



AIX MARSEILLE UNIVERSITE
Faculté des Sciences de Luminy

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'AIX MARSEILLE
en Microbiologie, Biologie Végétale et Biotechnologie
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

**Ecologie microbienne et métabolisme associé : étude
de l'eau interstitielle et de la roche argileuse du
Callovo-Oxfordien
dans le Laboratoire de Recherche Souterrain de
l'Andra (Meuse/Haute-Marne)**

Soutenue publiquement le 13 Décembre 2012 par

Bruno MAYEUX

Membres du jury :

Mr Jean-Claude SIGOILLOT

Mr Jean-Jacques GODON

Mme Claire SERGEANT

Mr Marc LABAT

Mme Agnès VINSOT

Mme Rizlan BERNIER-LATMANI

Président

Rapporteur

Rapporteur

Directeur de Thèse

Responsable Andra

Invitée

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait pu se réaliser sans le soutien financier de l'Agence Nationale pour la gestion des Déchets RadioActifs. L'Andra m'a permis de réaliser avec sérénité, et dans de bonnes conditions, ce travail de thèse en rapport avec un problème de société passionnant, et de participer à des missions nombreuses et particulièrement enrichissantes, tant sur le plan humain que scientifique. Merci à ma responsable Andra, Mme Agnès VINSOT, pour avoir répondu positivement à toutes mes sollicitations et de m'avoir fait découvrir cette installation si particulière qu'est le Laboratoire de Recherche Souterrain. Reçoit ici ma plus grande gratitude pour ta disponibilité, ton enthousiasme sans faille et tes encouragements.

Mes remerciements s'adressent à mes rapporteurs : Mr Jean-Jacques Godon et Mme Claire Sergeant, mais également à Mr Jean-Claude Sigoillot et Mme Rizlan Bernier-Latmani pour avoir accepté de participer au jury de thèse.

Je suis particulièrement reconnaissant à Mr Marc Labat d'avoir accepté la charge de Directeur de Thèse, de m'avoir encadré, orienté et soutenu tout au long de ce travail. Recevez ici ma plus profonde reconnaissance pour votre disponibilité, vos nombreux conseils et vos encouragements.

Qu'il me soit permis de remercier Mr Jean-Luc Tholozan, directeur du LMBEC, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de permettre la réalisation de cette thèse.

J'adresse également mes remerciements à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail. Merci à Mr Bernard Ollivier de m'avoir accueilli au sein de l'équipe anaérobie et à Mme Marie-Laure Fardeau pour m'avoir encadré, conseillé et soutenu tout au long de ma thèse. Reçoit ici ma plus grande reconnaissance pour tous les conseils et tous les travaux que nous avons réalisés ensemble.

Je n'oublie pas toute l'équipe aérobie dans laquelle se trouvait mon bureau, pour leur disponibilité, leur soutien, leur bonne humeur. Je remercie plus particulièrement Mme Laurie Casalot pour son aide en phylogénétique et ces longs moments passés devant l'ordinateur.

Je remercie également Mme Sylvie Daumas pour son aide et son soutien tout au long de ce travail de thèse, pour ces bons moments passés ensemble au Laboratoire Souterrain et sur Marseille.

Merci à tous les collègues de l'IRD pour leurs encouragements et leur aide si précieuse : Corinne, Manon, Gwénola, Zouhaier Richard, Yannick, Sylvain, Nathalie, Jean-Luc, Didier, Gaël, Anne, Jean, Isabelle, Guy, Pierre, Agnès, Grégoire, à tous les collègues thésard de l'IRD : Alexia, Oulfat, Matthieu, Saber, Wagdi, Raja, Nadia, Rafael, Abdeljabar. Merci à vous pour tous ces précieux moments passés ensemble.

Je n'oublierai pas non plus les collègues de l'INRA, sans qui les pauses auraient été beaucoup moins plaisantes : Mathieu, Holly, Marie, Laetitia, Sacha et Julia.

A mes amis de fac et de longue date, à mes amis intimes, Bénédicte, David, Isma, merci à vous.

Je remercie également tous les membres du Centre International de Rencontres Mathématiques pour m'avoir fait confiance et offert plusieurs postes différents permettant le financement de mes études depuis ma troisième année de fac. Olivia, Muriel, Joëlle, Monia, Mr Sylvain, Gilbert et tous les autres, merci pour tous ces moments plus agréables les uns que les autres passés en votre compagnie depuis toutes ces années.

Merci à ma famille d'avoir toujours été présente pour moi et de m'avoir soutenu sans faille durant toute ma période universitaire. Merci à mes parents à qui je dois les encouragements les plus précieux et les plus chaleureux depuis tant d'années. Papa, Maman, que cette thèse vous soit dédiée.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I. INTRODUCTION

I.1 CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE DE L'ETUDE	1
I.2 LES ENVIRONNEMENTS PROFONDS	1
I.3 LE LABORATOIRE DE RECHERCHE SOUTERRAIN DE BURE (MEUSE/Haute-MARNE, FRANCE)	2
I.4 LA ROCHE ARGILEUSE DU CALLOVO-OXFORDIEN	3
I.4.1 Migration des éléments dissous dans un milieu poreux	3
I.4.2 Propriétés de confinement	3
I.4.3 L'argilite	4

CHAPITRE II : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1 LES LIMITES PHYSICOCHIMIQUES DE LA VIE : APPLICATION AU LABORATOIRE SOUTERRAIN DE BURE	7
II.1.1 Oxygène et condition oxydoréductrice	7
II.1.2 Température	8
II.1.3 L'influence du pH	9
II.1.4 Salinité	9
II.1.5 Conditions de Pression	10
II.1.6 Métabolisme et disponibilité de la matière organique	10
II.1.7 L'eau dans le Cox	11
II.1.8 Espace disponible	12
II.2 CORROSION ABIOTIQUE ET BIOCORROSION DES ACIERS	14
II.2.1 Fragilisation des aciers par l'hydrogène	14
II.2.1.1 Fragilisation par hydrogène externe, sous forte activité	15
- Fissuration induite par l'hydrogène	15
- Rupture différée, propagation de fissure	16
- Mécanisme chimique de l'action abiotique de l'H ₂ S	17
II.2.1.2 Fragilisation par l'hydrogène externe, sous faible activité	18
- Hydrogène gazeux	18
- FPH et corrosion sous contrainte	18
II.2.2 Corrosion influencée par les microorganismes ou biocorrosion	18
II.2.2.1 Respiration microbienne du fer : impacts sur les processus de corrosion	
- Généralités sur les bactéries réduisant le fer	20
- Effets des IRB sur les surfaces métalliques	21

II.2.2.2 Bactéries sulfato-réductrices et corrosion	22
- Théorie de la dépolarisation cathodique	22
- Influence de l'acidification bactérienne	22
II.2.2.3 Action des substances polymériques extracellulaires	23
II.2.2.4 Cas particulier d'EPS : enzymes et biocorrosion	24

II.3 PRODUITS DU METABOLISME BACTERIEN : CAS DES ACIDES GRAS VOLATILS ET DU DIOXYDE DE CARBONE 25

II.3.1 Les acides gras volatils	25
II.3.2 Le dioxyde de carbone	26

CHAPITRE III : MATERIELS, METHODES ET VALIDATIONS EXPERIMENTALES

III.1 LIEUX DE PRELEVEMENT 30

III.2 METHODES DE PRELEVEMENT 31

III.2.1 Echantillons liquides	31
III.2.1.1 Flacon ouvert, méthode gravitaire : KEY1001-1	31
III.2.1.2 Flacon fermé, méthode gravitaire : KEY1001-2	32
- Montage	32
- Principe	32
- Test du dispositif	32
- Validation expérimentale	33
• Test hydraulique	
• Test anaérobiose	
- Récupération de l'eau interstitielle	33
III.2.1.3 Dispositif en ligne de prélèvement : PAC1002	34
III.2.2 Echantillons solides	34
III.2.2.1 Les différents échantillonnages	34
- Forage BAC1201	34
- Forage TER1901	35
- Forage BHT-1	35
III.2.2.2 Protocole et précautions pour la récupération des échantillons solides : cas de BHT-1	35
- Jour 1 : forage à l'air	35
- Jour 2 : forage à l'Argon	36

III.3 TRAITEMENT DES ECHANTILLONS	36
III.3.1 Echantillons liquides	36
III.3.1.1 Utilisation directe	36
III.3.1.2 Technique de filtration/concentration	37
- Principe	37
- Montage	37
- Test du dispositif	37
- Validation expérimentale	38
• 1 ^{er} essai	
• 2 ^{ème} essai	
• 3 ^{ème} essai	
III.3.1.3 Conditionnement et préparation de l'inoculum-mère	39
III.3.2 Echantillons solides	39
III.3.2.1 Protocole de récupération du cœur de carotte	39
- Elagage du pourtour de la carotte	40
- Broyage du cœur de carotte	41
III.3.2.2 Conditionnement et préparation de l'inoculum-mère	42
III.4 MICROBIOLOGIE	42
III.4.1 Milieux de culture	42
III.4.1.1 Etude aérobie	42
- Milieu liquide	42
- Milieu solide	42
III.4.1.2 Etude anaérobie	43
- Milieu liquide	43
- Milieu solide	44
III.4.2 Protocole d'enrichissement et d'isolement	44
III.4.3 Identification des souches isolées	44
III.4.3.1 Généralités	44
III.4.3.2 Amplification de l'ADNr 16S	44
III.4.3.3 Séquençage et identification	45
III.4.3.4 Hybridation ADN/ADN	45
III.4.4 Identification des produits du métabolisme	45
III.4.4.1 Production d'acides gras volatils	45
III.4.4.2 Production d'H ₂	46
III.4.4.3 Production d'H ₂ S	46
III.4.5 Etude de la microflore présente par l'intermédiaire de la biologie moléculaire	
III.4.5.1 Généralités sur l'outil moléculaire	47
III.4.5.2 Extraction de l'ADN	47
III.4.5.3 Amplification de l'ADNr 16S	48
III.4.5.4 Migration et révélation de l'amplification	48
III.4.6 Caractérisation d'une nouvelle espèce bactérienne	48

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1 ETUDE DE LA MICROFLORE PRESENTE DANS LES ECHANTILLONS LIQUIDES	50
IV.1.1 Analyses physico-chimiques des échantillons d'eau interstitielle	51
IV.1.2 Etude microbiologique de l'eau interstitielle	51
IV.1.2.1 Flacon ouvert, méthode gravitaire : KEY1001-1	51
IV.1.2.2 Flacon fermé, méthode gravitaire : KEY1001-2	53
IV.1.2.3 Dispositif en ligne de prélèvement : PAC1002	54
IV.2 ETUDE DE LA MICROFLORE PRESENTE DANS LES ECHANTILLONS SOLIDES	54
IV.2.1 Forage BAC1201	55
IV.2.2 Forage TER1901	55
IV.3 CONCLUSION PARTIELLE SUR LES ETUDES DE LA MICROFLORE DU LABORATOIRE SOUTERRAIN DE RECHERCHE PAR APPROCHE CULTURALE	
IV.4 ETUDE DE LA BIODIVERSITE MOLECULAIRE PRESENTE DANS LES ECHANTILLONS SOLIDES DU LABORATOIRE SOUTERRAIN	57
IV.4.1 Premier essai d'extraction	57
IV.4.2 Second essai d'extraction	58
IV.4.3 Troisième essai d'extraction	59
IV.4.4 Quatrième essai d'extraction	59
IV.4.5 Conclusion partielle sur les études de la microflore par biologie moléculaire	
IV.5 ANALYSES METABOLIQUES	62
IV.5.1 Souches aérobies	62
IV.5.2 Souches anaérobies facultatives	63
IV.5.2.1 Acides gras volatils et alcool produit	63
IV.5.2.2 Production d'hydrogène	64
IV.5.3 Souche anaérobie stricte	65
IV.5.3.1 Production de sulfure d'hydrogène par <i>Desulfosporosinus burensis</i>	
IV.5.4 Conclusion partielle sur les études métaboliques	66
IV.6 CARACTERISATION D'UNE NOUVELLE ESPECE DE SULFATO-REDUCTEUR : <i>DESULFOSPOROSINUS BURENSIS</i>	66
IV.6.1 Etude phylogénétique de la souche BSREI1	66
IV.6.2 Propriétés morphologiques de la souche BSREI1	67
IV.6.3 Etude physiologique de la souche BSREI1	67
IV.6.3.1 Température optimale de croissance	67
IV.6.3.2 Effet du pH	68
IV.6.3.3 Influence de la concentration en sel	68
IV.6.4 Propriétés métaboliques de la souche BSREI1	68

IV.6.4.1 Etude de la dégradation des substrats par la souche BSREI1	68
IV.6.4.2 Milieu minimum	69
IV.6.4.3 Composition de la souche BSREI1 en acide gras (%)	70
IV.6.4.4 Test d'anaérobiose	70
IV.6.4.5 Etude des accepteurs d'électrons	70
IV.6.5 Conclusion partielle sur la caractérisation d'une nouvelle espèce	70

CHAPITRE V : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

V.1 CONCLUSION GENERALE	73
V.2 PERSPECTIVES	78

REFERENCES

ANNEXES

Annexe 1 : Les grands principes de la loi du 30 décembre 1991

Annexe 2 : Nomenclature Andra

Annexe 3 : Laboratoire souterrain du Mont-Terri

Annexe 4 : *Desulfosporosinus burensis* sp. nov.: a spore-forming, mesophilic, sulfate-reducing bacterium isolated from a deep clay environment

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I : INTRODUCTION

CHAPITRE I : INTRODUCTION

I.1 CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE DE L'ETUDE

Ce présent travail porte sur l'étude de la microbiologie d'un environnement profond constitué par une couche argileuse datée d'environ 160 millions d'années et située à 490m de profondeur à l'Est du bassin Parisien, à la limite de la Meuse et de la Haute-Marne. Cette roche est étudiée par de nombreuses disciplines (géochimie, géologie, hydrogéologie, géomécanique, etc.) dans le cadre du projet français de stockage géologique de déchets radioactifs de haute activité à vie longue. A toutes ces disciplines non biologiques doit s'ajouter la microbiologie. En effet, les microorganismes sont susceptibles de jouer un rôle sur l'évolution d'un stockage, à la fois sur la dégradation des matériaux (acier, béton, etc.), sur la composition de l'eau et des gaz dans le stockage et, en conséquence, sur la migration des radionucléides. Ainsi cette étude associe une recherche fondamentale sur un environnement profond et une recherche appliquée au projet de stockage en profondeur de déchets radioactifs.

Une des difficultés inhérentes à l'étude microbiologique de ce type d'environnement profond concerne les conditions de stérilité des échantillons, contrainte nécessaire pour s'affranchir de toute contamination microbiologique potentielle qui serait non liée au site de prélèvement : le laboratoire souterrain de recherche de l'Andra. De plus, cet environnement profond est considéré comme totalement anaérobie dans son état naturel et il faut pouvoir préserver les conditions anaérobies initiales des échantillons. Ainsi, le développement et l'adaptation de techniques de prélèvement, de traitement et d'études métaboliques en milieu anaérobie et sans contamination font partie des problématiques associées à un tel sujet.

Après une introduction présentant les environnements profonds, puis le laboratoire souterrain de recherche de l'Andra, complété par une description de la couche sédimentaire hôte du projet de stockage de déchets radioactifs, nous verrons, sur la base d'une recherche bibliographique, si cette dernière possède les prérequis indispensables à l'établissement d'une vie bactérienne. Il sera présenté ensuite plusieurs notions de corrosion : soit une corrosion non liée au vivant (abiotique) soit une corrosion influencée par les microorganismes ou encore appelée biocorrosion (biotique). Cette notion de (bio)corrosion est abordée car il est connu maintenant depuis plus d'un siècle que les microorganismes, de par leur métabolisme, peuvent influencer la corrosion de plusieurs types de matériaux, qu'ils soient métalliques ou non. Ainsi, une étude plus précise sera focalisée sur deux produits majeurs du métabolisme bactérien : les acides gras volatils et le dioxyde de carbone.

Après la présentation des matériels, méthodes et validations expérimentales réalisées lors de cette étude, les résultats obtenus seront discutés puis synthétisés dans la conclusion générale et enfin accompagnés de perspectives à plus ou moins long terme pour ce travail.

I.2 LES ENVIRONNEMENTS PROFONDS

L'écologie microbienne des environnements profonds (de plusieurs dizaines à plusieurs milliers de mètres) est un sujet encore mal connu, notamment en raison de la difficulté de l'échantillonnage. L'étude de cette biosphère a commencé il y a une vingtaine d'années (Cragg *et al.*, 1992) et a pu se développer grâce aux campagnes d'exploitation pétrolière, à

des carottages profonds (pétrole, gaz, aquifère...) ou en utilisant les matériaux des sites miniers profonds.

Les forages permettent d'accéder à des échantillons très profonds. Le record de forage revient à la Russie, avec un forage à 12 262 m de profondeur (Butler, 1994). Un second forage extrême a été réalisé en Forêt Noire en Allemagne, à une profondeur de 9 100 m, dans une couche sédimentaire de la limite crétacé-tertiaire atteignant une température de 265°C (Butler, 1994). Une recherche d'organismes thermophiles dans ces forages a été réalisée à 4 000m de profondeur et à une température de 118°C, mais aucun résultat positif n'a été obtenu. Actuellement, la température hyperthermophile la plus haute jamais atteinte est de 113°C (Stetter, 1996).

Dans la biosphère profonde, la vie est rare mais pas inexistante. Pendant longtemps, les environnements extrêmes ont été considérés comme stériles. Mais depuis quelques décennies, les études sur la biodiversité dans ce type d'environnement tendent à prouver le contraire. Ainsi, dans les fumeurs noirs des fosses abyssales, dans les puits de pétrole, dans les geysers et autres types d'environnement, une microflore riche a-t-elle été trouvée et étudiée. La vie subterrannée a été localisée à des profondeurs de plusieurs milliers de mètres dans les sédiments de la fosse océanique des Mariannes (10 898 m de profondeur). Deux souches piézophiles extrêmes ont pu être isolées (Kato *et al.*, 1998).

Les écosystèmes de la croûte terrestre sont pourvus de vie, dans la quasi-totalité de type procaryotique. Pour les environnements terrestres, la vie a été identifiée à 5 278 m de profondeur dans une couche granitique en Suisse (Szewzyk, 1994).

La biomasse de ces microorganismes subterrannéens pourrait être égale à la masse totale des plantes marines et terrestres. Ces microorganismes semblent avoir une activité faible mais significative et plusieurs travaux indiquent que les chimiolithotrophes formeraient une base chimiosynthétique (Pedersen, 2000).

A l'intérieur de la croûte terrestre, les gaz comme l'hydrogène, le méthane et le dioxyde de carbone sont produits en continu et constituent probablement des sources durables de carbone et d'énergie pour les écosystèmes de la biosphère profonde.

I.3 LE LABORATOIRE DE RECHERCHE SOUTERRAIN DE MEUSE/Haute-MARNE

Etablissement public, industriel et commercial, placé sous la tutelle des ministères de l'Industrie, de la Recherche et de l'Environnement, l'Agence Nationale pour la gestion des Déchets RadioActifs (Andra) a en charge la gestion de l'ensemble des déchets radioactifs en France. Elle étudie la faisabilité d'un stockage réversible des déchets de haute activité et à vie longue en formation géologique à plus de 400 m de profondeur dans la roche argileuse du Callovo-Oxfordien à l'est du bassin parisien, à la limite des départements de Meuse et de Haute-Marne (Andra dossier 2005 sur site web ANDRA).

Dans ce cadre, l'Andra a construit un laboratoire souterrain de recherche (LS) sur la commune de Bure (Meuse) dans le Callovo-Oxfordien. Le LS est constitué de deux puits d'accès verticaux et d'un réseau de plusieurs centaines de mètres de galeries subhorizontales dont le niveau principal se situe à 490 m de profondeur (Delay *et al.* 2007).

Avant la construction du LS de l'Andra, des études microbiologiques en environnement subterrestre argileux avaient été commencées dans le Jura Suisse (Stroes-Gascoyne *et al.*, 2004) dans le cadre du projet international du Mont Terri (Annexe 3). Le projet du Mont Terri porte sur le développement d'un laboratoire méthodologique pour les études liées aux projets

de stockage de déchets radioactifs de haute activité à vie longue. Il se situe dans la formation argileuse des Argiles à Opalinus (Bossart *et al.*, 2008). Les études microbiologiques menées au Mont Terri ont consisté à analyser les communautés microbiennes présentes ainsi que les coproduits issus de leur métabolisme. Les résultats combinés de ces études suggèrent que les Argiles à Opalinus de ce site paraissent contenir une communauté microbienne viable restreinte. Dans la roche, cette microflore est probablement métaboliquement inactive, en raison du manque d'eau et d'espace. Lors des excavations, ces organismes peuvent être réactivés grâce à l'apport d'eau, de nutriment et d'espace.

Sur le site de l'Andra à Bure, des études microbiologiques ont été menées par S. Daumas (2005) et S. Poulain (2006). Ces travaux ont prouvé la présence de bactéries sulfato-réductrices, réputées pour leur pouvoir biocorrosif et fréquemment rencontrées dans de nombreux environnements. D'autres espèces bactériennes, comme les méthanogènes et les réductrices de fer ont également été trouvées. Dans le cas de S. Daumas, ces résultats ont été obtenus par des études de numération, nombre le plus probable (NPP) à deux tubes par dilution. Même si cette technique permet une bonne approche sur la flore microbienne présente, elle n'est pas assez sensible pour détecter l'étendue de la biodiversité présente dans ce type d'environnement. Une étude plus précise de la microflore endogène est donc indispensable pour évaluer le rôle potentiel de ces organismes microscopiques. Les travaux de S. Poulain (2006) ont montré une très faible densité cellulaire dans les sédiments argileux analysés, mais ces travaux ont néanmoins conduit à l'isolement, par approche culturale, de souches montrant la présence d'une biodiversité importante par l'éventail de genres provenant de cluster différents, essentiellement du domaine aérobie.

I.4 LA ROCHE ARGILEUSE DU CALLOVO-OXFORDIEN

I.4.1 Migration des éléments dissous dans un milieu poreux

Les roches renferment de minuscules interstices : les pores, dans lesquels il y a de l'eau. L'eau porale contient des éléments chimiques dissous comme par exemple le chlorure ou le sodium. Ces éléments se déplacent naturellement dans le milieu poreux, selon deux modes :

- * un transport par convection, quand l'eau présente dans les pores de la roche se déplace sous l'effet d'une différence de pression. Elle entraîne avec elle les éléments chimiques dissous.

- * un transport par diffusion, qui est lié à une différence de concentration d'un élément chimique entre deux endroits donnés. Les éléments dissous se déplacent des zones les plus concentrées vers les zones les moins concentrées, pour se répartir uniformément.

I.4.2 Propriétés de confinement

La roche du Callovo-Oxfordien contient environ 8% d'eau en masse (Andra, a, 2005). Pour le stockage de déchets radioactifs, cette eau joue un rôle important. Sur plusieurs dizaines de milliers d'années, elle contribue à l'altération des conteneurs de déchets, dissout les substances radioactives contenues dans les déchets et facilite leur déplacement, permettant ainsi leur dispersion dans le milieu géologique.

La vitesse de migration de ces substances dans le milieu géologique dépend des propriétés de confinement de la roche. La roche argileuse du Callovo-Oxfordien est peu perméable (moins

de 10^{-11} m/s, Andra, a, 2005) et retarde ou limite naturellement la migration des solutés dans le milieu géologique.

Les roches sont composées de minéraux, substances solides caractérisées par un agencement particulier d'éléments chimiques. Les minéraux argileux sont des silicates, constitués d'atomes de silicium et d'oxygène mais également d'aluminium, de fer, de calcium ou encore de potassium. Au sein de la roche, ces minéraux sont organisés en feuillets empilés les uns sur les autres. Cet empilement de feuillets a le pouvoir de fixer un grand nombre d'éléments chimiques.

Du fait de leurs propriétés de rétention remarquables, les couches argileuses sont utilisées comme barrière naturelle pour le stockage de déchets. En plus de leurs capacités de rétention, les roches argileuses susceptibles d'accueillir un stockage en France sont sélectionnées en fonction de plusieurs critères auxquels elles doivent également répondre. Ainsi elles doivent :

- * avoir une épaisseur importante;
- * présenter des propriétés constantes et ne pas être traversées de failles;
- * être très peu perméables et encadrées de couches rocheuses où les écoulements d'eau sont également lents;
- * être adaptées au creusement d'ouvrages souterrains, dotées de qualités mécaniques qui limiteront les perturbations dues à la construction de ces ouvrages;
- * être relativement planes, afin de permettre la construction d'ouvrages souterrains.

De même, les couches argileuses choisies doivent être situées à distance de toute source d'activité sismique ou volcanique. Enfin, le site envisagé doit être éloigné de toute ressource naturelle exploitable (minerai, nappes phréatiques, géothermie...).

Tous ces points ont été mis en place lors de l'énoncé de la loi Bataille du 30 décembre 1991. Les axes principaux de cette loi sont résumés dans l'annexe 1 : Les grands principes de la loi du 30 décembre 1991.

I.4.3 L'argilite

Agée de 160 millions d'années, l'argilite du Callovo-Oxfordien est une roche argileuse étudiée pour le stockage profond des déchets les plus radioactifs du fait de ses propriétés remarquables. Les recherches portent également sur les roches qui encadrent cette couche d'argile.

Le bassin de Paris est une vaste cuvette géologique constituée d'une alternance de couches de roches sédimentaires, à dominante calcaire ou argileuse, déposées dans un environnement marin durant le jurassique moyen et supérieur : de -175 à -145 millions d'années.

Au sein de ces différentes couches, se trouve une roche argileuse compacte : l'argilite du Callovo-Oxfordien. Cette couche de roche s'est déposée il y a environ 160 millions d'années, dans un climat plus chaud qu'aujourd'hui, à partir de sédiments déposés au fond d'une mer, qui recouvrait la région aux âges Callovien et Oxfordien, pendant la période jurassique de l'ère secondaire. Depuis sa formation, cette couche géologique est très stable.

Suite à l'enfoncement progressif du bassin de Paris et aux cycles de dépôt de nouveaux sédiments et d'érosion, cette couche de roche argileuse, épaisse d'environ 130 mètres, est aujourd'hui située entre 400 et 600 mètres de profondeur. Une profondeur suffisante pour ne pas être affectée par des phénomènes géologiques de surface : érosion, glaciation... tout en étant assez proche de la surface pour que la construction d'ouvrages souterrains soit possible.

Dans le milieu naturel, il existe différents types de roches argileuses, classées suivant leur teneur en argile et en autres minéraux (quartz, carbonates, feldspaths, sulfures...) et suivant

leur texture. Le terme argilite désigne une roche argileuse indurée, c'est-à-dire cimentée par des cristaux de quartz et/ou des carbonates, dont la teneur en argile, principalement de la smectite et de l'illite, est d'environ 40 à 45 %.

L'argilite du Callovo-Oxfordien forme une roche grise, homogène et sèche au toucher, quand elle est en profondeur. Elle est caractérisée par :

- * une très faible perméabilité
- * des circulations d'eau très lentes
- * une capacité de rétention élevée des éléments, radioactifs ou non, dissous dans l'eau
- * une bonne résistance mécanique
- * une régularité sur une grande surface
- * un environnement géologique stable depuis sa formation.

La couche d'argilite du Callovo-Oxfordien est entourée de deux couches de roches calcaires, appelés encaissants, dont la perméabilité, bien que supérieure à celle de l'argilite, reste faible. Datant respectivement d'il y a environ 165 et 150 millions d'années, ces deux couches de roche correspondent à l'empilement de couches calcaires d'environ 300 mètres d'épaisseur chacune. En dessous se trouve le Dogger calcaire et au-dessus, l'Oxfordien carbonaté.

La première partie de l'étude bibliographique présente les limites de la vie connues à ce jour et leurs applications au laboratoire de recherche souterrain (LS) de Bure, dans le but de montrer que la présence de microorganismes est possible dans cet environnement. La deuxième partie décrit les différents types de biocorrosion et des bactéries qui lui sont associées.

CHAPITRE II : ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE II : ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES

D'après les travaux antérieurs de Stroes Gascoyne (2004, 2007) et Poulain (2006), il a été montré qu'une microflore viable mais en quantité faible était présente dans la couche sédimentaire du Callovo-Oxfordien (Cox). Ces résultats ont incité l'Andra à poursuivre les investigations sur la microbiologie du Cox. Une étude récente (Urios *et al.*, 2012) a également confirmé ces résultats en montrant la présence de bactéries dans une autre couche argileuse française, datée du Toarcian (-180 million d'années) à Tournemire. Sur les trois travaux ci-dessus cités, seules les méthodes de mise en culture ont permis la caractérisation microbienne de ces couches argileuses, les méthodes de biologie moléculaire n'ayant pas donné de résultats positifs.

Pour s'assurer que les conditions physico-chimiques du Cox sont en adéquation avec la présence potentielle d'une vie bactérienne, nous verrons tout d'abord dans ce chapitre bibliographique les conditions nécessaires à la croissance bactérienne et leurs applications à l'argilite du Callovo-Oxfordien.

Ensuite la deuxième partie sera consacrée à la corrosion et à la corrosion influencée par les microorganismes ou biocorrosion. En effet, certaines bactéries sont connues depuis plus d'un siècle pour leur capacité biocorrosive ou tout du moins pour leur capacité à augmenter les effets de corrosion. Dans un contexte de confinement de déchets radioactifs, en présence de matériaux type aciers et bétons, il est important de savoir si le métabolisme bactérien et surtout les produits issus de ce métabolisme pourraient avoir une influence sur le taux et la vitesse de corrosion de ces matériaux.

II.1 LES LIMITES PHYSICOCHIMIQUES DE LA VIE : APPLICATION AU LABORATOIRE SOUTERRAIN DE RECHERCHE

Tous les microorganismes possèdent leurs propres relations avec l'environnement. Chaque type bactérien a besoin de conditions qui lui sont propres pour assurer sa croissance. Et pour chaque type bactérien, il existe des exceptions aux conditions de croissance (par exemple, la tolérance à l'oxygène chez les bactéries anaérobies strictes).

Ce chapitre doit beaucoup aux travaux de Pedersen et Karlsson (1995) et utilise les résultats des recherches Andra pour la partie application au Laboratoire Souterrain de Recherche (LS), notamment détaillés dans l'article Vinsot *et al.* (2008)

II.1.1 Oxygène et conditions oxydoréductrices

Les relations entre l'oxygène et la croissance bactérienne sont multiples. Cinq types de croissances bactériennes différents peuvent être distingués en fonction de l'utilisation de l'oxygène :

- * Aérobiose obligatoire : l'O₂ est indispensable à la croissance
- * Aérobiose facultative : l'O₂ n'est pas indispensable mais le plus souvent, la croissance est meilleure en sa présence
- * Microaérophilie : l'O₂ est indispensable mais à une concentration inférieure à la concentration atmosphérique
- * Anaérobiose facultative : l'O₂ n'est pas indispensable et le plus souvent, la croissance n'est pas augmentée par sa présence

* Anaérobiose obligatoire : l'oxygène est inutile à la croissance et peut être dangereux voire létal pour certains types bactériens (absence chez ces bactéries de cytochrome oxydase, dernier enzyme de la chaîne respiratoire).

Ces différentes relations sont dues à de nombreux facteurs. On peut citer entre autres l'inactivation de protéines et d'enzymes en présence d'oxygène ou inversement la présence d'oxygène indispensable à leur bon fonctionnement.

De façon similaire, le potentiel d'oxydoréduction varie selon le type bactérien. Les environnements oxygénés possèdent un fort potentiel d'oxydoréduction (aux environs de +400mV pour les plus oxygénés), qui diminue avec la disparition de l'oxygène, résultant le plus souvent de la respiration oxygénique des bactéries. Dans un même environnement, on peut donc être en présence d'une zone oxygénée à fort potentiel d'oxydoréduction, suivie d'une zone microaérophile pour ensuite avoir une zone anaérobie à bas potentiel d'oxydoréduction (pour détail, voir paragraphe II.2.2).

Les mesures de potentiel d'oxydoréduction de l'eau interstitielle donnent des valeurs comprises entre -150 et -220mV ESH (Electrode Standard à Hydrogène). Ces mesures sont en relation avec la teneur en oxygène, en effet, il n'y a pas d'oxygène disponible dans l'eau interstitielle du Callovo-Oxfordien.

Cependant, lors du creusement des ouvrages souterrains et lors de leur exploitation, une ventilation permanente est mise en place. Ainsi, les galeries du stockage constitueront un microenvironnement aérobie (de composition atmosphérique) au sein de la couche du Cox. A la fin de la phase de ventilation et après fermeture de l'ouvrage (des galeries puis du site de stockage lui-même) et une fois tout l'oxygène consommé, ce microenvironnement deviendra anaérobie.

II.1.2 Température

La température affecte profondément la vie sur Terre, notamment les bactéries, mais aussi les autres organismes unicellulaires et poïkilothermes (dont la température interne varie avec celle de l'environnement). Un facteur important de la température est son influence sur la croissance et la thermosensibilité des enzymes. De manière générale, la cinétique des réactions enzymatiques est ralentie à basse température, la cinétique augmentant avec l'augmentation de la température. Au-delà d'un certain seuil, la température devient critique et cause de nombreux dommages comme la dénaturation protéique (transporteur, enzyme), la dégradation de l'ADN et la croissance est finalement inhibée car ces dommages ne peuvent être réparés. Le seuil de température cité ci-dessus varie en fonction du microorganisme. En effet, il existe plusieurs types bactériens en fonction de leurs températures de croissance et pour chaque type bactérien, un minimum, un optimum et un maximum thermique peuvent être définis. En fonction de la température, les organismes sont appelés comme suit :

- * Psychrophile : minimum 0°C, optimum 5-15°C et maximum 20°C
- * Mésophile : minimum 15-20°C, optimum 20-40°C et maximum 45°C
- * Thermophile : minimum 45°C, optimum 55-65°C et maximum 70°C
- * Hyperthermophile : minimum 60°C, optimum 80-100°C et maximum 113°C

Ces classes n'étant pas figées, on peut également parler d'organisme thermotolérant, psychrotolérant ou également de thermofacultatif.

Les thermophiles diffèrent des mésophiles grâce à des protéines plus stables et un système de synthèse protéique capable de fonctionner à haute température.

Dans le Cox, la température est d'environ 20°C, température augmentant avec la profondeur de la couche argileuse mais sans grande variation. On est donc en présence d'un environnement mésophile.

Pour le site de stockage, de fortes variations seront apportées par les colis de déchets radioactifs (type C) atteignant une température maximale d'environ 90°C à leur surface. Confinés dans leurs alvéoles, ils ne devraient pas perturber la température du réseau de galeries (qui restera donc de 20°C) mais perturberont la roche. L'environnement immédiat des alvéoles sera donc de type thermophile à hyperthermophile. La température baissant avec l'éloignement de l'alvéole, on passera ensuite par un environnement thermophile pour revenir à la température initiale de la roche.

II.1.3 L'influence du pH

Le pH fait partie des facteurs influençant très largement les organismes sur Terre. La plus grande partie des protozoaires et bactéries croît à un pH proche de la neutralité entre 6 et 8. Chaque espèce possède une plage de pH dans laquelle la croissance est possible et un pH optimum.

Plusieurs classes peuvent être déterminées en fonction de l'affinité de la bactérie avec le pH :

- * Acidophile : croissance entre 1.0 et 5.5 unités pH
- * Neutrophile : croissance entre 5.5 et 8.5
- * Alkalophile : 8.5 et 11.5
- * Alkalophile extrême : optimum supérieur à 10 unités pH.

Cependant, malgré les grandes variations de pH dans l'environnement, le pH intracellulaire de la plupart des bactéries est proche de la neutralité, neutralité résultant de la difficulté des protons à traverser les membranes (impermeabilité aux protons). De plus, des transporteurs de protons et d'ions hydroxyle permettent de réguler ce pH interne.

Les bactéries peuvent également influencer le pH de leur environnement par la production de métabolites acides ou basiques. Par exemple, les bactéries fermentaires produisent des acides à partir de sucres (carbohydrates) ou encore certains chimiolithotrophes (comme *Thiobacillus*) oxydent les sulfures en acide sulfurique.

