



**HAL**  
open science

# Exploration multi-échelle de l'électroactivité bactérienne au travers de l'étude de la biocorrosion du fer

Marion Lherbette

## ► To cite this version:

Marion Lherbette. Exploration multi-échelle de l'électroactivité bactérienne au travers de l'étude de la biocorrosion du fer. Bactériologie. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASP061 . tel-03347974

**HAL Id: tel-03347974**

**<https://theses.hal.science/tel-03347974v1>**

Submitted on 17 Sep 2021

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

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

Exploration multi-échelle de  
l'électroactivité bactérienne au travers de  
l'étude de la biocorrosion du fer

*Multiscale exploration of bacterial electroactivity  
through the study of iron biocorrosion*

**Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay**

École doctorale n° 564 : Physique en Ile-de-France (PIF)

Spécialité de doctorat : Physique

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CNRS,

Laboratoire de Physique des Solides, 91405, Orsay, France

Référent : Faculté des sciences d'Orsay

**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,  
le 22 juillet 2021, par**

**Marion LHERBETTE**

**Composition du Jury**

**Giuseppe FOFFI**

Professeur, Université Paris-Saclay

Président

**Régine BASSEGUY**

Directrice de recherche, Université de Toulouse

Rapporteur & Examinatrice

**Frédéric JORAND**

Professeur, Université de Lorraine

Rapporteur & Examineur

**Sigolène LECUYER**

Chargée de recherche, ENS de Lyon

Examinatrice

**Céline REMAZEILLES**

Maîtresse de conférences, La Rochelle Université

Examinatrice

**Direction de la thèse**

**Eric RASPAUD**

Directeur de recherche, Université Paris-Saclay

Directeur de thèse

**Christian MARLIÈRE**

Directeur de recherche, Université Paris-Saclay

Co-Directeur de thèse

**Christophe REGÉARD**

Maître de conférences, Université-Paris-Saclay

Co-Directeur de thèse

**Alain BERGEL**

Directeur de recherche, Université de Toulouse

Invité

**Titre :** Exploration multi-échelle de l'électroactivité bactérienne au travers de l'étude de la biocorrosion du fer

**Mots clés :** bactéries, électroactivité, biophysique, corrosion, approche multi-échelle, nanofilm

**Résumé :** La mise en évidence de la capacité des bactéries à transporter des électrons à l'extérieur de leur cellule a ouvert tout un nouveau champ de recherche aussi bien fondamentale, sur l'électroactivité bactérienne, qu'appliquée à la bioremédiation de polluants ou la fabrication de biopiles. Ce travail de thèse propose d'observer expérimentalement les mécanismes mis en jeu au cours de ces transferts extracellulaires d'électrons, principalement au travers de l'étude de la biocorrosion du fer. La bactérie anaérobie facultative modèle, *Shewanella oneidensis MR-1*, connue pour son électroactivité et sa capacité à réduire le fer ferrique, a été choisie.

L'originalité de l'approche expérimentale proposée ici réside dans l'utilisation de nanofilms de fer (10nm d'épaisseur) permettant de visualiser, *in situ* et en temps réel, les bactéries au cours du processus de corrosion tout en suivant optiquement la dégradation de la couche de fer qui en résulte. Ces nanofilms, partiellement transparents, sont obtenus par évaporation thermique et ont été caractérisés par différentes techniques complémentaires (XPS, AFM, réflectivité X, résistivité et absorbance optique). Elles indiquent une surface de rugosité sub-nanométrique, homogène et composée, sur les premiers nanomètres, d'une couche passivante d'oxydes de Fe(II) et Fe(III) recouvrant entièrement le Fe(0). La construction d'un montage optique, combiné à des mesures de courant électrique et de potentiel en circuit ouvert, nous permettent de suivre, pas à pas, la dégradation du fer au contact d'une solution bactérienne. En seulement quelques heures, après une première étape dite « phase d'initiation », la corrosion homogène et uniforme du Fe(0) est observée. Afin de comprendre l'origine de cette phase d'initiation, la concentration initiale en bactéries, l'environnement chimique ou encore les espèces bactériennes (*E.coli*, *L.plantarum*) ont été modifiées. Les résultats suggèrent que, par des processus directs, comme l'utilisation de fer ferrique en tant que dernier accepteur d'électrons dans la chaîne respiratoire, ou indirects, comme la production de molécules corrosives, les bactéries induisent la dégradation de la couche passive d'oxyde de fer. Le Fe(0), alors au contact de la solution aqueuse, s'oxyde chimiquement. Des observations de microscopie optique *in situ* ont également permis de suivre la localisation et la dynamique des bactéries au voisinage de la surface de fer avant, pendant et après la corrosion.

En parallèle, des études aux échelles locale et génomique ont été initiées. Dans l'idée de cartographier, via un microscope à force atomique, la charge à la surface des bactéries, un protocole d'adhésion des bactéries à un substrat conducteur (sans traitement chimique) est à l'étude.

**Title :** Multiscale exploration of bacterial electroactivity through the study of iron biocorrosion

**Keywords :** bacteria, electroactivity, biophysics, corrosion, multiscale approaches, nanofilm

**Abstract :** The observation of bacteria ability to perform external electron transfer open up a broad field of researches at both fundamental (concerning bacterial electroactivity) and applied level (regarding contaminant bioremediation or microbial fuel cells technology). In this PhD thesis, we explore bacterial mechanisms involved in this phenomenon mainly through the study of iron biocorrosion. This work focuses on the facultative anaerobe bacterium, *Shewanella oneidensis MR-1*, known for its electroactivity and its ability to reduce ferric iron.

The novel approach proposed here lies in the use of iron nanofilm (10 nm thick) allowing the real time and *in situ* visualization of bacterial action during the corrosion process. These thermally evaporated nanofilms, partially transparent, were characterized thanks to different complementary techniques (XPS, AFM, X-ray reflectivity, resistivity and optical absorbance). Data suggest a homogeneous nanorugose surface mainly composed, in the first nanometers, of iron (II) and (III) oxides. This observation highlights the formation of a passive iron oxide nanooverlayer which totally covered the underlying iron(0). An optical set-up, combined with electrical current and open circuit potential measurements, enables monitoring the iron degradation in contact with bacterial solution. Within few hours, we observe after an initiation phase an homogeneous and uniform corrosion of the iron(0) underlayer. Different experiments have been performed to understand which parameters drive this initiation phase. Inoculum bacterial turbidity, chemical environment and bacterial species (*E.coli*, *L.plantarum*) have been modified. Results suggest that, through direct processes (such as the use of iron as last electron acceptor in respiratory chain) or indirect ones (through secretion of corrosive molecules) bacteria induce the degradation of the oxide overlayer. Consequently, the chemical oxidation of iron(0), in contact with the aqueous solution, occurs. Additionally, the *in situ* tracking of bacteria localized near the iron surface thanks to an optical microscope allow the determination of bacterial dynamic before, during and after the corrosion process.

At the same time, local and genomic scales studies were initiated. In order to map the bacterial surface charge density with an atomic force microscope, we started to build up a protocol to control bacterial adhesion onto a conductive substrate (without any chemical treatment).



# Remerciements

Par ces quelques lignes je tiens à remercier tout(es) celles et ceux qui ont contribué à faire avancer ce beau projet. Ce fut un réel plaisir d'avoir pu travailler avec chacun d'entre vous.

Je remercie les membres du comité du LABEX PALM d'avoir accepté de financer ce projet.

Je remercie Mme Régine Basséguy (INP, Toulouse) et M. Frédéric Jorand (LCPME, Nancy) d'avoir rapporté ce travail de thèse avec tant de rigueur et de détails. Merci également à Mme Sigolène Lecuyer (ENS Lyon), Mme Céline Rémazeilles (LaSIE, La Rochelle) et M. Giuseppe Foffi (LPS, Orsay) qui ont accepté de participer à l'évaluation de ce travail. Merci à chacun d'entre vous pour votre lecture attentive et pour l'intérêt que vous avez porté à ces travaux. Une mention particulière à M. Alain Bergel (INP, Toulouse) : merci pour le suivi bienveillant et les échanges fructueux que nous avons pu avoir tout au long de ma thèse.

Je remercie tout particulièrement mes trois directeurs de thèse, Eric Raspaud (LPS), Christophe Regard (I2BC) et Christian Marlière (ISMO) avec qui j'ai eu la joie de pouvoir travailler à nouveau. Merci de m'avoir si bien accompagnée au cours de ces trois années. Merci Eric pour ta disponibilité, ton attention, ta gentillesse, tes idées innovantes. Merci Christian, pour ton souci du détail et le temps passé à me former à l'utilisation de l'AFM. Merci Christophe d'avoir eu la patience de me former à la microbiologie avec tant de pédagogie. Merci pour ces échanges enrichissants nourris par vos points de vue scientifiques différents. Merci pour votre confiance.

Je remercie Virginie Bailleux et Laetitia Poncet pour leur aide précieuse dans le domaine de la microbiologie et plus particulièrement le dosage à la ferrozine. Merci pour tous vos conseils, toutes vos réponses à mes questions.

Je tiens à remercier tous les autres membres de l'équipe TICE pour leur accueil chaleureux : Fatma Briki, Catherine Even et Laura Sabatier. Merci pour vos remarques et ces temps d'échange sur ce travail.

Je remercie Stéphane Cabaret et Marc Bottineau, membres du service mécanique, pour leur écoute, leurs suggestions avisées et le temps passé à la réalisation de nos dispositifs expérimentaux complexes.

Je remercie Raphaël Weil et Sylvie Gautier de m'avoir permis d'utiliser l'évaporateur et d'avoir toujours su réagir efficacement à chaque problème rencontré. Merci Sylvie pour ton aide dans la préparation des échantillons.

Je remercie Zhizhong Li de m'avoir formée à l'utilisation du diffractomètre. Merci pour ta patience, ton temps et ta disponibilité.

Je remercie les membres de l'équipe Electronique Instrumentation - Jérémie Sanchez, Vincent Klein, Yannic Simon et Sambath Saranga - pour leur disponibilité et leur efficacité.

Je remercie les membres du service informatique pour leur réactivité face à tous les problèmes informatiques que j'ai pu rencontrer.

Merci à Sandrine Mariot pour ton aide et tes conseils dans le domaine de la microfluidique.

Je remercie l'ensemble des stagiaires pour leur investissement dans ce projet : Gaïa, Richard, Dylan, Izia, Fabien, Nemo, Marjolaine, Clara, Louis, Djibril, Alexis, Ahmadj, Anouk, Mathieu, Bachira, Indirah. J'ai beaucoup apprécié pouvoir vous accompagner dans cette découverte de la recherche.

Je remercie Diano Dragoë (ICCMO, Orsay) qui a effectué la mesure et l'analyse des données XPS. Merci pour tes explications pédagogiques.

Je remercie Jean-Christophe Piard et Virgile Guéneau (Institut Micalis, INRIA) de nous avoir gracieusement transmis la souche *L. plantarum*, Prof Jeffrey A. Galnick et Cécile Jourlin-Castelli pour les mutants de *Shewanella oneidensis* respectivement  $\Delta mtrA/\Delta mtrD$ ,  $\Delta mtrC/\Delta omcA/\Delta mtrF$  et  $\Delta mxD$ .



# Sommaire

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Résumé</b> .....   | <b>2</b>  |
| <b>Abstract</b> .....   | <b>3</b>  |
| <b>Remerciements</b> .....  | <b>5</b>  |
| <b>Liste des figures et schémas</b> .....   | <b>13</b> |
| <b>Introduction générale</b> .....  | <b>18</b> |
| <b>Chapitre 1 : Introduction bibliographique</b> .....                              | <b>21</b> |
| <b>I. Introduction à la corrosion abiotique du fer</b> .....                        | <b>22</b> |
| 1. Définition de la corrosion chimique du fer .....                                 | 22        |
| 2. Aspects thermodynamiques des réactions électrochimiques.....                     | 23        |
| 3. Aspects cinétiques des réactions électrochimiques.....                           | 24        |
| 4. Corrosion généralisée ou localisée.....  | 25        |
| <b>II. L'électroactivité bactérienne</b> .....                                      | <b>27</b> |
| 1. Respiration cellulaire et électroactivité bactérienne .....                      | 27        |
| 2. Les différents modes de transfert d'électrons .....                              | 30        |
| a. Transferts directs.....  | 31        |
| b. Transferts indirects .....   | 31        |
| <b>III. Interactions bactéries-fer</b> .....  | <b>33</b> |
| 1. Rôle prépondérant des procaryotes dans le cycle biogéochimique du fer.....       | 33        |
| 2. Mécanismes bactériens développés pour l'absorption du fer .....                  | 34        |
| 3. Mécanismes bactériens développés pour la respiration du fer .....                | 35        |
| a. Dissimilation oxydative : $Fe^{2+}$ comme source d'électrons .....               | 35        |
| b. Dissimilation réductrice : $Fe^{3+}$ comme accepteur terminal d'électrons .....  | 36        |
| <b>IV. La corrosion du fer influencée par la présence de microorganismes</b> .....  | <b>37</b> |
| 1. Définition de la corrosion influencée par les microorganismes .....              | 37        |
| 2. Les bactéries impliquées dans la biocorrosion du fer.....                        | 38        |
| a. Les bactéries sulfato-réductrices .....  | 38        |
| b. Les bactéries acidifiantes .....   | 39        |
| c. Les bactéries oxydantes .....  | 39        |
| d. Les bactéries réductrices .....  | 39        |
| 3. Les biofilms électroactifs .....   | 40        |
| 4. <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1.....   | 41        |
| <b>Références</b> .....   | <b>43</b> |
| <b>Chapitre 2 : Caractérisation physique et chimique des nanofilms de fer</b> ..... | <b>51</b> |
| <b>I. Contexte et objectifs</b> .....   | <b>52</b> |
| <b>II. Préparation des nanofilms de fer</b> .....                                   | <b>54</b> |

