



**HAL**  
open science

# Biocicatrisation des structures en béton par injection et aspersion de milieux rhéofluidifiants inoculés

Adrien Perrin

► **To cite this version:**

Adrien Perrin. Biocicatrisation des structures en béton par injection et aspersion de milieux rhéofluidifiants inoculés. Matériaux. Ecole nationale supérieure Mines-Télécom Lille Douai; Université de Sherbrooke (Québec, Canada), 2022. Français. NNT : 2022MTLD0003 . tel-04508382

**HAL Id: tel-04508382**

**<https://theses.hal.science/tel-04508382>**

Submitted on 18 Mar 2024

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

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

N° d'ordre : 2022MTLD0003

IMT NORD EUROPE



UNIVERSITE DE LILLE



UNIVERSITE DE SHERBROOKE



## THESE

Présentée en vue d'obtenir le grade de

## DOCTEUR

en

Discipline : Chimie des matériaux

par

**Adrien PERRIN**

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE  
DELIVRE PAR L'IMT NORD EUROPE**

Titre de la thèse :

### **Biocicatrisation des structures en béton par injection et aspersion de milieux rhéofluidifiants inoculés**

Soutenue le 17 mars 2022 devant le jury d'examen :

<b>Président</b>	Denis DAMIDOT (Pr), IMT Nord Europe
<b>Rapportrice</b>	Michèle QUENEUDEC-T'KINT (Pr), Université de Picardie Jules Verne
<b>Rapporteur</b>	Hubert CABANA (Pr), Université de Sherbrooke
<b>Examineur</b>	Faisal BOUSTA (Dr), LRMH
<b>Examinatrice</b>	Josée DUSCHENE (Pr), Université de Laval
<b>Directrice</b>	Christine LORS (Pr), IMT Nord Europe
<b>Co-directeur</b>	Richard GAGNE (Pr), Université de Sherbrooke
<b>Membre invité</b>	Nhu Cuong TRAN (Dr), EDF

Laboratoire d'accueil : CERI Matériaux et Procédés de l'IMT Nord Europe, Laboratoire Génie Civil et géoEnvironnement (LGCgE)

Ecole Doctorale SMRE 104 (Univ. Lille, Centrale Lille Institut, IMT Nord Europe)



N° d'ordre : 2022MTLD0003

IMT NORD EUROPE



UNIVERSITE DE LILLE



UNIVERSITE DE SHERBROOKE



## THESE

Présentée en vue d'obtenir le grade de

## DOCTEUR

en

Discipline : Chimie des matériaux

par

**Adrien PERRIN**

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE  
DELIVRE PAR L'IMT NORD EUROPE**

Titre de la thèse :

### **Biocicatrisation des structures en béton par injection et aspersion de milieux rhéofluidifiants inoculés**

Soutenue le 17 mars 2022 devant le jury d'examen :

<b>Président</b>	Denis DAMIDOT (Pr), IMT Nord Europe
<b>Rapportrice</b>	Michèle QUENEUDEC-T'KINT (Pr), université de Picardie Jules Verne
<b>Rapporteur</b>	Hubert CABANA (Pr), Université de Sherbrooke
<b>Examineur</b>	Faisal BOUSTA (Dr), LRMH
<b>Examinatrice</b>	Josée DUSCHENE (Pr), Université de Laval
<b>Directrice</b>	Christine LORS (Pr), IMT Nord Europe
<b>Co-directeur</b>	Richard GAGNE (Pr), Université de Sherbrooke
<b>Membre invité</b>	Nhu Cuong TRAN (Dr), EDF

Laboratoire d'accueil : CERI Matériaux et Procédés de l'IMT Nord Europe, Laboratoire Génie Civil et géoEnvironnement (LGCgE)

Ecole Doctorale SMRE 104 (Univ. Lille, Centrale Lille Institut, IMT Nord Europe)





## Résumé

Le béton, le matériau de construction le plus utilisé au monde, peut s'altérer au contact de son environnement, conduisant à générer des fissures et à réduire la durabilité des ouvrages. La méthode de réparation des fissures fines la plus utilisée actuellement est l'injection de résines (époxy, polyuréthanes, etc.). Cependant, il s'agit d'une technique polluante, de courte durée et parfois peu compatible avec le béton. L'objectif de cette thèse est de développer une méthode de réparation biologique applicable à des ouvrages réels en injectant une formulation inoculée pour colmater une fissure avec un composite formé de carbonate de calcium biosourcé et de biofilm. Deux éléments ont été développés : un inoculum microbien et un outil prédictif permettant la production de formulations épaissies rhéofluidifiantes adaptées à la taille de la fissure à traiter.

L'inoculum microbien est un consortium de micro-organismes indigènes adaptés aux matériaux cimentaires. Il a une croissance rapide et permet la production significative de calcite et de vaterite à partir de lactate de calcium dans les conditions environnementales d'un ouvrage en béton (20°C et pH de surface alcalin). L'outil prédictif a permis la production de formulations injectables et biocompatibles dans des fissures allant de 40 à 1000 µm. Une formulation sélectionnée, en association avec le consortium microbien, a été injectée dans des mortiers fissurés en conditions de laboratoire (20°C, 100% d'humidité relative). Une injection de la formulation épaissie inoculée a permis de réduire l'ouverture apparente de fissures fines (de l'ordre de 100 µm) de 84-90% et de fissures moyennes (250 et 450 µm) de 77-78%. Le système de biocicatrisation a été utilisé pour bioréparer deux fissures de l'ordre de 400 µm dans une dalle en béton fissurée (1 x 2 x 0,15 m) en conditions de laboratoire (20°C). Les résultats obtenus ont montré une réduction de la perméabilité à l'eau de 99% pour les deux fissures avec une confirmation que le matériau de colmatage est bien de nature biologique. Deux méthodes d'injection adaptées à des fissures sèches et humides ont été développées. Elles ont permis de tester le système de biocicatrisation sur des fissures d'ouvrages réels : la maquette VeRCoRs d'EDF (Electricité De France) à Moret-Loing-et-Orvanne, France (fissures sèches), qui reproduit à l'échelle 1/3 une enceinte de réacteur nucléaire et un barrage de la centrale hydroélectrique d'Hydro-Sherbrooke à Weedon, CANADA (fissures humides). Ces deux essais ont montré des résultats prometteurs et constituent une preuve de concept de cette technique de biocicatrisation par injection.

*Mots-clés :*

*biocicatrisation/bactérie/consortium/béton/mortier/fissure/injection/rhéologie/réparation*



## Abstract

Concrete, the most widely used construction material, can deteriorate on contact with its environment, leading to cracks which may negatively impact its durability. The most commonly used method for repairing fine cracks is the injection of resins (epoxy, polyurethanes, etc.). However, these potentially polluting materials can have a limited lifespan and are sometimes incompatible with concrete. The objective of the thesis is to develop a biological crack repair method for concrete structures. Crack sealing is achieved by injecting an inoculated thickened liquid, leading to the production of bio-based calcium carbonate and biofilm into the crack. The development has two main innovations: a specific microbial inoculum and a predictive model for the design and the production of shear thinning injection liquid specifically optimized for the opening of the crack to be repaired.

The microbial inoculum is a consortium of native microorganisms adapted to cementitious materials. The consortium grows rapidly and produces significant amount of calcite and vaterite from the metabolization of calcium lactate under typical environmental conditions found in a crack (humidity, 20°C and alkaline pH). The predictive model has demonstrated its effectiveness in designing injectable and biocompatible formulations in cracks with opening ranging from 40 to 1000 µm. A selected formulation inoculated with the microbial consortium was injected into mortar samples with a range of crack opening, and then stored under laboratory conditions (20°C, 100% relative humidity). For fine cracks (approximately 100 µm) injection of the inoculated thickened formulation reduced the apparent crack opening by 84-90%. For larger cracks (250 and 450 µm), the apparent crack opening was reduced by 77%. The same biocicatrisation system was used to bio-repair two 400 µm cracks in a concrete slab (1 x 2 x 0.15 m) stored in laboratory conditions (20°C). Biotreatment of the cracks resulted in a 99% reduction in water permeability for both cracks, with the confirmation that some sealing materials formed in the cracks are the result of a biological process. Two injection methods suitable for dry and wet cracks have been developed for bio-treatment tests performed on larger scale concrete structures: for dry cracks, the EDF VeRCoRs mock-up, which is 1/3 scale nuclear reactor enclosure; and for wet cracks, a dam in the hydroelectric power plant of Weedon, Canada. These two on-site trials have produced promising results and are a significant contribution to the proof of concept of this new approach for biotreatment of cracks.

*Keywords:*

*biohealing/bacteria/consortium/concrete/mortar/cracks/injection/rheology/repairation*



## Remerciements

Je tiens d'abord à remercier Christine Lors et Richard Gagné pour avoir dirigé cette thèse, m'avoir accompagné durant ces trois ans et pour m'avoir permis de réaliser cette thèse en cotutelle entre le Canada et la France. Je suis particulièrement reconnaissant à Richard Gagné pour son accueil chaleureux par -30°C dans un nouveau pays, pour son soutien continu autant logistique que scientifique ainsi que pour sa présence et son enthousiasme tout le long de ce projet. Je remercie Christine Lors pour sa présence et son soutien tout le long de cette thèse, pour m'avoir accueilli aussi bien à Douai et pour tout le travail qu'elle a fourni lors de la correction de ce manuscrit de thèse.

Je remercie aussi l'équipe de EDF pour le financement et l'aide qui m'ont permis de réaliser cette thèse. Ce travail a notamment bénéficié d'un financement partiel du MAI-SN, Materials Aging Institute (<http://themai.org>). Je remercie Alexis Legrix, Laurent Petit et Nhu Cuong Tran pour leur aide, leur écoute et le temps qu'ils m'ont consacré lors de mes visites du EDF lab des Renardières pour réaliser les campagnes VeRCoRs.

Je remercie Michèle Queneudec-T'Kint, Hubert Cabana, BOUSTA Faisl, Josée Duchenne et Denis Damidot pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie les deux laboratoires d'accueil de part et d'autre de l'Atlantique. Plus précisément, du côté du département de Génie civil de l'Université de Sherbrooke je tiens à remercier Josée Bilodeau pour son aide autant au laboratoire qu'au barrage de Weedon pour les essais sur site. Je remercie Stéphane Gutierrez pour son aide, son temps et ses explications face à ma curiosité sur la tomographie. Je remercie Charles Bertrand pour son aide et le temps qu'on a passé pour trouver des micro-grottes pleines de *Fungi* dans la dalle en béton. Je remercie l'équipe d'Ammar Yahia pour m'avoir formé et permis d'utiliser un rhéomètre. Je remercie Chantal Brien pour son aide chaleureuse pour toutes les démarches qui ont permis la réalisation de ce projet coté Sherbrooke. Je remercie aussi Olivier Savary pour son aide pour les essais biologiques de cette thèse et Isabelle Arsenault avoir gardé et congelé mon consortium. Je remercie aussi Mathieu Valiquette et Yvan Drapeau d'Hydrosherbrooke pour m'avoir permis de réaliser des tests sur un des barrages d'Hydrosherbrooke et pour m'avoir accompagné et aidé sur site. De l'autre côté de l'océan, au CERI Matériaux et Procédés de l'IMT Nord Europe, je remercie Johanna Caboche pour son aide et sa bonne humeur. Je remercie aussi Damien Betrancourt pour son aide. Je remercie Carole Delcambre pour son aide pour les démarches nécessaires lors de mes séjours à Douai.

Je remercie les personnes que j'ai rencontré pour leur soutien moral et leur aide : Jesus Torres, Emma, Nadège, Shirley-Anne, Gautier, Kevin, Marie, Adrian, Adoum, Tristan, Karim, Mathilde, Stéphanie, Claudine, Bader, Ola, Angelika, Inès et Maël.

Je remercie aussi mon frère, ma sœur et mes parents pour leur soutien et leur aide dans tout ce que je fais. Je remercie ma sœur pour m'avoir aidé à la relecture de mon manuscrit.



# Table des matières

<b>INDEX DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>1</b>
<b>INDEX DES TABLEAUX.....</b>	<b>4</b>
<b>INDEX DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>7</b>
1. CONTEXTE DE LA THESE .....	7
2. OBJECTIFS DE LA THESE .....	9
3. DEMARCHE DE LA THESE.....	10
<b>CHAPITRE 1. ETAT DE L'ART .....</b>	<b>12</b>
1.1 MATERIAUX CIMENTAIRES .....	12
1.1.1 Généralités sur les matériaux cimentaires .....	12
1.1.2 Technique de réparations conventionnelles.....	15
1.2 BIOMINERALISATION MICROBIOLOGIQUE .....	19
1.2.1 La minéralisation biologique .....	19
1.2.2 Le règne des micro-organismes.....	22
1.2.3 Le carbonate de calcium, produit issu de la biominéralisation .....	25
1.2.4 Différentes voies métaboliques conduisant à la biominéralisation du carbonate de calcium .....	27
1.2.5 Effet de l'enveloppe bactérienne et du biofilm sur la cristallisation de la calcite.....	31
1.2.6 Les bactéries biominéralisantes utilisées en laboratoire.....	35
1.3 TECHNIQUES DE REPARATION BIOLOGIQUES .....	37
1.3.1 La biocicatrisation, généralités .....	37
1.3.2 L'inclusion de bactéries dans le béton : l'autobiocicatrisation .....	38
1.3.3 L'utilisation d'un fluide chargé en cellules bactériennes .....	44
1.3.4 La biocicatrisation sans matériel biologique vivant .....	47
1.3.5 Conclusion .....	48
1.4. MODIFICATION DE LA RHEOLOGIE POUR L'INJECTION.....	49
1.4.1 Notions générales de rhéologie nécessaires à l'injection .....	49
1.4.2 Fluides rhéofluidifiants, le milieu d'injection .....	51
1.4.3 Fluides avec un comportement linéaire, pour des viscosités types .....	52
<b>CHAPITRE 2 : UTILISATION D'UN PLAN D'EXPERIENCES POUR LIER LA COMPOSITION DES FORMULATIONS A LEUR RHEOLOGIE .....</b>	<b>54</b>
2.1. INTRODUCTION .....	54
2.2. MATERIEL ET METHODES.....	57
2.2.1 Suspensions épaissies étudiés .....	57
2.2.2 Caractérisation rhéologiques des suspensions épaissies.....	58
2.2.3 Plans d'expériences .....	59
2.3. RESULTATS ET DISCUSSION.....	62
2.3.1 Création du plan d'expériences .....	62
2.3.2 Traitement des données du plan d'expériences .....	63
2.3.3 Analyse des résultats et évaluation de l'effet des facteurs sur les réponses .....	69
2.3.4 Outil prédictif des réponses.....	73
2.4. CONCLUSION .....	74
<b>CHAPITRE 3 : LIEN ENTRE UNE TAILLE DE FISSURE ET LES PARAMETRES RHEOLOGIQUES D'UNE FORMULATION INJECTABLE .....</b>	<b>76</b>
3.1. INTRODUCTION .....	76
3.2. MATERIEL ET METHODES.....	76
3.2.1 Fabrication des fissures contrôlées .....	76



3.2.2 Suspensions de carboxyméthylcellulose (CMC) .....	77
3.2.3 Injection dans une fissure de taille contrôlée .....	78
3.2.4 Détermination des limites basses et hautes d'injection .....	79
3.2.5 Formulations injectables produites .....	79
3.3. RESULTATS ET DISCUSSION.....	80
3.3.1 Caractéristiques rhéologiques des suspensions de CMC .....	80
3.3.2 Injection des suspensions de CMC dans des fissures de taille contrôlée .....	80
3.3.3 Gradient de cisaillement théorique induit par une injection avec une seringue .....	82
3.3.4 Différentes valeurs de viscosité utilisables pour les différentes tailles de fissures .....	83
3.3.5 Mise au point de milieux d'injection rhéofluidifiants adaptés à une taille de fissure .....	85
3.4. CONCLUSION .....	91
<b>CHAPITRE 4 : MISE AU POINT D'UN CONSORTIUM MICROBIEN INDIGENE .....</b>	<b>92</b>
4.1. INTRODUCTION .....	92
4.2. MATERIELS ET METHODES .....	93
4.2.1 Milieux utilisés.....	93
4.2.2 Prélèvements microbiens de France .....	94
4.2.3 Sélection des micro-organismes biominéralisants .....	99
4.2.4 Finalisation du mélange microbien prélevé en France .....	100
4.2.5 Mélange microbien prélevé au Canada.....	100
4.2.6 Constitution du consortium microbien indigène et étude de son potentiel biominéralisant .....	102
4.3. RESULTATS ET DISCUSSION.....	104
4.3.1 Evaluation de la capacité de biominéralisation du consortium microbien.....	104
4.3.2 Croissance microbienne en fonction du pH .....	107
4.3.3 Croissance microbienne en fonction de la température.....	108
4.3.4 Evaluation des capacités biominéralisantes des inocula.....	110
4.4 CONCLUSION .....	114
<b>CHAPITRE 5 : VALIDATION DE LA BIOCOMPATIBILITE DES FORMULATIONS EPAISSIES SELECTIONNEES AVEC LE CONSORTIUM MICROBIEN ET BACILLUS PSEUDOFIRMUS.....</b>	<b>116</b>
5.1. INTRODUCTION .....	116
5.2. MATERIELS ET METHODES .....	117
5.2.1 Milieux utilisés.....	117
5.2.2 Evaluation de la croissance microbienne et des performances de biominéralisation du consortium microbien .....	117
5.3. RESULTATS ET DISCUSSION.....	121
5.3.1 Evaluation de la consommation du lactate par le consortium microbien dans les formulations épaissies .....	121
5.3.2 Evaluation de la production de carbonate de calcium par le consortium microbien .....	124
5.3.3 Lien entre le lactate consommé et le carbonate de calcium produit.....	126
5.4. CONCLUSION .....	127
<b>CHAPITRE 6 : ESSAIS DE BIOCATRISATION SUR DES MATERIAUX CIMENTAIRES FISSURES EN CONDITION DE LABORATOIRE .....</b>	<b>128</b>
6.1 INTRODUCTION .....	128
6.2 MATERIELS ET METHODES .....	129
6.2.1 Modèle de laboratoire : les éprouvettes de mortier.....	129
6.2.2 Fabrication de la dalle en béton.....	134
6.2.3 Biotraitement des fissures de la dalle et suivi de leurs colmatages .....	138
6.2.4 Observations en microscopie électronique à balayage (MEB) du produit de réparation.....	143
6.3 RESULTATS ET DISCUSSION.....	144
6.3.1 Essais de biocatratisation en situation contrôlée de laboratoire.....	144
6.3.2 Essais de biocatratisation sur la dalle en béton .....	148
6.4 CONCLUSION .....	163

<b>CHAPITRE 7 : ESSAIS DE BIOCATRISATION SUR DES OUVRAGES REELS .....</b>	<b>165</b>
7.1 INTRODUCTION .....	165
7.2 MATERIELS ET METHODES .....	166
7.2.1 <i>Maquette VeRCoRs</i> .....	166
7.2.2 <i>Le barrage de la centrale hydroélectrique d'Hydro-Sherbrooke à Weedon</i> .....	180
7.3. RESULTATS ET DISCUSSION.....	186
7.3.1 <i>Résultats du biotraitement de février 2020 sur la maquette VeRCoRs</i> .....	186
7.3.2 <i>Résultats de l'injection dans les fissures du barrage de la centrale Weedon</i> .....	192
7.4. CONCLUSION .....	195
<b>CHAPITRE 8 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>197</b>
8.1 MISE AU POINT D'UNE FORMULATION INJECTABLE.....	199
8.2 MISE AU POINT D'UN CONSORTIUM MICROBIEN INDIGENE .....	201
8.3 EVALUATION DU PROCEDE DE BIOMINERALISATION DEVELOPPE .....	202
8.4 PERSPECTIVES .....	204
<b>ANNEXES.....</b>	<b>206</b>
ANNEXE 1 : FORMULATIONS UTILISEES POUR LE PLAN D'EXPERIENCES A QUATRE FACTEURS .....	206
ANNEXE 2 : EVALUATION DES COEFFICIENTS LIANT LA REPONSE K AUX QUATRE FACTEURS .....	207
ANNEXE 3 : EVALUATION DES COEFFICIENTS LIANT LA REPONSE N AUX QUATRE FACTEURS.....	210
ANNEXE 4 : CMC, VISCOSITE EN FONCTION DU GRADIENT DE CISAILLEMENT EN ECHELLES LOGARITHMIQUES .....	212
ANNEXE 5 : CALCUL DE L'INCERTITUDE DE MESURE DU CARBONATE DE CALCIUM PRODUIT PAR CBB2020 DANS LES CINQ FORMULATIONS.....	213
ANNEXE 6 : ANALYSES DU BETOCARB F® .....	214
ANNEXE 7 : PLANNING D'HUMIDIFICATION DES ZONES BIOTRAITEES SUITE AU TRAITEMENT DE LA MAQUETTE VERCoRS DE FEVRIER 2020.....	216
ANNEXE 8 : CAPTEURS DE TEMPERATURE PLACES SUR LES ZONES TRAITES DE LA CAMPAGNE DE FEVRIER 2020 SUR LA MAQUETTE VERCoRS.....	217
ANNEXE 9 : CALCUL DU COUT DE PRODUCTION D'UN LITRE DE FORMULATION GMIN.....	218
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>219</b>

# Index des illustrations

Figure 1 : Schéma explicatif de la démarche de la thèse.....	11
Figure I.1 : Composition d'un ciment Portland.....	12
Figure I.2 : Effet d'une fissure sur une barre d'armature en acier.....	14
Figure I.3 : Différents cas de traitement d'une fissure.....	16
Figure I.4 : Exemple de stromatolithe de type lamellaire.....	19
Figure I.5 : Comparaison de cristaux de calcite.....	21
Figure I.6 : Exemples de biominéralisation.....	21
Figure I.7 : Classification des bactéries selon T. Cavalier-Smith.....	23
Figure I.8 : Schématisation de l'enveloppe bactérienne.....	24
Figure I.9 : Réaction de production du carbonate en fonction du pH.....	26
Figure I.10 : Calcite biosourcée ou non.....	27
Figure I.11 : Réaction de production de carbonate de calcium uréolytique.....	28
Figure I.12 : Réaction de production de carbonate de calcium par dénitrification.....	29
Figure I.13 : Réaction de production de carbonate de calcium en utilisant les composés soufrés.....	30
Figure I.14 : Réaction de production de carbonate de calcium par respiration de composés organiques.....	30
Figure I.15 : Réaction de production de carbonate de calcium par oxydation du méthane.....	31
Figure I.16 : Evolution du potentiel zêta de la surface de <i>Pseudomonas multocida</i> en fonction du pH.....	32
Figure I.17 : Précipitation de calcite sur deux jours.....	32
Figure I.18 : Les différentes phases de formation d'un biofilm.....	33
Figure I.19 : Potentiel Zêta de la MEC de <i>Rhodococcus opacus</i> en fonction de la concentration en ions calcium ajoutés.....	34
Figure I.20 : Répartition en pourcentage de l'utilisation des différentes bactéries biominéralisantes en laboratoire de 1999 à 2021.....	36
Figure I.21 : Effet d'un comblement de fissures dans un mortier avec différentes concentrations de cellules bactériennes <i>S. pasteurii</i> durant 27 jours sur la résistance en compression.....	37
Figure I.22 : Nombre de publication sur « concrete healing ».....	38
Figure I.23 : Résistance en compression d'un béton avec incorporation de bactéries.....	42
Figure I.24 : Viabilité des cellules bactériennes de <i>S. pasteurii</i> dans un mortier ou dans une pâte de ciment.....	43
Figure I.25 : Schéma explicatif de l'autobiocicatrisation.....	44
Figure I.26 : Résistance en compression d'un béton avec incorporation de bactéries.....	45
Figure I.27 : Illustration d'une technique d'exobiocicatrisation en échelle pilote pendant 2 mois.....	46
Figure I.28 : Restauration esthétique d'un monument en pierres calcaires.....	47
Figure I.29 : Effet de l'ajout d'uréase dans la composition d'un mortier.....	48
Figure I.30 : Calcul de la viscosité.....	49
Figure I.31 : Comportements rhéologiques de fluides.....	50
Figure I.32 : Représentation en échelle logarithmique de la viscosité en fonction du gradient de cisaillement.....	51
Figure I.33 : Viscosité en fonction du gradient de cisaillement de différentes concentrations de CMC.....	53
Figure II.1 : Domaines expérimentaux à une, deux ou trois dimensions.....	56
Figure II.2 : Molécule de L-lactate de calcium hydraté.....	57
Figure II.3 : Molécule de D-gluconate de calcium hydraté.....	58
Figure II.4 : Programme (nommé rhéogramme) utilisé lors des essais rhéologiques.....	58
Figure II.5 : Equation du modèle d'Oswald.....	59
Figure II.6 : Diagramme d'Ishikawa.....	60
Figure II.7 : Diagrammes des effets des quatre facteurs liés à la réponse k obtenus avec l'équation ajustée.....	65
Figure II.8 : Effets du modèle utilisant l'équation ajustée liant les quatre facteurs à la réponse k, en unités codées.....	66
Figure II.9 : Diagrammes des effets des quatre facteurs et la réponse n obtenus avec l'équation ajustée.....	68
Figure II.10 : Effets du modèle utilisant l'équation ajustée liant les quatre facteurs à la réponse n, en unités codées.....	69

Figure III.1 : Dispositif de fissures de tailles contrôlées.....	77
Figure III.2 : Différentes tailles (45, 100, 250, 500 et 1000 $\mu\text{m}$ ) de fissures contrôlées réalisées.....	77
Figure III.3 : Dispositif d'injection d'un fluide dans une fissure contrôlée.....	79
Figure III.4 : Injection de la formulation L13G3A4C15 dans des fissures de taille contrôlée (250, 500 et 1000 $\mu\text{m}$ ). .....	86
Figure III.5 : Injection des cinq formulations candidates dans une fissure de 45 $\mu\text{m}$ . .....	89
Figure IV.1 : Schéma explicatif de l'obtention du consortium biominéralisant.....	93
Figure IV.2 : Sites des prélèvements solides effectués.....	95
Figure IV.3 : Sites des prélèvements liquides effectués.....	96
Figure IV.4 : Sites des prélèvements réalisés à la surface de bétons ou de pâtes cimentaires.....	96
Figure IV.5 : Schéma récapitulatif des étapes conduisant à l'obtention du « prélèvements microbiens réalisés en France ».....	101
Figure IV.6 : Observations au MEB des produits solides générés par le consortium CBB2020, après sept jours de croissance à 20 °C.....	105
Figure IV.7 : Analyse DRX des cristaux produits par le consortium CBB2020. ....	106
Figure IV.8 : Croissance du consortium microbien CBB2020 et <i>B. pseudofirmus</i> en fonction du pH à 20°C .....	107
Figure IV.9 : Croissance du consortium CBB2020 et de <i>B. pseudofirmus</i> en fonction de la température à 10, 20 et 30 °C.....	109
Figure IV.10 : Cinétique de consommation du lactate par le consortium CBB2020 et <i>B. pseudofirmus</i> , à 20°C. ....	110
Figure IV.11 : Comparaison des cinétiques de consommation du lactate par <i>B. pseudofirmus</i> avec des données antérieures. ....	113
Figure V.1 : Procédure de quantification du lactate consommé et du carbonate de calcium produit. ....	118
Figure V.2 : Analyses ATG du BétocarbF, de l'AttageI50 et du lactate de calcium.....	119
Figure V.3 : Concentration du lactate dans les différents surnageants lors du rinçage des culots. ....	122
Figure V.4 : Quantité moyenne de lactate consommée pour chaque formulation en 23 jours de croissance microbienne.....	123
Figure V.5 : Quantité moyenne maximale de carbonate de calcium totale et produite pour chaque formulation. .....	125
Figure VI.1 : Schéma d'une éprouvette de mortier et du système de fissuration.....	129
Figure VI.2 : Moule d'une éprouvette de mortier avec armature d'acier suspendue par des fils en nylon. ....	129
Figure VI.3 : Dispositif de mesure du débit de l'air à travers les fissures des éprouvettes de mortier. ....	131
Figure VI.4 : Débit d'air traversant des fissures d'éprouvettes de mortier en fonction de son ouverture, pour un différentiel de pression de 0,1 bar.....	132
Figure VI.5 : Injecteurs utilisés sur les éprouvettes de mortier cylindriques.....	133
Figure VI.6 : Dalle de béton dans son coffrage pendant sa cure humide. ....	135
Figure VI.7 : Dalle de béton sur son cadre.....	135
Figure VI.8 : Soutiens latéraux de la dalle. ....	136
Figure VI.9 : Tente de carbonatation de la dalle. ....	136
Figure VI.10 : Fissures de la dalle en béton. ....	137
Figure VI.11 : Système de mesure du débit d'eau à travers les fissures de la dalle.....	139
Figure VI.12 : Préparation de l'injection des fissures de la dalle. ....	140
Figure VI.13 : Injection d'une fissure de la dalle.....	141
Figure VI.14 : Zone centrale dégagée pour permettre les mesures de débit d'eau intermédiaires.....	141
Figure VI.15 : Différents biotraitement réalisés sur les fissures de la dalle. ....	142
Figure VI.16 : Forage de la dalle en béton et ouverture des carottes de béton. ....	143
Figure VI.17 : Observations des fissures fines dans les éprouvettes de mortier.....	145
Figure VI.18 : Observations des fissures moyennes dans les éprouvettes de mortier.....	146
Figure VI.19 : Observations des fissures larges dans les éprouvettes de mortier.....	146
Figure VI.20 : Evolution du débit d'eau (mL/s par m) à travers les deux fissures de la dalle en béton. ....	149
Figure VI.21 : Observations des fissures de la dalle après les trois traitements biologiques. ....	151
Figure VI.22 : Zones de prélèvements des carottes de béton. ....	152
Figure VI.23 : Observations des carottes de béton fissurées après leurs ouvertures. ....	153
Figure VI.24 : Observations au MEB des deux faces de la carotte 1A. ....	153

<i>Figure VI.25 : Observations au MEB de la même zone à différents grossissements.</i>	154
<i>Figure VI.26 : Observations au MEB des structures filamenteuses.</i>	155
<i>Figure VI.27 : Observations au MEB de la structure mixte constituée de filaments fins et d'éléments solides.</i>	156
<i>Figure VI.28 : Observations au MEB de la structure amorphe et lisse.</i>	158
<i>Figure VI.29 : Analyses MEB et EDS réalisées sur trois phases minérales cubiques.</i>	160
<i>Figure VI.30 : Analyses MEB et EDS sur les deux types phases minérales.</i>	161
<i>Figure VI.31 : Analyses MEB et EDS de la calcite biogénérée et une structure biologique.</i>	161
<i>Figure VI.32 : Observations au MEB d'une surface d'un mortier carbonatée.</i>	162
<i>Figure VII.1 : Photo de la maquette VeRCoRS du centre de recherche Les Renardières EDF (France).</i>	166
<i>Figure VII.2 : Matériels d'injection.</i>	167
<i>Figure VII.3 : Préparation de la fissure GOU 2007 pour l'essai de biocicatrisation par injection.</i>	169
<i>Figure VII.4 : Présentation des différentes zones de la maquette VeRCoRS.</i>	172
<i>Figure VII.5 : Photos des deux fissures verticales initiales et préparées pour l'injection.</i>	173
<i>Figure VII.6 : Injection de milieu liquide inoculé dans les fissures verticales.</i>	174
<i>Figure VII.7 : Injection du milieu épaisi dans les fissures verticales GOU 2005 et GOU 2007.</i>	174
<i>Figure VII.8 : Zones d'hydratation visibles lors de l'enlèvement du système d'injection.</i>	175
<i>Figure VII.9 : Badigeonnage final des fissures verticales.</i>	175
<i>Figure VII.10 : Système de protection des fissures verticales.</i>	176
<i>Figure VII.11 : Badigeonnage de la zone fuyarde TAM 2029.</i>	176
<i>Figure VII.12 : Système de protection des zones biotraitées par badigeonnage.</i>	177
<i>Figure VII.13 : Fissure GOU 3017 préparée pour l'injection.</i>	177
<i>Figure VII.14 : Fissure GOU 3017 badigeonnée avec Gmin.</i>	178
<i>Figure VII.15 : Photos du barrage de la centrale hydroélectrique d'Hydro-Sherbrooke (Weedon).</i>	180
<i>Figure VII.16 : Réparation de la fissure A dans le barrage de la centrale de Weedon.</i>	181
<i>Figure VII.17 : Fissures A et B traitée sur le barrage de la centrale Weedon.</i>	184
<i>Figure VII.18 : Injection dans une fissure située au niveau du barrage de la centrale de Weedon.</i>	184
<i>Figure VII.19 : Fissures A et B traitées au niveau du barrage de la centrale de Weedon.</i>	185
<i>Figure VII.20 : Boîte collectrice permettant de mesurer le débit de fuite de la fissure verticale GOU 2005.</i>	186
<i>Figure VII.21 : Valeurs de débit de fuite des zones FUT 2014 et TAM 2029 de la maquette VeRCoRS.</i>	188
<i>Figure VII.22 : Pourcentages de débit de fuite des fissures verticales de la maquette VeRCoRS.</i>	189
<i>Figure VII.23 : Suivi de l'humidité relative en fonction du temps au niveau des zones fissurées (TAM 2029, FUT 2014 et GOU 2007) après le biotraitement de février 2020.</i>	192
<i>Figure VII.24 : fissures A et B situées au niveau du barrage de Weedon à l'état initial et traitées.</i>	194
<i>Figure VII.25 : fissures A et B situées au niveau barrage de Weedon quatre mois après le traitement.</i>	195
<i>Figure IX.1 : CMC, viscosité en fonction du gradient de cisaillement en échelles logarithmiques.</i>	212
<i>Figure IX.2 : Fiche technique du Bétovarb F®</i>	214
<i>Figure IX.3 : Analyse DRX du Bétovarb F®</i>	215
<i>Figure IX.4 : Capteurs de température placés sur les zones traitées de la campagne de février 2020 sur la maquette VeRCoRS.</i>	217

# Index des tableaux

Tableau I.1 : Méthodes de réparation de fissures actives et inactives. ....	18
Tableau I.2 : Evaluation du gain de résistance en compression par des techniques de biocicatrisation. ....	39
Tableau I.3 : Evaluation de la réparation de fissures dans un matériau cimentaire par des techniques de biocicatrisation. ....	40
Tableau I.4 : Evaluation de la réduction de l'absorption d'eau un matériau cimentaire fissuré après des techniques de biocicatrisation. ....	41
Tableau II.1 : Les niveaux du plan d'expériences à quatre facteurs. ....	60
Tableau II.2 : Matrice d'expérimentation du plan d'expériences à ....	61
Tableau II.3 : Matrice d'expériences complète du plan d'expériences à quatre facteurs. ....	62
Tableau II.4 : Coefficients liants quatre facteurs à la réponse k. ....	70
Tableau II.5 : Coefficients liant quatre facteurs à la réponse n. ....	72
Tableau II.6 : Récapitulatif des effets des quatre facteurs sur les deux réponses k et n. ....	75
Tableau III.1 : Equations de tendance liant le gradient de cisaillement (x) à la viscosité (y) pour chaque suspension de CMC testée. ....	80
Tableau III.2 : Détermination de la limite haute de viscosité des suspensions de CMC testées. ....	81
Tableau III.3 : Détermination de la limite basse de viscosité des suspensions de CMC testées. ....	81
Tableau III.4 : Limites basse et haute de viscosité des suspensions de CMC testées en fonction de la taille de la fissure. ....	82
Tableau III.5 : Viscosités hautes et basses pour chaque taille de fissure pour un gradient de cisaillement de $377 \text{ s}^{-1}$ . ....	84
Tableau III.6 : Limites minimales et maximales des indices de consistance (k) pour chaque taille de fissure et pour différentes valeurs d'indice d'écoulement (n) pour un gradient de cisaillement de $377 \text{ s}^{-1}$ . ....	85
Tableau III.7 : Formulations candidates pour l'injection dans des fissures fines générées par l'outil prédictif du plan d'expériences à quatre facteurs. ....	88
Tableau III.8 : Valeurs rhéologiques (k et n) mesurées et calculées des cinq formulations. ....	90
Tableau IV.1 : Composition des différents mélanges microbiens obtenus à partir des prélèvements réalisés. ....	98
Tableau IV.2: Evaluation de la croissance microbienne des différents mélanges après les trois repiquages successifs. ....	98
Tableau IV.3: Essais de sélection en fonction du pH. ....	99
Tableau IV.4 : Cinétiques de consommation du lactate, pour un litre de milieu, à $20^\circ\text{C}$ . ....	111
Tableau IV.5 : Production de carbonate de calcium du consortium CBB2020 et <i>B. pseudofirmus</i> après douze jours à $20^\circ\text{C}$ . ....	112
Tableau IV.6 : Récapitulatif des résultats de croissance du consortium microbien et de <i>B. pseudofirmus</i> . ....	115
Tableau V.1 : Composition des cinq formulations testées. ....	117
Tableau V.2 : Quantité de lactate consommée en vingt-trois jours de croissance microbienne. ....	122
Tableau V.3 Quantité de carbonate de calcium biogénéré en vingt-trois jours de croissance microbienne. ....	124
Tableau V.4 : Masse de carbonate de calcium produite (en g) par gramme de lactate de calcium consommé. ....	126
Tableau VI.1 : Tailles de fissure des éprouvettes de mortier. ....	130
Tableau VI.2 : Tailles de fissure des éprouvettes de mortier. ....	133
Tableau VI.3 : Ouvertures des deux fissures de la dalle en béton. ....	137
Tableau VI.4 : Ouvertures apparentes des fissures dans les éprouvettes de mortier avant le traitement. ....	144
Tableau VI.5 : Colmatage des fissures fines, moyennes et grosses des éprouvettes de mortier. ....	145
Tableau VI.6 : Colmatage des fissures fines et grosses des éprouvettes de mortier, après une immersion de vingt-quatre heures dans de l'eau. ....	147
Tableau VI.7 : Réduction du débit d'eau à travers les fissures en pourcentage et facteur de réduction du débit par rapport au débit initial. ....	148
Tableau VII.1 : Récapitulatif des traitements biologiques réalisés pour chaque campagne VerCoRs. ....	179
Tableau VII.2 : Débits de fuite en valeurs absolues et pourcentages en fonction de la VD1. ....	187
Tableau IX.1 : Formulations utilisées pour le plan d'expériences à quatre facteurs. ....	206

<i>Tableau IX.2 : Comparaison des coefficients et de l'étalon pour le plan à quatre facteurs liés à la réponse k...</i>	208
<i>Tableau IX.3 : Analyse de variance complète du modèle ajusté pour le plan à quatre facteurs liés à la réponse k.</i>	208
<i>Tableau IX.4 : Analyse de variance des coefficients significatifs du modèle ajusté pour le plan à quatre facteurs liés à la réponse k.</i>	209
<i>Tableau IX.5 : Comparaison des coefficients et de l'étalon pour le plan à quatre facteurs liés à la réponse n...</i>	210
<i>Tableau IX.6 : Analyse de variance complète du modèle ajusté pour le plan à quatre facteurs liés à la réponse n.</i>	211
<i>Tableau IX.7 : Analyse de variance complète du modèle ajusté pour le plan à quatre facteurs liés à la réponse n.</i>	211
<i>Tableau IX.8 : Masse de lactate présente dans chaque surnageant et évaluation de la surestimation maximale de la production de carbonate de calcium.</i>	213
<i>Tableau IX.9 : Analyse du BétoCarbF® à la spectrométrie de fluorescence X.</i>	215
<i>Tableau IX.10 : Planning d'humidification des zones biotraitées (VeRCoRs).</i>	216
<i>Tableau IX.11 : Coût de production d'un litre de formulation Gmin.</i>	218

## Index des abréviations

ATG	: analyse thermogravimétrique
Atm	: atmosphère
CMC	: carboxyméthylcellulose
DO	: densité optique
DXR	: analyse par diffraction aux rayons X
EDF	: électricité de France
EDS	: <i>energy dispersive spectroscopy</i>
EPS	: substance extracellulaire polymérique
HR	: humidité relative
IMT	: Institut Mines Télécom
LPS	: lipopolysaccharides
MEB	: microscopie électronique à balayage
mL	: millilitre
mm	: millimètre
NL	: normo-litre
PDAI	: premier degré avec interaction
R <sup>2</sup>	: coefficient de corrélation
RPM	: <i>revolution per min</i> (tour par minute)
VD	: épreuve de mise sous pression de la maquette VeRCoRs
µm	: micromètre



# Introduction générale

## 1. Contexte de la thèse

Le béton est fréquemment employé pour ses nombreuses propriétés adaptables aux différents problèmes de construction, sa résistance à la compression importante et son faible coût. Cependant, le béton n'est pas inerte, il réagit avec son environnement. Plusieurs mécanismes altèrent ses propriétés mécaniques et esthétiques. Cela peut être dû à l'action des différents composés chimiques présents dans l'environnement (les chlorures, les sulfates, les nitrates, les acides, les sels de déglacage...), à l'action de l'eau, à des actions physiques (la température, les cycles de gel/dégel, les chocs, l'écaillage...) ou encore à des actions biologiques (1). Ces stress entraînent des dégradations allant de la microfissure à l'instabilité structurale de l'ouvrage. Les fissures de tailles variables, même petites, représentent un danger pour l'intégrité de la structure. Les fissures ouvrent des voies d'accès pour des agents potentiellement agressifs, amplifiant le phénomène de dégradation et altérant le béton en profondeur. Ces réactifs peuvent réagir directement avec la pâte cimentaire ou induire la corrosion des barres en acier présentes dans le béton. À la suite de cette corrosion, la rouille formée augmente de volume, ce qui induit des contraintes dans le matériau. Comme le béton a une faible résistance à la traction, cela amplifie la fissuration voire, dans un cas extrême, conduit à l'éclatement du béton. Il est par conséquent nécessaire de réparer efficacement les fissures pour augmenter la durée de vie de l'ouvrage.

Les plus grosses fissures peuvent être réparées par injection de coulis ou de mortier très fin, ce qui représente une solution durable, propre et compatible avec le béton. Pour les fissures plus fines, la solution actuelle consiste à y injecter des résines synthétiques, telles que les résines de type époxy (2). Cependant, ces résines peuvent réagir avec la lumière et dégager par photodégradation du bisphénol A (3). Cette réactivité a deux conséquences : relarguer des molécules toxiques dans l'environnement, comme le bisphénol A, et une dégradation de la résine laissant la fissure de nouveau accessible. De plus, les résines n'ont pas des caractéristiques physiques comparables à celles du béton (4). Lors d'une variation de température, les deux matériaux n'ont pas la même dilatation thermique. Cette différence peut induire de nouveaux dommages, réduisant l'efficacité de la réparation. Cela limite l'efficacité de l'usage d'une réparation avec de la résine époxy à l'extérieur. Ce problème est particulièrement important au Canada, en hiver, où des cycles de gel / dégel sont fréquents.

Ainsi, l'utilisation de résines époxy est une technique polluante, de courte durée et peu compatible avec le béton.

La forme gazeuse du carbone inorganique terrestre a un impact écologique important. Le CO<sub>2</sub> est le deuxième gaz le plus influent sur l'effet de serre, après la vapeur d'eau, avec un impact sur l'effet de serre de 26% et 60% respectivement (5). L'industrie cimentaire joue un rôle important sur l'augmentation de la quantité de CO<sub>2</sub> dégagée avec une production de 7% des émissions anthropiques annuelles de CO<sub>2</sub> (6). Cet impact écologique, en plus de l'impact économique, renforce l'attrait du prolongement de la durée de vie des ouvrages en béton, ce qui permettrait d'éviter de nouvelles émissions découlant de leur démolition et de leur reconstruction. C'est dans cette optique que s'insère la bioréparation des fissures dans le béton.

La calcite (CaCO<sub>3</sub>) est un matériau de réparation alternatif à l'utilisation de résine. Elle peut permettre de réparer les fissures fines dans le béton par une technique nommée biocicatrisation. Cette stratégie nécessite la présence de certaines bactéries capables de survivre au contact d'un environnement basique que constitue la pâte cimentaire. En dégradant des molécules organiques, ces bactéries produisent du CO<sub>2</sub>. Ce dernier réagit avec l'eau et forme de l'acide carbonique (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). A pH basique, l'acide carbonique réagit avec l'eau pour former des ions bicarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Ces ions réagissent avec les ions calcium libres présents dans le milieu pour former du bicarbonate de calcium soluble (CaHCO<sub>3</sub>). Celui-ci, dans les conditions basiques de la pâte cimentaire, devient du carbonate de calcium, insoluble qui précipite. Lors de la précipitation, le carbonate de calcium cristallise sur le biofilm et sur l'enveloppe des cellules bactériennes pour former majoritairement de la calcite biogénérée. Ce composé est un solide ionique, non toxique, durable et possédant des propriétés physiques proches de celles du béton. Dans le cas de la biocicatrisation d'une fissure, celle-ci est colmatée par un matériau composite formé d'un mélange de calcite biogénérée et de biofilm. Un autre avantage de cette stratégie est son faible coût de production. Cela en fait une candidate idéale pour la réparation des fissures fines dans le béton. Cette technique de bioréparation serait moins polluante, plus durable et mieux compatible avec le béton que les systèmes actuellement sur le marché.

L'utilisation de la biocicatrisation comme méthode de réparation des fissures au sein des matériaux cimentaires a été étudiée lors de deux thèses réalisées en collaboration entre l'IMT Nord Europe et l'Université de Sherbrooke.

La première thèse (7) a permis la sélection d'une espèce bactérienne *Bacillus pseudofirmus* et de la voie métabolique associée conduisant à la production de carbonate de calcium. La méthode consiste à utiliser la respiration de *Bacillus pseudofirmus* pour produire du CO<sub>2</sub>, par consommation d'une source de carbone organique, le lactate de calcium. Des essais de biocicatrisation sur mortiers fissurés ont été mis au point en immergeant des échantillons de mortier dans une suspension bactérienne en phase exponentielle contenant de l'ordre de 10<sup>9</sup> bactéries. mL<sup>-1</sup>. Ces essais ont permis de démontrer en laboratoire la faisabilité de cette technique de biocicatrisation avec une réduction de plus de 70% de l'ouverture apparente d'une fissure de plus de 200 µm (7). Cependant, l'immersion des éprouvettes de mortier n'est pas une méthode applicable à des ouvrages réels.

La deuxième thèse (8) a permis de mettre au point un système d'injection utilisable en laboratoire et d'un milieu injectable rhéofluidifiant et thixotropique à base de Welan et d'Attagel. Cela signifie qu'il est fluide lors qu'on lui applique une contrainte puis, une fois au repos, il se gélifie, conduisant donc à un apport de bactéries par injection dans des fissures comprises entre 150 et 500 µm sans drainage. Les résultats obtenus ont montré une réduction de l'ouverture apparente des fissures de 200 µm à 30°C en 35 jours dans des conditions de laboratoire. Il s'agit de la seule publication utilisant l'exobiocicatrisation par injection pour réparer des fissures dans le béton. Cependant, la méthodologie utilisée doit être adaptée pour une application sur des ouvrages réels en conditions environnementales. La technique d'injection développée n'est pas utilisable sur des fissures présentes sur un ouvrage en béton tant au niveau du dispositif d'injection utilisé que le système biologique employé.

## **2. Objectifs de la thèse**

L'objectif de cette thèse est d'appliquer la technique de biocicatrisation par injection à des ouvrages réels fissurés en adaptant le système biologique (milieu et bactéries) et le dispositif d'injection. Cette injection nécessite l'optimisation des paramètres rhéologiques de la solution injectable permettant l'apport et la survie des bactéries dans une fissure. Les formulations mises au point seront testées en laboratoire pour évaluer leur potentiel biominéralisant et leur potentiel de colmatage de fissures. Pour une application en conditions réelles, il est nécessaire d'utiliser un inoculum adapté aux conditions *in situ* et capable de se développer à une température de 20°C.

La méthode développée sera utilisée pour réparer deux types de fissures présentes au niveau d'ouvrages réels en situation non contrôlée : des fissures humides sur un barrage d'Hydro-Sherbooke de la centrale de Weedon et des fissures sèches sur la maquette VeRCoRS, une reproduction à l'échelle 1/3 d'une enceinte nucléaire (centre de recherche EDF Lab les Renardières, France).

### **3. Démarche de la thèse**

Cette thèse comprend trois phases successives (Fig. 1).

#### ***Partie 1 : modification de l'aspect rhéologique des formulations en vue de leurs injections.***

Dans un premier temps, un plan d'expériences est créé, permettant de lier la concentration de quatre composés aux paramètres rhéologiques de la formulation générée. Grâce à ce plan d'expériences, il est possible de déterminer la composition d'une formulation pour un comportement rhéologique donné.

Dans un deuxième temps, des suspensions sont injectées dans des fissures de tailles contrôlées (45, 100, 250, 500 et 1000  $\mu\text{m}$ ), afin de déterminer les suspensions pouvant rentrer et rester dans une taille de fissure donnée et finalement, déterminer une viscosité minimale et une viscosité maximale pour chaque taille de fissure.

Les informations issues de ces deux étapes sont couplées et permettent de déterminer, pour une taille de fissure donnée, la composition d'une ou plusieurs formulations susceptibles d'y pénétrer. Il est donc possible de créer des formulations candidates injectables pour différentes tailles de fissures.

#### ***Partie 2 : développement d'un inoculum adapté aux conditions in situ***

Un consortium, constitué d'un mélange de micro-organismes, est sélectionné à partir de différents prélèvements environnementaux. La sélection se base sur une croissance à température réaliste pour un ouvrage en béton (20°C), la consommation en lactate de calcium et sur la résistance à un pH basique (pH du béton carbonaté égal à 9-10). Le consortium est ensuite mis en culture de biominéralisation.

### Partie 3 : essais de biocicatrisation de fissures en conditions de laboratoire et *in situ*

Dans un premier temps, le milieu d'injection développé, inoculé avec le consortium, est testé sur des éprouvettes de mortier fissurées et sur une dalle en béton fissurée en conditions de laboratoire pour vérifier la faisabilité du procédé de biocicatrisation (inoculum et formulation injectable) en conditions contrôlées.

Dans un deuxième temps, ce procédé est testé sur des ouvrages réels, en disposant au préalable d'un système d'injection adapté à une application *in situ*.

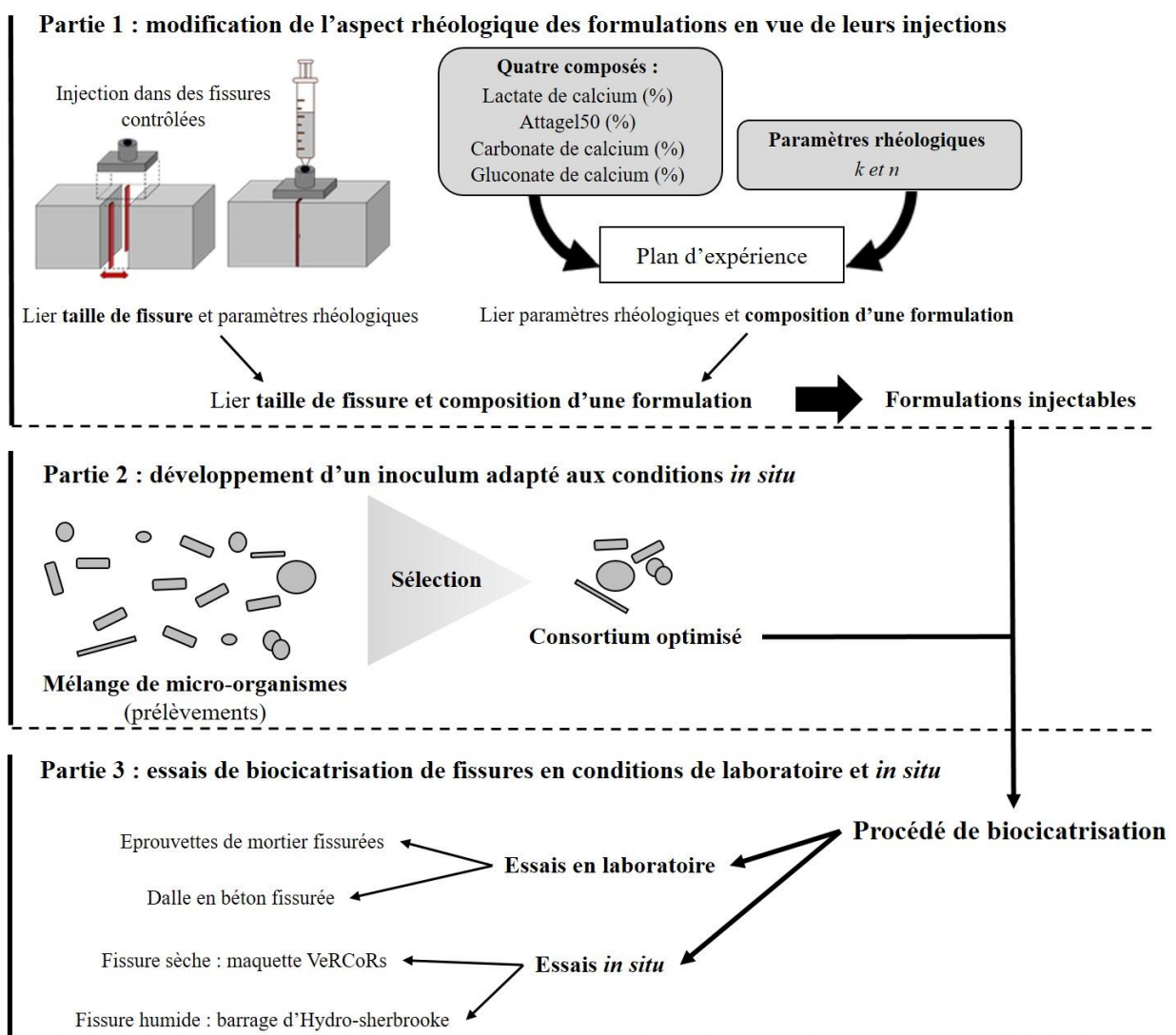


Figure 1 : Schéma explicatif de la démarche de la thèse.

# Chapitre 1. Etat de l'art

## 1.1 Matériaux cimentaires

### 1.1.1 Généralités sur les matériaux cimentaires

Actuellement, le béton est le matériau de construction le plus utilisé au monde. Selon le rapport annuel de 2017 du CEMBUREAU, la production annuelle mondiale de ciment en 2016 était de 4,65 milliards de tonnes. La production d'acier, deuxième matériau le plus utilisé, a été de 1,63 milliards de tonnes la même année selon le rapport annuel 2017 du Worldsteel association. Ils comportent de trois à cinq constituants :

- le liant hydraulique ;
- l'eau ;
- les granulats ;
- les adjuvants (optionnels).

Un liant hydraulique est une matière capable, en présence d'eau de s'hydrater et de devenir une pâte plastique. Lors de l'hydratation, elle durcit, ce qui permet de lier les différents constituants. Il y a différents types de liants. Le plus utilisé est le ciment Portland. Il est fabriqué avec un mélange de 20% d'argile et de 80% de calcaire (9) qui sont broyés puis calcinés à 1450°C, ce qui donne le clinker. Un ajout de gypse ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) conduit à la formation du ciment Portland. Sa composition est résumée dans la figure I.1.

Phase	Notation	% du ciment
Alite	$\text{C}_3\text{S}$	95 (clinker)
Bélite	$\text{C}_2\text{S}$	
Aluminate tricalcique	$\text{C}_3\text{A}$	
Alumino-ferrite tétracalcique	$\text{C}_4\text{AF}$	
Gypse	$\text{C}\bar{\text{S}}\text{H}_2$	5

Figure I.1 : Composition d'un ciment Portland. (9)

La teneur en eau ajoutée lors de la production d'un matériau cimentaire a beaucoup d'influence sur la structure finale de l'ouvrage. Plus le rapport eau/ciment est bas et plus la résistance en compression est élevée.

Les granulats sont de taille variable, la taille du granulats permet de différencier les différents types de matériaux cimentaires. Les granulats fins (diamètre inférieur à 4 mm), ou le sable,

permettent de former le mortier. L'ajout de granulats plus gros (diamètre supérieur à 4 mm), conduit à la formation du béton. Une pâte cimentaire est un mélange d'eau et de ciment sans ajout de granulats. Des adjuvants peuvent être ajoutés en faible proportion pour modifier les caractéristiques du matériau telles que la maniabilité à l'état frais, les propriétés mécaniques et les caractéristiques de durabilité.

Le squelette granulaire, constitué de sable et de gros granulats, est enrobé par la pâte de ciment formée par le mélange de l'eau et du ciment. Dans le béton à l'état frais, c'est la pâte de ciment qui produit la fluidité et la cohésion du mélange. L'hydratation du ciment engendre le durcissement de la pâte de ciment, ce qui solidarise les particules du squelette granulaire et permet le développement des propriétés mécaniques du matériau cimentaire. La pâte de ciment hydratée a une structure poreuse, qui comprend une microporosité constituée de pores capillaires et une macroporosité formée par les bulles d'air piégées lors du malaxage. C'est via ce réseau poreux que peuvent se produire différents mécanismes de transport (perméabilité et diffusion) d'agents potentiellement agressifs (liquides, gazeux ou ioniques) pouvant induire des dégradations ayant un impact sur l'intégrité de l'ouvrage.

La plupart des matériaux cimentaires ont une faible déformabilité et une résistance à la traction relativement faible par rapport à leur résistance à la compression. La fissuration se produit lorsque des sollicitations externes (charges de service, efforts thermiques et hydriques, variations volumiques empêchées, etc.) ou internes (pressions hydrauliques, osmotiques, de cristallisation, etc.) engendrent des contraintes internes supérieures à la capacité en traction de la pâte de ciment hydraté. La fissuration peut diminuer très significativement la performance des ouvrages en béton en compromettant leur capacité structurale globale, leur étanchéité, leur durabilité et leur esthétique.

Les fissures sont des chemins préférentiels pour la pénétration d'agents externes potentiellement agressifs (liquides, gaz, ions). Elles contribuent à accélérer les interactions délétères avec la pâte de ciment, les granulats ou les aciers d'armature. Ces mécanismes peuvent accélérer le vieillissement des ouvrages en béton, notamment en favorisant la formation de nouvelles fissures ou en contribuant à ouvrir davantage des fissures existantes.

En Amérique du Nord, la corrosion des aciers d'armature est la principale cause de la dégradation des structures de béton. La fissuration accélère les mécanismes de corrosion en favorisant la pénétration de l'oxygène, de l'humidité et des ions chlorures vers les aciers

d'armature. La formation de rouille est très expansive et engendre des pressions internes qui peuvent provoquer la fissuration et la perte de l'enrobage des barres d'armature (Fig. I.2) (10).

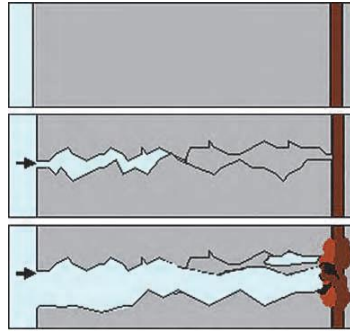


Figure I.2 : Effet d'une fissure sur une barre d'armature en acier.(10)

L'augmentation de la perméabilité des matériaux cimentaires rend la pâte cimentaire accessible aux attaques chimiques, conduisant à la lixiviation de certains hydrates et à la dégradation de la pâte cimentaire. La lixiviation est l'extraction de molécules sous l'effet d'un solvant, ici l'eau. Cette extraction altère progressivement la pâte cimentaire, qui ne peut plus maintenir l'agrégation des granulats sur cette zone. La pâte cimentaire peut, par exemple, être attaquée par des acides (11,12). Cela entraîne, dans le cas du ciment Portland, la dissolution de la Portlandite ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) et la libération du calcium venant du silicate de calcium hydraté (C-S-H). Une exposition à des acides, d'origine environnementale ou biologique, conduit à la perte de structure de l'agent liant permettant le maintien de l'intégrité du matériau cimentaire (11,12).

Un autre exemple de composé ayant un impact sur la pâte cimentaire est l'ion ammonium. Lorsqu'il rentre en contact avec un matériau cimentaire, il peut induire une décalcification et une expansion, due à la production d'ettringite, de gypse et de gaz ( $\text{NH}_3$ ), qui va conduire à une fissuration du matériau (13). Ces deux phénomènes augmentent rapidement la porosité de la peau du béton et par conséquent sa perméabilité. Cela augmente donc la quantité de composé réactif rentrant dans le matériau et ainsi amplifie le phénomène de dégradation. L'ammonium est capable de détruire un matériau cimentaire extrêmement rapidement. Le sulfate d'ammonium a plus d'effet que le chlorure ou le nitrate d'ammonium. Dans le cas de l'usage du nitrate d'ammonium (14) une décalcification rapide, due à la solubilisation du calcium, explique la perte de solidité.

Un autre type d'altération est dû à la perméabilité de l'ouvrage à l'air. Le  $\text{CO}_2$  présent dans l'air se dissout dans l'eau et peut réagir avec la Portlandite et le C-S-H, il s'agit du processus de carbonatation naturelle (9). Il y a libération d'ions calcium qui réagissent avec les ions carbonate issus de la solubilisation dans l'eau du  $\text{CO}_2$ , conduisant à la production de carbonate



de calcium et à un pH alcalin à la surface du béton exposée à l'air. Il s'agit d'un des mécanismes permettant l'autocicatrisation.

L'autocicatrisation est la réduction spontanée de la taille d'une fissure dans un matériau cimentaire en présence d'eau et de  $\text{CO}_2$ , elle permet de colmater des fissures dont le diamètre est inférieur à 100  $\mu\text{m}$ . Ce phénomène a été observé pour la première fois en 1836 (15). Elle est principalement due à deux mécanismes :

- L'hydratation des grains de ciment anhydres résiduels, qui constitue le mécanisme le plus efficace. Lors de la production d'un béton ou d'un mortier, l'ensemble du ciment n'est pas hydraté. Par la suite, une fissuration permet une entrée d'eau au cœur de l'ouvrage, assurant ainsi l'hydratation de ces grains.
- La carbonatation de la Portlandite : ce mécanisme est moins efficace car limité à la surface de contact avec l'air, mais ce phénomène joue un rôle important pour l'interaction entre la pâte de ciment et les organismes vivants. La carbonatation est la dissolution de la Portlandite ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) avec formation de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ), cela réduit le pH du matériau cimentaire et permet donc la survie des micro-organismes sur le béton.

### **1.1.2 Techniques de réparation conventionnelles**

De nombreuses altérations peuvent dégrader les matériaux cimentaires d'ouvrages et réduire leurs durées de vie. Face à ces altérations, il est nécessaire de mettre en place des mesures de maintenance, comme les techniques de réparation utilisées pour colmater les fissures et/ou recouvrir les capacités mécaniques des éléments en béton fissurés.

Quand la fissuration est trop importante et menace l'intégrité de l'ouvrage, une stratégie de réparation plus globale doit être utilisée. Elle peut consister à retirer le béton détérioré, remplacer les aciers d'armature corrodés et remettre en place un nouveau béton d'enrobage. Cette approche est généralement complexe, coûteuse et longue à mettre en œuvre. De plus, la fissuration due au retrait empêché du nouveau béton d'enrobage est un défi technologique souvent difficile à maîtriser. Il est toutefois possible d'éviter ces problèmes par un traitement des fissures en amont. Pour un ouvrage commun, les fissures inférieures à 0,3 mm sont tolérées mais cette limite dépend des usages, par exemple pour un béton exposé à un environnement défavorable l'ouverture minimale tolérée peut être réduite à 0,1 mm. Si cette fissure est jugée

esthétiquement inacceptable, qu'elle compromet l'étanchéité ou la capacité structurale de l'ouvrage, elle doit être réparée. Le but de cette réparation est de réduire la perméabilité du matériau pour prévenir l'aggravation des fissures, d'assurer un regain de la structure pour éviter une perte de performance de l'ouvrage ou les deux. Différents traitements peuvent être effectués (Fig. I.3). L'injection permet le remplissage complet des fissures avec un produit de réparation. Le colmatage est un comblement superficiel des fissures pour réduire la perméabilité sans impacter la résistance mécanique de l'ouvrage. Le calfeutrage est une solution temporaire de fermeture d'une fissure pour contenir le fluide injecté le temps d'une injection. Le pontage est une fermeture superficielle de la fissure avec un traitement de surface (16).

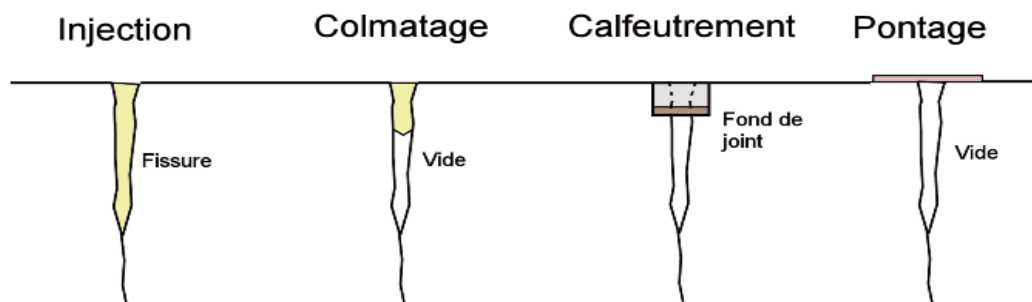


Figure I.3 : Différents cas de traitement d'une fissure. (16)

Il existe trois grands types de fissures :

- Les fissures dormantes ou inactives sont des fissures stables dont l'ouverture n'évolue pas. Il s'agit par exemple des fissures dues au retrait du béton qui a terminé son séchage. Dans ce cas, le produit de réparation recommandé est un matériau rigide.
- Les fissures actives sont des fissures dont l'ouverture est variable au cours du temps. Cela peut être dû, par exemple, aux cycles de température jour/nuit, qui vont jouer sur le volume du béton. Dans ce cas, le produit de réparation recommandé est un matériau souple.
- Les fissures évolutives sont des fissures dont l'ouverture augmente tant que leur cause reste active. C'est par exemple le cas de la corrosion des barres d'armature. La réparation ne peut se faire qu'une fois que la cause est éliminée. La fissure devient alors dormante avec nécessité d'un matériau de réparation rigide.

Pour le traitement des fissures dormantes et actives, il existe 8 grandes méthodes :

#### *Injection de résine rigide (époxy)*

Cette méthode consiste à injecter une résine rigide dans une fissure. Des ports d'injection sont forés tous les 15-30 cm pour y fixer des têtes d'injection. Puis, la résine est injectée sous

pression dans la profondeur de la fissure. La résine utilisée est de type époxy car elle possède une bonne résistance mécanique et chimique. L'avantage de cette stratégie de réparation est une réduction importante de la perméabilité et un regain de la résistance mécanique de l'ouvrage. Par exemple, le comblement des fissures avec de la résine de type époxy diminue de 32,7% la perte de résistance induite par des fissures (17). La rigidité de cette résine ne permet son usage que pour la réparation de fissures inactives.

### *Injection*

Cette méthode consiste à injecter différents produits de comblement dans des fissures. Ces injections permettent d'étanchéiser l'ouvrage mais ne permet pas un regain structurel. Il existe différents types de produits d'injection en fonction des différents types d'ouvrages. Du ciment Portland peut par exemple être utilisé, soit seul (coulis) soit associé à du sable fin (mortier) en fonction de la taille des fissures. La rigidité des produits utilisés ne permet que la réparation de fissures inactives.

### *Évidage et calfeutrage*

Il s'agit de la technique la plus simple et la plus utilisée. La partie superficielle de la fissure est élargie puis cette zone est comblée par un matériau calfeutrant. Ces colmatages permettent d'étanchéiser l'ouvrage mais ne permet pas un regain structurel. Cela peut se faire par exemple avec l'usage de mortiers, de polymères, de matériaux bitumineux et de résine époxy. La rigidité des produits utilisés ne permet que la réparation de fissures inactives.

### *Scellement flexible*

Cette méthode consiste à réaliser une coupure à la scie dans l'axe longitudinal de la fissure pour limiter les contraintes, puis combler la fissure avec un joint déformable capable de suivre ses mouvements. Ces comblements permettent d'étanchéiser l'ouvrage mais ne permet pas un regain structurel. Des joints siliconés peuvent être utilisés par exemple. La flexibilité des produits utilisés permet la réparation de fissures actives.

### *Scellement par gravité*

Cette méthode est utilisée pour des fissures très fines. Des résines très fluides (principalement de type époxy) sont appliquées au pinceau sur les fissures, puis le produit pénètre par gravité. Il n'y a pas de gain structural. La rigidité des produits utilisés ne permet que la réparation de fissures inactives.

### *Agrafages*

Cette méthode consiste à forer des trous de part et d'autre des bords de la fissure, puis d'y sceller des agrafes en acier avec de la résine de type époxy. Cela bloque la fissure et restaure les capacités structurales sans effet sur la perméabilité. Cependant, il est possible d'ajouter un traitement d'étanchéisation de la fissure. La rigidité des agrafes ne permet que la réparation de fissures inactives.

### *Couche de revêtement*

Cette méthode est utile dans le cas de fissures en réseau. Elle consiste à recouvrir la fissure avec un produit superficiel, il s'agit d'un pontage. Le béton peut être recouvert d'une membrane adhésive dans le cas d'une fissure dormante, avec par exemple du béton au latex. La couche de revêtement utilisée doit être non adhésive si la fissure est active. Cela nécessite l'usage d'une couche de désolidarisation (couche de sable) au niveau de la fissure.

Ces différentes méthodes sont résumées dans le tableau I.1.

*Tableau I.1 : Méthodes de réparation de fissures actives et inactives.*

Méthode de réparation	Exemple de produit	Regain structurel	Diminution perméabilité	Type de fissure
Injection époxy	Résine époxy	oui	oui	inactive
Injection	Coulis de ciment/mortier Uréthane, acrylamide	non	oui	inactive
Évidage et calfeutrage	Mortiers Matériaux bitumineux Résine époxy	non	oui	inactive
Scellement flexible	Joint siliconé	non	oui	active
Scellement par gravité	Résine époxy	non	oui	inactive
Agrafages	Agrafe en acier	oui	non	inactive
Couche de revêtement	Béton au latex	non	oui	active ou inactive

De toutes ces méthodes, l'injection est le système le plus efficace pour la réparation de matériau cimentaire, puisqu'il joue sur le regain de résistance et sur la baisse de la perméabilité. Cependant, seul l'usage de résine est utilisable pour l'injection de fissures fines, utiliser des matrices minérales n'est pas possible. Il y a une différence importante entre une résine plastique et un matériau cimentaire. Un autre matériau de réparation injectable et plus proche d'une matière minérale serait intéressant, tel que du carbonate de calcium.

## 1.2 Biominéralisation microbienne

### 1.2.1 La minéralisation biologique

Le premier signe de vie connue aujourd'hui est un stromatolithe datant de 3,4 milliards d'années (18), constitué de structures laminaires de carbonate de calcium formées par des couches successives de biofilm microbien, calcifiées au cours du temps (Fig. I.4). Ce sont des structures minérales, marquées par l'activité biologique, qui perdurent jusqu'à nos jours. Il s'agit de structures formées d'une part minérale et une part biologique.



*Figure I.4 : Exemple de stromatolithe de type lamellaire. (18)*

La biominéralisation est la production d'un minéral, un solide ionique, par une action biologique directe ou indirecte. Cela conduit à la production de structures complexes composées : des éléments du minéral (différents ions), d'une structure biologique et d'éléments traces (19). Pour que la nucléation et la croissance des cristaux se fassent, il faut maintenir une zone de sursaturation. Cette sursaturation ne peut être maintenue qu'en limitant la diffusion des constituants dans une zone précise. Le plus souvent, l'action se fait sur les cations. Les charges généralement négatives des molécules biologiques permettent de les lier aux cations de façon réversible par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques et donc de limiter leur diffusion.

Il y a deux grands types de biominéralisation (19). La minéralisation biologiquement induite : c'est l'interaction entre une structure biologique et l'environnement qui produit le minéral. Une membrane biologique, riche en phospholipides chargés négativement, peut attirer les cations chargés positivement. Cela induit une surconcentration locale, permettant la nucléation, puis la croissance d'un cristal. Les conditions de pH et de charges de la structure biologique utilisée peuvent jouer de façon indirecte sur le type de minéral produit. Cela génère des cristaux différents des cristaux abiotiques mais de formes et de tailles aléatoires. La minéralisation biologiquement contrôlée : les fonctions cellulaires ont une action directe sur la nucléation, la

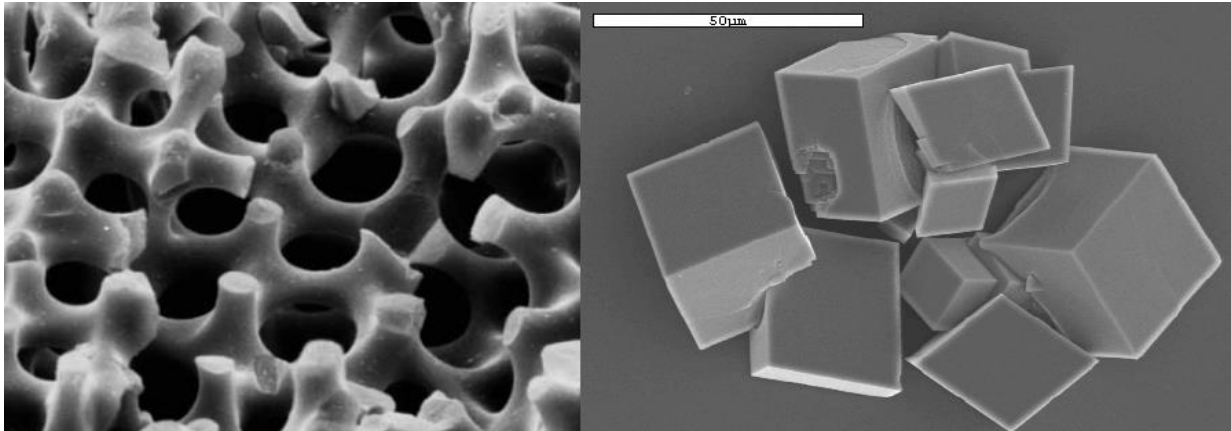
localisation du dépôt, la morphologie et la taille du minéral. Cela permet la production de minéraux très sophistiqués, avec une forme précise et reproductible, constitués d'un ou de plusieurs types de cristaux. Un exemple est la création des coquilles chez les mollusques. Ces fonctions de contrôle peuvent être extra, inter ou intracellulaire :

- Dans le cas du contrôle extracellulaire, les cellules sécrètent une matrice extracellulaire qui est la base sur laquelle se fait la cristallisation. Puis les cellules augmentent, de façon directe ou indirecte, la concentration en cations pour induire la minéralisation de la matrice. C'est, par exemple, le cas de la production d'os chez les vertébrés.
- Le cas du contrôle intercellulaire n'est pas très fréquent. On le retrouve dans des colonies d'individus unicellulaires. La nucléation se fait entre les cellules mais de façon contrôlée. C'est, par exemple, le cas des coraux.
- Dans le cas du contrôle intracellulaire, la nucléation se fait dans la cellule, directement dans des vésicules ou des vacuoles. Cela permet à la cellule de construire des cristaux uniques dans des conditions totalement contrôlées. Une fois que le cristal est formé, la cellule va l'excréter. Ils seront ensuite assemblés à l'extérieur pour former des structures plus complexes. Cela peut donner des structures importantes. Par exemple, cette stratégie est utilisée par les *Echinodermas* (oursins) pour produire leurs spicules, faisant jusqu'à plusieurs centimètres de long. Les vésicules peuvent aussi rester dans la cellule. C'est le cas des magnétosomes bactériens.

Lors de la biominéralisation, il peut y avoir une grande diversité de cristaux formés. Pour chaque association d'ions possibles, le contrôle biologique permet la production de différents cristaux dont la structure tridimensionnelle est plus complexe (Fig. I.5). Cela est dû aux différents isotopes utilisés, à la matière organique incluse dans le matériau, aux éléments traces présents et à la structure lors de la cristallisation. Au moins 64 minéraux peuvent être produits par différents taxons du monde biologique.

Il existe des exemples de biominéralisation dans tous les domaines du vivant. Chez les *Procaroyotes*, on retrouve des exemples chez les *Eubactéries* ou bactéries. *Magnetospirillum magnetotacticum* est une bactérie capable de produire des monocristaux de magnétite ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) intracellulaires (20). Il s'agit de la première bactérie magnétotactique décrite. Plusieurs de ces cristaux s'alignent dans la cellule pour former un organe, le magnétosome (Fig. I.6A). Sa fonction est de permettre à la bactérie de toujours suivre un axe fixe, puisque le magnétosome

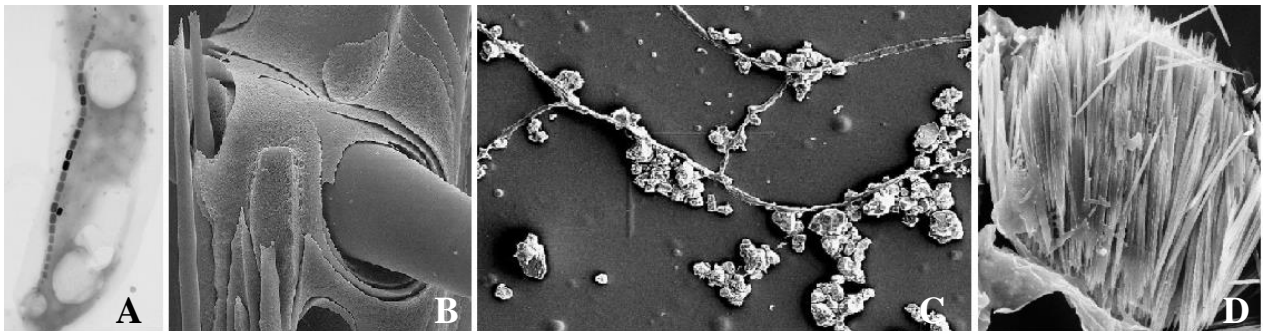
s'aligne avec le champ magnétique terrestre. Il s'agit là d'une biominéralisation intracellulaire contrôlée.



A droite, calcite minéralogique et à gauche calcite provenant d'*Echinoderma* (embranchement des étoiles de mer).

Figure I.5 : Comparaison de cristaux de calcite. (19)

Il n'existe pas d'exemple connu de biominéralisation chez les *Archéobactéries*. Cela peut s'expliquer par leur découverte plus récente et le peu d'informations dont on dispose à leur sujet, en comparaison avec les bactéries.



A : magnétosome (noir) dans une bactérie (19). B : squelette en silice d'un *Radiozoa* (21). C : hyphes de *Cephalotrichum* recouverts de calcite (22). D : cristaux d'oxalate de calcium monohydraté dans le cytoplasme d'une *Psychotria* (13).

Figure I.6 : Exemples de biominéralisation.

On retrouve aussi des exemples de biominéralisation chez les *Eucaryotes*. On observe de très nombreux types de cristaux produit par les *Protistes*. Par exemple, les organismes du sous-embanchement des *Radiozoa* produisent un squelette intracellulaire à base de silice ( $\text{SiO}_2$ ) (Fig. I.6B) (21). Il s'agit là d'une biominéralisation intracellulaire contrôlée. Il y a aussi des exemples de biocicatrisation chez les champignons comme chez les organismes de *Cephalotrichum* (22). Ils sont capables de produire de la calcite, un cristal de carbonate de

calcium, sur leurs hyphes (Fig. I.6C). Il s'agit là d'un exemple de biominéralisation induite. Chez les plantes, les individus du genre *Psychotria* sont capables de produire des cristaux d'oxalate de calcium monohydrate ( $\text{CaC}_2\text{O}_4$ ) dans leur cytoplasme (Fig. I.3D) (19). On retrouve beaucoup d'exemples d'organismes capables de biominéralisation dans le clade des *Métazoaires*. Par exemple, *Sycon raphanus* (8), est un organisme appartenant à l'embranchement des *Porifera* (éponges). Il est capable de produire des spicules de calcite. Un exemple, beaucoup plus connu, est la production de phosphate de calcium par les ostéoblastes chez les vertébrés, dont l'Homme, pour produire des os. Il s'agit là d'une biominéralisation extracellulaire contrôlée, utilisant une matrice extracellulaire en cartilage.