Les mesures de pH montrent que le Cox est un environnement neutre, avec un pH mesuré à 7.2 +/- 0.2 unité pH.

II.1.4 Salinité

Les organismes halophiles nécessitent du sel (NaCl) pour leur croissance. La salinité, suivant la concentration en sels dissous, peut être un facteur limitant de la vie, et on peut différencier deux classes de microorganisme en fonction de la salinité.

D'une part les halotolérants, microorganismes qui acceptent une certaine concentration en sel de l'ordre de 1 à 6% de NaCl voire plus mais qui n'est pas indispensable à leur croissance et les halophiles qui nécessitent obligatoirement la présence de NaCl pour leur croissance. Cette concentration peut varier entre 1 et 6% pour les faiblement halophiles jusqu'à 15-30% pour les bactéries halophiles extrêmes (comme *Halobacterium*).

Pour la couche argileuse du Cox, la concentration massique totale en solutés est d'environ 6 g/l (Vinsot *et al.*, 2008). Les cations majoritaires sont le chlore (50mM) et le sulfate (15mM). Les anions majoritaires sont le sodium (50mM), le calcium et le magnésium. Le Cox présente donc une eau faiblement salée.

II.1.5 Conditions de pression

Les organismes piézophiles (ou barophiles) sont des êtres vivants qui ne peuvent vivre qu'en pression hyperbare comme les bactéries ou les archées vivant dans les grands-fonds océaniques. De nombreux vertébrés, invertébrés et des micro-organismes (surtout des procaryotes) sont rencontrés dans des environnements où la pression dépasse souvent 380 atmosphères (38 MPa). Une bactérie barophile, suivant la définition de Kato (1998) est une bactérie qui ne pourra se développer sous une pression inférieure à 50 MPa mais qui peut croître à une pression supérieure à 100 MPa. Pour un organisme non adapté à la pression (membrane lipidique de composition différente, pores adaptés...), cette dernière devient un facteur létal.

A l'inverse, une très grande majorité des organismes décrits actuellement vit à pression atmosphérique ou légèrement supérieure.

La pression dans le Cox est de l'ordre de 40 bars, soit 40 atm ou encore 4 MPa. Cette pression est supérieure à la pression atmosphérique mais n'est pas considérée comme une pression hyperbare.

II.1.6 Métabolisme et disponibilité de la matière organique

Les bactéries peuvent être divisées en quatre grands types nutritionnels en fonction de leurs sources de carbone et d'énergie. Le tableau 1 résume les grands types nutritionnels :

Classe du besoin	Nature du besoin	Type trophique
Source d'énergie	Rayonnement lumineux	Phototrophe
	Oxydation de composés organiques ou inorganiques	Chimiotrophe
Donneur d'électrons	Minéral	Lithotrophe
	Organique	Organotrophe
Source de carbone	Composé minéral	Autotrophe
	Composé organique	Hétérotrophe
Facteurs de croissance	Non nécessaires	Prototrophe
	Nécessaires	Auxotrophe

Tableau 1 : Types trophiques bactériens en fonction de la classe et de la nature du besoin.

La matière organique (MO) pour les organismes hétérotrophes est un élément essentiel. Sans elle, aucune croissance n'est possible. La concentration de la MO est un autre facteur limitant

la croissance bactérienne. Suivant la concentration en MO du milieu naturel, différentes classes de bactéries ont été définies :

- * Oligotrophe : milieu pauvre en MO
- * Mésotrophe : milieu moyennement riche en MO
- * Eutrophe : milieu riche en MO

Les organismes à croissance et métabolisme lent sont idéalement adaptés au milieu oligotrophe (généralement liquide) dans lequel l'accessibilité à la MO est faible.

En culture bactérienne, le besoin en MO est étudié par l'intermédiaire du milieu minimum. La souche est testée dans différentes conditions pour analyser ses besoins nutritionnels. Ainsi, la souche est mise en présence de son substrat de prédilection auquel sont ajoutés ou non d'autres éléments, notamment une concentration en extrait de levure différente (milieu de composition optimal comportant tous les acides aminés nécessaires) : de 0.1, 0.5 ou 1g/l et également en présence ou non de vitamines. Une bactérie qui se multiplie en utilisant uniquement un seul substrat (sans ajout de vitamines ou facteurs de croissance) est considérée comme ayant un milieu minimal nul et donc oligotrophe. Une faible concentration de son substrat de prédilection lui permet d'enclencher sa croissance, sans autres facteurs.

Pour la couche argileuse du Cox, le carbone organique total (TOC pour Total Organic Carbon) a été mesuré à une concentration de 0.03 mole de carbone par litre et la matière organique dissoute à une concentration de 0.007 mole de carbone par litre. Nous sommes donc en présence d'un milieu oligotrophe. Cependant, la variété de composés organiques disponibles est relativement large : de nombreux composés acides, mono- ou di-, saturés ou insaturés avec une longueur de chaîne variable (acide fulvique, humique, propionique, lactique...), différents acides gras (de C7 à C18), des aldéhydes et également des acides aminés et autres petits composés protéiques. Il y a donc un large spectre de matière organique endogène dans le Cox mais qui reste à une concentration très faible (Huclier-Markai *et al.*, 2010).

Pour le site de stockage, la quantité de matière organique qui sera apportée pendant la construction et l'exploitation du site n'est pas encore connue. Deux sources différentes peuvent être citées : les activités humaines et les déchets eux-mêmes (type déchets bituminés) qui pourront être source de MO exogène.

II.1.7 L'eau dans le Cox

Le facteur le plus limitant pour la croissance bactérienne semble être la disponibilité en eau. Parce que la concentration en eau de l'habitat est un facteur limitant de la croissance, il est important de pouvoir quantifier la disponibilité de l'eau. Les micro-organismes ont besoin d'eau "libre" (libre pour les réactions biochimiques) pour se développer. La quantité d'eau disponible pour les bactéries peut être réduite par les interactions avec les solutés (l'effet osmotique) et par l'absorption de la matière (l'effet de la matrice).

La roche du Callovo-Oxfordien est saturée en eau. Sa teneur massique en eau est d'environ 8 % (ce qui équivaut à 8 g d'eau pour 100 g d'argile humide). Il n'y a pas de phase gaz dans le Cox. La perméabilité, qui décrit la propriété de la roche à laisser couler l'eau est très faible de l'ordre de 10^{-12} à 10^{-14} m/s. En prenant la notion de porosité (cf section ci-dessous) qui est de l'ordre de 18 %, on a 18 cm³ d'eau pour 100 cm³ de matière humide. L'eau porale dite « libre » est celle qui n'est pas retenue sur les minéraux et qui peut se déplacer sous l'effet d'un gradient de charge hydraulique. L'eau libre représente environ 50 % de l'eau porale : sur

un volume 1 L de roche humide, 18 % de l'espace est occupé par l'eau et il y a donc 9 % d'eau non structurée sur les parois des pores, soit 90mL. En conséquence, dans cet environnement, la teneur en eau est faible et sa disponibilité est très faible.

Pour le site de stockage, la ventilation continue ne permettra pas la resaturation en eau de la paroi : la roche sera donc encore plus sèche à proximité immédiate des galeries. Cependant, après l'arrêt de l'exploitation et de la ventilation, la roche tendra à se resaturer et le site lui-même sera envahi par l'eau. La disponibilité de l'eau dans les galeries sera donc très forte.

II.1.8 Espace disponible

Les environnements sédimentaires (roche et minéraux) sont des écosystèmes très différents des environnements terrestre et aquatique. L'eau y est un élément ubiquiste mais le ratio entre la surface (m^2) et le volume d'eau (m^3) est faible et de manière générale on est en présence d'un espace disponible relativement faible pour l'eau et donc les microorganismes.

Les organismes subterrannéens se trouvent donc dans des espaces libres, au sein des structures, les anfractuosités mais aussi dans les pores du sédiment. Plus le rapport volume-surface est grand, plus l'espace disponible est grand, et donc plus l'espace réellement disponible pour l'eau et les microorganismes sera grand.

La porosité totale est définie comme le rapport entre le volume des vides (V_v) et le volume total (V_t) de la roche. Le volume des vides comprend tout l'espace non occupé par les phases solides ($V_t - V_s$). Ainsi, la porosité totale comprend la porosité connectée (fraction volumique des vides reliés entre eux) et la porosité non connectée encore appelée porosité piégée. Les variations de porosité totale résultent d'une diversité de processus sédimentaires et diagénétiques ayant affecté la roche au cours de son histoire. En contexte géologique naturel, les roches constituent des réservoirs dont les pores peuvent être occupés par de l'eau, des gaz ou d'autres fluides.

Les cellules micrométriques sont adaptées à ce type d'environnement. La taille moyenne admise par la communauté scientifique se situe entre 0.2 et $4\mu m$, pour une cellule vivante. Cependant les microorganismes peuvent réduire leur taille par plusieurs mécanismes différents :

* La sporulation qui permet à l'organisme d'adopter une forme de résistance extrême, qui sera suivie par une germination quand les conditions seront plus favorables à la cellule. Durant cette phase, la paroi membranaire change de composition pour être plus résistante à la dessiccation, la chaleur, le pH. La spore est formée au sein même de la bactérie qui entrera en lyse une fois la spore produite. Toutes les bactéries ne sont pas sporulantes.

* La dormance. Cet état est moins drastique que la sporulation, il est représenté par une diminution du contenu cytoplasmique. La cellule reste viable mais n'entre plus dans le processus de division cellulaire. Il se présente notamment dans des conditions d'oligotrophie : l'environnement ne représentant pas une menace directe pour la viabilité de la cellule, celle-ci n'entre pas en sporulation mais la quantité de matière organique disponible étant faible et ne permettant pas la division cellulaire, la bactérie entre alors en dormance (Velimirov, 2001).

* Il existe également des ultras microbactéries (ou encore nanobactéries). Ces bactéries survivent à des périodes de privation de nutriments par la réduction de leur taille. Elles peuvent ainsi atteindre une taille de 200 nm pour un volume compris entre 0.014 et $0.06 \mu m^3$ (Velimirov, 2001) Cet état est différent de la dormance.

La vie peut donc être active dans des espaces libres (cassure, infractuosité) sous la surface et être en dormance dans des pores sédimentaires ou des micro-environnements oligotrophes.

La formation argileuse du Callovo-Oxfordien et les plateformes carbonatées encaissantes de Meuse/Haute-Marne possèdent leurs propres porosités mais qui sont remplies d'eau. D'après les mesures de porosimétrie au mercure (Sammartino *et al.*, 2001), la porosité de l'argilite du Callovo-Oxfordien se présente principalement (Figure 1) sous la forme d'une macroporosité (entre 5 et 20 % de la porosité totale en moyenne, taille des pores supérieure à 50 nanomètres), d'une mésoporosité (entre 75 et 90 % en moyenne, taille des pores comprise entre 3 et 50 nanomètres), et enfin d'une microporosité (entre 2 et 4 % en moyenne, taille des pores inférieure à 3 nanomètres) (Figure 2). La macroporosité est associée aux minéraux détritiques (quartz) et aux agrégats argileux, c'est une porosité inter-agrégats et inter-grains.

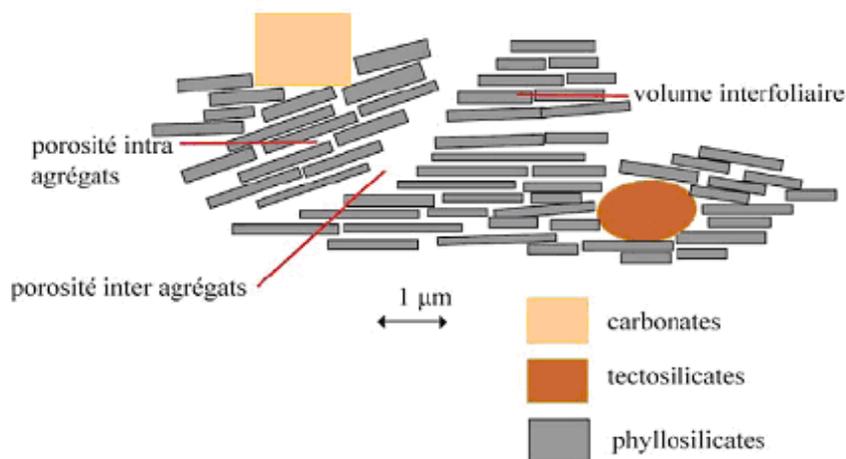


Figure 1 : Représentation schématique du réseau poreux de l'argilite du Cox (Source : Leroy 2005, Transport ionique dans les argiles. Influence de la microstructure et des effets d'interface. Application à la roche du Callovo-Oxfordien sur le site de Bure).

La mésoporosité est une porosité intra-agrégat argileux, située entre les particules d'argile (interparticulaire). Une grande partie de la macroporosité est une porosité piégée. Cependant, la porosité interne de la matrice argileuse, qui représente près de 90 % du volume poreux total, est généralement connectée.

La roche argileuse du Cox a une porosité très faible, avec des pores pour la plupart de l'ordre du nm, cependant, on retrouve un faible pourcentage de pores de l'ordre micrométrique, seul endroit suffisamment grand pour le développement bactérien.

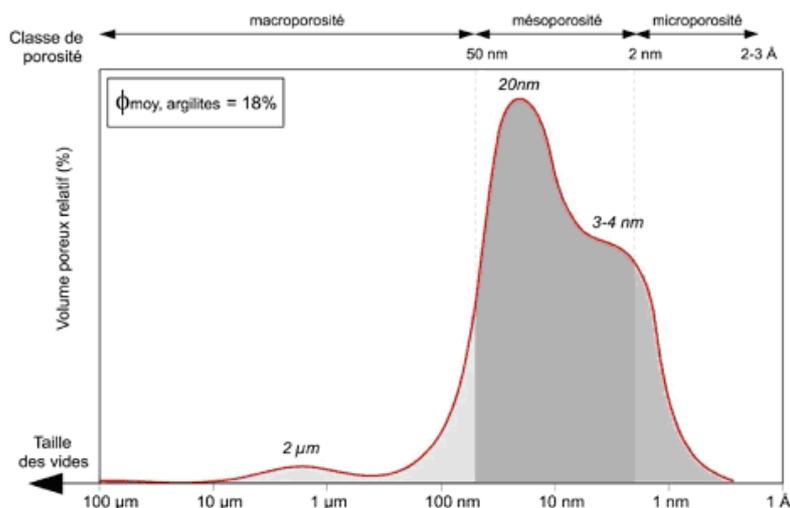


Figure 2 : Modèle conceptuel de distribution des tailles de pore dans les argilites du Cox (Source : Document interne ANDRA 2005, Référentiel du site de Meuse/Haute-Marne).

II.2 CORROSION ABIOTIQUE ET BIOCORROSION DES ACIERS

Dans tout ce travail le terme corrosion désigne une corrosion de type abiotique et le terme biocorrosion désigne l'influence de microorganismes sur le taux corrosion abiotique.

Les mécanismes de la corrosion sont des processus très complexes mais ubiquitaires dans les environnements terrestres et aqueux. Ils se composent de phénomènes abiotiques et biotiques. La corrosion est un procédé qui implique la détérioration ou la dégradation d'un composant métallique par une action chimique ou électrochimique. Ce processus requiert un transfert d'électrons en présence d'un électrolyte via une série de réaction d'oxydation (anodique) et de réduction (cathodique). Il en résulte un changement des propriétés chimiques des matériaux, incluant la perte de masse. On sait que la participation des bactéries productrices d'H₂S à la constitution de biofilms est une condition importante à la manifestation des phénomènes de corrosion mais pas uniquement. Nous verrons dans cette partie les différents phénomènes de corrosion, en premier lieu les phénomènes abiotiques puis les phénomènes biotiques, encore appelés biocorrosion ou Microbiologically Influenced Corrosion (MIC).

II.2.1 Fragilisation des aciers par l'hydrogène

Cette partie doit beaucoup aux travaux de Coudreuse *et al.*, 2000.

Les situations pouvant conduire à des phénomènes de fragilisation des aciers par l'hydrogène (FPH) sont nombreuses et diverses : introduction d'hydrogène lors de l'élaboration du matériau, d'opérations de transformation et de mise en œuvre (traitements thermiques, soudage), utilisation des aciers en présence d'hydrogène ou de mélanges gazeux hydrogénés, hydrogène produit par des réactions électrolytiques, hydrogène provenant des réactions de corrosion (environnement aqueux).

Une manière de classer les différents phénomènes de FPH peut se faire suivant la source d'hydrogène (Figure 3) qui peut être soit interne au matériau lui-même soit externe. On peut citer pour les sources internes notamment l'introduction d'hydrogène lors de l'élaboration, de la mise en œuvre ou encore lors de la mise en service du matériau, donc préalablement aux problèmes de FPH. Cette partie ne traitera que des problèmes de FPH par source externe, la source interne résultant uniquement de la fabrication même du matériau. Pour ce cas de source externe, une distinction sera faite entre une faible ou une forte concentration en hydrogène.

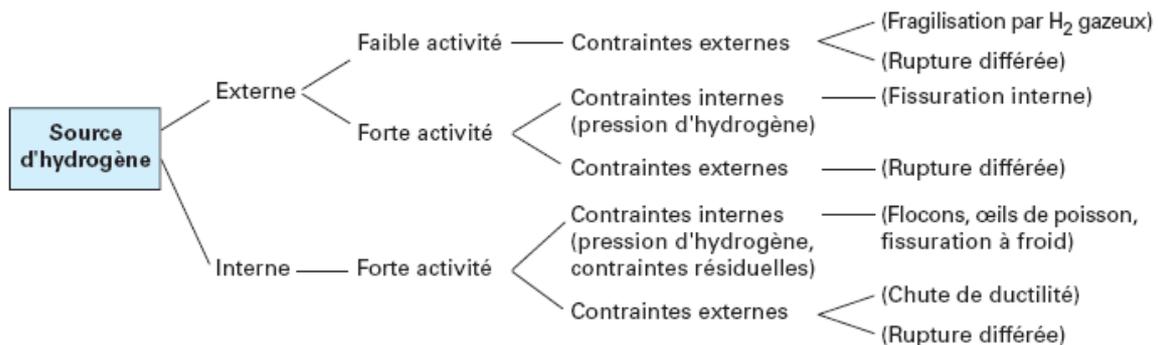


Figure 3 : Classification des phénomènes de fragilisation par l'hydrogène (source : Dossier m175 : Techniques de l'ingénieur).

II.2.1.1 Fragilisation par hydrogène externe, sous forte activité

Ce cas de figure se retrouve lorsque le matériau est exposé à un environnement, source d'hydrogène, susceptible de rendre possible la pénétration ou la diffusion de quantités importantes d'hydrogène dans l'acier. Il s'agit en général d'environnements aqueux pour lesquels l'activité en hydrogène est due à la réaction cathodique de décharge d'hydrogène (réaction abiotique qui peut être influencée par les microorganismes).

- Fissuration induite par l'hydrogène

Ce type d'endommagement est souvent désigné par les termes anglais, soit de Hydrogen Induced Cracking (HIC, fissuration induite par l'hydrogène), soit de Blistering, (cloquage, Figure 4), soit de Step Wise Cracking (fissuration en escalier). Il a fréquemment été décrit pour les environnements contenant de l'hydrogène sulfuré (H_2S) en présence d'humidité.

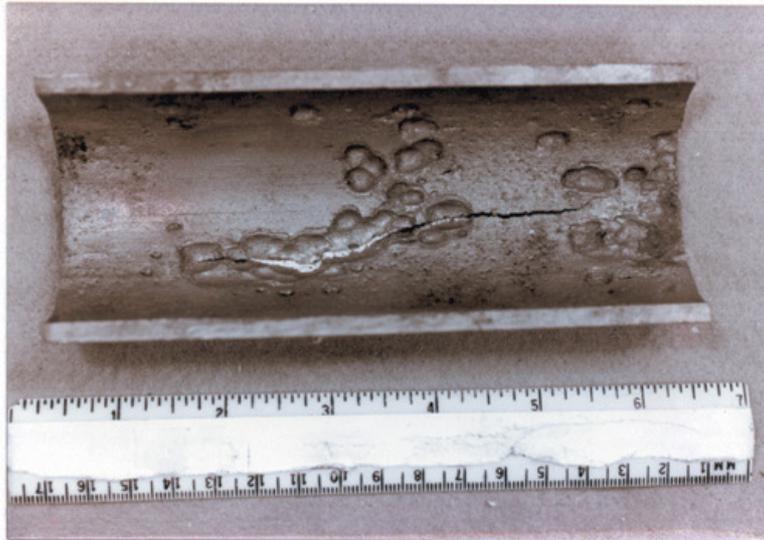


Figure 4 : Photo de la fragilisation par l'hydrogène de type « cloques » sur une surface métallique.

Dans ces environnements généralement acides en raison de la présence de CO_2 , une réaction de corrosion se produit en surface du matériau. À la réaction anodique de base de dissolution du métal est associée une réaction cathodique de décharge d'hydrogène à la surface du matériau. L' H_2S agit comme un poison qui, en freinant la recombinaison d'hydrogène sous forme moléculaire, favorise la diffusion d'hydrogène dans l'acier. Des quantités élevées d'hydrogène peuvent ainsi être introduites dans le matériau. L'hydrogène en sursaturation peut se recombinaison sous forme d'hydrogène moléculaire aux interfaces avec les défauts de la structure comme les inclusions ou encore les carbures (carbures métalliques, où le carbone est associé au calcium, au fer, au tungstène, etc.). Sous l'effet de pressions importantes (jusqu'à 10 000 bars), une fissure peut s'amorcer et se propager. La propagation des fissures est d'autant plus aisée qu'il y a présence de structures sensibles (comme les ségrégations qui se définissent par la formation d'une hétérogénéité dans la composition chimique qui peut se produire lors d'une solidification ou d'un traitement thermique). Ce type d'endommagement se produit en l'absence de contraintes externes appliquées. Il est généralement observé pour des aciers présentant des caractéristiques mécaniques relativement faibles, tels que les aciers au carbone ou faiblement alliés utilisés pour la fabrication de pipelines ou d'appareils à pression. Tous les environnements susceptibles de favoriser l'absorption de quantités importantes d'hydrogène par le matériau peuvent être à l'origine des mêmes phénomènes pour ce type d'acier.

- Rupture différée, propagation de fissure

Les conditions de service qui permettent l'absorption de quantités importantes d'hydrogène peuvent également conduire à des problèmes de rupture différée ou de propagation de fissures. Là encore les environnements contenant de l' H_2S humide sont propices à ce type d'endommagement. On utilise alors fréquemment le terme de Sulfide Stress Cracking (SSC) (Figure 5). En général, pour un matériau donné, la sensibilité au phénomène de SSC est d'autant plus grande que les caractéristiques mécaniques sont élevées. Un cas particulier de rupture différée combine les phénomènes de SSC et de HIC. Il s'agit du phénomène dit de SOHIC (Stress Oriented Hydrogen Induced Cracking) (Figure 5). Il se manifeste dans les aciers faiblement alliés sensibles au phénomène de HIC en présence de contraintes.

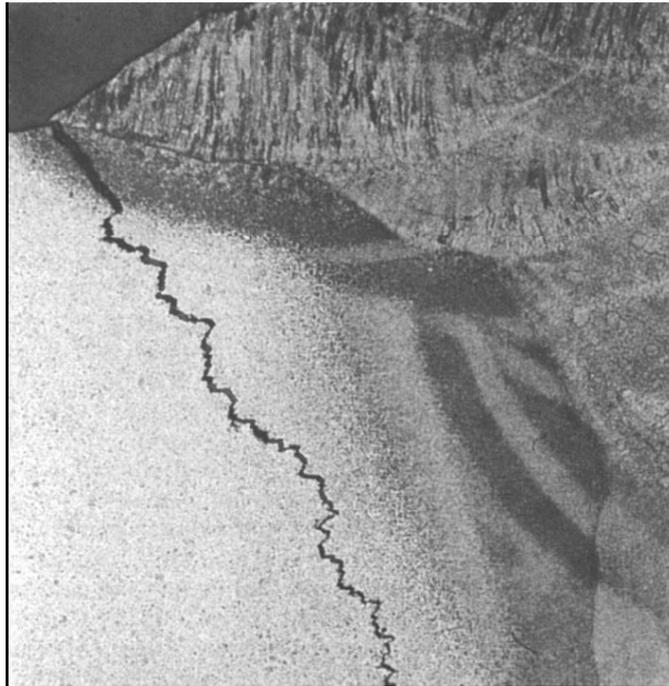
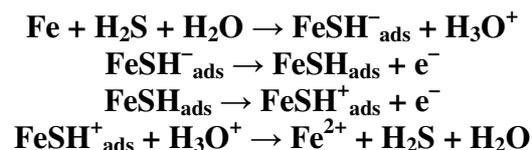


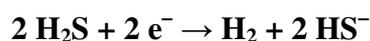
Figure 5 : Photo d'une fissure qui s'est amorcée dans la zone affectée de la soudure (SSC) et se propage par un mécanisme de SOHIC dans le métal de base. (Source : Dossier m175 : Techniques de l'ingénieur).

- Mécanisme chimique de l'action abiotique de l'H₂S

Les propriétés corrosives de l'H₂S pour le fer sont bien connues (Iofa *et al.*, 1964 ; Shoesmith *et al.*, 1980 ; Cheng *et al.*, 1998). En milieu abiotique sulfuré neutre ou alcalin, le fer se corrodé uniformément. La réaction anodique se compose d'une séquence d'étapes de chimisorption et de décharges anodiques :



Dans cette séquence, l'H₂S est tout d'abord adsorbé (ads) chimiquement à la surface métallique. Surviennent ensuite les réactions de décharge électronique. C'est la troisième réaction de la séquence qui exerce le contrôle cinétique sur la séquence de réactions anodiques. Dans la quatrième réaction, Fe²⁺ est incorporé à la couche de mackinawite (FeS_(1-x)) existante. La réaction cathodique est gouvernée, selon Costello (1974), par la réduction du sulfure d'hydrogène comme suit :



En milieu liquide saturé en H₂S (3,5 g×l⁻¹), l'acier se corrodé uniformément dans une gamme de pH compris entre 6 et 13 (Dvoracek, 1976). Les produits de corrosion formés progressent des formes les plus riches en fer jusqu'aux formes les plus riches en sulfures, de FeS_(1-x) à FeS₂, via le Fe_(1-x)S et le FeS (Wikjord *et al.*, 1980).

II.2.1.2 Fragilisation par l'hydrogène externe, sous faible activité

- Hydrogène gazeux

La fragilisation en présence d'hydrogène gazeux des aciers faiblement alliés se manifeste en général au voisinage de la température ambiante. Ce type de fragilisation se traduit par une dégradation des caractéristiques mécaniques du matériau et, en particulier, des caractéristiques de ductilité. Une déformation plastique est généralement nécessaire pour qu'il y ait fragilisation en présence d'hydrogène gazeux. L'hydrogène gazeux a en outre un effet sur l'accélération des vitesses de fissuration.

- FPH et corrosion sous contrainte

Les phénomènes de corrosion sous contrainte concernent de nombreux couples/environnements. Ce terme s'applique lorsqu'un matériau est soumis à l'action conjointe d'un environnement chimique et de sollicitations mécaniques constantes. Le matériau subit alors une fissuration qui se différencie d'une rupture mécanique pure. Des phénomènes de corrosion sous contrainte peuvent se manifester dans des environnements humides chargés en chlorures ou en espèces soufrés. Il est maintenant établi que l'hydrogène produit lors des réactions de corrosion est à l'origine des fissurations observées.

II.2.2 Corrosion influencée par les microorganismes ou biocorrosion

La biocorrosion ou corrosion influencée par les microorganismes (MIC pour Microbiologically Influenced Corrosion) est le résultat d'interactions le plus souvent synergiques, entre la surface métallique et les produits de corrosion abiotiques d'une part et les cellules bactériennes (associées en biofilm) et le produit de leur métabolisme d'autre part. Ce dernier inclut les acides organiques et inorganiques et les composés volatils comme l'ammoniac et l'hydrogène sulfuré. L'importance de la synergie bactérienne a récemment été confirmée par des études sur la corrosion de l'acier par des bactéries isolées d'échantillon de roche (Yucca Mountain) obtenue dans le cadre d'une étude sur le stockage de déchets radioactifs de haute activité (Pitanzo *et al.*, 2004). Ces travaux ont montré que le taux de corrosion obtenu avec différentes combinaisons de cultures bactériennes mixtes était considérablement plus élevé que celui mesuré avec des cultures pures. La Figure 6 illustre un exemple de synergie entre un métabolisme aérobie et un métabolisme anaérobie (BSR).

Les principaux types de bactéries associés aux surfaces métalliques en environnement terrestre ou aqueux sont les bactéries sulfato-réductrices, les bactéries oxydant le soufre, les bactéries oxydant/réduisant le fer, les bactéries oxydant le manganèse et les bactéries produisant des acides organiques.

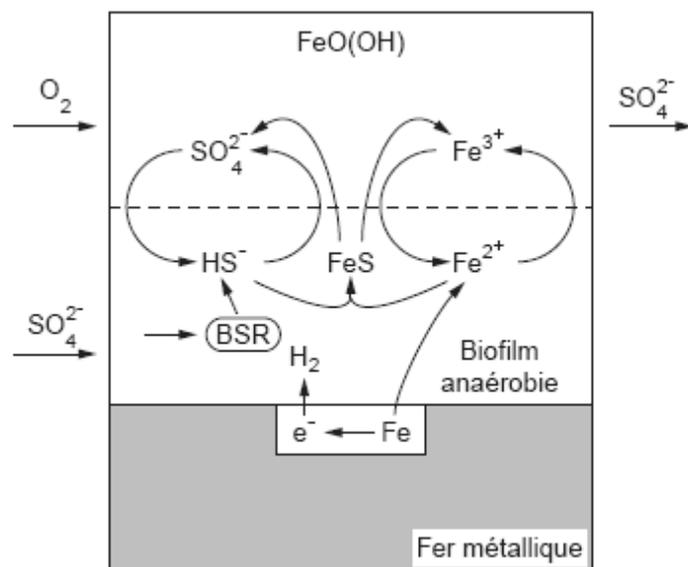


Figure 6 : Relations entre métabolismes aérobie et anaérobie dans les biofilms naturels (source : Nielsen *et al.*, 1993). Echange de composés entre zones aérobie et anaérobie à différents niveaux d'oxydoréduction.

Ces bactéries coexistent naturellement en biofilms, formant des consortia complexes et corrodant les surfaces métalliques (Baker *et al.*, 2003, Kjellerup *et al.*, 2003 et Zhang *et al.*, 2003). La Figure 7 est une illustration schématique de la formation d'un biofilm.

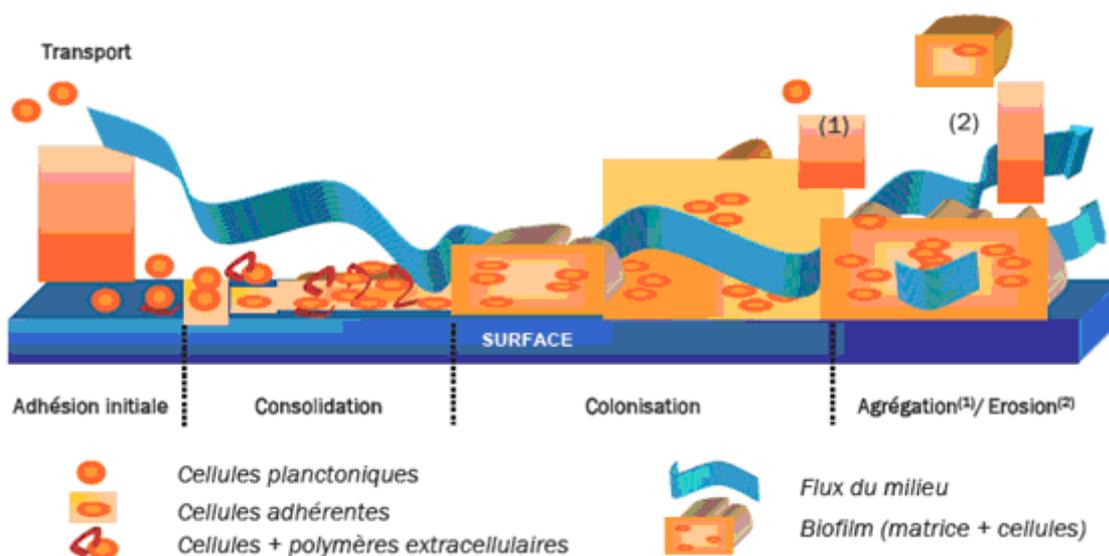


Figure 7 : Schéma de la formation d'un biofilm (source : Marconnet, 2007)

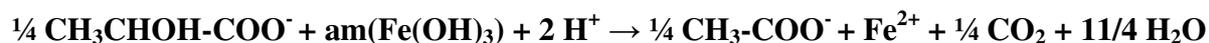
Nous verrons dans la partie suivante l'état des connaissances sur l'impact de la respiration microbienne du fer sur la corrosion, l'impact des bactéries sulfato-réductrices sur la corrosion et pour finir sur l'action des enzymes bactériennes et des substances polymériques extracellulaires sur la corrosion.

II.2.2.1 Respiration microbienne du fer : impacts sur les processus de corrosion

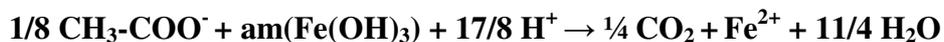
- Généralités sur les bactéries réduisant le fer

Des bactéries réduisant le fer (IRB pour Iron-reducing bacteria) ont été trouvées sous forme de biofilms sur des surfaces d'acier corrodées (Dawood et Brozel, 1998). Il existe deux formes de réduction du fer. Une dite « assimilatrice » où la bactérie, via des sidérophores (chélateurs de fer) va récupérer et transporter le fer environnant à l'intérieur de la cellule pour permettre la synthèse de protéines de type hémique ou avec des centres Fer-Soufre. Parce que seule une concentration de fer sous forme de trace est requise pour la réduction assimilatrice du fer, il est certain que cette forme de réduction ne peut affecter significativement les concentrations de fer environnantes (Lee et Newman, 2003). La seconde forme de réduction du fer est dite « dissimilatrice ». La réduction dissimilatrice du fer est un mécanisme permettant de générer de l'énergie pour la cellule bactérienne. Elle implique un transfert d'électrons dans le cadre des voies respiratoires ou fermentaires (Lovley, 1997). Comme les organismes fermentaires ont la capacité d'utiliser une quantité non négligeable de fer, la réduction dissimilatrice du fer est la voie la plus susceptible d'influencer la corrosion.

La réduction dissimilatrice du fer couple l'oxydation de substrats organiques, comme le lactate ($\text{CH}_3\text{CHOH-COO}^-$) ou l'acétate ($\text{CH}_3\text{-COO}^-$), à la réduction du Fer(III) en Fer(II) suivant la réaction :



$$\Delta G^\circ = -95.2 \text{ kJ/mol am(Fe(OH)}_3)$$



$$\Delta G^\circ = -85.1 \text{ kJ/mol am(Fe(OH)}_3)$$

La formation du fer amorphe (solide) de formule $\text{am(Fe(OH)}_3)$, se déroule suivant les réactions suivantes. Le fer amorphe est considéré comme un produit de la corrosion :



¹ Cette équation représente la réaction basique de corrosion, couplant l'oxydation du fer (réaction anodique) à la réduction de l'oxygène (réaction cathodique) à la surface du métal, dans un environnement oxygéné.

Le Fe(OH)_3 peut ensuite être converti sous d'autres formes d'oxyde de fer comme la goethite ($\alpha\text{-FeOOH}$) ou l'hématite (Fe_2O_3).

- Effets des IRB sur les surfaces métalliques

Il y a conflit dans la littérature à propos des effets des IRB sur les surfaces métalliques. Certains auteurs affirment que les IRB promeuvent la corrosion alors que d'autres affirment que les IRB inhibent la corrosion.