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| 1.           | Technique de dépôt utilisée : l'évaporation thermique sous vide .....  | 54        |
| a.           | La mise sous-vide de l'enceinte de dépôt .....   | 54        |
| b.           | Description de la résistance chauffante .....  | 54        |
| c.           | Mesure de la variation d'épaisseur du dépôt à l'aide d'un oscillateur à quartz .....   | 55        |
| d.           | Amélioration du dispositif .....   | 55        |
| 2.           | Protocole de lavage des lamelles de verre .....  | 56        |
| 3.           | Paramètres choisis pour les évaporations thermiques .....  | 56        |
| 4.           | Remarque sur la possibilité de la formation d'un alliage fer-titane .....  | 57        |
| <b>III.</b>  | <b>Caractérisation de la semi-transparence optique du nanofilm .....</b>   | <b>59</b> |
| 1.           | Facteur de transmission/réflexion aux interfaces et absorption .....   | 59        |
| 2.           | Mesure du coefficient d'absorption du nanofilm de fer : matériel et méthode .....  | 61        |
| 3.           | Résultats des mesures d'absorption optique sur le nanofilm de fer .....  | 61        |
| <b>IV.</b>   | <b>Caractérisation des propriétés d'interface et de composition chimique du nanofilm par réflectivité X sous incidence rasante .....</b> | <b>63</b> |
| 1.           | Réflectivité de rayons X en incidence rasante : matériel et méthode .....  | 63        |
| 2.           | Résultats des mesures de réflectivité X .....  | 64        |
| <b>V.</b>    | <b>Caractérisation de la topographie de la surface du nanofilm par microscopie à force atomique .....</b>                                | <b>68</b> |
| 1.           | Microscopie à force atomique : matériel et méthode.....  | 68        |
| 2.           | Résultats des mesures de microscopie à force atomique .....  | 70        |
| <b>VI.</b>   | <b>Caractérisation de la composition chimique du nanofilm par spectroscopie photo-électronique à rayons X (XPS).....</b>                 | <b>73</b> |
| 1.           | Principe de la mesure XPS .....  | 73        |
| 2.           | Spectroscopie photo-électronique à rayons X : matériel et méthode .....  | 73        |
| 3.           | Résultats des mesures de spectrométrie photoélectronique de rayons X .....   | 74        |
| <b>VII.</b>  | <b>Caractérisation des propriétés électriques du nanofilm .....</b>  | <b>78</b> |
| 1.           | Mesure quatre points de la résistivité électrique : matériel et méthode .....  | 78        |
| 2.           | Résultats des mesures de résistivité électrique .....  | 79        |
| <b>VIII.</b> | <b>Conclusion .....</b>  | <b>83</b> |
|              | <b>Références .....</b>  | <b>85</b> |
|              | <b>Chapitre 3 : Biocorrosion des nanofilms de fer : matériels et méthodes .....</b>  | <b>92</b> |
| <b>I.</b>    | <b>Introduction.....</b>   | <b>93</b> |
| <b>II.</b>   | <b>Description des bactéries et des milieux de culture utilisés .....</b>  | <b>94</b> |
| 1.           | Choix des différentes bactéries .....  | 94        |
| 2.           | Milieux de culture .....   | 96        |
| 3.           | Protocole de culture des bactéries .....   | 96        |
| <b>III.</b>  | <b>Description des techniques expérimentales développées pour le suivi de la biocorrosion .....</b>                                      | <b>98</b> |
| 1.           | Description du montage de mesures optiques macroscopiques.....   | 98        |
| 2.           | Etalonnage du montage optique .....  | 99        |

|             |   |            |
|-------------|---|------------|
| a.          | Détermination de la relation entre tension aux bornes de la photodiode et densité optique .....             | 99         |
| i.          | Contribution du nanofilm .....  | 100        |
| ii.         | Contribution des bactéries .....  | 100        |
| iii.        | Contribution du nanofilm et des bactéries.....  | 102        |
| b.          | Vérification de la loi d'additivité des densités optiques .....   | 103        |
| c.          | Description de la méthode de conversion de la tension aux bornes de la photodiode en épaisseur de fer ..... | 104        |
| 3.          | Description du montage de mesures électriques à deux électrodes .....                                       | 106        |
| 4.          | Description du montage de microscopie optique .....   | 108        |
| 5.          | Mesures locales du pH et du dioxygène à l'aide de microsondes .....   | 109        |
| 6.          | Mesure de la concentration en Fe <sup>2+</sup> par le test à la ferrozine .....                             | 110        |
| 7.          | Description de la chambre de culture bi-compartmentée .....   | 111        |
| <b>IV.</b>  | <b>Conclusion.....</b>  | <b>112</b> |
|             | <b>Références .....</b>   | <b>113</b> |
|             | <b>Annexe 3-1 : Principe de fonctionnement d'une photodiode .....</b>                                       | <b>115</b> |
|             | <b>Chapitre 4 : Biocorrosion des nanofilms de fer : mesures et analyses .....</b>                           | <b>118</b> |
| <b>I.</b>   | <b>Contexte et objectifs .....</b>  | <b>119</b> |
| <b>II.</b>  | <b>Mise en évidence expérimentale du phénomène de biocorrosion .....</b>                                    | <b>120</b> |
| 1.          | Résultats des mesures au microscope optique : dégradation homogène du fer .....                             | 120        |
| 2.          | Mise en évidence de trois étapes dans la biocorrosion du fer .....  | 121        |
| 3.          | Résultats des mesures électriques enregistrées simultanément .....  | 124        |
| a.          | Mesures de tension en circuit ouvert .....  | 124        |
| b.          | Mesures d'intensité électrique .....  | 126        |
| c.          | Lien entre l'intensité électrique mesurée et l'épaisseur du nanofilm de fer .....                           | 128        |
| d.          | Influence de la variation d'épaisseur ou de surface du nanofilm de fer... 130                               |            |
| <b>III.</b> | <b>Modification de l'environnement physico-chimique des nanofilms de fer. 132</b>                           |            |
| 1.          | Evolution des concentrations locales de pH et de dioxygène .....  | 132        |
| 2.          | Influence de la densité optique de l'inoculum .....   | 134        |
| 3.          | Influence du contact entre les bactéries et la surface du nanofilm de fer .....                             | 136        |
| 4.          | Influence de l'état physiologique des bactérie .....  | 140        |
| 5.          | Influence de l'ajout de Fe(III) soluble .....   | 141        |
| a.          | Mesure des vitesses de réduction du Fe(III) en anaérobie stricte.....                                       | 141        |
| b.          | Mesure des vitesses de réduction du Fe(III) en conditions statique aérobie .....                            | 143        |
| c.          | Décalage du déclenchement de la corrosion .....   | 144        |
| 6.          | Influence de l'espèce bactérienne interagissant avec le fer .....   | 147        |
| <b>IV.</b>  | <b>Observation au microscope optique .....</b>  | <b>151</b> |

|  |            |
|--|------------|
| 1. Analyse de la densité surfacique des bactéries en fonction du temps d'incubation .....                          | 151        |
| 2. Analyse de la dynamique des bactéries.....  | 156        |
| a. Vitesse de déplacement des bactéries sur ou au voisinage de la surface .....                                    | 156        |
| b. Régénération rapide des bactéries au contact de la couche de fer .....  | 158        |
| <b>V. Conclusion .....</b>   | <b>162</b> |
| <b>Références .....</b>  | <b>165</b> |
| <b>Chapitre 5 : Etude préliminaire de la densité de charge à la surface des bactéries .....</b>                    | <b>169</b> |
| <b>I. Contexte et objectif .....</b>   | <b>170</b> |
| 1. Méthodes de mesures électriques par AFM .....   | 170        |
| 2. Objectifs .....   | 173        |
| 3. Lavage des lames d'ITO .....  | 175        |
| <b>II. Tests préliminaires : dépôt d'une goutte de culture bactérienne sur la surface du substrat .....</b>        | <b>176</b> |
| 1. Matériels et méthodes .....   | 176        |
| 2. Résultats et discussions .....  | 176        |
| <b>III. Fixation des bactéries à l'aide d'un montage micro-fluidique.....</b>                                      | <b>180</b> |
| 1. Matériels et méthodes .....   | 180        |
| a. Description du milieu de culture utilisé .....  | 180        |
| b. Description du montage .....  | 181        |
| i. Fabrication de la cellule micro-fluidique .....   | 181        |
| ii. Description du montage de micro-fluidique .....  | 181        |
| iii. Protocole utilisé pour le nettoyage du dispositif de micro-fluidique .....                                    | 181        |
| iv. Protocole d'inoculation des bactéries dans le montage de micro-fluidique .....                                 | 182        |
| c. Etalonnage du débit de la pompe .....   | 183        |
| 2. Résultats et discussions .....  | 183        |
| a. Résultats obtenus au microscope optique inversé à contraste de phase  | 184        |
| b. Résultats obtenus au microscope à force atomique .....  | 186        |
| <b>IV. Fixation des bactéries par application d'un potentiel positif à la surface du substrat conducteur .....</b> | <b>189</b> |
| 1. Matériels et méthodes .....   | 189        |
| 2. Résultats et discussions .....  | 190        |
| <b>V. Conclusion .....</b>   | <b>194</b> |
| <b>Références .....</b>  | <b>195</b> |
| <b>Conclusion générale .....</b>   | <b>198</b> |



# Liste des figures et schémas

Figure 1-1 - Diagrammes de Pourbaix

Figure 1-2 – Définition du potentiel et de l'intensité de corrosion

Figure 1-3 - Schéma distinguant la corrosion généralisée de la corrosion localisée

Figure 1-4 - Schéma décrivant le phénomène de corrosion uniforme d'un alliage

Figure 1-5 - Schéma présentant le transfert des électrons au sein de la membrane cytoplasmique bactérienne

Figure 1-6 – « Electron tower »

Figure 1-7 - Schémas extraits des travaux de Hirose et al [14] présentant les différentes voies cataboliques de transferts extracellulaires des électrons par *Shewanella oneidensis* MR-1 en fonction du potentiel de l'électrode alors considérée comme accepteur terminal d'électrons

Figure 1-8 - Figure reprise de Lovley [18] présentant les différents modes bactériens de transferts extracellulaires des électrons vers une électrode

Figure 1-9 - Image de nanofils conducteurs

Figure 1-10 - Modèle proposé par Liu et al [38] pour l'absorption du fer chez *Shewanella oneidensis*

Figure 1-11 - Corrosion influencée par la présence de microorganismes

Figure 1-12 - Modèle de croissance d'un biofilm bactérien

Figure 1-13 - Représentation schématique du transport d'électron chez *Shewanella oneidensis* lorsque le Fe(III) est utilisé comme accepteur terminal en condition anaérobie

Figure 2.1 – Semi-transparence des nanofilms de fer et visualisation des bactéries sur la surface

Figure 2-2 – Evaporateur à effet Joule

Schéma 2-1 – Schéma représentant le système bicouche fer/verre pour le calcul des coefficients de Fresnel

Figure 2.3 – Coefficient de réflexion et de transmission et absorption d'une couche de 10 nm de fer déposée sur du verre

Figure 2-4 – Détermination du coefficient d'absorption du nanofilm de fer

Figure 2-5 – Schéma présentant le principe de la mesure par réflectivité X

Figure 2-6 – Spectre de réflectivité X et extraction de la valeur de l'épaisseur du nanofilm de fer pour le système monocouche

Figure 2-7 – Schéma présentant le dispositif de microscopie à force atomique

Figure 2-8 – Données typiques extraites par AFM

Figure 2-9 – Cartographie de la surface du nanofilm de fer obtenue par microscopie à force atomique

Figure 2-10 – Homogénéité de la surface du nanofilm de fer.

Figure 2-11 – Schéma du dispositif expérimental de spectrométrie photoélectronique X

Figure 2-12 – Résultats des mesures obtenues par spectroscopie photoélectronique X

Figure 2-13 – Schéma présentant le montage de mesure à quatre points de la résistivité électrique.

Figure 2-14 – Dépendance de la résistance électrique en fonction de l'épaisseur du nanofilm de fer

Figure 2-15 – Modélisation reprise de l'article de Boamah et al [59] présentant la structure d'un nanofilm de fer

Figure 3-1 – Présentation des mutants de *S. oneidensis*.

Tableau 3-1 – Tableau récapitulatif présentant l'ensemble des bactéries étudiées aux cours des expériences de biocorrosion

Figure 3-2 - Schéma du montage utilisé pour réaliser les mesures optiques.

Figure 3-3 – Relation entre tension aux bornes de la photodiode et transmittance optique

Figure 3-4 – Vérification de la relation d'additivité des densités optiques

Figure 3-5 – Courbes d'étalonnage du montage de mesure optique

Figure 3-6 – Vérification de la fiabilité de l'étalonnage

Figure 3-7 - Schéma du montage utilisé pour réaliser les mesures électriques

Figure 3-8 - Chambre de culture utilisée sur le microscope optique

Figure 3-9 – Observation des bactéries au microscope optique inversé à contraste de phase au grossissement 40 x sur une lame de verre

Figure 3-10 - Chambre de culture bi-compartmentée

Figure 3-11 : Schéma présentant le montage de mesures optiques combiné au montage de mesures électriques

Figure 3-S1 – Description d'une photodiode

Figure 4-1 – Observation de la dégradation du nanofilm de fer au microscope optique inversé

Figure 4-2 – Observation de la dégradation du nanofilm de fer via le montage optique macroscopique

Figure 4-3 – Vitesse de dégradation du nanofilm de fer

Figure 4-4 – Variation temporelle du signal OCP au cours de la dégradation du nanofilm de fer

Figure 4-5 – Intensité électrique et potentiel de corrosion d'une feuille épaisse de fer

Figure 4-6 – Variation temporelle de l'intensité électrique au cours de la dégradation du nanofilm de fer

Figure 4-7 – Vitesse de dégradation du nanofilm de fer en présence de mesures électriques.

Figure 4-8 – Relation de dérivation entre l'intensité électrique et l'épaisseur du nanofilm de fer

Figure 4-9 – Influence de la surface et de l'épaisseur du nanofilm de fer sur  $t_{onset}$  et la vitesse de corrosion

Figure 4-10 – Variation temporelle de la concentration en dioxygène au fond de l'échantillon

Figure 4-11 – Variation temporelle du pH local au voisinage du nanofilm de fer

Figure 4-12 – Influence de la densité optique de l'inoculum sur le déclenchement de la corrosion

Figure 4-13 – Influence du surnageant et du contact bactérie-nanofilm sur le déclenchement de la corrosion

Figure 4-14 – Influence de la présence d'un gel agar au contact de la surface du nanofilm sur le déclenchement de la corrosion

Figure 4-15 – Influence de deux états physiologiques des bactéries sur  $t_{onset}$  et la vitesse de corrosion

Figure 4-16 – Cinétique de réduction du Fe(III) en condition anaérobie stricte

Figure 4-17 - Cinétique de réduction du Fe(III) en condition statique aérobie

Figure 4-18 – Influence de l'ajout de Fe(III) soluble sur le déclenchement de la corrosion

Figure 4-19 – Influence de différentes bactéries sur la corrosion du nanofilm de fer

Figure 4-20 – Vitesse de corrosion du nanofilm de fer pour différentes bactéries

Figure 4-21 – Visualisation des bactéries à la surface du nanofilm de fer pour différents temps d'incubation

Figure 4-22 - Détail du traitement d'images utilisé pour extraire la densité surfacique en bactéries

Figure 4-23 – Variation temporelle de la densité surfacique en bactéries

Figure 4-24 – Variations temporelles de la densité de surface bactérienne au contact du nanofilm de fer

Figure 4-25 – Densité surfacique bactérienne à l'instant  $t = t_{onset}$  en fonction du temps de déclenchement de la corrosion  $t_{onset}$

Figure 4-26 – Comparaison de vitesses instantanées des bactéries dans un milieu fraîchement oxygéné et juste après le déclenchement de la corrosion

Figure 4-27 - Visualisation des bactéries (ou d'une partie de leur surface) restant immobiles au cours du temps

Figure 4-28 – Analyse quantitative de l'immobilité des bactéries basée sur l'étude d'une fonction de localisation

Figure 5-1 - Présentation du montage de mesures de charges de surface sur la membrane de la bactérie *Rhodococcus wratislaviensis*

Figure 5-2 – Instrumentation permettant les mesures électriques par microscopie à force atomique

Figure 5-3 - Densité surfacique en bactéries permettant le repérage de bactéries isolées

Figure 5-4 - Cartographies des bactéries à la surface de la lame d'ITO obtenues par microscopie à force atomique à l'issue du premier protocole de simple mise en contact des bactéries avec la surface du substrat

Figure 5-5 - Description du montage micro-fluidique

Figure 5-6 - Etalonnage du débit volumique de la pompe

Figure 5-7 - Suivi de l'évolution de la densité de surface en bactéries au sein du canal microfluidique

Figure 5-8 - Inhomogénéité de la densité de surface en bactéries au sein du canal micro-fluidique

Figure 5-9 - Cartographies des bactéries à la surface de la lame d'ITO obtenues par microscopie à force atomique à l'issue du protocole de micro-fluidique

Figure 5-10 - Cartographies typiques de la surface de la lame d'ITO obtenues par microscopie à force atomique lorsque les bactéries ne sont pas correctement adhérees

Figure 5-11 – Chronoampérométrie

Figure 5-12 - Cartographies des bactéries à la surface de la lame d'ITO obtenues par microscopie à force atomique à l'issue de l'application d'un potentiel positif sur le substrat conducteur



# Introduction générale

L'épuisement des sources d'énergie fossile et la pollution grandissante de notre écosystème nous poussent à l'urgente nécessité de concevoir des outils nous permettant de retrouver une empreinte écologique compatible avec la biocapacité de la Terre.