La présence de la biominéralisation dans tous les domaines du vivant montre qu'il s'agit d'une évolution convergente ubiquitaire. La biominéralisation permet un gain de fonctions qui représente un avantage évolutif. Cela nous renseigne sur l'importance de la biominéralisation dans le vivant et de l'usage des minéraux biosourcés pour les différentes formes de vie.

### 1.2.2 Le règne des micro-organismes

Le règne des micro-organismes représente la plus grande proportion du monde des organismes vivants, autant en nombre d'individus qu'en biomasse totale. Il tient une place importante dans tous les cycles géochimiques et écologiques. Les micro-organismes sont retrouvés dans tous les environnements. Leur petite taille leur permet d'occuper des niches écologiques inaccessibles aux macro-organismes, tels que les plantes ou les métazoaires.

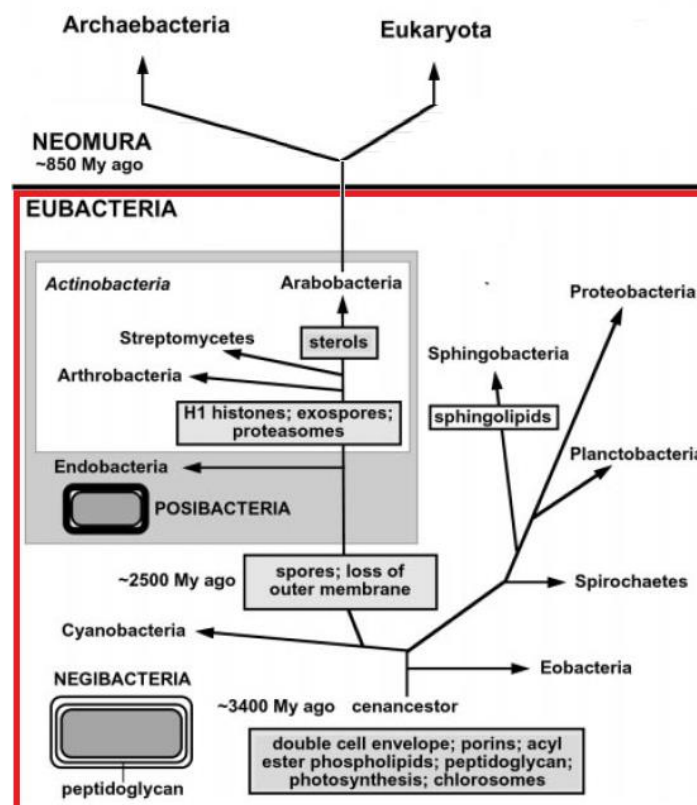
Les micro-organismes sont classés dans un groupe polyphylétique constitué des *Eubacteria* ou bactéries, des *Archeobacteria* ou archéobactéries, des *Fungi* ou champignons et des *Protistes*. Ce groupe est défini majoritairement par un caractère commun : une taille référencée en  $\mu\text{m}$ . Cependant, il existe beaucoup d'exceptions à cette règle rendant la définition de ce groupe complexe. Certaines bactéries, des myxomycètes, forment un plasmode, une fusion de la colonie en une seule cellule, qui peut atteindre des tailles de l'ordre du centimètre (23).

Comme présenté précédemment, on retrouve des exemples de biominéralisation dans tous ces groupes, sauf chez les archéobactéries, actuellement. Les organismes les plus adaptés pour la biominéralisation sont les bactéries. Elles sont caractérisées par une grande diversité d'espèces et de physiologies, leur temps de génération est faible et le risque de contamination aéroporté est



peu important. Par conséquent, nous nous intéressons aux bactéries et à leur implication dans la biominéralisation.

Le taxon des *Eubacteria* comporte les premiers organismes découverts. La première forme de vie qui a pu être datée est un stromatolithe de 3,4 milliards d'années (18). Un article de *Nature* de 2016 (24) datait la première trace de vie connue à 3,7 milliards d'années mais cet article a été remis en question en 2018 (25). Le taxon appartient au domaine des procaryotes (Fig. I.7). Un des caractères des membres de ce groupe est de ne pas posséder de noyau pour compartimenter leur matériel génétique. La classification proposée par Cavalier-Smith (26) utilise les bactéries pour enraceriner l'arbre phylogénique de la vie car ce sont les premiers organismes, dont on a retrouvé des traces actuellement. Il a utilisé, en partie, la perte de membrane, un évènement rare, pour élaborer cette histoire évolutive.



Le cadre rouge encadre le taxon des bactéries.

Figure I.7 : Classification des bactéries selon T. Cavalier-Smith. (26)

Les bactéries sont, pour la plupart, des organismes unicellulaires. Chaque organisme est représenté par une cellule, renfermant toutes les fonctions nécessaires à sa survie et délimitée par l'enveloppe cellulaire bactérienne. L'enveloppe bactérienne (Fig. I.8) est la frontière entre le cytoplasme et l'environnement extracellulaire. Elle est constituée d'une ou de deux

membranes plasmiques, d'une paroi en peptidoglycane et du périplasma, un espace entre la paroi et la membrane cytoplasmique.

De façon simplifiée, on peut diviser les bactéries en deux grandes catégories, basées sur la différence de composition chimique de l'enveloppe cellulaire (Fig. I.8). Elle est constituée de deux ou trois couches en fonction des groupes, en fonction de leur coloration de Gram (27).

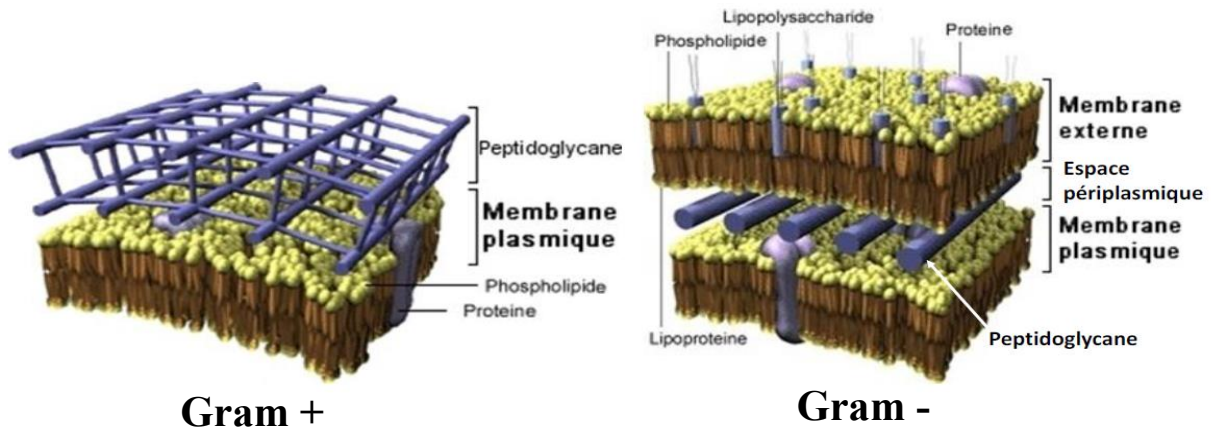


Figure I.8 : Schématisation de l'enveloppe bactérienne. (27)

La coloration de Gram se fait en trois étapes successives : une première coloration au cristal violet, une décoloration à l'éthanol et une contre coloration, souvent à la fuchsine.

Dans le cas des bactéries à coloration de Gram négative, l'enveloppe ne retient pas le cristal violet lors de l'étape de décoloration à l'éthanol. Les cellules sont donc colorées par le colorant utilisé lors de la contre-coloration, en rose dans le cas de la fuchsine. Phylogéniquement, ces bactéries sont retrouvées majoritairement dans l'embranchement des *Négibacteries*. Ce groupe possède une enveloppe formée de trois couches : deux membranes et une paroi. La structure basale, délimitant le cytoplasme, est la membrane plasmique composée de différents lipides et protéines insérés dans une bicouche phospholipidique. Au-dessus, séparé par un espace : le périplasma, une paroi fine formée de peptidoglycane rigide maintient la forme de la cellule. La couche superficielle est une autre membrane formée d'une bicouche phospholipidique, de protéines, de lipides et de lipopolysaccharides (LPS). L'organisme type de ce phylum est *Escherichia coli*, une bactérie retrouvée dans le tube digestif humain.

Le deuxième groupe est composé des bactéries à coloration de Gram positive. Leur enveloppe retient le cristal violet lors de l'étape de décoloration et la cellule se teinte en violet. Phylogéniquement, ces organismes sont majoritairement retrouvés dans l'embranchement des *Posibacteries*. Ce groupe possède une enveloppe formée de deux couches : une membrane et

une paroi. La membrane est une membrane plasmique de composition similaire à celle des bactéries à coloration de Gram négative. Au-dessus, une paroi plus épaisse formée de peptidoglycane rigide assure une résistance mécanique plus importante. L'organisme type de ce phylum est *Bacillus subtilis*, une bactérie aussi retrouvée dans le tube digestif humain.

Les micro-organismes ont une grande diversité autant en termes d'espèces, de fonctionnements et de biominéraux produits. Leur faible taille de l'ordre du  $\mu\text{m}$  permet la colonisation de niches écologiques exclusives. Les bactéries ont, en plus, l'avantage d'avoir un temps de génération très court, vingt minutes pour *E. coli* par exemple.

### 1.2.3 Le carbonate de calcium, produit issu de la biominéralisation

Les bactéries sont capables, comme les autres taxons, d'utiliser les différents ions présents dans leur environnement pour produire différents cristaux. Le calcium est le cation le plus utilisé dans les exemples de biominéralisation connus. La moitié des minéraux obtenus par action biologique en contient (19). Cette prédominance est due au rôle biologique central de ce métal alcalin ainsi que de son abondance, c'est le cinquième élément le plus abondant de la croûte terrestre. Parmi les minéraux produits à partir du calcium, le carbonate de calcium est le plus abondant ; ce qui en fait le solide ionique biosourcé le plus produit, aussi bien en quantité qu'en répartition dans le monde du vivant.

La formation du carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) est une réaction chimique dépendante de la concentration en calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), en carbonate ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) et de leur solubilité. Cela donne une variable liée à ces concentrations : la valeur de saturation ( $\Omega$ ) (28).

$$\Omega = \frac{[\text{Ca}^{2+}] \cdot [\text{CO}_3^{2-}]}{K_{sp \text{ CaCO}_3}}$$

$K_{sp \text{ CaCO}_3}$  = constante de solubilité du carbonate de calcium à 25°C, égale à  $2,8 \cdot 10^{-9}$ .

La présence de carbonate est directement liée à la cinétique de réaction de production de carbonate de calcium. La quantité et la disponibilité de ce composé sont très dépendantes du pH du milieu (29). Le carbonate appartient à une structure acide-base. Il est l'espèce basique du couple carbonate - bicarbonate qui est lui-même l'espèce basique du couple bicarbonate -

acide carbonique. L'acide carbonique quant à lui, provient de la dissolution du CO<sub>2</sub> atmosphérique dans l'eau, si le pH est supérieur à 2,84 (Fig. I.9). Plus le pH augmente et plus la réaction va vers la production de carbonate, qui survient au-dessus d'un pH de 10,33 (30).

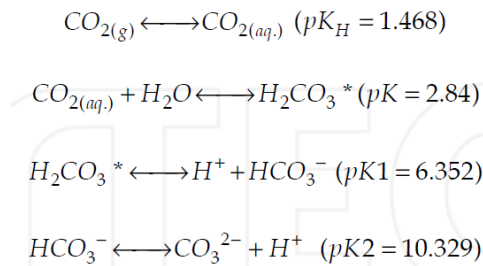


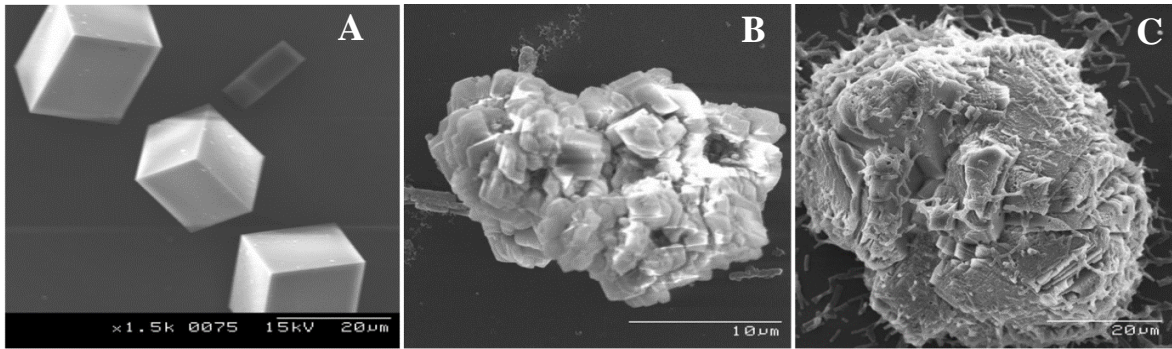
Figure I.9 : Réaction de production du carbonate en fonction du pH.(30)

Le carbonate de calcium (31), une fois formé peut soit s'agglomérer sans structure périodique sous forme amorphe, soit, dans les bonnes conditions, cristalliser. Il existe trois formes cristallines constituées de carbonate de calcium pur : la calcite, l'aragonite et la vatérite.

- La calcite est la forme la plus abondante et la plus stable dans les conditions de surface terrestre.
- L'aragonite est peu présente dans le sol car elle y est recristallisée en calcite, plus stable. Elle est la forme la plus retrouvée dans les coquilles des mollusques, où l'action biologique permet l'enrichissement de cette forme cristalline.
- La vatérite est aussi retrouvée dans les coquilles des mollusques mais peu dans le sol. Cependant, elle peut être produite en laboratoire par des micro-organismes du sol dans des milieux de culture liquides ou solides (31).

La forme cristalline du carbonate de calcium la plus intéressante, dans le cas de la biocicatrisation, est la calcite. Il s'agit du cristal le plus stable, dans les conditions considérées. Le carbonate de calcium néoformé pourrait cristalliser sous forme de vatérite au départ mais ce cristal finira par devenir de la calcite plus stable. L'évaluation de la réparation des fissures dans les matériaux cimentaires se fait sur le long terme pour concurrencer l'usage des résines synthétiques. Il est donc plus intéressant de se concentrer sur l'étude de la calcite et de considérer ce cristal comme le produit de réparation envisagé.

La biominéralisation de la calcite dépend par conséquent, de quatre facteurs : de la présence de carbone inorganique dissous, de la présence d'ions calcium libres, du pH du milieu et des sites de nucléation. Des bactéries peuvent agir sur quelques, ou tous ces facteurs, pour induire une cristallisation du carbonate de calcium en biocalcite. Il y a une différence morphologique entre de la calcite abiotique et de la calcite biosourcée comme on peut le voir dans la figure I.10. (32)



Observation au microscope électronique à balayage de A : calcite non biosourcée ; B-C : calcite biosourcée.

*Figure I.10 : Calcite biosourcée ou non. (32)*

La calcite naturelle a une structure rhomboïde plus reproductible (Fig.I.10A). La calcite biogénérée a une forme dépendante du micro-organisme qui a conduit à sa production et de la structure spatiale de la population microbienne (Fig.I.10B). La figure I.10C montre des bactéries à la surface du minéral ou des traces de leur présence dans le minéral. Il s'agit d'un marqueur direct permettant de déterminer la nature biologique d'un cristal de calcite. La production de calcite extracellulaire, produit par des bactéries se fait par l'intermédiaire du métabolisme bactérien et de l'enveloppe cellulaire.

#### **1.2.4 Différentes voies métaboliques conduisant à la biominéralisation du carbonate de calcium**

La biominéralisation du carbonate de calcium est en partie dépendante du métabolisme cellulaire. Dans ce cas, cette production ne se fait pas de façon directe. Elle est produite indirectement, en étant une conséquence d'un autre processus. Chez les bactéries, il y a six voies connues conduisant à la biominéralisation de carbonate de calcium.

##### ***1.2.4.1 Le cycle de l'azote***

La production de carbonate de calcium est une conséquence indirecte de l'utilisation de l'azote comme source d'électrons ou d'azote.

##### ***La voie uréolytique***

Il s'agit de la voie la plus étudiée et utilisée pour la biominéralisation en laboratoire. Elle a le meilleur rendement de production de carbonate de calcium, parmi les voies actuellement

connues. Les organismes utilisant cette voie sont capables de produire de l'uréase (28), un enzyme capable d'hydrolyser l'urée. Les bactéries possédant cet enzyme peuvent utiliser l'urée comme source d'azote et, indirectement, peuvent produire du carbonate de calcium (Fig. I.11).

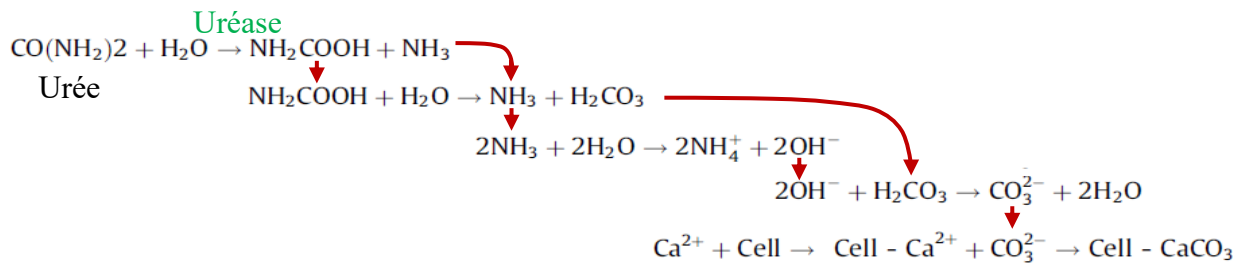


Figure I.11 : Réaction de production de carbonate de calcium uréolytique. (28)

La dégradation de l'urée produit du carbamate et de l'ammoniaque. Puis le carbamate est hydrolysé en ammoniaque et en acide carbonique. Les molécules d'ammoniaque produites augmentent le pH, ce qui a pour effet de transformer l'acide carbonique en ions carbonate. En parallèle, les ions calcium libres dans le milieu sont sur-concentrés au voisinage de l'enveloppe cellulaire des bactéries, chargée négativement, par des interactions ioniques. Les ions calcium et les ions carbonate réagissent pour former du carbonate de calcium qui précipite et qui peut cristalliser avec un site de nucléation adapté.

L'avantage de cette voie est qu'elle apporte une source d'acide carbonique et joue aussi sur l'augmentation du pH. Cela modifie l'équilibre acide / base et conduit à la production d'ions carbonate grâce à l'acide carbonique produit et celui présent dans le milieu, venant de la réaction entre le CO<sub>2</sub> atmosphérique et l'eau.

Cette voie est réalisée par de nombreuses souches bactériennes, telles que, *Sporosarcina pasteurii*, anciennement nommée *Bacillus pasteurii* (28,32–36), *B. sphaericus* (22), *B. megaterium* (22), *Aerobacter aerogenes*, *B. megaterium*, *B. subtilis* (10), *B. thuringiensis*, *Denitrobacillus halophila*, *Halomonas eurihalina*, *Helicobacter pylori*, *Kocuria flava* CR1, *Methylocystis parvum*, *Myxococcus xanthus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas denitrificans*, *Spolactobacillus* sp., *Sporosarcina ginsengisoli* et *Sporosarcina pasteurii* (12).

Il y a donc une grande diversité d'espèces bactériennes capables de produire du carbonate de calcium en dégradant de l'urée. Cette voie a été utilisée par Anbu et al. (2016) (37) pour augmenter le potentiel de bioconsolidation d'un sol en fournissant aux bactéries indigènes de l'urée et du calcium à 15°C. Les résultats obtenus ont montré une augmentation de la production de carbonate de calcium de 1,37 fois par rapport à un échantillon sans apport d'urée.

### Dénitrification

Dans cette voie métabolique (22), des bactéries anaérobies ou anoxique vont oxyder de la matière organique en  $\text{CO}_2$  en réduisant un composé azoté servant d'accepteur terminal d'électrons. Le  $\text{CO}_2$  produit réagit avec l'eau pour former de l'acide carbonique (Fig. I.12). Si le pH est au-dessus de 10,3, cela produit des ions carbonate, pouvant réagir avec le calcium.

L'avantage de cette voie est de pouvoir fonctionner en absence de dioxygène à condition d'être en présence de composés azotés. Cependant, il n'y aura aucune production de carbonate de calcium si le pH n'est pas alcalin. Ce mécanisme est réalisé, entre autres, par des bactéries du genre *Pseudomonas*, *Thiobacillus*, *Denitrobacillus*, *Alcaligenes*, *Micrococcus* et *Diaphorobacter* (22).

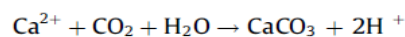
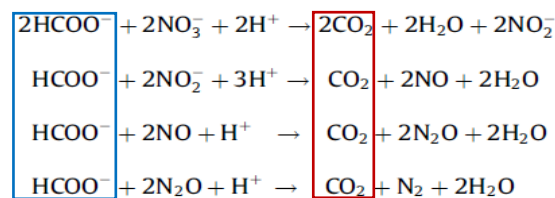


Figure I.12 : Réaction de production de carbonate de calcium par dénitrification. (28)

#### 1.2.4.2 Le cycle du soufre

Cette voie métabolique, basée sur le cycle du soufre, peut produire du carbonate de calcium avec deux types de mécanisme (22) (Fig. I.13) :

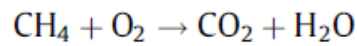
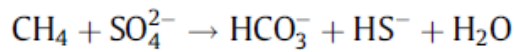
- ① La dissolution abiotique du gypse ( $\text{CaSO}_4, 4 \text{H}_2\text{O}$ ) crée un environnement riche en ions calcium et ions sulfate (Fig. I.13A). En anaérobie, des bactéries utilisent les ions sulfate comme accepteur terminal d'électrons. La réduction des ions sulfate en sulfure d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{S}$ ) se fait grâce à l'oxydation de la matière organique en ions bicarbonate et en  $\text{CO}_2$ . Le  $\text{CO}_2$  se dissout dans l'eau et forme de l'acide carbonique. Le  $\text{H}_2\text{S}$ , sous forme gazeuse, sort de l'environnement de la bactérie, ce qui induit une augmentation du pH. Cela permet la transformation de l'acide carbonique en ions bicarbonate puis en ions carbonate. L'avantage de cette voie est le fonctionnement en anaérobie, la production d'ions bicarbonate, l'augmentation du pH et la présence d'ions calcium.
- ② Un autre procédé utilisé est la réduction du sulfate de calcium en sulfite de calcium (Fig. I.13B). Cela conduit, en réagissant avec de l'eau, à la production de carbonate de calcium et







L'avantage de cette voie est qu'elle produit des ions bicarbonate ou du CO<sub>2</sub>. Cependant, elle n'augmente pas le pH, il faut donc utiliser une bactérie se développant dans un milieu alcalin.



*Figure I.15 : Réaction de production de carbonate de calcium par oxydation du méthane. (28)*

Toutes ces voies métaboliques permettent, de façon indirecte, la production de CO<sub>2</sub> ou des ions bicarbonate. Avec un pH basique, induit par l'action métabolique bactérienne ou dépendant de l'environnement, ces deux composés deviennent des ions carbonate. Pour obtenir du carbonate de calcium, il faut ajouter au milieu du calcium libre et une surconcentration locale des deux composés. Le carbonate est largué dans l'environnement proche de la cellule bactérienne. Les ions calcium sont maintenus dans cette zone en étant liés à l'enveloppe bactérienne ou au biofilm. Ces structures ont donc une grande importance dans la production finale du carbonate de calcium et sa cristallisation sous forme de calcite.

### **1.2.5 Effet de l'enveloppe bactérienne et du biofilm sur la cristallisation de la calcite**

Pour assurer la production de calcite, la cellule bactérienne doit, en premier lieu, réunir dans une même zone du carbonate et du calcium. La structure universelle apte à réaliser cette fonction est l'enveloppe bactérienne.

#### ***1.2.5.1 L'enveloppe bactérienne***

Les enveloppes bactériennes sont globalement chargées négativement par des groupements phosphoryles et carboxylates. Pour les bactéries à coloration de Gram négative, leurs membranes externes comportent, entre autres, des phospholipides et des lipopolysaccharides chargés négativement. Pour les bactéries à coloration de Gram positive, la partie externe de leur enveloppe, la paroi, est constituée d'un épais peptidoglycane. Celle-ci comporte, entre autres, des acides N-acétylmuramiques qui contiennent de l'acide lactique. Celui-ci est chargé négativement au-dessus d'un pH de 3,86. Dans ces deux grands groupes bactériens, la partie externe de l'enveloppe est chargée négativement. Cela permet une interaction ionique avec les ions calcium, chargés positivement.

Une façon d'évaluer la charge de surface d'une cellule bactérienne est d'utiliser le potentiel Zêta (30). Cette valeur est estimée grâce à la mobilité des éléments chargés présents à la surface de la cellule bactérienne lorsqu'on le soumet à un champ électrique. Etant donné que l'enveloppe est constituée de protéines et d'acides gras, comportant des groupements carboxyliques, le pH a beaucoup d'influence sur le potentiel Zêta d'une bactérie (Fig. I.16). Plus le pH est alcalin et plus la surface de la bactérie sera chargée négativement.

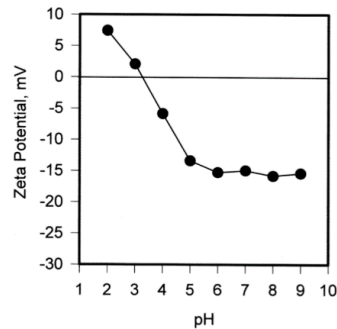
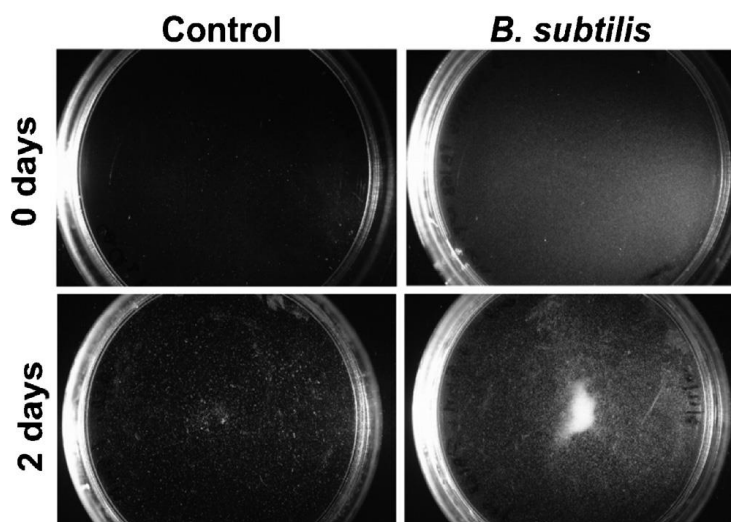


Figure I.16 : Evolution du potentiel zêta de la surface de *Pseudomonas multocida* en fonction du pH. (30)

Cela renforce l'intérêt de se placer en milieu alcalin dans la production de calcite puisqu'il agit sur la production d'ions carbonate et sur la surconcentration en ions calcium.

Une étude de 2014 (11) montre, chez *Bacillus subtilis*, que l'ajout de bactéries mortes ou uniquement de leurs enveloppes bactériennes fragmentées permet la nucléation de la calcite en laboratoire (Fig. I.17). Le calcium est fourni par du chlorure de calcium et le carbonate par du carbonate d'ammonium.



Le précipité blanc est de la calcite. Le cas contrôle est sans bactérie. Le cas *B. subtilis* est réalisé avec  $10^8$  bactéries/ mL tuées par choc thermique.

Figure I.17 : Précipitation de calcite sur deux jours. (11)

Cela confirme le rôle de l'enveloppe bactérienne dans la production de calcite dans l'environnement proche de la cellule bactérienne. Elle assure donc un lieu de surconcentration de calcium mais aussi un site de nucléation pour lancer la cristallisation de la calcite. Une autre structure microbienne assure ce rôle dans un environnement plus large : le milieu intercellulaire.

### 1.2.5.2 La matrice extracellulaire du biofilm

Un biofilm (38) est une structure bactérienne complexe formée de cellules prises dans une matrice extracellulaire. Les cellules peuvent appartenir à une seule espèce ou à plusieurs espèces bactériennes différentes. Il s'agit d'une forme de résistance de la population bactérienne aux conditions environnementales. Un biofilm se forme en quatre étapes successives (Fig. I.18). Une phase d'adhésion cellulaire réversible qui devient irréversible, puis les cellules bactériennes prolifèrent en micro-colonies conduisant à la production de polymères extracellulaires. Leur développement sous forme d'une monocouche de surface fait suite à un développement tridimensionnel avec des couches multiples de cellules traduisant la phase de maturation du biofilm. Lorsque le biofilm vieillit, certaines cellules bactériennes reviennent à l'état de libre circulation et peuvent ainsi coloniser d'autres surfaces.

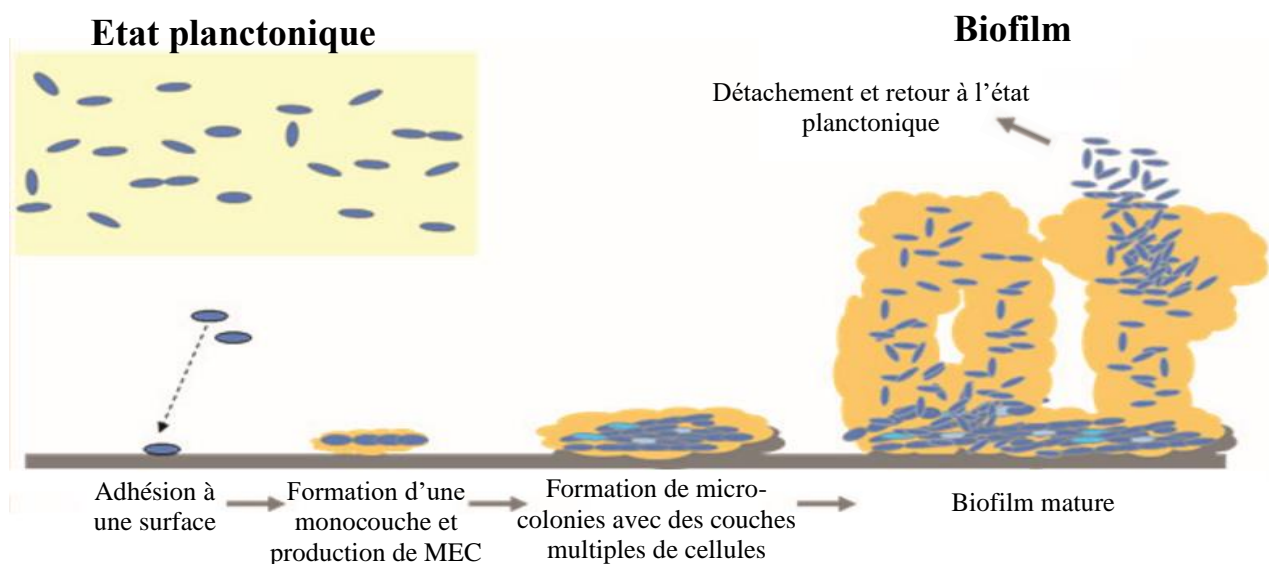


Figure I.18 : Les différentes phases de formation d'un biofilm. (38)

MEC = matrice extra cellulaire.

Le biofilm contient jusqu'à 97% d'eau, 2-5% de cellules, 1-6% de matrice extracellulaire (MEC) et des ions (32). La MEC, autrement nommée EPS : Substance Extracellulaire Polymérique, est une structure complexe dont la composition est variable entre les différents biofilms. Elle contient (34) :

- 40-95% de polysaccharides, qui permettent l'adhésion au support, l'agrégation des cellules, la rétention d'eau, l'absorption de composants, le stockage de nutriments, le maintien des enzymes et la protection contre les agressions extérieures biotiques ou abiotiques.
- 1-60% de protéines, qui permettent l'adhésion au support, l'agrégation des cellules, la rétention d'eau, l'absorption de composants, l'apport d'électrons, le maintien des enzymes et la protection contre les agressions extérieures biotiques ou abiotiques.
- 1-10% d'acides nucléiques, qui permettent l'adhésion au support, l'agrégation des cellules, le stockage de nutriments, l'échange d'informations génétiques et de composants cellulaires.
- 1-10% de lipides, qui permettent l'échange de composants cellulaires.
- Des acides humiques, qui permettent l'adhésion au support et servent de donneurs ou d'accepteurs d'électrons.

Tous ces éléments ont un impact sur la biominéralisation. Szcześ et *al.* (2018) (35) ont montré que la MEC de *Rhodococcus opacus* est capable de retenir les ions calcium de son environnement. La figure I.19 montre que l'augmentation de la concentration d'ions calcium dans le milieu augmente le potentiel Zêta, et donc la charge de la MEC de cette bactérie après lavage.

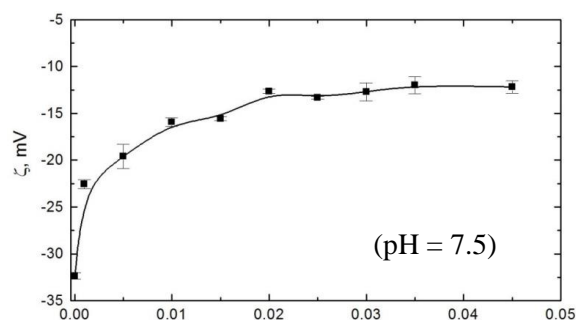


Figure I.19 : Potentiel Zêta de la MEC de *Rhodococcus opacus* en fonction de la concentration en ions calcium ajoutés. (35)

De plus, cette étude montre que l'augmentation de la quantité de MEC ajoutée, pour une quantité de calcium constante, réduit la taille des cristaux de carbonate de calcium et augmente leur nombre. Les biopolymères présents dans la matrice extracellulaire servent donc aussi bien

de site de nucléation pour le carbonate de calcium que de structure de rétention de calcium. Ces deux conditions favorisent la production de calcite extracellulaire.

### **1.2.6 Les bactéries biominéralisantes utilisées en laboratoire**

Plusieurs voies métaboliques permettent la production, directe ou indirecte, de carbonate de calcium. Cela permet d'utiliser un panel important de bactéries provenant de niches écologiques différentes. Une seule caractéristique est essentielle : supporter un pH basique, supérieur à 9. Il s'agit du pH d'un béton carbonaté. De plus, les réactions des couples acide / base de l'acide carbonique / bicarbonate / carbonate nécessitent un pH basique pour tendre vers la production de carbonate. La forme basique des acides organiques ( $\text{COO}^-$ ) est chargée négativement. Ce groupement chimique est retrouvé dans tous les polymères biologiques, formant la structure des cellules (protéines, acides gras, glucides et acide désoxyribonucléique). Cette charge négative est nécessaire pour permettre la surconcentration en ions calcium. Ces deux points permettent la production et la cristallisation du carbonate de calcium. En dehors de ce point central, la physiologie des bactéries utilisées peut être très différente.

*Sporosarcina pasteurii* (39) est la bactérie la plus utilisée pour la biominéralisation en laboratoire. Cet organisme a été isolé d'un échantillon de sol, qui correspond à un milieu dont des conditions d'hygroscopie, de température et de source de nutriments sont variables.

*Bacillus subtilis* (11) est aussi utilisé pour produire du carbonate de calcium en laboratoire. Cet organisme a été isolé à partir d'échantillons provenant du tube digestif de mammifères. Cela signifie qu'il vient d'un milieu avec des conditions d'hygroscopie, de température, de pH et de source de nutriments globalement fixes.

Ces deux organismes proviennent de niches écologiques très différentes mais permettent toutes les deux de produire du carbonate de calcium en laboratoire.

La figure I.20 regroupe des données issues de 70 publications scientifiques traitant de la biominéralisation de carbonate de calcium en laboratoire de 1999 à 2021. Cette figure présente les différentes bactéries utilisées ainsi que leur pourcentage d'occurrence dans l'ensemble de ces 70 publications (11,36,39–95).

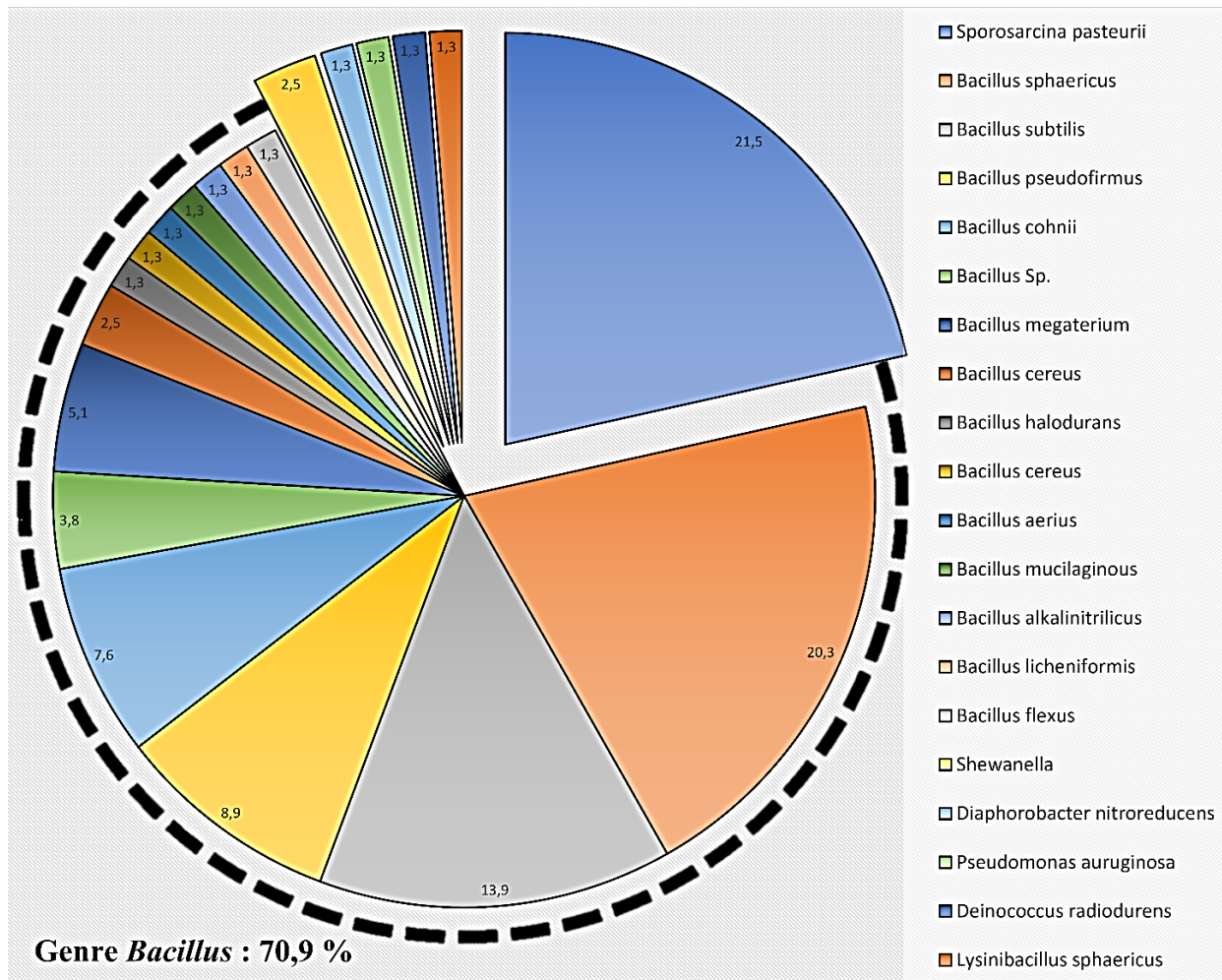


Figure I.20 : Répartition en pourcentage de l'utilisation des différentes bactéries biominéralisantes en laboratoire de 1999 à 2021. (11, 36, 39-95)

Cette figure montre que la majorité des micro-organismes utilisés sont du genre *Bacillus*, avec 70,9% des articles publiés sur le sujet. *Sporosarcina pasteurii* ne fait pas partie de ce genre mais a été rattaché au genre *Bacillus* jusqu'en 2001 (96), où il a été reclassifié dans le genre *Sporosarcina*. Ce qui signifie que cette espèce bactérienne a des caractéristiques proches de celles du genre *Bacillus*. Le choix prépondérant, pour la biominéralisation, de ces deux genres *Bacillus* et *Sporosarcina*, vient du fait qu'ils appartiennent à l'embranchement des *Firmicutes*. Un des caractères des organismes de cet embranchement est la capacité de sporulation. Les spores sont une forme de résistance bactérienne. L'enveloppe bactérienne s'épaissit et les processus physiologiques sont stoppés en attente de conditions plus favorables. Cela permet aux cellules de survivre au manque d'eau ou de nutriments. La capacité de sporulation est importante pour la survie de bactéries au sein de matériaux cimentaires. Cette survie permet d'utiliser des bactéries biominéralisantes pour la réparation biologique de fissures dans un béton : la biocicatrisation.



## 1.3 Techniques de réparation biologiques

### 1.3.1 La biocicatrisation, généralités

Le premier article (65) qui présente une solution de réparation biologique, date de 2001. Cette équipe a travaillé avec *Sporosarcina pasteurii* (anciennement appelée *Bacillus pasteurii*) et *Pseudomonas aeruginosa* : des bactéries uréolytiques respectivement à coloration de Gram positive et négative. Deux stratégies différentes ont été utilisées : l'ajout de la suspension bactérienne directement dans la pâte cimentaire, et le comblement d'une fissure avec un mélange de bactéries et de sable pour réparer une fissure. Ces essais ont été effectués à partir de cubes de mortier fissurés. Les fissures ont été comblées avec du sable et des bactéries puis les éprouvettes sont ensuite placées dans une eau contenant de l'urée durant 28 jours. Après 28 jours, la résistance à la compression des mortiers traités par des suspensions de cellules bactériennes est supérieure à celle du mortier témoin (Fig. I.21).

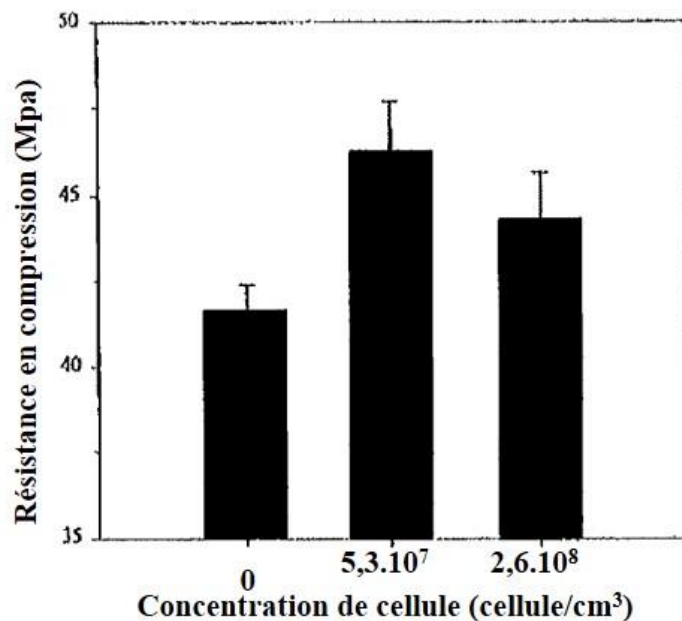


Figure I.21 : Effet d'un comblement de fissures dans un mortier avec différentes concentrations de cellules bactériennes *S. pasteurii* durant 27 jours sur la résistance en compression. (65)

Un autre micro-organisme a montré des résultats intéressants pour l'amélioration de la résistance à la compression d'un mortier : une bactérie du genre *Shewanella*. Il a été démontré que l'ajout de  $10^5$  cellules par mL dans un mortier pouvait augmenter sa résistance en compression de 25% en vingt-huit jours (44). Cependant, l'usage de ces micro-organismes a été abandonné à cause de leur faible durée de vie dans un béton, qui est de cinq à six jours, et de leur caractère pathogène pour l'être humain (28).

Par la suite, la majorité des études se sont concentrées sur les bactéries uréolytiques. Les bactéries de l'embranchement des *Firmicutes* à coloration de Gram positive, du genre *Bacillus* uréolytiques (44) et *S. pasteurii* sont majoritairement étudiées. Cela est dû à leur production d'uréase, leur capacité de sporulation et leur caractère alcalinophile. Le nombre de publication sur « *concrete healing* » augmente (97) depuis 2001, avec une accélération de cette augmentation à partir de 2005 (Fig. I.22.)

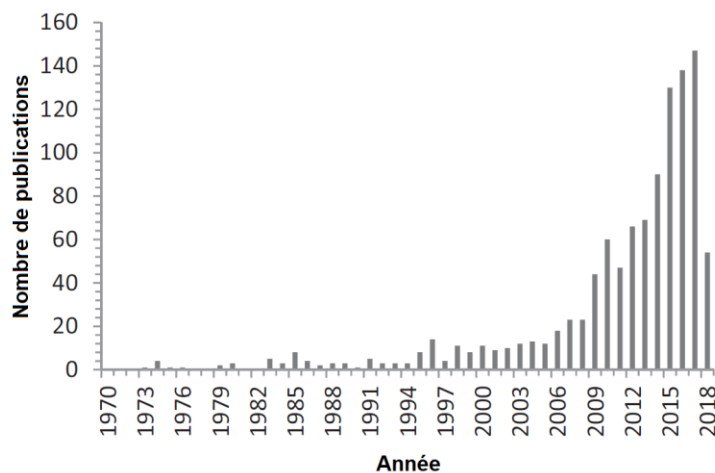


Figure I.22 : Nombre de publication sur « *concrete healing* ». (97)

Les deux stratégies de biocicatrisation existent : l'ajout des cellules bactériennes directement dans la pâte cimentaire et le comblement d'une fissure avec un fluide chargé en bactéries. Elles ont été développées lors de la première étude sur la biocicatrisation et ont depuis été reprises et améliorées (65). Ces deux grandes stratégies pour effectuer des réparations biologiques se nomment l'autobiocicatrisation et l'exobiocicatrisation.

### 1.3.2 L'inclusion de bactéries dans le béton : l'autobiocicatrisation

Une solution expérimentée pour réparer ou prévenir l'apparition de fissures est l'incorporation de bactéries et de nutriments dans un matériau cimentaire. L'autobiocicatrisation vise à incorporer des agents biologiques lors de la fabrication du béton. Ces derniers s'activeront en cas de fissuration et de contact avec le milieu extérieur. L'avantage de cette technique est de traiter des fissures inaccessibles pour un opérateur extérieur et de réduire les coûts de maintenance.



Il y a deux méthodes d'incorporation des agents biologiques dans un matériau cimentaire :

- l'incorporation directe.
- l'incorporation d'agents biologiques encapsulés.

Différentes évaluations permettent de quantifier les effets des biotraitements. Il s'agit de la résistance en compression (tableau I.2), la réparation de fissure (tableau I.3) et l'absorption d'eau par un matériau cimentaire (tableau I.4).

Tableau I.2 : Evaluation du gain de résistance en compression par des techniques de biocicatrisation.

Bactéries testées	Applications	Résistance en compression	Références
<i>Sporosarcina pasteurii</i>		↑ de 10% (28 jours)	(98)
		↑ de 22% (28 jours)	(99)
		↑ 61% (28 jours)	(65)
		↓	(100)
<i>Bacillus subtilis</i>		↑ 27% (27 jours)	(101)
		↑ 30% (eau cure) ou 10% (béton)	(102)
<i>Bacillus sp.</i>		↑ 65 %	(91)
		↑ 36% (28 jours)	(103)
<i>Bacillus sphaericus</i>	Incorporation directe	↑ 50% (cure 96 h avec des bactéries)	(104)
		↑ à 7 jours : 57% (mortier) 34% (béton) ↑ à 28 jours : 23% (mortier) 36% (béton)	(105)
		↓ 68% (27 jours)	(106)
		↑ 24%	(107)
<i>Bacillus megaterium</i>		↑ 12% (28 jours)	
<i>Bacillus licheniformis</i>		↑ 16% (28 jours)	(108)
<i>Bacillus flexus</i> BSKNAU		↑ 11% (28 jours)	
<i>Diaphorobacter nitroreducens</i>		↑ 6% (28 jours)	
<i>Pseudomonas auruginosa</i>		↓ 13% (27 jours)	(106)
Lysinibacillus sphaericus WJ-8		↑	(65)
<i>Bacillus aerius</i>		↑ 10% (28 jours)	(109)
<i>Bacillus aerius</i>		↑ 10% (28 jours)	(110)
<i>Bacillus subtilis</i>	Bentonite ou nano-particule d'oxyde de fer	↑ 45% (bentonite) et ↑ 85% (nano particule d'oxyde de fer)	(91)
<i>Bacillus sphaericus</i>	Encapsulée Gel de silicate ou du polyuréthane	↑ 5% (silicate) ou 60% (polyuréthane)	(111)
<i>Sporosarcina pasteurii</i>	Non-dit	↑ de 12% (28 jours)	(112)

Tableau I.3 : Evaluation de la réparation de fissures dans un matériau cimentaire par des techniques de biocicatrisation.

Bactéries testées	Applications	Tailles des fissures réparées	Références	
<i>Bacillus subtilis</i>	Incorporation directe	400 µm (44 jours)	(113)	
		Fermeture de 90% (27 jours)	(101)	
450 µm		(91)		
<i>Deinococcus radiodurens</i>		1500 µm	(94)	
<i>Bacillus mucilaginous</i>		400 µm	(89)	
<i>Bacillus cereus</i>		100-800 µm	(90)	
<i>Bacillus megaterium</i>		100% refermée (90 jours)		(108)
<i>Bacillus megaterium</i>				
<i>Bacillus licheniformis</i>				
<i>Bacillus flexus</i> BSKNAU				
<i>Bacillus cohnii</i>	Perlite	1240 µm	(93)	
<i>Bacillus pseudofirmus</i>		Remplissage fissure (165 jours)	(114)	
<i>Bacillus sphaericus</i> LMG 22557	Terre de diatomée	150-170 µm (28 jours)	(115)	
<i>Bacillus sphaericus</i>	Hydrogel (chitosan)	200-300 µm (70 jours)	(88)	
<i>Bacillus pseudofirmus</i>	Hydrogel (alginate de calcium)	1000 µm	(86)	
<i>Bacillus sphaericus</i> LMG 22557	Hydrogel	500 µm	(116)	
<i>Bacillus subtilis</i>	Encapsulée	Bentonite ou nano-particule d'oxide de fer	200 µm (bentonite) et 1200 µm (nano-particule d'oxide de fer)	(91)
<i>Bacillus cohnii</i>		Argile	150 µm	(68)
<i>Bacillus subtilis</i>		Fin granulats ou de gros granulats recyclés	1100 µm (fin agrégat) et 700 µm (gros agrégat recyclé)	(92)
<i>Bacillus sphaericus</i>		Biochar	400-750 µm	(87)
<i>Bacillus subtilis</i>		Nano plaques de graphite	800 µm (28 jours)	(117)
<i>Sporosarcina pasteurii</i>		Ciment de sulfo-aluminate de calcium	417 µm (28 jours)	(85)

Tableau I.4 : Evaluation de la réduction de l'absorption d'eau un matériau cimentaire fissuré après des techniques de biocicatrisation.

Bactéries testées	Applications	Absorption d'eau	Références	
<i>Sporosarcina pasteurii</i>		↓ 4 fois	(99)	
		↓ 5 fois (168 heures)	(118)	
<i>Bacillus subtilis</i>	Incorporation directe	↓ 23% (27 jours)	(101)	
<i>Bacillus Sp.</i>		↓ 50 %	(119)	
		↓ 6 fois	(103)	
<i>Bacillus pseudofirmus</i>		↓ (agrégats) 10% (20 mm), 13% (10 mm) et 23% (5 mm) (28 jours)	(120)	
<i>Bacillus alkalinitrilicus</i>		100 jours immergés : 0,46 mm pénétration	(121)	
<i>Bacillus sphaericus</i> LMG		↓ : 85% (e/c 0,5), 90% e/c 0,6 et 75% e/c 0,7	(58)	
<i>Bacillus sphaericus</i> LMG 22557	Terre de diatomée	↓	(115)	
<i>Bacillus sphaericus</i> LMG 22557	Encapsulée	Hydrogel	↓ 68%	(116)
<i>Bacillus cohnii</i>		Perlite	28 jours immergés : 0,79 mm pénétration	(122)
<i>Bacillus sphaericus</i>		↓ 65-90%	(123)	
<i>Sporosarcina pasteurii</i>	Traitement de surface	↓	(124)	
<i>Bacillus subtilis</i>		↓ 16,7% (laboratoire) et 6,8% (milieu réel)	(125)	

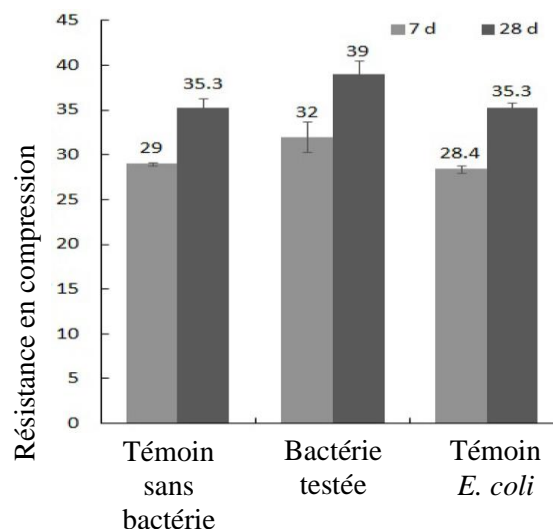
### L'incorporation directe

Les agents biologiques en dormance utilisés et les nutriments sont directement incorporés dans le béton lors du gâchage. Les spores bactériennes sont directement en contact avec le matériau cimentaire, qui contient les nutriments nécessaires à leur future croissance. De façon théorique, quand une fissure apparaît, les bactéries présentes sous forme de spores, inclusent dans le matériau, se réhydratent et les cellules bactériennes redeviennent actives. La reprise de leur activité biologique, permise par la présence de nutriments, induit la production de carbonate de calcium. Ainsi, la fissure se referme, les bactéries sont à nouveau privées d'eau et d'air, ce qui les pousse à sporuler. Cela maintient la capacité du béton à s'autoréparer.

Une étude en 2007 (43) a montré la faisabilité de cette technique en incorporant à un mortier des spores de *B. cohnii*, *B. halodurans* et *B. pseudofirmus*, et a montré une survie de ces bactéries après 10 jours, ainsi qu'une présence de cristaux de calcite après 12 jours.

Cette technique est toujours très étudiée. En 2019, Tayebani et Mostofinejad (2019) ont montré que l'ajout de spores de *B. subtilis* et *S. pasteurii* et de nutriments réduit l'absorption de l'eau et la pénétration des ions chlorure dans le béton, en plus d'augmenter sa résistance en compression et sa résistance électrique (126).

Lors de l'incorporation des cellules bactériennes au béton, leur concentration peut avoir un impact sur la résistance du béton. Une concentration trop faible ou trop forte de cellules a un impact négatif sur la résistance en compression du béton. Une étude en 2018 a permis de montrer que la concentration optimale est de  $10^5$  cellules par mL dans le cas de *B. subtilis* (42). En 2017, Jeong, et al. (45) incorpore lors du gâchage d'un béton des cellules bactériennes de *Lysinibacillus sphaericus* WJ-8, de l'urée et du lactate de calcium. Au bout de vingt-huit jours, le béton contenant les bactéries uréolytiques a une résistance en compression 10% plus importante que dans le cas du béton témoin (Fig. I.23).



Le témoin sans bactéries : béton sans bactéries.  
Le témoin *E. coli* : bactérie non uréolytique.

Figure I.23 : Résistance en compression d'un béton avec incorporation de bactéries. (45)

Les auteurs ont fait les mêmes essais avec une autre bactérie non uréolytique, *Escherichia coli*, et la résistance en compression du béton est similaire au béton témoin. Cette augmentation de résistance en compression observée est donc bien due à la capacité uréolytique de *L. sphaericus* WJ-8.

Cependant, il y a deux difficultés dans l'usage de cette technique. Il faut que les spores puissent survivre dans le matériau cimentaire assez longtemps et que l'incorporation des nutriments dans le béton n'altère pas ses capacités mécaniques. Une étude a mesuré la survie à long terme de *S.*

*pasteurii* et a démontré une survie d'environ 50% des cellules bactériennes dans un mortier au bout de 330 jours (Fig. I.24) (50). Il n'y a aucune cellule bactérienne retrouvée à trois cent trente jours lorsque les cellules bactériennes ont été incluses dans une pâte de ciment sans granulat. La présence de granulat a donc un impact sur la survie cellulaire. Toutefois, cette étude ne fait pas état de la capacité des bactéries à produire du carbonate de calcium à trois cent trente jours.

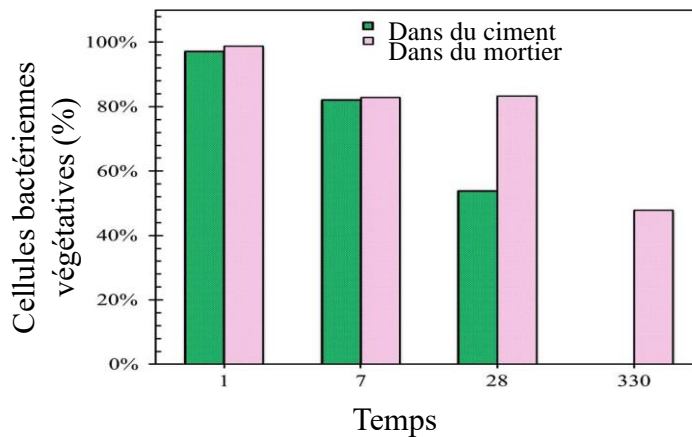


Figure I.24 : Viabilité des cellules bactériennes de *S. pasteurii* dans un mortier ou dans une pâte de ciment. (50)

Des techniques visant à réduire les désavantages de l'incorporation directe sont proposées. Une approche vise à améliorer la viabilité des cellules bactériennes dans la matrice cimentaire en augmentant la quantité de nutriments fournis (65) pour l'utilisation de granulats poreux pré-tremés dans une solution nutritive contenant des bactéries. Cela permet, en comparaison avec le même matériau cimentaire sans granulats poreux, un maintien de la totalité des spores viables sur 21 jours et une réduction de la perte de viabilité sur 49 jours.

Cependant, ces deux difficultés constituent toujours un frein à l'usage d'incorporation directe et de son usage à long terme. Cela est aussi, en partie, dû au fait qu'une autre stratégie d'autobiocicatrisation est plus utilisée et a remplacé l'incorporation directe : l'incorporation d'agents biologiques encapsulés.

#### *L'incorporation d'agents biologiques encapsulés*

Il s'agit de la solution de réparation biologique des fissures dans un matériau cimentaire la plus étudiée. Les spores bactériennes ne sont plus en contact direct avec la pâte cimentaire. Elles sont incluses dans un élément protecteur qui se cassera au moment de la fissuration (Fig. I.25). Le but est d'augmenter la durée de survie des spores pour leur permettre une action sur le long terme.

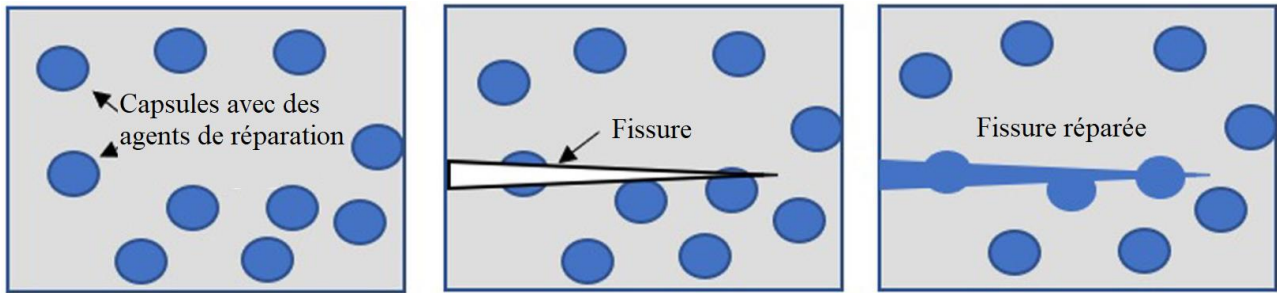


Figure 1.25 : Schéma explicatif de l'autobiocicatrisation. (95)

Un exemple d'agent d'encapsulation est la perlite expansée, contenant les spores bactériennes (47,67). Cette perlite retient les spores bactériennes jusqu'au moment où elle est atteinte par une fissure. Celle-ci apporte de l'eau et du dioxygène, nécessaires pour la germination des spores et la reprise de l'activité bactérienne. Les espèces bactériennes utilisées et les types de nutriments sont les mêmes que dans le cas de l'incorporation directe : la modification est l'encapsulation des spores.

Il existe différents types de structures d'encapsulation possibles (127) :

- encapsulation dans des microcapsules polymériques, formées par exemple de mélamine ;
- encapsulation dans des capsules d'hydrogel, formées par exemple d'alginate de sodium ;
- encapsulation dans des agrégats poreux, tel que la perlite ;
- encapsulation dans des composants minéraux, tel que la terre des diatomées venant de capsules produites par des micro-organismes ;
- encapsulation avec un système vasculaire, il s'agit d'un cas particulier d'encapsulation avec des contenants en verre plus allongés pour couvrir une surface plus importante.

Tous ces systèmes permettent de supprimer une des causes de mortalité des spores incluses dans un matériau cimentaire qu'est le contact avec la pâte de ciment fortement basique. Cependant, l'usage d'agent encapsulé coûte cher et nécessite l'ajustement de la technique de production du béton pour ne pas les détruire lors du malaxage.

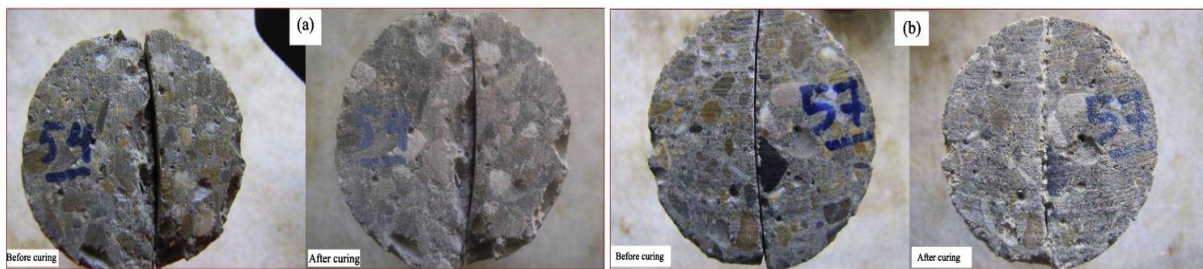
### 1.3.3 L'utilisation d'un fluide chargé en cellules bactériennes

Une autre solution possible pour la réparation d'un matériau cimentaire est l'application externe d'un fluide chargé en cellules bactériennes et en nutriments. Cela élimine le problème de survie bactérienne puisque celle-ci est apportée uniquement au moment de la réparation. Elle vient concurrencer les solutions abiotiques et nécessite, comme elles, l'accès aux fissures par un opérateur humain.

### *Exobiocicatrisation des matériaux cimentaires*

Ce type de biocicatrisation est fait par l'intermédiaire d'un fluide chargé en cellules bactériennes et en nutriments pour combler des fissures d'un matériau cimentaire. Cette stratégie est moins étudiée que l'autobiocicatrisation, car l'obligation d'action d'un opérateur augmente les coûts de maintenance.

Un essai de réparation par exobiocicatrisation de fissures de béton projeté a montré des résultats encourageants avec *Bacillus subtilis* (48). La résistance en compression des échantillons fissurés est 30% plus élevée après vingt-huit jours que celle des échantillons témoins. De plus, une réduction de la perméabilité à l'eau a été observée ainsi qu'une réduction visuelle de la taille des fissures (Fig. I. 26).



a : cas contrôle sans ajout de bactéries, b : cas avec ajout de cellules bactériennes.

*Figure I.26 : Résistance en compression d'un béton avec incorporation de bactéries. (48)*

La réduction la plus importante est observée lors d'un ajout de cellules bactériennes. Toutefois, bien que plus faible, une réduction est observée pour les échantillons témoins, probablement due à la carbonatation du béton lors de la cure sous eau pendant vingt-huit jours.

Un cas d'exobiocicatrisation à l'échelle pilote a été réalisé dans un parking. Cette équipe a pulvérisé une solution nutritive de gluconate de sodium et de nitrate de calcium, contenant des cellules bactériennes de *Bacillus alkalinitrilicus* (46), sur des fissures du deuxième étage d'un parking en réalisant 7 applications en deux mois. Au terme de ce traitement, l'efficacité du traitement a été évaluée en faisant couler de l'eau dans les fissures à partir de l'étage supérieur. Les résultats obtenus montrent que les fissures non traitées présentent des fuites d'eau importantes (Fig. I.27 a et b) comparées à celles traitées. Toutefois, de légères fuites sont observées au niveau des fissures traitées, démontrant que les fissures ne sont pas totalement colmatées (Fig. I.27 c et d).



a et b : fissures témoins non traitées, c et d : fissures traitées.

Figure I.27 : Illustration d'une technique d'exobiocicatrisation en échelle pilote pendant 2 mois.(56)

Les deux thèses réalisées par les équipes de l'IMT Nord Europe et l'Université de Sherbrooke ont basé leurs stratégies sur l'exobiocicatrisation pour réparer des fissures au sein de matériaux cimentaires. La thèse de Ducasse-Lapeyrusse (2014) (7) a permis de développer une technique de biocicatrisation permettant de colmater en surface des micro-fissures au sein de mortiers. Cette technique consiste à imprégner la fissure d'un milieu à base de lactate de calcium, d'extrait de levure, de nitrate de calcium. Sur des fissures carbonatées, ce milieu en présence de *Bacillus pseudofirmus* confère au mortier une capacité de biocicatrisation accrue pour des fissures larges ( $> 200 \mu\text{m}$ ). Une réduction de l'ouverture de la fissure de plus de 70% résulte de la formation d'une couche de carbonate de calcium mêlée à un biofilm, de plus de  $75 \mu\text{m}$  d'épaisseur.

La thèse de Feurgard (2017) (8) avait pour objectif de mettre au point en laboratoire une technique de biocicatrisation de fissures d'ouvertures comprises entre  $150$  et  $500 \mu\text{m}$ , reposant sur l'injection d'un milieu épaissi préalablement inoculé. Une suspension thixotrope et rhéofluidifiante à base de Welan et d'Attigel a été développée pour faciliter l'injection dans les fissures étudiées et éviter son drainage. Les essais de biocicatrisation conduits sur mortiers fissurés ont montré que des fissures de  $200 \mu\text{m}$  étaient totalement colmatées par un dépôt formé de carbonate de calcium biogénéré et d'Attigel.

L'exobiocicatrisation permet d'utiliser une réparation biologique sur n'importe quel type de matériau cimentaire. Il n'y a plus besoin d'une incorporation de nutriments et de spores dans l'ouvrage au cours de sa construction.



### *Le traitement de surface*

Une autre façon d'utiliser l'application de fluide chargé en cellules bactériennes est le traitement de surface. Le but de cette technique est de produire une couche protectrice de carbonate de calcium à la surface d'un matériau. Cela peut se faire sur des surfaces de matériaux cimentaires ou de pierres calcaires. L'objectif peut être la protection des ouvrages ou la restauration de leur qualité esthétique (Fig. I.28). Il est possible d'utiliser la population bactérienne déjà présente sur les surfaces à traiter (128) ou d'en apporter une autre ; dans les deux cas, on doit leur fournir l'eau et les nutriments nécessaires à leur activité. Il ne s'agit pas dans ce cas d'une technique de réparation, mais bien de prévention de l'apparition des fissures à la surface d'un matériau.



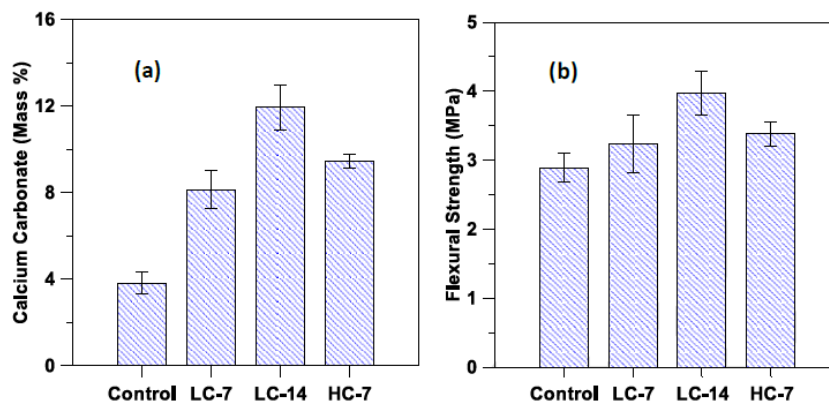
*Figure I.28 : Restauration esthétique d'un monument en pierres calcaires. (128)*

Les surfaces blanches sont recouvertes de calcite.

#### **1.3.4 La biocicatrisation sans matériel biologique vivant**

La réparation des fissures peut aussi se faire en utilisant des molécules biologiques et non des organismes vivants. L'avantage de cette technique est de ne plus avoir besoin de maintenir les cellules en vie. L'usage de molécules biologiques peut être adapté à l'autobiocicatrisation ou à l'exobiocicatrisation. Deux types de structures ont été étudiées : les extraits cellulaires et les enzymes. En 2014, Perito (2014) (11) a utilisé un extrait cellulaire constitué d'enveloppes cellulaires fragmentées de *Bacillus subtilis* pour la réparation de pierres calcaires d'une église. Cela a permis une réduction de l'absorption de l'eau de la pierre calcaire de 16,7%. Un seul enzyme, l'uréase, est actuellement utilisé pour améliorer la biocicatrisation d'un matériau cimentaire. Cela reprend le principe de fonctionnement des bactéries uréolytiques, mais sans avoir besoin de fournir de nutriments aux cellules bactériennes comme source de carbone et d'énergie. En 2018, Dakhane et al. (2018) (129) ont étudié l'effet de l'ajout d'uréase en présence d'urée et de chlorure de calcium dans la formulation d'un mortier. Ils ont observé que

cet ajout induit une augmentation de la quantité de carbonate de calcium présent dans le mortier, ainsi qu'une augmentation de la résistance en flexion du mortier de 33% au bout de quatorze jours (Fig. I.29).



LC-7 : low concentration (uréase 1g/l, 0,6 M d'urée et 0,5 M de CaCl<sub>2</sub>) sur 7 jours.  
 LC-14 : low concentration (uréase 1g/l, 0,6 M d'urée et 0,5 M de CaCl<sub>2</sub>) sur 14 jours.  
 HC-7 : high concentration (uréase 1g/l, 1,2 M d'urée et 1,0 M de CaCl<sub>2</sub>) sur 7 jours.  
 a : pourcentage de carbonate de calcium dans un mortier, b : résistance en flexion.

Figure I.29 : Effet de l'ajout d'urée dans la composition d'un mortier. (100)

Cette technique est très prometteuse, mais n'est pas encore applicable à échelle réelle, en raison de la difficulté et du prix de production de l'urée.

### 1.3.5 Conclusion

Les techniques de réparations biologiques sont de bonnes alternatives aux réparations conventionnelles. L'autobiocicatrisation avec des agents biologiques encapsulés permettrait une réparation des fissures dès leur apparition. Cette technique n'entre pas en compétition avec les techniques conventionnelles, dans la mesure où l'ouvrage est réparé avant qu'une fissure ne devienne visible ou dommageable. Cependant, cette stratégie n'est utilisable que sur des bétons contenant préalablement des bactéries. De plus, actuellement plusieurs freins empêchent son utilisation. Les cellules bactériennes ne survivent pas à long terme en raison des conditions du béton (manque d'oxygénation et pH élevé), ce qui fait perdre au béton sa capacité de cicatrisation au moment où il en a besoin. L'incorporation de nutriments réduit la résistance initiale du matériau en interagissant avec la pâte de ciment, ce qui réduit par conséquent sa durée de vie.

L'exobiocicatrisation permet un usage universel sur n'importe quel type de béton. Cette stratégie rentre en compétition directe avec les techniques de réparations conventionnelles puisqu'elle est basée sur le même principe de comblement des fissures. Toutefois, elle présente

des avantages liés au fait qu'il s'agit d'une solution plus écologique, potentiellement moins chère et plus durable.

## 1.4. Modification de la rhéologie pour l'injection

### 1.4.1 Notions générales de rhéologie nécessaires à l'injection

La rhéologie est l'étude de la déformation des matériaux, sous l'effet d'une contrainte. Cette étude permet de caractériser le comportement d'un fluide et de le quantifier grâce à différents paramètres obtenus à l'aide d'un rhéomètre. Il y a deux grandes catégories de rhéomètres : les rhéomètres capillaires à écoulement forcé et les rhéomètres rotatifs, les plus utilisés. Pour les rhéomètres rotatifs, il existe différentes symétries qui vont avoir un impact sur les paramètres mesurés.

Le paramètre clef pour cette évaluation est la viscosité ( $\mu$ ), exprimée en Pa.s. Cette valeur permet de quantifier la capacité d'un fluide à s'écouler. Ce paramètre est calculé à partir de deux variables mesurées : le gradient de cisaillement ( $D$ ) en  $s^{-1}$  et la contrainte de cisaillement ( $\tau$ ) en Pa (Fig. I.30).

$$\mu = \frac{\tau}{D}$$

$\mu$  =viscosité (Pa.s)  
 $\tau$  = contrainte de cisaillement (Pa)  
 $D$  = gradient de cisaillement ( $s^{-1}$ )

Figure I.30 : Calcul de la viscosité.

Le gradient de cisaillement est une évaluation du cisaillement appliqué au fluide. Dans le cas d'un rhéomètre rotatif, la partie mobile du rhéomètre tourne à une vitesse de rotation qui est proportionnelle au gradient de cisaillement. La contrainte de cisaillement est une force appliquée à un fluide par unité de surface. Dans le cas d'un rhéomètre rotatif, le fluide applique, sur toute la surface de contact, une force sur la partie mobile : la contrainte de cisaillement. Il s'agit de la force que l'appareil doit fournir, par unité de surface de contact avec le fluide, pour assurer la vitesse de rotation voulue de la partie mobile dans le fluide. Plus le fluide est visqueux et plus la contrainte de cisaillement est importante à un gradient de cisaillement fixe.

Pour injecter un fluide dans une fissure d'un matériau cimentaire, il peut être avantageux d'avoir un comportement rhéologique non linéaire. Cela veut dire que la viscosité du fluide varie avec la variation de la contrainte qui lui est appliquée. Il est souhaitable que le fluide ait une viscosité importante au repos et une viscosité plus faible sous agitation. Cela permet

d'injecter dans une fissure une formulation fluide sous la contrainte de la pression. Une fois au repos, cette formulation devient plus visqueuse, ce qui évite un drainage post-injection.

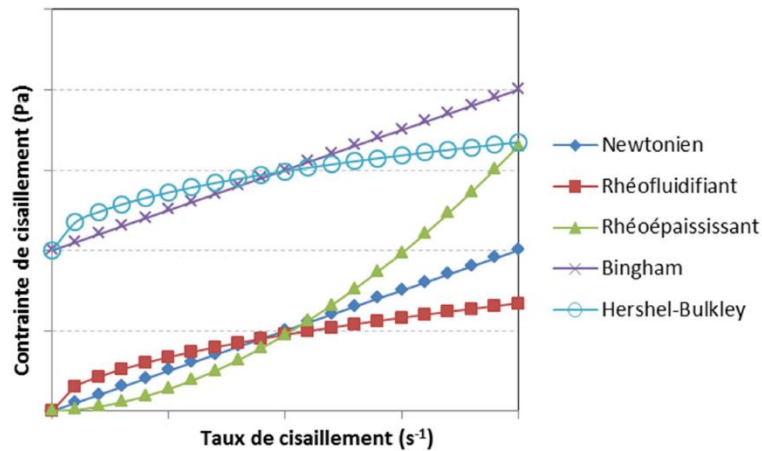


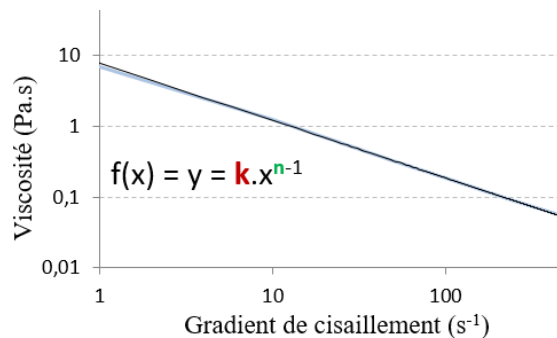
Figure I.31 : Comportements rhéologiques de fluides. (8)

Il existe différents types de comportement de fluide (Fig. I.31) :

- Les fluides newtoniens sont des fluides ayant un comportement d'écoulement linéaire. Il s'agit d'un comportement rhéologique idéal. La viscosité est fixe et ne dépend pas des contraintes appliquées au fluide.
- Les fluides rhéofluidifiants ou pseudoplastiques, sont des fluides ayant un comportement d'écoulement non-linéaire. Plus on leur applique une contrainte importante et plus leur viscosité diminue. À l'inverse, les fluides rhéoépaississants ou dilatants ont une viscosité qui augmente en fonction de la contrainte appliquée.
- Les fluides de Bingham, sont des fluides à seuil. Sous un certain seuil de cisaillement, ce type de fluide a le comportement élastique d'un solide. Quand le seuil de cisaillement est dépassé, le fluide perd son comportement élastique et adopte un comportement visqueux avec un écoulement linéaire ; c'est-à-dire que la viscosité est fixe et ne dépend pas des contraintes appliquées au fluide.
- Les fluides de Hershel-Bulkley, sont des fluides ayant un comportement d'écoulement non linéaire. Il s'agit aussi d'un fluide à seuil. Quand le fluide dépasse le seuil et est visqueux, il a un comportement d'écoulement non-linéaire. Plus on leur applique une contrainte importante et plus leurs viscosités diminuent.

## 1.4.2 Fluides rhéofluidifiants, le milieu d'injection

Les fluides rhéofluidifiants ont des propriétés d'écoulement favorables pour l'injection des fissures. Lors de l'injection, la mise sous contrainte du fluide engendre une baisse de sa viscosité qui facilite le remplissage du volume de la fissure. Lorsque l'injection est terminée, la viscosité du fluide au repos augmente, ce qui le stabilise dans la fissure et diminue le risque de drainage gravitaire. Le comportement rhéologique d'un fluide rhéofluidifiant peut être décrit à l'aide du modèle d'Ostwald. Ce modèle fournit deux paramètres : l'indice de consistance ( $k$ ) et l'indice d'écoulement ( $n$ ). Ces deux paramètres sont déterminés à partir de la courbe de tendance modélisant la représentation graphique logarithmique de la relation entre la viscosité et le gradient de cisaillement appliqué (Fig. I.32).



L'équation présentée est celle de la courbe de tendance de type puissance qui modélise au mieux les données expérimentales.

Figure I.32 : Représentation en échelle logarithmique de la viscosité en fonction du gradient de cisaillement.

Le modèle suit donc une équation de type puissance :

$$y = k \cdot x^{n-1}$$

$y$  = viscosité

$x$  = gradient de cisaillement

$k$  = indice de consistance

$n$  = indice d'écoulement

L'indice de consistance est une approximation de la viscosité sous un gradient de cisaillement de  $1 \text{ s}^{-1}$ . C'est la valeur type de viscosité à utiliser pour décrire une solution.

L'indice d'écoulement caractérise l'aspect rhéofluidifiant d'une solution. Plus  $n$  est faible et plus le fluide est rhéofluidifiant.

- Si  $n$  est compris entre 0 et 1, le fluide est rhéofluidifiant.
- Si  $n$  est égal à 1, le fluide est newtonien.
- Si  $n$  est supérieur à 1, le fluide est rhéoépaississant.

