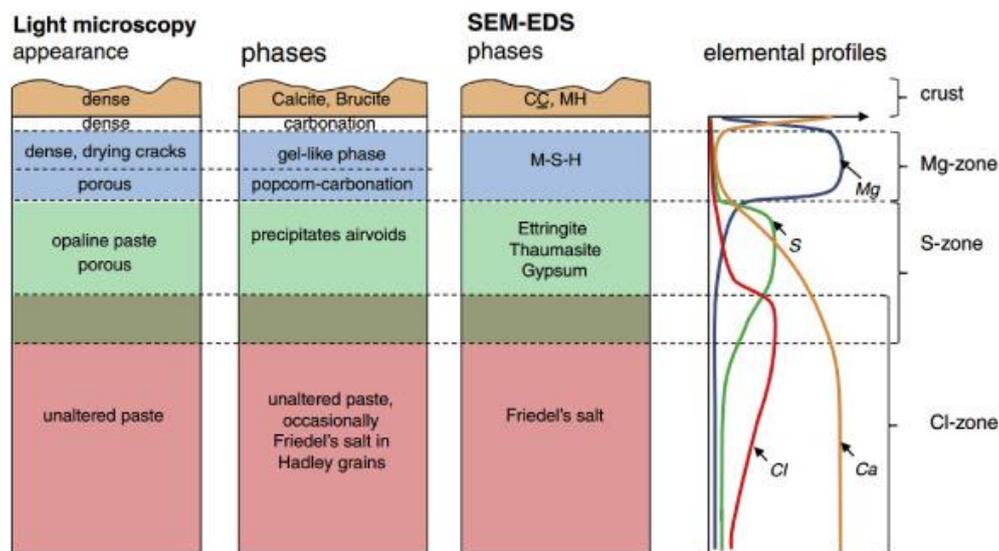


Figure 2. Changements de phases induits par l'attaque de l'eau de mer (Jakobsen et al., 2016)

1.1. Les ions chlorure

Les ions chlorure peuvent être présents dans le béton de deux façons. Ils peuvent être introduits dans la matrice cimentaire dès le départ étant présents dans certaines matières premières. Par

ailleurs, les ions chlorure peuvent provenir de l'extérieur (milieu environnant) impactant la matrice par diffusion. En effet, le béton est un matériau poreux, la pénétration des ions chlorure se fait en présence d'eau.

Les ions chlorure peuvent exister sous différents états dans la structure interne du matériau cimentaire (Figure 3). Ils peuvent être soit :

- libres (sous forme ionique et n'ayant pas réagi avec la matrice cimentaire) dans la solution interstitielle des pores,
- liés chimiquement aux produits d'hydratation du matériau et physiquement par adsorption sur les C-S-H (Figure 3) par exemple.

La quantité totale de chlorures (appelée chlorures totaux) correspond à l'ensemble des ions chlorure liés aux phases du ciment et des ions libres dans la solution interstitielle.

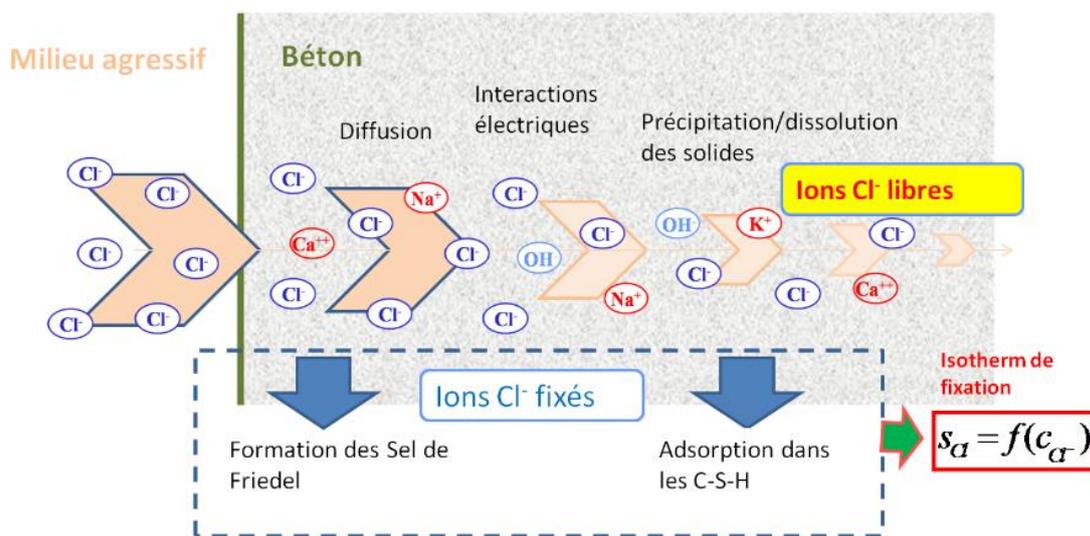


Figure 3. Schéma de la pénétration des ions chlorure dans le béton (Wang, 2012)

Les ions chlorure libres dans la solution interstitielle peuvent pénétrer jusqu'au niveau des armatures du béton qui peuvent subir un phénomène de corrosion (Figure 4). La capacité d'une structure en béton à résister à l'attaque des chlorures dépend entre autres de sa capacité à fixer les ions chlorure (Neville, 1995; Yuan et al., 2009). En effet, elle va influencer le transport de ces ions. L'isotherme de fixation des ions chlorure (Figure 3) peut être estimée de plusieurs façons. Ainsi, les réactions physicochimiques entre les ions chlorure et les phases cimentaires vont permettre de réduire la diffusion des ions chlorure. Par conséquent, ces réactions peuvent avoir un effet bénéfique pour le matériau puisqu'elles peuvent réduire la progression des ions Cl⁻ libres jusqu'aux armatures. La capacité de fixation des ions chlorure peut dépendre de plusieurs facteurs comme le milieu environnant, la température, la carbonatation et le type de ciment utilisé (Yuan et al., 2009).

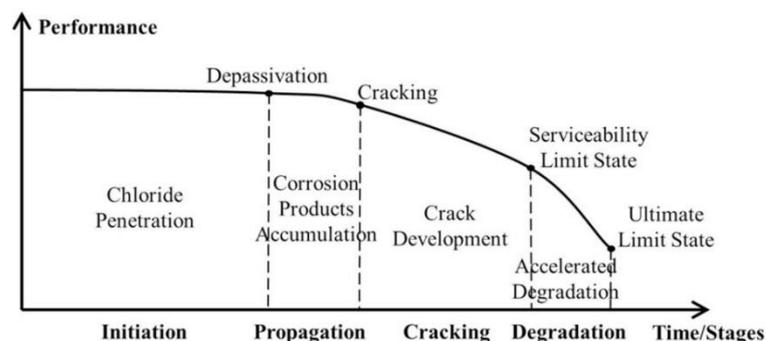
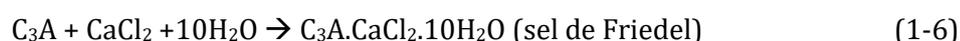


Figure 4. Processus de corrosion induit par les ions chlorure des structures en béton (Wang et al., 2018)

La diffusion des ions chlorure dans le béton exposé à l'eau de mer peut être influencée à la fois par les performances intrinsèques du béton (composition et conditions de cure) et par les conditions d'expositions de celui-ci (Yi et al., 2020).

Les ions chlorure pénètrent par diffusion dans le béton sous l'effet d'un gradient de concentration lorsque le matériau est saturé (immergé complètement) (Figure 3) ou par absorption (Neville, 1995) lorsque le matériau est en zone de marnage. Suivant la position du matériau vis-à-vis de la marée et des phénomènes de cycles de séchage et de mouillage, la pénétration des ions chlorure peut s'accroître en fonction de la durée d'immersion. Dans cette thèse, nous nous sommes principalement intéressés à l'étude de la diffusion naturelle de ces ions dans le matériau cimentaire en établissant des profils d'ions chlorure en fonction de la profondeur. Il est également possible de suivre la pénétration des ions chlorure par migration sous champ électrique.

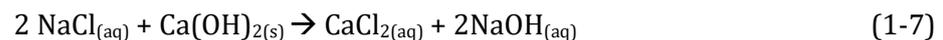
Les ions chlorure peuvent favoriser la dissolution, des changements de structure de phase au sein de la matrice cimentaire et la formation de précipités. La formation de nouveaux composés à base de chlorure dépend de la solubilité des phases hydratées du matériau cimentaire. Les ions chlorure liés à la matrice cimentaire vont réagir avec les anhydres et les hydrates qui n'ont pas eu de réaction lors de la cure. Par exemple, la diffusion des sels de calcium CaCl_2 peut former le sel de Friedel ($\text{C}_3\text{A} \cdot \text{CaCl}_2 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) (Birnin-Yauri and Glasser, 1998) (Figure 3), autrement appelé chloroaluminate de calcium hydraté, par la réaction des chlorures avec l'aluminate tricalcique C_3A (équation 1-6) (Glasser et al., 1999; Matschei et al., 2007).



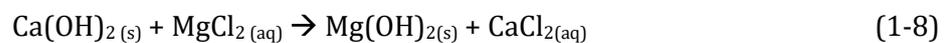
Cette réaction réduit le taux d'ions Cl^- libres dans la solution interstitielle, réduisant la pénétration de ces ions jusqu'aux armatures. Mais cette protection peut être déstabilisée par l'action des sulfates qui peuvent réagir avec le monochloroaluminate de calcium, et former de l'ettringite expansive.

La présence d'autres ions dans l'eau de mer, par exemple Mg^{2+} et SO_4^{2-} , peut empêcher la formation du sel de Friedel (De Weerd et al., 2014, 2019). Ainsi le chloroaluminate de calcium hydraté a tendance à se former dans la couche intérieure du béton (au-delà de la profondeur de pénétration externe du Mg^{2+} et du SO_4^{2-} , mais disponible pour les ions Cl^-) plutôt que dans la couche de surface (Figure 2). Une fois que les C_3A sont épuisés, les ions chlorure commencent à s'attacher chimiquement aux feuilletts C-S-H en libérant des ions OH^- provoquant ainsi sa décalcification. De même, ces réactions chimiques peuvent entraîner la formation d'ettringite.

Le pH de l'eau de mer peut provoquer des déséquilibres chimiques entre la solution interstitielle et la phase solide. Ainsi, la concentration en ions OH^- et Ca^{2+} diminue entraînant la lixiviation des produits d'hydratation de la pâte de ciment pour rééquilibrer la solution interstitielle des pores. Le NaCl a une double action sur les hydrates (portlandite et C-S-H) de la pâte cimentaire. En effet, la portlandite va réagir avec le chlorure de sodium (NaCl) selon l'équation 1-7. Le NaCl peut également impacter les C-S-H par consommation des ions calcium par formation de chlorure de calcium soluble. La matrice cimentaire va alors peu à peu être fragilisée.



L'exposition du matériau à des ions $MgCl_2$ va provoquer la précipitation de brucite ($Mg(OH)_2$) (1-8) suite à la dissolution de la portlandite :



La formation de brucite va diminuer l'alcalinité de la solution interstitielle du béton et va provoquer la déstabilisation du C-S-H. Il peut également y avoir la formation de monochloroaluminate de calcium après action des ions chlorure de sodium ou des chlorure de magnésium avec les aluminates.

Les ions Mg^{2+} du $MgCl_2$ peuvent favoriser la décalcification du C-S-H pour former le Silicate de Magnésium Hydraté (M-S-H, Magnésium Silicate hydrate) (équation 1-9) par substitution ionique du Calcium par le Magnésium (Ragab et al., 2016; Bernard et al., 2017).



Une des solutions pour augmenter la durabilité du béton immergé en milieu marin en augmentant sa compacité, est d'avoir une teneur limitée en C_3A (ciments pour les travaux mer) et d'ajouter des additions minérales réduisant la teneur en Portlandite.

En milieu marin, la lixiviation des éléments provenant du matériau va favoriser la fixation d'organismes marins suite à la diminution du pH qui va entraîner la formation d'un biofilm.

1.2. Les ions sulfates

Les sulfates sont également naturellement présents dans l'eau de mer comme les sulfates de magnésium MgSO_4 et les sulfates de calcium CaSO_4 . Ces derniers sont agressifs vis-à-vis du béton (Jakobsen et al., 2016).

Les sulfates de magnésium MgSO_4 réagissent avec la portlandite Ca(OH)_2 et provoquent sa dissolution. Ces réactions conduisent à la précipitation de brucite Mg(OH)_2 et la formation de gypse ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (équation 1-10) (Ghafoori et al., 2008).

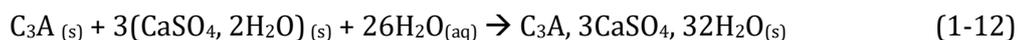


Ces ions peuvent aussi entraîner la transformation progressive des C-S-H en silicates de magnésium hydratés (M-S-H) (Figure 2).

Les sulfates de sodium NaSO_4 peuvent aussi réagir avec la portlandite Ca(OH)_2 entraînant aussi la formation de gypse (réaction 1-11) (De Weerd et al., 2019). L'attaque des ions sulfates sont les premiers à l'origine de la formation de gypse (Stroh et al., 2016). L'ion sulfate peut réduire la teneur en sel de Friedel et en portlandite (Cheng et al., 2020).



Les sulfates de calcium CaSO_4 réagissent quant à eux avec l'aluminate tricalcique C_3A et conduisent à la croissance d'aiguilles d'ettringites ($\text{C}_3\text{A}, 3\text{CaSO}_4, 32\text{H}_2\text{O}$) (Ghafoori et al., 2008) appelé aussi trisulfate aluminate tricalcique hydraté (équation 1-12).



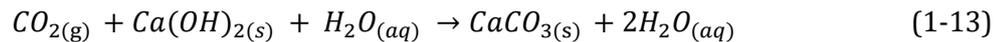
La capacité de liaison des ions chlorure peut-être réduite dans les phases AF_m à cause des ions sulfate entraînant la formation d'ettringite. Cette réaction conduit à l'augmentation de la pénétration des ions chlorure dans le matériau (De Weerd et al., 2014; Maes and De Belie, 2014).

Les ions magnésium et sulfate peuvent également réduire la quantité de portlandite et provoquer la décalcification des C-S-H. La lixiviation des ions calcium de la portlandite et des C-S-H accroît la porosité et le volume des pores accélérant le transfert des ions agressifs au sein du matériau (Cheng et al., 2020).

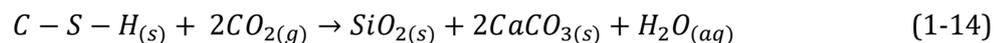
Lorsque dans le milieu marin la concentration en sulfates SO_4^{2-} et la concentration en chlorures Cl^- sont élevées il peut y avoir un phénomène d'inhibition des sulfates car la vitesse de diffusion des ions chlorure est plus rapide que pour les ions sulfates dans le béton. Les hydrates d'aluminium sont ainsi d'abord attaqués par les ions chlorure (Stroh et al., 2016).

1.3. La carbonatation

Immergé dans l'eau de mer, le béton peut subir un phénomène de carbonatation. En effet, le dioxyde de carbone atmosphérique ($CO_{2(g)}$) se dissout dans l'eau pour former du H_2CO_2 qui est instable et va se dissocier en ions bicarbonates (HCO_3^-) et par la suite en ions carbonates CO_3^{2-} (Figure 5). Ces derniers peuvent pénétrer dans la solution interstitielle des pores et ainsi réagir avec les ions Ca^{2+} dissous suite à la lixiviation de la portlandite conduisant à la précipitation des carbonates de calcium ($CaCO_3$) à la surface du matériau (équation 1-13).



La Portlandite est l'hydrate qui se carbonate le plus rapidement. Cependant, d'autres produits d'hydratation réagissent aussi en présence de CO_2 dissous comme les C-S-H pour former des carbonates de calcium (équation 1-14) (Figure 5). La décalcification des C-S-H peut également conduire à la formation de silice amorphe (équation 1-13) (Sadati et al., 2016).



La décalcification de phases hydratées entraîne une diminution du pH de la solution interstitielle. Cette réduction du pH dans la solution de pores augmente la solubilité du sel de Friedel (Saillio et al., 2014; Ting et al., 2021). Suivant le type de béton, celui-ci peut être plus ou moins affecté par la carbonatation. En effet, la carbonatation réduit la capacité de liaison des chlorures du béton qui libèrent les chlorures liés chimiquement et se retrouvent sous forme de chlorures libres dans la solution interstitielle. Le chlorure lié, qui existait sous forme de sel de Friedel dans le béton, est décomposé pendant la carbonatation et ne peut pas se reformer (Chang, 2017). Tous ces phénomènes entraînent une accélération de la pénétration des ions chlorure (Qu et al., 2021; Sadati et al., 2016; Suryavanshi and Narayan Swamy, 1996). Dans les matériaux carbonatés, les C-S-H perdent leur capacité de fixation du chlorure (Saillio et al., 2014). La carbonatation et le processus de transport des ions chlorure jouent un rôle majeur dans la corrosion des armatures et la dégradation des bétons. La carbonatation entraîne des modifications importantes de la microstructure de la matrice cimentaire. En effet, la précipitation de la calcite va notamment entraîner une diminution de la porosité totale. Cette diminution peut avoir un impact positif sur le béton puisqu'elle implique une augmentation de la résistance mécanique et une protection contre la pénétration d'ions agressifs. De plus, la réduction du pH va permettre le développement d'organismes marins à sa surface.

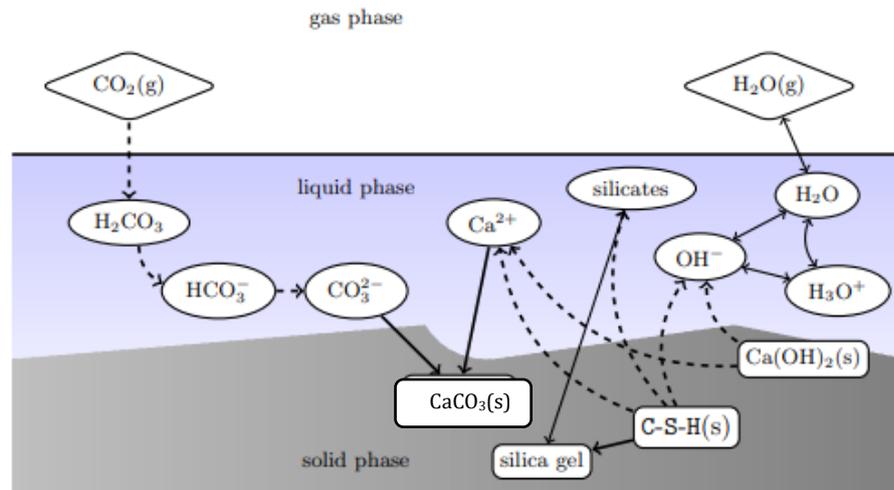


Figure 5. Principales phases impliquées dans le phénomène de carbonatation (Morandea, 2013)

2. Effet de la zone d'immersion

Suivant la position des infrastructures maritimes construites dans le milieu marin, les agressions physiques et mécaniques sur le béton peuvent être contrôlées par plusieurs phénomènes (Figure 1) (Mehta, 1991 ; Ting et al., 2021).

- En zone immergée, l'action des courants et de la houle peuvent dégrader la surface du béton tout comme le sable en suspension pouvant éroder la surface du béton,
- En zone de marnage, le béton est le plus vulnérable car il subit le cycle des marées et le vent (cycles d'humidification-séchage). Ces derniers favorisent la diffusion des ions chlorure (Safehian and Ramezani pour, 2013). Tout comme en zone immergée, le béton peut être soumis à l'action de la houle et des courants. De plus, les ouvrages situés sur des sites maritimes sont sujets aux chocs et frottements des navires.
- En zone totalement émergée, le béton est moins exposé à des dégradations physiques. Il peut recevoir quelques éclaboussures pouvant à long terme, engendrer une dégradation du matériau. Dans certaines régions, cette zone peut également subir des cycles de gel-dégel.

3. Effet de la bio-colonisation

Un matériau immergé dans le milieu marin est tout d'abord recouvert après quelques semaines d'un biofilm constitué de micro-organismes.

3.1. Le biofilm, premier colonisateur

Un biofilm est constitué d'une grande diversité de micro-organismes, fixés à une surface et enveloppé dans une matrice d'EPS (Extracellular Polymeric Substance) (Costerton et al., 1994,

1995; Hall-Stoodley et al., 2004). Ces micro-organismes varient en fonction des molécules chimiques présentes initialement à la surface, de la composition du substrat et aux conditions environnementales du milieu (oxygène, température, pH ; lumière etc...).

Dans le milieu marin, les micro-organismes du biofilm sont composés de bactéries, d'archées et d'eucaryotes unicellulaires tels que des micro-algues comme les diatomées, des champignons microscopiques, des flagellés hétérotrophes et des ciliés sessiles. Ils sécrètent et synthétisent des EPS qui sont principalement responsables de l'intégrité structurelle et fonctionnelle des biofilms. Les EPS sont considérées comme les composants clés qui déterminent les propriétés physicochimiques et biologiques des biofilms (Wingender et al., 1999). Ces EPS sont des polymères à haut poids moléculaire principalement composé de polysaccharides (exopolysaccharides) et de protéines, mais comprennent d'autres macromolécules telles que des acides nucléiques, des lipides et d'autres composés polymériques (Sheng et al., 2010). Selon quelques études (Costerton et al., 1995; Leriche et al., 2000; Staats et al., 2000), la production d'EPS dépend des espèces mais aussi de l'état physiologique du biofilm (stress nutritifs, âge du biofilm). Les EPS peuvent avoir un rôle protecteur sur la structure qu'elles colonisent (Decho, 2000).

3.2. Les micro-organismes photosynthétiques constituant le biofilm

Les communautés périphytiques (Johnson et al., 2013) (principalement les diatomées benthiques et les cyanobactéries) sont des constituants majeurs des biofilms marins qui constituent un composant fonctionnel important des écosystèmes benthiques marins (Thompson et al., 2004).

3.2.1. Les diatomées

Les diatomées sont des micro-organismes phototrophes unicellulaires qui peuvent vivre soit en suspension (diatomées pélagiques) ou soit sur le fond ou fixé sur un substrat (diatomées benthiques ; (MacIntyre et al., 1996)). Les formes pélagiques appartiennent aux phytoplanctons, les formes benthiques appartiennent au microphytobenthos. Les diatomées ou aussi appelé Bacillariophycées ont une taille qui varie de quelques micromètres à plus de 0,5 mm. Elles dominent les océans dans le monde. En effet, il existe entre 10 000 et 12 000 espèces de diatomées unicellulaires constituant l'une des lignées les plus diversifiées dans l'ensemble du règne Eucaryote (Alverson et al., 2011). Elles jouent aujourd'hui un rôle écologique primordial notamment au niveau des cycles biogéochimiques dont celui du carbone, de l'azote et du silicium. En effet, ces micro-organismes sont considérés comme des moteurs clés de la pompe à carbone biologique marine (Nelson et al., 1995; Sarthou et al., 2005; Tréguer et al., 2018). En effet, les diatomées en réalisant la photosynthèse (3.2.1.4, b) transforment le CO₂ et produisent de l'O₂. La production de Matière Organique (MO) suite au carbone fixé par ces organismes va être assimilée par les organismes marins. Les particules (pelotes fécales, cellules mortes...) migrent ensuite vers

le fond et se retrouvent dans les sédiments. Elles se trouvent aussi à la base des chaînes alimentaires marines et représentent 40% de la production primaire marine totale (Nelson et al., 1995).

Les diatomées comme d'autres micro-algues sont capables d'assimiler différentes formes d'azote inorganique (NO_2^- , NO_3^- et NH_4^+) et organique (urée, acide-aminés, ...). L'azote se trouve dans les protéines et les acides-nucléiques. Les diatomées vont réaliser via des voies métaboliques (transporteurs et enzymes) le cycle de l'azote et de l'urée (Armbrust et al., 2004). Ce cycle permet de fixer le carbone inorganique dans des composés azotés sans passer par la photosynthèse.

Les diatomées benthiques ont la capacité d'influencer le peuplement larvaire, elles contribuent ainsi à la croissance et à la structure de communautés macroscopiques d'importance écologique et économique (Sweat and Johnson, 2013).

3.2.1.1. EPS chez les diatomées

Les diatomées sont capables dans des conditions environnementales favorables à leur croissance de former un biofilm à la surface d'un substrat. Elles sécrètent via leur raphé (présent au milieu de la frustule) de grandes quantités d'EPS. Ces EPS permettent l'adhésion au substrat grâce à l'attachement des cellules entre elles. Le microphytobenthos peut également se déplacer sur le substrat (Hoagland et al., 1993).

Par ailleurs, les EPS peuvent être utilisés comme source de nourriture pour de nombreux organismes hétérotrophes et brouteurs (Hill and Hawkins, 1991; Jenkins et al., 2001; Morelle et al., 2018). Elles représentent ainsi un rôle important dans le flux de carbone et donc dans la production primaire.

Il existe plusieurs types d'EPS. Les EPS colloïdaux correspondent à la fraction directement sécrétée dans le milieu. Ils sont le constituant principal du biofilm. Les EPS liées et attachées au frustule des diatomées jouent un rôle dans l'adhésion et la protection des cellules algales. De plus, les EPS sont représentées par une fraction soluble composée principalement de galactose et d'acide glucuronique (Brouwer et al., 2005) et d'une fraction particulaire sous la forme de particules exopolymériques transparentes (TEP) principalement composées de fucose et de rhamose (Fukao et al., 2010).

3.2.1.2. Morphologie des diatomées

Les diatomées diffèrent des autres micro-algues car elles possèdent une paroi cellulaire appelée frustule qui est constituée en deux moitiés de silice polymérisée amorphe (Zurzolo and Bowler, 2001) formée de tétraèdres SiO_4 . Le frustule est essentiellement constitué de silice amorphe hydratée (SiO_2 , H_2O) qu'on appelle silice biogénique (bSi) qui est associée à des composants

organiques (Hildebrand et al., 2018). Le frustule est percé de pores permettant le passage des éléments nutritifs à l'intérieur du protoplasme.

Les frustules de diatomées sont généralement composés d'une grande valve appelée épivalve, d'une plus petite appelée hypovalve et de bandes cingulaires (girdle bands) (Figure 6). Ces dernières sont des anneaux de silice produits pendant la croissance cellulaire (partie 3.2.1.3) et permettent de maintenir les deux valves (Figure 6).

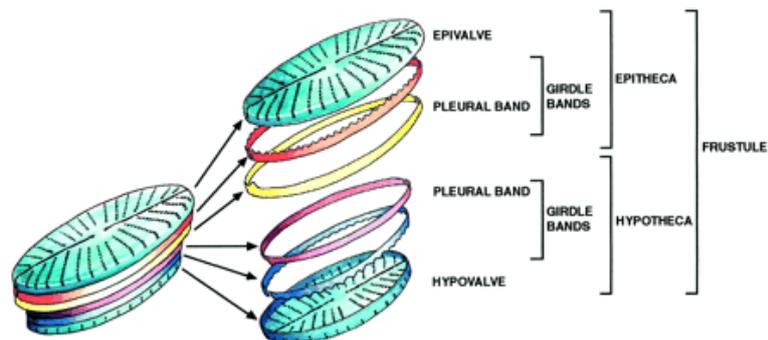


Figure 6. Vue d'ensemble schématique des composants siliceux des parois cellulaires de diatomées (Zurzolo and Bowler, 2001)

Cette paroi cellulaire siliceuse possède différentes fonctions protectrices puisqu'elle joue un rôle dans protection contre les rayons solaires et contre le broutage par certains prédateurs (Hamm et al., 2003). Elle peut également servir de tampon pH favorisant un bon rendement photosynthétique (Milligan and Morel, 2002).

On peut classer les diatomées en deux grands groupes (Battarbee et al., 2001) grâce à la morphologie de leur frustule :

- les pennées avec une symétrie bilatérale possédant ou non un raphé. On y trouve majoritairement le microphytobenthos.
- les centriques avec une symétrie radiale.

3.2.1.3. Formation du frustule

La division cellulaire des diatomées se déroule généralement au travers de divisions mitotiques asexuées (Figure 8). Tous les jours, lorsque les conditions de croissance sont optimales, les cellules vont se multiplier par mitose.

Les diatomées utilisent l'acide orthosilicique ($\text{Si}(\text{OH})_4$) présent dans l'environnement pour biosynthétiser leurs frustules (Compartiment 1, Figure 7). Une fois que la cellule a absorbé du silicium, des protéines transporteuses d'acide orthosilicique ou Silicic acid Transporter proteins (SIT) vont agir sur la membrane pour créer un flux de silicium vers l'intérieur de la cellule. Ces

SITs transportent ensuite le Si(OH)_4 à travers le cytoplasme (Compartment 2, Figure 7) pour atteindre les Vésicules de Dépôt du Silicium ou Silica Deposition Vesicle (SDV) (Compartment 3, Figure 7) (Javaheri et al., 2014). L'absorption et le dépôt de silice sont réalisés à différents moments du cycle cellulaire. L'absorption a lieu avant la mitose et est indispensable pour la synthèse du frustule. Cette étape est réalisée juste avant la division cellulaire. Le dépôt de silice biogénique dans les SDV (lieu de silicification ; Compartment 4 (Figure 7)) permet la division cellulaire et la croissance des diatomées (Ragueneau et al., 2000). Il existe différents types de SDV fonctionnant à différents stades du cycle cellulaire : les SDV à valve et à bandes cingulaires (Figure 8). En effet, les valves de chaque thèque du frustule sont formées durant la division cellulaire tandis que les bandes cingulaires sont formées durant l'interphase du cycle cellulaire (Kröger and Poulsen, 2009). Lorsque la formation des valves et des bandes cingulaires est terminée à l'intérieur de leur SDV, elle est exocytosée à la surface de la cellule et s'incorpore dans la paroi cellulaire (Figure 8) (Heintze et al., 2020).

En phase G1, les cellules initiales synthétisent les bandes cingulaires sur l'hypothèque. Durant la phase S, la réplication de l'ADN et la cytokinésie sont produites, entraînant la présence de deux protoplastes de cellules filles dans la cellule mère. Dans la phase G2+M, de nouvelles valves (hypoalves) sont synthétisées dans le SDV à l'intérieur de la cellule par un phénomène d'expansion (Compartment 4 ; Figure 7 et Figure 8).

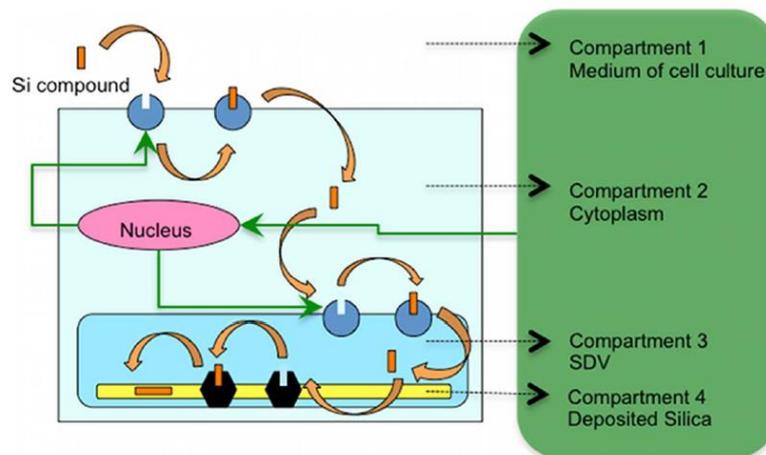


Figure 7. Représentation schématique du transport du silicium au sein d'une diatomée (d'après Javaheri et al., 2014). D'après ces auteurs, le compartiment 1 correspond à l'environnement où la diatomée va absorber l'acide orthosilicique. Les SITs sont situées sur la membrane cellulaire et vont permettre le transport du silicium du cytoplasme vers le SDV (compartiment 3). Dans le SDV, le silicium soluble se dépose entraînant la formation du frustule (compartiment 4). Les flèches vertes correspondent à la régulation cellulaire sur la quantité de SIT. Le noyau de la cellule peut modifier le niveau des SITs en fonction du flux silicium entrant dans la cellule.

L'hypovalve fusionne alors avec la membrane plasmique, donnant naissance à 2 cellules-filles par exocytose (Kale and Karthick, 2015) (Figure 8). Ainsi une des valves de la cellule mère devient l'épithèque d'une cellule-fille, qui synthétise son hypothèque et l'autre valve correspondant à l'hypothèque de la cellule mère devient l'épithèque de la cellule fille qui génère par la suite son hypothèque. Après séparation des cellules, celles-ci se développent avec expansion des bandes cingulaires (phase G1) et le cycle recommence.

En conséquence, l'une des deux diatomées-filles est de taille inférieure à la diatomée initiale, alors que l'autre cellule fille est de même taille que la valve de la cellule mère.

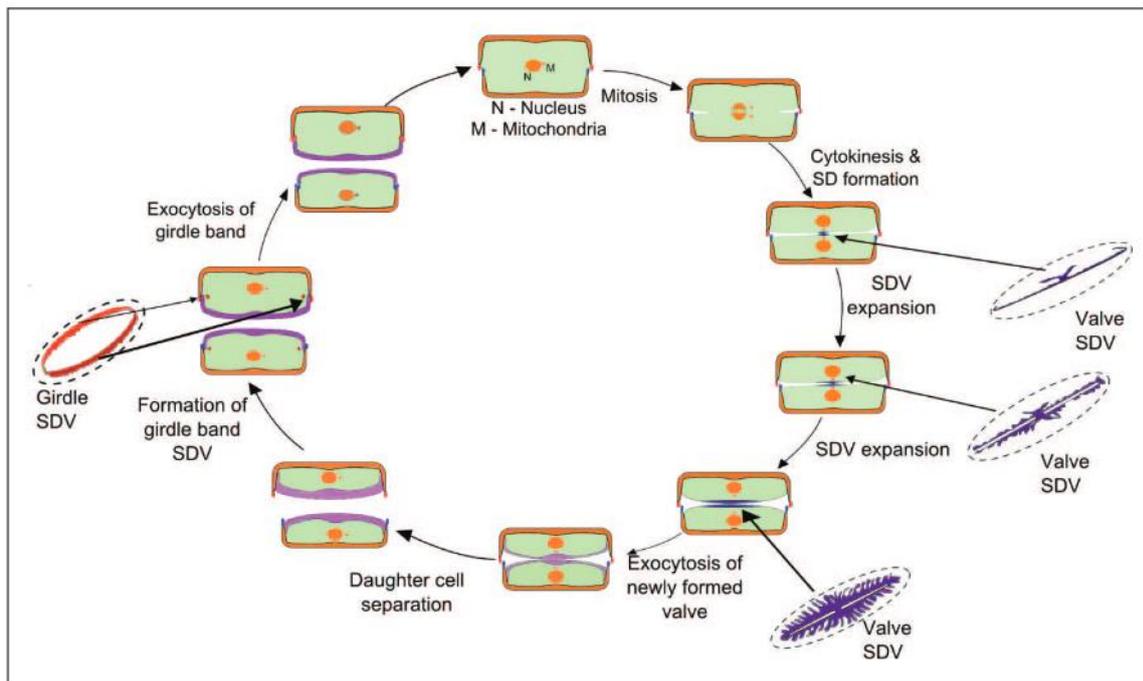


Figure 8. Schématisation de la division cellulaire des diatomées et de la formation des nouvelles valves et bandes cingulaires par les Vésicules de Dépôt de Silicium (SDV) (Redessiné par Kale and Karthick, (2015) à partir de Zurzolo and Bowler, (2001))

En revanche sous certaines conditions, les diatomées peuvent réaliser une reproduction sexuée (Dassow et al., 2006). En effet, au cours de divisions successives, les diatomées de l'une des lignées descendantes vont être de plus en plus petites à chaque génération. Après plusieurs générations, les cellules qui sont plus petites qu'un seuil critique retrouveront leur taille initiale par reproduction sexuelle. En effet, les cellules vont réaliser une méiose et vont produire des gamètes. La paroi de la frustule sera non siliceuse. Le zygote nouvellement formé suite à la fusion des gamètes va grandir jusqu'à sa taille initiale où un nouveau frustule va se former (Langlois, 2006).

3.2.1.4. Les facteurs de contrôle de la croissance des diatomées

Les espèces phytoplanctoniques et microphytobenthos présentent une grande diversité, avec des taux de croissances variables et des réponses rapides aux changements environnementaux. Leurs états physiologiques peuvent être modifiés suite à ces différents facteurs extrinsèques et notamment avoir un impact sur leur capacité de photosynthèse ayant ainsi des conséquences sur leur métabolisme (Winder and Sommer, 2012).

a) Les nutriments, éléments essentiels à leur métabolisme

Les diatomées ont des exigences en éléments nutritifs. Il existe plusieurs sources de nutriments provenant du milieu environnemental et/ou de certains micro-organismes. Les diatomées ont besoin de macro-nutriments (constitués de carbone (C), phosphore (P), azote (N), et silicium (Si)) leur apportant des éléments nutritifs indispensables à leurs fonctions métaboliques puisqu'ils permettent de synthétiser les macromolécules qui les constituent (comme les polysaccharides, les acides nucléiques, les protéines et les lipides) (Geider and Roche, 2002). L'azote et le phosphore sont par exemple des constituants de l'appareil photosynthétique, des enzymes et des protéines. Ils jouent un rôle crucial dans le métabolisme cellulaire (composant des membranes) et dans la transduction de l'énergie (c'est un composant de l'ATP, de l'ADP et du NADP⁺/NADPH) (Dauta, 1982). En plus de ces macronutriments, les diatomées ont besoin d'ions inorganiques (Calcium (Ca), Potassium (K) et Sodium (Na)) (Moore et al., 2013). Les micro-nutriments, comme le fer (Fe), le Zinc (Zn), le cuivre (Cu) ou le manganèse (Mn) considérés comme des éléments traces, jouent le rôle de co-enzymes pour les réactions métaboliques (Morel et al., 2003; Pasqueron De Fommervault, 2016).

Les cellules microphytobenthiques doivent récupérer ces éléments dans le milieu naturel car elles sont incapables de les synthétiser d'elles-mêmes. Des nutriments limitants dans le milieu peuvent entraîner une diminution des réserves cellulaires modifiant la composition chimique de ces dernières comme une réduction de la quantité de chlorophylle.

Il existe différents types de limitations nutritives. La limitation de Blackman (1905) et Liebig (1855) indique que la quantité totale d'un nutriment définit une limite maximum de biomasse produite. Il peut y avoir différentes formes de limitations nutritives. L'une est liée au stress entraînant une réponse physiologique de la cellule algale suite au manque d'un nutriment et l'autre est liée à une limitation nutritive caractérisée par un déséquilibre du rapport stœchiométrique d'un nutriment par rapport à un autre. Dans les conditions optimales, les diatomées absorbent les nutriments dans des rapports stœchiométriques théoriques C:N:P = 106:16:1 (Redfield et al., 1963) et dans les rapports Si:N = 1 et Si:C = 0,09-0,13 pour l'acide orthosilicique (Brzezinski, 1985). La disponibilité de ces éléments est un facteur limitant pour la croissance du microphytobenthos et phytoplanctonique.

Cette thèse va s'intéresser en particulier à un des éléments nutritifs essentiels aux diatomées : le Silicium. La silice dissoute dans l'eau de mer est présente sous différentes formes chimiques (Si(OH)_4 ; Si(OH)_3^-) (Figure 9). Le Si(OH)_4 , présentant une teneur de 97% dans les océans (Amo and Brzezinski, 1999), est la forme la plus utilisée par les diatomées. Comme dit précédemment, ce nutriment est limitant pour la croissance des diatomées puisqu'il joue un rôle essentiel pour la constitution de leur paroi cellulaire (Martin-Jézéquel et al., 2000 ; Martin-Jézéquel and Lopez, 2003) et donc la biosynthèse du frustule. Il représente donc un facteur déterminant de la productivité primaire. Lewin, (1955) a été le premier à démontrer que les diatomées étaient capables de récupérer le silicium.

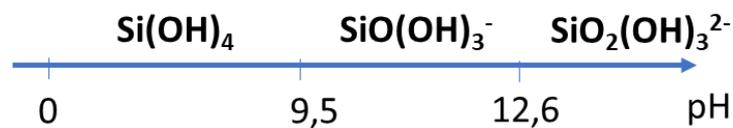


Figure 9. Différentes formes de Silicium dissous en fonction du pH de la solution

Les concentrations en DSi varient considérablement dans l'eau de mer naturelle, allant de 10 à 40 μM dans l'Atlantique Nord (Tréguer et al., 1995) et peuvent également être limitantes pour la croissance des diatomées dans l'écosystème côtier avant les autres nutriments (Del Amo et al., 1997). En effet, selon Dugdale et al., (1995), le Si(OH)_4 est rapidement incorporé dans les diatomées. Il est exporté vers les eaux profondes sous forme de bSi ou via les excréments fécales (Staresinic et al., 1983). La disponibilité de la silice dans le milieu sera à l'origine de la répartition des communautés phytoplanctoniques et microphytobenthiques (Howarth et al., 2011).

L'évaluation du statut nutritionnel chez les communautés phytoplanctoniques et microphytobenthiques est utilisée pour comparer les concentrations ambiantes et les valeurs des concentrations de demi-saturation de l'absorption (K_s) pour les différents sels nutritifs. Lorsque la concentration ambiante en un sel nutritif est inférieure à la valeur du K_s , on dit que la croissance est sub-optimale ($< V_{max}/2$). La disponibilité de l'élément nutritif est ainsi limitante.

La vitesse d'absorption (V) du silicium suit la cinétique de type Michaelis-Menten (1913) (Johnson and Goody, 2011; Paasche, 1980) et le taux de croissance des diatomées suit la cinétique de Monod (1942) où le taux d'absorption (V) et le taux de croissance (μ) sont en fonction de la concentration en Si(OH)_4 (équation 1-15 et 1-16).

$$V = \frac{V_{max} \times [\text{Si(OH)}_4]}{K_s + [\text{Si(OH)}_4]} \quad (1-15)$$

$$\mu = \frac{\mu_{max} \times [\text{Si(OH)}_4]}{K_\mu + [\text{Si(OH)}_4]} \quad (1-16)$$

Où V_{\max} et μ_{\max} représentent les taux d'absorption et de croissance potentiels maximums aux concentrations infinies et K_S et K_μ sont les constantes de demi-saturation, c'est-à-dire les valeurs de concentrations de $\text{Si}(\text{OH})_4$ qui limitent les V_{\max} et les μ_{\max} à la moitié de leur valeur (Figure 7). Les constantes de demi-saturation des taux de division (K_μ) sont inférieures à celles du taux d'absorption du silicium (K_S).

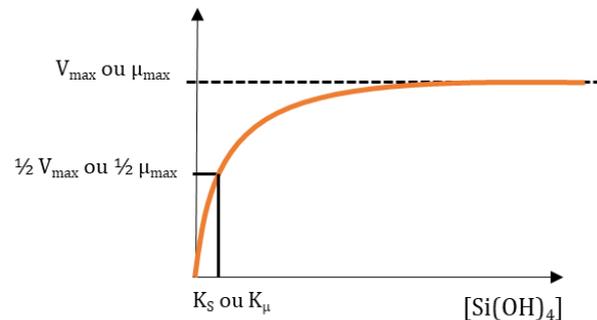


Figure 10. Représentation graphique de la détermination du K_S ou du K_μ en fonction du V_{\max} et μ_{\max} .

Les carences en Silicium peuvent perturber le cycle cellulaire qui se traduit par une diminution du taux de croissance. En effet, d'après Brzezinski et al., (1990), celles-ci peuvent conduire à un arrêt de la croissance en phases G1/S et G2/M du cycle cellulaire.

b) La lumière : Production primaire de ces organismes photosynthétiques

Les diatomées dominent le compartiment du microphytobenthos qui peut dépasser 50% de la production totale de biomasse. La productivité du microphytobenthos, comme pour tout organisme photoautotrophe, repose sur un pigment photosynthétique que l'on appelle la Chlorophylle *a* (Chl*a*) exprimé en $\text{mg Chl}a \cdot \text{m}^{-2}$. Par conséquent, la concentration de Chl*a* a toujours été parmi les variables choisies pour décrire les assemblages de micro-algues benthiques et est fréquemment utilisée comme indicateur de la biomasse. Cet indicateur est un paramètre clé pour étudier le fonctionnement des écosystèmes (Kazemipour et al., 2012). Outre la chlorophylle, les micro-algues ont également des pigments de type caroténoïdes.

Les diatomées sont ainsi capables de synthétiser des molécules complexes à partir de l'énergie lumineuse. La production primaire représente la quantité de carbone organique produit par unité de temps et de surface, suite à la fixation du carbone inorganique (dioxyde de carbone, CO_2) via la photosynthèse (Falkowski and Raven, 2007).

La photosynthèse est réalisée dans la membrane des thylakoïdes séparant le stroma et le lumen localisés au sein des chloroplastes (Behrenfeld et al., 2016) (Figure 11). L'énergie lumineuse est captée par les pigments photosynthétiques constituant les antennes collectrices de lumière (LHC pour Light Harvesting Complex). Ces antennes pigmentaires vont transférer l'énergie lumineuse

sous forme d'électrons excités vers le Centre Réactionnel du photosystème II (CR_{II}). Le Photosystème II (PS_{II}) est constitué de chlorophylle *a* (appelée alors P₆₈₀ car elle capte les photons d'une longueur d'onde de l'ordre de 680 nm).

Ainsi l'énergie récupérée au niveau des CR_{II} va être envoyée au complexe P₆₈₀. Ce complexe est alors excité P₆₈₀₊, il transmet un électron à un premier accepteur, la quinone A (Q_A). Lorsque le pool de Q_A est réduit, le centre réactionnel est alors dit fermé (Q_A⁻). Si le CR_{II} reçoit des photons alors qu'il est fermé, une partie de l'énergie est réémise sous forme de fluorescence, on observe ainsi une augmentation de la fluorescence de la chlorophylle *a* du CR_{II} (Kolber and Falkowski, 1993). Cette variation de fluorescence va pouvoir être utilisée pour déterminer l'activité photosynthétique au niveau du PSII, c'est-à-dire la production d'électrons (Falkowski and Raven, 2007). Les électrons produits au niveau du PSII sont ensuite transmis au second accepteur, une quinone B (Q_B). Le complexe b6-f reçoit les électrons de la plastoquinone et les transmet à la plastocyanine (PC). La PC transfère ensuite les électrons vers le centre réactionnel du PS_I (CR_I) constitué de chlorophylle *a* (P₇₀₀). Ce transfert d'électrons des PS_{II} aux PS_I est couplé à un pompage de protons (H⁺) au niveau du cytochrome b6-f. Un gradient de protons est ainsi créé permettant de synthétiser l'ATP à partir de l'ADP et du Pi. L'ATP et le NADPH produits au cours des réactions claires vont permettre la fixation du carbone par le cycle de Calvin. Cette fixation du CO₂ se produit dans le stroma des chloroplastes pendant la phase sombre.

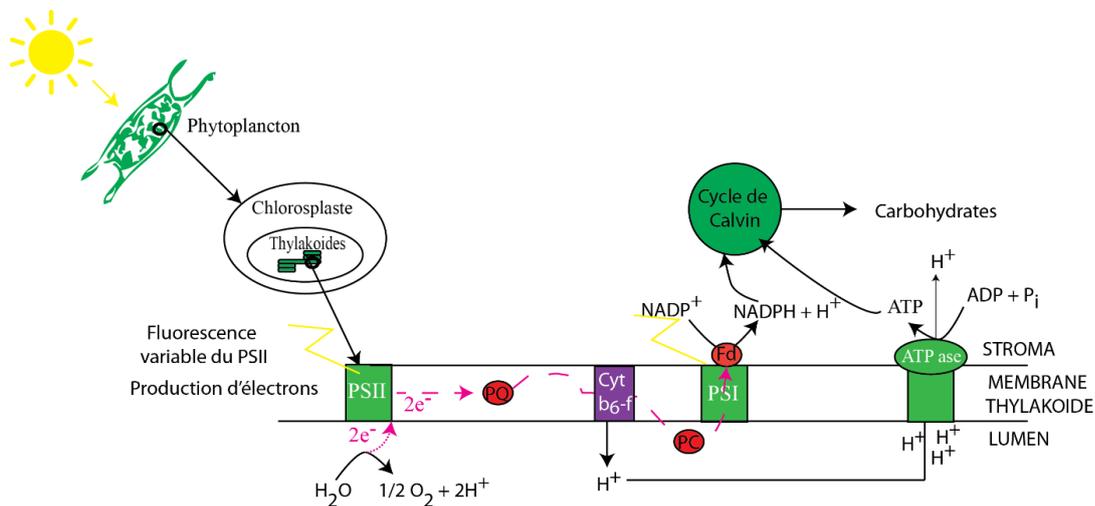


Figure 11. Schéma simplifié du système de transport des électrons lors de la photosynthèse : PSII : photosystème II, PSI : photosystème I, PQ : plastoquinone, Cyt b6-f : Cytochrome b6-f, Fd : ferrédoxine, PC : plastocyanine, NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate, éclair jaune : excitation par un photon. Les photosystèmes des thylakoïdes absorbent l'énergie pour produire ATP et NADPH. Les électrons perdus par les photosystèmes sont remplacés par oxydation d'H₂O. L'ATP et le NADPH par une suite d'évènement en cascade servent à la fixation du carbone par le cycle de Calvin (modifié d'après Behrenfeld et al., 2016)

Le principe de la photosynthèse que l'on dit oxygénique peut ainsi être exprimé par l'équation 1-17 suivante :



Toutes les réactions du métabolisme des cellules photosynthétiques nécessitent l'absorption de nutriments par ces dernières. Il apparaît alors évident qu'outre des besoins en énergie lumineuse, la présence de nutriments est indispensable à la réalisation de la photosynthèse. Ces nutriments se trouvent dans le milieu environnant des cellules photosynthétiques.

c) La température

La variation de la température peut influencer le taux de croissance des espèces algales mais aussi les paramètres photosynthétiques (Claquin et al., 2008; Edwards et al., 2016; Staehr and Sand-Jensen, 2006). Bien que plusieurs études montrent que les taux de photosynthèse, de respiration et de croissance augmentent avec la température, les cellules sont capables de s'acclimater aux variations de la température de l'eau. Des changements significatifs sur la photosynthèse et la respiration peuvent avoir lieu après seulement quelques générations (Coles and Jones, 2000; Vona et al., 2004). La variation de température est principalement liée à la dynamique saisonnière.

3.3. Espèce de diatomée étudiée : *Cylindrotheca closterium*

L'espèce *C. closterium* (Ehrenberg) Reimann & J.C. Lewin 1964 a été étudiée pour cette thèse (Figure 12). C'est une espèce cosmopolite écologiquement importante (très répandue dans les eaux marines côtières notamment dans la Manche, espèce locale). De plus, *C. closterium* est facilement cultivable en laboratoire et est capable de recouvrir rapidement des surfaces.

La taille de *C. closterium* varie entre 25 et 400 µm (Cupp, 1943; Kraberg et al., 2010). *C. closterium* est une diatomée avec une morphologie de type pennale (Figure 12). Cette diatomée est une espèce benthique marine. C'est une espèce motile possédant un raphé, dotée d'un noyau au centre et de 2 chloroplastes où s'effectuent les réactions de photosynthèse (Cupp, 1943).



Figure 12. Observation microscopique de l'espèce *C. closterium* (Ehrenberg) Reimann & J.C. Lewin 1964

Le développement de cette espèce algale est favorisé par une combinaison de paramètres extrinsèques. Cette espèce est considérée comme eutrophique. Les conditions optimales de culture de la diatomée *C. closterium*, (Affan et al., 2009) sont :

- une température comprise entre 10 et 25 °C
- un pH entre 7,3 et 9,0 ;
- une lumière fluorescente de $180 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ avec un cycle Jour/Nuit ;
- une salinité élevée d'environ 25–35 psu.

Comme expliqué précédemment (partie 3.2.1.4.a), les diatomées *C. closterium* ont des besoins spécifiques en nutriments. En effet, elles ont besoins d'une certaine concentration en Silice dissoute dans le milieu pour constituer leur frustule. D'après Sunlu et al., (2006), lors d'une culture de *C. closterium* la valeur de K_{μ} après ajout de différentes concentrations en silicate était de $9,58 \mu\text{M}$ avec une croissance maximale de $4,32 \text{ jour}^{-1}$.

3.4. Formation d'un biofilm et attaques biologiques sur un matériau cimentaire

La bio-colonisation et le développement de biofilm sur une surface cimentaire est dépendante de l'interaction du matériau, des microorganismes vivants et de l'environnement de ces derniers (Lors et al., 2017 ; Hayek et al., 2020a).

Les matériaux cimentaires sont ainsi bio-réceptifs dans le milieu marin (Marquez-Peñaranda et al., 2016; Hayek et al., 2020a). Guillitte, (1995) définit le concept de la bio-réceptivité comme « l'aptitude d'un matériau à être colonisé par un ou plusieurs groupes d'organismes vivants sans nécessairement induire une bio-détérioration ». Il existe deux types de bio-réceptivité. La bio-réceptivité dite intrinsèque qui est liée aux propriétés physico-chimiques de la surface du béton

comme la porosité, la rugosité (Ammar et al., 2015; De Muynck et al., 2009; Manso et al., 2015; Hayek et al., 2021) et la composition chimique du matériau (Hayek et al., 2021). La composition interne du matériau peut avoir un impact sur la richesse spécifique des espèces fixées (McManus et al., 2018). En effet, elle peut également modifier la chimie de surface des structures artificielles et influencer l'initiation du biofilm et de l'épibionte (Natanzi et al., 2021). Les propriétés chimiques du matériau cimentaire peuvent par exemple modifier le recrutement de la méiofaune. La rugosité de surface peut aussi rendre un matériau cimentaire attractif pour la faune et la flore marine. Celle-ci se traduit par des aspérités et des irrégularités en surface du matériau (Pioch et al., 2018). Elle peut être sous différentes formes et échelles pouvant servir d'abris et favorisant l'adhésion de micro ou macro-organismes grâce leur sécrétion d'EPS ou de colle biologique (Kawabata et al., 2012; Tibabuzo Perdomo et al., 2018). De plus, l'introduction de granulats biogéniques (coquillages concassés) dans un matériau, peut avoir un impact négatif sur la texture et la chimie de surface du béton mais favoriser le recrutement des organismes marins. En effet, le béton avec une substitution de granulats minéraux par des granulats coquilliers peut créer un substrat attractif en imitant certains des signaux chimiques naturels produits par la famille de l'espèce dont on souhaite améliorer le recrutement (Vasquez et al., 2013; Graham et al., 2017; Hanlon et al., 2018). A long terme, le béton contenant des coquilles d'huitres va servir de refuge et de nourricerie pour différents poissons pélagiques (Graham et al., 2017).

La bio-réceptivité peut aussi être dite extrinsèque due au milieu environnant (Lors et al., 2017). Plusieurs facteurs environnementaux (hydrodynamisme, lumière, température, dépôt sédimentaire, etc.) peuvent être considérés comme des facteurs de recrutement pouvant affecter les communautés voulant se fixer sur les matériaux cimentaires. L'effet de ces facteurs dépend du temps d'immersion du matériau.

La composition chimique d'un matériau cimentaire peut influencer certains paramètres comme la rugosité, la porosité et le pH. La capacité d'un microorganisme à se fixer sur un matériau cimentaire dépend du pH de sa surface. De plus, le pH joue un rôle majeur dans les activités métaboliques de certains micro-organismes (Stanley et al., 2017), l'adhésion et la synthèse des EPS. Au début de l'immersion d'un matériau cimentaire en mer, la colonisation par des organismes marins ne peut avoir lieu. Des travaux antérieurs (Nandakumar et al., 2003; Sella and Perkol-Finkel, 2015) ont mis en évidence l'inadéquation des structures artificielles en béton de ciment Portland comme habitats pour la flore et la faune marines, due à la forte alcalinité (pH compris entre 11 et 13) de surface de ce matériau. Natanzi et al., (2021) ont montré une richesse plus importante en espèces (diatomées, cyanobactéries et algues vertes) sur des bétons ayant une alcalinité de surface plus faible se rapprochant au mieux du pH de l'eau de mer. Néanmoins, Hsiung et al., (2020) ont montré que la colonisation d'un substrat carbonaté (7-8) n'avait pas de

différence significative par rapport à un substrat alcalin. Ainsi le pH de surface des structures artificielles peut être modifié suivant la composition du béton et peut influencer l'adhésion de certaines espèces marines.

Le matériau va être sujet à différents types d'agressions chimiques au fil du temps dues aux ions présents dans l'eau de mer. Ces agressions vont toucher les phases internes et externes du béton provoquant une diminution de son pH en surface jusqu'à une valeur de 9 (voir partie II.1). Ces conditions de surface du béton sont optimales pour la colonisation microbienne. En effet, chaque espèce a un pH optimal de croissance. Lors de l'initiation du biofilm, la population microbienne est composée de microorganismes que l'on dit neutrophiles ($6 < \text{pH} < 8$) et/ou acidophiles ($\text{pH} < 6$) (Wei et al., 2013). D'après Guilbeau et al., (2003), le béton doit rester immergé un minimum de 6 mois avant que le pH de la couche superficielle ne se rapproche de celui de l'eau de mer augmentant sa bio-réceptivité.

La formation du biofilm commence tout d'abord par la fixation réversible de bactéries planctoniques isolées sur la surface du matériau. Celles-ci s'organisent en amas de cellules. Puis les bactéries s'ancrent de façon irréversible sur la surface (Stoodley et al., 2002) (Figure 13). Les micro-rugosités sur la surface du béton permet aux microorganismes d'y adhérer plus facilement. L'hétérogénéité de surface est bien connue pour faciliter le recrutement des espèces mais celle-ci dépend de l'échelle de rugosité par rapport aux traits morphologiques (taille, forme etc...) des organismes s'installant à la surface d'un matériau (Crisp and Barnes, 1954; Aldred et al., 2010; Santo Domingo et al., 2011; Carl et al., 2012; Firth et al., 2014; Perkol-Finkel and Sella, 2014; Coombes et al., 2015; Perkol-Finkel et al., 2018; Pioch et al., 2018; Hanlon et al., 2018). En effet, certaines espèces colonisent plus rapidement des surfaces lisses (Berntsson et al., 2000; Cooper et al., 2011) comme c'est le cas des diatomées (Sweat and Johnson, 2013).

Huang et al., (2018) ont montré que des micro-sillons pouvaient servir de points d'ancrage pour les micro-algues en limitant les contraintes de cisaillement, favorisant ainsi la formation et la croissance du biofilm. Les nutriments et l'humidité disponible en surface des matériaux, vont favoriser le développement des micro-organismes. Le biofilm va ainsi progressivement arriver à maturation (Figure 13). La phase de maturation du biofilm se caractérise par une augmentation de la taille de la structure via la multiplication cellulaire et la synthèse importante d'EPS. Les bactéries et les diatomées sont souvent à l'origine de l'initiation et de la formation du biofilm (Salta et al., 2013).

En fin de maturation et en fonction des conditions hydrodynamiques, un certain nombre de microorganismes ou colonies se détachent du biofilm pour retourner à l'état planctonique et peuvent aller coloniser de nouvelles surfaces et former un nouveau biofilm (Figure 13).

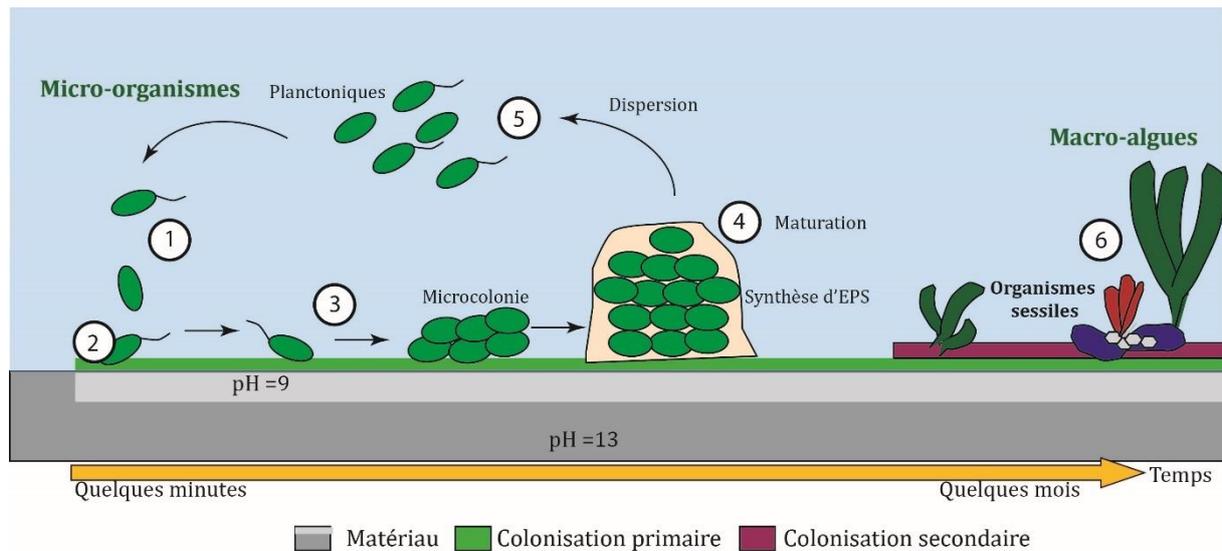


Figure 13. Principales étapes de la formation d'un biofilm sur un matériau cimentaire. Les micro-organismes planctoniques isolés évoluant librement dans la colonne d'eau (1), se fixent de manière réversible sur la surface du matériau (2). Ensuite ils se fixent de façon irréversible (3) et s'organisent en amas de cellules en synthétisant une grande quantité d'EPS (4). Le biofilm est arrivé à maturation et correspond au biofilm primaire. Certains micro-organismes peuvent se détacher du biofilm et retourner dans la colonne d'eau (5). Un biofilm secondaire va se former suite à la colonisation par des macro-organismes (6)

Le développement du biofilm peut entraîner de la bio-détérioration (Figure 14). H. J. Hueck définit dès 1965 la bio-détérioration comme étant « *tout changement indésirable dans les propriétés d'un matériau causé par l'activité vitale d'organismes* ». Les mécanismes de bio-détérioration peuvent être classés selon leurs effets sur les matériaux (Sanchez-Silva and Rosowsky, 2008). Ils dépendent de plusieurs paramètres comme la composition du matériau utilisé et des conditions environnementales favorables (température, humidité, pluie, exposition au soleil, polluants) (Bastidas-Arteaga et al., 2008).

Sous l'action des phénomènes chimiques et d'une succession de micro-organismes à la surface du béton, le pH va continuer de diminuer pouvant atteindre une valeur de pH inférieure à 5. La surface du béton devenue très acide va fragiliser le béton au fil du temps suite à de la bio-détérioration chimique (Bastidas-Arteaga et al., 2008; Hughes et al., 2013) (Figure 14).

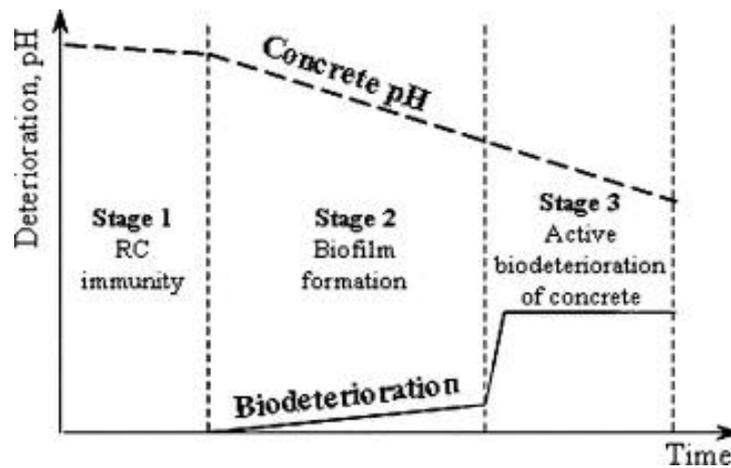


Figure 14. Processus de bio-détérioration du béton (Bastidas-Arteaga et al., 2008)

Il existe deux types de dégradations biochimiques dus aux organismes marins. Il y a le processus d'assimilation opéré lorsque les organismes utilisent le composant comme source de nourriture, modifiant ainsi l'intégrité du matériau. Les organismes sont soit autotrophes, soit hétérotrophes. La structure d'un biofilm est composée dans sa partie externe de micro-organismes autotrophes photosynthétiques. Ces micro-organismes fournissent via le processus de photosynthèse de la matière organique assimilable pour les organismes hétérotrophes situés en dessous d'eux. Dans certains biofilms, jusqu'à 50 % du carbone peut être produit par les diatomées (Salaün et al., 2012). Il y a également le processus de dissimilation réalisé lorsqu'un organisme vivant excrète des déchets ou d'autres substances qui réagissent chimiquement avec le substrat. Ainsi, les biofilms regroupent des micro-organismes aux métabolismes divers. Ils correspondent à des "micro-écosystèmes" répondant aux fluctuations environnementales du milieu.

Certains micro-organismes issues du biofilm produisent plusieurs types de métabolites en fonction de leur activité métabolique comme par exemple des acides (Cwalina, 2008) avec l'acide polythionique et d'acide sulfurique (Sand, 1987) qui vont également provoquer des dégradations chimiques à la surface du matériau. Toutes ces substances vont ainsi affecter négativement la matrice cimentaire. Cette activité biologique peut entraîner une accélération du relargage dans le milieu environnant d'espèces chimiques issues du béton par des phénomènes de lixiviation de la matrice. La quantité d'ions est variable suivant le choix du ciment de la matrice cimentaire. Un autre processus biologique va fragiliser le béton, la photosynthèse des micro-algues qui va entraîner la production d'oxygène et de glucose. D'après Stanley et al., (2017), l'oxygène produit lors de ce processus pourrait jouer un rôle dans la détérioration du béton. En effet, l'oxygène peut diffuser à l'intérieur des pores du béton et ainsi engendrer sa biodétérioration. L'O₂ pourrait migrer jusqu'aux armatures et entraîner de la corrosion.

Les EPS sécrétées par les micro-organismes peuvent également être impliquées dans le mécanisme de bio-détérioration (Ferrero, 2018). En effet, lors d'un cycle de marée (cycle de

mouillage-séchage), les EPS subissent un retrait puis un gonflement. Ce phénomène induit des contraintes supplémentaires sur le matériau qui peuvent le fragiliser dans le temps (Lors et al., 2017).

Différents essais en laboratoire peuvent être réalisés pour suivre la biodétérioration d'un matériau cimentaire. En revanche, le problème des sécrétions produites par les micro-organismes *in situ* est que leur quantité est différente suivant les espèces présentes au sein du biofilm, leur âge et l'évolution de ce dernier dans le temps. De plus, les essais sont réalisés à un instant T où plusieurs paramètres abiotiques peuvent modifier l'activité du biofilm (développement et métabolismes). D'où la difficulté de développer des essais en laboratoire représentatifs des conditions réelles.

Des études expérimentales ont montré que les micro-organismes peuvent également pénétrer dans le béton par un processus de diffusion modifiant sa microstructure. Les micro-organismes peuvent pénétrer à l'intérieur de la matrice de béton même s'il n'y a pas de fissures observables dans sa structure (Sanchez-Silva and Rosowsky, 2008). Le mécanisme le plus courant pour leur pénétration dans le béton se fait via des microfissures ou des pores capillaires. Ferrero, (2018) a suivi l'effet de la bio-colonisation du mortier par la diatomée *Cylindrotheca closterium* à partir d'essais expérimentaux en laboratoire. Elle a démontré que celle-ci a favorisé la pénétration des ions chlorure et sulfate au sein du matériau en le fragilisant. Ferrero, (2018) a émis l'hypothèse que les diatomées pouvaient être capables de créer un micro-réseau dans le matériau augmentant ainsi la diffusion de ces ions.