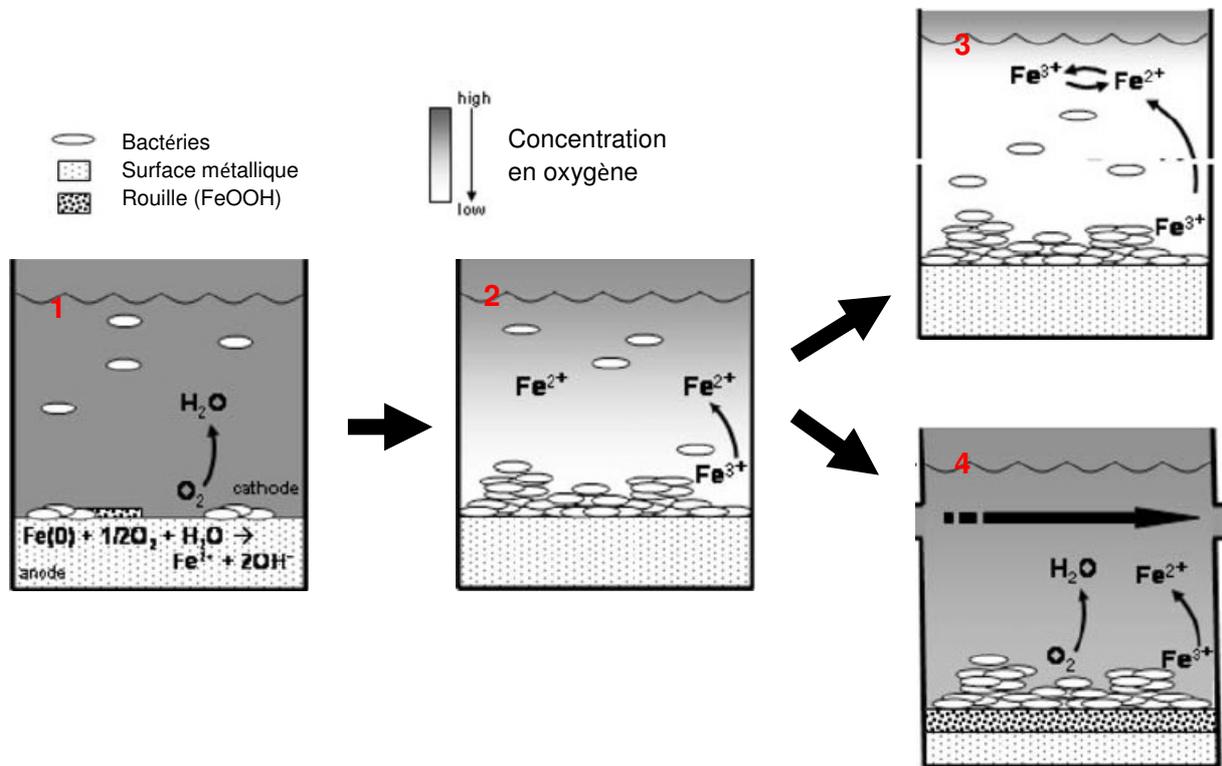


Figure 8 : Illustration du processus de MIC ou d'inhibition de la corrosion par les IRB facultatives (source : Lee et Newman, 2003).

Ces différences concernant l'effet des IRB sur la corrosion peuvent être réconciliées en considérant le développement métabolique des biofilms que les IRB forment sur les surfaces métalliques (Figure 8). Il est maintenant connu que l'attachement localisé des bactéries et leur croissance créent des zones anoxiques au niveau de la surface métallique alors que d'autres parties de la surface métallique restent en contact avec l'oxygène dissous de la phase aqueuse environnante (1). Ce zonage conduit à la formation de gradient d'oxygène et de cellules de corrosion, où les électrons sont transférés du Fe(0) (anode) à l'O₂ (cathode) (Angell, 1999). Cependant, ce gradient local d'O₂ à la surface métallique est transitoire (2), en raison du développement bactérien. La disparition progressive de l'oxygène va avoir pour résultat la disparition des sites anodique et cathodique. Si l'oxygène reste indisponible pour la croissance bactérienne, les IRB facultatives vont alors utiliser le Fe(III) comme accepteur primaire d'électrons (Beliaev *et al.*, 2002). Ce changement métabolique permettra l'accumulation de Fe(II) en solution, créant ainsi un environnement anoxique et un bouclier chimique où le Fe(II) réduira tout l'oxygène présent. Fe(II) est alors oxydé en Fe(III) qui à son tour sera réduit par la respiration bactérienne. Dans ce schéma en milieu liquide statique, ou avec un flux d'eau anoxique, l'élimination rapide de l'oxygène résiduel facilite l'inhibition de la

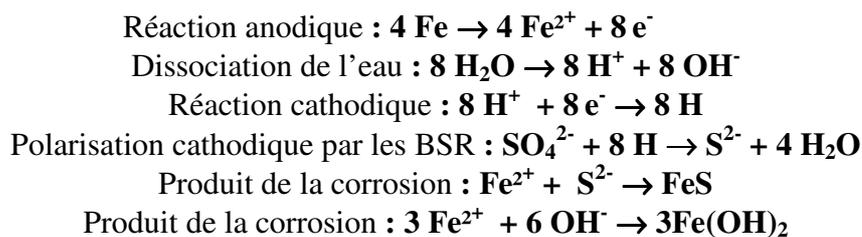
corrosion (3). Mais en milieu non statique, le Fe(II) est dilué et l'apport en oxygène dissous constant ce qui diminue l'inhibition de la corrosion et favorise la MIC (4).

II.2.2.2 Bactéries sulfato-réductrices et corrosion

Les mécanismes avancés pour rendre compte de l'influence de micro-organismes dans le déroulement du processus de biocorrosion prennent généralement en considération le rôle électrochimique exercé par les sulfures de fer. Pour certains auteurs, le phénomène de biocorrosion s'explique uniquement par la formation de ces sulfures dans un mécanisme qui s'apparente à celui de la corrosion abiotique par l'H₂S. Pour d'autres auteurs, au contraire, un rôle spécifique des micro-organismes est nécessaire pour rendre compte des cinétiques rapides observées en biocorrosion. Ainsi, deux théories principales sont avancées pour expliquer ces cinétiques : celle de la dépolarisation cathodique et celle de l'acidification bactérienne.

- Théorie de la dépolarisation cathodique

La théorie de la dépolarisation cathodique (ou théorie VWK pour Von Wolzogen Kühn) est encore actuellement la plus couramment citée pour justifier les vitesses importantes enregistrées en biocorrosion anaérobie. La base de cette théorie a été initialement formulée en 1934 par Von Wolzogen Kühn et Van Der Vlugt. Elle postule la consommation microbiologique de l'hydrogène provenant de la réaction cathodique par le mécanisme suivant (Mc Neil et Little, 1990) :



La réaction globale s'établissant comme suit :



La dépolarisation cathodique suppose que seules les BSR qui possèdent une hydrogénase sont capables de produire, par déplacement d'équilibres, des vitesses de corrosion importantes. Pour certains auteurs, cette condition serait effectivement vérifiée. Ainsi, Bryant *et al.* (1991) ont isolé des populations mixtes de BSR à partir d'oléoducs corrodés mais également à partir d'oléoducs non corrodés. Le biofilm corrosif (7,8 mm/an) présente une activité hydrogénase positive tandis que le biofilm non corrosif (0,5 mm/an) ne manifeste aucune activité hydrogénase mesurable. La théorie de la dépolarisation cathodique suppose que l'élimination de l'hydrogène constitue l'étape cinétiquement limitante dans la séquence réactionnelle. Cette situation est cependant peu probable puisque la réaction d'élimination de l'hydrogène est classiquement considérée comme étant un processus irréversible (Videla, 1988 ; Crolet, 1990). La participation des hydrogénases bactériennes n'occupe donc peut-être pas le rôle qu'on lui a attribué pendant des années. Cela n'exclut pourtant pas l'existence, dans les biofilms naturels anoxiques, de relations syntrophiques de type classique entre espèces productrices et espèces consommatrices d'hydrogène

- Influence de l'acidification bactérienne

Il est aujourd'hui admis que, dans le processus électrochimique de corrosion, la dissolution anodique du fer en présence d' H_2S est d'autant plus importante que le pH du milieu est bas (Cheng *et al.*, 1998). Crolet *et al.* (1992) ont alors proposé qu'une zone anodique pouvait se former par une acidification locale résultant du métabolisme bactérien. Tous les microorganismes modifient, par leur croissance, les propriétés acido-basiques du milieu (excrétion de métabolites comme l'acide acétique, l' H_2S , le CO_2). Cependant, en termes de physiologie cellulaire, un mécanisme de régulation externe est peu probable (Crolet *et al.*, 1992). C'est en réalité la régulation intracellulaire du pH qui est connue pour être déterminante (notamment pour la fonctionnalité enzymatique de la bactérie). Chez les BSR, le pH conditionne un facteur essentiel : la disponibilité en fer. L'acidification, sous les biofilms, est susceptible de rendre possible une croissance bactérienne par libération d'ions Fe^{2+} devenus limitant pour le microorganisme (à pH moins acide, la disponibilité en Fe^{2+} est plus faible qu'à un pH plus acide (Billy, 1973, Marchal, 1999)). L'acidification de l'environnement bactérien immédiat pourrait donc contribuer à satisfaire l'exigence nutritionnelle en ions Fe^{2+} des bactéries sulfurogènes. Ce besoin nutritionnel est en effet primordial compte tenu de l'implication du fer dans la biosynthèse des cytochromes dans la chaîne respiratoire des BSR (Postgate, 1984). La disponibilité en ions ferreux qui dépend principalement du pH est donc une condition essentielle pour la croissance des BSR et permet de promouvoir l'effet biocorrosif de ce type de bactéries.

II.2.2.3 Action des substances polymériques extracellulaires

Le développement d'un biofilm est facilité par la production de substances polymériques extracellulaires (EPS pour Extracellular Polymeric Substances) comprenant des macromolécules comme les protéines, les polysaccharides, les acides nucléiques et les lipides. La capacité des EPS à se lier aux ions métalliques est importante pour les réactions de MIC (Kinzler, 2003 ; Sand, 2003 et Rohwerder, 2003) et dépend des espèces bactériennes présentes et de la nature des ions métalliques. La liaison des ions métalliques aux EPS implique des interactions entre l'ion et des groupes fonctionnels anioniques (ex : groupe carboxyle, phosphate, sulfate, glycérate, pyruvate et succinate), groupes communs aux protéines et carbohydrates des EPS. En particulier, l'affinité de ligands anioniques pour des ions multivalents (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+}) peut être très forte. La présence et l'affinité pour les ions métalliques dans des états d'oxydation différents dans la matrice du biofilm peut induire un décalage dans les potentiels standards de réduction. Par exemple, le potentiel redox du couple Fe(II/III) varie significativement avec différents ligands (de +1.2 V à -0.4V). Les EPS liant les ions métalliques peuvent, de plus, agir comme des « navettes » pour les électrons et peuvent ouvrir la voie à de nouvelles réactions redox dans le système métal/biofilm, comme un transfert direct d'électrons du métal (fer) ou d'un biominéral (FeS). Avec la présence d'un accepteur d'électrons adapté (O_2 en condition aérobie et nitrate ou sulfate en condition anaérobie), cette voie d'oxydoréduction peut mener à la dépoliarisation de la cathode et augmenter la corrosion (Beech and Sunner, 2004). Bien que la présence d'ions métalliques dans la matrice du biofilm ait été reconnue comme pertinente dans les phénomènes de MIC, l'implication probable des EPS liées aux ions métalliques dans le transfert direct d'électrons à partir du métal de base à un accepteur d'électrons approprié a été négligée.

Une étude récente de biofilms incrustés sous des dépôts d'hydroxyde de fer a révélé que des exopolymères bactériens (très probablement des acides polysaccharidiques) pourraient agir comme intermédiaires dans l'assemblage des cristaux d'akaganeites ($\beta\text{-FeOOH}$) (Chan, 2003). La minéralisation observée provient du contact entre des EPS et du fer oxydé, par

l'intermédiaire de la liaison entre le fer ferrique et les groupes carboxyliques des polymères. Les auteurs ont souligné que l'oxydation des ions ferreux et la précipitation d'oxyhydroxydes de fer qui en découle mélangés aux EPS, libère des protons, menant à une acidification du pH extracellulaire. Ils en concluent que le but de la production d'EPS est de biominéraliser les précipités d'oxyhydroxyde de fer aux alentours immédiats des cellules, augmentant ainsi la génération d'énergie métabolique à travers l'augmentation de la force proto-motrice.

Mis à part la biominéralisation à l'intérieur de la matrice du biofilm et son influence majeure sur le niveau d'activité des organismes dans le biofilm, le phénomène décrit a également une implication dans la biocorrosion. En présence de Fe^{2+} , les couches d'oxyhydroxydes de fer liées aux EPS du biofilm peuvent absorber le fer ferreux menant à son oxydation, fournissant ainsi une contribution supplémentaire aux réactions cathodiques et influençant ainsi le taux de corrosion.

II.2.2.4 Cas particulier d'EPS : enzymes et biocorrosion.

L'activité enzymatique présente dans les biofilms est facilement mesurable, cependant l'importance des réactions avec pour intermédiaire ces enzymes a été seulement récemment considérée comme applicable à la biocorrosion (Beech, 2003 ; L'Hostis, 2003 et Busalmen, 2002). En particulier, les études pour déterminer les mécanismes qui augmentent le potentiel de corrosion libre (E_{corr}), encore appelé anoblissement, de l'acier inoxydable, souvent retrouvé dans les eaux naturelles oxygénées, mettent en lumière la présence d'enzymes (quand le potentiel de corrosion libre E_{corr} dépasse le potentiel d'apparition de piqûres E_{piq} , la corrosion localisée peut se déclencher). Une baisse d'anoblissement a été observée quand un biofilm était traité par de l'azoture de sodium (NaN_3), inhibiteur connu de la chaîne respiratoire microbienne et d'enzymes comme les catalases, les peroxydases ou encore les superoxyde-dismutases. Ces enzymes sont impliquées dans les réactions de réduction de l'oxygène et par conséquent elles peuvent faciliter la corrosion en accélérant l'ensemble des réactions cathodiques (Beech and Sunner, 2004). Cependant, il est important de prendre en compte que la capacité de ces enzymes à accélérer la réduction de l'oxygène, dépend fortement de la chimie de la surface métallique. L'effet de catalases extracellulaires produites par les espèces du genre *Pseudomonas* sur des laitons d'aluminium est l'un des meilleurs exemples d'une telle relation (Busalmen, 2002). Cette étude a montré que la présence de catalases influence fortement la cinétique de réduction de l' H_2O_2 (produit durant la réduction de l'oxygène) sur le taux de corrosion de laitons d'aluminium. Une augmentation du courant cathodique (supérieur à 60%) a été mesurée quand la surface métallique était composée essentiellement de CuO . Avec une monocouche de Cu_2O sur la surface métallique, il n'y avait aucun changement du courant cathodique. Avec la présence simultanée de Cu_2O et CuO , une augmentation de 35% du courant cathodique a été mesurée. La Figure 9 présente le mécanisme des catalases durant la MIC. Ce mécanisme couple la réduction par les catalases du peroxyde d'hydrogène suivant la réaction : $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ avec le processus de réduction de l'oxygène à la surface métallique. Il est communément accepté que la réaction de réduction de l' O_2 peut se dérouler suivant deux mécanismes différents : un mécanisme à une étape mettant en jeu 4 électrons, sans formation d'intermédiaire de réaction et un mécanisme comprenant deux étapes mettant en jeu 2 électrons chacune, avec H_2O_2 ou HO_2^- comme intermédiaires de réaction.

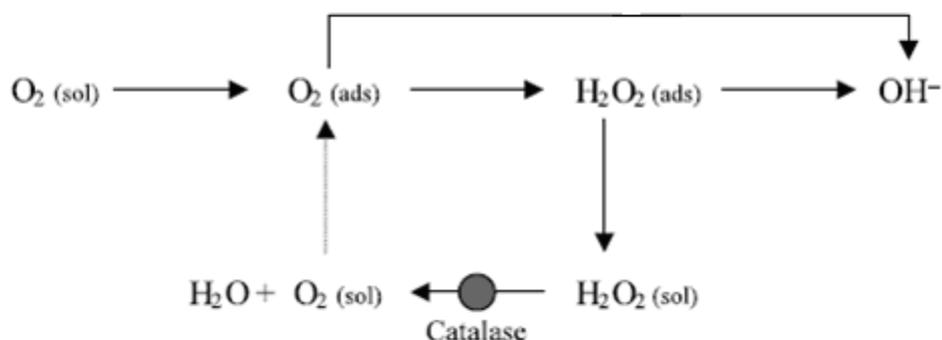


Figure 9 : Représentation schématique du mécanisme d'action des catalases. Les espèces en solution (sol) ou adsorbées à la surface métallique (ads) sont indiquées.

Busalmen *et al.* (1998) ont montré que, suivant la composition de la surface métallique, l'électro-réduction du peroxyde peut être inhibé ou non, permettant une plus ou moins forte désorption du peroxyde de la surface métallique. Le mécanisme des catalases est basé sur la conversion enzymatique de l' H_2O_2 produit électro-chimiquement en oxygène et eau à la proximité de la surface métallique. L'oxygène généré par les enzymes peut alors être réduit électro-chimiquement en plus de l'oxygène atteignant la surface par diffusion, ce qui amplifie la cinétique de la réaction cathodique, attribuée à l'augmentation de la concentration en oxygène et donc à l'action des catalases.

II.3 PRODUITS DU METABOLISME BACTERIEN : CAS DES ACIDES GRAS VOLATILS ET DU DIOXYDE DE CARBONE

Les acides gras volatils (AGV) et le CO_2 sont deux produits du métabolisme bactérien. Les acides gras volatils sont le produit métabolique anaérobie de différents types bactériens, comme les bactéries fermentaires et les BSR alors que le CO_2 est le produit métabolique des bactéries aérobies et de certaines bactéries anaérobies. En plus de représenter une source de matière organique (AGV) et inorganique (CO_2) pour de nombreux types bactériens et permettant ainsi leur croissance (synergie entre produits formés par un type bactérien et substrats consommés par un autre type), ils sont tous deux à l'origine de différents mécanismes, expliqués dans la partie ci-dessous.

II.3.1 Les acides gras volatils

Etudiés depuis plusieurs années après avoir été trop longtemps sous-estimés par les industriels (Farquhar, 1998), les acides gras volatils (AGV) mais également leurs formes anioniques, les anions d'acide aliphatique à courte chaîne (SCA pour Short-Chain Aliphatic acid Anion) sont responsables de différents types de corrosion, directe ou indirecte.

Les acides gras volatils sont des acides faibles avec un $pK_A < 5$. Ils sont identifiés sous leurs formes anioniques quand le pH de la solution aqueuse dans laquelle ils se trouvent est inférieur à 4.8 unité pH. L'acidité de ces composés provient de la capacité du groupe carboxyle

(-COOH) à libérer un proton (H+) suivant la réaction :



En présence de cations métalliques comme le sodium, ils forment des sels de carboxylate suivant la réaction :



Les SCA dans les eaux de subsurface sont impliqués dans différents mécanismes (Means *et al.*, 1987). Ils entrent en jeu dans la dissolution des minéraux en profondeur qui augmentera alors la porosité de la roche. Les SCA sont des précurseurs de gaz naturel, produits de façon biotique comme la méthanogenèse (dégradation de SCA) ou la formation de dioxyde de carbone mais également de façon abiotique par décarboxylation thermique suivant la réaction :



En se liant à des cations métalliques pour former des sels de carboxylates, les SCA permettent la complexation de ces cations et leur transport dans les fluides interstitiels. Il a de plus été montré que les SCA avaient la capacité de se complexer chimiquement avec des radionucléides (Means *et al.*, 1987) et donc augmenter leur mobilité dans les fluides interstitiels. Les SCA jouent également un rôle très important dans la modification du pH et de l'alcalinité de l'eau interstitielle. Enfin, les SCA permettent d'initier la formation de biofilms par accréation sur de nombreux types de surfaces. Ils représentent ainsi une source de carbone permettant l'émergence de biofilms.

Sur les métaux, une étude réalisée par Joosten *et al.* (2002) a montré que le taux de corrosion à 90°C (0.25 à 5 mm/an) à pH4 était fortement dépendant de la concentration en AGV et notamment en acide acétique (à ce pH, l'acétate est sous sa forme acide, CH₃COOH). Ce dernier empêche également la précipitation de carbonate de fer (film protecteur) permettant ainsi l'augmentation de la corrosion par le CO₂ même à de faibles pressions partielles.

Les AGV et leurs formes anioniques sont donc, en plus d'être de la matière organique disponible pour la croissance bactérienne, des facteurs influençant de nombreux paramètres et entrant en jeu dans les phénomènes de corrosion des minéraux et des métaux.

II.3.2 Le dioxyde de carbone

Le dioxyde de carbone est un gaz ubiquitaire. Rencontré en faible concentration dans les environnements aérobies, il est très présent dans les environnements anoxiques et est indispensable à la croissance des bactéries autotrophes qui ont la capacité de transformer le carbone inorganique du CO₂ en carbone organique, le plus souvent sous forme d'acétate. Ce gaz possède également un pouvoir corrosif sur les bétons, expliqué dans la partie ci-après.

Mécanisme de la carbonatation des bétons et bétons armés :

Cette partie doit beaucoup aux travaux de thèse de Mickaël (2008) et Drouet (2010).

La carbonatation atmosphérique du béton dégrade les bétons armés et est notamment responsable de la mise à nu de leurs armatures en acier. La carbonatation entraîne des

problèmes de durabilité puis de résistance sur les structures en béton armé. Les barres d'acier, censées garantir cette résistance, gonflent sous l'effet de la corrosion et font éclater le béton d'enrobage, les aciers sont alors mis à nu. Son mécanisme est le suivant : lors de la fabrication du béton, la quantité d'eau introduite pour l'hydratation de son ciment est toujours supérieure à la quantité stœchiométrique nécessaire. De ce fait, le ciment hydraté est toujours un milieu poreux dont les pores sont d'abord remplis d'eau qui se chargent en ions pour respecter l'équilibre chimique avec les hydrates du ciment. Lorsque le matériau cimentaire sèche à l'air libre, il se désature en eau et les pores se remplissent partiellement d'air.

Le CO_2 naturellement présent dans l'atmosphère est alors susceptible de diffuser à travers la phase gazeuse du ciment. La diffusion dans la phase liquide est négligeable. On constate que les ciments totalement saturés en eau ne se carbonatent que sur leur couche limite du fait d'un colmatage immédiat des pores par formation de calcite.

Le CO_2 présent dans la phase gazeuse des pores se dissout dans la solution interstitielle pour former des ions carbonates qui réagissent principalement avec les ions calcium Ca^{2+} . La portlandite, de formule $\text{Ca}(\text{OH})_2$, formée durant le durcissement du béton (hydratation des silicates de calcium bi et tricalciques ($\text{SiO}_2, 2\text{CaO}$) et ($\text{SiO}_2, 3\text{CaO}$)) et le dioxyde de carbone créent du carbonate de calcium (CaCO_3). La formation de carbonate de calcium est représentée par la Figure 10.

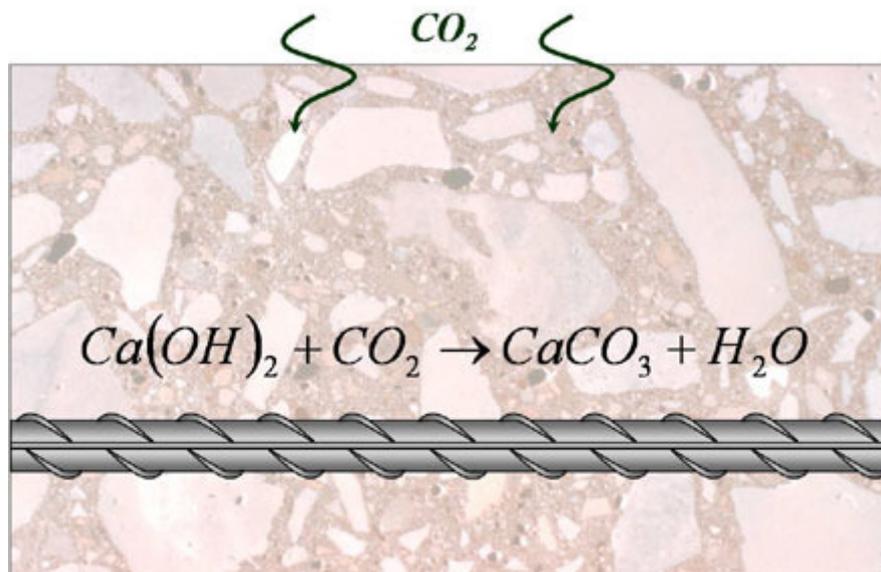


Figure 10 : Illustration de la formation de carbonate de calcium par carbonatation.

La modification de l'équilibre chimique entre les hydrates de la matrice cimentaire et la solution interstitielle entraîne une dissolution des hydrates. Le nouvel équilibre chimique correspond alors à une solution bien plus acide qu'initialement. Le pH passe d'une valeur de 13 dans la zone non carbonatée à une valeur de pH inférieure à 9 dans la zone dégradée. Lorsque la zone de carbonatation atteint les armatures en acier, la corrosion du métal peut commencer en produisant notamment des espèces plus volumineuses que les matériaux initialement présents. Ceci explique l'éclatement du béton autour des armatures corrodées. Toutefois, la carbonatation augmente l'imperméabilité du béton grâce au colmatage de certains pores par le carbonate : l'absorption capillaire est réduite et la résistance mécanique est meilleure.

L'humidité relative de l'air joue un rôle important sur la vitesse de carbonatation. Pour les bétons courants, elle est maximale pour une humidité relative de l'ordre de 60 % et presque nulle en atmosphère sèche ou saturée en eau. La carbonatation est par conséquent plus importante sur les surfaces protégées que sur celles exposées à la pluie. Une importante concentration en CO₂ est également un facteur augmentant la vitesse de carbonatation.

Synthèse sur la biocorrosion : les phénomènes impliqués dans la biocorrosion restent encore peu connus malgré les études réalisées depuis plusieurs décennies. Cette complexité vient du fait que la MIC combine à la fois des réactions abiotiques autocatalytiques et des réactions biotiques. Les bactéries sembleraient jouer un rôle de catalyseurs de ces réactions, par un mécanisme de réductions et d'oxydations réversibles.

L'examen de la littérature montre que la biocorrosion anaérobie est un phénomène complexe. Les bactéries sulfurogènes exercent dans ce phénomène un rôle prépondérant par la production d'H₂S qui résulte de leur métabolisme. Même si les propriétés corrosives d'H₂S sur l'acier au carbone, notamment en milieu acide, sont bien connues, le problème de biocorrosion ne se résume toutefois pas à un simple problème de corrosion abiotique par ce composé. Une condition nécessaire et suffisante pour la production d'H₂S est, en effet, la fonctionnalité de la cellule microbienne dans l'environnement concerné. Cet environnement est celui du biofilm au contact de la phase métallique. Nous avons vu que la disponibilité en ions ferreux qui dépend principalement du pH, est une condition essentielle pour la manifestation de l'activité physiologique. Ce n'est certainement pas la seule condition prérequis.

Un autre point important relatif à la corrosion concerne l'interaction entre les différentes espèces constituant les biofilms et notamment entre les espèces qui produisent des acides organiques (source de matière organique pour de nombreuses espèces bactériennes) et donc les liens synergiques pouvant se créer entre elles.

Pour finir, l'environnement est un point très important à prendre en compte. Tous les paramètres environnementaux peuvent influencer positivement ou négativement sur la corrosion : température, pH, concentration en oxygène... Il y a donc de nombreux cas de figure possibles pour qu'à un moment donné, dans un contexte donné s'amorcent des phénomènes de biocorrosion.

CHAPITRE III : MATERIELS, METHODES ET VALIDATIONS EXPERIMENTALES

CHAPITRE III : MATERIELS, METHODES ET VALIDATIONS EXPERIMENTALES

III.1 LIEUX DE PRELEVEMENTS

Le laboratoire de recherche souterrain de l'ANDRA se situe dans la commune de Bure, à la limite des départements de Meuse et Haute-Marne. Il a été creusé dans une couche sédimentaire argileuse, datée de 160 millions d'années, à une profondeur de 490m. L'accès aux galeries se fait par l'intermédiaire de deux puits d'accès. La Figure 11 est une représentation schématique du LS, avec ses installations de surfaces, ses puits d'accès et son réseau de galeries.

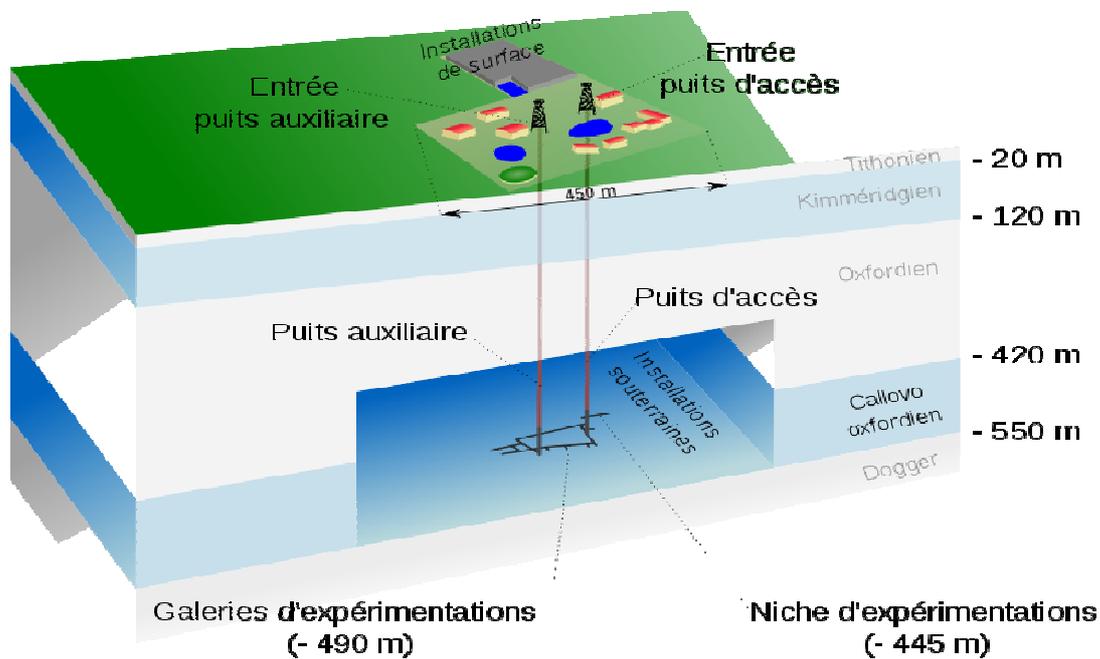


Figure 11 : Représentation schématique du LS (source : ANDRA bloc laboratoire-2004-09)

Les échantillons étudiés durant cette thèse ont été prélevés à différents endroits de ce réseau de galerie, tous à 490m de profondeur. La Figure 12 situe les sites de prélèvement au sein du LS. Deux carottages différents et deux prélèvements d'eau interstitielle ont été étudiés : BAC1201 et TER1901 pour les échantillons solides et KEY1001 et PAC1002 pour les échantillons liquides. Le but des expérimentations ayant conduit aux prélèvements de ces différents échantillons seront décrits plus en détails dans la partie « méthodes de prélèvements ».

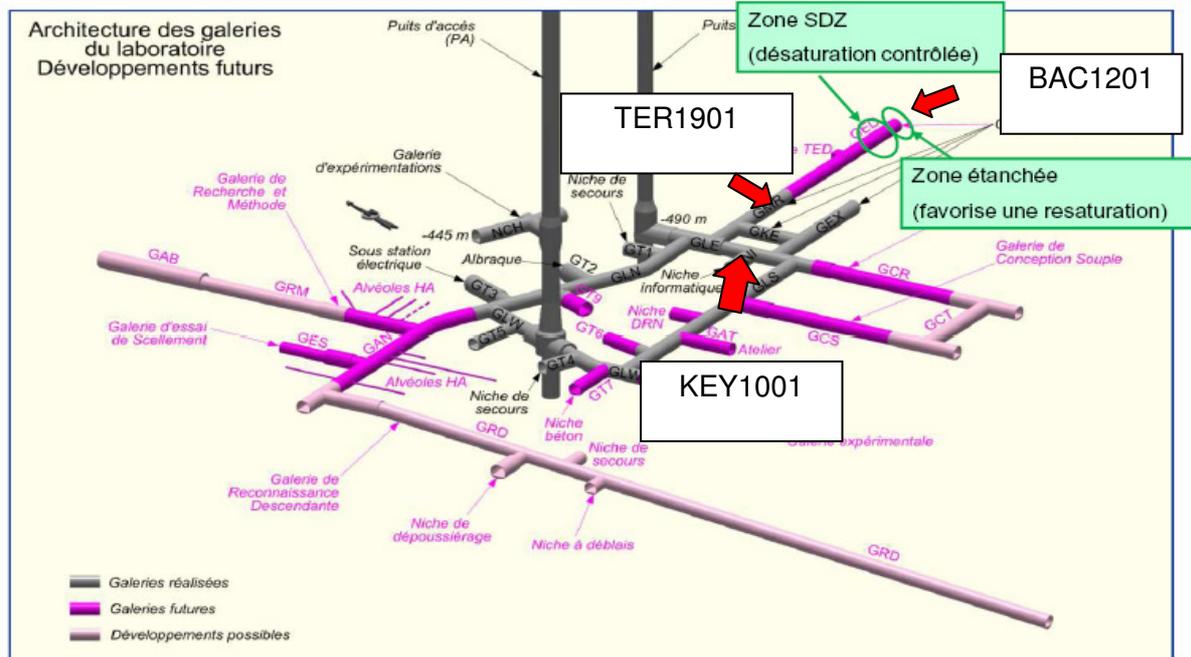


Figure 12 : Lieux de prélèvements des différents échantillons (source ANDRA).

III.2 METHODES DE PRELEVEMENT

Tous les échantillons, liquides comme solides, possèdent une nomenclature «Andra ». La nomenclature appliquée à chaque échantillon est présentée dans l'annexe 2.

III.2.1 Echantillons liquides

Les échantillons liquides ont été prélevés par l'intermédiaire de trois techniques différentes. Les deux premières ont été appliquées à la tête du forage KEY1001

III.2.1.1 Flacon ouvert, méthode gravitaire : KEY1001-1

Le premier type d'échantillon étudié durant ces travaux de thèse a été un échantillon d'eau provenant du forage KEY1001. Le forage KEY1001 a été réalisé en 2005 dans le cadre des expériences KEY. Il était dédié à des mesures ponctuelles et a été laissé ouvert suite à ces mesures après la pose de simples tubages en PVC. Il a ensuite été observé que de l'eau sortait de ce forage. Près de deux ans après sa réalisation, ce forage a été équipé de façon opportuniste avec un bouchon percé d'un tuyau relié à un bidon de 5L en polyéthylène placé sur une balance. Ces dispositifs ont permis de mesurer les débits de production de ces forages qui sont de l'ordre de 40 à 60 mL par jour.

Après conditionnement dans un flacon plastique stérile, cette eau a été envoyée à l'IRD pour des études microbiologiques.

III.2.2.2 Flacon fermé, méthode gravitaire : KEY1001-2

Dans le cadre d'une étude sur la microflore potentiellement présente dans l'eau interstitielle du Callovo-Oxfordien de Bure, un nouveau dispositif a dû être testé au laboratoire avant d'être mis en place *in situ*, à la tête du forage KEY1001. Le but de ce dispositif (Figure 13) est de récupérer cette eau interstitielle tout en permettant de garder le potentiel d'oxydo-réduction au plus près de son niveau « *in situ* », c'est-à-dire -200mV ESH (Vinsot *et al.*, 2008).

Ce nouveau dispositif permet une collecte en condition plus anoxique et plus stérile de l'eau interstitielle provenant d'une roche argileuse et s'écoulant, au goutte à goutte actuellement, à partir d'un tuyau en cuivre collecteur ouvert.

- Montage

Le dispositif consiste en une première bouteille en verrerie spécifique inerte DURAN (flacon anaérobie récupérateur), couplé à une seconde bouteille en verre de même type (flacon régulateur de mise en pression atmosphérique) munie d'un embout standardisé. Un tuyau de raccordement étanche est installé entre les deux verreries d'une part, et entre le tuyau de cuivre et le flacon de récupération d'autre part.