Face à cette demande, l'électromicrobiologie a suscité une attention particulière partagée par la communauté des physiciens et microbiologistes. Issue de l'observation de la capacité d'une communauté bactérienne (biofilm) [8] à produire un courant électrique, cette discipline repose sur l'étude de la capacité des microorganismes à céder (organismes exoélectrogènes) ou capter (organismes électrotrophiques) des électrons situés à l'extérieur de leur cellule [10]. La découverte de cette propriété remarquable des microorganismes a ouvert tout un nouveau champ de recherche, tant fondamentale, qu'appliquée à la création de biopiles, à la catalyse de réactions chimiques conduisant à la fabrication de molécules chimiques plus viables écologiquement ou encore à la bioremédiation de polluants tel que l'uranium [18].

Bien que des avancées significatives aient été opérées dans ces domaines, la diversité des mécanismes biologiques mis en jeu au cours de ces transferts extracellulaires d'électrons rend complexe le développement de systèmes, à forts rendements électrochimiques, utilisables à grande échelle. Dans ce contexte, ce travail de thèse propose d'étudier expérimentalement les processus impliqués au cours de l'électroactivité bactérienne par une approche à la fois pluridisciplinaire (interface physique-chimie-biologie) et multi-échelle (du nanoscopique au macroscopique).

Pour cette étude, la bactérie Gram-négatif anaérobie facultative *Shewanella oneidensis* MR-1 a été choisie. Cette bactérie exoélectrogène présente une versatilité respiratoire et métabolique particulièrement diversifiée. Elle est notamment connue pour sa capacité à réduire les oxydes ferriques par respiration extracellulaire en condition anaérobie (bactérie ferri-réductrice) [92]. De plus, l'interaction de *S. oneidensis* avec le fer ne se limite pas à cette réduction externe. En effet, elle a également besoin d'assimiler le fer pour le fonctionnement optimal de ces processus biologiques (synthèse d'ADN, transport et stockage de l'oxygène, production des hèmes dans les cytochromes ...). L'existence de ces deux voies d'interaction avec le fer nous conduit à nous interroger sur la façon dont elle est capable de corroder le fer. En effet, un lien direct existe entre le phénomène de dégradation influencée par la présence de microorganismes (CIM) et l'électroactivité. Cette étude constitue la majeure partie du travail de thèse présenté ici.

Le premier chapitre est une introduction bibliographique consacrée à la définition et à la mise en contexte des différents termes présents dans le titre du manuscrit, à savoir électroactivité bactérienne, biocorrosion et fer. Une présentation détaillée des mécanismes d'interaction

bactéries/fer ainsi que les différentes voies utilisées pour le transfert extracellulaire des électrons sera effectuée, particulièrement sur la bactérie *S. oneidensis*.

Les chapitres 2 à 4 se focalisent sur l'étude de la biocorrosion du fer. L'objectif est ici de comprendre l'origine de l'initiation de la corrosion : quelles sont les étapes de la dégradation du métal, quels phénomènes se déroulent à sa surface. De plus, la biocorrosion étant souvent associée à la formation d'un biofilm et une corrosion par piqûres, nous nous sommes demandé s'il était possible que des bactéries isolées induisent une corrosion homogène du fer. Pour répondre à ces questions, nous proposons une approche originale consistant à utiliser des nanofilms de fer (10 nm d'épaisseur). Leur semi-transparence permet de visualiser conjointement, in situ et en temps réel, le comportement des bactéries au cours du processus de corrosion et la dégradation de la couche de fer qui en résulte. Ces nanofilms étant thermiquement évaporés au laboratoire, le chapitre 2 se focalise sur leurs caractérisations physique et chimique, surfacique et volumique, via différentes techniques d'analyses complémentaires (XPS, réflectivité X, AFM, résistivité électrique et absorbance optique). Le chapitre 3 décrit, lui, les différents outils mis en place pour caractériser le phénomène de biocorrosion de ces nanofilms : montage permettant des mesures optiques macroscopiques couplées à des mesures électriques et dispositif pour mener des observations au microscope optique. Enfin le chapitre 4 présente les différents résultats obtenus et notamment l'influence de différents paramètres physiques, chimiques ou biologiques sur le déclenchement de la corrosion du fer.

Le dernier chapitre présente des résultats préliminaires visant à cartographier les transferts de charge à la surface des bactéries à l'échelle nanométrique via un microscope à force atomique. Ce dispositif permettrait, en effet, de visualiser à une autre échelle les différentes voies de transfert extracellulaire des électrons développées par les bactéries et notamment les processus directs comme la formation de nanofils ou d'appendices cellulaires conducteurs. Ce dispositif nécessite une adhésion préalable des bactéries à un substrat conducteur. Les différents protocoles testés (utilisation d'une cellule micro-fluidique, application d'un potentiel positif à la surface du substrat) seront ici décrits.



# Chapitre 1

## Introduction bibliographique

Ce chapitre est dédié à la présentation et à la mise en contexte de chacun des termes présents dans le titre de ce manuscrit à savoir électroactivité bactérienne, biocorrosion et fer. Il commence par rappeler quelques aspects thermodynamiques et cinétiques de la corrosion abiotique du fer. Dans un second temps, l'origine de l'électroactivité bactérienne sera discutée et les différentes voies de transferts extracellulaires des électrons vers un substrat solide seront précisées. Dans un troisième temps, on s'intéressera aux divers mécanismes mis en place par les bactéries pour interagir avec le fer qui est un élément central au bon fonctionnement du métabolisme bactérien. Enfin nous connecterons l'ensemble de ces trois parties par la description du phénomène de biocorrosion et notamment l'implication des bactéries et de la formation de biofilm sur ce processus. Une sous-partie sera dédiée à la bactérie *Shewanella oneidensis* sur laquelle notre étude a principalement été menée.

## I. Introduction à la corrosion abiotique du fer

### 1. Définition de la corrosion chimique du fer

La corrosion est définie par la norme ISO 8044 [1] comme étant « l'interaction physicochimique entre un métal et son milieu environnant entraînant des modifications dans les propriétés du métal et pouvant conduire à une dégradation significative de la fonction du métal, du milieu environnant ou du système technique dont il fait partie ». Cela se traduit par le couplage de deux réactions électrochimiques :

- L'oxydation anodique du métal M conduisant à la formation d'un cation métallique  $M^{n+}$  thermodynamiquement plus stable dont la structure peut prendre différentes formes (hydroxyde, oxyhydroxyde, ionique...). Cette perte d'électrons du métal est symbolisée via une demi-réaction d'équation  $M \rightarrow M^{n+} + ne^-$ .
- La réduction cathodique (gain d'électrons) d'équation de demi-réaction du type :  $Ox + ne^- \rightarrow R$  avec Ox/R un couple oxydant/réducteur présent dans le milieu environnant. En milieu aqueux, les phénomènes cathodiques les plus fréquemment rencontrés correspondent à : la réduction du proton  $H^+$  (ou  $H_3O^+$ ) en milieu acide d'équation de demi-réaction  $2 H^+ + 2 e^- \rightarrow H_2$  ou, sous la forme hydratée  $2 H_3O^+ + 2 e^- \rightarrow H_2 + 2 H_2O$  (équivalent à  $2 H_2O + 2 e^- \rightarrow H_2 + 2 HO^-$  i.e. l'autoprotolyse de l'eau) ou à la réduction de l'oxygène dissous dans des milieux aérés (neutres ou basiques) via la demi-réaction d'équation :  $\frac{1}{2} O_2 + H_2O + 2 e^- \rightarrow 2 HO^-$  écrite ici en milieu basique.

Au cours de la dissolution anodique du métal, des ions métalliques sont relargués dans le milieu environnant (électrolyte) et les électrons produits circulent dans le métal solide conducteur vers le site de réduction cathodique. La corrosion implique la présence de multiples réactions électrochimiques à la surface du métal où les sites superficiels anodiques et cathodiques, spatialement séparés, polarisent le métal et génèrent des champs électriques suffisamment importants pour conduire le déplacement des électrons au travers du conducteur.

Dans le cas de la corrosion du fer dans un milieu liquide à un pH = 6.5, la réaction anodique met en jeu le couple Fe/  $Fe^{2+}$  associé à la demi-réaction d'équation :  $Fe \rightarrow Fe^{2+} + 2 e^-$ . En milieu aqueux et basique, le fer (alors réducteur le plus fort) va réagir avec l'eau (oxydant le plus fort) conduisant à la réaction-bilan écrite en milieu basique d'équation :



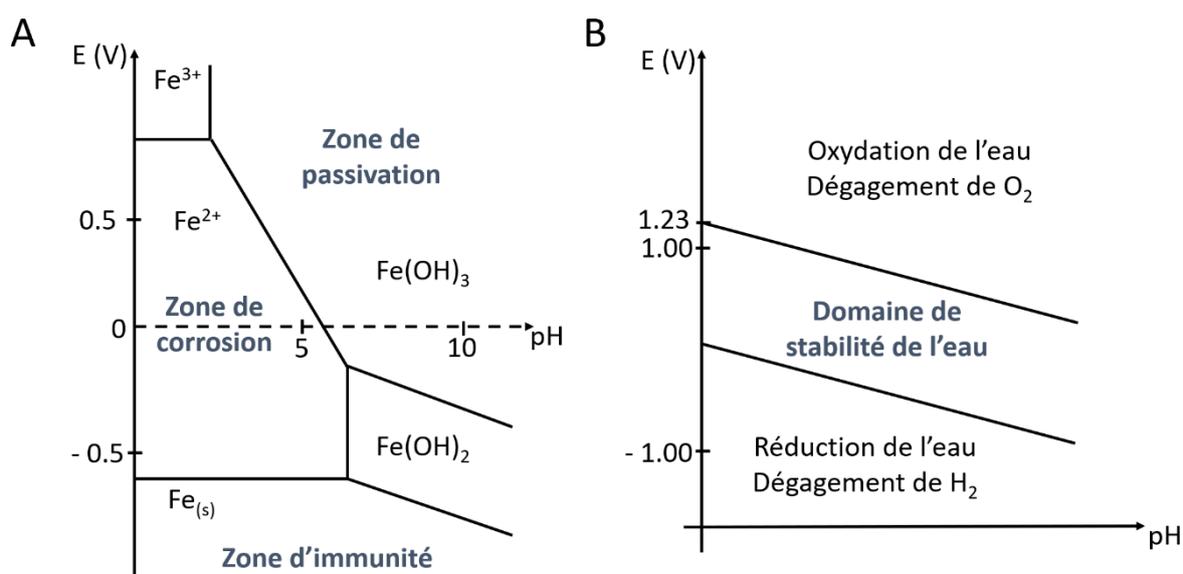
Si les conditions le permettent (pH basique par exemple), une couche passive composée d'oxydes et/ou d'hydroxydes ( $Fe(OH)_2$ ,  $Fe(OH)_3$ ) peut se former à la surface du métal. Cette dernière, imperméable à l'oxygène et adhérente, va alors le protéger et limiter le phénomène de corrosion (cinétique de dégradation du Fe(0) quasi nulle). Tant que l'oxydant est présent dans le milieu et que cette couche dite passive n'est pas formée, la réaction de corrosion se poursuit jusqu'à épuisement du métal.

## 2. Aspects thermodynamiques des réactions électrochimiques

Thermodynamiquement, chaque demi-réaction est associée à un potentiel électrique appelé potentiel de demi-électrode. Ce dernier peut être calculé par la loi de Nernst donnée par :

$$E = E^\circ + \frac{RT}{n_e F} \ln\left(\frac{\prod_O a_O^{v_O}}{\prod_R a_R^{v_R}}\right)$$
 où  $E^\circ$  est le potentiel standard du couple redox étudié,  $R$  la constante des gaz parfaits,  $T$  la température,  $F$  la constante de Faraday,  $n_e$  le nombre d'électrons échangés,  $a_O$  et  $a_R$  les activités des espèces oxydantes et réductrices mises en jeu et  $v_O$  et  $v_R$  leurs nombres stœchiométriques [2].

En milieu aqueux, ce potentiel peut dépendre de la concentration en ions  $H^+$  et donc du pH. Afin de regrouper cette relation entre le potentiel de Nernst et le pH pour un élément donné à différents degrés d'oxydation, un diagramme E-pH appelé diagramme de Pourbaix est tracé. Il permet de visualiser la stabilité d'une espèce chimique en fonction du pH à l'équilibre thermodynamique. Le diagramme de Pourbaix simplifié du fer, présenté sur la Figure 1-1.A, est tracé en supposant un équilibre thermodynamique avec un milieu liquide et une concentration en fer égale à  $10^{-6}M$ . On constate qu'en milieu aqueux, selon les valeurs de pH et de potentiels, trois domaines peuvent être distingués : un domaine d'immunité où le fer métallique (Fe) est thermodynamiquement stable, des domaines dits de corrosion où les produits de corrosion stables sont sous forme ionique ( $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ) et des domaines dits de passivation où les produits de corrosion stables sont cette fois sous forme d'oxydes/hydroxydes ( $Fe_2O_3$ ,  $Fe_3O_4$ ,  $Fe(OH)_2$ ,  $Fe(OH)_3$  ...). Comme nous l'avons évoqué dans la partie précédente, la réaction cathodique la plus fréquemment rencontrée lors d'une corrosion est celle de l'eau ou du dioxygène. En superposant ce diagramme de Pourbaix à celui de l'eau, il est possible de prévoir les réactions thermodynamiquement favorables à une valeur de pH donnée si ces derniers présentent des domaines disjoints (Figure 1-1.B).



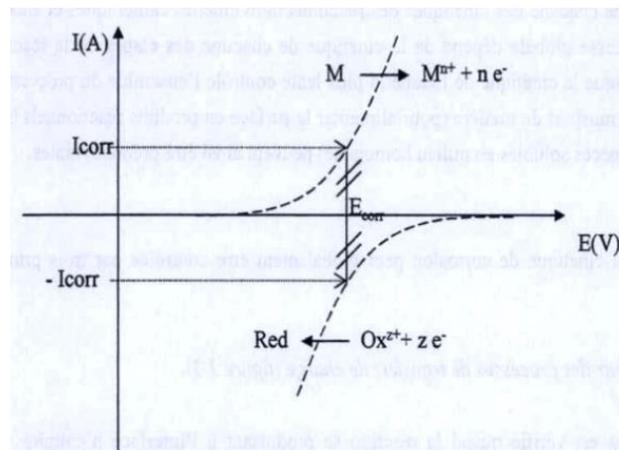
**Figure 1-1 - Diagrammes de Pourbaix** extraits de [2] à 25°C (A) Diagramme simplifié du fer (avec  $[Fe] = 10^{-6} M$ ) (B) Diagramme pour les couples de l'eau.