Sur ce biofilm initial ou biofilm primaire, un autre biofilm que l'on dit secondaire va se former. Des macro-organismes vont coloniser le matériau comme des macro-algues et invertébrés (Figure 13). Un nouveau réseau trophique va ainsi s'installer. Le biofilm est source de nutriments comme pour les brouteurs. L'arrivée d'autres espèces marines peut amplifier le phénomène de bio-détérioration sur le substrat (Javaherdashti et al., 2009). Les macro-algues ont besoins de certains nutriments (Ca, Si, Al, Fe) pour réaliser leur métabolisme. Ils peuvent récupérer ces nutriments à partir de la pâte cimentaire par bio-solubilisation de la matrice dans la colonne d'eau (Javaherdashti et al., 2009; Jayakumar and Saravanane, 2010). Lorsque les algues colonisent des structures, elles sont capables d'absorber le calcium, la silice et le magnésium (Javaherdashti et al., 2009) par les fissures ou cavités formées dans la matrice. Jayakumar and Saravanane, (2009) ont montré que les macro-algues avaient utilisé des cristaux comme la Yeelite, la Gismondine et la Portlandite comme source de minéraux. Les macro-algues sont ainsi capable d'assimiler les ions calcium provenant de la dissolution de la portlandite pour leurs besoins physiologiques. Le phénomène de bio-détérioration peut également être amplifié par les acides organiques sécrétés par l'activité métabolique des macro-algues tels que le myristate, le palmitate ou encore le

nonadecylate, mais aussi des acides inorganiques comme les acides acétique ou lactique, ou encore le dioxyde de carbone (Jayakumar and Saravanane, 2009; Jayakumar and Saravanane, 2010; Wei et al., 2013). La matrice est ainsi de plus en plus fragilisée. La porosité du béton va augmenter. L'augmentation de la porosité peut modifier les propriétés de transfert du béton (Sanchez-Silva and Rosowsky, 2008).

A plus long terme, il peut y avoir des invertébrés sessiles (les balanes par exemple) et des poissons qui vont considérer ces matériaux comme des habitats et/ou refuges pour poursuivre leur cycle de vie. L'accumulation d'espèces ingénieuses à la surface du béton va permettre le développement d'assemblages macrobenthiques plus complexes et diversifiés (Coombes et al., 2015; Hanlon et al., 2018). Les espèces ingénieuses (traduction de « engineer species ») ont été définies comme des « *organisms that directly or indirectly modulate the availability of resources (other than themselves) to other species, by causing physical state changes in biotic or abiotic material. In doing so they modify, maintain and/or create habitats* » (Jones, 1994).

Outre la bio-détérioration chimique et physique, la bio-colonisation peut aussi provoquer une altération du matériau d'un point de vue esthétique due à l'accumulation d'organismes à sa surface (Hughes et al., 2013).

3.5. Effet protecteur de la bio-colonisation

La bio-détérioration du béton par les organismes marins devient un sujet au centre des préoccupations (voir partie 3.4) scientifiques et industrielles dans le but de créer de nouvelles structures plus résistantes, plus durables et plus écologiques permettant la formation de nouveaux écosystèmes marins (Pioch et al., 2018). Cependant, la bio-colonisation à la surface des ouvrages maritimes a aussi des effets bénéfiques. Nous pouvons prendre l'exemple de l'atténuation des vagues, le piégeage des sédiments et la protection des infrastructures maritimes contre les agressions marines (Risinger, 2012; Coombes et al., 2013, 2017; Perkol-Finkel and Sella, 2014). Plusieurs études ont démontré que des espèces intertidales comme les balanes, les huitres et le biofilm ont des bienfaits sur la durabilité du béton (Chlayon et al., 2018, 2020; Coombes et al., 2017; La Marca et al., 2015; Lv et al., 2015a, 2015b). En effet, Chlayon et al., 2018 attestent que les balanes améliorent la durabilité du béton en se fixant à sa surface et en refermant les microfissures. La fermeture de ces fissures a pour conséquence une diminution du taux de diffusion des chlorures. Les balanes et le biofilm forment une couche micro-protectrice supplémentaire, préservant ainsi les conditions alcalines dans la matrice cimentaire. Le biofilm dense formé par les bactéries peut réduire considérablement la perméabilité du béton et améliorer sa durabilité (Lv et al., 2015b). En effet, Lv et al., (2015b) ont observé une diminution de la pénétration de certains ions agressifs (Cl^- , Mg^{2+} ...) due à la présence en surface d'un biofilm

formé de bactéries du genre *Pseudoalteromonas*. Shuying and Xiaoning, 2018 ont également démontré que l'activité du biofilm constituée de bactéries halophiles étudiée en zone intertidale pouvait être corrélée à une meilleure résistance du béton. En effet, un biofilm actif favorise la diminution de la pénétration des ions chlorure par rapport à un biofilm inactif.

Le biofilm bactérien peut induire la formation de carbonate de calcium autrement appelé MICP (Microbiologically Induced Calcium carbonate Precipitation) via un processus biologique qui va jouer un rôle bio-auto-cicatrisant sur le béton (Seifan and Berenjian, 2018).

Kawabata et al., (2012) ont montré que la résistance du béton à la pénétration des ions chlorure est améliorée à long terme lorsqu'il est recouvert à la surface d'organismes sessiles marins. En effet, ces organismes sessiles vont produire un ciment secondaire lors de la fixation des larves sur le substrat. Ce ciment biologique, composé organique-inorganique, va avoir un effet bénéfique sur le béton puisqu'il va ralentir et réduire la pénétration des ions chlorure. Lorsque les organismes sessiles marins se détachent de la surface du béton, le ciment biologique reste en surface. Le béton conserve ainsi sa protection contre les attaques chimiques de l'eau de mer. L'accumulation d'organismes vivants à la surface du béton immergé va former une couche suite au dépôt de carbonate de calcium par les colonisateurs calcaires (coraux, mollusques etc...). Ainsi, ils contribuent à protéger le béton et donc à favoriser la durabilité de sa structure au fil du temps (Lv et al., 2015a; Perkol-Finkel and Sella, 2014, 2015). Les précipitations biogènes de CaCO_3 par les cellules bactériennes dans les vides de la matrice cimentaire améliorent ses propriétés de durabilité (Joshi et al., 2018). Risinger, (2012) a montré que la croissance biogénique des huîtres à la surface du béton (Figure 15a) augmentait significativement la résistance à la flexion de ce dernier dans le temps par rapport à un béton sans fixation d'huîtres (Figure 15b).

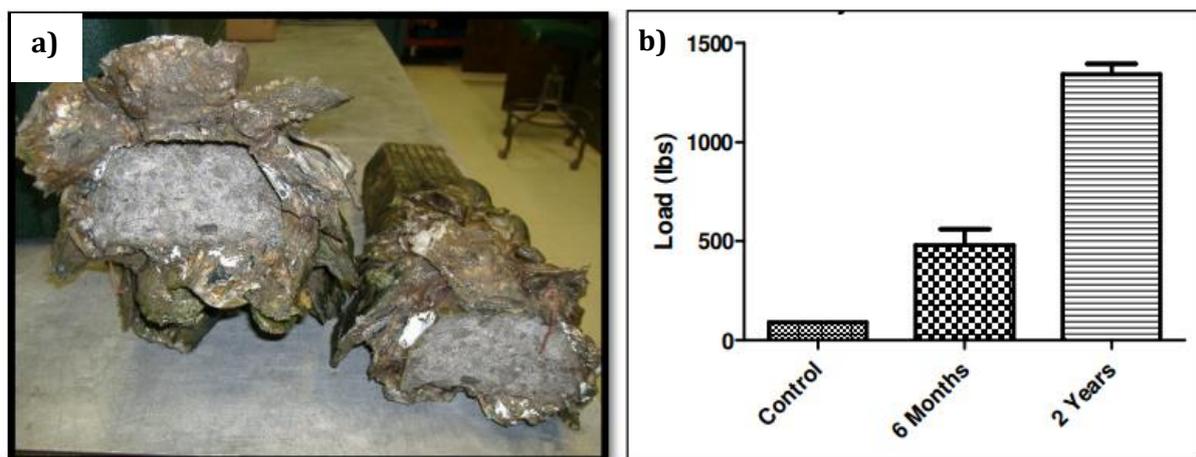


Figure 15. (a) Béton avec croissance d'huîtres ; (b) variations de la résistance à la flexion (d'après Risinger, 2012).

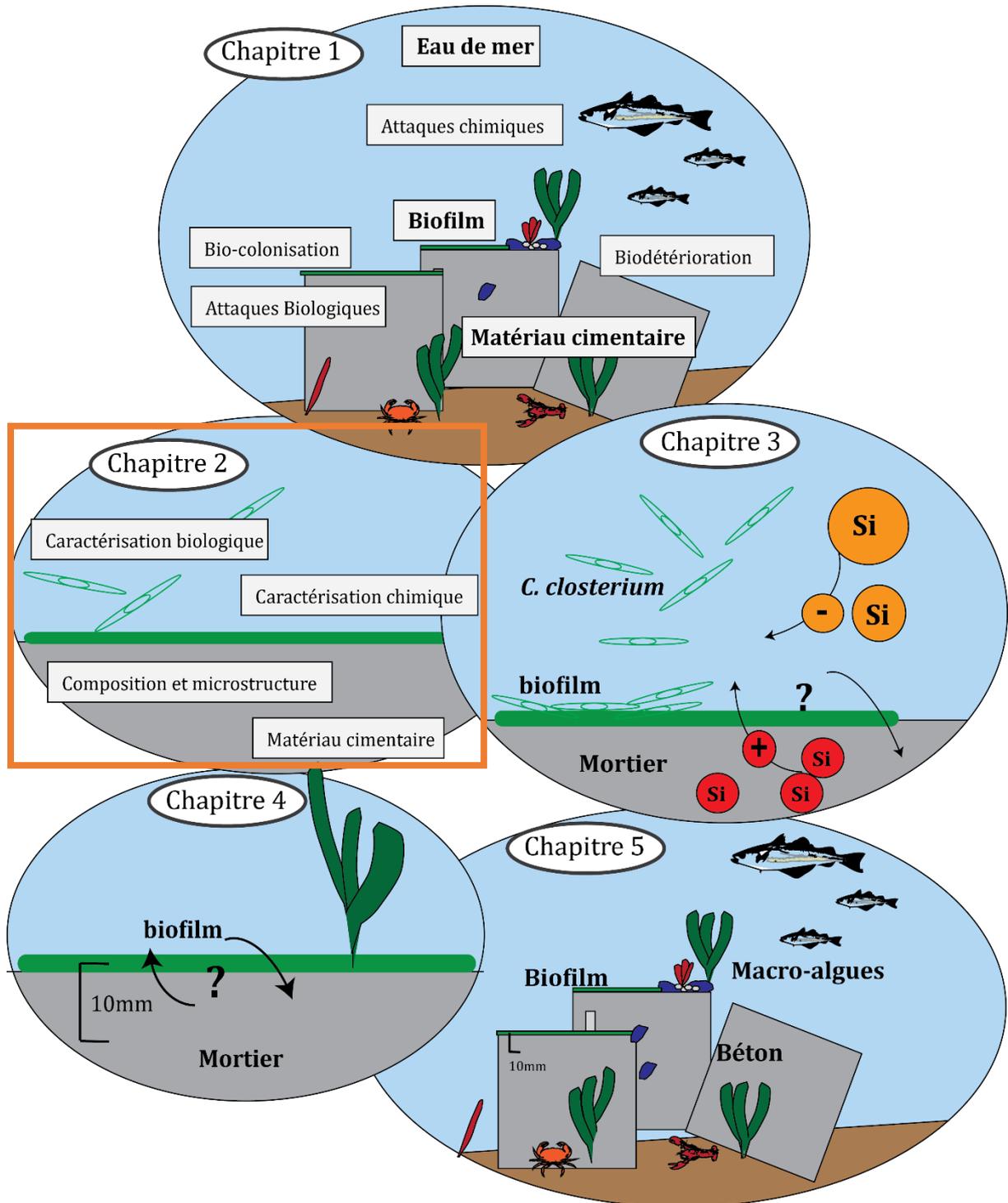
Conclusion

Cette étude bibliographique a permis de présenter les acquis scientifiques et dégager les manques de connaissances découlant de cette problématique. Celle-ci met en évidence l'intérêt d'étudier les interactions entre le matériau cimentaire et le microphytobenthos. La composition, la rugosité et les propriétés du matériau cimentaire jouent sur la bio-réceptivité de celui-ci. Le substrat associé aux conditions environnementales a un impact sur le développement du biofilm. En effet, les micro-algues constituant le biofilm ont des besoins spécifiques liés à la température, aux nutriments et à l'intensité lumineuse pour croître et permettre le recrutement d'autres espèces marines sur le substrat.

D'après les travaux présentés dans ce chapitre, le microphytobenthos peut avoir des effets négatifs mais aussi positifs sur le matériau cimentaire. Une fois immergé en eau de mer, les espèces chimiques agressives de l'eau de mer ainsi que celles dépendantes de l'activité biologique peuvent progresser au sein du matériau et vont modifier la composition et la microstructure du matériau. En effet, ces réactions chimiques peuvent entraîner la dissolution des phases hydratées et anhydres, et/ou la précipitation de produits nouvellement formés. Celles-ci vont influencer sur les propriétés mécaniques, de transports des matériaux cimentaires et sur leur durabilité.

Par conséquent, l'intérêt est de confirmer et d'approfondir les connaissances déjà existantes dans le but de favoriser les bénéfices mutuels (interactions positives) entre le compartiment biologique et le matériau cimentaire dans le milieu marin.

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes



Introduction :

Dans ce travail, nous présentons l'élaboration des deux types de matériaux (mortier et béton), leur optimisation et leur caractérisation par diverses techniques. L'évolution de la composition de la matrice cimentaire au cours du temps suite à la formation en surface d'un biofilm ou à la fixation de plusieurs espèces marines, est suivie pour qualifier et quantifier les modifications observées sur la couche superficielle de la matrice cimentaire. La matrice est également caractérisée chimiquement et mécaniquement. Enfin, concernant la bio-colonisation des surfaces par les diatomées *Cylindrotheca closterium*, nous présentons le mode de culture de cette espèce ainsi que les outils et méthodes utilisés pour suivre le développement du microphytobenthos à la surface du matériau.

I. Matériaux cimentaires étudiés

Le mortier sélectionné a été utilisé pour étudier plus précisément l'impact d'une colonisation sur la matrice en surface et en profondeur. Le mortier est un matériau facile à fabriquer et très rapidement recouvrable par une fine couverture algale lors de son immersion en mer.

Le béton est quant à lui très utilisé lors de la mise en place d'infrastructures maritimes, c'est donc un bon matériau pour suivre, sur des échantillons de taille réduite, l'effet de la colonisation sur sa durabilité et sur sa résistance mécanique.

1. Caractérisation des matériaux de fabrication

1.1. Ciment

Le ciment utilisé est un ciment Portland composé (ajout de cendres volantes, fumées de silice, ... (Tableau 2) (Calcia), de référence CEM II/A-LL 42.5 R CE PM-CP2 NF. Ce ciment est adapté pour une utilisation en mer, il est considéré comme un Prise Mer (PM).

Les caractéristiques chimiques de ce ciment sont présentées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Teneurs en oxydes chimiques en % du ciment CEMII/A-LL étudié (Calcia)

SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	TiO ₂	MnO	CaO	MgO	SO ₃	K ₂ O	Na ₂ O	P ₂ O ₅	S	Cl
19,4	4,5	3,8	0,3	0	63,7	1	2,6	0,86	3	0,3	0,1	0,03

1.2. Sable

Un sable alluvionnaire siliceux a été utilisé de classe granulaire 0/2 mm pour la confection de nos 2 matériaux cimentaires (Figure 16a). Ses caractéristiques physiques sont présentées Tableau 4.

1.3. Eau

L'eau utilisée pour le gâchage des mortiers est l'eau de distribution de la commune d'Epron. Sa composition chimique se trouve bien dans la norme d'une eau de gâchage (NF EN 1008). D'après la SAUR Centre Normandie, la quantité de chlore est de 0,24 mg(Cl₂)/L.

1.4. Granulats

Les granulats ont été uniquement utilisés lors de la formulation de béton composé de deux dimensions de gravillons, avec les deux classes granulaires 10/20 mm et 4/10 mm (Figure 16bc). Leurs caractéristiques physiques sont présentées Tableau 4. Ces derniers gravillons minéraux sont de nature siliceuse.

Une substitution de granulats (4/10 mm) (Figure 16b) par des granulats coquilliers d'huître creuse (*Crassostrea gigas*) (6/12,5 mm) (Figure 16d) a également été réalisée. Les granulats coquilliers sont de nature calcaire. Les coquilles ont une tendance à réduire la résistance et la durabilité des bétons. La masse volumique absolue des granulats de coquilles d'huîtres réalisées selon la norme NF EN 1097-6:2014-01 est de 2725 kg.m⁻³. Leur coefficient d'absorption d'eau [NF EN 1097-6:2014-01] (4,58%) est plus élevé par rapport aux autres granulats utilisés pour le béton. La compacité granulaire a été déterminé conformément à la norme [NF EN 932-2:1999-08].

Tableau 4 : Caractéristiques physiques des granulats utilisés

Granulats	Sable 0/2mm	Granulats 4/10mm	Granulats 10/20mm	Granulats coquilliers 6/12,5 mm
Caractéristiques				
Densité absolue (kg.m⁻³)	2740	2699	2704	2725
Coefficient d'absorption de l'eau WA24 (%)	0.54	0.62	0.79	4.58
Compacité granulaire (%)	66	58	58	38

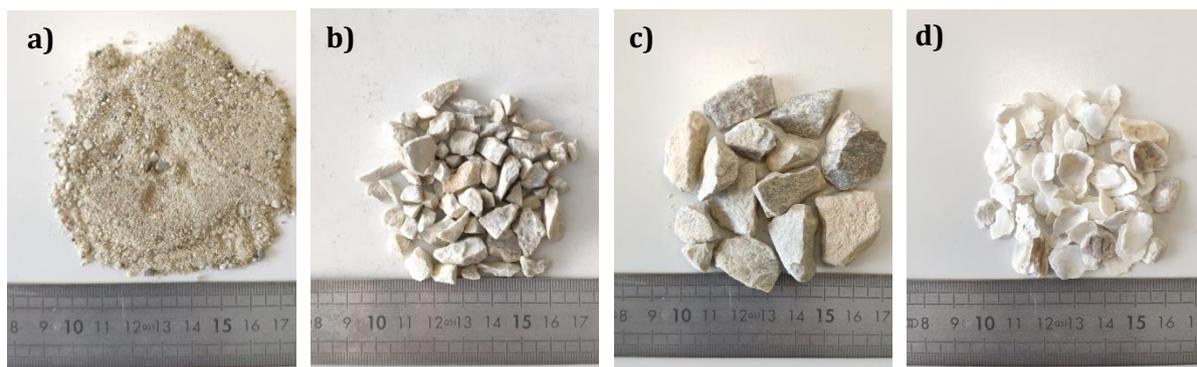


Figure 16 : Les différents types de granulats utilisés pour élaborer les matériaux cimentaires : Sable 0/2mm **(a)** ; Granulats 4/10 mm **(b)** et 10/20mm **(c)** ; Granulats coquilliers 6/12,5 mm **(d)**

2. Confection des éprouvettes

2.1. Mortier

Nous traitons des mortiers siliceux normalisés, les éprouvettes élaborées respectent la norme NF EN 196-1. Le rapport Eau sur Ciment (E/C) est constant et fixé à 0,5.

En suivant cette norme, la réalisation d'une gâchée permet de fabriquer trois éprouvettes de mortier de dimension 40 mm x 40 mm x 160 mm. La mise en œuvre des mortiers se fait dans un malaxeur d'une capacité de 5 L (Figure 17a). Afin de conserver les caractéristiques du mortier pour chaque éprouvette, celles-ci sont réalisées trois par trois.

Tout d'abord, le sable et le ciment sont homogénéisés à petite vitesse (140 tours/min) puis l'eau est ajoutée dans les 30 secondes. L'ensemble est mélangé pendant 30 secondes supplémentaires à grande vitesse (285 tours/min). Les parois sont ensuite raclées pendant 30 secondes manuellement. Pendant 60 secondes, le mélange est laissé au repos. Après ce temps écoulé le malaxage peut reprendre pendant 60 secondes à grande vitesse. La pâte est ensuite placée dans des moules en polystyrène. Les éprouvettes sont moulées en deux couches à l'aide d'une table à chocs normalisée (Proviteq) (Figure 17c). Les moules sont ensuite placés dans une chambre de conservation dont la température est à 20 ± 1 °C et l'humidité relative à $95 \pm 5\%$ (Figure 17c). D'autres éprouvettes cylindriques de diamètre 110 mm et de hauteur 50 mm, sont réalisées, dans un malaxeur de 30 L (Figure 17b et e). Après malaxage, les moules cylindriques sont remplis en deux couches. Chaque couche est serrée manuellement par des chocs successifs. Au bout de 24 heures, les éprouvettes sont démoulées et conservées (pour une durée de cure de 90 jours) dans des bacs remplis d'eau permettant une conservation à 100% d'humidité. Les bacs sont entreposés dans une chambre climatique à température constante (20 ± 1 °C).

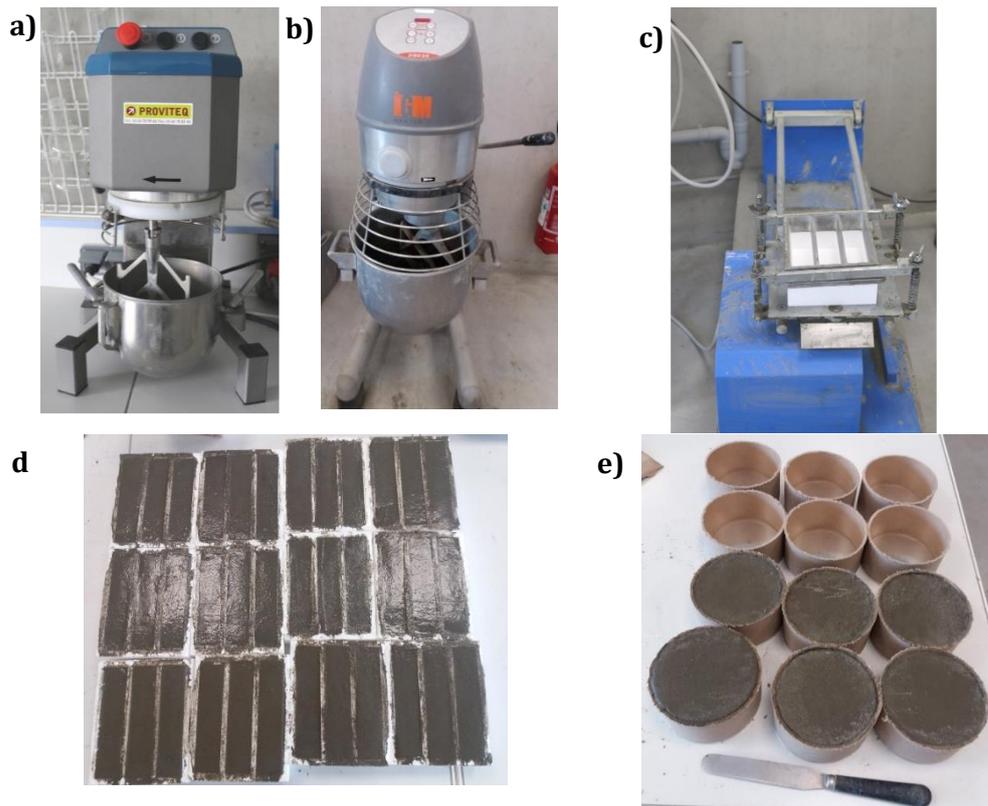


Figure 17. Malaxeurs **(a)** 10L et **(b)** 30L pour l'élaboration d'éprouvettes de mortier ; **(c)** table à choc et éprouvettes de mortiers **(d)** parallélépipédiques 40 mm × 40 mm × 160 mm et cylindriques $\varnothing=110$ mm et h=50mm

2.2. Béton

Deux types de bétons sont étudiés dans cette thèse (Chapitre 5), un béton coquillier avec une substitution en masse de 20% de granulats 4/10 par des coquilles d'huitres que l'on nommera CEMII +20%C et un béton non coquillé nommé CEMII +0%C.

Durant la phase de formulation, un cône d'Abrams (Figure 18a) a été utilisé pour vérifier l'étalement du béton optimisé. Un aéromètre permettant de mesurer l'air occlus est également utilisé (Figure 18b). Les deux types de bétons sont de type XS3 de consistance S4 (auto-plaçant) avec un air occlus de 1.2% pour le béton CEMII +0%C et de 0.7% pour le béton CEMII +20%C. Le rapport Eff/C (Eau efficace/Ciment) est de 0,43 L'eau efficace est caractérisée par la différence entre la quantité d'eau contenue dans le béton frais et la quantité absorbée par les granulats. Après optimisation des formulations, les bétons obtenus (Tableau 5) suivent la norme XS3 [EN 206-1, 2014].

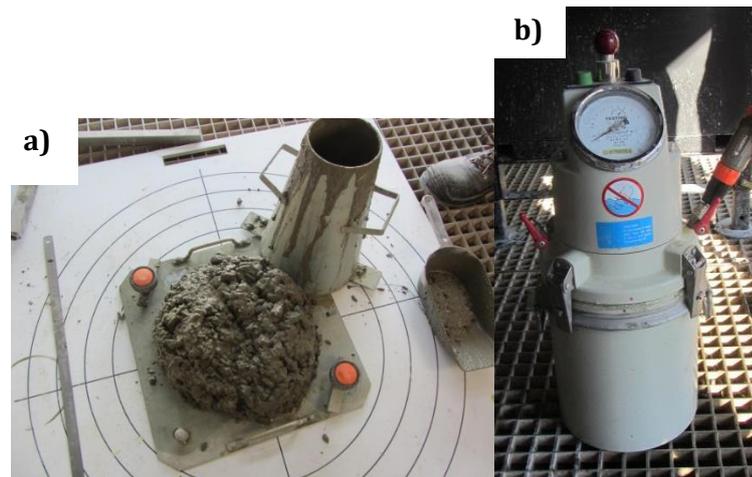


Figure 18. Mesure au cône d'Abrams (a) ; Mesure de l'air occlus (b)

Tableau 5. Constituants des éprouvettes de béton coquillier ou non en kg/m³.

Matériaux (kg/m ³)	Béton non coquillier (CEMII+0%C)	Béton coquillier (CEMII +20%C)
Ciment CEMII	350	350
Sable siliceux 0/2 mm	810	810
Granulats 4/10 mm	600	480
Granulats 10/20 mm	500	500
Granulats coquilliers 6/ 12,5 mm	/	120
Eau	175	175
Superplastifiant	4,49	7

Le superplastifiant utilisé est un Masterglenium SKY 841. Après pesée des constituants du béton souhaités un malaxeur de 50 L a été utilisé pour réaliser les différentes éprouvettes de béton (Figure 19a). Les constituants sont introduits dans un ordre précis dans le malaxeur en commençant par les granulats les plus grossiers puis le ciment et le sable. Au bout de 30 secondes de malaxage à sec, l'eau et le superplastifiant sont préalablement mélangés puis incorporés progressivement dans le mélange jusqu'à la consistance souhaitée (Figure 19b) lors de l'essai d'affaissement par le cône d'Abrams.

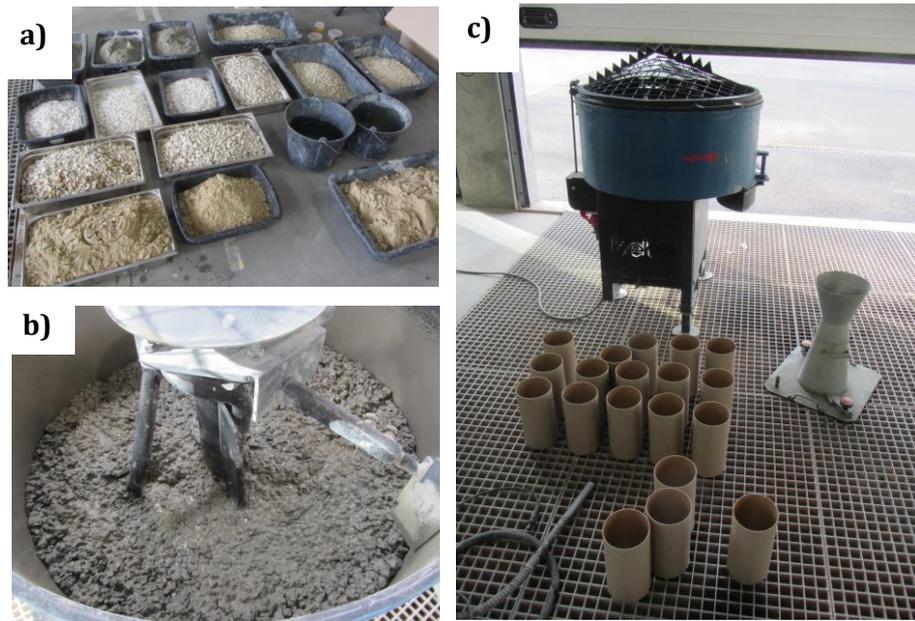


Figure 19. Préparation des constituants du béton **(a)** ; Malaxage du béton **(b)** ; Préparation du coulage **(c)**

Le coulage du béton est ensuite effectué dans les différents moules en carton ($\text{Ø}110 \text{ mm} \times \text{H}220 \text{ mm}$ et $\text{Ø}110 \text{ mm} \times \text{H}50 \text{ mm}$) de dimensions nécessaires à la réalisation des différents tests (Figure 19c). Une aiguille vibrante est utilisée pour répartir uniformément le mélange dans le moule. Les moules sont placés dans la même chambre de conservation que les mortiers. Au bout de 24h, les éprouvettes de bétons sont démoulées (Figure 20a) puis sont conservées dans un bac rempli d'eau le temps de la cure (90 jours) (Figure 20b).

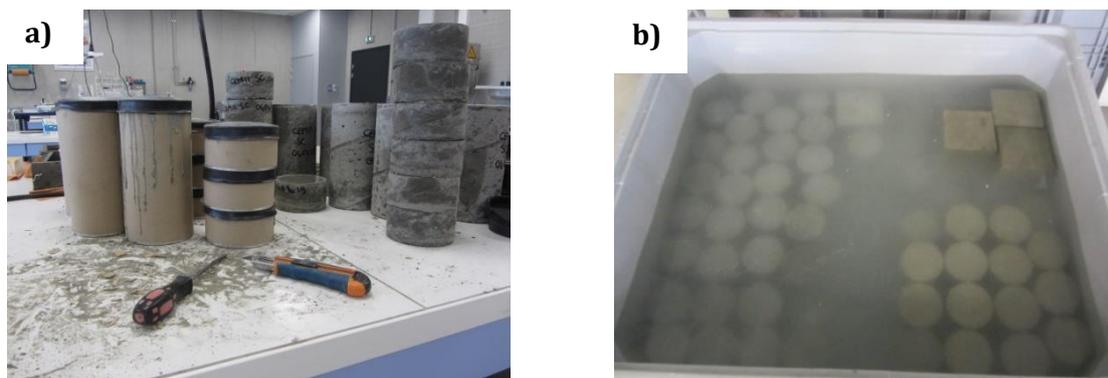


Figure 20. Démoulage des éprouvettes de bétons **(a)** ; Cure de 90 jours des éprouvettes dans de l'eau douce ($\text{pH} = 7,7$) **(b)**

II. Caractérisation du matériau cimentaire et du milieu d'immersion

Les essais présentés ci-dessous vont permettre de comprendre l'effet du biofilm marin sur le matériau cimentaire. Cette évaluation sera réalisée à différentes échéances permettant de suivre l'évolution de la composition chimique du matériau cimentaire après colonisation.

1. Caractérisation chimique

La caractérisation chimique du matériau est réalisée sur des matériaux de dimension $\varnothing 110$ mm \times H50 mm. Pour ces essais, les éprouvettes sont tout d'abord résinées (résine époxy) en deux couches tout autour de la génératrice de l'éprouvette et sur la surface arasée. Une fois la résine sèche, une deuxième couche est effectuée. La face étudiée (non résinée) correspond à celle en contact avec le fond du moule, car elle est identique pour toutes les éprouvettes. Les essais sont réalisés en triplicats.

La caractérisation chimique du matériau est réalisée sur des échantillons de poudre prélevée des matériaux étudiés. Des prélèvements de poudres sont ainsi effectués à différentes profondeurs à l'aide d'une grignoteuse (Forêt plat) (Figure 21a) pour le mortier et d'une perceuse à colonne (Forêt conique) pour le béton (Figure 21c). Le grignotage est réalisé par pas de 2 mm jusqu'à 10 mm de profondeur (Figure 21b). Ces essais sont destructifs autant pour le matériau que pour les espèces marines fixées.

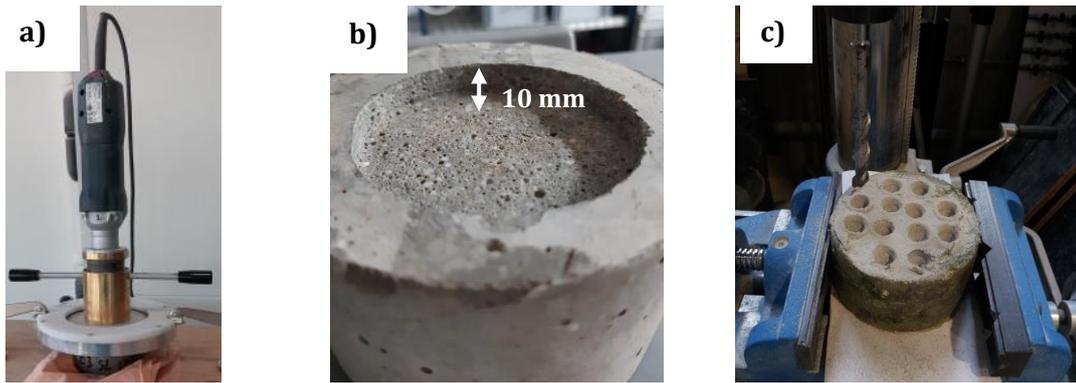


Figure 21. Grignoteuse **(a)**, éprouvette de mortier ($\varnothing 110 \text{ mm} \times H 50 \text{ mm}$) après grignotage à 10 mm de profondeur **(b)**, perceuse à colonne **(c)**

1.1. Profils d'ions chlorure : analyse par chromatographie en phase ionique

Les ions chlorure ont été introduits par diffusion naturelle dans le matériau. Le matériau préalablement résiné permet de laisser pénétrer les ions chlorure perpendiculairement à la surface d'étude (face de contact avec l'eau de mer). La diffusion des ions chlorure au sein du matériau a été suivie à partir de leurs concentrations analysées à l'aide de la chromatographie en phase ionique. Cet appareil est utilisé pour estimer la concentration en cations et anions (Figure 22) présents en phase aqueuse par passage de l'échantillon, entraîné par la phase mobile, dans une résine échangeuse d'ions (phase stationnaire). La résine va grâce à ses affinités (reposant sur des interactions électrostatiques) séparer cations et anions qui sont ensuite détectés en sortie de colonne par mesure de la conductivité de la solution (Figure 22). Deux types de résine sont utilisés pour séparer soit les anions, soit les cations.

Environ 2 g de poudres de chaque échantillon sont pesés après le grignotage à différentes profondeurs. Cette poudre est ensuite diluée dans 18 g d'eau. Après 5 min d'agitation à l'aide d'un agitateur magnétique, le lixiviat obtenu est filtré puis mis en solution dans une fiole de 50 mL (dilution au $1/25^{\text{ème}}$). Cette dilution permet d'éviter une saturation du signal dans le détecteur. La solution obtenue est ensuite filtrée à l'aide d'une seringue ($0,45 \mu\text{m}$) pour enlever toutes les impuretés restantes. La solution finale va par la suite passer en chromatographie en phase ionique.

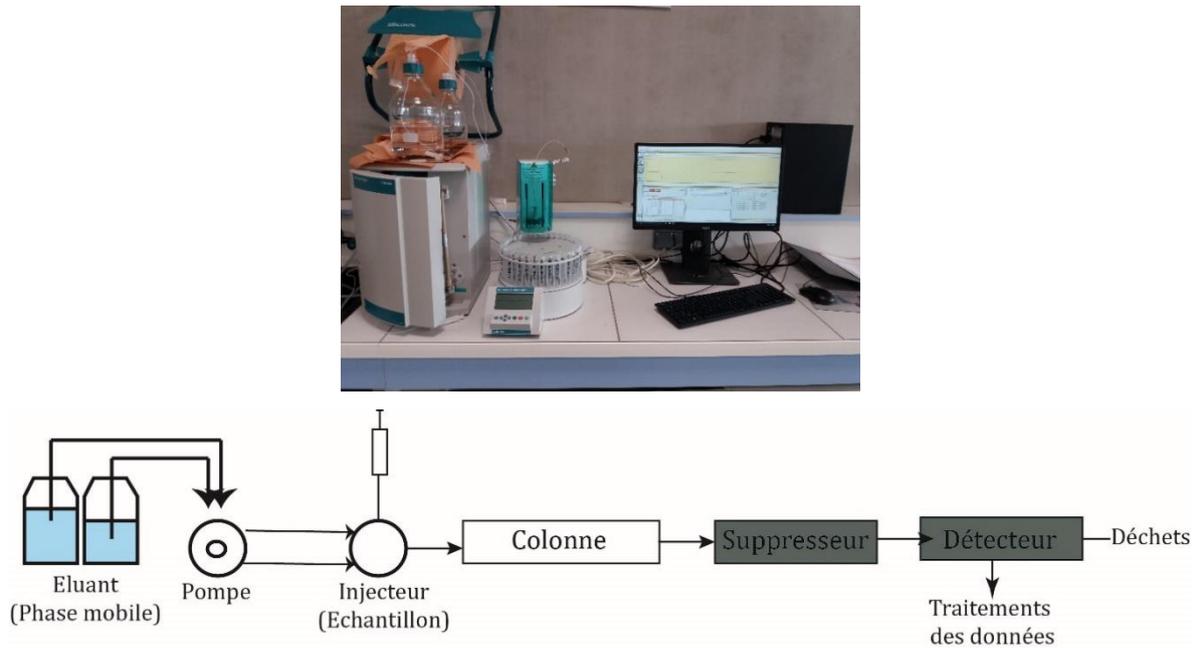


Figure 22. Chromatographe en phase ionique et son schéma de fonctionnement

1.2. Mesure du pH

Le pH du matériau cimentaire est mesuré sur les lixiviats après dilution obtenus lors de la préparation des échantillons pour la chromatographie en phase ionique. Le pH de l'eau ultra pure utilisée pour la dilution de la poudre de mortier est de 7,0. Cet essai a pour but de comprendre l'effet de la colonisation sur le pH du matériau. En effet, le pH d'un matériau cimentaire avant immersion dans le milieu marin est de 13. Cette valeur diminue progressivement suite à sa bio-colonisation (Chapitre 1). Le pH du milieu est également mesuré directement dans les différents milieux d'immersions et après chacune des échéances étudiées.

Les mesures de pH sont réalisées à l'aide d'un pH-mètre pH 510 (Eutech Instruments).

2. Evaluation de l'évolution de la microstructure et de la composition du matériau cimentaire

2.1. Analyse thermogravimétrique (ATG/DTG)

La technique d'analyse thermogravimétrique (ATG) ou thermogravimétrie (TG) utilisée pour l'analyse de matériaux cimentaires, permet d'évaluer, de façon semi-quantitative, les proportions des différentes phases (ettringite, C-S-H, portlandite, calcite, etc...), en chauffant un échantillon. On mesure l'évolution de la masse de l'échantillon en fonction de la température. Les variations de masse sont liées aux départs gazeux, aux décompositions et aux transformations des phases présentes dans l'échantillon. Ces analyses sont réalisées à partir des poudres obtenues lors du grignotage. L'appareil utilisé pour effectuer les analyses thermogravimétriques est un STA 449 F5

(Netzch) (Figure 23). Les essais se déroulent sur un intervalle de température de 20 °C à 1000 °C, avec une vitesse de chauffe de 20 °C/min et sous balayage d'azote à 50 mL/min. Une atmosphère inerte a été utilisée dans le but de ne pas créer d'éventuelles réactions secondaires au moment de la chauffe du matériau.



Figure 23. Thermo gravimètre de type STA 449 F5

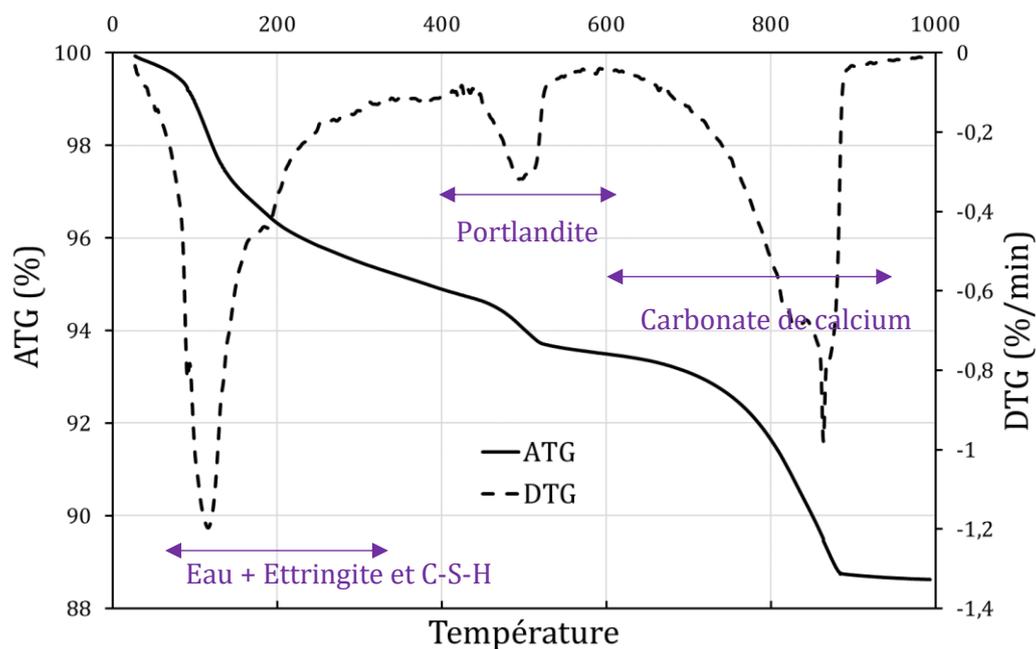
L'analyse thermique permet d'obtenir des informations sur la minéralogie d'un matériau en lui faisant subir une augmentation progressive de température, pourvu que sa température de décomposition soit connue, que sa transformation soit suffisamment rapide, et que plusieurs phases ne se décomposent pas aux mêmes domaines de températures.

Dans notre cas, la perte de masse en fonction de la température est caractéristique soit de la déshydratation de phases hydratées ou hydroxydes telles que l'ettringite, les C-S-H et la portlandite, soit d'un départ de dioxyde de carbone pour les phases carbonatées comme la calcite lors de leur décomposition. Les poudres des échantillons prélevés à différentes profondeurs sont placées dans un creuset d'alumine ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$) puis analysés selon les paramètres présentés précédemment. Les valeurs de perte de masse mesurées par l'appareil permettent de remonter à la perte de masse par minute (ATG) et à sa dérivée (DTG) (Figure 24), qui donnent des informations sur les phases formées ou consommées lors de la bio-détérioration du matériau suite à la formation d'un biofilm à sa surface (Welton et al., 2005).

Les courbes ATG et DTG de poudre de béton (Figure 24) montrent des variations de masse pouvant être attribuées à certaines transformations (Tableau 6) (Villain et al., 2007 ; Drouet, 2010).

Tableau 6. Températures de changement d'état type pour une pâte de ciment jusqu'à 1000°C

Température	Phase
100°C	Evaporation de l'eau libre
130°C	Déshydratation de l'ettringite
200°C jusqu'à 400°C	Décomposition des C-S-H (et les aluminates)
400 -600°C	Déshydroxylation de la portlandite Ca(OH)_2 en chaux libre
600 - 1000 °C	Décomposition du carbonate de calcium (départ d'une molécule de dioxyde de carbone)

**Figure 24.** Courbes type ATG et DTG d'un béton coquillier après 90 jours de cure, dans les 2 premiers mm

2.1.1. Détermination de la quantité de Portlandite Ca(OH)_2

A partir des analyses thermogravimétriques, il est possible d'estimer la quantité de portlandite présente dans le matériau cimentaire étudié. Suite à l'augmentation de la température, la portlandite se décompose en eau et en chaux libre (CaO) (Equation 2-1) :



La quantité de portlandite initiale est déterminée à partir de la mesure de la quantité d'eau dégagée par perte de masse suivant l'équation (2-2) :

$$m_{portlandite} = \frac{M_{portlandite} \times m_{eau}}{M_{eau}} \quad (2-2)$$

Avec $m_{portlandite}$ la masse de la portlandite (g), $M_{portlandite}$ la masse molaire de la portlandite (73 g.mol^{-1}), m_{eau} la masse de l'eau (g) perdue lors de la montée en température (entre 400 et 600°C) spécifique à la décomposition de la portlandite (Tableau 6) et M_{eau} la masse molaire de l'eau (18 g.mol^{-1}).

Pour avoir la quantité de portlandite en pourcentage (%), on divise $m_{portlandite}$ par la masse de l'échantillon que l'on multiplie par 100.

2.1.2. Détermination de la quantité de Carbonate de calcium (CaCO_3)

Le carbonate de calcium va à la suite de l'augmentation de la température se décomposer en dioxyde de carbone et en chaux selon l'équation (2-3) :



Tout comme la portlandite, il est possible d'estimer la quantité de carbonate de calcium présent dans le matériau à l'aide de la perte de masse correspondant cette fois au départ du dioxyde de carbone selon l'équation (2-4) :

$$m_{CaCO_3} = \frac{M_{CaCO_3} \times m_{CO_2}}{M_{CO_2}} \quad (2-4)$$

Avec m_{CaCO_3} la masse du CaCO_3 (g), M_{CaCO_3} la masse molaire du CaCO_3 (100 g.mol^{-1}), m_{CO_2} la masse de dioxyde de carbone (g) perdue lors de la montée en température spécifique à la décomposition du CaCO_3 (entre 600°C et 1000°C , Tableau 6) et M_{CO_2} la masse molaire du CO_2 (44 g.mol^{-1}). La distinction entre les différents carbonates de calcium n'a pas été réalisée. La quantification des CaCO_3 prend en compte la quantité de calcite et d'aragonite.

Pour avoir la quantité de carbonates de calcium en pourcentage (%), on divise m_{CaCO_3} par la masse de l'échantillon que l'on multiplie par 100.

2.2. La diffraction des rayons X (DRX)

La diffraction des rayons X (DRX) permet d'avoir des informations sur l'évolution de la minéralogie du matériau (Welton et al., 2005). Le diffractomètre de rayons X permet d'identifier

de manière qualitative et quantitative la nature de toutes les substances cristallisées, d'origine organique et inorganique. Un faisceau de rayons X est dirigé sur l'échantillon de mortier et un détecteur analyse l'angle de diffraction des rayons X, qui est lié à la structure cristallographique des cristaux présents dans l'échantillon ainsi qu'à leur cristallinité, leur texture cristalline, et leur pourcentage en volume dans l'échantillon. Un diffractogramme est alors tracé, présentant en abscisse les angles diffractés, et en ordonnée, l'intensité de chaque pic. Chaque phase cristalline diffracte les rayons X suivant des angles et des intensités relatives spécifiques, véritable carte d'identité des phases en présence. En comparant les diagrammes observés avec des structures connues il est possible d'identifier et de quantifier les phases présentes dans l'échantillon. Les surfaces des échantillons ont été mesurées à l'aide du diffractomètre TFS à 4 cercles (Ecocorail) équipé d'un détecteur CPS 120 et de la longueur d'onde $\text{Cu K}\alpha_{12}$ (Morales et al., 2002). Le diffractomètre est calibré sur une poudre étalon NIST LaB_6 (srm 660a) pour déterminer la contribution instrumentale (Caglioti et al., 1958). Un angle d'incidence de 3° entre le faisceau incident et la surface analysée est utilisé afin de limiter le signal à la proche surface. Un temps d'acquisition de 12h par point de mesure a été utilisé. L'empreinte de la taille du faisceau sur la surface de l'échantillon reste dans les 1-2 mm^2 pendant la mesure.

Les poudres de mortier ont été analysé à l'aide d'un diffractomètre XPert 2 (tube cuivre), mesurés de $5\text{-}140^\circ$ en 2θ et avec un temps d'acquisition de 3h.

L'identification-quantification de phases est effectuée par recherche dans la base de données ouverte Crystallographie Open Database (COD) (Gražulis et al., 2012) et l'affinement des diagrammes par la méthode de Rietveld opérée à l'aide du logiciel MAUD (Lutterotti et al., 1997). Les mesures ont été effectuées au laboratoire CRISMAT, UMR CNRS 6508, Unicaen (Caen, France).

2.3. La Microspectrométrie Raman (MSR)

La Micro-spectrométrie Raman (Figure 25) est une méthode généralement non destructive, voire non invasive, qui permet de fournir des réponses quant à la composition moléculaire des matériaux et la minéralogie qualitative. Elle est considérée comme totalement non destructive car elle ne nécessite aucun prélèvement, et même aucun contact avec l'échantillon (Vandenabeele et al., 2007). Elle peut aussi être réalisée à partir de poudres d'échantillon. La position et l'intensité des modes de vibration dans un spectre Raman sont liées à la composition et à la structure des molécules (Hedegaard et al., 2006).

Les informations apportées par la spectroscopie Raman sont relativement étendues :

- Identification de phases ou de composés chimiques.
- Caractérisation des matériaux.

- Détermination de la structure moléculaire.
- Étude des systèmes amorphes et cristallins.

Ses performances sont particulièrement remarquables. Il s'agit de la méthode spectroscopique dotée de la meilleure résolution (1 micron) pour l'identification et la caractérisation de composés ou de phases. Sa capacité à identifier les systèmes amorphes est également inégalée.

Tous les spectres Raman présentés ici ont été enregistrés à température ambiante en utilisant un microscope Raman Thermo Fisher Scientific DXR (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) avec un laser à 532 nm comme source d'excitation. Le spectromètre Raman du laboratoire CRISMAT, UMR CNRS 6508, Unicaen (Caen, France) est équipé d'un réseau de diffraction de 900 lignes/mm. Un objectif X 50 longue distance a été sélectionné pour focaliser le faisceau laser sur la surface et collecter la lumière diffusée dans une géométrie de rétrodiffusion.

Les spectres Raman des matériaux présentent des bandes vibrationnelles dans deux régions qui sont souvent traitées séparément : la région entre 3500 et 4000 cm^{-1} correspond aux bandes de vibrations des molécules d'eau. La région entre 2600 et 3500 cm^{-1} correspond aux bandes relatives aux vibrations d'élongation des liaisons CH, et la région entre 50 et 1800 cm^{-1} correspond aux bandes de vibrations spécifiques à chaque matériau (liaisons CH, C=O, C=C, C-O, etc...). Les données ont été collectées entre 50 et 1500 cm^{-1} . Le diamètre du spot laser est estimé à 0,8 μm et la résolution spectrale à 2-3 cm^{-1} . Les spectres Raman ont été systématiquement enregistrés deux fois avec une faible puissance laser (2 mW) et avec un temps d'intégration de 120 s. Nous avons utilisé le logiciel Origin et les courbes gaussiennes comme fonctions d'ajustement élémentaires. Les analyses Raman ont été réalisées à partir de morceaux de mortier fracturé et par comparaison avec les phases répertoriées dans la Raman Open database (El Mendili et al., 2019).



Figure 25. Spectromètre Raman

2.4. Microscope Electronique à Balayage (MEB) couplé à un spectroscope à rayon X (EDS)

La morphologie et la composition chimique des principaux composants minéraux du mortier, à l'échelle du micromètre, ont été analysées au moyen d'un Microscope Electronique à Balayage (MEB) JEOL 7200 LV équipé d'un spectroscope à rayons X à dispersion d'énergie BRUKER (ou EDS, abréviation de l'anglais « Energy Dispersive X-ray Spectroscopy ») (Figure 26), instrument du laboratoire CRISMAT, CNRS UMR 6508, Unicaen (Caen, France).

Après observation au microscope (cf Chapitre 2 IV. 1.4), les échantillons de taille 10 mm x 10 mm x 5 mm sont fixés avec 2,5% de glutaraldéhyde pendant quelques jours dans un tampon cacodylate de sodium 0,2M pH7,4 en présence de 7% de saccharose sont ensuite rincés dans ce tampon. Les échantillons sont alors déshydratés par des bains progressifs d'alcool puis séchés sous vide (200mbar) après deux bains de HMDS (hexamethyldisilazane). Les échantillons sont collés sur un plot de MEB avec un ruban à la colle carbone pour évacuer les charges.

L'EDS permet d'analyser la composition élémentaire en surface de l'échantillon étudié grâce à l'analyse des rayonnements X produit par l'impact du faisceau d'électrons sur l'échantillon. L'analyse chimique élémentaire est effectuée sous une pression contrôlée de 60Pa pour limiter les potentiels accumulation de charges, elle est obtenue avec une tension d'accélération 7kV et environ 1000 cps afin d'exciter les électrons des couches L ou K pour obtenir suffisamment de raies de fluorescence spécifiques des atomes présents à la surface de l'échantillon. La distance échantillon-objectif (marquée WD sur les images) est de 10 mm. Le spectre EDS est composé de pics correspondant aux rayonnements caractéristiques d'un élément spécifique. Les mesures sont réalisées sur une petite zone d'un échantillon rugueux ne peut donner qu'un résultat semi-quantitatif concernant la présence des éléments chimiques. En effet, les rayons X ne sont pas émis avec le même angle de départ sur un échantillon rugueux, et la pression contrôlée perturbe l'analyse élémentaire.

Par la suite les échantillons ont été métallisés afin de les rendre conducteurs et de limiter les potentiels accumulation de charges. Les images MEB ont alors été réalisées sous une tension d'accélération de 3kV et d'un WD d'environ 6mm.



Figure 26. MEB-EDS Jeol 7200 LV

Le MEB couplé à l'EDS permet d'observer, entre autres, la présence de composés amorphes et cristallisés, la texture du matériau ainsi que de détecter la présence de micro-organismes en les caractérisant morphologiquement. Les micro-organismes sécrètent des métabolites spécifiques en fonction de l'espèce fixée et de leur métabolisme. L'effet de cette sécrétion peut également être observé grâce à cette technique en observant l'évolution et donc les changements du matériau par rapport à un matériau référence (matériau non colonisé) (Dubosc et al., 2001; Giannantonio et al., 2009; Welton et al., 2005).

3. Caractérisation mécanique : Résistance à la compression

La caractérisation mécanique d'un matériau permet de mieux appréhender les réponses du matériau suite à son immersion et la colonisation des organismes marins (micro-organismes etc.).

Les essais de compression sur éprouvettes de béton ont été réalisés avec une presse 3R (Figure 27) selon la norme NF EN 12390-3. On utilise des éprouvettes cylindriques de dimension $\varnothing 110 \text{ mm} \times 220 \text{ mm}$. Les deux extrémités de ces éprouvettes sont tout d'abord rectifiées afin d'obtenir deux faces parallèles entre elles et perpendiculaires à l'axe de la force appliquée, homogène sur toute la surface. L'essai est réalisé selon la norme NF EN 206-1. La presse utilisée donne directement la résistance en compression en MPa.



Figure 27. Essai de compression sur éprouvette de béton (\varnothing 110 mm \times 220 mm) après 3 mois d'immersion *in situ*

III. Culture de la souche de diatomée sélectionnée : *C. closterium*

1. Milieu de culture : milieu de Conway

L'espèce *C. closterium* provient de la collection de cultures de micro-algues de l'Université de Caen (AlgoBank). Elle est cultivée dans un milieu dit de Conway (Tompkins et al., 1995). Le milieu de Conway est composé d'eau de mer artificielle et de nutriments essentiels à la croissance des diatomées. Ce milieu est préparé à partir de trois solutions différentes (Tableau 7).

Tableau 7. Mise en œuvre du milieu de culture d'une diatomée

1. Solution principale (composition pour 1L)	
Nitrate de sodium (NaNO_3)	100 g
Di-hydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4)	20g
Acide Ethylènediamine tetraacétique de sodium (Na_2EDTA)	45g
Acide borique (H_3BO_3)	33,6g
Chlorure de manganèse (MnCl_2)	0,36g
Chlorure ferrique (FeCl_3)	1,3g
Solution métallique	1mL
Eau déminéralisée	Qsp 1L

Solution métallique (composition pour 1L)	
Chlorure de zinc (ZnCl_2)	21 g
Chlorure de cobalt hexahydraté ($\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$)	20g
Sulfate de cuivre pentahydraté ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$)	20g
Ammonium heptamolybdate tetrahydraté ($6(\text{NH}_4) \text{Mo}_7\text{O}_{24}, 4\text{H}_2\text{O}$)	9g
Eau déminéralisée	Qsp 1L

2. Solution vitaminique (composition pour 1L)	
Thiamine (Vitamine B_1)	2 g
Cyanocobalamine (Vitamine B_{12})	0.1g
Eau déminéralisée stérilisée	Qsp 1L

3. Solution silicatée (composition pour 1L)	
Métasilicate de sodium ($\text{Na}_2\text{SiO}_3, 5\text{H}_2\text{O}$)	40 g
Eau déminéralisée	Qsp 1L

L'eau de mer artificielle utilisée est fabriquée à partir de sels marins (Instant Ocean®, Spectrum Brand) dosés à 33,3 g/L. Le milieu obtenu se rapproche ainsi de la composition de l'eau de mer naturelle (Atkinson and Bingma, 1997). Le milieu de Conway est ainsi composé de 1 L d'eau de mer artificielle (eau déminéralisée + sels marins) contenant 1 mL de solution principale, 0,1 ml de solution vitaminique et 1 ml de solution silicatée spécifique pour la culture de diatomées.

Un repiquage de la culture est nécessaire pour renouveler le milieu en nutriment. Le but étant de conserver les diatomées cultivées et de les garder en phase de croissance exponentielle. Le procédé consiste à prélever un faible volume de culture (inoculum) dans une solution mère. Cet inoculum (10% du volume final) est ensuite remis en suspension dans une solution fille (Erdogan et al., 2016). Ainsi 90% du volume final est constitué de milieu de Conway. D'après Ferrero, (2018) le repiquage de la culture de diatomées est réalisé tous les 16 jours.

2. Dispositif expérimental des cultures de micro-algues (milieu d'immersion contrôlé en laboratoire)

La diatomée *C. closterium*, est un organisme photosynthétique. Elle a ainsi un besoin vital en lumière pour se développer. Les cultures sont ainsi exposées à la lumière en cycle journalier jour/nuit (12h :12h) (Figure 28). Les lampes utilisées sont des LED X-change tube Daylight Sunrise (SERA) allant à des longueurs d'ondes de 450 nm (bleu) et de 625 nm (rouge) spécifique à ce que les micro-algues sont capables d'absorber en lumière lors de la photosynthèse. Les cultures sont placées dans une chambre climatique contrôlée dont la température est réglée à $19,5 \pm 1$ °C. Un système d'injection d'air (Figure 28) est mis en place dans la culture permettant en outre la remise en suspension des micro-algues benthiques et une disponibilité optimale des éléments nutritifs.

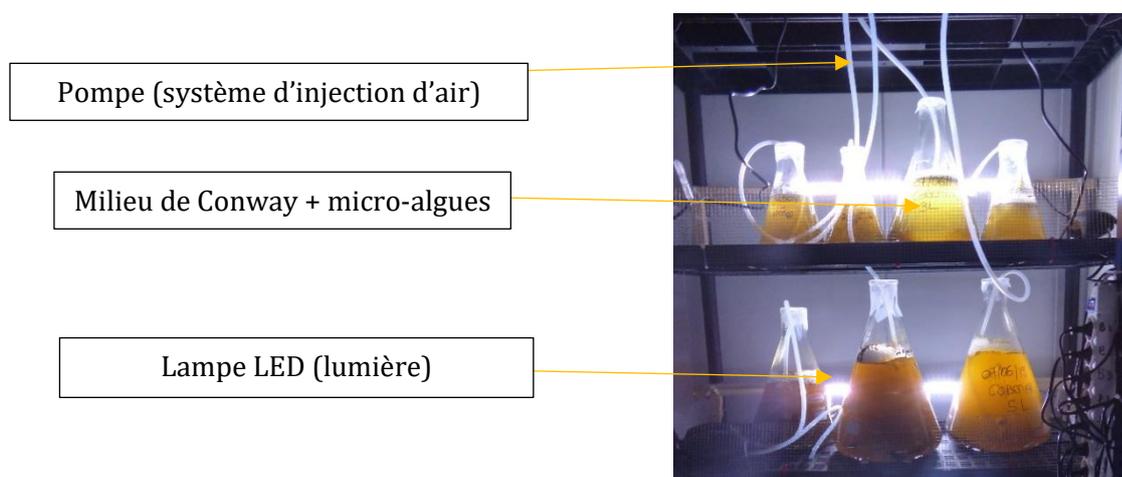


Figure 28. Dispositif expérimental de la culture de la diatomée « *C. closterium* »

3. Caractérisation biologique suite à la colonisation du matériau

3.1. Suivi de la colonisation

Un matériau cimentaire immergé après 90 jours de cure est rapidement colonisé par des micro-organismes. Le suivi de la colonisation du matériau a été évalué à l'aide de différents appareils détaillés dans cette partie.

3.1.1. Evaluation de la biomasse et des paramètres photosynthétiques : Mesure PAM

La mesure de la fluorescence par la méthode PAM (Pulse Amplitude Modulation) permet de déterminer les paramètres photosynthétiques des biofilms marins. Pour effectuer ces mesures, un Junior PAM (Walz Teaching-PAM fluorometer) a été utilisé. Le JUNIOR-PAM est contrôlé par un PC via une interface USB et le logiciel WinControl-3 permettant la visualisation des mesures.

Une fibre optique (de 40 cm de long et 1,5 mm de diamètre) reliée au PAM a été utilisée pour les mesures. La mesure des paramètres photosynthétiques est effectuée directement sur la surface du matériau (Figure 29). Le suivi de la colonisation a été effectué sur des échantillons cylindriques (diamètre = 110 mm et hauteur = 50 mm). Cette mesure est non destructive pour le matériau et pour le biofilm présent en surface.

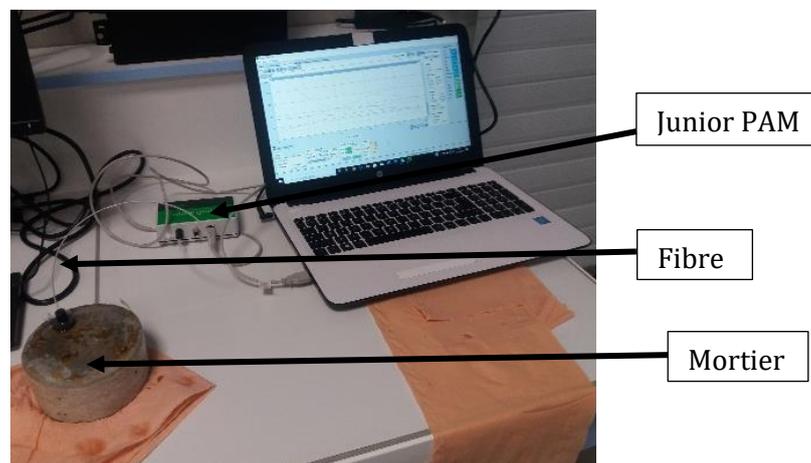


Figure 29. Mesure PAM à la surface du matériau

Les échantillons sont tout d'abord placés à l'obscurité pendant 10 minutes. L'obscurité permet de s'assurer de l'oxydation des premiers accepteurs d'électrons des Photosystèmes II (PS_{II}) appelé Quinones A (Q_A) situés dans les chloroplastes des micro-algues. La mesure des paramètres photosynthétiques est très rapide (milliseconde) et permet de connaître l'émission de fluorescence de la Chl_a du PS_{II} après que l'échantillon ait été exposé à un flash de lumière saturante

bleue (450 nm). Après 10 minutes d'acclimatation à l'obscurité, la mesure des paramètres photosynthétiques a été effectuée directement sur la surface du matériau après chaque jour étudié. L'échantillon est d'abord excité par une faible lumière bleue ($1 \mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 450 nm, la fréquence des impulsions de mesure est de 5Hz) pour enregistrer la fluorescence minimale (F_0). F_0 est un indice de la biomasse chlorophyllienne. Elle est exprimée sur la base d'unités arbitraires d'absorbance relative (u.a). Un premier flash lumineux de haute intensité LS (0,6s, $1500 \mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 450 nm) est ensuite appliqué. On obtient ainsi la fluorescence (F_m) correspondant à la fluorescence maximale, Figure 30) permettant de réduire tout le pool des Quinones A (Q_A).

L'état physiologique des cellules algales est obtenu grâce à la mesure du rapport F_v/F_m ou rendement quantique maximal du PS_{II} . Il est maximum après une période d'acclimatation à l'obscurité : c'est-à-dire quand le pool de l'accepteur primaire des électrons (quinones A) est complètement oxydé et prêt à recevoir les électrons. Le rapport F_v/F_m a été calculé selon l'équation 2-5 (Genty et al., 1989) :

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{(F_m - F_0)}{F_m} \quad (2-5)$$

Avec F_v : augmentation du rendement de fluorescence durant un flash saturant ; F_0 : rendement de fluorescence minimale après acclimatation à l'obscurité ; F_m : rendement de fluorescence maximale, d'un échantillon acclimaté à l'obscurité atteint durant un flash de lumière saturant.

L'efficacité de la séparation de charge PS_{II} mesurée par le rendement quantique (F_v/F_m) est largement utilisée comme indicateur du stress nutritionnel des cellules du microphytobenthos (Juneau et al., 2005). Le rapport F_v/F_m doit être compris entre 0,5 et 0,7 pour considérer les cellules algales en bon état physiologique, sans stress et donc bien acclimatées à leur milieu environnant. En revanche si les cellules se retrouvent en dessous de 0,3, elles sont considérées en mauvais état physiologique.

Ensuite, une gamme de lumière actinique (L_{Ai}) d'irradiances croissantes (E_i) est appliquée pendant un temps donné à l'échantillon et pour chaque irradiance (E_i), une fluorescence de base stable ($F_{s,i}$) est atteinte. Un flash de lumière LS est émis pour chaque irradiance et la fluorescence $F_{m,i}$ est alors déterminée (Figure 30). Les échantillons sont ainsi exposés à neuf irradiances de 0 à $420 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pendant 55 secondes.