- Principe

Le flacon anaérobie récupérateur est pressurisé avec de l'azote pour chasser l'oxygène présent à l'intérieur et garantir les conditions d'anaérobiose pendant la phase de récupération de l'eau interstitielle. L'eau interstitielle pénètre dans le flacon anaérobie récupérateur à l'aide d'une aiguille de gros diamètre fixée dans l'une des deux sorties. La seconde sortie permet de relier ce flacon anaérobie récupérateur au second récipient pour à la fois réguler la pression sortante et empêcher une dépression (système hydraulique de non-retour), source d'aérobiose. Cela permet à l'azote, poussé par l'eau entrant dans le récupérateur, de s'échapper.

Petit à petit, le récupérateur va se remplir d'eau interstitielle en chassant l'azote et en gardant des conditions d'anaérobiose (maintien d'un bas potentiel redox), comme de stérilité de l'atmosphère gazeuse du flacon.

- Test du dispositif

Le test du dispositif a été réalisé suivant deux axes expérimentaux complémentaires. En premier lieu, il s'est agi de tester la compatibilité de ce dispositif avec une arrivée d'eau au goutte à goutte. Une étude du montage adéquat a été réalisée avec une faible arrivée d'eau, puis une arrivée au goutte à goutte, chacun des tests étant effectué sur plusieurs jours.

Dans un deuxième temps, il s'est agi de tester les capacités de ce dispositif à préserver l'anaérobiose. Sur milieu « liquide test » légèrement réduit, un indicateur d'oxydo-réduction, la résazurine a été ajoutée permettant d'estimer la présence d'oxygène dissous dans le liquide collecté goutte à goutte. Le virage de cette résazurine de l'incolore au rose indique que le seuil d'anaérobiose est dépassé.

- Validation expérimentale

- Test hydraulique

Sans pressurisation préalable du flacon anaérobie récupérateur (pression atmosphérique), le goutte à goutte s'effectue normalement et la récupération de pression ainsi que le système non-retour fonctionnent également normalement (3 gouttes collectées dans le flacon anaérobie récupérateur provoquent le départ d'une bulle de gaz d'azote dans le flacon régulateur). Le goutte à goutte du dispositif s'arrête quand la surpression hydraulique est trop faible. Techniquement cela correspond à une surpression due à une faible hauteur de colonne d'eau (en-dessous de 8 cm).

- Test anaérobiose

Le test de maintien d'anaérobiose a été réalisé en utilisant une solution faiblement anaérobie, à la place de l'eau interstitielle. Une fois parvenue dans le flacon anaérobie récupérateur, l'eau collectée goutte à goutte est restée anaérobie jusqu'au démontage du dispositif, soit plus de 8 jours après le début de l'expérience, montrant l'absence d'entrée d'air et donc d'oxygène dissous dans la collecte d'eau au goutte à goutte. Sauf avarie pendant la récupération, le dispositif permet donc de garder l'eau collectée de manière anaérobie sans limite de temps (le maintien d'anaérobiose est assuré par l'étanchéité à l'oxygène de la verrerie, des bouchons utilisés et l'utilisation de tuyaux de raccordement étanches).

- Récupération de l'eau interstitielle

Le dispositif de récupération d'eau interstitielle (Figure 13) a été installé dans le laboratoire souterrain sur la tête du forage KEY1001 le 10 décembre 2008. Cependant, pour des raisons probables de manque de surpression suffisante entre le tuyau en cuivre sortant du forage KEY1001 et ce nouveau dispositif, la collecte d'eau interstitielle a été perturbée. En effet une fuite s'est produite au niveau du raccord initial entre ces deux éléments. Après une nouvelle reconnection modifiée pour ce raccord, la fuite a pu être atténuée mais non stoppée. Pour éviter toute surcharge de pression et d'eau à l'intérieur du forage, il a été décidé d'enlever provisoirement le dispositif, après récupération de 800mL d'eau interstitielle dans le flacon anaérobie récupérateur.



Figure 13 : Dispositif de récupération de l'eau interstitielle du forage KEY1001 anaérobie et stérile

III.2.1.3 Dispositif en ligne de prélèvement : PAC1002

Le second forage échantillonné, le forage PAC1002, possède à sa tête un réseau de conduites permettant l'analyse en temps réel par chromatographie ionique de l'eau interstitielle. Un échantillon liquide provenant de ces conduites d'approvisionnement enrichi en milieu sulfato-réducteur et thiosulfato-réducteur s'est avéré positif (travaux de numération bactérienne réalisés par CFG/IRD). Cet échantillon positif a été mis en culture pour identification ultérieure.

III.2.2 Echantillons solides

III.2.2.1 Les différents échantillonnages

- Forage BAC1201

Le forage BAC1201 a été réalisé en 2009 dans le cadre de l'expérience BAC dédiée à l'étude de l'impact des microorganismes sur les réactions entre l'eau, la roche et plusieurs matériaux. Du point de vue de l'étude des perturbations oxydantes, ce forage a la particularité d'avoir été réalisé tout au fond d'une galerie, dans la section où les murs de cette galerie ont été recouverts par un revêtement étanche quelques semaines après le creusement de la galerie.

L'objectif de ce forage est de pouvoir observer les éventuelles modifications de la composition de l'eau porale et de la population bactérienne dans une situation de resaturation d'une paroi de galerie. Ainsi, l'air a été susceptible d'entrer dans la zone désaturée de la roche autour de la galerie pendant la durée du creusement et les semaines qui ont suivi. A partir de la pose du revêtement étanche, l'air ne peut plus entrer dans la roche et l'eau ne peut plus en sortir sous l'effet de la ventilation. La charge hydraulique doit alors augmenter au voisinage de la paroi qui devrait se resaturer progressivement

- Forage TER1901

Le forage TER (pour ThERmique) a, quant à lui, été dédié aux effets de la température sur le Cox. En effet les déchets de type HA sont des déchets à haute activité et leur conditionnement fait que ces derniers dégagent de la chaleur, à une température de 90°C au contact direct de l'alvéole de conditionnement. C'est pour cette raison que ce forage a été réalisé. Il consiste en un premier forage dans lequel est insérée une sonde chauffante. Après trois ans de chauffe, la sonde a été retirée et plusieurs forages ont été réalisés aux alentours plus ou moins immédiats de la sonde. Ce forage issu d'une expérimentation longue et complexe a été étudié par différents corps de métiers dont des géomécanciens, hydrogéologues, physiciens, géologues et microbiologistes.

- Forage BHT-1

Le forage BHT-1 (pour Borehole Hydrogen Transfert) provient du site expérimental du Mont Terri dans le Jura Suisse. Ce site expérimental est décrit dans l'annexe 3. Mon travail de thèse impliquant ma participation à ce forage, ce dernier sera décrit en détail dans la partie ci-dessous pour expliquer le protocole et les précautions utilisés lors de la récupération des échantillons de carottage.

III.2.2.2 Protocole et précautions pour la récupération des échantillons solides : cas de BHT-1

Le forage BHT-1 du Mont Terri s'inscrit dans le cadre d'une étude sur les transferts d'hydrogène à travers l'argile. Ce forage ascendant a été réalisé dans le but de traverser perpendiculairement les différentes strates géologiques, il s'est déroulé en deux parties. Une première partie a été forée à l'air et une seconde forée à l'argon stérile.

- Jour 1 : forage à l'air

Cette première partie de forage a été réalisée à l'air et sans précaution microbiologique particulière. Une fois la carotte extraite de la roche mère et déposée sur un reposoir, des géologues étudient chaque morceau de carotte pour rechercher d'éventuelles fractures et changements de faciès dans la formation traversée puis les différents échantillons sont conditionnés sous vide, après un flush à l'argon pour éviter toute oxydation de la roche par l'oxygène. Puis les échantillons sont conservés dans des gaines en aluminium thermo-soudable, étanche aux gaz et à l'humidité.

Un échantillon de ce premier carottage a été récupéré dans le but de finaliser la technique d'extraction du cœur de carotte, pour analyse ultérieure au laboratoire IRD de Marseille, en conditions stérile et anaérobie.

Une longueur totale de 8 m25 a été forée à l'air, permettant de récupérer une première série de carottes argileuses.

- Jour 2 : forage à l'Argon

Cette deuxième partie du forage ne s'est pas réalisée à l'air afin de minimiser les perturbations du milieu natif et donc de l'échantillon récupéré. Les forages « anaérobies » se réalisent généralement sous azote. Cependant, certains échantillons étant destinés à l'analyse de l'azote dans cette formation géologique, ce gaz n'a pas été retenu pour éviter les perturbations qu'entraînerait un forage sous azote pour une analyse de ce même gaz. L'argon a donc été choisi.

Pour cette deuxième partie de forage, des précautions microbiologiques ont été prises pour limiter la contamination dues aux manipulations humaines. Les tiges de forages sont arrivées emballées dans des sacs plastiques stériles après avoir été stérilisées grâce à l'eau de javel. Les foreurs ont porté des gants tout au long du forage, gants régulièrement changés et nettoyés à l'alcool à 90°. Entre chaque manœuvre (passe de forage), la tête de forage composée de trois parties métalliques cylindriques, a été stérilisée à l'alcool à 90° (intérieur et extérieur) et chaque tige a été nettoyée à l'alcool à 90° (extérieur) peu avant son entrée dans le forage. Ces précautions ne permettent en aucun cas de garantir une stérilité de 100% du dispositif mais diminuent de manière très significative les possibilités de contact entre les échantillons carottés et des bactéries viables provenant de l'extérieur.

Pour ce forage, le reposoir recevant la carotte après extraction, a été recouvert d'un plastique épais stérilisé à l'alcool à 90° peu avant l'arrivée des carottes. Pour cette étape, de nouvelles précautions microbiologiques ont été prises : une analyse géologique la plus rapide possible pour limiter l'exposition de la carotte à l'air (oxydation) mais également aux contaminants présents dans les aérosols. Les géologues, ainsi que toute personne présente au-dessus du reposoir, portaient des gants stérilisés à l'alcool à 90° ainsi que des masques.

Les échantillons ont ensuite été, comme précédemment, conditionnés en gaine aluminium thermo-soudable, sous vide après balayage à l'argon.

III.3 TRAITEMENT DES ECHANTILLONS

III.3.1 Echantillons liquides

III.3.1.1 Utilisation directe

Les échantillons es forages PAC1002 et KEY1001-2 ont été utilisés directement (pour les étapes d'enrichissement) sans passer par la technique de filtration/concentration pour deux raisons :

PAC 1002 : l'échantillon présentant un trop faible volume et surtout une croissance bactérienne forte (test de numération en milieu synthétique, CFG service, kit Labège BSR/BTSR) a été analysé directement, sans étape de filtration concentration préalable.

KEY1001-2 : la récupération de cet échantillon s'étant déroulée dans des conditions les plus anoxiques possibles, le fait de passer par une étape de filtration/concentration de la biomasse aurait engendré un apport trop important d'oxygène. Donc dans le souci de garder l'anaérobiose de l'eau interstitielle pour l'échantillon KEY1001-2, il a été décidé de travailler directement sur l'échantillon.

III.3.1.2 Technique de filtration/concentration

D'après les travaux de S. Poulain (2006) sur l'eau interstitielle du LS de Bure, il a été trouvé que la microflore présente se trouve en très faible concentration. Pour permettre une disponibilité de biomasse bactérienne qui rende compte de la microflore minoritaire par rapport à une microflore dominante, un des moyens techniques efficace est de pouvoir les concentrer. Pour cela, un système de filtration sous vide, sur filtre collecteur de biomasse bactérienne, a été envisagé. Cependant, pour être pertinente sur le plan microbiologique, cette filtration doit être réalisée de façon complètement stérile. La validité de la stérilité du dispositif a donc été évaluée.

- Principe

Ce système complet de filtration sous vide a déjà été approuvé et est utilisé en routine par le laboratoire IRD UMR180 de Marseille. Le principe de cette méthode est de pouvoir réaliser un transfert d'échantillon totalement stérile et ceci pour chacune des étapes de la filtration. Pour cela, des conditions sont pré-requises : travail avec du matériel stérilisé à l'avance et transfert sous hotte à flux laminaire.

- Montage

Utilisation d'un système complet de filtration sous vide, de filtres Supor®-200, Gelman Sciences (porosité 0,2 microns, diamètre 47mm), et travail stérile, effectué sous hotte à flux laminaire.

Ce système de filtration se compose d'un récipient receveur en verre (partie supérieure), clipsé de façon étanche par une pince, sur filtre Supor®-200 et un second récipient collecteur du filtrat (partie inférieure), muni d'une sortie. Par cette dernière, un vide est créé et les échantillons liquides se trouvant dans le récipient supérieur sont filtrés et collectés dans le flacon inférieur. Le filtre Supor®-200 permet de concentrer la biomasse bactérienne potentielle.

- Test du dispositif

Le test est réalisé de manière à valider l'absence de toute source exogène de microorganisme provenant du laboratoire lui-même (UMR180 IRD-LMBEC). Pour cela, un milieu de base « test » enrichi en matière organique dans lequel une croissance bactérienne dense (milieu pour croissance de bactéries du genre *Thermotoga*) a été initiée. Ce milieu riche en bactéries métaboliquement actives a été autoclavé pour stériliser la microflore présente. Ce milieu « test » a été ensuite filtré par ce système complet de filtration sous vide, pour récupérer la biomasse stérilisée. Les filtres Supor®-200 ont été fractionnés en quatre à l'aide d'une pince plate stérile et d'une lame de rasoir stérile, et chaque quart a servi d'inoculum pour une mise en culture sur milieu permettant de cibler, pour ce seul test de stérilité, la microflore anaérobie totale. Cette mise en culture ne doit bien entendu donner aucun résultat positif, c'est-à-dire aucune croissance bactérienne après transfert et concentration de l'échantillon test, ce qui permettra de valider cet outil avant l'essai *in situ*.

Les quarts de filtrat ont ensuite été mis à incuber en tube de Hungate avec 4.5 ml de milieu de base, 1g/l de glucose et 5g/l de peptone, en étuve à 37°C (condition valable pour les trois essais décrits ci-dessous).

- Validation expérimentale

• Premier essai

La filtration a été effectuée sous hotte à flux laminaire pour assurer une atmosphère stérile autour du dispositif de filtration. De l'alcool à 90°C a été utilisé pour stériliser la verrerie et le filtre. Ces dispositions ont été toutefois insuffisantes pour assurer une filtration totalement stérile. Effectivement, après deux jours d'incubation, les tubes inoculés avec des quarts de filtre présentaient une croissance bactérienne significative, confirmée par observation microscopique où des formes de bacilles ont été observées.

• Deuxième essai

Dans ce deuxième test, l'alcool à 90°C a été remplacé par de l'alcool à 45% (v/v) et toute la verrerie a été préalablement stérilisée par autoclave. De même, pour la validation de la stérilité du filtre, lui-même a subi un passage à l'alcool à 45%. Ensuite, l'ensemble de la filtration a été effectué sous hotte à flux laminaire.

Dans ce deuxième test, après incubation dans les mêmes conditions que le premier, aucune croissance bactérienne n'a pu être observée. L'observation microscopique a permis de confirmer ce résultat. Ce deuxième test a permis de valider l'absence de tout défaut de stérilité, par l'utilisation de ces conditions expérimentales.

• Troisième essai

A la suite de ce résultat, un troisième test de filtration a été initié dans l'optique de récupérer le filtrat pour s'en servir ensuite comme milieu de base. Dans ce test, la stérilité du filtrat récupéré n'est pas une priorité car ce dernier peut être stérilisé par autoclavage après récupération. Le point important de ce test est de ne pas perturber le filtrat avec l'apport d'alcool qui sert à la stérilisation du filtre. Pour cela, une manipulation intermédiaire est nécessaire : un deuxième flacon de récupération est utilisé. Le premier flacon récupérateur va servir à collecter l'alcool passé par le filtre. Ensuite, ce flacon est enlevé et un deuxième flacon vient le remplacer. Ce dernier ayant été autoclavé est stérile et n'a donc pas besoin d'être une nouvelle fois stérilisé à l'alcool. Ce changement de flacon nécessite une manipulation et est à l'origine de mouvements d'air susceptibles d'être contaminant. Même si le travail se fait avec port de gants stériles et stérilisés à l'alcool à 45% et sous hotte à flux laminaire, il nous fallait valider l'absence de tout défaut de stérilité et donc être certain de pouvoir s'affranchir de toute erreur d'interprétation possible sur l'origine de bactéries concentrées par filtration.

Une série de tests de validation a donc été lancée. Après filtration et récupération du filtrat, plusieurs types de culture ont été testés :

- mise en culture du filtre dans des tubes de Hungate en condition fermentaire, pour tester la stérilité du filtre, après collecte liquide.
- mise en culture du filtrat en condition fermentaire dans des tubes de Hungate avec inoculum, pour tester la possible perturbation liée à la présence d'alcool résiduel.
- mise en culture du filtrat dans les mêmes conditions mais sans inoculum, pour tester la stérilité du filtrat.

Les résultats obtenus ont été les suivants : les quarts de filtre mis en culture n'ont donné aucune croissance bactérienne comme prévu, tout comme le filtrat sans inoculum. La stérilité

est donc bien conservée tout le long de la filtration, à savoir dans les différentes verreries utilisées ainsi que pour le filtre lui-même.

Le filtrat mis en culture avec inoculum a été utilisé pour estimer les perturbations que pourrait provoquer l'alcool résiduel (pendant la stérilisation du filtre). Ce filtrat a été inoculé par la contamination obtenue pendant le premier test de filtration. Après quelques jours à l'étuve, une croissance bactérienne s'est amorcée. Le dernier test a ainsi montré que le filtrat récupéré est non seulement stérile mais de plus, peu perturbé par l'alcool résiduel potentiellement présent.

Extrapolé au contexte de Bure, l'eau interstitielle peut donc être filtrée pour permettre une concentration de la faible densité bactérienne présente, et ceci en l'absence de toute source exogène de microorganisme provenant du laboratoire lui-même.

De plus, cette eau interstitielle peut également être ensuite récupérée de manière stérile pour servir de milieu de base pour de prochaines cultures bactériennes. L'autoclavage de ce milieu n'est donc pas nécessaire et permet d'éviter une nouvelle perturbation potentielle de cette eau, liée aux 120°C qui sont indispensables à la stérilisation par autoclave.

III.3.1.3 Conditionnement et préparation de l'inoculum-mère

Une fois validée la possible utilisation de cette eau interstitielle stérile, ainsi que la pertinence de la filtration-concentration de biomasse bactérienne, la filtration de l'eau interstitielle elle-même a donc été réalisée et 900mL d'eau de KEY1001-1 ont été filtrés. Le filtre obtenu a ensuite été repris dans une verrerie spécifique avec 25 mL d'eau interstitielle stérile. Ainsi un inoculum appelé « inoculum mère » a été obtenu. Ce dernier a été observé par microscopie pour certifier la présence de bactéries. Dans un premier temps, un unique morphotype a été observé, avec une faible densité bactérienne, malgré l'étape de filtration-concentration. Des bactéries de formes en bacilles, de taille et morphologie similaires, dont certaines avec une mobilité vraie, ont pu être observées. A la suite de cela, les premiers essais d'enrichissements ont été effectués.

Préalablement à cette filtration-concentration bactérienne, 3x75 mL d'eau de Bure ont été mis de côté dans 3 flacons pénicillines et stockés à 4°C comme solution « stock de secours » d'eau de Bure initiale, c'est-à-dire avec microflore non concentrée.

III.3.2 Echantillons solides

III.3.2.1 Protocole de récupération du cœur de carotte

Par retour d'expérience interne sur le broyage de carotte, la technique du mortier-pilon a été retenue car elle permet une plus grande maîtrise de la stérilité des instruments utilisés, contrairement au broyeur automatique dont toutes les pièces ne sont pas autoclavables ni stérilisables à l'alcool à 45°. De plus, ces broyeurs génèrent un mouvement d'air susceptible de contaminer les échantillons et ne permettent pas le travail en conditions anaérobies. La scie aurait pu être également un outil permettant l'élagage de la carotte, mais les va-et-vient de cet outil auraient entraîné une contamination de la partie interne par la partie externe et cela même avec une stérilisation régulière de l'instrument.

Le broyage a été réalisé en deux étapes successives : une première étape pour récupérer le cœur de la carotte et une deuxième pour le broyage proprement-dit.

Tout au long de ces deux étapes, le matériel utilisé a été stérilisé par la flamme et l'alcool à 90° et les mains lavées à l'alcool à 45°, puis dans des gants en nitrile nettoyés également à l'alcool à 45°. La stérilité de l'atmosphère ambiante a été assurée par l'utilisation de deux brûleurs à butane (Butagaz) générant une plus grosse chaleur et un plus large « parapluie stérile » à l'intérieur duquel les manipulations sont effectuées, que les becs bunsen (Figure 14). Le port du masque a été une précaution microbiologique prise également. Une atmosphère « anaérobie » techniquement réalisable a été obtenue par l'intermédiaire d'un flushage continu de la zone de travail avec de l'azote (lui-même filtré à travers du coton cardé, donc stérile).

Toutes ces précautions ont été prises pour garantir l'anaérobiose et la stérilité depuis l'ouverture des gaines de conditionnement des carottes, jusqu'au conditionnement de la poudre elle-même et cela pour tous les échantillons étudiés.

- Elagage de l'extérieur de la carotte

Cette étape consiste à rogner les bords de la carotte (Figure 15), potentiellement contaminée après avoir été en contact avec le matériel de forage et l'atmosphère non stérile lors de son observation par les géologues et avant son conditionnement. Pour cela, la carotte a été placée sur une rondelle métallique, dans un plat recouvert d'aluminium et flushé en permanence à l'azote stérile. Maintenu par un étau métallique flambé, la carotte a été débitée par fractures successives à l'aide d'un marteau et d'un burin eux même stérilisés. Environ 1 cm a été retiré sur le pourtour de la carotte. Bien qu'il ait été tenté de récupérer les carottes les plus cohésives possibles, ne présentant pas de failles pour éviter toute contamination par ces failles lors du forage, des morceaux du cœur de la carotte se sont détachés d'eux même à cause des coups répétés du burin sur la roche. Ces morceaux ne présentant aucune marque faite par le burin ont été tout particulièrement choisis et stockés dans un béccher stérile et flushé en continu à l'azote stérile avant leur broyage.

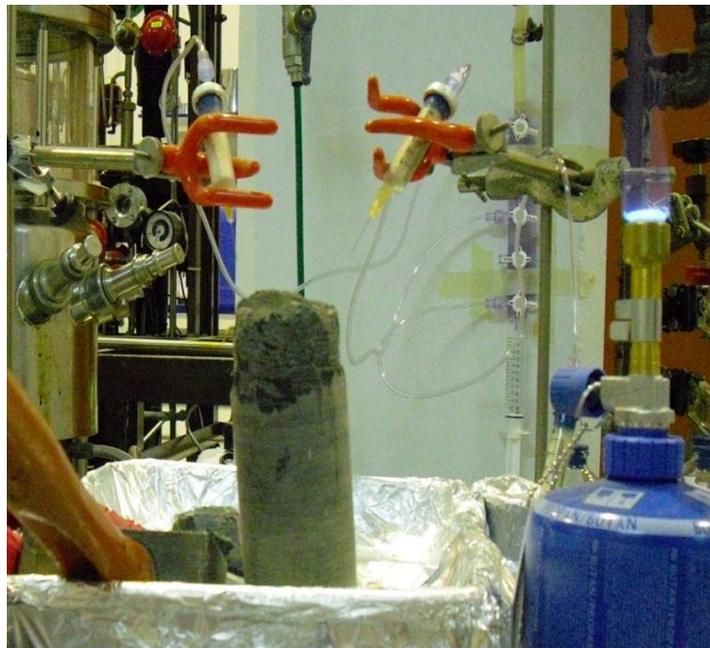


Figure 14 : Illustration du champ de stérilité, de l'apport d'azote stérile et de l'élagage de la carotte.

- Broyage du cœur

Les morceaux choisis (Figure 15) ont ensuite été placés dans un mortier en inox, les uns après les autres. Le mortier a été préalablement flambé à l'alcool ainsi que le pilon en inox. Un flux d'azote stérile et continu a été dirigé vers l'intérieur du mortier et les mouvements d'air provoqués par les coups de pilon ont, autant que possible, été réduits bien qu'ils aient été réalisés à l'intérieur du champ de stérilité fourni par les brûleurs à butane (Figure 16).



Figure 15 : Différence entre un cœur de carotte (gauche) et une section de carotte non élaguée (droite)



Figure 16 : Illustration du broyage du cœur de carotte par mortier/pilon)

III.3.2.2 Conditionnement et préparation de l'inoculum-mère

Une fois réduit en poudre, le cœur de carotte est conditionné à l'intérieur de bouteilles pénicillines préalablement flushées à l'aide d'un mélange CO₂/N₂ (20/80%) et autoclavées (20 min à 120°C et sous une pression de 2 bars).

Le conditionnement terminé, les bouteilles pénicillines contenant les échantillons de carottes réduits en poudre sont stockées à 4°C.

La poudre a ensuite été hydratée, soit par le milieu de base décrit ci-dessous soit par de l'eau interstitielle filtrée (stérile). Ce mélange poudre/eau représente l'inoculum mère utilisé. Pour les trois forages étudiés, l'inoculum mère a toujours été réalisé de la même façon.

III.4 MICROBIOLOGIE

III.4.1 Milieux de culture

Pour toutes les analyses, un même milieu synthétique dit « de base » a été utilisé. L'intérêt de ces milieux synthétiques est de pouvoir contrôler tous les paramètres de l'enrichissement et de pouvoir donc faire varier un ou plusieurs éléments. Sa composition est la suivante : KCl (0.1 g/L), NH₄Cl (0.5 g/L), KH₂PO₄ (0.6 g/L), K₂HPO₄ (0.6 g/L), MgCl₂ x 7H₂O (0.3 g/L), CaCl₂ x 2H₂O (0.05 g/L).

III.4.1.1 Etude en aérobie

Pour les analyses en conditions aérobies, les oligo-éléments de Balch (Balch *et al.*, 1979) ont été ajoutés à une concentration de 10 mL/L.

- Milieu liquide

Les analyses en conditions aérobies liquides ont été réalisées en tubes de Hungate. Ces tubes ont un septum qui empêche l'entrée de l'oxygène. Pour les cultures en aérobiose il est préférable d'utiliser des tubes sans bouchons, fermés par du coton cardé, ce qui permet de faire entrer l'oxygène stérilement lors de la croissance aérobie. Cependant, la phase gazeuse étant deux fois plus importante que la phase liquide (10mL/5mL respectivement), il a été décidé d'utiliser les tubes de Hungate pour assurer une entière stérilité des analyses, notamment pendant l'ajout des différents éléments (tampon, substrats, inoculum etc).

Avant autoclavage, les tubes de Hungate contiennent 5mL du milieu de base. Après autoclavage, le milieu de base est supplémenté par les vitamines de Balch (Balch *et al.*, 1979), le tampon carbonaté (NaHCO₃ 10%), le substrat organique. Les substrats organiques testés ont été l'extrait de levure, la peptone et la biotrypcase. A ce stade, les tubes sont prêts pour recevoir l'inoculum.

- Milieu solide

Les analyses en milieu solide sont réalisées dans des boîtes de Pétri. On ajoute au précédent milieu de l'agar-agar à une concentration de 20 g/L. Ce milieu est ensuite « coulé » dans les boîtes de Pétri sous hotte à flux laminaire pour un travail stérile.

III.4.1.2 Etude en anaérobie

Pour les analyses en conditions anaérobies, sont ajoutés un réducteur de milieu la cystéine-HCl (1 g/L), un agent coloré permettant la détection d'oxygène dans le milieu, la résazurine (1 mL/L) et les oligo-éléments de Widdel (1 mL/L), (Widdel et Pfennig, 1981).

Ce milieu est supplémenté par divers éléments ciblant divers types bactériens listés dans le tableau 2 ci-dessous.

	Anaérobie totale	BSR lactate	BSR acétate	BTSR lactate	BTSR acétate	Réductrice de fer	Nitrato-réductrice
Vitamines	0.05 mL	0.05 mL	0.05 mL	0.05 mL	0.05 mL	0.05 mL	0.05 mL
NaHCO ₃ (10% w/v)	0.15 mL	0.15 mL	0.15 mL	0.15 mL	0.15 mL	0.15 mL	0.15 mL
Na ₂ S 2 % (w/v)	0.1 mL						
Extrait de levure (1g/L)		0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL
Peptone (5 g/L)	0.1 mL						
Glucose 1 g/L	0.1 mL						0.1mL
Lactate (2 g/L)		0.125 mL		0.125 mL			
Acétate 5 mM			0.1 mL		0.1 mL		
Thiosulfate 1M				0.1 mL	0.1 mL		
Sulfate 1M		0.1 mL	0.1 mL				
Fer amorphe						900 mM	
Milieu de base	Qsp 5 mL	Qsp 5 mL	Qsp 5 mL	Qsp 5 mL	Qsp 5 mL	Qsp 5 mL	Qsp 5 mL

Tableau 2 : Composition des milieux synthétiques par type métabolique testé.

- Milieu liquide

A la différence de l'aérobiose, le milieu de base est mené à ébullition sous un flux d'azote continu jusqu'au virement de couleur de l'indicateur coloré. Ce dernier passe d'une teinte bleutée à une absence de teinte. Ensuite, toujours sous un flux d'azote, le milieu est réparti dans les tubes de Hungate (Hungate, 1969). Une fois fermés par le vissage d'un bouchon plastique et de son septum en butyl, les tubes sont flushés à l'azote et au dioxyde de carbone avec un rapport 80/20. Après autoclavage, différents éléments sont ajoutés suivant les analyses voulues, toujours en anaérobiose par l'introduction des éléments à travers le septum en butyl, grâce à une seringue, elle-même anaérobie et stérile. Ces différentes solutions, comme le tampon carbonaté ou encore les donneurs d'électrons, sont toutes anaérobies pour ne pas faire entrer d'oxygène dans les tubes de Hungate.

- Milieu solide

Les analyses anaérobies en milieu solide sont réalisées à partir de la technique des Rolls-tubes (Hungate, 1969 ; Miller et Wollin, 1974). 16 g/L (test à 30°C) ou 25 g/L (test à 55°C) d'agar sont ajoutés dans les tubes de Hungate avant d'y ajouter le milieu de base. L'étude est réalisée ensuite à 65°C pour maintenir la gélose liquide. Une fois ajoutés tous les éléments nécessaires au type de croissance étudié, les Rolls-tubes sont disposés dans un appareil spécifique, le tube Spinner, permettant une rotation rapide du tube sur lui-même. En appliquant un glaçon le long du tube en rotation, la gélose se durcit sur le pourtour de ce dernier, de façon homogène.

III.4.2 Protocole d'enrichissement et d'isolement

Les techniques d'inoculation et d'isolement ont été sensiblement les mêmes pour l'aérobiose et l'anaérobiose. Un inoculum mère a d'abord été réalisé, servant de base pour les isollements. Cet inoculum mère a servi à ensemercer les tubes de Hungate.

Après enrichissement, quand un début de croissance bactérienne s'est avéré positif dans un tube de Hungate, la technique d'isolement par « suspension-dilution » a été réalisée de la manière suivante : une série de 10 tubes est préparée dans lesquels une cascade de dilution au 10^{ème} à partir de l'inoculum est initiée. Le dernier tube montrant un résultat positif, c'est-à-dire une croissance bactérienne, est conservé pour procéder aux étapes ultérieures d'isolement jusqu'à l'obtention d'une souche certifiée pure ou clone bactérien référencé.

L'étape suivante ou deuxième étape d'isolement, utilise à nouveau la dernière dilution positive liquide mais avec la technique d'inoculation-épuisement en milieu solide. Cette technique permet de récupérer une colonie (clone pur) qui est suspendue ensuite dans le milieu utilisé pour son isolement (milieu synthétique). Cette colonie sert alors de nouvel inoculum sur milieu solide. Une colonie bien isolée sur boîte, et issue de ce 2^{ème} étalement est alors récupérée. Pour les boîtes de Pétri, la colonie est récupérée sous hotte à flux laminaire et pour les Rolls-tube, la colonie est récupérée dans une enceinte anaérobie sous N₂.

III.4.3 Identification des souches isolées

III.4.3.1 Généralités

L'identification des souches isolées se fait par l'intermédiaire du séquençage d'une partie du gène codant pour l'ARNr 16S. Ce gène est un gène essentiel entrant dans la synthèse de la machinerie de traduction de la bactérie (traduction de l'ARN en protéine). Toutes les bactéries possèdent donc ce gène. Il est constitué de parties conservées, de parties à variabilité intermédiaire et de 9 parties hypervariables.

III.4.3.2 Amplification de l'ADNr 16S

L'extraction de l'ADN des différents isolats s'est réalisée directement sur culture pure. 1 mL de culture mis dans un tube eppendorf est chauffé à 80°C pendant 20 min pour permettre la lyse des cellules, l'ADN de ces isolats se trouvant alors dans le milieu.

Le gène codant l'ARNr 16S a été amplifié en tube eppendorf en ajoutant 0.5 µL d'ADN dans un mélange contenant 0.5 µL de chaque amorce universelle (50 pmol/µL) Fd1 et Rd1, 10 µL de Taq polymérase Q Biogene et 38.5 µL d'eau distillée stérile. Les amorces universelles Fd1

et Rd1 (Fd1, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' et Rd1, 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') sont utilisées pour obtenir des fragments PCR d'environ 1.5kb, correspondant à la portion comprise entre les positions 8 et 1542 de *Escherichia coli* (Winker et Woese, 1991). Les tubes sont ensuite introduits dans un thermocycleur. Le programme d'amplification PCR est indiqué dans le tableau 3. 5 µL des produits PCR sont analysés sur gel d'agarose de 1 % (w/v).

Réaction	Dénaturation initiale	Dénaturation	Hybridation	Elongation	Elongation finale
T (°C)	95	95	55	72	72
Temps	1 min	20s	30s	1.5 min	5 min
Nombre de cycles	1	30			1

Tableau 3 : Programmes et cycles d'amplification du gène codant l'ARNr 16S

III.4.3.3 Séquençage et identification

Les produits PCR obtenus sont envoyés par la suite pour séquençage à la société GATC (Allemagne). Les résultats du séquençage de l'ADNr 16S sont ensuite analysés par confrontation (alignement) avec des banques de données.

III.4.3.4 Hybridation ADN/ADN

L'hybridation ADN/ADN permet de comparer les ADN génomiques de deux souches différentes entre eux. Ce type d'expérimentation est indispensable quand l'homologie de l'ADNr 16S est supérieure ou égale à 97% entre la souche isolée et la souche type apparentée la plus proche. Pour cela, 6 g de biomasse ont été produite en ballon de culture de 6 L avec une forte concentration de matière organique. La biomasse totale récupérée a été envoyée en Allemagne à la DSMZ (banque internationale de souches bactériennes isolées et décrites) pour une hybridation ADN/ADN. La technique consiste à récupérer l'intégralité de l'ADN génomique et d'hybrider les ADN de la souche isolée et de la souche type apparentée la plus proche.

III.4.4 Identification des produits du métabolisme

L'étude du métabolisme de chaque souche est nécessaire pour l'étude générale du métabolisme présent dans le Cox.

III.4.4.1 Production d'acides gras volatils (AGV)

Les souches anaérobies facultatives isolées des cœurs de carottes, ont été testées pour estimer leur capacité à produire des acides. Ces souches isolées de manière aérobie ont été mises en culture dans ce même milieu mais rendu anaérobie (cf. III.4.1.2). Il n'y a pas eu d'ajout de

Na₂S, uniquement de la cystéine-HCl. Les cultures se font en tubes de Hungate (anaérobie et stérile) et en duplicata (deux tubes pour la même souche et le même sucre testé) avec 5 mL de milieu. Un seul substrat (sucres ci-dessous listés) est rajouté par tube. Les tubes sont ensuite inoculés avec les bactéries à tester (une espèce par tube) Après observation microscopique pour s'assurer de la croissance des bactéries, et après une DO de 1 obtenue, les tubes sont repiqués dans le même milieu avec le même substrat pour s'assurer que le substrat testé représente l'unique source de carbone (la matière organique présente lors de la première inoculation ayant été complètement métabolisée lors de la première partie du test). Ces tubes sont ensuite laissés à température ambiante pendant trois semaines pour une complète oxydation du substrat. A cela, deux témoins sont ajoutés : un témoin non inoculé et un témoin inoculé mais sans substrat.