L'évolution de la viscosité en fonction du temps est une autre caractéristique importante des fluides non-linéaires. Sous une contrainte de cisaillement constante, la viscosité peut évoluer en fonction du temps.

Deux comportements opposés peuvent être observés :

- Un comportement thixotropique : lorsqu'il est mis sous contrainte, la viscosité d'un fluide diminue progressivement au cours du temps. Puis, au repos, la viscosité augmente progressivement.
- Un comportement anti-thixotropique ou rhéoplexique : lorsqu'il est mis sous contrainte, la viscosité d'un fluide augmente progressivement au cours du temps. Puis, au repos, la viscosité diminue progressivement.

Globalement, selon ces principes, l'utilisation d'un fluide rhéofluidifiant et thixotrope est souhaitable pour faciliter le remplissage du volume de la fissure et pour minimiser le drainage gravitaire lorsque le fluide est au repos au terme de l'injection.

### **1.4.3 Fluides avec un comportement linéaire, pour des viscosités types**

Des fluides épaissis peuvent être utilisés pour lier une viscosité type à une taille de fissure. Il est important que le comportement du fluide soit le plus indépendant possible des conditions expérimentales. Les fissures ont des géométries difficilement contrôlables. De plus, de trop nombreux facteurs peuvent influencer la contrainte exercée sur le fluide au moment d'une injection. Il est donc nécessaire d'utiliser des fluides dont la viscosité est indépendante de la contrainte à laquelle ils sont soumis. C'est le cas, en théorie, des fluides ayant un comportement d'écoulement linéaire, tels que les fluides newtoniens ou les fluides de Bingham. En pratique, il n'existe pas de fluide réellement linéaire dans des conditions normales. Cependant, certains composés ont des comportements proches du linéaire dans une certaine gamme de gradients de cisaillement. Les gradients de cisaillement cohérents avec cette étude sont compris entre 1 et  $1000 \text{ s}^{-1}$ . Le carboxyméthylcellulose (CMC) (130), mis en suspension dans l'eau, a un comportement proche du linéaire dans ces gammes de gradient de cisaillement.

La représentation de la viscosité en fonction du gradient de cisaillement de différentes concentrations de CMC est présentée dans la figure I.33.

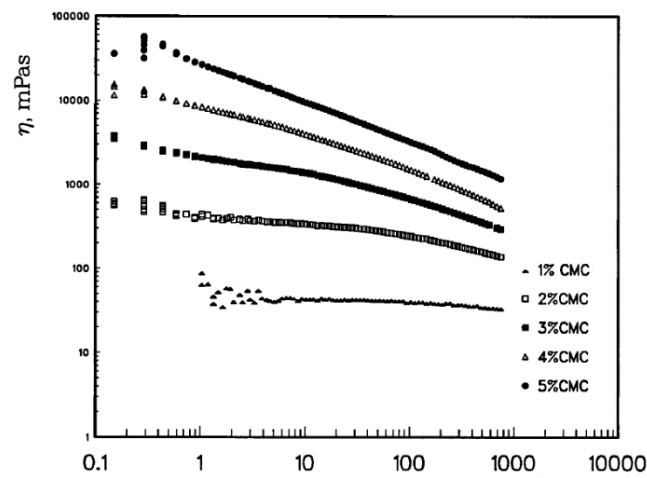


Figure I.33 : Viscosité en fonction du gradient de cisaillement de différentes concentrations de CMC. (131)

La suspension contenant 1% de CMC a une viscosité indépendante de sa contrainte pour des gradients de cisaillement compris entre 1 et 1000  $s^{-1}$ . Toutefois, pour des concentrations plus élevées, ce composé a un comportement rhéologique moins linéaire mais cela reste suffisant pour l'objectif recherché. Ce composé constitue donc un bon candidat pour réaliser cette étude.

# Chapitre 2 : Utilisation d'un plan d'expériences pour lier la composition des formulations à leur rhéologie

## 2.1. Introduction

L'objectif de cette thèse est de développer une méthode de biocicatrisation applicable à des ouvrages réels. Pour réaliser la première partie de cet objectif, il est nécessaire d'avoir un milieu apportant les éléments permettant la biominéralisation du  $\text{CaCO}_3$  permettant cette injection et aussi son maintien dans la fissure. Il faut donc connaître et adapter les propriétés rhéologiques du milieu aux fissures rencontrées. La première étape de cette partie rhéologique est la mise au point d'un plan d'expériences permettant de lier la composition de formulations à leurs paramètres rhéologiques.

Plus précisément, ce chapitre vise à mieux comprendre la relation entre les viscosités des formulations et leurs constituants, afin de déterminer la viscosité appropriée à une taille de fissure donnée. Des essais préliminaires ont permis de présélectionner trois composés nécessaires au procédé de biocicatrisation et ayant un impact sur la rhéologie de la formulation : le lactate de calcium, le carbonate de calcium et l'Attagel 50. Un autre composé est ajouté, le gluconate de calcium. Le lactate et le gluconate de calcium servent de source de carbone et de calcium aux bactéries pour produire de la biocalcite. L'Attagel 50 sert d'ancrage physique initial sur lequel les bactéries peuvent venir se développer. Enfin, le carbonate de calcium apporte de la matière solide, un surplus de calcium et un site de nucléation pour faciliter la cristallisation du carbonate de calcium en biocalcite.

Comme les mesures des valeurs rhéologiques de toutes les formulations possibles nécessiterait environ cinq ans de mesures en continu, un plan d'expériences a été envisagé. En effet, une variation de concentration massique de ces composés (entre 11 et 14% pour le lactate de calcium, 2 et 4% pour l'Attagel 50, 1 et 15% pour le carbonate de calcium et 1 et 5% pour le gluconate de calcium) avec un pas de 0,1% pour chaque composé, nécessiterait de produire et de mesurer 91 791 formulations différentes. Un plan d'expériences permet d'obtenir les mêmes résultats avec beaucoup moins d'essais en utilisant la modélisation mathématique. Le concept est de créer un modèle théorique à partir de formulations particulières qui contiennent les concentrations extrêmes des différents composés. Ce modèle peut ensuite être confirmé grâce



à une répétition de mesures d'une formulation de concentration moyenne. Si le modèle est valide, cela signifie qu'entre les concentrations extrêmes choisies, on peut obtenir les valeurs rhéologiques d'intérêt de toutes les formulations possibles.

Dans un plan d'expériences, l'information terminale est la **réponse**. Il s'agit de la grandeur d'intérêt étudiée. Dans le cas de cette étude, il y a deux réponses étudiées, l'indice de consistance (k) et l'indice d'écoulement (n).

Le but d'un plan d'expériences est de lier ces réponses aux **facteurs** qui correspondent aux différentes variables ayant un effet important sur les réponses. En règle générale, il existe un nombre ingérable de facteurs. Il est donc nécessaire de bien identifier les facteurs d'intérêt pour l'étude et de fixer les autres pour qu'ils puissent être négligés. Dans le cas de cette étude, les facteurs considérés sont les concentrations des quatre composés étudiés. Ces facteurs ont un impact élevé sur le comportement rhéologique d'une formulation. De plus, ce sont des facteurs qu'il est possible de contrôler dans le cadre de la biocicatrisation.

Il faut ensuite définir leurs **niveaux**, qui sont les différentes valeurs minimales et maximales que peuvent prendre les facteurs. Pour notre étude, ce sont les concentrations minimales et maximales en lactate de calcium, Attagel, carbonate de calcium et gluconate de calcium permettant de produire un milieu stable et potentiellement injectable.

Les coordonnées dans un plan d'expériences sont simplifiées. La valeur maximale devient +1, la valeur minimale devient -1 et la valeur centrale devient 0. Les variables initiales, valeurs absolues, sont centrées réduites. Elles sont ainsi nommées **variables codées** ou **valeurs codes** et sont obtenues grâce à l'équation suivante :

$$Valeur\ code = \frac{valeur\ absolue\ (A) - valeur\ centrale\ (A_0)}{Le\ pas = 0,5 * (max - min)}$$

Ces deux niveaux sont des bornes qui délimitent le domaine du facteur. Par exemple pour le facteur « concentration en lactate de calcium », avec un niveau -1 de 11% et un niveau +1 de 14 %, le domaine de ce facteur représente toutes les concentrations comprises entre 11 et 14%. Avec une résolution dépendante du niveau de précision du plan d'expériences. L'espace délimité par tous les domaines d'un facteur est nommé le **domaine d'étude**. Il peut être en une, deux, trois dimensions ou plus en fonction du nombre de facteurs considérés (Fig. II.1).

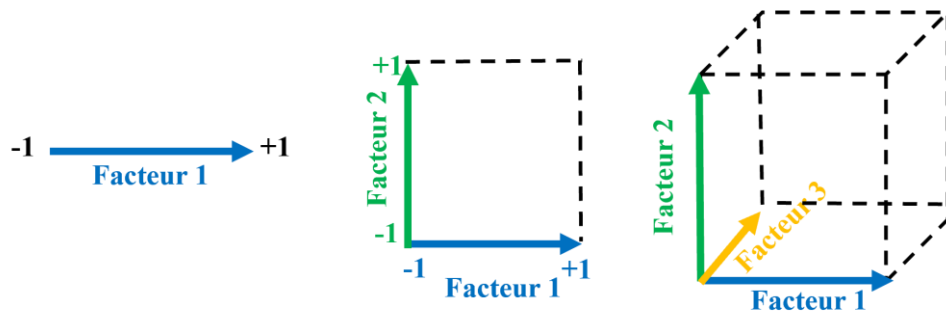


Figure II.1 : Domaines expérimentaux à une, deux ou trois dimensions.

Ces différentes notions permettent de préparer le plan d'expériences et de déterminer les formulations à tester. Une fois ces essais effectués, le plan est généré à partir d'une équation liant la réponse aux facteurs. Pour certaines études, il existe des équations préétablies liant les deux. Dans le cas de cette étude, il n'existe pas de fonction connue qui lie la réponse  $k$  ou la réponse  $n$  aux quatre facteurs étudiés. Il est donc nécessaire d'utiliser un modèle à priori et de voir, au cours des essais, s'il est valable ou non pour le confirmer à posteriori. Le modèle à priori par défaut utilisé pour des plans d'expériences est un modèle polynomial du premier degré avec interactions (modèle PDAI). Le système de résolution utilise la méthode des moindres carrés. Pour un plan d'expériences à trois facteurs, l'équation à priori qui relie la réponse aux facteurs est la suivante :

$$Y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{12}x_1 x_2 + a_{23}x_2 x_3 + a_{13}x_1 x_3 + a_{123}x_1 x_2 x_3$$

$a_0$  = coefficient constant, il s'agit de la réponse au point 0/0/0, le point central.

$a_1$ ,  $a_2$  et  $a_3$  = coefficients ou effets des facteurs 1, 2 et 3.

$a_{12}$ ,  $a_{23}$ ,  $a_{13}$  et  $a_{123}$  = coefficients ou effets des interactions 2 à 2 ou des trois facteurs.

Un **effet** ou **coefficient**, d'un facteur est une mesure de la variation de la réponse entre le niveau central (0) et le niveau haut d'un facteur (+1) ou entre le niveau bas (-1) et le niveau central (0). Si cet effet est positif, alors l'augmentation de la valeur du facteur augmente la valeur de réponse. Cette relation est vraie uniquement dans le cas de l'équation utilisant les unités codées initiales. Ce système d'unité est nécessaire pour une comparaison d'effets entre les différents facteurs pouvant avoir des coordonnées absolues très différentes et dans des unités incomparables.

La résolution de l'équation liant une réponse aux facteurs correspondants permet d'obtenir les coefficients de chaque facteur ou interaction. Cela permet de conclure sur l'effet qu'a un de ces éléments sur la grandeur physique considérée.

Une autre notion importante est l'erreur. Celle-ci est constituée de deux éléments : le manque d'ajustement et l'erreur expérimentale. Le premier est la différence entre le modèle expérimental et la réalité. Le deuxième prend en compte la nature aléatoire de la réponse par l'intermédiaire de la variabilité entre les points de mesures.

Le plan d'expériences à quatre facteurs permettra dans d'une part de déterminer l'effet des composés sur les paramètres rhéologiques ( $n$  et  $k$ ) d'une formulation rhéofluidifiante et d'autre part d'obtenir un outil prédictif donnant les différentes valeurs rhéologiques ( $n$  et  $k$ ) pour n'importe quelle formulation à l'intérieur du plan d'expériences.

## 2.2. Matériels et méthodes

Les différentes notions théoriques sur les plans d'expériences, présentées dans ce rapport, proviennent du livre « Introduction aux plans d'expériences » 5<sup>ème</sup> édition de Jacques Goupy, paru en 2017.

### 2.2.1 Suspensions épaissies étudiés

#### 2.2.1.1 Composés utilisés

Tous les pourcentages exprimés dans ce document sont des pourcentages massiques.

Le L-lactate de calcium hydraté,  $C_6H_{10}CaO_6 \cdot 5H_2O$ , (Sigma Aldrich) d'une pureté d'au moins 98 % a une masse moléculaire de 308,29 g/mol. (Fig. II.2).

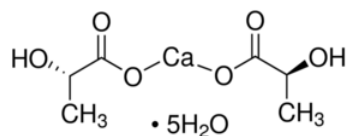


Figure II.2 : Molécule de L-lactate de calcium hydraté.

L'Attagel 50 (BASF) est constitué de particules d'une taille moyenne de 9  $\mu\text{m}$  de densité moyenne de 400  $\text{kg/m}^3$ . Il est composé d'attapulгите et d'aluminosilicate de magnésium hydraté ((Mg, Al)  $5\text{Si}_8\text{O}_{20} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ).

Le carbonate de calcium (Bétocarb<sup>®</sup> F) est constitué de particules de densité moyenne de 1900  $\text{kg/m}^3$ . Il est formé de 93 % de carbonate de calcium et 1,5 % de carbonate de magnésium. La perte d'humidité à 110°C de 0,07 %.

Le D-gluconate de calcium monohydraté,  $C_{12}H_{22}CaO_{14} \cdot H_2O$ , (Sigma Aldrich) a une pureté d'au moins 98 % et une masse moléculaire de 448,39 g/mol. (Fig. II.3).

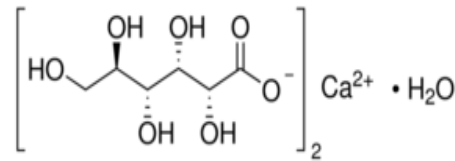


Figure II.3 : Molécule de D-gluconate de calcium hydraté.

### 2.2.1.2 Mise en suspension des formulations

Les formulations sont produites selon la procédure suivante : mélanger tous les composés solides pesés dans un flacon en plastique de 100 mL, mesurer le volume d'eau distillée nécessaire et mettre un tiers du volume d'eau distillée dans le Waring Blender, puis y rajouter les composés solides en poudre. Ajouter les deux tiers restants d'eau. Lancer l'agitation 1 minute à la vitesse 2. Couler le mélange dans un tube puis attendre au maximum cinq minutes avant de le transvaser dans la partie fixe du rhéomètre. Le Waring Blender utilisé pour le mélange est de la marque Waring Commercial® de modèle Xtreme. Les compositions des formulations utilisées sont résumées en Annexe 1.

## 2.2.2 Caractérisation rhéologique des suspensions épaissies

### 2.2.2.1 Programmes utilisés

Un rhéomètre à cylindres coaxiaux de marque Anton-Parr modèle MCR 302 équipé d'un cylindre cannelé CC27/P6 a été utilisé. Les mesures sont réalisées à 20°C. Le programme utilisé est nommé « rhéogramme » (Fig. II.4). Il est constitué d'une période d'homogénéisation de cent secondes à un gradient de cisaillement de  $1000 \text{ s}^{-1}$  puis de 8 paliers de vingt secondes, avec 100 mesures par palier, ayant un gradient de cisaillement décroissant. Les gradients de cisaillement sont 625-500-250-100-50-10-1-0.1  $\text{s}^{-1}$ .

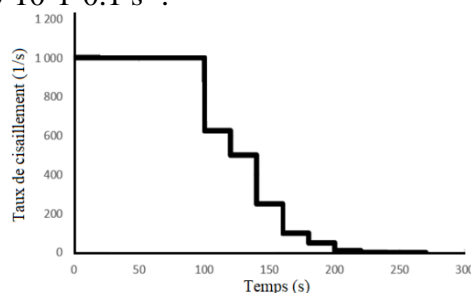


Figure II.4 : Programme (nommé rhéogramme) utilisé lors des essais rhéologiques.

### 2.2.2.2 Traitement des résultats obtenus

Pour chaque gradient de cisaillement, la viscosité est la moyenne des 20 dernières mesures de viscosité du palier. Les mesures rhéologiques obtenues durant ces essais permettent de tracer une représentation graphique, en échelle logarithmique, de la viscosité moyenne en fonction du gradient de cisaillement. L'équation de la courbe de tendance de cette représentation graphique est de type puissance. Les fluides utilisés sont considérés à priori comme des fluides rhéofluidifiants, ce qui permet d'utiliser le modèle d'Oswald. Ce modèle fournit une équation permettant de modéliser le comportement d'un fluide rhéofluidifiant (Fig. II.5).

$$\text{Viscosité} = k * \text{gradient de cisaillement}^{n-1}$$

Figure II.5 : Equation du modèle d'Oswald.

L'équation de la courbe de tendance de la représentation graphique de la viscosité en fonction du gradient de cisaillement fournit les informations nécessaires à l'usage du modèle d'Oswald : l'indice de consistance (k) et l'indice d'écoulement (n). L'indice de consistance est une approximation de la viscosité sous un gradient de cisaillement de  $1 \text{ s}^{-1}$ . C'est la valeur type de viscosité à utiliser pour décrire une solution. L'indice d'écoulement caractérise l'aspect rhéofluidifiant d'une solution. Si n est compris entre 0 et 1, le fluide est rhéofluidifiant. S'il est égal à 1, le fluide est newtonien. Enfin, s'il est supérieur à 1, le fluide est rhéoépaississant. Plus n est faible et plus le fluide est rhéofluidifiant.

### 2.2.3 Plans d'expériences

En s'appuyant sur le plan d'expériences à deux facteurs réalisé ultérieurement pour sélectionner des formulations à base d'Attigel 50 et de Welan-gum (8), un plan d'expériences à quatre facteurs est effectué. Il lie quatre concentrations de composés (lactate de calcium, Attigel 50, carbonate de calcium et gluconate de calcium) à l'indice de consistance (k) et à l'indice d'écoulement (n).

#### 2.2.3.1 Réponses, facteurs et niveaux choisis

Ce plan d'expériences repose sur des mesures rhéologiques de 19 formulations. Ces formulations sont préparées par la même personne, le même jour au même endroit, avec le

même appareil et dans les mêmes conditions d'agitation. Le but est d'avoir des conditions identiques entre les différents essais et de fixer certains facteurs pour les exclure du plan d'expériences. Dans un plan d'expériences, deux réponses ont été sélectionnées, l'indice de consistance  $k$  et l'indice d'écoulement  $n$ . De nombreux facteurs peuvent avoir un impact sur les réponses, les plus importants sont présentés dans la figure II.6.

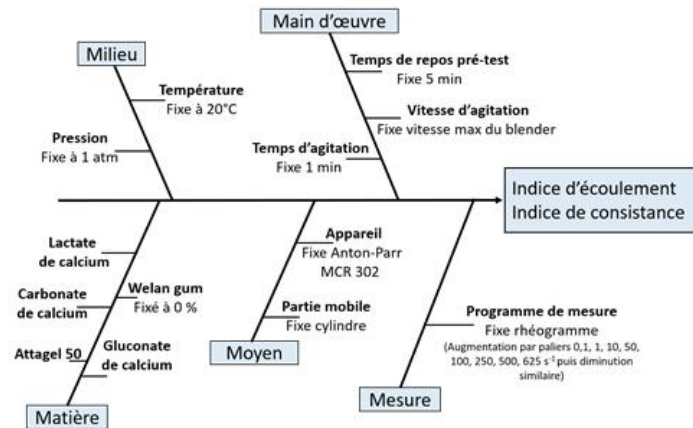


Figure II.6 : Diagramme d'Ishikawa.

Pour le plan d'expériences à quatre facteurs, les facteurs sont les concentrations :

- lactate de calcium : entre 11 et 14 % car en dessous le fluide n'est pas stable et au-dessus il est trop épais pour des fissures fines.
- carbonate de calcium (1-15 %), d'Attagel 50 (2-4 %) et le gluconate de calcium (1-5 %) par suite d'essais préliminaires.

Deux autres facteurs sont présents mais sont fixés et donc non pris en compte dans ce plan d'expériences : la concentration d'extrait de levure (fixée à 0,3%). Les niveaux des quatre facteurs sont représentés dans le tableau II.1, en valeurs codées et en valeurs absolues (valeurs de concentration réelles).

Tableau II.1 : Les niveaux du plan d'expériences à quatre facteurs.

Facteurs sélectionnés :	Valeur code	-1	0	+1
Concentration en lactate de calcium (%)	Facteur A	11	12,5	14
Concentration en Attagel 50 (%)	Facteur B	2	3	4
Concentration en de carbonate calcium (%)	Facteur C	1	8	15
Concentration en de gluconate calcium (%)	Facteur D	1	3	5

### 2.2.3.2 Plans d'expériences utilisés

Pour le plan d'expériences à quatre facteurs, chaque facteur a deux niveaux, ce qui correspond, pour un plan complet à  $2^4$  essais soit seize essais. Il faut ajouter trois répétitions du point central, pour un total de dix-neuf essais. Par conséquent, le plan choisi est un plan complet à quatre facteurs et à deux niveaux. Les formulations sont représentées dans la matrice d'expérimentation (Tableau II.2), avec leurs coordonnées absolues et avec leurs coordonnées codées. Les essais sont classés avec l'ordre de Yates.

Tableau II.2 : Matrice d'expérimentation du plan d'expériences à quatre facteurs.

L = lactate de calcium, G = gluconate de calcium, A= Attagel 50 et C = carbonate de calcium.

Essais	Formulations	Facteur A (%) / code	Facteur B (%) / code	Facteur C (%) / code	Facteur D (%) / code
A	L11 A2 C1 G1	11	2	1	1
B	L14 A2 C1 G1	14	2	1	1
C	L11 A4 C1 G1	11	4	1	1
D	L14 A4 C1 G1	14	4	1	1
E	L11 A2 C15 G1	11	2	15	1
F	L14 A2 C15 G1	14	2	15	1
G	L11 A4 C15 G1	11	4	15	1
H	L14 A4 C15 G1	14	4	15	1
I	L11 A2 C1 G5	11	2	1	5
J	L14 A2 C1 G5	14	2	1	5
K	L11 A4 C1 G5	11	4	1	5
L	L14 A4 C1 G5	14	4	1	5
M	L11 A2 C15 G5	11	2	15	5
N	L14 A2 C15 G5	14	2	15	5
O	L11 A4 C15 G5	11	4	15	5
P	L14 A4 C15 G5	14	4	15	5

Le programme de calcul utilisé est le logiciel Design-Expert® 12. Ce plan d'expériences a aussi été fait sur les programmes Minitab® et JMP® et a donné des résultats similaires.

## 2.3. Résultats et discussion

### 2.3.1 Création du plan d'expériences

Chaque formulation est préparée et mesurée avec le programme rhéogramme. Les coefficients de corrélation élevés ( $> 0,99$ ) obtenus pour toutes les formulations testées montrent qu'elles sont bien rhéofluidifiantes et que le modèle d'Ostwald peut donc être utilisé.

Tableau II.3 : Matrice d'expériences complète du plan d'expériences à quatre facteurs.

Essais	Formulations	Lac	Att	Carb	Glu	Réponse k	Réponse n
A	L11 A2 C1 G1	-1	-1	-1	-1	3,2	0,124
B	L14 A2 C1 G1	+1	-1	-1	-1	9,6	0,093
C	L11 A4 C1 G1	-1	+1	-1	-1	8,2	0,105
D	L14 A4 C1 G1	+1	+1	-1	-1	17,6	0,118
E	L11 A2 C15 G1	-1	-1	+1	-1	8,6	0,126
F	L14 A2 C15 G1	+1	-1	+1	-1	41,4	0,155
G	L11 A4 C15 G1	-1	+1	+1	-1	22,3	0,162
H	L14 A4 C15 G1	+1	+1	+1	-1	63,9	0,177
I	L11 A2 C1 G5	-1	-1	-1	+1	1,0	0,237
J	L14 A2 C1 G5	+1	-1	-1	+1	6,5	0,121
K	L11 A4 C1 G5	-1	+1	-1	+1	4,1	0,189
L	L14 A4 C1 G5	+1	+1	-1	+1	15,3	0,13
M	L11 A2 C15 G5	-1	-1	+1	+1	4,3	0,152
N	L14 A2 C15 G5	+1	-1	+1	+1	25,2	0,173
O	L11 A4 C15 G5	-1	+1	+1	+1	10,3	0,169
P	L14 A4 C15 G5	+1	+1	+1	+1	54,3	0,179
0 (1)	L12,5G3A3C8 (1)	0	0	0	0	12,4	0,127
0 (2)	L12,5G3A3C8 (2)	0	0	0	0	12,8	0,129
0 (3)	L12,5G3A3C8 (3)	0	0	0	0	11,5	0,134

Pour les points centraux répliqués trois fois (L12,5G3A3C8 ou 0/0/0), la moyenne des indices k est de 12,2 avec un écart type de 0,67. La moyenne des indices n est de 0,130 avec un écart type de 0,0036. Le tableau II.3 présente les mesures rhéologiques nécessaires pour la création du plan d'expériences.



## 2.3.2 Traitement des données du plan d'expériences

### 2.3.2.1 Modèle mathématique et programme de calcul utilisés

Il n'y a pas de fonction connue qui lie la réponse  $k$  ou  $n$  aux quatre facteurs étudiés. Il est donc nécessaire d'utiliser un modèle à priori puis de déterminer, en cours d'analyse, s'il est valable ou non, pour le confirmer à posteriori. Le modèle à priori par défaut est un modèle polynomial du premier degré avec interactions (modèle PDAI). Une fois le plan généré, les valeurs de réponses rentrées et le modèle mathématique choisi, le logiciel calcule, à partir des 16 essais, les effets de chaque facteur. Un effet positif indique que ce facteur augmente la réponse. Pour transposer cela en termes spécifiques à cette étude avec la réponse  $k$ , un coefficient positif indique qu'une augmentation de la concentration du composé induit une augmentation de la viscosité type. Cette relation est l'inverse si le coefficient est négatif. Ces coefficients permettent de présenter la fonction polynomiale de premier degré liant une réponse aux quatre facteurs et à leurs interactions. Pour déterminer la validité d'un modèle, le logiciel fournit la *p-value* du modèle ainsi que celle de l'erreur liée au modèle. La *p-value* du modèle est la probabilité que la similitude entre le modèle calculé et les résultats mesurés soit due au hasard. Plus la *p-value* est proche de 0, plus le modèle est bon et reflète fidèlement la réalité mesurée. À l'inverse, une *p-value* de 1 indique une probabilité de 100% que toutes les ressemblances entre les valeurs calculées et mesurées soient dues au hasard (aléatoires). Une valeur par défaut pour déterminer si un élément est significatif ou non est une *p-value* de 0,1. Ce sera la valeur seuil utilisée pour déterminer la validité d'un élément (modèle ou facteur) sur la base de sa *p-value*.

Une fois qu'un modèle capable de lier la réponse aux facteurs est déterminé, une analyse de variance est utilisée pour déterminer les facteurs ou interactions significatifs et éliminer les éléments non significatifs.

### 2.3.2.2 Indice de consistance ( $k$ )

Le plan d'expériences est généré dans un premier temps avec un modèle à priori à quatre facteurs du type de celui présenté au point précédent. L'utilisation d'une équation polynomiale avec interactions a permis de créer le plan d'expériences mais cette modélisation mathématique à priori n'est pas nécessairement la meilleure. Pour l'équation à priori, la *p-value* du modèle

est de 0,0372 ; ce qui signifie que le modèle a une probabilité de 0,372 % d'être erroné, ce qui est faible. Ce modèle est donc valide. La *p-value* de l'erreur due au modèle, le manque d'ajustement, est de 0,0046. Elle est inférieure à 0,1, ce qui signifie qu'elle est aussi significative. L'erreur d'ajustement, avec l'utilisation de l'équation à *priori*, est plus significative que le modèle. L'équation à *priori* ne peut donc pas être utilisée.

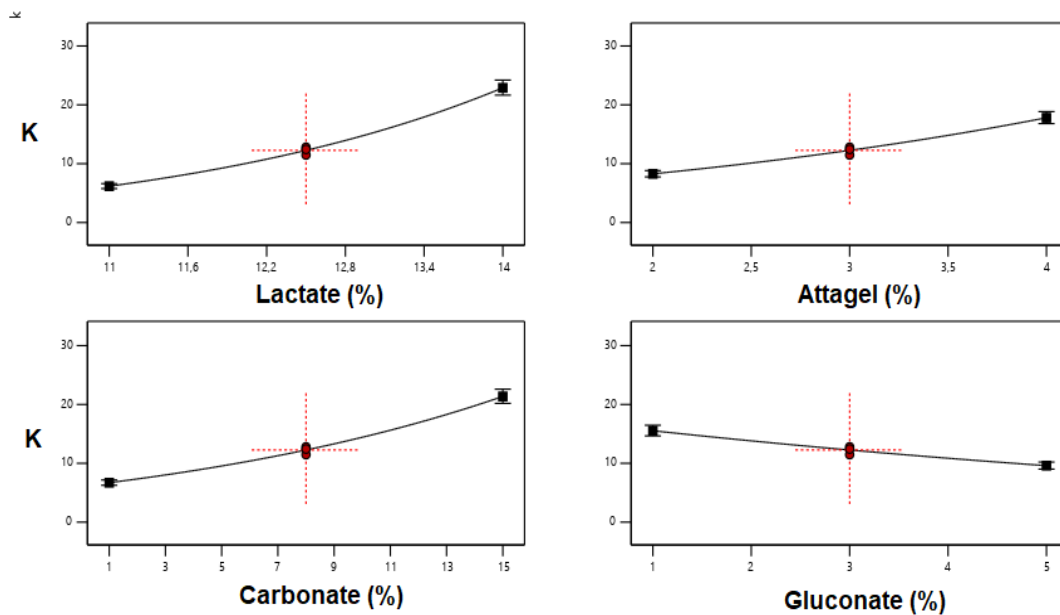
*Modification de l'équation à priori, mise au point de l'équation ajustée pour la réponse k*

Une amélioration possible du plan d'expériences est l'usage d'une équation plus adaptée au phénomène physique étudié que l'équation par défaut (à *priori*). Le logiciel Design Expert® permet plusieurs modifications de l'équation liant la réponse k et les quatre facteurs. De nombreuses modifications ont été effectuées à l'équation initiale, dans le but de réduire l'erreur d'ajustement. L'équation donnant le meilleur modèle est  $y' = \ln(y+2)$ . La *p-value* de l'erreur est la plus élevée (0,9517) ; ce qui signifie que l'erreur d'ajustement a 95,17% de probabilité d'être nulle. Il s'agit d'une probabilité très importante qui signifie que le modèle reflète très bien la réalité. Le modèle est donc valable. La nouvelle équation est donc :

$$\ln(k + 2) = k' \Leftrightarrow e^{\ln(k+2)} = e^{k'} \Leftrightarrow k + 2 = e^{k'} \Leftrightarrow k = e^{k'} - 2$$

$$k = e^{a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + a_3 x_3 + a_4 x_4 + a_{12} x_1 x_2 + a_{13} x_1 x_3 + a_{14} x_1 x_4 + a_{23} x_2 x_3 + a_{24} x_2 x_4 + a_{34} x_3 x_4 + a_{123} x_1 x_2 x_3 + a_{124} x_1 x_2 x_4 + a_{134} x_1 x_3 x_4 + a_{234} x_2 x_3 x_4 + a_{1234} x_1 x_2 x_3 x_4} - 2$$

Pour ce modèle, la *p-value* du modèle est de 0,0001 ; ce qui signifie que le modèle à une probabilité de 0,001% d'être faux. Ce modèle est donc significatif. La *p-value* du manque d'ajustement est de 0,9517, cette erreur est donc non significative. Le coefficient de détermination ( $R^2$ ) est de 0,9976, le modèle est donc très proche des valeurs mesurées. La figure II.7 présente le diagramme des effets de chaque facteur, avec l'équation ajustée. Il s'agit d'une représentation graphique la modification de la réponse en fonction des différentes valeurs de chaque facteur, en coordonnées absolues.



Ces graphiques représentent la réponse ( $k$ ) en fonction de la valeur du facteur en pourcentage. Les points rouges représentent les points centraux.

*Figure II.7 : Diagrammes des effets des quatre facteurs liés à la réponse  $k$  obtenus avec l'équation ajustée.*

Ces diagrammes des effets montrent que le modèle est correct pour les points limites ainsi que pour le centre du domaine expérimental. Cette équation est donc bien adaptée pour lier la réponse  $k$  aux quatre facteurs. L'effet des interactions est moins marqué. Il est nécessaire d'utiliser une approche statistique pour déterminer si un facteur ou une interaction peut être utilisé ou s'il doit être, au contraire, éliminé de l'étude.

#### *Evaluation des coefficients du modèle ajusté pour la réponse $k$*

La partie précédente présente le modèle utilisé avec tous les coefficients des facteurs et des interactions possibles. Il est nécessaire de déterminer quels éléments sont significatifs ou non et pour cela, la valeur numérique seule d'un coefficient ne permet pas de le déterminer. S'il est considéré comme significatif, l'élément associé (facteur ou interaction), a un impact significatif sur la réponse. A l'inverse, si un coefficient ne l'est pas, l'élément qui lui est associé peut-être supprimé de l'étude. Pour obtenir cette réponse, on utilise un étalon. C'est l'estimation des erreurs qui sert d'étalon pour évaluer l'importance des coefficients. Par exemple, si l'erreur est de 10 et que le coefficient est de 9, alors il est non significatif. En revanche, le même coefficient de 9 pour une erreur de 0,05 est très significatif. La démarche d'évaluation des coefficients de la réponse  $k$  ainsi que l'analyse de la variance sont présentées dans l'Annexe 2.

Cette approche montre que les interactions BC, BD, CD, ABC, ACD, BCD et ABCD ne sont pas significatives (A : lactate de calcium, B : Attagel, C : carbonate de calcium et D : gluconate de calcium). Elles peuvent donc être supprimées du modèle. Toutes ces modifications permettent de fixer l'équation utilisée pour ce plan d'expériences, en coordonnées codées. Cela donne :

$$k = e^{2,660+0,557*Lac+0,328*Att+0,493*Carb-0,207*Glu-0,031*Lac*Att+0,116*Lac*Carb+0,075*Lac*Glu+0,039*Lac*Att*Glu} - 2$$

### Coefficients des éléments significatifs liés à la réponse k

Le système de comparaison des coefficients codés ne se fait pas avec ces coefficients liés à k' mais bien avec les coefficients directement liés à la réponse k. Cela permet de simplifier l'équation obtenue. Pour avoir les coefficients de k il faut les calculer. Les coefficients liés à k sont notés ax et les coefficients liés à k' sont notés ax'.

Pour le point 0/0/0 :  $a_0 = e^{a_0'} - 2 = e^{2,66} - 2 = 12,3$

En utilisant chaque fois les valeurs de +1 du coefficient considéré et 0 pour les autres :

$$a_0 + ax = e^{a_0'} * e^{ax'} - 2 \Leftrightarrow ax = e^{a_0'} * e^{ax'} - 2 - a_0$$

Ces équations permettent d'obtenir les coefficients de chaque facteur et interaction. Les interactions étant négligeables, seuls les coefficients des facteurs sont donnés dans la figure II.8.

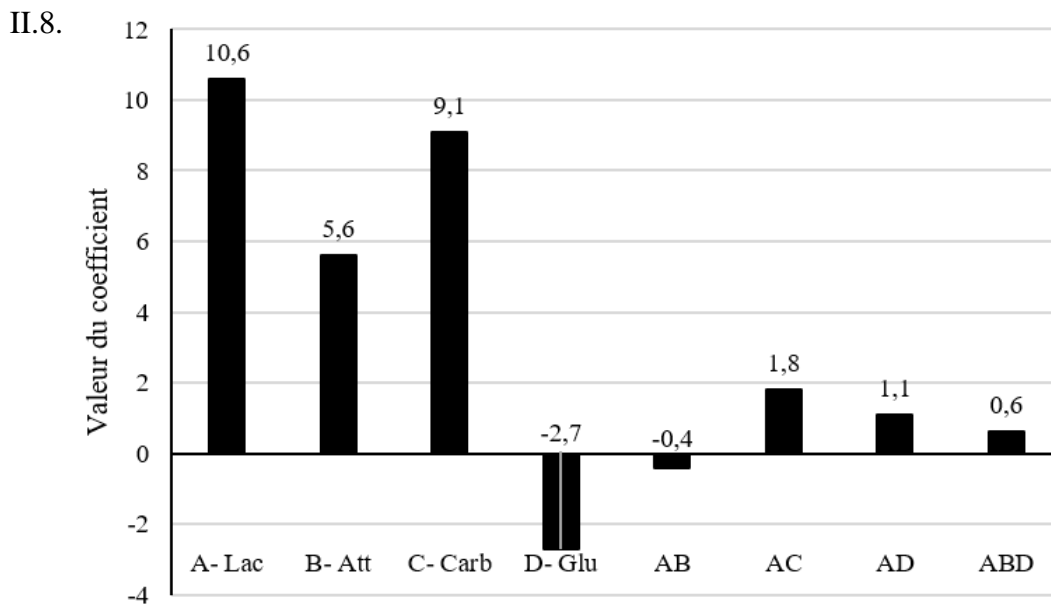


Figure II.8 : Effets du modèle utilisant l'équation ajustée liant les quatre facteurs à la réponse k, en unités codées.

### 2.3.2.3 Indice d'écoulement (n)

Le modèle utilisant l'équation ajustée pour lier la réponse k aux facteurs ne peut pas être réutilisé car il s'agit d'une autre grandeur physique. Il faut recommencer l'approche complète en commençant par générer un plan d'expériences avec le modèle à priori pour lier les différents facteurs à la réponse n. Dans un premier temps, l'utilisation d'une équation polynomiale avec interaction a permis de créer le plan d'expériences. Cela ne signifie pas que cette modélisation mathématique soit celle qui sera retenue. Pour la réponse n, la *p-value* du modèle est de 0,1528, ce modèle est donc non-significatif. La *p-value* du manque d'ajustement est de 0,0119, elle est significative. Le modèle n'est pas utilisable avec l'équation utilisée à priori.

*Modification de l'équation à priori, mise au point de l'équation ajustée pour la réponse n*

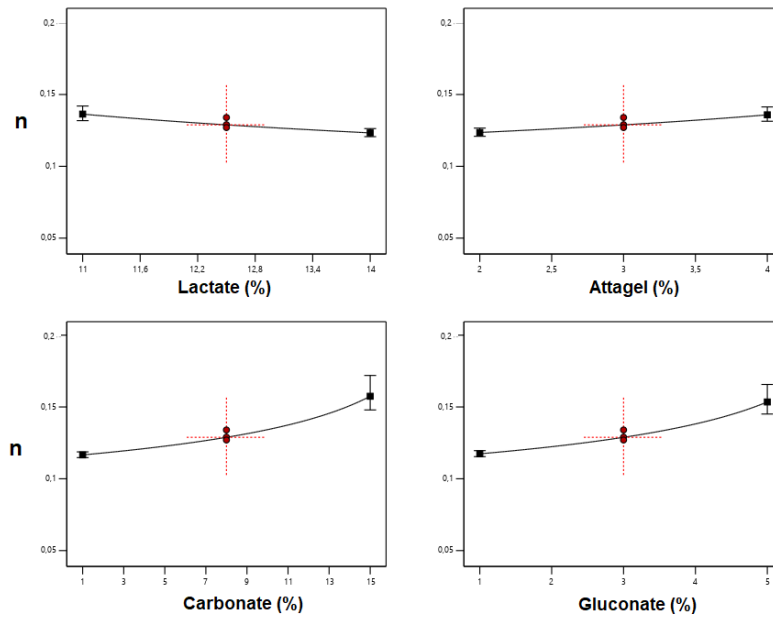
Une amélioration possible du plan d'expériences serait l'usage d'une équation plus adaptée au phénomène physique étudié que l'équation par défaut (à priori). Le logiciel permet plusieurs modifications de l'équation liant la réponse n et les quatre facteurs. De nombreuses modifications ont été effectuées à l'équation initiale, dans le but de réduire l'erreur d'ajustement et d'améliorer le modèle. L'équation donnant le meilleur modèle est :  $y' = (y - 0,04)^{-3}$ . Avec cette équation, la *p-value* du modèle est de 0,0008 et la *p-value* du manque d'ajustement est de 0,6347. Le modèle est donc valable. La nouvelle équation est donc :

$$(n - 0,04)^{-3} = n' \leftrightarrow \frac{1}{(n-0,04)^3} = n' \leftrightarrow \frac{\sqrt[3]{1}}{\sqrt[3]{(n-0,04)^3}} = \sqrt[3]{n'} \leftrightarrow \frac{1}{n-0,04} = \sqrt[3]{n'} \leftrightarrow n = \frac{1}{\sqrt[3]{n'}} + 0,04$$

$$n = \frac{1}{\sqrt[3]{a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_4x_4 + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{14}x_1x_4 + a_{23}x_2x_3 + a_{24}x_2x_4 + a_{34}x_3x_4 + a_{123}x_1x_2x_3 + a_{124}x_1x_2x_4 + a_{134}x_1x_3x_4 + a_{234}x_2x_3x_4 + a_{1234}x_1x_2x_3x_4} + 0,04}$$

Pour ce modèle, la *p-value* du modèle est de 0,0008 ; ce qui signifie que le modèle à une probabilité de 0,008 % d'être faux. Ce modèle est donc significatif. La *p-value* du manque d'ajustement est de 0,6347 ; ce qui signifie que l'erreur d'ajustement a 63,47% de probabilité d'être nulle. Cette erreur est donc non significative. Le coefficient de détermination ( $R^2$ ) est de 0,9916, le modèle est donc très proche des valeurs mesurées. La figure II.9 présente le diagramme des effets de chaque facteur en utilisant l'équation ajustée.

Les diagrammes des effets montrent que le modèle est correct pour les points délimitant le modèle ainsi que pour le centre du domaine expérimental. Cette équation est donc bien adaptée pour lier la réponse  $n$  aux quatre facteurs.



Ces graphiques représentent la réponse ( $n$ ) en fonction de la valeur du facteur en pourcentage. Les points rouges représentent les points centraux.

Figure II.9 : Diagrammes des effets des quatre facteurs et la réponse  $n$  obtenus avec l'équation ajustée.

#### Evaluation des coefficients du modèle ajusté pour la réponse $n$

La démarche d'évaluation des coefficients de la réponse  $n$  ainsi que l'analyse de la variance sont présentées dans l'Annexe 3. Cette approche montre que l'interaction AD n'est pas significative. Ces modifications permettent de fixer l'équation utilisée pour ce plan d'expériences, en coordonnées codées :

$$n = \frac{1}{1427 + 304 * Lac - 286 * Att - 793 * Carb - 729 * Glu - 394 * Lac * Att - 486 * Lac * Carb + 88 * Att * Carb + 207 * Att * Glu + 579 * Carb * Glu + 512 * Lac * Att * Carb + 333 * Lac * Att * Glu + 86 * Lac * Carb * Glu - 83 * Att * Carb * Glu - 403 * Lac * Att * Carb * Glu} + 0,04$$

#### Coefficients des éléments significatifs liés à la réponse $n$

Le système de comparaison des coefficients codés ne se fait pas avec ces coefficients liés à  $n$  mais bien avec les coefficients directement liés à la réponse  $n$ . Cela permet de simplifier

l'équation obtenue. Les coefficients liés à n sont notés ax et les coefficients liés à n' sont notés ax'.

Pour le point 0/0/0 : 
$$a_0 = \frac{1}{\sqrt[3]{a_0'}} + 0,04 = 0,129$$

En utilisant chaque fois les valeurs de +1 du coefficient considéré et 0 pour les autres :

$$a_0 + ax = \frac{1}{\sqrt[3]{a_0' + ax'}} + 0,04 \leftrightarrow ax = \frac{1}{\sqrt[3]{a_0' + ax'}} + 0,04 - a_0$$

Ces équations permettent d'obtenir les coefficients de chaque facteur et interaction. Les interactions étant négligeables, seuls les coefficients des facteurs sont donnés dans la figure II.10.

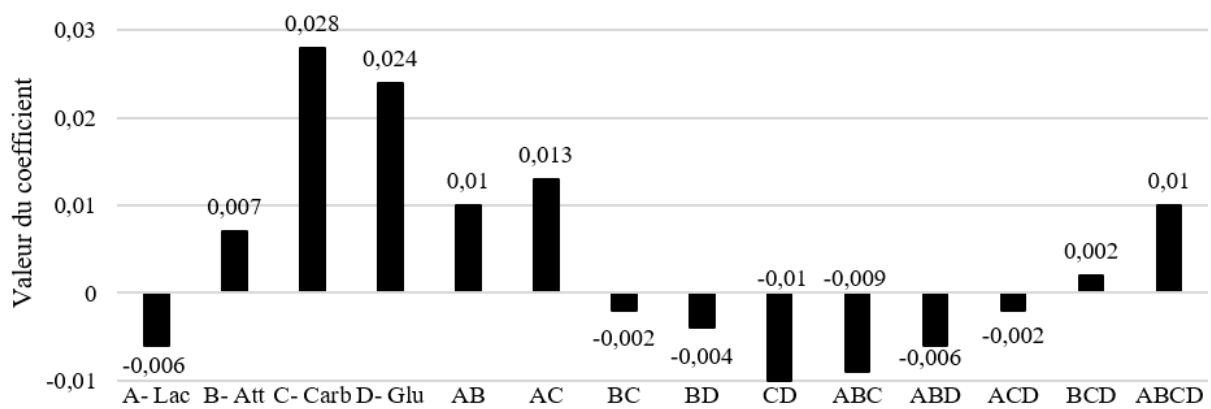


Figure II.10 : Effets du modèle utilisant l'équation ajustée liant les quatre facteurs à la réponse n, en unités codées.

### 2.3.3 Analyse des résultats et évaluation de l'effet des facteurs sur les réponses

La partie précédente a permis de déterminer un modèle liant la réponse k aux quatre facteurs et un modèle pour la réponse n aux quatre facteurs. Il s'agit de modèles simplifiés, les coefficients et les interactions non significatifs ont été retirés. Ces deux équations ont permis d'obtenir les coefficients pondérant les variables influentes sur les réponses étudiées. Les valeurs de ces coefficients sont présentées dans cette partie et ces résultats sont discutés pour répondre au premier objectif de cette étude : connaître l'effet du lactate de calcium, de l'Attigel 50, du carbonate de calcium et du gluconate de calcium sur l'indice de consistance et l'indice d'écoulement d'une formulation.

### 2.3.3.1 Indice de consistance (k)

Les coefficients présentés sont ceux obtenus à partir de l'équation suivante :

$$k = e^{2,660+0,557*Lac+0,328*Att+0,493*Carb-0,207*Glu-0,031*Lac*Att+0,116*Lac*Carb+0,075*Lac*Glu+0,039*Lac*Att*Glu} - 2$$

Cette équation permet d'obtenir des coefficients sous une autre forme que les coefficients en coordonnées codées. La modification logarithmique ne change pas les unités de la réponse. Les coefficients modifiés sont donc proportionnels aux coefficients codés mais n'ont pas les mêmes valeurs. En utilisant l'équation permettant la conversion des coefficients en coordonnées modifiées et des coefficients en coordonnées codées, les deux coefficients sont présentés dans le tableau II.4.

Tableau II.4 : Coefficients liants quatre facteurs à la réponse k.

Nom du coefficient	Valeurs modifiées	Valeurs codées
a <sub>0</sub>	2,66	12,3
A-Lac	0,56	10,6
B-Att	0,33	5,6
C-Carb	0,49	9,1
D-Glu	-0,21	- 2,7
AB	-0,03	- 0,4
AC	0,12	1,8
AD	0,07	1,1
ABD	0,04	0,6

Le coefficient a<sub>0</sub> est une constante représentant la valeur de la réponse k au point 0/0/0/0 correspondant à la formulation L12,5A3C8G3. Il s'agit de la valeur calculée à partir du modèle. La valeur moyenne des trois réponses k mesurées pour ce point est 12,2, pour un écart type de 0,67. Cet écart type est faible par rapport à la valeur de la moyenne.

Seuls les coefficients en valeurs codées sont utilisables pour des comparaisons et déterminent l'effet d'un facteur ou d'une interaction.

Les résultats obtenus montrent que les facteurs ont les effets les plus importants. Le lactate de calcium, l'Attigel et le carbonate de calcium ont des coefficients positifs. Le gluconate de calcium a un effet négatif sur la réponse k.

L'interaction AB, entre le lactate de calcium et l'Attigel a un faible effet négatif. L'association des augmentations des facteurs 1 et 2 donne des valeurs de la réponse k moins élevée que prévu, sur la base des coefficients des facteurs.



L'interaction AC entre le lactate de calcium et le carbonate de calcium a un faible effet positif. L'association des augmentations des facteurs 1 et 3 donne des valeurs de la réponse k plus élevée que prévu, sur la base des coefficients des facteurs. L'usage du logiciel Design Expert® permet de dire que l'effet du lactate de calcium est plus important à 15% de carbonate de calcium que celui à 1% de carbonate de calcium. On observe que le coefficient de l'interaction entre le lactate de calcium et le carbonate de calcium est le plus élevé parmi les interactions testées. Il lie en effet les deux coefficients les plus influents.

L'interaction AD entre le lactate et le gluconate a un faible effet positif. Le gluconate a un effet négatif et le lactate a un effet positif sur la réponse. L'interaction positive entre ces deux facteurs indique que cette relation ne s'inverse pas. Le lactate de calcium augmente la réponse pour n'importe quelle concentration de gluconate de calcium, mais à 5% de gluconate de calcium, l'effet du lactate est plus faible que celui obtenu avec 1% de gluconate de calcium.

On observe une cohérence entre les coefficients : le coefficient de l'interaction AD est de 1,1, celle AB de -0,4, leur association numérique fait 0,7. Leur association réelle (ABD) est de 0,6, ce qui est comparable.

### 2.3.3.2 Indice d'écoulement (n)

La réponse utilisée est l'indice d'écoulement n. Il s'agit d'un indice permettant d'apprécier le caractère rhéofluidifiant d'une formulation. Plus l'indice n est faible plus la formulation est rhéofluidifiante.

Les coefficients présentés sont ceux obtenus à partir de l'équation suivante :

$$n = \frac{1}{1427 + 304 * Lac - 286 * Att - 793 * Carb - 729 * Glu - 394 * Lac * Att - 486 * Lac * Carb + 88 * Att * Carb + 207 * Att * Glu + 579 * Carb * Glu + 512 * Lac * Att * Carb + 333 * Lac * Att * Glu + 86 Lac * Carb * Glu - 83 * Att * Carb * Glu - 403 * Lac * Att * Carb * Glu} + 0,04$$

Cette équation permet d'obtenir des coefficients sous une autre forme que les coefficients en coordonnées codées. La modification change les unités de la réponse, ces coefficients modifiés n'ont pas le même signe que les coefficients codés. En utilisant l'équation présentée dans un point précédent pour la conversion, les coefficients en coordonnées modifiées et en coordonnées codées sont présentés dans le tableau II.5.

Tableau II.5 : Coefficients liant quatre facteurs à la réponse n.

Nom du coefficient	Valeurs modifiées	Valeurs codées
a <sub>0</sub>	1427,61	0,129
A-Lac	303,71	-0,006
B-Att	-286,42	0,007
C-Carb	-793,43	0,028
D-Glu	-728,78	0,024
AB	-393,7	0,010
AC	-485,79	0,013
BC	87,83	-0,002
BD	206,79	-0,004
CD	579,49	-0,010
ABC	511,96	-0,009
ABD	332,67	-0,006
ACD	85,73	-0,002
BCD	-82,85	0,002
ABCD	-402,63	0,010

Le coefficient a<sub>0</sub> est une constante représentant la valeur de la réponse n au point 0/0/0/0 correspondant à la formulation L12,5A3C8G3. La valeur moyenne des 3 réponses mesurées pour ce point est 0,130, pour un écart type de 0,0036. Elle est proche de la valeur 0/0/0 calculée par le logiciel, 0,129.

Les coefficients des facteurs, correspondants au carbonate de calcium, au gluconate de calcium et à l'Attigel sont positifs. Celui du lactate est négatif. L'effet le plus important est celui du carbonate, suivi de près par celui du gluconate puis l'Attigel et enfin le lactate.

Les interactions ayant l'effet le plus fort sont celles faisant intervenir le lactate : AC, AB ABCD, ABC et ACD. Une seule interaction ne faisant pas intervenir le lactate a un effet comparable, c'est l'interaction CD. L'interaction AC reste positive mais pour une concentration de lactate plus importante, le seuil pour lui faire changer sa tendance est 12,3% de carbonate de calcium. L'interaction AB est similaire et la concentration d'Attigel nécessaire pour modifier la tendance du lactate est de 3,7%. Le gluconate n'est pas capable de modifier la tendance du lactate dans ce domaine expérimental. Ces résultats sont obtenus avec le logiciel Design Expert.

Ces résultats montrent que le carbonate et le gluconate ont les effets positifs les plus importants sur la réponse. L'Attigel a aussi un effet positif mais plus restreint. Le lactate, quant à lui, a un effet négatif sur la réponse n. Cela fait de lui le seul composé de cette étude capable de réduire la réponse et donc d'augmenter l'aspect rhéofluidifiant d'une formulation.

La capacité du lactate à augmenter la rhéofluidification d'une formulation dépend de la concentration de carbonate de calcium. A une concentration inférieure à 14,5%, le lactate de calcium augmente l'aspect rhéofluidifiant des formulations alors qu'à une concentration égale ou supérieure l'effet est inversé. La capacité rhéofluidifiante du lactate de calcium la plus importante est obtenue avec une concentration de 1% de carbonate de calcium. Cet effet est observable aussi dans le cas de l'Attigel. Au-dessus de 3,7% d'Attigel, le lactate de calcium a un effet positif sur la réponse. Si l'objectif est d'avoir une formulation la plus rhéofluidifiante possible, il serait intéressant d'augmenter la concentration de lactate de calcium tout en baissant celle de carbonate de calcium et d'Attigel.

### **2.3.4 Outil prédictif des réponses**

La partie précédente a permis de créer deux modèles mathématiques liant efficacement les quatre facteurs considérés aux deux réponses : l'indice de consistance  $k$  et d'écoulement  $n$ . Ces modélisations permettent aussi de réaliser un outil prédictif pour obtenir les valeurs de  $n$  et  $k$  en fonction de la composition des milieux. Il pourrait aussi être utilisé pour déterminer la composition des milieux permettant de produire des valeurs spécifiées de  $n$  et de  $k$ , et inversement.

Jusqu'à présent, les équations liant les facteurs à chaque réponse étaient exprimées en valeurs codées. Ce système de coordonnées permettait de comparer les différents éléments et de déterminer leurs impacts sur les réponses sans se soucier de leurs valeurs réelles disparates. Dans ces plans d'expériences, les quatre facteurs ont les mêmes unités, des pourcentages massiques. Cependant, leurs domaines expérimentaux réels ne sont pas les mêmes. Par exemple, pour passer de la valeur codée 0 à la valeur +1, pour le facteur B (Att) c'est une augmentation de 1% et pour le facteur C (Carb) il s'agit d'une augmentation de 7%. Ces différences empêchent la comparaison entre les coefficients liés aux équations en coordonnées réelles. Ces équations ne sont donc pas comparables entre les plans d'expériences et ne renseignent pas sur l'effet d'un élément sur la réponse. Elles servent de base à l'outil prédictif

car elles permettent de calculer une valeur de réponse théorique (k ou n) pour n'importe quelle formulation contenue dans le plan d'expériences.

Pour le plan d'expériences à quatre facteurs, l'équation liant les quatre facteurs à la réponse k, en coordonnées absolues, donne :

$$k = e^{-1,95+0,28*Lac+0,58*Att-0,07*Carb-0,41*Glu-0,2*Lac*Att+0,01*Lac*Carb+0,02*Lac*Glu+0,001*Lac*Att*Glu} - 2$$

L'équation liant les quatre facteurs à la réponse n, en coordonnées absolues, donne :

$$n = \frac{1}{-24689,45 + 2530,20 * Lac + 7946,16 * Att + 2197,97 * Carb - 1147,75 * Glu - 702,81 * Lac * Att - 202,11 * Lac * Carb - 641,04 * Att * Carb - 58,77 * Att * Glu + 19,27 * Carb * Glu + 53,71 * Lac * Att * Carb + 16,76 * Lac * Att * Glu + 3,19 * Lac * Carb * Glu + 14,70 * Att * Carb * Glu - 1,65 * Lac * Att * Carb * Glu} + 0,04$$

Ces deux équations permettent de calculer directement les réponses k et n en rentrant les valeurs de chaque composant en pourcentage massique. Pour ce plan aussi, ces équations peuvent être utilisées sous cette forme en dehors du logiciel Design Expert®. Ce logiciel peut fournir la composition de formulations théoriques avec une réponse définie.

## 2.4. Conclusion

L'utilisation d'un plan d'expériences a permis de lier la composition d'une formulation à ses indices de consistance (k) et d'écoulement (n). Une approche statistique a montré que les deux équations liant les quatre facteurs à chacune des deux réponses sont significatives et ne sont pas le fruit du hasard. Cela permet la production d'un outil robuste permettant d'atteindre les deux objectifs de cette partie.

La mise au point de ce plan d'expériences permet de répondre à la première partie de l'objectif de cette étude : déterminer les effets du lactate de calcium, de l'Attigel 50, du carbonate de calcium et du gluconate de calcium sur l'indice de consistance et d'écoulement d'une formulation :

- L'augmentation de la concentration de lactate de calcium augmente l'indice de consistance (k) et augmente l'indice d'écoulement (n). Il s'agit du composé avec le plus d'impact sur la réponse k.

- L'augmentation de la concentration de carbonate de calcium augmente l'indice k et l'indice n. Il s'agit du composé qui a le plus d'impact sur la réponse n.
- L'augmentation de la concentration d'Attagel augmente l'indice k et l'indice n, comme le fait le carbonate de calcium.
- L'augmentation de la concentration de gluconate de calcium diminue l'indice k et augmente l'indice n.

L'interaction AC, entre le lactate de calcium et le carbonate de calcium, est l'interaction la plus importante pour les réponses k et n.

Pour la réponse k, l'augmentation de la concentration de carbonate de calcium augmente l'effet du lactate de calcium sur la réponse et inversement.

Pour la réponse n, l'augmentation de la concentration du carbonate de calcium modifie l'effet du lactate de calcium. En dessus de 12,4 % de carbonate de calcium, le lactate de calcium diminue la réponse n, au-dessus de ce seuil de carbonate, le lactate de calcium augmente la réponse n, comme les autres composés. Cet effet est observable aussi dans le cas de l'Attagel avec un seuil à 3,7 %. Un récapitulatif des coefficients des quatre facteurs est présenté dans le tableau II.6.

*Tableau II.6 : Récapitulatif des effets des quatre facteurs sur les deux réponses k et n.*

Les valeurs sont présentées de façon relative. Les + indiquent des effets positifs et les - des effets négatifs d'un facteur sur la réponse. Le nombre de + ou - donne l'importance relative de ce facteur par rapport aux autres.

	Réponse k	Réponse n
Facteur A (lactate de calcium)	++++	-
Facteur B (Attagel 50)	++	+
Facteur C (carbonate de calcium)	+++	+++
Facteur D (gluconate de calcium)	-	+++

Le plan d'expériences à quatre facteurs permet aussi de répondre à la première partie de l'objectif de cette étude : créer un outil prédictif pour prévoir la composition d'une formulation à partir d'indices k et n donnés. Cet outil sera utilisé dans le chapitre 3 pour obtenir une formulation adaptée à une taille de fissure donnée.

# Chapitre 3 : Lien entre une taille de fissure et les paramètres rhéologiques d'une formulation injectable

## 3.1. Introduction

Le chapitre précédent fait le lien entre la composition d'une formulation et ses paramètres rhéologiques ( $k$  et  $n$ ). Ce chapitre a pour objectif de mettre en relation ces paramètres rhéologiques et la taille d'une fissure, puisque ces données ne sont pas encore disponibles dans la littérature. En couplant les informations de ces deux chapitres, il sera possible de faire le lien entre la composition d'une formulation et la taille d'une fissure dans laquelle elle peut être injectée. Pour cela il faut déterminer la viscosité maximale pouvant rentrer dans une fissure (borne haute) et la viscosité minimale (borne basse) nécessaire pour éviter un drainage. Des dispositifs de fissures reproductibles et de tailles contrôlées sont utilisés pour cette étude. Lors d'une injection dans un matériau cimentaire, la géométrie de la fissure est unique. Cela va donc modifier la contrainte appliquée au fluide injecté. Pour cela, il est nécessaire d'utiliser un fluide dont la viscosité est peu modifiée par la contrainte appliquée, plus précisément un fluide ayant un comportement proche d'un comportement linéaire, où la viscosité est fixe quelle que soit la contrainte appliquée. Les fluides choisis sont des suspensions ayant différentes concentrations de carboxyméthylcellulose (CMC) et donc des viscosités différentes. L'injection de ces différents fluides dans des fissures de tailles contrôlées va permettre de lier la taille de la fissure et les limites de viscosité utilisables.

## 3.2. Matériels et méthodes

### 3.2.1 Fabrication des fissures contrôlées

Pour déterminer les bornes de viscosité haute et basse injectables dans une fissure de taille fixe, il est nécessaire d'avoir un dispositif de simulation de fissure contrôlée. Le dispositif expérimental est composé de deux cubes de mortier séparés par un espace dont la taille est régulée. Le dispositif est présenté de façon schématique dans la figure III.1.

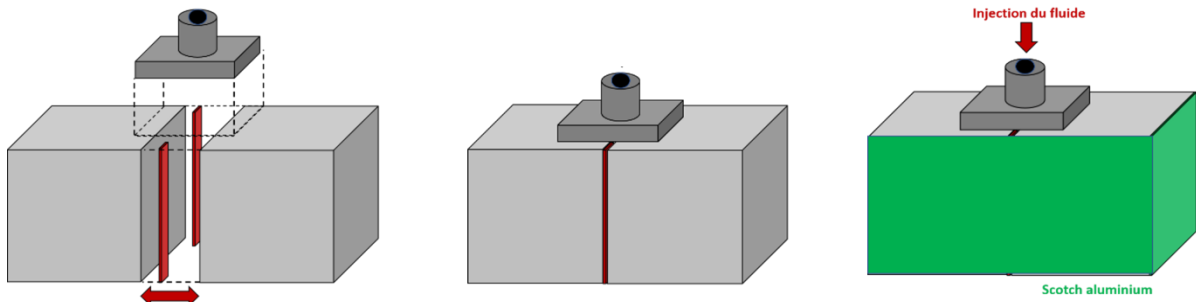


Figure III.1 : Dispositif de fissures de tailles contrôlées.

Les cubes de mortier font 5 x 5 x 5 cm. Ils sont produits avec le mortier standard de la procédure de la norme ASTM C109. L'espace entre les cubes est obtenu grâce à l'utilisation de plaques en acier ou en laiton d'épaisseur fixe (76  $\mu\text{m}$  ou 256  $\mu\text{m}$ ). Deux rectangles de 1 x 5 cm sont utilisés. Ils sont placés sur les bords des cubes, puis les deux cubes sont maintenus à l'aide d'aluminium adhésif. Les épaisseurs des écarteurs sont 44  $\mu\text{m}$  (sans écarteur, il s'agit de l'espace dû à la rugosité de la surface des cubes de mortier), 76  $\mu\text{m}$  (arrondi à 100  $\mu\text{m}$  à cause de la rugosité de la surface de mortier), 256  $\mu\text{m}$ , 512  $\mu\text{m}$  (deux écarteurs de 256  $\mu\text{m}$ ) et 1024  $\mu\text{m}$  (quatre écarteurs de 256  $\mu\text{m}$ ). Ces tailles de fissures sont simplifiées pour la suite des essais (de 45, 100, 250, 500 et 1000  $\mu\text{m}$  (Figure III.2)).



Figure III.2 : Différentes tailles (45, 100, 250, 500 et 1000  $\mu\text{m}$ ) de fissures contrôlées réalisées.

### 3.2.2 Suspensions de carboxyméthylcellulose (CMC)

Le carboxyméthylcellulose de sodium *medium viscosity* (CMC) (Sigma-Aldrich) est un polymère.

### ***3.2.2.1 Mise en suspension du CMC***

Les différentes suspensions de CMC ont été mises en suspension dans 100 mL d'eau distillée à 50°C sous agitation magnétique, à la vitesse maximale, le temps nécessaire pour une dissolution complète. Les suspensions ont été mises au repos pendant vingt-quatre heures avant les mesures rhéologiques pour assurer une hydratation complète du CMC. Avant le passage dans le rhéomètre, les suspensions sont homogénéisées par trois retournements du récipient. Les différentes concentrations utilisées sont 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 et 5 %.

### ***3.2.2.2 Mesures rhéologiques des suspensions de CMC utilisées***

Les essais ont été réalisés avec un rhéomètre à cylindres coaxiaux de marque Anton-Parr modèle MCR 302 équipé avec un cylindre cannelé CC27/P6. Les mesures sont faites à 20°C. Le programme utilisé est nommé « rhéogramme » (Fig. II.4). Il est constitué d'une période d'homogénéisation de cent secondes à un gradient de cisaillement de 1000 s<sup>-1</sup> puis de 8 paliers de vingt secondes, avec 100 mesures par palier, ayant un gradient de cisaillement décroissant. Les gradients de cisaillement sont 625-500-250-100-50-10-1-0.1 s<sup>-1</sup>.

Pour chaque gradient de cisaillement, la viscosité utilisée est la valeur moyenne des 20 dernières mesures de viscosité du palier. Les mesures rhéologiques obtenues durant ces essais permettent de tracer une représentation graphique, en échelle logarithmique, de la viscosité moyenne en fonction du gradient de cisaillement.

### **3.2.3 Injection dans une fissure de taille contrôlée**

Une fois le dispositif de fissure contrôlée réalisé, un injecteur est plaqué sur la face supérieure de la fissure. L'injecteur est un rectangle d'aluminium de 3 x 5 x 1 cm. Il est troué en son centre avec un filetage pour accueillir un adaptateur permettant d'y coupler une seringue standard. Sur la face en contact du mortier, un joint torique en caoutchouc entoure le trou de sortie du fluide. Le dispositif monté est présenté dans la figure III.3.





Figure III.3 : Dispositif d'injection d'un fluide dans une fissure contrôlée.

### 3.2.4 Détermination des limites basses et hautes d'injection

La limite basse est la viscosité minimale d'un fluide empêchant son drainage post injection. Les suspensions de CMC sont injectées dans les fissures de tailles contrôlées jusqu'à leur remplissage. Après retrait de la seringue, si le trou de l'injecteur se vide en moins d'une minute, la formulation est considérée comme trop fluide pour la taille de fissure testée.

La limite haute est la viscosité maximale d'un fluide pouvant rentrer dans une fissure. Les suspensions de CMC sont injectées dans les fissures de tailles contrôlées et différents cas sont observés : pénétration dans la fissure sans difficulté (sans résistance sur le piston de la seringue), avec une faible pression appliquée, avec une forte pression ou sans pénétration.

### 3.2.5 Formulations injectables produites

La formulation L13G3A4C15 a été produite avec 13 % de lactate de calcium, 3 % de gluconate de calcium, 4 % d'Attigel 50 et 15 % de carbonate de calcium

### 3.3. Résultats et discussion

#### 3.3.1 Caractéristiques rhéologiques des suspensions de CMC

Les paramètres rhéologiques des suspensions de CMC (0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 et 5 %), en particulier leur viscosité en fonction du gradient de cisaillement (en échelle logarithmique), sont présentés en Annexe 4. Comme ces suspensions ne sont pas des fluides rhéofluidifiants, le modèle d'Ostwald ne peut donc pas être utilisé. Par conséquent, l'équation de tendance découlant des données mesurées a été utilisée afin de déterminer une équation reliant le gradient de cisaillement à la viscosité et à son coefficient de détermination ( $R^2$ ) pour les différentes suspensions de CMC testées (Tableau III.1).

Tableau III.1 : Equations de tendance liant le gradient de cisaillement ( $x$ ) à la viscosité ( $y$ ) pour chaque suspension de CMC testée.

Fluides	Equations liant le gradient de cisaillement à la viscosité	$R^2$
CMC 0,5%	<b>0,1&lt;x&lt;10 :</b> $y = 0,0171x^{0,0385}$	0,780
	<b>10&gt;x&gt;625 :</b> $y = -3*10^{-6}x + 0,0181$	0,955
CMC 1%	$y = 5*10^{-8}x^2 - 6*10^{-5}x + 0,0545$	0,996
CMC 2%	$y = 5*10^{-12}x^4 - 8*10^{-9}x^3 + 4*10^{-6}x^2 - 0,001x + 0,2257$	0,999
CMC 3%	$y = -0,458\ln(x) + 3,3304$	0,992
CMC 4%	$y = -0,727\ln(x) + 5,0497$	0,992
CMC 5%	$y = -0,939\ln(x) + 6,4$	0,992

Pour la suspension CMC 0,5 %, l'équation obtenue est caractérisée par un faible coefficient de détermination (0,780). Une agitation plus puissante (supérieure à  $10 \text{ s}^{-1}$ ) a permis d'augmenter le coefficient de détermination à 0,955. Pour les 5 autres concentrations de CMC, une seule équation de tendance unique est suffisante et leurs  $R^2$  supérieurs à 0,992 permettent leurs utilisations. On obtient une viscosité qui varie peu en fonction du gradient de cisaillement, comme ce qui était attendu par rapport à ce qui a été réalisé précédemment (131).

#### 3.3.2 Injection des suspensions de CMC dans des fissures de taille contrôlée

Les six suspensions de CMC sont injectées dans les différentes fissures de taille contrôlée (45, 100, 250, 500 et 1000  $\mu\text{m}$ ) afin de déterminer la limite haute et la limite basse de viscosité pour une taille de fissure donnée.

### 3.3.2.1 Détermination de la limite haute de viscosité des suspensions de CMC

L'objectif est de déterminer la limite haute de viscosité d'une taille de fissure donnée. Les résultats sont présentés dans le tableau III.2.

Le fluide le plus visqueux à rentrer, sans devoir forcer sur la seringue, dans une fissure sans écarteur (45  $\mu\text{m}$ ) est 1 % de CMC. Pour des fissures de 100, 250, 500 et 1000, peuvent rentrer respectivement une suspension de 2, 3, 4 et 5 % de CMC.

Tableau III.2 : Détermination de la limite haute de viscosité des suspensions de CMC testées.

V = pénétration sans difficulté. V diff. = pénétration avec faible pression. X = pénétration avec une trop forte pression ou sans pénétration.

Taille des fissures	CMC 0,5%	CMC 1%	CMC 2%	CMC 3%	CMC 4%	CMC 5%
45 $\mu\text{m}$	V	<b>V</b>	V diff.	X	X	X
100 $\mu\text{m}$	V	V	<b>V</b>	V diff.	X	X
250 $\mu\text{m}$	V	V	V	<b>V</b>	V diff.	X
500 $\mu\text{m}$	V	V	V	V	<b>V</b>	V diff.
1000 $\mu\text{m}$	V	V	V	V	V	<b>V</b>

### 3.3.2.2 Détermination de la limite basse de viscosité des suspensions de CMC

L'objectif est de déterminer la limite basse de viscosité d'une taille de fissure donnée. Les résultats sont présentés dans le tableau III.2.

Tableau III.3 : Détermination de la limite basse de viscosité des suspensions de CMC testées.

V = absence de drainage en au moins 1 minute. X = drainage en 1 minute ou moins.

Les carrés noirs sont les situations non injectables.

Taille des fissures	CMC 0,5%	CMC 1%	CMC 2%	CMC 3%	CMC 4%	CMC 5%
45 $\mu\text{m}$	<b>V</b>	V	V	V		
100 $\mu\text{m}$	X	<b>V</b>	V	V	V	
250 $\mu\text{m}$	X	X	<b>V</b>	V	V	V
500 $\mu\text{m}$	X	X	X	<b>V</b>	V	V
1000 $\mu\text{m}$	X	X	X	X	<b>V</b>	V

Le fluide le moins visqueux capable de rester dans une fissure sans écarteur (45  $\mu\text{m}$ ) sans drainage est une suspension de 0,5 % de CMC. Pour des fissures de 100, 250, 500 et 1000, peuvent rester en place sans drainage respectivement une suspension de 1, 2, 3, et 4 % de CMC.

### 3.3.2.3 Choix des limites de viscosité pour les suspensions de CMC

Les limites basse et haute de viscosité pour les suspensions de CMC ont été sélectionnées sur la base des critères suivants :

- Pour la limite haute de viscosité, la concentration choisie est la plus élevée qui pénètre sans difficulté dans la fissure.
- Pour la limite basse de viscosité, la concentration choisie est la plus faible qui reste dans la fissure sans drainage.

Le tableau III.4 indique, pour chaque taille de fissure, les limites basse et haute de viscosité pour les suspensions de CMC.

*Tableau III.4 : Limites basse et haute de viscosité des suspensions de CMC testées en fonction de la taille de la fissure.*

Taille des fissures ( $\mu\text{m}$ )	Concentration de CMC (%)	
	Limite basse de viscosité	Limite haute de viscosité
45	0,5	1
100	1	2
250	2	3
500	3	4
1000	4	5

### 3.3.3 Gradient de cisaillement théorique induit par une injection avec une seringue

Le fluide doit être injecté avec une seringue de 20 mL. Cette dernière est constituée d'un cylindre de 2 cm de diamètre intérieur contenant 20 mL de fluide, suivi d'un rétrécissement (tube de sortie) ayant un cylindre plus fin de 0,3 cm de diamètre intérieur. Le calcul du gradient de cisaillement se fait uniquement dans le cylindre plus fin. Comme les turbulences générées par le passage dans le rétrécissement ne sont pas prises en compte, le gradient de cisaillement calculé est sous-estimé alors que la viscosité calculée est surestimée. La surestimation des

valeurs de viscosité est intéressante car cela donne une marge entre les essais d'injection menés en conditions de laboratoire et ceux menés *in situ*. En effet, les dispositifs expérimentaux de laboratoire permettent de générer des fissures reproductibles mais très régulières. Les fissures d'ouvrages réels peuvent présenter des irrégularités et une taille d'ouverture variable.

Pour estimer le gradient de cisaillement, la partie à l'intérieur du cylindre fin est considérée comme un plan mobile (le fluide) et un plan fixe (les bords en plastique du cylindre). La vitesse maximale de cisaillement est celle exercée au centre du cylindre. La distance entre la zone où la vitesse de cisaillement est maximale et la zone où la vitesse de cisaillement est nulle correspond au rayon du cylindre, égal à 0,15 cm. La formule de l'écoulement de Couette permet de faire le lien entre ces différentes valeurs :

$$\text{Gradient de cisaillement } (\dot{\gamma}) = \frac{V_{max}}{r} = \frac{2 D}{\pi r^3}$$

D = débit (cm<sup>3</sup>/s ou mL/s)

r = rayon en cm

La seringue fait un volume de 20 mL. Pour ces essais, le fluide est expulsé lentement pour limiter la pression exercée par le fluide lors de son utilisation. Il faut environ 10 s pour la vider lentement soit un débit de 2 mL/s. Cela donne :

$$(\dot{\gamma}) = \frac{2*2}{\pi 0,15^3} = 377 \text{ s}^{-1}$$

En utilisant ce type de seringue, le gradient de cisaillement lors d'une injection est de 377 s<sup>-1</sup> au minimum, vu que cette valeur est sous-estimée.

### 3.3.4 Différentes valeurs de viscosité utilisables pour les différentes tailles de fissures

#### 3.3.4.1 Valeurs de viscosité adaptées aux différentes tailles de fissures

Les mesures rhéologiques des suspensions de CMC, couplées avec le gradient de cisaillement d'une injection avec une seringue de 20 mL (377 s<sup>-1</sup>) permet de déterminer la viscosité de chaque suspension de CMC lors d'une injection dans une fissure. Pour chaque taille de fissure, il est possible de déterminer les limites haute et basse de viscosité pour un gradient de cisaillement de 377 s<sup>-1</sup> à partir des équations de tendance des courbes reliant le gradient de cisaillement à la viscosité (Tableau III.1).

Dans le cas de la fissure de 100  $\mu\text{m}$ , les injections entre les cubes ont montré que la limite basse d'injection correspond à la suspension CMC 1% et la limite haute est la suspension CMC 2% (Tableau III.4). Les équations de tendance des courbes de ces deux suspensions de CMC permettent de lier un gradient de cisaillement (x) en  $\text{s}^{-1}$  à la viscosité (y) correspondante en Pa.s.

$$\text{Limite basse (CMC 1\%)} : y = 5 \cdot 10^{-8} x^2 - 6 \cdot 10^{-5} x + 0,0545$$

$$\text{Limite haute (CMC 2\%)} : y = 5 \cdot 10^{-12} x^4 - 8 \cdot 10^{-9} x^3 + 4 \cdot 10^{-6} x^2 - 0,001x + 0,2257$$

Pour un gradient de cisaillement égal à  $377 \text{ s}^{-1}$  ( $x = 377$ ), la limite basse de viscosité (CMC 1%) est égale à 0,039 Pa.s et la limite haute de viscosité (CMC 2%) est égale à 0,090 Pa.s. Les différentes viscosités pour chaque taille de fissure sont présentées dans le tableau III.5.

*Tableau III.5 : Viscosités hautes et basses pour chaque taille de fissure pour un gradient de cisaillement de  $377 \text{ s}^{-1}$ .*

Taille des fissures ( $\mu\text{m}$ )	Limite basse de viscosité (Pa.s)	Limite haute de viscosité (Pa.s)
45	0,017	0,039
100	0,039	0,090
250	0,090	0,613
500	0,613	0,737
1000	0,737	0,830

### **3.3.4.2 Indices de consistance et d'écoulement adaptés aux différentes tailles de fissures**

Les milieux d'injection pour la biocicatrisation des fissures sont rhéofluidifiants. Le modèle d'Oswald permet de lier ces limites basses et hautes de viscosité à des fluides rhéofluidifiants. Le gradient de cisaillement au repos n'est pas nul. Il est fixé à  $10 \text{ s}^{-1}$  car la propre masse du fluide induit une légère contrainte de cisaillement. Le gradient de cisaillement de l'injection est celui induit par une seringue de 20 mL.

Pour chaque taille de fissure, le gradient de cisaillement lors de l'injection ( $377 \text{ s}^{-1}$ ), le gradient de cisaillement au repos ( $10 \text{ s}^{-1}$ ), les viscosités minimale et maximale sont connues. En fixant la valeur de l'indice d'écoulement (n), cela permet de calculer des valeurs de l'indice de consistance (k) minimal et maximal à partir des équations suivantes :

$$\text{Viscosité } (\eta) = k * \dot{\gamma}^{n-1} \leftrightarrow \frac{\eta}{k} = \dot{\gamma}^{n-1} \leftrightarrow k = \frac{\eta}{\dot{\gamma}^{n-1}}$$

$$k_{min} = \frac{\eta_{min}}{10^{n-1}} \quad \text{et} \quad k_{max} = \frac{\eta_{max}}{377^{n-1}}$$

Pour chaque taille de fissure, les valeurs de k minimal et k maximal sont calculées pour différentes valeurs de n et un gradient de cisaillement de 377 s<sup>-1</sup>. Pour k minimal, le gradient de cisaillement est celui du fluide au repos. Pour le k maximal, le gradient de cisaillement est celui du fluide lors de l'injection. L'ensemble des résultats sont regroupés dans le Tableau III.8.