Notons que la différence de potentiel entre le potentiel de demi-électrode de la cathode et celui de l'anode donne le potentiel de la cellule. Plus la différence de potentiel est grande plus la corrosion sera favorisée thermodynamiquement. Nous sommes donc en mesure de prévoir l'évolution et la composition finale du système. Toutefois, nous n'avons aucune indication de la cinétique avec laquelle ces réactions vont se faire.

### 3. Aspects cinétiques des réactions électrochimiques

La cinétique d'une réaction électrochimique est reliée à la quantité d'électrons transférée par unité de temps. Deux processus peuvent limiter ce transfert d'électrons : le transfert de charge et le transfert de matière. Le transfert de charge correspond à l'échange électronique au niveau de l'interface entre le métal ou la couche passive, si celle-ci est présente, et le milieu aqueux corrosif. Le transfert de matière décrit lui le transport des réactifs vers l'électrode et des produits vers le milieu réactionnel par diffusion, convection ou migration. Des étapes intermédiaires d'adsorption ou désorption des réactifs ou produits de la surface métallique peuvent avoir lieu [3].

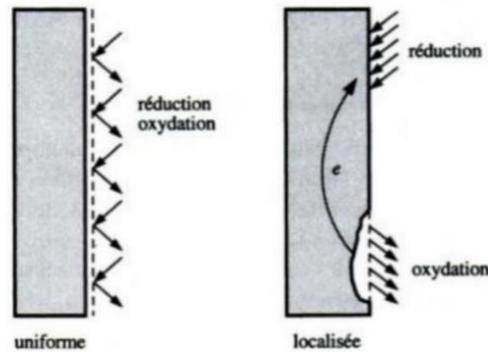
Le potentiel de corrosion libre  $E_{corr}$ , appelé également potentiel mixte ou encore potentiel de circuit ouvert, est le potentiel que prend spontanément une électrode en l'absence de courant circulant dans le circuit extérieur. Cela signifie que, pour cette valeur de potentiel, le courant anodique est égal au courant cathodique alors noté  $I_{corr}$  (Figure 1-2). La valeur du potentiel de corrosion est comprise entre le potentiel maximum de la réaction anodique et minimum de la réaction cathodique correspondant aux potentiels standards des réactions anodique et cathodique modulo d'éventuelles surtensions. Cette valeur d'intensité électrique et donc de vitesse de corrosion est fixée par la réaction la plus lente : c'est le contrôle anodique ou cathodique.



**Figure 1-2 – Définition du potentiel et de l'intensité de corrosion.** *Figure reprise de [3] présentant la variation de l'intensité électrique en fonction du potentiel. Les valeurs d'intensité négatives correspondent à la branche cathodique et les valeurs positives à la branche anodique (oxydation du métal).*

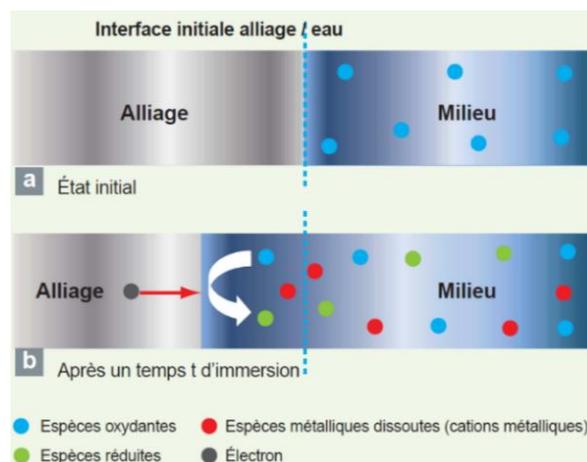
#### 4. Corrosion généralisée ou localisée

On peut distinguer deux modes de corrosion d'un composé métallique (alliage, métal) selon la localisation des sites actifs d'oxydation et de réduction sur la surface du métal : la corrosion dite localisée et la corrosion dite généralisée (Figure 1-3) [4].



**Figure 1-3 - Schéma distinguant la corrosion généralisée de la corrosion localisée.** Figure extraite de [4].

La corrosion uniforme est définie par la norme internationale ISO 8044 comme étant une « corrosion généralisée progressant approximativement à la même vitesse sur l'ensemble de la surface » [5]. Ici, les sites actifs, très proches les uns des autres, sont répartis uniformément sur l'ensemble de la surface : il n'y a pas de localisation préférentielle des sites actifs. Ce type de corrosion induit la diminution régulière de l'épaisseur du métal avec le temps ou la formation d'une couche uniforme passivante d'oxydes, selon la solubilité des produits de corrosion et la structure physico-chimique de la couche d'oxydes (Figure 1-4). Au cours de ce processus, la totalité de la surface du métal est au potentiel de corrosion. C'est le type de corrosion à laquelle une pièce métallique est typiquement soumise en milieu acide. Une pièce de zinc ou de fer en milieu acide subira par exemple une corrosion généralisée.



**Figure 1-4 - Schéma décrivant le phénomène de corrosion uniforme d'un alliage.** Figure extraite de [6] présentant la diminution de l'épaisseur d'un matériau métallique au cours du temps par corrosion uniforme.

La corrosion localisée est quant à elle induite par une répartition inhomogène des sites actifs à la surface du métal : la corrosion n'a lieu qu'en certains points de la surface. Divers modes de corrosions localisées peuvent alors être observés selon l'état de surface du métal et la composition physico-chimique du milieu environnant et du métal (alliages de fer). Parmi eux, on peut citer la corrosion par piqûres, par crevasses, caverneuse ou encore intergranulaire [7]. Par exemple, un acier inoxydable en milieu neutre chloruré subira, le plus souvent, une corrosion par piqûre : la présence de chlorure induit une rupture locale du film passif à l'origine de la formation d'une cavité métastable pouvant soit continuer de croître soit se recouvrir d'un film passif (re-passivation).

## II. L'électroactivité bactérienne

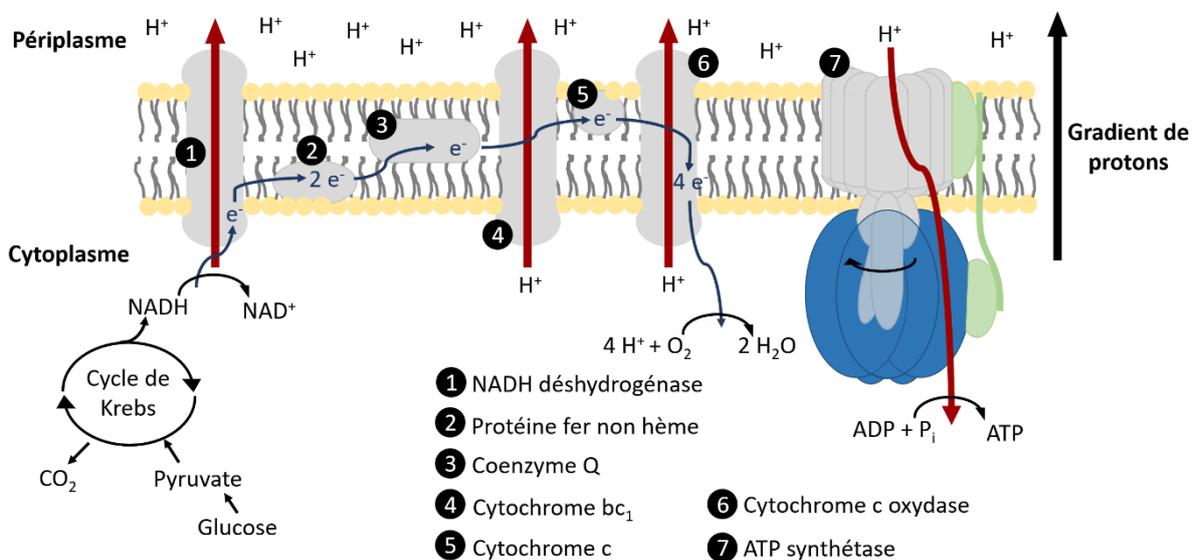
L'électroactivité repose sur la capacité des microorganismes à transférer, c'est-à-dire donner ou capter, des électrons à l'extérieur de leur membrane. Ce phénomène a été découvert par des géomicrobiologistes qui ont constaté l'apparition d'un courant électrique entre deux électrodes en graphite : l'une plongée dans des sédiments marins (anaérobie) et l'autre placée à la surface de l'eau (aérobie). En retirant l'électrode enfouie dans les sédiments, ils se sont alors aperçus qu'un amas, principalement composé de bactéries de type *Geobacter*, l'avait colonisée. Les bactéries étaient donc à l'origine de l'apparition d'un courant électrique [8]. Cette découverte a conduit à l'émergence d'une nouvelle discipline, l'électromicrobiologie, où de nombreuses avancées ont eu lieu grâce notamment à l'étude des piles microbiennes [9]. L'électroactivité ne concerne pas uniquement les bactéries mais également les archées et les eucaryotes. On appelle les microorganismes capables de transférer les électrons à l'extérieur de leur membrane des exoélectrogènes et ceux qui captent les électrons des électrotrophes [10]. Dans cette partie, nous nous focaliserons sur les bactéries. Nous discuterons de l'origine de ces électrons et les différents modes de transferts extracellulaires d'électrons seront présentés.

### 1. Respiration cellulaire et électroactivité bactérienne

Deux grands groupes de réactions chimiques peuvent avoir lieu chez les bactéries : celles conduisant à la fabrication de nouvelles molécules (assimilation) nécessitant de l'énergie (anabolisme) et celles conduisant à la fabrication de cette énergie (catabolisme) via la dégradation de composés organiques ou inorganiques (dissimilation). La respiration cellulaire correspond à un ensemble de réactions d'oxydoréduction, où la dégradation de composés organiques conduit à la fabrication d'énergie (sous forme d'adénosine triphosphate ou ATP) et d'autres composés organiques ou inorganiques nécessaires aux réactions d'assimilation. Ce processus, se compose de plusieurs étapes dont la représentation simplifiée se rapporte à la chaîne respiratoire mitochondriale (Figure 1-5). Selon l'organisme vivant, la complexité de cette chaîne respiratoire va varier (présence de plusieurs quinones ou métaquinones, de protéines à centre fer-soufre...). Chez certains, elle est même continuellement adaptée selon les conditions environnementales comme chez les bactéries anaérobies facultatives à respiration obligatoire (versatilité respiratoire).

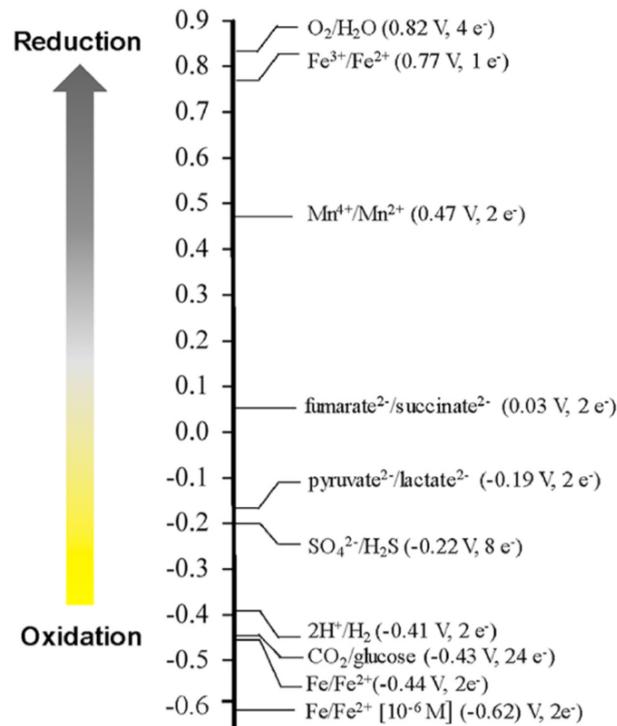
La chaîne respiratoire, chez les organismes organotrophes, commence par l'oxydation des molécules organiques, telles que le glucose (glycolyse), qui sont ensuite intégrées au cycle de Krebs où elles seront transformées en  $\text{CO}_2$  par oxydations successives tout en générant de l'ATP. Les électrons libérés lors de ces oxydations peuvent être captés par des coenzymes (transporteurs d'électrons) telles que la  $\text{NAD}^+$ , qui sous forme  $\text{NADH}$ , redonneront ses électrons à un transporteur membranaire de potentiel standard d'oxydo-réduction plus élevé. Les électrons vont alors être transférés d'intermédiaires chimiques en intermédiaires chimiques, tous situés au sein de la membrane cytoplasmique, dans le sens de potentiels standards croissants car thermodynamiquement favorable (Figure 1-6). Ces intermédiaires peuvent être : des flavines, des cytochromes, des composants non hèmes ou encore des

cytochromes oxydases. En aérobie, les électrons vont circuler de la NADH (-320 mV vs ESH) vers une quinone (20 mV vs ESH) puis cyt b (70 mV vs ESH), cyt c (250 mV vs ESH), cyt a (290 mV vs ESH) jusqu'à être cédés à l'accepteur terminal d'électrons le dioxygène  $O_2$  (820 mV vs ESH à pH=7) [11]. Le transfert des électrons au sein de la membrane cytoplasmique induit le pompage de protons du cytoplasme vers le périplasma à l'origine d'un gradient de concentration en ions  $H^+$  de part et d'autre de la membrane cytoplasmique. Lorsque ce gradient est suffisamment important, cette force proton-motrice va permettre la rotation de la partie mobile de l'ATP-synthase à l'origine de la génération d'ATP, assurant ainsi l'apport en énergie nécessaire au bon fonctionnement de la cellule. Notons que plus la différence de potentiel entre le donneur et l'accepteur d'électrons est grande plus le nombre de molécules d'ATP fabriquées sera important.



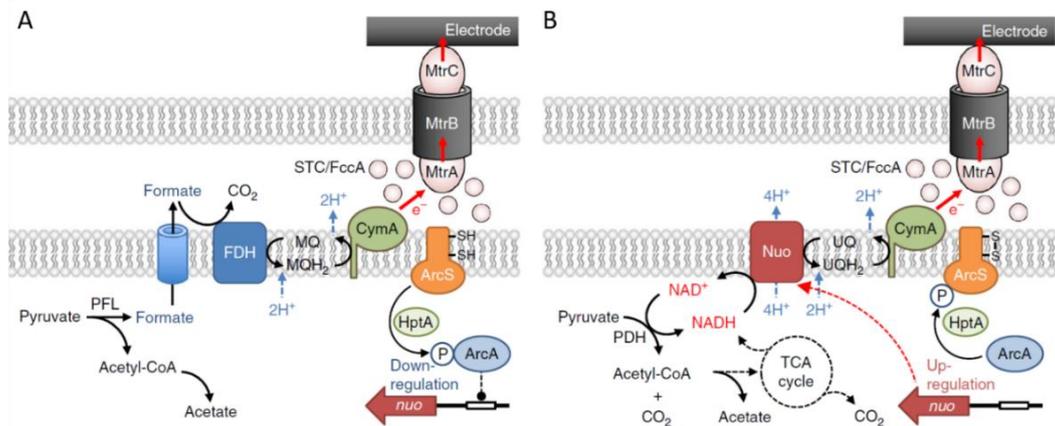
**Figure 1-5 - Schéma inspiré de [12] présentant le transfert des électrons au sein de la membrane cytoplasmique bactérienne.** Ce flux d'électrons induit l'apparition d'un gradient de concentration en ions  $H^+$  de part et d'autre de la membrane cytoplasmique à l'origine de la rotation de la partie mobile de l'ATP-synthétase générant ainsi de l'ATP.