Les cultures ont été réalisées avec les substrats suivants : arabinose (1M), cellobiose (0.25M), fructose (1M), glucose (1M), maltose (1M), ribose (0.5M), xylose (1M), galactose (1M) et glycérol (1M).

Les produits du métabolisme ont été analysés par HPLC (High Performance Liquid Chromatography), chromatographie en phase liquide à haute performance avec une colonne Aminex HPX-87H (Biorad) et 5 mM d'H₂SO₄ comme phase mobile. Après trois semaines de croissance, 1ml de la phase liquide du tube de Hungate est prélevé stérilement et transféré dans un tube Eppendorf 1.5 ml. Après centrifugation à 13000rpm pendant 5min, 600ml du surnageant est transféré pour étude par chromatographie.

III.4.4.2 Production d'H₂

La production d'H₂ a été mesurée par chromatographie en phase gazeuse en utilisant la GC 8A Shymadzu (Shymadzu Corporation), équipée d'une colonne remplie (carbosphère) maintenue à 150°C, d'un injecteur et d'un détecteur maintenus à 200°C, d'azote comme gaz vecteur et un courant de filament de 70 mA. Après 3 semaines de croissance, 0.1 mL de la phase gaz du tube de Hungate est prélevé stérilement puis injecté dans la chromatographie pour permettre l'identification des gaz produits, notamment de l'H₂.

III.4.4.3 Production d'H₂S

La production d'H₂S est mesurée par dosage turbidimétrique des sulfures par la méthode de Cord-Ruwisch (1985). 0.1 mL d'échantillon (phase liquide) est ajouté à 4 mL de réactif de Cord-Ruwisch (50 mM de HCl et 5mM de CuSO₄). Le sulfate de cuivre, en réagissant avec le sulfure d'hydrogène (H₂S), forme un précipité de sulfure de cuivre (Goorissen *et al.*, 2003) suivant la réaction :



La quantité de sulfure est calculée par rapport à une courbe d'étalonnage réalisée avec du sulfure de sodium.

III.4.5 Etude de la microflore présente par l'intermédiaire de la biologie moléculaire

III.4.5.1 Généralités sur l'outil moléculaire

Dans tous types d'environnements, le ratio bactéries cultivables / bactéries non cultivables est très faible, de l'ordre de 1 à 5% selon les auteurs. En cela, une forte proportion de genres bactériens ne peut pas être étudiée par l'approche culturale car réfractaire à la culture, pour différentes raisons, notamment le manque de composés (ions, molécules organiques, facteurs de croissance...) nécessaires à leur croissance. Un bon moyen pour remédier à cela est d'utiliser les outils qu'offre la biologie moléculaire.

Ce domaine de la biologie, dont le terme « biologie moléculaire », a été utilisé pour la première fois en 1938 par Warren Weaver, désigne l'ensemble des techniques de manipulation d'acides nucléiques (ADN, ARN), appelées aussi techniques de génie génétique.

L'intérêt de la création d'une banque de gènes dans un environnement permet de mettre à jour les bactéries non cultivables par identification génétique et donc de pouvoir avoir accès à la microflore réellement présente dans un biotope.

Le projet de création d'une banque de gènes sur l'argilite du Callovo-Oxfordien se basera sur le gène codant pour l'ARN ribosomique 16S. Ce gène, ubiquitaire dans les domaines Eubacteria et Archaea, permet, par confrontation avec des banques de données, de pouvoir identifier les différentes bactéries d'un biotope à partir des différences nucléotidiques présentes dans la séquence du gène.

Une fois réalisée, la banque permet donc d'avoir accès aux différents groupes métaboliques grâce à l'analyse du gène codant pour l'ARNr 16S (sulfato-réducteur, autotrophe, méthanogène...). Une fois la bactérie identifiée (mais non cultivée), il est possible de créer un milieu de culture spécifique et pouvoir ainsi tenter de la cultiver pour une étude métabolique *in vivo*. A savoir que nombres de bactérie restent réfractaires à toute culture. Sans pouvoir faire d'étude *in vivo*, il sera possible d'apprécier la présence de ce type de bactérie dans un milieu et de « spéculer » sur ses capacités métaboliques (ex : si une bactérie a été identifiée comme appartenant au groupe des sulfato-réducteurs sur la base du gène codant pour l'ARNr 16S mais qu'il est impossible de l'isoler par culture, il sera alors possible de supputer sur la capacité de cette bactérie à produire notamment de l'H₂S et donc d'avoir une activité biocorrosive).

III.4.5.2 Extraction de l'ADN

L'extraction d'ADN a été réalisée par l'utilisation et suivant le protocole du kit Fast DNA spin kit for soil (MP Biomedicals), un kit utilisé en routine pour l'extraction d'ADN d'échantillon provenant du sol. Le protocole a été modifié d'après les données des travaux de thèse de Poulain (2008) qui montraient une faible quantité d'ADN présent. Les extractions ont été réalisées en utilisant 4x0.5g de poudre (au lieu de 0.5g) et par l'ajout de PolyAcryl Carrier dans la poudre, un agent biologique permettant de limiter la rétention des molécules d'ADN dans l'échantillon, mécanisme de rétention dont les minéraux argileux, entre autres, sont connus comme responsables (Urios *et al.*, 2012).

III.4.5.3 Amplification de l'ADNr 16S

L'amplification de l'ADNr 16S s'est faite sur le domaine des eubactéries et des archaeobactéries. Pour ces dernières, l'amorce Farch 9 (5'-CTGGTTGATCCTGCCAG-3') remplace l'amorce Fd1. La protéine gp32 (Q Biogen) du bactériophage T4, connue pour augmenter l'efficacité de la PCR a également été utilisée (quantité : 1/10^{ème} de la Taq polymerase). Le reste du protocole est le même que pour la partie « amplification de l'ADNr 16S » (III.4.3.2).

III.4.5.4 Migration et révélation de l'amplification

La migration des amplicons obtenus par PCR est réalisée sur gel d'agarose 2% (w/v). Après migration dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon TBE 10X (20min, 100mV), la révélation devient possible grâce au Bromure d'Ethydium (BET), un intercalant des bases de l'ADN ajouté dans le gel et qui réagit au rayonnement UV entre 254 et 365 nm.

De plus, pour confirmer ou infirmer les résultats obtenus par migration, une technique plus sensible à été utilisée : la spectrophotométrie (Biospec-nano 230V, Shimadzu Corporation, Japon). Cet outil permet de détecter des quantités infimes d'acides nucléiques dans 1 à 2 µL de produit PCR. La limite inférieure de détection est de 11 ng/µL à une DO à 260 nm).

III.4.6 Caractérisation d'une nouvelle espèce bactérienne

Le protocole expérimental utilisé pour la caractérisation d'une nouvelle espèce est décrit dans l'article *Desulfosporosinus burensis* sp. nov.: a spore-forming, mesophilic, sulfate-reducing bacterium isolated from a deep clay environment (Mayeux *et al.*, 2012), accepté par la revue IJSEM. Ce document se trouve en Annexe 4.

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1 ETUDE DE LA MICROFLORE PRESENTE DANS LES ECHANTILLONS LIQUIDES

IV.1.1 Analyses physico-chimiques des échantillons d'eau interstitielle

A partir d'un écosystème aqueux oligotrophe et profond, des essais d'isolement de bactéries ont été effectués. Au niveau du site de prélèvement, la température mesurée est de 19°C. Le pH mesuré dans l'eau interstitielle est proche de la neutralité. La concentration totale en espèces dissoutes est de 6 g/l. Les caractéristiques physico-chimiques de l'eau interstitielle sont indiquées dans le tableau 4.

pH	7.00<pH<7.4
Potentiel Redox	-200mV ESH
Température	20°C
Oxygène	Absence
Solutés : concentration massique totale	6 g/L
SO ₄ ²⁻	15 mmol/L
Cl ⁻	50 mmol/L
Na ⁺	55 mmol/L
Ca ²⁺	7.2 mmol/L
Mg ²⁺	5.8 mmol/L
K ⁺	1 mmol/L
TIC (Carbone inorganique Total)	4 mmol/L
Pression	4 MPa
TOC (Carbone Organique Total)	0.03 mole de carbone par litre
Carbone organique dissous	0.007 mole de carbone par litre

Tableau 4 : Principales caractéristiques physico-chimiques de l'eau interstitielle (d'après Vinsot *et al.* 2008)

IV.1.2 Etude microbiologique de l'eau interstitielle

L'isolement de différents microorganismes à partir des trois échantillons d'eau interstitielle a été effectué en utilisant la méthode d'enrichissement décrite dans la partie « matériels et méthodes ». L'objectif de cette partie est l'étude de la biodiversité des microorganismes qui composent cet environnement.

IV.1.2.1 Flacon ouvert, méthode gravitaire : KEY1001-1

Après filtration et récupération du filtrat dans de l'eau interstitielle stérile (filtrée), des études en anaérobiose ont été tout d'abord menées en ciblant les anaérobies totales et les sulfato-réductrices. Les résultats d'enrichissement, même après un temps prolongé d'incubation (4 semaines) se sont avérés négatifs.

Comme une absence de bactéries cultivables, en anaérobiose, a été supposée suite aux résultats précédents, des essais en condition aérobie, avec les mêmes conditions que pour le test de la microflore anaérobie totale, mais sans les réducteurs de milieu, ont été lancés. Les résultats d'enrichissements n'ont montré aucune croissance bactérienne. Une hypothèse a été émise sur le fait que, puisque des bactéries mobiles et donc viables, avaient été observées, quoiqu'en faible concentration, l'eau du Callovo-Oxfordien devait posséder un élément essentiel à la croissance bactérienne, élément ne se trouvant pas dans les milieux synthétiques utilisés pour ces expérimentations.

Pour tester cette hypothèse, un nouveau milieu a été employé. Ce milieu a été réalisé de la façon suivante : le milieu synthétique a été concentré par deux pour être ensuite dilué (50/50 v/v) avec de l'eau du Callovo-Oxfordien. Cependant, ce milieu a généré des précipitations à froid et également à chaud (autoclave). Un milieu précipité est un handicap pour les cultures bactériennes car il ne permet ni de réaliser des mesures de densité optique, ni de voir à l'œil nu si une croissance s'est initiée. C'est pour cette raison que les enrichissements se font systématiquement sur milieu limpide, sauf exigence particulière qui nécessite l'utilisation d'un milieu turbide ou partiellement précipité. Ce milieu non limpide a tout de même été testé et donc inoculé. Après quelques jours, aucune croissance n'a été observée, et cette absence de croissance a été confirmée même après une incubation prolongée (4 semaines).

Suite à cette absence de cultivabilité sur les différents milieux testés, en anaérobiose comme en aérobie, un test a été réalisé avec le milieu utilisé par CFG Services pour la technique du Nombre le Plus Probable ou NPP (essais réalisés en 2005) et dans lequel la présence d'une flore aérobie avait été démontrée pour d'autres eaux du Callovo-Oxfordien.

Ce nouveau milieu, dont la composition est résumée dans le tableau 5, a donc été testé. Ce milieu, appelé « milieu CFG » était aussi riche en matière organique facilement métabolisable que le précédent (6 g/L), mais composé de biotrypcase et extrait de levure au lieu de peptone et glucose. Cependant ce milieu a également précipité à froid lors de l'ajustement du pH avec une solution de KOH ou de NaOH. Ce milieu non limpide a tout de même été testé et inoculé. Après quelques jours, aucune croissance n'a été observée, et comme précédemment cette absence de croissance a été confirmée même après une incubation prolongée (4 semaines).

Cependant, lors d'une nouvelle observation de flacons pénicilline contenant les 75 mL d'Eau du Callovo-Oxfordien stockées avant filtration, un début de croissance bactérienne a été observé après une conservation prolongée (3 mois) à 4°C.

Composant	Concentration
Biotrypcase	1g/L
Extrait de levure	3g/L
MOPS (tampon phosphate)	3g/L
KCl	1g/L
NH ₄ Cl	3g/L
KH ₂ PO ₄	1g/L
MgCl ₂ x 7H ₂ O	1g/L
CaCl ₂ x 2H ₂ O	1g/L

Tableau 5 : Composition du « milieu CFG »

Suite à cette observation, il a été décidé de tenter, en dernier recours, un enrichissement directement sur l'eau de KEY1001, supplémentée de matière organique. Plusieurs tubes ont donc été réalisés avec comme milieu de base, non plus l'eau synthétique, mais l'eau du Callovo-Oxfordien provenant du forage KEY1001. Afin de faciliter une culture bactérienne des microorganismes observés, 5 séries d'essais de croissance ont été effectuées (Vf : 5 mL) :

Série 1 : glucose (0.1g/l), peptone (0.5g/l) et extrait de levure (0.1g/l) sans tampon carbonaté. Cette série correspond à une croissance en milieu pauvre et non tamponné.

Série 2 : glucose (1g/l), peptone (5g/l) et extrait de levure (1g/l) sans tampon carbonaté.

Série 3 : glucose (1g/l), peptone (5g/l), extrait de levure (1g/l) et 0.1mL de tampon carbonaté.

Série 4 : glucose (1g/l), peptone (5g/l), extrait de levure (1g/l) et 0.2mL de tampon carbonaté.

Série 5 : glucose (1g/l), peptone (5g/l), extrait de levure (1g/l) et 0.3L de tampon carbonaté.

Les 4 dernières séries (2-5) correspondent à une croissance en milieu riche (7g/l) et plus ou moins fortement tamponné.

Chacune des séries a été réalisée en quadruplicat pour pouvoir tester en même temps plusieurs températures (4, 20, 25 et 37°C).

Dès le lendemain, tous les tubes inoculés ont présenté une forte densité bactérienne, excepté les tubes inoculés à 4°C. La plus forte densité ayant été obtenue dans le tube de la série 4 à 25°C (S4), ce tube a servi comme nouvel inoculum pour les expériences ultérieures.

Une première souche a été isolée par la technique d'isolement par « suspension-dilution » à partir de ce tube S4.

Un repiquage de cette souche a été initié en milieu synthétique en profitant de la phase exponentielle de croissance dans laquelle se trouvaient les bactéries. Car un frein à l'utilisation de l'eau du Callovo-Oxfordien comme milieu de base vient du fait de ne pas pouvoir contrôler tous les besoins métaboliques indispensables aux bactéries qui pourraient être présentes dans l'eau du Callovo-Oxfordien. Pour la suite de ce travail, l'eau du Callovo-Oxfordien ne sera utilisée que si elle apparaît indispensable à la croissance d'une souche donnée. Le test a donc été effectué avec le milieu synthétique déjà utilisé, supplémenté de glucose (1 g/l), peptone (5 g/l), extrait de levure (1 g/l) et 0.2 mL de tampon carbonaté. Dès le lendemain, dans chacun des tubes inoculés, une croissance bactérienne à forte densité a pu être observée. De ces premiers résultats, l'eau du Callovo-Oxfordien semblerait soit

facilitatrice, soit requise pour la revivification des espèces bactériennes présentes. Pour cet enrichissement, c'est le côté facilitateur qui semble à prendre en compte puisque, une fois en phase exponentielle de croissance, le milieu synthétique (reproduisant les éléments présents théoriquement dans l'eau du Callovo-Oxfordien) s'est révélé suffisant pour obtenir une croissance équivalente. Toutes les expériences à partir de cet inoculum ont ensuite été réalisées avec les milieux synthétiques.

Après isolement et caractérisation phylogénétique, deux souches bactériennes ont pu être identifiées. Il s'est avéré que les deux souches étaient affiliées à deux espèces déjà connues dans la littérature sous le nom de *Pseudomonas peli* et *Brevundimonas mediterranea*. La comparaison de l'ADN de ces deux souches avec les banques de données a montré une homologie de 100% avec l'espèce *Pseudomonas peli* et *Brevundimonas mediterranea* pour la région codant pour l'ARNr16S.

IV.1.2.2 Flacon fermé, méthode gravitaire : KEY1001-2

Le dispositif de récupération de l'eau interstitielle installé à la tête du forage KEY1001 a permis de collecter 800 mL d'eau avant qu'un problème de pression n'apparaisse et n'oblige au retrait de ce dispositif.

Les 800 mL ont donc été récupérés et analysés. De la même manière que le premier test d'enrichissement et d'isolement effectué à partir de ce forage, deux souches bactériennes ont pu être isolées et appartiennent aux mêmes espèces que sur le premier dispositif placé par l'ANDRA. Ces deux espèces sont donc à nouveau *Pseudomonas peli* et *Brevundimonas mediterranea*. Ces espèces, d'après les données de la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures), possèdent chacune au moins une souche référencée qui a été isolée d'échantillons de sol. Cependant, il est assez difficile de se prononcer sur le caractère d'endémicité pour les quatre souches bactériennes appartenant à ces deux espèces et isolées dans ce travail à partir de l'eau du Callovo-Oxfordien.

Par contre, le fait de retrouver ces mêmes deux espèces bactériennes lors de deux étapes d'enrichissement-isolement réalisées à des dates différentes, mais sur le même site de prélèvement d'eau interstitielle, montre la continuité de la présence dans le temps de ces espèces bactériennes. En outre, ces résultats montrent de manière formelle leur capacité à subsister dans ce milieu qu'est l'eau interstitielle présente dans l'argile du Callovo-Oxfordien.

Dans ce même échantillon de 800 ml, une troisième souche a pu être identifiée, cette fois-ci en condition sulfato-réductrice (anaérobiose). La comparaison de la région codant pour l'ADNr 16S de cette souche a montré une homologie de 96% pour une espèce déjà décrite sous le nom de *Desulfosporosinus lacus*. Ce pourcentage d'homologie (<97%) est en faveur de la présence d'une nouvelle espèce. Pour confirmer cette hypothèse, un test d'hybridation ADN/ADN entre ce clone isolé et son espèce type apparentée a été réalisé. Les résultats ont montré une similarité de 29.6% entre ces deux souches. Le pourcentage de similarité a été fixé à 70% par un consensus scientifique pour permettre une description comme nouvelle espèce (Wayne *et al.*, 1987). En dessous de ce pourcentage, l'espèce peut être considérée comme nouvelle si les caractéristiques métaboliques entre ces deux organismes sont suffisamment différentes. Une étape de caractérisation de la souche BSRE11 a donc été lancée. La partie (IV.6) se consacre à l'étude de cette nouvelle espèce.

IV.1.2.3 Dispositif en ligne de prélèvement : PAC1002

Un échantillon liquide provenant de la ligne en peek reliant le module de prélèvement d'eau au chromatographe ionique a été soumis à un test de numération bactérienne par CFG/IRD. Le test a été effectué sur un milieu sulfato-réducteur et sur un milieu thiosulfato-réducteur et il s'est avéré positif dans les deux cas.

En utilisant toujours le même procédé, les colonies qui s'étaient développées ont été mises en culture pour être isolées et il est apparu que les colonies étaient les mêmes dans les deux milieux (sulfato-réducteur et thiosulfato-réducteur). Après identification, la souche (Figure 17) issue de cette colonie a été apparentée (98%) à une souche isolée d'une argile à kaolinite présente en Russie et identifiée sous le nom de *Pelosinus fermentans*. Cette souche décrite dans la littérature (Evgenya S. Shelobolina *et al.*, 2007) est connue pour sa capacité à réduire le fer ferreux en présence de composés fermentescibles de type extrait de levure, glucose ou encore lactate.

Cette souche bactérienne isolée du LS a été étudiée plus en détail pour vérifier s'il s'agissait ou non d'une nouvelle espèce, en comparant cette souche à l'espèce type par la technique de l'hybridation ADN/ADN. Avec un pourcentage de 76.1%, cette souche isolée n'a pas les critères pour être décrite comme une nouvelle espèce et reste donc affiliée à l'espèce *Pelosinus fermentans* (Figure 17).

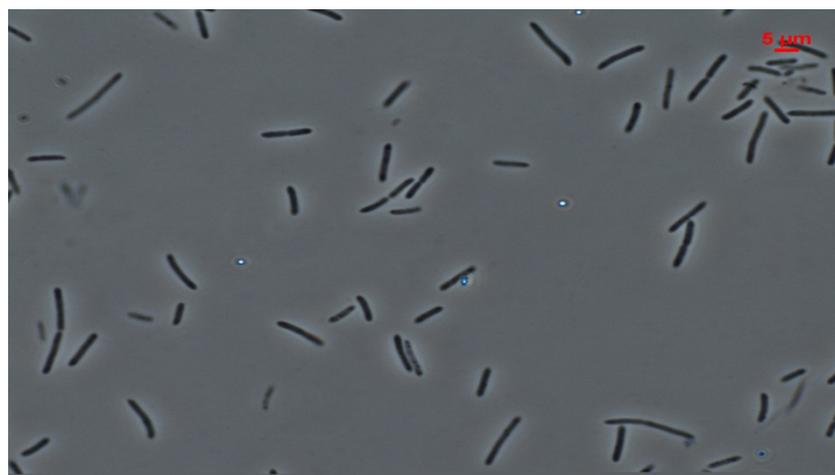


Figure 17 : *Pelosinus fermentans* observée au microscope optique à contraste de phase.

IV.2 ETUDE DE LA MICROFLORE PRESENTE DANS LES ECHANTILLONS SOLIDES

Les études de la biodiversité en milieu solide ont d'abord été initiées par réhydratation de la poudre de roche argileuse avec le milieu minéral (cf partie III.3.2.2) supplémenté de tampon carbonaté. Comme pour les échantillons liquides et après une absence de croissance bactérienne, même après un temps d'incubation prolongé (4 semaines), cette même poudre a été réhydratée avec de l'eau interstitielle stérilisée par filtration.

Cette roche réduite en poudre selon le protocole précédemment décrit est issue des « cœurs de carotte » provenant de deux forages différents : forage BAC1201 et forage TER1901.

IV.2.1 Forage BAC1201

Seuls les échantillons enrichis en condition aérobie (cf. III.4.1.1) ont montré des résultats positifs après deux semaines d'incubation. Les cultures ont été réalisées à 25 et 50°C. Après identification grâce au séquençage de la région codant pour l'ARNr 16S, 4 souches mésophiles et une souche thermophile ont été identifiées, toutes affiliées à une espèce déjà décrite (entre 99 et 100% de similarité). Sur ces 5 souches, 4 sont sporulantes. Les souches isolées appartiennent aux espèces suivantes :

Souches mésophiles sporulantes : *Bacillus circulans*, *Bacillus subtilis subsp. spizizenii*, *Brevibacillus laterosporus*

Souche mésophile non sporulante : *Pseudomonas putida*

Souche thermophile sporulante : *Geobacillus thermodenitrificans*

IV.2.2 Forage TER1901

Toujours sur le même principe, deux souches aérobies sporulantes dont une thermophile ont pu être isolées, souches apparentées à une espèce déjà décrite dans la littérature.

Souche mésophile sporulante : *Paenibacillus panacisoli*

Souche thermophile sporulante : *Ureibacillus thermosphaericus*.

Cependant, contrairement au forage BAC1201, un enrichissement en milieu anaérobie s'est montré positif en condition fermentaire. Après isolement et identification, cette souche a été affiliée à l'espèce déjà décrite dans la littérature, *Pelosinus fermentans*, dont une souche a été isolée lors des travaux précédents (échantillon CFG/IRD).

Une autre souche isolée une seconde fois a donc pu être affiliée à la même espèce *Pelosinus fermentans*, mais à partir d'un échantillon provenant d'un milieu solide. La comparaison de l'ADNr 16S entre la souche isolée de l'échantillon liquide et celle de cet échantillon solide a montré une homologie de 100%.

Isolée de deux endroits différents au sein du LS et dans les deux types d'échantillons étudiés, la potentialité du caractère d'endémicité de cette souche à l'argile du Cox est donc forte. Cette endémicité est appuyée par le fait que cette souche ait été initialement isolée puis décrite dans une argile à kaolinite en Russie. Remarque : PAC1002 et TER sont assez proches et dans la même galerie (GEX). Les essais ont été installés en 2005 tous les deux, même si les prélèvements d'eau dans PAC1002 et de roche dans TER étudiés ici sont postérieurs de plus de 5 ans.

IV.3 CONCLUSION PARTIELLE SUR LES ETUDES DE LA MICROFLORE DU LABORATOIRE SOUTERRAIN PAR APPROCHE CULTURALE

L'étude de la microflore présente dans l'eau interstitielle et dans les carottes de la roche argileuse du Cox a permis d'isoler et d'identifier plusieurs souches bactériennes. Des bactéries aérobies strictes, aérobies facultatives et anaérobies strictes ont pu être identifiées. Le tableau 6 classe les souches isolées suivant quatre paramètres : l'origine des échantillons et trois caractères métaboliques (température, anaérobiose et sporulation).

Sur les 11 souches identifiées, 8 d'entre elles sont sporulantes, 2 sont anaérobies strictes et 2 sont thermophiles. Parmi les souches thermophiles, *Ureibacillus thermosphaericus* a montré une croissance forte ($DO > 1$) en 5h à 55°C et *Geobacillus thermodenitrificans* à 65°C. La

souche représentant la nouvelle espèce *Desulfosporosinus burensis* quant à elle est mésophile mais également psychrotolérante. Sa croissance est beaucoup plus lente à 5°C qu'à 25°C mais une DO de 0.9 a été obtenue à 5°C au bout de deux mois d'incubation.

Pour toutes les souches aérobies strictes ou facultatives isolées dans ce travail, le milieu minimal est composé uniquement du substrat carboné (milieu synthétique en présence d'un seul substrat métabolisable et sans ajouts de vitamines). L'ajout d'extrait de levure en tant que facteur de croissance ou de vitamines n'influence pas la croissance. Elles font donc partie des bactéries de type oligotrophe.

	Aérobie			Anaérobie
	Mésophile		Thermophile	Mésophile
	Non-sporulante	Sporulante	Sporulante	Sporulante
KEY1001-1 - eau	<i>Pseudomonas peli</i> <i>Brevundimonas mediterranea</i>			
KEY1001-2 - eau	<i>Pseudomonas peli</i> <i>Brevundimonas mediterranea</i>			<i>Desulfosporosinus burensis</i>
PAC1002 - eau				<i>Pelosinus fermentans</i>
BAC1201 – roche saine	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Bacillus circulans</i> <i>Brevibacillus laterosporus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>subsp. spizizenii</i>	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	
TER1901 – roche au voisinage d'un essai thermique		<i>Paenibacillus panacisoli</i>	<i>Ureibacillus thermosphaericus</i>	<i>Pelosinus fermentans</i>

Tableau 6 : Souches isolées dans le LS (en gras les souches anaérobies facultatives)

Bien que l'environnement soit anaérobie, il n'est pas inhabituel de pouvoir y isoler des bactéries aérobies. En effet, une étude très récente, publiée en 2012 dans Science par Roy *et al.*, a mis en évidence une respiration microbienne aérobie dans une argile rouge sous-marine datée de 86 millions d'années. Cette équipe a montré que le taux de respiration cellule spécifique allait en décroissant avec la profondeur pour se stabiliser aux environs de 10⁻³ femtomoles d'O₂ par cellule et par jour. Malgré cela, cette équipe a permis :

- de confirmer qu'une véritable respiration microbienne aérobie est possible en profondeur même dans un environnement dit « anaérobie » à savoir quasiment anoxique.

- Mais surtout de montrer la persistance d'une vie sub-terrestre (ou sub-marine) active, quoique très faiblement, pendant 86 millions d'années et ceci grâce au maintien d'un métabolisme bactérien extrêmement faible.

De façon surprenante, très récemment Urios *et al*, (2012) ont également réussi à isoler par une approche culturale plusieurs genres différents, ceci après avoir étudié une roche encore 2 fois plus ancienne, une roche argileuse du Toarcian (180 millions d'années). Les diverses espèces isolées au cours de cette étude l'ont été isolées à d'échantillon argileux solide tout comme pour notre étude et regroupent les mêmes genres *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Geobacillus*, *Desulfosporosinus* et *Brevundimonas* qui ont été également retrouvés dans nos propres travaux. Il semblerait donc qu'il y ait une certaine convergence pour la biodiversité présente en conditions sub-terrestres à l'intérieur des écosystèmes argileux profonds, puisque des mêmes genres bactériens se retrouvent dans des biotopes similaires mais géographiquement très éloignés.

De plus, les travaux de l'Andra reportés en 2006 sur le même biotope (Sébastien Poulain, 2006) semblent également montrer notre capacité à retrouver, à plusieurs années d'intervalle, les mêmes groupes bactériens (au niveau du genre, voire de l'espèce bactérienne). En effet, en comparant les identifications bactériennes effectuées pour ces 2 travaux, on remarque une biodiversité partiellement commune puisque certains des genres présents (les genres *Desulfosporosinus* et *Pseudomonas*) ont été retrouvés dans les 2 études (Thèse S. Poulain et thèse B. Mayeux, ce travail), dont une identification de la même espèce. Ces 2 études montrent ainsi que la même espèce *Brevundimonas mediterranea* a été retrouvée puis isolée d'une eau de forage Il semblerait donc que ces genres ou espèces bactériennes aient la faculté de perdurer dans le temps et soient potentiellement indigènes à l'écosystème constitué par l'argilite du Callovo-Oxfordien.

IV.4 ETUDE DE LA BIODIVERSITE MOLECULAIRE PRESENTE DANS LES ECHANTILLONS SOLIDES DU LABORATOIRE SOUTERRAIN DE BURE

Quatre tentatives d'extraction d'ADN ont été réalisées sur une carotte provenant du forage TER1901 dont les enrichissements se sont avérés positifs.

IV.4.1 Premier essai d'extraction

La première extraction a été réalisée en 4 exemplaires sur le même échantillon mais pour pouvoir pooler et concentrer l'ADN faiblement disponible dans le but d'améliorer les potentialités d'amplification.

L'échantillon obtenu après le pool des quatre exemplaires (ADN de tout type) a ensuite été amplifié par PCR en ciblant les *Eubacteria* et les *Archaea*. Trois PCR ont été réalisées, la première a été réalisée directement après l'extraction. Le résultat de l'amplification étant négatif pour les *Eubacteria* et les *Archaea*, le produit d'extraction a été dilué pour diluer en même temps d'éventuels répresseurs de PCR pouvant se trouver dans le produit d'extraction¹. Malgré cela, le résultat de l'amplification a encore été négatif. Un nouvel essai a été mené en concentrant le produit d'extraction pour concentrer l'éventuel ADN présent. Les résultats de l'amplification ont été à nouveau négatifs.

¹ Les répresseurs sont des molécules présentes notamment dans des échantillons de surface et qui présentent des activités de répression de l'amplification par PCR, tels que les acides humiques ou fulviques.

Malgré ces précautions expérimentales, un doute subsistait quant à la présence d'un répresseur de PCR. C'est pour cette raison qu'une seconde extraction a été réalisée.

IV.4.2 Second essai d'extraction

La seconde extraction a été initiée pour lever le doute sur la présence de répresseur de PCR et en même temps pour pouvoir quantifier la sensibilité réelle du kit d'extraction utilisé. Pour cela, une série de 4 échantillons du LS a été utilisée. En parallèle, une série de 4 échantillons du Mont Terri a été également employée.

Composition des 4 échantillons utilisés :

- échantillon 1 : poudre stérilisée par UV, 20 min à $220000\mu\text{J}/\text{cm}^2$ (témoin négatif)
- échantillon 2 : poudre supplémentée de 10^3 bactéries et 10^3 archées
- échantillon 3 : poudre supplémentée de 10^5 bactéries et 10^5 archées
- échantillon 4 : poudre supplémentée de 10^7 bactéries et 10^7 archées

Pour augmenter la quantité d'amplicons produits pendant la PCR, la protéine GP32 du phage T4 a été ajoutée. Pour les extractions faites à partir des échantillons du forage BHT-1 et pour s'affranchir d'un potentiel biais amené par la protéine GP32, 4 témoins ont été réalisés : 2 témoins positifs l'un avec la protéine GP32 et l'autre sans ainsi que deux témoins négatifs, sur le même principe que les témoins positifs. Sur la Figure 18, on voit nettement que la protéine GP32 n'introduit aucun biais : les témoins positifs présentent une bande alors que les témoins négatifs n'en présentent pas, avec ou sans GP32 (deux puits à gauche des témoins positifs).

Avec la roche du LS transformée par l'ajout de la protéine, les résultats ont été positifs. L'absence de répresseurs de PCR présents dans l'argile du Callovo-Oxfordien est donc clairement établie. La sensibilité du kit d'extraction a montré qu'à partir de 10^3 bactéries (idem pour les archées) une révélation de l'ADN est possible (Figure 18). En effet, les spots, encadrés de différentes couleurs, sont de plus en plus faibles de 10^7 vers 10^3 et complètement absents pour 0 (ce qui était attendu). Pour déterminer plus précisément ce seuil, un test a été lancé avec 10^2 et 10^4 bactéries par tube. Les résultats ont encore été positifs. Le kit permet donc de détecter bactéries et archaées avec une concentration de 10^2 cellules ayant un ADN fonctionnel (ou suffisamment peu dénaturé) dans environ 0.5 g d'échantillon.

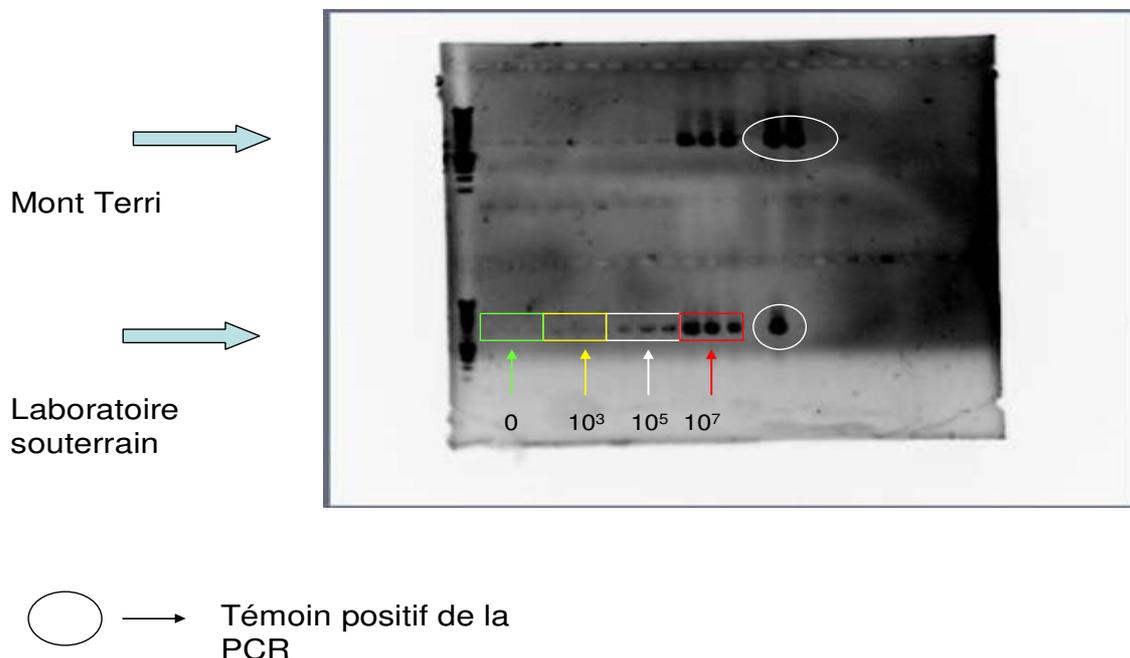


Figure 18 : Photo du gel de révélation de l'amplification par PCR du 2^e essai d'extraction d'ADNr 16S bactérien.

IV.4.3 Troisième essai d'extraction

Avec ces résultats encourageants, une troisième extraction a été réalisée en utilisant cette fois-ci un total de 10g de poudre de la carotte TER. Après extraction, les échantillons ont été poolés dans le même tube eppendorf puis concentrés (ThermoSavant, SC110A Speedvac® plus) par un facteur 5. Une fois la PCR réalisée, les résultats de l'amplification ont été de nouveau négatifs.

Malgré l'utilisation de PolyAcryl Carrier (qui augmente la précipitation des acides nucléiques présents dans l'échantillon) pendant l'extraction et de la protéine GP32 (qui augmente l'efficacité de la PCR) lors de la PCR, aucune amplification d'ADN n'a pu être obtenue.