Le taux de transport relatif des électrons rETR (relatif Electron Transport Rate) est calculé selon l'équation 2-6 :

$$rETR(E) = \frac{F_{m,i} - F_{s,i}}{F_{m,i}} \times E \quad (2-6)$$

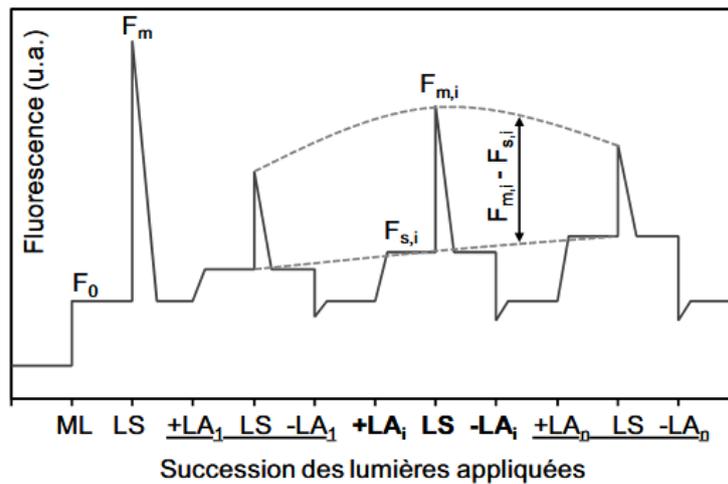


Figure 30. Schéma d'irradiation appliqué en mesure PAM (avec F_0 : rendement de fluorescence minimale après acclimatation à l'obscurité ; F_m : rendement de fluorescence maximale, d'un échantillon acclimaté à l'obscurité atteint durant un flash de lumière saturant ; $F_{m,i}$: rendement maximal de fluorescence d'un échantillon acclimaté à une certaine intensité lumineuse atteint durant un flash saturant ; $F_{s,i}$: fluorescence de base stable ; ML : Lumière de mesure de faible intensité ; LAi : Lumière actinique)

Pour estimer les paramètres photosynthétiques, le taux de transport relatif des électrons (rETR, relative Electron Transport Rate ; relative unit) a été calculé pour chaque irradiance (E). Le modèle mécaniste développé par Webb et al., (1974) est appliqué pour ajuster les données en estimant le α correspondant à l'efficacité maximale d'utilisation de la lumière (pente aux faibles éclaircissements) ($\mu\text{mol électrons} \cdot \mu\text{mol photons}^{-1}$) et le E_k correspondant à l'indice de saturation de la lumière ($\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) (équation 2-7) :

$$rETR = \alpha \times E_k \times (1 - e^{-\frac{E}{E_k}}) \quad (2-7)$$

Ensuite, le plateau atteint à saturation lumineuse mesure la capacité photosynthétique soit le taux maximal de transport relatif des électrons ($rETR_{max}$, $\mu\text{mol électrons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) est calculé comme suit (équation 2-8) :

$$rETR_{Max} = \alpha \times E_k \quad (2-8)$$

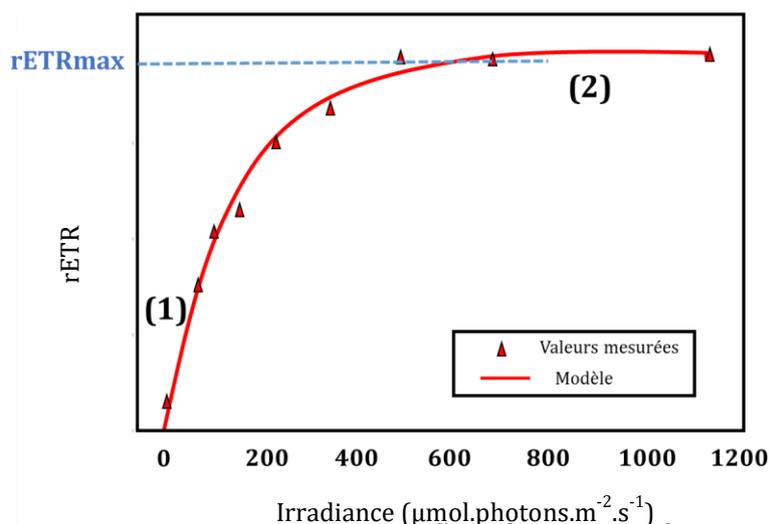


Figure 31. Courbe de réponse à la lumière rETR vs E permettant de connaître les paramètres photosynthétiques. Sur la courbe on peut observer une région limitée par la lumière, notée (1). On peut ainsi observer une région de saturation par la lumière sous forme de plateau noté (2).

Les mesures sont réalisées sur des triplicatas puis moyennées pour avoir une estimation de la capacité photosynthétique du biofilm fixé sur les matériaux cimentaires étudiés.

3.1.2. Le taux d'encrassement

Le taux d'encrassement dans le milieu marin est un indice de la colonisation des matériaux, c'est une mesure non destructive, basée sur les valeurs de réflectance, mesurées à l'aide d'un spectromètre portable Ci60 (X-Rite) (Figure 32a) sur une gamme de longueurs d'ondes allant de 400 nm à 700 nm. Ces mesures ont été réalisées sur les éprouvettes de diamètre \varnothing 110 mm×50 mm.



Figure 32. Spectrocolorimètre utilisé (Ci60 (X-Rite)) (a) ; disposition de l'emplacement des mesures au spectromètre réalisées (ronds noirs) (b)

Les éprouvettes sont tout d'abord nettoyées très délicatement avec une pipette contenant de l'eau de mer artificielle, sans faire éclater les cellules algales. Ce nettoyage permet également d'enlever les impuretés et les diatomées non fixées sur les éprouvettes.

La réflectance R_{λ} correspond à la fraction de lumière réfléchiée par une surface en fonction de la longueur d'onde (λ). En l'absence de biofilm à la surface du matériau cimentaire, la lumière incidente est assez fortement réfléchiée à toutes les longueurs d'ondes. En revanche, en présence de biofilm, la lumière réfléchiée est plus faible à certaines longueurs d'ondes. En effet les pigments photosynthétiques des micro-algues, dont la chlorophylle *a*, absorbent la lumière rouge autour de 670 nm. On observe ainsi une diminution importante de la réflectance à cette longueur d'onde.

A partir de ces valeurs de réflectance, il est alors possible de quantifier la densité des micro-algues après x (10, 30, 90...) jours d'immersion du matériau cimentaire à l'aide de l'équation ci-dessous (De Muynck et al., 2009) (équation 2-9) :

$$\text{Intensité d'encrassement}(\%) = (R_{700nm} - R_{670nm})x_{im} - (R_{700nm} - R_{670nm})x_{0s} \quad (2-9)$$

Avec R_{700nm} et R_{670nm} à x_{im} (jours mouillés) correspondant au pourcentage de réflectance à 700 nm et 670 nm pour un matériau immergé après x_i jours d'immersion et x_{0s} R_{700nm} et R_{670nm} à 0 jour sec correspondant au pourcentage de réflectance à 700 nm et 670 nm pour un matériau sec jamais immergé (matériau référence).

La zone analysée est un cercle de 8 mm de diamètre. La mesure est effectuée 5 fois, à différents endroits d'une éprouvette afin de caractériser au maximum la surface de l'éprouvette colonisée (Figure 32b). Cette surface prend en compte la surface qui sera grignotée lors des essais de caractérisation chimique du matériau pour comprendre l'effet de l'accumulation de biomasse sur la matrice.

Ces mesures sont réalisées sur les 3 éprouvettes puis moyennées afin d'avoir une estimation du recouvrement algal après x jours d'immersion dans un environnement spécifique.

3.1.3. Suivi photographique

A chaque sortie des échantillons des différents milieux d'immersions, une photo à l'aide d'un appareil photo (éprouvettes Ø110 mm×50 mm) ou d'un scan (éprouvettes 40 mm × 40 mm × 160 mm) est réalisé pour suivre la colonisation du matériau immergé au cours du temps.

3.1.3.1. Observation par microscopie numérique et par macroscopie optique et par fluorescence

Le Microscope numérique (Keyence - VHX-6000) (Figure 33a) est utilisé pour analyser et observer les organismes marins fixés à la surface du matériau à différents grossissements. La

répartition de la biomasse algale peut être observée et permet l'identification des espèces marines à partir de captures d'images prises à la surface du matériau. Le suivi de la colonisation des éprouvettes issues des différents milieux d'immersions peut ainsi s'effectuer.

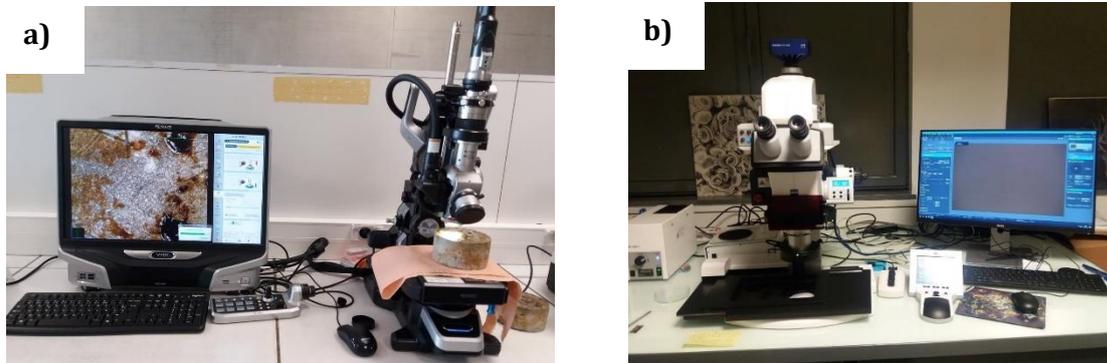


Figure 33. Observation au microscope Keyence des éprouvettes après colonisation **(a)** ;
Macroscopie Zeiss **(b)**

La colonisation marine à la surface du matériau a également été observée à l'aide d'un macroscopie ZEISS (observation au grossissement X20 et X80) (Figure 33b). Les observations macroscopiques ont été réalisées au sein du laboratoire CMAbio3 Unicaen (Caen, France). L'échantillon utilisé pour ce test est un mortier de dimension 10 mm x 10 mm x 5 mm. Les observations macroscopiques sont réalisées à partir du mortier immergé dans un environnement donné. Les échantillons sont placés dans une petite boîte de pétri où une couche d'eau provenant du milieu d'immersion recouvre l'échantillon. Les observations sont réalisées peu de temps après la sortie de l'échantillon pour conserver au maximum les pigments photosynthétiques des micro-algues ou macro-algues fixées à la surface. Un filtre noir est placé sous l'optique pour limiter la réverbération de la lumière.

La fluorescence EGFP (émission de fluorescence de couleur verte) a été utilisée pour visualiser la biomasse fixée en surface grâce au pigment chlorophyllien caractéristique des micro-algues (observation au grossissement X20 et X80) (Figure 34a). Le taux de recouvrement chlorophyllien de la surface de l'échantillon a été estimé en utilisant le logiciel Image J. Les images de fluorescence obtenues à partir du macroscopie sont binarisées en pixels blancs (zone colonisée) et noirs (zone non colonisée) (Figure 34b).

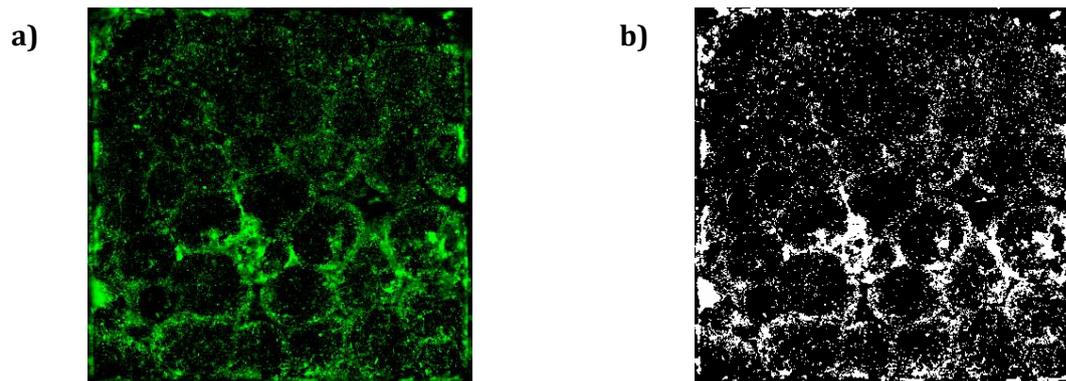
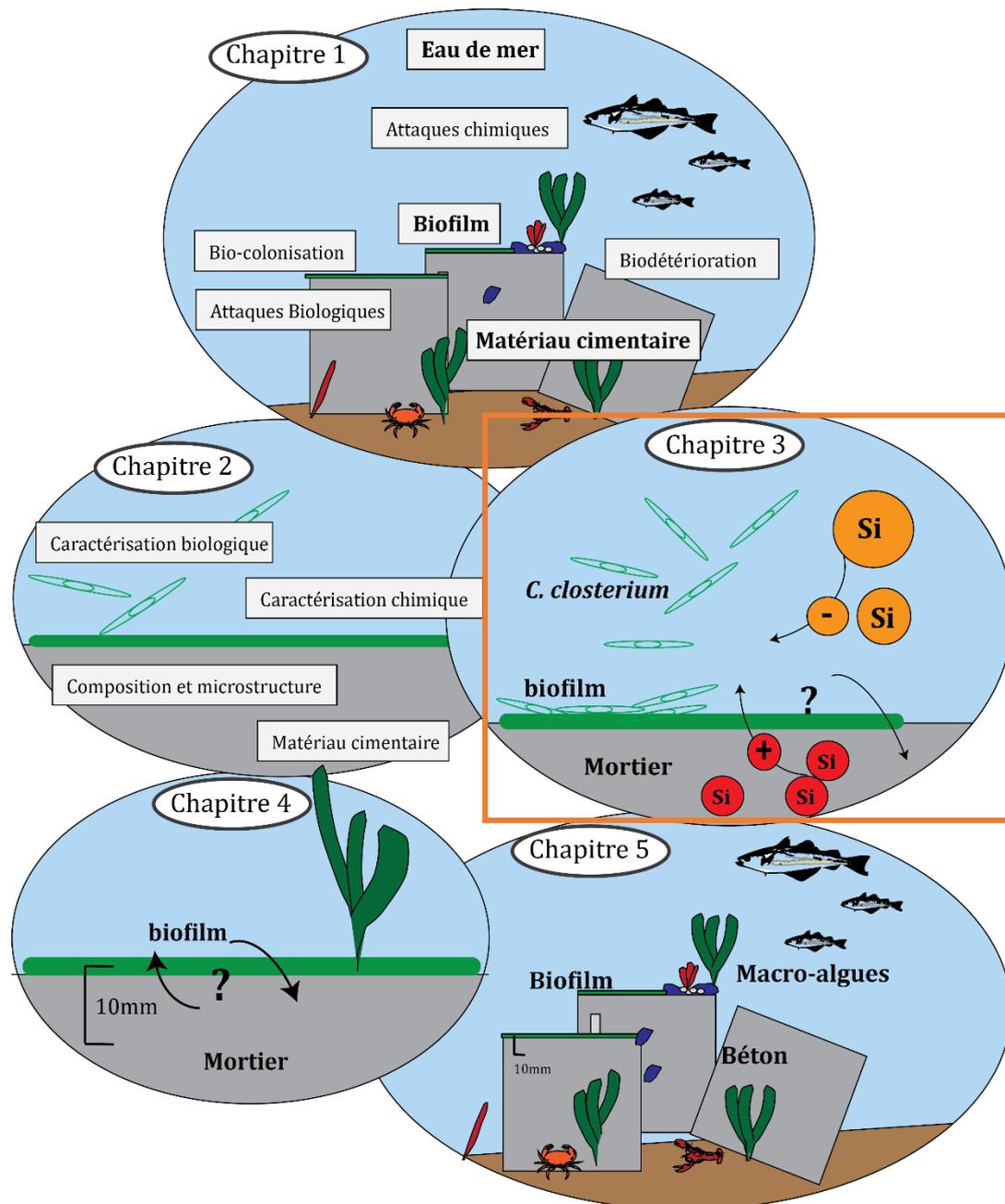


Figure 34. Observation macroscopique de mortier colonisé par diverses micro-algues après fluorescence **(a)** et une fois binarisée en noir et blanc **(b)**

Chapitre 3 : Interaction entre un mortier siliceux et *Cylindrotheca closterium* dans un milieu carencé en silice.



Introduction

L'objectif de ce chapitre est d'explorer l'interaction entre un matériau cimentaire et un biofilm constitué de diatomées benthiques *C. closterium*. Cette étude s'est principalement intéressée à la demande de ces micro-algues en Silicium pour leur croissance. En effet, celui-ci constitue leur frustule. Le substrat utilisé est un mortier cimentaire.

La capacité de *C. closterium* à assimiler la silice dissoute relarguée par le mortier a été étudiée. Une première étape a été consacrée au suivi de la cinétique de dissolution de la silice provenant du mortier. Dans un deuxième temps, une expérience en laboratoire a été réalisée dans le but d'évaluer la possibilité d'assimilation de la silice dissoute à partir du mortier par les diatomées pour leur croissance. Dans ce contexte, des cultures discontinues de type « batch » de *C. closterium* ont été réalisées sous limitation de silice avec ou sans la présence de mortier dans le milieu. La cinétique de croissance des diatomées et plusieurs performances physiologiques ont également été étudiées.

I. Dispositif expérimental

1. Echantillons de mortier

Les essais ont été réalisés sur du mortier siliceux comme présenté dans le chapitre 2. Les mortiers siliceux 40 mm × 40 mm × 160 mm ont été préalablement coupés, à l'aide d'une scie de précision, en cubes avec une dimension de 10 mm × 10 mm × 5 mm (Figure 35).

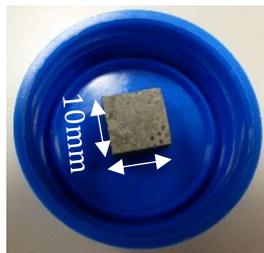


Figure 35. Taille des échantillons de mortier étudiés (10 mm × 10 mm × 5 mm).

2. Mise en place du dispositif expérimental

Afin d'investiguer l'interaction entre le mortier et la diatomée *C. closterium*, la concentration en silicium dissous dans le milieu, la croissance des diatomées ainsi que les paramètres physiologiques ont été mesurés dans quatre différentes conditions et à différentes échéances (E1 et E2) (Figure 36) :

- **Condition 1 (M+/Si-/Cc-)** : avec le mortier (M+), sans addition de Si(OH)_4 (Si-), sans inoculum de *C. closterium* (Cc-) pendant 30 jours (E1),
- **Condition 2 (M+/Si-/Cc+)** : avec du mortier (M+), sans addition de Si(OH)_4 (Si-), avec inoculum de *C. closterium* (Cc+) sur 15 jours (E2),
- **Condition 3 (M-/Si+/ Cc+)** : sans mortier (M-), avec ajout de Si(OH)_4 (Si+), avec inoculum de *C. closterium* (Cc+) sur 15 jours (E2),
- **Condition 4 (M-/Si-/Cc+)** : sans mortier (M-), sans ajout de Si(OH)_4 (Si-), avec inoculum de *C. closterium* (Cc+) sur 15 jours (E2).

La comparaison des conditions 1 et 2 a pour objectif d'évaluer si la dissolution du mortier (mesurée dans la condition 1) permet de supporter la croissance de diatomée (condition 2) et d'évaluer l'évolution de cette interaction dans le temps. Les conditions 3 et 4 sont des témoins des conditions 1 et 2. La condition 2 et la condition 3 permettent de comparer la cinétique de croissance des diatomées soutenue par la dissolution du mortier à une culture enrichie directement en Si(OH)_4 . La condition 4 permet d'évaluer l'évolution de la croissance de *C. closterium* dans des conditions carencées en Si. Cette condition comparée à la condition 2 permet d'établir l'effet de l'interaction entre le mortier et la diatomée.

Dans cette étude, toute contamination externe par du Si a été évitée (utilisation de matériels en polypropylène).

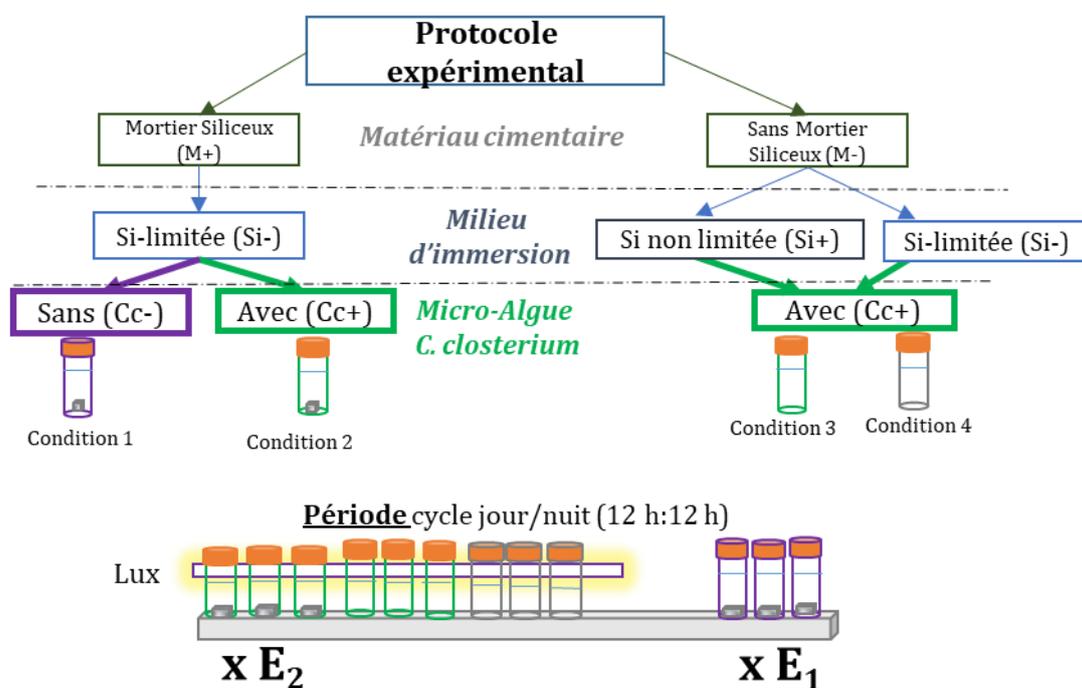


Figure 36. Dispositif expérimental

2.1. Milieux d'immersion

Le premier milieu d'immersion avec du mortier contient de l'eau de mer artificielle et est enrichi en milieu de Conway (Tompkins et al., 1995) (exempt de solution silicatée) source de nutriments pour les micro-algues. Le mortier a été fixé au bouchon du tube. Ce milieu est appelé condition 1 (M+/Si-/Cc-) (Figure 37a). Les tests ont été réalisés en triplicata. Le rapport poids (g) du mortier sur volume (mL) du milieu d'immersion ($g/v = 0,023$) a été maintenu constant pour tous les tests. La condition 2 (M+/Si-/Cc+) a été obtenue après avoir inoculé les micro-algues dans la condition 1, préalablement centrifugées afin d'éliminer tout ce qui provient du milieu de culture (notamment les nutriments), (Figure 37b).

Les milieux témoins nommés condition 3 (M-/Si+/Cc+) et condition 4 (M-/Si-/Cc+) ne contiennent pas de mortier mais contiennent l'eau de mer artificielle enrichi en milieu de Conway respectivement avec ajout ou non de solution silicatée. Comme décrit pour la condition 2, les micro-algues sont préalablement centrifugées et rincées avant d'être inoculées dans les milieux 3 et 4. Pour l'ensemble des expérimentations, les cultures sont cultivées à 19 °C sous un cycle lumière/obscurité (12 h : 12 h) en batch, c'est-à-dire sans renouvellement de milieu ou ajout de sels nutritifs pendant la durée du suivi. Les incubations sont régulièrement mélangées pour toutes les conditions appliquées.

a)



b)



Figure 37. Dispositif expérimental de la dissolution du mortier immergé dans la condition 1 (a) et condition 2 (b).

3. Suivi de la dissolution de la Silice du mortier

La cinétique de dissolution de la silice du mortier a été étudiée pour différentes durées en fonction de la condition étudiée en mesurant la concentration d'acide silicique dans le milieu. La durée de la phase expérimentale a été fixée à 30 jours (E1 : jour 1-2-3-6-9-12-15-20 et 30) pour la condition 1 (M+/Si-/Cc-). Cette large plage de temps permet de déterminer jusqu'à combien de temps le Si(OH)_4 serait disponible en solution pour les micro-algues. Pour les conditions 2 (M+/Si-/Cc+), 3 (M-/Si+/Cc+) et 4 (M-/Si-/Cc+), la phase expérimentale s'est déroulée sur 15 jours (E2 : jour 1, 2, 3, 6, 9, 12 et 15). Cette différence d'échéances entre les conditions sera expliquée plus précisément dans la partie résultats.

Après chaque échéance, la concentration en DSi (Si(OH)_4) du milieu d'immersion est mesurée à l'aide d'un analyseur automatique de type Seal Analytical AA3 HR (Aminot et Kérouel, 2007) qui est basé sur une méthode colorimétrique. Lorsque des cellules algales sont présentes dans le milieu (conditions 2, 3 et 4), une centrifugation est nécessaire avant le prélèvement afin de récupérer uniquement la DSi (surnageant). L'assimilation nette de la silice par les diatomées sera estimée par jour.

4. Estimation de la Silice Biogène (bSi)

Afin d'évaluer la formation du frustule, la teneur en bSi par cellule a été mesurée. Le culot contenant les micro-algues après la centrifugation (partie 3.) est remis en suspension dans 10 mL d'eau de mer artificielle (Figure 39). La concentration cellulaire a été estimée par comptage des cellules à l'aide d'une chambre de comptage Mallassez (Figure 38 et Figure 39) et d'un microscope optique à un grossissement de 150 \times . Cette densité de cellule permet d'avoir un indice de la biomasse présente en solution. Cet indice de biomasse est important pour faire le lien avec la teneur en bSi par cellule.

Le comptage a été réalisé sur 5 rectangles. Le volume total de la cellule de Malassez est de $0,2 \times 2 \times 2,5 = 1 \text{ mm}^3$ soit 10^{-3} ml soit $1 \mu\text{l}$ (Figure 38).

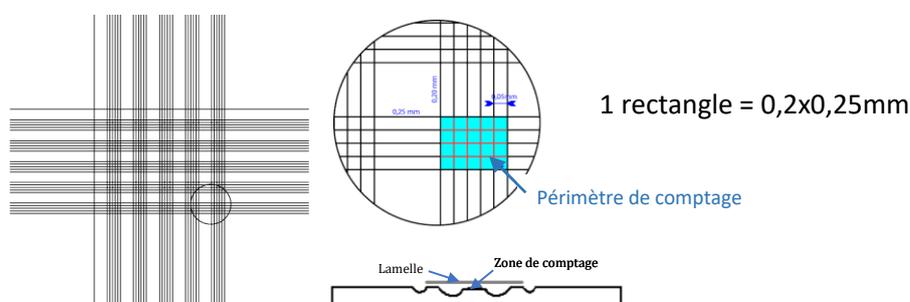


Figure 38. Cellule de Malassez (IUT Laval)

Après rinçage des cellules dans de l'eau de mer artificielle, la solution est de nouveau centrifugée pendant 10 min (3000 tr/min, 19 °C) (Figure 39). Le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension dans 10 ml de NaOH (0,2 M) pour réaliser l'hydrolyse alcaline de la silice biogène pendant 45 min. La solution est régulièrement agitée pour assurer la dissolution de toute la bSi (Ragueneau and Tréguer, 1994). 1 ml de solution a été dilué dans 9 ml d'eau MilliQ. Les échantillons ont été conservés au réfrigérateur jusqu'à l'analyse. Tout comme pour la DSi (partie 3.), les concentrations en bSi ont été déterminées à l'aide d'un auto-analyseur de type Seal Analytical. À partir de ces données, la teneur en bSi par cellule est calculée.

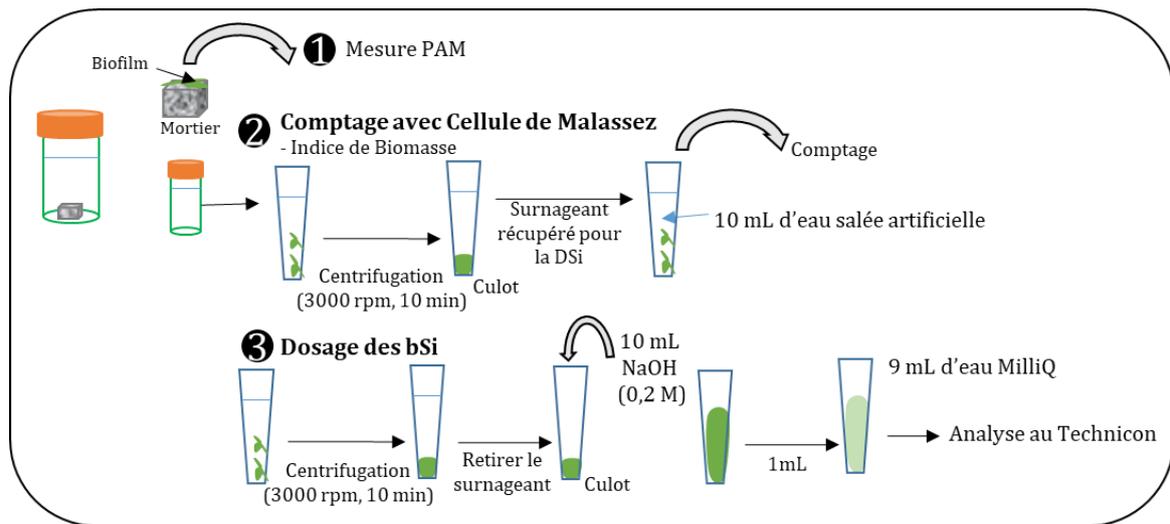


Figure 39. Protocole expérimentale réalisé à X jours.

5. Mesure du pH

Un suivi du pH du milieu d'immersion a été réalisé tout au long de l'expérience (une mesure par jour) à l'aide d'un pH-mètre 510 (Eutech instrument). Ces mesures ont été effectuées afin d'évaluer l'effet du pH sur la cinétique de dissolution de la silice.

6. Mesure de la surface cellulaire et du biovolume

Les dimensions des cellules ont été mesurées à l'aide d'une capture d'image au microscope numérique Keyence VHX-6000 (à un grossissement de 500×). Les estimations du biovolume (V) (équivalent à la biomasse réelle) ont été réalisées à partir de la moyenne des dimensions linéaires en utilisant les formules géométriques appropriées reflétant la forme de la cellule (Hillebrand et al., 1999). La mesure des dimensions a été réalisée à partir de 10 cellules prises au hasard sur l'image capturée au microscope.

Le calcul du volume des cellules a été effectué avec l'hypothèse de la forme « rotationnel ellipsoïde » en utilisant l'équation 3-1 (Olenina et al., 2006) :

$$\text{Biovolume (V)} = \frac{\pi}{6} \times \text{Longueur} \times \text{Diamètre}^2 \quad (3-1)$$

Où V est en μm^3 et L et D est en μm .

La surface cellulaire (S) est tirée des travaux de Hillebrand et al., (1999) (équation 3-2) :

$$\text{Surface (S)} = \frac{\pi D}{2} \times \left(D + \frac{L^2}{\sqrt{L^2 - D^2}} \sin^{-1} \frac{\sqrt{L^2 - D^2}}{L} \right) \quad (3-2)$$

Le biovolume (V), la surface (S) et le rapport S/V sont des paramètres liés à la productivité et au métabolisme des micro-algues.

7. Extractions de la chlorophylle *a*

Les extractions de la chlorophylle *a* (Chl *a*) ont été réalisées sur un biofilm prélevé sur un mortier après 1 jour d'incubation dans les mêmes conditions que l'expérimentation. Le biofilm a été prélevé avec une brosse à dents lisse sur la surface du mortier puis il a été dilué dans 10 ml d'eau de mer artificielle (33,3 g.L⁻¹). 10 ml d'acétone à 90% (v/v) ont été ajoutés pour l'extraction du pigment puis les échantillons ont été laissés 12 h dans l'obscurité à 4°C. Après deux centrifugations pendant 5 min à 1700 g, la concentration en Chl *a* a été mesurée à l'aide d'un fluorimètre Trilogy (Turner Designs, Sunnyvale, USA) selon la méthode de Strickland and Parsons (1972).

Ces données nous ont permis de calculer un rapport entre F_0 (indicateur de biomasse) et Chl *a* ($\mu\text{g.m}^2$) sur 3 échantillons qui est :

$$\frac{F_0}{\text{Chl } a} = 3,14 \quad (3-3)$$

Ce rapport permettra d'estimer la quantité de Chl *a* pour chaque échantillon à chaque échéance à partir du F_0 (indice de biomasse chlorophyllienne) obtenue lors des mesures PAM.

8. Analyse des données

Des analyses de variance à mesures répétées (ANOVA RM) ont été réalisées à l'aide de SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc. Chicago, USA), suivies d'une comparaison multiple par paires (test de Tukey) lorsque les tests de normalité de Shapiro-Wilk et d'égalité de variance (homoscédasticité) ont respectivement réussi ($>0,05$). En cas d'échec des tests de normalité ou d'égalité ($<0,05$), une analyse de variance à mesures répétées de Friedman par rangs a été appliquée, suivie d'une comparaison multiple par paire (test de Tukey). Les différences ont été considérées comme significatives lorsque la valeur p était inférieure à 0,05.

II. Etude de l'interaction entre le mortier et la diatomée étudiée

1. Cinétique de dissolution de la silice du mortier sans et avec la présence de micro-algues dans le milieu.

La Figure 40a montre la cinétique de dissolution de la silice du mortier dans la condition 1 (M+/Si-/Cc-). La concentration en DSi (Si(OH)_4) augmente dans le milieu jusqu'à atteindre son maximum après 2 jours avec une valeur de $99,84 \mu\text{mol.L}^{-1}$. A partir du 2^{ème} jour, la concentration en silice dissoute diminue jusqu'à atteindre des valeurs inférieures à $6 \mu\text{mol.L}^{-1}$ après 6 jours d'expérimentation. La DSi n'est plus disponible dans le milieu à la fin de l'expérience (jour 30 ($1,89 \mu\text{mol.L}^{-1}$)). Cette diminution de la concentration en DSi est combinée à une augmentation du pH jusqu'à la fin de l'expérience avec un pH de 9,7 au jour 30.

La Figure 40a montre également la cinétique de dissolution de la silice du mortier une fois que les micro-algues ont été introduites dans le milieu (condition 2, (M+/Si-/Cc+)). La concentration en DSi augmente pendant les 2 premiers jours ($11,39 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et $21,51 \mu\text{mol.L}^{-1}$ au jour 1 et 2 respectivement) puis diminue à partir du jour 3 jusqu'à atteindre des valeurs inférieures à $9,82 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Il est à noter également que les concentrations en DSi sont beaucoup plus faibles dans la condition 2 (M+/Si-/Cc+) que dans la condition 1 (M+/Si-/Cc-). Il en ressort que la DSi disponible dans le milieu a été absorbé par les micro-algues. Après 15 jours, ce nutriment est totalement épuisé. Ces résultats expliquent l'arrêt de l'expérience à cette échéance.

La Figure 40b montre la teneur en DSi disponible dans les milieux de contrôle (la condition 3 (M-/Si+/Cc+) et de la condition 4 (M-/Si-/Cc+)). Initialement, le milieu témoin non limité en Si (condition 3, M-/Si+/Cc+) contenait $190 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de DSi (contenu dans le milieu de Conway). Comme dans la condition 2 (M+/Si-/Cc+), la quantité de silice dissoute diminue pour atteindre des valeurs proches de 0 après 9 jours.

Les diatomées assimilent progressivement la DSi disponible dans le milieu jusqu'à son épuisement (DSi disponible totalement consommée). La DSi dans le milieu témoin limité en Si (condition 4, M-/Si-/Cc+) (Figure 40b) est proche de 0. Ce résultat confirme que le milieu étudié est exempt de silice dissoute (Si(OH)_4).

D'après le test de Friedman, nous observons une différence significative ($P = <0.001$) dans la concentration en DSi entre les différents milieux. Le test de Tukey a révélé qu'il n'y avait pas de différence significative entre les conditions 1 et 3 et entre les conditions 1 et 2 ($P = 0.405$).

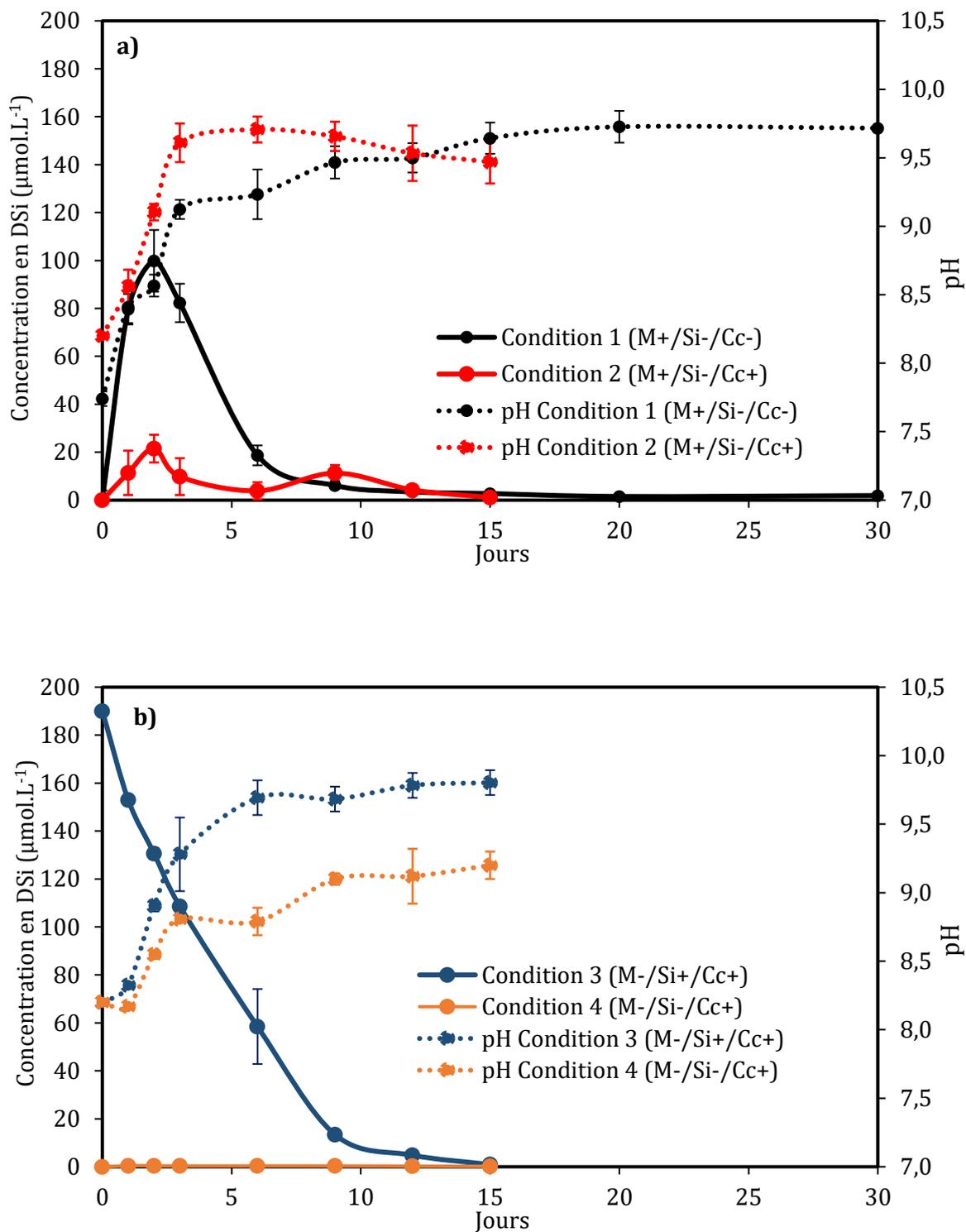


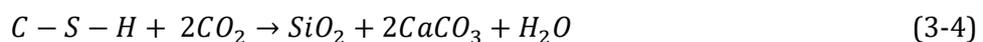
Figure 40. Concentration en silice dissoute et pH mesurés dans la condition 1 (M+/Si-/Cc-) et condition 2 (M+/Si-/Cc+) **(a)** dans les conditions de contrôle (condition 3 (M-/Si+/Cc+) et condition 4 (M-/Si-/Cc+)) **(b)**. Les moyennes \pm la plage de trois répétitions sont indiquées.

Une augmentation significative du pH, de 7,74 (jour 0) à 9,1, a été observée après trois jours d'expérience dans la condition 1 (M+/Si-/Cc-) (Figure 40a). L'évolution du pH dans la condition 2 (M+/Si-/Cc+) suit la même tendance que dans la condition 1 (M+/Si-/Cc-) (Figure 40a) avec un pH de 8,2 au Jour 0 et un pH=9,6 au Jour 3. Ainsi, un pH plus alcalin est obtenu dans la condition 2. Par ailleurs, une stabilisation des valeurs de pH est enregistrée après 9 jours dans les deux conditions. Dans la condition 2 (M+/Si-/Cc+), le pH du milieu environnant change avec la lixiviation de la matrice cimentaire induite par l'activité biologique du biofilm et l'attaque chimique de l'eau de mer. Nos résultats suggèrent que la photosynthèse induisant la fixation du dioxyde de carbone par les micro-algues conduit à un pH plus élevé dans le milieu par rapport à un milieu sans diatomée (Falkowski and Raven, 1997).

Dans les conditions témoins (3 et 4) (Figure 40b), le pH augmente également progressivement dans le milieu au cours de l'expérience, ne dépassant pas 9,2 pour la condition 4, contrairement à la condition 3 où une élévation du pH jusqu'à 9,8 est observée. D'après l'ANOVA RM, il existe une différence significative ($P = <0,001$) de pH entre les différents milieux. Le test de Tukey a révélé que le pH du milieu n'était pas significativement différent entre les conditions 2 et 3 et entre les conditions 3 et 1 contrairement aux autres.

Les résultats de la cinétique de dissolution de la silice du mortier ont montré une concentration élevée de DSi pendant les premiers jours de l'expérience. La vitesse de dissolution de la silice amorphe augmente avec le pH (Iler, 1980). Ainsi si la silice dissoute dans le milieu provient de la silice amorphe du mortier cela pourrait expliquer l'augmentation de la concentration de DSi dans la condition 1 (M+/Si-/Cc-) pendant les premiers jours de l'expérience. Les concentrations de DSi obtenues dépassent la constante de demi-saturation en silicate ($K_{1/2}$) de *C. closterium* qui est égale à $9,58 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Sunlu et al., 2006). Par conséquent, dans la condition 2, au cours des premiers jours, selon la concentration en DSi, le Silicium devrait être disponible pour les diatomées à un taux d'absorption élevé. En effet, une modification de la cinétique de dissolution de la silice dans la condition 2 (M+/Si-/Cc+) est observée Figure 40a. Ces résultats indiquent que les diatomées *C. closterium* sont capables d'assimiler la silice dissoute, sous forme de DSi, provenant du mortier pour leur métabolisme.

La dissolution de la silice du mortier peut être attribuée à la décalcification de la phase minérale hydratée : C-S-H (Calcium Silicate Hydrate) (équation 3-4) (Sadati et al., 2016). En effet, la décalcification du C-S-H conduit à la formation de SiO_2 . De plus, aux pH de l'eau de mer, les liaisons silice-siloxane sont hydrolysées (Dove, 1994) conduisant à sa dissolution sous la forme DSi (Si(OH)_4) (équation 3-5).





Dans la condition 1 (M+/Si-/Cc-), une diminution progressive de la concentration en DSi est observée. Elle est associée à une augmentation du pH de la solution jusqu'à la fin de l'expérience. L'augmentation du pH est due à l'attaque chimique du mortier par l'eau de mer artificielle. Cette attaque favorise la dissolution de la portlandite (Ca(OH)_2) conduisant à l'augmentation des concentrations en ions Ca^{2+} et OH^- dans la solution (Ragoug et al., 2019) (équation 3-6) engendrant l'augmentation du pH dans la solution.



La diminution de la concentration en DSi enregistrée dans la condition 1 s'explique par la diminution de la solubilité de la forme Si(OH)_4 dans le milieu. En effet, Dent Glasser et Kataoka, (1981) expliquent que les différentes formes de silice varient en fonction de la température, du pH et de la composition en ions alcalins. Dans les solutions aqueuses, les différentes formes de silice dissoutes dont les abondances dépendent du pH sont : Si(OH)_4 , SiO(OH)_3^- , $\text{SiO}_2(\text{OH})_2^{2-}$, $\text{SiO}_3(\text{OH})^{3-}$ and SiO_4^{4-} (Sjöberg et al., 1983).

Selon Sjöberg et al., (1981), les réactions acide-base de Si(OH)_4 en solution saline (25°C ; 0,6M NaCl) sont (équation 3-7 et 3-8):



La forme Si(OH)_4 assimilée par les diatomées est surtout présente à des pH inférieurs à 9 (Del Amo et Brzezinski, 1999 ; Seidel et al., 1997). En effet, lorsque le pH est supérieur au pKa_1 (9,47), Si(OH)_4 se dissocie sous une autre forme (équation 3-7 et 3-8). Ainsi, l'augmentation du pH au cours de l'expérience conduit au changement de forme de la DSi en SiO(OH)_3^- et explique la diminution de la concentration en Si(OH)_4 dans le milieu.

A partir de la mesure de la concentration en DSi dans la solution, il est possible d'estimer la concentration de DSi absorbée par les diatomées au cours de l'expérience. La Figure 41 montre l'évolution de la quantité de DSi assimilée par jour par *C. closterium* dans la condition 2 (M+/Si-/Cc+) en fonction de la durée de l'expérience. Nous remarquons que l'assimilation de la silice par les diatomées sous la forme Si(OH)_4 est très élevée pendant les 3 premiers jours avec une moyenne de $73 (\pm 5) \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (Figure 41). La quantité de silice dissoute assimilée est maximale au Jour 2 avec un total de $78 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ puis diminue progressivement jusqu'à une valeur nulle à partir du 9^{ème} jour. L'absorption de cette silice dissoute a ainsi pu conduire à la production de bSi par les diatomées (mesurée Figure 42ab). Par ailleurs, l'assimilation de Si(OH)_4 par les diatomées

dépend de la quantité de silice dissoute provenant du mortier. A la fin de l'expérience, les microalgues ont consommé la totalité de la DSi présente en solution.

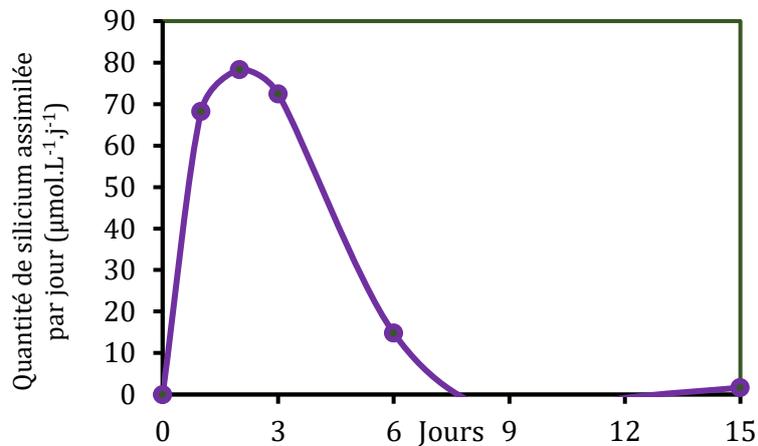


Figure 41. Si assimilé par jour par *C. closterium* en condition 2 (M+/Si-/Cc+).

2. Influence de la disponibilité de la DSi sur la croissance de la diatomée

2.1. Densité cellulaire et silice biogène (bSi)

La croissance de *C. closterium* a montré une phase initiale de latence (jour 1, 2 et 3), suivie d'une phase exponentielle qui a environ duré jusqu'au jour 6 dans la condition 2 (Figure 42b). La concentration maximale de cellules était de $1,59 \cdot 10^9$ cellules. L⁻¹ après cette période. La densité des cellules a commencé à diminuer les derniers jours de l'expérience. Les résultats obtenus pour la croissance cellulaire sont à considérer avec précaution puisque ceux-ci ne prennent pas en compte la formation et le développement du biofilm sur le mortier (Figure 46 et Figure 47a). Nous ne prenons en compte ici que la densité cellulaire dans l'eau.

Le taux de formation des frustules (correspondant à la concentration en bSi) était élevé seulement pendant la phase de croissance exponentielle des cellules (Figure 42a). La croissance de *C. closterium* conduit à une augmentation de la silice biogène dès le premier jour d'expérimentation. En effet, dans la condition 2 (M+/Si-/Cc+), la concentration en bSi était initialement égale à $1176 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et a atteint la valeur de $1303 \mu\text{mol.L}^{-1}$ au jour 6 pour ensuite se stabiliser autour des $1246 (\pm 38) \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Dans la condition 3 (M-/Si+/Cc+), nous observons une légère augmentation de la densité cellulaire les 2 premiers jours de l'expérience avant sa diminution au jour 3 et 6. Après cette période, celle-ci réaugmente au jour 9 avec un total de $1,68 \cdot 10^9$ cellules. L⁻¹. Cette augmentation est accompagnée d'une élévation de la teneur en bSi.

L'analyse ANOVA RM montre qu'il y a une différence significative ($P = <0,001$) dans les différents milieux de culture. Le test de Tukey nous informe que pour la densité cellulaire, il n'y a pas de

différence significative entre la condition 2 (M+/Si-/Cc+) et la condition 3 (M-/Si+/Cc+). En revanche, il y a un effet significatif de la disponibilité de DSi sur la densité cellulaire dans la condition 4. En effet, les micro-algues ne se sont pas développées dans le milieu témoin limité en Si (condition 4 (M-/Si-/Cc+)). Selon le test de Friedman, il y avait une différence significative ($P = 0,016$) de la teneur en bSi ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) entre la condition 2 et la condition 3. Le test de Tukey a montré qu'il y avait une différence significative ($P < 0,050$) entre la condition 2 et la condition 3.

La quantité de bSi par cellule était variable au cours de la croissance de la culture (Figure 42b). En effet, dans la condition 2 (M+/Si-/Cc+), la teneur en bSi par cellule était initialement égale à $1,43 \cdot 10^{-6} \mu\text{mol.L}^{-1} \cdot \text{cellule}^{-1}$ et a atteint une valeur de $1,30 \cdot 10^{-6} \mu\text{mol.L}^{-1} \cdot \text{cellule}^{-1}$ le dernier jour. Les teneurs maximales en bSi par cellule a été enregistrée au jour 1 et au jour 2 avec respectivement une valeur de $1,82 \cdot 10^{-6} \mu\text{mol.L}^{-1} \cdot \text{cellule}^{-1}$ et $1,49 \cdot 10^{-6} \mu\text{mol.L}^{-1} \cdot \text{cellule}^{-1}$ dans la condition 2 (Figure 42b). La teneur en silice par cellule est relativement stable à partir du 3ème jour avec une moyenne de $1,02 \cdot 10^{-6} (\pm 2,3 \cdot 10^{-7}) \mu\text{mol.L}^{-1} \cdot \text{cellule}^{-1}$.

Dans la condition 3 (M-/Si+/Cc+), on observe cette même tendance mais quelques jours plus tard. Selon le test Anova RM, il n'y a pas de différence statistiquement significative ($P = 0,337$) de la teneur en bSi par cellule de *C. closterium* ($\mu\text{mol.L}^{-1} \cdot \text{cellule}^{-1}$) entre les conditions 2 et 3. Dans la condition 3, la bSi par cellule est très importante au jour 3 et au jour 6 atteignant respectivement une valeur de $1,74 \cdot 10^{-6} \mu\text{mol.L}^{-1} \cdot \text{cellule}^{-1}$ et une valeur de $1,99 \cdot 10^{-6} \mu\text{mol.L}^{-1} \cdot \text{cellule}^{-1}$ (Figure 42b). Ces résultats sont associés à une densité cellulaire relativement faible dans les milieux de cultures suggérant un allongement de la durée du cycle cellulaire.

En effet, la concentration de bSi par cellule et l'épaisseur du frustule (étudié Tableau 8) sont régulés par la quantité totale de Si absorbée, qui est directement déterminée par la durée du cycle cellulaire (Claquin et al., 2006). La dynamique de croissance des diatomées dans le milieu contenant le mortier et dans le milieu directement enrichi en Si(OH)_4 est la même. La formation des valves des cellules filles dans la cellule mère a eu lieu entre le jour 1 et 2 pour la condition 2 et entre le jour 3 et 6 dans la condition 3 expliquant l'augmentation de la quantité de bSi par cellule (Figure 42bc).

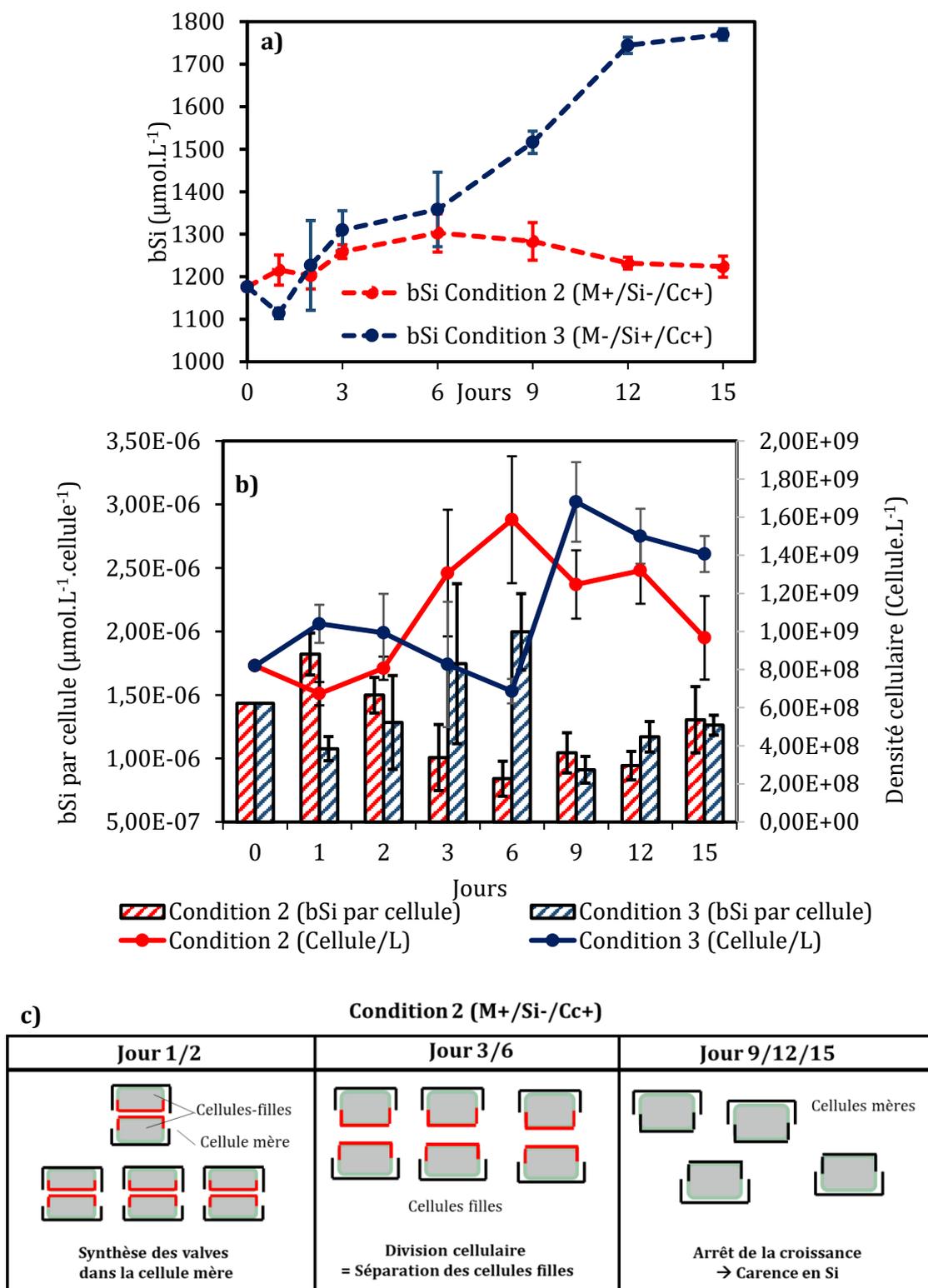


Figure 42. Concentration de silice biogène (bSi), i.e. le taux de formation des frustules ($\mu\text{mol.L}^{-1}$), et densité cellulaire (cellule.L^{-1}) de *C. closterium* en fonction du temps (a) ; teneur en bSi par cellule ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{cellule}^{-1}$) (b) ; Schéma simplifié du cycle cellulaire des diatomées cultivées dans la condition 2 au cours du temps (c).

A partir du jour 3 pour la condition 2 et du jour 9 pour la condition 3, nous observons une augmentation de la quantité de cellules dans le milieu (Figure 42b) dû à la division cellulaire et donc à la séparation des cellules filles de la cellule mère (Figure 42c).

Ainsi, les cellules filles sont présentes en grande quantité dans la culture. La séparation des cellules filles explique la diminution de la quantité de bSi par cellule avec une valeur de $1,7 \cdot 10^{-6} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cellule}^{-1}$ au jour 3 pour la condition 2 et $9,1 \cdot 10^{-7} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cellule}^{-1}$ au jour 9 pour la condition 3. A partir de ces échéances, la quantité de silice dissoute dans le milieu est très faible (Figure 40ab) provoquant l'arrêt de la croissance des diatomées (Figure 42c). Il en ressort que la disponibilité en DSi dans le milieu a un effet sur le taux d'incorporation de la silice (bSi) dans les frustules et donc sur le cycle cellulaire des diatomées.

Nous pouvons en conclure que les cinétiques de croissance des diatomées sont similaires dans les deux cultures (condition 2 et 3). En revanche, la différence observée entre les deux conditions s'explique uniquement par le fait que la quantité de silicium disponible dans le milieu est plus faible lorsque la silice dissoute provient du mortier (à l'échelle de nos essais en laboratoire) que dans une culture enrichie directement en $\text{Si}(\text{OH})_4$.

Par ailleurs, à partir du 6^{ème} jour, très peu de cellules en suspension ont été observées dans la colonne d'eau dans la condition 2. De nombreuses cellules algales se sont agrégées puis ont sédimenté dans le fond. Les agrégats de cellules peuvent se former à la suite d'une limitation en nutriments. Ces agrégats ont pu être observés au microscope (Figure 43). Les agrégats de cellules ont été davantage observés dans la condition 4 (M-/Si-/Cc+) que dans les autres milieux de culture. Nous pouvons noter qu'aucune dégradation des frustules des diatomées n'a été observée dans les milieux étudiés.

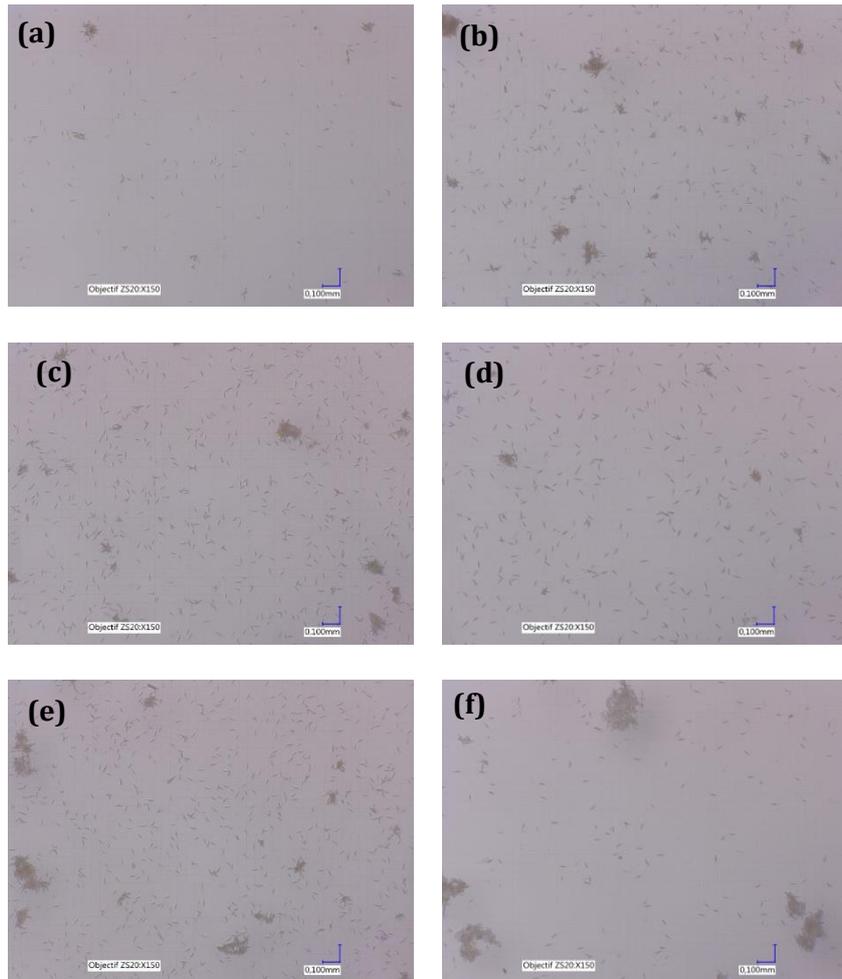


Figure 43. Observation microscopique (Objectif $\times 20$ – grossissement $\times 150$) de *C. closterium* au jour 1 **(a)**, jour 3 **(b)**, jour 9 **(c)**, jour 15 **(d)** en condition 2 (M+/Si-/Cc+) et au jour 15, condition 3 (M-/Si+/Cc+) **(e)**, condition 4 (M-/Si-/Cc+) **(f)**.

La Figure 44 montre des observations microscopiques de chloroplastes (lieu de la photosynthèse) de *C. closterium* dans le milieu en condition 2 (M+/Si-/Cc+) au jour 0 (Figure 44a) et au jour 15 (Figure 44b). Une dépigmentation des chloroplastes était clairement visible sous limitation en Si.

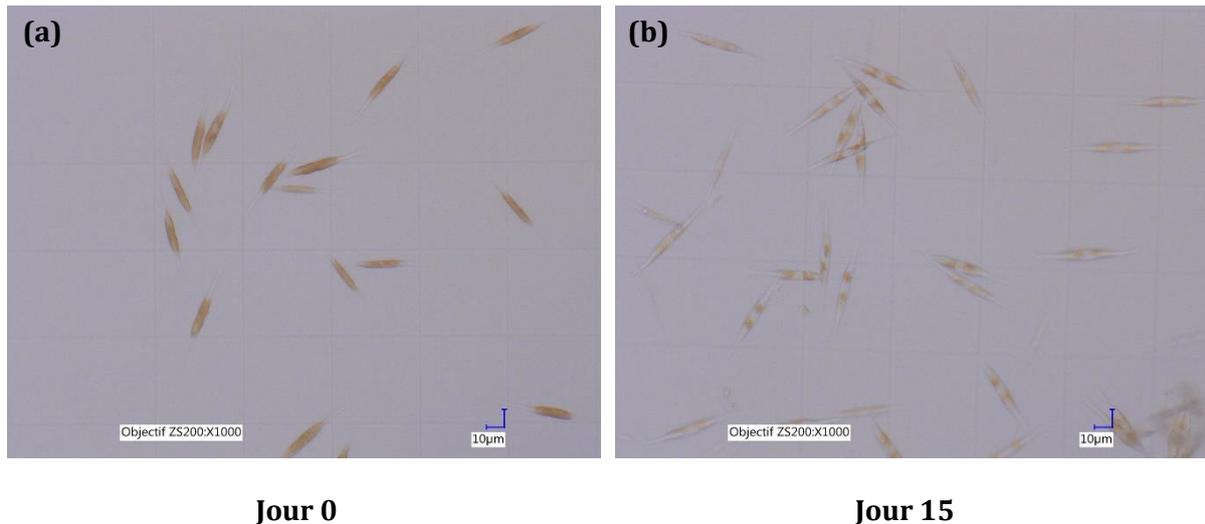


Figure 44. Observation microscopique (Objectif $\times 200$ - grossissement $\times 1000$) des chloroplastes de *C. closterium* dans la solution initiale au jour 0 **(a)** et au jour 15 **(b)** dans la condition 2 (M+/Si-/Cc+).

L'influence de la disponibilité de la DSi sur la croissance des micro-algues dans le milieu a été étudié en évaluant la concentration en bSi et la densité des cellules au cours de l'expérience. Celles-ci ont été comparées aux résultats obtenus dans les conditions de contrôle (sans présence de mortier). Dans cette étude, l'augmentation de la concentration en bSi associée à une augmentation de la densité cellulaire montre que les micro-algues se sont développées et ont pu élaborer leur frustule suite à l'assimilation de la silice dissoute dans le milieu. Capellacci et al., (2013) ont étudié les paramètres de croissance de deux espèces de diatomées (*Chaetoceros sp* et *Skeletonema marinoi*) dans des conditions de culture contrôlées en présence de différentes sources de silicium (silice cristalline ou amorphe). Ces auteurs ont pu montrer que les diatomées avaient un taux de croissance, une densité cellulaire et un taux d'assimilation du silicium plus élevés lorsqu'elles étaient cultivées dans un milieu contenant de la silice cristalline que dans un milieu contenant de la silice amorphe.

Il faut également noter que les micro-algues se sont bien acclimatées aux modifications environnementales notamment à l'augmentation du pH. En effet, Hinga, (2002) a démontré que *C. closterium* ne peut pas se développer lorsque les valeurs de pH sont supérieures à 8,5. Or dans notre étude les diatomées ont continué de croître même à des pH atteignant 9,1. Par conséquent, le pH, dans nos conditions expérimentales, n'est pas apparu comme étant un facteur limitant pour le développement de *C. closterium*.

Le taux de croissance des diatomées suit la cinétique de Monod qui dans le cas de *C. closterium* a une constante de demi-saturation (K_{μ}) de $9,58 \mu\text{M}$ de $\text{Si}(\text{OH})_4$ (Sunlu et al., 2006). Nous avons ainsi pu observer une division cellulaire jusqu'à ce que la concentration en $\text{Si}(\text{OH})_4$ soit en dessous de

ce seuil (à partir du 6^{ème} jour pour la condition 2 et du 12^{ème} jour la condition 3 avec respectivement 3,87 et 4,80 μM de $\text{Si}(\text{OH})_4$).

Ainsi, ces résultats indiquent que le premier facteur limitant dans cette étude pour la croissance de *C. closterium* est la silice dissoute.

Les observations microscopiques ont montré la formation d'agrégats cellulaires à la fin de l'expérience et dans le milieu limité en silice (condition 4). La dissolution partielle des polysaccharides extracellulaires, sécrétés par les diatomées, est à l'origine de la cohésion des cellules entre elles conduisant à la formation d'agrégats (Thornton, 2002). Cette forme est appelée TEP (Transparent Exopolymer Particles) (Passow et al., 2001). Moriceau et al. (2007, 2014) ont montré que les taux de dissolution de la silice biogène (bSi) étaient réduits lorsque les diatomées étaient incorporées dans les agrégats, ce qui les rendent plus résistantes.

2.2. Biovolume

La grande variation de taille chez les diatomées est montrée par les mesures des traits morphologiques présentées dans le Tableau 8. Le diamètre et la longueur de *C. closterium* étaient égaux à 5,7 et 57,1 μm respectivement dans la condition 2 (M+/Si-/Cc+) et 5,2 et 57,2 μm dans les milieux témoins (condition 3 et 4) au jour 0. Dans la condition 2 (M+/Si-/Cc+), l'épaisseur du frustule (Tableau 8) se réduit de plus en plus au fur et à mesure de l'expérimentation. En effet, elle diminue de 5,7 μm (jour 0) à 5 μm (jour 15). Le même comportement est observé pour la condition 3 (M-/Si+/Cc+) avec des valeurs qui diminuent de 5,2 μm à 4,6 μm au Jour 15. Cependant, dans le milieu témoin correspondant à la condition 4 (M-/Si-/Cc+), l'épaisseur des frustules reste stable durant l'expérience avec une valeur moyenne de 5,2 μm (+-0,16).