La voie métabolique présentée sur la Figure 1-5 n'est qu'un exemple des nombreuses possibilités de voies de transferts d'électrons possibles chez les bactéries. Ces dernières présentent en effet l'avantage de pouvoir utiliser une multitude de donneurs et d'accepteurs d'électrons différents selon l'environnement dans lequel elles se trouvent. Certaines ont même la capacité de transférer leurs électrons à un accepteur terminal d'électrons situé à l'extérieur de leur cellule : ce sont les bactéries électroactives.



**Figure 1-6 – « Electron tower ».** Figure extraite de [13]. La « tour d'électron » est un outil permettant de visualiser rapidement les différents transferts d'électrons thermodynamiquement favorables au sein de systèmes biologiques. Les valeurs de potentiel sont exprimées par rapport à l'ESH pour un pH = 7 à 25°C.

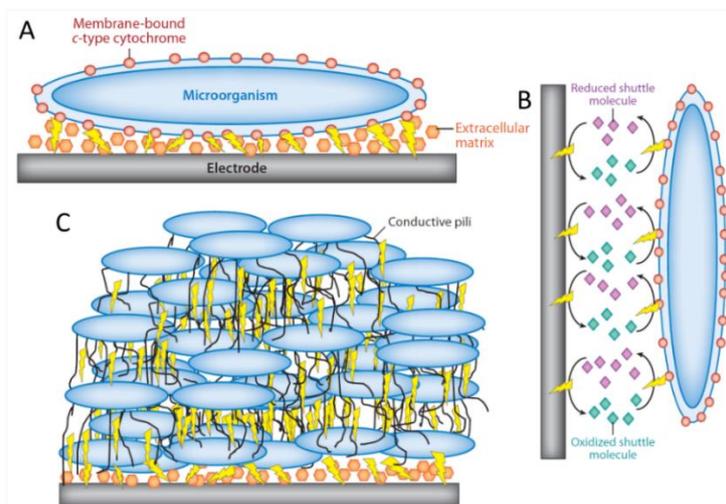
En environnement aérobie, les bactéries vont utiliser le dioxygène comme accepteur terminal d'électrons tandis qu'en condition anoxique, un composé organique ou métallique (par exemple le Fe(III) pour des bactéries ferri-réductrices) pourra notamment être utilisé. Notons que pour les bactéries aérobies facultatives, dès que le dioxygène est présent, celui-ci sera favorisé car il permet la fabrication d'une plus grande quantité d'ATP. Par ailleurs, comme le montrent Hirose et al [14] (Figure 1-7) dans une récente publication, la bactérie *Shewanella oneidensis* MR-1 serait même capable, en anaérobiose, de percevoir le potentiel d'une électrode utilisée comme accepteur terminal d'électrons et d'ajuster sa voie de respiration cellulaire en conséquence. Cet ajustement serait effectué par un système de régulation de l'expression des gènes dont les produits (protéines) sont impliqués dans le transport des électrons (par exemple des déshydrogénases adaptées à une valeur de potentiel donnée). Ces observations soulignent la grande flexibilité des bactéries face aux fluctuations de leur environnement. [15] Cette capacité est à l'origine de leur grande adaptabilité.



**Figure 1-7 - Schémas extraits des travaux de Hirose et al [14] présentant les différentes voies cataboliques de transferts extracellulaires des électrons par *Shewanella oneidensis* MR-1 en fonction du potentiel de l'électrode alors considérée comme accepteur terminal d'électrons. Deux voies catabolisant le pyruvate sont ici présentées (A) Si le potentiel de l'accepteur terminal d'électrons est nul (0 mV) la voie dépendant du formiate sera utilisée. (B) Si le potentiel de l'accepteur terminal d'électrons est plus élevé (+500 mV), les bactéries vont activer la voie NADH.**

## 2. Les différents modes de transfert d'électrons

Nous venons de voir que l'électroactivité bactérienne était intimement liée à leur besoin de respiration cellulaire. En effet, certaines bactéries seront capables de transférer les électrons issus de la dégradation de la matière organique vers des substrats situés à l'extérieur de leur membrane afin de permettre la production d'énergie (ATP). Deux grands types de transferts extracellulaires d'électrons sont proposés dans la littérature : direct et indirect (Figure 1-8). Ces derniers sont notamment étudiés dans le cadre de la réduction par les bactéries d'oxydes métalliques insolubles, impliquant nécessairement un transfert extracellulaire d'électrons [16,17].

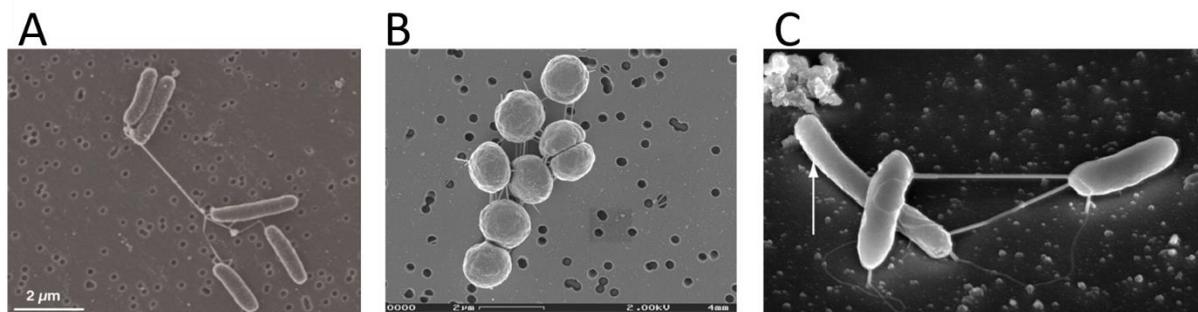


**Figure 1-8 - Figure reprise de Lovley [18] présentant les différents modes bactériens de transferts extracellulaires des électrons vers une électrode. (A) Contact direct de courte**

portée : rôle de protéines électrochimiquement actives situées sur la membrane externe des bactéries, comme les cytochromes de type-c, (B) Rôle de molécules navettes solubles réduites à la surface de la membrane externe qui vont diffuser jusqu'à la surface de l'électrode pour donner leurs électrons, (C) Contact direct à longue portée : rôle des pili conducteurs et de la matrice extracellulaire combiné aux cytochromes.

#### a. Transferts directs

Deux modes de transfert direct des électrons sont utilisés par les bactéries : un de courte portée et un à plus grande portée. Le premier repose sur l'utilisation de protéines situées sur la membrane externe des bactéries : les cytochromes de type-c. Ces derniers sont composés d'une partie protéique à laquelle est reliée, par des liaisons covalentes, une porphyrine complexée à un atome de fer que l'on appelle hème. Le second mode de transfert direct implique des pili ou appendices ou nanofils conducteurs (Figure 1-9). Les propriétés électriques de ces filaments seraient liées à la présence de cytochromes décahèmes de type-c. [19]. D'autres groupes ont également montré la capacité de l'espèce *Geobacter sulfurreducens* à transférer des électrons sur des distances de l'ordre du centimètre grâce à la formation de nanofils. Ces filaments protéiques présenteraient une conductivité similaire à celle des métaux. [20]. Ce mode de transfert est commun à de nombreuses bactéries car il permet un transfert et une distribution efficace des électrons vers le substrat conducteur [21].



**Figure 1-9 - Image de nanofils conducteurs.** Images de microscopie électronique à balayage extraites de l'article de [21] présentant les nanofilms produits par différentes bactéries : (A) Bactérie ferri-réductrice *Shewanella oneidensis* MR-1 (B) Cyanobactérie *Synechocystis* sp. PCC 6803 (C) Coculture des bactéries méthanogènes *Pelotomaculum thermopropionicum* et *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (indiquée par une flèche blanche).

#### b. Transferts indirects

Le transfert indirect des électrons s'effectue via des molécules « navettes » capables de jouer à la fois le rôle d'oxydant et de réducteur. Initialement à l'intérieur de la cellule, ces dernières sont exportées vers la membrane externe sous leur forme oxydée pour se réduire au niveau de la membrane en tant qu'accepteurs finaux d'électrons de la chaîne respiratoire. Elles migrent ensuite sous leur forme réduite vers un substrat conducteur auquel ses électrons seront transférés par oxydation. Le potentiel standard associé à ce couple oxydant/réducteur doit donc être élevé comparé à celui des autres couples oxydoréducteurs présents au sein de la

membrane externe ou dans le périplasme [22]. Certains micro-organismes sont capables de produire leurs propres médiateurs alors appelés médiateurs endogènes. Il s'agit notamment des flavines produites à partir de la riboflavine. La forme la plus communément rencontrée est la flavine mononucléotide particulièrement soluble (de formule  $C_{17}H_{21}N_4O_9P$  et de masse molaire 456 g/mol). Récemment, une molécule similaire aux ménaquinones a été découverte comme molécule navette chez *S. oneidensis* [23]. Ces médiateurs peuvent être recyclés par la bactérie. D'autres études ont montré que l'ajout de médiateurs artificiels (dits exogènes) dans des milieux de culture bactérienne permettait d'enclencher le processus de transfert extracellulaire d'électrons chez des bactéries habituellement non électroactives. C'est le cas d'espèces comme *Escherichia coli* [24], *Pseudomonas* ou encore *Bacillus*. Parmi ces médiateurs exogènes, on peut trouver : la thionine (médiateur anodique) [25], le rouge neutre (médiateurs anodique et cathodique) [24], ou encore des dérivés de la quinone (médiateur anodique) [26].

Notons qu'une espèce bactérienne n'utilisera pas nécessairement l'un ou l'autre de ces deux types de transfert, direct et indirect. Ces deux mécanismes peuvent en effet être conjoints et dépendants des conditions environnementales. Des études rapportent notamment la combinaison d'un transfert direct couplé à un transfert indirect chez la bactérie *Shewanella oneidensis* MR-1 [27].

### III. Interactions bactéries-fer

Les interactions entre les bactéries et les métaux ont fait l'objet de recherches intensives de par leurs nombreuses applications tant dans la biolixiviation (technique visant à purifier à extraire un métal d'intérêt d'un minerai par solubilisation) que dans la décontamination de polluants. En effet, grâce à leur métabolisme, ou à des produits issus de leur métabolisme, certaines bactéries sont capables d'induire la précipitation d'ions métalliques passant alors sous une forme solide plus facile à collecter. *Shewanella oneidensis* MR-1 possède, par exemple, la capacité à réduire l'uranium de sa forme soluble et toxique vers une forme moins soluble. Différents types d'interaction bactérie-métal peuvent avoir lieu : les métaux peuvent précipiter sur les membranes bactériennes [28] ou au contraire être assimilés et concentrés dans la cellule pour ses besoins métaboliques (bioaccumulation). Dans cette partie, nous nous intéresserons plus particulièrement aux interactions des bactéries avec le fer.

#### 1. Rôle prépondérant des procaryotes dans le cycle biogéochimique du fer

Le fer est considéré comme étant le quatrième élément le plus abondant [29] que l'on retrouve, dans la croûte terrestre, principalement sous forme ferrique (Fe(III)) ou ferreuse (Fe(II)). Les liens entre l'histoire de la terre, le fer, et l'évolution de la vie commencent à être compris [30] et dans la plupart des environnements, il est connu que les procaryotes jouent un rôle prépondérant dans le cycle géochimique du fer [31].

Devenu peu disponible, car majoritairement présents sous forme d'oxydes de Fe(III) et Fe(II) faiblement solubles à pH neutre suite à la Grande Oxydation, les bactéries ont dû développer de nouvelles voies pour parvenir à exploiter le fer [2]. En effet, cet élément est un composant essentiel au bon fonctionnement de nombreux processus biologiques tels que le transport de l'oxygène, la synthèse d'ADN ou de protéines impliquées dans la respiration cellulaire (cytochromes, hydrogénases). Exceptées les bactéries *Lactobacillus plantarum* et *Borrelia burgdorferi*, connues pour avoir remplacé le fer par du manganèse ou du cobalt, toutes les bactéries répertoriées contiennent et ont besoin d'un nombre d'atomes de fer cellulaire important [32,33]. Typiquement, le nombre d'atomes de fer estimé chez *E. coli* varie selon le milieu de culture entre  $10^3$  et  $10^6$  atomes/cellule [34]. Ce problème de disponibilité est un facteur de croissance limitant pour de nombreux organismes vivants adaptés à un mode de vie dans des milieux neutres, ces derniers étant alors soumis à un stress nutritionnel [35]. Toutefois, une concentration intracellulaire en fer trop élevée peut aussi être toxique à cause de la catalyse de la réaction de Fenton à l'origine de la production de radicaux hydroxyles [36]. Il est donc important que l'homéostasie du fer soit correctement régulée chez les bactéries. Dans le cas du genre *Shewanella*, la régulation se fait (au moins en partie) par l'intermédiaire de la protéine Fur qui se lie au fer ferreux et réprime de nombreux opérons impliqués dans l'acquisition du fer. Toutefois, le rôle de Fur dépasse la simple régulation du fer puisque son rôle dans la régulation de la respiration d'accepteurs d'électrons autres que l'oxygène a notamment été mis en évidence [37].

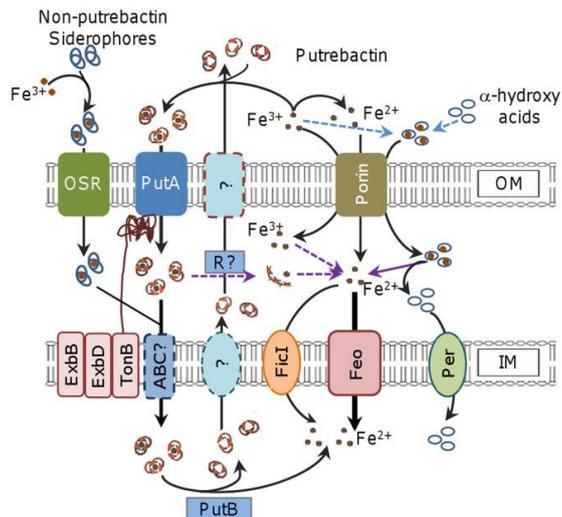
Si la plupart des cellules vivantes assimilent le fer pour leur fonctionnement optimal (homéostasie), des organismes procaryotes, tels que les bactéries ferri-réductrices, sont

capables d'utiliser le Fe(III) présent dans leur environnement comme accepteur terminal d'électrons de leur chaîne respiratoire. Au contraire, pour les bactéries ferro-oxydantes, c'est le Fe(II) qui peut jouer le rôle de donneur d'électrons tant en milieu aérobie qu'anaérobie. Cette diversité de mécanismes se répartit sur l'ensemble des phyla bactériens et archéens soulignant le caractère ancien de cette interaction fer/bactéries. Chacunes des deux parties suivantes se focalisent sur d'une part les mécanismes d'assimilation du fer et d'autre part sur ceux mis en place pour la respiration du fer.