### 3.3.5 Mise au point de milieux d'injection rhéofluidifiants adaptés à une taille de fissure

Le plan d'expériences a permis le développement d'un outil prédictif permettant de déterminer les indices k et n d'une formulation en connaissant sa composition. Ces informations, couplées avec celles présentées dans le tableau III.6, permettent d'adapter la composition d'une formulation en fonction de la taille de la fissure à injecter.

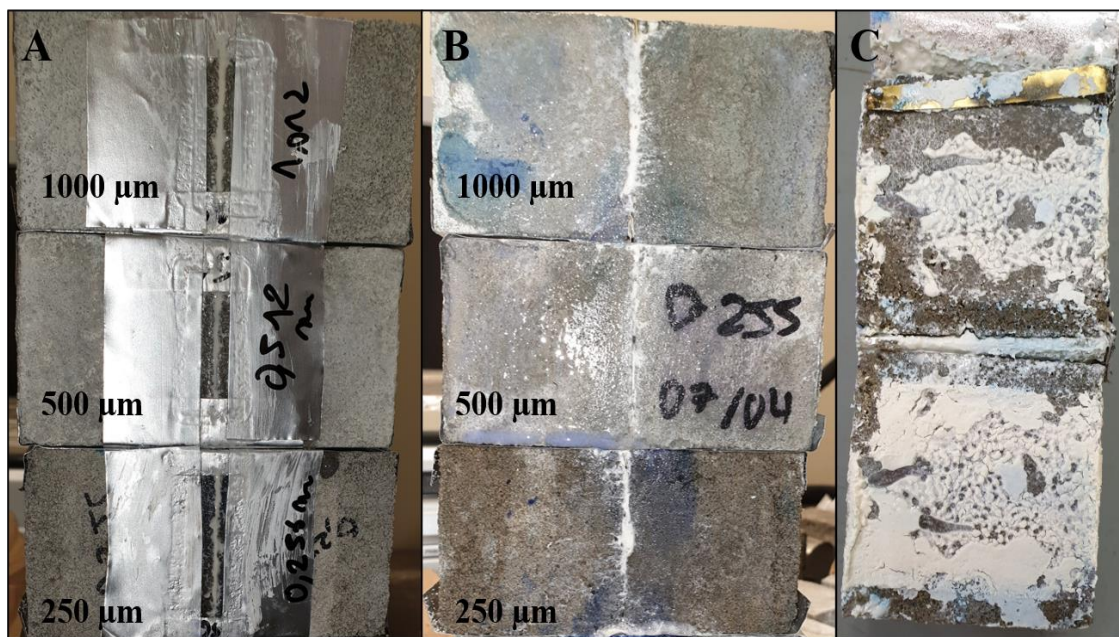
Tableau III.6 : Limites minimales et maximales des indices de consistance (k) pour chaque taille de fissure et pour différentes valeurs d'indice d'écoulement (n) pour un gradient de cisaillement de 377 s<sup>-1</sup>.

Taille de la fissure (μm)	n = 0,1		n = 0,15		n = 0,2		n = 0,25	
	k <sub>min</sub>	k <sub>max</sub>	k <sub>min</sub>	k <sub>max</sub>	k <sub>min</sub>	k <sub>max</sub>	k <sub>min</sub>	k <sub>max</sub>
45	0,1	8,1	0,1	6,0	0,1	4,5	0,1	3,3
100	0,3	18,7	0,3	13,9	0,2	10,4	0,2	7,7
250	0,7	127,7	0,6	94,9	0,6	70,6	0,5	52,4
500	4,9	153,5	4,3	114,1	3,9	84,8	3,4	63,1
1000	5,9	172,9	5,2	128,5	4,7	95,5	4,1	71,0
Taille de la fissure (μm)	n = 0,3		n = 0,35		n = 0,4		n = 0,5	
	k <sub>min</sub>	k <sub>max</sub>	k <sub>min</sub>	k <sub>max</sub>	k <sub>min</sub>	k <sub>max</sub>	k <sub>min</sub>	k <sub>max</sub>
45	0,1	2,5	0,1	1,8	0,1	1,4	0,1	0,8
100	0,2	5,7	0,2	4,3	0,2	3,2	0,1	1,7
250	0,5	39,0	0,4	29,0	0,4	21,5	0,3	11,9
500	3,1	46,9	2,7	34,8	2,4	25,9	1,9	14,3
1000	3,7	52,8	3,3	39,2	2,9	29,2	2,3	16,1

### 3.3.5.1 Injection d'une formulation dans des fissures modèles de 250, 500 et 1000 $\mu\text{m}$

La formulation L13G3A4C15 est produite, le plan d'expériences permet de déterminer une valeur  $k$  théorique de 38,2 et une valeur  $n$  théorique de 0,177. Dans le tableau III.6, la valeur de  $n$  (0,177) n'est pas présente. Il est nécessaire d'arrondir à une valeur de  $n$  de 0,2. Comme la valeur de  $k$  (38,2) est supérieure aux  $k$  min pour chaque taille de fissure, cette formulation ne risque pas d'être drainée lors de son injection dans des fissures ayant une ouverture de 45 à 1000  $\mu\text{m}$ . En revanche, comme la valeur de  $k$  est inférieure aux  $k$  max uniquement pour des fissures de 250  $\mu\text{m}$  à 1000  $\mu\text{m}$ , elle ne peut donc pas être injectée sans pression dans une fissure ayant une ouverture de 45 et 100  $\mu\text{m}$ .

Cette formulation est ensuite injectée dans un dispositif ayant les 3 tailles de fissures contrôlées suivantes : 250, 500 et 1000  $\mu\text{m}$ . Après l'injection, les fissures sont placées verticalement quinze minutes avant de les photographier (Fig. III.4).



A : face avant injectée. B : face arrière. C : cubes ouverts 30 min après l'injection (250  $\mu\text{m}$ ).

Figure III.4 : Injection de la formulation L13G3A4C15 dans des fissures de taille contrôlée (250, 500 et 1000  $\mu\text{m}$ ).

On constate que quinze minutes après l'injection les fissures sont toujours remplies de milieu d'injection puisqu'il apparait sur la face avant injectée et la face arrière du dispositif d'étude (Fig. III.7A et B). Au bout de trente minutes, la fissure de 250  $\mu\text{m}$  est ouverte (Fig. III.7.C). On peut donc voir la disposition spatiale de la formulation dans la fissure, celle-ci a rempli la fissure.



Pour confirmer les résultats précédents, une injection a été réalisée sur des fissures de 45 et 100  $\mu\text{m}$  d'ouverture. La formulation n'entre pas dans la fissure de 45  $\mu\text{m}$  d'ouverture. Dans le cas de la fissure de 100  $\mu\text{m}$ , il est possible de faire rentrer la formulation dans la fissure en augmentant la pression d'entrée. Cependant, cette augmentation de pression modifie le gradient de cisaillement du fluide.

La formulation L13G3A4C15 peut donc être injectée dans des fissures de 250, 500 et 1000  $\mu\text{m}$  comme le prévoient les calculs théoriques. De plus, cette formulation n'est pas drainée dans des fissures de cette taille. Les tailles de fissures inférieures à la limite prévue par le calcul (45 ou 100  $\mu\text{m}$ ) ne sont pas injectables ou nécessitent une pression plus importante pour rentrer dans la fissure. Cela conforte l'usage de cette méthode prédictive pour la production de formulations rhéofluidifiantes injectables.

### ***3.3.5.2 Injection d'une formulation dans des fissures très fines (45 $\mu\text{m}$ )***

Pour développer des milieux injectables dans des fissures fines, le dispositif sans écarteur (45  $\mu\text{m}$ ) a été utilisé. Il s'agit du cas d'injection le plus difficile et le modèle le plus proche de la plupart des fissures de la maquette VeRCoRs (139, 140).

En premier lieu, le milieu doit être rhéofluidifiant. La valeur moyenne de l'indice d'écoulement des différentes formulations utilisées pour le plan d'expériences à quatre facteurs est de 0,154. Il s'agit d'une valeur de l'indice  $n$  très faible. Cela signifie qu'une formulation ayant un indice  $n$  de 0,15 ou moins serait très rhéofluidifiante. La valeur égale à 0,15 est la valeur de  $n$  maximale tolérée dans le cas de la fissure sans écarteur. De plus, il est important que la formulation soit la plus fluide possible, il est donc intéressant de minimiser  $n$ .

Le milieu doit aussi avoir une viscosité adéquate. Pour cela, il est nécessaire d'utiliser le tableau III.6 pour obtenir les valeurs  $k$  min et  $k$  max adaptées à cette taille de fissure. Cela donne un  $k$  min de 0,1 et un  $k$  max de 6,0 Pa.s.

Ces informations permettent de déterminer quatre critères de choix :

**Critère 1** : minimiser l'indice d'écoulement ( $n$ ).

**Critère 2** : avoir une valeur  $n$  égale ou inférieure à 0,15.

**Critère 3** :  $0,1 \text{ Pa.s} \leq k \leq 6,0 \text{ Pa.s}$ .

**Critère 4** : maximiser un composé à chaque fois (pour obtenir quatre formulations).

Les trois premiers critères sont liés à la rhéologie du milieu d'injection. Le 4<sup>ème</sup> critère est lié aux essais de biominéralisation. Il permet de vérifier si une des concentrations maximales d'un composé a un effet toxique pour la bactérie ou nocif sur l'activité biominéralisante de l'inoculum. Ces différents critères sont intégrés dans l'outil prédictif du logiciel Design Expert® permettant de sélectionner quatre milieux d'injection dont leur composition est indiquée dans le tableau III.7. Il s'agit des milieux nommés Lac max, Att max, Carb max et Glu max, qui ont respectivement la concentration maximale en lactate de calcium, l'Attigel 50, le carbonate de calcium et le gluconate de calcium. Pour obtenir des formulations candidates respectant ces quatre critères, l'outil prédictif doit maximiser la concentration en gluconate de calcium. Le gluconate de calcium est le seul composé capable de diminuer la valeur de k, maximiser ce composé permet au logiciel de se conformer au deuxième critère de choix. Une cinquième formulation (Gmin) est donc ajoutée en minimisant le facteur gluconate de calcium. Elle sert à évaluer l'effet d'une faible concentration en gluconate de calcium sur la biominéralisation.

*Tableau III.7 : Formulations candidates pour l'injection dans des fissures fines générées par l'outil prédictif du plan d'expériences à quatre facteurs.*

Formulations	Lac (%)	Att (%)	Carb (%)	Glu (%)	k	n
Lac max	<b>13,8</b>	2,0	1,0	5,0	5,9	0,123
Att max	11,3	<b>4,0</b>	1,2	4,2	5,4	0,140
Carb max	11,3	2,0	<b>15,0</b>	4,6	5,9	0,150
Glu max	12,3	3,0	3,2	<b>5,0</b>	5,7	0,150
Glu min	11,2	2,0	7,3	<b>1,0</b>	5,5	0,123

Les cinq formulations sont ensuite injectées à l'aide d'une seringue standard de 20 mL dans des fissures d'une taille contrôlée égale à 45 µm. Le but est de déterminer si les cinq milieux candidats, générés par le calcul théorique, peuvent être injectés dans des fissures sans écarteur (45 µm). Les milieux d'injections sont préparés et injectés avec une seringue standard. Chaque milieu est injecté dans le même dispositif. Il est rincé à l'eau distillée entre chacun. Les résultats obtenus quinze minutes après l'injection sont présentés dans la figure III.5. La face photographiée est celle du bas (l'injection a eu lieu sur la phase opposée).

Les cinq milieux d'injections rentrent dans la fissure de 45 µm et ne sont pas drainés après l'injection. La méthodologie développée permet donc de produire des formulations capables de pénétrer et de rester dans une fissure fine.

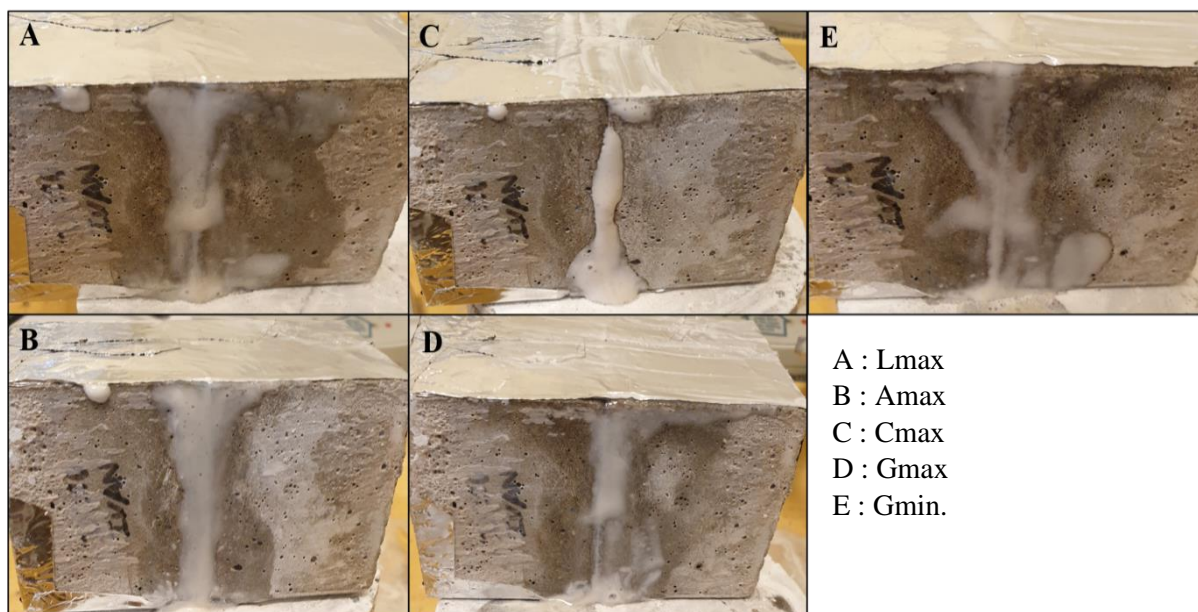


Figure III.5 : Injection des cinq formulations candidates dans une fissure de 45  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.5.3 Validation rhéologique de formulations adaptées à des fissures très fines (45 $\mu\text{m}$ )

Les essais précédents ont permis de confirmer la validité de la démarche, combinant l'injection entre des cubes et le plan d'expériences, pour mettre au point des formulations injectables pour une taille de fissure précise. Une autre validation est intéressante, celle de mesurer les paramètres rhéologiques  $k$  et  $n$  des cinq formulations créées. Ces formulations sont produites et leurs paramètres rhéologiques sont mesurés avec le même programme que celui utilisé pour le plan d'expériences. Les essais ne sont pas faits en même temps que ceux réalisés pour créer le plan d'expériences. D'autres facteurs que les quatre principaux ont peut-être changés (température du mélange, agitation et temps entre la mise en suspension et la mesure rhéologique). Cependant, les quatre facteurs choisis sont ceux ayant le plus d'impact sur les réponses  $k$  et  $n$ , ces changements n'induisent que de faibles modifications. Ces résultats sont présentés dans le tableau III.8.

Tableau III.8 : Valeurs rhéologiques ( $k$  et  $n$ ) mesurées et calculées des cinq formulations.

Indice de consistance ( $k$ )			
Formulation	Valeurs calculées	Valeurs mesurées	Différence
Lmax	5,9	8,5	2,6
Amax	5,4	3,9	-1,5
Cmax	5,9	5,8	-0,1
Gmax	5,7	5,2	-0,5
Gmin	5,5	5,4	-0,1
Indice d'écoulement ( $n$ )			
Formulation	Valeurs calculées	Valeurs mesurées	Différence
Lmax	0,123	0,153	0,030
Amax	0,140	0,189	0,049
Cmax	0,150	0,185	0,035
Gmax	0,150	0,157	0,007
Gmin	0,123	0,143	0,020

On constate que pour l'indice de consistance ( $k$ ), les valeurs calculées par l'outil prédictif du plan d'expériences sont proches des valeurs mesurées des formulations Cmax, Gmax et Gmin. Le plan d'expériences surévalue la valeur de  $k$  de la formulation Lmax. Cela explique pourquoi cette formulation était la plus difficile à injecter. Le plan d'expériences sous-évalue la valeur de  $k$  de la formulation Amax. Elle reste dans les valeurs d'injections théoriques.

Pour trois des cinq formulations les valeurs de  $k$  calculées sont les mêmes que celles mesurées. Pour les deux autres formulations il y a une faible différence. La formulation Lmax a une valeur de  $k$  légèrement supérieure à la valeur de  $k_{max}$  (6) pour la taille de fissure de  $45 \mu\text{m}$  (Fig. III.8). Cela se confirme lors de l'injection, il faut légèrement augmenter la pression pour l'injection de cette formulation dans les fissures très fines. L'augmentation de pression modifie le gradient de cisaillement appliqué à la formulation. Il s'agit d'un fluide rhéofluidifiant, cette augmentation de gradient de cisaillement diminue la viscosité et permet l'entrée du fluide dans la fissure.

On constate que pour l'indice de consistance ( $n$ ), les valeurs calculées par l'outil prédictif du plan d'expériences sont proches des valeurs mesurées pour toutes les formulations. Les différences entre les valeurs calculées et théoriques sont toutes inférieures à 0,05. Le plan d'expériences modélise correctement la réponse  $n$ .

### 3.4. Conclusion

L'injection dans des fissures de taille contrôlée a permis de lier des tailles de fissures aux indices  $k$  et  $n$  d'un fluide rhéofluidifiant. En couplant ces informations avec l'outil prédictif généré dans le chapitre 2, il est possible de lier la composition d'une formulation à une taille de fissure.

Cette méthodologie peut être utilisée pour générer une formulation adaptée à la taille des fissures à injecter. Les fissures pouvant être injectées théoriquement ont pu l'être en pratique. Celles qui ne rentrent pas les conditions permettant l'injection (comme c'est le cas des fissures de 45 et 100  $\mu\text{m}$ ) ne sont pas injectables sans exercer une pression trop importante. Cela conforte la méthodologie développée pour des fissures de tailles moyennes à larges (250 à 1000  $\mu\text{m}$ ).

Cette méthodologie a permis également de générer des formulations adaptées à des fissures fines, qui seront utilisées pour l'injection dans les fissures présentes sur les murs intérieurs de la maquette VeRCoRs. Les formulations générées sont effectivement injectables dans les fissures contrôlées sans écarteur. Cela confirme la démarche. L'étape suivante sera d'évaluer le potentiel biominéralisant de l'inoculum microbien indigène dans ces formulations.

## Chapitre 4 : Mise au point d'un consortium microbien indigène

Les deux chapitres précédents ont permis de mettre au point cinq milieux injectables dans une fissure fine (de l'ordre de 100  $\mu\text{m}$ ) représentatives des fissures de la maquette VeRCoRs. Pour appliquer le procédé de bioréparation à un ouvrage réel, des prélèvements microbiens ont été réalisés à partir des matériaux cimentaires placés en milieu extérieur pour concevoir un inoculum microbien adapté à ce milieu et pouvant biominéraliser du carbonate de calcium.

### 4.1. Introduction

Ce travail de recherche fait suite à deux thèses (7,8) réalisées par la même équipe de chercheurs. Ces deux thèses ont étudié la biocicatrisation de mortiers fissurés par une souche bactérienne de collection appartenant à l'espèce *Bacillus pseudofirmus*. Le potentiel de biocicatrisation de fissures par cette bactérie a été éprouvé en conditions de laboratoire à 20°C (7, 8, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137 et 138) et *in situ* (139 et 140). Cependant, cette espèce bactérienne a un optimum de croissance en laboratoire de 30°C, et elle est utilisée en culture pure ce qui limite les capacités d'adaptation de cet inoculum à des conditions environnementales différentes. Toutefois, pour optimiser le procédé de biocicatrisation en conditions réelles, il est préférable de disposer d'un consortium de micro-organismes constitué d'un mélange de micro-organismes représentatifs du milieu d'étude (matériaux cimentaires) et adaptés aux conditions environnementales d'un milieu extérieur (notamment une température inférieure ou égale à 20°C). La mise au point de ce consortium microbien se fait en trois étapes successives (Fig. IV.1) :

- La première étape consiste à réaliser des prélèvements environnementaux de liquides en contact avec des matériaux cimentaires, de solides (sols, granulats) et à la surface de matériaux cimentaires. Les micro-organismes présents dans ou sur ces échantillons sont mis en culture en laboratoire puis mélangés.
- La deuxième étape, qui correspond à une étape de sélection, vise à favoriser la survie des micro-organismes capables de biominéraliser du carbonate de calcium. La sélection est basée sur une croissance microbienne à une température réaliste pour un ouvrage en béton

(20°C) et à un pH basique (pH de 9-10 représentatif d'un béton carbonaté) ainsi que sur la consommation du lactate de calcium comme source de carbone et de calcium.

- La troisième étape est l'obtention du consortium qui repose sur des repiquages successifs dans le même milieu pour augmenter la sélection des micro-organismes biominéralisants.

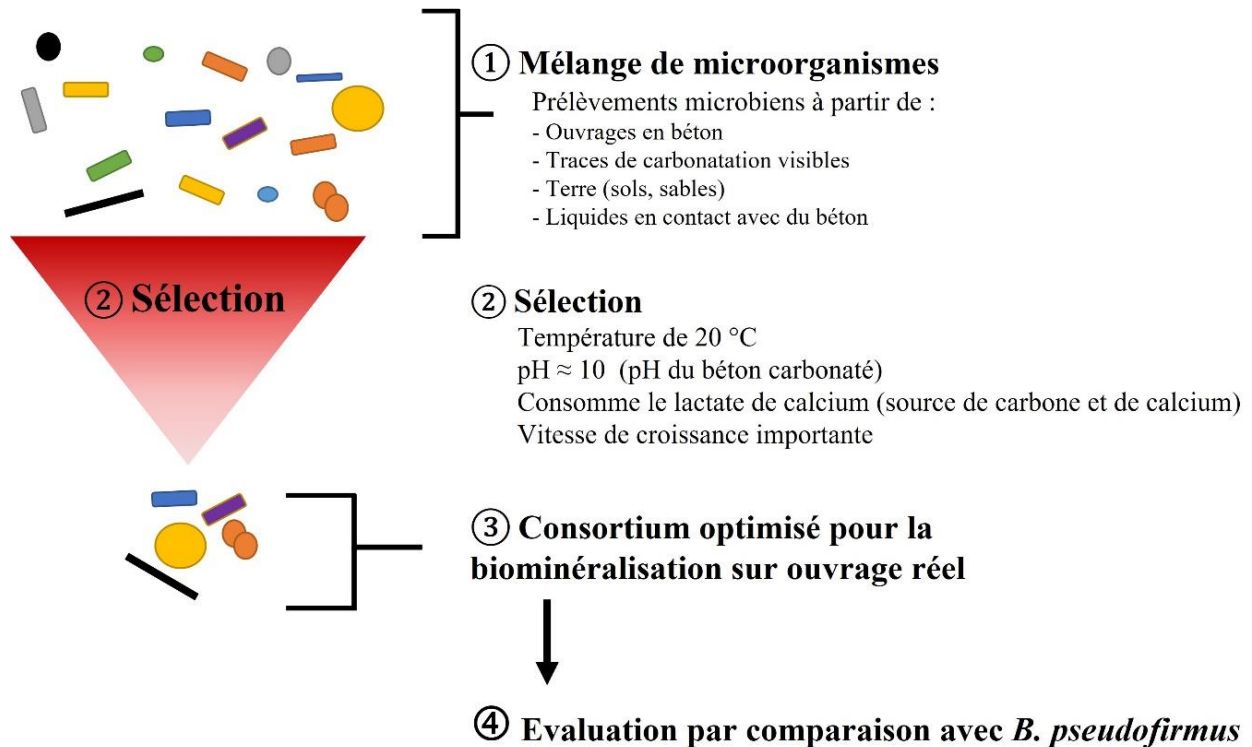


Figure IV.1 : Schéma explicatif de l'obtention du consortium biominéralisant.

## 4.2. Matériels et méthodes

### 4.2.1 Milieux utilisés

Les tampons sont réalisés avec du bicarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ) (Sigma Aldrich) et du carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Sigma Aldrich). Les milieux de culture sont produits avec du D-glucose anhydre (Sigma Aldrich), du Nutriment Broth (NB) (Difco<sup>TM</sup>), de l'extrait de levure (Biokar<sup>®</sup>), du lactate de calcium penta-hydraté (Sigma Aldrich) et du gluconate de calcium monohydraté (Sigma Aldrich). La liste suivante présente la composition détaillée des tampons et des milieux :

- **Le tampon 1, tampon carbonate/bicarbonate pH 9,8**, est préparé en mélangeant 80 mL d'eau distillée, 4,2 g de NaHCO<sub>3</sub> et 5,3 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, puis en ajustant le volume à 100 mL.
- **Le tampon 2, tampon carbonate/bicarbonate pH 10,6**, est préparé en mélangeant 80 mL d'eau distillée, 1,05 g de NaHCO<sub>3</sub> et 9,27 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, puis en ajustant le volume à 100 mL.
- **Le milieu 0 (préculture)** : ajouter 8 g NB à 1 L d'eau distillée tamponné à pH 9,7 avec le tampon 1.
- **Le milieu 1 (prélèvement)** : ajouter 8 g NB et 8,26 g D-glucose à 900 mL eau distillée. Tamponner à pH de 9,6 avec le tampon 1, puis en ajustant le volume à 1 L.
- **Le milieu 2** (NB à pH 9,9) : ajouter 8 g NB et 8,26 g D-glucose à 900 mL eau distillée. Tamponner à pH de 9,9 avec le tampon 2, puis en ajustant le volume à 1 L.
- **Le milieu 3** (NB à pH 10,15) : ajouter 8 g NB et 8,26 g D-glucose à 900 mL eau distillée. Tamponner à pH de 10,15 avec le tampon 2, puis en ajustant le volume à 1 L.
- **Le milieu 4** : ajouter 3 g d'extrait de levure et 50 g de lactate de calcium à 1 L d'eau distillée.
- **Le milieu 5** : ajouter 3 g d'extrait de levure, 50 g de lactate de calcium et 25 g de gluconate de calcium à 1 L d'eau distillée.

Les milieux sont stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes à l'exception des milieux 4 et 5 stérilisés par filtration avec un filtre de 0,2 µm stérile. Du glucose est utilisé comme source de carbone pour les milieux 1-3 car il s'agit du glucide le plus commun d'utilisation par les micro-organismes.

## **4.2.2 Prélèvements microbiens de France**

### ***4.2.2.1 Prélèvements environnementaux***

Les différents prélèvements sont constitués d'éléments solides, de milieux liquides et de frottis faits sur des surfaces de matériaux cimentaires. Ils ont été menés au niveau d'une aire de stockage du CERI Matériaux et Procédés de l'IMT Nord Europe (Douai) en décembre 2020.



### *Matrices solides :*

Différentes matrices solides (sol, sable) ont été prélevées en milieu extérieur et mis dans un flacon stérile. Au laboratoire, 15 ou 20 mL de milieu 1 sont introduits dans chaque flacon. Les flacons sont ensuite vortexés trente secondes puis sont incubés à 20°C pendant vingt-quatre heures, avec le bouchon partiellement dévissé. Trois prélèvements ont été effectués et sont présentés dans la figure IV. 2.



Les flèches rouges indiquent le lieu de prélèvement.

*Figure IV.2 : Sites des prélèvements solides effectués.*

- Le prélèvement 1 (S1) est constitué de 23,1 g de sol prélevé dans un récipient en plastique laissé ouvert en milieu extérieur pendant plusieurs années (Fig. IV.2A). Celui-ci a été introduit dans un flacon de prélèvement stérile, dans lequel a été ajouté 20 mL de milieu 1.
- Le prélèvement 2 (S2) est constitué de 37,7 g de sable prélevé dans un sac laissé ouvert en milieu extérieur pendant plusieurs années, puis additionné de 15 mL de milieu 1 (Fig. IV.2B).
- Le prélèvement 3 (S3) est constitué de 26,9 g de sol prélevé dans une gouttière en contact régulier avec des matériaux cimentaires (ciment, morceaux de mortier ou béton), puis additionné de 15 mL de milieu 1 (Fig. IV.2C).

### *Milieus liquides*

5 mL d'échantillons liquides ont été prélevés dans un tube stérile contenant 5 mL de milieu 1 stérile. Une fois au laboratoire, les tubes sont mélangés avec un vortex pendant cinq secondes puis ils sont incubés à 20°C vingt-quatre heures, avec le bouchon partiellement dévissé. Trois prélèvements liquides ont été effectués et sont présentés dans la figure IV. 3.



Figure IV.3 : Sites des prélèvements liquides effectués.

- Le prélèvement 1 (L1) est 5 mL de liquide contenu dans un bac en acier rempli d'eau contenant des morceaux de bétons (Fig. IV.3A). Ce bac a été mis à l'extérieur et soumis aux intempéries pendant plusieurs années.
- Le prélèvement 2 (L2) est constitué de 5 mL de liquide contenu dans un bac plastique sans couvercle rempli d'eau contenant des morceaux de bétons (Fig. IV.3B). Les sachets en plastique ne sont pas fermés hermétiquement, l'eau est en contact avec le béton. Ce bac a également été placé à l'extérieur et soumis aux intempéries pendant plusieurs années.
- Le prélèvement 3 (L3) est constitué de 5 mL de liquide contenu dans un bac plastique avec un couvercle à moitié en place, rempli d'eau contenant des morceaux de bétons et du carton (Fig. IV.3C). Les sachets en plastique ne sont pas fermés hermétiquement, l'eau est en contact avec le béton. Ce bac a été stocké à l'extérieur, soumis aux intempéries pendant plusieurs années.

#### *Surface de matériaux cimentaires*

La zone de prélèvement (10 x 10 cm) a été frottée énergiquement avec un coton tige imbibé de milieu 1 sur la surface sélectionnée, puis a été introduit dans le tube contenant 7,5 mL de milieu 1 en veillant à suspendre le prélèvement. Les tubes ont été mélangés avec un vortex pendant trente secondes puis, ils sont incubés à 20°C pendant vingt-quatre heures avec le bouchon partiellement dévissé. Quatre prélèvements à la surface de bétons ont été effectués (Fig. IV. 4).



Figure IV.4 : Sites des prélèvements réalisés à la surface de bétons ou de pâtes cimentaires.

- Le prélèvement 1 (Sur1) (Fig. IV.4A) est réalisé à la surface d'une dalle de béton.
- Le prélèvement 2 (Sur2) (Fig. IV.4B) est effectué à la surface d'une seconde dalle de béton. Des traces d'organismes photosynthétiques sont visibles.
- Le prélèvement 3 (Sur3) (Fig. IV.4C) est réalisé à la surface d'un échantillon de pâtes cimentaires élaboré par impression 3D et stocké à l'extérieur depuis au moins une année.
- Le prélèvement 4 (Sur4) (Fig. IV.4D) est réalisé à la surface d'un mur en béton.

#### *Amplification des prélèvements microbiens*

Après une nuit d'incubation à 20°C, tous les échantillons (solides, liquides et de surface) sont mélangés avec un vortex pendant dix secondes pour remettre en suspension les éléments solides. 5 mL de chaque tube sont transférés dans 100 mL de milieu 1 dans un erlenmeyer de 250 mL, refermé avec un bouchon en coton. Cette culture est mise trois jours à 20°C sous agitation (150 rpm).

#### **4.2.2.2 Mélanges des différents prélèvements microbiens**

Au terme de ces trois jours de culture, trois mélanges, nommés M1, M2 et M3, sont réalisés à partir des différentes cultures issues des 10 prélèvements. Chaque mélange a été réalisé dans un erlenmeyer de 250 mL. La composition de chaque mélange est indiquée dans le tableau IV.1. L'évaluation de la croissance microbienne est réalisée par mesure indirecte de la concentration des cellules microbiennes, par la mesure de la densité optique (DO) à 600 nm. Dans un milieu ne contenant que de l'eau, des solutés et des micro-organismes cette densité optique est proportionnelle au nombre de cellules (vivantes ou mortes) dans le milieu, selon la loi de Beer-Lambert. Cette linéarité n'est applicable qu'en dessous d'une densité optique de 1. C'est pourquoi lorsque la densité optique dépasse la valeur de 1 le milieu de culture est dilué dans le liquide servant de blanc de mesure. Cette technique d'évaluation de la biomasse surestime la croissance microbienne car elle prend aussi en compte les cellules mortes. La démarche utilisée est une approche comparative et non absolue, la surévaluation des deux croissances évaluées ne pose pas de problème pour les comparer l'une avec l'autre. Les croissances microbiennes des dix cultures ont été évaluées par la mesure de la densité optique (DO) à 600 nm et les résultats sont reportés dans le tableau IV.1.

Tableau IV.1 : Composition des différents mélanges microbiens obtenus à partir des prélèvements réalisés.

Prélèvements	DO <sub>(600nm)</sub> (3 jours)	Volume de chaque prélèvement utilisé (mL)		
		M1	M2	M3 (sans solide)
Sur1	1,16			10
Sur2	0,20			20
Sur3	0,79			15
Sur4	0,13			20
S1	2,50*	10	10	0
S2	4,34*			0
S3	3,17*			0
L1	2,11			10
L2	0,70			15
L3	0,95			10

\* Densité optique (DO) biaisée par la présence de particules solides en suspension.

Les mélanges M1 et M2 sont des duplicats d'un mélange uniforme des dix cultures issues des différents prélèvements, à raison de 10 mL de chaque culture. Le mélange M3 (sans solide) est ajouté dans l'éventualité où les particules solides soient toxiques pour les micro-organismes du mélange. M1, M2 et M3 sont mélangés énergiquement, puis 1 mL est repiqué dans 100 mL de milieu 1 et est incubé 48 h à 20°C sous agitation (150 rpm).

Après 48 h, 0,5 mL de chaque mélange est repiqué dans 100 mL de milieu 1 et mis en culture vingt-quatre heures à 20°C sous agitation (150 rpm). Cette procédure est répétée trois fois. La mesure des densités optiques des différents repiquages de M1, M2 et M3 est présentée dans le tableau IV.2.

Tableau IV.2: Evaluation de la croissance microbienne des différents mélanges après les trois repiquages successifs.

Mélange	Densité optique à 600 nm		
	1 <sup>er</sup> repiquage	2 <sup>ème</sup> repiquage	3 <sup>ème</sup> repiquage
M1	2,89*	2,48	1,75
M2	2,91*	2,49	<b>1,92</b>
M3	2,13	1,59	1,85

\* DO biaisée par la présence de particules solides.

Pour les mélanges M1 et M2, chaque repiquage diminue la densité optique. Cela correspond à la dilution des particules solides présentes dans les sédiments prélevés. La présence de particules solides n'a pas empêché la croissance des micro-organismes puisque le mélange M3

présente une DO de 2,13 au 1<sup>er</sup> repiquage, qui diminue au cours des repiquages successifs. Le mélange M2 est donc celui qui présente une DO la plus élevée au troisième repiquage.

#### 4.2.3 Sélection des micro-organismes biominéralisants

Cette étape vise à sélectionner les micro-organismes capables de biominéraliser du carbonate de calcium à partir du mélange M2. La sélection est réalisée sur la capacité des micro-organismes à se développer à pH basique, à se développer une température de 20°C et à dégrader le lactate de calcium ou le gluconate de calcium comme sources de carbone et de calcium.

##### 4.2.3.1 Sélection par le pH

Le consortium sélectionné doit être capable de croître au moins à un pH de 9,6 et si possible à un pH supérieur à 10. Pour cela, 200 µl de M2 sont repiqués dans 100 mL de milieu 1 (pH 9,6), de milieu 2 (pH 9,9) et de milieu 3 (pH 10,15). Ces trois cultures sont mises 48 h à 20°C sous agitation (150 rpm). Les densités optiques en fin de culture sont présentées dans le tableau IV.3.

Tableau IV.3: Essais de sélection en fonction du pH.

Milieu	Densité optique à 600 nm
1 (pH 9,6)	1,92
2 (pH 9,9)	1,40
3 (pH 10,15)	1,16

Plus le pH des solutions est élevé et moins les micro-organismes prélevés se développent. Cependant, la densité optique obtenue après une croissance de vingt-quatre heures dans un milieu tamponné à un pH de 10,15 est importante (supérieure à 1,00). Cela montre que le mélange de micro-organismes supporte un pH supérieur à 10 (10,15) et est capable de se développer à ce pH. La culture dans le milieu 3 est nommée culture « pH10,15 ».

##### 4.2.3.2 Sélection par la source carbonée

Le consortium sélectionné doit pouvoir consommer du lactate de calcium et du gluconate de calcium. 200 µl de la culture pH10,15 sont mis en culture dans 100 mL de milieu 4 à base d'extrait de levure et de lactate de calcium. Cette culture est mise vingt-quatre heures à 20°C sous agitation (150 rpm). Après vingt-quatre heures, la DO<sub>600nm</sub> de cette culture est de 1,82.

200 µl de cette nouvelle culture sont mis en culture dans 100 mL de milieu 4. Cette culture est mise vingt-quatre heures à 20°C sous agitation (150 rpm). Après vingt-quatre heures, la DO<sub>600nm</sub> de cette culture est de 1,91.

200 µl de cette nouvelle culture sont mis en culture dans 100 mL de milieu 5 à base d'extrait de levure, de lactate de calcium et de gluconate de calcium. Cette culture est mise vingt-quatre heures à 20°C sous agitation (150 rpm). Après vingt-quatre heures, la DO<sub>600nm</sub> de cette culture est de 1,99. Cette culture dans le milieu 5 est nommée culture « LG ».

L'ensemble de ces repiquages et l'obtention systématique d'un DO élevée après vingt-quatre heures de croissance (supérieure à 1) montre que le mélange de micro-organismes présents dans la culture LG est capable de se développer en utilisant du lactate ou du gluconate de calcium.

#### **4.2.4 Finalisation du mélange microbien prélevé en France**

Pour s'assurer que le mélange LG ne contient que des micro-organismes sélectionnés, il est repiqué deux fois.

200 µl de culture LG sont utilisés pour inoculer 100 mL de milieu 5 dans un erlenmeyer de 250 mL puis mis en culture vingt-quatre heures à 20°C sous agitation (150 rpm). Cette étape est effectuée deux fois. Après ces deux repiquages, la DO<sub>600nm</sub> de cette culture est de 1,74. Cette culture dans le milieu 5 est nommée culture « prélèvement France ».

La figure IV.5 présente les trois étapes permettant l'obtention de la culture « prélèvement France ».

#### **4.2.5 Mélange microbien prélevé au Canada**

Des prélèvements environnementaux ont été réalisés dans trois stations du métro (Du collège, Lucien l'Allier et Snowdon) de la ville de Montréal en automne 2019. Les trois prélèvements ont été faits sur des surfaces (10 x 10 cm) de béton humide au voisinage de fissures desquelles s'écoulait un faible suintement d'eau. Une fois prélevés, ils sont incubés dans 100 mL de milieu 4. Après 48 heures de croissance, 10 mL de chaque prélèvement sont mélangés à 70 mL de milieu 4. Après 48 heures de croissance, 200 µl de cette culture sont utilisés pour inoculer 100 mL de milieu 4. Après vingt-quatre heures de croissance, ce milieu est la culture « prélèvement Canada ».

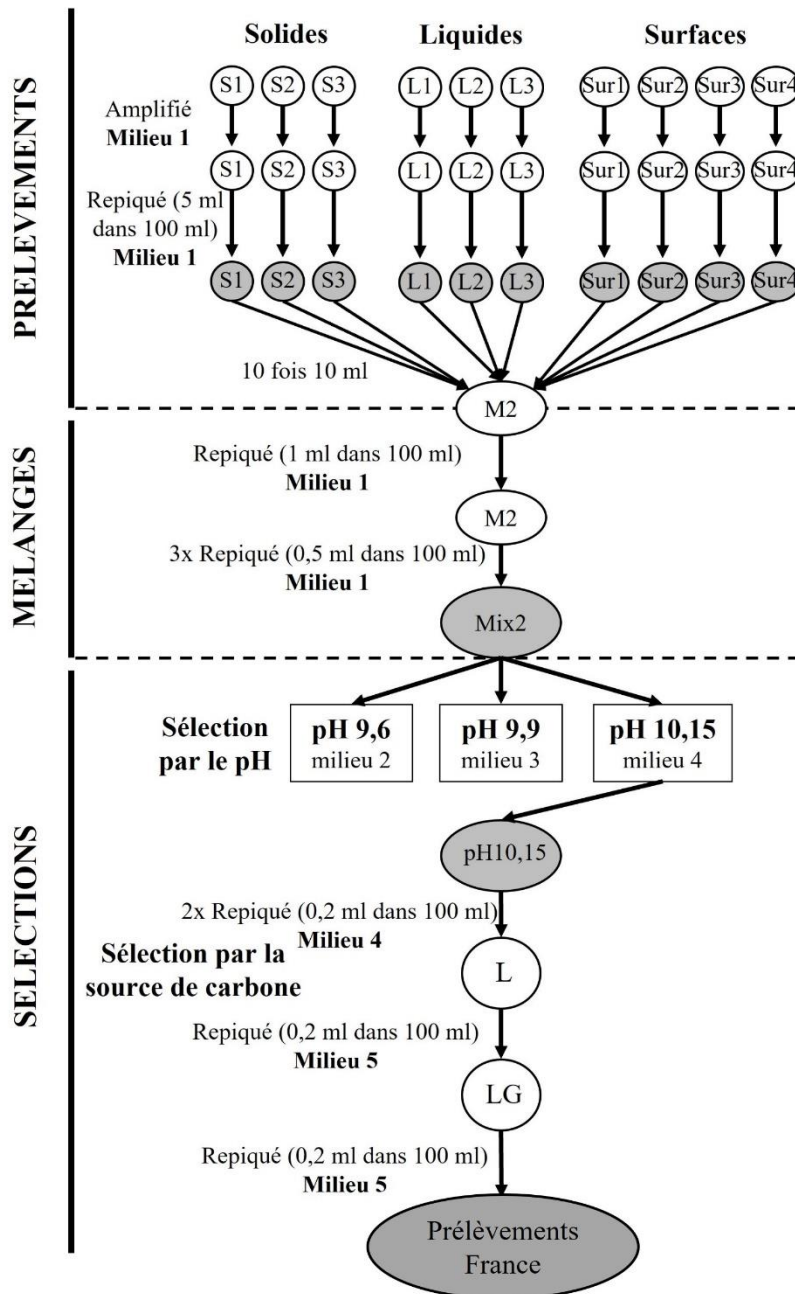


Figure IV.5 : Schéma récapitulant les étapes conduisant à l'obtention du « prélèvements microbiens réalisés en France ».

Des cryotubes de cette culture « prélèvement Canada » ont été réalisés fin 2019, à raison de 1 mL de culture et de 0,5 mL de glycérol (1/4). Des essais préliminaires ont montré des résultats de biominéralisation avec ce mélange.

Une préculture « prélèvement Canada » a été réalisée avec un cryotube « prélèvement Canada » dans 100 mL du milieu 0 dans un erlenmeyer de 250 mL, puis mis en culture vingt-quatre heures à 20°C sous agitation (150 rpm).

200 µl de cette préculture sont utilisés pour inoculer 100 mL de milieu 4 dans un erlenmeyer de 250 mL, puis mis en culture vingt-quatre heures à 20°C sous agitation (150 rpm). La densité optique à 600 nm de cette culture nommée « prélèvement Canada » est de 1,98.

#### **4.2.6 Constitution du consortium microbien indigène et étude de son potentiel biominéralisant**

A partir de la culture « prélèvement France » (DO = 1,74) et la culture « prélèvement Canada » (DO = 1,98), 200 µl de « prélèvement France » et 200 µl de « prélèvement Canada » sont utilisés pour inoculer 100 mL de milieu 5 dans un erlenmeyer de 250 mL puis mis en culture vingt-quatre heures à 20°C sous agitation (150 rpm). 200 µl de cette culture sont utilisés pour inoculer 100 mL de milieu 5 dans un erlenmeyer de 250 mL, puis mis en culture vingt-quatre heures à 20°C sous agitation (150 rpm). Le consortium ainsi produit est nommé « CBB2020 » (Consortium Biocicatrisation Béton 2020). Ce consortium microbien a été conservé à -80°C en cryotubes, à raison de 1 mL de culture et de 0,5 mL de glycérol (25 %).

##### **4.2.6.1 Croissance microbienne en fonction du pH**

Cette étape vise à soumettre le consortium microbien à différents pH, NB non tamponné ou NB tamponné (9,7 et 10,15) pour évaluer son potentiel de croissance. Le consortium est comparé à une souche de laboratoire connue pour être biominéralisante : une souche de la collection de micro-organismes DSMZ : *Bacillus pseudofirmus* (numérotée DSM 2516).

Un cryotube contenant *B. pseudofirmus* ou consortium CBB2020 est mis en culture dans des milieux NB à différents pH : non tamponné (pH ≈ 6,5), pH de 9,7 tamponné avec le tampon 1 et pH de 10,15 tamponné avec le tampon 2. Les essais ont été réalisés en duplicat. 100 mL des différents milieux sont inoculés avec 200 µl de la préculture de *B. pseudofirmus* (DO = 0,79) ou de CBB2020 (DO = 1,49) dans un erlenmeyer de 250 mL, puis mis en culture cinq jours à 20°C sous agitation (150 rpm). La densité optique (DO) du milieu est mesurée à 600 nm à deux jours et à cinq jours. Ce choix de deux points de mesure vient d'une volonté de déterminer la capacité de croissance des inocula aux différents pH à court et moyen terme et non de déterminer une cinétique de croissance.



#### **4.2.6.2 Croissance microbienne en fonction de la température**

Cette étape vise à soumettre le consortium microbien à différentes températures (10, 20 et 30°C) pour évaluer son potentiel de croissance, en comparaison avec *B. pseudofirmus*.

Les deux inocula microbiens (*B. pseudofirmus* et CBB2020) conservés à -80°C en cryotube, sont mis en culture dans des milieux NB (8 g.L<sup>-1</sup>) tamponnés à un pH de 9,7 avec le tampon 1. Les essais sont réalisés en duplicat. 100 mL du milieu sont inoculés avec 200 µl de la préculture de *B. pseudofirmus* ou de CBB2020 dans un erlenmeyer de 250 mL puis mis en culture onze jours à 10, 20 ou 30°C. La densité optique (DO) du milieu est mesurée à 600 nm aux jours 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10 et 11.

#### **4.2.6.3 Potentiel biominéralisant du consortium microbien**

Le potentiel biominéralisant du consortium microbien et de *B. pseudofirmus* est évalué en quantifiant la consommation de lactate et la production de carbonate de calcium.

Le lactate consommé est quantifié à partir des surnageants filtrés. Les deux inocula conditionnés en cryotube (*B. pseudofirmus* et CBB2020) sont mis en culture dans 100 mL de milieu 4 à base d'extrait de levure et de lactate de calcium dans un erlenmeyer de 250 mL. Ils sont mis en culture douze jours à 20°C avec un prélèvement de 5 mL de surnageant aux jours 1, 2, 5, 7, 9 et 12. Les essais ont été réalisés en duplicat pour chaque inoculum testé. 5 mL du surnageant sont récupérés et filtrés à 0,2 µm. Le dosage du lactate est réalisé par chromatographie ionique (ICS-6000, Dionex) avec une colonne AS11HC et une pré-colonne AG11HC, l'éluant qui est utilisé est du KOH à 1 mM (1,5 mL/min). La quantité de lactate consommé est déterminée en soustrayant la quantité de lactate mesurée au temps t à la quantité de lactate mesuré au temps T<sub>0</sub>.

Le carbonate de calcium produit lors de la croissance microbienne est quantifié à partir des culots de culture. Les deux inocula sont mis en culture dans 100 mL de milieu 4 dans un erlenmeyer de 250 mL pendant douze jours à 20°C. A la fin de la croissance, la totalité du contenu de l'erlenmeyer est centrifugé quinze minutes à 5000 g à 20°C. La quantification du carbonate de calcium se fait par dégradation à une température supérieure à 550°C dans l'air. Les échantillons sont séchés préalablement à 30°C pendant quarante-huit heures jusqu'à masse constante, puis ils sont pesés. Ils sont ensuite chauffés deux heures trente à 550°C et pesés. Puis,

ils sont chauffés une heure vingt à 1000°C et pesés. La différence entre la masse obtenue après la période de chauffage jusqu'à 550°C et celle mesurée après la période de chauffe jusqu'à 1000°C permet de mesurer la perte de masse due à la dégradation du carbonate de calcium. Des essais préliminaires ont montré que cette technique est fonctionnelle pour un minimum de 1 g de composé.

#### **4.2.6.4 Analyse des produits de biominéralisation**

Lors de la croissance dans du milieu 4, à base de lactate de calcium et d'extrait de levure, le consortium microbien produit des résidus solides qui sédimentent. Il est intéressant de déterminer la nature de ces éléments solides pour vérifier s'il s'agit bien de carbonate de calcium. Pour ce faire, 100 mL de milieu 4 sont inoculés avec 200 µL (d'une culture de sept jours dans du milieu 4) puis mis en culture dans un erlenmeyer de 250 mL pendant sept jours à 20°C sans agitation. La culture se fait sans agitation pour ne pas interférer avec la cristallisation du carbonate de calcium. En fin de culture le culot est récupéré par centrifugation pendant quinze minutes à 5000 g à 20°C puis il est mis à sécher quarante-huit heures à 30°C. Une partie de la poudre récupérée est collée à un porte échantillon puis métallisée à l'aide d'une couche mélange d'or-palladium pour pouvoir être observée au microscope électronique à balayage (Hitachi S-3000N). Le reste de la poudre est broyé puis analysé par diffractométrie de rayon X ou DRX (X'Pert Pro MPD, Panalytical). La DRX permet d'évaluer la nature et la structure cristalline d'un échantillon.

### **4.3. Résultats et discussion**

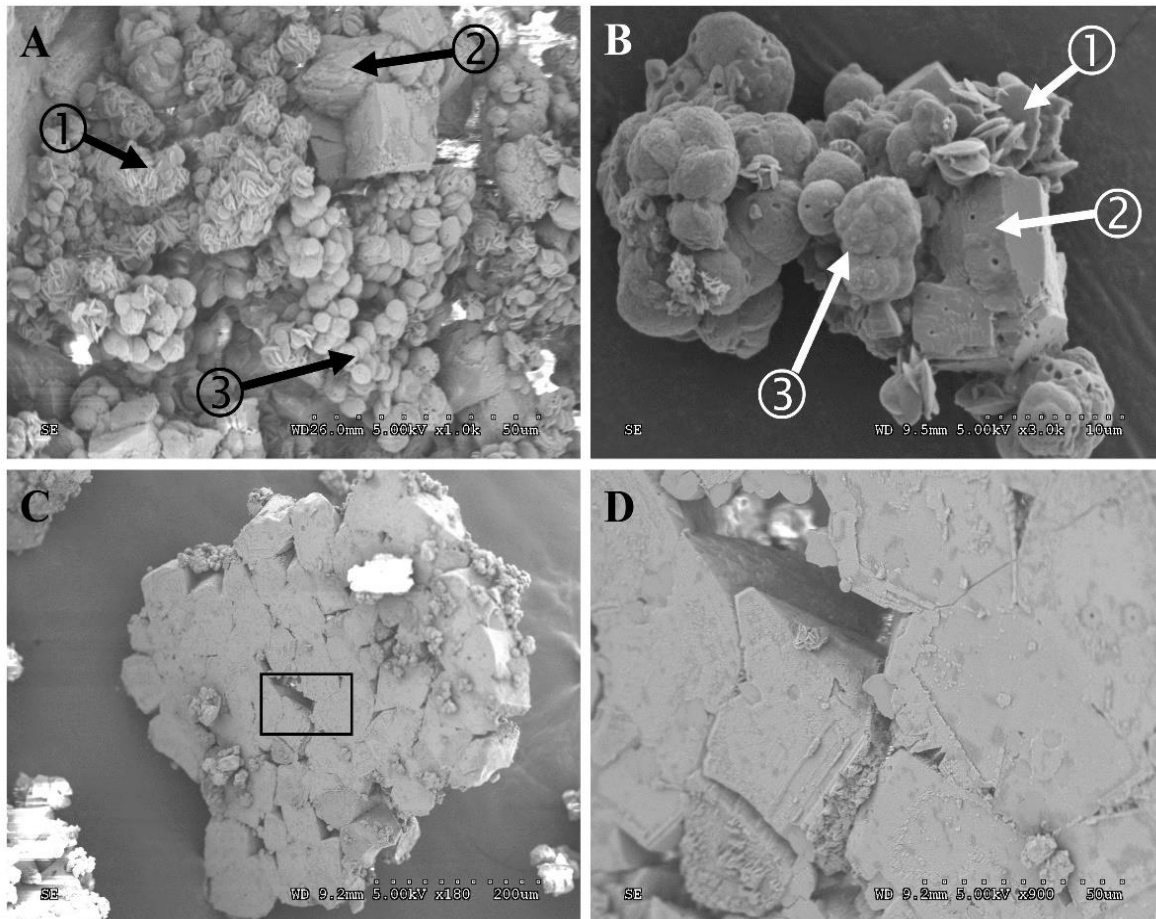
Avant de pouvoir évaluer les performances du consortium CBB2020 il est nécessaire de vérifier sa capacité à produire du carbonate de calcium. Une fois cela fait, la performance du consortium est évaluée en fonction du pH, de la température, de sa capacité à consommer du lactate de calcium et de sa capacité à produire du carbonate de calcium. *Bacillus pseudofirmus* sert de référence pour comparer les performances du consortium microbien CBB2020.

#### **4.3.1 Evaluation de la capacité de biominéralisation du consortium microbien**

Le culot d'une culture de sept jours dans du milieu 4 est récupéré et utilisé pour déterminer la nature des produits solides générés par le consortium microbien.

### 4.3.1.1 Analyses minéralogiques des produits biosourcés solides récupérés

La figure IV.6 présente les micrographies observées au MEB des produits solides biosourcés produits par le consortium microbien.



A : Les différents éléments retrouvés (x 1000). B : Les différents éléments retrouvés (x 3000).  
C : Éléments avec une face plate (X180). D : Cadre noir de C (x900).

Élément 1 : cristaux formés de disques fusionnés ensemble.

Élément 2 : gros cristaux de forme anguleuse.

Élément 3 : cristaux de forme sphérique.

*Figure IV.6 : Observations au MEB des produits solides générés par le consortium CBB2020, après sept jours de croissance à 20 °C.*

La micrographie des solides produits par le consortium CBB2020 montre trois types de cristaux :

- L'élément 1 montre des cristaux formés de différents disques de 3-5  $\mu\text{m}$  de diamètre, fusionnés sur différents plans.
- L'élément 2 montre des gros cristaux anguleux de 20 à 50  $\mu\text{m}$ . Ils fusionnent pour former des structures plus grosses de 300 à 400  $\mu\text{m}$ . La figure IV.6C montre une de ces structures

formées d'une association de ces différents cristaux. La figure IV.6D montre la fusion entre ces cristaux. Ces deux micrographies montrent une surface plane sur ces cristaux. Il s'agit probablement de la surface de contact avec le fond de l'erenmeyer dans lequel la culture a été réalisée.

- L'élément 3 montre des cristaux de forme sphérique formés de différentes sphères fusionnées ensemble.

Ces cristaux ont été produits par le consortium microbien car ils n'ont pas été apportés en début de culture. Ces cristaux ont été analysés par diffraction des rayons X pour déterminer les phases minéralogiques présentes et sont présentés dans la figure IV.7.

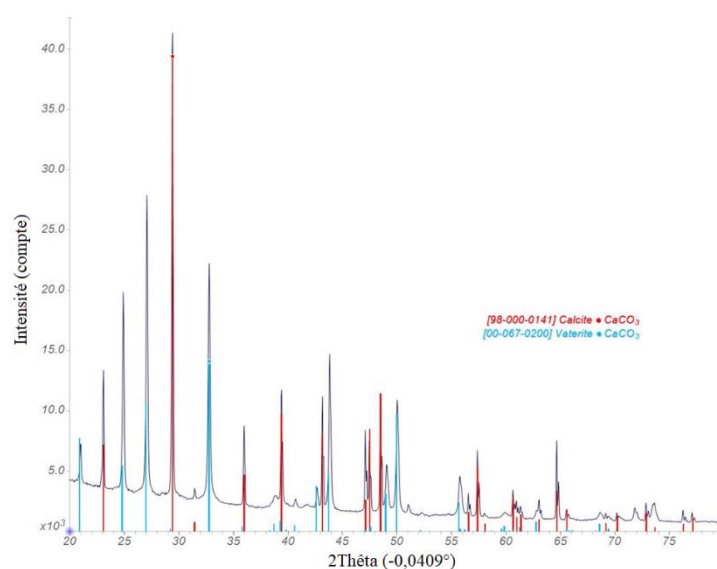
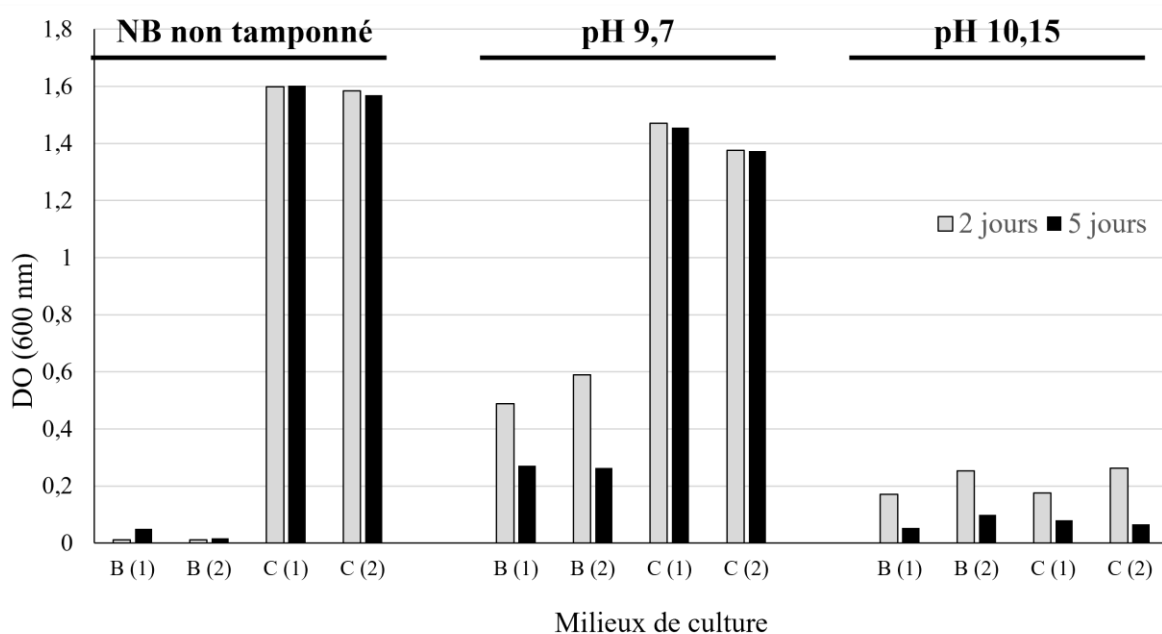


Figure IV.7 : Analyse DRX des cristaux produits par le consortium CBB2020.

L'analyse DRX montre que la matière solide produite par les micro-organismes constituant le consortium CBB2020 est composée de calcite et de vaterite. Ces deux éléments sont des cristaux de carbonate de calcium. Cela montre que les cristaux observés au MEB sont des cristaux de carbonate de calcium et que CBB2020 est donc capable de produire à partir de lactate de calcium et d'extrait de levure des cristaux de carbonate de calcium qui peuvent s'agglomérer entre eux et former des structures de taille pouvant aller jusqu'à 400  $\mu\text{m}$ . Une autre étude a montré des cristaux de morphologies similaires (144). Les cristaux sont produits à 30 °C par *Sporosarcina pasterii* dans un milieu contenant de l'urée et du chlorure de calcium. Ils ont obtenu des cristaux de carbonate de calcium, identifiés comme de la vaterite et de la calcite et ayant une morphologie similaire aux cristaux des éléments 2 et 3 obtenus dans cette thèse.

### 4.3.2 Croissance microbienne en fonction du pH

Le pH est un paramètre clef dans le procédé de biocicatrisation. Les bactéries sont soumises à des pH basiques lors de leur contact avec des matériaux cimentaires. Le pH d'un béton carbonaté est de 9-10. De plus, un pH basique est nécessaire à la réaction de production du carbonate de calcium à partir du CO<sub>2</sub>. D'un point de vue expérimental, trois valeurs de pH sont utilisées : 7 ; 9,7 et 10,15. Le pH de 7 représente le pH neutre des formulations épaissies avant leur contact avec le béton. Le pH de 9,7 correspond au pH d'un béton carbonaté et au pH optimum de croissance de *Bacillus pseudofirmus*. Le pH de 10,15 est la valeur maximale de pH permettant une croissance de *B. pseudofirmus* (7). Les résultats sont présentés dans la figure IV.8.



B = *B. pseudofirmus* ; C = CBB2020. Les 1 et 2 correspondent aux essais réalisés en duplicat pour chaque condition de pH et chaque inoculum microbien.

Figure IV.8 : Croissance du consortium microbien CBB2020 et *B. pseudofirmus* en fonction du pH à 20°C.

On constate d'abord que les résultats des duplicats sont comparables, on peut donc se fier à ces résultats pour interpréter l'influence du pH sur la croissance :

- Dans un milieu NB non tamponné, la croissance de CBB2020 est élevée (DO =1,6) au bout de deux jours, et cette valeur reste constante jusqu'à cinq jours. En revanche, *B. pseudofirmus* présente une croissance très faible pendant toute la durée de l'essai. Toutefois, des essais précédents ont montré une croissance significative de *B. pseudofirmus* dans un milieu NB tamponné à pH de 7,5 (avec le tampon 1) à 30°C (7). Des essais réalisés avec *B.*

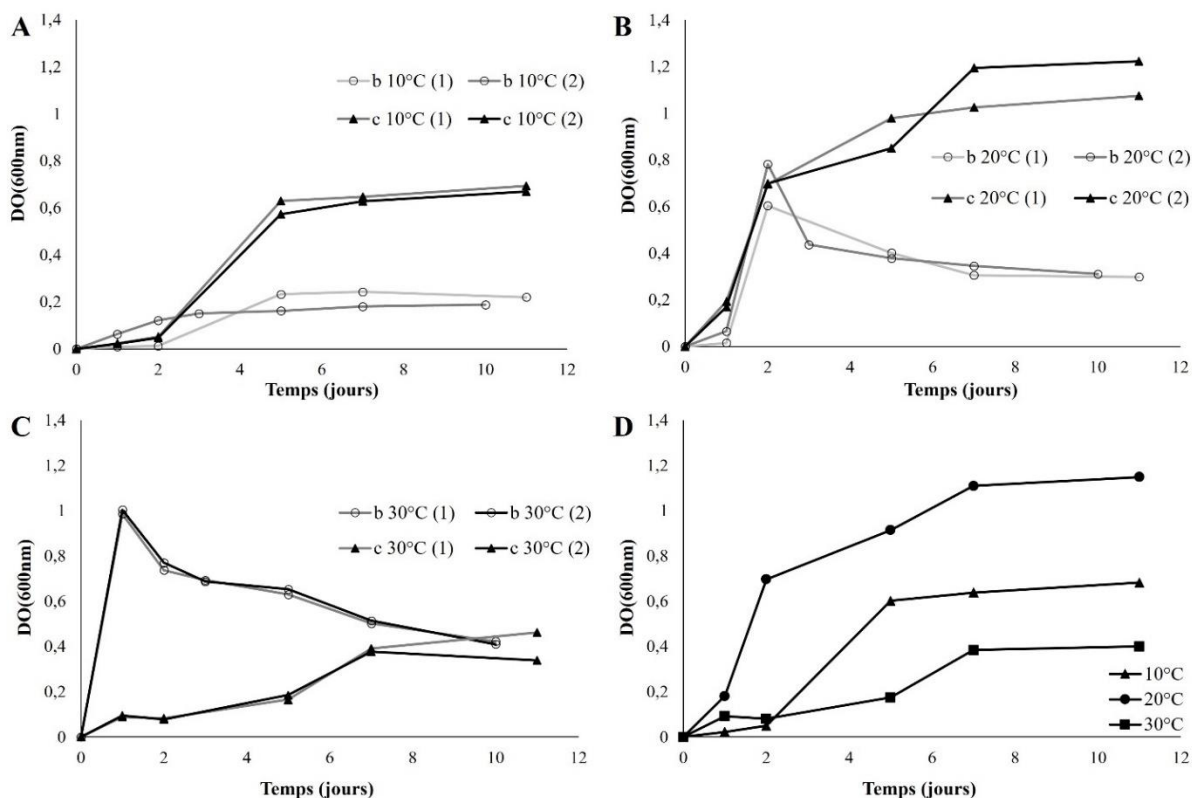
*pseudofirmus* en triplicat dans un milieu NB à un pH 7 et à 20°C ont montré un développement bactérien à deux jours ( $DO = 0,41 \pm 0,02$ ) qui se stabilise à cinq jours (140). La différence de croissance observée entre un milieu NB non tamponné et un milieu NB tamponné à pH 7 pourrait s'expliquer par la présence du tampon 1 qui pourrait avoir un effet favorable sur la croissance de *B. pseudofirmus*. L'utilisation de ce tampon pourrait limiter les variations de pH lors de la croissance microbienne.

- A un pH de 9,7, CBB2020 présente une croissance élevée ( $DO = 1,4$ ) au bout de deux jours et cette valeur se maintient jusqu'au jour 5. Le développement des micro-organismes constituant le consortium est environ deux fois plus élevé que celui de *B. pseudofirmus* à deux jours ( $DO = 0,6$ ) et environ quatre fois plus élevé à cinq jours ( $DO = 0,3$ ).
- A un pH de 10,15, le consortium CBB2020 se développe faiblement ( $DO = 0,2$ ) pendant toute la durée de l'essai (cinq jours), tout comme *B. pseudofirmus*. Ce pH élevé ne semble pas compatible avec une bonne croissance des deux inocula.

Le consortium CBB2020 est capable de croître à pH 7 et 9,7 avec un développement légèrement plus élevé à pH 7. Le consortium CBB2020 est donc capable de se développer aussi bien en dehors d'une fissure carbonatée (pH 7) qu'à l'intérieur (pH 9,7).

#### **4.3.3 Croissance microbienne en fonction de la température**

Un des objectifs du développement de ce consortium est d'être capable de se développer efficacement à faible température. La croissance du consortium CBB2020 et *B. pseudofirmus* a été évaluée à différentes températures : 10, 20 et 30°C. La température de 30°C correspond à la température optimale de croissance de *B. pseudofirmus* alors que la température de 20°C est la plus représentative d'un milieu extérieur. La température de 10°C a également été testée car elle peut être retrouvée en milieu extérieur en hiver. Comme le pH de 9,7 permet une croissance significative des deux inocula microbiens, ce pH a été choisi pour le milieu de ces essais menés pendant onze jours avec des prélèvements réguliers au bout de 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10 et 11 jours. Les résultats sont présentés dans la figure IV.9.



A : croissance à 10°C ; B : croissance à 20°C ; C : croissance à 30°C et D : cinétiques moyennes de croissance du consortium aux différentes températures.

b = *B. pseudofirmus* ; c = CBB2020. Les 1 et 2 correspondent aux duplicats réalisés.

Figure IV.9 : Croissance du consortium CBB2020 et de *B. pseudofirmus* en fonction de la température à 10, 20 et 30 °C.

Les résultats obtenus pour les duplicats sont très proches permettant donc de bien mettre en évidence les effets de la température sur la croissance des micro-organismes. L'analyse de la figure VI.6 permet de comprendre l'influence des températures de 10, 20 et 30°C sur la croissance :

- A une température de 10°C, CBB2020 présente une phase de latence de deux jours suivie d'une phase de croissance de deux jours atteignant une DO de 0,6 et d'une phase stationnaire de sept jours (Fig. IV.6.A). Il n'y a pas de phase de déclin à la fin des onze jours de croissance. En revanche, la croissance de *B. pseudofirmus* est plus faible et atteint un palier correspondant à un état stationnaire de croissance pour une DO de l'ordre de 0,2.
- A une température de 20°C (Fig. IV.6.B), La croissance de CBB2020 suit une sigmoïde avec une phase exponentielle de sept jours conduisant à une DO de 1 à 1,2, suivi d'une phase stationnaire de quatre jours sans phase de déclin observée. En revanche, *B. pseudofirmus* présente une croissance plus faible avec une DO maximale de l'ordre de 0,8.

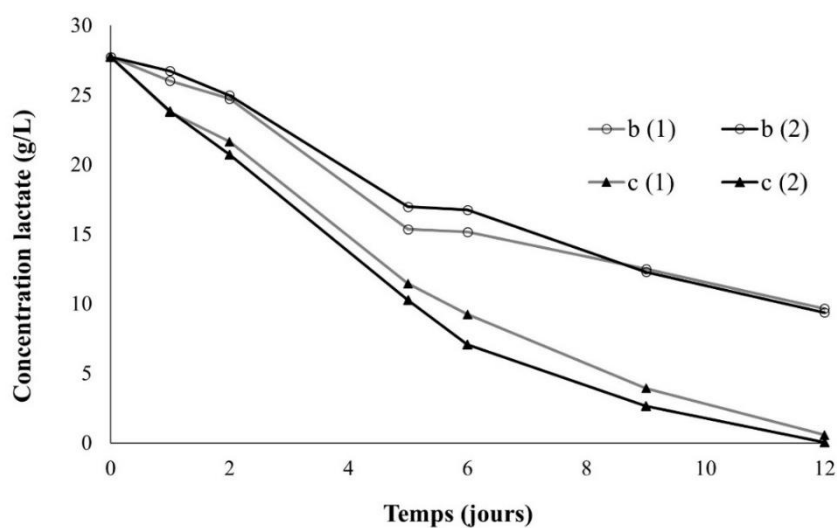
- A une température de 30°C (Fig. IV.6.C), la croissance de CBB2020 présente une phase exponentielle plus lente qu'à 20°C puisqu'elle se termine au bout de sept jours et avec un faible développement cellulaire (DO = 0,3 à 0,4). En revanche, *B. pseudofirmus* se développe rapidement pendant les premières vingt-quatre heures atteignant une DO de 1, puis diminue progressivement.

Le consortium CBB2020 croît plus rapidement à 20°C qu'à 10°C avec un développement cellulaire plus élevé, DO de 1 à 1,2 contre 0,6 (Fig. IV.9.D). Il n'y a pas de phase de latence observée à 20°C contrairement à 10°C. A 30°C, la cinétique de croissance est plus lente avec un développement cellulaire plus faible (DO = 0,3 à 0,4). Ce consortium semble donc adapté à des environnements où la température est comparable à celle trouvée en milieu extérieur.

#### 4.3.4 Evaluation des capacités biominéralisantes des inocula

##### 4.3.4.1 Consommation de lactate

Le potentiel biominéralisant du consortium CBB2020 et de *B. pseudofirmus* est évalué par la consommation du lactate de calcium et par la production de carbonate de calcium. La croissance microbienne est réalisée à 20°C pendant douze jours dans le milieu 4 à base de lactate de calcium (source de carbone et de calcium) et d'extrait de levure (source de protéine et d'azote). Des prélèvements périodiques (1, 2, 5, 7, 9 et 12 jours) du milieu sont réalisés pour évaluer la consommation du lactate. Les résultats sont présentés dans la figure IV.10.



b = *B. pseudofirmus* ; c = CBB2020. Les 1 et 2 correspondent au duplicat.

Figure IV.10 : Cinétique de consommation du lactate par le consortium CBB2020 et *B. pseudofirmus*, à 20°C.



La cinétique de consommation du lactate est similaire pour les deux essais menés pour chaque inoculum. Dans les deux cas, on observe une diminution de la concentration de lactate dans le milieu de culture, correspondant à une consommation du lactate par l'inoculum considéré. Les vitesses de consommation du lactate (en g/j) sont présentées dans le tableau IV.4.

Tableau IV.4 : Cinétiques de consommation du lactate, pour un litre de milieu, à 20°C.

Essais	Cinétique de consommation de lactate (g/jour)		Concentration résiduelle de lactate (g/L)	
	Jour 0 à 6	Jour 6 à 12	Jour 6	Jour 12
<i>B. pseudofirmus</i> (1)	2,1	0,8	15,2	9,7
<i>B. pseudofirmus</i> (2)	1,8	1,1	16,8	9,4
Consortium (1)	3,1	1,2	9,2	0,6
Consortium (2)	3,4	1,0	7,1	0
<i>B. pseudofirmus</i>	2,0 ± 0,19	0,9 ± 0,19	16,0 ± 1,13	9,6 ± 0,21
Consortium	3,3 ± 0,26	1,1 ± 0,16	8,1 ± 1,54	0,3 ± 0,42

La concentration initiale de lactate est égale à 27,7 g/l.

Pour le consortium CBB2020, on observe une diminution progressive de la concentration du lactate avec une consommation initiale rapide qui correspond à la phase exponentielle (3,3 grammes de lactate consommés par jour) jusqu'au sixième jour puis un ralentissement qui correspond à la phase stationnaire (1,1 grammes de lactate consommé par jour) jusqu'au douzième jour. En fin de croissance (jour 12) il ne reste plus de lactate correspondant à une consommation de 100% du lactate initial en douze jours.

*B. pseudofirmus* présente une cinétique de consommation du lactate plus lente avec une consommation continue (0,9 – 1,1 grammes de lactate consommés par jour). A douze jours, il reste 9,5 g/L de lactate correspondant à une consommation de 66%.

Les résultats montrent que le consortium CBB2020 consomme 71% de lactate lors des six premiers jours et 99% en douze jours, plus rapidement que *B. pseudofirmus* à 20°C et qu'en douze jours la consommation du lactate est totale. La croissance de *B. pseudofirmus* dans un milieu à base de lactate de calcium a été évaluée à 30 °C (138-139) et à 10 et 20°C (140).

#### 4.3.4.2 Production de carbonate de calcium

La consommation du lactate est un marqueur d'activité microbologique et un signe indirect de biominéralisation alors que la mesure de la production de carbonate de calcium est un marqueur direct de biominéralisation du carbonate. Pour déterminer la production du carbonate de calcium par les micro-organismes, les essais ont été réalisés en utilisant le même milieu que précédemment (milieu 4) pendant douze jours à 20°C mais sans prélèvement au cours du temps. Comme le milieu utilisé ne contient que du lactate de calcium et de l'extrait de levure sans apport exogène de carbonate de calcium, le carbonate de calcium formé et quantifié en fin d'expérimentation est biogénéré. Les résultats sont présentés dans le tableau IV.5.

Tableau IV.5 : Production de carbonate de calcium du consortium CBB2020 et *B. pseudofirmus* après douze jours à 20°C.

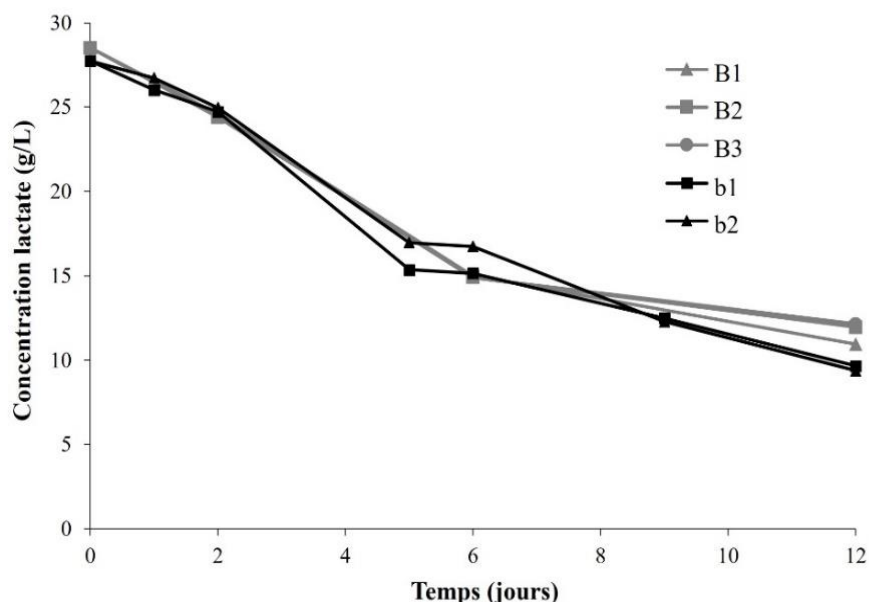
Inoculum	Masse sèche du culot (g)	Masse de carbonate produite (g)
<i>Bacillus pseudofirmus</i> (1)	0,4	0,3
<i>Bacillus pseudofirmus</i> (2)	0,5	0,3
Moyenne <i>Bacillus pseudofirmus</i>	0,4 ± 0,07	0,3 ± 0,04
Consortium (1)	1,5	1,3
Consortium (2)	1,3	1,1
Moyenne consortium	1,4 ± 0,13	1,2 ± 0,10

La reproductibilité des résultats est bonne pour les masses sèches, les masses de carbonate produites, pour les deux inocula. La masse sèche du culot est différente de la masse de carbonate produite car d'autres éléments solides que du carbonate de calcium peuvent être présents dans le culot, comme des cellules microbiennes mortes et des éléments du biofilm.

Le milieu initial contenant 5 g de lactate de calcium pentahydraté ( $M= 308,29 \text{ g/mol}$ ), il s'agit de la seule source significative de calcium apportée dans le milieu. Cela signifie qu'une mole de lactate de calcium ne peut que donner une mole de carbonate de calcium ( $M= 100,09 \text{ g/mol}$ ). En utilisant ces valeurs, si tout le calcium est utilisé pour former du carbonate de calcium, l'apport initial de lactate de calcium permet la formation de 1,6 g de carbonate de calcium.

Le consortium CBB2020 produit  $1,2 \text{ g} \pm 0,096$  de carbonate de calcium (84% du solide récupéré) pour 100 mL de milieu contenant 5 g de lactate de calcium. Cette production correspond à 75% du carbonate de calcium productible à partir de 5 g de lactate de calcium pentahydraté.

La biominéralisation par *B. pseudofirmus* conduit à une production de carbonate de calcium plus faible :  $0,3 \text{ g} \pm 0,043$  pour 100 mL de milieu contenant 5 g de lactate de calcium (73% du solide récupéré). Cette production correspond à 19% du carbonate de calcium productible à partir de 5 g de lactate de calcium pentahydraté. D'autres essais de croissance de *B. pseudofirmus* ont été réalisés précédemment dans des conditions similaires : croissance dans le milieu 4 à 20°C sous agitation (139). Les résultats de consommation de lactate par *B. pseudofirmus* à 20°C sont présentés dans la figure IV.11 de même que les résultats obtenus lors de cette thèse.



Essais faits avec *B. pseudofirmus* à 20°C.

B = données issues de (139).

b= données issues de cette thèse.

Figure IV.11 : Comparaison des cinétiques de consommation du lactate par *B. pseudofirmus* avec des données antérieures.

Ces résultats montrent une cinétique de consommation de lactate par *B. pseudofirmus* similaire entre les deux essais. Cependant, les résultats obtenus montrent une production de carbonate de calcium de  $0,70 \text{ g} \pm 0,07$  pour  $0,77 \text{ g} \pm 0,08$  de résidus solides, cela représente 90,5% de carbonate de calcium dans le culot. Il y a donc environ deux fois plus de carbonate de calcium produit lors de ces essais.

Le métabolisme conduisant à la production de carbonate de calcium est la conversion des composés organiques. Cela signifie que le carbonate de calcium n'est pas directement produit par les cellules mais par l'excrétion de CO<sub>2</sub> lors de la respiration en utilisant du lactate de calcium. Pour les cellules, la source de carbone (ici le lactate) peut soit être utilisée pour produire de la biomasse ou de l'énergie. Dans une population jeune, la majorité du carbone sera utilisée pour produire de la biomasse et ainsi croître alors que dans le cas d'une population plus vieille, la majorité du carbone sera utilisé pour maintenir la biomasse préexistante, en produisant de l'énergie. Des états physiologiques de ces différentes populations pourraient expliquer les différences observées. La matière solide présente dans le culot est donc formée principalement par de la biomasse (cellules vivantes et/ou mortes) et du carbonate de calcium. Les essais présentés dans ce rapport montrent une présence de 9,5% de biomasse dans le culot alors que les essais réalisés lors de cette thèse en ont montré 27,2%. Il y a donc une différence entre ces populations cellulaires dans l'utilisation du lactate de calcium. Cela permet de montrer que la production de carbonate de calcium n'est pas fixe et peut dépendre de l'état physiologique de la population cellulaire.