L'évolution du volume cellulaire (Biovolume) et du rapport Surface/Volume (S/V) pour *C. closterium* est également présentée dans le Tableau 8. Concernant le biovolume des cellules, il diminue au cours de l'expérience passant de 989 μm^3 au jour 0 à 787 μm^3 le dernier jour dans la condition 2 (M+/Si-/Cc+) et de 809 μm^3 au jour 0 à 645 μm^3 au jour 15 dans la condition 3 (M-/Si+/Cc+). Le biovolume des diatomées dans la condition 4 (M-/Si-/Cc+) montre des valeurs relativement stables au cours de l'expérience avec des valeurs proches de 820 μm^3 (± 54).

Tableau 8. Valeurs moyennes des mesures linéaires, n =10. Biovolume (V), surface cellulaire (S) et rapport surface/volume (S/V) des espèces de *C. closterium*.

Milieu	Jours	Longueur (µm)	Diamètre (µm)	V (µm ³)	S (µm ⁻²)
Condition 2 (M+/Si-/Cc+)	0	57,1 (±3,8)	5,7 (±0,7)	989 (±278)	809 (±130)
	1	55,1 (±2,4)	5,6 (±0,7)	917 (±238)	765 (±101)
	3	56,3 (±4,6)	5,2 (±0,6)	815 (±236)	728 (±129)
	9	56,1 (±5,1)	5,1 (±0,8)	727 (± 215)	683 (±138)
	15	55,0 (±2,0)	5,0 (±0,6)	787 (±180)	708 (±83)
Condition 3 (M-/Si+/Cc+)	0	57,2	5,2	809	736
	1	58,0 (±2,1)	5,2 (±0,4)	829 (±169)	748 (±85)
	3	57,2 (±2,1)	4,9 (±0,3)	722 (±90)	694 (±52)
	9	58,0 (±2,4)	4,5 (±0,7)	607 (±159)	638 (±95)
	15	57,7 (±2,0)	4,6 (±0,5)	645 (±137)	656 (±72)
Condition 4 (M-/Si-/Cc+)	0	57,2	5,2	809	736
	1	56,8 (±2,0)	5,2 (±0,6)	840 (±156)	748 (±85)
	3	57,9 (±1,7)	5,2(±0,7)	894 (±176)	777 (±79)
	9	57,7 (±2,1)	5,0 (±0,4)	745 (±110)	708 (±66)
	15	57,1 (±2,1)	5,2 (±0,4)	813 (±141)	735 (±65)

La Figure 45 montre l'évolution de la bSi par surface cellulaire et du rapport S/V dans les conditions 2 (M+/Si-/Cc+) et 3 (M-/Si+/Cc+) en fonction de la durée de l'expérience.

Une diminution du degré de silicification des diatomées (Figure 45a) associée à une diminution de la concentration en DSi (Figure 40ab) dans les deux milieux sont observées au cours de l'expérience. Dans la condition 2, les cellules sont plus silicifiées les premiers jours de l'expérience, qu'à partir du 3^{ème} jour passant de $2,46 \cdot 10^{-9} \mu\text{mol.bSi} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ au jour 1 à $1,42 \cdot 10^{-9} \mu\text{mol.bSi} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ au jour 3. On observe la même tendance pour les cellules cultivées dans la condition 3 avec une augmentation de la silicification des cellules jusqu'au jour 3 avec une valeur de $2,5 \cdot 10^{-9} \mu\text{mol.bSi} \cdot \mu\text{m}^{-2}$. En effet, l'absorption de silicium par les diatomées est plus élevée dans la condition 3 les 3 premiers jours dû à une plus forte concentration en silicium dans le milieu. Cette augmentation du taux de la production de silice peut être due à l'augmentation de la durée de la phase G2+M dans le cycle cellulaire des diatomées (Claquin et al., 2002 ; Hildebrand, 2005). A partir du jour 9, la disponibilité en silicium est limitée dans les deux milieux ($11,29 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dans la condition 2 et $13,41 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dans la condition 3, Figure 40ab).

Nos résultats nous permettent de conclure que les cellules sont de moins en moins silicifiées au cours de l'expérience. Néanmoins cela n'a pas empêché la croissance des diatomées. Ces dernières sont ainsi capables de réguler la teneur en silice incorporée dans leur frustule en fonction de la quantité de $\text{Si}(\text{OH})_4$ disponible dans le milieu sans pour autant impacter leur croissance.

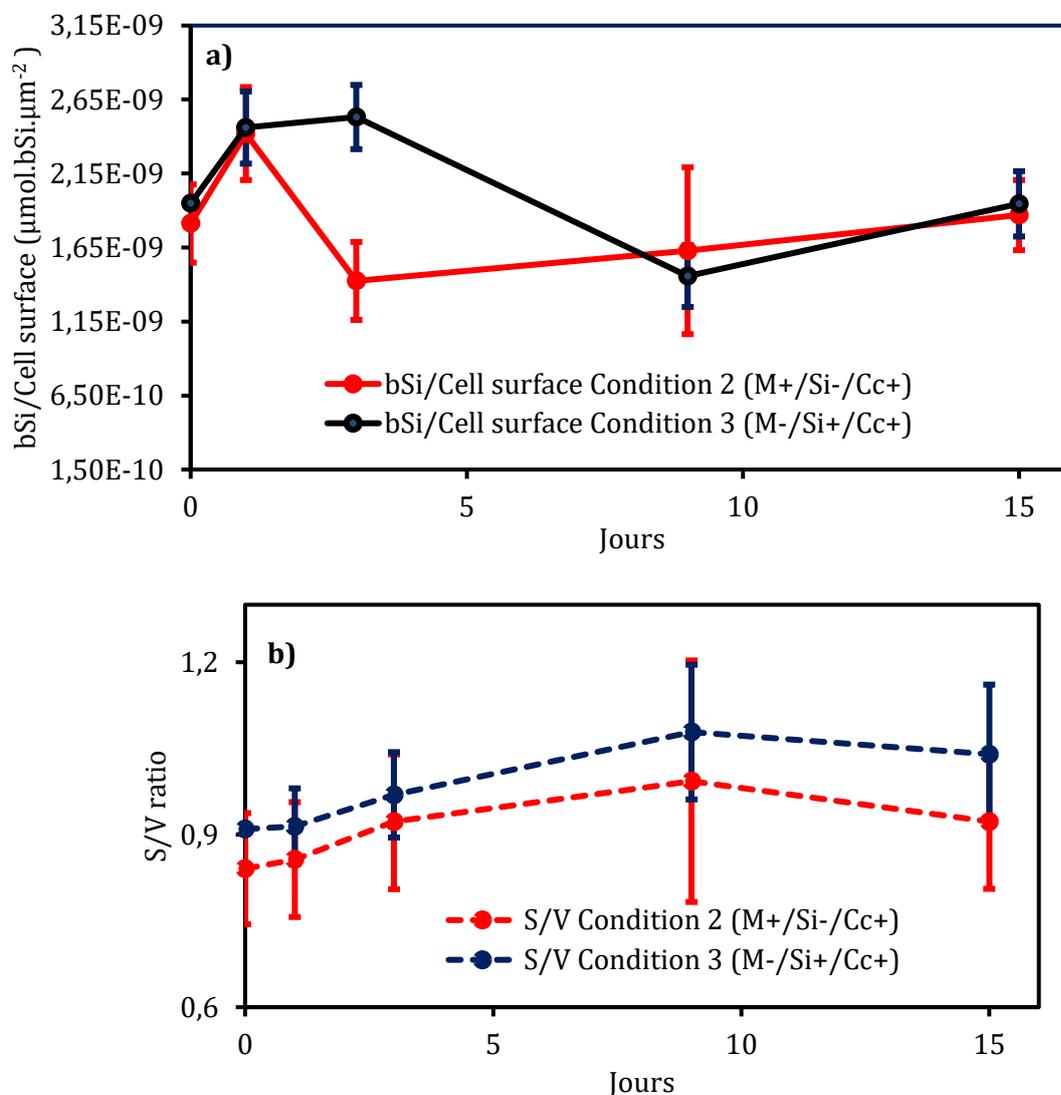


Figure 45. Taux de production de la silice par les diatomées i.e. degré de silicification (bSi par surface cellulaire) **(a)** et rapport S/V dans la condition 2 (M+/Si-/Cc+) et 3 (M-/Si+/Cc+) **(b)**

D'après McNair et al., (2018), les diatomées s'acclimatent à la réduction de la disponibilité du silicium en amincissant leurs frustules réduisant l'impact de la diminution des taux d'absorption du Si sur les taux de division. Cet amincissement des frustules (cellules plus petites et plus fines) peut se traduire par une augmentation du rapport S/V. En effet, nos résultats montrent une augmentation progressive du rapport S/V au cours de l'expérience passant de 0,84 initialement à 0,92 le dernier jour dans la condition 2 (M+/Si-/Cc+) et de 0,91 initialement à 1,04 le dernier jour dans la condition 3 (M-/Si+/Cc+) (Figure 45b). En revanche dans la condition 4 (M-/Si-/Cc+), le

rapport S/V est relativement stable au cours de l'expérience (environ 0,91). En effet, dans cette condition de culture les micro-algues ne se sont pas développées, leurs traits morphologiques sont restés les mêmes qu'au jour 0.

Ces résultats montrent que les diatomées sont capables de s'acclimater à la disponibilité en DSi en réduisant l'épaisseur de leur frustule. Cette acclimatation permet aux cellules de continuer à croître jusqu'à ce que le milieu soit épuisé (Brzezinski et al., 1990 ; Paasche, 1973). Selon Bonato, (2015), le rapport surface/volume des cellules (S/V) permet à la cellule d'acclimater sa capacité à récolter la lumière et les nutriments dans des conditions limitantes. Ainsi le rapport S/V de *C. closterium* a augmenté en réponse à une acclimatation de ces cellules à une faible concentration de DSi. L'augmentation associée du rapport S/V et la diminution de l'épaisseur de la cellule peuvent améliorer les sites de transport des nutriments (Pahlow et al., 1997) et sa cinétique d'absorption. En effet, les protéines transporteuses de silicium (SIT) sont impliquées dans l'absorption et le transport du silicium dans la cellule (Thamatrakoln et Hildebrand, 2008). Le nombre et le type de SITs par surface cellulaire déterminent la capacité d'absorption du silicium des diatomées (Leynaert et al., 2009). L'acclimatation de *C. closterium* en réduisant la taille des cellules lui permet une absorption plus efficace des nutriments limitants. La limitation en DSi induit une diminution du volume cellulaire sur l'ensemble de la croissance en condition 2 et 3 limitée en silice (M+/Si-/Cc+ et M-/Si+/Cc+) (Tableau 8). Nous avons souligné que les diatomées s'acclimatent à la limitation en silice dissoute en diminuant la taille de leurs cellules. De plus, Leynaert et al., (2004) montrent que la cinétique des paramètres d'absorption du Si(OH)₄ est liée à la taille des cellules. Vanucci et al., 2012 ont également révélé une modification du volume des cellules dans un environnement limité en nutriments

Les résultats obtenus nous amènent à conclure que les changements observés dans le degré de silicification et les caractéristiques morphologiques spécifiques des diatomées pennées sont une réponse à la disponibilité du silicium dans le milieu afin d'améliorer son absorption, son transport dans la cellule et son dépôt dans les SDV responsable de la formation de nouvelles valves.

3. Influence de la disponibilité de la DSi sur la formation de biofilm à la surface du mortier.

Les observations microscopiques montrant l'état de la bio-colonisation du mortier immergé dans la condition 2 (M+/Si-/Cc+) après les différentes échéances sont présentées dans la Figure 46. Au cours de l'essai un biofilm se forme à la surface du mortier. Il est nécessaire de préciser que tous les triplicats de mortier ne sont pas uniformes en termes de biomasse algale fixée à leur surface.

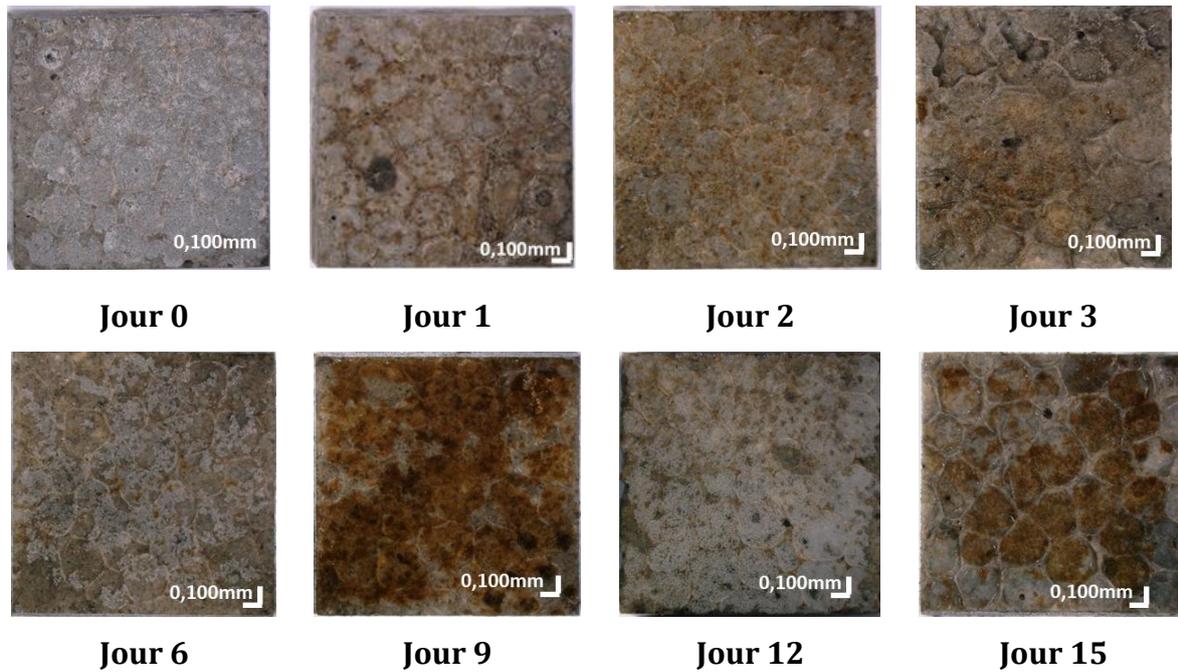


Figure 46. Exemples d'observations microscopiques (Objectif x 20 - grossissement x150) du mortier au jour 0, 1, 2, 3, 6, 9, 12 et jour 15 après immersion (exemple d'un des triplicatas).

L'influence de la disponibilité en silice dissoute dans le milieu sur la formation du biofilm a été étudié en suivant les paramètres photosynthétiques et la biomasse microphytobenthique à la surface du matériau. Ces mesures ont été réalisées à chaque échéance. Il convient de préciser que ces mesures représentent un état de la bio-colonisation à un instant T. En effet, une partie du biofilm est capable de se détacher de la surface. Par la suite, de nouvelles cellules vont s'accumuler pour former à nouveau un biofilm.

La Figure 47a montre l'évolution de la biomasse fixée sur le mortier. Nous pouvons voir que la colonisation du mortier évolue au cours de l'expérience (Figure 46 et Figure 47a). La biomasse chlorophyllienne augmente dès les premiers jours (maximum 46,40 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$ au jour 2) puis une fluctuation de la biomasse est observée à partir du jour 6 pour atteindre son maximum au jour 9 avec 54,24 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$.

La Figure 47b montre l'évolution du rapport F_v/F_m en fonction du temps. Les résultats obtenus indiquent que les micro-algues sont en bon état physiologique (avec une moyenne de 0,43). Au jour 6, le rapport F_v/F_m est le plus faible ($0,22\pm 0,25$) par rapport aux autres jours.

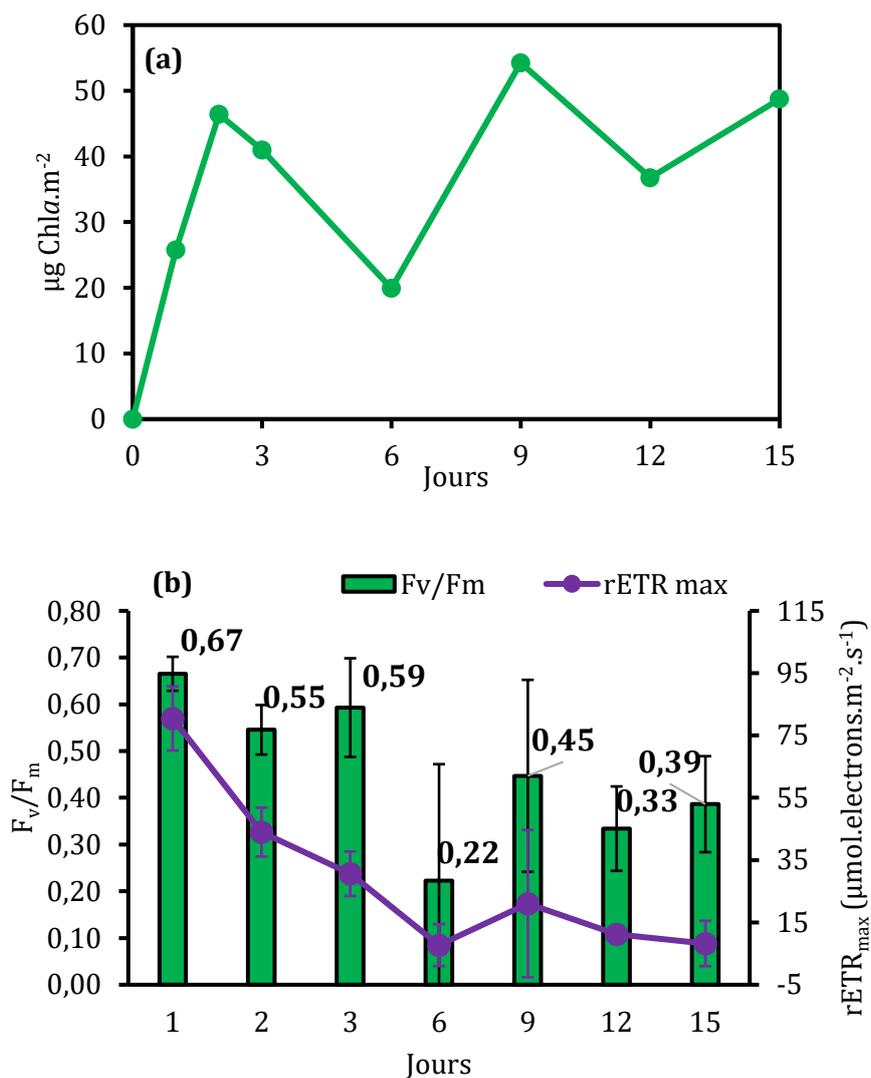


Figure 47. Dynamique de la colonisation du biofilm microphytobenthique sur le mortier en fonction du temps : Biomasse chlorophyllienne par unité de surface **(a)** ; Moyenne de l'indice F_v/F_m de l'efficacité de la quantité maximale de PSII (c'est-à-dire l'indice de l'état physiologique) et capacité photosynthétique du biofilm (ETR_{max}) **(b)**.

Les résultats de la capacité photosynthétique ($rETR_{max}$) (Figure 47b) montrent un meilleur taux de transport d'électrons pendant les deux premiers jours de l'expérience avec $80,47 \pm 10,3 \mu\text{mol.électrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et $43,99 \pm 7,9 \mu\text{mol.électrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Une diminution progressive de la capacité photosynthétique est observée au cours de la période d'immersion pour atteindre des valeurs minimales au jour 6 et au jour 15 ($7,72 \pm 6,7$ et $8,23 \pm 7,3 \mu\text{mol.électrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ respectivement).

L'influence de la disponibilité en DSi sur la colonisation du mortier par le biofilm a été étudiée en surveillant les paramètres photosynthétiques et la biomasse de Chl *a* pendant l'expérience. Le rapport F_v/F_m est un indicateur de stress nutritionnel des cellules chlorophyllienne. On peut donc

supposer que la diminution du rapport F_v/F_m après 6 jours d'immersion peut être la conséquence d'une compétition accrue entre les diatomées pour l'accès à la lumière ou aux nutriments. De plus, la silice dissoute disponible dans l'environnement est presque nulle à cette période, ce qui provoque un stress pour les diatomées. Un meilleur développement du biofilm observé au jour 9 a conduit à la création d'un micro-habitat permettant à l'espèce de s'acclimater aux changements de son milieu, ce qui peut expliquer l'augmentation du F_v/F_m (Parkhill et al., 2001) malgré la faible concentration en nutriments et le pH élevé. Cependant, le F_v/F_m n'atteindra plus les valeurs obtenues lors de la phase initiale de développement du biofilm.

Les rendements photosynthétiques F_v/F_m et la capacité photosynthétique maximale $rETR_{max}$ diminuent progressivement tout au long de l'expérience en raison de la limitation en silicium. Seules quelques études ont traité de l'effet de la limitation en Si sur la photosynthèse. Dans une étude réalisée sur deux diatomées pélagiques, Napoléon et al., (2013) ont montré que les paramètres photosynthétiques étaient faiblement influencés par la limitation en Si, mais la limitation appliquée dans notre étude est plus importante. De plus, le déclin de la capacité photosynthétique peut être dû à une diminution de l'absorption de l'énergie lumineuse suite à l'acclimatation des cellules en réduisant la quantité de leurs pigments. En effet, Jungandreas et al., (2012) ont démontré que la réduction de la chlorophylle *a* est une acclimatation à la diminution du taux de croissance puisqu'elle va réduire la quantité d'énergie lumineuse absorbée nécessaire au maintien de la synthèse de la biomasse. Les performances photosynthétiques de *C. closterium* sont donc perturbées par les conditions environnementales du milieu conduisant à une acclimatation des cellules.

Conclusion

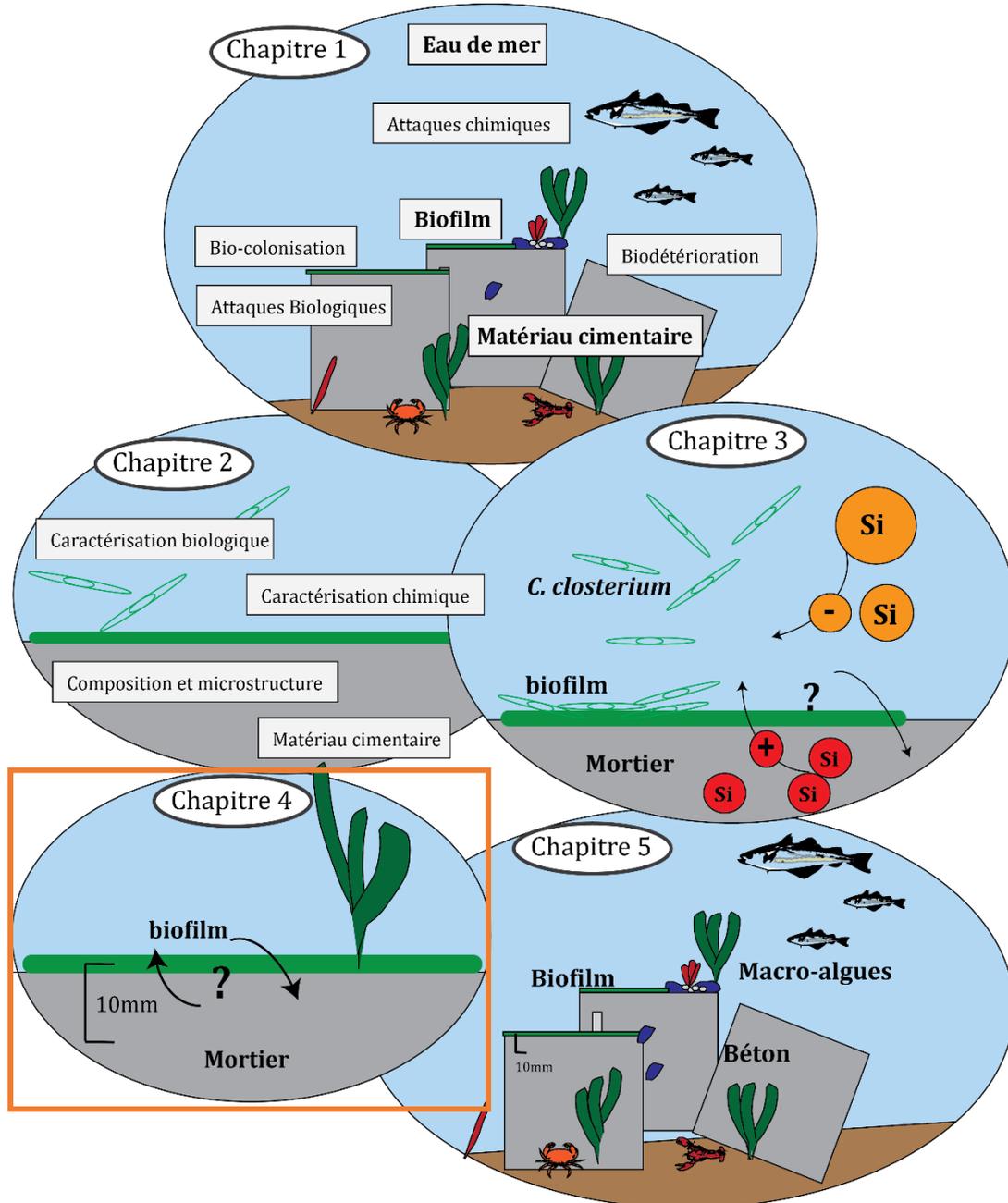
Cette étude a permis d'examiner l'influence d'un mortier siliceux sur la cinétique de croissance de la diatomée *C. closterium* cultivée dans un milieu limité en silicium. Le suivi en laboratoire a montré que la diatomée était capable d'assimiler la silice dissoute (Si(OH)_4) provenant du mortier.

L'augmentation du pH a eu un effet sur la quantité de silice dissoute (DSi) absorbée par les diatomées puisqu'elle a rendu le Si(OH)_4 indisponible pour *C. closterium* à partir du 6^{ème} jour de l'expérimentation dans la condition 2 (M+/Si-/Cc+) et à partir du 12^{ème} jour pour la condition 3 (M-/Si+/Cc+). Les espèces étudiées sont capables d'ajuster leurs traits morphologiques pour améliorer l'absorption et le transport du silicium dans la cellule. Les diatomées ont assimilé toute la DSi sous forme Si(OH)_4 disponible dans la solution. La disponibilité en silicium a également engendré des modifications sur le degré de silicification des diatomées.

En milieu naturel, la dissolution de la DSi du mortier des structures artificielles ne sera pas limitée par le pH en raison des grands volumes de masse d'eau et des courants. Ainsi, ces structures artificielles permettraient d'apporter de nouvelles sources de silicium assimilables par le microphytobenthos et le phytoplancton. Cette nouvelle source en silicium à partir de la structure artificielle viendrait en complément des apports déjà présents naturellement dans le milieu marin (dissolution des particules de bSi déposées dans les fonds marins et du lessivage des roches et des sols siliceux par la pluie). Nous pourrions envisager d'adapter la composition du béton/mortier dans des milieux où la silice dissoute serait limitée. En effet, dans les estuaires par exemple les apports en silice dissoute peuvent être limités par rapport à des apports en phosphore et en azote ce qui peut avoir des implications écologiques non négligeables. Il faut savoir que lorsque toute la silice dissoute est consommée par les diatomées, des micro-organismes nuisibles tels que des dinoflagellés, chlorophycées et autres cyanobactéries vont proliférer dans le milieu. Cette prolifération peut par exemple avoir un impact sanitaire pour la conchyliculture.

Ces résultats suggèrent que les structures maritimes en béton participeraient à la restauration des producteurs primaires apportant de nouvelles ressources trophiques pour le développement de la faune et de la flore marine sur le substrat.

Chapitre 4 : Effet du biofilm microphytobenthique sur le mortier en milieu marin



Introduction

Les matériaux cimentaires exposés à l'eau de mer peuvent être sujet à diverses attaques chimiques, physiques et biologiques. Comme présenté précédemment dans le chapitre bibliographique, l'effet de l'activité biologique sur la matrice a déjà fait l'objet de nombreuses études. Il en résulte que les propriétés chimiques et microstructurales du matériau cimentaire vont être modifiés suite au développement de micro et macro-organismes.

Dans ce contexte, une étude à long terme a été réalisée dans le but d'étudier la microstructure et la composition du mortier afin d'apporter des réponses sur l'évolution de ceux-ci en fonction de plusieurs paramètres : le milieu (présence biologique ou non) et le temps d'immersion (à court et long terme). Cette étude s'est déroulée à différentes échéances pendant une période allant de 10 à 360 jours.

Pour ce faire, un dispositif expérimental a été réalisé en laboratoire (milieu contrôlé) et en mésocosme semi-fermé (eau de mer naturelle) afin de pouvoir comparer les différences observées au sein de la matrice suite à sa bio-colonisation. La bio-colonisation en laboratoire a été réalisé en inoculant les milieux par une espèce de diatomée qui est *C. closterium*.

L'influence de la bio-colonisation sur la couche superficielle (premiers millimètres) du mortier a été particulièrement évaluée en étudiant l'évolution de sa composition et sa microstructure ainsi que la diffusion des ions chlorure en fonction des conditions d'immersion. Pour répondre à cette problématique, un protocole adapté basé sur une caractérisation chimique, biologique et microstructurale a également été mis en place.

Afin de distinguer les effets de l'attaque biologique engendrée par la bio-colonisation de celui de l'attaque chimique de l'eau de mer, des mortiers ont été également immergés uniquement dans de l'eau de mer artificielle.

I. Dispositif expérimental

Le matériau cimentaire étudié dans ce chapitre est un mortier siliceux. La Figure 48 présente l'ensemble du protocole expérimental réalisé pour cette étude. Après la fabrication des différents échantillons (taille variable suivant les tests réalisés), ceux-ci ont été conservés pendant 90 jours à température ambiante et à 100% d'humidité. Après cette période, les échantillons ont été immergés dans différents milieux (voir partie I1 et I2.) pendant une durée déterminée (10-30-90-180-260-360 jours). Les immersions ont commencé en septembre 2019 et ont pris fin en septembre 2020. Différents essais ont été mis en place afin de comprendre l'effet de la bio-colonisation sur la surface du mortier en fonction des différents paramètres environnementaux.

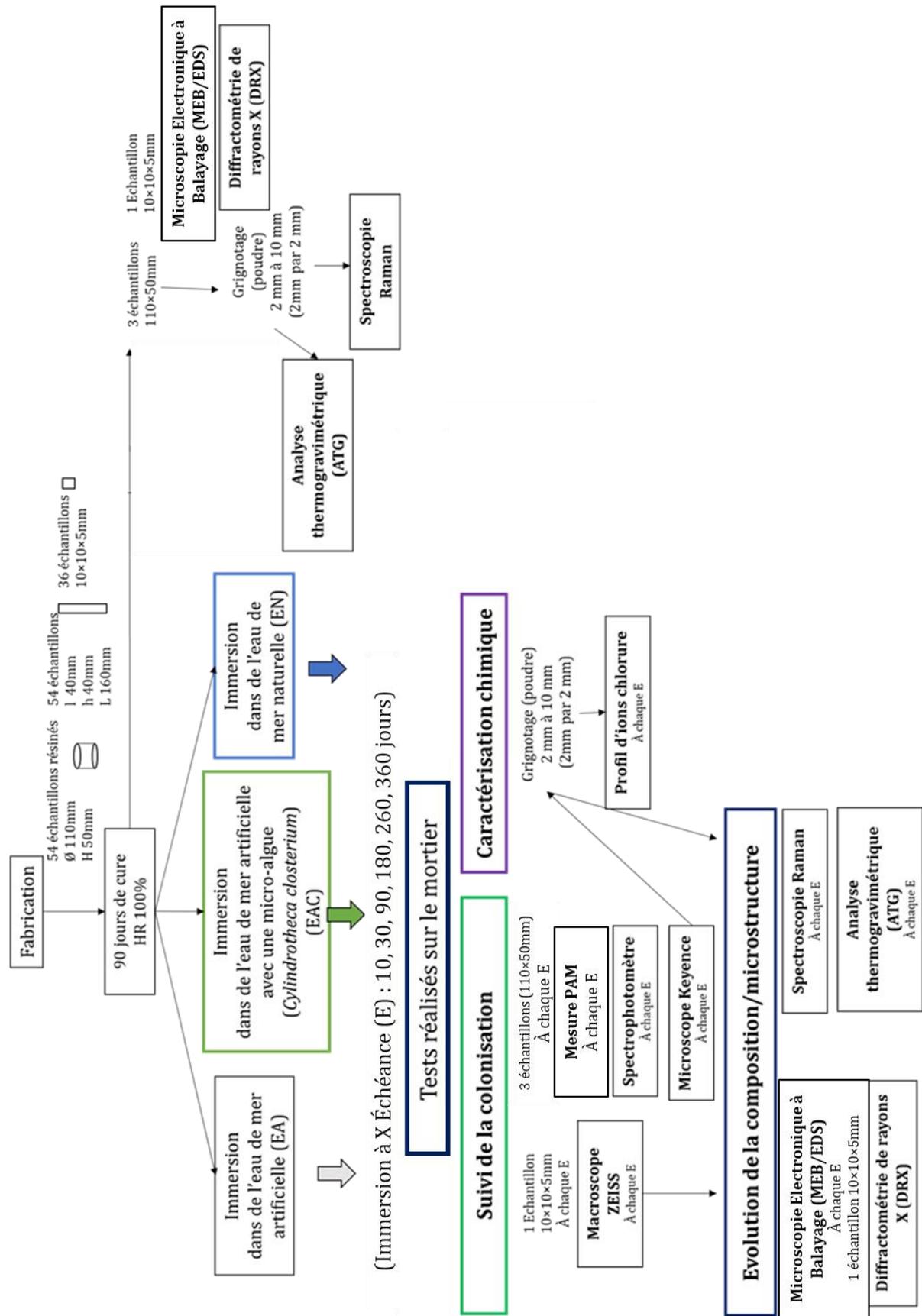


Figure 48. Protocole expérimental de cette étude

Le suivi de la bio-colonisation et de l'activité biologique des biofilms a été réalisé via des mesures photosynthétiques, des indicateurs de biomasse et des observations microscopiques. La composition chimique et l'évolution de la microstructure du mortier a été suivi à partir d'observations MEB/EDS, d'analyses d'ATG/DTG, etc. La résistance à la diffusion des ions chlorure du mortier ont été également étudiés afin de suivre l'évolution de sa durabilité en fonction de la durée et du milieu d'immersion.

1. En laboratoire

1.1. Matériels et milieu d'immersion des mortiers

Le dispositif expérimental, récemment mis en place par Ferrero, (2018), est très facilement reproductible. Il se compose de bacs (L=30cm, l= 36cm, h= 40cm) couleur opaque permettant à la lumière de passer que d'un côté. Etant identique pour toutes les éprouvettes, la face étudiée correspond à celle qui était en contact avec le fond du moule lors du coulage. Cette dernière est orientée vers le haut du bac afin d'être bio-colonisée. Le volume d'eau contenu dans les bacs est de 10 L permettant ainsi aux éprouvettes d'être totalement immergées.

Afin de différencier l'effet de l'activité biologique de l'effet de l'eau de mer sur le mortier, deux milieux d'immersions ont été étudiés et installés en laboratoire (Tableau 9 ; Figure 49). Le premier correspond à un milieu d'Eau de mer Artificielle (milieu nommé EA) servant de milieu témoin (pas de colonisation) (Figure 49a). L'eau de mer Artificielle a été réalisée à partir de sel Instant Ocean®, Spectrum Brand dosé à 33,3 g.L⁻¹ (Atkinson and Bingma, 1997). Ces sels contiennent les éléments majeurs, mineurs et oligo-éléments essentiels retrouvés dans l'eau de mer naturelle. Le milieu a été régulièrement renouvelée pour en outre conserver un pH proche de celui de l'eau de mer naturelle.

Tableau 9. Constituant des milieux d'immersions des éprouvettes de mortiers installés en laboratoire

Volume (L)	Eau de mer Artificielle (EA)	Eau de mer Artificielle + Diatomées (EAC)
Eau distillée + sels marins (33,3 g/L)	10	0
Milieu de Conway (Eau distillée + sels marins (33,3 g/L) + nutriments)	0	9
<i>C. closterium</i>	0	1
Total	10	10
Renouvellement en eau	OUI	OUI

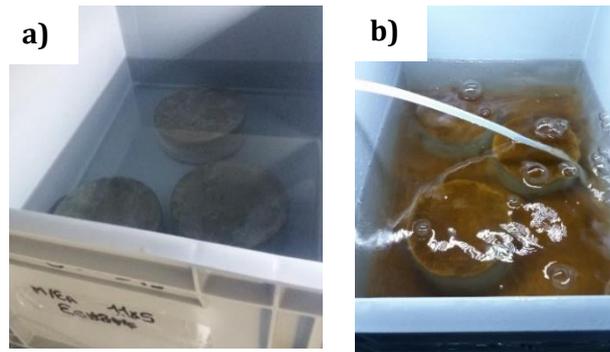


Figure 49. Dispositif expérimental des 2 environnements étudiés en laboratoire, mortiers immergés **(a)** ; dans le milieu EA ; **(b)** : dans le milieu EAC

Le deuxième milieu est un milieu composé d'Eau de mer Artificielle, de nutriments (milieu de Conway, voir chapitre 2) et des diatomées étudiées : *C. closterium* (milieu nommé EAC) (Figure 49b). Un système d'injection d'air a été installé pour permettre la remise en suspension des nutriments et des diatomées ainsi que l'apport de CO₂ (Figure 50). Les diatomées sont des organismes photosynthétiques, elles ont besoin de lumière pour se développer et ainsi réaliser la photosynthèse. A cette fin, une lampe LED, servant de système d'éclairage permettant d'appliquer un cycle lumière/obscurité équivalent à un cycle journalier naturel, a été installée au-dessus du bac (Figure 50). Le milieu a également été renouvelé toutes les trois semaines afin de continuer l'apport en nutriments nécessaire à la croissance des diatomées *C. closterium*. De plus, ceci permet d'éliminer les cellules mortes et de remettre à niveau la quantité d'eau dans les bacs (phénomène d'évaporation). Il est à noter que le renouvellement n'a pas pu être réalisé pendant la période du premier confinement (Mars à Mai 2020).

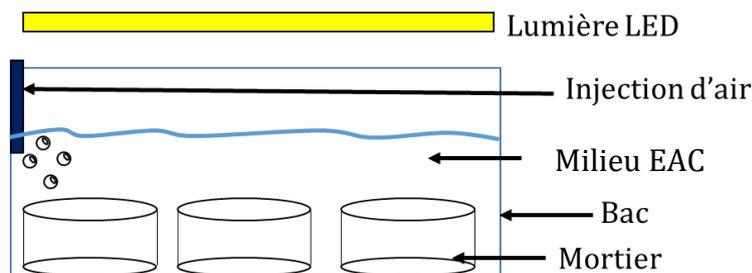


Figure 50. Dispositif expérimental installé en laboratoire pour le milieu EAC

Les essais d'immersion réalisés en laboratoire permettent d'observer l'effet du biofilm sur le matériau de façon accélérée puisque toutes les conditions de croissances sont optimales. Ainsi 36 éprouvettes Ø110 mm × H50 mm (soit 18 éprouvettes Ø110 mm × H50 mm pour les deux milieux étudiés) ont été immergées, pour réaliser les analyses aux différentes échéances. Il y a également 24 cubes de mortier (10 mm × 10 mm × 5 mm) qui ont été placés dans le fond du bac pour les deux

milieux contrôlés en laboratoire. Ces échantillons ont été utilisés pour réaliser les images MEB, fluorescence par microscope optique, ... (Figure 48).

2. Mésocosme : Eau de mer Naturelle (EN)

2.1. Matériels et installation du milieu d'immersion

Des mésocosmes semi-fermés ont été installés au sein de la Station Marine du CREC-Unicaen à Luc-sur-Mer (Figure 51). Ces mésosomes sont des bacs disposés les uns à côté des autres et reliés par des tuyaux permettant la circulation d'eau de mer. L'eau de mer provenant de la baie de Seine, est récupérée par la station marine à l'aide d'une prise installée dans la zone subtidale de la baie. Cette eau est non filtrée. Ce système permettra alors le développement de macro-algues et d'autres microphytobenthos sur la surface des échantillons. Les bacs sont placés sous une serre transparente permettant la lumière solaire, nécessaire à la photosynthèse, de pénétrer. L'immersion en mésocosme permettra ainsi d'observer l'effet du biofilm naturel associé à d'autres organismes marins sur le matériau dans des conditions se rapprochant du milieu *in situ*. Ce milieu composé d'Eau de mer Naturelle est nommé EN.

Les éprouvettes de mortiers ont été placées dans des bacs différents correspondant à un ordre de récupération suivant les échéances. L'immersion a été réalisée pendant une période allant de septembre 2019 à septembre 2020. Au total, 18 éprouvettes Ø110 mm × H50 mm ont été immergées pour réaliser les analyses aux différentes échéances. Il y a également 12 cubes de mortier (10 mm × 10 mm × 5 mm) qui ont été immergés dans ce dispositif.

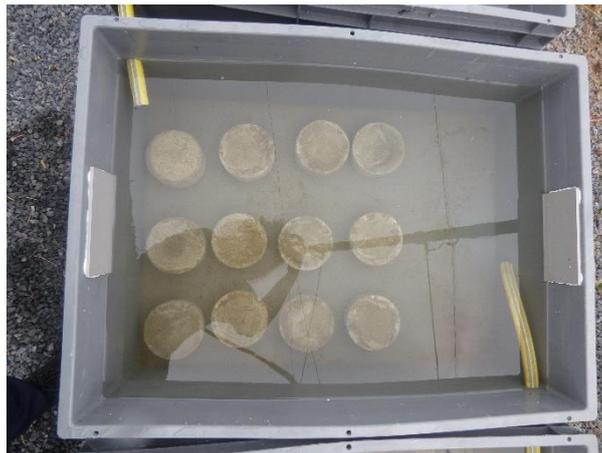


Figure 51. Dispositif expérimental des mortiers immergés dans le milieu EN

II. Suivi de la colonisation des éprouvettes de mortiers

1. Evolution des facteurs environnementaux des milieux d'immersion

Le suivi de certains paramètres environnementaux (pH et température) a été réalisé lors de la récupération des éprouvettes de mortier à chaque échéance pour les différents milieux étudiés (EA, EAC et EN).

Une variation de pH est observée dans les milieux d'immersion installés en laboratoire (EA et EAC, Figure 52). En effet, une augmentation du pH (pH de 9,02) est observée dès les premiers jours d'immersion (10 jours) dans le milieu contenant la diatomée *C. closterium*. Cette valeur va diminuer puis réaugmenter au cours du temps. Cette évolution du pH peut être due au relargage d'ions Ca^{2+} par la matrice cimentaire suite au phénomène de lixiviation de la portlandite. Nous le démontrerons par la suite grâce aux analyses ATG/DTG. Ce relargage d'ions associé à l'activité photosynthétique des micro-algues expliquent les différences obtenues avec le milieu EA où il n'y a pas de développement algal. Par ailleurs, le renouvellement du milieu peut expliquer la diminution du pH au cours de l'immersion. En revanche, en eau de mer naturelle (EN) (Figure 52), le pH reste stable avec une valeur autour de 7,60. La stabilisation du pH est due au renouvellement continu de ce milieu contrairement aux milieux d'immersions contrôlés en laboratoire.

En ce qui concerne la température, elle est restée relativement stable (autour des 19°C, Figure 52) au cours de l'expérimentation pour les milieux EA et EAC installés en chambre climatique.

Par contre, une variation de température a été enregistrée dans le milieu EN. Cette variation s'explique par la saisonnalité (immersion entre septembre 2019 et décembre 2020). Cette saisonnalité a favorisé la succession de diverses communautés algales observées à la surface des échantillons.

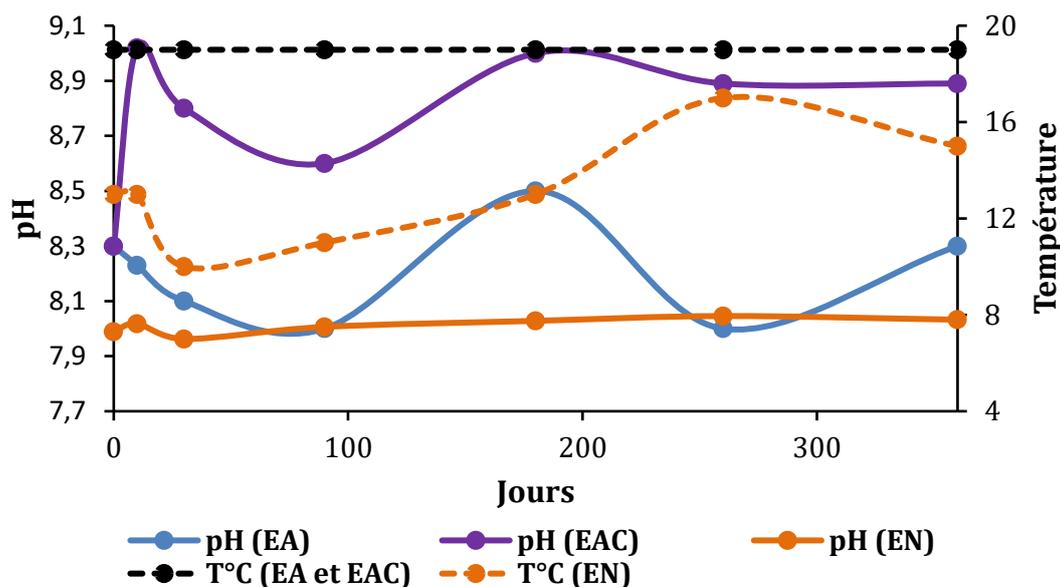


Figure 52. Evolution du pH (ligne en gras) et de la température (ligne en pointillé) en fonction de la durée et du milieu d'immersion (EA, EAC et EN)

2. Fluorescence par mesure PAM : Junior PAM

Les mesures de l'activité et de la capacité photosynthétique du biofilm ont été effectuées à chaque échéance pour les 2 environnements (EAC et EN) sur les éprouvettes Ø110 mm × H50 mm (Annexe 1ab).

Le suivi de la biomasse chlorophyllienne fixée à la surface du mortier a été réalisé grâce à l'indice F_0 (Figure 53a). Les résultats obtenus pour les mortiers immergés en laboratoire (EAC) montrent, dès les premiers jours d'immersion (10 jours), une quantité de biomasse (avec un total de 239 u.a) supérieure à celle obtenue aux échéances à plus long terme. Le biofilm est mature au bout d'environ 15 jours. Par la suite, une fluctuation de la bio-colonisation est observée (avec une moyenne de 187 u.a) jusqu'à un recouvrement plus faible à 360 jours d'immersion (avec une biomasse de 102 u.a). La formation progressive du biofilm est nettement visible sur les éprouvettes de mortier au cours du temps (Annexe 1ab). Le biofilm s'est progressivement épaissi et est devenu visible macroscopiquement.

En ce qui concerne le mortier immergé en EN, l'indice de biomasse atteint sa valeur maximale au bout de 30 jours d'immersion (198 u.a), puis la bio-colonisation va fluctuer en passant d'un minimum à un maximum à chaque échéance. Après 360 jours d'immersion, la quantité de biomasse fixée à la surface du matériau réaugmente (septembre 2020) avec une valeur de 149 u.a. En eau de mer naturelle, les épisodes saisonniers influencent fortement la disponibilité des nutriments dans la colonne d'eau. De plus, la température et la lumière sont des facteurs

favorisant le développement de certaines espèces. Une succession saisonnière peut ainsi être visible. Il est, dans ce cas, important de préciser que le suivi de la colonisation a débuté pendant la période automnale.

Par ailleurs, l'activité de broutage des micro-algues par des protozoaires, métazoaires (rotifères, nématodes...) ou autres gastéropodes de la microflore marine peut expliquer la diminution de la biomasse algale à la surface des éprouvettes. Le biofilm moins dense à certaines échéances a également favorisé le développement des macro-algues à 180 et 360 jours d'immersion (Annexe 1ab). Cependant, l'écart-type des mesures de biomasse est relativement important à certaines échéances (après 30 et 360 jours d'immersion par exemple) et dépend fortement de la zone de mesure. En revanche, les résultats enregistrés permettent d'obtenir un bon indice de la bio-colonisation du matériau. Les Figure 53a et Figure 53b montrent également que la biomasse du microphytobenthos ainsi que son état physiologique sont sensibles aux variations de température des cycles saisonniers (entre 10 et 17 °C) (Figure 52). De plus, chaque espèce de diatomée a une gamme de températures optimales de croissance d'où la diversification des espèces pouvant être présentes à la surface du mortier. L'effet de la température sur la quantité de biomasse n'est pas observé en laboratoire car elle est maintenue constante à 19 °C.

L'estimation du rendement quantique du photosystème II (F_v/F_m) permet de connaître l'état physiologique des micro-algues fixées sur les éprouvettes de mortier (Figure 53b). Il présente l'aptitude des cellules algales à réaliser la photosynthèse à des fins de production de matière organique. Il est donc sensible à certains facteurs abiotiques comme la lumière et la concentration en sels nutritifs du milieu environnant. Les résultats obtenus montrent que l'indice de l'état physiologique du biofilm est élevé, en moyenne $F_v/F_m = 0,6$ pour le milieu EN et 0,58 pour le milieu EAC. Ces résultats révèlent un très bon état physiologique du microphytobenthos. Le biofilm formé à la surface du mortier s'est bien acclimaté aux variations saisonnières en milieu EN et aux conditions de culture en laboratoire (EAC). Le F_v/F_m associé à la biomasse du microphytobenthos (F_0) montre que le biofilm s'est bien développé et acclimaté à son environnement et à son substrat.

La capacité photosynthétique maximale ($rETR_{max}$) des espèces d'algues à biofilm est présentée par la Figure 53b. Les résultats montrent qu'en milieu naturel (EN), l'activité de transport d'électrons du photosystème-PSII du biofilm fixé sur le mortier a observé beaucoup de variations jusqu'à atteindre une valeur maximale à 90 jours d'immersion ($109 \mu\text{mol.e}^- \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

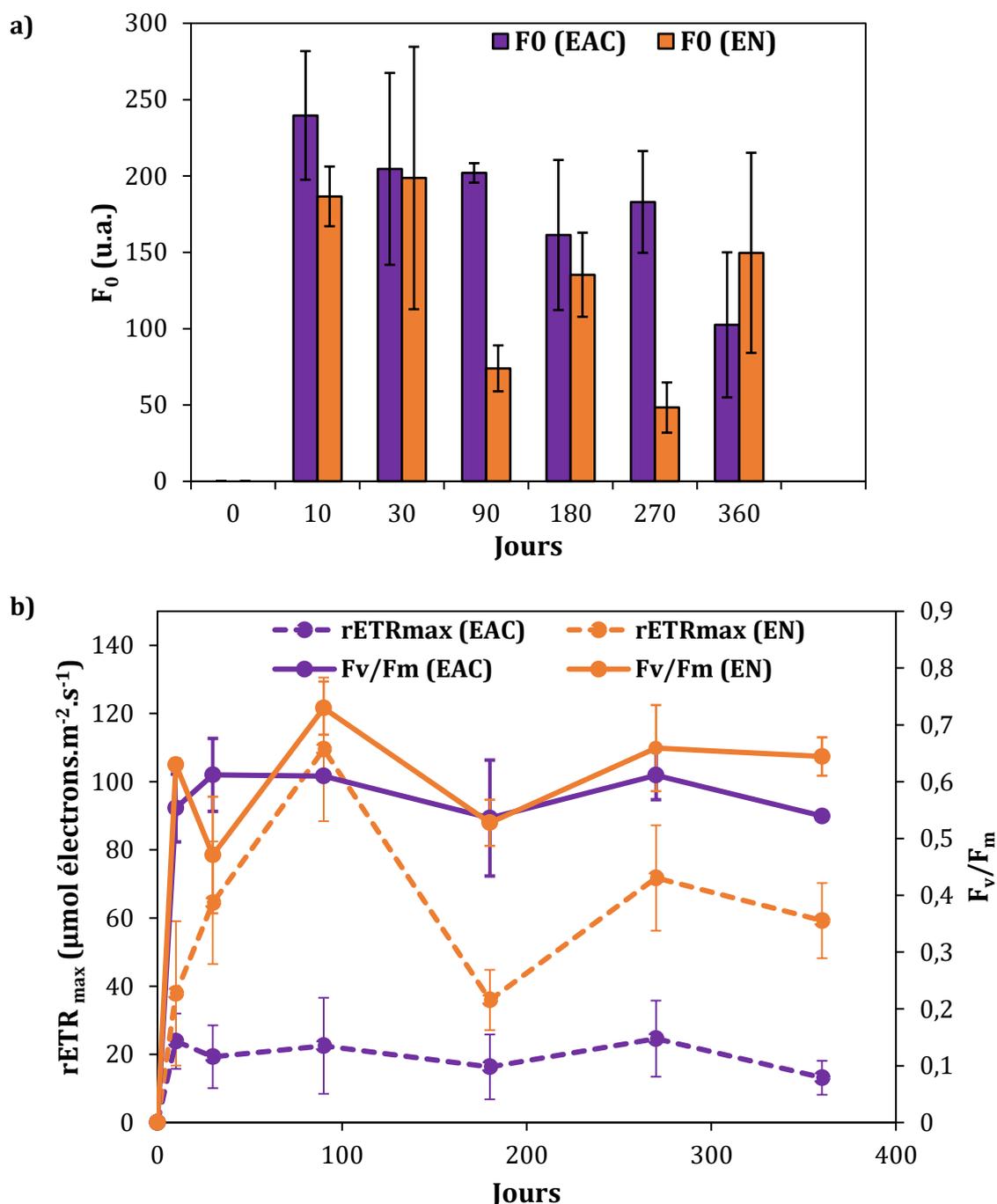


Figure 53. Dynamique de la colonisation par le biofilm microphytobenthique sur du mortier en fonction du temps dans les deux milieux étudiés (en Eau de mer Artificielle + biofilm de *C. closterium* + nutriments (EAC) (ligne en gras) et en Eau de mer naturelle + biofilm naturel (EN) (ligne en pointillée)) : **(a)** Biomasse chlorophyllienne F_0 du microphytobenthos et indice F_v/F_m Rendement quantique maximum du PSII (ie. Indice d'état physiologique) ; **(b)** Capacité photosynthétique maximale du biofilm ($rETR_{max}$, $\mu\text{mol. e}^{-}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)

Dans le milieu EN, il est à noter qu'à 90 jours et 260 jours d'immersion le F_v/F_m augmente alors que les indices de biomasse atteignent leur plus faibles valeurs (74 et 48 u.a respectivement) avec

une température de 10 °C et 17 °C ce qui signifie que le microphytobenthos, présent en surface du mortier, s'est adapté à ces gammes de températures (Figure 52).

La capacité photosynthétique des micro-algues dépend de l'énergie lumineuse nécessaire pour saturer la photosynthèse. Contrairement aux essais en laboratoire, où une espèce de diatomée est étudiée, en eau de mer naturelle les variations de la composition des communautés de micro-algues peuvent influencer la capacité photosynthétique car chaque espèce a une capacité maximale qui lui est propre. La capacité photosynthétique des micro-algues peut également être influencée par d'autres facteurs abiotiques tels que la température ou la disponibilité des nutriments qui vont varier au cours des saisons. Il est donc important de connaître les espèces qui composent le biofilm afin d'évaluer la productivité primaire.

En milieu contrôlé (EAC), le transport d'électrons est relativement stable pour l'espèce *C. closterium* au cours du temps avec une moyenne de $20 \mu\text{mol.e} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Les essais en laboratoire permettent de maîtriser l'ensemble des paramètres influençant les performances photosynthétiques des micro-algues. En effet, l'intensité lumineuse et la température sont stables tout au long de l'expérience avec des cycles de lumière jour/nuit contrôlés (Figure 52). Le milieu est également renouvelé régulièrement en nutriments pour permettre un développement optimal et continu des diatomées mais également pour garantir l'immersion totale des éprouvettes de mortier au cours de l'expérimentation (compensation du volume d'eau évaporé).

3. Taux d'encrassement

La bio-colonisation du mortier a également été suivie par spectrocolorimétrie sur les éprouvettes $\emptyset 110 \text{ mm} \times \text{H}50 \text{ mm}$ en mesurant les valeurs d'intensité d'encrassement en fonction du temps d'immersion dans l'environnement EN et EAC (Figure 54). La colonisation des éprouvettes n'a pas été uniforme pour les deux environnements étudiés tel qu'observé avec le suivi réalisé via l'indice F_0 (Figure 53a). Une augmentation progressive de la bio-colonisation du mortier est relevée en présence de *C. closterium* (milieu EAC) jusqu'à 90 jours d'immersion avec un taux d'encrassement de 6,5% puis ce taux se stabilise autour des 6%.

En eau de mer naturelle (EN), l'intensité d'encrassement du mortier est plus élevée dès les premiers jours d'immersion (10 jours) avec une valeur de 8%. Les mesures du spectromètre montrent ensuite que le mortier est moins recouvert de biofilm après cette échéance. En effet, l'intensité d'encrassement est à 4,9% après 30 jours d'immersion. Ces résultats montrent que l'initiation du biofilm n'est jamais homogène sur toutes les éprouvettes de mortier. Par la suite, une stabilisation du biofilm est observée au cours de l'immersion.

En comparant l'évolution de la bio-colonisation des éprouvettes de mortier à partir des valeurs obtenues par le suivi du taux d'encrassement et de l'indice de biomasse F_0 , une différence de

tendance entre les deux environnements est observée. En effet, les mesures PAM sont plus précises et permettent d'avoir des informations complémentaires comme notamment l'activité photosynthétique du microphytobenthos. Ces mesures permettent de comprendre l'effet de l'environnement et du substrat sur le développement du biofilm.

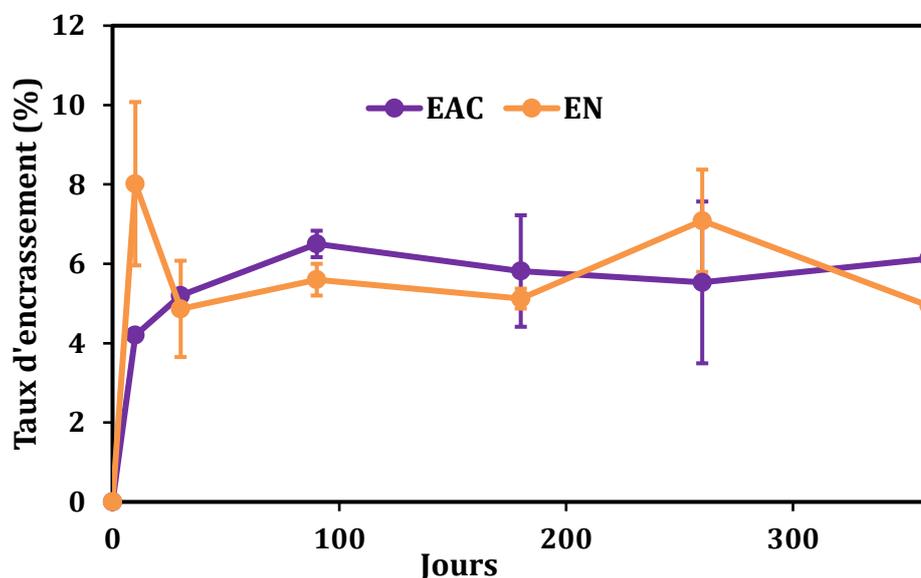


Figure 54. Taux d'encrassement (%) du mortier au cours du temps dans l'environnement EAC et EN

Bien que l'analyse n'ait pas été faite sur les mêmes triplicatas de mortier tout au long de l'expérience, étant donné que les tests réalisés, par la suite, sur les éprouvettes de mortier sont destructifs, ces résultats nous donnent néanmoins des informations sur la tendance de la cinétique de bio-colonisation en fonction du temps d'immersion dans les deux environnements étudiés.

L'intensité d'encrassement tout comme les mesures de l'indice de biomasse chlorophyllienne F_0 et activité photosynthétique du microphytobenthos à partir des mesures PAM vont permettre de comprendre leurs effets à long terme sur la surface de la matrice cimentaire en les comparant avec les résultats obtenus avec l'environnement EA (échantillons non colonisés).

4. Observation par macroscopie optique et par fluorescence

La colonisation du matériau a été étudiée à travers des observations au microscope sur des petits échantillons 10 mm x 10 mm x 5 mm à différentes échéances dans les milieux eau de mer artificielle avec diatomée (EAC) et eau de mer naturelle (EN). Cette méthode permet de visualiser la colonisation à la surface du matériau. La colonisation n'étant pas forcément visible à l'œil nu et même à de faible grossissement (Figure 55), la fluorescence a permis de révéler la biomasse fixée sur les échantillons de mortier.

Suite à ces observations, le taux de recouvrement est présenté Tableau 10. On note une augmentation de la colonisation par le microphytobenthos en fonction du temps et ce dans les deux environnements (EAC et EN). En effet, les valeurs passent de 0 à 30 % de recouvrement du mortier immergé dans le milieu EAC et jusqu'à 33,6 % dans le milieu EN après 360 jours d'immersion.

Tableau 10. Taux de recouvrement des mortiers après immersion en Eau de mer Artificielle + *C. closterium* (EAC) et en Eau de mer Naturelle (EN) à différentes échéances

Milieu	Jour 0	10 jours	30 jours	90 jours	180 jours	270 jours	360 jours
EAC	0%	11,7%	22,5%	18,7%	18,1%	23,3%	30%
EN	0%	15,3%	13%	23,6%	31,6%	25,1%	33,6%

Malgré les précautions prises lors de la fabrication et le sciage des mortiers, des petites cavités ont été formées sur la surface. Il a été observé que certaines cellules algales chlorophylliennes s'y sont installées et principalement dans le milieu EN. Ces cavités peuvent servir d'abris et ainsi protéger les espèces contre les brouteurs et autres prédateurs.

Par ailleurs, nous avons remarqué quelques cristaux de sels sur les échantillons de mortiers immergés dans le milieu eau de mer artificielle avec diatomée (EAC). Les conditions de laboratoire ont probablement favorisé le dépôt de ces cristaux dû notamment à l'évaporation de l'eau avant son renouvellement. Ces cristaux n'ont néanmoins pas impacté la colonisation puisque nous avons observé même quelques cellules de *C. closterium* (Figure 55) sur ceux-ci.

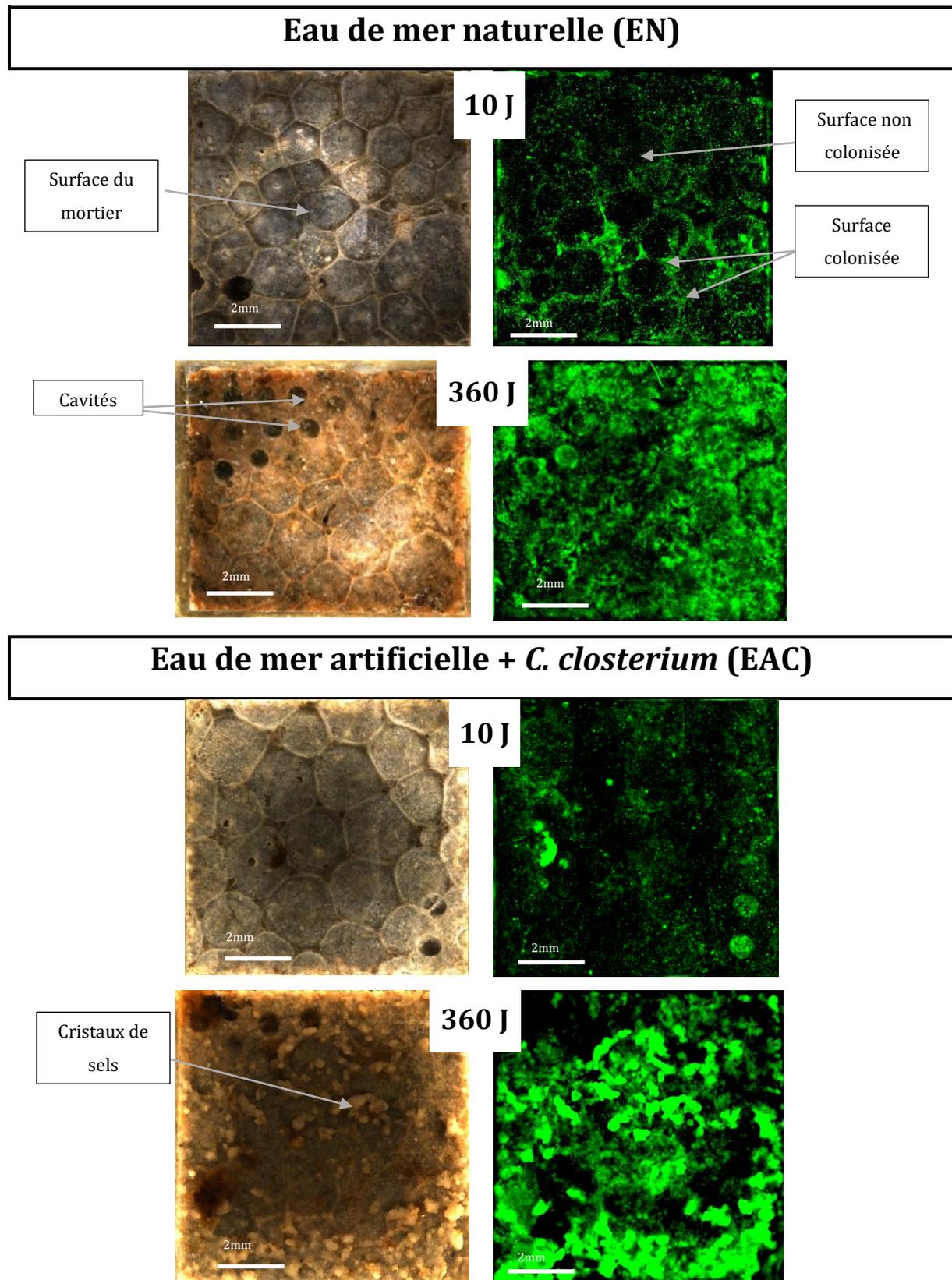


Figure 55. Observations macroscopiques (X80) de mortiers (10 mm × 10 mm × 5 mm) immergés à 10 et 360 jours (à gauche) ; Observations macroscopiques par fluorescence EGFP (à droite) en EN et EAC, la couleur verte est spécifique au pigment chlorophyllien du microphytobenthos fixé sur les échantillons, le noir représente la zone du mortier non colonisé

5. Observation au MEB

Les observations au Microscope Electronique à Balayage (MEB) ont été réalisées à chaque échéance, de 10 à 360 jours d'immersion sur les échantillons 10 mm×10 mm ×10 mm immergés en EAC et en EN. Nous nous sommes principalement focalisés sur les images représentatives des diatomées et bactéries observées et de leurs sécrétions sur le substrat (EPS : Substances Polymères Extracellulaires). Les images MEB ont permis d'étudier les caractéristiques morphologiques des diatomées composant le biofilm à la surface du mortier. La microstructure et la morphologie des phases de la matrice a quant à elle été plus particulièrement étudié dans la partie III. 2.2.2. de ce chapitre.

Les observations MEB des mortiers immergés dans l'eau de mer artificielle avec la diatomée *C. closterium* (EAC) ont montré une colonisation progressive du matériau au cours de l'immersion. Les cellules de *C. closterium* sont agglomérées sous forme de biofilm et incorporées dans une matrice composée de substances polymériques extracellulaires (EPS) (Figure 56ab).