## 2. Mécanismes bactériens développés pour l'absorption du fer

Depuis la période de la grande oxygénation, les organismes vivants ont évolué et développé différentes voies permettant d'assimiler efficacement le fer de leur environnement : 1) diminuer le pH externe pour augmenter sa solubilité, 2) produire des molécules chélatrices (molécules organiques solubles de faible poids moléculaire ayant une grande affinité avec le fer) telles que les sidérophores ou la ferritine capables respectivement de se complexer avec le Fe(III) externe ou de stocker le fer interne, 3) réduire l'état d'oxydation du Fe(III) vers des molécules plus solubles de Fe(II) grâce à des enzymes ferri-réductrices.

Penchons-nous sur la production des sidérophores chez *Shewanella oneidensis* MR-1 (Figure 1-10). Cette espèce sécrète un sidérophore appelé putrêbactine pouvant se complexer avec le fer ferrique situé à l'extérieur de la bactérie. Une fois le complexe formé, ce dernier est reconnu par un récepteur spécifique situé sur la membrane externe nommé PutA. Ce transporteur, TonB dépendant, est ensuite activé par le complexe protéique TonB, ExbB, ExbD, permettant le passage du complexe putrêbactine-fer dans le périplasme. L'entrée dans le cytoplasme est, elle, contrôlée par un transporteur ABC encore inconnu. Enfin une ferrique réductase, nommée PutB, va réduire le Fe(III) en Fe(II) libérant ainsi la putrêbactine et rendant le fer ferreux utilisable par la cellule comme pour son inclusion dans les hèmes par des ferrochélatases [38]. Le sidérophore peut être recyclé ou bien dégradé [33, 39] On retrouve cette production de sidérophores en milieu pauvre en Fe(III) chez les bactéries du genre *Pseudomonas*. Notons que le système Feo, caractérisé chez de nombreuses autres espèces bactériennes [40] joue également un rôle important dans l'import du fer ferreux chez *Shewanella*. En effet, une publication récente montre que le double mutant *feo-putA* n'est viable qu'en présence d'une quantité importante de Fe<sup>2+</sup> dans le milieu de culture tandis que l'impact des délétions simples *feo* et *pub/put* est plus faible [41]. De plus, en présence d'une concentration importante en Fe<sup>2+</sup> dans le périplasme, la protéine FicI (Ferrous iron and cobalt importer) soutient le système Feo [42].



**Figure 1-10 - Modèle proposé par Liu et al [38] pour l'absorption du fer chez *Shewanella oneidensis*.**

### 3. Mécanismes bactériens développés pour la respiration du fer

Les bactéries peuvent interagir avec le fer pour leur catabolisme soit par oxydation (bactéries ferro-oxydantes) soit par réduction (bactéries ferri-réductrices). Chacun de ces deux modes d'interaction nécessite le développement de mécanismes spécifiques que nous allons ici détailler [43].

#### a. Dissimilation oxydative : $\text{Fe}^{2+}$ comme source d'électrons

Dans le cas des bactéries ferro-oxydantes, le principal problème réside dans la compétition de leur processus oxydatif avec l'oxydation thermodynamiquement favorable du  $\text{Fe(II)}$  en  $\text{Fe(III)}$  en milieu oxygéné à pH neutre. Face à cette contrainte, les bactéries ont mis en place divers mécanismes.

Premièrement, une croissance en environnement anaérobie où l'oxydation du  $\text{Fe(II)}$  est couplée à la réduction du nitrate [44]. Initialement de nombreuses bactéries ont été décrites comme appartenant à ce groupe. Toutefois, la capacité des bactéries à catalyser ou non l'oxydation du  $\text{Fe(II)}$  via la production d'enzymes a conduit à distinguer les bactéries chimiodénitrificatrices des nitrate-réductrices-ferro-oxydantes. Ainsi, seule une souche bactérienne semble réellement pouvoir être placée dans la catégorie des nitrate-réductrices-ferro-oxydantes [44-46]. Cette oxydation anaérobie du  $\text{Fe(II)}$  est également possible chez les bactéries photosynthétiques grâce à la présence d'un opéron codant pour des cytochromes de type-c similaires au cytochrome MtrA chez *Shewanella oneidensis* MR-1 [47].

Bien qu'énergétiquement peu favorable, l'oxydation du fer ferreux est plus communément effectuée dans des conditions suboxiques [44]. Les bactéries se localisent alors dans une zone où la pression partielle en dioxygène est suffisamment faible pour assurer la stabilité du  $\text{Fe}^{2+}$  et permettre son oxydation bactérienne.

Une ancienne stratégie proposée reposait sur l'acidification, par les bactéries, de leur environnement ( $\text{pH} < 4$ ) pour garder le Fe(II) sous une forme soluble stable [48]. L'oxydation du Fe(II) pouvait alors être couplée à la réduction du dioxygène. Toutefois, cette hypothèse a rapidement été écartée car énergétiquement défavorable pour la bactérie. En effet, l'énergie produite par l'oxydation du  $\text{Fe}^{2+}$  et alimentant le métabolisme bactérien est inférieure à l'énergie nécessaire à la bactérie pour acidifier le milieu.

Soulignons que ces processus ferro-oxydatifs participent activement à l'apport de fer ferrique dans le cycle géochimique du fer.

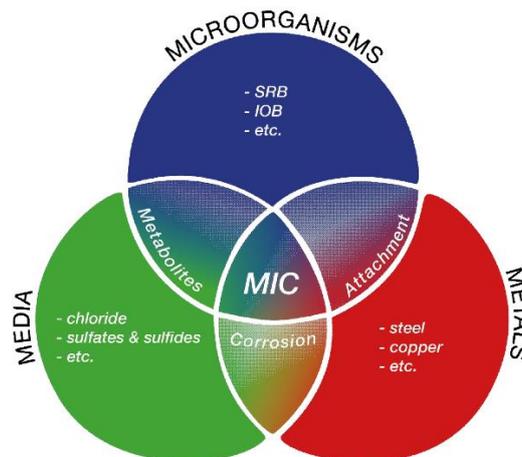
b. Dissimilation réductrice :  $\text{Fe}^{3+}$  comme accepteur terminal d'électrons

Les bactéries ferri-réductrices sont, elles, capables de réduire le fer ferrique en fer ferreux pour les besoins énergétiques de leur respiration cellulaire en anaérobiose [49]. Le Fe(II) produit n'est pas nécessairement assimilé par les bactéries qui peuvent se contenter du processus de dissimilation pour assurer ou maintenir leur croissance. Notons qu'en présence de dioxygène, les bactéries ferri-réductrices aérobie facultative, comme *Shewanella*, vont favoriser l'utilisation de l' $\text{O}_2$  en tant qu'accepteur terminal d'électrons, car énergétiquement plus favorable (Figure 1-6). Les mécanismes utilisés par les bactéries pour interagir avec le fer ferrique, notamment présent sous forme solide au sein des oxydes de fer, sont les mêmes que ceux décrits dans la partie II.2 assurant le transfert extracellulaire des électrons. Etant également capable de réduire d'autres composés chimiques, tels que les oxydes de manganèse ou encore d'uranium, le nitrate, leur présence dans les sédiments est souvent associée à d'importantes dégradations de la matière organique en environnement anaérobie [50]. Les genres bactériens ferri-réducteurs les plus étudiés à l'heure actuelle, de par leur capacité à produire un courant électrique au sein de biopiles, sont *Geobacter* et *Shewanella* [51].

#### IV. La corrosion du fer influencée par la présence de microorganismes

##### 1. Définition de la corrosion influencée par les microorganismes

La corrosion influencée par les microorganismes (CIM ou MIC en anglais), également appelée corrosion microbienne ou biocorrosion, correspond au phénomène de corrosion électrochimique influencée directement ou indirectement par la présence de microorganismes. Comme schématisé par Little et al (Figure 1-11) [52], ce type de corrosion implique l'interconnexion de trois facteurs : un milieu aqueux favorable au développement et à la croissance microbienne (présence de sources carbonées, d'accepteurs ou de donneurs d'électrons...), un métal immergé dans ce milieu jugé initialement peu corrosif et des microorganismes [53]. Les microorganismes peuvent agir de manière directe - c'est-à-dire par une participation active à la corrosion au travers de contacts directs, de sécrétions de médiateurs (décrits dans la partie II.2) – ou indirecte – via la sécrétion de molécules résultant de leur métabolisme [54]. De par ces interactions, les microorganismes vont induire des modifications physicochimiques de l'environnement situé au voisinage de la surface d'un métal [55]. Ainsi, des réactions de corrosion cinétiquement limitées (mais possibles thermodynamiquement) pourraient être accélérées par la présence de micro-organismes. A l'inverse, des réactions de corrosion thermodynamiquement défavorables hors du milieu bactérien pourraient être favorisées sous l'effet de ces modifications physicochimiques.



**Figure 1-11 - Corrosion influencée par la présence de microorganismes.** Schéma repris de Little et al [53] présentant les trois facteurs inhérents à la biocorrosion : le milieu aqueux, les microorganismes et le métal.

Bien qu'Hamilton et al [56] aient tenté de proposer un mécanisme universel de transfert des électrons au cours de la biocorrosion du fer, la diversité des microorganismes, des conditions environnementales et des matériaux empêche toute généralisation de ce phénomène ou même de définition d'éléments précurseurs au phénomène de biocorrosion.

Rappelons que dans un environnement aérobie, la réaction cathodique sera celle de réduction du dioxygène tandis qu'en environnement anaérobie, la réduction pourra être celle du proton  $H^+$  ou de l'eau à  $pH = 7$  ou encore de  $Fe^{3+}$ ,  $SO_4^{2-}$  s'ils sont présents dans le milieu liquide. L'implication des bactéries sulfato-réductrices sur la biocorrosion du fer a été la première à

être découverte suite à l'observation de dépôt de sulfure de fer sur des structures métalliques corrodées en milieu anaérobie. Ces bactéries ont, par la suite, fait l'objet de recherches intensives. Toutefois d'autres microorganismes sont également responsables du phénomène de biocorrosion. Nous les détaillons ci-après.

## 2. Les bactéries impliquées dans la biocorrosion du fer

De nombreux microorganismes sont impliqués dans la biocorrosion du fer : champignons unicellulaires, archées, bactéries, algues microscopiques [57,58] ... Par exemple, les diatomées sont des microorganismes eucaryotes qui de par leur processus photosynthétique vont alternativement produire des concentrations importantes/faibles de dioxygène selon le cycle jour/nuit. Cette alternance est à l'origine de la corrosion du fer par aération différentielle. Dans cette partie, nous nous focaliserons uniquement sur le rôle des bactéries.

### a. Les bactéries sulfato-réductrices

Les bactéries sulfurogènes sont un groupe de bactéries anaérobies utilisant la réduction de composés sulfurés comme le sulfate  $\text{SO}_4^{2-}$  (bactéries sulfatoréductrices ou BSR), le thiosulfate  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  (bactéries thiosulfatoréductrices ou BTR) ou encore le soufre pour leur besoin énergétique [59-61].

Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer leur rôle dans la biocorrosion du fer, caractérisée par la réaction anodique d'équation  $\text{Fe} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + 2 \text{e}^-$ . Le plus ancien repose sur la théorie de la dépolarisation cathodique [62], c'est-à-dire l'accélération de la corrosion par la consommation du dihydrogène produit par la réaction cathodique d'équation  $8 \text{H}^+ + 8 \text{e}^- \rightarrow 4 \text{H}_2$ . Deux pistes ont été évoquées pour expliquer l'origine de cette consommation de  $\text{H}_2$ . La première pourrait être liée à la présence d'enzymes situées à l'intérieur des bactéries (ou au sein de biofilms) : les hydrogénases. Ces dernières sont en effet capables de catalyser l'oxydation du dihydrogène en ions  $\text{H}^+$  [63]. La seconde concerne l'utilisation du dihydrogène dans la réduction du sulfate comme accepteur terminal d'électrons du métabolisme bactérien via la réaction d'équation :  $4 \text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{S}^{2-} + 4 \text{H}_2\text{O}$ . Toutefois, cette consommation du dihydrogène par les microorganismes comme facteur influençant la biocorrosion du fer est très contestée car la réaction cathodique de réduction de l'eau ou du proton est une réaction très lente, voire irréversible, qui ne peut être influencée par la consommation du dihydrogène produit. Rappelons également que la corrosion est un processus hors équilibre. En effet, d'autres études montrent que des bactéries non sulfatoréductrices mais interagissant avec le dihydrogène ne parviennent pas à enclencher la corrosion du fer [64]. D'autres processus ont donc été proposés. L'observation de la corrosion d'aciers inoxydables en présence d'hydrogénases soulignent le rôle de cette enzyme dans la corrosion mais s'explique ici par l'existence d'un contact direct entre le fer et l'hydrogénase à l'origine d'un transfert direct d'électrons [65,66]. Une autre piste, plus communément acceptée, évoque la formation d'une couche de sulfure de fer  $\text{FeS}$  par réaction des ions  $\text{Fe}^{2+}$  avec les ions  $\text{S}^{2-}$  issus de la dégradation du sulfate [67,68]. Cette couche pourrait induire la formation d'une pile galvanique où le sulfure de fer jouerait le rôle de la cathode et le fer celui de l'anode. Une autre possibilité serait la formation d'une pile par acidification locale : lors de la formation du

FeS, des protons sont libérés et conduisent à une acidification locale de la surface comparativement aux zones sans précipité de FeS [69]. La création de ces piles engendrerait l'apparition de piqûres à la surface du métal. Enfin, la transformation du  $\text{SO}_4^{2-}$  en  $\text{S}^{2-}$  induit également la formation d'anions corrosifs qui seraient capables d'abaisser la valeur du potentiel de corrosion et de repassivation des piqûres [70].

#### b. Les bactéries acidifiantes

De nombreux acides sont sécrétés au cours du métabolisme bactérien, tant fermentatif que respiratoire, induisant une augmentation de la corrosivité du milieu par diminution du pH. Ce mécanisme n'est pas propre à une catégorie de micro-organismes et concerne la plupart des groupes phylogénétiques. On distingue : les acides organiques, tels que l'acide lactique ou acétique sécrétés par les bactéries fermentaires ou encore ceux du cycle de Krebs (acide formique, maléique, ... [71]), et les acides inorganiques, tels que l'acide sulfurique sécrété par les bactéries sulfato-oxydantes [72].

#### c. Les bactéries oxydantes

Parmi les bactéries oxydantes, on distingue ici les bactéries ferro-oxydantes [73] (déjà présentées dans la partie III.3) et mangano-oxydantes [74]. Ces deux types de bactéries ont respectivement la capacité d'oxyder le Fe(II) et le Mn(II) en oxydes de fer et de manganèse stables et insolubles à pH neutre. Si ces oxydes se forment à la surface du fer métallique, ils pourront induire une corrosion sous-dépôt induite par une diminution de la concentration en dioxygène dissous dans le milieu liquide emprisonné entre le dépôt d'oxydes et la surface métallique comparativement à la teneur en dioxygène dissous dans le reste du milieu liquide. Si le potentiel de réduction du dépôt est supérieur au potentiel de corrosion, alors la couche d'oxyde se transforme en cathode et le métal sous la couche d'oxyde se corrode.

#### d. Les bactéries réductrices

Parmi les bactéries réductrices, on compte les bactéries réductrices de nitrate (BRN). Chez ces dernières, l'utilisation des nitrates comme accepteur terminal d'électrons dans leur chaîne respiratoire serait thermodynamiquement favorisée par la combinaison avec l'oxydation du Fe(0) en ions ferreux. En présence d'un biofilm de bactéries réductrices de nitrate, une corrosion par piqûres du métal est alors observée [75].