Le consortium CBB2020 est performant vis-à-vis de sa capacité biominéralisante puisqu'il consomme la totalité du lactate initial en douze jours à 20°C conduisant à une production de carbonate de calcium de 12 g/L. Son potentiel biominéralisant est plus élevé que celui de *Bacillus pseudofirmus* probablement dû au phénomène de synergie entre les différents micro-organismes composant le consortium.

#### **4.4 Conclusion**

Le tableau IV.6 synthétise l'ensemble des résultats obtenus pour la croissance du consortium microbien CBB2020 et de *Bacillus pseudofirmus*.

Tableau IV.6 : Récapitulatif des résultats de croissance du consortium microbien et de *B. pseudofirmus*.

Conditions testés		<i>B. pseudofirmus</i>	Consortium CBB2020
DO <sub>600nm</sub> 5 jours 20°C	pH	NB non tamponné	0,03
		pH 7	0,41 <sup>1</sup>
		pH 9,7	0,27
		pH 10,15	0,08
DO <sub>600nm</sub> 10 jours pH 9,7	Température	10°C	0,20
		20°C	0,32
		30°C	0,51
Consommation de lactate (12 jours) (g/100 mL)		18,2 / 66% 16,8 / 60 % <sup>2</sup>	27,4 100 %
Production de carbonate de calcium (12 jours) (g/100 mL)		0,3-0,7 <sup>2</sup>	1,2

Les croissances en fonction du pH (au bout de cinq jours) ou de la température (au bout de dix jours) sont évaluées par unité de densité optique (DO à 600 nm). La consommation de lactate et la production de carbonate de calcium (au bout de douze jours) sont évaluées en gramme de produit consommé ou produit pour 100 mL de milieu. <sup>1,2</sup> : résultats obtenus antérieurement (respectivement 140, 139).

Le consortium CBB2020 est capable de se développer à la fois à un pH de 7 ou de 9,7, permettant ainsi sa croissance dans des conditions neutres et alcalines (comme un béton carbonaté). De plus, à ces deux pH, la croissance de ce consortium est plus élevée que celle de *B. pseudofirmus*. Pour mieux s'approcher d'une situation réelle, il était nécessaire d'abaisser la température de fonctionnement de l'inoculum. CBB2020 est capable de se développer à 10 et 20°C avec une densité cellulaire importante. A la fin de la phase exponentielle, quand la majorité des nutriments sont consommés, le consortium garde une population stable. A 20°C, le consortium CBB2020 consomme totalement le lactate (concentration initiale = 50 g/L) avec production de 12 g/L de carbonate de calcium.

Le consortium microbien CBB2020 renferme donc probablement un mélange de micro-organismes biominéralisants adaptés pour réaliser une bioréparation d'un ouvrage en conditions réelles.

# Chapitre 5 : Validation de la biocompatibilité des formulations épaissies sélectionnées avec le consortium microbien et *Bacillus pseudofirmus*

## 5.1. Introduction

Les chapitres 2 et 3 ont permis la mise au point de cinq formulations candidates pour des fissures fines ( $< 100 \mu\text{m}$ ), contenant du lactate de calcium, de l'Attigel 50, du carbonate de calcium et du gluconate de calcium. Parmi ces cinq formulations, quatre sont sélectionnées pour avoir un des quatre composés à la concentration massique maximale utilisée pour la mise au point du plan d'expériences (Lmax, Amax, Cmax et Gmax). La cinquième formulation est la formulation Gmin pour laquelle la concentration du gluconate est minimale (1%). Elle est ajoutée car pour les quatre autres formulations, la concentration du gluconate de calcium est proche de la concentration maximale (5%).

Le chapitre 4 a permis la mise au point du consortium CBB2020. Il s'agit d'un mélange de micro-organismes indigènes vivant naturellement sur des matériaux cimentaires. Ces micro-organismes ont subi différentes étapes de sélection pour permettre la survie uniquement des organismes qui sont capables de biominéraliser du carbonate de calcium à pH alcalin et à 20°C. L'efficacité du consortium CBB2020 est validée en le comparant à une souche connue pour être biominéralisante, *Bacillus pseudofirmus*.

L'objectif de cette partie est de déterminer si le consortium CBB2020 est capable de se développer dans ces cinq milieux et de connaître dans quel(s) milieu(s) son potentiel biominéralisant est le plus élevé. S'il peut se développer dans chacun de ces milieux, c'est que le consortium est capable de supporter chacun des quatre composés à sa concentration massique maximale. Cela montrerait que les concentrations utilisées dans le plan d'expériences sont toutes biologiquement utilisables avec ce consortium microbien.

## 5.2. Matériels et méthodes

### 5.2.1 Milieux utilisés

La préculture du consortium CBB2020 est réalisée dans un erlenmeyer de 250 mL contenant 100 mL de milieu L50 (50 g/l de lactate de calcium et 3 g/l d'extrait de levure) inoculés avec un cryotube de l'inoculum CBB2020 conservé à -80°C. Elle est placée pendant vingt-quatre heures à 20°C sous agitation (rpm). La densité optique à 600 nm est de 1,83 à vingt-quatre heures.

Les constituants des cinq formulations testées sont stérilisés séparément par autoclavage vingt minutes à 120°C. L'Attigel 50, le carbonate de calcium et le gluconate de calcium sont stérilisés à sec. Le lactate de calcium, l'extrait de levure et l'eau distillée sont mélangés et stérilisés par autoclavage. Les différents constituants stérilisés sont introduits dans un Waring Blender stérile et mélangés une minute à la vitesse 2 (22 000 rpm). 500 µl de la préculture sont ajoutés, puis la formulation est mélangée quinze secondes à la vitesse 1 (18 000 rpm). La composition des cinq formulations est présentée dans le tableau V.1. Les essais sont réalisés en duplicat dans des erlenmeyers de 250 mL. Ils sont incubés pendant vingt-trois jours à 20°C sous agitation.

Tableau V.1 : Composition des cinq formulations testées.

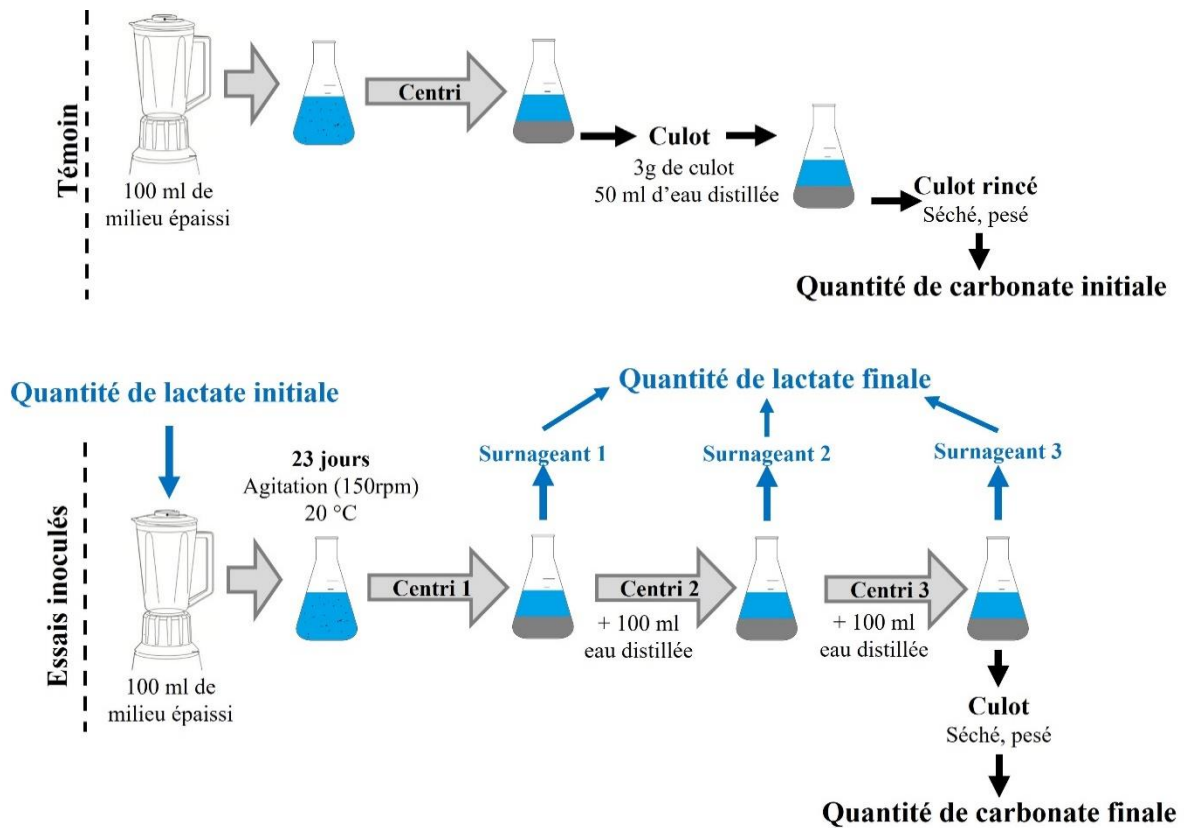
Formulations	Lac (g)	Carb (g)	Att (g)	Glu (g)	Ext. lev. (g)	Eau (mL)
Lac max	35,4	2,6	5,2	12,8	0,8	200
Att max	28,6	3	10,2	10,6	0,8	200
Carb max	33,8	45	6	13,8	0,8	200
Glu max	32,2	8,4	7,8	13,2	0,8	200
Glu min	28,6	18,6	5,2	2,6	0,8	200

Lac = lactate de calcium, Carb = carbonate de calcium, Att = Attigel 50, Glu = gluconate de calcium et Ext. lev. = extrait de levure.

### 5.2.2 Evaluation de la croissance microbienne et des performances de biominéralisation du consortium microbien

Pour évaluer l'efficacité d'une formulation, deux paramètres sont pris en compte : la consommation du lactate de calcium et la production de carbonate de calcium. La consommation de lactate de calcium est un indicateur indirect de la croissance de CBB2020 dans une formulation. La production de carbonate de calcium permet l'évaluation de son

efficacité de biominéralisation. A la fin de l'expérimentation, ces deux paramètres sont quantifiés pour chaque formulation. La procédure de récupération du carbonate de calcium est présentée dans la figure V.1.



Centri = centrifugation quinze minutes à 5000 g.

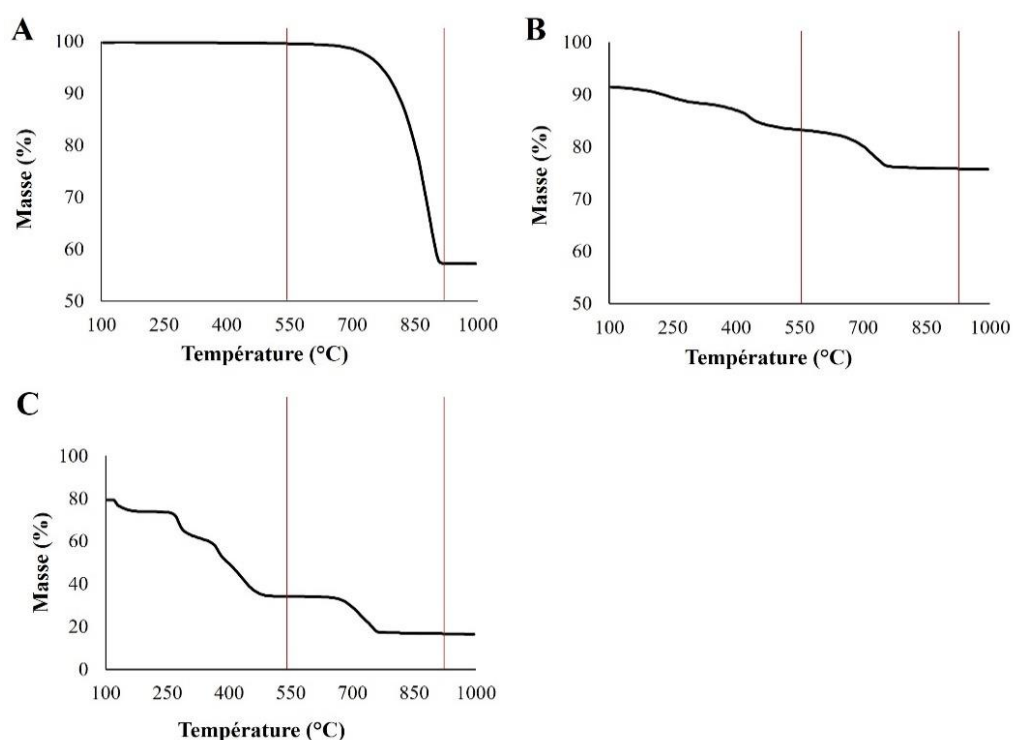
Figure V.1 : Procédure de quantification du lactate consommé et du carbonate de calcium produit.

### 5.2.2.1 Quantification du carbonate de calcium biogénéré

Le carbonate de calcium est quantifié à la suite de sa dégradation à une température supérieure à 550°C dans l'air. Les échantillons sont séchés préalablement pendant quarante-huit heures à 30°C. Ils sont pesés à température ambiante. Puis, ils sont chauffés deux heures trente à 550°C et pesés. Ils sont ensuite chauffés une heure vingt à 1000°C puis pesés. La différence entre la masse pesée après la dégradation à 550°C et celle après la période à 1000°C permet de déterminer la perte de masse due à la présence de carbonate de calcium. Des essais préliminaires ont montré que cette technique est fonctionnelle pour un minimum de 1 g d'échantillon.



Chaque formulation contient initialement du carbonate de calcium, une part connue par l'apport de carbonate de calcium présent dans le BétocarbF® et une part inconnue avec l'apport de l'Attagel 50. Les carbonates présents dans une poudre peuvent être quantifiés par une technique nommée analyse thermogravimétrique (ATG). Entre 550 et 900°C, les carbonates se dégradent et forment du CO<sub>2</sub> (141). La perte de masse mesurée lors de cette dégradation renseigne sur la quantité de carbonate présente dans l'échantillon. Cette technique a été utilisée pour déterminer la cinétique de perte de masse des matériaux initiaux dans cette gamme de température et les résultats sont présentés dans la figure V.2.



A : BétocarbF, B : Attagel 50 et C : lactate de calcium.

Figure V.2 : Analyses ATG du BétocarbF, de l'Attagel50 et du lactate de calcium.

Pour les trois produits considérés, il y a une perte de masse entre 550 et 900°C. Cette analyse montre qu'il y a une perte de masse d'environ 92% pour le BétocarbF, 16% pour l'Attagel 50 et 32% pour le lactate de calcium. Pour le BétocarbF et l'Attagel 50, ces pertes de masses correspondent bien à des pertes de CO<sub>2</sub> car ces valeurs concordent avec les quantités de carbonate présentes dans ces poudres. Cependant, le composé chimique conduisant à la perte de masse pour le lactate de calcium n'a pas été déterminé. On ne peut donc pas affirmer qu'il ne s'agit pas de CO<sub>2</sub>. Néanmoins, dans tous les cas la perte de masse due à la dégradation du lactate de calcium à ces températures est un facteur d'incertitude pour mesurer la quantité de carbonate présente dans un échantillon. Cependant, la forte solubilité du lactate de calcium vis-

à-vis de celle du carbonate de calcium permet de dissoudre le lactate de calcium par des lixiviations successives dans l'eau distillée du solide récupéré avant de quantifier le carbonate présent dans un échantillon. Ainsi, connaissant la quantité d'Attigel et de carbonate de calcium initial, il est possible de soustraire cette quantité à la quantité totale de carbonate de calcium mesurée par perte de masse par la chaleur (ATG ou four) après la bioprécipitation. Ceci permet donc de connaître la quantité de carbonate de calcium bioprécipitée.

La présence d'éléments initiaux contenant du carbonate de calcium peut être déterminée en utilisant un témoin sans bactérie pour chaque formulation. Dans le cas du témoin, le lactate n'a pas été consommé par des bactéries il est donc encore présent en forte quantité. L'usage d'un volume d'eau abaissant la concentration en dessous de la concentration saturante (58 g/l à 20°C) n'est pas suffisant pour récupérer tout le lactate dissous. Des essais ont montré qu'en dissolvant 3 g de culot dans 50 mL d'eau distillée et mis en agitation (150 rpm) pendant 1 h à 30°C, cela permet de rincer la totalité du lactate pour les cinq formulations. Il s'agit donc de la stratégie adoptée pour rincer les culots obtenus après la centrifugation quinze minutes à 5000 g à 20°C des formulations témoins. Le culot initial a été pesé et la quantité de carbonate qu'il contenait est obtenue par extrapolation de la quantité présente dans 3 g.

Pour les essais inoculés la procédure n'a pas pu être la même, de plus une dilution aussi importante n'est pas nécessaire car une partie du lactate a été consommé. La suspension microbienne est centrifugée après vingt-trois jours de culture et le surnageant est séparé du culot. Le culot est ensuite repris dans 100 mL d'eau distillée et mis en agitation (150 rpm) pendant 1 h à 30°C ; ceci a été réalisé deux fois pour solubiliser le lactate de calcium en excès. Le culot résultant est séché et pesé. La quantification de carbonate de calcium présent dans ce culot rincé est la quantité finale de carbonate de calcium.

La quantité de carbonate de calcium biogénéré est la différence entre la quantité de carbonate de calcium initial (provenant des constituants de la formulation) et la quantité de carbonate de calcium final :

$$\text{Quantité carbonate biogénéré} = \text{quantité carbonate final} - \text{quantité carbonate initial}$$

### 5.2.2.2 *Quantification du lactate consommé*

La quantité initiale de lactate est connue, il s'agit de la quantité de lactate utilisée pour préparer chaque formulation (tableau V.1).

La quantité finale de lactate est obtenue en quantifiant le lactate dissous dans les trois surnageants (1, 2 et 3). Le premier surnageant permet de quantifier le lactate dissous en fin de culture. Les deux suivants permettent de quantifier le lactate de calcium solide potentiellement présent dans le culot. Pour chaque surnageant, 5 mL sont récupérés et filtrés à 0,2 µm à l'aide de filtre seringue. Le dosage du lactate est réalisé par chromatographie ionique (ICS-3000, Dionex). La quantité finale de lactate est la somme des quantités de lactate présentes dans les trois surnageants.

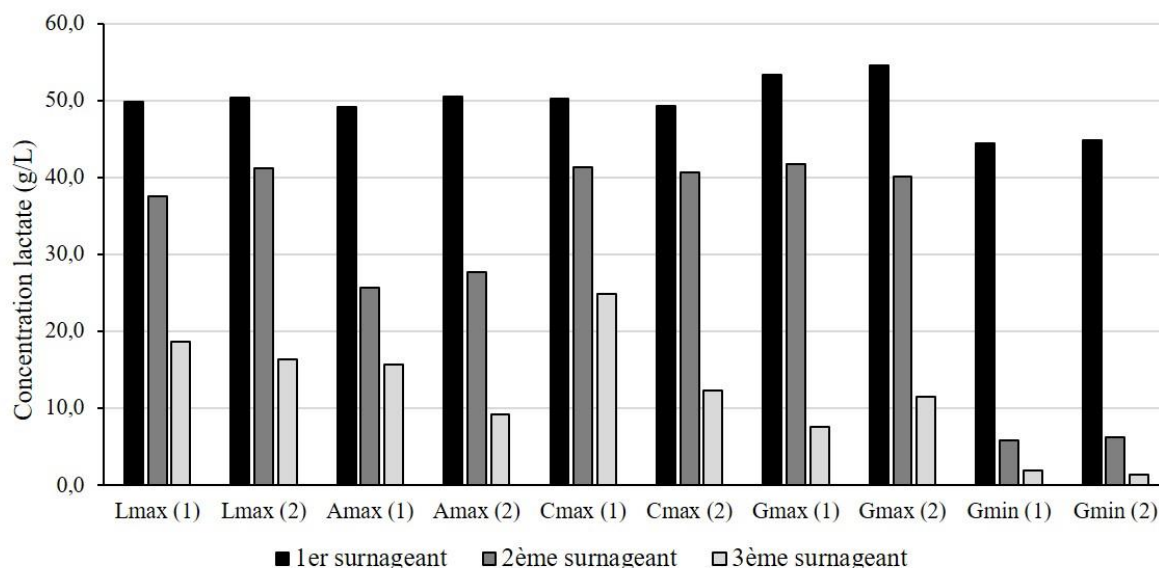
$$\text{Quantité lactate consommé} = \text{quantité lactate initial} - \text{quantité lactate final}$$

## 5.3. Résultats et discussion

### 5.3.1 Evaluation de la consommation du lactate par le consortium microbien dans les formulations épaissies

La figure V.3 indique les concentrations en lactate dans les trois surnageants récupérés suite aux centrifugations successives. Le premier surnageant permet de quantifier le lactate à la fin de l'expérimentation alors que les deux derniers surnageants représentent la part de lactate de calcium final non soluble qui était stockée dans le culot.

Les concentrations en lactate du premier rinçage sont toutes inférieures à la concentration de saturation (58 g/L à 20°C). Cependant, les surnageants provenant des deux rinçages suivants contiennent du lactate. Cela montre qu'il restait une part de lactate de calcium insoluble stockée dans les culots de culture des différentes formulations. Pour chaque formulation testée, on observe une diminution des concentrations de lactate à chaque rinçage, cela signifie que la quantité de lactate de calcium solide encore présente dans le culot de culture après deux rinçages est inférieure à la quantité de lactate retirée dans le troisième surnageant. Toutefois, un troisième rinçage aurait permis de vérifier que la totalité du lactate de calcium solide présent dans le culot a bien été solubilisée.



(1) et (2) sont les duplicats. 1<sup>er</sup> surnageant = lactate soluble.  
2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> surnageant = lactate en solution issu du lactate de calcium solide.

Figure V.3 : Concentration du lactate dans les différents surnageants lors du rinçage des culots.

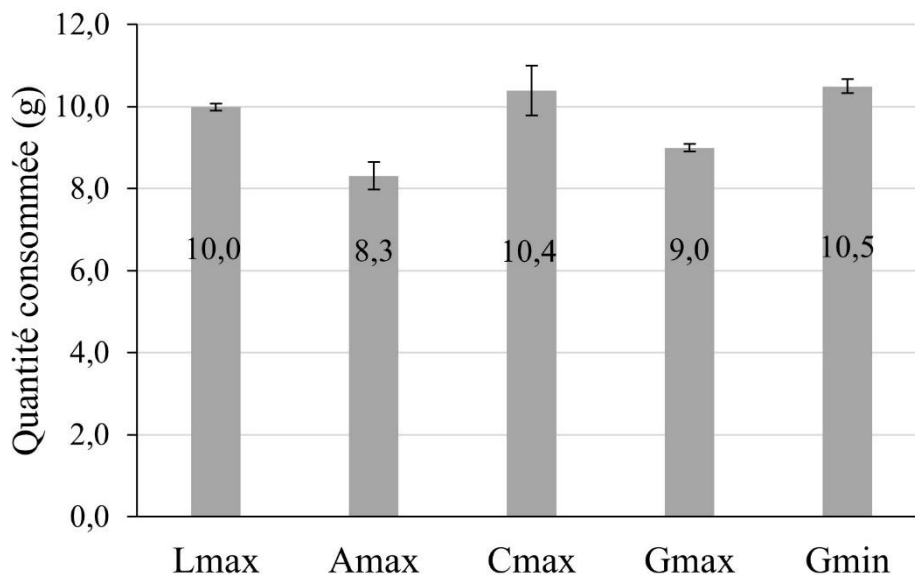
La somme des quantités de lactate dans les trois surnageants permettent de déterminer la quantité de lactate finale et d'estimer l'incertitude de mesure de la quantité de carbonate de calcium (Annexe 5). La quantité de lactate consommée après vingt-trois jours de croissance est obtenue en soustrayant la quantité initiale de lactate à la quantité de lactate finale (tableau V.2).

Tableau V.2 : Quantité de lactate consommée en vingt-trois jours de croissance microbienne.

	Quantité initiale (g)	Quantité finale (g)	Quantité consommée (g)	Pourcentage de consommation (%)
Lmax	17,7	7,8 ± 0,07	10,0 ± 0,07	56 ± 0,4
Amax	14,3	6,0 ± 0,28	8,3 ± 0,28	58 ± 2,0
Cmax	16,9	6,5 ± 0,57	10,4 ± 0,57	62 ± 3,3
Gmax	16,1	7,1 ± 0,14	9,0 ± 0,14	56 ± 0,8
Gmin	14,3	3,8 ± 0,14	10,5 ± 0,14	73 ± 1,0

Ces résultats sont obtenus pour 100 mL de formulation testés.

On observe peu de différences entre les deux essais réalisés pour une même formulation puisque la consommation absolue du lactate a peu de variabilité entre les deux duplicat. Les moyennes pour chaque formulation sont présentées dans la figure V.4.



Ces résultats sont obtenus pour 100 mL de formulation.

Figure V.4 : Quantité moyenne de lactate consommée pour chaque formulation en 23 jours de croissance microbienne.

On observe une consommation de lactate dans chacune des formulations. Cela montre que le consortium CBB2020 est capable de dégrader le lactate de calcium pour l'utiliser comme source de carbone pour sa croissance. Le développement du consortium microbien dans les formulations Lmax, Amax, Cmax et Gmax montre que les concentrations maximales des quatre composés utilisés pour le plan d'expériences n'empêchent pas son développement. Cela valide l'usage microbiologique des formulations pouvant être développées par le plan d'expériences présenté dans le chapitre 2.

Il y a une consommation absolue de lactate similaire entre Lmax, Cmax et Gmin et une consommation absolue légèrement plus faible pour Amax et Gmax. Comme la formulation Gmin est celle qui a le plus haut pourcentage de consommation de lactate (73%), soit 11 à 18 % de consommation supplémentaire, cette formulation semble être la plus adaptée au consortium CBB2020. Pour le confirmer, nous avons déterminé la quantité de carbonate de calcium biogénéré par le consortium microbien en présence des formulations. Une démarche similaire de croissance dans une formulation épaissie a été réalisée avec une formulation composée de lactate de calcium (7,5 %), d'Attigel 50 (6 %) et de Welan-gum (0,3 %) avec *Bacillus pseudofirmus* comme inoculum (8). La consommation de lactate de calcium était totale, soit 7,5 g (pour 100 mL) au bout de 18 jours à 30 °C. La formulation Gmin (11,2 % de lactate de calcium) couplée au consortium CBB2020 consomme plus de lactate, 10,5 g en 23 jours, à une température plus faible (20 °C).

### 5.3.2 Evaluation de la production de carbonate de calcium par le consortium microbien

Assurer la survie de l'inoculum n'est pas le seul rôle du milieu d'injection. Il doit aussi apporter les éléments nécessaires pour permettre à l'inoculum d'avoir une activité biominéralisante.

Pour quantifier cette activité, il faut déterminer la quantité de carbonate de calcium que le consortium peut produire dans chacune des cinq formulations candidates. La figure V.3 a montré qu'il peut rester un peu de lactate de calcium encore présent dans le culot. L'estimation due à la présence de ce lactate est calculée dans l'Annexe 5. Les quantités initiales, finales et biogénérées de carbonate de calcium sont présentées dans le tableau V.3.

*Tableau V.3 Quantité de carbonate de calcium biogénéré en vingt-trois jours de croissance microbienne.*

	CaCO <sub>3</sub> final ou total (g)	CaCO <sub>3</sub> initial (g)	CaCO <sub>3</sub> biogénéré (g)
Lmax 1	1,5 - 2,0	1,6	0 - 0,4
Lmax 2	1,2 - 1,7		0 - 0,1
Amax 1	2,2 - 2,5	1,9	0,3 - 0,6
Amax 2	2,1 - 2,4		0,2 - 0,5
Cmax 1	20,4 - 20,8	19,8	0,5 - 0,9
Cmax 2	22,8 - 23,2		2,9 - 3,4
Gmax 1	4,7 - 4,9	4,5	0,2 - 0,4
Gmax 2	5,1 - 5,3		0,6 - 0,8
Gmin 1	10,1	7,5	2,6
Gmin 2	11,2		3,7

Ces résultats sont obtenus pour 100 mL de formulation.

On observe une production de carbonate de calcium pour chaque duplicat de chaque formulation. Il faut dissocier deux notions : le carbonate de calcium total et celui biogénéré.

- Le carbonate de calcium total est la quantité totale de carbonate de calcium retrouvée dans le culot en fin de culture. Il s'agit du carbonate initialement ajouté et du carbonate biosourcé. Cependant, après vingt-trois jours en contact avec les micro-organismes, la distinction n'est pas forcément importante car le carbonate biosourcé est lié au carbonate initialement ajouté. Il s'agit de la quantité de matériau de réparation solide non soluble disponible pour refermer une fissure dans du béton.

- Le carbonate de calcium biogénéré est la quantité de carbonate de calcium produite par les micro-organismes à partir du lactate de calcium. Ce paramètre permet d'évaluer la capacité de conversion du lactate en carbonate par les micro-organismes. Il s'agit du paramètre le plus important pour l'évaluation d'une formulation.

Ces deux paramètres sont importants pour évaluer le potentiel de biocicatrisation d'une formulation. Pour être efficace, une formulation doit permettre, en fin de croissance, de produire un culot non soluble contenant beaucoup de matière solide (carbonate total) et un maximum de biocarbonate (carbonate produit) pour cimenter cette matière solide.

La figure V.5 présente pour chaque formulation les quantités moyennes et maximale du carbonate de calcium total et du carbonate de calcium biogénéré.

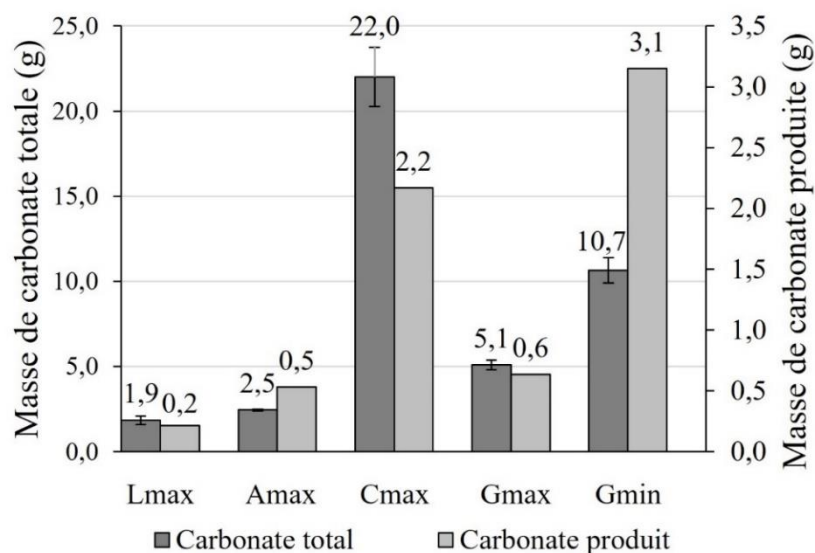


Figure V.5 : Quantité moyenne maximale de carbonate de calcium totale et produite pour chaque formulation.

Les formulations Lmax, Amax et Gmax produisent au bout de vingt-trois jours de culture un culot solide contenant peu de carbonate total et peu de carbonate de calcium biosourcé.

Les formulations Cmax et Gmin contiennent le plus de carbonate de calcium au bout de vingt-trois jours de culture, respectivement 21,6-22,0 et 10,7 g pour 100 mL de formulation. Elles produisent le plus de carbonate de calcium biosourcé, respectivement 1,8-2,2 et 3,1 g pour 100 mL de formulation. La formulation Cmax est donc celle contenant le plus de carbonate de calcium total (216 à 220 g par litre de formulation) et la formulation Gmin est celle produisant le plus de carbonate de calcium biosourcé (31 g par litre de formulation).

Une démarche similaire de croissance dans une formulation épaissie a été réalisée avec une formulation composée de lactate de calcium (7,5 %), d'Attagel 50 (6 %) et de Welan-gum (0,3

%) avec *Bacillus pseudofirmus* comme inoculum (8). En 35 jours, la croissance à 20 °C de cette bactérie dans 100 mL de cette formulation épaissie a permis la production de 2,5 g (+/- 0,3g) de carbonate de calcium biogénéré. La formulation Gmin permet la production de 3,1 g de carbonate de calcium, soit 20 % de plus en 23 jours (soit 12 jours de moins) à 20 °C.

### 5.3.3 Lien entre le lactate consommé et le carbonate de calcium produit

Un point important dans l'évaluation de l'efficacité des capacités de biominéralisation de CBB2020 dans une formulation est son rendement de production. Cela permet de produire plus de carbonate de calcium avec moins de lactate de calcium. Cela a deux avantages :

- Réduire la viscosité d'une formulation. Le chapitre 2 a montré que l'ajout de lactate de calcium augmente la viscosité type d'une formulation (indice k). Plus le rendement de production de carbonate de calcium est faible et plus il est possible d'obtenir des formulations fluides, avec des propriétés biominéralisantes équivalentes.
- Réduire les coûts de production. Un des avantages de la biocicatrisation sur la technique de réparation par injection de résine époxy est le prix de la solution de réparation. En utilisant moins de lactate pour la même efficacité de réparation, cela réduit le coût global de la réparation.

Il y a peu de différences de consommation de lactate entre les différentes formulations. En revanche, comme il a été observé dans la partie précédente, il y a une différence importante de production de carbonate de calcium entre les formulations Lmax, Amax, Gmax et les formulations Cmax et Gmin. Ces deux dernières formulations conduisent à la production la plus élevée de carbonate de calcium.

Connaitre la quantité de lactate de calcium consommée par le consortium et la quantité de carbonate de calcium produite pour chaque formulation permet de déterminer le rendement de production du carbonate de calcium, exprimé en g de carbonate de calcium par g de lactate de calcium consommé (tableau V.4).

Tableau V.4 : Masse de carbonate de calcium produite (en g) par gramme de lactate de calcium consommé.

	Lmax	Amax	Cmax	Gmax	Gmin
Rendement de production de carbonate (g/g de lactate consommé)	0,00 - 0,03	0,03 - 0,07	0,16- 0,20	0,04- 0,07	0,30



Les formulations Lmax, Amax et Gmax ont des rendements de production de carbonate de calcium plus faibles. Les formulations Cmax et Gmax ont des rendements de production de carbonate de calcium plus élevés. Une explication potentiel serait que tout le lactate ne peut pas être transformé en carbonate de calcium. Une part du carbone fourni par le lactate est utilisé pour produire de la biomasse, cellules et biofilm. Ces deux éléments ne sont pas pris en compte dans le calcul du rendement de production mais contribuent de manière indirecte à la quantité de carbonate de calcium produite. Le rendement de production le plus élevé est celui obtenu avec la formulation Gmin. Dans cette formulation, 0,3 g de carbonate de calcium sont produits pour 1 g de lactate de calcium consommé.

## **5.4. Conclusion**

La croissance du consortium CBB2020 dans les cinq formulations sélectionnées par le plan d'expériences mené à 20°C durant vingt-trois jours, a été évaluée au travers de la consommation du lactate et de la production du carbonate de calcium.

Les essais de croissance ont montré que le consortium microbien est capable de se développer dans les cinq formulations testées. La croissance de CBB2020 dans les formulations Lmax, Amax, Cmax et Gmax montre que les concentrations maximales de lactate de calcium, d'Attigel 50, de carbonate de calcium et de gluconate de calcium, utilisées pour le plan d'expériences, ne sont pas délétères vis-à-vis de la croissance du consortium. Parmi les cinq formulations candidates, celle dans laquelle CBB2020 consomme le plus de lactate de calcium est Gmin avec une consommation de 73% en vingt-trois jours conduisant à produire 3,2 g de carbonate de calcium pour 100 mL de formulation. Cette formulation contient beaucoup de carbonate de calcium à la fin de la culture environ 100 grammes de carbonate de calcium pour 1L de formulation. De plus, il s'agit de la formulation permettant le plus de production de carbonate de calcium biosourcé. Cela permet d'agglomérer au mieux les différents éléments solides présents en fin de biocicatrisation.

# Chapitre 6 : Essais de biocicatrisation sur des matériaux cimentaires fissurés en condition de laboratoire

## 6.1 Introduction

Les deux phases précédentes, le développement d'un milieu d'injection et de l'inoculum microbien, ont permis de mettre au point un procédé de biominéralisant. Ce procédé a été testé dans des conditions optimales (chapitre 5) pour mesurer le rendement de production de carbonate de calcium. Il est nécessaire d'utiliser des essais de laboratoire pour tester ce procédé et montrer ses capacités de biocicatrisation de fissures au sein d'un matériau cimentaire fissuré.

Dans un premier temps, le milieu épaissi Gmin inoculé avec le consortium est injecté dans des fissures d'éprouvettes de mortier dans des conditions contrôlées de laboratoire à 20°C. Le but est de déterminer la capacité de pénétration du milieu épaissi dans différentes tailles de fissures et d'observer l'effet de cette injection unique sur le colmatage de la fissure estimé par mesure de la perméabilité à l'air.

Dans un deuxième temps, le milieu épaissi Gmin inoculé avec le consortium CBB2020 est injecté dans deux fissures d'une dalle en béton. Il s'agit d'un dispositif comparable à une situation réelle, mais avec la possibilité de suivre le colmatage en mesurant le débit d'eau capable de traverser la fissure. Le but est de déterminer le biotraitement nécessaire pour un colmatage de la fissure et d'évaluer l'effet de ce traitement sur la perméabilité à l'eau de la fissure. En plus d'observer les performances de colmatage de la fissure, des observations au microscope électronique à balayage (MEB) sont effectuées pour identifier les composés présents dans les fissures traitées. Cette démarche en laboratoire sera une preuve du concept de ce procédé de biocicatrisation de fissures dans un béton avant une application sur des ouvrages réels.

## 6.2 Matériels et méthodes

### 6.2.1 Modèle de laboratoire : les éprouvettes de mortier

#### 6.2.1.1 Production des éprouvettes de mortier

Le dispositif expérimental utilisé pour générer des fissures dans un mortier a été développé en 2011 par Argouges (142). La procédure de malaxage du mortier utilisée suit la norme ASTM C 305 et le remplissage des moules suit la norme ASTM C109. Le granulat est un sable normalisé d'Ottawa qui respecte la norme ASTM C778. Il est constitué de grain de silice pure de granulométrie comprise entre 150 et 600  $\mu\text{m}$ . Le rapport sable/ciment utilisé est de 2,75. Le ciment est de type GU (usage général) de finesse Blaine 381  $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$  et le rapport eau/ciment est de 0,485.

Les éprouvettes de mortier utilisées sont de forme annulaire de diamètre extérieur de 150 mm, diamètre intérieur de 50 mm et de hauteur 50 mm (Fig. VI.1).

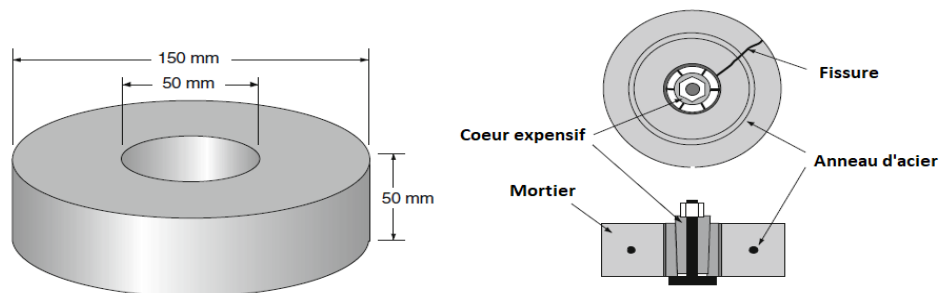


Figure VI.1 : Schéma d'une éprouvette de mortier et du système de fissuration. (142)

Les éprouvettes comportent un anneau d'acier de 4,8 mm de diamètre. Le diamètre intérieur de l'anneau est de 95 mm. L'anneau est maintenu en place dans le moule par des fils en nylon (Fig. VI.2).



Figure VI.2 : Moule d'une éprouvette de mortier avec armature d'acier suspendue par des fils en nylon.

Le remplissage des moules cylindriques se fait en deux couches, avec une légère vibration entre chaque couche pour permettre la mise en place du mortier sans détacher l'anneau d'armature (Fig. VI.2). La surface est ensuite arasée, puis le moule est couvert d'un film plastique pendant vingt-quatre heures. Après démoulage, les éprouvettes sont conservées vingt-huit jours dans une chambre humide (23°C et 100% d'humidité relative). Au terme de cette cure humide, la surface arasée du mortier est aplanie à l'aide d'une machine-outil pour enlever les aspérités de surface et pour rendre les deux faces parallèles.

Pour produire la fissuration, un cœur expansif, est inséré au centre de l'éprouvette. Il s'agit d'un cône d'acier tronqué entouré de six pétales d'acier compris dans une bague de PVC. L'enfoncement du cône central écarte les pétales d'acier. Cela conduit à l'augmentation du diamètre du cœur expansif. Cette contrainte mécanique induit la fissuration de l'éprouvette. La bague de PVC assure une élasticité pour éviter un éclatement local du mortier.

Au terme de cette fissuration, les éprouvettes fissurées sont placées dans une chambre de carbonatation, en présence de 4% de CO<sub>2</sub> et avec une humidité relative de 60%, durant six mois pour être carbonatés. Cette carbonatation est importante pour réduire le pH à la surface du mortier au voisinage de 9 et ainsi permettre la survie des inocula. Après la carbonatation, le cœur expansif de l'éprouvette est retiré et remplacé par de la paraffine.

Les tailles des fissures sont mesurées après carbonatation à l'aide d'une loupe bionculaire. L'estimation des tailles des fissures se fait grâce à une moyenne de dix mesures pour chacune des faces des fissures. L'ouverture apparente de vingt éprouvettes sont mesurées. Les tailles moyennes des fissures sont présentées dans le tableau VI.1.

*Tableau VI.1 : Tailles de fissure des éprouvettes de mortier.*

Numéro de l'éprouvette	Taille (µm)	Numéro de l'éprouvette	Taille (µm)
22	115	17	506
21	143	20	683
23	177	15	781
24	185	25	826
29	235	27	860
26	236	12	911
3	276	6	929
18	296	7	988
5	322	31	1087
9	413	10	1088

L'évaluation de la biocicatrisation se fait par le suivi de l'évolution de la perméabilité à l'air des fissures pour quantifier l'évolution des ouvertures apparentes de fissures. L'usage de l'air permet d'éviter une lixiviation des éprouvettes de mortier lors de la mesure.

La fissure est sélectionnée puis le reste de l'éprouvette est recouvert d'aluminium adhésif pour contraindre le passage de l'air dans une seule fissure. L'éprouvette est placée dans la cellule de perméabilité (Fig.VI.3). Une pression de confinement de 0,5 bar est appliquée dans le boudin d'étanchéité permettant d'empêcher l'air de passer sur les bords de l'éprouvette. L'échantillon est soumis à un différentiel de pression de 0,1 bar. Cela permet le passage de l'air dans la fissure. Le débit de sortie est mesuré par un débitmètre numérique (Massview MV-104, Bronkhors®).

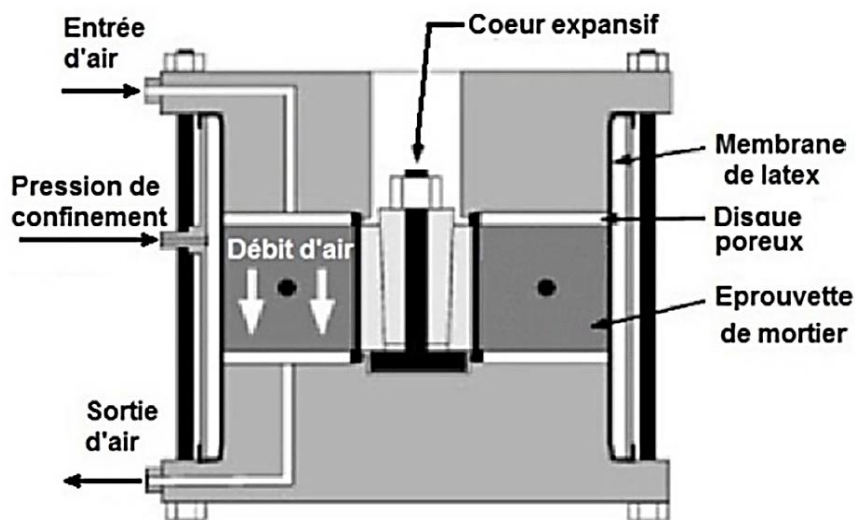


Figure VI.3 : Dispositif de mesure du débit de l'air à travers les fissures des éprouvettes de mortier.

Il existe une relation mathématique entre les ouvertures apparentes des fissures et le débit d'air qui peut les traverser. Cette relation permet, à partir de la mesure de débit d'air d'une fissure ayant une ouverture inconnue, de déterminer son ouverture apparente. Les vingt éprouvettes, dont les tailles sont présentées dans le tableau VI.1, ont été placées dans la cellule de perméabilité à l'air en utilisant un différentiel de pression de 0,1 bar. La figure VI.4 présente la relation entre les mesures d'ouvertures des fissures des éprouvettes produites et leurs débits d'air associés. L'équation de la courbe de tendance obtenue à partir des points de mesure permet de lier ces deux paramètres. Cette relation prend la forme d'une équation linéaire :

$$y = 43,136x + 7,6799$$

y est le débit d'air en L/min et x est l'ouverture apparente en  $\mu\text{m}$ .

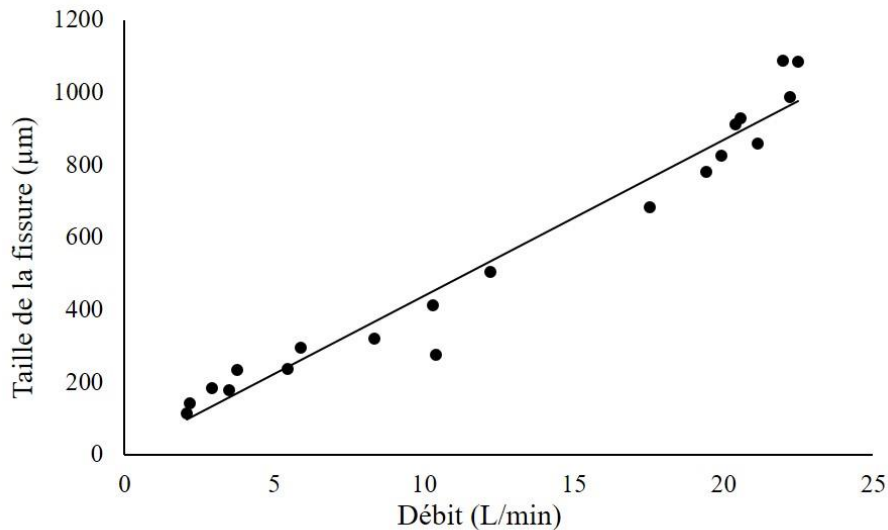


Figure VI.4 : Débit d'air traversant des fissures d'éprouvettes de mortier en fonction de son ouverture, pour un différentiel de pression de 0,1 bar.

Le coefficient de détermination ( $R^2$ ) de cette équation est 0,959 avec un effectif de 20. Cette modélisation permet une bonne représentation des valeurs mesurées.

#### 6.2.1.2 Préparation de la formulation injectée

Le milieu liquide L50 contenant  $50 \text{ g.L}^{-1}$  de lactate de calcium et  $3 \text{ g.L}^{-1}$  d'extrait de levure, il est inoculé la veille des essais avec un cryotube de 1,5 mL et mis en culture vingt-quatre heures sous agitation (150 rpm).

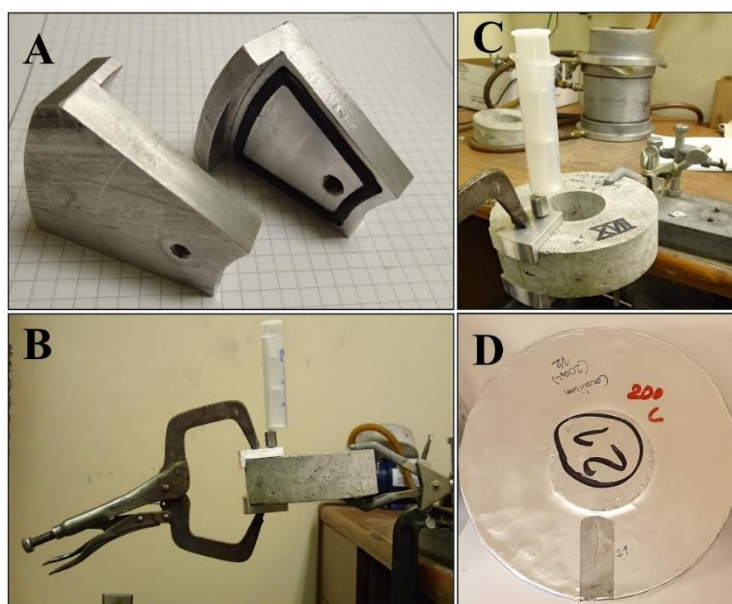
La formulation épaissie Gmin (200 mL) est utilisée, elle contient de l'Attigel 50 (5,2 g, 2%), du carbonate de calcium (18,6 g, 7,3%), du gluconate de calcium (2,6 g, 1%), du lactate de calcium (27,6 g, 11,2%), l'extrait de levure (0,8 g, 0,3%) et 200 mL d'eau distillée. Les procédures de stérilisation et d'épaississement sont présentées dans le chapitre 5. Cette formulation est inoculée le jour du test avec 5 mL de milieu L50.

#### 6.2.1.3 Injection dans les fissures

Les éprouvettes sont immergées dans de l'eau distillée stérile vingt-quatre heures avant l'injection pour présaturer le béton et éviter un désèchement de la formulation injectée. La formulation Gmin est injectée dans chaque fissure avec des injecteurs présentés dans la figure VI.5.

La figure VI.5A montre les plaques d'injection permettant de confiner la fissure lors de l'injection. La figure VI.5B-C montre le système d'injection installé sur une éprouvette de

mortier fissurée. Les plaques d'injections sont plaquées sur la fissure et maintenues avec une pince étau. Une seringue est enfoncée dans le trou de la plaque supérieure et permet l'injection. La figure VI.5D montre une éprouvette prête pour une injection.



Photos A, B et C proviennent de la thèse Feurgard, 2017 (8).

A : plaquettes d'injection. B et C : système d'injection. D : éprouvettes préparées pour le biotraitement.

Figure VI.5 : Injecteurs utilisés sur les éprouvettes de mortier cylindriques.

Pour les essais sur mortier fissuré, six éprouvettes sont sélectionnées en fonction des tailles de leurs fissures. Deux éprouvettes pour chacune des trois tailles de fissures sont choisies : fines (environ 100  $\mu\text{m}$ ), moyennes (entre 300 et 400  $\mu\text{m}$ ) et larges (environ 800  $\mu\text{m}$ ). Les éprouvettes sélectionnées pour l'injection sont présentées dans le tableau VI.2.

Tableau VI.2 : Tailles de fissure des éprouvettes de mortier.

Type de fissure	Localisation de la fissure	Taille ( $\mu\text{m}$ )
Fissures fines	Eprouvette 22	115
	Eprouvette 21	143
Fissures moyennes	Eprouvette 9	413
	Eprouvette 18	296
Fissures larges	Eprouvette 25	826
	Eprouvette 27	860

Toutes les éprouvettes injectées sont conservées pendant sept mois dans des seaux stériles avec un fond d'eau stérile (Les fissures ne sont pas en contact avec l'eau). L'eau est renouvelée au bout de trois mois (environs 1 L d'eau au fond du seau).

#### ***6.2.1.4 Evaluation de l'effet du biotraitement sur les fissures des éprouvettes de mortier***

Après les sept mois de conservation à l'humidité, les éprouvettes sont retirées des seaux et mises à sécher dans une étuve pendant 48 heures à 40°C. La cellule de perméabilité à l'air est ensuite utilisée pour mesurer les débits d'air traversant les fissures à un différentiel de pression de 0,1 bar.

Suite à cette mesure, pour déterminer la résistance du matériau de colmatage à la lixiviation, les deux éprouvettes comportant des fissures fines (épreuves 21 et 22), une contenant une fissure moyenne (épreuve 18) et les deux contenant des fissures larges (épreuves 25 et 27) sont chacune mises vingt-quatre heures dans 5 litres d'eau. Après ce passage dans l'eau, les éprouvettes sont mises à sécher une semaine à 40°C et les débits d'air sont mesurés à nouveau sous un différentiel de pression de 0,1 bar. L'épreuve 25 a été perdue lors d'une tentative de découpe pour des observations en microscopie électronique à balayage.

### **6.2.2 Fabrication de la dalle en béton**

La dalle en béton est un dispositif expérimental intermédiaire entre le dispositif de laboratoire (épreuve de mortier) et d'un ouvrage réel. Le dispositif reprend celui mis au point dans la thèse de Feurgard (8) en y appliquant quelques modifications.

#### ***6.2.2.1 Fabrication de la dalle***

La dalle (1 x 2 x 0,15 m) est traversée par trois barres d'armature de 30 mm filetées à leurs extrémités. Elle est faite avec un béton d'usine sans air entraîné avec une classe de résistance à la compression de 25 MPa à 28 jours et une plage d'affaissement de 100 +/- 30 mm. Le rapport eau/ciment nominal est de 0,7. Quatre plaques en métal de 1 mm d'épaisseur et de 5 cm de largeur ont été fixées aux deux côtés du coffrage pour créer deux sections de fragilité et favoriser l'apparition de deux fissures. Une amélioration par rapport à la première dalle réalisée dans la thèse d'I. Feurgard (8) est l'ajout, sur les barres d'armature, de tubes en acier de diamètre intérieur de 38 mm, d'une épaisseur de 5 mm et d'une longueur de 300 mm, afin de limiter l'adhérence entre le béton et la barre d'armature au niveau de la zone à fissurer. Cela permet le



glissement du béton au voisinage de la fissure, ce qui facilite la création de fissures de plus grandes ouvertures.

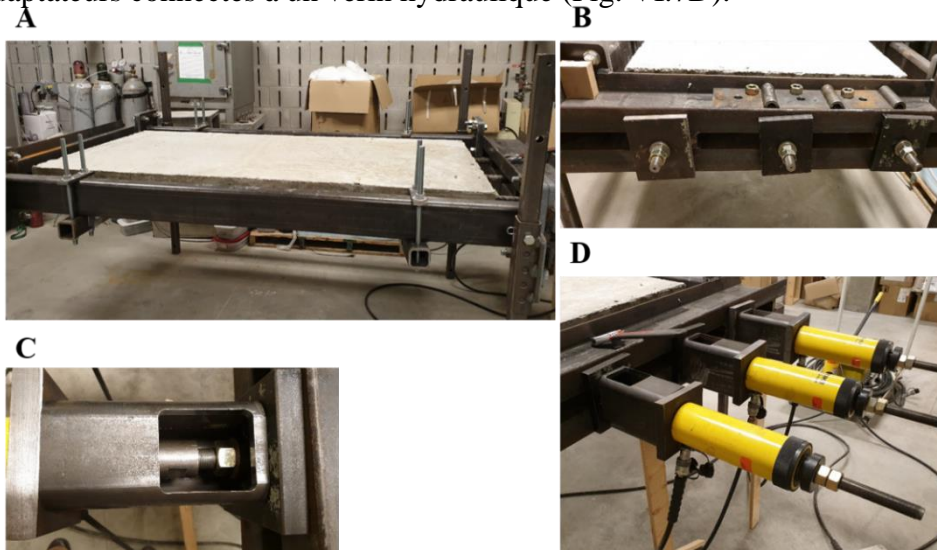
La dalle est coulée sans vibration. Elle est curée pendant quatorze jours dans son coffrage recouvert d'un jute humide régulièrement arrosé avec de l'eau pour le maintenir continuellement humide (Fig. VI.6). Au terme de ces quatorze jours, la dalle est montée sur le cadre.



Figure VI.6 : Dalle de béton dans son coffrage pendant sa cure humide.

### 6.2.2.2 Fissuration de la dalle

Le cadre rigide (Fig. VI.7A) permet la fissuration. Les barres d'armature sont maintenues au cadre par des plaques d'appui (Fig. VI.7B). De l'autre côté, les barres filetées sont raccordées à des adaptateurs connectés à un vérin hydraulique (Fig. VI.7D).



A : dalle sur son cadre.

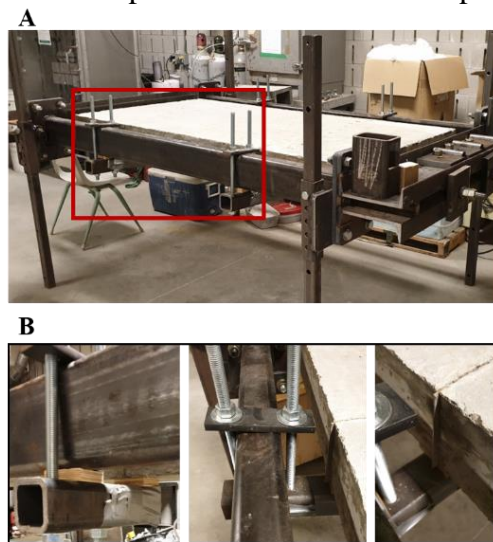
C : écrous de haute résistance, coté mobile.

B : écrous de haute résistance, coté fixe.

D : vérins hydrauliques.

Figure VI.7 : Dalle de béton sur son cadre.

Ces vérins tirent progressivement les barres d'armature pour induire une contrainte de traction dans le béton de la dalle. Comme le béton a une faible résistance en traction, il se fissure au niveau des deux sections de faiblesse engendrées par les plaques initiatrices. Un écrou à haute résistance (Fig. VI.7C), placé sur le filetage des barres d'armature du côté des vérins, permet de bloquer la position de la barre une fois que la taille de la fissure est satisfaisante. Des supports latéraux sont ajoutés au niveau des fissures (Fig. IV.8). Ils permettent, par effet de levier, de légèrement remonter la dalle en vissant la tige filetée externe. Cela permet de contrôler la taille de la fissure en dessous de la dalle pour avoir une taille comparable sur les deux faces de la dalle.



A : image globale pour localiser des soutiens. B : gros plan sur les soutiens.

*Figure VI.8 : Soutiens latéraux de la dalle.*

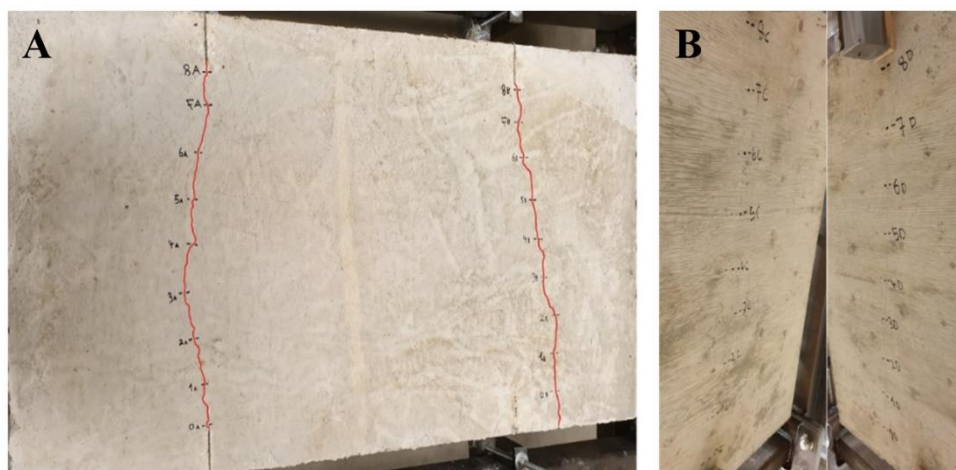
Une fois que la taille de la fissure est satisfaisante, les écrous, du côté des vérins, sont serrés et un deuxième écrou est ajouté. Cela permet de bloquer le système dans cette position. La dalle subit ensuite une carbonatation dans une bâche en plastique (Fig. VI.9) contenant un récipient rempli d'eau dans lequel du CO<sub>2</sub> est injecté en continu, afin de permettre un apport d'eau et de CO<sub>2</sub> pour assurer une carbonatation accélérée de la dalle. Un brumisateur est placé à l'intérieur de l'enceinte. La dalle est carbonatée pendant trois mois à 80% d'humidité relative et avec une concentration de CO<sub>2</sub> de 10 000 ppm (1%) sous la tente de carbonatation, avec une vérification manuelle quotidienne.



*Figure VI.9 : Tente de carbonatation de la dalle.*

### 6.2.2.3 Caractérisation de la taille des fissures

La fissuration de la dalle a été évaluée par des mesures, à l'aide d'un vidéo-microscope, de la taille des deux fissures sur leurs faces supérieures et inférieures. Neuf points de mesures ont été réalisés tous les 10 cm le long des deux fissures. Les fissures surlignées en rouge sont présentées dans la figure VI.10A (face supérieure) et VI.10B (face inférieure).



A : face supérieure avec la fissure « a » et « b ». B ; face inférieure avec la fissure « c » et « d ».

Figure VI.10 : Fissures de la dalle en béton.

Le tableau VI.3 présente les mesures de l'ouverture des fissures.

Tableau VI.3 : Ouvertures des deux fissures de la dalle en béton.

Points de mesure	Ouvertures de la fissure 1 (a-c)		Ouvertures de la fissure 2 (b-d)	
	A haut ( $\mu\text{m}$ )	C bas ( $\mu\text{m}$ )	B haut ( $\mu\text{m}$ )	D bas ( $\mu\text{m}$ )
0	452	560	457	450
1	486	440	397	450
2	360	430	324	420
3	441	320	438	380
4	426	480	449	440
5	452	410	475	390
6	478	420	484	460
7	360	510	425	390
8	289	450	442	490
Moyenne	416	447	432	430
Ecart type	61,9	63,6	45,6	35,3

Les deux fissures, les ouvertures de leurs faces supérieures et inférieures sont de tailles similaires avec une ouverture moyenne de 431 pour la fissure 1 et pour la fissure 2.

## 6.2.3 Biotraitement des fissures de la dalle et suivi de leurs colmatages

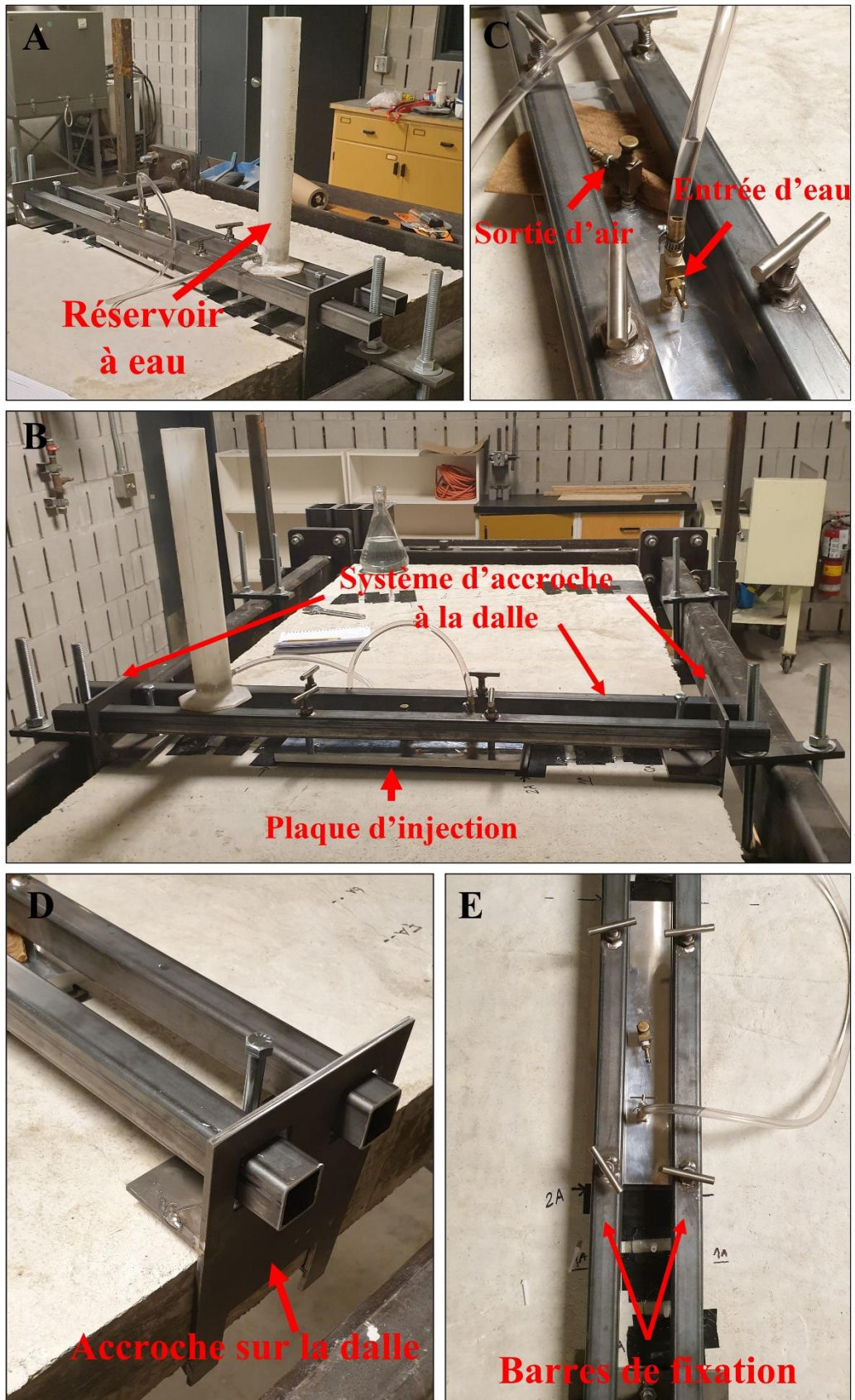
### 6.2.3.1 Mesure du débit d'eau à travers la dalle

Pour suivre l'évolution du colmatage des fissures, la technique choisie est de mesurer le débit d'eau traversant les fissures. Une fois la dalle prête, il est nécessaire de mesurer le débit d'eau initial avant de réaliser le biotraitement, Un dispositif d'injection d'eau est mis en place (Fig. VI.11).

Il s'agit d'une plaque d'injection constituée d'une boîte en aluminium de 40 x 14 x 3 cm avec une entrée d'eau munie d'une valve pour réguler le débit et une sortie d'air avec un interrupteur pour permettre l'évacuation de l'air lors du remplissage (Fig. VI.11B et C). Le volume interne de la boîte est de 38 x 8 x 1 cm. La boîte d'injection est rattachée à un petit réservoir d'eau, constitué d'une éprouvette graduée de 1 litre placée sur les barres de fixation, qui permet de mesurer précisément le volume d'eau injectée dans la fissure (Fig. VI.11A). La plaque d'injection est plaquée sur la dalle grâce à un système de tenue amovible (Fig. IV.11B). Il comporte deux mâchoires métalliques munies d'une vis pour les fixer sur le côté de la dalle (Fig. IV.11D). Ces mâchoires comportent deux trous pour recevoir deux tiges transversales (Fig. IV.11E). Ces tiges comportent chacune deux vis de serrage pour maintenir la plaque d'injection fermement appuyée contre la dalle en béton. La dimension intérieure de la plaque d'injection est de 38 cm. Il s'agit donc de la longueur de fissure sur laquelle se fait la mesure du débit d'eau à travers la fissure.

Pour réaliser la mesure de débit d'eau, l'éprouvette graduée est remplie avec 500 mL d'eau et le robinet est ouvert d'un demi-tour. A ce moment-là, le temps de passage de 100 mL est chronométré quatre fois (500-400 mL, 400-300 mL, 300-200 mL et 200-100 mL). La mesure de ces différents débits a permis de définir que l'on obtient un régime d'écoulement permanent la cinquième fois que cette procédure est appliquée (soit après 1,6 L d'eau). La moyenne des quatre débits mesurés lors de ce cinquième passage est la valeur de débit utilisée (en mL/s). La boîte collectrice fait 38 cm, cela signifie que cette valeur de débit est obtenue pour cette longueur de fissure. La valeur utilisée est la valeur de débit mesurée ramenée à celle que l'on aurait obtenue pour un mètre de fissure (en mL/s/m).





- A : réservoir d'eau.  
 B : plaque d'injection et système de fixation à la dalle.  
 C : entrée d'eau et sortie d'air dans la plaque d'injection.  
 D : accroche sur la dalle. E : barres de fixation plaquant la plaque d'injection sur la dalle.

Figure VI.11 : Système de mesure du débit d'eau à travers les fissures de la dalle.

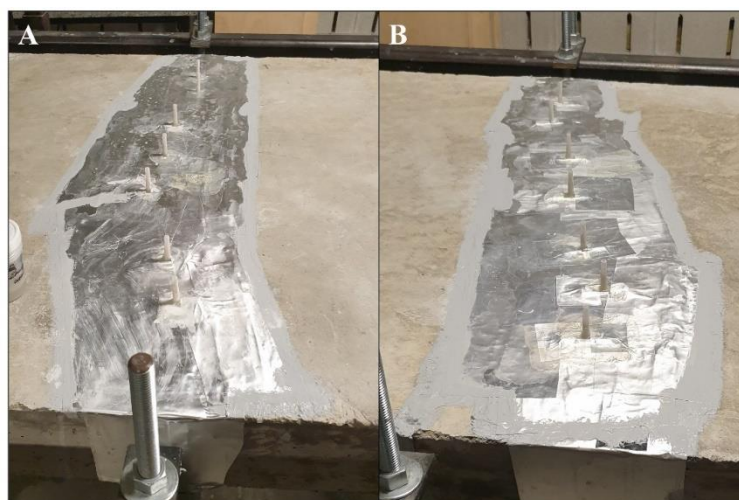
### 6.2.3.2 Formulations utilisées pour le traitement des fissures de la dalle

Deux milieux d'injections sont utilisés :

- Le milieu liquide L50 (500 mL) contenant 25 g de lactate de calcium et 1,5 g d'extrait de levure, il est inoculé la veille des essais avec 1 mL de culture du consortium et mis en culture vingt-quatre heures sous agitation (150 rpm) dans un erlenmeyer de 1 L.
- La formulation épaissie Gmin (400 mL) contenant de l'Attigel 50 (10,4 g, 2%), du carbonate de calcium (37,2 g, 7,3%), du gluconate de calcium (5,2 g, 1%), du lactate de calcium (57,2 g, 11,2%), l'extrait de levure (7,6 g, 0,3%) et 400 mL d'eau distillée. La procédure de stérilisation et d'épaississement sont présentés dans le chapitre 5. La formulation épaissie est mise en suspension avec un blender de la marque Waring Commercial® pendant 1 minute à la vitesse 2. Puis, elle est inoculée avec 5 mL du milieu L50 et mélangée quinze secondes à la vitesse 1.

### 6.2.3.3 Injection de formulation dans les fissures de la dalle

Des bandes adhésives d'aluminium sont utilisées pour colmater la face inférieure et les faces latérales de chaque fissure. Un enduit siliconé est utilisé pour colmater les fuites. Sur la face supérieure, des têtes d'injection sont installées et collées avec de la résine époxy. Des bandes adhésives, placées transversalement aux fissures, sont utilisées pour éviter que la résine entre dans les fissures lors du collage des têtes d'injection. Une fois que la résine a polymérisé, le reste de la fissure est refermée avec des bandes adhésives d'aluminium et de l'enduit siliconé (Fig. VI.12).



A : fissure 1. B : fissure 2.

Figure VI.12 : Préparation de l'injection des fissures de la dalle.

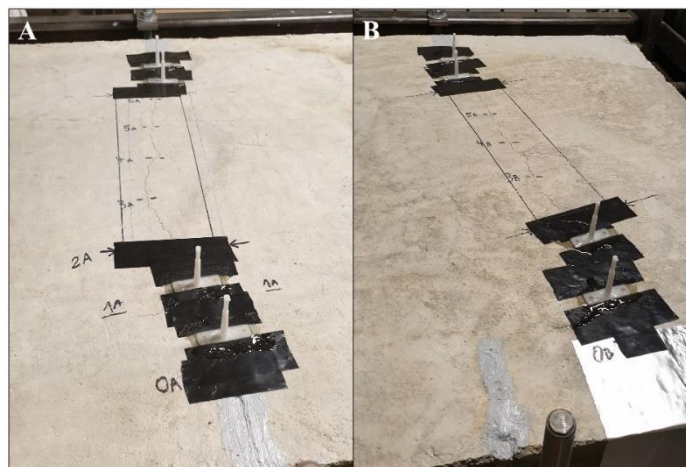
Le béton, à l'intérieur des fissures est relativement sec, ce qui pourrait nuire à l'activité biologique. Une phase de pré-saturation du béton au voisinage des fissures a donc été prévue. Durant trois semaines, les fissures sont remplies d'eau tous les deux jours à l'aide d'une seringue connectée aux têtes d'injection collées le long du trajet de la fissure.

Le jour de l'injection, le milieu L50 est injecté dans les fissures à l'aide d'une seringue de 20 mL. L'injection est réalisée séquentiellement, elle se fait en commençant sur un bord de la fissure, le milieu L50 est injecté dans la première tête (t1) jusqu'à le voir ressortir au niveau de la tête suivante (t2). Quand ceci est observé, la tête (t1) est bouchée et l'injection peut se faire dans la tête suivante (t2) jusqu'à ce que le milieu L50 ressorte au niveau de la tête suivante (t3) et ainsi de suite pour permettre un remplissage du volume intérieur. Par la suite, la formulation Gmin est préparée puis injectée avec une seringue de 20 mL (Fig. VI.13). L'injection est réalisée séquentiellement, d'une tête à l'autre, pour chasser le milieu L50 et ainsi permettre un remplissage optimal du volume interne des fissures avec la formulation Gmin.



Figure VI.13 : Injection d'une fissure de la dalle.

Une semaine plus tard, la zone centrale est dégagée des bandes adhésives et des têtes d'injection (Fig. VI.14). Les têtes sont retirées dans cette zone pour permettre l'installation de la plaque d'injection.



A : fissure 1. B : fissure 2.

Figure VI.14 : Zone centrale dégagée pour permettre les mesures de débit d'eau intermédiaires.



La plaque d'injection est placée sur la zone centrale et la mesure du débit d'eau est réalisée. Après la mesure des débits d'eau, les surfaces supérieures des deux fissures sont de nouveau préparées pour une injection. Les têtes d'injection ne sont pas placées au même endroit qu'à la première injection. Le dernier traitement est un badigeonnage de milieu épaissi Gmin à la surface des fissures. La séquence détaillée des biotraitements et de mesures de débit d'eau est présentée dans la figure IV.15.

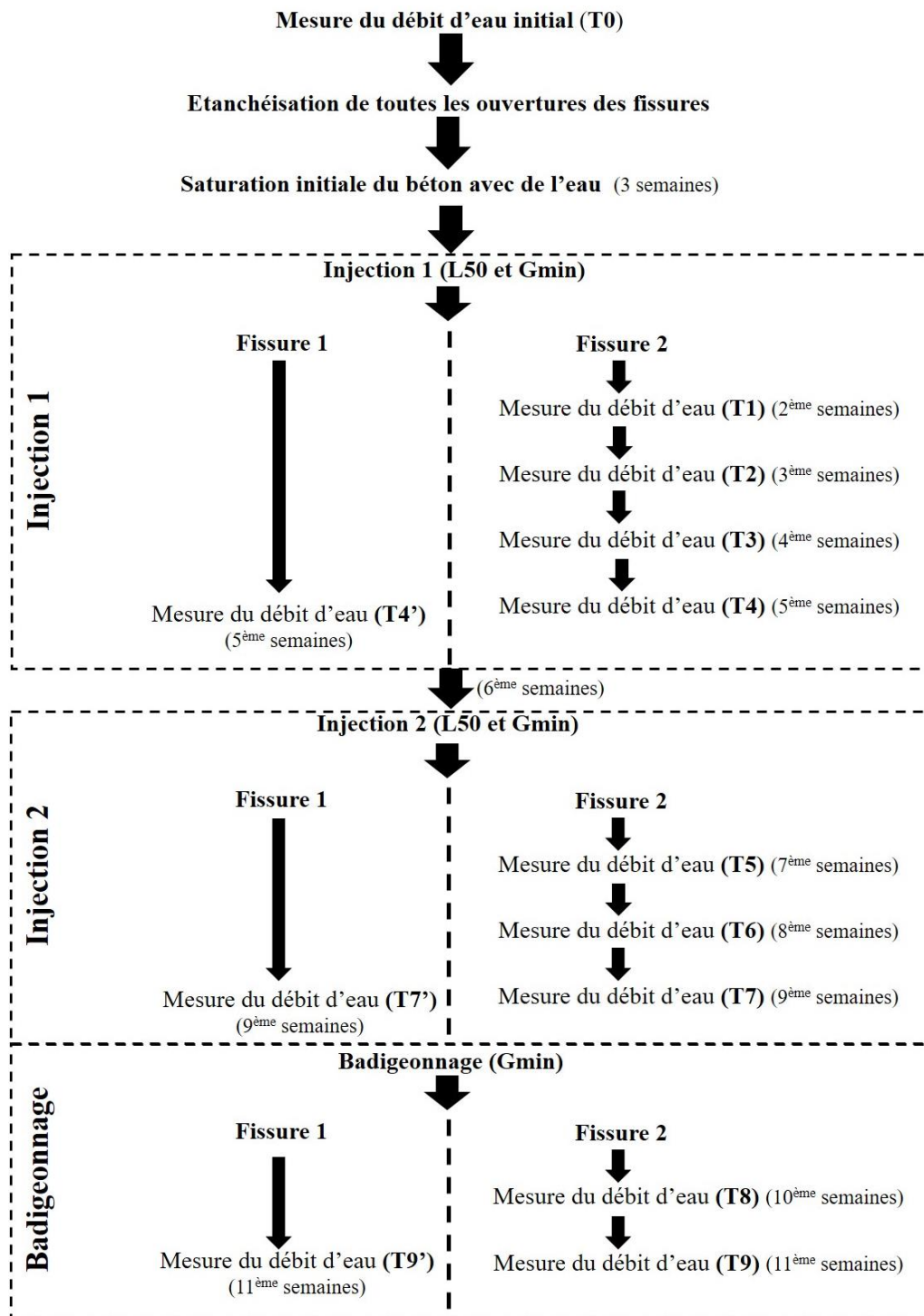


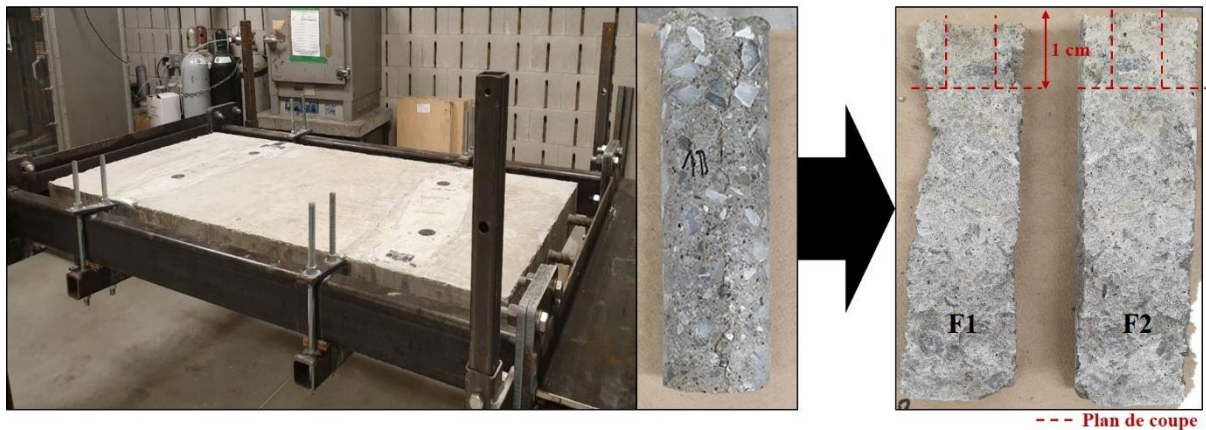
Figure VI.15 : Différents biotraitements réalisés sur les fissures de la dalle.