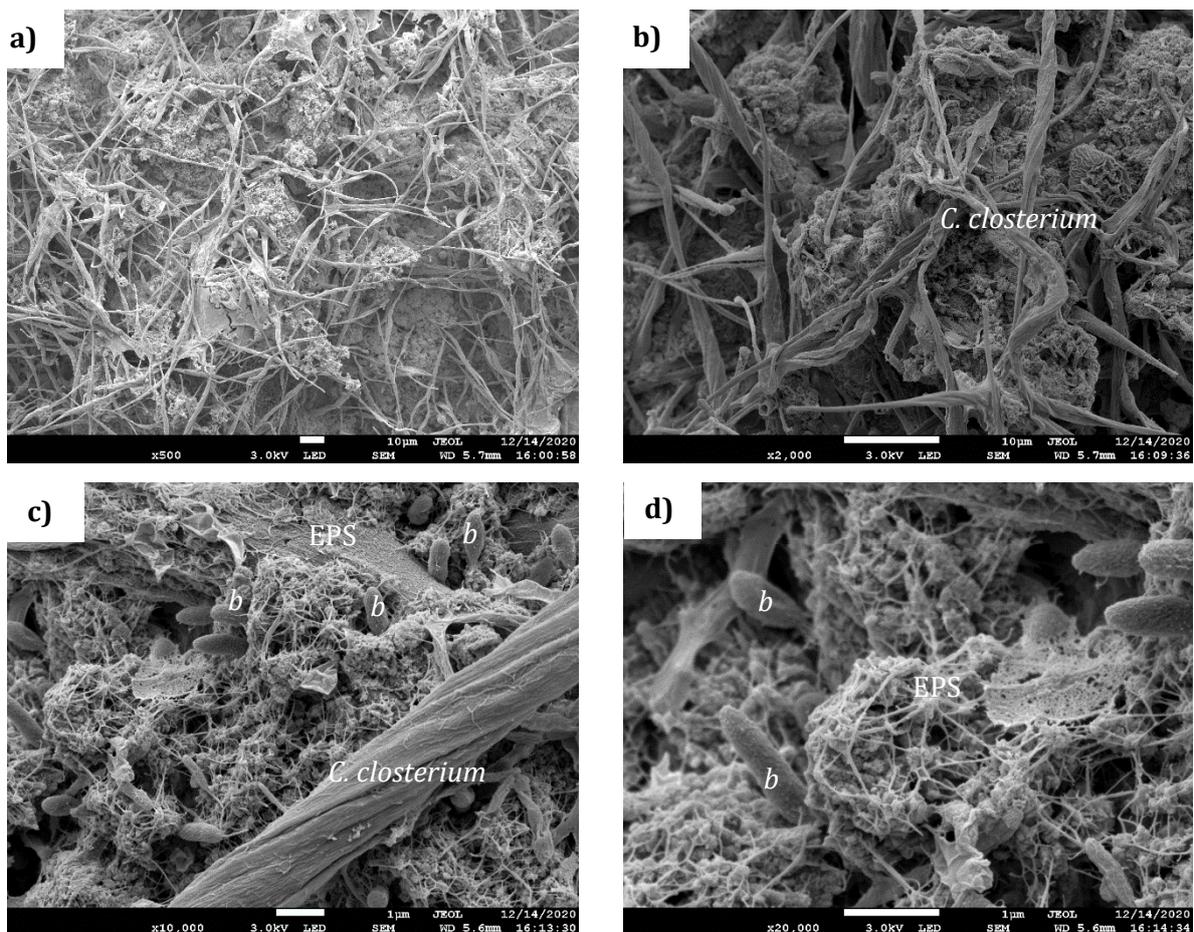


Figure 56. Exemple d'observations au microscope électronique à balayage, à différents grossissements, de biofilms de *C. closterium* fixés sur le mortier après 360 jours d'immersion (**a, b, c et d**) (*b* : bactéries ; EPS : Substances Polymères Extracellulaires sécrétées par les micro-organismes)

La déshydratation des échantillons de mortier n'a pas empêché l'identification des EPS qui ont un aspect filamenteux. Les diatomées *C. closterium* cultivées en laboratoire sont caractérisées par une forme allongée (Figure 56ab) dont quelques-unes sont torsadées (Figure 56c). Les images MEB nous montrent également la présence d'autres micro-organismes. En effet, à des grossissements plus importants, des souches bactériennes sont identifiables (Figure 56cb).

En ce qui concerne les mortiers immergés en eau de mer naturelle, les observations MEB ont montré une plus grande diversité d'espèces microphytobenthiques. Par ailleurs, de nombreux fragments de diatomées avec de fortes densités de cellules incorporées dans une matrice d'EPS (Figure 57) ont été observés. Cette matrice recouvre presque l'ensemble du mortier.

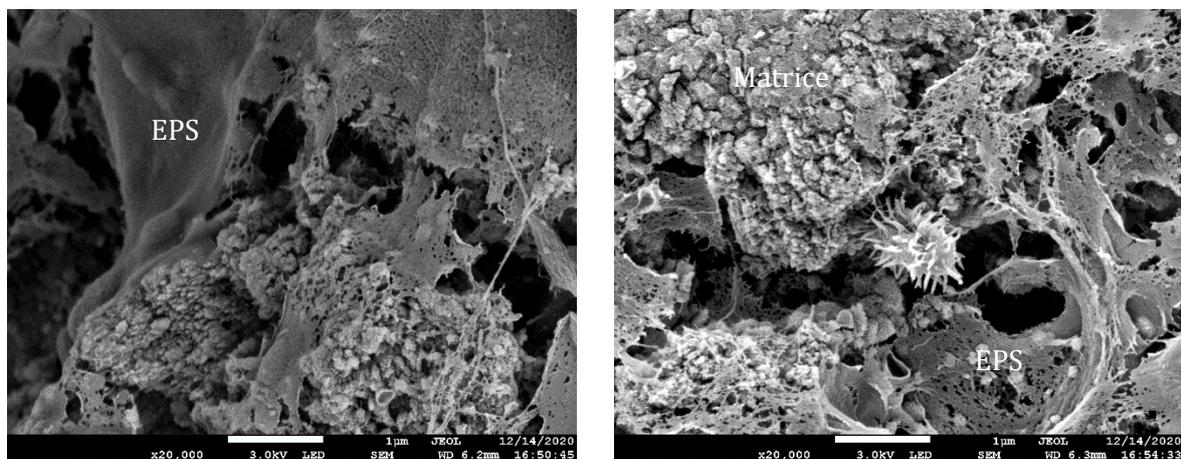


Figure 57. Exemple d'observations au microscope électronique à balayage de biofilms avec EPS (Substances Polymères Extracellulaires) sur le mortier après 360 jours d'immersion en eau de mer naturelle.

Une colonisation bactérienne a également été observée à la surface des mortiers (Figure 58 et Figure 59). Certaines diatomées ont des cellules bactériennes attachées à leur frustule (Figure 58). Les diatomées et les bactéries peuvent avoir une interaction dite mutualiste. En effet, cette association permet par exemple de favoriser la formation de biofilm (Windler et al., 2015; Salta et al., 2013) et de s'apporter de manière mutuelle des sources nutritives (Wetz and Wheeler, 2007).

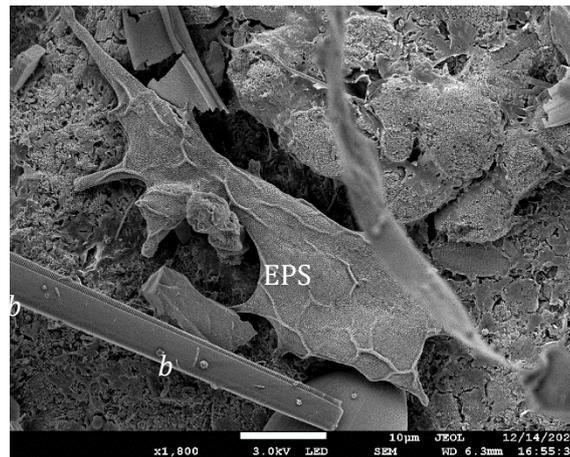


Figure 58. Observations au microscope électronique à balayage de biofilms avec EPS (Substances Polymères Extracellulaires) et bactéries (*b*).

Les images MEB montrent des diatomées ayant deux grands types de morphologie : Les centriques qui présentent une symétrie centrale et les pennées qui ont une symétrie bilatérale (Figure 59). Les diatomées pennées sont ensuite séparées entre les araphides et les raphides en fonction de la présence ou non d'un raphé. Le raphé, est une fente longitudinal observé au niveau du frustule qui est notamment impliqué dans le « glissement » des diatomées via l'excrétion de mucilage (Round et al., 1990).

Les observations au MEB des mortiers immergés dans l'eau de mer naturelle ont permis de montrer l'abondance et la diversité des diatomées benthiques. Cette diversité s'explique par des modifications abiotiques du milieu liées notamment à la saisonnalité. Une analyse plus approfondie des observations réalisées permettrait de déterminer les principaux genres de diatomées présents dans les échantillons. Nous avons également pu constater la très grande sécrétion d'EPS par les diatomées permettant l'initiation et la complexification du biofilm sur le substrat.

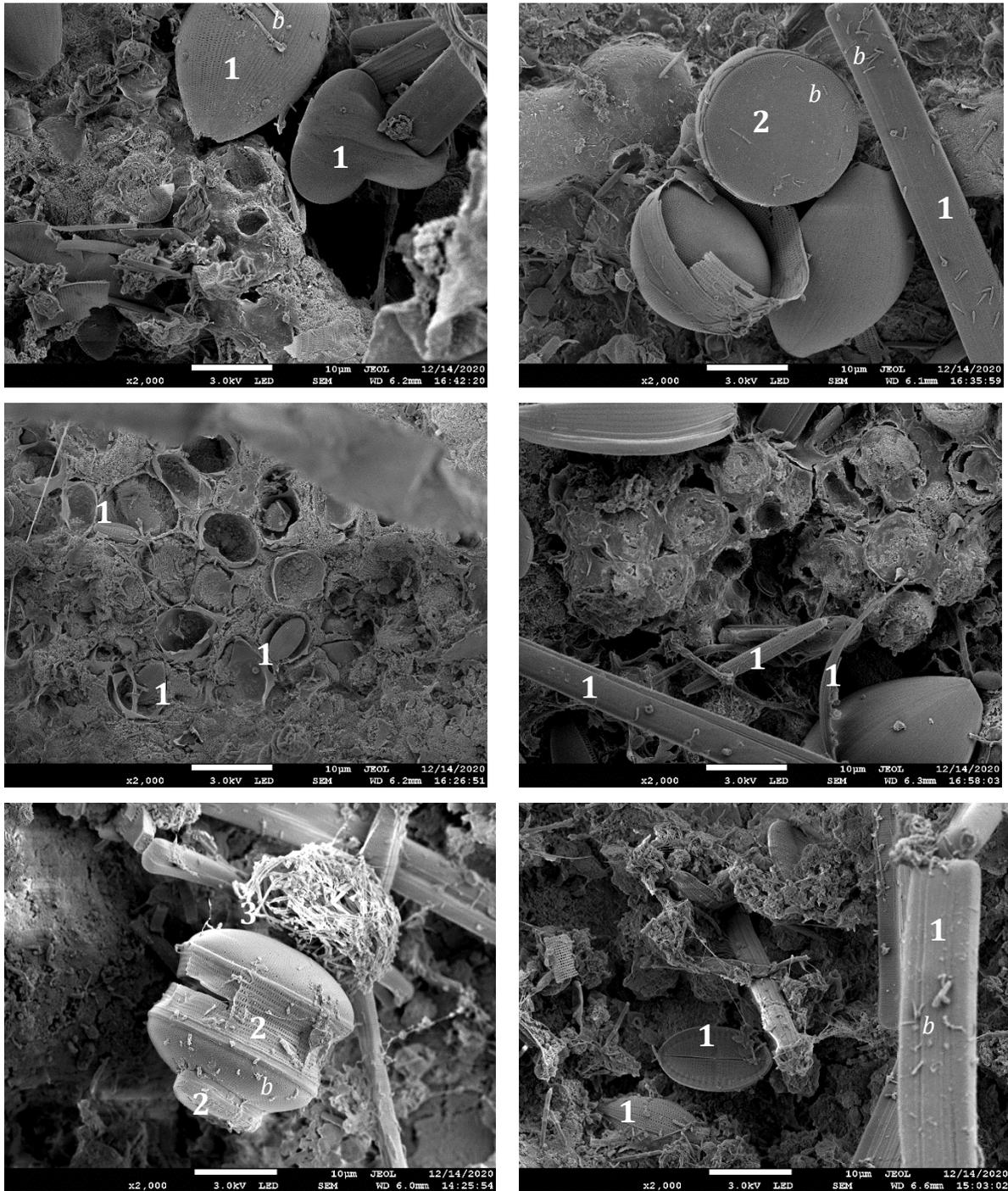


Figure 59. Exemple d'observations au Microscope Electronique à Balayage de biofilms microphytobenthiques à la surface du mortier après 360 jours d'immersion en eau de mer naturelle. Le biofilm est composé de diatomées pennales avec ou dépourvues de raphé (1), de diatomées centriques (2), de bactéries (*b*).

III. Effet du biofilm sur la couche superficielle du mortier

1. Caractérisation chimique du mortier

1.1. Diffusion des ions chlorure : mesure par chromatographie en phase ionique

La résistance des mortiers à la diffusion des ions chlorure a été étudiée en fonction des différents environnements d'immersion : eau de mer artificielle sans diatomée (EA), eau de mer artificielle avec diatomée (EAC) et eau de mer naturelle et EN). La Figure 60abc présente l'évolution de la concentration en ions Cl⁻ suivant la profondeur (de la surface jusqu'à 10 mm) ainsi que les milieux et la durée d'immersion.

Les résultats obtenus montrent que la diffusion des ions chlorure dans le mortier varie en fonction de l'environnement d'immersion et de sa durée d'immersion (Figure 60abc).

Initialement, le mortier référence (non immergé) ne contient pas beaucoup d'ions chlorure libres dans la solution interstitielle avec une teneur moyenne de 112 mg/kg de mortier.

En ce qui concerne le mortier immergé dans l'eau de mer artificielle (EA) (Figure 60a), une faible diffusion des ions chlorure est observée et ceci quelle que soit la profondeur.

A 10 jours d'immersion, la concentration en ions chlorure atteint une moyenne de 645 mg/kg de mortier soit une augmentation de 84% par rapport à la concentration d'ions chlorure présents initialement dans le mortier dans les premiers millimètres. Au cours de l'immersion, la teneur en Cl⁻ libres augmente légèrement à partir de 4 mm de profondeur. Cependant la concentration des ions chlorure ne dépasse pas les 700 mg/kg de mortier.

Dès que le matériau est colonisé par une fine couche de microphytobenthos (Figure 53a et Figure 54), une accélération de la pénétration des ions chlorure à l'intérieur du mortier est observée. Suivant le milieu d'immersion, la quantité de biomasse n'a pas eu le même effet sur la concentration en ions chlorure libres dans la matrice. Le mortier immergé dans l'eau de mer artificielle avec la diatomée *C. closterium* (EAC) (Figure 60b) montre une augmentation progressive de la teneur en ions chlorure dans le mortier au cours du temps jusqu'à 260 jours d'immersion. A 10 jours d'immersion, période après laquelle le biofilm a adhéré au mortier, la teneur en ions chlorure a presque doublé dans le matériau contrairement à un matériau non colonisé (milieu EA) (Figure 60a) (1530 mg/kg de mortier en EAC entre 0-2 mm de profondeur contre 865 mg/kg de mortier en EA). Par ailleurs, les résultats montrent que les ions chlorure pénètrent plus en profondeur dans le matériau au fur et à mesure de son immersion dans le milieu EAC sauf pour l'immersion à plus long terme (360 jours).

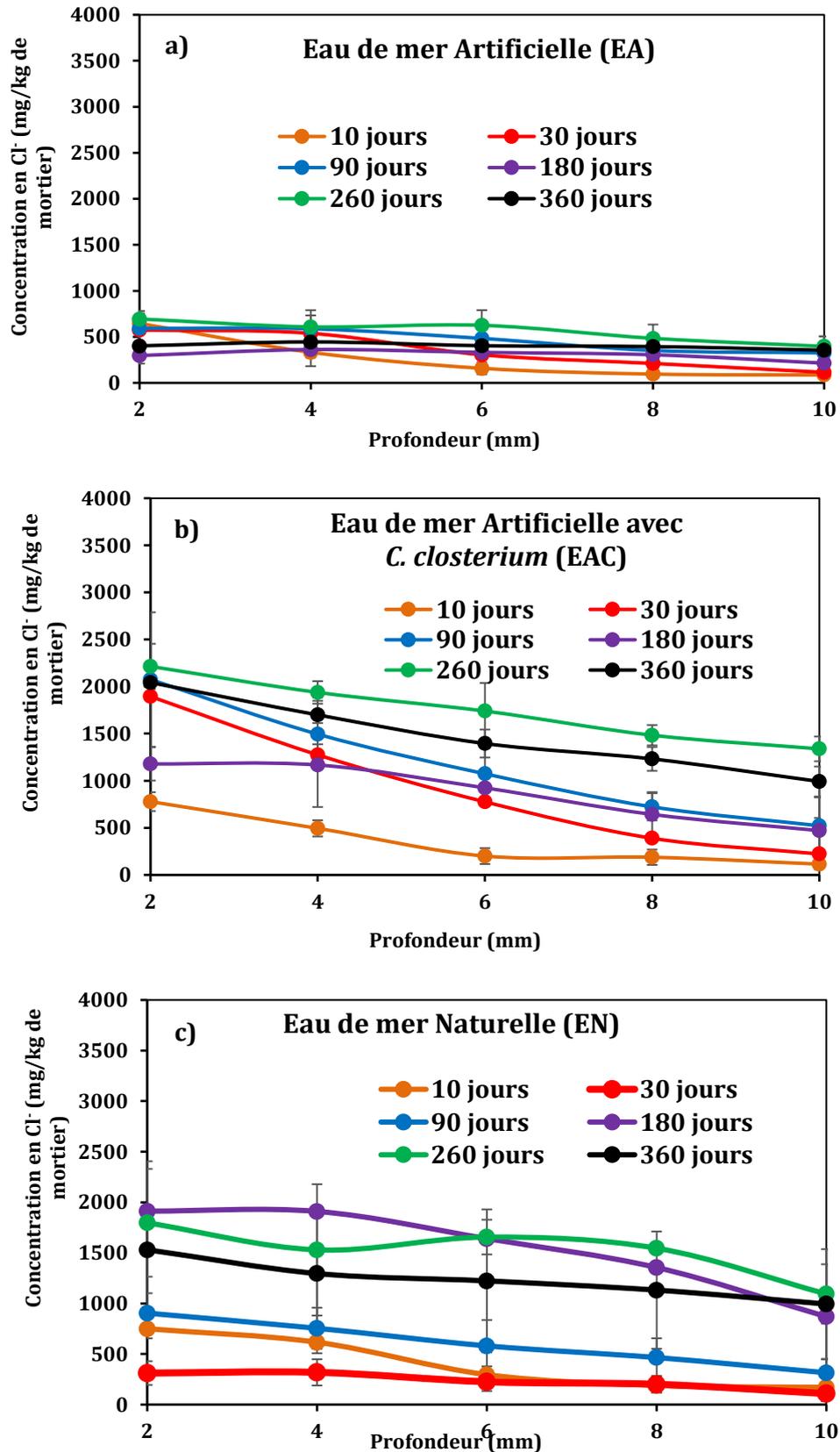


Figure 60. Diffusion des ions chlorure libres dans le mortier jusqu'à 10 mm de profondeur, au cours de l'immersion dans de **(a)** l'eau de mer artificielle ; **(b)** l'eau de mer artificielle + *C. closterium* ; **(c)** l'eau de mer naturelle

En effet, à cette échéance, on observe des teneurs en Cl⁻ plus faible dès les premiers millimètres par rapport au mortier immergé pendant 260 jours. Il est important de noter qu'à 360 jours d'immersion une plus faible biomasse est observée. Néanmoins, durant l'immersion une partie du biofilm peut se détacher et se remettre en suspension dans la colonne d'eau puis reformer un biofilm à un autre endroit ou sur une autre éprouvette. De plus, nous pouvons supposer que la sécrétion des EPS par *C. closterium* et les bactéries présentes à la surface a également pu piéger les ions chlorure et donc limiter sa diffusion dans la matrice cimentaire. En ce qui concerne le mortier immergé en eau de mer naturelle (Figure 60c) la résistance du mortier à la pénétration des ions chlorure est plus faible au cours de l'immersion et en profondeur par rapport au milieu EAC (Figure 60b et c). La formation progressive du biofilm (à 10 jours) entraîne une augmentation de la diffusion des ions chlorure entre 0 et 2 mm (1530 mg/kg de mortier). L'accélération de la diffusion des ions chlorure est observée à partir de 90 jours d'immersion où l'on passe de 904 à 1797 mg/kg de mortier à 0-2 mm de profondeur après 260 jours d'immersion. De plus, cette augmentation est également constatée jusqu'à 10 mm de profondeur passant de 314 à 1636 mg/kg de mortier.

Après 360 jours d'immersion, une diminution de la concentration en ions chlorure est également observée par rapport aux échéances précédentes (Figure 60c). En effet, la concentration en ions Cl⁻ est de 1530 mg/kg de mortier à environ 2mm de profondeur après 360 jours d'immersion alors qu'elle est de 1797 mg/kg de mortier après 260 jours d'immersion. On peut ainsi en conclure qu'au cours du temps le biofilm va accélérer la diffusion des agents agressifs de l'eau de mer puis celle-ci va être réduite à long terme supposant que le biofilm va jouer un rôle protecteur contre les ions chlorure.

1.2. Variation du pH

La variation du pH a été évaluée dans la couche superficielle du mortier (10 mm de profondeur). Cette mesure de pH (Figure 61abc) permet d'étudier l'impact du milieu d'immersion (avec ou sans présence de biofilm) sur le mortier.

Avant immersion, le pH du matériau est élevé (~12,3) en raison des alcalins présents dans la solution interstitielle. Ce pH est toutefois moins élevé que les valeurs trouvées dans la littérature, ce qui peut être expliqué par la carbonatation qui aurait eu lieu après la cure des échantillons. Les résultats obtenus montrent qu'après 10 jours d'immersion dans les trois milieux, le pH reste relativement stable par rapport à celui du mortier de référence (non immergé). En revanche, à partir de 30 jours d'immersion, une nette diminution du pH est observée. Cette diminution de pH dans les différents milieux étudiés, persiste au cours de l'expérimentation quelle que soit la profondeur.

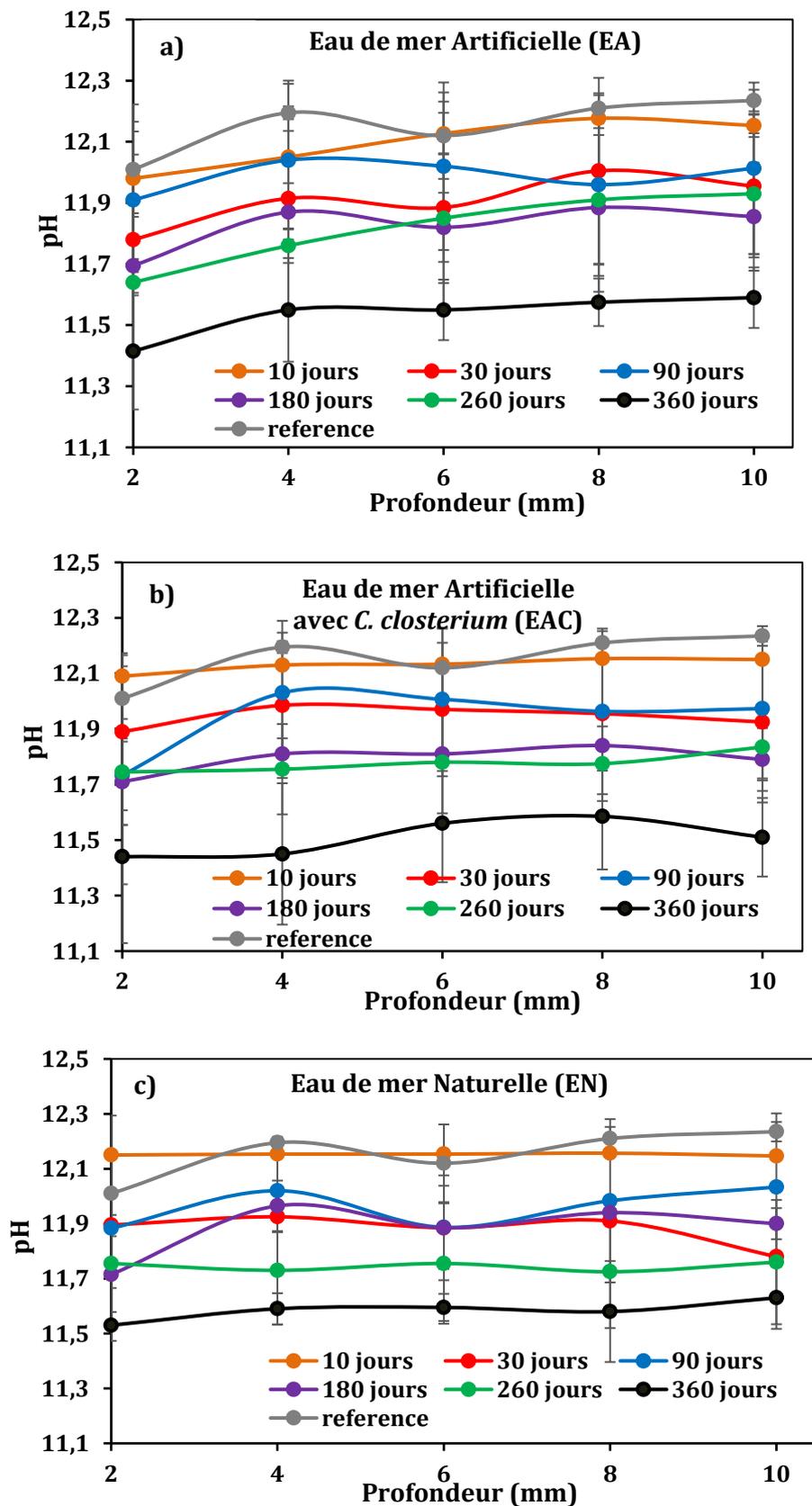


Figure 61. Evolution du pH du mortier en fonction de la durée d'immersion et de la profondeur dans différents milieux en : **(a)** eau de mer artificielle ; **(b)** eau de mer artificielle + *C. closterium* ; **(c)** eau de mer naturelle

En effet, à long terme, les valeurs de pH enregistrées pour une profondeur de 2 mm sont quasiment atteintes à 10 mm de profondeur. A titre d'exemple, après 260 jours d'immersion en eau de mer naturelle EN le pH obtenu à 10 mm de profondeur est d'environ 11,8 (Figure 61c). Les mesures de pH (Figure 61abc et Figure 62) montrent également que les plus faibles valeurs sont obtenues après 360 jours d'immersion dans les trois milieux. Par ailleurs, ces valeurs ne varient pas d'un milieu à l'autre (11,42 en EA, 11,44 en EAC et 11,53 en EN) ce qui nous indique que la bio-colonisation des mortiers dans les environnements EAC et EN n'a pas eu d'influence sur la variation du pH du matériau cimentaire. Ainsi, La réduction du pH est une conséquence de la modification de la composition de la matrice cimentaire engendrée par l'attaque chimique de l'eau de mer (Chapitre 1, II.1). Cette action aura également une influence sur l'évolution de la microstructure du matériau au cours de son immersion.

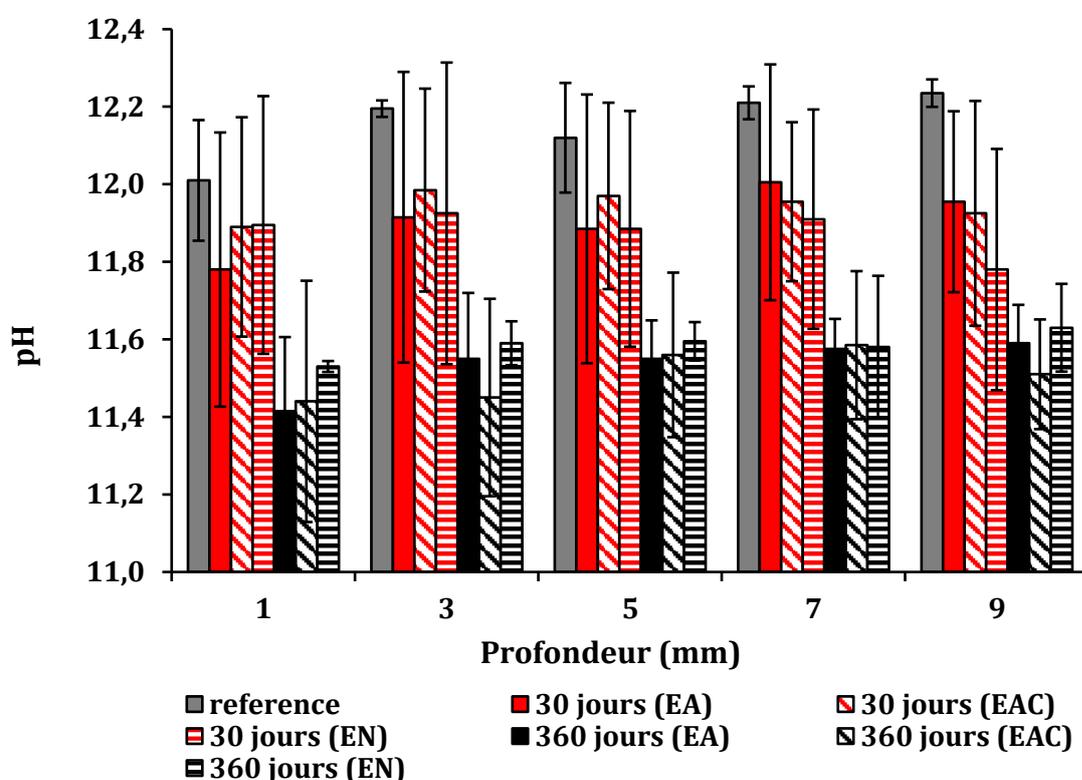


Figure 62. Evolution du pH du mortier référence et du mortier immergé après 30 et 360 jours d'immersion dans les trois milieux étudiés (EA, EAC et EN)

2. Evolution de la microstructure et de la composition de la couche superficielle du mortier

Le suivi de l'évolution de la composition chimique du matériau a été réalisée grâce à différents essais permettant de semi-qualifier et de quantifier les éléments formés et/ou disparus (comme

les hydrates et les carbonates de calcium) au cours de l'immersion et en fonction du milieu étudié (EA-EAC et EN).

2.1. Analyse thermogravimétrique (ATG/DTG)

La composition du matériau a été évaluée à l'aide des analyses ATG/DTG après 10-30-90-180-260 et 360 jours d'immersion, aux 5 profondeurs étudiées dans cette thèse. Les résultats obtenus pour la profondeur 0-2 sont illustrés par la Figure 63. Les autres spectres sont présentés en Annexe 2ab. En se basant sur les courbes obtenues, un suivi de l'évolution de la quantité de portlandite et de carbonates de calcium au cours de l'immersion dans les trois environnements étudiés permettra d'expliquer les modifications observées au sein de la matrice cimentaire. Pour ce faire, le choix des échéances s'est porté sur 10, 90 et 360 jours d'immersion.

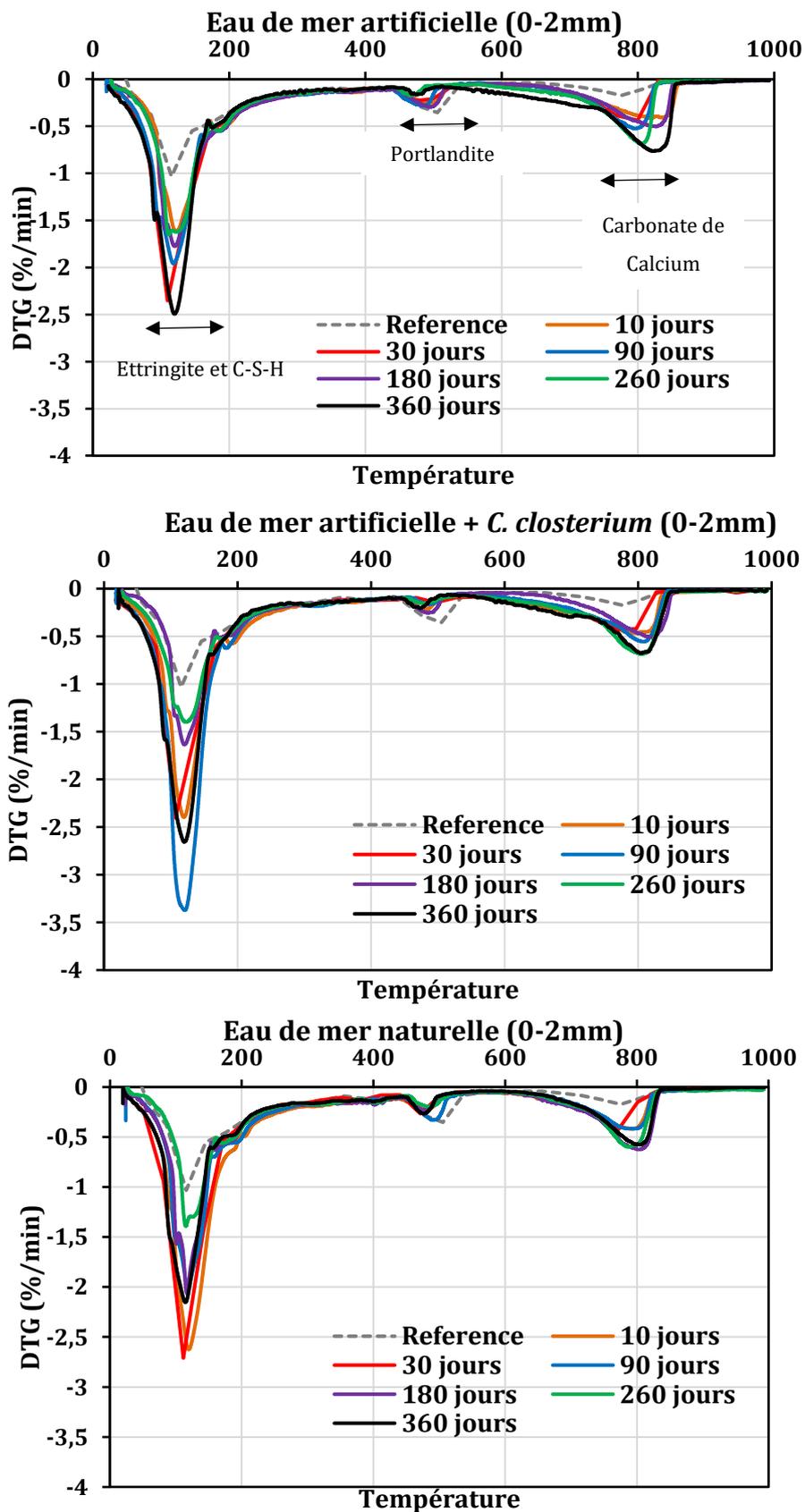


Figure 63. Courbes DTG (%/min) des mortiers référence et immergées, dans les trois milieux étudiés après 10 -30-90-180-260-360 jours d'immersion (profondeur étudiée : 0-2 mm)

2.1.1. Evolution de la quantité de portlandite

Initialement, le pourcentage massique de portlandite présente dans la couche superficielle (de 0 à 10 mm) du mortier étudié a pour valeur moyenne 6,3 %. Les résultats obtenus (Figure 64ab) montrent que la quantité de portlandite diminue dès les premiers jours d'immersion dans les trois milieux étudiés : eau de mer artificielle sans diatomée (EA), eau de mer naturelle (EN) et eau de mer artificielle avec diatomée (EAC). Par ailleurs, nous remarquons que l'installation du biofilm dans les milieux (EAC et EN) a engendré une légère diminution de la quantité de portlandite que lorsque le mortier n'est pas colonisé. En effet, les pourcentages massiques enregistrés à 10 jours pour une profondeur de 2 mm dans les milieux EA, EAC et EN sont à respectivement 5,1%, 3,8 et 4,5%.

Après 90 jours d'immersion, nous observons une diminution de la quantité de portlandite dans les trois conditions. Celle-ci est d'autant plus marquée lorsque le mortier est colonisé par *C. closterium* conduisant à un pourcentage massique de 4,8 % entre 4-6 mm de profondeur alors que la valeur obtenue en milieu naturel reste stable par rapport à la référence et est égal à 6,4 %. Cette réduction de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ se poursuit jusqu'à 10 mm de profondeur. Il peut y avoir plusieurs hypothèses qui expliqueraient l'accentuation de la lixiviation de la portlandite dans le milieu EAC. Premièrement, la bio-colonisation du matériau est plus élevée dans ce milieu (Figure 53a) que dans le milieu EN (au moment de la mesure). Les conditions de croissance en laboratoire sont optimales par rapport aux conditions environnementales du milieu naturel ce qui peut accélérer la bio-détérioration du matériau. Deuxièmement, certaines carences en nutriments ont pu avoir lieu avant le renouvellement du milieu. Nous pouvons alors supposer que le stress des diatomées aurait provoqué la synthèse plus importante d'EPS et modifié leur métabolisme pour s'acclimater aux nouvelles conditions du milieu engendrant une bio-détérioration et donc à une lixiviation plus importante des $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Cette hypothèse est cependant moins probable puisque l'état physiologique des micro-algues reste bon tout au long de l'expérience (Figure 47b). A long terme (360 jours d'immersion), le mortier non colonisé voit sa quantité de portlandite chuter entre 0-2 mm de profondeur atteignant un pourcentage massique de 2,3 % mais celle-ci reste relativement stable de 2 à 10 mm de profondeur avec une moyenne de 6,2 %. Les résultats montrent également qu'à cette échéance, la lixiviation de la portlandite est moins marquée au niveau des deux premiers millimètres pour les mortiers colonisés (EAC et EN). Néanmoins, l'appauvrissement en $\text{Ca}(\text{OH})_2$ s'accroît à des profondeurs plus élevées pour les mortiers en présence de biofilm (Figure 64ab). A long terme, le biofilm en milieu naturel (EN) a réduit la quantité de portlandite jusqu'à 8 mm de profondeur atteignant un pourcentage massique de 4,5 % (Figure 64a). En milieu EAC, ce phénomène est également observé avec une dissolution de la portlandite aboutissant à un pourcentage massique de 4,4 % à 10 mm.

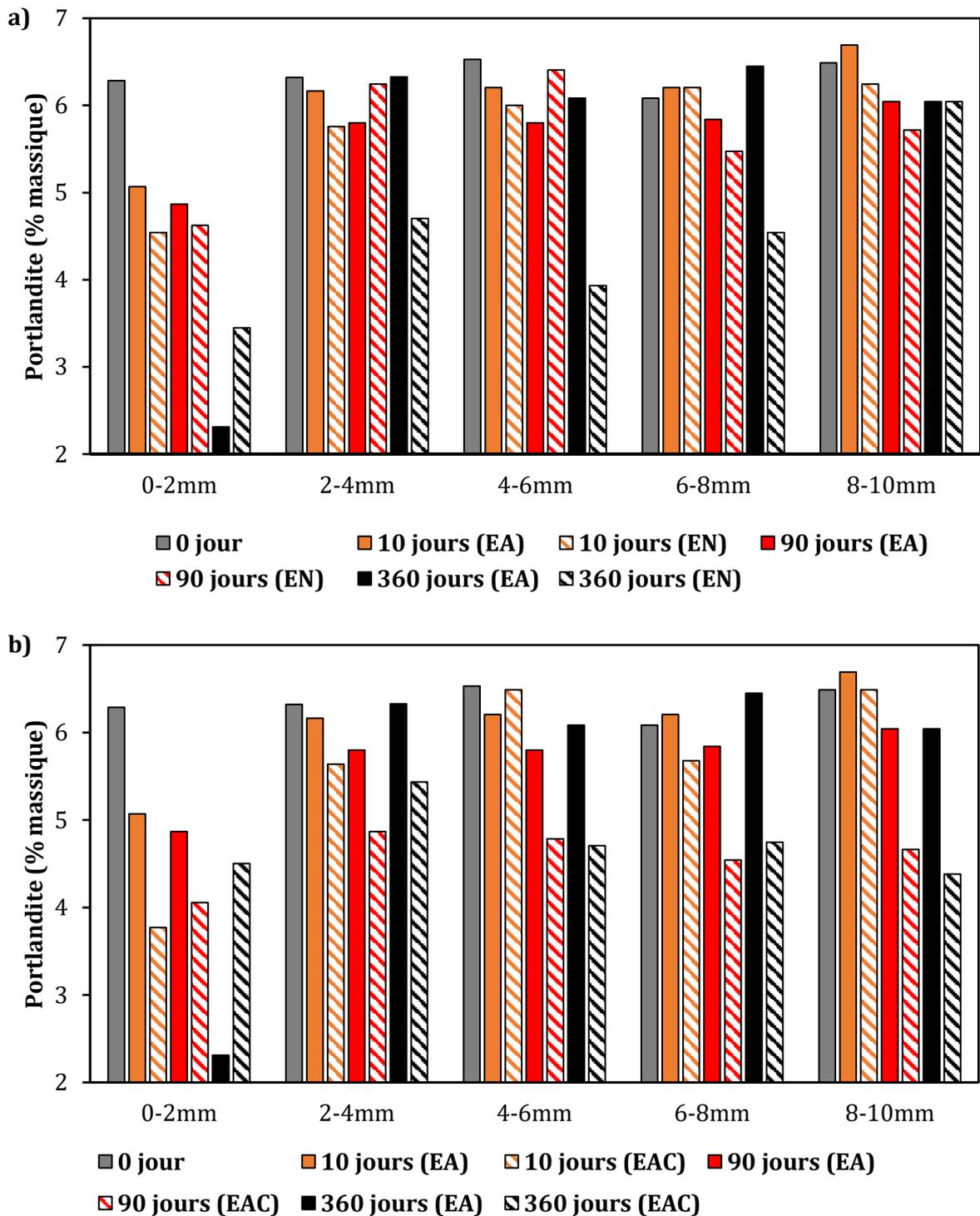


Figure 64. Evolution de la portlandite (% massique) dans les mortiers immergés en Eau de mer Naturelle + Biofilm naturel (EN) **(a)** et en Eau de mer Artificielle avec *C. closterium* (EAC) **(b)** comparé au mortier référence et immergé en Eau de mer Artificielle (EA) à différentes profondeurs après 10, 90 et 360 jours d'immersion

Ces résultats nous permettent d'émettre l'hypothèse que la présence de biofilm à la surface du mortier a accéléré à long terme la lixiviation de la portlandite en profondeur. La biodétérioration du matériau cimentaire induite par les micro-organismes est plutôt localisée au niveau de la surface de développement du biofilm. La quantité d'acides produite par les micro-organismes n'est pas connue d'où la difficulté de les comparer à des attaques purement chimiques. Nous pouvons également supposer que la vitesse et la profondeur de diffusion des substances agressives bio-induites par les micro-organismes dans la solution interstitielle des pores du matériau cimentaire sont plus importantes que pour des attaques purement chimiques (eau de mer).

Le suivi de l'évolution de la quantité de portlandite a permis de montrer qu'outre les agents agressifs de l'eau de mer, l'activité biologique associée à la croissance du biofilm tout le long de l'expérimentation ont favorisé la dissolution de la portlandite. Cette dissolution entraîne le relargage d'ions Ca^{2+} qui peuvent être assimilés par les diatomées pour leur métabolisme. Jayakumar and Saravanane, 2010 ont également observé cette capacité d'assimilation des ions calcium chez des macro-algues.

2.1.2. Evolution de la quantité de Carbonate de calcium

Initialement, le pourcentage massique de carbonates de calcium présente dans la couche superficielle (de 0 à 10 mm) du mortier étudié a pour valeur moyenne 2,3 %. Après seulement 10 jours d'immersion, la quantité de carbonate de calcium, pour une profondeur entre 0 et 2 mm, augmente dans les trois environnements étudiés (EA, EAC et EN) (Figure 65ab) avec des valeurs allant jusqu'à 6,7 % pour EA, 8,4 % pour le milieu EAC, et 6,1 % pour le milieu EN. De 2 à 10 mm de profondeur, la quantité de $CaCO_3$ reste relativement stable par rapport à la référence avec par exemple une moyenne de 2 % pour le mortier immergé uniquement dans de l'eau de mer artificielle (EA).

Cette augmentation de $CaCO_3$ est due au phénomène de carbonatation. Le carbonate de calcium est formé par la dissolution de la portlandite et la fixation du CO_2 (équation 4-1) (Figure 64b) à la surface du matériau.



L'augmentation plus importante du $CaCO_3$ en milieu EAC peut être expliquée par l'activité du biofilm. En effet, l'activité biologique du biofilm composé de *C. closterium* et de bactéries a favorisé un relargage plus important d'ions Ca^{2+} de la matrice cimentaire conduisant à la formation de carbonates de calcium à la surface du matériau. De plus, les essais en laboratoire sont des méthodes accélérées donc leurs effets sur le mortier sont amplifiés.

A long terme (360 jours) entre 0-2mm de profondeur, nous remarquons que la quantité de CaCO_3 augmente dans le mortier immergé en EAC (9,9%) mais se stabilise en milieu EN (6,80%).

La plus forte carbonatation a quant à elle été observée à la surface du mortier immergé en eau de mer artificielle sans diatomée (EA) avec une valeur de 12,2 % de CaCO_3 . Cette différence observée entre la surface du mortier non colonisée et colonisée peut s'expliquer par le fait que les diatomées peuvent assimiler les ions Ca^{2+} pour leur métabolisme et incorporer le CO_3^{2-} pour la réalisation de la photosynthèse. Par conséquent, ces formes dissoutes sont moins disponibles dans le milieu pour former des carbonates de calcium à la surface du mortier. Cette compétition entre la carbonatation et la photosynthèse a déjà pu être observée par Ferrero, (2018).

De plus, à cette échéance et à cette profondeur, la lixiviation de la portlandite est la plus importante (2,3%) dans le milieu EA par rapport aux deux autres milieux. Ces résultats peuvent traduire que l'origine de cette carbonatation provient de la carbonatation de la portlandite. La carbonatation observée les deux premiers millimètres du mortier immergé en eau de mer artificielle peut expliquer la plus faible concentration en ions chlorure libres par rapport aux autres mortiers immergés dans les deux autres milieux. La précipitation de CaCO_3 a pu colmater les microporosités du matériau.

La dissolution de la portlandite n'est pas la seule cause de la carbonatation du mortier. En effet, le phénomène de carbonatation n'a pas lieu à des profondeurs au-delà de 2 mm de profondeur contrairement à la lixiviation de la portlandite qui est plus importante dans les milieux EAC et EN à des profondeurs supérieures à 2mm. La décalcification des C-S-H peut également former du CaCO_3 . Cependant celle-ci n'est réalisée qu'une fois que toute la portlandite s'est dissoute et carbonatée (Chaussadent, 1999).

L'origine de la carbonatation sera plus précisément identifiée après l'analyse des échantillons en DRX en distinguant les carbonates de calcium formés sur la couche superficielle du mortier.

La profondeur de carbonatation ne dépasse pas les 2 mm de profondeur pour les différents milieux étudiés. Cependant, nous ne pouvons ici émettre que certaines hypothèses quant à l'évolution de la composition du mortier en fonction de son milieu d'immersion. En effet, les mesures ATG/DTG ne peuvent donner ici que des tendances permettant la compréhension des modifications observées à la surface du matériau suite à son immersion en milieu salé et/ou colonisé par des micro-organismes. On observe dans cette étude que les modifications de la matrice s'amplifient principalement lors d'une immersion prolongée. Ces différents changements sont à l'origine de la diminution du pH observé même après 10 mm de profondeur (Figure 62). Par ailleurs, nous pouvons noter que les modifications observées au sein de la matrice (à des profondeurs supérieures à 2 mm) sont principalement dû à l'activité métabolique et au

développement du biofilm puisque les agents agressifs de l'eau de mer diffusent moins à long terme (360 jours) (Figure 60bc).

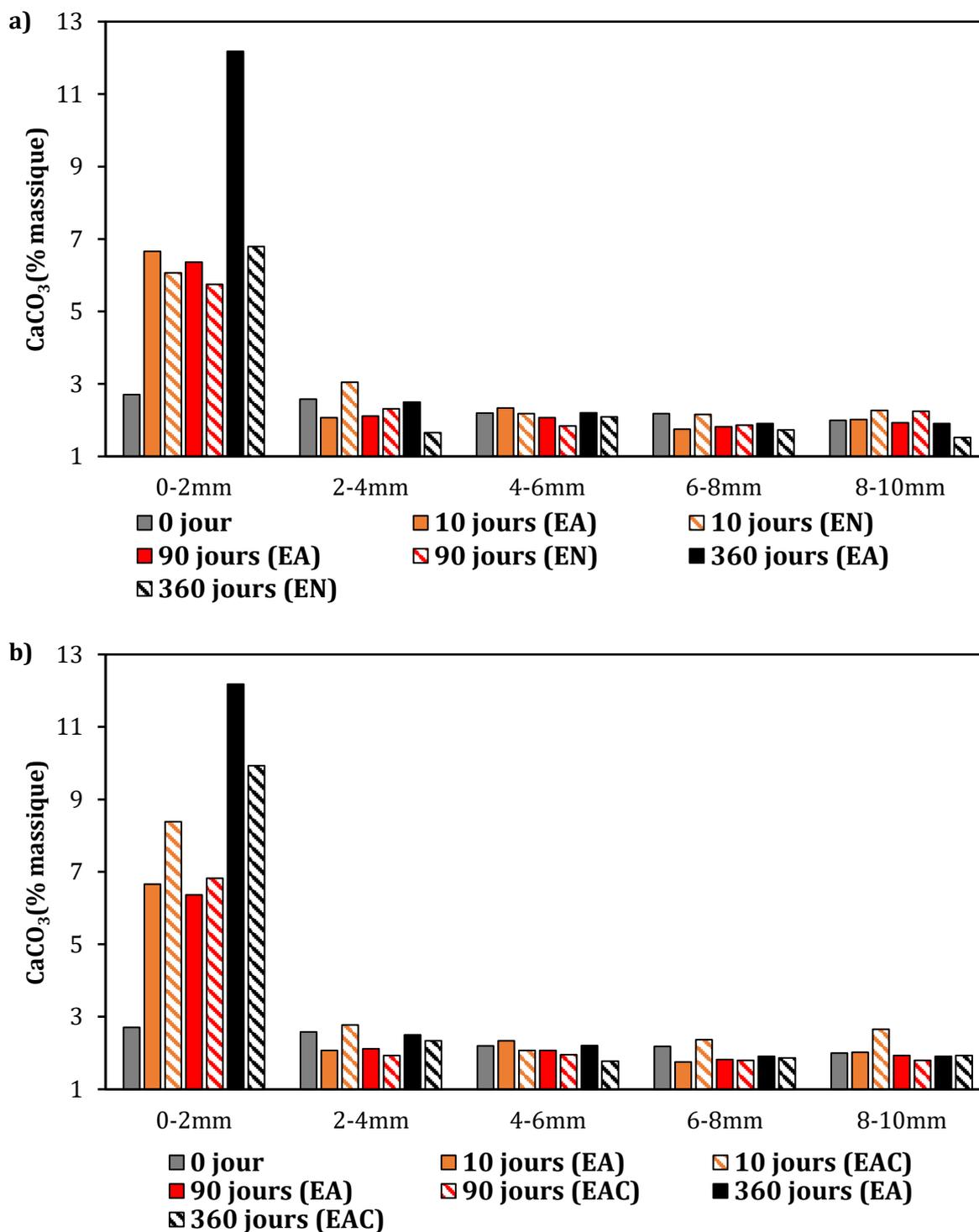


Figure 65. Evolution du Carbonate de Calcium (% massique) dans les mortiers immergés en Eau de mer Naturelle + Biofilm naturel (EN) (a) et en Eau de mer Artificielle avec *C. closterium* (EAC) (b) comparé au mortier référence et immergé en Eau de mer Artificielle (EA) à différentes profondeurs après 10, 90 et 360 jours d'immersion

2.2. Observation au MEB-EDS

La microstructure et la morphologie des phases du mortier avant (référence) et après immersion dans les différents environnements marins (EA, EAC et EN) ont été étudiées afin d'examiner les influences de la bio-colonisation sur la matrice cimentaire.

Les observations MEB du mortier référence (non immergé) (Figure 66) montrent l'aspect et la texture du matériau étudié avant son immersion. Il est néanmoins difficile de pouvoir distinguer les faciès des différentes phases que l'on trouve initialement dans la pâte cimentaire. Cependant, nous pouvons observer les C-S-H visibles sous forme de gel (Figure 66) à la surface des échantillons. Ils sont majoritairement responsables de la cohésion de la pâte de ciment.

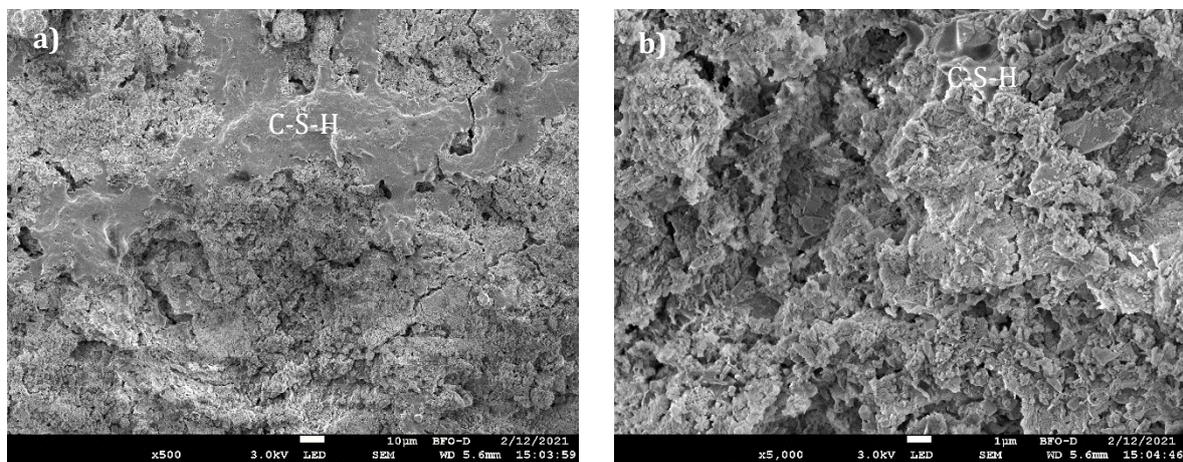


Figure 66. Observations MEB du mortier référence (avant immersion) en surface (a,b). C-S-H : gel de Calcium de Silicate Hydrate

Les observations MEB des mortiers immergés dans l'eau de mer artificielle montrent une microstructure différente du mortier référence (Figure 66 et Figure 67). En effet, nous observons en surface des cristaux de morphologie aciculaire (sous forme d'aiguilles) (Figure 67b). Ces aiguilles sont caractéristiques de l'aragonite qui est un polymorphe du carbonate de calcium (Mehta, 2005 ; Palin et al., 2015) (remarquable par un système cristallin orthorhombique). A 90 jours d'immersion, ces aiguilles sont très fines et enchevêtrées, d'environ 5µm de longueur et de 1µm de diamètre (Figure 67b). A 360 jours d'immersion, ces aiguilles sont morphologiquement différentes de celles présentées précédemment. En effet, celles-ci sont beaucoup plus épaisses avec un diamètre d'environ 3 µm et une forme plus hexagonale et plus longue (Figure 67d). Ce type de prismes à section droite pseudo-hexagonale est assez couramment observé pour la phase aragonite en milieu synthétique et dans des biominéraux naturels (Krauss et al., 2008). Dans ces derniers, l'exemple type est celui des microstructures nacrées des mollusques (Chateigner et al., 2000). L'aragonite s'est avérée être le polymorphe de carbonate de calcium préféré à la calcite et à la vaterite lorsqu'elle est formée par les carbonates dissous dans l'eau de mer (Buenfeld and

Newman, 1986). En effet, cette phase est plus stable en milieu marin contenant des ions Mg^{2+} qui déstabilisent la calcite, cette dernière étant alors défavorisée (Nguyen et al., 2017). La précipitation de l'aragonite est visible sur l'ensemble des échantillons immergés entre 10 et 360 jours en eau de mer artificielle. Une autre phase présente dans les matériaux cimentaires cristallise aussi sous forme aciculaire, l'ettringite. Les aiguilles d'ettringite sont toutefois d'aspect différent de celles présentes en Figure 67. Nous verrons par diffraction de rayons X que les aiguilles présentes ici sont bien constituées d'aragonite.

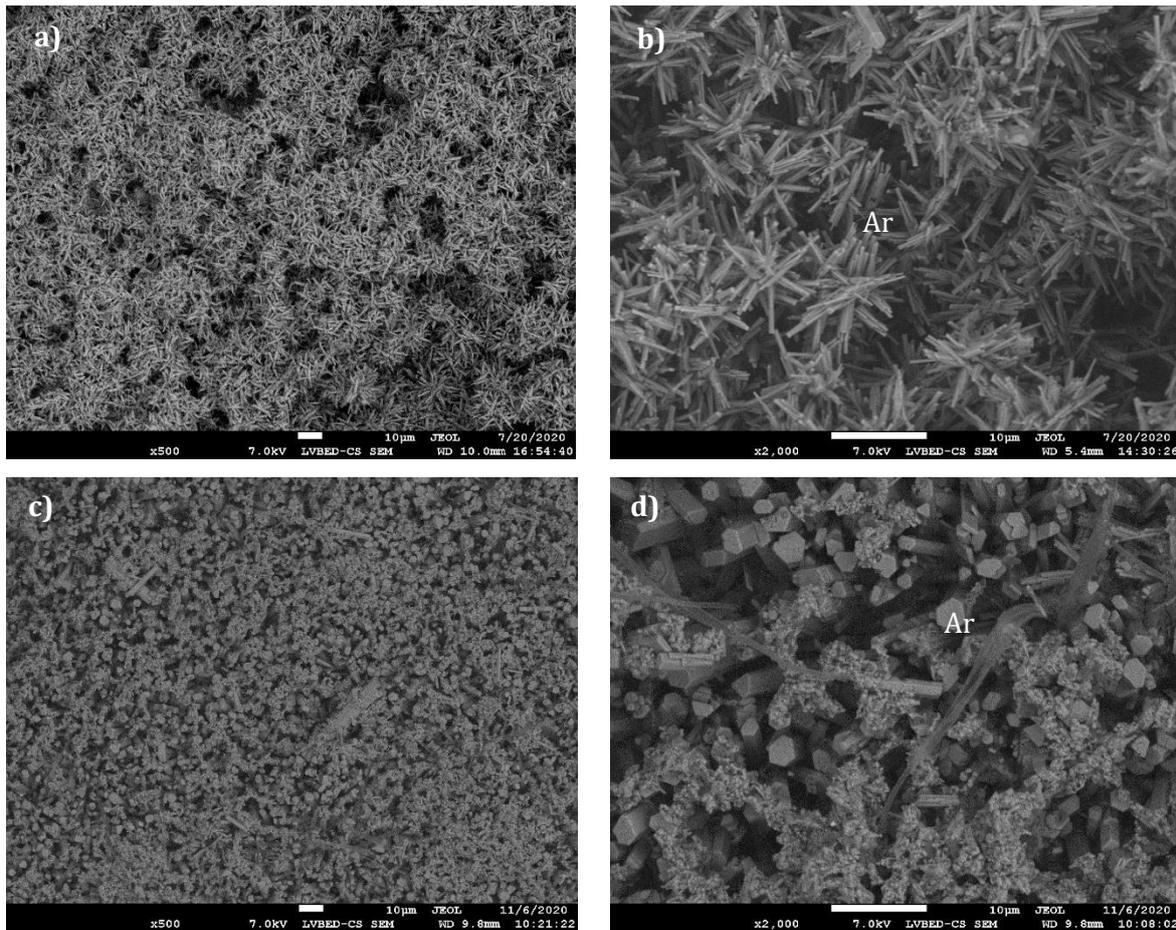


Figure 67. Observations MEB du mortier immergé en Eau de mer Artificielle après 90 (a-b) et 360 jours (c-d) d'immersion (Ar : Aragonite)

Les mortiers immergés en eau de mer naturelle (EN) présentent aussi quelques différences avec le mortier référence et le mortier immergé dans le milieu EA. Nous avons pu détecter la présence de cristaux de portlandite (Figure 68a) qui est de forme hexagonale. Des changements dans la morphologie des carbonates précipités sont observés. Une autre morphologie d'aragonite est observée à la surface du mortier, elle est en forme de chou-fleur (Figure 68b). De plus, la calcite devrait être principalement formée de rhomboèdres entrecroisés. Or ici, cette forme n'est pas présente à la surface des mortiers. Loste et al., (2003) ont étudié le mécanisme de formation des calcites magnésiennes dans le but d'étudier le rôle du Mg dans le contrôle de la morphologie de la

calcite. Parmi les différentes morphologies dépendantes du rapport Mg:Ca observées par ces auteurs, quelques-unes peuvent être retrouvées sur les images MEB réalisées sur le mortier immergé en eau de mer naturelle après 360 jours d'immersion (Figure 68b). Nous pourrions confirmer ou non cette hypothèse lors des analyses DRX de la surface de notre échantillon.

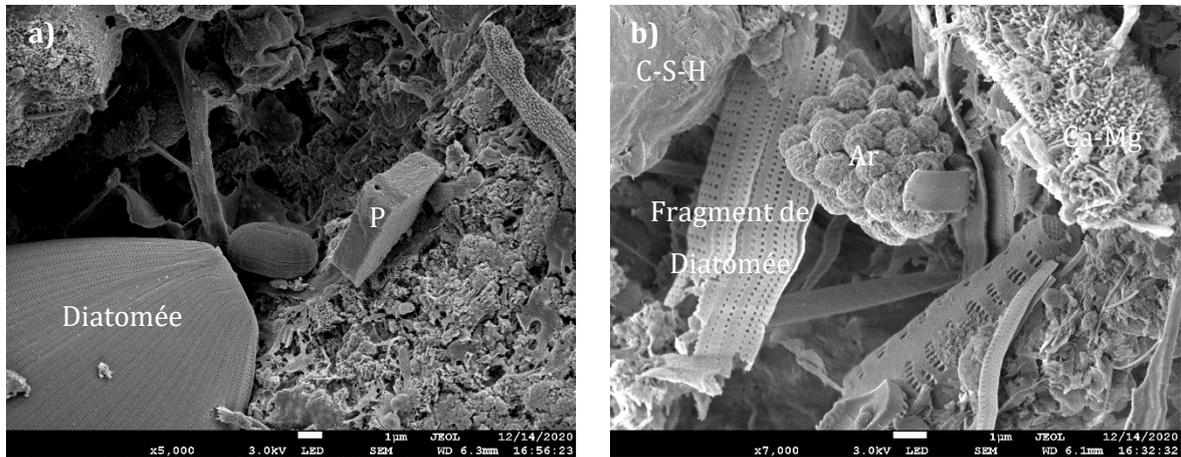


Figure 68. Observations MEB du mortier immergé en Eau de mer Naturelle après 360 jours d'immersion **(a-b)** (P : Portlandite, C-S-H, Ar : Aragonite, Ca-Mg : Calcite magnésienne)

Les mortiers immergés dans le milieu EAC (Figure 69abcd) montrent aussi quelques différences avec le mortier référence. Après 90 jours d'immersion, le mortier présente une forme de faciès Figure 69ab différente de ce qui a pu être observé sur les échantillons immergés dans le milieu EN. Une autre structure est visible sous le biofilm après 360 jours d'immersion Figure 69cd. Il est difficile de connaître l'identité du minéral formé. Cependant on peut supposer que les minéraux présents s'apparentent à des carbonates de calcium pouvant correspondre à l'une des morphologies de l'aragonite. En effet, la structure de ces minéraux varie en fonction de l'agencement des molécules les unes avec les autres qui dépendent de l'organisation des atomes au sein de celles-ci. Elles peuvent également évoluer en fonction des conditions du milieu d'immersion. Les analyses EDS associé au DRX vont permettre de spécifier le polymorphe de carbonates de calcium.

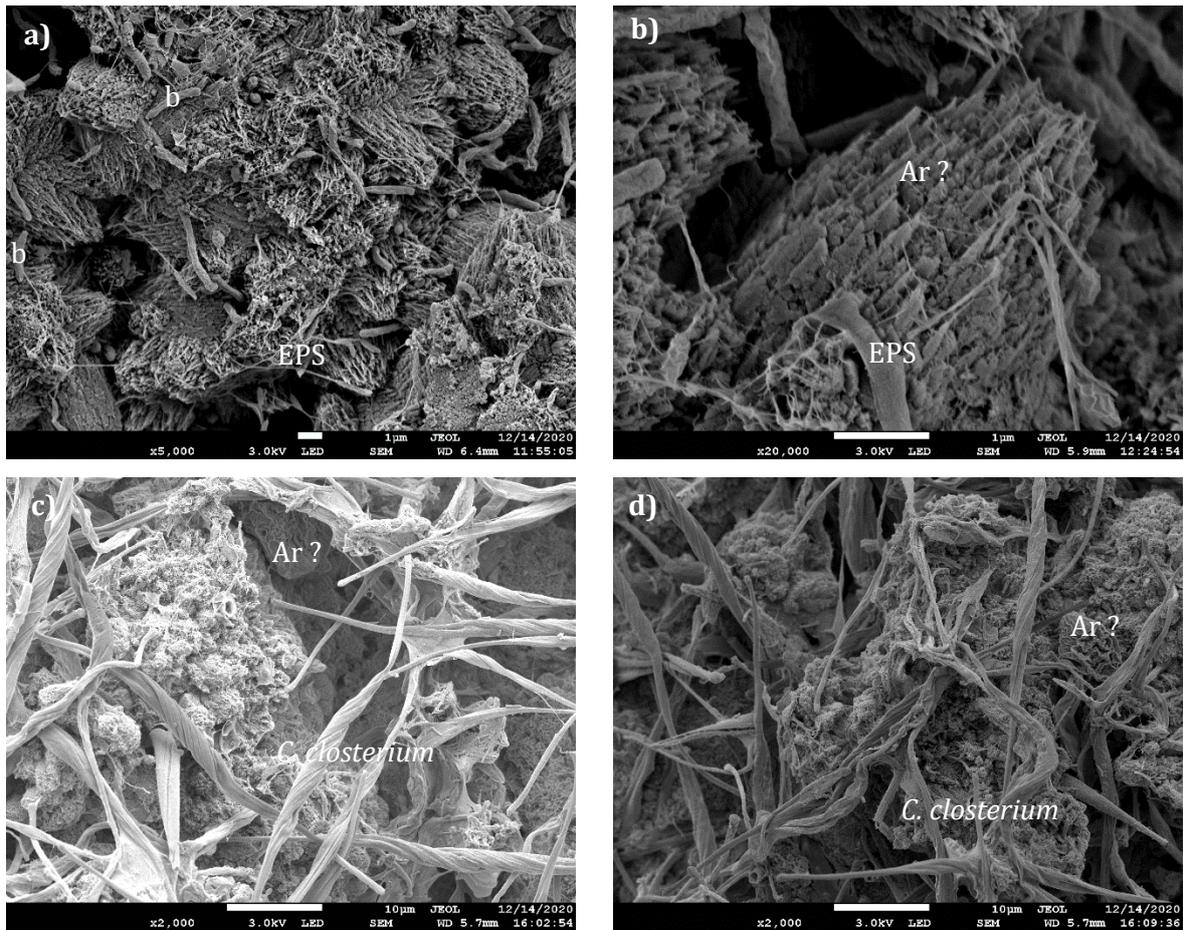


Figure 69. Observations MEB du mortier immergé en Eau de mer Artificielle avec *C. closterium* après 90 (a et b) et 360 jours d’immersion (c et d)

Après observation des images MEB, l’analyse élémentaire de la surface du mortier a été réalisée. Elle a permis de suivre semi-quantitativement les éléments chimiques présents à la surface du matériau en fonction des paramètres étudiés (milieux et durée d’immersion). L’Oxygène et le Carbone ne sont pas pris en compte dans l’analyse semi-quantitative, réservée aux éléments de Z plus élevés.