IV.4.4 Quatrième essai d'extraction

Une dernière tentative d'extraction a été réalisée en utilisant un second protocole et un second type de kit : kit QIAamp Mini Kit. Le protocole utilisé (Moleta *et al.*, 2007) permet d'extraire de l'ADN dans des eaux peu chargées en biomasse. Les échantillons n'ont pas été filtrés mais la poudre de cœur de carotte a remplacé le filtre (utilisé pour l'étude de milieu liquide). Cette tentative d'extraction sur un pool de 4 échantillons a également donné des résultats négatifs.

IV.4.5 Conclusion partielle sur les études de la microflore par biologie moléculaire

Les analyses en biologie moléculaire effectuées lors de ce travail de thèse n'ont pas permis d'obtenir des résultats positifs aux différentes extractions d'ADN réalisées. Pour des raisons restées inconnues, aucune extraction d'ADN ne s'est avérée positive. Ces résultats de non extraction ni amplification d'ADN confirment d'autres travaux menés depuis 2009 sur divers échantillons du LS (N° document : APR 09010 RPP 0A, juillet 2009 & APR ANDRA 09010 RDM2, septembre 2009).

La conclusion du groupe concerné sur toutes ces séries de mesures est que l'ADN disponible via ces techniques est en deçà de la limite de détection, puisque aucun des échantillons n'a pu être amplifié, donnant ainsi un comptage par PCR et une analyse par SSCP négative.

Les résultats obtenus par ce même groupe ont été reportés tous concordants, c'est-à-dire que l'ensemble des résultats analytiques est resté en dessous de la limite de détection pour permettre l'amplification d'ADN provenant d'une quelconque microflore issue du LS.

Pour mes propres travaux, malgré les essais réitérés (4 extractions différentes et successivement testées) et malgré les différents kits d'extraction et volumes importants d'échantillons testés, les outils de biologie moléculaire utilisés au cours de ce travail n'ont pas permis d'extraire d'ADN microbien de la roche argileuse du LS. Pour confirmer ce résultat d'absence d'ADN extrait, la quantité d'ADN potentiellement présent dans les quatre extractions décrites ci-dessus, a été mesurée grâce à la spectrophotométrie (Biospec-nano 230V, Shimadzu Corporation, Japon). Cet appareil permet de détecter des quantités infimes d'ADN. Le résultat mesuré est en deçà du seuil de détection pour chacune de ces quatre extractions ce qui confirme bien l'absence (ou plutôt la quasi absence) d'ADN dans ces échantillons. Cependant, cette observation était relativement prévisible du fait du petit nombre et de l'hétérogénéité de distribution des pores les plus volumineux, de dimension micrométrique, susceptible de renfermer des microorganismes, attendus dans les échantillons.

Ces mêmes résultats avaient déjà été précédemment trouvés dans les travaux effectués sur le même site du LS (Thèse S. Poulain, 2006). Ainsi, à notre connaissance toutes les extractions d'ADN tentées à partir d'échantillons de carotte du LS n'ont jusqu'à ce jour pas donné de résultats positifs.

Par contre des travaux précédents menés par l'équipe de S. Selenska-Pobell (2009) sur des échantillons solides d'origine argileuse, mais provenant du site Suisse du Mont-Terri ont montré des résultats positifs. En effet, après extraction d'ADN microbien à partir de 50 g de roche argileuse du Mont Terri, la présence d'une microflore variée a été reportée. Ces tests ont été effectués, après conservation des échantillons de carotte à -70°C, à partir d'une lyse bactérienne directe. Lors de ces travaux, les études moléculaires effectuées ont montré la présence d'une microflore détectable et dont la composition varie suivant que les analyses ont été réalisées par prélèvement de roche argileuse provenant du pourtour de la carotte (< 1cm) ou provenant du seul cœur de la carotte.

Les résultats obtenus par l'équipe de S. Selenska-Pobell à partir de la partie superficielle de la carotte (pourtour) montrent la présence d'une microflore composée uniquement de β -protéobactéries (genres *Ralstonia*, *Burkholderia*) alors que le cœur de la carotte présente une microflore plus variée, composée de groupes bactériens étonnamment très divers.

Les effectifs bactériens identifiés comme présents au cœur des carottes se répartissent en 3 grands groupes :

Groupe 1 = les *Actinobacteria* (comprenant les genres *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Ureibacillus*, *Paenibacillus* et *Geobacillus*).

Groupe 2 = les *Acidobacteria* et également des α , β , γ et δ -*Proteobacteria* (comprenant les genres *Brevundimonas* pour les α et *Pseudomonas* pour les δ)
et Groupe 3 = les clostridiales (comprenant les genres *Desulfosporosinus* et *Pelosinus*).

Ces résultats sont étonnamment très variés pour un cœur de carotte dont le biotope est très restreint en termes de nutriments et intrants potentiels, donc en terme de disponibilité métabolique pour les micro-organismes présents. Mais le manque d'information sur les données expérimentales ne nous permet pas de « valider » ces résultats microbiologiques, tels qu'ils ont été obtenus.

- En effet, pour les pratiques culturales utilisées pour cette étude il n'a pas été précisé si les microorganismes avaient été préservés d'une lyse cellulaire lors de leur stockage à -70°C (grâce à la présence de glycérol ou autre composé protecteur).
- De même, pour les analyses moléculaires, il n'est pas précisé pour les pourcentages fournis si les % d'extractions obtenues correspondent à des microorganismes dominants en terme de quantités d'ADN retrouvées ou dominants en terme de nombre d'espèces identifiées.
- Et enfin, il est par ailleurs étonnant de constater qu'aucun des microorganismes identifiés dans les cœurs de carottes ne se retrouve sur le pourtour de la carotte. De ce fait, paradoxalement, pour les travaux réalisés sur le biotope argileux du Mont Terri, la biodiversité des zones contaminées ou contaminables se trouve très limitée par rapport à la forte biodiversité des zones potentiellement non contaminées.

Bien que les techniques d'échantillonnages et surtout la traçabilité devant permettre de minimiser au maximum toute intrusion bactérienne extérieure ne soient pas strictement les mêmes, une comparaison des résultats obtenus pour les travaux réalisés sur le biotope argileux du LS de Bure est néanmoins possible :

- L'utilisation du broyage fin par voie mécanique pour réduire la carotte en poudre, à l'instar des travaux de thèse de S. Poulain, est une technique qui a pu être considérée comme « trop violente », c'est-à-dire engendrant la possible dénaturation de l'ADN. Cependant, l'isolement de microorganismes par des techniques culturales sur les mêmes échantillons de carottes broyées dans les mêmes conditions montre la persistance d'un ADN tout à fait viable et donc potentiellement extractible. Cette présence bactérienne viable démontre bien qu'au moins une partie de l'ADN initialement présent n'a pu être détruit par broyage mécanique.
- L'utilisation du sciage, sous réserve que tous les microorganismes soient tués après élimination de la couche superficielle de la carotte (râpage puis nettoyage à l'alcool), est une technique envisageable. Par contre, la communauté scientifique s'accorde généralement sur le fait qu'une cassure nette au burin et marteau stérile représente le meilleur gage de non contamination des échantillons internes.
- Pour notre étude, l'utilisation d'une coupe franche (marteau et burin stérile), sous atmosphère anaérobie et stérile, élimine une potentielle contamination locale du fait qu'à aucun moment la « microflore non endogène », c'est à dire celle éventuellement présente sur le pourtour de la carotte, n'a pu se mélanger avec celle du « cœur de carotte ».
- Ces travaux ont permis l'isolement par pratique culturale et à partir d'un broyat de carotte de bactéries connues pour coloniser des biotopes argileux ou provenant du sol. Ces résultats confirment ainsi à nouveau, d'une part que de l'ADN fonctionnel (donc potentiellement extractible) est présent et d'autre part que le broyage effectué n'a pas détérioré la paroi cellulaire bactérienne (les cellules sont restées viables), et donc en aucun cas n'a pu en détériorer son noyau renfermant les molécules d'ADN à extraire.

Donc ce qui devra être amélioré pour l'avenir est donc plutôt, soit le seuil de sensibilité de la technique d'extraction à utiliser, soit réussir à s'affranchir de la « connexion forte » qui doit exister entre l'ADN à extraire et les forces ioniques présentes dans la structure argileuse étudiée.

Toujours concernant le matériel biologique présent en milieu argileux et son extraction, une étude très récente datée de 2011 et menée par l'équipe du Pr Magot, présente une nouvelle fois la difficulté d'extraire de l'ADN à partir de roche argileuse. Pour ces travaux c'est d'ailleurs cette technique du marteau et burin qui a été à nouveau utilisée pour échantillonner de manière fiable un cœur de carotte (Urios *et al.*, 2012).

Ces derniers résultats confortent le fait que pour les différentes études précitées, aucune extraction d'ADN n'a pu être validée à partir du Callovo- Oxfordien, et ceci malgré les divers essais et plus particulièrement les tests cumulatifs et variés de techniques d'extraction tentées au cours de ce travail.

De même, Urios *et al.*, (2012), ont travaillé sur de l'argilite plus ancienne, à savoir datant de 180 millions d'année à Tournemire (France) et cette argilite a été reportée par ces auteurs pour avoir des caractéristiques très proches de l'argile du Cox. Pour cette étude sur l'argile de Tournemire, deux approches différentes ont été testées : tout d'abord une extraction directe d'ADN à partir de l'argile et ensuite une séparation des cellules de l'argile avant lyse cellulaire. Tout comme dans nos propres travaux, malgré l'utilisation de poly-adenylate pour limiter la rétention de l'ADN par l'argile, aucun résultat positif n'a été obtenu lors de ces deux types d'extraction.

Ces diverses tentatives effectuées par divers auteurs, avec des techniques diverses et des argiles différentes (quoique comparables entre elles) confirment bien la difficulté technique actuelle pour obtenir une extraction d'ADN à partir d'échantillon de roche argileuse ancienne. Pourtant les nombreux isolats bactériens reportés précédemment montrent bien que cette microflore sub-terrestre est présente et viable, et donc possède un ADN tout à fait fonctionnel, et donc potentiellement extractible. De plus ce type de microflore provenant de roches sédimentaires anciennes a été très récemment reconnue comme capable de subsister de nombreux milliers d'années en conditions de forte restriction nutritive et avec de très faibles disponibilités en oxygène (Roy *et al.*, 2012).

IV.5 ANALYSES METABOLIQUES

Les microorganismes présents dans les ouvrages souterrains peuvent contribuer à modifier la composition des gaz et de l'eau dans les ouvrages. Ils peuvent aussi participer à l'altération des matériaux présents et en particulier des aciers en accélérant leur corrosion. Le processus de biocorrosion est un processus complexe, impliquant différents types de microorganismes.

Une analyse métabolique des souches isolées a été menée pour connaître la potentialité de biocorrosion des souches concernées. Durant cette étude, seules les souches aérobies facultatives et anaérobies strictes ont été testées.

IV.5.1 Souches aérobies

Les souches aérobies sont susceptibles de produire du dioxyde de carbone, par oxydation complète du substrat carboné initialement disponible et amené par la construction du centre de stockage. Le métabolisme de ces souches n'a pas fait l'objet d'étude spécifique ici.

IV.5.2 Souches anaérobies facultatives

IV.5.2.1 Acides gras volatils et alcool produits

Les souches anaérobies facultatives ont été testées sur différents sucres pour étudier les produits métaboliques issus de la dégradation de ces différents substrats carbonés.

Le tableau 7 synthétise les sucres utilisés et les produits issus de leur métabolisme.

Les acides gras volatils (AGV) sont définis comme étant des acides gras avec une chaîne carbonée inférieure ou égale à 5 atomes de carbone. En grande majorité, et ce pour toutes les souches, ont été formés les acides gras volatils suivants : acide formique, acide lactique et acide acétique et plus rarement acide butyrique. Ces composés sont présents sous leurs formes anioniques en solution : formate, lactate, acétate et butyrate. Leur concentration diffère suivant le sucre métabolisé ainsi que la souche testée. Un point commun à toutes les souches est la production d'acétate et d'éthanol.

De plus, on sait que pour la production d'une mole d'acétate, il est parallèlement produit une mole de CO_2 . Toutes les souches anaérobies facultatives isolées dans ce travail sont productrices de CO_2 , et ceci a été confirmé qualitativement par chromatographie gazeuse. Toutes les souches testées sont également productrices d'acétate, quel que soit le sucre métabolisé lors du métabolisme de l'éthanol. Les valeurs obtenues dans le tableau 7 sont une moyenne des duplicatas réalisés pour ce test.

Souches testées		<i>Paenibacillus panacisoli</i>	<i>Pelosinus fermentans</i>	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	<i>Bacillus circulans</i>
Substrat	Produits du métabolisme*	Quantité produite(mM)			
Cellobiose 5mM	Acétate	9.5		4.7	5.7
	Butyrate				
	Formate	13.6		7.1	
	Lactate				14
	Ethanol	11.4		3.7	6.2
Fructose 20mM	Acétate	15	23	7.6	3.8
	Butyrate		1.4		
	Formate	21.4		21	
	Lactate	Tr	3.9	Tr	44.5
	Ethanol	17.3	37.4	10.3	5.4
Glucose 20mM	Acétate	4.6	8	4.3	6.7
	Butyrate				
	Formate	7.2		4.6	3.3
	Lactate	Tr		Tr	
	Ethanol	5.3	8.4	3.2	1.2
Maltose 20mM	Acétate	3.4		5	3.8
	Butyrate				
	Formate	7.2		6.3	
	Lactate	Tr			44.1
	Ethanol	3.4		8.1	6.4
Ribose 10mM	Acétate	9.5	4		
	Butyrate				
	Formate	11.2			
	Lactate	Tr	28.5		
	Ethanol	9.6	2.7		
Xylose 20mM	Acétate	10.4	15		
	Butyrate		0.3		
	Formate	16			
	Lactate	Tr			
	Ethanol	12.1	32		
Glycérol 20mM	Acétate		6.3		
	Butyrate				
	Formate				
	Lactate				
	Ethanol		14.7		

Tableau 7 : Résultats des produits mesurés du métabolisme en fonction du sucre dégradé pour les souches anaérobies facultatives (Tr : traces), * : aucune croissance sur galactose.

IV.5.2.2 Production d'hydrogène

Les souches appartenant aux deux espèces isolées du LS de Bure, *Pelosinus fermentans* et surtout *Paenibacillus panacisoli* se sont avérées être des bactéries productrices d'hydrogène, responsable de la corrosion par fragilisation des aciers. La plus forte production d'hydrogène

a été obtenue en présence de cellobiose, fructose et xylose où la pression de la phase gaz piégée à l'intérieur des tubes de Hungate est montée avec *Paenibacillus panacisoli* à 1.4, 1.5 et 1.5 10⁵ Pa respectivement. Pour *Pelosinus fermentans*, une pression de 1.3 10⁵ Pa dans la phase gaz a été mesuré uniquement en présence de fructose.

Globalement pour le site du LS la présence de souches bactériennes productrices d'hydrogène est importante à considérer. En effet cet hydrogène représente la seule source d'énergie primaire non carbonée disponible au LS et permettant potentiellement à divers représentants bactériens de type autotrophe de pouvoir utiliser le CO₂ comme source de carbone pour leur croissance, grâce à la réduction du CO₂ par catabolisme, et ceci grâce à l'apport énergétique fourni par l'hydrogène (ces micro-organismes autotrophes, anaérobies stricts, peuvent être potentiellement présents au LS mais n'ont pas été isolés durant ce travail de thèse).

IV.5.3 Souche anaérobie stricte

IV.5.3.1 Production de sulfure d'hydrogène par *Desulfosporosinus burensis*

Les bactéries sulfato-réductrices sont responsables de la production de sulfure d'hydrogène. Une seule souche sulfato-réductrice a pu être isolée au LS. Cette souche BSREI1 a été entièrement caractérisée (cf. IV.6) comme nouvelle espèce et sa production d'H₂S a été mesurée. La plus forte production de sulfure d'hydrogène a été obtenue en présence de fructose en tant que donneur d'électrons. La Figure 19 présente la relation consommation/production entre le sulfate et le sulfure d'hydrogène en présence de fructose. Pour 10.76 mM de sulfate présent initialement dans le milieu, un maximum de 9.1 mM de sulfure d'hydrogène a été produit. Tous les sulfates ont donc été transformés en sulfures dans ce cas.

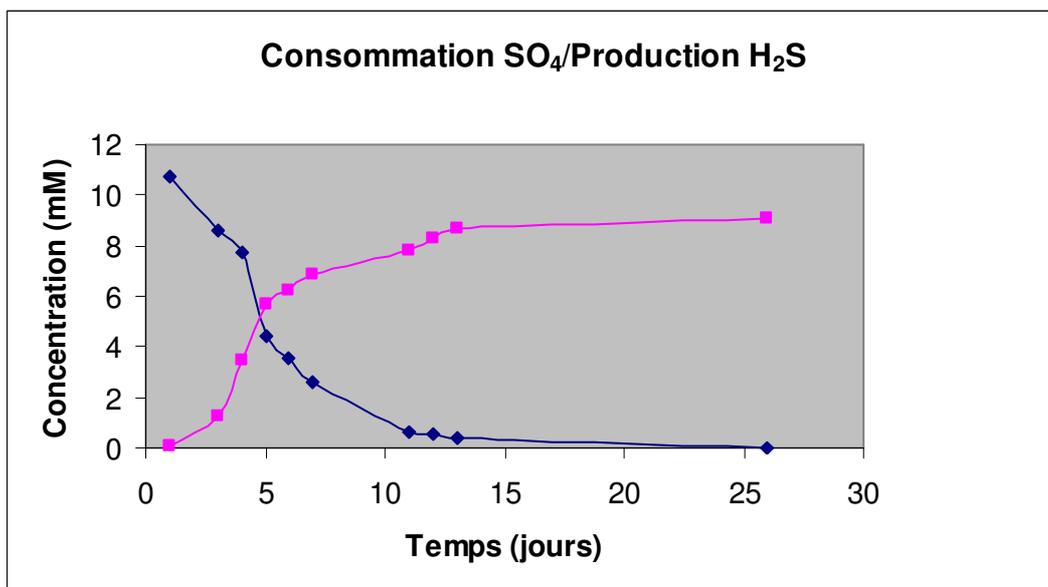


Figure 19 : Relation entre la consommation de sulfate et la production de sulfure d'hydrogène par *Desulfosporosinus burensis* (souche BSREI1) en présence de fructose. En rose : H₂S, en bleu SO₄²⁻ (mM = mmol/L).

IV.5.4 Conclusion partielle sur les études métaboliques

Grâce à l'étude métabolique des souches aérobies facultatives et anaérobies strictes, différents composés issus du métabolisme bactérien ont pu être identifiés. Trois différents types de gaz ont pu être montrés comme produits par les souches isolées du LS : le dihydrogène, le sulfure d'hydrogène et le dioxyde de carbone. Les résultats montrent également que différents AGV sont produits par fermentation de sucres à la fois par les souches anaérobies facultatives et par les bactéries anaérobies strictes. En plus des AGV, de l'éthanol a également été produit (excepté pour *D. burensis*).

IV.6 CARACTERISATION D'UNE NOUVELLE ESPECE DE SULFATO-REDUCTEUR : *DESULFOSPOROSINUS burensis*

Les analyses phylogénétiques des différents échantillons du LS ont montré une diversité des espèces microbiennes présentes, la plupart étant de type aérobie mésophile. Cependant, l'étude de l'eau interstitielle a permis l'isolement et l'identification d'une nouvelle espèce. Cette espèce nouvelle possède un métabolisme purement anaérobie de type sulfato-réducteur. Cette souche a été référencée par les six lettres suivantes : BSREI1 pour Bactérie Sulfato-Réductrice isolée de l'Eau Interstitielle 1.

IV.6.1 Etude phylogénétique de la souche BSREI1

Le séquençage de l'ADNr 16S de la souche BSREI1 a été réalisé et les résultats obtenus ont permis de positionner la souche par rapport aux espèces les plus proches. Cette séquence a été comparée avec les séquences de l'ADNr 16S des souches appartenant au genre des *Desulfosporosinus*. Cette comparaison n'a pas permis de l'affilier à une espèce connue. Cette souche possède un pourcentage de similitude de 96% avec l'espèce *Desulfosporosinus lacus* qui lui est la plus proche phylogénétiquement (Figure 20). En se basant sur les caractéristiques phylogénétiques, la souche BSREI1 a été décrite comme une nouvelle espèce appartenant au genre *Desulfosporosinus* : *Desulfosporosinus burensis* sp. nov. Une caractérisation phénotypique, physiologique et métabolique a été réalisée.

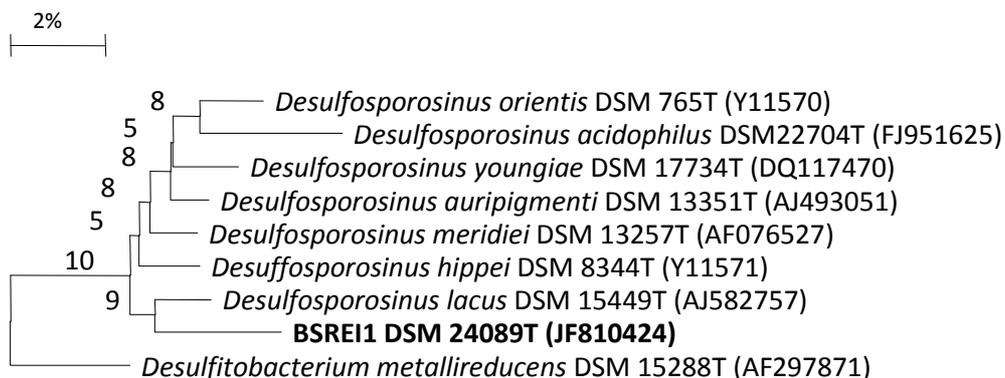


Figure 20 : Position phylogénétique de la souche BSREI1 parmi les membres du genre *Desulfosporosinus*.

IV.6.2 Propriétés morphologiques de la souche BSREI1

Les colonies de la souche BSREI1 ont été obtenues après un mois d'incubation en Roll tube et ont un diamètre compris entre 1 et 2 mm. L'observation macroscopique de la souche BSREI1 a montré que les colonies bactériennes sont transparentes, présentant une morphologie circulaire et à contours réguliers. L'observation microscopique des cellules bactériennes (Figure 21) montre que celles-ci sont en forme de bacilles avec une forme caractéristique dite en « fer à cheval » et sont sporulantes. Une absence de mobilité a été observée en milieu synthétique mais de façon surprenante, la mobilité de la souche BSREI1 a pu être observée dans son milieu originel, l'eau interstitielle. La taille des cellules de la souche BSREI1 en phase exponentielle de croissance, est comprise entre 5 et 7 μm de long et 0.9 et 1.1 μm de large. Les cellules sont séparées ou groupées deux à deux. L'analyse des coupes au microscope électronique de la souche BSREI1 montre qu'elle possède une paroi typique des bactéries Gram positif.

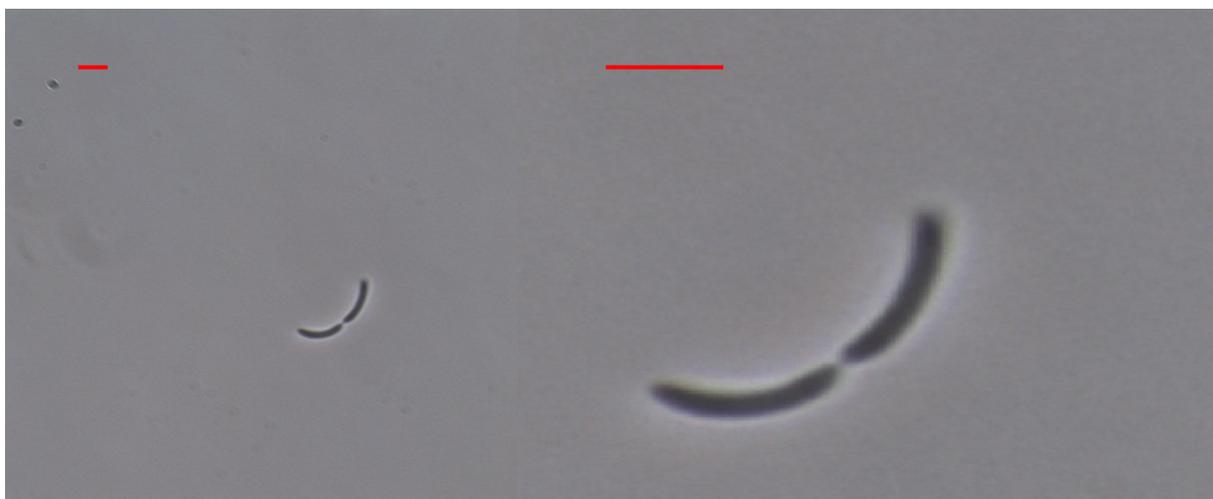


Figure 21 : Souche BSREI1 observée au microscope optique à contraste de phase (barre = 5 μm)

IV.6.3 Etude physiologique de la souche BSREI1

IV.6.3.1 Température optimale de croissance

La multiplication de la souche BSREI1 a été évaluée dans différentes conditions de culture (température, pH et concentration en sel). Le suivi de la DO a permis de déterminer le taux de croissance. La souche BSREI1 est capable de se développer à des températures comprises entre 5 et 30°C. La température optimale de croissance est de 25°C. Il s'agit donc d'une souche mésophile (Figure 22).

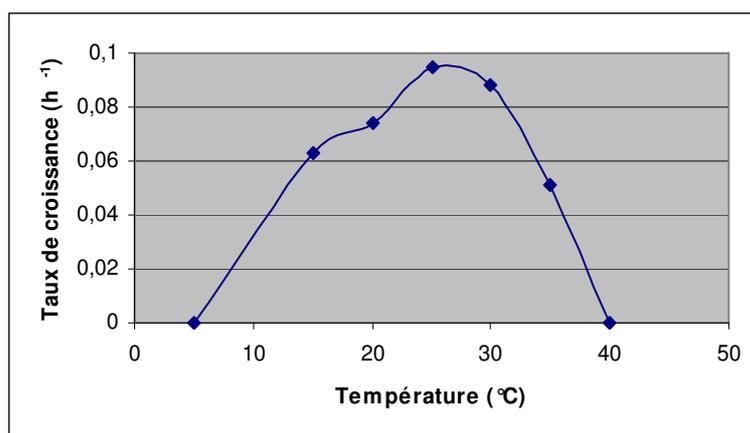


Figure 22 : Cinétique de la croissance de la souche BSREI1 en fonction de la température.

IV.6.3.2 Effet du pH

La souche BSREI1 se multiplie à des pH limites situés entre 6 et 8 avec un optimum à 7. En dehors de ces limites, la croissance est complètement inhibée. BSREI1 est donc une souche neutrophile.

IV.6.3.3 Influence de la concentration en sel

La souche BSREI1 a une véritable croissance jusqu'à une concentration de 15 g/l de sel (1.5%). Au-dessus de cette limite, la croissance est complètement inhibée et les cellules ayant servi d'inoculum entrent en lyse cellulaire.

IV.6.4 Propriétés métaboliques de la souche BSREI1

IV.6.4.1 Etude de la dégradation des substrats par la souche BSREI1

Dans le but de déterminer la dégradation des substrats carbonés par la souche BSREI1, différents substrats ont été ajoutés au milieu de croissance. L'utilisation de ces substrats est contrôlée par la mesure de la DO et la détermination des produits formés. Les résultats obtenus en HPLC, associés à la mesure de la DO, ont montré que la souche BSREI1 est capable de dégrader en présence de sulfate le crotonate, le formate, le lactate, le pyruvate, le fructose, le glycérol et l'extrait de levure (Tableau 8). Ces substrats organiques sont incomplètement oxydés en acétate, excepté pour le crotonate (acétate et formate), le formate (H_2/CO_2 et traces d'acétate) et l'extrait de levure (acétate et propionate). Toutes ces dégradations en présence de sulfate sont couplées à la production de sulfure d'hydrogène. Cette nouvelle espèce a également été comparée aux espèces les plus proches (Tableau 8).

Caractéristiques	Souche BSREI1 ^T	<i>Desulfosporosinus lacus</i> ^{a,c} DSM 15449 ^T	<i>Desulfosporosinus meridiei</i> ^{b,c} DSM 13257 ^T	<i>Desulfosporosinus hippei</i> ^{b,c} DSM 8344 ^T
Source	Roche argileuse	Sédiment de lac	Eau souterraine anaérobie	Dépôt de permafrost
Diamètre cellulaire (µm)	0.9-1.1	0.5-0.7	0.7-1.1	1.0-1.2
Gram	Positif	Négatif	Négatif	Négatif
Position de l'endospore	Subterminale	Subterminale	Subterminale	Terminale
Mobilité	Variable	Variable	Mobile	Mobile
Gamme de température (°C)	5-30	4-32	10-37	5-37
Température optimum (°C)	25	30	28	28
Gamme de pH	6-8	6.5-7.5	ND	6.5-7.5
pH optimum	7	ND	7	7
gamme de NaCl (%)	<1.5	ND	<4.0	<2.0
Donneur d'électrons en présence de sulfate				
H ₂ (source de carbone)	-	+ (avec CO ₂)	+ (avec CO ₂)	-
Fructose	+	ND	ND	ND
Ethanol	-	+	ND	+
Glycérol	+	+	+	-
Méthanol	-	+	+	-
Accepteurs d'électron ^{1,2}				
Sulfite	+	+	+	-
Sulfure	-	-	+	-
Fe(III)	-	+	-	-
Croissance fermentaire sur lactate	-	+	+	-
G + C %	43.3	42.7	46.9	42.1
Quinones	MK-7	MK-7, MK-5	ND	ND
ND not determinated +, support growth; -, did not support growth ¹ with fructose as electron donor for strain BSREI1 ^T ² with lactate as electron donor for the other strains ^a Data from <i>Ramamoorthy et al.</i> , 2006 ^b Data from <i>Vatsurina et al.</i> , 2008 ^c Data from <i>Lee et al.</i> , 2009				

Tableau 8 : Comparaison entre la souche BSREI1 et les espèces phylogénétiquement proches.

IV.6.4.2 Milieu minimum

Ce test a pour but de vérifier quels sont les besoins de la souche pour sa croissance. Pour cela, différentes concentrations en extrait de levure (0.1, 0.5, 1 g/l) sont ajoutées au milieu avec le substrat de référence (fructose pour la souche BSREI1). Pour chaque concentration d'extrait de levure, on supplémente le milieu ou non de vitamines de Balch. Bien que la croissance soit plus forte et plus rapide en présence d'extrait de levure et de vitamines, ces éléments ne sont pas indispensables à la croissance de la souche. En effet, la souche BSREI1 peut se multiplier en présence de fructose seul. La souche BSREI1 est donc une souche oligotrophe.

IV.6.4.3 Composition de la souche BSREI1 en acide gras (%)

Les résultats des analyses des lipides de la paroi de la souche BSREI1 sont indiqués dans le tableau 9 ci-dessous (cf. annexe 4 pour la méthode utilisée).

Acide gras	BSREI1
C_{14:0}	12.28
C_{16:1} ω7c	39.95
C_{16:1} ω9c	12.52
C _{16:1} ω5c	2.77
C_{16:0}	17.06
Iso-C _{17:1} I et/ou anteiso-C _{17:1} B	4.22
C _{18:1} ω9c	3.30
C _{18:1} ω7c	4.80
C _{18:0}	1.22

Tableau 9 : Composition en acides gras de la souche BSREI1. En gras, les acides gras majoritaires.

IV.6.4.4 Test d'anaérobiose

Les résultats de la tolérance à l'oxygène de la souche BSREI1 montrent que la croissance est nulle, même en présence d'une faible quantité d'oxygène. Il s'agit donc d'une souche anaérobie stricte (cf. annexe 4 pour la méthode utilisée).

IV.6.4.5 Etude des accepteurs d'électrons

Dans le but de déterminer les accepteurs d'électrons finaux utilisés par la souche BSREI1, le soufre élémentaire, le sulfate, le thiosulfate, le sulfite, le fumarate, le nitrate, le nitrite et le fer ferrique ont été testés. Le fructose est utilisé comme source de carbone pour la souche BSREI1. Cette étude montre que tous les accepteurs d'électrons testés ne sont pas utilisés par la souche BSREI1. La souche BSREI1 est capable de réduire uniquement le sulfate, le thiosulfate et le sulfite en sulfure d'hydrogène. Par contre, elle n'est pas capable de réduire le soufre élémentaire, le fumarate, le nitrate, le nitrite et le fer ferrique.

IV.6.5 Conclusion partielle sur la caractérisation d'une nouvelle espèce

L'étude de la microflore présente dans l'eau interstitielle du Cox a abouti à l'isolement et l'identification d'une souche bactérienne sulfato-réductrice BSREI1. L'identification moléculaire de cette souche montre qu'elle est phylogénétiquement proche des souches du genre *Desulfosporosinus* avec un pourcentage de similitude de 96% avec *Desulfosporosinus lacus*. Les caractéristiques phénotypiques, biochimiques, physiologiques, métaboliques et phylogénétiques ont donc permis de classer la souche BSREI1 comme étant une nouvelle espèce du genre *Desulfosporosinus*, dont nous avons accordé le nom de *Desulfosporosinus burensis*. La souche type est BSREI1^T a été déposée dans les banques DSM et JCM sous le n° DSM 24089^T et JCM 17380^T respectivement (Mayeux *et al.*, 2012).

Desulfosporosinus burensis est une espèce bactérienne anaérobie stricte, sulfato-réductrice et donc productrice de sulfure d'hydrogène. Les tests réalisés lors de ce travail ont montré sa capacité à réduire en sulfure d'hydrogène des composés soufrés représentant plusieurs niveaux d'oxydation du soufre, à savoir le sulfate, le thiosulfate et le sulfite. Pour environ 10mM de sulfate présent, *D. burensis* produit 9 mM de H₂S. Cette souche n'est cependant pas capable de réduire les nitrites ni les nitrates. Le produit majoritaire de son métabolisme est l'acétate.

CHAPITRE V : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CHAPITRE V : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

V.1 CONCLUSION GENERALE

L'étude de la faisabilité d'un stockage de déchets radioactifs en profondeur est un sujet d'étude commun à de nombreux pays comme les Etats-Unis, la Suède ou la Suisse. En France, l'Agence Nationale pour la Gestion des Déchets Radioactifs (Andra) a construit un laboratoire souterrain dans la roche argileuse du Callovo-Oxfordien pour mener ces études. Le présent travail a eu pour objet d'isoler des souches bactériennes métaboliquement actives au sein de ce Laboratoire de Recherche Souterrain. Son objectif est de contribuer à évaluer le rôle potentiel des microorganismes dans un stockage de déchets radioactifs. En effet, les microorganismes peuvent avoir une action irréversible sur le long terme en raison de leur activité métabolique et des co-produits de ce dernier : changement des conditions physiques et (géo)chimiques du site de stockage, production de gaz, de molécules complexantes et augmentation des effets abiotiques de la corrosion.

Les bactéries ont la capacité de produire des gaz comme le dioxyde de carbone, le méthane ou encore l'hydrogène moléculaire. En conséquence, les microorganismes doivent être pris en compte lors de l'étude de l'évolution des gaz dans un stockage. De plus, ces gaz peuvent représenter une source de carbone et d'énergie non négligeable à la croissance de certains types bactériens (autotrophes) et alimenter ainsi un réseau trophique implanté dans le site de stockage.

Par ailleurs, les microorganismes peuvent jouer un rôle sur la migration des radionucléides par différents processus. Si les microorganismes sont mobiles, ils peuvent augmenter la migration des radionucléides en agissant en tant que colloïdes. Ils peuvent également produire des agents chélateurs (comme les anions aliphatiques à courte chaîne carbonée et notamment l'ion acétate) et modifier le pH et l'alcalinité de leur environnement (consommation de l'oxygène, réduction des ions métalliques, production d'acide), affectant à leur tour la solubilité des radionucléides.

Enfin certains microorganismes sont responsables de biocorrosion. Les produits de leur métabolisme (hydrogène sulfuré) et leur métabolisme lui-même (oxydation/réduction des métaux) peuvent influencer sur le taux de corrosion abiotique.