Les deux fissures subissent les mêmes traitements biologiques : deux injections puis un badigeonnage de milieu épais. Dans le cas de la fissure 2, des mesures de débit d'eau sont faites régulièrement (chaque semaine). Dans le cas de la fissure 1, une seule mesure de débit d'eau est faite une fois après chaque traitement.

#### 6.2.4 Observations en microscopie électronique à balayage (MEB) du produit de réparation

Après les dernières mesures de débit d'eau, deux carottes (A et B) ont été prélevées dans chaque fissure. Les carottes ont un diamètre de 5 cm et une longueur de 30 cm. Les quatre carottes sont nommées 1A, 1B, 2A et 2B (Fig. VI.16).



F1 = face 1 et F2 = face 2.

*Figure VI.16 : Forage de la dalle en béton et ouverture des carottes de béton.*

Immédiatement après le forage, les carottes sont séparées en deux le long du plan de fissuration (F1 et F2). Le groupe de huit éprouvettes comprend donc les échantillons 1AF1, 1AF2, 1BF1, 1BF2, 2AF1, 2AF2, 2BF1 et 2BF2. Pour chaque échantillon, un morceau de 1 cm<sup>2</sup> est découpé à l'aide d'une scie à lame en céramique. Ces morceaux sont immédiatement placés dans une chambre de dessiccation pour éviter la formation d'une couche de carbonatation à la surface du béton. Les échantillons sont métallisés à l'aide d'une couche mélange d'or-palladium pour pouvoir être observés au microscope électronique à balayage : Hitachi S-3000N (MEB 1) et Hitachi S-4700 (MEB 2).

## 6.3 Résultats et discussion

### 6.3.1 Essais de biocicatrisation en situation contrôlée de laboratoire

L'objectif de ces essais est de déterminer la faisabilité de l'injection d'une formulation dans des fissures de différentes tailles et d'évaluer leur degré de colmatage. Ces fissures sont traitées avec une injection unique de la formulation Gmin inoculée avec le consortium. Après biotraitement, le colmatage des fissures est estimé par détermination de la réduction de leurs ouvertures apparentes mesurées par perméabilité à l'air.

#### 6.3.1.1 Mesures des ouvertures apparentes initiales

Avant l'injection, le débit d'air traversant chaque fissure est mesuré avec une pression de 0,1 bar. Cela permet de calculer l'ouverture apparente initiale de chaque fissure en utilisant l'équation présentée dans la partie 2.1.1. Ces résultats sont présentés dans le tableau VI.4.

Tableau VI.4 : Ouvertures apparentes des fissures dans les éprouvettes de mortier avant le traitement.

Catégories de fissures	Nom éprouvette	Débit (L/min)	Ouverture apparente ( $\mu\text{m}$ )
Fissures fines	Eprouvette 22	2,09	98
	Eprouvette 21	2,19	102
Fissures moyennes	Eprouvette 9	10,30	452
	Eprouvette 18	5,89	262
Fissures larges	Eprouvette 25	19,93	867
	Eprouvette 27	21,13	919

Trois catégories de fissures sont utilisées : fines ( $\approx 100 \mu\text{m}$ ), moyennes ( $200 < 500 \mu\text{m}$ ) et larges ( $> 800 \mu\text{m}$ ). Dans la catégorie moyenne, les deux ouvertures apparentes des fissures sont différentes car elles se retrouvent à chacune des limites de la plage. Cette différence devra être prise en compte dans l'évaluation du colmatage des fissures.

Après l'injection, les éprouvettes sont placées dans un récipient fermé contenant de l'eau pour une durée de sept mois.

### 6.3.1.2 Mesures des fissures fines, moyennes et grosses après le traitement

Au terme de la période de sept mois, le débit d'air est de nouveau mesuré pour calculer les ouvertures apparentes. Les résultats sont présentés dans le tableau VI.5.

Tableau VI.5 : Colmatage des fissures fines, moyennes et grosses des éprouvettes de mortier.

Catégorie	N° d'éprouvette	Ouverture apparente initiale (μm)	Ouverture apparente finale (μm)	Réduction de l'ouverture apparente (μm)	Réduction de l'ouverture apparente (%)
Fine	22	98	10	88	90
	21	102	16	86	84
Moyenne	9	452	106	346	76
	18	262	61	201	77
Large	25	867	577	290	33
	27	919	614	305	33

On constate une diminution de l'ouverture apparente pour toutes les fissures traitées. Dans le cas des fissures fines la réduction de l'ouverture apparente est de 86 et 88 μm soit 84 et 90%. L'ouverture apparente finale est comprise entre 10 et 16 μm, ce qui est très faible compte tenu qu'une fissure de moins de 100 μm a très peu d'impact sur la durabilité du matériau. La figure VI.17 présente l'aspect visuel des fissures avant et sept mois après l'injection dans les fissures.

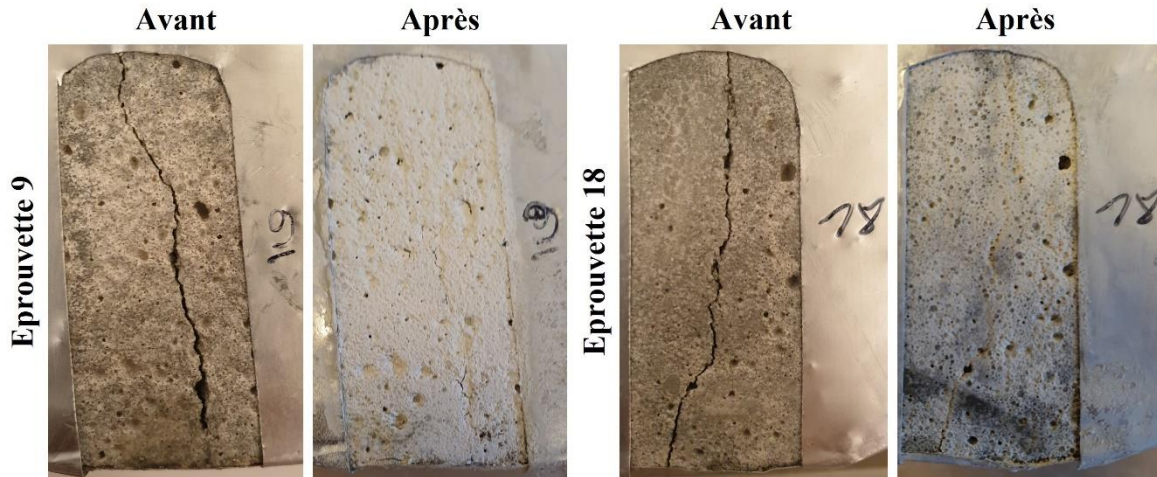


Les photos sont prises avant et après le biotraitement.

Figure VI.17 : Observations des fissures fines dans les éprouvettes de mortier.

Globalement, les fissures ne sont presque plus visibles après le traitement. Cela est cohérent avec les ouvertures apparentes de moins de 20 μm calculées à partir des débits d'air.

Les deux fissures moyennes (échantillons 9 et 18) ont une ouverture apparente initiale très différente, respectivement de environ 450 et 250  $\mu\text{m}$ . Pourtant, après traitement, elles ont des pourcentages de réduction très proches, 76 et 77%. La figure VI.18 présente l'aspect visuel des fissures avant et sept mois après l'injection dans les fissures.

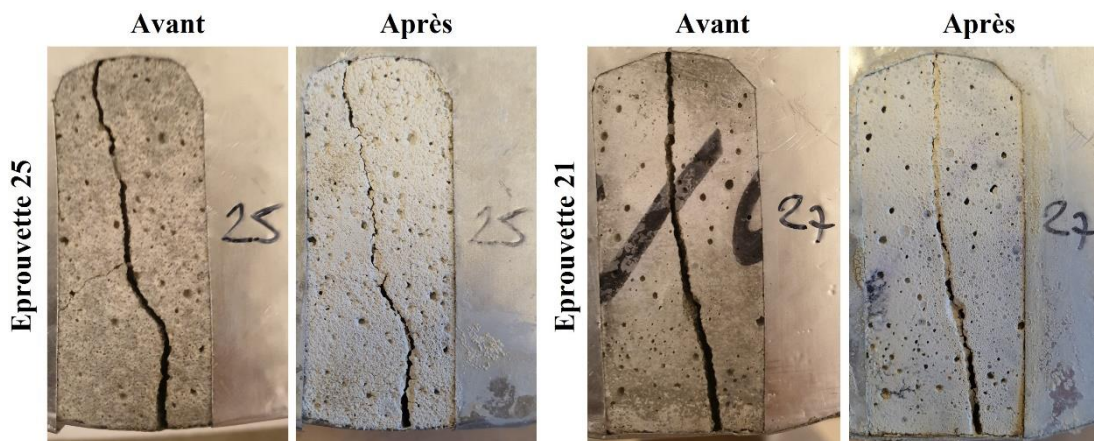


Les photos sont prises avant et après le biotraitement.

Figure VI.18 : Observations des fissures moyennes dans les éprouvettes de mortier.

On observe que, pour les deux fissures moyennes, l'injection de la formulation Gmin permet un colmatage significatif. La fissure reste visible par endroit, ce qui explique que la réduction de l'ouverture apparente ne soit pas totale mais l'ouverture apparente finale est de l'ordre de 100  $\mu\text{m}$ , ce qui limite l'impact de la fissuration sur la durabilité. La taille fine (100  $\mu\text{m}$ ) des fissures suggère qu'une deuxième injection aurait permis un colmatage plus important.

Le traitement sur les fissures larges est moins efficace et ne permet qu'une réduction de l'ouverture apparente d'environ 300  $\mu\text{m}$ , soit 33%. Les deux fissures ont un pourcentage de réduction de leurs ouvertures apparentes identiques. La figure VI.19 présente l'aspect visuel des fissures avant et sept mois après l'injection dans les fissures..



Les photos sont prises avant et après le biotraitement.

Figure VI.19 : Observations des fissures larges dans les éprouvettes de mortier.

Dans le cas des fissures larges, on constate que le traitement n'a que très partiellement colmaté les fissures. Au vu des essais réalisés avec les fissures fines et moyennes, ce résultat suggère que trois injections pourraient être nécessaires pour produire un colmatage complet d'une fissure de l'ordre de 900  $\mu\text{m}$ .

La suite de cette partie de l'étude consistera à conserver dans l'eau pendant vingt-quatre heures les éprouvettes comportant des fissures fines et larges.

### **6.3.1.3 Test de lixiviation du matériau de réparation colmatant les fissures des éprouvettes de mortier**

Les éprouvettes de mortier sont immergées durant vingt-quatre heures dans cinq litres d'eau. Après séchage, une mesure de débit d'air est réalisée. Le tableau VI.6 présente les résultats obtenus.

*Tableau VI.6 : Colmatage des fissures fines et grosses des éprouvettes de mortier, après une immersion de vingt-quatre heures dans de l'eau.*

Catégorie	N° d'éprouvette	Ouverture apparente avant immersion ( $\mu\text{m}$ )	Ouverture apparente après immersion ( $\mu\text{m}$ )	Augmentation de l'ouverture apparente ( $\mu\text{m}$ )
Fine	22	10	13	3
	21	16	20	4
Moyenne	18	61	73	12
Large	25	577	538	-39
	27	614	616	2

On constate une légère augmentation de l'ouverture apparente pour presque toutes les fissures des éprouvettes immergées. C'est avec les fissures fines que l'augmentation maximale est observée, avec une augmentation de 4 à 3  $\mu\text{m}$ . Cependant, les ouvertures apparentes finales restent inférieures à 20  $\mu\text{m}$ . L'immersion a un impact plus faible sur l'ouverture apparente de la fissure moyenne immergée (12  $\mu\text{m}$  d'augmentation) et un impact encore plus faible sur les deux fissures larges avec aucun impact ou une légère diminution de 39  $\mu\text{m}$ .

Cette immersion n'a donc pas d'impact significatif sur l'ouverture apparente des fissures traitées. Cela permet de conclure que le matériau de réparation est résistant à l'eau, il est donc possible d'utiliser la mesure d'un débit eau traversant une fissure traitée pour quantifier son colmatage sans risquer de dissoudre le matériau de réparation.



### 6.3.2 Essais de biocicatrisation sur la dalle en béton

La dalle est un élément en béton qui se rapproche de la structure d'un ouvrage fissuré. Les fissures ont chacune une ouverture d'environ 425  $\mu\text{m}$ , ce qui correspond à des ouvertures moyennes de fissures utilisées lors des essais avec des éprouvettes de mortier fissurées. Les essais sur ces fissures suggéraient la nécessité de deux injections pour permettre le colmatage des fissures. L'ajout d'un badigeonnage final permettrait d'atteindre un colmatage plus complet. Par conséquent, les deux fissures sont traitées avec deux injections et un badigeonnage superficiel de la formulation Gmin sélectionnée au chapitre 5.

#### 6.3.2.1 Evaluation du colmatage de la fissure par mesure du débit à l'eau des fissures

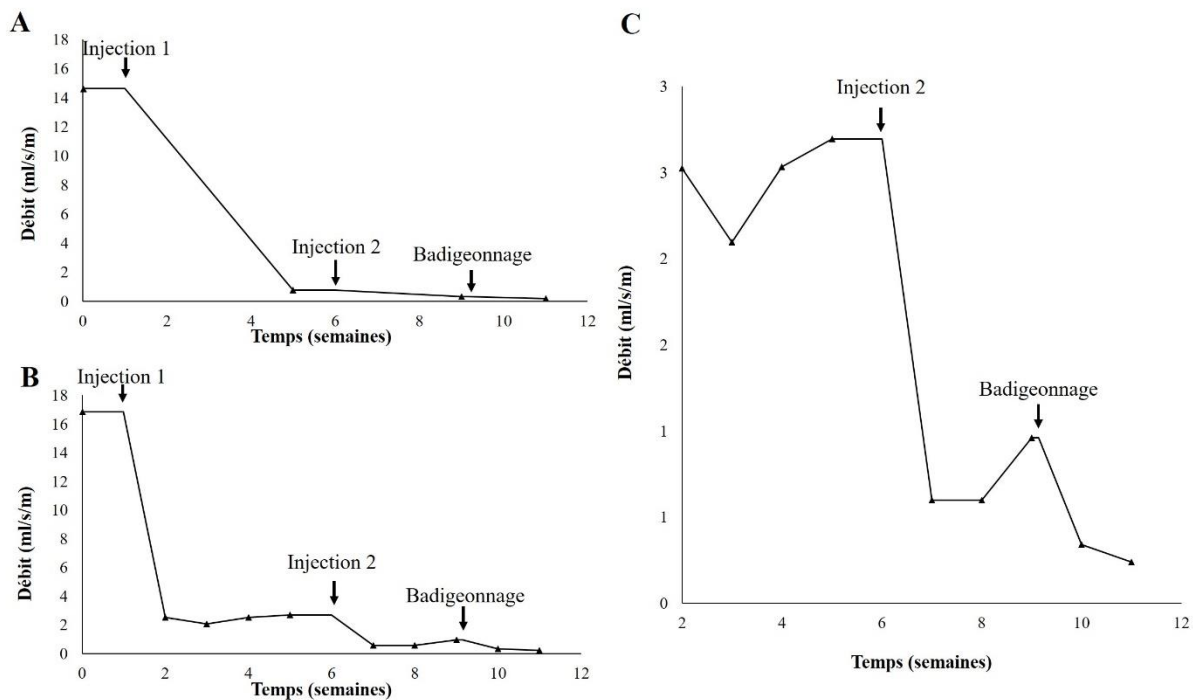
Les deux fissures ont été traitées de la même manière mais la séquence de mesure de débit d'eau diffère (Fig. VI.15). Pour la fissure 1, une seule mesure terminale du débit d'eau a été faite après chaque traitement pour limiter le risque de lixiviation du colmatage partiel entre chaque phase d'injection. Le débit d'eau à travers la fissure 2 est mesuré plusieurs fois entre chaque traitement pour mieux suivre la cinétique du colmatage de la fissure. Les valeurs chiffrées de réduction sont présentées dans le tableau VI.7. Les données présentées sont le pourcentage de réduction par rapport au débit initial et le facteur de réduction (débit initial/ débit considéré).

Tableau VI.7 : Réduction du débit d'eau à travers les fissures en pourcentage et facteur de réduction du débit par rapport au débit initial.

Fissure	Débits d'eau	Injection 1	Injection 2	Badigeonnage
1	Valeur de débit (mL/s/m)	0,77	0,32	0,17
	Pourcentage de réduction (%)	95	98 (+3)	99 (+1)
	Facteur de réduction du débit	19	46	86
2	Valeur de débit (mL/s/m)	2,69	0,96	0,24
	Pourcentage de réduction (%)	84	94 (+10)	99 (+4)
	Facteur de réduction du débit	6	18	70

Débits initiaux : fissure 1 = 14,65 mL/s/m et fissure 2 = 16,86 mL/s/m.

La figure VI. 20 montre l'évolution des débits d'eau dans les fissures 1 et 2.



A : fissure 1, B : fissure 2 et C : fissure 2 sans la mesure initiale.

Figure VI.20 : Evolution du débit d'eau (mL/s par m) à travers les deux fissures de la dalle en béton.

Pour la fissure 1, chaque phase du traitement a provoqué une réduction du débit d'eau (Fig. VI.20A). La réduction la plus importante est celle observée un mois après la première injection, soit 95% de réduction du débit initial (tableau VI .7). Les deux traitements suivants provoquent une réduction additionnelle de 3% pour la deuxième injection et de 1% pour le badigeonnage. Après le premier traitement, le débit d'eau initial est divisé par 19. A la fin des trois traitements, le débit d'eau initial est divisé par 85. Il passe de 14,65 à 0,17 mL.s<sup>-1</sup>.m<sup>-1</sup>. Ces résultats démontrent que chaque biotraitement améliore le colmatage. La majorité du colmatage se produit en un mois suite à la première injection. Au terme des trois biotraitements, la fissure est colmatée à 99% et le débit initial est divisé par 85, en 10 semaines.

Pour la fissure 2, chaque traitement a aussi produit une réduction du débit d'eau (Fig. VI.20B). De nouveau, la réduction la plus importante (84%) est celle observée un mois après la première injection (tableau VI .7). Les deux traitements suivants induisent une réduction additionnelle de 10% pour la deuxième injection et de 4% pour le badigeonnage. Pour cette deuxième fissure, les deux derniers traitements ont plus d'impact sur le colmatage que dans le cas de la fissure 1. A la fin des trois traitements, le débit d'eau passe de 16,86 à 0,24 mL.s<sup>-1</sup>.m<sup>-1</sup>. Au terme des trois biotraitements, la fissure est colmatée à 99% et le débit initial est divisé par 70, en 10 semaines.

La figure VI.20.C montre pour la fissure 2 les valeurs de débit d'eau à partir de deux semaines avec une meilleure résolution pour pouvoir mieux apprécier l'évolution des débits après la première phase du biotraitement. Après la première injection, chaque prise de mesure du débit d'eau induit une augmentation du débit. Le même phénomène est observé après la deuxième injection. Ces résultats suggèrent que l'écoulement de l'eau a un impact négatif sur le colmatage, probablement dû au lessivage du lactate de calcium soluble non consommé. Cela diminue l'efficacité de chaque traitement. Si un biotraitement est effectué par la suite, son effet sera plus marqué, ce qui semble provoquer une plus grande marge de progression entre chaque traitement (10% pour la deuxième injection et 4% pour le badigeonnage). Après la première et la deuxième injection, chaque nouvel apport d'eau augmentait le débit d'eau suivant. Après le badigeonnage, le colmatage est de 94% et le débit d'eau réduit à chaque mesure. Il est possible que si le colmatage de la fissure est suffisant, cela limite suffisamment l'entrée d'eau dans la fissure pour lui permettre de continuer à lessiver les éléments solubles.

Au terme des trois traitements (10 semaines), les deux fissures sont colmatées à 99%. En un mois et après une injection le colmatage est de 95% et de 84% si la fissure est soumise à un flux d'eau trois fois de plus. Les prises de mesures intermédiaires (fissure 2) semblent lessiver une partie des produits de colmatage et diminuer l'efficacité du traitement. Cependant, les deux traitements suivants permettent de compenser cela. Après le badigeonnage, le colmatage est finalement le même pour les deux fissures.

### ***6.3.2.2 Observations macroscopiques du colmatage des fissures de la dalle en béton***

Les résultats de mesure des débits d'eau traversant la dalle conduisent à une quantification indirecte de l'efficacité du colmatage de la fissure. L'observation visuelle des fissures après chaque traitement permet une évaluation qualitative du colmatage. La figure VI.21 présente l'aspect visuel de la surface fissurée de la dalle à l'état initial (To) et après chaque phase du traitement (injections 1, 2 et badigeonnage).

Pour les deux fissures, après la première injection, un produit de colmatage blanc est observé à la surface du béton. Le remplissage de la fissure est beaucoup plus complet après la deuxième injection. Après le badigeonnage, il n'est plus possible de distinguer la fissure à la surface de la dalle. Ces appréciations visuelles directes concordent avec les résultats quantitatifs obtenus grâce aux mesures de débit d'eau à travers les fissures.



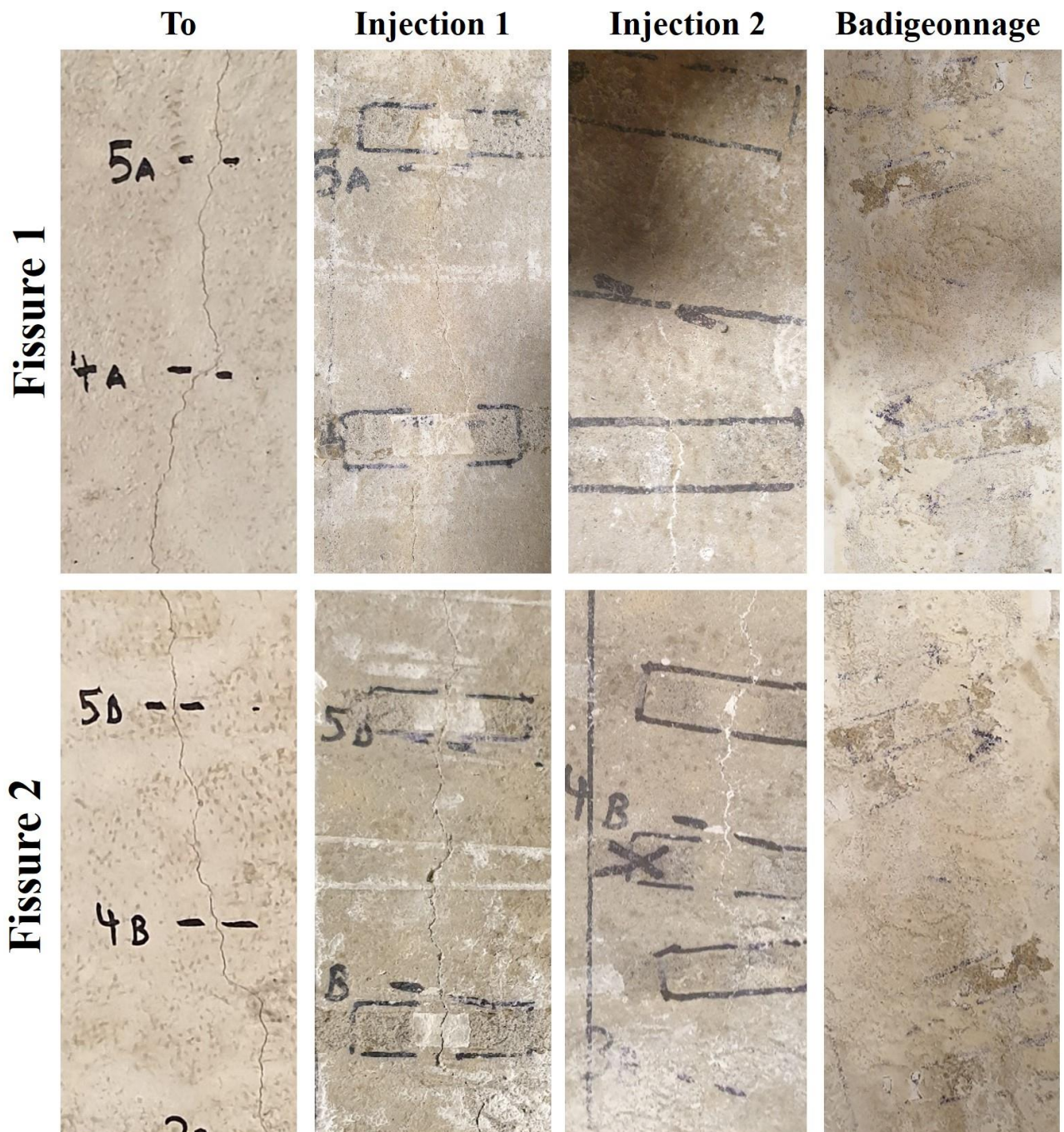


Figure VI.21 : Observations des fissures de la dalle après les trois traitements biologiques.

### 6.3.2.3 Observations microscopiques de l'intérieur des fissures de la dalle en béton

Le suivi de la mesure du débit d'eau a permis de démontrer que les trois étapes du biotraitement permettent un colmatage important des fissures de l'ordre de 400  $\mu\text{m}$  d'ouverture initiale dans une dalle en béton. L'étape suivante est de déterminer si ce colmatage peut être lié à une action biologique.

Pour cela, des carottes ont été prélevées au droit des fissures. Les carottes sont localisées en dehors de la zone utilisée par la plaque d'injection pour la mesure du débit d'eau. Seule la carotte 1B a dû être forée dans la zone de mesure du débit d'eau à cause de la présence de la barre d'armature. Les zones de prélèvements sont présentées dans la figure VI.22.

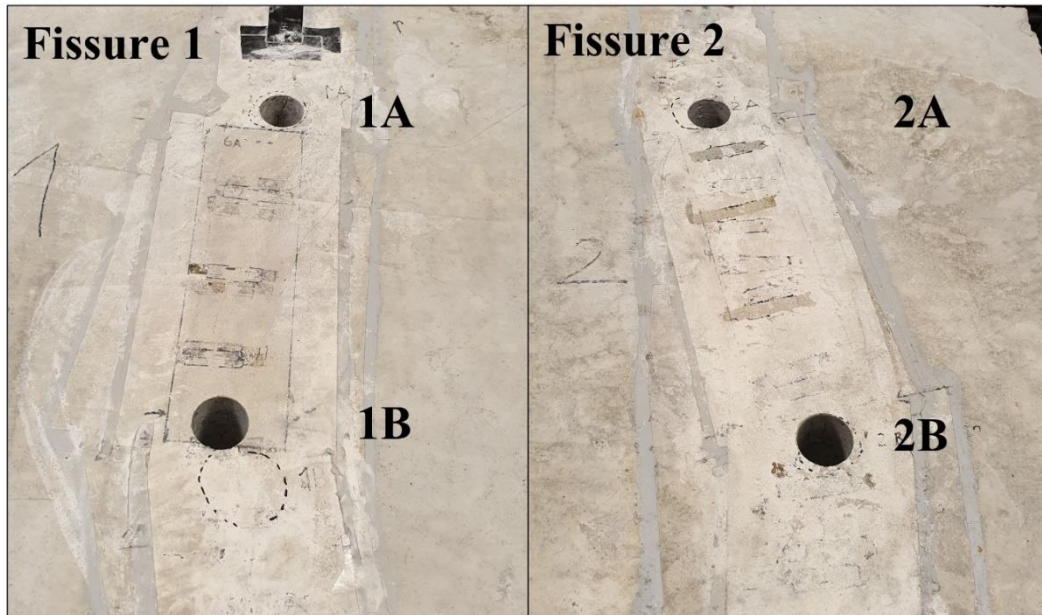
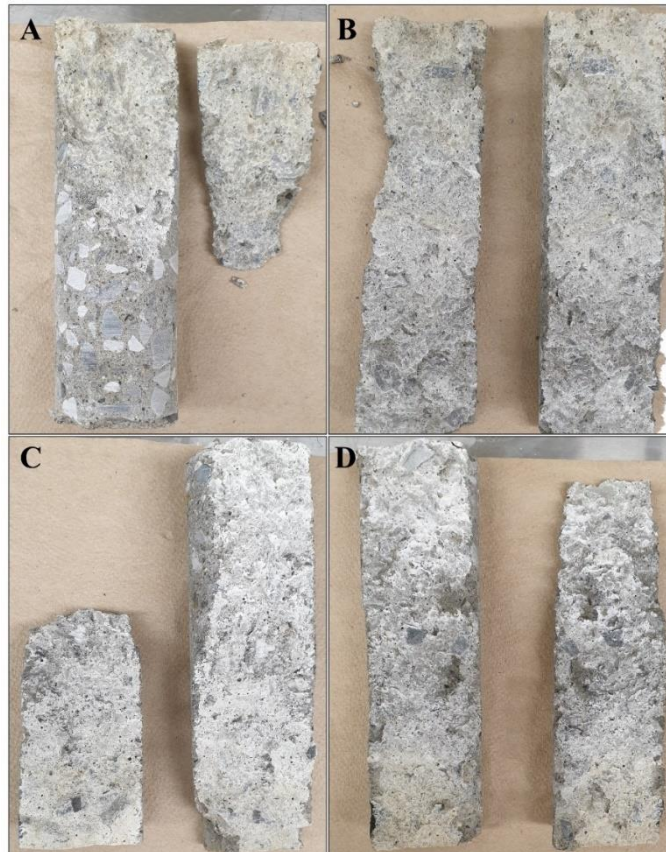


Figure VI.22 : Zones de prélèvements des carottes de béton.

#### 6.3.2.2.1 Observations macroscopiques des carottes de béton

Après l'extraction, les carottes sont séparées selon le plan de la fissure. Une certaine force a été requise pour séparer les deux morceaux. Toutes les carottes comportent une seule fissure continue (pas d'embranchement). La force nécessaire pour séparer en deux les carottes découle donc nécessairement de la présence des produits de colmatage. La figure VI.23 présente l'aspect visuel des faces intérieures des carottes. La fissure 1 coupe uniquement la partie haute de la carotte 1A (Fig. VI.23A). Une des faces de la carotte 2A s'est cassée lors du forage (Fig. VI.23C). On observe, pour les quatre carottes, un dépôt blanc uniforme résistant à l'eau sur toutes leurs surfaces intérieures. Il n'y a pas de différence de couleur pour le dépôt quel que soit la profondeur considérée. Pour déterminer la nature des matériaux de colmatage, deux méthodes sont utilisées : l'observation au microscope électronique à balayage (MEB) et la spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (EDS).



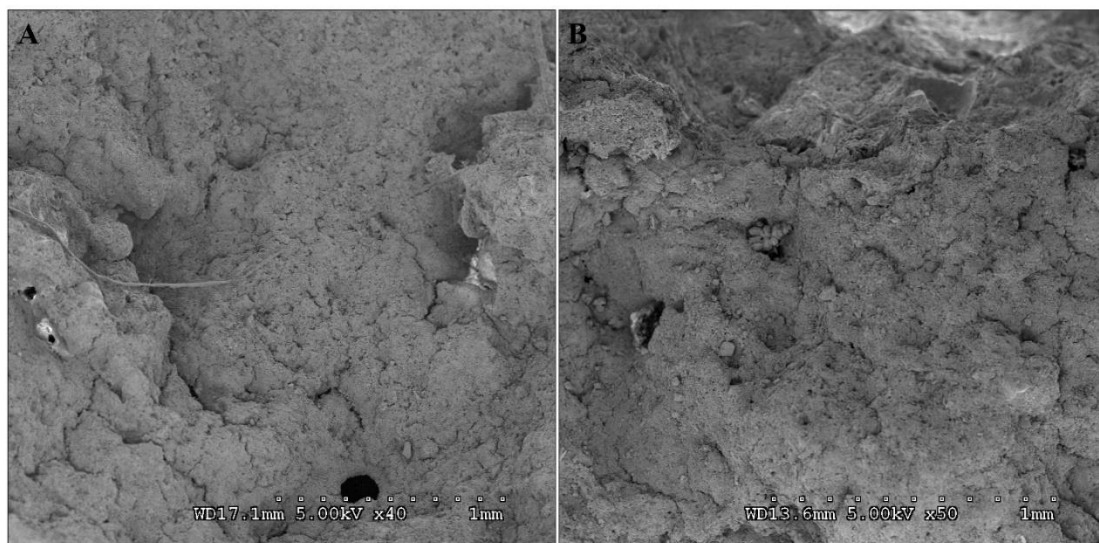


A : fissure 1 carotte A (1A). B : fissure 1 carotte B (1B).  
C : fissure 2 carotte A (2A). D : fissure 2 carotte B (2B).

Figure VI.23 : Observations des carottes de béton fissurées après leurs ouvertures.

#### 6.3.2.2.2 Observations microscopiques au MEB de l'intérieur des fissures

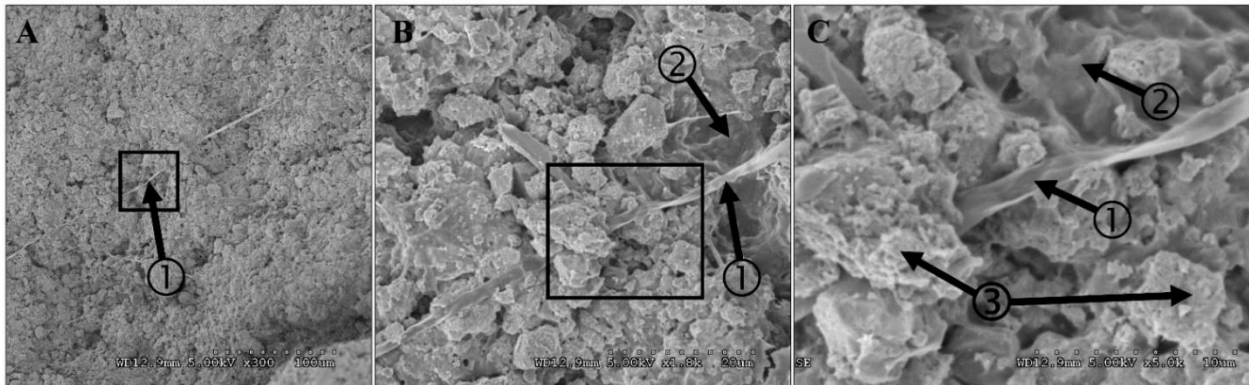
Les observations au MEB des deux échantillons (F1 1A et F2 1A) de la carotte 1A sont présentées dans la figure VI.24.



A : face 1 de la carotte 1A. B : face 2 de la carotte 1A. Observées au grossissement (X 50, MEB 1).

Figure VI.24 : Observations au MEB des deux faces de la carotte 1A.

Il n'y a pas de différence visuelle entre les deux faces d'une même carotte de béton. Le produit de colmatage est relativement dense, d'aspect granuleux et homogène sur toute la surface. Il est le même pour les deux faces des carottes A et B. La figure VI.25 montre un grossissement plus important de la surface intérieure de la fissure 1.



Observation de l'échantillon F2 A1 avec le MEB 1.

A : zone d'intérêt au grossissement minimal (x300).

B : zone d'intérêt au grossissement moyen (x1000). Dans le carré présent dans A.

C : zone d'intérêt au grossissement maximal (x5000). Dans le carré présent dans B.

1 : filaments de 2-3  $\mu\text{m}$  d'épaisseur.

2 : zone amorphe et lisse.

3 : structures mixtes constituées de filament fins (d'épaisseurs inférieures à 0,1  $\mu\text{m}$ ) agglomérant des blocs solides.

*Figure VI.25 : Observations au MEB de la même zone à différents grossissements.*

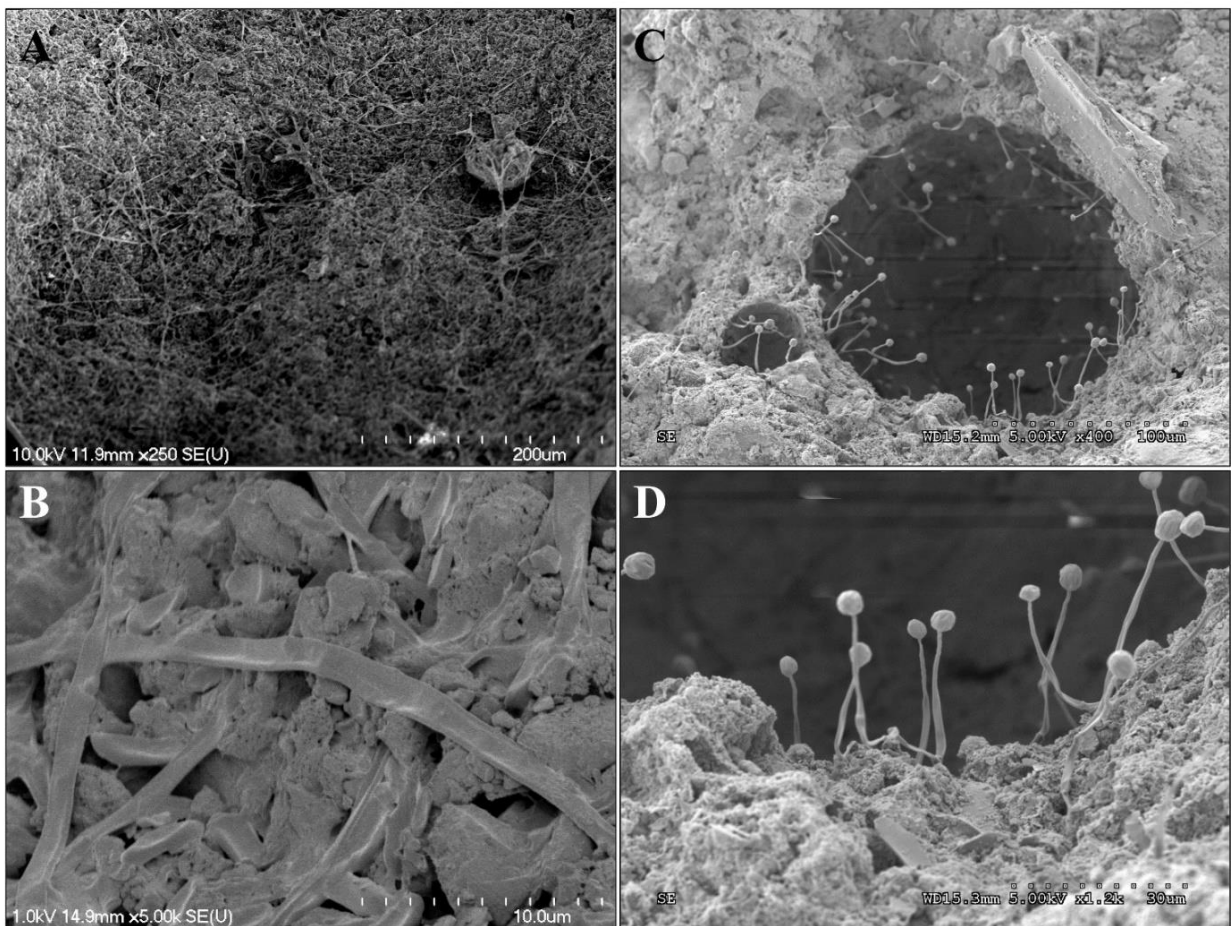
On observe, en augmentant le grossissement, que les produits de colmatage sont constitués de petits cristaux de formes très variées. La structure est compacte et homogène.

L'élément 1, de la figure IV.25, montre des filaments de taille importante, en comparaison avec les autres éléments. Ces filaments ne sont pas des éléments isolés, ils sont retrouvés sur chacun des échantillons observés au MEB et à plusieurs endroits des échantillons. Le diamètre de ces filaments est compris entre deux et une dizaine de  $\mu\text{m}$ . Ces filaments sont très probablement de nature biologique. Il pourrait s'agir d'hyphes de champignons.

L'élément 2, de la figure IV.25, montre une structure lisse, d'aspect amorphe et floue à certains endroits observés. Il peut y avoir des petits cristaux à sa surface ou non. Ces éléments sont très probablement de nature biologique.

L'élément 3, de la figure IV.25, montre une structure compacte formée d'un agglomérat d'éléments solides, probablement de nature minérale, maintenus ensemble par des filaments très fins (largeur de taille inférieure à 0,1  $\mu\text{m}$ ). Ces éléments sont très probablement de nature biologique. Il pourrait s'agir d'un composite biofilm bactérien et cristaux.

Des grossissements plus importants ont été réalisés pour affiner les observations précédentes. La figure VI. 26A montre des filaments qui forment un réseau à la surface des produits de colmatage. Ce réseau n'est pas toujours aussi important sur tous les échantillons observés, mais les filaments sont visibles partout à fort grossissement. Cette formation en réseau et leur aspect confirme qu'il s'agit d'éléments biologiques. Un grossissement plus important permet de mieux visualiser ces filaments (Fig. VI.26B). Ils semblent avoir été déformés par la déshydratation lors de la métallisation des échantillons. Il est tout de même possible de reconnaître des hyphes de champignons. Lorsque les cellules d'un *Fungi* se divisent, les cellules nouvellement formées ne se séparent pas de leurs cellules mères. Elles vont s'allonger et fusionner les unes avec les autres. Cela donne ces structures filamenteuses, caractéristiques des champignons ou *Fungi*.



A : zone contenant une quantité importante de filaments (x 250, MEB 2, F2 2B).

B : grossissement plus important des filaments (x5000, MEB 2, F2 2B).

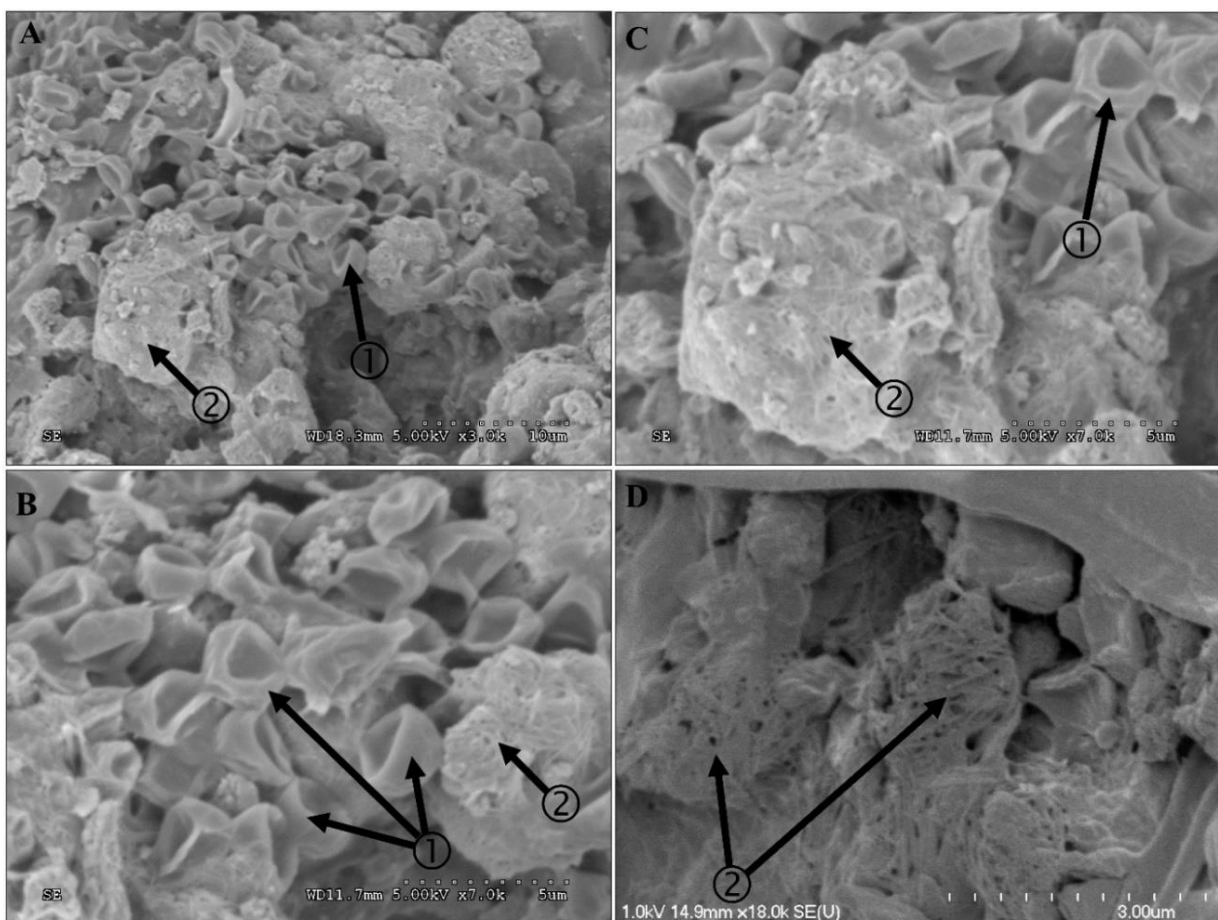
C : cavité dans la surface de l'échantillon (x400, MEB 1, F1 1B).

D : grossissement plus important de la cavité présentée dans C (x1200, MEB 1, F1 1B).

Figure VI.26 : Observations au MEB des structures filamenteuses.

Une cavité dans la surface interne de la fissure, probablement une bulle d'air, a donné l'espace nécessaire au *Fungi* pour produire des spores à l'extrémité terminale des hyphes (Fig. IV.26C et D). Cela permet de confirmer la nature biologique des filaments observés dans la figure VI.26. La présence systématique de ces hyphes dans les deux fissures et pour les quatre carottes pourrait signifier qu'il s'agisse de l'un des micro-organismes du consortium CBB2020, cependant l'absence de stérilisation des fissures ne permet pas d'écarter la possibilité d'une contamination au sein des fissures.

La figure VI.27 montre les observations réalisées pour déterminer la nature de la structure mixte constituée de filament fins et d'éléments solides.



A : zone d'intérêt au grossissement minimal (x3000, MEB 1, F2 2B).

B : agrandissement de A ciblé sur la structure 1 (x7000, MEB 1, F2 2B).

C : agrandissement de A ciblé sur la structure 2 (x7000, MEB 1, F2 2B).

D : autre observation de la structure mixte (x18000, MEB 2, F2 2B).

1 : sphères de 1-3  $\mu\text{m}$  déshydratées.

2 : structures fibreuses.

*Figure VI.27 : Observations au MEB de la structure mixte constituée de filaments fins et d'éléments solides.*

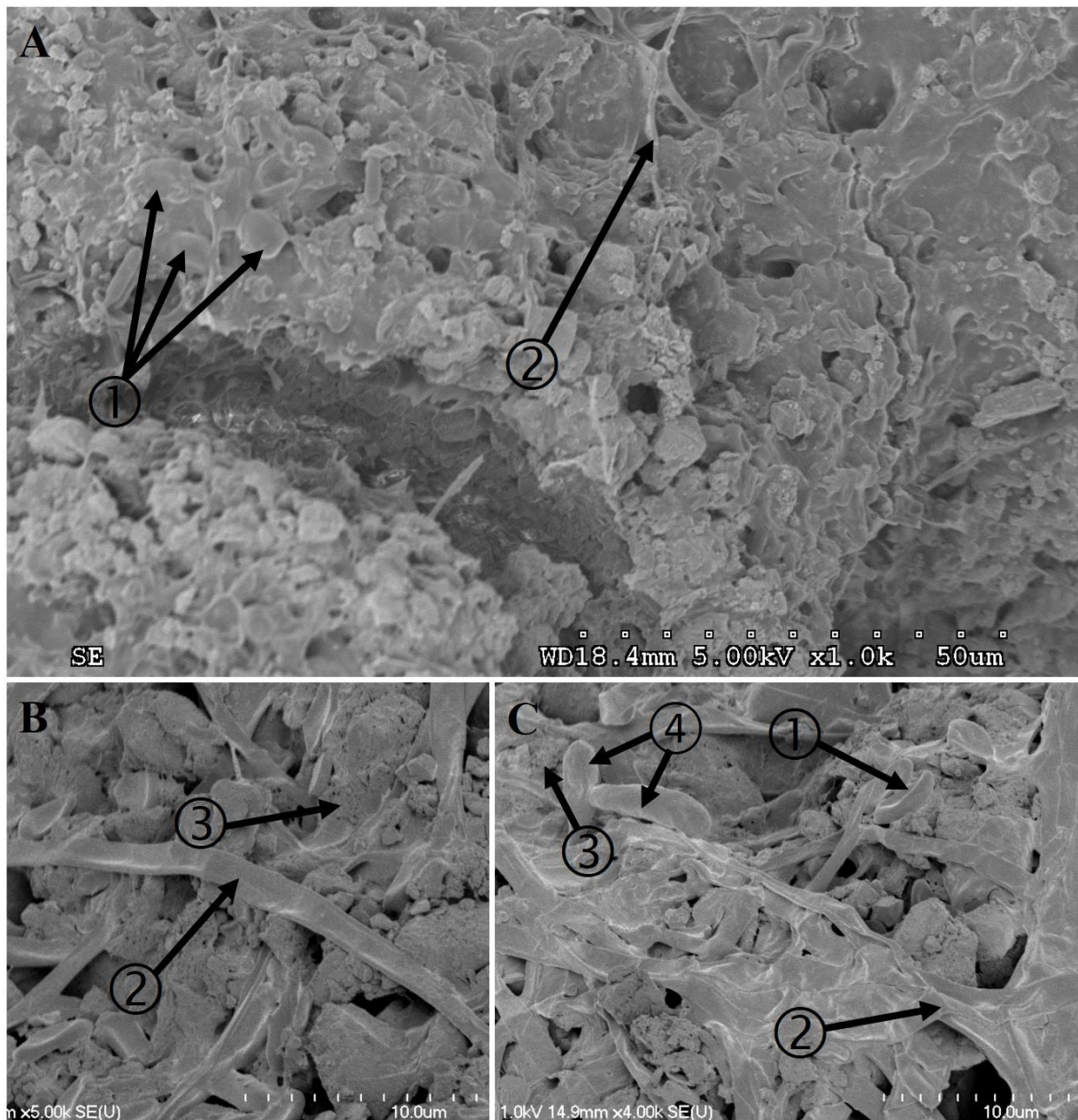
On observe sur la figure VI.27A deux types de structures distinctes. Le premier type de structure (l'élément 1) est formé d'éléments globulaires d'une taille de 1 à 3  $\mu\text{m}$ . Ces formes ressemblent à des sphères souples déformées par la déshydratation. Des éléments similaires ont été observés dans la thèse d'I. Feurgard en 2017 (8) dans la figure 142B et ont été catégorisés de cellules bactériennes plasmolysées par le séchage nécessaire à l'observation au MEB. Comme on peut le voir plus précisément sur la figure VI.27B, ces éléments sont nombreux et associés les uns aux autres. Chacun des éléments a une morphologie proche mais pas identique, ce qui semble confirmer la possibilité d'une déshydratation. Au vu de leur taille, de leur forme et de leurs dispositions spatiales les uns par rapport aux autres, ces éléments peuvent être des cellules bactériennes plasmolysées par leur déshydratation.

Le deuxième type de structure observé (élément 2) est la structure composite présentée dans la figure VI.25. Cet agrandissement permet de bien distinguer les différentes fibres et permet une estimation plus précise de la taille de ces fibres, inférieures à 0,1  $\mu\text{m}$  (Fig. VI.27C). La taille de ces fibres est trop faible pour qu'il s'agisse d'hyphes ou de micro-organismes. Leur forme et leur disposition indique qu'il s'agit d'une structure biologique fibreuse, de taille subcellulaire, extracellulaire. La figure VI.27C montre que la structure fibreuse contient des structures de l'élément 1 il s'agit donc probablement d'un biofilm bactérien. De plus, ce biofilm probable contient aussi des cristaux, ceci formerait donc une structure composite comportant du biofilm (biologique) et des cristaux (minéral). La présence de ces deux éléments (1 et 2) au même endroit et leur interaction renforce l'interprétation de leur nature bactérienne et de biofilm.

La figure VI.27D montre un assemblage de fibres de tailles similaires mais qui semblent avoir une forme plus régulière. Il pourrait aussi s'agir de biofilm mais il est possible que ces structures soient des aiguilles d'Attigel 50. Des aiguilles d'Attigel 50 ont été observées au même grossissement et dans des conditions comparables dans la thèse d'I. Feurgard en 2017 (8) dans la figure 150. Dans ces travaux, une formulation contenant 6% d'Attigel 50 a été utilisée (WA36). Les structures observées dans la figure VI.27D semblent être plus fines que celles présentées dans la thèse d'I. Feurgard, mais il est possible que la concentration faible d'Attigel dans la formulation Gmin (2%) ne permette pas la production de nombreuses aiguilles d'Attigel et que celles-ci soient de tailles réduites. Cette structure n'a été observée qu'une fois avec des fibres aussi régulières, il est donc possible qu'un grain d'Attigel 50 aggloméré ait été mal homogénéisé lors de la production de la formulation Gmin. Cela aurait conduit à une surconcentration locale en Attigel 50 et aurait ainsi permis la formation d'aiguilles.



La figure VI.28 montre les observations réalisées pour déterminer la nature de la structure amorphe et lisse.



A : zone d'intérêt au grossissement minimal (x1000, MEB 1, F2 2B).

B : agrandissement ciblé sur la structure 2 (x5000, MEB 2, F2 2B).

C : agrandissement ciblé sur la structure 1 et 2 (x4000, MEB 2, F2 2B).

1 : structure en sphères déshydratées observées précédemment.

2 : hyphes observés précédemment.

3 : structure mixte observée précédemment.

4 : bactéries sous forme de bâtonnets.

Figure VI.28 : Observations au MEB de la structure amorphe et lisse.



La figure VI.28A montre la structure amorphe considérée. Celle-ci a un aspect visuel différent des éléments cristallins granuleux que l'on observe ailleurs dans la fissure. On y retrouve deux éléments caractéristiques de cette structure amorphe. Il s'agit de sphères, ressemblant fortement aux bactéries observées dans la figure VI.27 et de structures filamenteuses, ressemblant aux hyphes de champignon observées dans la figure VI.26.

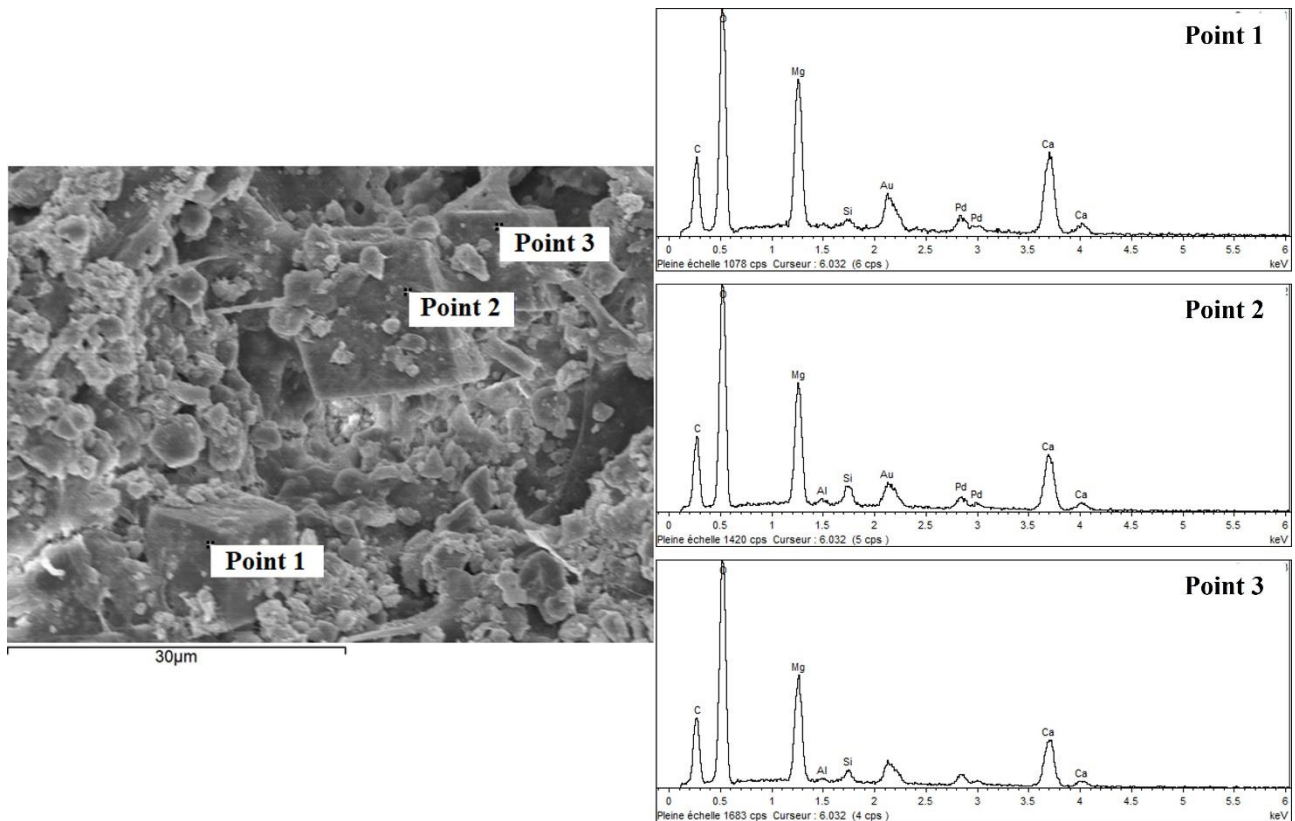
La figure VI.28B permet de confirmer la nature des structures filamenteuses, il s'agit bien d'hyphes fongiques. La figure VI.28C montre comment ces filaments s'associent pour former la structure ayant un aspect lisse à plus faible grossissement. De plus, à ce grossissement, quelques bactéries en forme de bâtonnets sont observées. Les figures VI.28B et C montrent des structures mixtes identifiées comme un mélange de cellules bactériennes et de biofilm.

Globalement, ces observations suggèrent que la structure considérée est formée d'un assemblage d'éléments biologiques tels que des hyphes, des bactéries et potentiellement du biofilm. Tous ces éléments, après déshydratation, forment une surface lisse et amorphe de nature biologique. Les éléments minéraux solides (calcite biogénérée, calcite et Attagel 50) sont imbriqués dans une matrice biologique formée par du biofilm bactérien et des hyphes ou les corps cellulaires de champignons.

#### *6.3.2.2.3 Vérification de la nature des produits de réparation en utilisant la spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (EDS)*

Les observations au MEB ont permis de démontrer la nature biologique de certains produits de colmatage. Cependant, elles n'ont pas permis de déterminer si les cristaux observés sont bien des cristaux de calcite biogénérée. Le milieu injecté dans les fissures contient du carbonate de calcium BétocarbF® les données fournisseurs indiquent la présence de 93% de carbonate de calcium et 1,5% de carbonate de magnésium. Les analyses réalisées sur ce produit montrent, en plus de la présence de magnésium, des traces d'aluminium et de silicium (Annexe 6). La figure I.10 montre la morphologie des deux types de calcite. La calcite abiotique, tel que le BétocarbF®, est de forme rhomboïde. La calcite biogénérée n'a pas de forme générique bien définie. La distinction entre les cristaux de carbonate de calcium biosourcé et le carbonate de calcium BétocarbF® est importante pour démontrer l'implication de l'activité biologique dans la réparation des fissures de la dalle en béton.

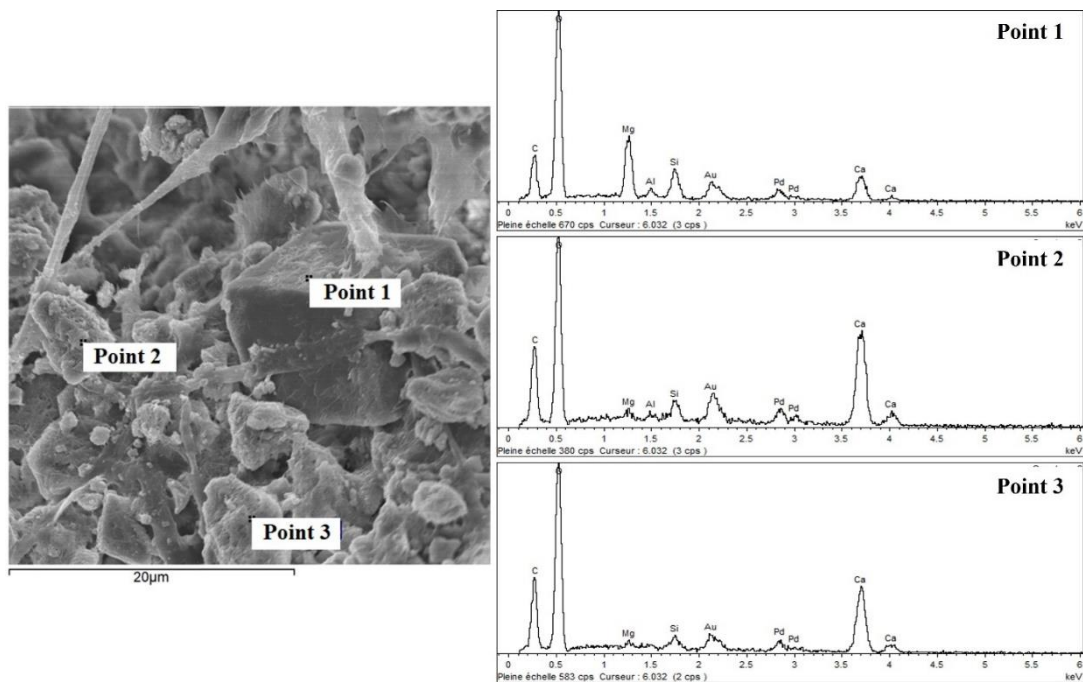
L'éprouvette de la face 2 de la carotte 2B (F2 2B) a été analysée au MEB (MEB 2) et une EDS est réalisée pour déterminer la composition élémentaire des structures présentes dans la fissure (Fig. VI.29).



Trois points de mesures ont été réalisés et sont localisés sur la photo de gauche. Leurs spectres sont présentés à droite.

*Figure VI.29 : Analyses MEB et EDS réalisées sur trois phases minérales cubiques.*

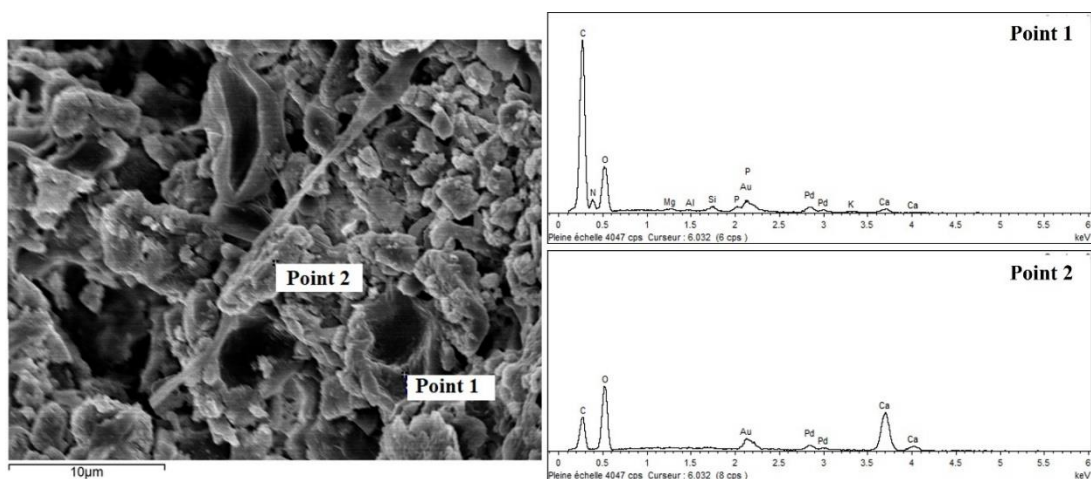
La micrographie de la figure VI.29 montre trois structures cubiques à la surface de la couche de produits de colmatage dans la fissure 2. Ces cristaux ont une morphologie typique de la calcite abiotique, apporté par le BétocarbF®. Pour les trois cristaux analysés, les éléments majoritaires sont le carbone, l'oxygène, le magnésium et le calcium, avec des traces d'aluminium et de silicium. La source de carbonate abiotique (Bétocarb F®) est principalement constituée de carbonate de calcium mais contient aussi un peu de carbonate de magnésium et des traces d'aluminium et de silicium. Ces analyses suggèrent donc que les gros cristaux de forme rhomboïde, ayant une forme de cube à ce grossissement, sont du BétocarbF®. D'autres analyses ont été faites sur des cristaux similaires et dans tous les cas on retrouve ces quatre éléments. La présence de magnésium permet d'identifier le carbonate de calcium abiotique présent initialement dans la formulation Gmin. La figure VI.30 présente deux types de cristaux observés.



Trois points de mesures ont été réalisés et sont localisés sur la photo de gauche. Leurs spectres sont présentés à droite.

*Figure VI.30 : Analyses MEB et EDS sur les deux types phases minérales.*

La micrographie de la figure VI.30 montre un minéral rhomboïde de carbonate de calcium (point 1) contenant du magnésium, ce qui indique qu'il s'agit de carbonate de calcium contenu dans le BétocarbF®. Les points 2 et 3 présentent des cristaux de formes irrégulières et contenant trois éléments : du carbone, de l'oxygène et du calcium. Ce sont les trois éléments formant du carbonate de calcium. La morphologie de ces cristaux et l'absence de magnésium suggère que ces cristaux pourraient être du carbonate de calcium biosourcé. La figure VI.31 montre de mêmes types de cristaux très étroitement associés à une structure biologique.



Trois points de mesures ont été réalisés et sont localisés sur la photo de gauche. Leurs spectres sont présentés à droite.

*Figure VI.31 : Analyses MEB et EDS de la calcite biogénérée et une structure biologique.*

Le point 1 cible une structure identifiée dans la figure VI.27 comme étant une bactérie déshydratée. On en retrouve plusieurs dans cette micrographie. Cette structure contient beaucoup de carbone, de l'oxygène et de l'azote. Ce sont les trois éléments majoritaires constituant la matière biologique. Cela vient conforter la nature biologique de ces structures.

Le point 2 cible un cristal de carbonate de calcium avec la même morphologie irrégulière et contenant les mêmes éléments que ceux identifiés dans la figure VI.30. Il s'agit probablement de carbonate de calcium biosourcé car l'association de ces deux éléments au même endroit est compatible avec une origine biologique. Cependant, il ne faut pas exclure la possibilité que ces cristaux puissent avoir été formés par la carbonatation due à la pénétration du  $\text{CO}_2$  atmosphérique dans la fissure ou de la carbonatation de la surface de l'échantillon qui aurait pu avoir lieu entre l'ouverture de la fissure et le moment où elle a été placée dans le dessiccateur. Cette hypothèse reste néanmoins peu probable car la microstructure des carbonates de calcium formés dans les fissures par la carbonatation atmosphérique est très différente de celle qui a été observée. La figure VI.32, provenant des travaux de Gagne et Argouges (143), montre une surface de mortier carbonatée.

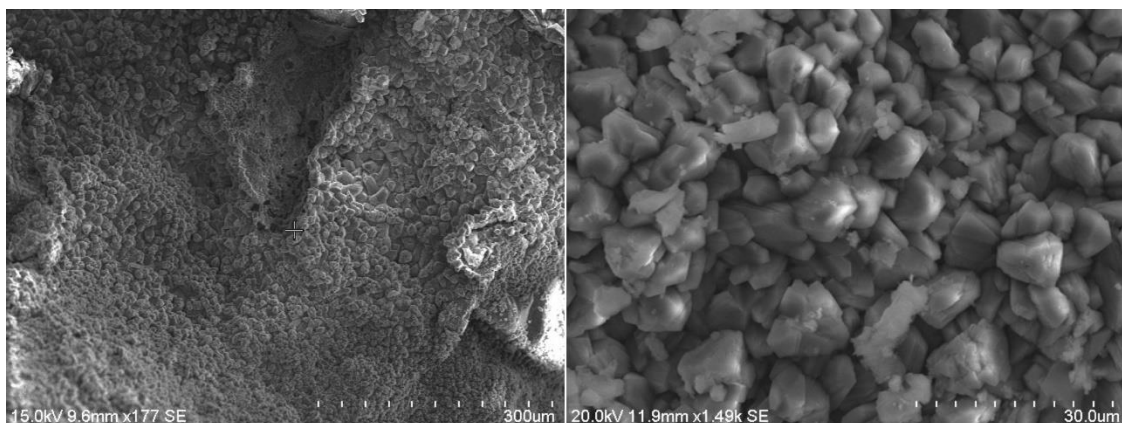


Figure VI.32 : Observations au MEB d'une surface d'un mortier carbonatée. (143)

Ces micrographies montrent que la surface d'une fissure de mortier carbonatée est entièrement recouverte par des cristaux d'une dizaine de  $\mu\text{m}$  imbriqués les uns dans les autres. Ceci n'a pas été observé sur les échantillons de la dalle en béton. De plus, les cristaux observés sont plus anguleux que les petits cristaux retrouvés dans la couche de carbonatation.

Globalement, les analyses au MEB révèlent la présence de deux principaux types de carbonates de calcium. Un premier type comprend des cristaux massifs de formes assez régulières et grossièrement cubiques. Ces gros cristaux de plusieurs dizaines de  $\mu\text{m}$  de hauteur proviennent sûrement du BétocarbF® puisque l'analyse EDS a révélé qu'ils étaient constitués d'un mélange

de carbonate de calcium et de carbonate de magnésium. L'autre type de cristaux de carbonate de calcium comporte des cristaux très petits ( $< 10 \mu\text{m}$ ) et de formes très irrégulières. Ces petits cristaux sont toujours associés géographiquement avec des produits biologiques (cellules bactériennes, hyphes de fongiques et biofilm). Cette association systématique suggère qu'ils sont le résultat d'une minéralisation microbiologique.

## 6.4 Conclusion

Les essais en laboratoire, réalisés sur des mortiers fissurés et sur une dalle en béton fissurée, cherchaient à évaluer l'efficacité du procédé de biocicatrisation développé dans les chapitres précédents. Il s'agit de l'usage du consortium CBB2020 en association avec la formulation Gmin.

Les essais sur les éprouvettes de mortier ont montré que l'injection est possible dans des fissures de 100, 250, 450 et 900  $\mu\text{m}$ . Une injection unique est suffisante pour les fissures d'environ 100  $\mu\text{m}$  car elle permet une réduction de la perméabilité à l'air des fissures de 84 à 90% avec des ouvertures apparentes finales de 10 à 16  $\mu\text{m}$ . Un badigeonnage final aurait peut-être permis un colmatage total des fissures. Pour le cas des fissures moyennes (250 et 450  $\mu\text{m}$ ), une injection unique de la formulation Gmin a permis une réduction de 76% de la perméabilité à l'air des fissures avec une ouverture apparente finale de 60 et 100  $\mu\text{m}$  pour des ouvertures initiales de 250 et 450  $\mu\text{m}$  respectivement. Ces ouvertures apparentes finales sont comparables aux ouvertures apparentes initiales des fissures fines. Cela suggère qu'une seconde injection de la formulation Gmin couplée à un badigeonnage aurait permis un colmatage intéressant d'une fissure de 450  $\mu\text{m}$ . D'autres essais de biocicatrisation par injection ont été réalisés dans la thèse d'I. Feurgard (8) sur les mêmes éprouvettes de mortier fissurées. L'inoculum utilisé est *Bacillus pseudofirmus* avec une formulation épaissie (WA36) et les essais ont aussi été réalisés à 20°C. Une fissure de 300  $\mu\text{m}$  a été traitée durant seize semaines par huit injections de formulation épaissie inoculée, cela a permis une réduction du débit de l'air de 88%. Cela montre que le procédé Gmin-CBB2020 est efficace car il permet une réduction de 76% de la perméabilité à l'air d'une fissure de 450  $\mu\text{m}$  en une seule injection. Pour le cas des fissures larges (900  $\mu\text{m}$ ), l'injection unique de formulation Gmin a permis une réduction du débit d'air de 33% en permettant une réduction de l'ouverture apparente des fissures d'environ 300  $\mu\text{m}$ . Ce faible colmatage suggère que la formulation Gmin n'est pas une formulation adaptée pour des fissures de cette taille. Gmin avait été créée pour traiter des fissures fines ( $< 100 \mu\text{m}$ ), il ne s'agit donc

pas de son cas d'utilisation. De plus, toutes les éprouvettes ont été immergées dans de l'eau sans que cela n'ait un impact significatif sur le colmatage des fissures, montrant donc que le matériau de réparation utilisé est résistant à l'eau.

Par la suite, d'autres essais ont été réalisés sur deux fissures moyennes de 400 µm présentes sur une dalle en béton. Après une injection et vingt-huit jours de traitement, la perméabilité de la fissure à l'eau est réduite de 95%. Après une deuxième injection et un badigeonnage, cette réduction de perméabilité à l'eau est de 99%. Si la fissure est soumise à un flux d'eau quatre fois plus important, cette réduction est de 84% après la première injection. Les deux traitements suivant (deuxième injection et badigeonnage) permettent de retrouver la réduction de perméabilité (99%) observée sur une fissure moins exposée à l'eau. Le lessivage du matériau de colmatage est très visible après une seule injection mais ce contact avec un flux d'eau quatre fois plus important n'a plus d'impact après le biotraitement complet de la fissure. Cela peut être dû à un colmatage suffisant de la fissure pour empêcher une pénétration de l'eau dans l'ensemble de la fissure et donc ce colmatage assure une protection de la majorité de la surface traitée. Dans les deux cas observés, des fissures de 400 µm, biotraitées par deux injections et d'un badigeonnage final, sont colmatées à 99% au bout de 10 semaines. Cela concorde avec les observations réalisées sur l'éprouvette de mortier comportant une fissure moyenne de 450 µm. De plus, des observations au MEB et des analyses élémentaires à l'EDS ont prouvé la nature biologique du matériau de réparation systématiquement associé à du carbonate de calcium probablement biosourcé. Le procédé de biocicatrisation développé est donc fonctionnel.

# Chapitre 7 : Essais de biocicatrisation sur des ouvrages réels

## 7.1 Introduction

Les phases précédentes ont permis de mettre au point un procédé de biominéralisation efficace. Il s'agit de l'utilisation conjointe de la formulation Gmin, développée dans le chapitre 3 et du consortium microbien CBB2020, développé dans le chapitre 4. Cependant, pour que ce procédé de laboratoire puisse être utilisé sur des ouvrages réels, il faut développer une méthode d'injection efficace de la formulation inoculée. Deux ouvrages ont été utilisés pour la mise au point d'une méthode de biocicatrisation fonctionnelle : la maquette VeRCoRs, implantée au centre de recherche Les Renardières d'EDF (Moret-sur-Loing, FRANCE) et une centrale hydroélectrique d'Hydro-Sherbrooke (Sherbrooke, CANADA).

La maquette VeRCoRs est une maquette représentative des enceintes à double parois des tranches 1300 MW exploitées par EDF en France. Elle est utilisée comme installation de test pour vérifier s'il est envisageable d'exploiter les réacteurs équipés de ce type d'enceinte sur des durées supérieures à quarante ans, comme prévu initialement.

Tous les dix ans, les tranches nucléaires françaises sont soumises à une visite décennale (VD) pendant laquelle ces installations sont arrêtées et subissent une batterie de tests destinés à vérifier leur sûreté. Trois essais majeurs sont réalisés : une épreuve hydraulique du circuit primaire dans lequel circule l'eau pressurisée au contact du combustible nucléaire, une inspection de la cuve du réacteur directement au contact du combustible nucléaire et une épreuve enceinte, la troisième barrière de sécurité de l'installation. L'épreuve enceinte consiste à augmenter la pression dans l'enceinte de confinement au-delà de la pression de fonctionnement normale (pression atmosphérique), pour s'assurer de la résistance du béton constituant l'enceinte de confinement par la mesure de son taux de fuite. Pour ce faire, la pression du bâtiment est augmentée par paliers successifs, à l'aide de compresseurs. C'est ce type de test qui est reproduit régulièrement tous les ans dans la maquette VeRCoRs dont le taux de fuite est mesuré à une pression de l'ordre de 5 bars.

Les principaux phénomènes induisant un vieillissement du béton et la détérioration de ses propriétés de confinement (fluage, retrait....) sont tous plus ou moins directement liés au séchage du béton qui est un phénomène diffusif proportionnel à la racine carrée du temps. Une

épaisseur du mur d'enceinte de VeRCoRs trois fois plus petite que dans la réalité conduit donc à une vitesse de séchage neuf fois plus rapide que dans la réalité. Une épreuve enceinte réalisée sur VeRCoRs tous les ans correspond donc à un vieillissement sur enceinte réelle de l'ordre de dix ans. C'est tout l'intérêt de cette maquette qui permet de suivre sur une courte durée l'état des enceintes du parc EDF au-delà de quarante ans (un an VeRCoRs = dix ans enceinte du parc EDF). Lors de l'épreuve enceinte sur VeRCoRs, les zones de fuites peuvent être suivies individuellement pour évaluer l'effet d'un traitement spécifique, et notamment un traitement biologique de fissures, comme réalisé dans le cadre de cette thèse. Le biotraitement se fait sur l'extrados de l'enceinte interne dans l'espace inter-enceinte soumis à un environnement sec permettant de travailler sur un béton fissuré peu saturé en eau. Cette épreuve de mise sous pression annuelle de VeRCoRs permet de mesurer l'évolution du débit de fuite des fissures biotraitées.

## **7.2 Matériels et méthodes**

### **7.2.1 Maquette VeRCoRs**

#### ***7.2.1.1 Description de l'ouvrage***

VeRCoRs (Vérification Réaliste du Confinement des Réacteurs) est une maquette échelle 1/3 des enceintes de confinement en béton de réacteurs nucléaires, implantée sur le site des Renardières (Fig. VII.1).



*Figure VII.1 : Photo de la maquette VeRCoRs du centre de recherche Les Renardières EDF (France).*



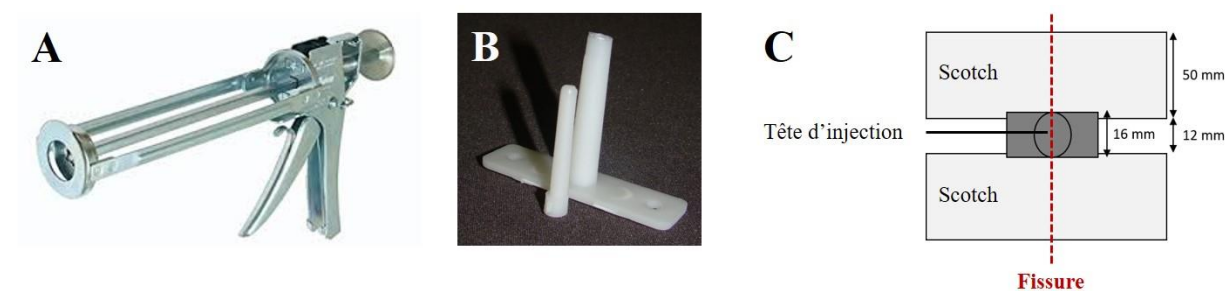
### 7.2.1.2 Procédure de l'injection

Pour ne pas perturber le comportement de la maquette VeRCoRs afin qu'elle reste représentative, il n'est pas possible de réaliser de forages dans le mur de l'enceinte interne pour ancrer le système d'injection. Il est donc nécessaire de réaliser des collages pour fixer le système d'injection, la surface relativement sèche du béton permettant l'usage de résine époxy.

#### 7.2.1.2.1 Matériel d'injection

Le matériel d'injection est composé de têtes d'injection, de cartouches d'injection, d'un pistolet injecteur et d'un système de fixation à la paroi.

Les têtes d'injection, présentées dans la figure VII.2B, sont des cylindres avec un trou de 4 mm de diamètre minimal (en haut) et 5 mm de diamètre maximal (en bas) rattachés à une plaque en plastique rectangulaire (16 X 59 mm). La longueur du tube est de 43 mm. Elles sont collées au mur avec de la résine époxy.



A : pistolet injecteur, B : tête d'injection et C : positionnement des têtes d'injections sur les fissures.

Figure VII.2 : Matériels d'injection.