La comparaison des images MEB et des analyses EDS à 90 et 360 jours d’immersion, opérées sur l’ensemble de la surface illustrée par la Figure 70 montrent que le matériau a été modifié dès les 90 jours d’immersions (Tableaux 11 et 12).

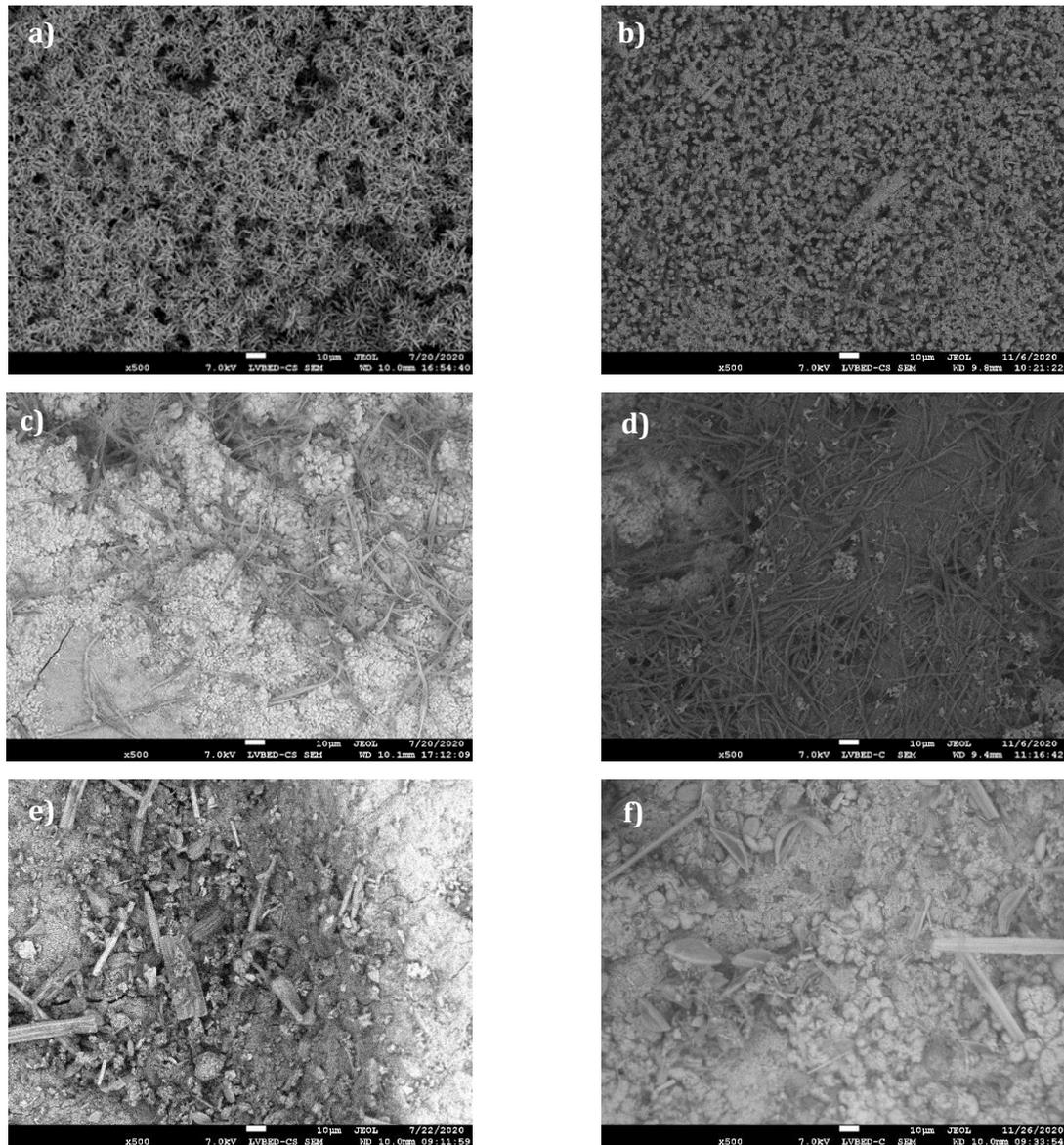


Figure 70. Images MEB ($\times 500$) réalisées après 90 (colonne de gauche) et 360 jours (colonne de droite) d'immersion en Eau de mer Artificielle **(a-b)** ; en Eau de mer Artificielle + *C. closterium* **(c-d)** ; en Eau de mer Naturelle **(e-f)**. La surface de ces images correspond à la surface sondée pour les analyses EDS

La surface du mortier référence montre un niveau élevé de silicium (62%) et de calcium (32%), ainsi que la présence significative de magnésium et d'aluminium (1,2 et 4,7% resp.). Ces concentrations élémentaires sont cohérentes avec les phases attendues pour la pâte cimentaire du mortier utilisé.

A 90 jours d'immersion en eau de mer artificielle, la surface du mortier (Tableau 11) ne montre que très peu de silicium (3,3%) et une forte concentration en Ca (95,8%). L'augmentation du niveau de calcium est due au phénomène de carbonatation en surface de l'échantillon, qui occulte en partie le signal provenant de la matrice cimentaire sous-jacente contenant le silicium. Les

aiguilles d'aragonite formées à la surface du mortier (Figure 67ab) expliquent cette observation. La présence faible de Na (0,9%) provient du sel marin piégé en surface.

Tableau 11. Analyses EDS de la surface d'un mortier référence et de mortiers immergés après 90 jours d'immersion en Eau de mer artificielle (EA), Eau de mer Artificielle + *C. closterium* (EAC), Eau de mer Naturelle (EN)

	Référence	Eau de mer artificielle (EA)	Eau de mer artificielle avec diatomée (EAC)	Eau de mer naturelle (EN)
Elément	Atome %			
O
C
Si	62,0	3,3	19,5	51,3
Ca	32,0	95,8	55,0	10
Mg	1,2	-	16,6	32,3
Al	4,7	-	2,0	3,5
Na	-	0,9	3,8	-
Zn	-	-	-	1,2
Fe	-	-	3,0	1,8
Total	100,00			

L'ajout de *C. closterium* à l'eau de mer artificielle (EAC) engendre une augmentation plus modérée de la quantité de calcium (55%) par rapport à la référence et une diminution moindre de la quantité de Si que sur l'échantillon en EA seule. Une forte augmentation de la teneur en magnésium est observée accompagnée de l'apparition de Fe jusqu'à 3%. En eau de mer naturelle (EN) la même tendance est observée, avec un accroissement notable de la teneur en Mg jusqu'à 32,3% et seulement 10% de Ca.

Nous pouvons indiquer d'ores et déjà que l'eau de mer étant riche en ions Mg^{2+} , cet élément peut probablement être intégré à l'hydrate C-S-H suite à sa décalcification et contribuer à la formation de M-S-H (Silicates de Magnésium Hydratés) suite au remplacement des Ca^{2+} du C-S-H par l'ion Mg^{2+} . Cependant, ces différentes phases ne peuvent être identifiées à partir des images MEB. Aussi, une telle substitution ionique au sein de la structure cristalline de C-S-H ne peut s'opérer que si la variation du rayon ionique résultante ne déstabilise pas la structure par effet stérique. En effet, pour qu'une structure reste stable, il faut à la fois que la charge de l'ion incorporé soit la même que la charge de l'ion remplacé (pour respecter la neutralité électrique globale), et que son rayon ionique (taille) ne soit pas trop différent de celui qu'il substitue (pour ne pas déstabiliser la structure).

D'autre part, on peut aussi supposer que la quantité de Magnésium peut provenir de son incorporation au réseau cristallin d'autres composés cristallins, comme la calcite, la calcite magnésienne étant également une forme connue dont un des membres contient Mg et Ca à pourcentage égal (dolomite $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$). A ce stade de l'analyse, il est difficile de comprendre les évolutions élémentaires détectées, dans la mesure où les phases en présence ne sont pas déterminées. L'analyse par diffraction des rayons X nous permettra de spécifier certains schémas d'incorporation de ces éléments.

A 360 jours (Tableau 12), la tendance est la même, en faveur de plus de Ca (74,9 et 40,1 % pour EAC et EN respectivement) et de moins de Mg et Si. La précipitation de l'aragonite à la surface du mortier immergé en EAC peut expliquer ce plus grand pourcentage, en accord avec les images MEB de la surface du matériau. Les analyses DRX vont permettre de préciser les formes de carbonates observées à partir des images MEB et aux analyses EDS.

Les éléments métalliques de transition (Fer et Zinc) observés à 90 jours ont disparus, et ne sont donc pas significatif de la cinétique d'évolution. En revanche, du soufre apparaît, et pourrait provenir éventuellement de certains métabolismes des bactéries et/ou des diatomées. En effet, la minéralisation de la Matière Organique (MO) présente à la surface des échantillons de mortier après colonisation peut expliquer cette quantité de soufre provenant des sulfates.

Tableau 12. Analyses EDS de la surface d'un mortier référence et de mortiers immergés après 360 jours d'immersion en Eau de mer artificielle (EA), Eau de mer Artificielle + *C. closterium* (EAC), Eau de mer Naturelle (EN)

	Référence	Eau de mer artificielle (EA)	Eau de mer artificielle avec diatomée (EAC)	Eau de mer naturelle (EN)
Elément	Atome %			
O
C
Si	62,0	2,1	6,6	38,8
Ca	32,0	96,2	74,9	40,0
Al	4,7		10,3	2
Na	-	1,4	5,2	6,3
Mg	1,2	-	0,7	9,5
S	-	0,4	2,3	3,3
Zn	-	-	-	-
Fe	-	-	-	-
Total	100,00			

La quantité de silicium diminue dans les deux milieux EAC (6,6%) et EN (38,8%) comparé aux échantillons à 90 jours. Cette diminution peut être due à plusieurs phénomènes, lixiviation de Si, effet de masquage du signal EDS dû à la carbonatation de surface et développement du biofilm. De plus, la pénétration du faisceau électronique dans le matériau est faible, typiquement quelques dizaines de micromètres. Le développement du biofilm participe donc à atténuer fortement le signal EDS. Cependant nous observons un signal de Si fort même après couverture. Il est donc naturel d'attribuer la relativement forte présence de Si au développement des micro-algues. Celui-ci est à l'origine de l'observation de Si en forte quantité (38,8%) même après 360 jours pour lequel plus de carbonatation a été observée par ATG. Aussi, la fraction de silicium détecté à la surface du mortier provient principalement des frustules des diatomées fixées sur l'échantillon, et dépend ainsi de la quantité de bSi des cellules algales.

Finalement, les images MEB associées aux données EDS montrent que le mortier a été modifié en surface suite à son immersion dans les trois conditions étudiées. Outre une colonisation largement visible sur les mortiers, le matériau a également subi une modification de sa microstructure et aussi de sa composition. Ces modifications sont dues au développement du microphytobenthos mais elles sont aussi liées à la composition chimique de l'eau de mer.

2.3. Analyses DRX

L'analyse minéralogique par diffraction des rayons X (DRX) a été réalisée dans le but de comparer la nature des phases minérales cristallisées présentes dans le mortier non immergé (référence) et immergés dans les trois milieux (EN, EA et EAC). Ces analyses ont porté sur deux types d'échantillons, un correspondant à la surface du mortier (directement en contact avec le milieu) et l'autre à de la poudre de mortier récupérée sur 2mm de profondeur. Nous avons fait le choix de présenter les résultats d'analyses DRX du matériau obtenu après 90 et 360 jours d'immersion. Les analyses qualitatives des échantillons ont permis de mettre en évidence les phases minérales cristallisées présentes initialement dans la matrice cimentaire puis celles pouvant apparaître ou disparaître après immersion en milieu salé avec ou sans bio-colonisation.

La composition minéralogique de la surface de l'échantillon référence est constituée de quartz et de calcite (Figure 71). Le quartz correspond au sable présent dans le mortier. Une quantification des phases est effectuée à partir des spectres DRX à l'aide du logiciel MAUD en utilisant l'affinement de Rietveld permettant de calculer leur pourcentage massique.

La quantification des phases montre que le pourcentage massique de calcite représente 95,7 % (Tableau 13) de l'échantillon. Ce résultat signifie que l'échantillon référence a été carbonaté avant l'analyse et son immersion dans les différents milieux étudiés. Cette carbonatation a pu avoir un effet positif sur la cinétique de bio-colonisation puisque certaines études (Hayek et al., 2020b ;

Natanzi et al., 2021) ont montré que celle-ci améliore l'initiation du biofilm microbien et donc par la suite la colonisation par le microphytobenthos et d'autres macroorganismes.

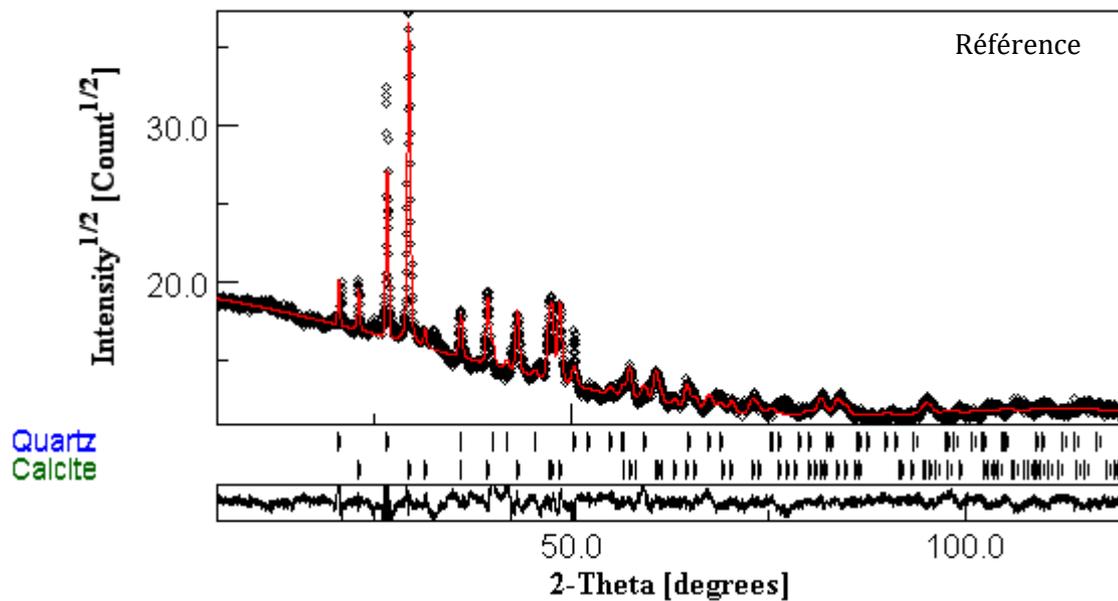


Figure 71. Spectre DRX de la surface d'un mortier référence (avant immersion)

Les mortiers immergés dans les différents milieux étudiés (EAC/EA/EN), montrent quelques différences dans la nature des phases cristallines présentes. La couche superficielle de la matrice, une fois immergée, présente également des signes de carbonatation. En plus de la carbonatation initiale de l'échantillon, celle-ci s'est avérée plus importante une fois le mortier immergé. Après 90 jours d'immersion, l'intensité des pics correspondant aux phases de carbonates de calcium (Figure 72) prédomine le diagramme. Les cristaux de quartz étant gros et statistiquement insuffisamment représentés, la valeur du pourcentage de cette phase n'est pas quantitative. Il convient de ne pas tenir compte du quartz, sa présence dans le modèle d'affinement de Rietveld n'étant introduite qu'à des fins de représentation du diagramme mesuré. Aussi, seuls les carbonates sont visibles en surface, sous forme de plusieurs polymorphes : calcite, aragonite et calcite magnésienne.

En eau artificielle, une diminution de la calcite au profit de l'aragonite est observée. Les facteurs abiotiques du milieu peuvent expliquer la prépondérance de l'aragonite due à la forte concentration des cations divalents comme le Magnésium présents dans l'eau de mer qui inhibent la formation de la calcite et favorisent la stabilisation d'aragonite (Palin et al., 2015). Le pH est aussi un facteur pouvant influencer la nature du carbonate de calcium. En effet, Nguyen et al., (2017) ont montré qu'en absence de Mg^{2+} la calcite se forme typiquement à des pH supérieurs à 10, tandis que la vaterite est stabilisée à des pH inférieurs.

Cette quantité d'aragonite plus importante dans le milieu EA que dans le milieu contenant *C. closterium* (89,8% contre 30,2% resp. (Tableau 13) peut aussi expliquer les résultats obtenus pour la pénétration des ions chlorure (Figure 60). En effet, ce minéral pourrait ainsi jouer un rôle barrière à la surface du mortier (Figure 67) en ralentissant la diffusion des ions chlorure au sein du matériau. Plusieurs études (Costa and Appleton, 1999 ; Mehta, 1991 ; Buenfeld and Newman, 1984 ; Haynes, 1980) montrent que la formation d'aragonite (associé à la brucite) suite à l'immersion du matériau cimentaire dans l'eau de mer forme une couche protectrice à la surface de ce dernier diminuant la perméabilité de surface et limitant ainsi la pénétration des ions Cl⁻. Ces études ne définissent pas le mécanisme mis en jeu mais ceci peut s'expliquer par le fait que l'aragonite est caractérisée par une structure plus dense que la calcite. Cette dernière forme une barrière physique protégeant le mortier contre les agents agressifs de l'eau de mer.

Tableau 13. Pourcentage (%) des phases minérales cristallisées en surface d'un mortier référence et après 90 et 360 jours d'immersion en Eau de mer Artificielle (EA), en Eau de mer Artificielle + *C. closterium* (EAC), en Eau de mer Naturelle (EN)

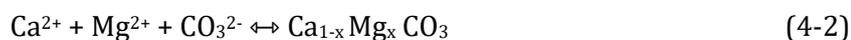
	Référence	EA		EAC		EN	
	0j	90 j	360 j	90 j	360 j	90 j	360 j
Halite	-		15,3 (± 0,5)	-	-	-	-
Aragonite	-	89,8 (±4,0)	62,8	30,2 (± 2,8)	-	11,7 (± 1,1)	38,6 (± 2,7)
Calcite	95,7	10,17	21,8 (± 1,9)	-	61,1	-	30,5 (± 2,2)
Calcite Mg	-	-	-	63,7	-	84,2	28,3 (± 2,1)
Quartz	4,23 (± 0,1)	-	-	6,0 (± 1,3)	38,9 (±1,77)	4,1 (± 0,9)	2,5

La formation d'aragonite est également visible sur le spectre DRX du milieu EN après 90 jours d'immersion mais avec des intensités beaucoup plus faibles synonymes d'une plus faible présence de cette phase (11,7%) en faveur des calcites. En effet, le premier minéral identifié après 90 jours d'immersion sur les échantillons où un biofilm s'est formé (EN et EAC) est la calcite. Ces résultats sont en adéquation avec ceux obtenus par ATG. En effet, ces derniers ont montré que la dissolution de la portlandite est visible à de plus grande profondeur au sein des mortiers colonisés (EAC et EN) ce qui peut expliquer la prépondérance de la calcite par rapport à l'aragonite (phase majoritaire dans le milieu EA). La dissolution de portlandite tendant à augmenter le pH devrait aussi favoriser la calcite c'est ce qui a pu se produire ainsi sur le mortier immergé en milieu EAC puisque nous avons une augmentation du pH au cours du temps dans le milieu (Figure 52). De plus, cette formation de calcite peut être expliquée par la synthèse d'EPS par les bactéries qui peuvent changer le polymorphisme du carbonate de calcium. En effet, Tournay and Ngwenya,

2009 ont montré que ces EPS bactériens pouvaient libérer en solution du carbone organique dissous inhibant ainsi la formation de la vaterite au profit de la calcite.

L'examen de la position des raies sur les diagrammes de diffraction X montre que c'est plus précisément la calcite magnésienne qui est présente en plus grande proportion pour un total de 63,7 % à la surface du mortier immergé en EAC et à 84,2 % en EN.

Le magnésium influence la précipitation du carbonate de calcium. En effet, le magnésium peut s'incorporer dans la structure cristalline de la calcite lorsque le rapport Mg:Ca en solution est faible (Berner, 1975; Loste et al., 2003). Ainsi les ions Mg^{2+} inhibent la croissance de la calcite par ce mécanisme d'incorporation et modifient la morphologie du réseau cristallin des carbonates (Loste et al., 2003). La substitution du calcium par le magnésium dans la matrice de la calcite peut être défini selon l'équation 4-2.



Après 360 jours d'immersion (Figure 73), la calcite magnésienne diminue au profit de la calcite pour le milieu EAC où elle atteint 61,1 % (Tableau 13). De plus, en eau de mer naturelle, une diminution de la quantité de calcite magnésienne avec le temps (de 84,2 % à 90 jours à 28,3 % à 360 jours) est également observée. Comme expliqué précédemment, la croissance cristalline de la calcite dans l'eau de mer est fortement inhibée par le Mg^{2+} au profit de la calcite magnésienne. Par ailleurs, la calcite magnésienne est plus soluble que la calcite pure, ce qui rend cette phase moins stable (Berner, 1975). Nous pouvons alors supposer que le microphytobenthos a pu récupérer le magnésium dissous permettant à la calcite pure de se stabiliser. On peut alors supposer que nous avons bien observé de la calcite magnésienne à partir des images MEB (Figure 68c).

Les analyses DRX permettent d'affiner les phases identifiées à la surface du mortier et de confirmer ou non les hypothèses émises lors de l'analyse élémentaire à partir de l'EDS (Tableau 11 et Tableau 12) et des analyses ATG/DTG (Figure 65). Nous pouvons ainsi montrer que la proportion de Mg observée en EDS est essentiellement localisée au sein de la calcite magnésienne.

Finalement, l'analyse DRX des mortiers de surface permet de constater que la composition minérale du matériau référence et des mortiers immergés dans les différents milieux n'est qualitativement et quantitativement pas identique. L'intensification de la présence de calcite et la formation d'un nouveau composé tel que l'aragonite et la calcite magnésienne montrent l'impact de l'immersion sur la couche superficielle du matériau. L'évolution de la concentration en Magnésium dans les milieux où le mortier est recouvert d'un biofilm (EN et EAC) influe sur les phases cristallisées à la surface. La colonisation a eu un effet sur la réduction de l'incorporation du magnésium dans le réseau cristallin de la calcite puisque cet élément a pu être utilisé comme nutriment pour le microphytobenthos. L'évolution du pH de surface du matériau a aussi eu un effet sélectif sur les cristaux formés.

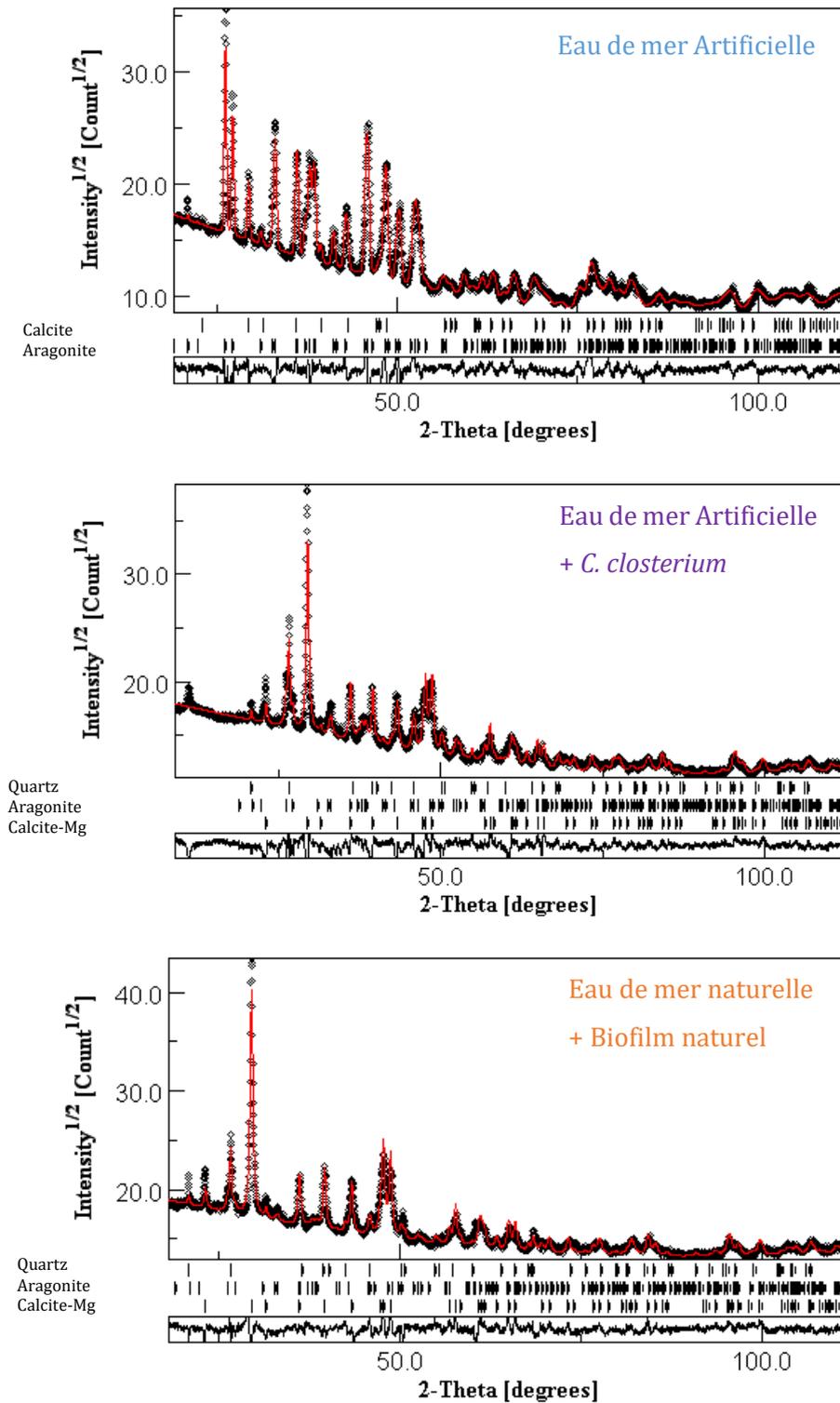


Figure 72. Spectres DRX de la surface des mortiers immergés 90 jours dans les trois conditions étudiées (EA, EAC et EN)

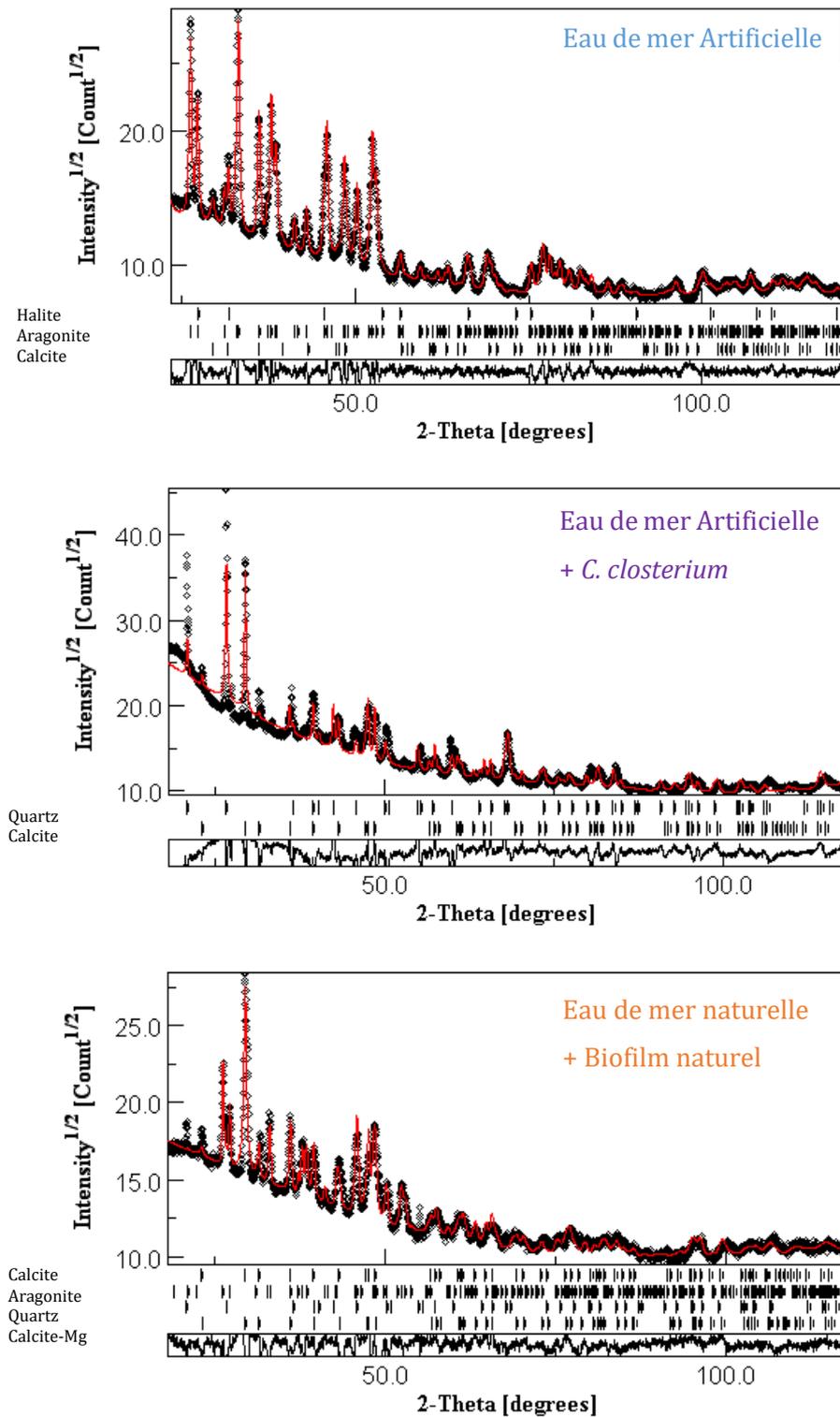


Figure 73. Spectres DRX de la surface des mortiers immergés 360 jours dans les trois conditions étudiées (EA, EAC et EN)

Afin de caractériser le matériau en volume, la poudre grignotée du mortier (0-2 mm de profondeur) a été analysée par diffraction des rayons X. Tous les pics s'indexent dans un mélange de quartz, calcite et portlandite (Figure 74). On remarque que la portlandite est détectée seulement dans le mortier grignoté, l'absorption du signal due à la carbonatation de la matrice en surface ayant empêché sa détection sur l'échantillon massif.

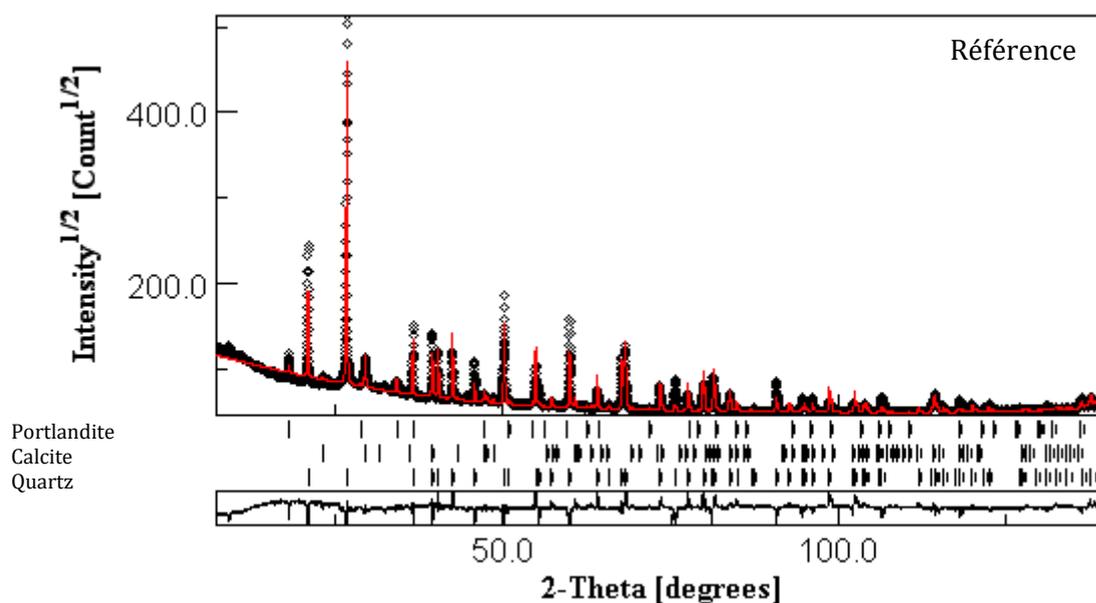


Figure 74. Spectre DRX de poudre (sur 2mm de profondeur) de mortier référence (avant immersion)

Les échantillons grignotés (Figure 75 et Figure 76) contiennent les mêmes phases cristallines : quartz, calcite, aragonite, portlandite, ettringite.

L'intensité des pics de diffraction de l'ettringite est presque confondue avec le bruit de fond, et il est donc difficile d'estimer quantitativement sa proportion dans le mortier. L'intensité des raies de diffraction des carbonates (calcite et aragonite) est au profit de celle des raies des différents composés cimentaires (ettringite et portlandite).

Le Tableau 14 présente le pourcentage de phases minérales cristallines de la poudre du mortier avant immersion et après 90 et 360 jours immersion dans les trois milieux étudiés (EA, EAC et EN).

Certaines phases n'ont pas pu être quantifiées comme c'est le cas de l'ettringite dans certaines poudres de mortier alors que celle-ci est visible sur le premier pic du spectre DRX de la poudre du mortier immergé en EA après 360 jours (Figure 76). L'affinement de Rietveld n'a pas permis dans ces cas-là de représenter correctement la proportion de cette phase, à cause probablement d'un effet d'orientation cristalline.

Tableau 14. Pourcentage (%) des phases minérales cristallisées de la poudre (0-2mm de profondeur) de mortier référence et après 90 et 360 jours d'immersion en Eau de mer Artificielle (EA), en Eau de mer Artificielle + *C. closterium* (EAC), en Eau de mer Naturelle (EN)

	Référence	EA		EAC		EN	
	0j	90 j	360 j	90 j	360 j	90 j	360 j
Quartz	82,8	63,7 (±3)	57,3	72,2	68,2 (±1,85)	82,8	74,4 (±2,4)
Ettringite		2,7		3,2 (±0,6)	2,5 (±0,54)	5,3 (± 1)	7,4
Portlandite	2,8 (±0,2)	1,6 (±1,2)	0,5 (+ - 12)	0,8 (±0,2)	0,9 (+ -0,1)	5,4 (±0,3)	
Calcite	15,0 (±0,4)	32 (± 2)	19 (+ - 0,5)	12,5 (±0,3)	13,5	6,5 (±0,2)	7
Aragonite			23,4 (+ - 0,7)	11,4 (±0,8)	15 (± 0,79)		9,8

L'analyse DRX des mortiers grignotés (0-2mm de profondeur) permet de constater que la proportion de calcite et d'aragonite des mortiers immergés diminuent de EA vers EN, et de façon plus prononcée à 90 jours qu'à 360 jours. La colonisation de surface a ainsi un impact sur la carbonatation de surface des mortiers.

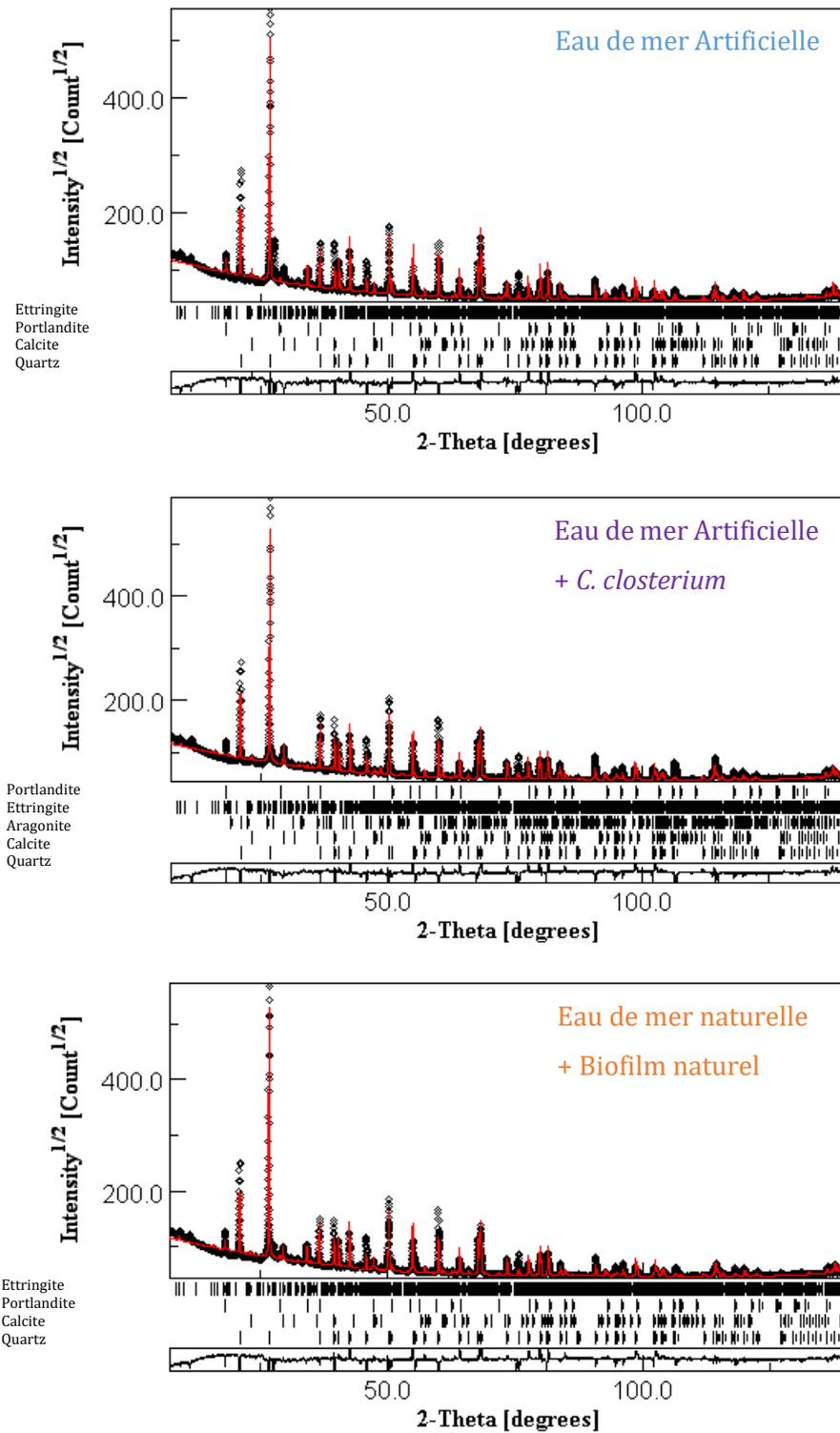


Figure 75. Spectres DRX de poudre de mortier immergé après 90 jours d’immersion dans les trois conditions étudiées (EA, EAC et EN)

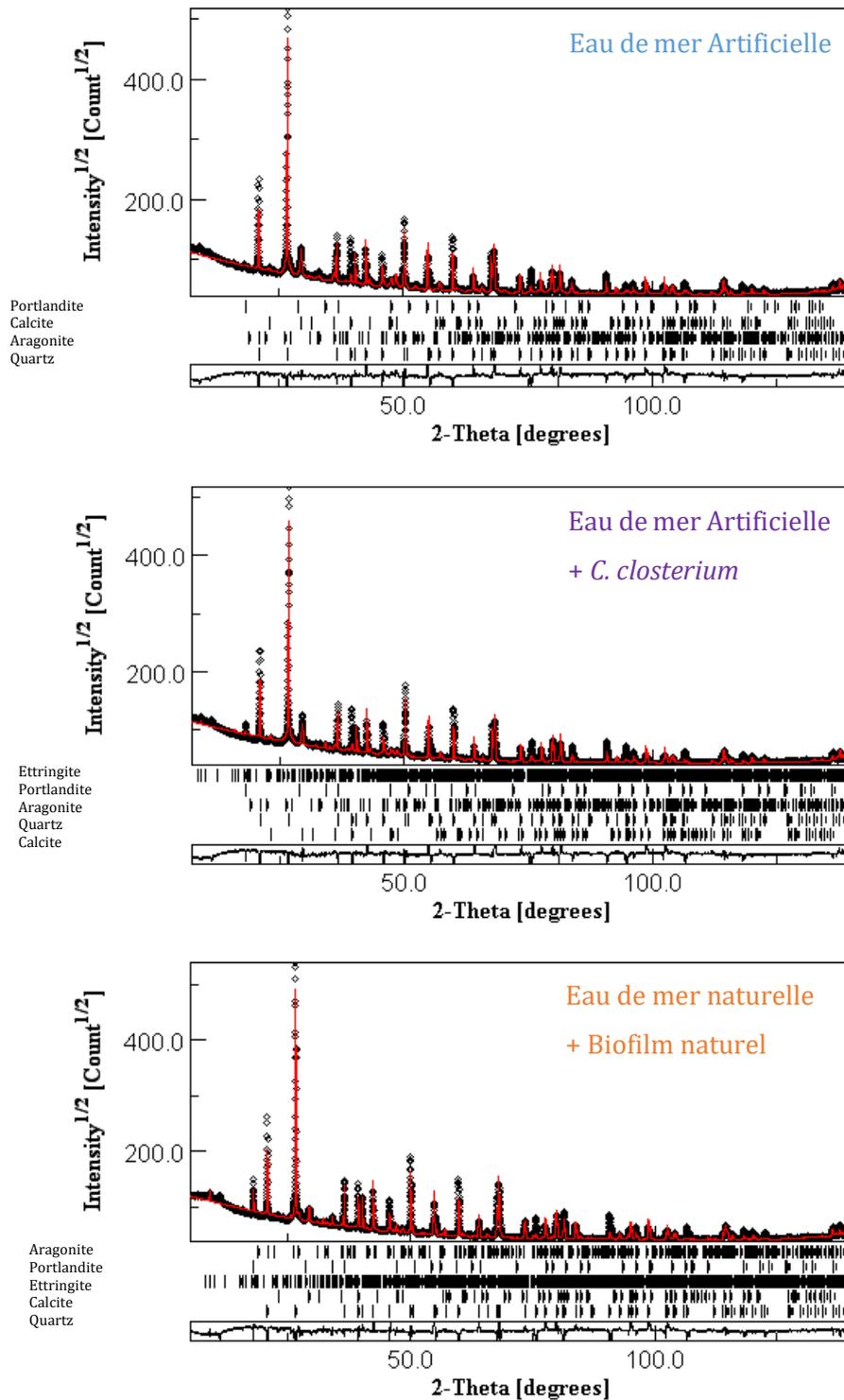


Figure 76. Spectres DRX de poudre de mortier immergé après 360 jours d'immersion dans les trois conditions étudiées (EA, EAC et EN)

2.4. Microspectrométrie Raman (MSR)

Les analyses RAMAN ont été réalisées à la surface de morceau de mortier fracturé provenant de mortier référence et des mortiers immergés en Eau de mer Artificielle (EA), en Eau de mer Artificielle + *C. closterium* (EAC) et en Eau de mer Naturelle (EN). Les modes de vibration des différentes phases identifiées dans nos mortiers sont regroupés dans le Tableau 15. Le choix des échéances s'est porté sur les plus pertinentes pour suivre les modifications de la matrice. Les spectres Raman sélectionnés correspondent donc aux mortiers immergés pendant 90 et 360 jours (Figure 77ab).

Après 90 jours d'immersion (Figure 77a), l'analyse Raman des 3 mortiers montre un profil très similaire pour les trois conditions étudiées. Néanmoins, les intensités de quelques modes de vibrations sont légèrement différentes. La bande intense dans la région $\sim 690 \text{ cm}^{-1}$ correspond à la vibration d'élongation symétrique Si-O-Si (C-S-H) (Garbev et al., 2007). Nous savons que le nombre d'onde des modes de vibration liés à la flexion Si-O-Si peut diminuer avec l'augmentation de la polymérisation des silicates. Nous remarquons aussi que l'intensité de la vibration Si-O-Si est plus importante pour les mortiers immergés en EN et en EA. Nous pouvons également confirmer l'hypothèse émise lors des analyses thermogravimétrique d'une carbonatation des C-S-H par la présence de la large bande vibratoire à 1086 cm^{-1} due à l'étirement de la liaison C-O dans le groupe des carbonates, et qui est caractéristique aux groupes des carbonates de calcium CaCO_3 .

Tableau 15. Position des modes de vibration Raman pour chaque phase identifiée dans nos mortiers après 90 et 360 jours d'immersion dans les 3 conditions étudiées

Phase	Position des bandes (cm^{-1})
Calcite (CaCO_3)	156*, 283* : Ca-O 710* : modes d'étirement $\nu_4(\text{CO}_3^{2-})$ 1086* : modes d'étirement $\nu_1(\text{CO}_3^{2-})$
Aragonite (CaCO_3)	154*, 181*, 208*, 283* : Ca-O 714* : modes d'étirement $\nu_4(\text{CO}_3^{2-})$ 1086* : modes d'étirement $\nu_1(\text{CO}_3^{2-})$
C-S-H	(a) 100-350 : Ca-O (b-c) 445, 480 : torsion et étirement Si-O-Si (d) 670 : mode d'étirement Si-O (e-f-g-h) 880-1060 : modes d'étirement symétriques des espèces Q_n dans les silicates (Si-O)

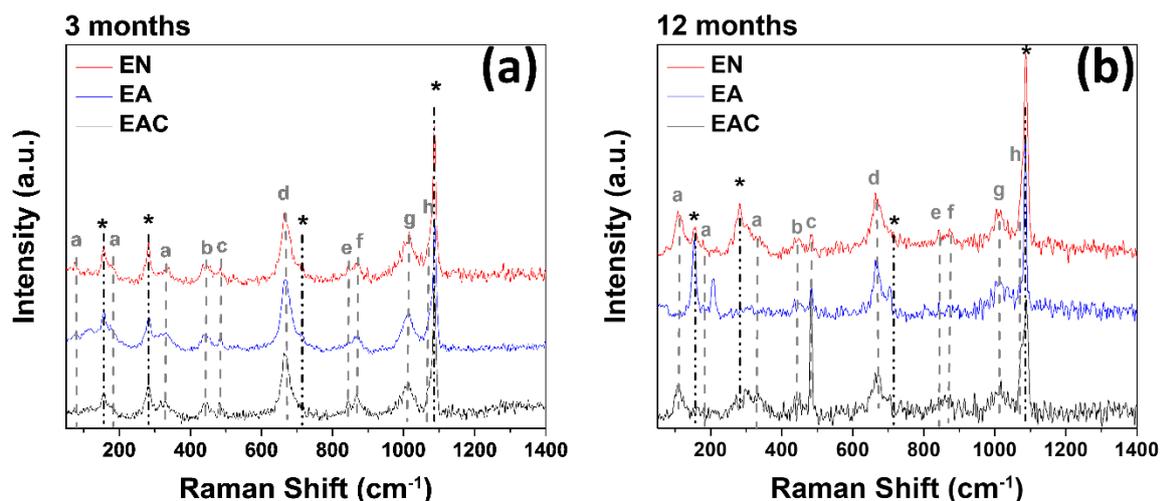


Figure 77. Analyse par spectroscopie Raman pour le mortier référence (a) et les mortiers immergés pendant 90 jours (a) et 360 jours (b) dans les trois conditions étudiées (EA, EAC et EN)

Les bandes présentes dans la gamme des nombres d'onde faibles (100-360 cm⁻¹) sont attribuées aux vibrations du réseau des polyèdres Ca-O, avec une contribution à 445 cm⁻¹ due à la torsion et à l'étirement des liaisons Si-O-Si.

L'analyse Raman a été utilisée avec succès sur une grande variété de verres vitrifiés et dans les systèmes CSH et CASH. La structure du réseau de silicate dans ces systèmes est principalement déterminée par le degré de polymérisation des tétraèdres de silicate (SiO₄) et décrite par l'abondance des différentes espèces Q_n, où Q_n fait référence à un tétraèdre lié par des atomes d'oxygène de pontage à n tétraèdres adjacents. L'intervalle de n est de 0 (correspondant à des tétraèdres isolés) à 4 (correspondant à un réseau tridimensionnel entièrement polymérisé). Q₀ est le monomère isolé, Q₁ et Q₂ sont des chaînes, et Q₃ et Q₄ reflètent les structures interconnectées.

L'incorporation d'éléments alcalins dans la structure des C-S-H va déstabiliser le réseau de tétraèdre en rompant les connections. L'oxygène va alors se lier au cation modificateur du réseau (Ca²⁺, etc.) et est appelé non pontant. L'augmentation de la dépolymérisation de la structure des C-S-H va donc créer des espèces Q₃, Q₂, Q₁ et Q₀.

Les modes de vibration présents dans la gamme 800-1100 cm⁻¹ sont associés aux modes d'étirement symétrique des espèces Q_n dans les silicates, aussi appelé ν₁ (Si-O). Ces vibrations d'étirement symétrique des C-S-H sont les principales phases formées pendant l'hydratation du ciment. Les spectres Raman obtenus sur nos mortiers montrent la présence des espèces Q₁, Q₂ et Q₃.

La vibration des espèces Q_2 est visible par la bande large autour de $950-1010\text{ cm}^{-1}$. Les bandes correspondant aux modes de vibration des espèces Q_1 et Q_3 sont respectivement localisées entre $880-886\text{ cm}^{-1}$ et autour de 1060 cm^{-1} (Kirkpatrick et al., 1997; Yu et al., 1999).

Les trois polymorphes du CaCO_3 (la calcite, l'aragonite et la vaterite) peuvent être différenciés par leurs spectres Raman. La présence des carbonates de calcium en grande quantité peut être identifiée par l'augmentation de l'intensité du mode de vibration principal (étirement, $\nu_1(\text{CO}_3^{2-})$) à 1086 cm^{-1} . Dans la région entre $100-500\text{ cm}^{-1}$, seules deux bandes apparaissent dans nos spectres, à 283 et 156 cm^{-1} (Pešková et al., 2011), ce qui montre la présence de la phase calcite.

Après 360 jours d'immersion (Figure 77a), l'analyse des spectres Raman obtenus sur les 3 mortiers montre que les modes de vibration du système C-S-H ont une intensité plus faible comparée à celles observée après 90 jours d'immersion.

Nous remarquons aussi que les modes de vibrations du réseau Ca-O s'affinent avec une augmentation de son intensité pour le mortier immergé en EAC et en EN après 90 jours. Ce phénomène montre d'un côté que le rapport Ca/Si devient plus important et d'un autre côté un phénomène de cristallisation plus prononcée dû au renforcement de la liaison Ca-O à 350 cm^{-1} . Ce renforcement peut s'expliquer par la diminution de la quantité de Si pouvant être engendré par l'assimilation de cette silice dissoute par les diatomées.

D'après l'analyse des carbonates présents dans nos échantillons après 360 jours d'immersion, nous remarquons cette fois-ci la présence de l'aragonite. En effet, l'aragonite est caractérisée par les modes de vibration à 1086 cm^{-1} , des bandes d'intensité moyenne à 208 et 154 cm^{-1} et une autre bande de faible intensité à 283 cm^{-1} (Edwards et al., 2005).

Conclusion

L'étude de la bio-colonisation du mortier par les différents outils utilisés (mesure PAM, intensité d'encrassement, image MEB, fluorescence) ont permis de suivre la formation du biofilm au cours du temps. Celle-ci nous a permis d'observer les premières étapes de colonisation sur le matériau en comparant leur dynamique suivant le milieu étudié (contrôlé en laboratoire (EAC) ou en EN). Les apports continus en sels nutritifs par le renouvellement de l'eau a permis au biofilm de se former rapidement et de se maintenir en bon état. Le suivi de la bio-colonisation dans le milieu contrôlé (EAC) a montré que le dispositif mis en place a permis d'étudier les différents aspects liés aux interactions entre le microphytobenthos et le matériau cimentaire.

L'étude de l'influence de l'eau de mer (EA) et de la bio-colonisation (EAC et EN) sur du mortier montre que sa surface change de manière, minéralogique et chimique au cours de son immersion.

Les modifications en profondeur de la matrice cimentaire dépendent du temps d'immersion et de la bio-colonisation du matériau.

La diffraction des rayons X (DRX), la spectrométrie Raman, MEB, et l'analyse thermique (ATG/DTG) nous ont permis d'obtenir des informations sur la minéralogie des cristaux formés ou disparus lors de la bio-colonisation du mortier. Ces méthodes d'analyses ont révélé que la composition des matériaux est qualitativement identique entre les deux milieux où un biofilm s'est formé à la surface des mortier (EN et EAC). Néanmoins suivant l'activité du biofilm, les cristaux sont quantitativement différents. Les interactions chimiques entre les espèces et le mortier ont conduit à la formation de composés carbonates (calcite et aragonite). D'autre part, la bio-colonisation accélère la lixiviation de la portlandite. Le devenir des ions Ca^{2+} est de deux sortes, ils peuvent être soit assimilés par le biofilm microphytobenthique soit former des carbonates.

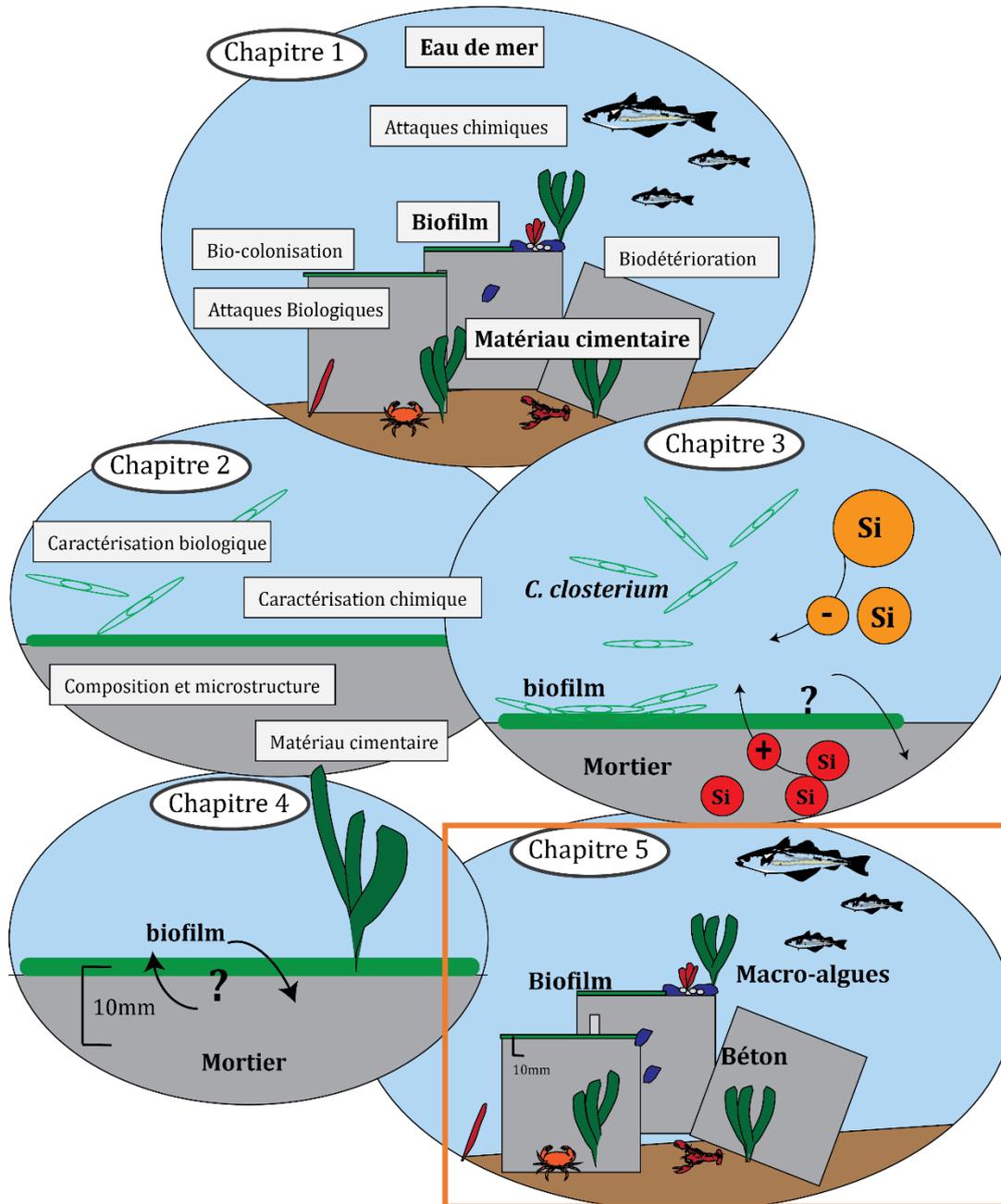
L'ion Mg^{2+} présent en grande quantité dans l'eau de mer a eu un effet sur les morphologies de cristaux de carbonates de calcium observées. En effet, suivant le rapport Mg:Ca, des formes de calcite magnésienne ont été observées à la surface des échantillons après la formation d'un biofilm microphytobenthique. Nos résultats suggèrent également que le biofilm peut utiliser les ions Mg^{2+} pour les métabolismes des espèces qui le composent et contrôler la précipitation du carbonate de calcium en surface.

La forte formation d'aragonite à la surface du mortier immergé en eau de mer artificielle explique la limitation de la diffusion des ions chlorure. A court terme, la bio-colonisation (milieu EAC et EN) du matériau a accéléré la pénétration de ces ions. En revanche à long terme, le développement du biofilm microphytobenthique à la surface du matériau a permis de réduire le transport des ions chlorure au sein de la matrice cimentaire en jouant un rôle barrière.

Ces études montrent qu'il est possible de séparer les effets de la bio-détérioration engendrés par le biofilm des autres processus et action de l'eau de mer sur les matériaux cimentaires (durée d'immersion, attaques chimiques par les ions chlorure, ...).

La démarche basée sur des mesures de durabilité associées aux méthodes de caractérisation physico-chimiques et microstructurales, permet d'apporter des connaissances quant aux interactions pouvant avoir lieu entre le microphytobenthos et la matrice cimentaire. Cette étude permet d'améliorer en conséquence la composition d'un matériau à des fins d'amélioration et de développement de la biodiversité en milieu marin lorsque la mise en place de structures artificielles en matériau cimentaire est indispensable à l'activité anthropique.

Chapitre 5 : Effet du biofilm microphytobenthique sur les propriétés du béton en milieu marin



Introduction

Le matériau cimentaire étudié dans ce chapitre est le béton. Celui-ci étant très souvent utilisé pour la réalisation des infrastructures maritimes qui jouent un rôle crucial dans le développement économique, social et politique de la plupart des pays côtiers.

Le béton immergé en mer est bio-réceptif et est rapidement bio-colonisé par une grande diversité de micro-organismes (Chapitre 1, II). Ces derniers peuvent impacter le matériau et sa durabilité, tout comme la composition chimique de l'eau de mer.

Dans ce contexte, l'étude des interactions pouvant avoir lieu entre ce type de matériau et la biomasse fixée est essentielle.

Les travaux présentés ici ont pour objectif d'étudier la formulation de béton la plus adaptée à la réalisation d'infrastructures maritimes (Modules de digue et prototype pour le captage des larves d'huitres) dans le cadre du projet MARINEFF. Pour cela, deux types de bétons composés de ciment Portland CEMII/A-LL ont été réalisés et étudiés, un avec une substitution partielle de granulats naturels par des granulats coquilliers (coquilles d'huitres creuses : *Crassostrea gigas*) (CEMII +20%C) et l'autre sans coquilles (CEMII +0%C). Afin de déterminer quel type de béton est le plus bio-réceptif, la bio-colonisation de surface a également été étudiée. Des tests ont été réalisés sur des bétons immergés en milieu marin à court et à long terme pour étudier leur durabilité (diffusion des ions chlorure) et suivre l'évolution de leurs propriétés mécaniques.

I. Dispositif expérimental et immersion des échantillons de béton *in situ* et en mésocosmes semi-fermés

Pour étudier la durabilité et la colonisation des bétons en milieu marin, deux types d'échantillons cylindriques ($\varnothing 110$ mm \times H50 mm et $\varnothing 110$ mm \times H220 mm) ont été confectionnés (Figure 78). A l'état frais, des essais d'affaissement et des mesures d'air occlus selon les normes [NF-EN 12350-2] et [NF-EN 12350-7] ont été réalisés lors de l'optimisation des formulations des deux types de béton (Chapitre 2). Après démoulage, les échantillons ont été stockés pendant 90 jours dans une salle contrôlée à 100 % d'humidité relative (HR) et à température $T = 20^{\circ}\text{C} \pm 1$. Une fois la cure terminée, les propriétés mécaniques ainsi que la composition minéralogique (qualifiée à partir d'analyses ATG/DTG) des bétons ont été évaluées sur des témoins. Les autres échantillons ont été immergés dans de l'Eau de mer Artificielles (EA) ou dans de l'Eau de mer Naturelle (*in situ* puis en en mésocosme (EN)). Ces deux milieux permettront de distinguer l'effet de l'eau salée de l'effet de la bio-colonisation sur la durabilité et les propriétés du béton. Après 90, 180 et 360 jours d'immersion, des mesures de résistance à la compression, de diffusion des ions chlorure et des

analyses thermogravimétriques ont été effectuées sur les échantillons. Le suivi de la bio-colonisation (biomasse et activité photosynthétique) a également été réalisé à chaque échéance.

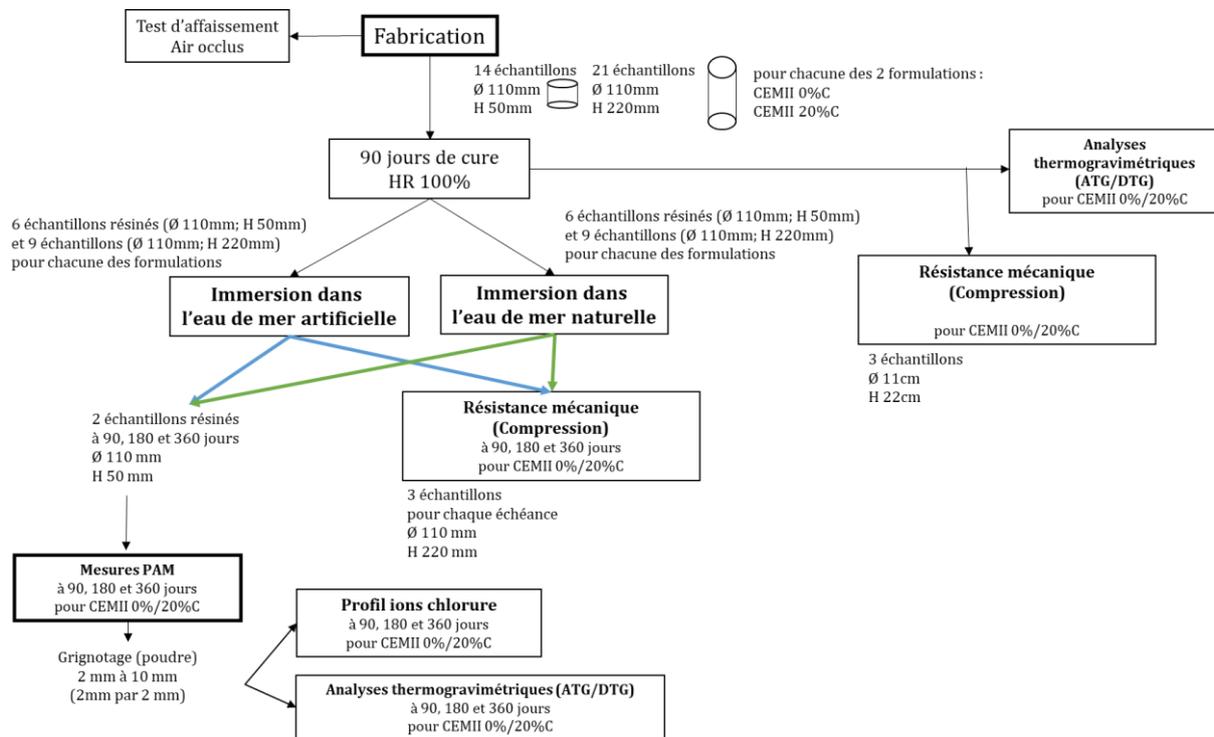


Figure 78. Étapes expérimentales

1. Expériences *in situ*

Après les 90 jours de cure, les échantillons de béton ont été placés dans des cages qui ont été immergées pendant 90 jours dans la Rance de Dinard (WGS 84 : 48°655224 2°061009 ; Lambert 93 : 6851391.9 327475.7 France) (Figure 79a) à partir de juin 2019. L'immersion *in situ* a été réalisée pendant la période de reproduction des huitres plates (*Crassostrea edulis*) dans le but de permettre le captage de leurs larves sur nos échantillons de béton. En effet, un des objectifs du projet MARINEFF était d'évaluer lesquels des bétons (CEMII +0%C ou CEMII +20%C) étaient le plus bio-réceptif pour le recrutement des huitres plates.

Au bout de ces 90 jours d'immersion dans la Rance de Dinard (septembre 2019), les échantillons ont été récupérés puis placés dans des mésocosmes semi-fermés (bacs remplis d'eau de mer naturelle) avec un flux continu permettant l'oxygénation des bacs, un brassage de la colonne d'eau et une mise à disposition d'éléments nutritifs pour les espèces marines fixées sur les échantillons (Figure 79b). L'immersion en mésocosme a été réalisée durant une période allant de septembre 2019 à juin 2020. Les deux formulations se trouvent dans des bacs différents pour favoriser leur identification. Ces mésocosmes sont installés au sein de la Station Marine CREC-Unicaen de Luc-

sur-Mer. La station marine récupère l'eau à l'aide d'une prise installée dans la zone subtidale de la baie de Seine. Cette eau est non filtrée. Ce système va permettre le développement du biofilm, des macro-algues et la croissance des huitres plates tout au long de l'expérience. Pour la condition en eau de mer artificielle, les échantillons ont été immergés dans des bacs contenant de l'eau de mer artificielle faite à partir du sel Instant Ocean®, marque Spectrum dosée à 33,3 g.L⁻¹ (Atkinson and Bingma, 1997).