La présente étude a été réalisée sur deux types d'échantillons provenant du LS de Bure : des échantillons de roche provenant de forages à 490 m de profondeur et des échantillons d'eau interstitielle, prélevés à la même profondeur.

Une approche culturale réalisée sur ces échantillons a permis de mettre en évidence la présence d'une microflore faible mais viable et métaboliquement assez variée. Deux espèces anaérobies strictes, neuf espèces aérobies dont quatre possèdent également un métabolisme anaérobie facultatif ont pu être isolées. Sur ces 11 espèces bactériennes, deux sont thermophiles, huit sont sporulantes et une espèce est psychrotolérante. Dans ce travail, même si le nombre de genres isolés est faible, il représente plusieurs types métaboliques différents : sulfato-réducteur, réducteur de Fe(III), fermentaire et aérobie (oxydation complète des substrats en CO₂).

Le caractère d'endémicité de ces bactéries ne peut être clairement établi pour la majorité des souches. Deux d'entre elles semblent cependant être autochtones : *Pelosinus fermentans*, bactérie anaérobie réductrice de Fe(III), isolée dans les échantillons d'eau et de roche et *Desulfosporosinus burensis*, espèce sulfato-réductrice, nouvellement isolée à Bure.

La relative faible biodiversité rencontrée pour ce travail peut s'expliquer par le fait, d'une part que l'isolement bactérien entraîne un fort biais réducteur sur la biodiversité par rapport à la technique moléculaire, et d'autre part du fait de l'oligotrophie du milieu qui oblige les microorganismes présents de manière endogène à adopter un métabolisme très lent et donc avec un très faible voire nul doublement cellulaire bactérien pendant de longues périodes.

En complément, il est également possible que la restriction de l'espace disponible *in situ*, c'est-à-dire la faible porosité de l'argile du LS de Bure, ait restreint ou limité la prolifération bactérienne. En effet, on trouve en moyenne 2% de pores de l'ordre du micromètre, seul endroit suffisamment grand pour permettre le développement bactérien. Par ailleurs des études de PLFA, Phospholipid fatty acid, tendent à montrer qu'il y aurait une concentration cellulaire comprise entre 10^5 et 10^6 cellules viables par gramme d'argile (Stroes-Gascoyne *et al.*, 2004) au niveau des argiles à Opalinus du Mont-Terri, argiles minéralogiquement proches de celles du LS.

Il est cependant à noter qu'une certaine convergence entre les genres bactériens identifiés comme présents semble exister au sein des environnements argileux. Lors de leurs travaux, Poulain (2006) puis Urios *et al.*, (2012) ont identifié divers genres bactériens, dont plusieurs d'entre eux sont identiques à ceux isolés durant ce travail. On y retrouve notamment, en comparant ces 3 travaux pourtant réalisés à 6 années d'intervalle, les mêmes identifications des 4 genres bactériens suivants : *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, *Bacillus* et *Desulfosporosinus*.

Il est également important de noter qu'une plus forte majorité de bactéries Gram positives ont été retrouvées dans les zones dites « non perturbées » de l'environnement argileux étudié. Ce sont les échantillons solides de ce travail, et la zone notée comme « non perturbée » pour l'étude d'Urios *et al.*, (2012). Il semblerait que la « matrice argileuse » exerce une pression sélective en faveur des bactéries Gram positives sur des temps géologiques, soit en raison des caractéristiques géochimiques de la roche soit en raison de la faible quantité d'eau disponible. Cette sélection semble plus résulter d'un meilleur taux de survie que d'une adaptation physiologique ou métabolique puisque l'activité microbienne est supposée très faible dans ce type d'environnement.

Malgré les différents protocoles appliqués pour extraire l'ADN de l'argile, le résultat négatif ne peut pas conduire à certifier l'absence de bactéries viables au sein de la roche du Cox. Cette approche moléculaire n'a pas pu permettre l'extraction de l'ADN, bien que cet ADN ait pourtant été montré comme à la fois viable (puisque obtention puis isolement de souches cultivables à partir de ces mêmes échantillons) et donc nécessairement présent dans les échantillons de roche. En effet, il a été démontré que l'ADN a la capacité de se lier fortement aux minéraux argileux et peut être ainsi protégé des réactions chimiques (ou enzymatiques) indispensables pour permettre son extraction (Gallori *et al.*, 1994 ; Garet and Moriarty, 1996).

Ces difficultés opératoires pour l'extraction d'ADN de structures argileuses ne sont pas nouvelles. Mais elles n'ont pas, à notre connaissance, été résolues, puisque très récemment Urios *et al.*, (2012) ont également rencontré les mêmes difficultés sur l'extraction d'ADN dans une argilite plus âgée et provenant du Toarcien (-180 millions d'années). En effet, malgré différents protocoles et de nombreuses expérimentations tentées lors de ces travaux, ils

n'ont pu obtenir de résultat positif d'extraction avec leur propre approche moléculaire et n'ont ainsi pas pu établir, avec l'outil moléculaire, quelle était la biodiversité de leur environnement argileux.

Face à cette difficulté récurrente pour l'extraction d'ADN et après consultation de la littérature déjà existante, nous proposons plusieurs hypothèses qui s'avèrent être en accord avec les très récents travaux de Urios *et al.*, (2012).

Voici les trois hypothèses proposées, pour justifier une absence récurrente d'extraction d'ADN :

- Premièrement, la très faible concentration en microorganismes potentiellement intacts se trouvant dans la couche d'argile. Cette hypothèse est appuyée par les résultats obtenus par les études menées par l'IRD, CFG Services et le BRGM qui ont montré que jusqu'à 80% des cellules microbiennes comptabilisées pouvaient ne pas être viables. Mais cette première hypothèse ne semble pas valide car cette non extraction existe même lorsque les pourcentages de viabilité comptabilisés sont élevés (travaux IRD et CFG Services). Par contre une faible concentration « globale » en micro-organismes pourrait justifier ces difficultés d'extraction rencontrées.
- Deuxièmement, la présence potentielle de cellules microbiennes viables mais non cultivables et possédant une paroi cellulaire épaisse réfractaire à la lyse cellulaire par les techniques utilisées en routine au laboratoire. Cette deuxième hypothèse ne semble pas la bonne non plus car cette non extraction existe alors que des parois cellulaires « fines » ont été rencontrées dans ce travail, grâce à l'isolation de souches bactériennes à la fois Gram positives et Gram négatives.
- Troisièmement, la présence d'une liaison forte et irréversible de l'ADN d'origine microbienne avec les minéraux argileux. Cette dernière hypothèse semble la plus plausible.

Ainsi, un effet cumulatif entre d'une part la faible quantité de cellules microbiennes disponibles et le caractère ionique de type « liaison forte » entre l'ADN et les molécules argileuses expliqueraient de manière très argumentée ces résultats négatifs.

Ce qui renforce cet effet cumulatif possible entre les hypothèses 1 et 3, entre la « faible quantité » de cellules présentes in-situ dans la roche argileuse et la « liaison forte » de l'ADN avec l'argile est que, malgré l'emploi de 2 facilitateurs différents, chacun des 2 étant bien reconnu pour son efficacité à limiter cette rétention (le PolyAcryl Carrier dans cette étude et le poly-adenylate pour l'étude de 2012 de Urios *et al.*) aucun début d'extraction n'a pu être pourtant observé. Ainsi aucun extrait d'ADN n'a été trouvé sur les divers échantillons argileux testés alors que, même avec un très faible rendement extractif, des traces d'ADN auraient pu être recueillies par l'ajout de ces « facilitateurs ». Mais cela n'a pas été le cas, et ceci même lorsque, pour notre étude, de gros volumes de prises d'échantillons ont été tentées, ou même après un « pooling » de différents échantillons.

Actuellement, à notre connaissance (pour des sédiments argileux) la seule extraction en milieu argileux réussie et publiée a été réalisée par les travaux de Boivin-Jahns *et al.*, (1996) mais sur une argile potentiellement très différente. En effet cette extraction réussie provient de l'argile de Mol (Belgique) une argile d'origine et de composition très différente de celles utilisées dans les études pré-citées.

Ces seuls résultats positifs d'extraction d'ADN de roche argileuse peuvent être expliqués par différents facteurs majeurs :

- La couche argileuse de Mol est d'une part beaucoup plus jeune, datée de 35 millions d'année. Elle est donc plus jeune de plus de 100 millions d'années par rapport à la couche sédimentaire du Cox de cette étude.
- La couche argileuse de Mol contient 3-4 fois plus d'eau interstitielle. Elle est donc plus propice à une prolifération bactérienne et potentiellement plus compatible avec la présence d'une « liaison plus faible » entre l'argile et l'ADN présent.
- Et surtout, la composition minéralogique de l'argile de Mol est très différente (Zeelmaekers *et al.*, (2010), Deniau *et al.*, (2008)). Cette dernière différence semble la plus pertinente du fait de sa relation de cohésion chimique différente et donc avec la présence d'une « liaison plus faible » entre l'argile et l'ADN présent.

Ce qui renforce très fortement ces précédentes argumentations est que le protocole utilisé par l'équipe de Boivin-Jahns *et al.*, (1996) a été également testé par Poulain *et al.*, (2008) sur l'argile à Opalinus du Mont-Terri (170 millions d'années). Des études comparatives (Mazurek *et al.* 2008) ont montré que l'argile du Mont Terri était de composition plus proche de celle du Cox (Travaux de Poulain et cette étude) que de l'argile de Mol (Belgique).

Les résultats obtenus avec les travaux de Poulain ont permis de montrer que, malgré cette utilisation d'un protocole d'extraction d'ADN efficace pour l'argile de Boom, aucune extraction et amplification d'ADN n'avait pu être réalisée pour l'argile du Mont Terri, et ceci malgré de nombreuses modifications du protocole (thèse de S. Poulain, 2006).

Notre propre hypothèse est donc que, du fait de cette proximité minérale entre l'argile du Mont Terri et l'argile du Cox, le critère majeur qui pourrait expliquer la NON extraction d'ADN dans ces 2 études, et le succès de cette même extraction d'ADN pour l'argile de Mol, serait la différence de composition minéralogique des différentes couches argileuses analysées.

Ce travail a permis d'établir la présence de différents métabolismes microbiens, dont certains d'entre eux, au vu des disponibilités métaboliques in-situ, pourraient potentiellement être actifs dans la couche argileuse du Cox. Les études métaboliques effectuées ont montré pour la totalité des souches isolées de type bactéries anaérobies facultatives, la production d'acides gras volatils (dont l'acétate obligatoirement présent) ainsi que la production d'hydrogène pour *Paenibacillus panacisoli*. Cette même production d'hydrogène a été montrée pour une souche anaérobie stricte *Pelosinus fermentans*. La souche *Desulfosporosinus burensis* est quant à elle productrice de sulfure d'hydrogène. Toutes les souches isolées lors de ce travail sont également productrices de CO₂.

Les études bibliographiques permettent de suspecter, en raison de ces différents métabolismes identifiés, la possibilité de phénomènes de biocorrosion au sein du site de stockage. En effet, l'étude des produits du métabolisme a permis de mettre à jour la présence de facteurs biotiques responsables ou amplifiant le phénomène de corrosion, notamment l'hydrogène sulfuré, le dioxyde de carbone, l'hydrogène moléculaire ainsi que les acides gras volatils. De nombreux matériaux peuvent ainsi être touchés, aussi bien le métal (par fragilisation des aciers par l'hydrogène ou par action de l'H₂S) que le béton (par carbonatation liée à la présence de CO₂), mais également la roche elle-même (par action des acides gras volatils).

L'étude des produits du métabolisme a permis d'identifier des agents biotiques ayant potentiellement une activité biocorrosive. Mais ces produits sont également une source de carbone et d'énergie nécessaires à la croissance bactérienne. Les acides gras volatils sont utilisés par de nombreuses bactéries, notamment fermentaires et sulfato-réductrices en tant

que sources de carbone et d'énergie. Le CO₂ et l'H₂ sont deux gaz indispensables à la croissance des bactéries autotrophes, productrices d'acétate et premier maillon d'un réseau trophique bactérien. Cet acétate peut alors être consommé par des bactéries fermentaires et sulfato-réductrices qui produiront alors du CO₂, et potentiellement de l'H₂. De plus Huclier-Markai *et al.*, (2010) ont mis en évidence la présence d'un large spectre de composés organiques (composés acides, acides gras, acides aminés, aldéhydes et composés humiques) dans l'eau interstitielle, qui une fois dégradés, permettent la production d'autres composés organiques... Il peut donc se former, dans le site de stockage, un réseau trophique bactérien indépendant de tout apport exogène de matière organique. Ce réseau aura la possibilité de s'auto-alimenter et perdurer ainsi dans le temps.

En cela, grâce aux apports de ce travail et des travaux précédents déjà cités, il apparaît fondamental que la composante biologique soit prise en compte dans la conception du stockage concerné en milieu argileux, afin notamment d'éviter ou de limiter au maximum tout apport de matière organique exogène à la formation argileuse du Cox (conteneur et contenant, protection cathodique des structures en métal...). Cette prise en compte biologique apparaît cruciale pour tenter de restreindre le réseau trophique bactérien à ces conditions initiales, c'est-à-dire celles qui sont potentiellement installés sur le site de stockage, et qui concernent les seules sources de carbone comme d'énergie autochtones.

V.2 PERSPECTIVES

La mise au point au cours de ce travail d'une méthodologie permettant un travail en conditions stériles et anoxiques et qui soit techniquement réalisable sur des échantillons solides profonds est une avancée importante. Cependant, malgré de nombreux essais, toutes les tentatives réitérées d'extraction d'ADN, tentatives qui ont pourtant cherché à améliorer techniquement l'efficacité de cette extraction, se sont révélées infructueuses. Une nouvelle méthode d'extraction d'ADN avec preuve d'efficacité pour le milieu argileux du site de Bure doit donc être mise au point pour permettre une étude d'écologie moléculaire de ces échantillons. En effet, les difficultés d'extraction rencontrées durant ces travaux ne sont pas nouvelles. S. Poulain durant sa thèse n'a pas pu obtenir d'extraction d'ADN de ses échantillons du Mont-Terri et de Bure. De même, 6 années plus tard, les travaux de Urios *et al.*, (2012) présentent les mêmes difficultés d'extraction sur une argilite provenant de Tournemire en France. Ces trois argiles, Mont-Terri, Tournemire et Bure sont des argiles de compositions minéralogiques proches comme l'indiquent les auteurs. Il semblerait donc qu'un ou plusieurs éléments composant ces argiles inhibent l'extraction d'ADN en se liant très certainement à ce dernier. Il serait donc intéressant de pouvoir déterminer en fonction de la composition des argiles, quels sont ce ou ces éléments qui empêchent l'extraction d'ADN.

Autre facteur important à prendre en compte pour tenter de lever la difficulté technique pour cette extraction d'ADN est la porosité et la teneur en eau, comme la composition des argiles. Il semble ainsi que la différence de porosité et de teneur en eau entre ces trois argiles, Mont-Terri, Tournemire et Bure ne soient pas suffisamment forte pour qu'une extraction d'ADN puisse efficacement être obtenue, avec les techniques actuelles connues.

Pourtant, une fois ce problème d'extraction d'ADN résolu, une étude globale de la biodiversité par l'utilisation de banque de clone serait possible (extraction d'ADN-amplification ADN_r16S-clonage (*E.coli*)-séquençage). Cette technique permettra alors d'avoir une image globale de la biodiversité par le séquençage des ADN_r16S obtenus grâce à l'outil PCR. Les résultats obtenus permettront alors d'avoir une image globale de la biodiversité présente dans la couche du Cox de Bure.

Ensuite, l'utilisation de sondes à ADN spécifiques à certains types métaboliques permettrait de s'affranchir de la partie mise en culture. En effet, il est possible de cibler par exemple uniquement un type bactérien, comme les bactéries sulfato-réductrices, en utilisant des amorces de PCR spécifiques à un gène codant pour une protéine indispensable à la sulfato-réduction. Certains de ces gènes sont connus comme ubiquitaire chez les bactéries sulfato-réductrice car indispensable à ce type de métabolisme.

D'autre part, même si aucune bactérie méthanogène n'a pu être isolée par l'intermédiaire des techniques culture-dépendantes durant ce travail, il existe également, sur le même principe, des sondes spécifiques à ce type de métabolisme. Cette technique permettrait alors d'obtenir une image métabolique (fonctionnelle ou non *in situ*) de la biodiversité présente dans le LS de Bure.

Actuellement nos travaux d'isolement bactérien, comparés à ceux des autres sites argileux, ont permis de montrer qu'il semblerait exister une convergence des genres isolés, notamment entre Bure et Tournemire. L'accès aux résultats de la biologie moléculaire permettrait un spectre plus large de comparaison.

Enfin, comme perspective à plus court terme, en complément de ces travaux d'écologie microbienne, de nombreux tests de biocorrosion pourraient être lancés pour identifier l'action possible des bactéries isolées dans ce travail sur les différents matériaux utilisés lors de la construction du site de stockage. Pour cela, des études pourraient être lancées sur l'activité biocorrosive réelle (et non plus théorique) de souches biocorrosives seules mais également en consortium (recherche de synergie ou de limitation biocorrosive en conditions de cultures mixtes aérobie/aérobie mais également aérobie/anaérobie). Une simulation en culture continue sur un long laps de temps (bioréacteur) pourrait également être lancée, en présence de différents métaux, avec contrôle négatif abiotique, pour déterminer l'influence de la MIC sur les phénomènes de corrosion abiotique.

REFERENCES

REFERENCES

- Andra (2005a) **Dossier 2005 Argile : Évaluation de la faisabilité du stockage géologique en formation argileuse profonde. Rapport de synthèse.** Andra, France. Available at: <http://www.andra.fr>.
- Andra (2005b) **Dossier 2005 Argile: Référentiel du site de Meuse/Haute-Marne, Tome 1 : Histoire géologique et état actuel.** Andra, France. Available at: <http://www.andra.fr>.
- Angell (1999) **Understanding microbially influenced corrosion as biofilm-mediated changes in surface chemistry.** *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**:269-272.
- Bachvarova and Selenska-Pobell (2009) **Natural bacterial community changes induced in Opalinus clay samples by treatments with nutrients or with uranium.** Intern meeting of the Mont Terri Rock Laboratory (not published).
- Baker, Ito and Watanabe (2003) **Marine prosthecate bacteria involved in the ennoblement of stainless steel.** *Environ. Microbiol.* **5**:925-932.
- Balch, Fox, Magrum and Wolfe (1979) **Methanogens: reevaluation of a unique biological group.** *Microbiol. Rev.* **43**:260-296.
- Beech (2003) **Sulfate-reducing bacteria in biofilms on metallic materials and corrosion.** *Microbiol Today.* **30**:115-117.
- Beech and Sunner (2004) **Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals.** *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**:181-186.
- Beliaev (2002) **Gene and protein expression profiles of Shewanella oneidensis during anaerobic growth with different electron acceptors.** *OMICS.* **6**:39-60.
- Billy (1973) **Introduction à la chimie analytique. Méthodes de séparation et d'analyse.** Dunod (ed.), Paris, 190pp.
- Boivin-Jahns, Ruimy, Bianchi, Daumas and Christen (1996) **Bacterial diversity in a deep-subsurface clay environment.** *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3405-3412.
- Bossart and Thury (2008) **Mont Terri Rock Laboratory. Project, Programme 1996 to 2007 and Results (193 pp.).** Wabern : reports of the Swiss Geological Survey n° 3.
- Bryant, Jansen, Boivin, Laishley and Costerton (1991) **Effect of Hydrogenase and Mixed Sulfate-Reducing Bacterial Populations on the Corrosion of Steel.** *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2804-2809.
- Busalmen, Frontini and De Sanchez (1995) **Proc. 9th Int. Congress on Marine Corrosion and Fouling, Portsmouth, UK, 17-21 July 1995.** In: Campbell, Campbell and Walsh (ed.) **Developments in Marine Corrosion.** Royal Society of Chemistry, United-Kingdom, 200pp.
- Busalmen, Vazquez and De Sanchez (2003) **New evidences on the catalase mechanism of microbial corrosion.** *Electrochim. Acta.* **47**:1857-1865.
- Butler (1994) **Drilling deep holes in the continents.** *Geol. Today.* **10**:32-35.

- Chan, de Stasio, Welch, Girasole, Frazer, Nesterova, Fakra and Banfield (2003) **Microbial polysaccharides template assembly of nanocrystal fibers**. *Science*. **303**:1656-1658.
- Cheng, Ma, Zhang, Chen, Chen and Yang (1998) **Corrosion of Iron in Acid Solutions with Hydrogen Sulfide**. *Corrosion*. **54**:369-376.
- Cord-Ruwisch (1985) **A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria**. *J. Microbiol. Methods*. **4**:33-36.
- Coudreuse (2000) **Fragilisation des aciers par l'hydrogène : étude et prévention**. *Dossier technique de l'ingénieur*, Ref. m175.
- Costello (1974) **Cathodic depolarization by sulphate reducing bacteria**. *S. Af. J. Sci.* **70**:202-204.
- Cragg, Harvey, Fry, Herbert and Parkes (1992) **Bacterial biomass and activity in the deep sediment layers of the Japan Sea, Hole 798B**. In: Pisciotta, Ingle, von Breymann, Barron (ed.) *Proc. ODP Sci. Results*, **127/128 (Pt.1)**: College Station, TX (Ocean Drilling Program), 761-776.
- Crolet (1990) **De "Biologie et corrosion" à "Biocorrosion"**. *Matériaux et Techniques*. 9-13.
- Crolet, Daumas and Magot (1992) **Biocorrosion : régulation du pH par les bactéries sulfato-réductrices**. *Matériaux et Techniques*. 71-77.
- Dawood, Ehrenreichl and Brörel (1998) **Shewanella putrefaciens reduces sulphite in the presence of molecular oxygen**. *FEMS Microbiol. Lett.* **164**:383-387.
- Delay, Vinsot, Krieguer, Rebours and Armand (2007) **Making of the underground scientific experimental programme at the Meuse/Haute-Marne underground research laboratory North Eastern France**. *J. Phys. Chem. Earth*. **32**:2-18
- Deniau, Devol-Brown, Derenne, Behar and Largeau (2008). **Comparison of the bulk geochemical features and thermal reactivity of kerogens from Mol (Boom clay), Bure (Callovo-Oxfordian argillite) and Tournemire (Toarcian shales) underground research laboratories**. *Sci. Total Environ.* **389**:475-485.
- Drouet (2010) **Impact de la température sur la carbonatation des matériaux cimentaires**. Thèse, Ecole Normale Supérieure de Cachan, France, 313pp.
- Dvoracek (1976) **Pitting Corrosion of Steel in H₂S Solution**. *Corrosion*. **32**: 64-68.
- Farquhar (1998) **A review and update of the role of volatile fatty acids (VFA's) in seawater injection systems**. *Corrosion* **98**: Paper No5.
- Gallori, Bazzicalupo, Dal Canto, Fani, Nannipiei, Vettori and Stotsky (1994) **Transformation of Bacillus subtilis by DNA bound on clay in non-sterile soil**. *FEMS Microbiol. Ecol.* **15**:119-126.
- Garet and Moriarty (1996) **Acid extraction of tritium label from bacterial DNA in clay sediment**. *J. Microbiol. Methods*. **25**:1-4.
- Goorissen, Boschker, Stams and Hansen (2003) **Isolation of thermophilic Desulfatamaculum strains with methanol and sulfite from solfataric mud pools, and characterization of Desulfatamaculum solfataricum sp. Nov.** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:1223-1229.

- Huclier-Markai, Landesman, Rogniaux, Monteau, Vinsot and Grambow (2010) **Non-disturbing characterization of natural organic matter (NOM) contained in clay rock pore water by mass spectrometry using electrospray and atmospheric pressure chemical ionization modes.** *Rapid Communication in Mass Spectrometry*. **24**:191-202.
- Hungate (1969) **A roll-tube method for the cultivation of strict anaerobes.** *In*: Norris and Ribbons (ed.) *Methods in microbiology*, **3B**. Academic Press, London, 369pp.
- Iofa, Batrakov and Cho-Ngok-Ba (1964) **Influence of Anion Adsorption on the Action of Inhibitors on the Acid Corrosion of Iron and Cobalt.** *J. Electrochem. Soc.* **127**:1645-1653.
- Joosten, Kolts and Hembree (2002) **Organic acid corrosion in oil and gas production.** *Corrosion 2002*: Paper No 02294.
- Kato, Li, Nogi, Nakamura, Tamaoka and Horikoshi (1998) **Extremely Barophilic Bacteria Isolated from the Mariana Trench, Challenger Deep, at a Depth of 11,000 Meters.** *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1510-1513.
- Kinzler, Gehrke, Telegdi and Sand (2003) **Bioleaching: a result of interfacial processes caused by extracellular polymeric substances (EPS).** *Hydrometallurgy*. **71**:83-88.
- Kjellerup, Olesen, Nielsen, Frolund, Odum and Nielsen (2003) **Monitoring and characterisation of bacteria in corroding district heating systems using fluorescence in situ hybridisation and microautoradiography.** *Water Sci. Technol.* **47**:117-122.
- Lee and Newman (2003) **Microbial iron respiration: impacts on corrosion processes.** *App. Microbiol. Biotechnol.* **62**:134-139.
- Lee, Romanek and Wiegel (2009) ***Desulfosporosinus youngiae* sp. nov., a sporeforming, sulfate-reducing bacterium isolated from a constructed wetland treating acid mine drainage.** *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 2743-2746.
- L'Hostis, Dagbert and Feron (2003) **Electrochemical behavior of metallic materials used in seawater-interactions between glucose oxidase and passive layers.** *Electrochim. Acta.* **48**:1451-1458.
- Lovley (1997) **Microbial Fe(III)-reduction in subsurface environments.** *FEMS Microbiol. Rev.* **20**:305-313.
- Marchal (1999) **Rôle des bactéries sulfurogènes dans la corrosion du fer.** *Oil & Gas Science and Technology*. **54**:649-659.
- Marconnet (2007) **Influence de l'adhésion et de l'activité enzymatique du biofilm sur le comportement électrochimique des aciers inoxydables immergés en eaux de rivière.** Thèse, Ecole Centrale, Paris, France, 329pp.
- Mazurek, Gautschi, Marshall, Vigneron, Lebon and Delay (2008) **Transferability of geoscientific information (study sites, underground laboratories, natural analogues) to support safety cases for radioactive waste repositories in argillaceous formations.** *Phys. Chem. Earth.* **33**:95-105
- McNeil and Little (1999) **The use of mineralogical data in interpretation of long-term microbiological corrosion processes: sulfiding reactions.** *J. Amer. Inst. Conser.* **38**:186-199.

Means and Hubbard (1987) **Short-Chain Aliphatic Acid Anions in Deep Subsurface Brines: A Review of Their Origin, Occurrence, Properties and Importance and New Data on Their Distribution and Geochemical Implications in the Palo Duro Basin, Texas, Organ.** *Geochem.* **11-3**:177-191.

Mickaël Thiery (2008) **Modélisation de la Carbonatation atmosphérique des matériaux cimentaires.** Thèse, Ecole Nationale des Ponts et Chaussées, France, 347pp.

Miller and Wolin (1974) **A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes.** *Appl. Microbiol.* **27**:985-987.

Moletta, Delgenes and Godon (2007) **Differences in the aerosolization behavior of microorganisms as revealed through their transport by biogas.** *Sc of the Total Env.* **379**:75-88

Nielsen, Lee, Lewandowski, Morizon and Characklis (1993) **Corrosion of Mild Steel in an Alternating Oxidic and Anoxic Biofilm System.** *Biofouling.* **7**:267-284.

Pederson and Karlsson (1995) **Investigations of subterranean microorganisms. Their importance for performance assessment of radioactive waste disposal.** *Swedish Nuclear Fuel and Waste Co., SKB technical report 95-10.*

Pedersen (2000) **Exploration of deep intraterrestrial microbial life: current perspectives.** *FEMS Microbiol. Let.* **185**:9-16.

Pitonzo, Castro, Amy, Southam, Jones and Ringelberg (2004) **Microbiologically Influenced Corrosion Capability of Bacteria Isolated from Yucca Mountain.** *Corrosion.* **60**:paper No1.

Postgate (1984) **The Sulphate Reducing Bacteria.** *Cambridge University Press, United-Kingdom,* 181pp.

Poulain, Sergeant, Simonoff, Le Marrec and Altmann (2008) **Microbial investigations in Opalinus Clay, an argillaceous formation under evaluation as a potential host rock for a radioactive waste repository.** *Geomicrobiol. J.* **25**:240-249.

Poulain (2006) **Caractérisation microbiologique de l'argile à Opalinus du Mont –Terri et de l'argilite du Callovo-Oxfordien de Meuse/Haute-Marne.** *Thèse, Université de Bordeaux, France,* 246pp.

Ramamoorthy, Sass, Langner, Schumann, Kroppenstedt, Spring, Overmann and Rosenzweig (2006) ***Desulfosporosinus lacus* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from pristine freshwater lake sediments.** *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 2729-2736.

Rohwerder, Gehrke, Kinzler and Sand (2003) **Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**:239-248.

Roy, Kallmeyer, Adhikari, Pockalny, Jorgensen and D'Hondt (2012) **Aerobic microbial respiration in 86-million-year-old deep-sea red clay.** *Science.* **336**:922-925

Sand (2003) **Microbial life in geothermal waters.** *Geothermics.* **32**:655-667.

Shoesmith, Taylor, Bailey and Owen (1980) **The Formation of Ferrous Monosulfide Polymorphs During the Corrosion of Iron by Aqueous Hydrogen Sulfide at 21°C.** *J. Electrochem. Soc.* **127**:1007-1015.

Stetter (1996) **Hyperthermophilic prokaryotes.** *FEMS Microbiol. Rev.* **18**:149-158.

Stroes-Gascoyne, Schippers, Schwyn, Poulain, Sergeant, Simonoff, Le Marrec, Altman, Nagaoka, Mauclaire, McKenzie, Dumas, Vinsot, Beaucaire and Matray (2007) **Microbial Community Analysis of Opalinus Clay Drill Core Samples from the Mont Terri Underground Research Lanoratoty, Switzerland.** *Geomicrobiol. J.* **24**:1-17

Stroes-Gascoyne, Schwyn, Schippers, Poulain, Sergeant, Le Marrec, Simonoff, Altman, Nagaoka, Mauclaire, Vasconcelos, McKenzie, Dumas, Vinsot, Beaucaire and Matray (2004) **Microbial investigations on unperturbed Opalinus clay samples.** *Mont Terri technical note TN-2004-44.*

Szewzyk, Szewzyk and Stenstrom (1994) **Thermophilic, anaerobic bacteria isolated from a deep borehole in granite in Sweden.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:1810-1813.

Urios, Marsal, Pellegrini and Magot (2012) **Microbial diversity of the 180 million-year-old Toarcian argillite from Tournemire, France.** *Appl. Geochem.* **27**:1442-1450

Vatsurina, Badrutdinova, Schumann, Spring and Vainshtein (2008) ***Desulfosporosinus hippei* sp. nov., a mesophilic sulfate-reducing bacterium isolated from permafrost.** *Int J Syst Evol Microbiol* **58**:1228-1232.

Velimirov (2001) **Nanobacteria, Ultramicrobacteria and Starvation Forms: A Search for the Smallest Metabolizing Bacterium.** *Microbes and Environments.* **16**:67-77.

Videla (1988) **Electrochemical Review Article on the Influence of Sulphide Inclusion on the Corrodibility of Fe and Steel.** *Corros. Sci.* **9**:585-602.

Vinsot, Mettler and Wechner (2008) **In situ characterization of the Callovo-Oxfordian pore water composition.** *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C.* **33**:75-86.

Von Wolzogen Kuehr and Van Der Vlugt (1934) **The graphitization of cast iron as an electrobiochemical process in anaerobic soil.** *Water.* **18**:147-165.

Widdel and Pfennig (1981) **Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids I. Isolation of new sulfatereducing bacteria enriched with acetate from saline environments. Description of *Desulfobacter postgatei* gen. nov., sp. nov.** *Arch. Microbiol.* **129**:395-400.

Wikjord, Rummery, Doern and Owen (1980) **Corrosion and deposition during the exposure of carbon steel to H₂O-H₂S solutions at elevated pressures.** *Corros. Sci.* **20**:651-671.

Zeelmaekers, Honty, Derkowski, De Craen, Vandenberghe and Van Geet (2010) **A new and improved methodology for qualitative and quantitative mineralogical analysis of Boom clay.** *In: Clays in Natural and Engineered Barriers for Radioactive Waste Confinement. 4th Internat. Meeting*, March 2010, Nantes, France.

Zhang, Fang and Ko (2003) **Methanogen population in a marine biofilm corrosive to mild steel.**
Appl. Microbiol. Biotechnol. **63**:101-106.

ANNEXES

ANNEXE 1

Les grands principes de la loi du 30 décembre 1991 (Source: Ministère de l'Économie, des Finances et de l'Industrie, DGEMP, version du 27/09/2005).

La loi n°91-1381 du 30 décembre 1991 (désormais codifiée sous la forme des articles L542-1 et suivants du code de l'environnement), appelée également loi Bataille, du nom de son rapporteur, le Député du Nord Christian Bataille, a fixé les grandes orientations relatives aux recherches sur la gestion des déchets radioactifs de haute activité ou à vie longue, qui constituent, par nature, les plus complexes à gérer. La loi du 30 décembre 1991 a été votée sans opposition par le Parlement pour trouver une issue dynamique à une situation bloquée dans laquelle le moratoire observé à cette époque entre 1989 et 1991 avait enfermé le programme de gestion des déchets nucléaires de haute activité et à vie longue. Elle a fixé un certain nombre de principes et apporté de nombreuses garanties en ce qui concerne tant la rigueur que la transparence de la démarche. Cette loi prévoit des recherches conduites selon trois axes de manière à ce que le Parlement puisse disposer de l'ensemble des données scientifiques nécessaires à une prise de décision.

Axe 1: la séparation et la transmutation des éléments radioactifs à vie longue

Il s'agit d'étudier la possibilité de réduire la nocivité de ces déchets, en séparant les éléments les plus toxiques et en les transformant en éléments radioactifs de plus faible activité ou de durée de vie plus courte, donc plus faciles à isoler de l'homme et de l'environnement sur de longues durées.

Axe 2: les possibilités de stockage dans les formations géologiques profondes

Il s'agit de démontrer l'aptitude géologique de ces formations à stocker, dans des conditions de sûreté optimales, les déchets hautement radioactifs et à durée de vie longue. Cette démonstration est menée en s'appuyant sur des résultats expérimentaux obtenus dans des laboratoires souterrains (à quelques centaines de mètres) à vocation uniquement de recherche et dans lesquels le stockage de déchets radioactifs est explicitement interdit. Ces laboratoires de recherche permettent d'étudier in situ les roches en les qualifiant sur le plan mécanique, chimique, hydrogéologique et thermique.

Axe 3: l'étude de procédés de conditionnement et d'entreposage de longue durée en surface

Contrairement au stockage, l'entreposage est une solution provisoire, offrant une solution d'attente pour placer les déchets en sécurité sur une durée qui fait l'objet des recherches (à l'échelle de quelques dizaines voire centaines d'années), notamment dans la perspective de progrès scientifiques majeurs. Les recherches sur le premier et le troisième axes sont coordonnées par le Commissariat à l'énergie atomique (CEA), celles sur le second par l'Agence nationale pour la gestion des déchets radioactifs (ANDRA).

La création de l'Andra

La loi de 1991 a permis la création d'un établissement public en charge de la gestion à long terme des déchets radioactifs : L'Andra ou l'Agence Nationale pour la gestion des Déchets Radioactifs. Les missions précises de cet établissement ont par la suite été définies dans le décret n°92-1391 du 30 décembre 1992. La création de l'Andra a conduit à la séparation et à l'autonomie de cet ancien département du CEA.

ANNEXE 2

Nomenclature Andra

Echantillons liquides

1^{er} échantillon : Flacon ouvert, méthode gravitaire

EST02390F-01 (2008) : eau interstitielle (sans mesures microbiologiques) récupérée du forage KEY1001 : 900mL

2^{ème} échantillon : Flacon fermé, méthode gravitaire

EST03602F-01 (2009) : eau interstitielle (dispositif anaérobie et stérile) récupérée du forage KEY1001 : 800mL

3^{ème} échantillon : Dispositif en ligne de prélèvement

EST03603F-01 (2009) : eau interstitielle récupérée du forage PAC1002 : 20mL

Echantillons solides

1^{er} échantillon : BAC1201

EST32773 (2009) : carotte récupérée du forage BAC 1201 (passe K2, 1m60 à 1m77).