On retrouve également les bactéries ferri-réductrices déjà présentées dans la partie III.3. Ces dernières sont connues pour induire la corrosion du fer via la dissolution du film d'oxydes de Fe(III) présent à la surface du fer métallique en ions Fe(II) [76]. Toutefois l'effet de ces bactéries sur la corrosion est controversé. En effet, d'autres études montrent que selon les conditions environnementales, les produits issus de la corrosion, inclus dans un biofilm, peuvent former une barrière protectrice au voisinage de la surface empêchant toute diffusion du dioxygène vers la surface et inhibant ainsi la corrosion du fer métallique [77].

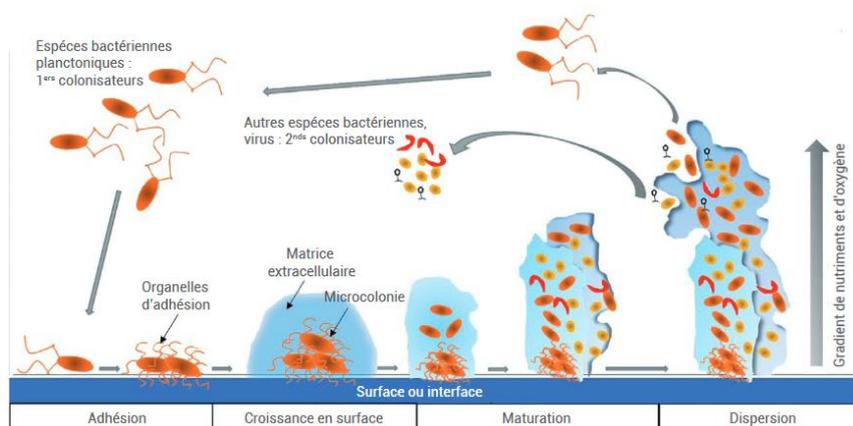
Cette liste de bactéries potentiellement impliqués dans la biocorrosion du fer n'a pas vocation à être exhaustive. Par ailleurs l'ensemble des microorganismes vivent le plus souvent en

syntrophie au sein des environnements naturels influençant ainsi mutuellement leurs métabolismes. Ces derniers sont les plus souvent regroupés au sein d'une matrice polymérique formant alors un biofilm.

### 3. Les biofilms électroactifs

Il existe, chez les microorganismes, deux modes de vie : la vie planctonique, où les organismes restent en suspension dans un milieu liquide, et la vie au sein d'une communauté bactérienne parfaitement organisée et structurée, fixée à une interface, les biofilms [78]. C'est ce second mode de vie qui prévaut au sein des écosystèmes. En effet, ce réseau complexe composé de bactéries (10%) et de biopolymères (90%) confère aux bactéries une résistance aux agents extérieurs (chimiques, climatiques ...) bien supérieure à celle de bactéries isolées [79].

La formation de ce système est généralement décrite comme une succession d'étapes bien particulières (Figure 1-12) [80, 81]. Elle commence par une phase d'adhésion réversible des bactéries à l'aide d'organelles d'adhésion présents sur leur membrane tels que les pilis [82]. Après cette étape surfacique, la croissance va évoluer vers un développement en trois dimensions (structure en « champignon »). Les bactéries vont alors sécréter une matrice polymérique composée majoritairement d'eau et également d'exopolysaccharides, d'ADN, de lipides et de protéines. Cette matrice est à l'origine d'une adhésion souvent irréversible des microorganismes à la surface [83]. Ce phénomène de la maturation du biofilm est associé à l'apparition de canaux, permettant la circulation de nutriments, d'enzymes, de métabolites ou encore du dioxygène au sein de l'agglomérat [84]. Le biofilm présente donc une structure hétérogène pouvant engendrer une hétérogénéité chimique : du fait de la répartition inégale de la biomasse, des gradients de concentration en oxygène, métabolites, composés chimiques organiques ou inorganiques peuvent apparaître au sein des biofilms. Les conditions de transport à l'intérieur du biofilm sont directement ou indirectement dépendantes des conditions hydrodynamiques du liquide environnant [85]. Cette structure polymérique confère au biofilm la rhéologie d'un gel. Au sein du biofilm, les bactéries présentent un phénotype et des caractéristiques physiologiques différents de celui des bactéries planctoniques. De plus, leur proximité au sein du biofilm favorise le transfert horizontal de gènes.



**Figure 1-12 - Modèle de croissance d'un biofilm bactérien.** Figure extraite de la publication [80].

Lorsque le biofilm se développe sur une surface métallique, sa présence peut induire des modifications physico-chimiques locales (pH, concentration en dioxygène) au voisinage de la surface et donc influencer le processus de corrosion [86]. Par ailleurs, des produits issus de la corrosion peuvent être emprisonnés dans la matrice impliquant de nouvelles contraintes environnementales au voisinage du métal. De nombreuses études montrent que la formation d'un biofilm induit une augmentation du potentiel de corrosion (anoblissement) et donc une accélération de la cinétique de réduction associée à une corrosion par piqûres du métal [87]. D'autre part, la distribution inhomogène de la concentration en dioxygène au sein du biofilm peut faire apparaître des poches d'aération différentielle [88]. En consommant l'oxygène pour leur respiration cellulaire, les bactéries peuvent créer un environnement local anaérobie au cœur du biofilm (en supposant que la diffusion de l'oxygène au sein du biofilm soit plus lente que sa consommation par les bactéries). Cette différence de concentration en O<sub>2</sub> va être à l'origine de l'oxydation du métal dans la zone anaérobie. Les électrons alors cédés vont migrer vers une zone aérobie où ils seront utilisés pour la réduction de l'oxygène [89]. Le phénomène inverse est possible pour les bactéries photosynthétiques qui peuvent créer des zones localement riches en dioxygène à l'origine de la passivation du métal.

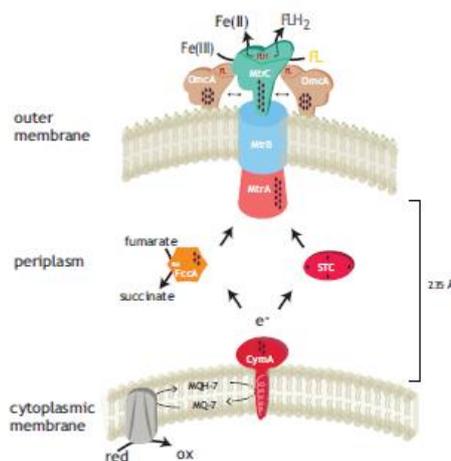
#### 4. *Shewanella oneidensis* MR-1

Notre étude se focalisant particulièrement sur la bactérie *Shewanella oneidensis* MR-1, une présentation détaillée de ses mécanismes de transferts extracellulaires d'électrons est ici proposée. *S. oneidensis* est une bactérie à Gram-négatif aérobie facultative présente dans les milieux aquatiques et les sédiments. Cette bactérie modèle fait l'objet de recherches intensives notamment en raison de ses propriétés électroactives remarquablement diversifiées tant en termes de chaînes respiratoires possibles que de modes de transferts extracellulaires des électrons issus de sa respiration vers un substrat. En effet, elle est capable d'utiliser de nombreux donneurs d'électrons (lactate, glucose, pyruvate, formiate...) [90] et accepteurs finaux d'électrons (oxydes d'uranium, de manganèse, de fer, nitrate...) différents. Cette versatilité respiratoire pourrait provenir du nombre important de gènes codant pour des cytochromes de type-c situés pour la plupart sur la membrane externe [91]. Cette propriété est partagée par d'autres bactéries également connues comme étant particulièrement électroactives : *Geobacter metallireducens*, *Geobacter sulfurreducens* et *Desulfuromonas acetoxidans*.

Diverses voies sont utilisées par *S. oneidensis* pour le transfert extracellulaire de ses électrons (EET). Comme nous l'avons évoqué sur la Figure 1-9, *S. oneidensis* est capable de produire, en condition anaérobie, des nanofils conducteurs d'une centaine de nanomètres permettant le transfert direct d'électrons sur de grandes distances, notamment lorsque les bactéries sont engluées dans un biofilm [19,92]. Toutefois, il a récemment été montré que ces nanofils sont en réalité des excroissances de la membrane externe sur lesquelles des cytochromes de type-c sont présents [93]. Les pili de type IV pourraient également être impliqués dans les mécanismes de l'EET [94]. Des transferts indirects sont également possibles puisque *S. oneidensis* est capable de sécréter des médiateurs endogènes tels que la riboflavine (B2) ou la flavine mononucléotide (FMN) qui contribueraient à 75 % au transfert extracellulaire

d'électrons. [95-97]. Ces molécules navettes diffuseraient librement dans le milieu liquide ou seraient utilisées comme cofacteurs des cytochromes de la membrane externe via la formation de semiquinones [98]. Enfin, dans des conditions d'accepteurs d'électrons limitées, *S. oneidensis* pourrait produire des vésicules navettes contenant le système MtrABC-OmcA [99]. Ce système MtrABC-OmcA est le plus connu et caractérisé des processus de transferts directs d'électrons chez *S. oneidensis* [100]. Il est présenté sur la Figure 1-13. En anaérobiose, les électrons issus de la dégradation de la matière organique sont transportés par la NADH jusqu'à un accepteur d'électrons membranaire (Figure 1-5). Les électrons circulent ensuite dans la membrane interne via un pool de quinones et arrivent jusqu'au cytochrome CymA. Les électrons sont alors transférés au système MtrABC-OmcA (ici via les complexes FccA et STC) puis expulsés de la cellule. Notons qu'en l'absence de donneurs d'électrons, *Shewanella oneidensis* semble capable d'utiliser les cytochromes, non plus pour transférer les électrons vers l'extérieur mais pour les capter vers l'intérieur à l'origine d'une plus grande adaptabilité du biofilm au sein de son environnement [101].

Soulignons que le nombre important de cytochromes couplé à l'ensemble des protéines nécessitant du fer comme cofacteur marquent le besoin important en fer pour *S. oneidensis*.



**Figure 1-13 - Représentation schématique du transport d'électron chez *Shewanella oneidensis* lorsque le Fe(III) est utilisé comme accepteur terminal en condition anaérobie. Figure extraite de [102].**

## Références :

- [1] ISO 8044, « Corrosion des métaux et alliages – Termes principaux et définitions » (2000)
- [2] F. Miomandre, S. Sadki, P. Audebert, R. Méallet-Renault, *Electrochimie : Des concepts aux applications*. Dunod, 3<sup>ème</sup> éd., ISBN 978-2-10-071234-2 (2014).
- [3] J. Sarrazin, M. Verdaguer, *L'oxydoréduction, Concepts et expériences*. Ellipses (1991)
- [4] D. Landolt, *Corrosion et chimie de surfaces des métaux*. PPUR presses polytech., vol. 12 (2003)
- [5] ISO 8044, « Corrosion des métaux et alliages – termes principaux et définitions » (200)
- [6] Commissariat à l'énergie atomique, *Une monographie à la Direction de l'énergie nucléaire : La corrosion et l'altération des matériaux du nucléaire*, ISBN 978-2-281-11368-6 (2010)
- [7] G. S. Frankel, *Pitting Corrosion of metals : a review of the critical factors*. J. Electrochem. S., **145**, 2186-2198 (1998)
- [8] D. R. Bond, D. E. Holmes, L. M. Tender, D. R. Lovley, *Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments*. Science, **295**, 483-485 (2002)
- [9] D.R. Lovley, *Electromicrobiology*. Annu. Rev. Microbiol., **66**, 391-409 (2012)
- [10] B. E. Logan, R. Rossi, A. Ragab, P. E. Saikaly, *Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems*. Nat. Rev. Microbiol., **17**, 307-319 (2019)
- [11] R. K. Thauer, K. Jungermann, K. Decker, *Energy Conservation in Chemotrophic Anaerobic Bacteria*. Bacteriol. Rev., **41**, 100-108 (1977)
- [12] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochimie*. Médecine-Sciences, Flammarion, 6<sup>ème</sup> éd. (2008)
- [13] B. J. Little, J. Hinks, D. J. Blackwood, *Microbially influenced corrosion : Towards an interdisciplinary perspective on mechanisms*. Int. Biodeter. & Biodegrad., **154**, 105062 (2020)
- [14] A. Hirose, T. Kasai, M. Aoki, T. Umemura, K. Watanabe, A. Kouzuma, *Electrochemically active bacteria sense electrode potentials for regulating catabolic pathways*. Nat. Com., **9**, 1-10 (2018)
- [15] S. Luchi et E. C. C. Lin, *Adaptation of Escherichia coli to redox environments by gene expression*. Mol. Microbiol., **9**, 9-15 (1993)
- [16] D. R. Lovley, J. F. Stolz, G. L. Nord, E. J. P. Phillips, *Anaerobic production of magnetite by a dissimilatory iron-reducing microorganism*. Nature, **330**, 252-254 (1987)
- [17] C. R. Myers, K. H. Nealson, *Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor*. Science, **240**, 1319-1321 (1988.)
- [18] D. R. Lovley, *Electromicrobiology*. Annu. Rev. Microbiol., **66**, 391-409 (2012)

- [19] B. E. Logan, *Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells*. Nat. Rev. Microbiol., **7**, 375-381 (2009)
- [20] N. S. Malvankar, M. Vargas, K. P. Nevin, A. E. Franks, C. Leang, B.-C. Kim, D.R. Lovley, *Tunable metallic-like conductivity in microbial nanowire networks*. Nat. Nano., **6**, 573-579 (2011)
- [21] Y. A. Gorby *et al.*, *Electrically conductive bacterial nanowires produced by Shewanella oneidensis strain MR-1 and other microorganisms*. Proc. Nat. Ac. Sci., **103**, 11358-11363 (2006)
- [22] A. K. Shukla, P. Suresh, S. Berchmans, A. Rajendran, *Biological fuel cells and their applications*. Current Science, **87**, 455-468 (2004)
- [23] E. Mevers, L. Su, G. Pishchany, M. Baruch, J. Cornejo, E. Hobert, E. Dimise, C. M. Ajo-Franklin, J. Clardy, *An elusive electron shuttle forms a facultative anaerobe*. eLife, **8**, e48054 (2019)
- [24] D. H. Park, J. G. Zeikus, *Electricity generation in microbial fuel cells using neutral red as an electronophore*. Appl. Env. Microbiol., **66**, 1292-1297 (2000)
- [25] C. Thurston, H. Benneto, G. Delaney, J. Mason, S. Roller, J. Stirling, *Glucose metabolism in a microbial fuel cell stoichiometry of product formation in a thionine mediated Proteus vulgaris fuel cell and its relation to coulombic yields*. J. Gen. Microbiol., **131**, 1393-1401 (1985)
- [26] D. H. Park, B. H. Kim, B. Moore, H. A. O. Hill, M. K. Song, H. W. Rhee, *Electrode reaction of Desulfovibrio desulfuricans modified with organic conductive compounds*. Biotech. Tech., **11**, 145-148 (1997)
- [27] B. H. Kim, H. J. Kim, M. S. Hyun, D. H. Park, *Direct electrode reaction of Fe(III) - reducing bacterium, Shewanella putrefaciens*. Microbiol. and Biotech., **9**, 127-131 (1999)
- [28] I. B. Beech, C. C. Gaylarde, *Recent advances in the study of biocorrosion : an overview*. Revista de Microbiologia, **30**, 117-190 (1999)
- [29] M. Fleisher, *The abundance and distribution of the chemical elements in the earth's crust*. J. Chem. Educ. , **31**, 446-455 (1954)
- [30] M. Ilbert, V. Bonnefoy, *Insight into the evolution of the iron oxidation pathways*. Biochim. Biophys. Acta, **1827**, 161-75 (2013)
- [31] K. A. Weber, L. A. Achenbach, J. D. Coates, *Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction*. Nat. Rev. Microbiol., **4**, 752-64 (2006)
- [32] F. Archibald, *Lactobacillus plantarum, an organism not requiring iron*. FEMS Microbiol. Let., **19**, 29-32 (1983)
- [33] J. E. Posey, F. C. Gherardini, *Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen*. Science, **288**, 1651-1653 (2000)
- [34] S. C. Andrews, A. K. Robinson, F. Rodriguez-Quinones, *Bacterial iron homeostasis*. FEMS Microbiol. Rev., **27**, 215-237 (2003)