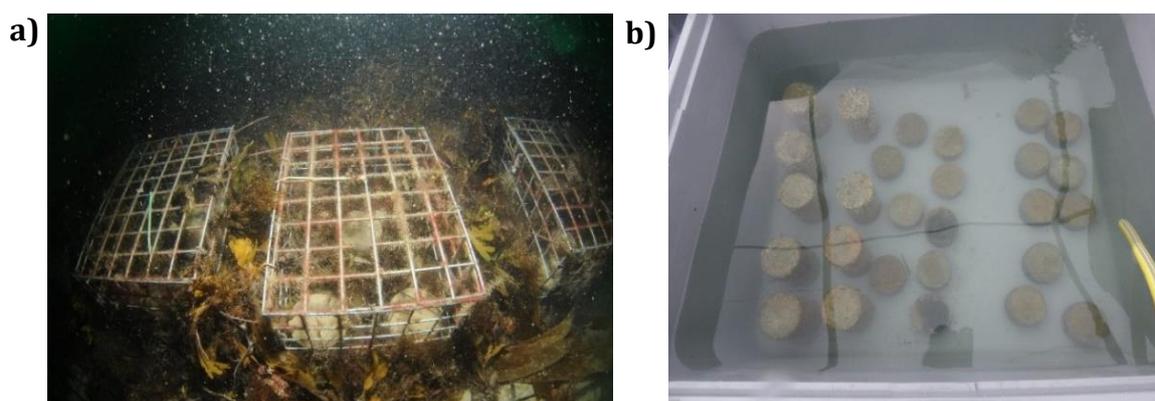


Figure 79. Immersion des éprouvettes de béton dans des cages pendant 3 mois dans la Rance de Dinard **(a)** ; immersion des éprouvettes en mésocosmes semi-fermés **(b)**

II. Suivi de la bio-colonisation des éprouvettes de béton

L'effet de la composition du béton sur les processus de bio-colonisation a principalement été évalué sur les premiers producteurs primaires c'est-à-dire ceux capable d'effectuer la photosynthèse (microphytobenthos). Ils ont été suivis *in situ* puis en mésocosme. Cette évaluation a été réalisée à partir de mesures des paramètres photosynthétiques du biofilm microphytobenthique développé à la surface des éprouvettes.

1. Suivi des facteurs environnementaux des différents milieux

Le suivi de certains paramètres environnementaux (pH et température) a été réalisé aux échéances de récupération des éprouvettes de béton pour la réalisation des différents tests de durabilités et de résistances mécaniques. Les données ont été récupérées à partir de la base de données SOMLIT (Dinard et SMILE de Luc-sur-Mer) et des mesures ponctuelles réalisées en laboratoire avec un pH-mètre et thermomètre.

Pour rappel l'immersion en Baie de Dinard a été réalisée de juin 2019 à septembre 2019 puis le suivi s'est poursuivi en mésocosme avec de l'eau de mer naturelle provenant de la zone intertidale

de Luc-sur-Mer jusqu'en juin 2020. L'évolution des paramètres physico-chimiques est présentée dans le Tableau 16.

Tableau 16. Evolution des paramètres physico-chimiques des environnements étudiés, (1 PSU = 1 g de sel (Na⁺Cl⁻) par kg d'eau de mer)

	<i>In situ</i> (Dinard)	Mésocosme (Eau de mer naturelle)		Eau de mer artificielle		
	90 Jours	180 Jours	360 Jours	90 Jours	180 Jours	360 Jours
Salinité (PSU)	35	33,35	32,46	33	33	33
Température (°C)	18	11	20	19	19	19
pH	8	7,74	7,82	8	8,5	8,6

Le pH de l'eau de mer artificielle a légèrement augmenté au cours de l'immersion des éprouvettes de bétons atteignant 8,6 à 360 jours d'immersion. Cette augmentation du pH peut s'expliquer par la lixiviation du béton au cours du temps.

La salinité et le pH (7,74- 8) de l'eau de mer naturelle sont restés relativement stables malgré les variations de température. Cette variation de température s'explique par la saisonnalité qui va favoriser la succession de diverses communautés algales. Leurs installations sur le matériau peuvent avoir un impact sur sa résistance et sa durabilité dans le temps.

2. Identification des espèces marines fixées sur le béton

Après 90 jours d'immersion dans la Rance de Dinard, les éprouvettes de béton ont été légèrement colonisées. Quelques larves d'huitres plates (*Ostrea edulis*) se sont fixées sur quelques éprouvettes (Figure 80). Initialement, les larves d'huitre sont sous forme pédivéligère, elles se trouvent dans la colonne d'eau à la recherche d'un substrat adéquat pour se fixer. A long terme, il peut être intéressant d'observer le comportement du matériau suite à l'accumulation et l'accroissement de ces bivalves à leur surface. En revanche, après 3 mois d'immersion certaines éprouvettes cylindriques de béton (Ø110 mm× H50 mm) destinées à l'étude de la résistance du matériau à la diffusion des ions chlorures ont été ensablées. Ainsi la bio-colonisation de ces éprouvettes sera considérée comme nulle.

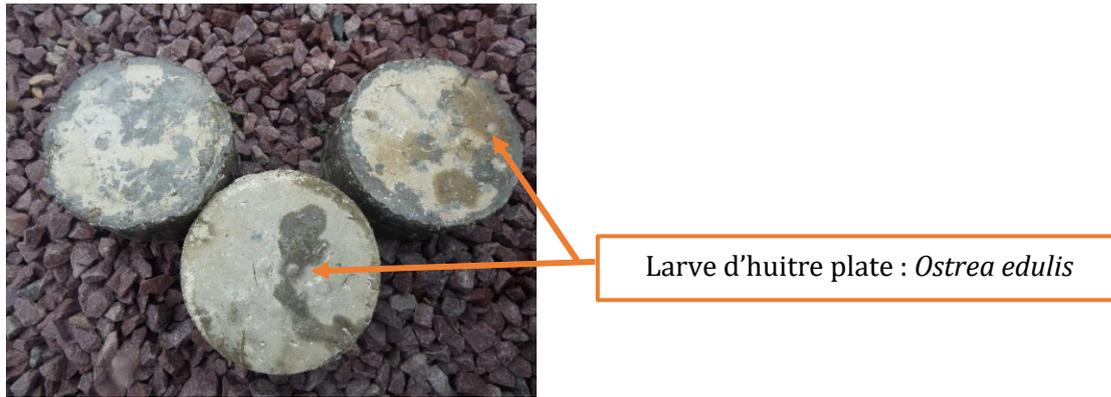


Figure 80. Photographie d'éprouvettes de béton coquiller après 90 jours d'immersion *in situ*.

En ce qui concerne les échantillons destinés aux tests de résistances mécaniques ($\varnothing 110$ mm \times H220 mm), quelques espèces marines se sont fixées (Figure 81) après 90 jours d'immersion. Nous pouvons observer différentes algues macrophytiques dont des Rhodophytes (algues rouges).

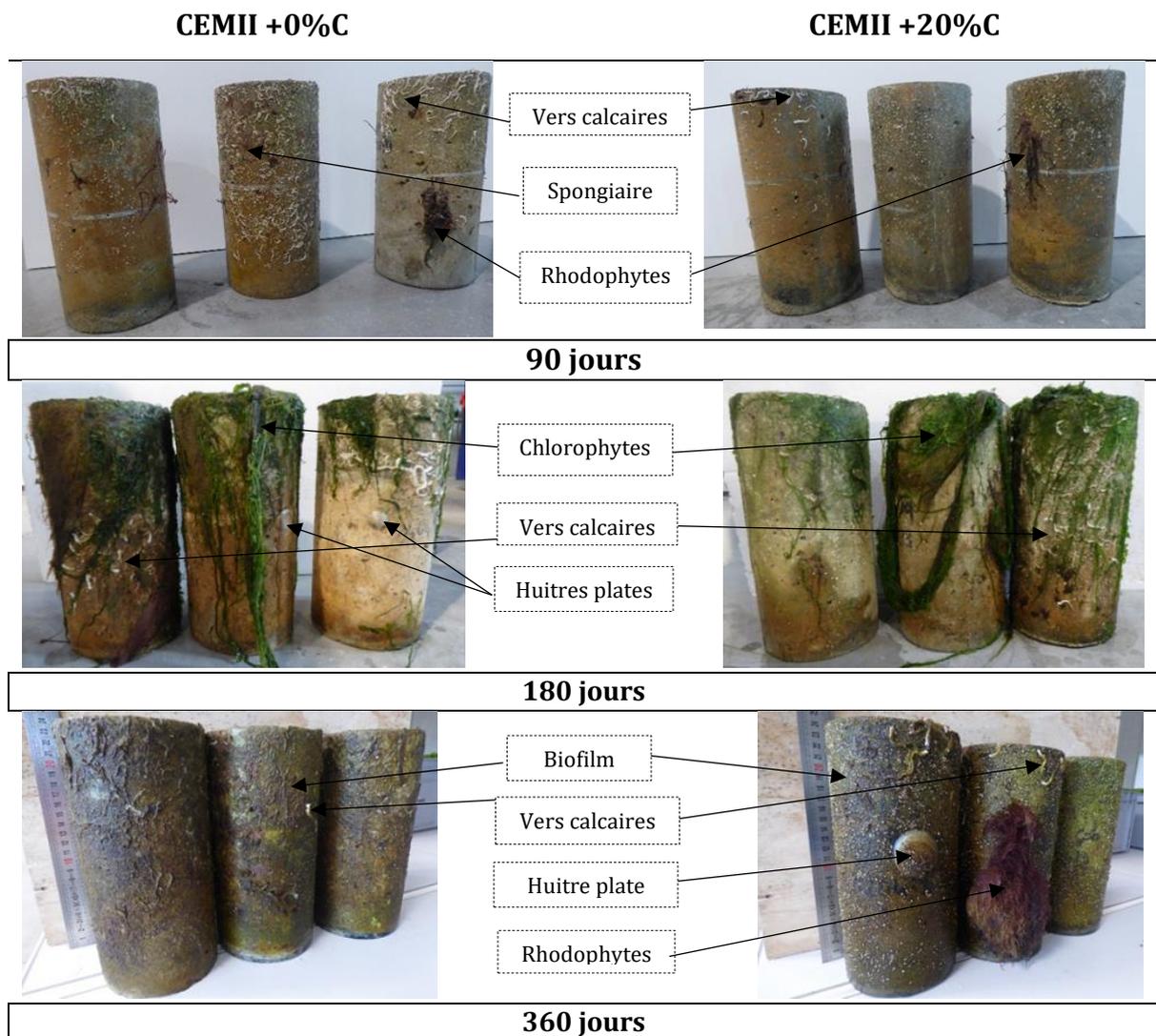


Figure 81. Photographie d'éprouvettes de béton CEMII +0%C et CEMII +20%C ($\varnothing 110$ mm \times H220 mm) après 90, 180 et 360 jours d'immersion en eau de mer naturelle

La faible adhésion des macro-algues peut être due aux facteurs environnementaux de la zone d'immersion. En effet la richesse algale est influencée par la source en nutriment et l'hydrodynamisme du milieu. De plus, la température, la pénétration de la lumière liée à la turbidité de l'eau dans la colonne d'eau ainsi que la sédimentation influe sur la distribution algale. Les macro-algues sont caractéristiques d'un biofilm secondaire, cela laisse penser qu'un biofilm microphytobenthique constitué principalement de micro-algues s'est d'abord formé à la surface du matériau.

Il y a également de nombreux types de vers annélides polychètes comme l'espèce *Spirobranchus triqueter* (ver allongé) et des Spirorbes (distinctif par sa forme enroulée en spirale) qui sont des vers calcaires. Certaines zones de l'éprouvette sont également recouvertes de spongiaires.

Après 180 jours d'immersion (dont 90 jours en mésocosme), toutes les étapes de la colonisation d'un matériau immergé en mer ont pu être observées. En effet, il y a eu tout d'abord la formation d'un biofilm primaire, suivis des macro-algues. Les éprouvettes de béton ont vu un accroissement des macro-algues et en particulier des chlorophytes (algues vertes) dont plusieurs du genre *Ulva*. Ces algues ont besoin de beaucoup de lumière et sont souvent présentes dans des eaux riches en azote et en phosphore. Les espèces majoritairement fixées sur les éprouvettes de béton sont *Ulva compressa*, *Ulva lactuca*. D'autres espèces de Rhodophytes dont *Porphyra sp*, *Chondrus crispus*, *Mastocarpus spp.* ont également pu être observées.

Les quelques larves d'huîtres fixées au cours de l'immersion des éprouvettes dans la Rance de Dinard ont vu un développement de leur coquille passant de 0,5 cm à au moins 2 cm (Figure 82). Ce développement de la coquille montre que le milieu est bien enrichi en élément nutritif nécessaire à la croissance de leur coquille. La coquille de l'huître va ainsi se former petit à petit suite au processus de minéralisation que l'on nomme la calcification (Mount et al., 2004). Le développement des macroalgues a également pu être favorisé par la croissance des huîtres plates. Les huîtres plates ont la capacité de réduire la turbidité de l'eau suite au stockage des nutriments sous forme de biomasse. Cette disponibilité en nutriments va également favoriser le recrutement de divers autres espèces benthiques (Newell et al., 2005).



Figure 82. Photographie d'une huître après 3 mois de fixation sur le béton

En ce qui concerne les éprouvettes Ø110 mm × H50 mm, on retrouve les mêmes espèces marines fixées sur les deux types de bétons avec ou sans coquilles (Figure 83ab).

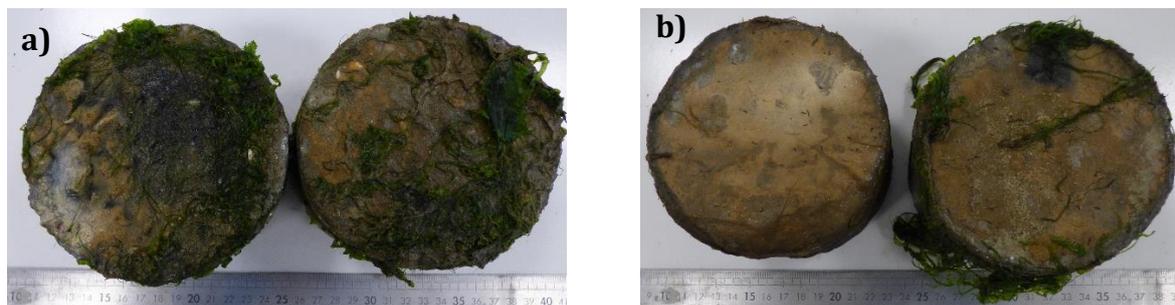


Figure 83. Photographie d'éprouvettes résinées (Ø110 mm × H50 mm) de type CEMII +20%C **(a)** et CEMII +0%C après 180 jours d'immersion en eau de mer naturelle **(b)**

3. Evaluation de la biomasse et des paramètres photosynthétiques : Mesure PAM

Les mesures des paramètres photosynthétiques (biomasse, activité photosynthétiques et capacité photosynthétique) du biofilm ont été effectuées à 180 et 360 jours d'immersion. Comme expliqué dans la partie 2.1 après 90 jours d'immersion dans la Rance, les mesures de l'activité photosynthétique n'ont pas été réalisées à cause de la trop faible colonisation par le microphytobenthos. En effet, le signal de fluorescence était beaucoup trop faible, dû notamment à une sédimentation sur les éprouvettes lors de l'immersion des cages dans le fond marin. Ce dépôt sédimentaire a ainsi modifié la cinétique de colonisation du biofilm et des organismes en modifiant la nature du substrat.

La quantité de biomasse microphytobenthique (Figure 84) présente à la surface des deux types de bétons est similaire à 180 jours d'immersion (144 u.a pour le CEMII +0%C et 140 u.a pour le CEMII +20%C, Figure 84a). Nous observons ensuite une augmentation de la biomasse à long terme sur le béton CEMII+0%C avec 170 u.a. En revanche, vu l'écart type des mesures de biomasse, celle-ci dépend fortement de la zone de mesure. Elle donne cependant un bon indicateur de la bio-colonisation du matériau. Les échantillons de béton suivis ne sont pas les mêmes à 90, 180 et 360 jours. On ne peut donc pas dire s'il y a eu une augmentation ou une diminution de la colonisation au moment de l'analyse. Cependant, cette biomasse va avoir un impact sur la matrice cimentaire, effet que nous allons chercher à qualifier et quantifier par la suite. De plus, l'analyse de la biomasse n'est réalisée qu'à un certain instant du développement. Or, au cours du temps, le biofilm peut se détacher ou d'autres facteurs biotiques comme le broutage, la compétition inter-espèces peuvent avoir un impact sur la quantité de biomasse restante en conditions *in situ*.

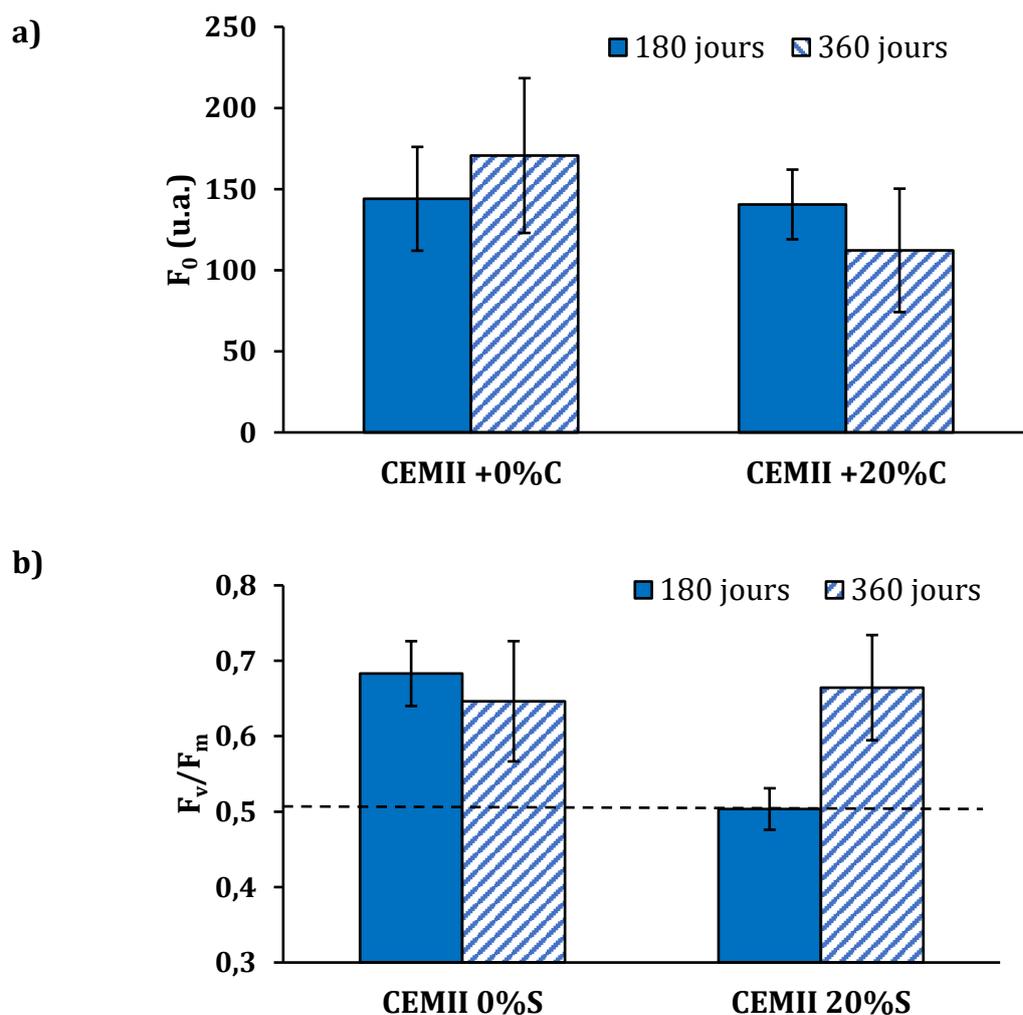


Figure 84. Dynamique de la colonisation par le biofilm microphytobenthique en fonction du type de béton. **(a)** Biomasse chlorophyllienne F_0 du microphytobenthos ; **(b)** Indice F_v/F_m Rendement quantique maximum du PSII (ie. Indice d'état physiologique)

L'indice de l'état physiologique du biofilm fixé sur le béton est élevé, en moyenne $F_v/F_m = 0,6$, ce qui révèle un très bon état physiologique (Figure 84b). L'état physiologique des micro-algues a légèrement augmenté après 360 jours d'immersion pour le béton coquillier. Le biofilm s'est mieux acclimaté après une période plus longue sur le substrat. Néanmoins on peut dire que globalement la dynamique de l'état physiologique est la même pour les 2 types de bétons. Ces résultats associés à la biomasse du microphytobenthos montrent que celui-ci s'est bien développé et bien acclimaté à son nouvel environnement et à son substrat.

La capacité photosynthétique maximale ($rETR_{max}$) des diatomées diffèrent sur les deux types de bétons (Figure 85) après 180 jours d'immersion avec $84,3 \mu\text{mol.électrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour le béton CEMII +0%C contre $52,7 \mu\text{mol.électrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour le béton CEMII +20%C. Après 360 jours d'immersion, le béton CEMII +20%C semble être celui où le biofilm a la capacité photosynthétique maximale la plus élevée. En effet, le $rETR_{max}$ augmente jusqu'à $126 \mu\text{mol.électrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($\pm 51,6$)

pour le béton CEMII +20%C contre $69 \mu\text{mol.électrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (± 36) pour le béton CEMII +0%C. Par ailleurs, l'écart-type est beaucoup plus important pour le biofilm fixé sur l'échantillon comportant 20% de coquilles que pour l'échantillon sans coquilles. Nous pouvons donc supposer que la capacité photosynthétique du biofilm formé sur le béton coquillier varie fortement suivant la zone étudiée. Malgré ces observations, nous ne pouvons pas attribuer les variations observées à la composition du béton, car la capacité photosynthétique des micro-algues dépend principalement de l'énergie lumineuse nécessaire pour saturer la photosynthèse. Ce paramètre dépend de la composition en espèces de la communauté d'algues et de leur capacité photosynthétique. La capacité photosynthétique des micro-algues peut également être influencée par d'autres facteurs abiotiques tels que la température ou la disponibilité en nutriments. Il est donc important de connaître les espèces composant le biofilm afin d'évaluer la productivité primaire.

Le suivi des paramètres photosynthétiques du biofilm n'a pas révélé de différence significative entre les deux bétons utilisés. Cuadrado et al., (2016) et Souche et al., (2016) ont constaté que l'incorporation de coquilles n'avait aucune influence sur la bio-réceptivité du béton.

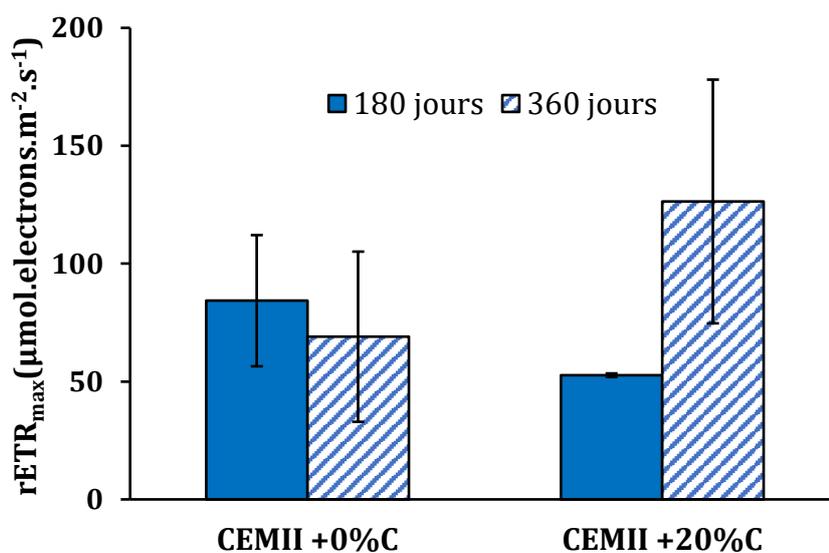


Figure 85. Capacité photosynthétique maximale $r\text{ETR}_{\text{max}}$ du microphytobenthos des éprouvettes de bétons immergés

D'autre part, l'activité du biofilm semble dépendre davantage des facteurs extrinsèques du milieu environnant que de facteurs intrinsèques liés à la composition du béton. En effet, la compétition inter-espèces, la prédation ainsi que le développement de macro-algues ont pu être à l'origine des différences observées sur les 2 formulations de béton. Néanmoins, malgré la plus faible biomasse observée sur le béton CEMII +20%C, le biofilm s'est mieux acclimaté aux substrats et aux

variations du milieu. Il serait intéressant d'étudier plus précisément l'effet de la rugosité du matériau sur sa bio-réceptivité. Cependant cette rugosité dépend de l'échelle des espèces marines. En effet, une surface lisse à l'œil nu peut être considérée comme une surface avec des micro-rugosités selon le type de micro-organismes en action. Ainsi, le suivi à long terme a permis de montrer l'impact de la saisonnalité sur la bio-colonisation du béton et sur les paramètres photosynthétiques du biofilm qui dépendent des conditions environnementales (température, intensité lumineuse, nutriments...).

III. Effet de l'immersion sur la durabilité et les résistances mécaniques du matériau

1. Propriétés mécaniques

Les résultats des essais de compression sont illustrés par la Figure 86. La classe de résistance visée est un C35/45 selon la norme EN 206-1. Nos résultats montrent que l'incorporation de granulats coquillers dans le béton CEMII engendre une perte de résistance mécanique. En effet, après 90 jours de cure, la résistance à la compression passe de 46,3 MPa pour le béton non coquillier à 31,1 MPa pour le béton coquillier. La diminution de la résistance observée pour les bétons contenant des coquilles peut s'expliquer par plusieurs facteurs. Tout d'abord, la rigidité intrinsèque des coquilles d'huîtres, bio-composites calcitiques contenant environ 1 % de matrices organiques, est inférieure à celle des autres granulats utilisés dans la composition du béton. Par ailleurs, la calcite présente dans les coquilles d'huîtres est également fortement anisotrope mécaniquement, avec des microstructures de couches de calcite foliées et prismatiques. Si ces microstructures sont mal orientées dans le béton, elles peuvent facilement offrir une faible résistance mécanique par clivage sous contrainte mécanique. De plus, les coquilles peuvent également donner lieu à une plus grande absorption d'eau. D'autre part, la présence de coquilles dans le béton forme des vides à l'intérieur de la matrice. Ces vides engendrent une augmentation de la porosité du matériau et donc réduit la résistance du béton CEMII +20%C.

Après immersion en milieu salé (eau de mer artificielle sans diatomée (EA) ou eau de mer naturelle (EN)), les résultats des résistances moyennes à la compression des bétons coquilliers (CEMII +20%C) et non coquilliers (CEMII +0%C) montrent une tendance à l'augmentation (Figure 86) par rapport à leurs références respectives (matériaux non immergés). En effet, la résistance à la compression du béton coquillier passe d'une moyenne de 32 MPa avant immersion à 50 MPa après 90 jours d'immersion dans l'EA. Néanmoins, si nous prenons en compte les écarts types des bétons références, cette augmentation des résistances des deux types bétons reste relativement légère une fois immergé. Par ailleurs, le comportement mécanique de ces bétons demeure stable au cours de l'immersion à partir de 90 jours.

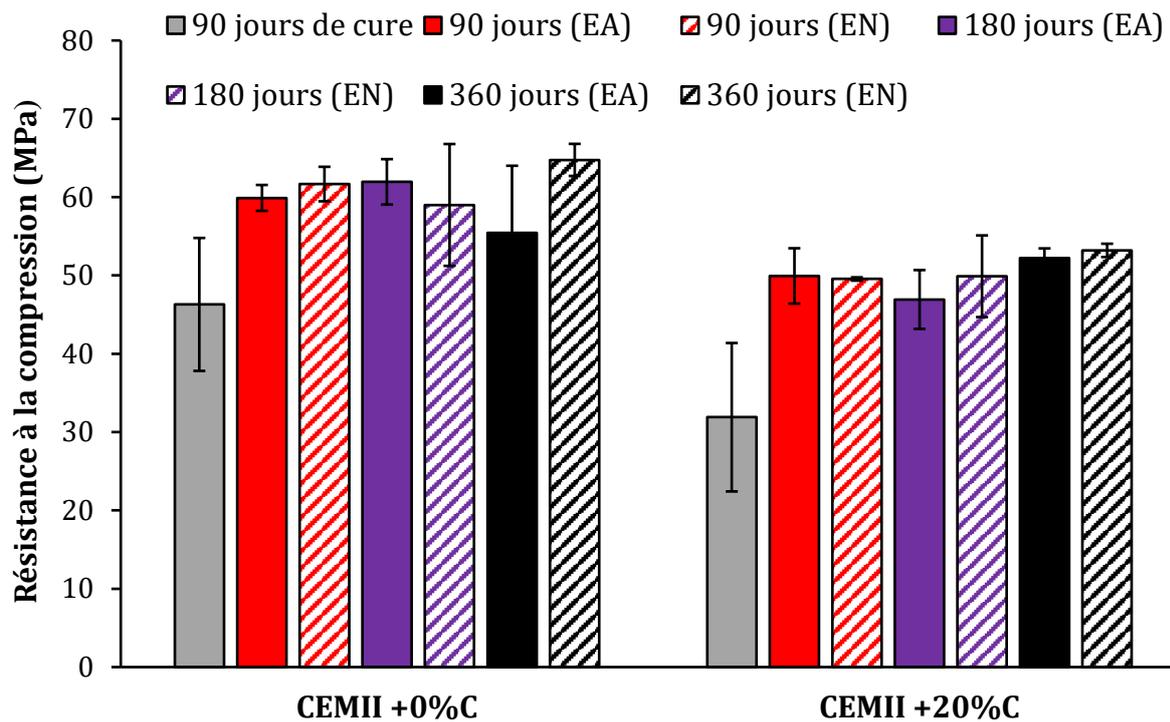


Figure 86. Résistance à la compression des bétons après 90 jours de durcissement et après 90, 180 et 360 jours d'immersion dans l'EA et l'EN

L'augmentation des résistances mécaniques pourrait s'expliquer par le phénomène de carbonatation. Afin d'étudier cette hypothèse, des analyses thermogravimétriques ont été réalisées. La Figure 87, présente les résultats obtenus pour les deux types de bétons à partir de poudre prélevée dans leur couche superficielle. Les deux bétons CEMII présentent une augmentation de la quantité de carbonate de calcium (pic de décomposition entre 600 et 900°C (Villain et al., 2007)). Cette formation de phase peut être due au phénomène de carbonatation du matériau cimentaire. En effet, le $MgCl_2$, naturellement présent dans l'eau de mer, peut induire la libération de Ca^{2+} à partir de l'hydrate $Ca(OH)_2$, pour former du $CaCO_3$ (Zhu et al., 2012) ou induire la décalcification des C-S-H (Kurdowski, 2004). Ainsi les ions calcium vont précipiter dans la porosité avec les ions carbonates sous forme de carbonate de calcium. De plus, les analyses nous montrent quelques différences entre le béton coquillier et non coquillier (Figure 87). En effet, la quantité de carbonate de calcium dans les bétons références est plus élevée dans le béton CEMII +20%C que dans le béton CEMII +0%C. Ces résultats s'expliquent par la présence de coquilles d'huîtres dans ce type de béton, composées à plus de 99 % de calcite (Mo et al., 2018; Perdomo et al., 2018). Le pic de décomposition du carbonate de calcium n'est pas homogène lorsque le matériau est immergé dans un milieu salé (Figure 87). Le $CaCO_3$ peut cristalliser sous trois formes polymorphiques, dont deux sont les plus stables : la calcite (750 et 820 °C) et l'aragonite (pic entre 530 et 760 °C) (Drouet, 2010). La distinction entre les deux principales

formes de carbonate de calcium est facilement observable sur les deux formulations après immersion dans les deux environnements étudiés

Bier, (1986), a démontré que la carbonatation induit une modification de la structure des pores des matériaux cimentaires. Il a démontré que cette modification dépendait du type de ciment. En effet, une réduction du volume des pores capillaires est observée lorsque le ciment contient un taux de clinker élevé. Dans le cas du ciment CEMII A/LL utilisé dans cette étude, la quantité de clinker est de 81,9%.

D'autres études (Song and Kwon, 2007 ; Thiery et al., 2007) ont montré que la précipitation du CaCO_3 bouche les pores du béton. Ce phénomène réduit la porosité du béton conduisant à une amélioration de sa résistance mécanique comme observée dans cette étude (Figure 86).

Les résultats obtenus ont également montré que l'augmentation de la résistance mécanique a été maintenue lorsque les échantillons CEMII ont été immergés dans de l'Eau de mer Naturelle (EN) jusqu'à 180 jours. A court terme (90 et 180 jours d'immersion), il n'y a pas de grande différence entre les bétons immergés en Eau de mer Naturelle et ceux immergés en Eau de mer Artificielle (par exemple le béton non coquillier atteint une résistance à 60 MPa en EA contre 61,7 MPa en EN). Ainsi à court terme, la bio-colonisation du béton n'a pas d'impact sur les résistances mécaniques des bétons.

La bio-colonisation associée à la carbonatation peut être considérée comme bénéfique pour ce béton. L'accumulation et le développement d'organismes marins à la surface du CEMII +0%C (Figure 86) peuvent jouer un rôle protecteur, notamment après 360 jours d'immersion. De plus, la présence d'huîtres, de vers serpulides et de coraux, observés à la surface des bétons immergés dans l'Eau de mer Naturelle, peuvent induire la formation de carbonates de calcium pouvant précipiter dans les porosités de la matrice cimentaire rendant le matériau plus résistant. Il serait intéressant de vérifier ces hypothèses par la réalisation d'images MEB.

En revanche, la quantité limitée et non homogène de larves d'huîtres fixées après 90 jours d'immersion en Baie de Dinard ne permet pas de conclure que la croissance de ces bivalves (visible après 180 et 360 jours d'immersion) (Figure 81), a eu un impact réel sur la résistance des différents bétons. Néanmoins, il est important de prendre en compte la fixation de ces colonisateurs calcaires. En effet, des études antérieures (Kawabata et al., 2012; Perkol-Finkel and Sella, 2014; Risinger, 2012; Sella and Perkol-Finkel, 2015) ont montré qu'une telle colonisation pouvait contribuer à protéger la structure et ainsi favoriser la durabilité du béton sur le long terme.

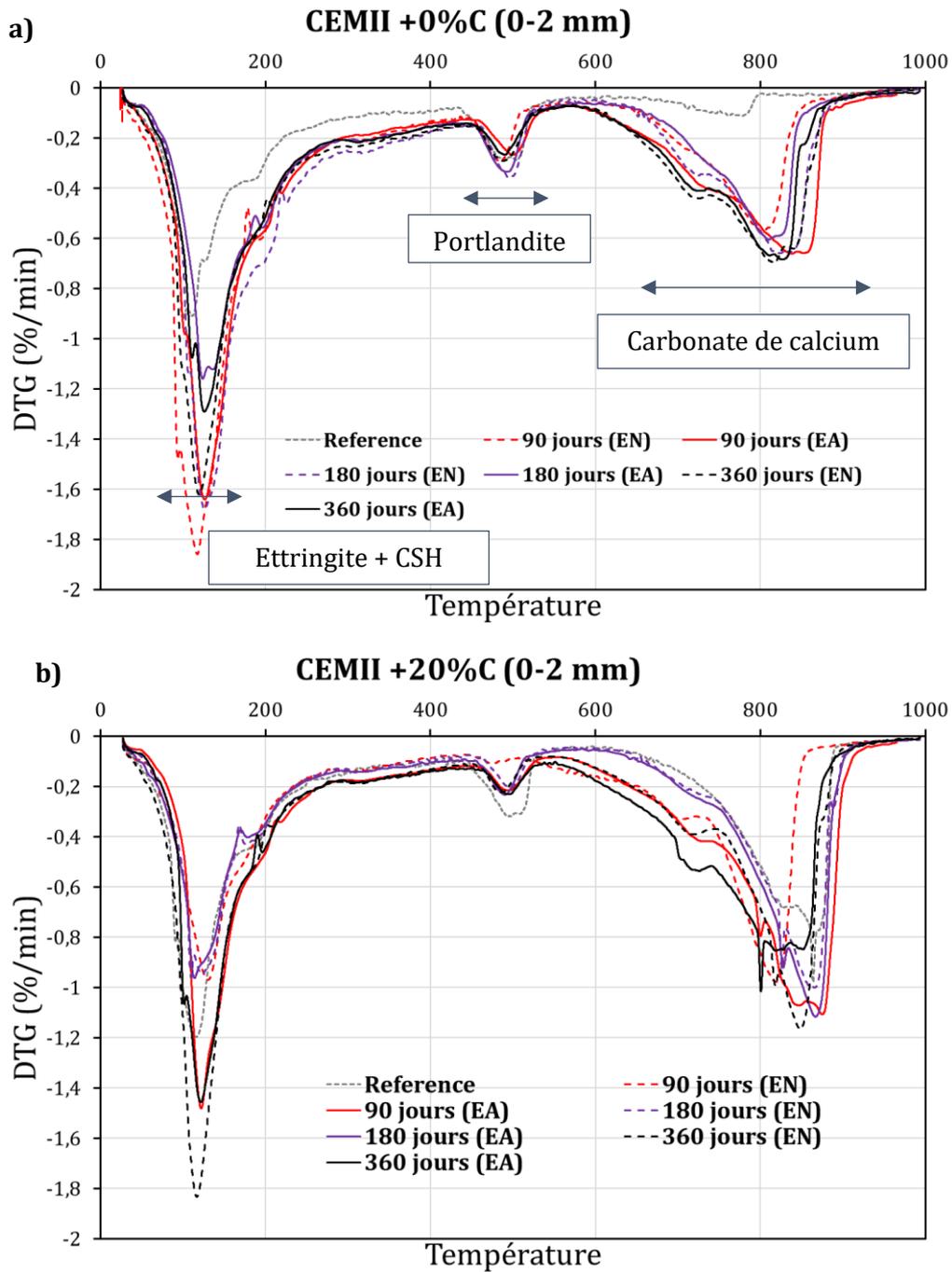


Figure 87. Courbes DTG (%/min) de bétons CEMII +0%C et CEMII +20%C référence et immergés dans les 2 environnements étudiés (EN et EA) à 90 -180 et 360 jours à une profondeur de 0 - 2 mm

2. Profils d'ions chlorure

Les profils de pénétration des ions chlorure des bétons à différentes profondeurs dans les deux milieux étudiés (EA et EN) sont présentés par la Figure 88ab.

Après 90 jours d'immersion, les concentrations en ions chlorure dans les deux types de bétons diffèrent dès les deux premiers millimètres (Figure 88ab). En effet, nous avons une plus importante concentration en ions chlorure libres dans le béton CEMII +20%C immergé en EA avec un total de 789 mg/kg de béton que le béton CEMII +0%C avec un total de 640 mg/kg de béton. Pour tous les profils, on observe une importante concentration en ions Cl^- dès les premiers millimètres du matériau jusqu'à environ 6 mm de profondeur à partir de laquelle elle tend à se stabiliser. Les profils d'ions chlorure n'ont été réalisés que jusqu'à 10 mm de profondeur. Nous pouvons supposer qu'à des profondeurs plus importantes, la concentration en ions chlorure se rapproche des concentrations obtenues pour le béton référence.

Entre 90 et 180 jours d'immersion, les concentrations des ions Cl^- libres sont légèrement plus importantes pour les échantillons immergés en Eau de mer Naturelle (EN) (lignes pointillées) à toutes les profondeurs et ce quelle que soit la teneur en granulats coquillers des échantillons. Il est intéressant de rappeler qu'à 90 jours *in situ*, le béton n'était pas colonisé à cause de la sédimentation. Or nous avons observé une augmentation de la pénétration des ions chlorure sur ces échantillons par rapport aux échantillons immergés en eau de mer artificielle. Ainsi on peut en déduire que ce sont les conditions environnementales *in situ* qui ont favorisé la diffusion des ions Cl^- .

La carbonatation observée sur les échantillons de bétons peut également libérer les ions chlorure liés, ce qui augmente potentiellement la concentration d'ions chlorure libres pouvant diffuser plus profondément dans le matériau (Wan et al., 2013).

A 180 jours d'immersion, la concentration en ions chlorure libres dans la matrice est plus élevée dans l'eau de mer naturelle pour les deux types de bétons. Lors de la ré-immersion des échantillons dans le mésocosme à Luc sur mer (soit une durée totale d'immersion de 180 jours dans de l'eau de mer Naturelle), un biofilm s'est formé à la surface des échantillons. Dans nos résultats précédents, nous avons vu que les quantités de biomasse présentes à la surface des deux types de bétons étaient similaires (Figure 84a) à cette échéance. Nous pouvons ainsi conclure que l'installation du biofilm a rendu le béton plus perméable aux agents agressifs de l'eau de mer. La bio-colonisation fragilise la matrice cimentaire à court terme.

La présence de granulats coquillers a en revanche un effet positif sur la durabilité du matériau lorsque celui-ci est immergé puisque nous observons une plus faible concentration en ions chlorures libres dans l'échantillon étudié qu'il soit colonisé ou non. En effet, la concentration en ions chlorure libres est de 1299 mg/kg de béton pour le CEMII +0%C entre 0 et 2 mm de

profondeur contre 878 mg/kg de béton pour le CEMII +20%C en Eau de mer Naturelle. De plus, la profondeur de pénétration des ions chlorure pour le béton CEMII +0%C est plus importante que pour l'autre type de béton. Ces résultats nous permettent d'appuyer l'hypothèse que la présence de coquilles associé à la carbonatation observée dans les premiers millimètres augmente la durabilité du matériau par rapport à un béton sans coquilles. Cuadrado, (2016) a étudié l'effet de l'ajout de granulats coquilliers (pétoncle) sur la durabilité du béton. Il a montré que l'ajout de coquilles concassées peut diminuer l'action des agents agressifs du milieu marin en raison du caractère imperméable des pores engendrés par les substances organiques solubles des coquilles concassées.

Pour le béton CEMII +20%C l'écart relatif est négatif entre 90 et 180 jours d'immersion. L'échantillon CEMII +20%C une fois colonisé (à 180 jours), voit la concentration en ions chlorure libres réduite par rapport à 90 jours.

Au cours du temps, la pénétration des ions chlorure dans le béton immergé dans l'eau de mer artificielle (EA) tend à augmenter. Cette augmentation est plus importante à 360 jours avec un total de 2431 mg/kg de béton pour le CEMII +0%C et 1585 mg/kg de béton pour le CEMII +20%C.

Le béton coquillier (Figure 88b) est cependant plus résistant en environnement EA à toutes les échéances puisque dans les premiers millimètres la pénétration des ions chlorure est réduite de moitié jusqu'à des concentrations similaires au béton non coquillier vers les 10 mm de profondeur.

A 360 jours d'immersion en eau de mer naturelle, le biofilm s'est cette fois plus développé sur la surface du béton CEMII +0%C. La diffusion des ions chlorure a pu être stoppée par le biofilm puisque leur pénétration est plus faible en profondeur pour le béton CEMII +0%C (<400 mg/kg de béton entre 8 et 10 mm de profondeur) que pour le béton CEMII +20%C (>600 mg/kg de béton entre 8 et 10 mm de profondeur). Concernant le béton CEMII +20%C, nous pouvons faire l'hypothèse que si la colonisation à sa surface était plus importante (Figure 84) nous aurions une résistance plus accrue face aux agents agressifs de l'eau de mer.

Les auteurs AL-Ameeri et al., (2021) et Lee et al., (2014), ont montré que la carbonatation pouvait accélérer la pénétration des ions chlorure au sein de la matrice en favorisant la libération des ions chlorure liés suite à la décomposition du sel de Friedel et/ou la décomposition du gel de C-S-H (Geng et al., 2015).

De plus, la lixiviation de la portlandite et la décalcification des C-S-H augmentent la porosité du béton. Ce phénomène peut expliquer les résultats obtenus pour les deux types de béton CEMII immergés uniquement dans l'eau de mer artificielle (EA).

En Eau de mer Naturelle, l'accumulation de biofilm sur le long terme joue un rôle de barrière protectrice contre l'action des ions chlorure et réduit donc la concentration en ions Cl⁻ libres dans

la matrice. Shuying and Xiaoning, 2018 ont également pu observer que le biofilm actif (vivant) était plus résistant à la perméabilité des ions chlorure.

Ainsi la bio-colonisation du béton a un effet protecteur puisqu'elle va le rendre plus résistant à la pénétration des ions chlorure sur le long terme et ceux dès les premiers millimètres de la matrice.

D'autres études (Chlayon et al., 2018, 2020; Coombes et al., 2013, 2017; La Marca et al., 2015) ont montré qu'à long terme, la diffusion des ions chlorure est moins importante lorsque le matériau est recouvert à sa surface de nombreux organismes sessiles. Ces résultats concernent principalement des matériaux immergés dans la zone intertidale, ce qui n'est pas le cas dans notre étude. Néanmoins, les larves d'huîtres sécrètent un ciment biologique (protéines adhésives bio-organiques à base de calcaire) pour se fixer à la surface d'un matériau (Perdomo et al., 2018). Cette sécrétion peut avoir un effet protecteur sur le matériau en limitant la pénétration des ions chlorure. D'où l'importance de créer des matériaux bio-réceptifs pour ces espèces.

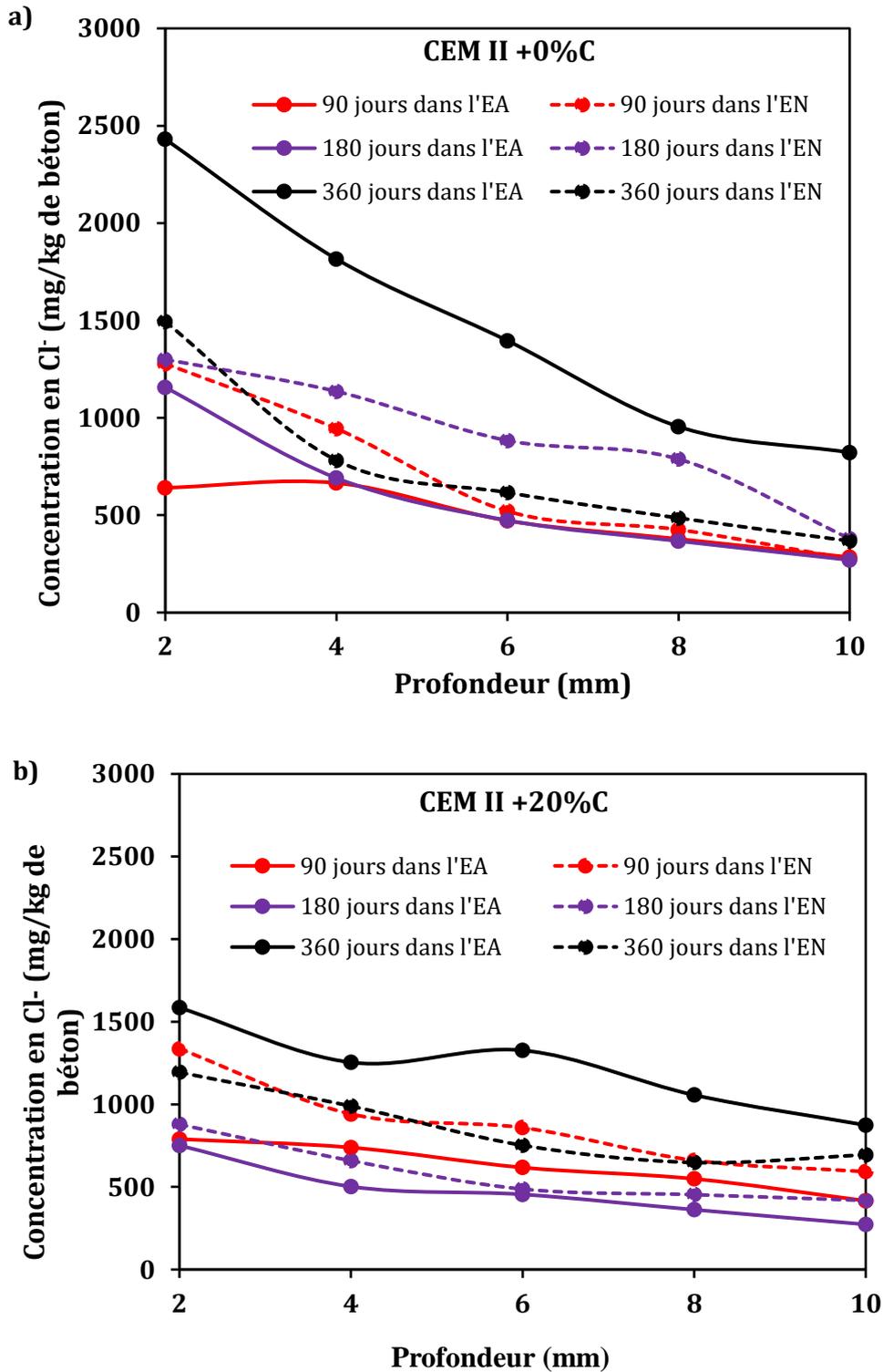


Figure 88. Profils de pénétration des ions chlorure libres des échantillons jusqu'à 10 mm de profondeur, par rapport aux temps d'immersion dans de l'eau de mer artificielle (EA) (ligne pleine) dans de l'eau de mer naturelle (EN) (ligne pointillée) pour le béton CEM II +0%C (a) et le béton CEMII +20%C (b)

3. Variation du pH

Lorsque le béton est immergé en mer celui-ci va subir de nombreuses agressions dues à la différence de pH entre l'eau de mer et sa matrice cimentaire (pH alcalin). En effet, le pH de l'eau de mer naturelle provenant du mésocosme est de 7,6 et celui de l'eau de mer artificielle est d'environ 8,0.

La Figure 89 montre les variations du pH des deux formulations de béton à différentes profondeurs au cours de leurs immersions dans les 2 milieux salés.

Après 90 jours de cure, le béton a un pH de 12,3. Les résultats obtenus montrent qu'après immersion ce pH va progressivement diminuer à des valeurs plus basiques. A 90 jours d'immersion, les deux types de béton ont une matrice dont le pH est plus faible lorsqu'il est immergé *in situ* que dans l'eau de mer artificielle. Après 180 jours d'immersion, le pH continue de diminuer dans les deux types de béton quand il est immergé dans le milieu EA passant par exemple de 12,22 (90 jours d'immersion) à 11,5 (180 jours d'immersion) pour le béton CEMII +20%C. La diminution du pH est en revanche moins importante lorsque les bétons sont bio-colonisés.

En revanche, la diminution du pH est plus importante à long terme (360 jours) lorsque le matériau est bio-colonisé. A cette échéance, le béton est plus résistant à la pénétration des ions chlorure (Figure 88ab). De plus, on observe les mêmes variations de pH pour les deux types de béton malgré que la biomasse soit plus importante sur le béton CEMII +0%C que le béton CEMII +20%C (Figure 84a). La réduction du pH en surface a permis aux espèces marines de se fixer et de se développer sur les échantillons. L'activité métabolique de certaines micro-algues a pu accélérer la diminution du pH jusqu'à 10 mm de profondeur.

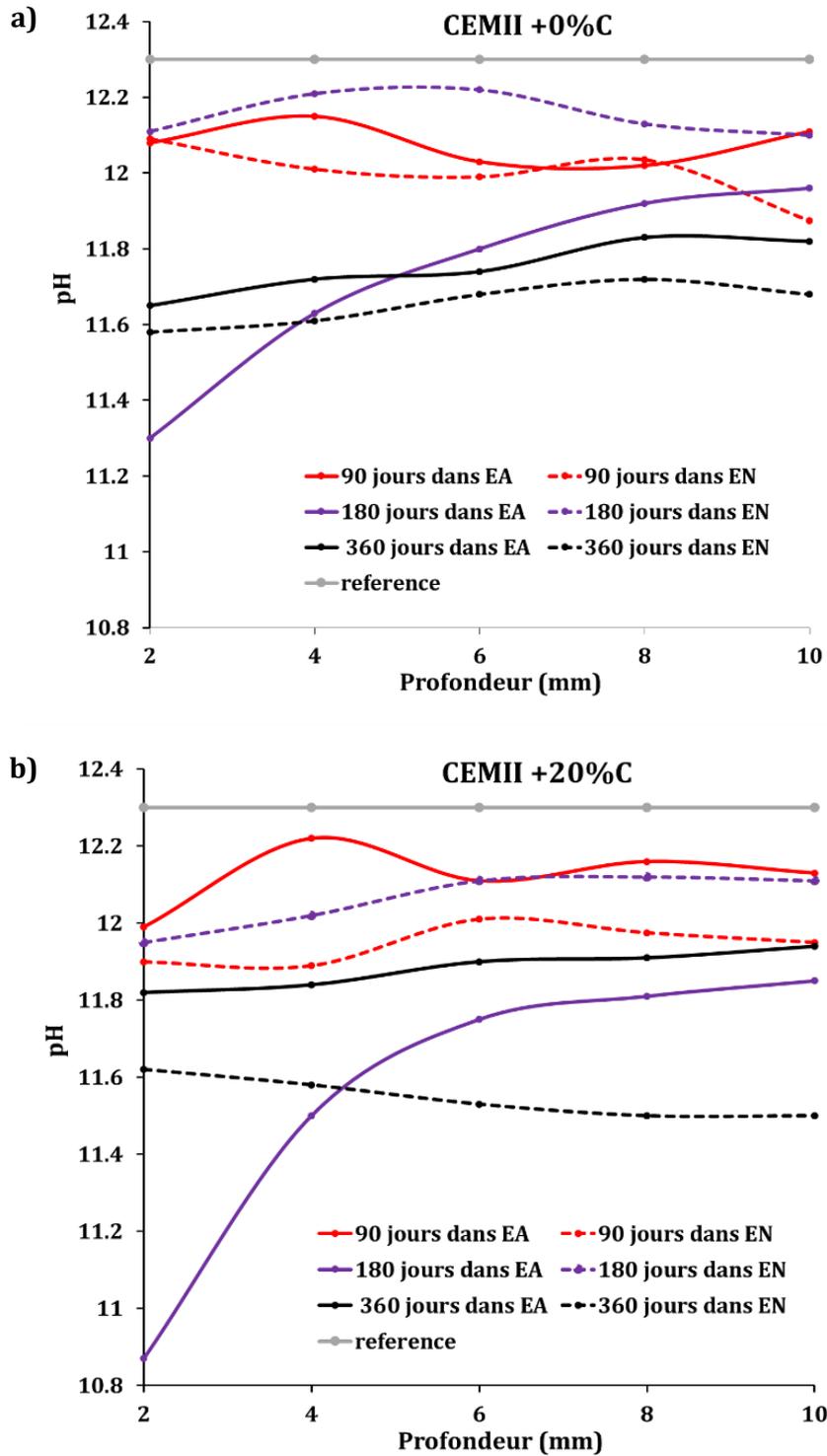


Figure 89. Variation du pH du béton CEMII +0%C (a) et CEMII +20%C (b) obtenue à partir du lixiviat de la matrice cimentaire à différentes profondeurs dans l'eau de mer naturelle (EN) et l'eau de mer artificielle (EA) après 90, 180 et 360 jours d'immersion

Conclusion :

L'objectif principal de cette étude était d'étudier l'influence de la substitution de granulats minéraux par des granulats coquilliers sur la durabilité du béton suite à son immersion dans un environnement marin. Ces résultats ouvrent la voie à une meilleure compréhension des liens entre les propriétés du béton (composition, durabilité, ...) et son milieu d'immersion (eau de mer artificielle et eau de mer naturelle). Il en ressort que, l'ajout des granulats coquilliers a eu un effet sur la durabilité et la résistance mécaniques des bétons.

Le suivi des paramètres photosynthétiques des biofilms et de leur biomasse à la surface des matériaux a montré une meilleure acclimatation du microphytobenthos sur le substrat CEMII +20%C que sur le béton CEMII +0%C malgré une colonisation plus faible sur ce béton.

La présence de granulats coquilliers a réduit considérablement la résistance du matériau après 90 jours de cure. Les résistances mécaniques des deux types de béton augmentent lorsqu'ils sont immergés en environnement marin. La carbonatation pourrait expliquer les résultats obtenus pour les résistances mécaniques du matériau. Ce phénomène a pu être expliqué à l'aide des analyses de la composition des deux types de bétons.

La diffusion des ions chlorure à long terme a été plus réduite lorsque les bétons étaient immergés en eau de mer naturelle que dans l'eau de mer artificielle. Nous en avons conclu qu'au cours du temps, la bio-colonisation protège le matériau cimentaire contre les ions chlorure. De plus, les facteurs biotiques et abiotiques sont différents selon la zone d'immersion et ont un impact majeur sur le matériau. L'impact des organismes sur la durabilité du béton pourrait dépendre du type d'organismes fixés à la surface de l'échantillon. Cette étude a également mis en évidence que la diffusion des ions chlorure était réduite lorsque le béton contient des granulats coquilliers.

Cette étude révèle également l'importance des essais à petite échelle et le suivi à long terme avant la conception d'infrastructures maritimes. Cette recherche a permis également de mettre en lumière l'importance de développer des matériaux conservant une bonne intégrité structurelle tout en étant bio-réceptif pour son utilisation dans la mise en œuvre d'infrastructures côtières ou de récifs artificiels.

Pour conclure, le béton CEMII +20%C est la formulation de béton la plus appropriée pour la fabrication d'infrastructures marines, en particulier si elles doivent contenir des armatures car ce type de béton limite la diffusion des ions chlorure au sein de sa matrice.

Conclusion générale et perspectives

L'objectif de ce travail porte sur les interactions entre les matériaux cimentaires et les micro-organismes marins. Des expériences en laboratoire et en mésocosme ont été réalisées sur deux matériaux : le mortier et le béton. L'interaction du mortier avec une diatomée pennée (*C. closterium*) a été particulièrement étudiée.

Les dispositifs expérimentaux réalisés en laboratoire, en mésocosme et *in situ* ont montré que les matériaux cimentaires (mortier ou béton) sont rapidement colonisés par des micro-algues. Le dispositif mis en place en laboratoire a permis de maintenir le développement et le bon état physiologique du biofilm. Les conditions environnementales du milieu jouent un rôle primordial sur l'activité photosynthétique du biofilm (température, lumière, sels nutritifs) et peut impacter le comportement du biofilm à la surface du matériau cimentaire.

L'interaction entre le mortier et la diatomée *C. closterium* dans un milieu limité en silicium a été étudié dans le but de suivre la cinétique de croissance des diatomées suite à la dissolution de la silice provenant du mortier. Il en résulte que les diatomées sont capables de synthétiser leur frustule à partir de la silice dissoute provenant du mortier. Ces dernières vont modifier leur traits morphologiques, leur degré de silicification et leurs paramètres photosynthétiques en fonction de la disponibilité en silice dissoute dans le milieu.

L'évolution à long terme de la composition et de la microstructure du mortier suite aux interactions chimiques et biologiques ont été évaluées par analyses thermogravimétriques, MEB/EDS, DRX et Raman. Ces dernières ont permis de suivre les modifications engendrées dans le mortier par l'eau de mer et le développement du biofilm. Il a été démontré que le mortier va rapidement former des carbonates de calcium une fois immergé. Cependant, la forme des carbonates de calcium varie suivant que le mortier soit bio-colonisé ou non. L'aragonite est la forme majoritaire en surface lorsque le mortier est immergé uniquement en eau de mer artificielle atteignant un total de 63 % après 360 jours. La calcite ainsi que la calcite magnésienne sont majoritairement présentes lorsque le biofilm se développe à la surface du matériau cimentaire avec respectivement 30,5 % et 28,3 % pour le mortier immergé en eau de mer naturelle après 360 jours. Ces résultats ont permis de mettre en avant l'impact de la présence des diatomées sur la concentration en magnésium dans le milieu. En effet, ces dernières sont capables d'utiliser cet élément comme nutriment pour leur croissance. Elles ont donc pu être à l'origine des formes de carbonates présentes à la surface du mortier. Nous avons également pu émettre l'hypothèse que le microphytobenthos est capable d'accélérer la lixiviation de la portlandite du mortier jusqu'à 10 mm de profondeurs après 360 jours avec une diminution de 32 %. Le calcium libéré au cours de ce phénomène a pu être assimilé par les micro-organismes constituant le biofilm.

L'influence de la composition du béton sur sa durabilité et ses résistances mécaniques à long terme suite à sa bio-colonisation ont été essentiellement étudiées via la substitution de granulats minéraux par des granulats coquilliers. D'après cette étude le béton coquillier s'est avéré être le matériau le plus adapté pour son utilisation dans la construction d'infrastructures maritimes. La diffusion des ions chlorure au sein du béton a été modifiée suite au développement du biofilm à sa surface. En effet, ce dernier a permis à long terme de réduire la pénétration des ions chlorure libres au sein du béton. Cette tendance a été aussi observée pour le mortier. La matrice extracellulaire sécrétée par le biofilm a pu jouer un rôle barrière. Par ailleurs, la carbonatation du matériau a pu avoir des effets bénéfiques sur les propriétés mécaniques et sur les propriétés de transfert du matériau cimentaire.

Nos études ont permis de mettre en évidence les apports mutuels existants entre le microphytobenthos et les matériaux cimentaires suite à leurs interactions. L'impact de la bio-colonisation sur la composition et la microstructure d'un matériau cimentaire a été qualifié et quantifié jusqu'à 10 mm de profondeur contrairement à un mortier non colonisé où l'impact de la composition de l'eau de mer n'a été principalement observé que dans les deux premiers millimètres. La lixiviation ou la formation de nouvelles phases a permis à long terme de favoriser les échanges entre le mortier et le biofilm. En effet, le matériau cimentaire peut servir de source de nutriments pour les micro-algues puisque ces dernières ont été capables d'assimiler le silicium, le calcium et le magnésium provenant de la lixiviation du matériau cimentaire. De plus, le développement du biofilm à la surface du matériau cimentaire l'a protégé à long terme contre la diffusion des ions chlorure et a amélioré ces résistances mécaniques.

L'intérêt aujourd'hui serait de favoriser le développement d'un biofilm sur un substrat artificiel puisqu'à long terme cette association s'est avérée bénéfique pour les deux.

Plusieurs études sont encore nécessaires pour approfondir ces problématiques permettant à long terme de réduire considérablement les impacts écologiques des structures artificielles sur les écosystèmes marins. Ainsi, plusieurs perspectives peuvent être dégagées. En effet, il serait intéressant de :

- Suivre la durabilité et les propriétés mécaniques du béton à plus long terme. Dans nos études, nous n'avons été que jusqu'à 1 an d'immersion alors que les structures artificielles sont faites pour rester immergées plus d'une dizaine d'années.
- Etudier les EPS responsables de l'adhésion des cellules algales afin de comprendre leurs interactions avec les composés des matériaux cimentaires.
- Compléter les connaissances des effets d'autres diatomées sur les matériaux cimentaires et des bénéfiques qu'ils peuvent s'apporter mutuellement.

- Poursuivre les expérimentations *in situ* afin de se rapprocher au mieux de l'initiation du biofilm. Le déploiement d'échantillons dans des zones de forts marnages seraient également intéressant à étudier car celles-ci présentent d'autres types d'agressions biologiques et physiques du milieu marin.
- Poursuivre les investigations après installation d'organismes marins sessiles (huitres, balanes, etc.) afin d'observer l'impact du nouveau réseau trophique sur les structures artificielles.

Bibliographie

Affan, A., Heo, H.J., Jeon, Y.J., and Lee, J.B. (2009). Optimal growth conditions and antioxidative activities of *Cylindrotheca closterium* (bacillariophyceae)(1). *J. Phycol.* 45, 1405-1415.

AL-Ameeri, A.S., Rafiq, M.I., and Tsioulou, O. (2021). Combined impact of carbonation and crack width on the Chloride Penetration and Corrosion Resistance of Concrete Structures. *Cem.Concr.Comp* 115, 103819.

Alverson, A.J., Beszteri, B., Julius, M.L., and Theriot, E.C. (2011). The model marine diatom *Thalassiosira pseudonana* likely descended from a freshwater ancestor in the genus *Cyclotella*. *BMC Evol. Biol.* 11, 125.

Aminot A. et K erouel R. (2007), Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines, méthodes en flux continu, Edition QUAE, 187p

Ammar, Y., Swailes, D., Bridgens, B., and Chen, J. (2015). Influence of surface roughness on the initial formation of biofilm. *Surf. Coat. Technol.* 284, 410–416.

Amo, Y.D., and Brzezinski, M.A. (1999). The chemical form of dissolved si taken up by marine diatoms. *J. Phycol.* 35, 1162–1170.

Anderson, M.J., and Underwood, A.J. (1994). Effects of substratum on the recruitment and development of an intertidal estuarine fouling assemblage. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 184, 217–236.

Armbrust, E.V., Berges, J.A., Bowler, C., Green, B.R., Martinez, D., Putnam, N.H., Zhou, S., Allen, A.E., Apt, K.E., Bechner, M., et al. (2004). The Genome of the Diatom *Thalassiosira Pseudonana*: Ecology, Evolution, and Metabolism. *Science* 306, 79–86.

Atkinson, M.J., and Bingma, C. (1997). Elemental composition of commercial seasalts. *J. Aquaric. Aquat. Sci.* VIII 2 39-43.

Bastidas-Arteaga, E., Sánchez-Silva, M., Chateauneuf, A., and Silva, M.R. (2008). Coupled reliability model of biodeterioration, chloride ingress and cracking for reinforced concrete structures. *Struct. Saf.* 30, 110–129.

Battarbee, R.W., Jones, V.J., Flower, R.J., Cameron, N.G., Bennion, H., Carvalho, L., and Juggins, S. (2001). Diatoms. In *Tracking Environmental Change Using Lake Sediments: Terrestrial, Algal, and Siliceous Indicators*, J.P. Smol, H.J.B. Birks, W.M. Last, R.S. Bradley, and K. Alverson, eds. (Dordrecht: *Springer Netherlands*), pp. 155–202.

Behrenfeld, M., T. O'Malley, R., Boss, E., K. Westberry, T., Graff, J., Halsey, K., Milligan, A., Siegel, D., and Brown, M. (2016). Revaluating ocean warming impacts on global phytoplankton. *Nat. Clim. Change* Advanced Online Access.

Bergen, S.D., Bolton, S.M., and L. Fridley, J. (2001). Design principles for ecological engineering. *Ecol. Eng.* 18, 201–210.

Bernard, E., Lothenbach, B., Le Goff, F., Pochard, I., and Dauzères, A. (2017). Effect of magnesium on calcium silicate hydrate (C-S-H). *Cem. Concr. Res.* 97, 61–72.

Berner, R.A. (1975). The role of magnesium in the crystal growth of calcite and aragonite from sea water. *Geochim. Cosmochim. Acta* 39, 489–504.

Berntsson, K.M., Jonsson, P.R., Lejhall, M., and Gatenholm, P. (2000). Analysis of behavioural rejection of micro-textured surfaces and implications for recruitment by the barnacle *Balanus improvisus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 251, 59–83.

Birnin-Yauri, U.A., and Glasser, F.P. (1998). Friedel's salt, $\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})(6)(\text{Cl},\text{OH})\text{center dot } 2\text{H}_2\text{O}$: Its solid solutions and their role in chloride binding. *Cem. Concr. Res.* 28, 1713–1723.

Bier, T.H.A. (1986). Influence of Type of Cement and Curing on Carbonation Progress and Pore Structure of Hydrated Cement Pastes. *MRS Online Proc. Libr.* 85, 123.

Bonato, S. (2015). Étude de la variabilité spatiale et temporelle des communautés phytoplanctoniques en Manche Orientale - Utilisation de la cytométrie en flux de scanning. *Ecologie, Environnement. phdthesis. Université du Littoral Côte d'Opale. Français. NNT : 2015DUNK0379. tel-01337264*

Brouwer, J.F.C. de, Wolfstein, K., Ruddy, G.K., Jones, T.E.R., and Stal, L.J. (2005). Biogenic Stabilization of Intertidal Sediments: The Importance of Extracellular Polymeric Substances Produced by Benthic Diatoms. *Microb. Ecol.* 49, 501–512.

Brzezinski, M.A. (1985). The Si:C:N ratio of marine diatoms: interspecific variability and the effect of some environmental variables¹. *J. Phycol.* 21, 347–357.

Brzezinski, M., Olson, R., Chisholm, S., and Chisholm, S. (1990). Silicon Availability and Cell-Cycle Progression in Marine Diatoms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 67, 83–96.