Deux résines ont été utilisées : la résine époxy Krytex<sup>®</sup> k60m de 300 mL (résistance à la compression : vingt-quatre heures : 20-22 MPa, sept jours : 69 MPa et résistance à la traction : 34 MPa) pour la campagne VeRCoRs 2020 et la résine LOCTITE<sup>®</sup> power époxy rapide (cinq minutes, résistance maximale théorique 240 kg.cm<sup>-2</sup>) pour les traitements réalisés en 2021. Le système de confinement de la formulation dans la fissure se fait avec du scotch T-REX<sup>®</sup> de 50 mm de largeur et avec de la résine époxy. Pour éviter que la résine époxy ne rentre dans la fissure et ne fausse les résultats, des bandes adhésives sont placées perpendiculairement à la fissure et espacées de 16 mm. Cet espacement permet aux têtes d'injection de se plaquer sur les scotchs sans pour autant obstruer le port d'injection. La figure VII.2C schématise le

positionnement d'une tête d'injection au niveau d'une fissure. Pour pouvoir injecter les milieux liquides ou épaissis dans les fissures par l'intermédiaire des têtes d'injection, on utilise des cartouches d'injection et un pistolet injecteur (Fig. VII.2A). Les cartouches d'injection (50 mm de diamètre, 215 mm de longueur) ont une contenance de 300 mL et sont scellées au niveau de la zone de sortie du fluide. Cette zone doit être découpée au moment de l'injection. Le pistolet d'injection est un pistolet standard utilisant une cartouche standardisée de 50 mm de diamètre et 215 mm de longueur.

#### *7.2.1.2.2 Préparation d'une fissure*

Les différentes étapes de la fixation des têtes d'injection le long d'une fissure sont indiquées ci-dessous :

- ① La zone contenant la fissure est délimitée par du scotch pour déterminer la zone à traiter.
- ② Des bandes de scotch de 50 mm sont placées transversalement à la fissure. Ces bandes sont espacées de 16 mm. Un morceau de scotch représente la largeur minimum entre différentes têtes. Cette largeur peut, en revanche, être plus importante sur des zones ne présentant aucun élargissement susceptible de permettre l'entrée de la formulation épaissie d'injection (Fig. VII.3A).
- ③ Une fois le scotch en place, les têtes sont positionnées temporairement de sorte que la fissure soit visible dans le trou d'injection. Deux traits latéraux d'extrémités sont réalisés pour marquer la position de la tête, puis les têtes sont enlevées (Fig. VII.3B).
- ④ La cartouche contenant de la résine époxy est préparée puis ouverte. Deux zones d'environ 1 cm<sup>2</sup> d'époxy sont appliquées entre chaque trait et la fissure. La résine époxy est déposée à une distance raisonnable (environ 1 cm) de la fissure pour éviter son comblement lors de la pose de la tête. Une fois les deux dépôts réalisés, la tête est appuyée contre la résine en s'assurant d'empiéter légèrement sur les scotchs. Lorsque toutes les têtes sont positionnées, elles sont scellées hermétiquement avec un joint en résine époxy tout autour du plateau. Deux dépôts supplémentaires de résine sont faits au niveau des trous dans le plateau des têtes d'injection pour permettre une tenue maximum de la tête lors de l'injection. Ces nouveaux dépôts permettent un raccordement entre le joint latéral et l'époxy sous le plateau, la communication se fait par les deux trous dans le plateau (Fig. VII.3C).

Le système est laissé en place vingt heures pour permettre la polymérisation de la résine époxy.

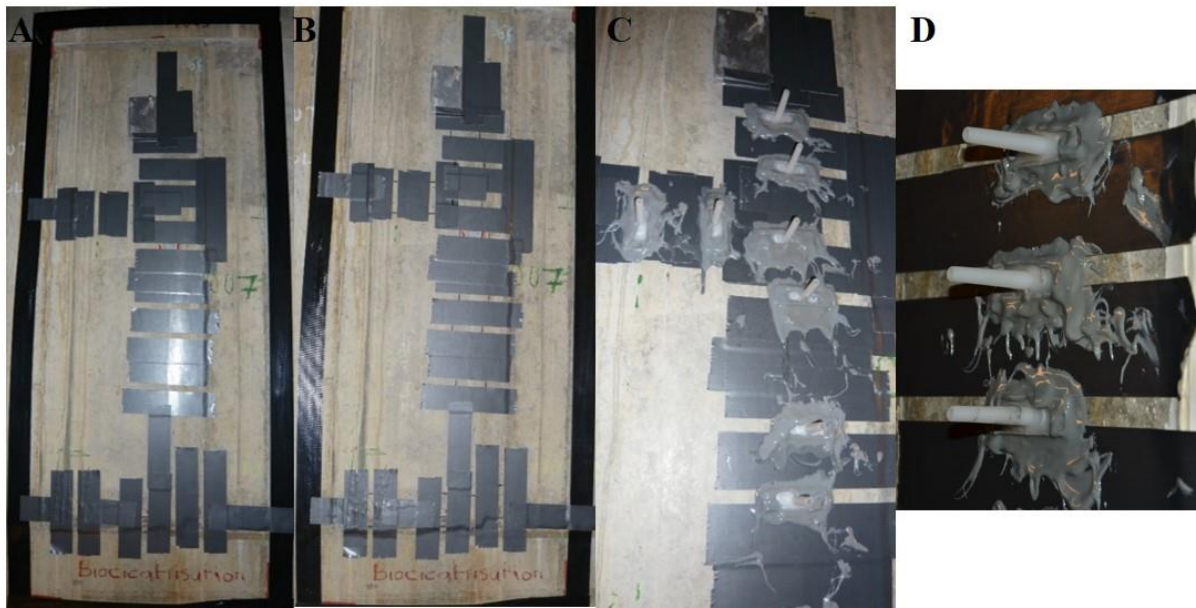


Figure VII.3 : Préparation de la fissure GOU 2007 pour l'essai de biocicatrisation par injection.

A : mise des scotchs. B : marquage de positionnement des têtes d'injection. C : collage des têtes d'injection. D : têtes d'injection collées.

### 7.2.1.3 Préparation des inocula microbiens et des formulations

La formulation Gmin est utilisée pour l'injection, sa composition est décrite au chapitre 3. Deux inocula microbiens sont utilisés pour traiter les fissures : la souche de *Bacillus pseudofirmus* et le consortium microbien CBB2020 développé dans le chapitre 4.

#### 7.2.1.3.1 *Bacillus pseudofirmus*

##### *Préculture*

Le milieu de préculture utilisé pour *B. pseudofirmus* est le milieu NB (Nutrient Broth, Difco™) à 8 g.L<sup>-1</sup> tamponné à un pH 9,7 avec un tampon (4,2 g NaHCO<sub>3</sub>, 5,3 gNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dans 100 mL d'eau distillée) et mesuré avec une électrode de pH Sentix® 41 à 20°C. Ce milieu est stérilisé par autoclave avec un cycle classique (120°C pendant quinze minutes). Les cellules de *B. pseudofirmus* utilisées sont stockées en cryotubes de 1,5 mL à -85°C. La préculture est réalisée dans un erlenmeyer de 250 mL contenant 100 mL de milieu NB à pH = 9,7 inoculée avec un cryotube, puis placée sous agitation (150 rpm) à 30°C pendant dix-huit heures.

### *Milieux liquides*

Les milieux liquides sont les milieux dans lesquels les inocula sont amplifiés avant le traitement. Ils sont utilisés pour l'injection de milieu liquide pour la pré-saturation du béton au voisinage de la fissure ou pour le badigeonnage. Le milieu liquide pour la culture de *B. pseudofirmus* est réalisé à partir d'un milieu contenant 75 g.L<sup>-1</sup> de lactate de calcium et 3 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure. Un litre de milieu est inoculé avec 1 mL (février 2020) ou 2 mL (mars et octobre 2021) d'une préculture de *B. pseudofirmus* ayant une Densité Optique (D.O.) de 0,8 à 620 nm puis mis en culture six jours à 30°C sous agitation (150 rpm). Deux milieux liquides différents sont réalisés :

- **L75** : il s'agit de la suspension bactérienne après six jours de croissance utilisée pour de l'injection et du badigeonnage.
- **L75-G** : il s'agit de la suspension bactérienne après six jours de croissance, additionnée le jour des essais de gluconate de calcium (20 g/L) stérile, utilisée pour l'injection et le badigeonnage.
- **L75-G-C** : il s'agit de la suspension bactérienne après six jours de croissance, additionnée le jour des essais de carbonate de calcium (50 g/L) et de gluconate de calcium (20 g/L) stériles, utilisée pour l'injection et le badigeonnage.

### *Formulation épaissie*

Pour la première campagne réalisée en février 2020, la formulation L11A4C5 a été utilisée, car la formulation Gmin n'avait pas encore été développée. Cette formulation contient 34,5 g de lactate de calcium (11%), 0,95 g d'extrait de levure (0,3%), 12,55 g d'Attigel 50 (4%), 15,7 g de carbonate de calcium (5%) et 250 mL d'eau distillée. Elle a été inoculée le jour des essais avec 2 mL de préculture de *B. pseudofirmus* pour 250 mL de formulation L11A4C5. Cette formulation donne, après 30 jours de culture avec *Bacillus pseudofirmus* à 20 °C une production brute de 4,7 g de carbonate de calcium pour 100 mL de formulation. La consommation de lactate de calcium est de 67 % en 30 jours.

Par la suite, la formulation utilisée est la formulation Gmin décrite dans le chapitre 3. L'Attigel 50 (5,2 g, 2%), le carbonate de calcium (18,6 g, 7,3%), le gluconate de calcium (2,6 g, 1%) sont introduits dans un flacon, puis, comme les Waring Blenders, sont stérilisés par autoclave (120°C, quinze minutes). Une bouteille contenant le lactate de calcium (28,6 g, 11.2%),

l'extrait de levure (0,8 g, 0,3%) et 200 mL d'eau distillée est stérilisée par autoclave. La solution liquide est ensuite placée à 4°C pour la nuit pour permettre la recristallisation du lactate de calcium. Des tubes contenant 2 mL d'inocula sont préparés le jour du traitement à partir du milieu liquide L75. 2 mL de préculture sont utilisés pour 200 mL de formulation épaissie Gmin. Le mélange est fait sur place : le contenu de la bouteille de poudre solide et celui de la bouteille de liquide sont introduits dans un Waring Blender et agités pendant deux minutes à la vitesse 2 (22 000 rpm). Le tube contenant l'inoculum est ajouté puis le mélange est agité pendant dix secondes à la vitesse 1 (18 000 rpm). Le mélange obtenu constitue la formulation épaissie Gmin inoculé par *B. pseudofirmus*.

#### 7.2.1.3.2 Consortium CBB2020

##### *Préculture*

Le milieu de préculture utilisé pour le consortium est un milieu L50 contenant 50 g.L<sup>-1</sup> de lactate de calcium et 3 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure. Ce milieu est stérilisé par filtration avec un filtre de 0,2 µm. La préculture est réalisée dans un erlenmeyer de 250 mL contenant 100 mL de milieu L50 et inoculée avec un cryotube de 1,5 mL, puis placée sous agitation (150 rpm) à 20°C pendant douze heures.

##### *Formulations liquides*

Le milieu liquide utilisé pour la culture de CBB2020 est le milieu L50 contenant 50 g.L<sup>-1</sup> de lactate de calcium et 3 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure. Le milieu est inoculé avec 2 mL d'une préculture de CBB ayant Densité Optique (D.O.) de 1,9 à 620 nm pour 1 L de milieu. Il est mis en culture quarante-huit heures à 20 °C sous agitation (150 rpm). Deux milieux différents sont ainsi réalisés :

- **L50** : il s'agit de la suspension bactérienne après deux jours de croissance utilisée pour l'injection et le badigeonnage.
- **L50-G-C** : il s'agit de la suspension bactérienne après deux jours de croissance, additionnée le jour des essais de carbonate de calcium (50 g/L) et de gluconate de calcium (20 g/L) stériles, utilisée pour l'injection et le badigeonnage.

##### *Formulation épaissie*

Seule la formulation Gmin est utilisée et elle est préparée en suivant la procédure décrite pour les essais avec *B. pseudofirmus*.

#### 7.2.1.4 Traitements réalisés

Des campagnes menées début février 2018 et 2019 ont été réalisées avant cette thèse (139) sur une reprise de bétonnage (FUT 2014) et une fissure verticale (GOU 2007). Ces zones ont été traitées par plusieurs badigeonnages de milieu L75 inoculé avec *B. pseudofirmus*, la procédure est décrite dans (Lors *et al.*, 2020) (139). Une épreuve de mise sous pression en mars a eu lieu après chaque biotraitement, elles sont nommées VD2 et VD3.

Trois campagnes additionnelles ont été réalisées dans le cadre de cette thèse, durant les périodes suivantes : février 2020, mars 2021 et octobre 2021. Lors de ces trois campagnes, différentes zones ont été traitées, trois fissures verticales GOU 2007, GOU 2005 et GOU 3017 ; une reprise de bétonnage FUT 2014 et une zone fuyarde TAM 2029. Ces acronymes signifient :

- GOU : zone du gousset présentée dans la figure VII.4.
- FUT : zone du fût présentée dans la figure VII.4.
- TAM : Tampon Accès Matériel, il s'agit d'une zone proche de l'ouverture vers l'intérieur de la maquette.

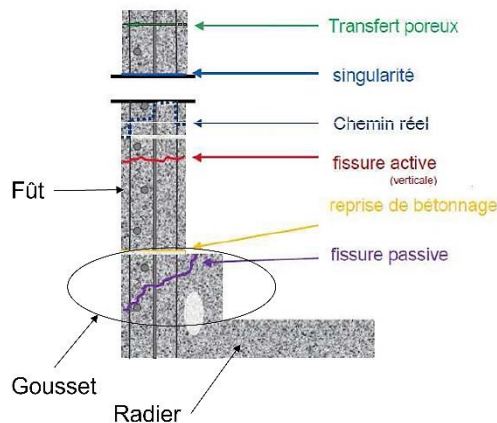


Figure VII.4 : Présentation des différentes zones de la maquette VeRCoRs.

Les traitements sont répartis ainsi :

- Campagne de février 2020 : traitement par injection (L75-G, L11A4C5 et *B. pseudofirmus*) et par badigeonnages (L75 et *B. pseudofirmus*) des fissures verticales GOU 2007, GOU 2005 et des zones FUT 2014 et TAM 2029.
- Campagne mars 2021 : traitement par injection (L75-G-C, Gmin et *B. pseudofirmus*) et par badigeonnages (L75-G-C et *B. pseudofirmus*) de la fissure GOU 3017 et traitement par badigeonnages (L75, L75-G-C et *B. pseudofirmus*) des fissures verticales GOU 2007 et GOU 2005 et des zones FUT 2014 et TAM 2029.

- Campagne octobre 2021 : traitement par badigeonnages (L50-G-C, Gmin et consortium CBB2020) de la fissure GOU 3017 et des zones FUT 2014 et TAM 2029 et traitement par badigeonnages (L75, L75-G-C, Gmin et *B. pseudofirmus*) des fissures verticales GOU 2007 et GOU 2005.

Les épreuves annuelles de mise sous pression sont normalement réalisées en mars. Cependant, avec la situation de pandémie de COVID19, la mise sous pression de 2020 (VD4) n'a pas été réalisée et la mise sous pression suivante (VD5) a été réalisée fin février 2021. Seul le premier traitement (février 2020) a pu faire l'objet de mesures de débit de fuite. Il n'a pas pu être réalisé dans des conditions optimales car, durant l'année qui a suivi le traitement, il n'y a pas eu d'apport d'eau durant de longues périodes (de mars à juillet 2020) à cause du confinement en vigueur en France. Les zones biotraitées ont tout de même été humidifiées de février à mars.

#### 7.2.1.4.1 Traitement de février 2020

La figure VII.5. illustre l'aspect visuel des fissures, avant et après la préparation du biotraitement.

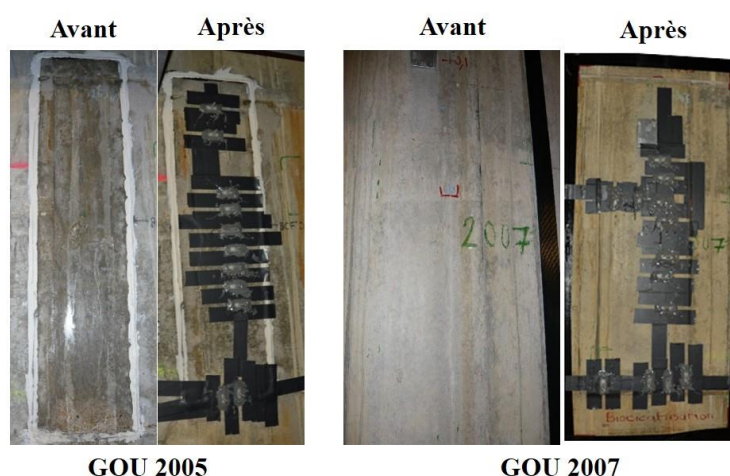


Figure VII.5 : Photos des deux fissures verticales initiales et préparées pour l'injection.

La première étape consiste à fixer les têtes au niveau des deux fissures verticales (GOU 2007 et GOU 2005), afin de laisser le temps à la résine de polymériser pour résister à la pression générée par l'injection. La fissure GOU 2005 comporte onze têtes d'injection, soit neuf têtes pour la fissure verticale et deux pour la fissure horizontale inférieure de reprise de bétonnage. La fissure GOU 2007 comporte treize têtes d'injection, soit sept têtes pour la fissure verticale, deux pour la partie horizontale supérieure et quatre pour la fissure horizontale inférieure de reprise de bétonnage. Le biotraitement comprend les quatre étapes suivantes :



① **Injection du milieu liquide.** Chacune des deux fissures verticales est injectée trois fois avec du milieu L75-G (Fig VII.6 A et B). Au total, environ 350 mL ont été injectés en partant du bas vers le haut. Tout le volume n'a pas pu rentrer dans les fissures car il y a eu des fuites, principalement au niveau de la reprise de bétonnage. Des bouchons ont été insérés dans les têtes déjà injectées pour éviter les baisses de pression lors des injections successives (Fig. VII.6 C). La continuité du volume interne a pu être confirmée par une sortie du milieu par les têtes adjacentes à celles qui ont été injectées (Fig. VII.6 D).



A et B : injection. C : bouchon pour éviter la sortie du fluide. D : sortie du fluide lors de l'injection d'une autre tête d'injection.

*Figure VII.6 : Injection de milieu liquide inoculé dans les fissures verticales.*

② **Injection du milieu épais.** L'injection de la formulation L11A4C5 inoculée par *B. pseudofirmus* dans les fissures GOU 2007 et GOU 2005 a montré une forte résistance à l'entrée du fluide dans la fissure. La seule zone où une quantité significative de formulation épaisse a pu être injectée est la zone de reprise de bétonnage (Fig. VII.7).



La flèche rouge indique le milieu épais injecté au niveau de la reprise de bétonnage.

*Figure VII.7 : Injection du milieu épais dans les fissures verticales GOU 2005 et GOU 2007.*

Après avoir retiré les têtes d'injection, les scotchés et gratté les résidus de résine époxy, on a pu observer une zone humide sur une région d'un centimètre de part et d'autre de la fissure. Cela confirme que le milieu liquide a bien pénétré dans la fissure entre les têtes d'injection (Fig. VII.8).





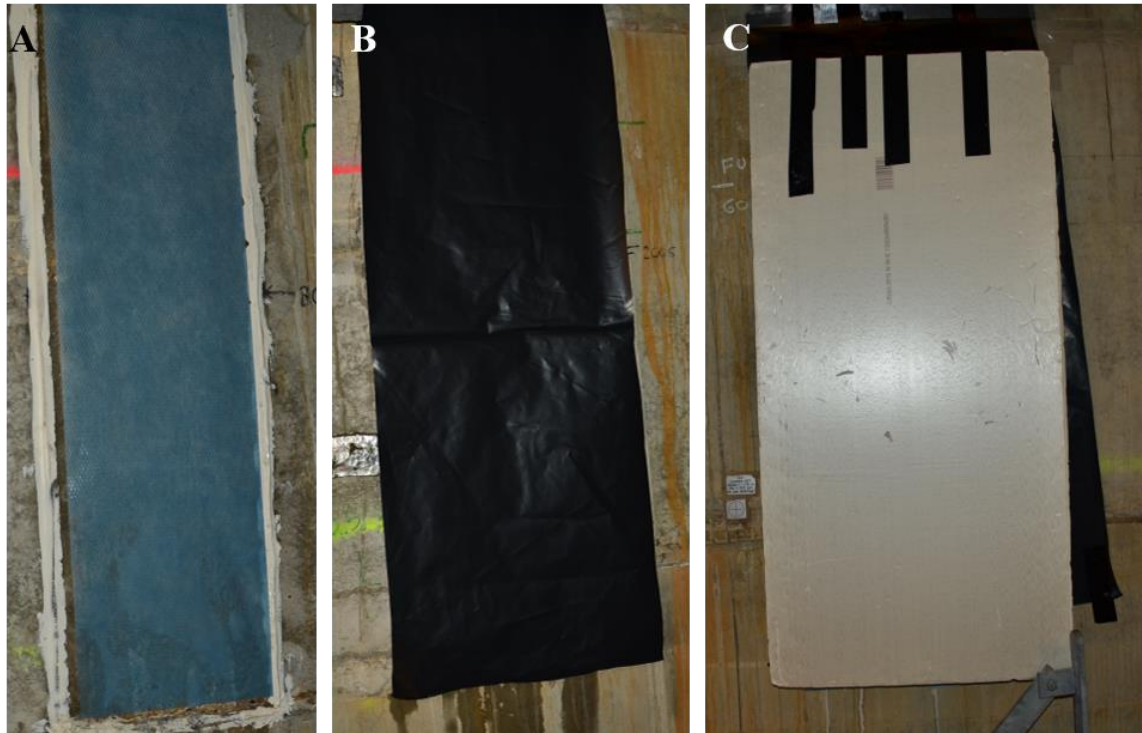
*Figure VII.8 : Zones d'hydratation visibles lors de l'enlèvement du système d'injection.*

③ **Badigeonnage externe des fissures.** Un pinceau de 40 mm est utilisé pour badigeonner à plusieurs reprises les fissures des zones GOU 2007 et GOU 2005 avec le milieu L75-G-C (Fig. VII.9).



*Figure VII.9 : Badigeonnage final des fissures verticales.*

④ **Pose d'équipement de protection.** Une protection de la zone traitée pour limiter les pertes d'humidité est nécessaire car la biocicatrisation est un processus qui nécessite un apport d'eau. Sur toute la surface des deux fissures traitées, une pièce de papier absorbant saturée d'eau est suspendue à la paroi puis recouverte par une bâche imperméable (Fig. VII.10A et B). Dans le cas de la fissure GOU 2007, une planche de polystyrène recouvre l'ensemble pour assurer une protection thermique supplémentaire en raison de la présence d'une porte extérieure à proximité (Fig. VII.10C).



A : papier absorbant (GOU 2005 et 2007). B : bâche imperméable (GOU 2005 et 2007).  
C : plaque de polystyrène isolante (GOU 2007 uniquement).

Figure VII.10 : Système de protection des fissures verticales.

Deux zones supplémentaires ont été traitées par badigeonnage : la reprise de bétonnage FUT 2014 et la zone fuyarde TAM 2009. Ces zones ne présentent pas de fissure visible mais un débit de fuite est toutefois mesuré. Le premier jour, cinq badigeonnages à l'aide d'un pinceau de 40 mm sont réalisés avec le milieu L75-G inoculé avec *B. pseudofirmus*, pour chaque zone traitée. Le lendemain, six badigeonnages supplémentaires sont réalisés avec du milieu L75-G-C inoculé avec *B. pseudofirmus* (Fig.VII.11).



Figure VII.11 : Badigeonnage de la zone fuyarde TAM 2029.

Comme dans le cas des fissures verticales, ces deux zones traitées par badigeonnage ont été protégées avec du papier absorbant saturé d'eau et une bâche imperméable (Fig. VII.12).



A droite FUT 2014 et à gauche la zone fuyarde TAM 2029.

*Figure VII.12 : Système de protection des zones biotraitées par badigeonnage.*

Par la suite, toutes les zones traitées ont été humidifiées par brumisation d'eau deux fois par semaine et de milieu L50 non inoculé une fois par semaine. Les fissures ont été humidifiées presque quotidiennement jusqu'au 6 mars, le plan d'humidification des surfaces est présenté dans l'Annexe 7. Le chauffage dans l'enceinte intérieure a été arrêté le 6 mars.

#### *7.2.3.1.2 Traitement de mars 2021*

Seule la fissure GOU 3017 a été traitée par injection du milieu liquide L75-G-C inoculé avec *B. pseudofirmus* (400 mL de milieu injecté) et la formulation Gmin (200 mL de formulation injectée) parmi les douze têtes utilisées pour la fissure verticale, cinq ont été utilisés pour la partie horizontale centrale et sept pour la fissure horizontale inférieure de reprise de bétonnage (Fig. VII13).



*Figure VII.13 : Fissure GOU 3017 préparée pour l'injection.*

A la fin du traitement, les têtes n'ont pas été retirées pour pouvoir procéder à une injection lors du traitement d'octobre 2021.



Lors de ces essais, on a constaté que les fissures GOU 2005 et 2007 ne sont plus injectables, les têtes ont donc été arrachées et les fissures donc été traitées par trois badigeonnages de milieu L75-C-G. La fissure GOU 2005 a été badigeonnée une fois avec de la formulation Gmin.

Les zones FUT 2014 et TAM 2029 ont été traitées par quatre badigeonnages de milieu L75-G et cinq badigeonnages de milieu L75-G-C.

Toutes les zones ont été ensuite protégées en suivant la même procédure que pour la campagne de février 2020.

#### *7.2.3.1.3 Traitement d'octobre 2021*

Après les traitements précédents, il n'a pas été possible d'injecter la fissure verticale de la zone GOU 3017. Seule la zone de reprise de bétonnage de cette zone a pu être injectée. Toutes les têtes ont donc été retirées et la zone GOU 3017 a été badigeonnée deux fois avec du milieu L50-C-G inoculé avec le consortium CBB2020 puis badigeonnée avec le milieu épaissi Gmin inoculé avec le consortium CBB2020 (Fig. VII14).



*Figure VII.14 : Fissure GOU 3017 badigeonnée avec Gmin.*

Les deux zones fuyardes FUT 2014 et la zone TAM 2029 ont été traitées par quatre badigeonnages de milieu L50-C-G inoculé avec le consortium CBB2020 puis badigeonnées avec le milieu épaissi Gmin inoculé avec le consortium.

Les fissures GOU 2005 et GOU 2007 ont été traitées par quatre badigeonnages de milieu L75 inoculé avec *B. pseudofirmus*, suivi de quatre badigeonnages de milieu L75-G-C inoculé avec *B. pseudofirmus*, puis badigeonnées avec le milieu épaissi Gmin inoculé avec *B. pseudofirmus*.

Toutes les zones ont été ensuite protégées en suivant la même procédure que pour la campagne de février 2020. Le tableau VII.1 présente le récapitulatif des traitements effectués sur chaque zone pour chaque campagne réalisée.

Tableau VII.1 : Récapitulatif des traitements biologiques réalisés pour chaque campagne VeRCoRs.

Campagne	Fissures verticales			Zones fuyardes	
	GOU2005	GOU2007	GOU 3017	FUT 2014	TAM2029
2018 Lors <i>et al.</i> , 2020)	NT	Badigeonnages L75 ( <i>B. pseudofirmus</i> )	NT	Badigeonnages L75 ( <i>B. pseudofirmus</i> )	NT
Epreuve de mise sous pression (VD2), mars 2018					
2019 (Lors <i>et al.</i> , 2020)	NT	Badigeonnages L75 ( <i>B. pseudofirmus</i> )	NT	Badigeonnages L75 ( <i>B. pseudofirmus</i> )	NT
Epreuve de mise sous pression (VD3), mars 2019					
Début de la thèse					
Février 2020	Injection L75-G Injection L11A4C5 Badigeonnages L75-G et L75-C-G ( <i>B. pseudofirmus</i> )		NT	Badigeonnages L75 ( <i>B. pseudofirmus</i> )	
Epreuve de mise sous pression (VD5), février 2021					
Mars 2021	Badigeonnages L75 et L75G-C Badigeonnage Gmin (GOU2005) ( <i>B. pseudofirmus</i> )		Injection L75G-C Injection Gmin ( <i>B. pseudofirmus</i> )		Badigeonnages L75 et L75G-C ( <i>B. pseudofirmus</i> )
Octobre 2021	Badigeonnages Gmin Badigeonnages L75 ( <i>B. pseudofirmus</i> )		Badigeonnages Gmin Badigeonnages L50GC (consortium CBB2020)		Badigeonnages Gmin Badigeonnages L50GC (consortium CBB2020)

NT = non traités.

## 7.2.2 Le barrage de la centrale hydroélectrique d'Hydro-Sherbrooke à Weedon

### 7.2.2.1 Description de l'ouvrage

L'ouvrage d'Hydro-Sherbrooke sélectionné est la centrale hydroélectrique située à Weedon. La figure VII.15A montre la centrale en aval du courant d'eau et la figure VII.15B la montre en amont du courant d'eau. La figure VII.15C montre la digue en béton permettant de contenir l'eau de la rivière pour l'envoyer vers les turbines. Des fissures sont présentes au niveau de cette digue. Un suintement régulier d'eau est observable, cela permet de travailler sur des fissures dans un béton saturé en eau.



A : photo de la centrale en aval de la rivière. B : photo de la centrale en amont de la rivière.  
C : photo de la digue en béton biotraitée.

*Figure VII.15 : Photos du barrage de la centrale hydroélectrique d'Hydro-Sherbrooke (Weedon).*

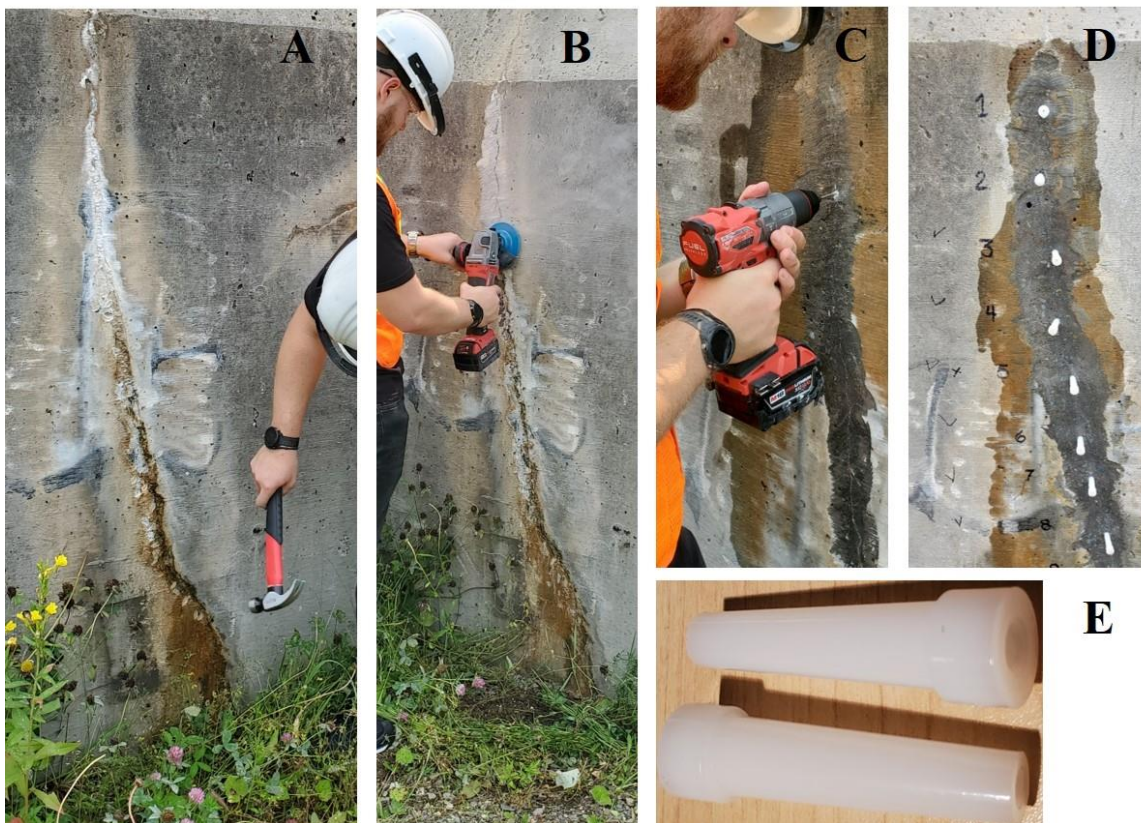
### 7.2.2.2 Procédure de l'injection

Au voisinage des fissures de retrait, la surface de béton est saturée avec par endroits un suintement d'eau au travers de la fissure. Il n'est donc pas possible d'utiliser de la résine époxy et de coller les têtes sur la surface à traiter.

### 7.2.2.2.1 Matériel d'injection

L'injection se fait avec des têtes d'injection cylindriques enfoncées dans un trou foré dans le béton au droit de la fissure (Fig. VII.16E). La tête d'injection fait 55 mm de long avec un diamètre maximal (en haut) de 16 mm et un diamètre minimal (en bas) de 9 mm. Le diamètre intérieur est uniforme et est de 5 mm. Le forage est fait avec une mèche à béton de 10 mm de diamètre et les trous font 10 cm de profondeur. Cela permet d'enfoncer suffisamment la tête pour qu'elle soit totalement coincée dans le trou et qu'il reste un espace vide. Cet espace vide sert de réservoir de formulation sous pression et permet l'accès à la fissure du fluide injecté, même si le trou n'a pas été fait exactement dans l'axe de la fissure. L'injection se fait avec le même système que celui utilisé sur la maquette VeRCoRs : un pistolet injecteur et des cartouches.

### 7.2.2.2.2 Préparation d'une fissure



A : mise à nu de la fissure avec un marteau. B : finition du nettoyage de la fissure au disque abrasif. C : forage des trous tous les 10 cm le long de la fissure. D : têtes d'injection installées E : tête d'injection.

Figure VII.16 : Réparation de la fissure A dans le barrage de la centrale de Weedon.

Les différentes étapes de préparation de l'injection sont indiquées ci-dessous :

- ① Les fissures sont mises à nu, d'abord avec un marteau puis avec un disque abrasif diamanté pour retirer la couche de calcaire superficielle présente à la surface de la fissure et empêchant l'injection (Fig. VII16A et B).
- ② Les trous sont forés le long de la fissure, chacun espacé de 10 cm (Fig. VII16C).
- ③ Les têtes sont enfoncées au maximum avec un marteau dans les trous (Fig. VII16D).
- ④ L'injection peut avoir lieu. Elle se fait en enfonçant l'embout du pistolet injecteur aux têtes d'injection.

### *7.2.2.3 Préparation des inocula et des formulations*

La formulation Gmin, inoculée avec le consortium CBB2020, a été utilisée pour l'injection des deux fissures de la centrale de Weedon.

#### *Préculture*

Le milieu de préculture pour le consortium est le même que celui utilisé pour la campagne VeRCoRs soit le milieu L50 contenant 50 g.L<sup>-1</sup> de lactate de calcium et 3 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure. Ce milieu est stérilisé par filtration avec un filtre de 0,2 µm. La préculture a été réalisée dans un erlenmeyer de 250 mL contenant 100 mL de milieu L50 et inoculé avec un cryotube, puis placé sous agitation à 20°C pendant douze heures.

#### *Formulations liquides*

Les formulations liquides sont les milieux dans lesquels les inocula sont amplifiés avant le traitement. Le milieu liquide utilisé pour la culture de CBB2020 est le milieu L50 contenant 50 g.L<sup>-1</sup> de lactate de calcium et 3 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure. Le milieu, d'un volume de 1 litre, est inoculé avec 2 mL d'une préculture de CBB2020 ayant une densité optique (D.O.) de 1,7 à 620 nm. Il est mis en culture quarante-huit heures à 20°C sous agitation (150 rpm). Le milieu **L50-G-C** est constitué du milieu L50 contenant 2% de gluconate de calcium (soit 20 g/L) et 5% de carbonate de calcium (soit 50 g/L).



### *Formulation épaisse*

Un litre de formulation épaisse Gmin contient 143 g de lactate de calcium, 26 g d'Attigel 50, 93 g de carbonate de calcium, 13 g gluconate de calcium et 4 g d'extrait de levure, non stérile. La stérilité n'est pas nécessaire car les essais se font dans des fissures non stériles. Les constituants nécessaires à la production d'un litre de formulation sont stockés dans un sac hermétique jusqu'au jour du traitement. Le jour du traitement, le sachet est vidé dans un seau de 10 L dans lequel un litre d'eau est ajouté, puis mélangé pendant deux minutes avec un agitateur monté sur une perceuse électrique. La dernière étape consiste à ajouter l'inoculum (10 mL de préculture), l'homogénéiser par agitation lente pendant trente secondes. Cette formulation épaisse peut alors être transférée dans la cartouche du pistolet injecteur.

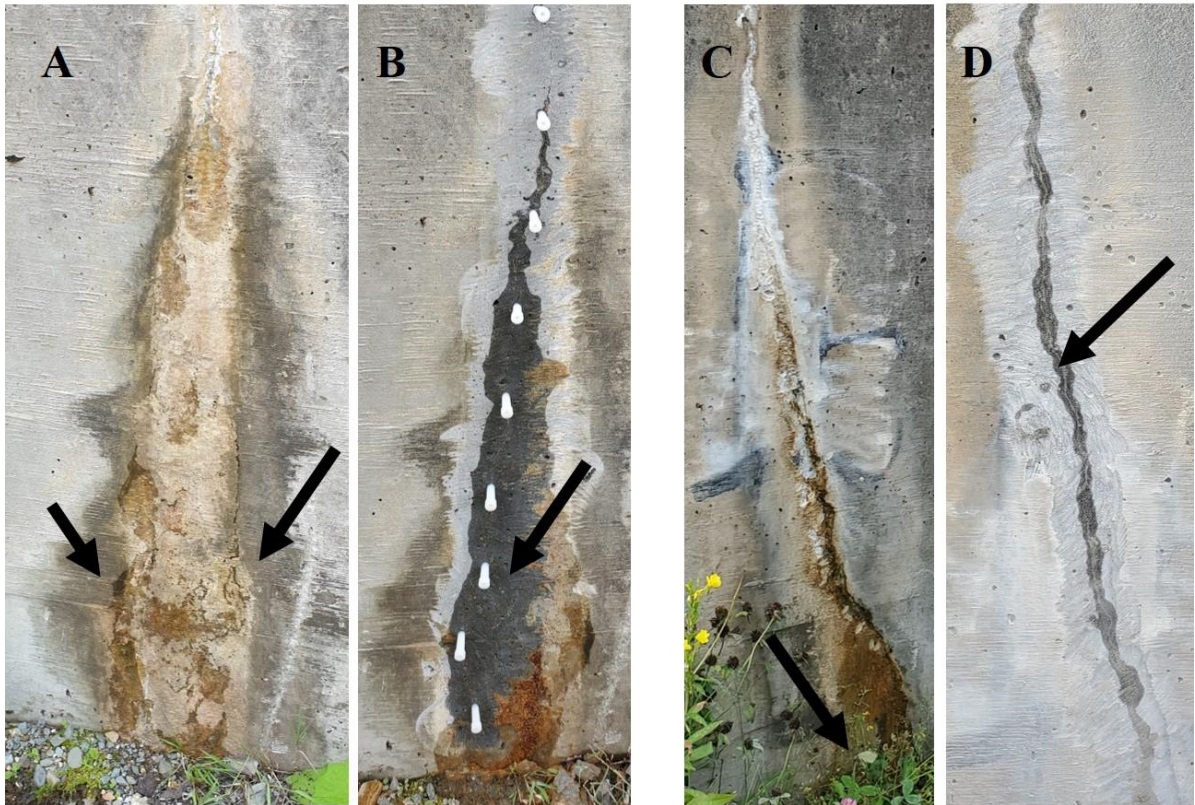
#### **7.2.2.4 Traitements réalisés**

Les figures VII.17A et C montrent les deux fissures verticales avant le biotraitement. Elles sont de taille similaire (environ 400  $\mu\text{m}$ , par observation des fissures sur site) et elles sont recouvertes d'une importante couche de calcaire en surface. Cette carbonatation provient de la réaction entre le  $\text{CO}_2$  de l'air et l'apport de calcium en solution provenant du béton. Les figures VII17 A et C montrent un suintement d'eau sous la couche de carbonatation. L'apport d'eau est bien visible après avoir enlevé mécaniquement la couche de carbonatation en surface (Fig.VII17 B et D).

Après le nettoyage de la surface et l'installation des têtes d'injection, les deux fissures ont d'abord été injectées avec le milieu liquide L50 G-C décrit dans le paragraphe 7.2.2.3. Pour chaque tête, la pression maximale pouvant être appliquée avec le pistolet injecteur est maintenue une minute. Les deux fissures ont été injectées deux fois avec le milieu liquide (Fig. VII.18A). Après avoir préparé le milieu épais (7.2.2.3) dans un seau avec un agitateur fixé sur une perceuse (Fig. VII.18B), le milieu épais est ensuite injecté avec la même procédure que celle utilisée pour le milieu liquide. La dernière étape consiste à badigeonner les zones injectées avec la formulation Gmin (Fig. VII19).

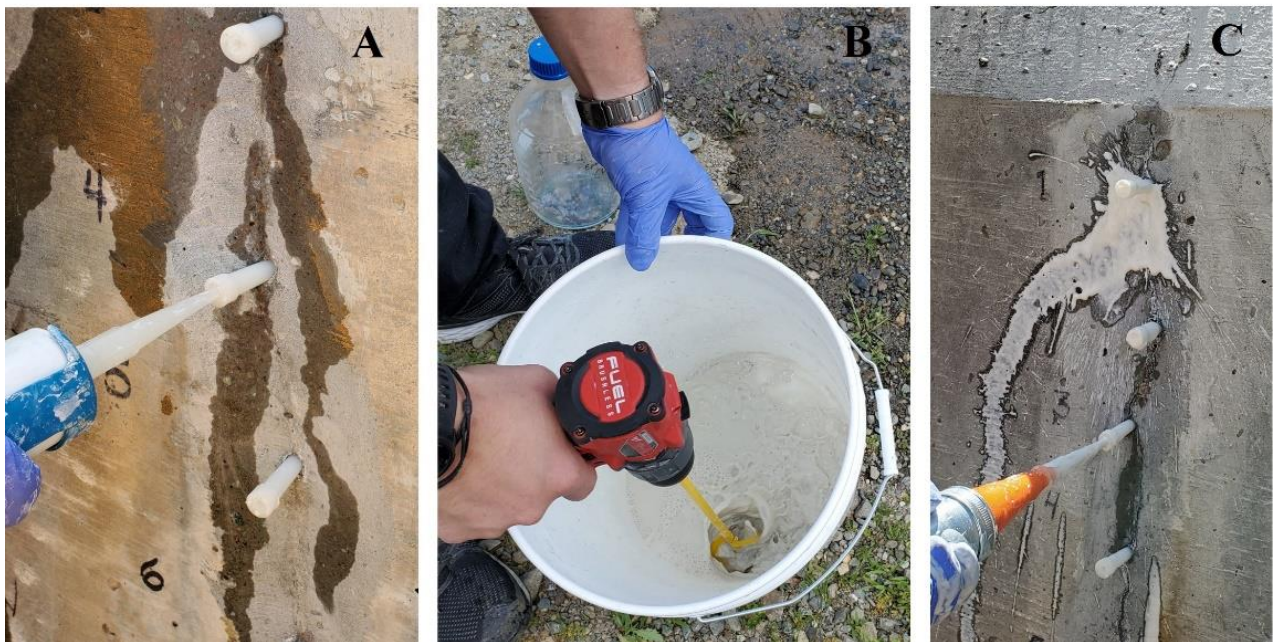
### Fissure A

### Fissure B



Les flèches correspondent aux zones humides. A : fissure A initiale.  
B : fissure A après nettoyage. C : fissure B initiale. D : fissure B après nettoyage.

*Figure VII.17 : Fissures A et B traitée sur le barrage de la centrale Weedon.*



A : injection de milieu liquide. B : préparation de la formulation épaissie. C : injection de formulation épaissie.

*Figure VII.18 : Injection dans une fissure située au niveau du barrage de la centrale de Weedon.*





A : fissure A. B : fissure B.

*Figure VII.19 : Fissures A et B traitées au niveau du barrage de la centrale de Weedon.*

Malgré qu'il n'y ait pas une évaluation quantitative de l'efficacité de ce traitement, comme dans le cas de la maquette VeRCoRs, des observations visuelles de l'humidité de surface peuvent aider à estimer l'efficacité des traitements, des photos ayant été prises avant et après le traitement (sept jours et quatre mois).

## 7.3. Résultats et discussion

### 7.3.1 Résultats du biotraitement de février 2020 sur la maquette VeRCoRs

#### 7.3.1.1 Résultats des débits de fuite de la maquette VeRCoRs

Les épreuves de mise en pression de la maquette VeRCoRs permettent d'obtenir des résultats quantitatifs du traitement biologique réalisé en 2020. La VD4 de mars 2020 n'a pas pu avoir lieu à cause de la pandémie de COVID19. Les épreuves sont donc passées directement de la VD3 de mars 2019 à la VD5 de février 2021.

Le colmatage est évalué en mesurant, pour les différentes zones, les débits de fuite d'air en Normo litre par heure (NL/h). Le volume d'un gaz dépend de sa température et de la pression, le NL est une unité de mesure du volume d'un gaz dans des conditions de température et de gaz normées (15°C à 1 Atm). Les mesures de débits de fuite ont été effectuées par des techniciens d'EDF spécialisés dans ce type de mesure. Plus cette valeur est élevée et plus la fuite est importante. Ces valeurs de débit de fuite sont quantifiées à trois échelles : un débit de fuite moyen pour la maquette VeRCoRs au complet, des débits moyens pour des zones de la structure (telles que les zones GOU ou FUT) et des débits pour un seul défaut dans la structure (fissure, zone fuyarde et reprise de bétonnage). Une réduction du débit de fuite correspond à une réduction de la perméabilité de la fissure. Le débit d'une zone spécifique est mesuré par des boîtes collectrices plaquées sur la surface externe de l'enceinte intérieure (Fig.VII20).



*Figure VII.20 : Boîte collectrice permettant de mesurer le débit de fuite de la fissure verticale GOU 2005.*

Les valeurs des débits de fuites mesurés sont présentées dans le tableau VII.2.

Tableau VII.2 : Débits de fuite en valeurs absolues et pourcentages en fonction de la VD1.

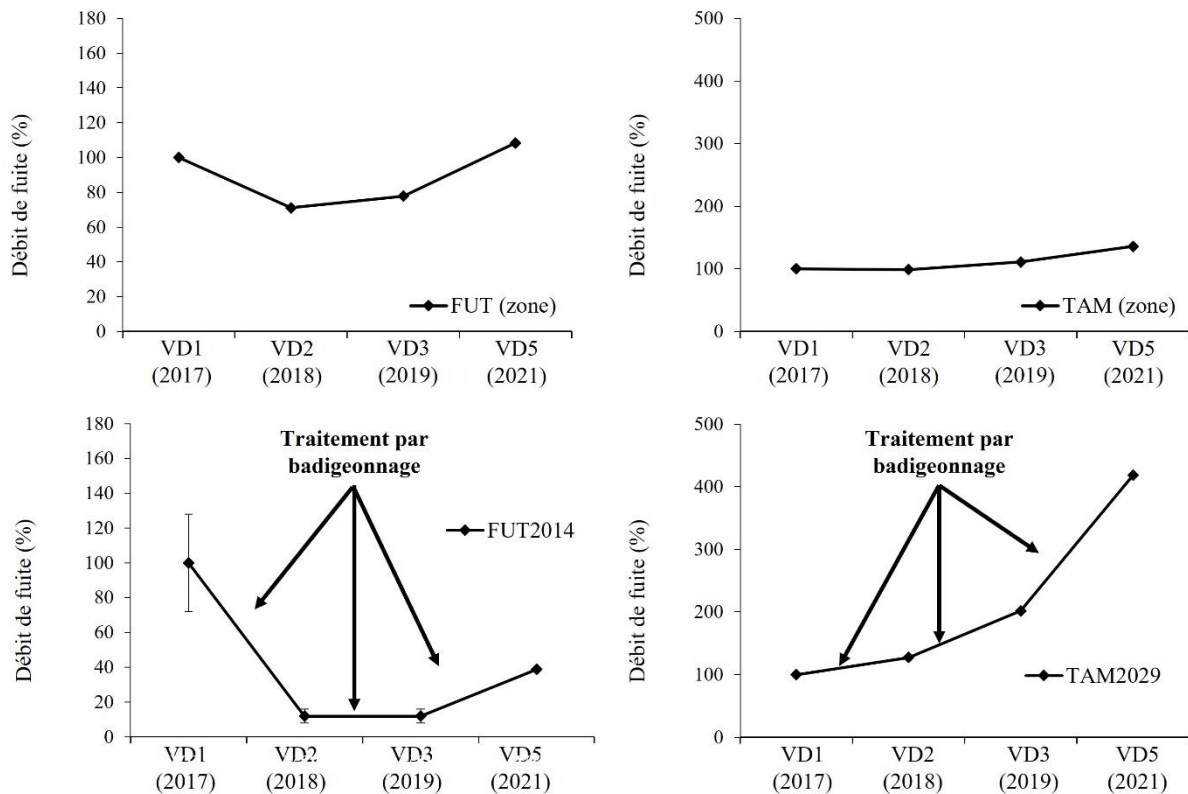
		VD1	VD2	VD3	VD5
GOU (zone)	Débit (NL/h)	20758	28058	33783	32836
	Débit (%)	100	135	163	158
GOU2005	Débit (NL/h)	650 ± 51	832 ± 407	963 ± 203	675
	Débit (%)	100 ± 8	128 ± 63	148 ± 31	104
GOU2007	Débit (NL/h)	690 ± 76	870 ± 76	900 ± 203	680
	Débit (%)	100 ± 11	126 ± 11	130 ± 29	99
FUT (zone)	Débit (NL/h)	2395	1703	1864	2594
	Débit (%)	100	71	78	108
FUT2014	Débit (NL/h)	253 ± 28	30 ± 4	30 ± 4	98
	Débit (%)	100 ± 11	12 ± 2	12 ± 2	39
TAM (zone)	Débit (NL/h)	796	787	882	1082
	Débit (%)	100	99	111	136
TAM2029	Débit (NL/h)	55	70	111	230
	Débit (%)	100	127	202	418

Les résultats de débit de fuites des zones fuyardes FUT 2014 et TAM 2029 en pourcentages sont présentés dans la figure VII.21. Ces pourcentages sont calculés à partir du débit de fuite de la VD1 qui représente le 100%.

Pour les deux zones fuyardes FUT 2014 et TAM 2029, un traitement par badigeonnage de milieu L75 a été fait avant deux épreuves de mise sous pression : en 2018 avant la VD2, en 2019 avant la VD3 et un traitement par badigeonnage de milieu L75-G et L75-C-G en 2020 un an avant la VD5.

Pour la zone FUT, on observe une diminution globale initiale du débit de fuite (entre la VD1 et 2), puis une légère augmentation à la VD3. Entre le VD3 et la VD5, le débit de fuite augmente significativement pour atteindre une valeur légèrement supérieure à celle mesurée à la VD1. La reprise de bétonnage traitée par badigeonnage (FUT 2014) suit une évolution similaire entre la VD1 et la VD5, mais avec une diminution plus importante entre la VD1 et la VD2 avec un débit qui passe de 253 à 30 NL/h soit une diminution du débit de fuite de 88%, et dans la même période une réduction du débit moyen de la zone FUT de 29%. Après la VD3, le débit de fuite reste constant jusqu'à la VD4 puis augmente (VD5). Ces résultats montrent que pour la zone de FUT 2014, la perméabilité à l'air a globalement diminuée et donc le premier traitement par badigeonnage a eu un effet favorable. Par la suite, la perméabilité a augmenté, ce qui est cohérent avec la nature des essais de séchages réalisés sur VeRCoRs. Ces résultats suggèrent

que le badigeonnage peut contribuer à colmater la porosité de surface du béton. Les premiers effets ont été une diminution de la perméabilité du béton entre la VD1 et la VD2. Ensuite ce colmatage semble diminuer l'intensité du séchage du béton, et limite ainsi l'augmentation de la perméabilité lors des mises sous pression subséquentes (VD 3 à 5).



Les valeurs de pourcentage sont calculées en rapport avec la mesure de débit à la VD1 (100%).  
VD = épreuve de mise sous pression.

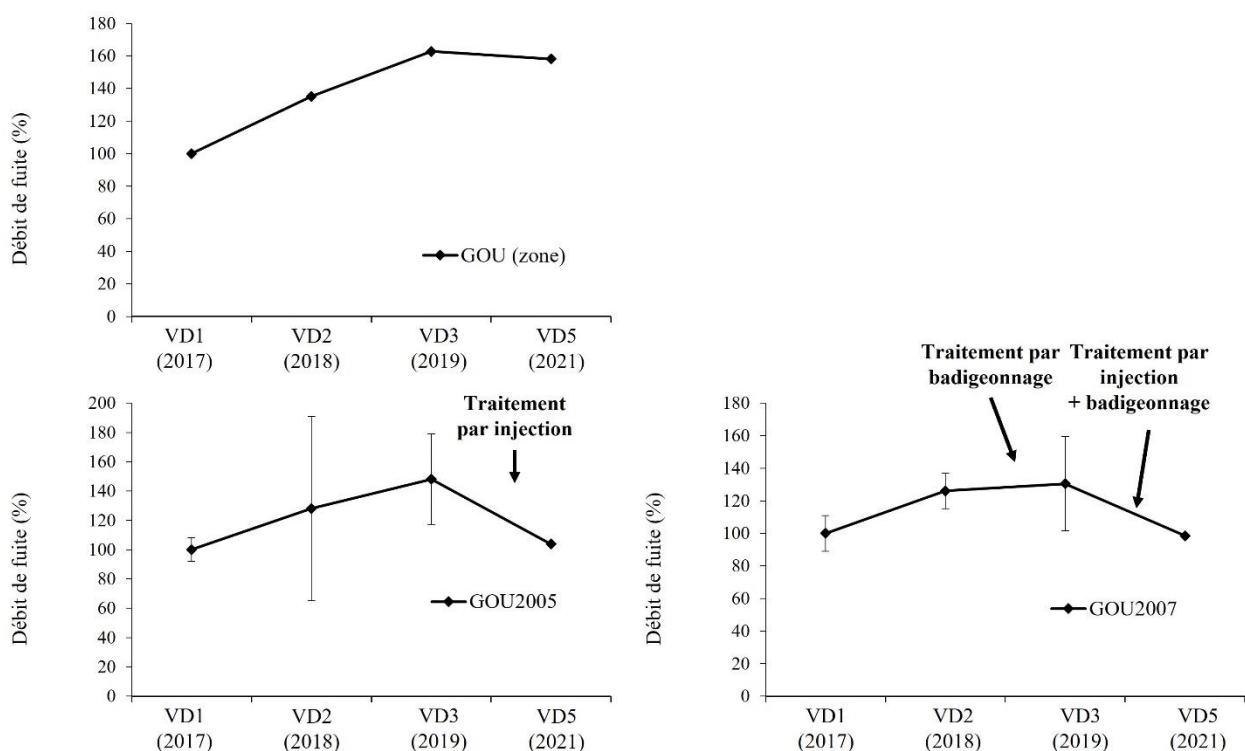
- A : débit de fuite moyen de la zone FUT.      B : débit de fuite de la zone fuyarde FUT 2014.  
C : débit de fuite moyen de la zone TAM.      D : débit de fuite de la zone fuyarde TAM 2029.

Figure VII.21 : Valeurs de débit de fuite des zones FUT 2014 et TAM 2029 de la maquette VeRCORS.

Pour la zone TAM, on observe une augmentation continue du débit de fuite à chaque épreuve de mise sous pression. On observe aussi cette augmentation pour la zone fuyarde traitée TAM 2029. Celle-ci est plus élevée que l'augmentation globale de la zone TAM. Ces résultats indiquent que le badigeonnage de la zone TAM 2029 n'a pas eu d'effet sur la perméabilité du béton que ce soit de façon directe, en colmatant la porosité de surface ou indirecte en diminuant la cinétique de séchage. Une explication potentielle de cette moins bonne performance par rapport à la zone FUT 2014 serait la nature des surfaces traitées. La zone FUT 2014 est une reprise de bétonnage ce qui permet une entrée facilitée du liquide de badigeonnage dans le

béton, la zone TAM 2029 est une zone fuyarde sans défaut visible dans l'espace inter-enceinte. Cependant, l'absence d'autre zone fuyarde ou de reprise de bétonnage traitée et des conditions environnementales différentes entre ces deux zones traitées (les zones globales FUT et TAM ne sont pas au même endroit sur la maquette VeRCoRS) ne permet pas de conclure sur les raisons de cette différence d'efficacité.

Les résultats de débit de fuites des fissures verticales GOU 2005 et 2007 sont présentés dans la figure VII.22. Ces pourcentages sont calculés à partir du débit de fuite de la VD1 qui représente le 100%.



Les valeurs de pourcentage sont calculées en rapport avec la mesure de débit à la VD1 (100%).

VD = épreuve de mise sous pression.

A : débit de fuite moyen de la zone GOU.

B : débit de fuite de la zone fuyarde GOU 2005. C : débit de fuite de la zone fuyarde GOU 2007.

Figure VII.22 : Pourcentages de débit de fuite des fissures verticales de la maquette VeRCoRS.

Ces deux fissures ont des tailles similaires (de l'ordre de 100  $\mu\text{m}$ ) et se situent à des localisations proches sur l'enceinte intérieure (quelques mètres). La fissure GOU 2007 a subi deux badigeonnages en 2018 avant la VD2 et en 2019 avant la VD3. Puis les deux fissures ont subi une injection en 2020 un an avant la VD5. On observe pour la zone GOU que le débit moyen

des différentes fuites, présentes dans cette zone, augmente à chaque épreuve jusqu'à la VD3, puis n'évolue pas de façon significative lors de la VD5. Le séchage initial du béton explique l'augmentation progressive de la perméabilité à l'air.

L'effet d'un badigeonnage peut être mis en évidence par la comparaison des débits entre la VD2 et la VD3 pour les fissures GOU 2005 et GOU 2007. Les deux fissures ont des débits comparables lors de la VD2, égaux à 832 et 870 NL/h respectivement. La fissure GOU 2005, non traitée, a une évolution proche de celle de la zone GOU, avec une valeur de débit de 963 NL/h à la VD3. A la VD3, la fissure GOU 2007 (traitée par badigeonnage) montre une augmentation du débit mais moins importante, avec une valeur de débit de fuite de 900 NL/h. Cela suggère que le badigeonnage contribue à diminuer la perméabilité, notamment par colmatage de surface qui diminue la cinétique de séchage. Entre les VD3 et la VD5, les deux fissures ont été traitées par injection. Dans les deux cas, on observe une diminution significative du débit qui n'est pas observée pour la zone GOU. Lors de la VD5, les débits sont de 675 NL/h et 680 NL/h pour les fissures GOU 2005 et 2007 respectivement, ce qui correspond à une réduction de la perméabilité à l'air de 30% pour GOU 2005 et 25% pour GOU 2007. Pendant cette période, la zone GOU a subi une réduction de débit de 3%. De plus, lors de la campagne de mars 2021, il n'a pas été possible de réinjecter les fissures GOU 2005 et 2007, et ce même avec le milieu liquide (L75). Cette donnée vient confirmer le colmatage des fissures. Globalement ces résultats montrent que l'injection réduit significativement le débit de fuite d'une fissure dans l'enceinte intérieure de la maquette VeRCoRs. Cet effet favorable a notamment pu être reproduit avec deux fissures dans la même zone d'essai (GOU).

Globalement les deux types de traitement, le badigeonnage et l'injection, ont eu un impact favorable sur la réduction du débit de fuite dans l'enceinte intérieure de la maquette VeRCoRs. Dans le cas d'une reprise de bétonnage, le badigeonnage peut réduire le débit de fuite. Cependant, dans le cas d'une zone fuyarde ce traitement n'a pas d'impact. Dans le cas d'une fissure, le badigeonnage réduit légèrement la perméabilité alors que l'injection la diminue de manière plus importante puisqu'il y a un colmatage des fissures en profondeur.



### **7.3.1.2 Suivi des conditions environnementales après les biotraitements réalisés sur la maquette VeRCoRs**

La maquette VeRCoRs est conçue pour étudier l'effet du séchage du béton, l'enceinte intérieure est donc volontairement placée dans un environnement sec. La biocicatrisation repose sur une action biologique, dépendante de l'eau liquide, réalisée par l'espèce bactérienne utilisée pour cette campagne : *Bacillus pseudofirmus*, ainsi que sur la présence d'humidité nécessaire à la formation de carbonate en présence de CO<sub>2</sub>. Des apports d'eau par aspersion ont été réalisés régulièrement à la surface des zones traitées. Pour suivre les conditions environnementales des zones traitées, trois capteurs d'humidité et de température ont été placés proches des différentes fissures traitées :

- Le capteur 1 localisé à proximité de la zone TAM 2029, à l'extérieur du film de protection (papier absorbant recouvert d'une bâche en plastique), (Fig.VII.23).
- Le capteur 2 est localisé au niveau de la fissure verticale GOU 2007, sous l'ensemble du système de protection (Fig.VII.23).
- Le capteur 3 est localisé dans la zone FUT 2014, à l'extérieur du film de protection (Fig.VII.23).

Les capteurs indiquent que la température est maintenue proche de 20°C, puis diminue, ce qui correspond à l'arrêt du chauffage (début mars) avant essai, les résultats sont présentés en Annexe 8. Il n'y a pas de différence entre les trois capteurs et la température générale de l'enceinte.

Le capteur 1 est placé en dehors de la couche de protection, mais à proximité directe avec celle-ci. Le niveau de base de l'humidité relative (HR) est à environ 60% et chaque apport d'eau à un impact visible avec des pics atteignant entre 80 et 90%.

Le capteur 2 est placé sous la couche de protection. On mesure une HR plus élevée comprise entre 60 et 80% d'HR. Les apports d'eau engendrent des pics d'HR à 100%.

Le capteur 3 est placé en dehors de la couche de protection, à proximité de la zone (une dizaine de centimètres). A cet endroit, le niveau de base de l'HR est compris entre 60 et 70% d'humidité relative.

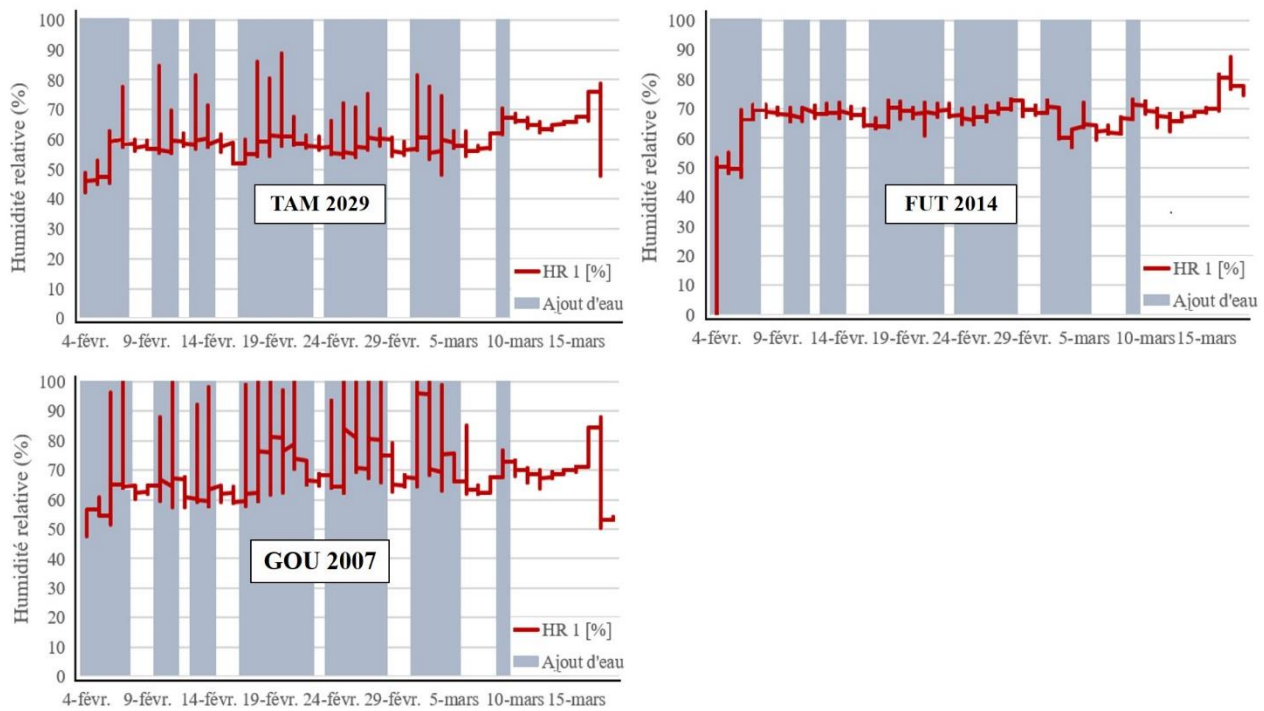


Figure VII.23 : Suivi de l'humidité relative en fonction du temps au niveau des zones fissurées (TAM 2029, FUT 2014 et GOU 2007) après le biotraitement de février 2020.

Ces résultats montrent que l'apport d'eau à la surface du béton permet de maintenir les bactéries dans un environnement plus humide. Sous la couche de protection, l'HR est souvent de 100% avec de courtes périodes à 60% minimum. De plus, l'humidité est mieux confinée sous la couche de protection. Les augmentations d'HR dues à l'apport d'eau et de milieu L50 non inoculé sont faibles à l'extérieur de la couche de protection et non mesurables à une dizaine de centimètres plus loin. Les systèmes de protection étaient similaires pour les différentes zones traitées, cela indique que les cellules de *B. pseudofirmus* ont eu accès à de l'eau après le traitement.

### 7.3.2 Résultats de l'injection dans les fissures du barrage de la centrale Weedon

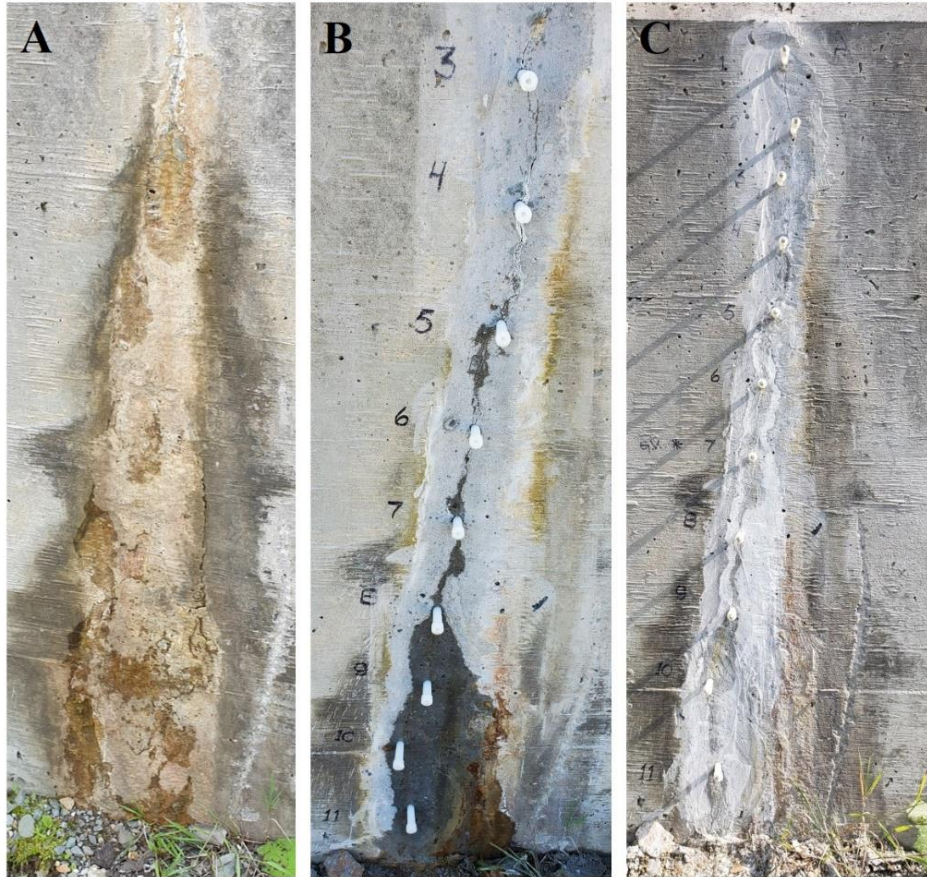
Deux fissures, A et B, sont traitées par injection de milieu liquide, de formulation épaissie et par un badigeonnage final de formulation épaissie au niveau du barrage de la centrale de Weedon. Les états initiaux montrent une couche de carbonatation superficielle n'imperméabilisant pas la fissure car la portion inférieure est constamment humide (Fig. VII.24A). Après avoir enlevé mécaniquement la carbonatation superficielle, on observe un suintement immédiat sur toute la hauteur des fissures (Fig. VII.24B). Cet apport d'eau est très favorable pour l'activité biologique du consortium.

Sept jours après le traitement, les deux fissures ont fait l'objet de nouvelles observations visuelles (Fig. VII.24C). On n'observe plus de suintement à la surface et celles-ci sont sèches au toucher. Les zones sombres sur les bords des fissures ne sont pas de l'humidité, cette teinte foncée était déjà présente avant le traitement.

Quatre mois après le traitement, de nouvelles observations ont été faites et présentées dans la figure VII.25.

Quatre mois après le traitement on observe que la fissure A est toujours totalement étanche et que, pour la fissure B, un léger suintement est visible au niveau des quatre têtes d'injection inférieures. Il s'agit de la zone où l'injection a été la plus difficile à réaliser, il semblerait qu'il n'y ait pas eu un apport suffisant de milieu épaissi pour compenser la pression hydrostatique exercée dans cette zone. Néanmoins, le traitement des fissures avec la méthode de biocicatrisation développée lors des chapitres précédents a montré des résultats très prometteurs. Elle permet, au bout de sept jours, de refermer des fissures de retrait dans un barrage en béton et si une quantité suffisante de produit a été injecté cette réparation perdure au moins quatre mois.

## Fissure A



## Fissure B



A : état initial. B : fissures nettoyées. C : fissures sept jours après le biotraitement.

Figure VII 24 : fissures A et B situées au niveau du barrage de Weedon à l'état initial et traitées.



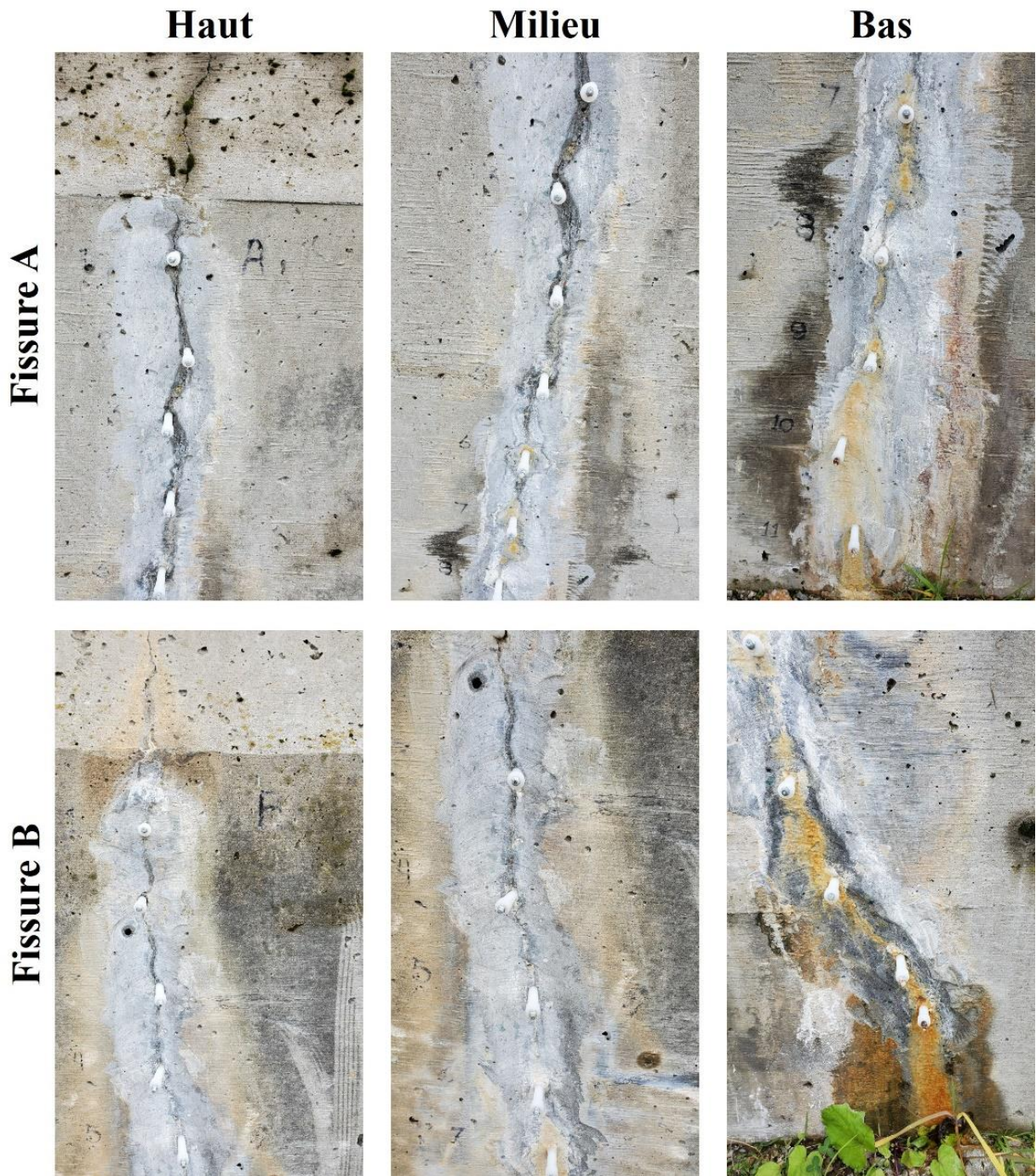


Figure VII 25 : fissures A et B situées au niveau barrage de Weedon quatre mois après le traitement.

#### 7.4. Conclusion

Le procédé de biocicatrisation testé en laboratoire (chapitre 6) a été utilisé pour traiter des fissures dans des ouvrages réels. Le développement des méthodes d'injection efficaces et compatibles avec des surfaces de béton saturé ou non a contribué à la mise en œuvre d'une technique de biocicatrisation adaptée à la réparation d'ouvrages réels. Cette technique de

réparation est avantageuse par rapport aux réparations conventionnelles de fissures fines puisque le matériau de colmatage, constitué d'un composite biofilm-carbonate de calcium, est moins toxique que les résines, plus durable et moins cher : un litre de formulation Gmin coûte 5,5 dollars canadien soit environs 4 euros (Annexe 9) contre 20 euros pour un litre de résine époxy.

Cette technique a pu être validée grâce à des essais *in situ* sur la maquette VeRCoRs et sur le barrage de la centrale de Weedon. Deux jours de travaux sont nécessaires pour la préparation et le traitement de fissures sèches avec des têtes d'injection collées (jour 1 : mise en place des têtes d'injection et durcissement de la résine ; jour 2 : injection du milieu inoculé). Dans le cas des surfaces de béton et des fissures humides, des ports d'injection forés sont utilisés et les travaux peuvent être réalisés en un seul jour.

Les résultats de cette méthode de biocicatrisation (injection de milieu liquide et d'injection et badigeonnage de formulation épaissie) ont montré des résultats prometteurs sur le barrage de la centrale Weedon avec un colmatage complet, pour une fissure, une semaine après le traitement qui se maintient durant au moins quatre mois, et un colmatage pour l'autre fissure, complet après une semaine avec un suintement visible quatre mois plus tard. Il est nécessaire d'injecter une quantité suffisante de produit pour permettre une réparation durable, et une injection réalisée à plus haute pression pourrait être intéressante pour atteindre cet objectif.

Lors des traitements des fissures GOU 2005 et GOU 2007 de la maquette VeRCoRs, une injection avec la formulation L11A4C5, proche de la formulation Gmin, suivie d'un badigeonnage de milieu L75 a montré une réduction du débit d'air de 25-30%. Des résultats similaires ont été obtenus avec ces deux fissures, ce qui conforte la validité de ces observations.

Ces premiers essais permettent de conclure que l'injection de formulation épaissie dans des fissures d'ouvrages réels est possible et que cela a un impact positif sur le colmatage des fissures fines et sèches (VeRCoRs) et moyennes et humides (barrage de la centrale de Weedon). L'addition d'un dispositif d'injection utilisable et du système biologique développé lors des phases précédentes permet la mise au point d'un procédé de biocicatrisation utilisable sur des ouvrages réels.

## Chapitre 8 : Conclusion et perspectives

La fissuration du béton a un impact délétère important sur la durabilité des ouvrages. Des solutions de réparation durables existent sur les grosses fissures (mortier fin ou coulis cimentaire) mais les réparations des fissures fines ( $< 200 \mu\text{m}$ ) se font principalement par injection de résine. Toutefois il s'agit d'une solution polluante, coûteuse et peu compatible avec le béton. Une autre méthode alternative repose sur la biocicatrisation, une technique de réparation biologique qui s'appuie sur le colmatage d'une fissure avec un composite formé de carbonate de calcium et de biofilm. Ce composite est non toxique, compatible avec le béton et durable, ce qui accroît la durée de vie de la réparation. De plus, les composés utilisés pour réaliser ces réparations biologiques sont peu coûteux et facilement disponibles.

Certaines études utilisent la biominéralisation du carbonate de calcium et reposent sur une autobiocicatrisation des fissures. Les bactéries et leurs nutriments sont inclus dans le béton lors de sa production en usine. Cette méthode de réparation préventive a toutefois des limites puisque le contact avec la pâte cimentaire, alcaline, réduit la durée de vie des micro-organismes utilisés. De plus, l'ajout de nutriments dans le béton lors de sa fabrication réduit la résistance du béton et par son principe cette technique ne s'applique pas à la réparation des ouvrages préexistants en béton ordinaire. Une autre stratégie, appelée l'exobiocicatrisation, permet la réparation de fissures au sein d'ouvrages en béton. Il s'agit d'un apport de bactéries biominéralisantes et de nutriments dans une fissure après sa formation. Cette stratégie sélectionnée pour ce travail de thèse s'inscrit dans la continuité d'un travail de recherche sur la bioréparation de fissures par biocicatrisation, constitué de deux thèses, réalisées en collaboration entre l'IMT Nord Europe et l'Université de Sherbrooke.

La thèse de J. Ducasse-Lapeyrusse (7) a étudié les mécanismes conduisant à la génération du composite carbonate de calcium–biofilm à partir d'une espèce bactérienne, *Bacillus pseudofirmus*, en respirant du lactate de calcium. Des essais ont été faits par immersion de mortiers fissurés dans une suspension bactérienne mature en conditions de laboratoire. La thèse de I. Feurgard (8) a permis d'améliorer la stratégie de biocicatrisation en mettant au point une formulation rhéofluidifiante, à base de lactate de calcium, de Welan et d'Attagel 50, adaptée à l'injection dans des fissures de 150 à 500  $\mu\text{m}$ .

Cette thèse s'inscrit dans cette démarche et vise à optimiser le procédé de biocicatrisation en augmentant la plage d'ouverture des fissures traitables et d'adapter le bioprocédé aux

contraintes d'usages sur ouvrages réels. Ainsi, le milieu précurseur, l'inoculum microbien et la méthode d'injection ont été perfectionnés pour produire une biocicatrisation plus complète et utilisable dans des conditions environnementales représentatives. Cette démarche comprend trois parties :

- Une première partie rhéologique permettant de lier la composition d'une formulation à une taille de fissure.
- Une deuxième partie microbiologique permettant de mettre au point un consortium de micro-organismes biominéralisants indigènes.
- Une troisième partie permettant de tester le procédé de biocicatrisation développé sur des fissures dans des conditions de laboratoire et sur des ouvrages réels.