EST32781 (2009) : carotte récupérée du forage BAC 1201 (passe K3, 2m96 à 3m11),

EST32786 (2009) : carotte récupérée du forage BAC 1201 (passe K4, 4m37 à 4m53),

2^{ème} échantillon : TER1901

EST34620 : carotte récupérée du forage TER 1901 (passe K7, 8m à 8m19)

EST 34618 : carotte récupérée du forage TER1901 (passe K7, 7m60 à 7m80)

ANNEXE 3

Laboratoire souterrain du Mont-Terri

<http://www.jura.ch/Htdocs/Images/Pictures/Departements/DEE/PCH/MontTerri/Monttunnel.jp g?puid=ffe8b01b-216d-4156-9126-d47107590843>

Le Laboratoire du Mont Terri (Figure 1) est un projet international de recherches scientifiques dans le domaine du stockage géologique profond. Sous l'égide de la Confédération suisse (swisstopo), les partenaires ont pour but d'étudier les possibilités de stockage de déchets radioactifs de haute activité dans les roches argileuses de type aaléniennes affleurant dans la galerie de sécurité du tunnel autoroutier du Mont Terri, entre Saint-Ursanne et Courgenay. Le projet de recherche international du Mont Terri vise à étudier les caractéristiques hydrogéologiques, géochimiques et géotechniques des roches argileuses, sur la base des Argiles à Opalinus. Le stockage de tout déchet radioactif est toutefois formellement interdit sur le site, qui ne peut être exploité qu'à des fins de recherche scientifique.

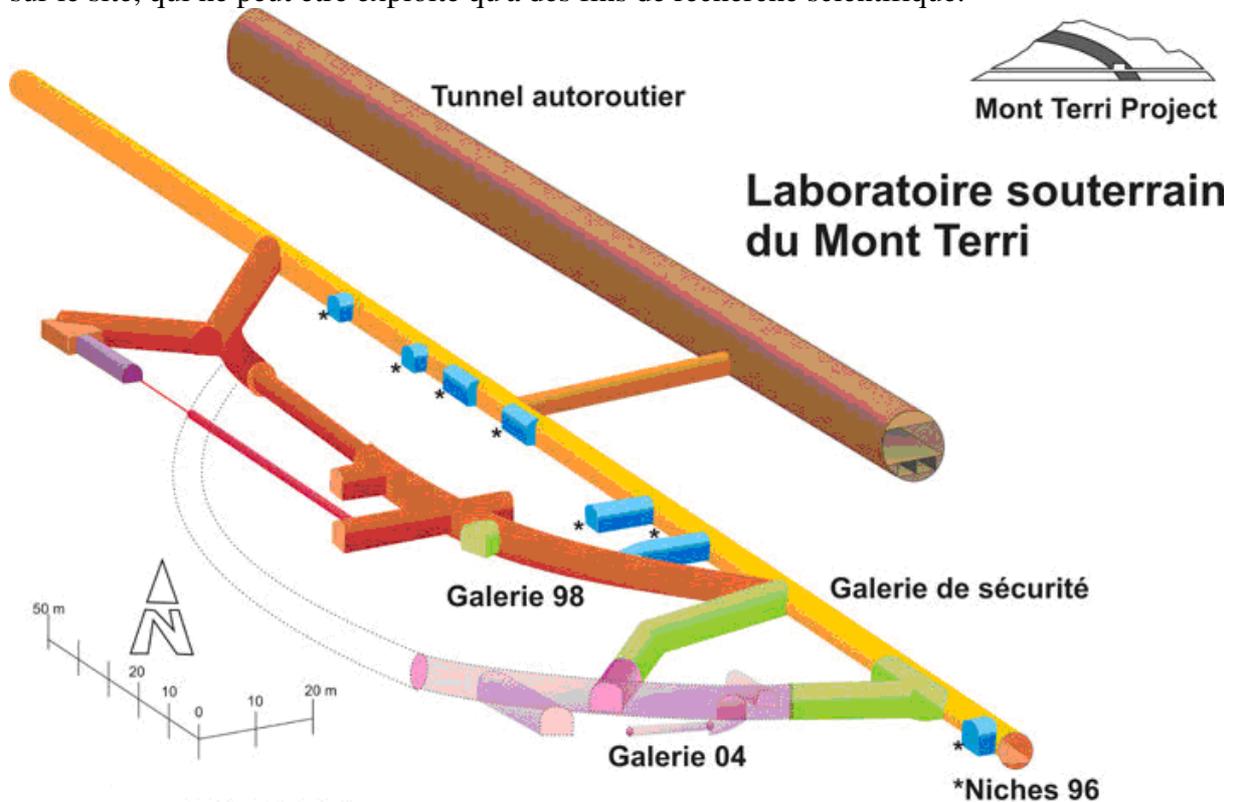


Fig 1 : Représentation schématique du tunnel autoroutier et du laboratoire souterrain du Mont-Terri (Ref : swisstopo).

ANNEXE 4

***Desulfosporosinus burensis* sp. nov.: a spore-forming, mesophilic, sulfate-reducing bacterium isolated from a deep clay environment**

Bruno Mayeux,^{1,2} Marie-Laure Fardeau,¹ Manon Bartoli-Joseph,¹ Laurie Casalot,¹ Agnès Vinsot,² and Marc Labat,¹.

¹Laboratoire de Microbiologie et Biotechnologie des Environnements Chauds, UMR D180, IRD ESIL MIO, Aix-Marseille Université, case 925, 163 Avenue de Luminy, F-13288 Marseille cedex 9, France.

²Andra, Centre de Meuse/Haute-Marne, F-55290 Bure, France.

Correspondance to : Marc Labat, Unité de Microbiologie et Biotechnologie des Environnements Chauds, Laboratoire IRD-UMR D180, Aix-Marseille Université, case 925, 163 avenue de Luminy, F-13288 Marseille cedex 9, France. *Tel* : +33(0) 4 91 82 85 85 ; *Fax* : +33(0) 4 91 82 85 70 ; *e-mail* : marc.labat@esil.univmed.fr .

The Genbank/EMBL/DDJB accession number for the 16S rRNA gene sequence of BSREI1^T is JF810424.

A new anaerobic, Gram-positive, spore-forming, curved-rod mesophilic and sulfate-reducing bacterium was isolated from porewater collected in a borehole at –490 m in Bure (France). This strain, designated BSREI1^T, grew at temperatures between 5 °C and 30 °C (optimum 25 °C) and at a pH between 6 and 8 (optimum 7). It did not require NaCl for growth, but tolerated it up to 1.5 %. Sulfate, thiosulfate and elemental sulfur were used as terminal electron acceptors. Strain BSREI1^T used crotonate, formate, lactate, pyruvate, fructose, glycerol and yeast extract as electron donors in the presence

of sulfate. The sole quinone was MK-7. The G+C content of the genomic DNA was 43.3 mol %. Strain BSREI1^T had *Desulfosporosinus lacus* (16S rRNA gene sequence similarity of 96.83 %) *D. meridiei* (96.31 %) and *D. hippei* (96.16 %) as its closest phylogenetic relatives. On the basis of phylogenetic and physiological properties, strain BSREI1^T (= DSM 24089^T = JCM 17380^T) is proposed as a new species of the genus *Desulfosporosinus*, named *D. burensis* sp. nov.

Running title: *Desulfosporosinus burensis* sp. nov.

The genus *Desulfosporosinus* was proposed in 1997 to accommodate the species *Desulfotomaculum orientis* (Stackebrandt *et al.*, 1997). It currently comprises seven species of obligately anaerobic, spore-forming bacteria with validly published names: *Desulfosporosinus orientis*, the type species of the genus *Desulfosporosinus*, (Stackebrandt *et al.*, 1997), *D. auripigmenti* (Stackebrandt *et al.*, 2003), *D. meridiei* (Robertson *et al.*, 2001), *D. lacus* (Ramamoorthy *et al.*, 2006) *D. hippei* (Vatsurina *et al.*, 2008) *D. youngiae* (Yong-Jin *et al.*, 2009) and *D. acidiphilus* (Alazard *et al.*, 2010). *Desulfosporosinus*-like organisms are widespread in different habitats. They occur in environments such as pristine aquifers, municipal drinking water, rice plant roots, permafrost and acid mining drainage sediments. Members of the genus also inhabit industrially impacted soil and sediments, coal-mining-impacted lakes and radionuclide-contaminated sediments (Vainshtein *et al.*, 2007).

Stackebrandt *et al.* (1997) distinguished this group from the genus *Desulfotomaculum* on the basis of phylogenetic evidence and their ability to grow under autotrophic conditions.

However, the property of autotrophic growth (i.e. 50 % of the biomass derived from inorganic carbon) has not been demonstrated unequivocally for all the species. Vatsurina *et al.* (2008) recently reported *Desulfosporosinus orientis* 343 as the type strain of a new species in the same genus, *D. hippei*, which does not oxidize H₂ with CO₂ or acetate. Here, we report

another new *Desulfosporosinus* species that is not able to grow lithotrophically, isolated from a pore water sample collected through a borehole at -490 m in a clay sediment where H₂S was detected.

A pore water sample was taken from clay sediments at the Andra's Underground Research Laboratory (URL) of Bure (Meuse/Haute Marne, France). The sample (800 ml) was collected using a sterile anaerobic bottle attached to a drill head. Standard anaerobic culture techniques were used throughout this study (Hungate, 1969). The culture medium used for enrichment and isolation was (g l⁻¹): yeast extract (0.1), KCl (0.1), KH₂PO₄ (0.6), K₂HPO₄ (0.6), MgCl₂·6H₂O (0.3), CaCl₂·2H₂O (0.05), cystein-HCl (0.5), NH₄Cl (0.5), Widdel trace element solution (Widdel & Pfennig, 1981) (1 ml) and resazurin (1 ml), all under a stream of N₂/CO₂ (80:20, v/v) gas. After sterilisation, per Hungate tube (5 ml), NaHCO₃ 10 % (0.15 ml), Na₂SO₄ 1 M (0.1 ml), yeast extract 50 g l⁻¹ (0.1 ml), glucose 1 M (0.1 ml) and lactate 1 M (0.1 ml) were added. Strain purity was checked by phase-contrast microscopy. The culture medium was formulated after growth optimization. It contained (g l⁻¹): (NH₄)₂SO₄ (0.45), KH₂PO₄ (0.05), MgSO₄·7H₂O (0.5), KCl (0.05), yeast extract (0.5), Ca(NO₃)₂·4H₂O (0.014), Na₂SO₄ (3), cystein-HCl (0.5), resazurin (1 ml) and Widdel trace element solution (1 ml), and pH was adjusted to 7.3. After autoclaving and before inoculation it was supplemented with Balch's vitamin solution (0.05 ml) (Balch *et al.*, 1979), NaHCO₃ 10 % (0.15 ml) and 1M fructose (0.1 ml).

Light-microscope examination was performed using a Nikon Eclipse 600 phase-contrast microscope. Gram reaction was obtained by the Hucker staining method (Murray *et al.*, 1994). Thin sections for electron microscopy were prepared as described by Fardeau *et al.*, (1997). Photomicrographs were taken with a Hitachi model H600 electron microscope at an accelerating voltage of 75 kV. The presence of spores was analysed by phase-contrast

microscopic observations of young and old cultures and pasteurization tests performed at 80, 90, 100 °C for 10 and 20 min.

Growth experiments were performed in duplicate, using Hungate tubes containing the medium for cultivation. Turbidity (580 nm) was used to assess growth. Temperature (5, 15, 20, 25, 30, 35, 45 °C), NaCl (0, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30 g l⁻¹) and pH (4–9) ranges and substrates were determined using the culture medium. For substrate tests, the final concentrations were 20 mM except for formate (40 mM), H₂/CO₂ (80/20 % under 2 bars) and H₂/CO₂ (80/20 % under 2 bars) with acetate (2 mM). The end products of sulfate respiration were determined by HPLC using an Aminex HPX-87H (Biorad) column with 5 mM H₂SO₄ as mobile phase. The test for minimal medium was run in the culture medium using different concentrations of yeast extract (0, 0.1, 0.5, 1 g l⁻¹) and Balch's solution vitamins (with or without) in the presence of fructose (20 mM). Electron acceptors (sulfate, thiosulfate, elemental sulfur, sulfite, fumarate), were supplied in the following, highly reduced medium (g l⁻¹): NH₄Cl (0.45), KCl (0.05), MgCl₂ (0.5), KH₂PO₄ (0.05), CaCl₂ (0.015), yeast extract (0.2), Widdel trace element solution (1 ml), cystein-HCl (0.5) and resazurin (1 ml). For nitrate, nitrite, selenite (Na₂SeO₃) and ferric iron (Fe(OH)₃), the previous medium was used, but cystein-HCl and resazurin were omitted. The carbon source used for these tests was fructose (20 mM) and different electron acceptors were tested, with a final concentration of 20 mM, except for sulfite (2 mM), nitrite (2 mM), elemental sulfur (10 g l⁻¹), selenite (0.2 mM) and Fe³⁺ (900 mM). Sulfide was assayed photometrically as colloidal CuS using the method of Cord-Ruwisch (1985).

For the fermentative tests, the medium used was the highly reduced medium, and the carbon sources tested were crotonate, formate, lactate, pyruvate, fructose, glycerol and yeast extract. The culture medium supplemented with increasing concentrations of selenite (Na₂SeO₃): 0,

0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 mM was used to check the ability of the strain BSREI1 to maintain or increase growth in the presence of selenium.

For 16S rRNA gene sequence analysis, PCR was performed directly on cells after 20 min at 80 °C, using the universal primers Fd1 and Rd1, and the sequence was determined and analysed (Maidak *et al.*, 2001, Weisburg *et al.*, 1991). The nearly complete sequence (1533 bp) of the 16S rDNA of BSREI1 was aligned with closely related sequences from the GenBank database using MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation) (Edgar, 2004). Nine aligned sequences were imported into the sequence editor BioEdit v 5.0.9 (Hall, 1999). The phylogenetic tree was constructed using various algorithms implemented in the TREECONW (van de Peer & De Wachter, 1994) and PHYLIP (Felstein, 1990) software packages. A resulting phylogenetic tree was constructed by the neighbour-joining method (Saitou & Nei, 1987).

The G + C content of the DNA was determined at the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Germany. DNA-DNA hybridization between strain BSREI1T and *Desulfosporosinus lacus* was performed at DSMZ. The following method was used: cells are disrupted by using a French pressure cell (Thermo Spectronic) and the DNA in the crude lysate is purified by chromatography on hydroxyapatite as described by Cashion *et al.* (1977). DNA-DNA hybridization is carried out as described by De Ley *et al.* (1970) under consideration of the modifications described by Huss *et al.* (1983) using a model Cary 100 Bio UV/VIS-spectrophotometer equipped with a Peltier-thermostatted 6x6 multicell changer and a temperature controller with in-situ temperature probe (Varian).

The fatty acid composition of the strain was determined at the Identification Service of DSMZ using 2 × 10 mL of liquid culture (Sasser, 1990). Cultures of strain BSREI1^T were stopped at the end of exponential phase and sent to DSMZ for fatty acid analysis. Fatty acids were

extracted using the method of Miller (1982), with the modifications of Kuykendall *et al.*, (1988), and the profile of cellular fatty acids was analysed by gas chromatography using the Microbial Identification System (MIDI, Sherlock Version 6.1; database, TSBA40; gas chromatograph, model 6890N, Agilent Technologies) using GC analysis according to the MIDI Microbial Identification system (e.g. Method: TSBA40). Respiratory quinones were analysed by the Identification Service and Dr. Brian Tindall, DSMZ, Braunschweig, Germany. Cytochromes were analysed using Postgate's method (Postgate, 1959) and the following method was used: Respiratory lipoquinones are extracted from 100 mg of freeze dried cell material using the two stage method described by Tindall (1990a; 1990b). Respiratory quinones are extracted using methanol:hexane (Tindall, 1990a, 1990b), followed by phase separation into hexane. Respiratory lipoquinones are separated into their different classes (menaquinones, ubiquinones, etc.) by thin layer chromatography on silica gel (Macherey-Nagel Art. No. 805 023), using hexane:tert-butylmethylether (9:1 v/v) as solvent. UV absorbing bands corresponding to the different quinone classes (e.g. menaquinones or ubiquinones) were removed from the plate and further analysed by HPLC. This step is carried out on a LDC Analytical (Thermo Separation Products) HPLC fitted with a reverse phase column (Macherey-Nagel, 2 mm x 125 mm, 3 μ m, RP18) using methanol:heptane 9:1 (v/v) as the eluant. Respiratory lipoquinones are detected at 269 nm.

A 0.5 ml aliquot of sample from a porewater collected in a borehole at -490 m was inoculated in Hungate tubes containing 5 ml of culture medium. The tubes were then incubated at 20 °C. To obtain pure cultures, the enrichment was subcultured several times under the same growth conditions before isolation. For isolation, the culture was serially diluted tenfold in roll tubes (Miller & Wolin, 1974) containing the same culture medium and supplemented with agar (2 % w/v); several colonies developed after incubation at 20 °C and were harvested separately. Colonies were transparent and circular with diameters ranging from 1.0 mm to 2.0 mm after

one month incubation at 25 °C. The process of serial dilution was repeated several times until the isolates were deemed anoxic. Several strains were isolated; they were similar in morphology and phylogeny, with the same metabolic profile for fructose. A strain designated BSREI1^T was selected and used for further metabolic and physiological characterization.

The cells of strain BSREI1^T were non-motile, curved rods 5–7 µm long and 0.1 µm wide, and stained Gram-positive. Oval-shaped endospores in the subterminal position were occasionally formed, which caused swelling of the cell. Strain BSREI1^T was anaerobic, growing optimally in medium for cultivation and maintenance containing fructose as electron donor and sulfate as electron acceptor at 25 °C (temperature growth range 5–30 °C). It grew in the pH range 6–8 with an optimum at pH 7 and in a salinity between 0 and 1.5 %. H₂S production was also optimal at pH 7 (9 mM H₂S produced after 15 days of incubation). Strain BSREI1^T coupled growth to sulfate respiration over the range 5–30 °C, with an optimal between 25 °C and 30 °C. Under optimal growth condition, the growth rate was 0.095 h⁻¹. All temperature tests were conducted at pH 7. pH optima were determined at 25 °C. Sulfidogenic growth was confined to the pH range 6–8. The substrates tested as possible energy and carbon sources in the presence of sulfate as electron acceptor are listed in Table 1.

Strain BSREI1^T needed no yeast extract or Balch's solution vitamin for growth, but the yields were significantly increased with 0.1 g l⁻¹ yeast extract. Strain BSREI1^T could use as electron donors crotonate, formate, lactate, pyruvate, fructose, glycerol and yeast extract with sulfate. Unlike *Desulfosporosinus lacus* and *D. meridiei*, strain BSREI1^T was unable to grow autotrophically. With sulfate as electron acceptor, no growth was observed on the following substrates: acetate, benzoate, butyrate, citrate, fumarate, malate, propionate, succinate, glucose, butanol, ethanol and methanol. Strain BSREI1^T was able to use sulfate, thiosulfate and sulfite as electron acceptor but not elemental sulfur, fumarate, nitrate, nitrite, selenite or Fe(III). Elemental sulfur and nitrite were both observed as inhibitors for strain BSREI1^T. It

tolerated selenite in the range 0.1–5 mM. Between 0.1 mM and 0.5 mM of selenite, growth was enhanced by a factor of 0.5 compared with the test without added selenite. At a concentration of 10 mM the growth of strain BSREI1^T stopped rapidly but even after 15 days of culture, the culture was still viable when reinoculated in a standard culture medium.

The main fatty acids of strain BSREI1^T were C_{16:1} ω7c (39.9 %), C_{16:0} (17.1 %), C_{16:1} ω9c (12.5 %), C_{18:1} ω7c (4.8 %), Iso-C_{17:1} I and/or anteiso-C_{17:1} B (4.2 %), C_{18:1} ω9c (3.3 %), C_{16:1} ω5c (2.7 %), C_{18:0} (1.2 %). MK-7 was the sole quinone found in the strain BSREI1^T. The analysis of cytochromes showed the presence of Sauret's band.

Analysis of the almost complete sequence of the 16S rRNA gene of the strain BSREI1^T (1533 bp) revealed that it was affiliated to the genus *Desulfosporosinus* (order *Clostridiales*, family *Peptococcaceae*). Positions of sequences with alignment uncertainties were omitted, and 1395 unambiguous aligned base-pairs were used in the analysis. The most closely related species was *D. lacus*. The phylogenetic relations between strain BSREI1, the closest phylogenetic relative strain (*D. lacus*) and the type species of the genus (*D. orientis*) are shown in Fig 1. The value of DNA-DNA hybridization was 29.6% between Strain BSREI1 and *D. lacus*. Strain BSREI1^T does not belong to the species *D. lacus* when the recommendations of a threshold value of 70 % DNA-DNA hybridization for the definition of bacterial species by the *ad hoc* committee (Wayne *et al.*, 1987) are considered. The DNA G + C content of strain BSREI1^T was 43.3 %, comparable to the values quoted for other members of the genus *Desulfosporosinus* (41.6–46.9 %)

Strain BSREI1^T was isolated from a porewater collected in a borehole at –490 m. Compared with other strains of the genus *Desulfosporosinus*, strain BSREI1^T is not able to grow under autotrophically conditions or to use S^o as an electron acceptor, and has a single quinone.

The first difference between strain BSREI1^T and strain *D. lacus* was that BSREI1^T stained Gram positive like *D. auripigmenti* whereas *D. lacus* stained negative. The composition of

quinones is clearly different: only MK-7 was detected for strain BSREI1^T when MK-7 and MK-5 were present in the ratio of 64/36 for *D. lacus*. Another difference was the composition in the fatty acids (summarised in table 2). Furthermore, contrary to *D. lacus*, strain BSREI1^T is not able to grow autotrophically, can not use Fe(III) as electron acceptor and can not ferment lactate. For electron donors, strain BSREI1^T can not use ethanol and methanol in presence of sulfate, unlike *D. lacus*. Finally, based on the phenotypic, phylogenetic and genetic differences observed between strain BSREI1^T and other members of the genus *Desulfosporosinus* (see Table 2), we identify it as a new species in this genus, and propose the name *D. burensis* sp.nov.

Description of *Desulfosporosinus burensis* sp. nov.

Desulfosporosinus burensis (bu.ren'sis. N.L. masc. adj. *burensis* belonging to Bure, the area where the strain was isolated) is a Gram-negative, curved rod. The cells are 5–7 µm long and 0.1 µm wide. They are non-motile. Endospores, subterminal and oval in shape, are weakly produced and swell the cells. The pH range for growth is 6–8, with an optimum at pH 7. The temperature range for growth is 5–30 °C with an optimum at 25 °C. The upper limit for salt tolerance is 15 g l⁻¹ NaCl. Sulfate is reduced to H₂S in the presence of crotonate, formate, lactate, pyruvate, fructose, glycerol and yeast extract. Organic substrates are incompletely oxidized to acetate except for crotonate (acetate and traces of formate), formate (H₂/CO₂ and traces of acetate) and yeast extract (traces of acetate and propionate). The following substrates are not used as electron donors: acetate, benzoate, butyrate, citrate, fumarate, malate, propionate, succinate, glucose, butanol, ethanol and methanol. Sulfate, thiosulfate and sulfite are used as electron acceptors, but not elemental sulfur, fumarate, nitrate, nitrite or Fe(III). The major fatty acids are: C_{16:1} ω7c (39.95 %), C_{16:0} (17.06 %) and C_{16:1} ω9c (12.52 %). It

contains a single quinone with a side chain of seven isoprene units (MK-7). The G + C content of the DNA is 43.3 mol%.

The type strain *Desulfosporosinus burensis*, (strain = DSM 24089^T = JCM 17380^T) was isolated from a porewater collected in a borehole at –490 m in Bure (France).

Acknowledgments: We thank the French Institution ANDRA who provided financial assistance to realise this work.

Alazard, D., Joseph, M., Battaglia-Brunet, F., Cayol, J. L. & Olliver, Bernard. (2010). *Desulfosporosinus acidiphilus* sp. nov.: a moderately acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acid minig drainage sediments. *Extremophiles* **14**, 305-312.

Balch, W. E., Fox, G. E., Magrum, R. J. & Wolfe, R. S. (1979). Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol Rev* **43**, 260–296.

Cashion, P., Hodler-Franklin, M. A., McCully, J. & Franklin, M. (1977). A rapid method for base ratio determination of bacterial DNA. *Anal Biochem* **81**, 461-466.

Cord-Ruwisch, R. (1985). A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *J Microbiol Methods* **4**, 33–36.

De Ley, J., Cattoir, H. & Reynaerts, A. (1970). The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur J Biochem* **12**, 133-142.

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**, 1792-1797.

Fardeau, M. L., Ollivier, B., Patel, B. K. C., Magot, M., Thomas, P., Rimbault, A., Rocchiccioli, F. & Garcia, J. L. (1997). *Thermotoga hypogea* sp. nov., a xylanolytic, thermophilic bacterium from an oil-producing well. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 1013–1019.

Felsenstein, J. (1990). PHYLIP Manual version 3.3. University Herbarium. University of California, Berkeley.

Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41**, 95–98.

Hungate, R. E. (1969). A roll-tube method for the cultivation of strict anaerobes. In: Norris JR, Ribbons DW (eds) *Methods in microbiology*, vol 3B. Academic Press, London, 117–132.

Huss, V. A. R., Festl, H. & Schleifer, K. H. (1983). Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Syst Appl Microbiol* **4**, 184–192.

Lee, Y. J., Romanek, C. S. & Wiegel, J. (2009). *Desulfosporosinus youngiae* sp. nov., a sporeforming, sulfate-reducing bacterium isolated from a constructed wetland treating acid mine drainage. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 2743–2746.

Miller, T. L., & Wolin, M. J. (1974). A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Appl Microbiol* **27**, 985–987.

Murray, R. G. E., Doetsch, R. N., & Robinow, C. F. (1994). Determinative and cytological light microscopy. In: Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR (eds) *Methods for general and molecular bacteriology*. ASM Press, Washington, DC, 21–41.

Postgate, J. R. (1959). A diagnostic reaction of *Desulphovibrio desulphuricans*. *Nature* **183**, 481–482.

Ramamoorthy, S., Sass, H., Langner, H., Schumann, P., Kroppenstedt, R. M., Spring, S., Overmann, J. & Rosenzweig, R. F. (2006). *Desulfosporosinus lacus* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from pristine freshwater lake sediments. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 2729–2736.

Robertson, W. J., Bowman, J. P., Franzmann, P. D. & Mee, B. J. (2001). *Desulfosporosinus meridiei* sp. nov., a spore-forming sulfatereducing bacterium isolated from gasoline-contaminated groundwater. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 133–140.

Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406–425.

Sasser, M. (1990). Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. *USFCC Newsletter* **20**, 1-6.

Stackebrandt, E., Sproer, C., Rainey, F. A., Burghardt, J., Pauker, O. & Hippe, H. (1997). Phylogenetic analysis of the genus *Desulfotomaculum*: evidence for the misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum* and description of *Desulfotomaculum*

orientis as *Desulfosporosinus orientis* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 1134–1139.

Stackebrandt, E., Schumann, P., Schüller, E. & Hippe, H. (2003). Reclassification of *Desulfotomaculum auripigmentum* as *Desulfosporosinus auripigmenti* corrig., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1439–1443.

Tindall, B. J. (1990). A comparative study of the lipid composition of *Halobacterium saccharovorum* from various sources. *Syst Appl Microbiol* **13**, 128–130.

Tindall, B.J. (1990). Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*. *FEMS Microbiol Letts* **66**, 199–202.

Vainshtein, M., Gogotova, G. & Hippe, H. (1994). A sulphate-reducing bacterium from the permafrost. In *Viable Microorganisms in Permafrost*, 68–74. Edited by D. Gilichinsky. Pushchino: Russian Academy of Science Pushchino Research Centre.

Vainshtein, M. B., Alfyorov, V. A. & Vatsurina, A. V. (2007). Manual on Water Microbiology and Biogeochemistry. Tula, Russia: Tula State University (in Russian).

Van de Peer, Y. & De Wachter, R. (1994). TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput Appl Biosci* **10**, 569–570.

Vatsurina, A., Badrutdinova, D., Schumann, P., Spring, S. & Vainshtein, M. (2008). *Desulfosporosinus hippei* sp. nov., a mesophilic sulfate-reducing bacterium isolated from permafrost. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 1228–1232.

Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E. & other authors (1987). International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* **37**, 463–464.

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

Widdel, F. & Pfennig, N. (1981). Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids I. Isolation of new sulfatereducing bacteria enriched with acetate from saline environments. Description of *Desulfobacter postgatei* gen. nov., sp. nov. *Arch Microbiol* **129**, 395–400.

Legends of figure and table:

Fig. 1. Phylogenetic tree based on an alignment of 1395 unambiguous base-pairs of 16S rRNA gene sequences, showing the affiliation of strain DSM 24089^T to the genus *Desulfosporosinus*. Bar, 2 % estimated sequence divergence.

Table 1. . Main characteristics differentiating strain BSREI1T from its closest phylogenetic relative *Desulfosporosinus lacus* and the type species of the genus *Desulfosporosinus orientis*.

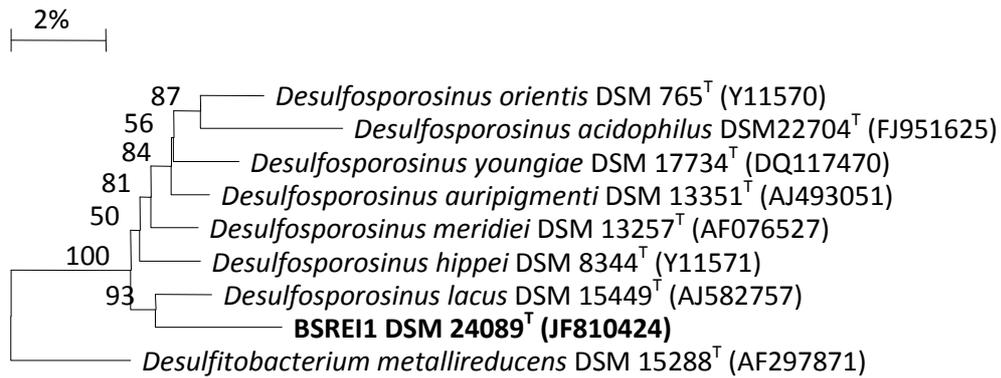


Fig. 1. Phylogenetic tree based on an alignment of 1395 unambiguous base-pairs of 16S rRNA gene sequences, showing the affiliation of strain DSM 24089^T to the genus *Desulfosporosinus*. Bar, 2 % estimated sequence divergence.

Table 1. Main characteristics differentiating strain BSREI1^T from its closest phylogenetic relative *Desulfosporosinus lacus* and the type species of the genus *Desulfosporosinus orientis*.

Features	Strain BSREI1 ^T	<i>Desulfosporosinus lacus</i> ^{a,b} DSM 15449 ^T	<i>Desulfosporosinus orientis</i> ^{a,c} DSM 765 ^T
Cell diameter (µm)	0.9-1.1	0.5-0.7	0.7-1.0
Gram	Positive	Negative	Negative
Endospore position	Subterminal	Subterminal	Subterminal
Motility	Variable	Variable	Motile
Temperature range (°C)	5-30	4-32	30-47
Temperature optimum (°C)	25	30	35
pH range	6-8	6.5-7.5	5.6-7.4
pH optimum	7	7	6.4-7
Electron donor in presence of sulfate			
H ₂ (carbon source)	- (with CO ₂)	+ (with CO ₂)	+ (with CO ₂)
Fructose	+	-	-
Ethanol	-	+	+
Glycerol	+	+	-
Methanol	-	+	+
Electron acceptors ^{1,2}			
Sulfite	+	+	+
Sulfur	-	-	+
Fe(III)	-	+	+
Fermentative growth on lactate	-	+	+
DNA G + C mol%	43.3	42.7	46.9
+, support growth; -, did not support growth ¹ with fructose as electron donor for strain BSREI1 ^T ² with lactate as electron donor for the other strains ^a Data from Ramamoorthy <i>et al.</i> , 2006 ^b Data from Lee <i>et al.</i> , 2009 ^c Data from Alazard <i>et al.</i> , 2010			

LISTE DES FIGURES

Fig 1 : Représentation schématique du réseau poreux de l'argilite du Cox (Source : Leroy 2005, Transport ionique dans les argiles. Influence de la microstructure et des effets d'interface. Application à la roche du Callovo-Oxfordien sur le site de Bure).

Fig 2 : Modèle conceptuel de distribution des tailles de pore dans les argilites du Cox (Source : Document interne ANDRA 2005, Référentiel du site de Meuse/Haute-Marne).

Fig 3 : Classification des phénomènes de fragilisation par l'hydrogène (source : Dossier m175 : Techniques de l'ingénieur).

Fig 4 : Photo de la fragilisation par l'hydrogène de type « cloques » sur une surface métallique.

Fig 5 : Photo d'une fissure qui s'est amorcée dans la zone affectée de la soudure (SSC) et se propage par un mécanisme de SOHIC dans le métal de base. (Source : Dossier m175 : Techniques de l'ingénieur).

Fig 6 : Relations entre métabolismes aérobie et anaérobie dans les biofilms naturels (source : Nielsen *et al.*, 1993). Echange de composés entre zones aérobie et anaérobie à différents niveaux d'oxydoréduction.

Fig 7 : Schéma de la formation d'un biofilm (source : Marconnet, 2007).

Fig 8 : Illustration du processus de MIC ou d'inhibition de la corrosion par les IRB facultatives (source : Lee et Newman, 2003).

Fig 9 : Représentation schématique du mécanisme d'action des catalases. Les espèces en solution (sol) ou absorbées à la surface métallique (ads) sont indiquées.

Fig 10 : Illustration de la formation de carbonate de calcium par carbonatation.

Fig 11 : Représentation schématique du LS (source : ANDRA bloc laboratoire-2004-09).

Fig 12 : Lieu de prélèvements des différents échantillons (source ANDRA).

Fig 13 : Dispositif de récupération de l'eau interstitielle du forage KEY1001 anaérobie et stérile.

Fig 14 : Illustration du champ de stérilité, de l'apport d'azote stérile et de l'élagage de la carotte.

Fig 15 : Différence entre un cœur de carotte (gauche) et une section de carotte non élaguée (droite).

Fig 16 : Illustration du broyage du cœur de carotte par mortier/pilon).

Fig 17 : *Pelosinus fermentans* observée au microscope optique à contraste de phase.

Fig 18 : Photo du gel de révélation de l'amplification par PCR de la seconde extraction d'ADNr 16S bactérien.

Fig 19 : Relation entre la consommation de sulfate et la production de sulfure d'hydrogène par *Desulfosporosinus burensis* (souche BSREI1) en présence de fructose. En rose : H₂S, en bleu SO₄²⁻.

Fig 20 : Position phylogénétique de la souche BSREI1 parmi les membres du genre *Desulfosporosinus*.

Fig 21 : Souche BSREI1 observée au microscope optique à contraste de phase (barre = 5µm)

Fig 22 : Cinétique de la croissance de la souche BSREI1 en fonction de la température.

LISTE DES TABLEAUX

Tab 1 : Types trophiques bactériens en fonction de la classe et de la nature du besoin.

Tab 2 : Composition des milieux synthétiques par types métaboliques testés.

Tab 3 : Programmes et cycles d'amplification du gène codant l'ARNr 16S.

Tab 4 : Principales caractéristiques physico-chimiques de l'eau interstitielle (d'après *Vinsot et al.* 2008).

Tab 5 : Composition du « milieu CFG ».

Tab 6 : Souches isolées dans le LS (en gras les souches aérobies facultatives).

Tab 7 : Produits du métabolisme formés en fonction du sucre dégradé pour les souches anaérobies facultatives.

Tab 8 : Comparaison entre la souche BSREI1 et les espèces phylogénétiquement proches.

Tab 9 : Composition en acides gras de la souche BSREI1. En gras, les acides gras majoritaires.