Buenfeld, N. R., and Newman, J. B. (1984). The Permeability of Concrete in a Marine Environment, *Magazine of Concrete Research*, V. 36, No. 127, pp. 67-80.

Buenfeld, N.R., and Newman, J.B. (1986). The development and stability of surface layers on concrete exposed to sea-water. *Cem. Concr. Res.* 16, 721–732.

Bullard, J.W., Jennings, H.M., Livingston, R.A., Nonat, A., Scherer, G.W., Schweitzer, J.S., Scrivener, K.L., and Thomas, J.J. (2011). Mechanisms of cement hydration. Conf Spec Cem Hydration Kinet Model Quebec City 2009 CONMOD10 Lausanne 41, 1208–1223.

Capellacci, S., Battocchi, C., Casabianca, S., Giovine, M., Bavestrello, G., and Penna, A. (2013). Bioavailability of different chemical forms of dissolved silica can affect marine diatom growth. *Mar. Ecol.* 34, 103–111. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.2012.00529.x>

Caglioti, G., Paoletti, A., and Ricci, F.P. (1958). Choice of collimators for a crystal spectrometer for neutron diffraction. *Nucl. Instrum.* 3, 223–228.

Chang, H. (2017). Chloride binding capacity of pastes influenced by carbonation under three conditions. *Cem. Concr. Compos.* 84, 1–9.

Chateigner, D., Hedegaard, C., and Wenk, H.-R. (2000). Mollusc shell microstructures and crystallographic textures. *J. Struct. Geol.* 22, 1723–1735.

Chaussadent, T. (1999). Etat des lieux et réflexions sur la carbonatation du béton armé. Etudes et Recherches des Laboratoires des Ponts et Chaussées. Laboratoire Central des Ponts et Chaussées.

Cheng, S., Shui, Z., Gao, X., Yu, R., Sun, T., Guo, C., and Huang, Y. (2020). Degradation mechanisms of Portland cement mortar under seawater attack and drying-wetting cycles. *Constr. Build. Mater.* 230, 116934.

Chlayon, T., Iwanami, M., and Chijiwa, N. (2018). Combined protective action of barnacles and biofilm on concrete surface in intertidal areas. *Constr. Build. Mater.* 179, 477–487.

Chlayon, T., Iwanami, M., and Chijiwa, N. (2020). Impacts from concrete microstructure and surface on the settlement of sessile organisms affecting chloride attack. *Constr. Build. Mater.* 239, 117863.

Claquin, P., Probert, I., Lefebvre, S., and Veron, B. (2008). Effects of temperature on photosynthetic parameters and TEP production in eight species of marine microalgae. *Aquat. Microb. Ecol.* 51, 1–11.

Claquin, P., Leynaert, A., Sferratore, A., Garnier, J., and Ragueneau, O. (2006). Physiological ecology of diatoms along the river–sea continuum: Diatom ecophysiology along the aquatic continuum from river to ocean. In: Ittekkot V, Unger D, Humborg C, Tac An N (eds.) *The Silicon Cycle: Human Perturbations and Impacts on Aquatic Systems*. SCOPE 66. Island Press, Washington DC. 121–138.

Claquin, P., Martin-Jézéquel, V., Kromkamp, J.C., Veldhuis, M.J.W., and Kraay, G.W. (2002). Uncoupling of Silicon Compared with Carbon and Nitrogen Metabolisms and the Role of the Cell

Cycle in Continuous Cultures of *Thalassiosira Pseudonana* (bacillariophyceae) Under Light, Nitrogen, and Phosphorus Control. *J. Phycol.* 38, 922–930.

Coles, J.F., and Jones, R.C. (2000). Effect of temperature on photosynthesis-light response and growth of four phytoplankton species isolated from a tidal freshwater river. *J. Phycol.* 36, 7–16.

Coombes, M.A., Naylor, L.A., Viles, H.A., and Thompson, R.C. (2013). Bioprotection and disturbance: Seaweed, microclimatic stability and conditions for mechanical weathering in the intertidal zone. *Geomorphology* 202, 4–14.

Coombes, M.A., La Marca, E.C., Naylor, L.A., and Thompson, R.C. (2015). Getting into the groove: Opportunities to enhance the ecological value of hard coastal infrastructure using fine-scale surface textures. *Ecol. Eng.* 77, 314–323.

Coombes, M.A., Viles, H.A., Naylor, L.A., and La Marca, E.C. (2017). Cool barnacles: Do common biogenic structures enhance or retard rates of deterioration of intertidal rocks and concrete? *Sci. Total Environ.* 580, 1034–1045.

Cooper, S.P., Finlay, J.A., Cone, G., Callow, M.E., Callow, J.A., and Brennan, A.B. (2011). Engineered antifouling microtopographies: kinetic analysis of the attachment of zoospores of the green alga *Ulva* to silicone elastomers. *Biofouling* 27, 881–891.

Costerton, J.W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., and James, G. (1994). Biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriol.* 176, 2137–2142.

Costa, A and Appleton, J. (1999). Chloride penetration into concrete in marine environment - Part I: Main parameters affecting chloride penetration *Materials and Structures/MaMriaux et Constructions*, Vol. 32, pp 252-259

Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., and Lappin-Scott, H.M. (1995). Microbial Biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711–745.

Crisp, D.J., and Barnes, H. (1954). The Orientation and Distribution of Barnacles at Settlement with Particular Reference to Surface Contour. *J. Anim. Ecol.* 23, 142–162.

Cuadrado H.R., Boutouil, M., Boudart, B., Claquin, P., and Leroy, F. (2016). Colonisation et détérioration des bétons incorporant des coquilles pour récifs artificiels. *Matér. Tech.* 104, 503.

Cupp, E.E. (1943). Marine plankton diatoms of the west coast of North America. *Bull. Scripps Inst. Oceanog. Univ. Calif.* 5:1-238

Cwalina, B. (2008). Biodeterioration of concrete. *Archit. Civ. Eng. Environ.* Vol. 1, 133–140.

Dassow, P.V., Chepurnov, V.A., and Armbrust, E.V. (2006). Relationships Between Growth Rate, Cell Size, and Induction of Spermatogenesis in the Centric Diatom *Thalassiosira Weissflogii* (bacillariophyta). *J. Phycol.* 42, 887–899.

Dauta, A. (1982). Conditions de développement du phytoplancton. Etude comparative du comportement de huit espèces en culture. II. Rôle des nutriments: assimilation et stockage intracellulaire. *Ann. Limnol.* 18, 263–292.

Del Amo, Y., and Brzezinski, M.A. (1999). The Chemical Form of Dissolved Si Taken up by Marine Diatoms. *J. Phycol.* 35, 1162–1170.

Del Amo, Y., Quéguiner, B., Tréguer, P., Breton, H., and Lampert, L. (1997). Impacts of high-nitrate freshwater inputs on macrotidal ecosystems. II. Specific role of the silicic acid pump in the year-round dominance of diatoms in the Bay of Brest (France). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 161, 225–237.

Dennis, H.D., Evans, A.J., Banner, A.J., and Moore, P.J. (2018). Reefcrete: Reducing the environmental footprint of concretes for eco-engineering marine structures. *Ecol. Eng.* 120, 668–678.

Dent Glasser, L.S and Kataoka, N. (1981). The chemistry of alkali-aggregate reaction. *Cement Concrete Res* 11(1):1–9

De Muynck, W., Ramirez, A.M., De Belie, N., and Verstraete, W. (2009). Evaluation of strategies to prevent algal fouling on white architectural and cellular concrete. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 63, 679–689.

De Weerd, K., Justnes, H., and Geiker, M.R. (2014). Changes in the phase assemblage of concrete exposed to sea water. *Cem. Concr. Compos.* 47, 53–63.

De Weerd, K., Lothenbach, B., and Geiker, M.R. (2019). Comparing chloride ingress from seawater and NaCl solution in Portland cement mortar. *Cem. Concr. Res.* 115, 80–89.

Decho, A.W. (2000). Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Cont. Shelf Res.* 20, 1257–1273.

Dove, P.M., (1994). The dissolution kinetics of quartz in sodium chloride solutions at 25 degrees to 300 degrees. *C. Am. J. Sci.* 294, 665–712

Drouet, E. (2010). Impact de la température sur la carbonatation des matériaux cimentaires : prise en compte des transferts hydriques. phdthesis. École normale supérieure de Cachan - ENS Cachan.

Dubosc, A., Escadeillas, G., and Blanc, P.J. (2001). Characterization of biological stains on external concrete walls and influence of concrete as underlying material. *Cem. Concr. Res.* 31, 1613–1617.

Dugdale, R.C., Wilkerson, F.P., and Minas, H.J. (1995). The role of a silicate pump in driving new production. *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.* 42, 697–719.

Dyson, K., and Yocom, K. (2015). Ecological design for urban waterfronts. *Urban Ecosyst.* 18, 189–208.

Edwards, H.G.M., Villar, S.E.J., Jehlicka, J., and Munshi, T. (2005). FT-Raman spectroscopic study of calcium-rich and magnesium-rich carbonate minerals. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 61, 2273–2280.

Edwards, K.F., Thomas, M.K., Klausmeier, C.A., and Litchman, E. (2016). Phytoplankton growth and the interaction of light and temperature: A synthesis at the species and community level. *Limnol. Oceanogr.* 61, 1232–1244.

El Mendili, Y., Vaitkus, A., Merkys, A., Gražulis, S., Chateigner, D., Mathevet, F., Gascoin, S., Petit, S., Bardeau, J.-F., Zanatta, M., et al. (2019). Raman Open Database: first interconnected Raman–X-ray diffraction open-access resource for material identification. *J. Appl. Crystallogr.* 52, 618–625.

Erdogan, A., Demirel, Z., Dalay, M.C. and Eroglu, A.E. (2016). Fucoxanthin content of *Cylindrotheca closterium* and its oxidative stress mediated enhancement. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 16, 491-498.

Falkowski, P.G., Raven, J.A., (1997). Aquatic photosynthesis. Blackwell Science, Malden, USA

Ferrero, M.-A. (2018). Colonisation et biodétérioration des bétons en milieu marin : mise au point d'essais en laboratoire et influence de la composition chimique du matériau cimentaire. phdthesis. Normandie Université.

Firth, L.B., Thompson, R.C., Bohn, K., Abbiati, M., Airoidi, L., Bouma, T.J., Bozzeda, F., Ceccherelli, V.U., Colangelo, M.A., Evans, A., et al. (2014). Between a rock and a hard place: Environmental and engineering considerations when designing coastal defence structures. *Coast. Eng.* 87, 122–135.

Firth, L.B., Browne, K.A., Knights, A.M., Hawkins, S.J., and Nash, R. (2016). Eco-engineered rock pools: a concrete solution to biodiversity loss and urban sprawl in the marine environment. *Environ. Res. Lett.* 11, 094015.

Fukao, T., Kimoto, K., and Kotani, Y. (2010). Production of transparent exopolymer particles by four diatom species. *Fish. Sci.* 76, 755–760.

Garbev, K., Stemmermann, P., Black, L., Breen, C., Yarwood, J., and Gasharova, B. (2007). Structural Features of C–S–H(I) and Its Carbonation in Air—A Raman Spectroscopic Study. Part I: Fresh Phases. *J. Am. Ceram. Soc.* 90, 900–907.

Geider, R., and Roche, J.L. (2002). Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *Eur. J. Phycol.* 37, 1–17.

Geng, J., Easterbrook, D., Liu, Q.-F., and Li, L.-Y. (2015). Effect of carbonation on release of bound chlorides in chloride-contaminated concrete. *Mag. Concr. Res.* 68, 353–363.

Genty, B., Briantais, J-M, Baker, NR. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* 990(1):87–92.

Ghafoori, N., Diawara, H., and Beasley, S. (2008). Resistance to external sodium sulfate attack for early-opening-to-traffic Portland cement concrete. *Cem. Concr. Compos.* 30, 444–454.

Giannantonio, D.J., Kurth, J.C., Kurtis, K.E., and Sobecky, P.A. (2009). Effects of concrete properties and nutrients on fungal colonization and fouling. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 63, 252–259.

Glasser, F.P., Kindness, A., and Stronach, S.A. (1999). Stability and solubility relationships in AFm phases: Part I. Chloride, sulfate and hydroxide. *Cem. Concr. Res.* 29, 861–866.

Graham, P.M., Palmer, T.A., and Pollack, J.B. (2017). Oyster reef restoration: substrate suitability may depend on specific restoration goals. *Restor. Ecol.* 25, 459–470.

Gražulis, S., Daškevič, A., Merkys, A., Chateigner, D., Lutterotti, L., Quirós, M., Serebryanaya, N.R., Moeck, P., Downs, R.T., and Le Bail, A. (2012). Crystallography Open Database (COD): an open-access collection of crystal structures and platform for world-wide collaboration. *Nucleic Acids Res.* 40, D420–D427.

Guilbeau, B., Harry, F., Gambrell, R., Knopf, F., Dooley, K. (2003). Algae attachment on carbonated cements in fresh and brackish waters-preliminary results. *Ecol. Eng.* 20, 309-319

Guillon, E. (2004). Durabilité des matériaux cimentaires : modélisation de l'influence des équilibres physico-chimiques sur la microstructure et les propriétés mécaniques résiduelles. Mécanique[physics.med-ph]. École normale supérieure de Cachan - ENS Cachan. Français.

Guillitte, O. (1995). Bioreceptivity: a new concept for building ecology studies. *Sci. Total Environ.* 167, 215–220.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., and Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 95–108.

Hamm, C.E., Merkel, R., Springer, O., Jurkojc, P., Maier, C., Prechtel, K., and Smetacek, V. (2003). Architecture and material properties of diatom shells provide effective mechanical protection. *Nature* 421, 841–843.

- Hanlon, N., Firth, L.B., and Knights, A.M. (2018). Time-dependent effects of orientation, heterogeneity and composition determines benthic biological community recruitment patterns on subtidal artificial structures. *Ecol. Eng.* 122, 219–228.
- Hayek M., Salgues M., Habouzit F., Bayle S., Souche J.-C., De Weerd K., and Pioch S. (2020a). La bioréceptivité de matériaux cimentaires dans l'eau de mer : mécanismes, facteurs agissants et conséquences. *Revue Paralia*, Vol. 13, pp n03.1–n03.22.
- Hayek, M., Salgues, M., Habouzit, F., Bayle, S., Souche, J.-C., Weerd, K.D., and Pioch, S. (2020b). L'influence de la carbonatation sur la biocolonisation de matériaux cimentaires dans le milieu marin. *Matériaux & Techniques* 108, 202.
- Hayek, M., Salgues, M., Souche, J.-C., Cunge, E., Giraudel, C., and Paireau, O. (2021). Influence of the Intrinsic Characteristics of Cementitious Materials on Biofouling in the Marine Environment. *Sustainability*. 13, 2625.
- Haynes, H. H., (1980). Permeability of concrete in sea water, in ACI SP-65, Proceedings of the International Conference on Performance of Concrete in Marine Environment, St. Andrews by-the-sea, Canada, 21–38.
- Hedegaard, C., Bardeau, J.-F., and Chateigner, D. (2006). Molluscan shell pigments: an in-situ resonance raman study. *J. Molluscan Stud.* 72, 157–162.
- Heintze, C., Formanek, P., Pohl, D., Hauptstein, J., Rellinghaus, B., and Kröger, N. (2020). An intimate view into the silica deposition vesicles of diatoms. *BMC Materials* 2, 11.
- Hill, A.S., and Hawkins, S.J. (1991). Seasonal And Spatial Variation of Epilithic Micro Algal Distribution and Abundance and its Ingestion By *Patella Vulgata* on A Moderately Exposed Rocky Shore. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 71, 403–423.
- Hillebrand, H., Dürselen, C.-D., Kirschtel, D., Pollinger, U., and Zohary, T. (1999). Biovolume Calculation for Pelagic and Benthic Microalgae. *J. Phycol.* 35, 403–424.
- Hildebrand, M. (2005). Silicic acid transport and its control during cell wall silicification in diatoms. pp. 171–188 in *Biomineralization of nano- and micro-structures*, edited by E.Bauerlein. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Hildebrand, M., Lerch, S.J.L and Shrestha, R.P., (2018). Understanding Diatom Cell Wall Silicification—Moving Forward. *Front. Mar. Sci.* 5.
- Hinga, K. R. (2002). Effects of pH on coastal marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 238, 281-300

- Hoagland, K.D., Rosowski, J.R., Gretz, M.R., and Roemer, S.C. (1993). Diatom Extracellular Polymeric Substances: Function, Fine Structure, Chemistry, and Physiology. *J. Phycol.* 29, 537–566.
- Howarth, R., Chan, F., Conley, D.J., Garnier, J., Doney, S.C., Marino, R., and Billen, G. (2011). Coupled biogeochemical cycles: eutrophication and hypoxia in temperate estuaries and coastal marine ecosystems. *Front. Ecol. Environ.* 9, 18–26.
- Hsiung, A.R., Tan, W.T., Loke, L.H.L., Firth, L.B., Heery, E.C., Ducker, J., Clark, V., Pek, Y.S., Birch, W.R., Ang, A.C.F., et al. (2020). Little evidence that lowering the pH of concrete supports greater biodiversity on tropical and temperate seawalls. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* ITRS.
- Huang, Y., Zheng, Y., Li, J., Liao, Q., Fu, Q., Xia, A., Fu, J., and Sun, Y. (2018). Enhancing microalgae biofilm formation and growth by fabricating microgrooves onto the substrate surface. *Bioresour. Technol.* 261, 36–43.
- Hueck, H.J. (1965). The biodeterioration of materials as a part of hylobiology, *Mate Orga*, 1, p.p. 5-34.
- Hughes, P., Fairhurst, D., Sherrington, I., Renevier, N., Morton, L.H.G., Robery, P.C., and Cunningham, L. (2013). Microscopic study into biodeterioration of marine concrete. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 79, 14–19.
- Iler, R.K. (1980). Isolation and characterization of particle nuclei during the polymerization of silicic acid to colloidal silica. *J. Colloid Interface Sci.* 75, 138–148. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(80\)90357-4](https://doi.org/10.1016/0021-9797(80)90357-4)
- Jakobsen, U.H., De Weerd, K., and Geiker, M.R. (2016). Elemental zonation in marine concrete. *Cem. Concr. Res.* 85, 12–27.
- Javaherdashti, R., Nikraz, H., Borowitzka, M., Moheimani, N., and Olivia, M. (2009). On the impact of algae on accelerating the biodeterioration/biocorrosion of reinforced concrete: A mechanistic review. *Eur. J. Sci. Res.* 36, 394–406.
- Javaheri, N., Dries, R., and Kaandorp, J. (2014). Understanding the Sub-Cellular Dynamics of Silicon Transportation and Synthesis in Diatoms Using Population-Level Data and Computational Optimization. *PLoS Comput. Biol.* 10, e1003687.
- Jayakumar S., Saravanane R. (2009) – Biodeterioration of coastal concrete structures by Macro algae - *Chaetomorpha antennina*, *Mat, Res*, 12, 4, p.p. 465-472.
- Jayakumar, S., and Saravanane, R. (2010). Biodeterioration of Coastal Concrete Structures by Marine Green Algae. *Int. J. Civ. Eng.* 8, 352–361.

- Jenkins, S.R., Arenas, F., Arrontes, J., Bussell, J., Castro, J., Coleman, R.A., Hawkins, S.J., Kay, S., Martinez, B., Oliveros, J., et al. (2001). European-scale analysis of seasonal variability in limpet grazing activity and microalgal abundance. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 211, 193–203.
- Johnson, K.A., and Goody, R.S. (2011). The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. *Biochemistry* 50, 8264–8269.
- Johnson, V.R., Brownlee, C., Rickaby, R.E.M., Graziano, M., Milazzo, M., and Hall-Spencer, J.M. (2013). Responses of marine benthic microalgae to elevated CO₂. *Mar. Biol.* 160, 1813–1824.
- Joshi, S., Goyal S., Reddy, M.S. (2018). Influence of nutrient components of media on structural properties of concrete during biocementation. *Constr. Build. Mater.*, Vol. 158, pp 601–613
- Juneau, P., Green, B.R., and Harrison, P.J. (2005). Simulation of Pulse-Amplitude-Modulated (PAM) fluorescence: Limitations of some PAM-parameters in studying environmental stress effects. *Photosynthetica* 43, 75–83.
- Jungandreas, A., Wagner, H., and Wilhelm, C. (2012). Simultaneous Measurement of the Silicon Content and Physiological Parameters by FTIR Spectroscopy in Diatoms with Siliceous Cell Walls. *Plant Cell Physiol.* 53, 2153–2162
- Kale, A., and Karthick, B. (2015). The Diatoms: Big Significance of Tiny Glass Houses. *Resonance* 20, 919–930.
- Kawabata, Y., Kato, E., and Iwanami, M. (2012). Enhanced Long-Term Resistance of Concrete with Marine Sessile Organisms to Chloride Ion Penetration. *J. Adv. Concr. Technol.* 10, 151–159.
- Kazemipour, F., Launeau, P., and Méléder, V. (2012). Microphytobenthos biomass mapping using the optical model of diatom biofilms: Application to hyperspectral images of Bourgneuf Bay. *Remote Sens. Environ.* 127, 1–13.
- Kirkpatrick, R.J., Yarger, J.L., McMillan, P.F., Ping, Y., and Cong, X. (1997). Raman spectroscopy of C-S-H, tobermorite, and jennite. *Adv. Cem. Based Mater.* 5, 93–99.
- Kolber, Z., and Falkowski, P.G. (1993). Use of active fluorescence to estimate phytoplankton photosynthesis in situ. *Limnol. Oceanogr.* 38, 1646–1665.
- Kraberg, A., Baumann, M., and Durselen, C.D. (2010). Coastal Phytoplankton: Photo Guide for Northern European Seas. Verl. Dr Friedrich Pfeil Munchen Ger. 204.
- Krauss, C., Chateigner, D., and Gil, O. (2008). Fully Inorganic Electrodeposition of Pure Aragonite Prismatic-like Textured Layers on Titanium Foils. *Crystal Growth & Design - CRYST GROWTH DES* 8.

Kröger, N., and Poulsen, N. (2009). Diatoms—From Cell Wall Biogenesis to Nanotechnology. *Annual Review of Genetics* 42, 83–107.

Kurdowski, W. (2004). The protective layer and decalcification of C-S H in the mechanism of chloride corrosion of cement paste. *Cem Concr Res*, 34. pp. 1555-1559

La Marca, E., Coombes, M., Viles, H.A., Naylor, L., Ruolo, I., Di Un, B.-P., and Biologica, I. (2015). The bio-protective role of a biological encrustation. *Biol. Mar. Mediterr.* 21 1 345-346.

Langlois, C. (2006). Diatomées. pdf

<http://step.ipgp.fr/images/a/a0/Langlois_biogeopal_TD5_FicheDiatomees.pdf> [en ligne]

Lee, M.K., Jung, S.H and Oh, B.H. (2014). Effects of carbonation on chloride penetration in concrete. *ACI Mater. J*, 111, 458–459.

Leriche, V., Sibille, P., and Carpentier, B. (2000). Use of an Enzyme-Linked Lectinsorbent Assay To Monitor the Shift in Polysaccharide Composition in Bacterial Biofilms. *Appl Env. Microbiol* 66, 1851–1856.

Leynaert, A., Longphuir, S.N., Claquin, P., Chauvaud, L., and Ragueneau, O. (2009). No limit? The multiphasic uptake of silicic acid by benthic diatoms. *Limnol. Oceanogr* 54, 571–576.

Leynaert, A., Bucciarelli, E., Claquin, P., Dugdale, R., Martin-Jezequel, V., Pondaven, P., and Ragueneau, O. (2004). Effect of Iron Deficiency on Diatom Cell Size and Silicic Acid Uptake Kinetics. *Limnol. Oceanogr* 49, 1134–1143.

Lewin, J.C. (1955). Silicicon metabolism in diatoms. *J. Gen. Physiol.* 39, 1–10.

Lors, C., Feugeas, F., Tribollet, B. (2017). Interactions Matériaux Micro-organismes : Bétons et métaux plus résistants à la biodétérioration. EDP Sciences.428p

Loste, E., Wilson, R.M., Seshadri, R., and Meldrum, F.C. (2003). The role of magnesium in stabilising amorphous calcium carbonate and controlling calcite morphologies. *J. Cryst. Growth* 254, 206–218.

Lutterotti, L., Matthies, S., Wenk, H.-R., Schultz, A.S., and Richardson, J.W. (1997). Combined texture and structure analysis of deformed limestone from time-of-flight neutron diffraction spectra. *J. Appl. Phys.* 81, 594–600.

Lv, J., Mao, J., and Ba, H. (2015a). Influence of *Crassostrea gigas* on the permeability and microstructure of the surface layer of concrete exposed to the tidal zone of the Yellow Sea. *Biofouling* 31, 61–70.

Lv, J., Mao, J., and Ba, H. (2015b). Influence of marine microorganisms on the permeability and microstructure of mortar. *Constr. Build. Mater.* 77, 33–40.

MacIntyre, H.L., Geider, R.J., and Miller, D.C. (1996). Microphytobenthos: The ecological role of the “secret garden” of unvegetated, shallow-water marine habitats. I. Distribution, abundance and primary production. *Estuaries* 19, 186–201.

Maes, M., and De Belie, N. (2014). Resistance of concrete and mortar against combined attack of chloride and sodium sulphate. *Cem. Concr. Compos.* 53, 59–72.

Manso, S., Calvo-Torras, M.Á., De Belie, N., Segura, I., and Aguado, A. (2015). Evaluation of natural colonisation of cementitious materials: Effect of bioreceptivity and environmental conditions. *Sci. Total Environ.* 512–513, 444–453.

Marquez-Peñaranda, J.F., Sanchez-Silva, M., Husserl, J., and Bastidas-Arteaga, E. (2016). Effects of biodeterioration on the mechanical properties of concrete. *Mater. Struct.* 49, 4085–4099.

Martin-Jézéquel, V., Hildebrand, M., and Brzezinski, M.A. (2000). Silicon Metabolism in Diatoms: Implications for Growth. *J. Phycol.* 36, 821–840.

Martin-Jézéquel, V., and Lopez, P.J. (2003). Silicon — a Central Metabolite for Diatom Growth and Morphogenesis. In *Silicon Biomineralization: Biology — Biochemistry — Molecular Biology — Biotechnology*, W.E.G. Müller, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 99–124.

Matschei, T., Lothenbach, B., and Glasser, F.P. (2007). The AFm phase in Portland cement. *Cem. Concr. Res.* 37, 118–130.

McManus, R.S., Archibald, N., Comber, S., Knights, A.M., Thompson, R.C., and Firth, L.B. (2018). Partial replacement of cement for waste aggregates in concrete coastal and marine infrastructure: A foundation for ecological enhancement? *Ecol. Eng.* 120, 655–667.

McNair, H.M., Brzezinski, M.A., and Krause, J.W. (2018). Diatom populations in an upwelling environment decrease silica content to avoid growth limitation. *Environmental Microbiology* 20, 4184–4193.

Nguyen Dang, D., Gascoin, S., Zanibellato, A., G. Da Silva, C., Lemoine, M., Riffault, B., Sabot, R., Jeannin, M., Chateigner, D., and Gil, O. (2017). Role of Brucite Dissolution in Calcium Carbonate Precipitation from Artificial and Natural Seawaters. *Crystal Growth & Design* 17, 1502–1513.

Mehta, P.K. (2005). *Concrete in the marine environment*. New York: Taylor & Francis.

Mehta, P.K. (1991). *Concrete in the marine environment*, London, *Elsevier Applied Science*, (Modern concrete technology series), 214 p.

- Milligan, A.J., and Morel, F.M.M. (2002). A proton buffering role for silica in diatoms. *Science* 297, 1848–1850.
- Mitsch, W.J. (2012). What is ecological engineering? *Ecol. Eng.* 45, 5–12.
- Monod, J. (1942). Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Hermann. Paris
- Mo, K.H., Alengaram, U.J., Jumaat, M.Z., Lee, S.C., Goh, W.I., and Yuen, C.W. (2018). Recycling of seashell waste in concrete: A review. *Constr. Build. Mater.* 162, 751–764.
- Moore, C.M., Mills, M.M., Arrigo, K.R., Berman-Frank, I., Bopp, L., Boyd, P.W., Galbraith, E.D., Geider, R.J., Guieu, C., Jaccard, S.L., et al. (2013). Processes and patterns of oceanic nutrient limitation. *Nat. Geosci.* 6, 701–710.
- Morales M., Chateigner D., Lutterotti L., Ricote J. (2002). X-ray Combined QTA using a CPS applied to a ferroelectric ultrastructure. *Materials Science Forum* 408-412, 113-118
- Morandeu, A. (2013). « Carbonatation atmosphérique des systèmes cimentaires à faible teneur en portlandite ». Thèse, Université Paris Est.
- Morel, F.M.M., Milligan, A.J., and Saito, M.A. (2003). Marine Bioinorganic Chemistry: The Role of Trace Metals in the Oceanic Cycles of Major Nutrients. *Treatise Geochem.* 6, 625.
- Morelle, J., Schapira, M., Françoise, S., Courtay, G., Orvain, F., and Claquin, P. (2018). Dynamics of exopolymeric carbon pools in relation with phytoplankton succession along the salinity gradient of a temperate estuary (France). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 209, 18–29.
- Moriceau, B., Garvey, M., Passow, U., and Ragueneau, O. (2007). Evidence for reduced biogenic silica dissolution rates in diatom aggregates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 333, 129–142.
- Moriceau, B., Laruelle, G.G., Passow, U., Van Cappellen, P., and Ragueneau, O. (2014). Biogenic silica dissolution in diatom aggregates: Insights from reactive transport modelling. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 517, 35–49.
- Mount, A.S., Wheeler, A.P., Paradkar, R.P., and Snider, D. (2004). Hemocyte-Mediated Shell Mineralization in the Eastern Oyster. *Science* 304, 297–300.
- Nandakumar, K., Matsunaga, H., and Takagi, M. (2003). Microfouling studies on experimental test blocks of steel-making slag and concrete exposed to seawater off Chiba, Japan. *Biofouling* 19, 257–267.
- Napoléon, C., Raimbault, V., Claquin, P. (2013). Influence of Nutrient Stress on the Relationships between PAM Measurements and Carbon Incorporation in Four Phytoplankton Species. *PLOS ONE* 8, e66423.

Natanzi, A.S., Thompson, B.J., Brooks, P.R., Crowe, T.P., and McNally, C. (2021). Influence of concrete properties on the initial biological colonisation of marine artificial structures. *Ecol. Eng.* 159, 106104.

Nelson, D.M., Tréguer, P., Brzezinski, M.A., Leynaert, A., and Quéguiner, B. (1995). Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: Revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Glob. Biogeochem. Cycles* 9, 359–372.

Neville, A. (1995). Chloride attack of reinforced concrete: an overview. *Mater. Struct.* 28, 63.

Newell, R.I.E., Fisher, T.R., Holyoke, R.R., and Cornwell, J.C. (2005). Influence of Eastern Oysters on Nitrogen and Phosphorus Regeneration in Chesapeake Bay, USA. In the Comparative Roles of Suspension-Feeders in Ecosystems, R.F. Dame, and S. Olenin, eds. (*Springer Netherlands*), pp. 93–120.

NF EN 196-1, Methods of testing cement — Part 1: Determination of strength, September 2016.

NF EN 12350-7 Testing fresh concrete - Part 7: air content - Pressure methods, June 2019.

NF EN 12350-2, Testing fresh concrete — Part 2: Slump test, June 2019.

NF EN 1008, Mixing water for concrete — Specification for sampling, testing and assessing the suitability of water, including water recovered from processes in the concrete industry, as mixing water for concrete, July 2003.

NF EN 1097-6, Tests for mechanical and physical properties of aggregates —Part 6: Determination of particle density and water absorption, January 2014.

NF EN 932-2, Tests for general properties of aggregates — Part 2: Methods for reducing laboratory samples, August 1999.

NF EN 206/CN, Concrete — Specification, performance, production and conformity — National addition to the standard NF EN 206, December 2014.

NF EN 206+A1, Concrete - Specification, performance, production and conformity, November 2016.

NF EN 12390-3, Testing hardened concrete - Part 3: compressive strength of test specimens, June 2019.

NF P18-459, Concrete - Testing hardened concrete - Testing porosity and density, March 2010.

- Olenina, I., Hajdu, S., Edler, L., Andersson, A., Wasmund, N., Busch, S., Göbel, J., Gromisz, S., Huseby, S., Huttunen, M., Jaanus, A., Kokkonen, P., Ledaine, I. and Niemkiewicz, E. (2006) Biovolumes and size-classes of phytoplankton in the Baltic Sea HELCOM Balt.Sea Environ. Proc. No. 106, 144pp
- Paasche, E. (1973). Silicon and the ecology of marine plankton diatoms. I. *Thalassiosira pseudonana* (*Cyclotella nana*) grown in a chemostat with silicate as limiting nutrient. *Mar. Biol.* 19, 117–126.
- Paasche, E. (1980). Silicon content of five marine plankton diatom species measured with a rapid filter method. *Limnol. Oceanogr.* 25, 474–480.
- Pahlow, M., Riebesell, U., and Wolf-Gladrow, D.A. (1997). Impact of cell shape and chain formation on nutrient acquisition by marine diatoms. *Limnol. Oceanogr.* 42, 1660–1672.
- Palin, D., Wiktor, V., and Jobkers, H.M. (2015). Autogenous healing of marine exposed concrete: Characterization and quantification through visual crack closure. *Cem. Concr. Res.* 73, pp.17-24.
- Parkhill, J.-P., Maillet, G., and Cullen, J.J. (2001). Fluorescence-Based Maximal Quantum Yield for Psii as a Diagnostic of Nutrient Stress. *J. Phycol.* 37, 517–529.
- Pasqueron De Fommervault O. (2016). Dynamique des nutriments en Méditerranée : des campagnes océanographiques aux flotteurs Bio-Argo. Thèse Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, Paris, 196 p.
- Passow, U., Shipe, R., Murray, A., Pak, D., Brzezinski, M., and Alldredge, A. (2001). The origin of Transparent Exopolymer Particles (TEP) and their role in the sedimentation of particulate matter. *Continental Shelf Research - Cont shelf res.* 21, 327–346.
- Perkol-Finkel, S., and Sella, I. (2014). Ecologically Active Concrete for Coastal and Marine Infrastructure: Innovative Matrices and Designs. In *From Sea to Shore ? Meeting the Challenges of the Sea*, (ICE Publishing), pp. 1139–1149.
- Perkol-Finkel, S., and Sella, I. (2015). Harnessing urban coastal infrastructure for ecological enhancement. *Proc. Inst. Civ. Eng. - Marit. Eng.* 168:3, 102-110
- Perkol-Finkel, S., Hadary, T., Rella, A., Shirazi, R., and Sella, I. (2018). Seascape architecture – incorporating ecological considerations in design of coastal and marine infrastructure. *Ecol. Eng.* 120, 645–654.
- Pešková, S., Machovic, V., and Prochazka, P. (2011). Raman spectroscopy structural study of fired concrete. *Ceram. - Silik.* 55, 410–417.

- Pioch, S., Relini, G., Souche, J.C., Stive, M.J.F., De Monbrison, D., Nassif, S., Simard, F., Allemand, D., Saussol, P., Spieler, R., et al. (2018). Enhancing eco-engineering of coastal infrastructure with eco-design: Moving from mitigation to integration. *Ecol. Eng.* 120, 574–584.
- Qu, F., Li, W., Dong, W., Tam, V.W.Y., and Yu, T. (2021). Durability deterioration of concrete under marine environment from material to structure: A critical review. *J. Build. Eng.* 35, 102074.
- Ragab, A.M., Elgammal, M.A., Hodhod, O.A., and Ahmed, T.E. (2016). Evaluation of field concrete deterioration under real conditions of seawater attack. *Constr. Build. Mater.* 119, 130–144.
- Ragoug, R., Metalsi, O.O., Barberon, F., Torrenti, J.-M., Roussel, N., Divet, L., and d’Espinoise de Lacaillerie, J.-B. (2019). Durability of cement pastes exposed to external sulfate attack and leaching: Physical and chemical aspects. *Cem. Concr. Res.* 116, 134–145.
- Ragueneau, O., and Tréguer, P. (1994). Determination of biogenic silica in coastal waters: applicability and limits of the alkaline digestion method. *Mar. Chem.* 45, 43–51.
- Ragueneau, O., Tréguer, P., Leynaert, A., Anderson, R.F., Brzezinski, M.A., DeMaster, D.J., Dugdale, R.C., Dymond, J., Fischer, G., François, R., et al. (2000). A review of the Si cycle in the modern ocean: recent progress and missing gaps in the application of biogenic opal as a paleoproductivity proxy. *Global and Planetary Change* 26, 317–365.
- Redfield, A.C., Ketchum, B.H. and Richards, F.A. (1963) The Influence of Organisms on the Composition of the Sea Water. In: Hill, M.N., Ed., *The Sea*, Vol. 2, Interscience Publishers, New York, 26-77
- Risinger, J. (2012). Biologically dominated engineered coastal breakwaters. LSU Doctoral Dissertations. 3300
- Round, F.E., Crawford, R.M., and Mann, D.G. (1990). *Diatoms: Biology and Morphology of the Genera* (Cambridge University Press).
- Sadati, S., Moradillo, M.K., and Shekarchi, M. (2016). Long-term durability of onshore coated concrete —chloride ion and carbonation effects. *Front. Struct. Civ. Eng.* 10, 150–161.
- Safehian, M., and Ramezani pour, A.A. (2013). Assessment of service life models for determination of chloride penetration into silica fume concrete in the severe marine environmental condition. *Constr. Build. Mater.* 48, 287–294.
- Sailio, M., Baroghel-Bouny, V., and Barberon, F. (2014). Chloride binding in sound and carbonated cementitious materials with various types of binder. *Constr. Build. Mater.* 68, 82–91.

- Salaün, S., La Barre, S., Dos Santos-Goncalvez, M., Potin, P., Haras, D., and Bazire, A. (2012). Influence of exudates of the kelp *Laminaria digitata* on biofilm formation of associated and exogenous bacterial epiphytes. *Microb. Ecol.* 64, 359–369.
- Salta, M.M., Wharton, J.A., Blache, Y., Stokes, K.R., and Briand, J.-F. (2013). Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* 15, 2879–2893.
- Sanchez-Silva, M., and Rosowsky, D.V. (2008). Biodeterioration of Construction Materials: State of the Art and Future Challenges. *J. Mater. Civ. Eng.* 20, 352–365.
- Sand, W. (1987). Importance of Hydrogen Sulfide, Thiosulfate, and Methylmercaptan for Growth of Thiobacilli during Simulation of Concrete Corrosion. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1645–1648.
- Santo Domingo, J.W., Revetta, R.P., Iker, B., Gomez-Alvarez, V., Garcia, J., Sullivan, J., and Weast, J. (2011). Molecular survey of concrete sewer biofilm microbial communities. *Biofouling* 27, 993–1001.
- Sarthou, G., Timmermans, K.R., Blain, S., and Tréguer, P. (2005). Growth physiology and fate of diatoms in the ocean: a review. *J. Sea Res.* 53, 25–42.
- Seidel, A., Löbbus, M., Vogelsberger, W., and Sonnefeld, J. (1997). The kinetics of dissolution of silica 'Monospher' into water at different concentrations of background electrolyte. *Solid State Ion.* 101–103, 713–719.
- Seifan, M., and Berenjian, A. (2018). Application of microbially induced calcium carbonate precipitation in designing bio self-healing concrete. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 34, 168.
- Sella, I., and Perkol-Finkel, S. (2015). Blue is the new green – Ecological enhancement of concrete based coastal and marine infrastructure. *Ecol. Eng.* 84, 260–272.
- Sheng, G.-P., Yu, H.-Q., and Li, X.-Y. (2010). Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotechnol. Adv.* 28, 882–894.
- Shuying, G., and Xiaoning, T. (2018). Impact Mechanism of Marine Biofilm on Concrete Durability. *Chem. Eng. Trans.* 64, 613–618.
- Sjöberg, S., Nordin, A., Ingri, N. (1981). Equilibrium and structural studies of silicon(IV) and aluminium(III) in aqueous solution. II. Formation constants for the monosilicate ions $\text{SiO}(\text{OH})_3^-$ and $\text{SiO}_2(\text{OH})_2^{2-}$. A precision study at 25°C in a simplified seawater medium. *Mar. Chem.* 10, 521–532.

- Sjöberg, S., Hägglund, Y., Nordin, A., and Ingri, N. (1983). Equilibrium and structural studies of silicon(iv) and aluminium(iii) in aqueous solution. V. Acidity constants of silicic acid and the ionic product of water in the medium range 0.05–2.0 M Na(Cl) at 25°C. *Mar. Chem.* 13, 35–44.
- Song, H.-W., and Kwon, S.-J. (2007). Permeability characteristics of carbonated concrete considering capillary pore structure. *Cem. Concr. Res.* 37, 909–915.
- Souche, J.-C., Saout, G.L., Salgues, M., and Pioch, S. (2016). Effets de bétons bio-actifs sur la colonisation marine en environnement méditerranéen. *Matér. Tech.* 104, 504.
- Staeher, P.A., and Sand-Jensen, K. (2006). Seasonal changes in temperature and nutrient control of photosynthesis, respiration, and growth of natural phytoplankton communities. *Freshw. Biol.* 51, 249–262.
- Stanley, H.O., Onwukwe, C.D., and Peesor, S.D. (2017). Assessment of microalgae-influenced biodeterioration of concrete structures. *Niger. J. Biotechnol.* 34, 19–23.
- Staresinic, N., Farrington, J., Gagosian, R.B., Clifford, C.H., and Hulburt, E.M. (1983). Downward Transport of Particulate Matter in the Peru Coastal Upwelling: Role of the Anchoveta, *Engraulis Ringens*. In *Coastal Upwelling Its Sediment Record: Part A: Responses of the Sedimentary Regime to Present Coastal Upwelling*, E. Suess, and J. Thiede, eds. (Boston, MA: Springer US), pp. 225–240.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., and Costerton, J.W. (2002). Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 187–209.
- Strain, E.M.A., Olabarria, C., Mayer-Pinto, M., Cumbo, V., Morris, R.L., Bugnot, A.B., Dafforn, K.A., Heery, E., Firth, L.B., Brooks, P.R., et al. (2018). Eco-engineering urban infrastructure for marine and coastal biodiversity: Which interventions have the greatest ecological benefit? *J. Appl. Ecol.* 55, 426–441.
- Strickland, J.D.H. (1972). *A Practical Handbook of Seawater Analysis*, 2nd Edition. 2nd edition. [place unknown]: Fisheries Research Board of Canada.
- Stroh, J., Meng, B., and Emmerling, F. (2016). Deterioration of hardened cement paste under combined sulphate-chloride attack investigated by synchrotron XRD. *Solid State Sci.* 56, 29–44.
- Sunlu, F.S., Buyukisik, B., Koray, T., and Sunlu, U. (2006). Growth Kinetics of *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann and Lewin Isolated from Aegean Sea Coastal Water (Izmir Bay/Türkiye). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9: 15-21
- Suryavanshi, A.K., and Narayan Swamy, R. (1996). Stability of Friedel's salt in carbonated concrete structural elements. *Cem. Concr. Res.* 26, 729–741.

- Sweat, L.H., and Johnson, K.B. (2013). The effects of fine-scale substratum roughness on diatom community structure in estuarine biofilms. *Biofouling* 29, 879–890.
- Thamatrakoln, K., and Hildebrand, M. (2008). Silicon Uptake in Diatoms Revisited: A Model for Saturable and Nonsaturable Uptake Kinetics and the Role of Silicon Transporters. *Plant Physiol.* 146, 1397–1407.
- Thiery, M., Villain, G., Dangla, P., and Platret, G. (2007). Investigation of the carbonation front shape on cementitious materials: Effects of the chemical kinetics. *Cem. Concr. Res.* 37, 1047–1058.
- Thompson, R.C., Norton, T.A., and Hawkins, S.J. (2004). Physical Stress and Biological Control Regulate the Producer-Consumer Balance in Intertidal Biofilms. *Ecology* 85, 1372–1382.
- Thornton, D. (2002). Diatom aggregation in the sea: mechanisms and ecological implications. *European J. Phyco.* 37, 149–161
- Tibabuzo Perdomo, A.M., Alberts, E.M., Taylor, S.D., Sherman, D.M., Huang, C.-P., and Wilker, J.J. (2018). Changes in Cementation of Reef Building Oysters Transitioning from Larvae to Adults. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 10, 14248–14253.
- Ting, M.Z.Y., Wong, K.S., Rahman, M.E., and Meheron, S.J. (2021). Deterioration of marine concrete exposed to wetting-drying action. *J. Clean. Prod.* 278, 123383.
- Tompkins, J., DeVille, M., Day, J., and Turner, M. (1995). Culture Collection of Algae and Protozoa: Catalogue of Strains. *Titus Wilson Son Ltd Kendal* p208.
- Tourney, J., and Ngwenya, B.T. (2009). Bacterial extracellular polymeric substances (EPS) mediate CaCO₃ morphology and polymorphism. *Chem. Geol.* 262, 138–146.
- Tréguer, P., Nelson, D.M., Van Bennekom, A.J., DeMaster, D.J., Leynaert, A., and Quéguiner, B. (1995). The Silica Balance in the World Ocean: A Reestimate. *Science* 268, 375–379.
- Tréguer, P., Bowler, C., Moriceau, B., Dutkiewicz, S., Gehlen, M., Aumont, O., Bittner, L., Dugdale, R., Finkel, Z., Iudicone, D., et al. (2018). Influence of diatom diversity on the ocean biological carbon pump. *Nat. Geosci.* 11, 27.
- Vandenabeele, P., Edwards, H.G., and Moens, L. (2007). A decade of Raman spectroscopy in art and archaeology. *Chem. Rev.* 107, 675–686.
- Vanucci, S., Pezzolesi, L., Pistocchi, R., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Iacovo, E.D., Fattorusso, E., Tartaglione, L., and Guerrini, F. (2012). Nitrogen and phosphorus limitation effects on cell growth, biovolume, and toxin production in *Ostreopsis cf. ovata*. *Harmful Algae* 15, 78–90.

- Vasquez, H.E., Hashimoto, K., Yoshida, A., Hara, K., Imai, C.C., Kitamura, H., and Satuito, C.G. (2013). A Glycoprotein in Shells of Conspecifics Induces Larval Settlement of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS ONE*. 8(12).
- Villain, G., Thiery, M., and Platret, G. (2007). Measurement methods of carbonation profiles in concrete: Thermogravimetry, chemical analysis and gammadensimetry. *Cem. Concr. Res.* 37, 1182–1192.
- Vona, V., Rigano, V.D.M., Lobosco, O., Carfagna, S., Esposito, S., and Rigano, C. (2004). Temperature responses of growth, photosynthesis, respiration and NADH: nitrate reductase in cryophilic and mesophilic algae. *New Phytol.* 163, 325–331.
- Wan, X., Wittmann, F.H., Zhao, T., and Fan, H. (2013). Chloride content and pH value in the pore solution of concrete under carbonation. *J. Zhejiang Univ. Sci. A* 14, 71–78.
- Wang, X. (2012). Modélisation du transport multi-espèces dans les matériaux cimentaires saturés ou non saturés et éventuellement carbonatés. Autre. Université Paris-Est. Français. NNT:2012PEST1037. tel-00730834
- Webb, W.L., Newton, M., and Starr, D. (1974). Carbon dioxide exchange of *Alnus rubra*. *Oecologia* 17, 281–291.
- Wei, S., Jiang, Z., Liu, H., Zhou, D., and Sanchez-Silva, M. (2013). Microbiologically induced deterioration of concrete: a review. *Braz. J. Microbiol.* 44, 1001–1007.
- Welton, R.G., Silva, M.R., Gaylarde, C., Herrera, L.K., Anleo, X., De Belie, N., and Modrý, S. (2005). Techniques applied to the study of microbial impact on building materials. *Mater. Struct.* 38, 883–893.
- Wetz, M.S., and Wheeler, P.A. (2007). Release of dissolved organic matter by coastal diatoms. *Limnol. Oceanogr.* 52, 798–807.
- Winder, M., and Sommer, U. (2012). Phytoplankton response to a changing climate. *Hydrobiologia* 698, 5–16.
- Windler, M., Leinweber, K., Bartulos, C.R., Philipp, B., and Kroth, P.G. (2015). Biofilm and capsule formation of the diatom *Achnanthes minutissimum* are affected by a bacterium. *J. Phycol.* 51, 343–355.
- Wingender, J., Neu, T.R., and Flemming, H.-C. (1999). What are Bacterial Extracellular Polymeric Substances? In *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and*

Function, J. Wingender, T.R. Neu, and H.-C. Flemming, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 1–19.

Yi, Y., Zhu, D., Guo, S., Zhang, Z., and Shi, C. (2020). A review on the deterioration and approaches to enhance the durability of concrete in the marine environment. *Cem. Concr. Compos.* 113, 103695.

Yu, P., Kirkpatrick, R.J., Poe, B., McMillan, P.F., and Cong, X. (1999). Structure of Calcium Silicate Hydrate (C-S-H): Near-, Mid-, and Far-Infrared Spectroscopy. *J. Am. Ceram. Soc.* 82, 742–748.

Yuan, Q., Shi, C., De Schutter, G., Audenaert, K., and Deng, D. (2009). Chloride binding of cement-based materials subjected to external chloride environment – A review. *Constr. Build. Mater.* 23, 1–13.

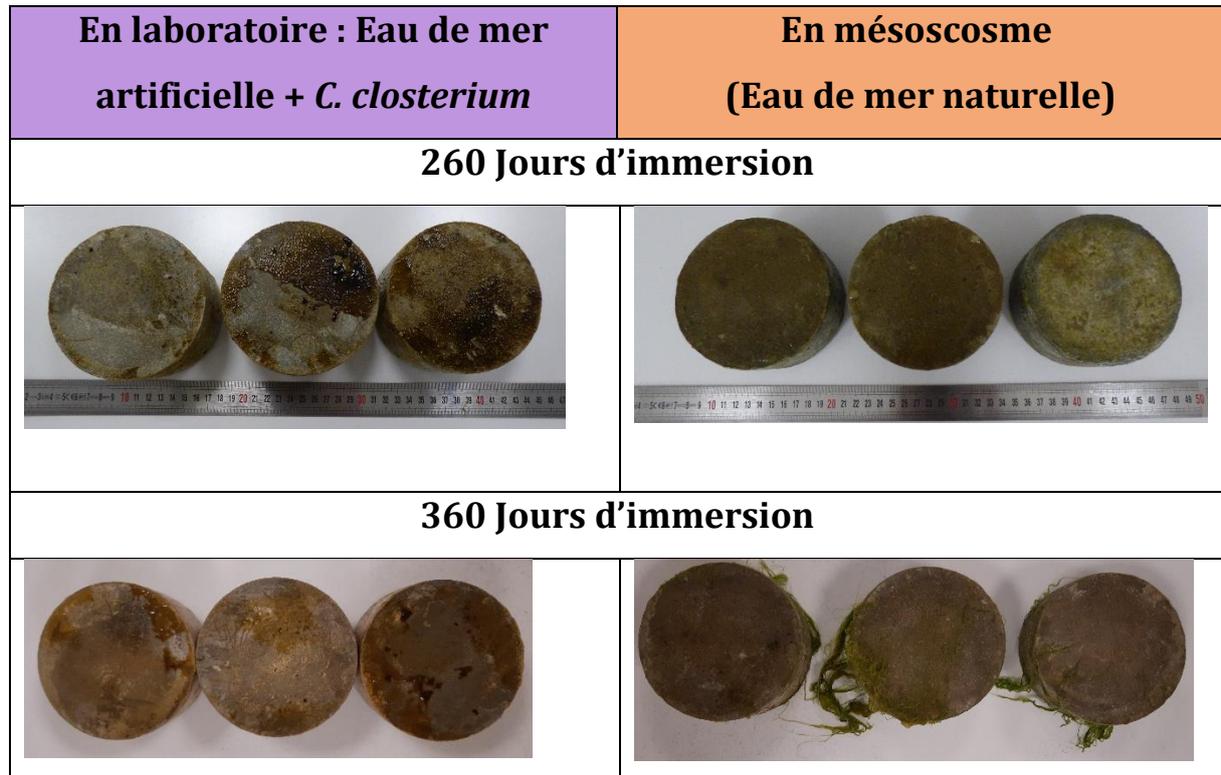
Zhu, Q., Jiang, L., Chen, Y., Xu, J., and Mo, L. (2012). Effect of chloride salt type on chloride binding behavior of concrete. *Constr. Build. Mater.* 37, 512–517.

Zurzolo, C., and Bowler, C. (2001). Exploring Bioinorganic Pattern Formation in Diatoms. A Story of Polarized Trafficking. *Plant Physiol.* 127, 1339–1345.

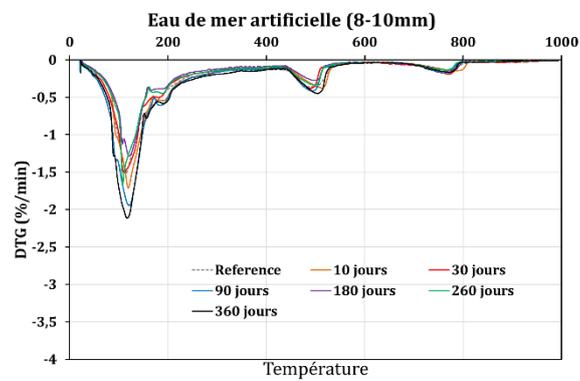
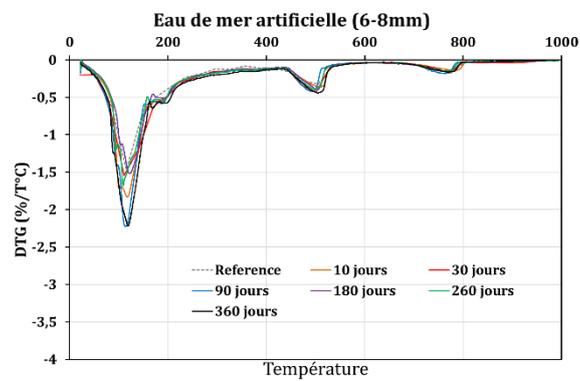
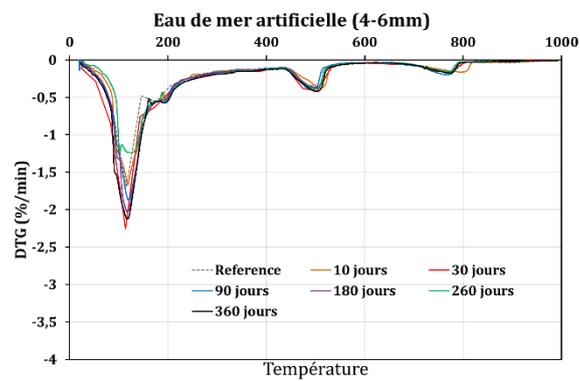
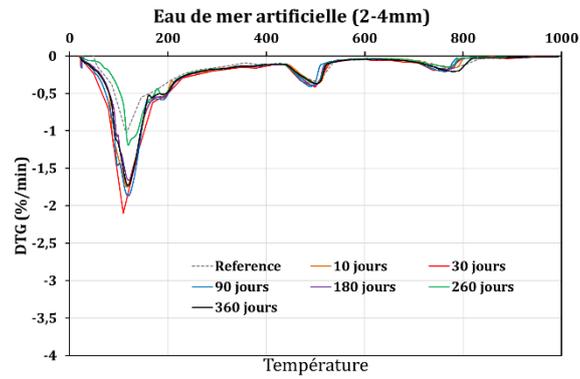
Annexe 1a : Suivi photographique de la colonisation des éprouvettes de mortier Ø110 mm
× H50 mm

En laboratoire : Eau de mer artificielle + <i>C. closterium</i>	En mésocosme (Eau de mer naturelle)
10 Jours d'immersion	
	
30 Jours d'immersion	
	
90 Jours d'immersion	
	
180 Jours d'immersion	
	

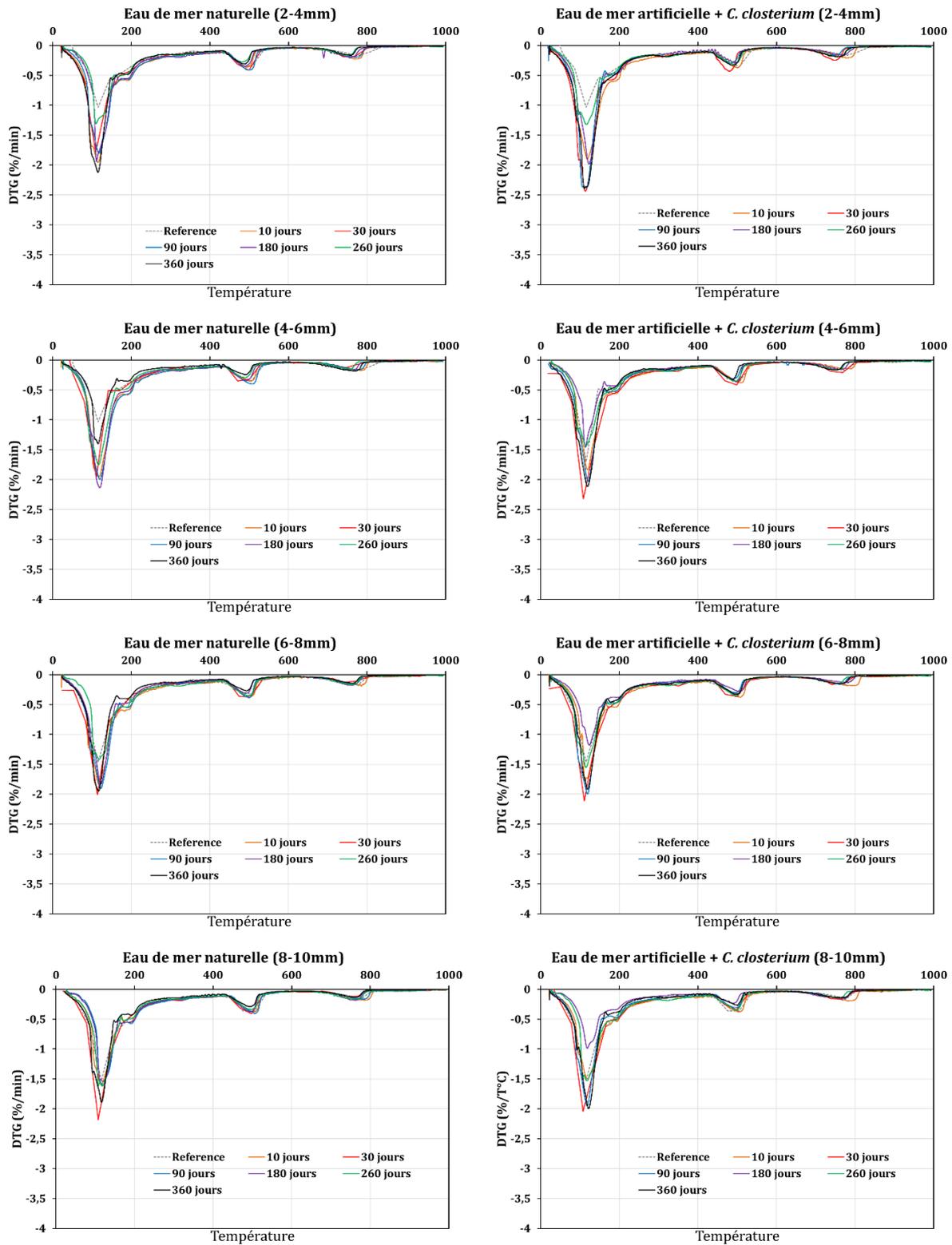
Annexe 1b : Suivi photographique de la colonisation des éprouvettes de mortier Ø110 mm × H50 mm



Annexe 2a : Courbes DTG obtenues des mortiers par analyse thermogravimétrique après immersion dans de l'eau de mer artificielle en fonction de la profondeur



Annexe 2b : Courbes DTG obtenues des mortiers par analyse thermogravimétrique après immersion dans l'eau de mer naturelle et dans l'eau de mer artificielle avec *C. closterium* en fonction de la profondeur



Glossaire

Acclimatation : Modification phénotypique (morphologique, physiologique...) rapide et réversible des individus exposés à un changement environnemental.

Assimilation : Processus opéré lorsque les organismes vivants utilisent un substrat comme source de nourriture.

Autotrophe : Dans le cas des organismes chlorophylliens, c'est leur capacité à générer leur propre matière organique à partir d'éléments minéraux grâce à l'énergie lumineuse par le processus de photosynthèse.

Bandes cingulaires : Anneaux de silice produit pendant la croissance cellulaire.

Bio-détérioration : dans le cas d'un matériau cimentaire, c'est sa capacité à être dégradés par l'activité métabolique de micro-organismes.

Biofilm : Constitué d'une grande diversité de micro-organismes, fixés à une surface et enveloppé dans une matrice d'EPS.

Biogénique : qui est produit par des organismes marins. Dans le cas des huitres, ces dernières vont déposer du carbonate de calcium pour former leur coquille.

Bio-réceptivité : Capacité d'un matériau à être colonisé par un ou plusieurs groupes d'organismes vivants.

Biovolume : Utilisé pour ajuster les variations de taille en estimant le volume total occupé par chaque type d'algues.

Cellules filles : Cellules produites au cours du cycle cellulaire des diatomées qui sont issues de la division d'une cellule mère, suite à une mitose.

Cellule mère : Cellule qui donne deux cellules que l'on nomme cellules filles après la mitose au cours du cycle cellulaire.

Chlorophylle a : Forme de chlorophylle (pigment) permettant aux organismes photosynthétiques de capter l'énergie lumineuse.

Chloroplaste : Organites présents dans le cytoplasme des cellules eucaryotes photosynthétiques.

Culture en batch : Culture fermée sans renouvellement du milieu ou ajout de sels nutritifs.

Cytokinésie : Processus par lequel le cytoplasme de la cellule algale se divise pour former deux cellules filles.

Cytoplasme : Partie d'une cellule eucaryote entre la membrane plasmique et le noyau.

Dissimilation : Processus réalisé lorsqu'un organisme vivant excrète des déchets ou d'autres substances qui réagissent chimiquement avec le substrat.

Diatomées : Groupe majeur du phytoplancton ou du microphytobenthos qui sont des organismes unicellulaires photosynthétiques appartenant à la super-classe des Bacillariophyta.

Epibionte : Organisme vivant sur un autre être vivant, ce dernier servant de substrat fixe.

EPS (Extracellular Polymeric Substance) : Matrice de substances polymériques extracellulaires sécrétée par les bactéries et le microphytobenthos pour se fixer sur un substrat dur.

Eucaryote : Organismes unicellulaires ou multicellulaires dont les cellules possèdent un noyau et des organites délimités par des membranes.

Frustule : Paroi cellulaire siliceuse des diatomées.

In situ : dans le milieu naturel.

Lumen : Membrane lipidique des thylacoïdes délimitant un espace intérieur.

Mésocosme : Système expérimental considéré comme un modèle des systèmes naturels.

Micro-organismes : Organismes microscopiques tels que des bactéries, archées et microphytobenthos (principalement constitués de diatomées).

Microphytobenthos : Microorganismes photosynthétiques constitués de diatomées, de cyanobactéries, de chlorophycées et/ou de flagellés présents dans les sédiments ou qui peuvent se fixer sur un substrat dur. C'est le contraire du phytoplancton qui eux se développent dans la colonne d'eau.

Milieu de Conway : Milieu de culture enrichi en éléments nutritifs essentiels à la croissance du phytoplancton et microphytobenthos.

Photosynthèse : Réalisée dans la membrane des thylacoïdes au sein des chloroplastes des diatomées. C'est un processus permettant à ces dernières de synthétiser de la matière organique à partir de d'énergie lumineuse, d'eau et de dioxyde de carbone.

Raphé : Valve de diatomées de symétrie axiale (chez certaines diatomées pennales) présentant en son milieu une fente étroite plus ou moins longue.

Réseau trophique : Ensemble des organismes d'un écosystème.

Sessile : se dit d'un organisme qui vit fixé directement sur un substrat comme des balanes, des éponges, des coraux...

Silice Biogénique : Utilisée pour la synthèse des nouvelles valves du frustule sous forme de silice amorphe hydratée.

Silice dissoute : Silice absorbée par les diatomées pour leur croissance majoritairement sous la forme $\text{Si}(\text{OH})_4$.

Stroma : Fluide incolore qui entoure les thylakoïdes dans les chloroplastes des cellules algales.

Thylacoïdes : Membranes situées entre le stroma et le lumen renfermant les complexes protéiques (PSI, PSII, plastoquinones, le complexe b6/f, plastocyanines, ATP synthase) nécessaires à la photosynthèse.

Vésicule de dépôt de silice (SDV) : Lieu où la silice dissoute est polymérisée en silice et incorporé à la nouvelle paroi cellulaire (Lieu de silicification).

Résumé

Aujourd'hui, les matériaux cimentaires sont majoritairement utilisés pour la construction d'infrastructures maritimes ou de récifs artificiels. Ces derniers sont rapidement colonisés par un biofilm composé de micro-organismes qui au cours du temps peut modifier sa composition et sa microstructure. Dans ce contexte, cette thèse vise à comprendre et suivre les interactions entre les micro-organismes marins et la matrice cimentaire. Les matériaux cimentaires étudiés pendant cette thèse sont le mortier et le béton. Les principaux objectifs associés portent sur la capacité des microalgues à assimiler certains nutriments provenant de la matrice cimentaire. Il en ressort que les diatomées *Cylindrotheca closterium* peuvent assimiler la silice dissoute provenant du mortier lorsque son milieu en est limité. Par ailleurs, celles-ci sont capables de s'acclimater à la disponibilité en silicium. Un des autres objectifs est d'étudier l'effet du biofilm sur la couche superficielle du matériau en fonction du temps. Des analyses de composition et de microstructure ont été réalisées. Des études accélérées en laboratoire et en mésocosme ont été mises en place. Une fois immergé, des modifications de la composition du matériau cimentaire ont été observées. L'activité biologique du biofilm a provoqué une augmentation de la dissolution en profondeur de la portlandite. La formation de carbonates de calcium est rapidement observée une fois le matériau immergé en eau de mer. La forme des carbonates de calcium varie suivant que le matériau cimentaire est colonisé ou non. A long terme, la bio-colonisation joue également un rôle protecteur contre la pénétration de ces agents agressifs.

Mots clés : matériau cimentaire, biofilm, microstructure, couche superficielle, bio-colonisation

Abstract

Today, the cementitious materials are mostly used for the construction of marine infrastructures or artificial reefs. These are rapidly colonised by a biofilm composed of micro-organisms which over time can modify its composition and its microstructure. In this context, this thesis aims to understand and monitor the interactions between marine micro-organisms and the cementitious matrix. The cementitious materials studied during this thesis are mortar and concrete. The main objectives of this thesis focus on the ability of microalgae to assimilate certain nutrients from the cementitious matrix. It emerges that the diatoms *Cylindrotheca closterium* can assimilate dissolved silica from the mortar when its environment is limited. Furthermore, they are able to acclimatise to silicon availability. Another objective is to study the effect of the biofilm on the surface layer of the material as a function of time. Compositional and microstructural analysis were performed. Accelerated laboratory and mesocosm studies were carried out. Once immersed, changes in the composition of the cementitious material were observed. The biological activity of the biofilm caused an increase of the portlandite dissolution in depth. The formation of calcium carbonates is rapidly observed once the material is immersed in sea water. The form of the calcium carbonates varies according to whether the cementitious material is colonised or not. In the long term, the bio-colonisation also plays a protective role against the penetration of these aggressive agents.

Keywords : cementitious material, biofilm, microstructure, surface layer, bio-colonization