### ***Partie 1 : Mise au point de formulations : relation entre leur rhéologie et la taille de la fissure***

Quatre composés utiles pour la biominéralisation du carbonate de calcium sont sélectionnés : le lactate de calcium, utilisé dans la thèse de J. Ducasse-Lapeyrusse (7), l'Attigel 50®, utilisé dans la thèse de de I. Feurgard (8), le BétocarbF® et le gluconate de calcium. Un plan d'expériences a été créé pour lier la concentration de ces quatre composés aux paramètres rhéologiques d'une formulation. En injectant des suspensions de carboxyméthylcellulose (CMC), ayant une viscosité connue, dans des fissures de tailles contrôlées (45, 100, 250, 500 et 1000 µm) il a été possible d'associer des paramètres rhéologiques à des tailles de fissures données. Le couplage de ces informations a permis ensuite de générer des formulations candidates injectables pour différentes tailles de fissures. Cinq formulations sont générées pour des fissures fines, représentatives des fissures de la maquette VeRCoRs.

### ***Partie 2 : Développement d'un consortium biominéralisant adapté à un environnement in situ***

Plusieurs prélèvements *in situ* ont été effectués à proximité ou sur des matériaux cimentaires exposés à un milieu extérieur pendant plusieurs années. Le mélange, constitué des différents prélèvements, a ensuite fait l'objet d'une sélection en fonction de la température (20°C), du pH (9,7) et de l'utilisation de sources carbonées spécifiques (lactate et gluconate de calcium), pour permettre la survie des micro-organismes capables de biominéraliser du carbonate de calcium.



Les micro-organismes ainsi sélectionnés forment un consortium de micro-organismes appelé consortium CBB2020. Par la suite, ce consortium a été mis en culture dans les cinq formulations produites pour être injectables dans des fissures fines, dans le but de sélectionner un système biologique formé d'une formulation (Gmin) et du consortium microbien. Les capacités biominéralisantes du système biologique ont été évaluées en déterminant la quantité de carbonate de calcium biogénérée en conditions de laboratoire.

### ***Partie 3 : Application du procédé de biocicatrisation à différentes échelles***

Le système biologique (Gmin-CBB2020) a dans un premier temps été injecté dans des éprouvettes de mortier fissurées pour valider la possibilité d'injecter ce fluide épaissi dans des fissures de tailles comprises entre 100 et 900  $\mu\text{m}$  et a validé ses capacités de biocicatrisation. Le système biologique biocicatrisant a ensuite été injecté dans deux fissures d'une taille d'environ 400  $\mu\text{m}$  d'une dalle en béton à l'aide d'une procédure d'injection adaptée à des fissures sèches. Ces essais ont permis de valider la faisabilité d'injection dans des fissures réalistes et de montrer l'efficacité du biotraitement conduisant à un colmatage des fissures à hauteur de 99%. Une autre procédure d'injection a été développée pour la réparation de fissures humides. Le procédé de biocicatrisation (système biologique et dispositif d'injection) a par la suite été testé sur deux ouvrages réels comprenant des fissures sèches (maquette VeRCoRs d'EDF, France) et des fissures humides (barrage d'une centrale hydroélectrique d'Hydro-Sherbrooke, Canada).

## **8.1 Mise au point d'une formulation injectable**

### ***Plan d'expériences***

Un plan d'expériences à quatre facteurs a été mis au point pour lier les concentrations massiques des quatre constituants d'une formulation (lactate de calcium, Attagel 50, carbonate de calcium et gluconate de calcium) aux indices de consistance (k) et d'écoulement (n). L'exploitation de ce modèle mathématique a permis de dégager les conclusions suivantes :

- L'augmentation de la concentration de lactate de calcium augmente la viscosité et l'aspect rhéofluidifiant de la formulation.

- L'augmentation de la concentration de carbonate de calcium et d'Attagel augmente la viscosité et diminue l'aspect rhéofluidifiant de la formulation.
- L'augmentation de la concentration de gluconate de calcium diminue la viscosité et diminue l'aspect rhéofluidifiant de la formulation.

Ces résultats montrent que le lactate de calcium est l'agent liant principal. Le carbonate de calcium et l'Attagel sont des agents de charge apportant une structure solide sur laquelle se fait la biominéralisation. Le gluconate de calcium agit comme un agent fluidifiant qui peut réduire la viscosité de la formulation épaissie. On comprend maintenant la fonctionnalité rhéologique de chacun des composés des formulations. De plus, le plan d'expériences est un outil qui, à partir de valeurs de  $k$  et  $n$ , donne la composition d'une formulation. Globalement le plan d'expériences donne de bonnes prévisions de  $n$  et de  $k$ , sauf dans le cas d'une formulation contenant une concentration maximale de lactate de calcium (14%). Le lactate de calcium produit des formulations rhéofluidifiantes, avec des viscosités fortement dépendantes de l'agitation. Par conséquent, dans une formulation fortement concentrée en lactate de calcium, une faible variation d'intensité d'agitation peut exercer une grande influence sur les caractéristiques rhéologiques. Cette sensibilité n'invalide pas les conclusions obtenues dans le plan d'expériences mais il faut toutefois prévoir une marge d'erreur lorsque l'outil prédictif est utilisé pour produire une formulation contenant une concentration en lactate de calcium supérieure à 13%.

### ***Injection dans des fissures d'ouvertures contrôlées***

L'injection de fluide ayant un comportement rhéologique presque linéaire (CMC) dans des fissures d'ouvertures contrôlées (45, 100, 250, 500, 1000  $\mu\text{m}$ ) a permis de déterminer les viscosités minimales et maximales adaptées aux différentes fissures. Ces viscosités, couplées au gradient de cisaillement appliqué lors des injections, permettent de déterminer les valeurs de  $k$  et de  $n$  adaptées à des fissures d'ouvertures données. Ces informations ont été utilisées pour créer un tableau donnant les plages de valeurs de  $k$  permettant l'injection d'une formulation dans des fissures de 45 à 1000  $\mu\text{m}$ , pour des valeurs de  $n$  comprises entre 0,1 à 0,5.

En utilisant l'outil prédictif et les données de ce tableau, une formulation (L13G3A4C15) a été injectée avec succès dans des fissures de tailles comprises entre 250 et 1000  $\mu\text{m}$ , ce qui confirme la validité de la procédure développée pour des fissures d'ouvertures moyennes à larges.

Cette méthodologie a été utilisée pour produire cinq formulations injectables dans des fissures comparables à celle de la maquette VeRCoRs (de l'ordre de 100  $\mu\text{m}$ ). Les formulations Lmax, Amax, Cmax et Gmax contiennent un des quatre composés du plan d'expériences à sa concentration maximale. Cela a permis de déterminer l'impact de chacun de ces composés sur l'inoculum bactérien. Une formulation (Gmin) a été ajoutée pour déterminer l'effet d'une faible concentration de gluconate de calcium sur le potentiel de biominéralisation du carbonate de calcium.

## 8.2 Mise au point d'un consortium microbien indigène

Un des objectifs de cette thèse est d'adapter la biocicatrisation par injection des ouvrages exposés à des conditions environnementales. Un consortium (nommé CBB2020) de micro-organismes naturellement en contact avec des matériaux cimentaires a été développé. Ses paramètres de croissance ont été évalués avec comme référence une bactérie reconnue comme étant biominéralisante, *Bacillus pseudofirmus*. Les essais ont montré qu'à 20°C, l'inoculum CBB2020 a une croissance significative et rapide un pH neutre et alcalin (pH = 9,7 comparable à un béton carbonaté), avec une croissance plus faible à 10°C à ce pH basique. Ce mélange de micro-organismes peut donc se développer sur des surfaces en béton carbonatées d'ouvrages réels. Cependant, le consortium CBB2020 n'est pas adapté à des températures élevées (30°C). Par conséquent, pour des réparations à cette température *B. pseudofirmus* devrait être privilégiée car cette bactérie se développe plus rapidement à 30°C. Le consortium microbien, en présence de lactate de calcium, l'utilise comme source de carbone, d'énergie et de calcium en le consommant totalement en douze jours à 20°C et forme du carbonate de calcium. Un litre de milieu L50 permet la production de 12 g de carbonate de calcium, soit un rendement de production de 75%. Ce carbonate de calcium biogénéré est constitué de cristaux de calcite et de vatérite qui, en s'agglomérant, peuvent atteindre une taille de 400  $\mu\text{m}$ . Le consortium microbien a donc un bon potentiel biominéralisant à 20°C et constitue donc un inoculum adapté aux conditions environnementales d'ouvrages réels.

Le consortium CBB2020 a été mis en culture dans les cinq formulations à 20°C pour évaluer, pour chacun de ces systèmes biologiques, la consommation de lactate de calcium et la production de carbonate de calcium. Les essais ont montré que le consortium se développe dans les cinq formulations, indiquant qu'aucune des concentrations maximales des quatre composés du plan d'expériences n'empêche la croissance des micro-organismes du consortium. De plus,

le consortium CBB2020 est capable de produire du carbonate de calcium biogénéré dans les cinq formulations. Toutefois, la formulation Gmin, en présence du consortium CBB2020, se démarque car il s'agit de la formulation ayant la consommation relative de lactate la plus importante (73%) et produit la plus grande quantité de carbonate de calcium (32 g pour un litre de formulation Gmin).

### **8.3 Evaluation du procédé de biominéralisation développé**

Un système biologique efficace et adapté à une température de 20°C a été développé en combinant la formulation Gmin et le consortium CBB2020. Avant de le tester sur des ouvrages réels, il était nécessaire de déterminer s'il peut être injecté dans des fissures représentatives, s'il peut colmater une fissure d'ouvertures réalistes et déterminer la nature des matériaux de colmatage produits.

Le système biologique (Gmin-CBB2020) a été injecté dans des fissures au sein d'éprouvettes de mortier dont l'ouverture est comprise entre 100 et 900  $\mu\text{m}$ . Toutes les injections ont été réalisées, ce qui confirme la faisabilité d'injecter cette formulation inoculée dans des fissures réelles. Une injection unique a permis de réduire l'ouverture apparente des fissures fines (de l'ordre de 100  $\mu\text{m}$ ) de 90%, des fissures moyennes (250 à 450  $\mu\text{m}$ ) de 77% et des fissures larges (de l'ordre de 900  $\mu\text{m}$ ) de 33%, dans des conditions de laboratoire (20°C, 100% HR). Ces résultats démontrent qu'une seule injection conduit à colmater à 90% une fissure de l'ordre de 100  $\mu\text{m}$ . Un badigeonnage final pourrait permettre un apport supplémentaire de matière pour se rapprocher d'un colmatage complet. L'ouverture apparente de la fissure moyenne traitée par une injection unique passe de 450  $\mu\text{m}$  à 100  $\mu\text{m}$ , ce qui suggère qu'une deuxième injection pourrait apporter le matériel nécessaire au colmatage de la fissure. En revanche, le faible colmatage des fissures larges (de l'ordre de 900  $\mu\text{m}$ ) suggère qu'il serait nécessaire de répéter plusieurs fois l'injection pour atteindre un colmatage complet. Dans ces conditions, il faudrait analyser dans quelle mesure ce traitement répété peut être considéré comme technologiquement et économiquement réaliste. Une autre solution serait de développer une formulation plus adaptée, contenant plus de matière solide et plus visqueuse. Le système biologique permet donc un traitement de fissures fines, et suggèrent que le traitement des fissures moyennes (450  $\mu\text{m}$ ) devrait comprendre deux injections suivies d'un badigeonnage pour conduire à un colmatage complet.

Le traitement de fissures moyennes par deux injections et un badigeonnage a été testé pour la réparation des deux fissures de 400  $\mu\text{m}$  présente au sein d'une dalle en béton. La technique d'injection utilisée (collage des têtes d'injection avec de la résine époxy suivie d'une étanchéisation des fissures avec du scotch) est adaptée à des injections de fissures sèches d'ouvrage réel. Après deux injections et un badigeonnage avec le système Gmin-CBB2020, les deux fissures ont une réduction de leur perméabilité à l'eau de 99%. Les observations au MEB de l'intérieur des fissures ont démontré que le colmatage de la fissure est associé à la présence d'un composite formé de carbonate de calcium biogénéré et de biofilm.

Deux types de fissures (fines et moyennes) ont été injectées dans des ouvrages réels : la maquette VeRCoRs (de l'ordre de 100  $\mu\text{m}$ ) et le barrage de la centrale hydroélectrique de Weedon ( $\approx$  400  $\mu\text{m}$ ). L'état d'humidité des fissures de ces deux ouvrages diffère, ce qui a nécessité deux systèmes d'injection. Pour les fissures sèches de la maquette VeRCoRs, le système d'injection est le même que celui utilisé sur la dalle en béton. Pour les fissures humides du barrage de la centrale hydroélectrique de Weedon, le système d'injection est constitué de canules d'injection insérées dans des forages réalisés le long du trajet de la fissure. Ce système est plus efficace et plus simple car il ne nécessite pas d'attendre la polymérisation de la résine époxy, il s'adapte à toutes les surfaces (humides ou sèches) et il permet d'appliquer une pression d'injection bien plus importante que dans le cas d'un système collé. Il n'a toutefois pas pu être utilisé sur la maquette VeRCoRs du fait de l'impossibilité de réaliser des forages dans le béton instrumentalisé de l'enceinte intérieure.

Dans le cas des essais sur le barrage de la centrale hydroélectrique de Weedon, le système biologique (Gmin-CBB2020) a montré des résultats prometteurs puisqu'il n'y a pas eu de ruissellement d'eau à travers les deux fissures une semaine après le traitement. Cette absence de ruissellement d'eau se maintient durant au moins quatre mois pour l'une des fissures. Dans le cas de l'autre fissure, pour laquelle l'injection a été plus difficile en raison d'une plus faible ouverture, le colmatage est observé une semaine après le traitement mais il n'est pas durable à moyen terme (quatre mois). Cette faible performance locale pourrait résulter d'une altération du matériel de réparation présent en trop faible quantité ou d'une variation de la hauteur d'eau en amont du barrage. Pour améliorer la performance du biotraitement, des modifications de la procédure pourraient être envisagées :

- Varier la profondeur ou l'angle de forage pour faciliter l'entrée de la formulation dans les fissures.

- Augmenter la pression d'injection en utilisant une pompe électrique à haute pression.
- Développer une formulation plus fluide (une dilution d'une formulation épaissie avec du milieu liquide inoculé) pour les zones où l'injection est plus difficile.

Les essais réalisés à Weedon ont aussi montré la simplicité de la méthode de réparation. La formulation est constituée d'un sachet de poudre à mélanger, au chantier, dans un litre d'eau et d'un tube contenant l'inoculum à ajouter au mélange. La procédure d'injection de cette formulation est similaire à celle d'une réparation classique par injection (résine époxy ou polyuréthane).

Le système biologique Gmin-CBB2020 n'a pas pu être utilisé pour biotraitier la maquette VeRCoRs puisqu'à la fin de son développement (campagne VERCORs d'octobre 2021), les fissures traitées n'étaient plus injectables. Cependant, deux fissures GOU 2005 et GOU 2007 ont été injectées avec le système biologique L11A4C5-*B. pseudofirmus* et la fissure GOU 3007 a été injectée avec un système biologique Gmin-*B. pseudofirmus*. Seul l'efficacité du biotraitement des fissures GOU 2005 et GOU 2007 a pu être évaluée par des mesures du débit de fuite lors d'une mise épreuve de sous pression de la maquette VeRCoRs. Ces deux fissures sont de tailles comparables et sont dans la même zone de la maquette (zone GOU). Trois injections de milieu liquide inoculé suivi d'une injection de formulation épaissie inoculée et d'un badigeonnage de milieu liquide inoculé ont permis de réduire le débit de fuite de 25 et 30% pour les fissures GOU 2005 et GOU 2007 respectivement.

Globalement, ces biotraitements, réalisés sur des fissures d'ouvrages réels et sur les fissures de la dalle en béton, permettent de montrer que le procédé de biominéralisation Gmin-CBB2020-système d'injection est applicable à des ouvrages réels, simple d'utilisation sur un chantier et efficace. De plus, il peut être spécifiquement adapté en fonction de l'ouverture de la fissure.

## 8.4 Perspectives

Le procédé de biominéralisation Gmin-CBB2020-système d'injection est basé sur l'utilisation d'une formulation adaptée aux fissures fines de l'ordre de 100  $\mu\text{m}$ . Des essais de biocicatrisation menés en laboratoire ont montré que cette formulation est aussi utilisable pour la réparation de fissures moyennes de 450  $\mu\text{m}$  mais elles nécessitent des injections supplémentaires pour obtenir un colmatage complet des fissures. Il serait donc intéressant de sélectionner une formulation plus visqueuse pour colmater totalement la fissure avec une seule

injection et un badigeonnage, limitant ainsi le temps d'intervention. Pour les fissures larges (de l'ordre de 1000  $\mu\text{m}$ ), le développement d'une formulation plus épaisse est nécessaire car la formulation Gmin ne permet pas de réaliser un colmatage significatif de la fissure avec un nombre de traitements réaliste.

Un autre point d'amélioration consisterait à utiliser un système d'injection composé d'une pompe raccordée aux canules d'injection forrées afin de gagner en efficacité d'injection, surtout si toutes les canules sont raccordées à la pompe. La pompe permettrait également d'exercer une pression d'injection plus élevée, facilitant ainsi l'entrée du fluide dans les fissures.

La mise au point du consortium microbien a permis de montrer que des micro-organismes biominéralisants du carbonate de calcium par conversion de composés organiques (lactate de calcium) vivent à la surface de matériaux cimentaires dans des conditions de croissance favorables. Différents points pourraient être explorés :

- Cette méthodologie pourrait être utilisée pour développer un consortium spécifique à l'ouvrage à réparer en utilisant les micro-organismes vivants à sa surface.
- Il serait intéressant d'identifier les micro-organismes présents dans le consortium CBB2020. Cela permettrait de mieux comprendre les métabolismes permettant la biominéralisation du carbonate de calcium avec ce consortium.
- Il serait intéressant de comparer les performances du consortium CBB2020 face à d'autres consortia biominéralisants issus d'environnements différents. Il serait ainsi possible d'améliorer le rendement de production de carbonate de calcium à partir de lactate de calcium.
- Il serait intéressant d'ajouter un facteur de sélection pour la mise au point des consortia : le fonctionnement des micro-organismes en absence de dioxygène. Prévoir un consortium pouvant se développer indépendamment du dioxygène améliorerait les réparations de fissures en profondeur.
- Il serait intéressant de développer un consortium optimisé pour une température de 10°C, et un autre pour 30°C permettrait d'élargir encore le champ d'application de la biocicatrisation d'ouvrages réels.

## Annexes

### Annexe 1 : Formulations utilisées pour le plan d'expériences à quatre facteurs

L = lactate de calcium  
 C = carbonate de calcium  
 A = Attagel 50  
 G = Gluconate de calcium

Tableau IX.1 : Formulations utilisées pour le plan d'expériences à quatre facteurs.

Nom formulation	Lac (g)	Carb (g)	Attagel (g)	Gluconate (g)	Extrait de lev (g)
L11 A2 C1 G1	13,0	1,2	2,4	1,2	0,35
L11 A4 C1 G1	13,3	1,2	4,8	1,2	0,36
L14 A2 C1 G1	15,7	1,2	2,4	1,2	0,36
L14 A4 C1 G1	16,0	1,2	4,9	1,2	0,37
L11 A2 C15 G1	15,5	21,1	2,8	1,4	0,42
L11 A4 C15 G1	15,9	21,7	5,8	1,4	0,43
L14 A2 C15 G1	20,6	22,1	2,9	1,5	0,44
L14 A4 C15 G1	21,2	22,7	6,1	1,5	0,45
L11 A2 C1 G5	13,6	1,2	2,5	6,2	0,37
L11 A4 C1 G5	13,9	1,3	5,1	6,3	0,38
L14 A2 C1 G5	17,9	1,3	2,6	6,4	0,38
L14 A4 C1 G5	18,4	1,3	5,3	6,6	0,39
L11 A2 C15 G5	16,4	22,4	3,0	7,5	0,45
L11 A4 C15 G5	16,9	23,1	6,2	7,7	0,46
L14 A2 C15 G5	21,9	23,4	3,1	7,8	0,47
L14 A4 C15 G5	22,6	24,2	6,5	8,1	0,48
L12,5 A3 C8 G3 (1)	17,0	10,9	4,1	4,1	0,41
L12,5 A3 C8 G3 (2)	17,0	10,9	4,1	4,1	0,41
L12,5 A3 C8 G3 (3)	17,0	10,9	4,1	4,1	0,41

Pour 100 mL d'eau :



## Annexe 2 : Evaluation des coefficients liant la réponse k aux quatre facteurs

Il existe deux grands types d'erreurs, l'erreur expérimentale et le manque d'ajustement. La somme de ces deux types d'erreurs est l'écart ( $e$ ). La variance des écarts  $V(e)$  permet de calculer la variance des coefficients  $V(a_i)$ . Celle-ci donne l'écart type des coefficients  $e(a_i)$ , l'étalon recherché.

$$V(a_i) = K * V(e)$$

Dans le cas d'un plan d'expériences avec un usage strict des niveaux +1 et -1 et avec un modèle polynomial, K est simple à déterminer, il s'agit de  $1/n$  ( $n$ = nombre d'essais). Cela donne :

$$V(a_i) = V(e) / n$$

Cette variance des écarts s'obtient grâce à l'analyse de la variance. Si la méthode de résolution du modèle utilise la méthode des moindres carrés, ce qui est le cas pour ce plan d'expériences à trois facteurs, les réponses mesurées s'écrivent  $y_i$ , les réponses calculées s'écrivent  $(\widehat{y}_i)$  et les écarts s'appellent les résidus ( $r_i$ ).

$$y_i = \widehat{y}_i + r_i.$$

On n'utilise pas ces valeurs directement, on utilise leurs carrés moyens. Il s'agit de la somme des écarts à la moyenne divisée par le degré de liberté. Etant donné que les résidus sont le nom donné aux écarts lorsque l'on utilise la technique de résolution des moindres carrés, la somme des  $r_i$  au carré est la plus faible valeur de la somme des carrés des écarts. Si on divise cela par le degré de liberté cela donne leur variance. Donc la variance des résidus est égale à la plus petite variance des écarts,  $V(e)$ .

$$V(r_i) = V(e)$$

La variance des résidus peut être calculée mais elle est fournie par le logiciel :  $V(r_i) = 0,0015$ .

$$V(a_i) = V(r_i) / n$$

$$V(a_i) = 0,0015 / 19 = 7,89 * 10^{-5}$$

$$e(a_i) = \sqrt{V(a_i)} = 0,009$$

L'étalon pour déterminer si un facteur est significatif ou non est l'écart type des coefficients,  $e(a_i)$ . Ici il est de 0,009. Si la valeur absolue du coefficient est strictement supérieure à l'étalon alors il est significatif. Si elle est strictement inférieure alors le coefficient est négligeable. Si l'étalon est proche du coefficient, deux à trois fois l'étalon, alors il s'agit d'une situation intermédiaire qu'il faut évaluer autrement. Cette valeur étalon est comparée avec les coefficients dans le tableau IX.2.

Tableau IX.2 : Comparaison des coefficients et de l'étalon pour le plan à quatre facteurs liés à la réponse  $k$ .

Source	Valeur absolue du coefficient	Etalon	Importance
A-Lac	0,557	0,009	Significatif
B-Att	0,328	0,009	Significatif
C-Carb	0,493	0,009	Significatif
D-Glu	0,207	0,009	Significatif
AB	0,031	0,009	Significatif
AC	0,116	0,009	Significatif
AD	0,075	0,009	Significatif
BC	0,002	0,009	Non significatif
BD	0,022	0,009	Intermédiaire
CD	0,020	0,009	Intermédiaire
ABC	0,013	0,009	Intermédiaire
ABD	0,039	0,009	Significatif
ACD	0,004	0,009	Non significatif
BCD	0,004	0,009	Non significatif
ABCD	0,020	0,009	Intermédiaire

Cette approche qualitative ne permet pas de trancher dans quatre cas. Pour choisir, il faut utiliser une autre approche, quantitative, qui utilise le F de Fisher. Plus le F de Fisher est élevé et plus les variations observées sont dues au facteur. Cette valeur est intéressante isolément mais elle sert aussi à calculer les  $p$ -values de chaque coefficient. Ce sont ses  $p$ -values qui permettent de déterminer si un coefficient est significatif (tableau IX.3).

Tableau IX.3 : Analyse de variance complète du modèle ajusté pour le plan à quatre facteurs liés à la réponse  $k$ .

Source	Somme des carrés	Ddl	Carrés moyens	F de Fisher	$p$ -value	
Model	11,63	15	0,7752	506,37	0,0001	Significatif
A-Lac	4,96		4,96	3238,40	< 0.0001	Significatif
B-Att	1,72		1,72	1125,30	< 0.0001	Significatif
C-Carb	3,9		3,9	2544,80	< 0.0001	Significatif
D-Glu	0,6836		0,6836	446,54	0,0002	Significatif
AB	0,015		0,015	9,81	0,052	Significatif
AC	0,2157		0,2157	140,92	0,0013	Significatif
AD	0,089		0,089	58,17	0,0047	Significatif
BC	0,0001	1	0,0001	0,04	0,8602	Non significatif
BD	0,0076		0,0076	4,99	0,1115	Non significatif
CD	0,0065		0,0065	4,22	0,1322	Non significatif
ABC	0,0027		0,0027	1,75	0,2781	Non significatif
ABD	0,0244		0,0244	15,92	0,0282	Significatif
ACD	0,0003		0,0003	0,17	0,7071	Non significatif
BCD	0,0003		0,0003	0,17	0,7097	Non significatif
ABCD	0,0066		0,0066	4,31	0,1294	Non significatif
Résidus	0,0046	3	0,0015			

Cette deuxième approche montre que les interactions BC, BD, CD, ABC, ACD, BCD et ABCD ne sont pas significatives. Elles peuvent donc être supprimées du modèle. Le tableau IX.4 présente l'analyse de variance du plan d'expériences ajusté sans les coefficients négligeables.

Tableau IX.4 : Analyse de variance des coefficients significatifs du modèle ajusté pour le plan à quatre facteurs liés à la réponse  $k$ .

Source	Somme des carrés	Ddl	Carrés moyens	F de Fisher	p-value
Model	11,6	8	1,45	508,06	< 0.0001
A-Lac	4,96		4,96	1736,49	< 0.0001
B-Att	1,72		1,72	603,41	< 0.0001
C-Carb	3,9		3,9	1364,57	< 0.0001
D-Glu	0,6836	1	0,6836	239,44	< 0.0001
AB	0,015		0,015	5,26	0,0448
AC	0,2157		0,2157	75,56	< 0.0001
AD	0,089		0,089	31,19	0,0002
ABD	0,0244		0,0244	8,54	0,0152
Résidus	0,0285	10	0,0029		

Toutes ces modifications permettent de fixer l'équation utilisée pour ce plan d'expériences, en coordonnées codées. Cela donne :

$$k = e^{2,660+0,557*Lac+0,328*Att+0,493*Carb-0,207*Glu-0,031*Lac*Att+0,116*Lac*Carb+0,075*Lac*Glu+0,039*Lac*Att*Glu} - 2$$

### Annexe 3 : Evaluation des coefficients liant la réponse n aux quatre facteurs

La variance des résidus fournie par le logiciel est :  $V(ri) = 19877,39$ .

$$V(a_i) = 19877,39 / 19 = 1046,18 \quad e(a_i) = \sqrt{V(a_i)} = 32,3$$

L'étalon pour déterminer si un facteur est significatif ou non est 32,3. Si la valeur absolue du coefficient est largement supérieure à l'étalon alors il est significatif. Cette valeur étalon est comparée avec les coefficients dans le tableau IX.5.

Tableau IX.5 : Comparaison des coefficients et de l'étalon pour le plan à quatre facteurs liés à la réponse n.

Source	Valeur absolue du coefficient	Etalon	Importance
A-Lac	303,71	32,3	Significatif
B-Att	286,42	32,3	Significatif
C-Carb	793,43	32,3	Significatif
D-Glu	728,78	32,3	Significatif
AB	393,7	32,3	Significatif
AC	485,79	32,3	Significatif
AD	1,31	32,3	Non significatif
BC	87,83	32,3	Intermédiaire
BD	206,79	32,3	Significatif
CD	579,49	32,3	Significatif
ABC	511,96	32,3	Significatif
ABD	332,67	32,3	Significatif
ACD	85,73	32,3	Intermédiaire
BCD	82,85	32,3	Intermédiaire
ABCD	402,63	32,3	Significatif

Certaines valeurs sont trop proches de la valeur étalon pour pouvoir trancher uniquement sur cette base. Il est nécessaire d'utiliser la *p-value* pour décider. Pour l'approche quantitative, l'ensemble des informations est résumé dans le tableau IX.6.

Cette deuxième approche montre que l'interaction AD n'est pas significative. Le tableau suivant présente l'analyse de variance du plan d'expériences ajusté sans les coefficients négligeables (tableau IX.7).

Toutes ces modifications permettent de fixer l'équation utilisée pour ce plan d'expériences, en coordonnées codées :

$$n = \frac{1}{1427 + 304 * Lac - 286 * Att - 793 * Carb - 729 * Glu - 394 * Lac * Att - 486 * Lac * Carb + 88 * Att * Carb + 207 * Att * Glu + 579 * Carb * Glu + 512 * Lac * Att * Carb + 333 * Lac * Att * Glu + 86 * Lac * Carb * Glu - 83 * Att * Carb * Glu - 403 * Lac * Att * Carb * Glu} + 0,04$$

Tableau IX.6 : Analyse de variance complète du modèle ajusté pour le plan à quatre facteurs liés à la réponse *n*.

Source	Somme des carrés	Ddl	Carrés moyens	F de Fisher	<i>p</i> -value	
Model	4,26 *10 <sup>7</sup>	15	2,84 *10 <sup>6</sup>	142,81	0,0008	Significatif
A-Lac	1,48 *10 <sup>6</sup>		1,48 *10 <sup>6</sup>	74,25	0,0033	Significatif
B-Att	1,31 *10 <sup>6</sup>		1,31 *10 <sup>6</sup>	66,03	0,0039	Significatif
C-Carb	1,01E *10 <sup>7</sup>		1,01 *10 <sup>7</sup>	506,73	0,0002	Significatif
D-Glu	8,50 *10 <sup>6</sup>		8,50 *10 <sup>6</sup>	427,52	0,0002	Significatif
AB	2,48 *10 <sup>6</sup>		2,48 *10 <sup>6</sup>	124,76	0,0015	Significatif
AC	3,78 *10 <sup>6</sup>		3,78 *10 <sup>6</sup>	189,96	0,0008	Significatif
AD	27,3		27,3	0,0014	0,9728	Non significatif
BC	1,23 *10 <sup>5</sup>	1	1,23 *10 <sup>5</sup>	6,21	0,0883	Significatif
BD	6,84 *10 <sup>5</sup>		6,84 *10 <sup>5</sup>	34,42	0,0099	Significatif
CD	5,37 *10 <sup>6</sup>		5,37 *10 <sup>6</sup>	270,31	0,0005	Significatif
ABC	4,19 *10 <sup>6</sup>		4,19 *10 <sup>6</sup>	210,98	0,0007	Significatif
ABD	1,77 *10 <sup>6</sup>		1,77 *10 <sup>6</sup>	89,08	0,0025	Significatif
ACD	1,18 *10 <sup>5</sup>		1,18 *10 <sup>5</sup>	5,92	0,0931	Significatif
BCD	1,10 *10 <sup>5</sup>		1,10 *10 <sup>5</sup>	5,53	0,1002	Significatif
ABCD	2,59 *10 <sup>6</sup>		2,59 *10 <sup>6</sup>	130,49	0,0014	Significatif
Résidus	59632,17	3	19877,39			

Tableau IX.7 : Analyse de variance complète du modèle ajusté pour le plan à quatre facteurs liés à la réponse *n*.

Source	Somme des carrés	Ddl	Carrés moyens	F de Fisher	<i>p</i> -value	
Model	4,26 *10 <sup>7</sup>	14	3,04 *10 <sup>6</sup>	203,92	< 0.0001	
A-Lac	1,48 *10 <sup>6</sup>		1,48 *10 <sup>6</sup>	98,95	0,0006	
B-Att	1,31 *10 <sup>6</sup>		1,31 *10 <sup>6</sup>	88,01	0,0007	
C-Carb	1,01E *10 <sup>7</sup>		1,01 *10 <sup>7</sup>	675,34	< 0.0001	
D-Glu	8,50 *10 <sup>6</sup>		8,50 *10 <sup>6</sup>	569,76	< 0.0001	
AB	2,48 *10 <sup>6</sup>		2,48 *10 <sup>6</sup>	166,28	0,0002	
AC	3,78 *10 <sup>6</sup>		3,78 *10 <sup>6</sup>	253,17	< 0.0001	
BC	1,23 *10 <sup>5</sup>	1	1,23 *10 <sup>5</sup>	8,27	0,0452	Significatif
BD	6,84 *10 <sup>5</sup>		6,84 *10 <sup>5</sup>	45,87	0,0025	
CD	5,37 *10 <sup>6</sup>		5,37 *10 <sup>6</sup>	360,25	< 0.0001	
ABC	4,19 *10 <sup>6</sup>		4,19 *10 <sup>6</sup>	281,18	< 0.0001	
ABD	1,77 *10 <sup>6</sup>		1,77 *10 <sup>6</sup>	118,72	0,0004	
ACD	1,18 *10 <sup>5</sup>		1,18 *10 <sup>5</sup>	7,88	0,0484	
BCD	1,10 *10 <sup>5</sup>		1,10 *10 <sup>5</sup>	7,36	0,0533	
ABCD	2,59 *10 <sup>6</sup>		2,59 *10 <sup>6</sup>	173,9	0,0002	
Résidus	59632,17	4	14914,87			

## Annexe 4 : CMC, viscosité en fonction du gradient de cisaillement en échelles logarithmiques

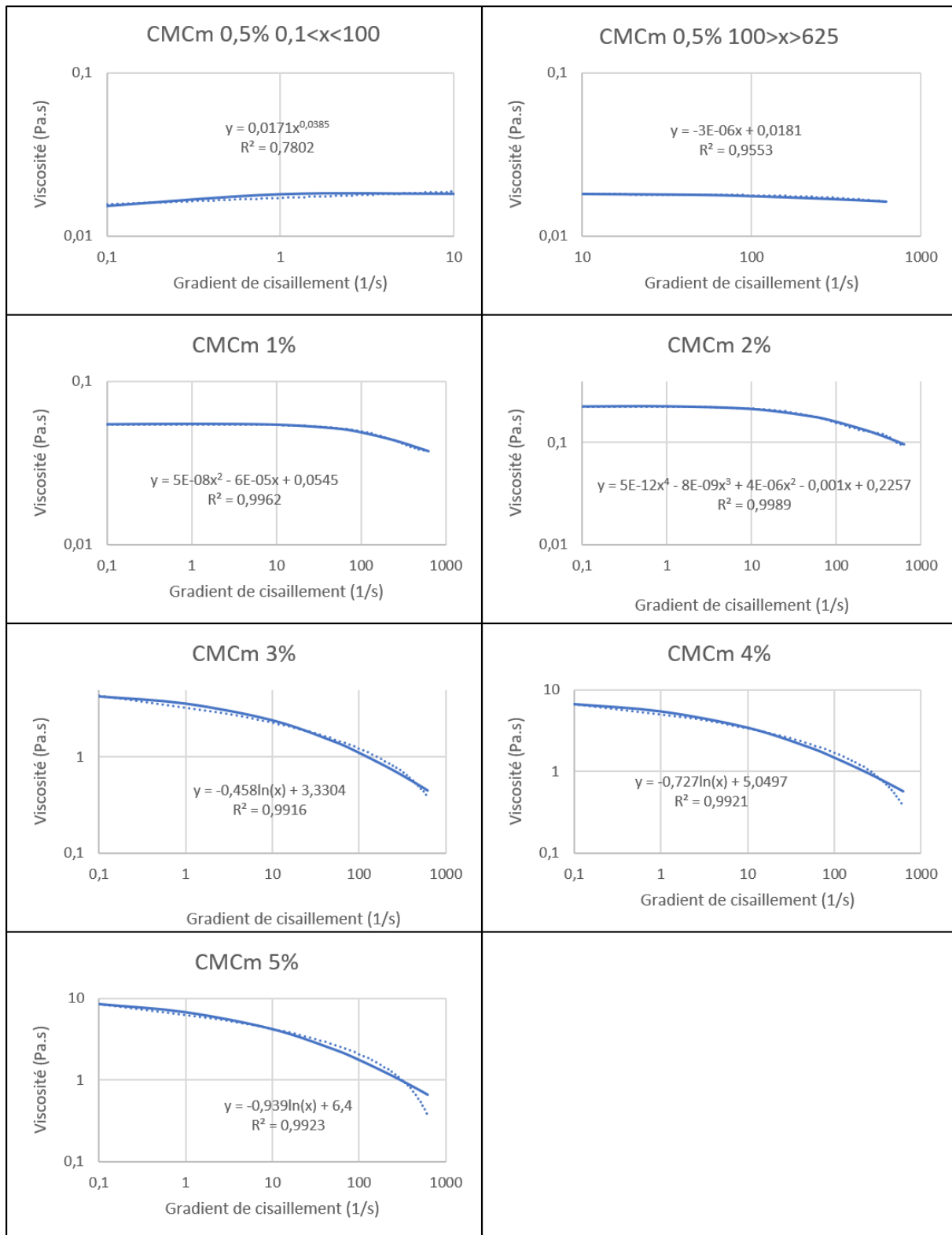


Figure IX.1 : CMC, viscosité en fonction du gradient de cisaillement en échelles logarithmiques.

## Annexe 5 : Calcul de l'incertitude de mesure du carbonate de calcium produit par CBB2020 dans les cinq formulations

La perte de masse du lactate de calcium entre 550 et 900°C est de 32% au four. Cela signifie que la surestimation maximale du carbonate de calcium total présent dans les culots de culture est égale à 32% de la masse de lactate présente dans le troisième surnageant. Les volumes finaux ne sont plus tous de 100 mL, il y a eu de l'évaporation lors des essais, cela a été pris en compte dans le calcul des quantités de lactates. Les quantités de lactate retirées dans chaque surnageant et les estimations de l'incertitude dans la quantification du carbonate de calcium total sont présentées dans le tableau IX.8.

Tableau IX.8 : Masse de lactate présente dans chaque surnageant et évaluation de la surestimation maximale de la production de carbonate de calcium.

	Masse de lactate (g)			Masse maximale moyenne pouvant être dégradée entre 550 et 900°C (g) = surestimation
	1 <sup>er</sup> surnageant	2 <sup>ème</sup> surnageant	3 <sup>ème</sup> surnageant	
Lmax 1	2,7	3,4	1,6	
Lmax 2	2,9	3,4	1,4	0,5
Amax 1	3,0	2,1	1,1	
Amax 2	2,7	2,3	0,8	0,3
Cmax 1	2,7	2,8	1,5	
Cmax 2	2,1	3,2	0,8	0,4
Gmax 1	2,7	3,7	0,7	
Gmax 2	2,8	3,5	0,8	0,2
Gmin 1	3,2	0,5	0,2	
Gmin 2	3,0	0,6	0,1	0,0

## Annexe 6 : Analyses du Bétocarb F®

### Betocarb® F - SA

Usine de Production :	Saint Armand, QC/Canada		
Brève Description du Produit :	Carbonate de calcium fin broyé à sec possédant d'excellentes propriétés de dispersion.		
Analyse Chimique de la Matière Première:	Carbonate de Calcium, pourcent		93
	Carbonate de Magnésium, pourcent		1.5
Propriétés Typiques:	Résiduel sur Tamis 325 mesh, pourcent		0.003
	Perte d'humidité à 110°C, pourcent		0.07
	Gravité Spécifique		2.71
	Densité Libre	0.48 g/cc	30 lbs./pi³
	Densité Compactée	1.05 g/cc	66 lbs./pi³
Caractéristiques Générales du Produit :	Blaine, m³/kg		1100

#### Applications:

Charge minérale idéale pour les mélanges de béton prêts à l'emploi, autoplaçants et préfabriqués, ainsi que les pavés, briques et mortiers.

#### Avantages:

Réduit la quantité de matériaux liants nécessaires dans les applications de ciment et béton : ciment, cendres volantes et laitiers de haut fourneau. Améliore l'hydratation, la résistance aux jeunes âges, et la finition de surface sans perte de résistance en compression.

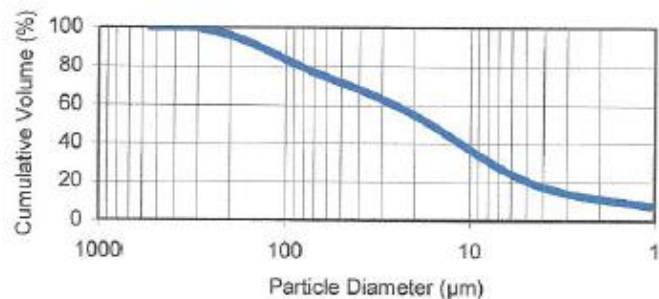


Figure IX.2 : Fiche technique du Bétocarb F®



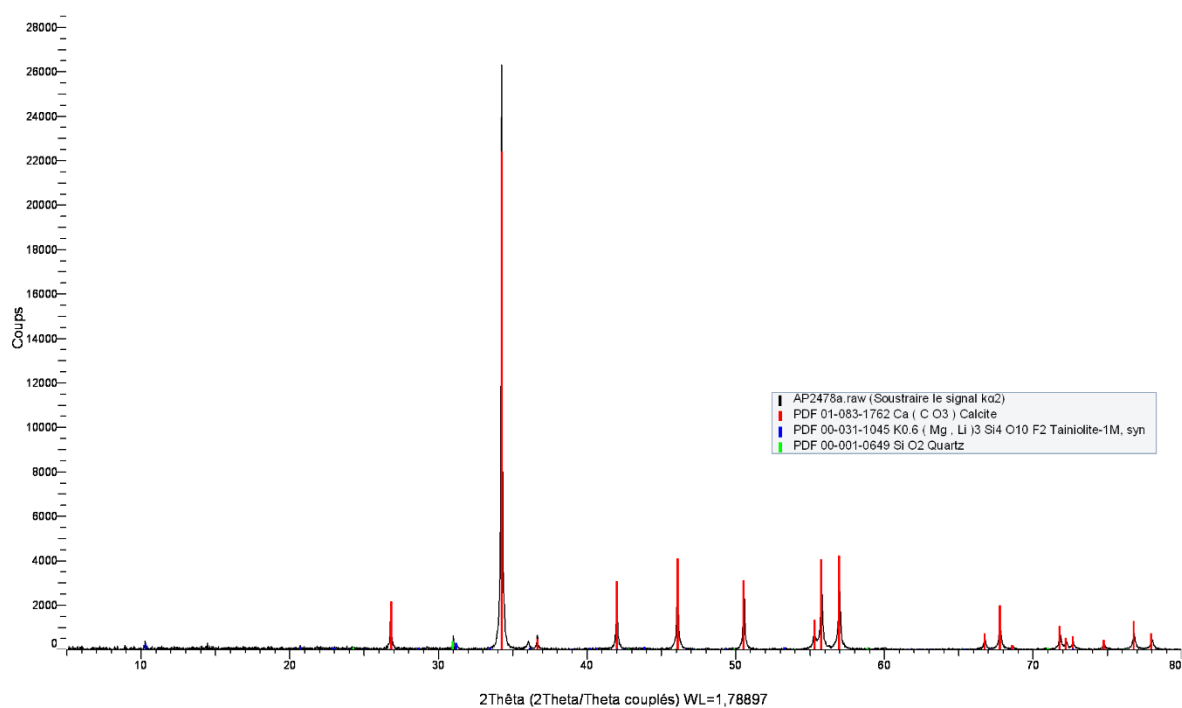


Figure IX.3 : Analyse DRX du Bétovarb F®.

Tableau IX.9 : Analyse du BétoCarbF® à la spectrométrie de fluorescence X.

Formule du composé	Concentrations
C	Déecté
O	52,0
Na	Traces (< 0,1%)
Mg	0,6
Al	0,6
Si	1,3
S	0,0
K	0,3
Ca	44,8
Ti	Traces
Fe	0,2
Total	99,9

## Annexe 7 : Planning d'humidification des zones biotraitées suite au traitement de la maquette VeRCoRs de février 2020

Tableau IX.10 : Planning d'humidification des zones biotraitées (VeRCoRs).

Janvier	28	Lancement pré-culture	
	29	Lancement culture bactérienne	
Février	5	Préparation des zones d'injection (fixation têtes,..) - 1ère application au pinceau de la suspension bactérienne (FUT2014, zone fuyarde)	
	6	Injections sur zones GOU2005 et GOU2007 - 2ème application au pinceau de la suspension bactérienne (FUT2014, zone fuyarde)	
	7	Aspersion d'eau sur le papier absorbant si sec	
	10	Aspersion d'eau sur le béton	
	11	Aspersion du milieu LN50 sur le béton + absorption d'eau du papier	
	13	Aspersion d'eau sur le béton + absorption d'eau du papier absorbant	
	14	Aspersion d'eau sur le béton + absorption d'eau du papier absorbant	
	17	Aspersion d'eau sur le béton + absorption d'eau du papier absorbant	
	18	Aspersion d'eau sur le béton + absorption d'eau du papier absorbant	
	19	Aspersion du milieu LN50 sur le béton + absorption d'eau du papier	
	20	Aspersion d'eau sur le papier absorbant	
	21	Aspersion d'eau sur le béton + absorption d'eau du papier absorbant	
	22	Aspersion d'eau sur le béton + absorption d'eau du papier absorbant	
	24	Aspersion d'eau sur le béton + absorption d'eau du papier absorbant	
	25	Aspersion d'eau sur le papier absorbant	
	26	Aspersion du milieu LN50 sur le béton + absorption d'eau du papier	
	27	Aspersion d'eau sur le papier absorbant	
	28	Aspersion d'eau sur le béton + absorption d'eau du papier absorbant	
	mars	2	Aspersion d'eau sur le béton + absorption d'eau du papier absorbant
		3	Aspersion d'eau sur le papier absorbant
4		Aspersion du milieu LN50 sur le béton + absorption d'eau du papier	
5		Aspersion d'eau sur le papier absorbant	
6		Aspersion d'eau sur le béton + absorption d'eau du papier absorbant	
9		Aspersion d'eau sur le béton + absorption d'eau du papier absorbant	

## Annexe 8 : Capteurs de température placés sur les zones traitées de la campagne de février 2020 sur la maquette VeRCoRs

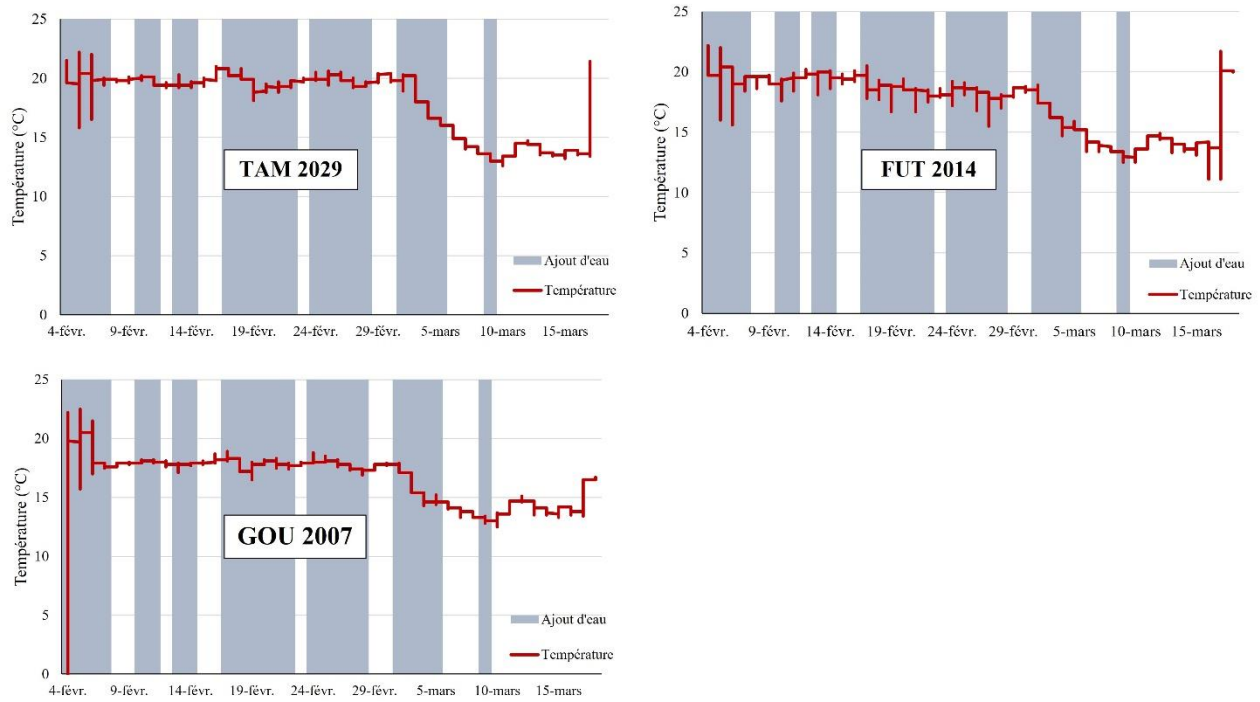


Figure IX.4 : Capteurs de température placés sur les zones traitées de la campagne de février 2020 sur la maquette VeRCoRs.

## Annexe 9 : Calcul du coût de production d'un litre de formulation Gmin

Tableau IX.11 : Coût de production d'un litre de formulation Gmin.

	Lactate	Attagel	Carbonate	Gluconate	Extrait de levure
Prix au kg (\$)	32,72	4,00	0,12	32,00	75,00
Masse pour 1 L (g)	143	26	93	13	4
Prix pour 1 L (\$)	4,68	0,10	0,01	0,42	0,30
Prix total pour 1 L (\$)	5,5 (environ 3 euros)				

Prix en dollars canadien.

## Références bibliographiques

1. Grengg, C. *et al.* (2018) Advances in concrete materials for sewer systems affected by microbial induced concrete corrosion: A review. *Water Research* **134** : 341–352.
2. Issa, C. A. & Debs, P. (2007) Experimental study of epoxy repairing of cracks in concrete. *Construction and Building Materials* **21** : 157–163.
3. Grassie, N. & Tennent, N. H. (1985) Degradation of Epoxy Polymers: 3 Photodegradation of BisphenoI-A Diglycidyl Ether. *Polymer Degradation and Stability* **13** : 249–259.
4. Ribeiro, M. C. S., Reis, J. M. L., Ferreira, A. J. M. & Marques, A. T. (2003) Thermal expansion of epoxy and polyester polymer mortars—plain mortars and fibre-reinforced mortars. *Polymer Testing* **22** : 849–857.
5. Kumar, M., Sundaram, S., Gnansounou, E., Larroche, C. & Thakur, I. S. (2018) Carbon dioxide capture, storage and production of biofuel and biomaterials by bacteria: A review. *Bioresource Technology* **247** : 1059–1068.
6. Benhelal, E., Zahedi, G., Shamsaei, E. & Bahadori, A. (2013) Global strategies and potentials to curb CO<sub>2</sub> emissions in cement industry. *Journal of Cleaner Production* **51** : 142–161.
7. Ducasse Lapeyrusse, J. (Université de Sherbrooke et Université de Lille, 2014). Étude du potentiel d'autocicatrisation et de biocicatrisation de matériaux cimentaires fissurés.
8. Feurgard, I. (Université de Sherbrooke et Université de Lille, 2017). Développement d'une méthode de réparation des matériaux cimentaires fissurés par biocicatrisation.
9. Olivier, M. K. (Université de Sherbrooke, 2016). Etude expérimentale et modélisation de l'auto- cicatrisation des matériaux cimentaires avec additions minérales.
10. Kaur, N., M., S. & Mukherjee, A. (InTech, 2012). Biofilm and Microbial Applications in Biomineralized Concrete. in *Advanced Topics in Biomineralization* (ed. Seto, J.) chap. 7.
11. Perito, B. (2014) A *Bacillus subtilis* cell fraction (BCF) inducing calcium carbonate precipitation: Biotechnological perspectives for monumental stone reinforcement. *Journal of Cultural Heritage* **15** : 345–351.
12. Anbu, P., Kang, C.-H., Shin, Y.-J. & So, J.-S. (2016) Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. *SpringerPlus* **5** : 1–26.
13. Pепенar, I., Group, I. & Centre, R. (2013) An overview of nitrates-induced corrosion of reinforced concrete structures: case studies, laboratory investigations and corrosion mechanisms. *Civil and Environmental Research* **5** : 106–110.
14. Jauberthie, R. & Rendell, F. (2003) Physicochemical study of the alteration surface of concrete exposed to ammonium salts. *Cement and Concrete Research* **33** : 85–91.
15. Clear, C. (1985) Effect of autogenous healing upon the leakage of water through cracks in concrete. *Tec.Rep.* 1–15.

16. STRRES. (2013) Guide traitement fissure par injection. *FABEM GUIDES STRRES*.
17. Sarmiento, J. L. & Gruber, N. (2002) Sinks for Anthropogenic Carbon. *Physics Today* **55** : 30–36.
18. Allwood, A. C., Walter, M. R., Kamber, B. S., Marshall, C. P. & Burch, I. W. (2006) Stromatolite reef from the Early Archaean era of Australia. *Nature* **441** : 714–718.
19. Weiner, S. & Dove, P. M. (2003) An Overview of Biomineralization Processes and the Problem of the Vital Effect. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* **54** : 1–29.
20. Faivre, D. & Schüler, D. (2008) Magnetotactic bacteria and magnetosomes. *Chem. Rev.* **108** : 4875–4898.
21. Afanasieva, M. S. & Amon, E. O. (2014) Biomineralization of radiolarian skeletons. *Paleontol. J.* **48** : 1473–1486.
22. Burford, E. P., Hillier, S. & Gadd, G. M. (2006) Biomineralization of fungal hyphae with calcite (CaCO<sub>3</sub>) and calcium oxalate mono- and dihydrate in carboniferous limestone Microcosms. *Geomicrobiology Journal* **23** : 599–611.
23. Fukasawa, Y., Komagata, Y. & Kawakami, S. (2017) Nutrient mobilization by plasmodium of myxomycete *Physarum rigidum* in deadwood. *Fungal Ecology* **29** : 42–44.
24. Nutman, A. P., Bennett, V. C., Friend, C. R. L., Van Kranendonk, M. J. & Chivas, A. R. (2016) Rapid emergence of life shown by discovery of 3,700-million-year-old microbial structures. *Nature* **537** : 535–538.
25. Allwood, A. C., Rosing, M. T., Flannery, D. T., Hurowitz, J. A. & Heirweh, C. M. (2018) Reassessing evidence of life in 3,700-million-year-old rocks of Greenland. *Nature* **563** : 241–244.
26. Cavalier-Smith, T. (2002) The neomuran origin of archaebacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52** : 7–76.
27. Mirvaux, B. (Université de Picardie Jules Verne, 2017). Des oxydes aux matériaux polyanioniques, valeurs ajoutées de la biominéralisation bactérienne de matériaux de batterie.
28. Mondal, S. (2019) Review on microbial induced calcite precipitation mechanisms leading to bacterial selection for microbial concrete. *Construction and Building Materials* **225** : 67–75.
29. Müller, W. E. G. *et al.* (2013) The enzyme carbonic anhydrase as an integral component of biogenic Ca-carbonate formation in sponge spicules. *FEBS Open Bio* **3** : 357–362.
30. Wilson, W. W., Wade, M. M., Holman, S. C. & Champlin, F. R. (2001) Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *Journal of Microbiological Methods* **43** : 153–164.
31. Durand, N., Monger, H. C., Canti, M. G. & Verrecchia, E. P. (Elsevier, 2018). Calcium Carbonate Features. in *Interpretation of Micromorphological Features of Soils and Regoliths* **9** : 205–258.

32. Bundur, Z. B., Amiri, A., Ersan, Y. C., Boon, N. & De Belie, N. (2017) Impact of air entraining admixtures on biogenic calcium carbonate precipitation and bacterial viability. *Cement and Concrete Research* **98** : 44–49.
33. Wu, J. & Zeng, R. J. (2017) Biomimetic Regulation of Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation Involving Immobilization of *Sporasarcina pasteurii* by sodium alginate. *Crystal Growth & Design* **17** : 1854–1862.
34. Chen, T. *et al.* (2018) Crystallization of calcium carbonate mineral with hierarchical structures regulated by silk fibroin in microbial mineralization system. *Journal of Crystal Growth* **493** : 51–57.
35. Williams, S. L., Kirisits, M. J. & Ferron, R. D. (2017) Influence of concrete-related environmental stressors on biomineralizing bacteria used in self-healing concrete. *Construction and Building Materials* **139** : 611–618.
36. Al-Salloum, Y. *et al.* (2017) Effect of some biotic factors on microbially-induced calcite precipitation in cement mortar. *Saudi Journal of Biological Sciences* **24** : 286–294.
37. Rajasekar, A., Moy, C. K. S. & Wilkinson, S. (2017) Stimulation of indigenous carbonate precipitating bacteria for ground improvement. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* **68** : 012010 (1–6).
38. Vasudevan, R. (2014) Biofilms: microbial cities of scientific significance. *JMEN* **1** : 1–16.
39. Qian, C., Yu, X. & Wang, X. (2018) Potential uses and cementing mechanism of bio-carbonate cement and bio-phosphate cement. *AIP Advances* **8** : 1–16.
40. Omoregie, A. I., Ngu, L. H., Ong, D. E. L. & Nissom, P. M. (2019) Low-cost cultivation of *Sporosarcina pasteurii* strain in food-grade yeast extract medium for microbially induced carbonate precipitation (MICP) application. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **17** : 247–255.
41. Žáková, H., Pazderka, J., Rácová, Z. & Ryparová, P. (2019) Effect of bacteria *Bacillus pseudofirmus* and fungus *Trichoderma reesei* on self-healing ability of concrete. *Acta Polytechnica CTU Proceedings* **21** : 42–45.
42. Mondal, S. & Ghosh, A. (Dey). (2018) Investigation into the optimal bacterial concentration for compressive strength enhancement of microbial concrete. *Construction and Building Materials* **183** : 202–214.
43. Jonkers, H. M. & Schlangen, E. (2007) Self-healing of cracked concrete: A bacterial approach. *Self Healing Materials. Springer Series in Materials Science* **100** : 195–204.
44. Ghosh, P., Mandal, S., Chattopadhyay, B. D. & Pal, S. (2005) Use of microorganism to improve the strength of cement mortar. *Cement and Concrete Research* **35** : 1980–1983.
45. Jeong, J.-H., Jo, Y.-S., Park, C.-S., Kang, C.-H. & So, J.-S. (2017) Biocementation of Concrete Pavements Using Microbially Induced Calcite Precipitation. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **27** : 1331–1335.

46. Wiktor, V. & Jonkers, H. M. (2011) Quantification of crack-healing in novel bacteria-based self-healing concrete. *Cement and Concrete Composites* **33** : 763–770.
47. Zhang, J. *et al.* (2017) Immobilizing bacteria in expanded perlite for the crack self-healing in concrete. *Construction and Building Materials* **148** : 610–617.
48. Kalhori, H. & Bagherpour, R. (2017) Application of carbonate precipitating bacteria for improving properties and repairing cracks of shotcrete. *Construction and Building Materials* **148** : 249–260.
49. Achal, V., Mukerjee, A. & Sudhakara Reddy, M. (2013) Biogenic treatment improves the durability and remediates the cracks of concrete structures. *Construction and Building Materials* **48** : 1–5.
50. Başaran Bundur, Z., Bae, S., Kirisits, M. J. & Ferron, R. D. (2017) Biomineralization in self-healing cement-based materials: investigating the temporal evolution of microbial metabolic state and material porosity. *J. Mater. Civ. Eng.* **29** : 1–9.
51. Nguyen, T. H., Ghorbel, E., Fares, H. & Cousture, A. (2019) Bacterial self-healing of concrete and durability assessment. *Cement and Concrete Composites* **104** : 1–15.
52. Chaerun, S. K., Rahayu, S., Rizki, I. N. & Pane, I. (2020) Utilization of a new locally isolated bacterial strain for promoting mechanical properties of mortar. *Int J Civ Eng* **18** : 665–671.
53. Krishnapriya, S., Venkatesh Babu, D. L. & G., P. A. (2015) Isolation and identification of bacteria to improve the strength of concrete. *Microbiological Research* **174** : 48–55.
54. Ghosh, S., Biswas, M., Chattopadhyay, B. D. & Mandal, S. (2009) Microbial activity on the microstructure of bacteria modified mortar. *Cement and Concrete Composites* **31** : 93–98.
55. Jonkers, H. M., Thijssen, A., Muyzer, G., Copuroglu, O. & Schlangen, E. (2010) Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete. *Ecological Engineering* **36** : 230–235.
56. Siddique, R. *et al.* (2016) Properties of bacterial rice husk ash concrete. *Construction and Building Materials* **121** : 112–119.
57. Erşan, Y. Ç., Da Silva, F. B., Boon, N., Verstraete, W. & De Belie, N. (2015) Screening of bacteria and concrete compatible protection materials. *Construction and Building Materials* **88** : 196–203.
58. Muynck, D. & Belie, D. (2007) Improvement of concrete durability with the aid of bacteria. *Proceedings of the First International Conference on Self Healing Materials*.
59. Sahoo, K. K., Sathyan, A. K., Sarkar, P. & Davis, R. (2018) Improvement of the mechanical properties of mortar and concrete using ureolytic bacteria. *Proceedings of the Institution of Civil Engineers - Construction Materials* **171** : 179–186.
60. Wu, C.-R., Zhu, Y.-G., Zhang, X.-T. & Kou, S.-C. (2018) Improving the properties of recycled concrete aggregate with bio-deposition approach. *Cement and Concrete Composites* **94** : 248–254.



61. Van Tittelboom, K., De Belie, N., De Muynck, W. & Verstraete, W. (2010) Use of bacteria to repair cracks in concrete. *Cement and Concrete Research* **40** : 157–166.
62. Wang, J., Van Tittelboom, K., De Belie, N. & Verstraete, W. (2012) Use of silica gel or polyurethane immobilized bacteria for self-healing concrete. *Construction and Building Materials* **26** : 532–540.
63. Wang, J. Y., Soens, H., Verstraete, W. & De Belie, N. (2014) Self-healing concrete by use of microencapsulated bacterial spores. *Cement and Concrete Research* **56** : 139–152.
64. Bang, S. S., Galinat, J. K. & Ramakrishnan, V. (2001) Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized *Bacillus pasteurii*. *Enzyme and Microbial Technology* **28** : 404–409.
65. Ramachandran, S. K., Ramakrishnan, V. & Bang, S. S. (2001) Remediation of concrete using micro-organisms. *ACI Materials Journal*. **98** : 3–9.
66. Jadhav, U. U. *et al.* (2018) Viability of bacterial spores and crack healing in bacteria-containing geopolymer. *Construction and Building Materials* **169** : 716–723.
67. Alazhari, M. (2018) Application of expanded perlite encapsulated bacteria and growth media for self-healing concrete. *Construction and Building Materials* **160** : 610–619.
68. Jonkers, H. M. (2011) Bacteria-based self-healing concrete. *heron*, **56** : 1–12.
69. Wang, J. Y., De Belie, N. & Verstraete, W. (2012) Diatomaceous earth as a protective vehicle for bacteria applied for self-healing concrete. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **39** : 567–577.
70. Wang, J. Y., Snoeck, D., Van Vlierberghe, S., Verstraete, W. & De Belie, N. (2014) Application of hydrogel encapsulated carbonate precipitating bacteria for approaching a realistic self-healing in concrete. *Construction and Building Materials* **68** : 110–119.
71. Wang, J. *et al.* (2015) Application of modified-alginate encapsulated carbonate producing bacteria in concrete: a promising strategy for crack self-healing. *Front. Microbiol.* **6** : 1–14.
72. Khaliq, W. & Ehsan, M. B. (2016) Crack healing in concrete using various bio influenced self-healing techniques. *Construction and Building Materials* **102** : 349–357.
73. Andalib, R. *et al.* (2016) Optimum concentration of *Bacillus megaterium* for strengthening structural concrete. *Construction and Building Materials* **118** : 180–193.
74. Chahal, N., Siddique, R. & Rajor, A. (2012) Influence of bacteria on the compressive strength, water absorption and rapid chloride permeability of fly ash concrete. *Construction and Building Materials* **28** : 351–356.
75. Siddique, R. *et al.* (2016) Influence of bacteria on compressive strength and permeation properties of concrete made with cement baghouse filter dust. *Construction and Building Materials* **106** : 461–469.
76. Le Métayer-Levrel, G., Castanier, S., Oriol, G., Loubière, J.-F. & Perthuisot, J.-P. (1999) Applications of bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of limestones in buildings and historic patrimony. *Sedimentary Geology* **126** : 25–34.

77. Achal, V., Mukherjee, A. & Reddy, M. S. (2011) Microbial concrete: way to enhance the durability of building structures. *J. Mater. Civ. Eng.* **23** : 730–734.
78. Achal, V., Mukherjee, A. & Reddy, M. S. (2011) Effect of calcifying bacteria on permeation properties of concrete structures. *J Ind Microbiol Biotechnol* **38** : 1229–1234.
79. De Muynck, W., Debrouwer, D., De Belie, N. & Verstraete, W. (2008) Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials. *Cement and Concrete Research* **38** : 1005–1014.
80. Kim, H. K., Park, S. J., Han, J. I. & Lee, H. K. (2013) Microbially mediated calcium carbonate precipitation on normal and lightweight concrete. *Construction and Building Materials* **38** : 1073–1082.
81. Qiu, J., Tng, D. Q. S. & Yang, E.-H. (2014) Surface treatment of recycled concrete aggregates through microbial carbonate precipitation. *Construction and Building Materials* **57** : 144–150.
82. Basaran Bundur, Z., Kirisits, M. J. & Ferron, R. D. (2015) Biomineralized cement-based materials: Impact of inoculating vegetative bacterial cells on hydration and strength. *Cement and Concrete Research* **67** : 237–245.
83. Bhaskar, S., Anwar Hossain, K. M., Lachemi, M., Wolfaardt, G. & Otini Kroukamp, M. (2017) Effect of self-healing on strength and durability of zeolite-immobilized bacterial cementitious mortar composites. *Cement and Concrete Composites* **82** : 23–33.
84. Stocks-Fischer, S., Galinat, J. K. & Bang, S. S. (1999) Microbiological precipitation of CaCO<sub>3</sub>. *Soil Biology and Biochemistry* **31** : 1563–1571.
85. Xu, J. & Wang, X. (2018) Self-healing of concrete cracks by use of bacteria-containing low alkali cementitious material. *Construction and Building Materials* **167** : 1–14.
86. Gao, M. *et al.* (2020) Immobilized bacteria with pH-response hydrogel for self-healing of concrete. *Journal of Environmental Management* **261** : 110225–110231.
87. Kua, H. W., Gupta, S., Aday, A. N. & Srubar, W. V. (2019) Biochar-immobilized bacteria and superabsorbent polymers enable self-healing of fiber-reinforced concrete after multiple damage cycles. *Cement and Concrete Composites* **100** : 35–52.
88. Wang, J. *et al.* (2018) A chitosan based pH-responsive hydrogel for encapsulation of bacteria for self-sealing concrete. *Cement and Concrete Composites* **93** : 309–322.
89. Qian, C., Chen, H., Ren, L. & Luo, M. (2015) Self-healing of early age cracks in cement-based materials by mineralization of carbonic anhydrase microorganism. *Front. Microbiol.* **6** : 1–9.
90. Wu, M., Hu, X., Zhang, Q., Xue, D. & Zhao, Y. (2019) Growth environment optimization for inducing bacterial mineralization and its application in concrete healing. *Construction and Building Materials* **209** : 631–643.
91. Shaheen, N. *et al.* (2019) Synthesis and characterization of bio-immobilized nano/micro inert and reactive additives for feasibility investigation in self-healing concrete. *Construction and Building Materials* **226** : 492–506.

92. Khushnood, R. A., Qureshi, Z. A., Shaheen, N. & Ali, S. (2020) Bio-mineralized self-healing recycled aggregate concrete for sustainable infrastructure. *Science of The Total Environment* **703** : 135007–135020.
93. Jiang, L., Jia, G., Jiang, C. & Li, Z. (2020) Sugar-coated expanded perlite as a bacterial carrier for crack-healing concrete applications. *Construction and Building Materials* **232** : 117222–117230.
94. Mondal, S., Das, P., Datta, P. & (Dey) Ghosh, A. (2020) *Deinococcus radiodurans*: A novel bacterium for crack remediation of concrete with special applicability to low-temperature conditions. *Cement and Concrete Composites* **108** : 1–11.
95. Dinarvand, P. & Rashno, A. (2021) Review of the potential application of bacteria in self-healing and the improving properties of concrete/mortar. *Journal of Sustainable Cement-Based Materials* 1–34.
96. Yoon, J.-H. *et al.* (2001) *Sporosarcina aquimarina* sp. nov., a bacterium isolated from seawater in Korea, and transfer of *Bacillus globisporus* (Larkin and Stokes 1967), *Bacillus psychrophilus* (Nakamura 1984) and *Bacillus pasteurii* (Chester 1898) to the genus *Sporosarcina* as *Sporosarcina globispora* comb. nov., *Sporosarcina psychrophila* comb. nov. and *Sporosarcina pasteurii* comb. nov., and emended description of the genus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51** : 1079–1086.
97. Sidiq, A., Gravina, R. & Giustozzi, F. (2019) Is concrete healing really efficient? A review. *Construction and Building Materials* **205** : 257–273.
98. Siddique, R. *et al.* (2016) Influence of bacteria on compressive strength and permeation properties of concrete made with cement baghouse filter dust. *Construction and Building Materials* **106** : 461–469.
99. Chahal, N., Siddique, R. & Rajor, A. (2012) Influence of bacteria on the compressive strength, water absorption and rapid chloride permeability of fly ash concrete. *Construction and Building Materials* **28** : 351–356.
100. Basaran Bundur, Z., Kirisits, M. J. & Ferron, R. D. (2015) Biomineralized cement-based materials: Impact of inoculating vegetative bacterial cells on hydration and strength. *Cement and Concrete Research* **67** : 237–245.
101. Mondal, S. & Ghosh, A. (Dey). (2018) Investigation into the optimal bacterial concentration for compressive strength enhancement of microbial concrete. *Construction and Building Materials* **183** : 202–214.
102. Kalhori, H. & Bagherpour, R. (2017) Application of carbonate precipitating bacteria for improving properties and repairing cracks of shotcrete. *Construction and Building Materials* **148** : 249–260.
103. Achal, V., Mukherjee, A. & Reddy, M. S. (2011) Microbial Concrete: Way to Enhance the Durability of Building Structures. *J. Mater. Civ. Eng.* **23** : 730–734.
104. Chaerun, S. K., Rahayu, S., Rizki, I. N. & Pane, I. (2020) Utilization of a New Locally Isolated Bacterial Strain for Promoting Mechanical Properties of Mortar. *Int J Civ Eng* **18** : 665–671.

105. Sahoo, K. K., Sathyan, A. K., Sarkar, P. & Davis, R. (2018) Improvement of the mechanical properties of mortar and concrete using ureolytic bacteria. *Proceedings of the Institution of Civil Engineers - Construction Materials* **171** : 179–186.
106. Erşan, Y. Ç., Da Silva, F. B., Boon, N., Verstraete, W. & De Belie, N. (2015) Screening of bacteria and concrete compatible protection materials. *Construction and Building Materials* **88** : 196–203.
107. Andalib, R. *et al.* (2016) Optimum concentration of *Bacillus megaterium* for strengthening structural concrete. *Construction and Building Materials* **118** : 180–193.
108. Krishnapriya, S., Venkatesh Babu, D. L. & G., P. A. (2015) Isolation and identification of bacteria to improve the strength of concrete. *Microbiological Research* **174** : 48–55.
109. Jeong, J.-H., Jo, Y.-S., Park, C.-S., Kang, C.-H. & So, J.-S. (2017) Biocementation of Concrete Pavements Using Microbially Induced Calcite Precipitation. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **27** : 1331–1335.
110. Siddique, R. *et al.* (2016) Properties of bacterial rice husk ash concrete. *Construction and Building Materials* **121** : 112–119.
111. Wang, J., Van Tittelboom, K., De Belie, N. & Verstraete, W. (2012) Use of silica gel or polyurethane immobilized bacteria for self-healing concrete. *Construction and Building Materials* **26** : 532–540.
112. Bang, S. S., Galinat, J. K. & Ramakrishnan, V. (2001) Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized *Bacillus pasteurii*. *Enzyme and Microbial Technology* **28** : 404–409.
113. Nguyen, T. H., Ghorbel, E., Fares, H. & Cousture, A. (2019) Bacterial self-healing of concrete and durability assessment. *Cement and Concrete Composites* **104** : 103340.
114. Alazhari, M., Sharma, T., Heath, A., Cooper, R. & Paine, K. (2018) Application of expanded perlite encapsulated bacteria and growth media for self-healing concrete. *Construction and Building Materials* **160** : 610–619.
115. Wang, J. Y., De Belie, N. & Verstraete, W. (2012) Diatomaceous earth as a protective vehicle for bacteria applied for self-healing concrete. *J Ind Microbiol Biotechnol* **39** : 567–577.
116. Wang, J. Y., Snoeck, D., Van Vlierberghe, S., Verstraete, W. & De Belie, N. (2014) Application of hydrogel encapsulated carbonate precipitating bacteria for approaching a realistic self-healing in concrete. *Construction and Building Materials* **68** : 110–119.
117. Khaliq, W. & Ehsan, M. B. (2016) Crack healing in concrete using various bio influenced self-healing techniques. *Construction and Building Materials* **102** : 349–357.
118. Achal, V., Mukherjee, A. & Reddy, M. S. (2011) Effect of calcifying bacteria on permeation properties of concrete structures. *J Ind Microbiol Biotechnol* **38** : 1229–1234.
119. Achal, V., Mukerjee, A. & Sudhakara Reddy, M. (2013) Biogenic treatment improves the durability and remediates the cracks of concrete structures. *Construction and Building Materials* **48** : 1–5.

120. Wu, C.-R., Zhu, Y.-G., Zhang, X.-T. & Kou, S.-C. (2018) Improving the properties of recycled concrete aggregate with bio-deposition approach. *Cement and Concrete Composites* **94** : 248–254.
121. Wiktor, V. & Jonkers, H. M. (2011) Quantification of crack-healing in novel bacteria-based self-healing concrete. *Cement and Concrete Composites* **33** : 763–770.
122. Zhang, J. *et al.* (2017) Immobilizing bacteria in expanded perlite for the crack self-healing in concrete. *Construction and Building Materials* **148** : 610–617.
123. De Muynck, W., Debrouwer, D., De Belie, N. & Verstraete, W. (2008) Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials. *Cement and Concrete Research* **38** : 1005–1014.
124. Qiu, J., Tng, D. Q. S. & Yang, E.-H. (2014) Surface treatment of recycled concrete aggregates through microbial carbonate precipitation. *Construction and Building Materials* **57** : 144–150.
125. Perito, B. (2014) A *Bacillus subtilis* cell fraction (BCF) inducing calcium carbonate precipitation: Biotechnological perspectives for monumental stone reinforcement. *Journal of Cultural Heritage* **15** : 345–351.
126. Guazzelli, E. (2001) Rhéologie des fluides complexes. cel-01522165.
127. Gupta, S., Pang, S. D. & Kua, H. W. (2017) Autonomous healing in concrete by bio-based healing agents – A review. *Construction and Building Materials* **146** : 419–428.
128. Jroundi, F. *et al.* (2017) Protection and consolidation of stone heritage by self-inoculation with indigenous carbonatogenic bacterial communities. *Nat Commun* **8** : 279–282.
129. Dakhane, A. *et al.* (2018) Crack Healing in Cementitious Mortars Using Enzyme-Induced Carbonate Precipitation: Quantification Based on Fracture Response. *J. Mater. Civ. Eng.* **30** : 1–20.
130. Ghannam, M. T. & Esmail, M. N. (1997) Rheological properties of carboxymethyl cellulose. *Journal of Applied Polymer Science* **64** : 289–301.
131. Ducasse-Lapeyrousse J., Gagné R., Lors C. & Damidot D. (2012) Biocicatrisation pour le traitement des fissures dans les matériaux cimentaires : étude de l'influence des souches bactériennes et du milieu précurseur. *Proceedings de la 13<sup>ème</sup> édition des journées Scientifiques du Regroupement Francophone pour la recherche et la formation sur le béton (RF<sup>2</sup>B)*. p. 107.
132. Ducasse-Lapeyrousse J., Gagné R., Lors C. & Damidot D. (2014) Etude de la biocicatrisation de mortiers fissurés. *Proceedings de la 15<sup>ème</sup> édition des journées Scientifiques du Regroupement Francophone pour la recherche et la formation sur le béton (RF<sup>2</sup>B)*. 121–127.
133. Ducasse-Lapeyrousse J., Gagné R., Lors C. & Damidot D. (2014) Traitement de mortiers fissurés par biocicatrisation : vers une évaluation quantitative de l'efficacité bactérienne. *Matériaux & Techniques*. **102** (1) : 1–11.
134. Ducasse-Lapeyrousse J., Gagné R., Lors C. & Damidot D. (2015) Biocicatrisation : application à la réparation de mortiers âgés. *Matériaux & Techniques*. **103** : 207.

135. Ducasse-Lapeyresse J., Gagné R., Lors C. & Damidot D. (2017) Effect of calcium gluconate, calcium lactate, and urea on the kinetics of self-healing in mortars. *Construction and Building Materials*. **157** : 489–497.
136. Lors C., Ducasse-Lapeyresse J., Gagné R. & Damidot D. (2017) Microbiologically induced calcium carbonate precipitation to repair micro-cracks remaining after autogenous in healing of mortars. *Construction and Building Materials*, **141** : 461–469.
137. Feurgard I., Lors C., Gagné R. & Damidot D. (2016) Mise au point d'une suspension bactérienne épaissie pour l'exobiocicatrissage de matériaux cimentaires fissurés. *Matériaux & Techniques*. **104** : 505–511.
138. Feurgard I., Lors C., Gagné R. & Damidot D. (2020) Use of colloidal thickeners for the injection and retention of bacterial growth media to repair cracked concrete. *Construction and Building Materials*. **262** : 119993.
139. Lors, C. *et al.* (2020) Bioprecipitation of a calcium carbonate – Biofilm composite on the surface of concrete for the maintenance of nuclear reactor enclosures. *Construction and Building Materials* **237** : 117618–117626.
140. Lors, C. and Damidot D. (2018) Mise au point d'un biotraitement pour réparer des microfissures au sein d'une enceinte nucléaire. Rapport IMT Nord Europe - EDF, 28p.
141. Martins, M. F., Salvador, S., Lapene, A. & Debenest, G. (2007) Caractérisation thermochimique de la structure d'un front de combustion en milieu poreux réactif: nouveau dispositif expérimental. *Congrès Français de Thermique*.
142. Argouges, M. (Université de Sherbrooke, 2011). Étude des mécanismes et de la cinétique de l'autocicatrisation dans des mortiers cimentaires fissurés.
143. Gagne, R. & Argouges, M. (2012) A study of the natural self-healing of mortars using air-flow measurements. *Materials and Structures* **45** : 1625–1638.
144. Zhang, W., Ju, Y., Zong, Y., Qi, H. & Zhao, K. (2018). In situ real-time study on dynamics of microbially induced calcium carbonate precipitation at a single-cell level. *Environ. Sci. Technol.* **52** : 9266–9276.