- [35] K. Li, W. H. Chen, S. D. Bruner, *Microbial siderophore-based iron assimilation and therapeutic applications*. *Biometals.*, **29**, 377-88 (2016)
- [36] J. A. Imlay, *The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium*. *Nat. Rev. Microbiol.*, **11**, 443-54 (2013)
- [37] H. Fu, L. Liu, Z. Dong, S. Guo, H. Gao, *Dissociation between iron and heme biosyntheses is largely accountable for respiration defects of *Shewanella oneidensis* fur mutants*. *Appl. Env. Microbiol.*, **84**, e00039 (2018)
- [38] D. Qiu *et al.*, *Differential Regulation of the Two Ferrochelatase Paralogues in *Shewanella loihica* PV-4 in Response to Environmental Stresses*. *Appl. Env. Microbiol.*, **82**, 5077-5088 (2016)
- [39] P. Cornelis, *Iron uptake and metabolism in pseudomonads*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **86**, 1637–1645 (2010)
- [40] C. K. Lau, K. D. Krewulak, H. J. Vogel, *Bacterial ferrous iron transport: the Feo system*. *FEMS Microbiol. Rev.*, **40**, 273-298 (2016)
- [41] L. Liu, S. Li, S. Wang, Z. Dong, H. Gao, *Complex Iron Uptake by the Putrebactin - Mediated and Feo Systems in *Shewanella oneidensis**. *Appl. Env. Microbiol.*, **84**, e01752 (2018)
- [42] B.D. Bennett, K. E. Redford, J. A. Gralnick, *MgtE homolog FicI acts as a secondary ferrous iron importer in *Shewanella oneidensis* strain MR-1*. *Appl. Env. Microbiol.*, **84**, e01245 (2018)
- [43] L.J. Bird, V. Bonnefoy, D.K. Newman, *Bioenergetic challenges of microbial iron metabolisms*. *Trends in microbiology*, **19**, 330-340 (2011)
- [44] A. Kappler, C. Bryce, M. Mansor, *An evolving view on biogeochemical cycling of iron*. *Nat Rev Microbiol*, **19**, 360-374 (2021)
- [45] M. Etique, F. Jorand, A. Zegeye, *Abiotic process for Fe(II) oxidation and green rust mineralization driven by a heterotrophic nitrate reducing bacteria (*Klebsiella mobilis*)*, *Environmental science & technology*, **48**, 3742-3751 (2014)
- [46] M. Blothe, E. E. Roden, *Composition and Activity of an Autotrophic Fe(II) - Oxidizing, Nitrate-Reducing Enrichment Culture*. *Appl. Env. Microbiol.*, **75**, 6937-6940 (2009)
- [47] L. R. Croal, Y. Jiao, D. K. Newman, *The fox Operon from *Rhodobacter* Strain SW2 Promotes Phototrophic Fe(II) Oxidation in *Rhodobacter capsulatus* SB1003*. *J. Bacteriol.* **189**, 1774-1782 (2007)
- [48] S. Hedrich, M. Schlomann, D. B. Johnson, *The iron-oxidizing proteobacteria*. *Microbiology*, **157**, 1551-1564 (2011)
- [49] S. C. Neubauer, D. Emerson, J. P. Megonigal, *Life at the Energetic Edge: Kinetics of Circumneutral Iron Oxidation by Lithotrophic Iron-Oxidizing Bacteria Isolated From the Wetland-Plant Rhizosphere*. *Appl. Env. Microbiol.*, **68**, 3988-3995 (2002)

- [50] E. J. Roekens, R. Van Grieken, *Kinetics of iron(II) oxidation in seawater of various pH*. Marine Chemistry **13**, 195-202 (1983)
- [51] K. O. Konhauser, A. Kappler, E. E. Roden, *Iron in Microbial Metabolisms*. Elements, **7**, 89-93 (2011)
- [52] A. L. Neal, K. M. Rosso, G. G. Geesey, Y. A. Gorby, B. J. Little, *Surface structure effects on direct reduction of iron oxides by Shewanella oneidensis*. Geoch. Cosmoch. Acta **67**, 4489-4503 (2003)
- [53] D. R. Lovley, D. E. Holmes, K. P. Nevin, *Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction*. In *Advances in microbial physiology*. Academic Press, 219-286 (2004)
- [54] B. J. Little, D. J. Blackwood, J. Hinks, F. M. Lauro, E. Marsili, A. Okamoto, S. A. Rice, S. A. Wade, H.-C. Flemming, *Microbially influenced corrosion – Any progress?* Corros. Sci., **170**, 108641 (2020)
- [55] D. Féron, C. Compère, I. Dupont, M. Magot, *Biodétérioration des matériaux métalliques ou biocorrosion*. In *Corrosion des métaux et alliages*. Lavoisier Science, Techniques & Documentations, France, 385-405 (2002)
- [56] A. Bergel, *Recent advances in electron transfer between biofilms and metals - Biohydrometallurgy: from the Single Cell to the Environment*. Adv. Mat. Sci., **20-21**, 329-334 (2007)
- [57] I. B. Beech, J. A. Sunner, K. Hiraoaka, *Microbe–surface interactions in biofouling and biocorrosion processes*. Intern. Microbiol., **8**, 157-168 (2005)
- [58] W. A. Hamilton, *Microbially influenced corrosion as a model system for the study of metal microbe interactions: a unifying electron transfer hypothesis*. Biofouling, **19**, 65-76 (2003)
- [59] M. Vastra, *Etude de la biocorrosion d'un ouvrage d'art en eau saumâtre : cas du pont du Larivot*. PhD thesis. Université des Antilles, France (2015)
- [60] N. Chabert, *Conception de biocathode et implication du fer dans de nouveaux modes de transfert d'électrons*. PhD thesis. Aix Marseille Université, France (2017)
- [61] E. E. Roden, D. R. Lovley, *Dissimilatory Fe(III) reduction by marine microorganism Desulfuromonas acetooxidans*. Appl. Env. Microbiol., **59**, 734-742 (1993)
- [62] I. B. Beech, *Sulfate reducing bacteria in biofilms on metallic materials and corrosion*. Microbiolog. Today, **30**, 115-117 (2003)
- [63] E. Malard, D. Kervadec, O. Gil, Y. Lefevre, S. Malard, *Interactions between stainless steel and sulphide producing bacteria - Corrosion on carbon steels and low-alloy steels in natural sea water*. Electrochem. Acta, **54**, 8-13 (2008)
- [64] R. D. Bryant, E. J. Laishley, *The role of hydrogenase in anaerobic biocorrosion*. Can. J. Microbiol. **36**, 259-264 (1990)

- [65] E. A. Abd El Meguid, N. A. Mahmoud, V. K. Gouda, *Pitting corrosion behaviour of AISI 316L steel in chloride containing solutions*. British Corrosion Journal, **33**, 42-48 (1998)
- [66] K. Mori, H. Tsurumaru, S. Harayama, *Iron corrosion activity of anaerobic hydrogen-consuming microorganisms isolated from oil facilities*. J. Biosci. Bioeng., **110**, 426-430 (2010)
- [67] S. Da Silva, R. Basseguy, A. Bergel, *The role of hydrogenases in the anaerobic microbiologically influenced corrosion of steels*. Bioelectrochem., **56**, 77-79 (2002)
- [68] M. Mehanna, *Mécanismes de transfert direct en corrosion microbienne des aciers : Application à Geobacter sulfurreducens et à l'hydrogénase de Clostridium acetobutylicum*. PhD Thesis. Université de Toulouse, France (2009)
- [69] C. Remazeilles, D. Neff, F. Kergourlay, E. Foy, *Mechanisms of long-term anaerobic corrosion of iron archaeological artefacts in seawater*. Cor. Sci., **51**, 2932-2941 (2009)
- [70] C. A. H. Von Wolzogen Küfir, L. S. Van Der Vlugt, *Graphitization of cast iron as an electrochemical process in anaerobic soil*. Water, **18**, 147-165 (1934)
- [71] F. Mercier-Bion, J. Li, H. Lotz, L. Tortech, D. Neff, P. Dillmann, *Electrical properties of iron corrosion layers formed in anoxic environments at the nanometer scale*. Cor. Sci. **137**, 98-110 (2010)
- [72] J.-L. Crolet, S. Dumas, J. Crousier, *Biocorrosion : régulation du pH par les bactéries sulfato-réductrices*. Matériaux et techniques, **80**, 71-77 (1992)
- [73] J. M. Burns, E. E. Staffeld, and O. H. Calderon, *Corrosion caused by organic acids reacting with three metals with special emphasis on Krebs citric acid cycle acids*. Dev. Ind. Microbiol., **8**, 327-331, (1969)
- [74] B. J. Little, J. S. Lee, *Causative Organisms and Possible Mechanisms*. In *Microbiologically influenced corrosion*. Wiley series in Corrosion, New Jersey, 22 – 55 (2007)
- [75] M. Ilbert, V. Bonnefoy, *Insight into the evolution of the iron oxidation pathways*. Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics, **1827**, 161-175 (2013).
- [76] P. Linhardt, *Microbially influenced corrosion of stainless steel by manganese oxidizing microorganisms*. Mat. Cor., **55**, 158-163 (2004)
- [77] D. Xu, Y. Li, F. Song, T. Gu, *Laboratory investigation of microbiologically influenced corrosion of C1018 carbon steel by nitrate reducing bacterium Bacillus licheniformis*. Cor. Sci., **77**, 385-390 (2013)
- [78] R. Javaherdashti *et al.*, *Fuzzy prediction of corrosion resistance of duplex stainless steel to biotic iron reducing bacteria and abiotic synthetic seawater environments: A phenomenological approach towards a multidisciplinary concept*. Int. J. Electrochem. Sci, **7**, 12573-12586 (2012)

- [79] M. Dubiel, C. H. Hsu, C. C. Chien, F. Mansfeld, D. K. Newman, *Microbial iron respiration can protect steel from corrosion*. Appl. Env. Microbiol., **68**, 1440-1445 (2002)
- [80] R. Chmielewski, J. F. Frank, *Biofilm formation and control in food processing facilities*. Comprehensive Review in Food Science and Food Safety, **2**, 22-32 (2002)
- [81] H.-C. Flemming, J. Wingender, *The biofilm matrix*. Nat. Rev. Microbiol., **8**, 623-633 (2010)
- [82] C. Douarche, V. Bailleux, C. Even, J-M. Allain, C. Regeard, E. Raspaud, *La mécanique des biofilms à la surface de liquides*. Reflets de la Physique, **56**, 20-24 (2018)
- [83] S. Lecuyer *et al.*, *Focus on the physics of biofilms*. New J. Phys., **17**, 030401 (2015)
- [84] M. C. Duvernoy *et al.*, *Asymmetric adhesion of rod-shaped bacteria controls microcolony morphogenesis*. Nat. Commun., **9**, 1120 (2018)
- [85] G. G. Geesey, Z. Lewandowski, H.-C. Flemming, *Biofouling and Biocorrosion in industrial water systems*. Lewis Publishers, Chelsea, Michigan (1994)
- [86] I. W. Sutherland, *The biofilm matrix – An immobilized but dynamic microbial environment*. Trends Microbiol. **9**, 222-227 (2001)
- [87] D. Herbert-Guillou, B. Tribollet, D. Festy, *Influence of the hydrodynamics on the biofilm formation by mass transport analysis*. Bioelectrochem., **53**, 119-125 (2001)
- [88] F. A. Lopes *et al.*, *Interaction of Desulfovibrio desulfuricans biofilms with stainless steel surface and its impact on bacterial metabolism*. J. Appl. Microbiol., **101**, 1087-1095 (2006)
- [89] N. Acuña, B. O. Ortega-Morales, A. Valadez-González, *Biofilm colonization dynamics and its influence on the corrosion resistance of austenitic UNS S31603 stainless steel exposed to Gulf of Mexico Seawater*. Marine Biotech., **8**, 62-70 (2006)
- [90] S. B. Borenstein, *Microbiologically Influenced Corrosion Handbook*. Industrial Press Inc. Edition, New York (1994)
- [91] C. C. Gaylarde and H. A. Videla, *Localised corrosion induced by a marine vibrio*. International Biodeterioration, **23**, 91-104 (1987)
- [92] J. K. Fredrickson *et al.*, *Towards environmental systems biology of Shewanella*. Nat. Rev. Microbiol, **6**, 592-603 (2008)
- [93] T. E. Meye *et al.*, *Identification of 42 possible cytochrome C genes in the Shewanella oneidensis genome and characterization of six soluble cytochromes*. OMICS, **8**, 57-77 (2004)
- [94] El-Naggar *et al.*, *Electrical transport along bacterial nanowires from Shewanella oneidensis MR-1*. Proc. Nat. Ac. Sci., **107**, 18127-18131 (2010)
- [95] S. Pirbadian *et al.*, *Shewanella oneidensis MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components*. Proc. Nat. Ac. Sci. U.S.A., **111**, 12883-12888 (2014).

- [96] L. A. Fitzgerald *et al.*, *Shewanella oneidensis* MR-1 Msh pilin proteins are involved in extracellular electron transfer in microbial fuel cells. *Process Biochem.*, **47**, 170-174 (2012)
- [97] E. Marsili *et al.*, *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proc. Nat. Ac. Sci. U.S.A.*, **105**, 3968-3973 (2008)
- [98] H. Von Canstein, J. Ogawa, S. Shimizu, J. R. Lloyd, *Secretion of flavins by Shewanella species and their role in extracellular electron transfer*. *Appl. Env. Microbiol.*, **74**, 615-623 (2008)
- [99] N. J. Kotloski, J. A. Gralnick, *Flavin Electron Shuttles Dominate Extracellular Electron Transfer by Shewanella oneidensis*. *mBio*, **4** (2013)
- [100] P. Subramanian, S. Pirbadian, M. Y. El-Naggar, G. J. Jensen. *Ultrastructure of Shewanella oneidensis MR-1 nanowires revealed by electron cryotomography*. *Proc. Nat. Ac. Sci. U.S.A.*, **115**, E3246-E3255 (2018)
- [101] S. Xu, Y. Jangi, M. Y. El-Naggar, *Disentangling the roles of free and cytochrome bound flavins in extracellular electron transport from Shewanella oneidensis MR-1*. *Electrochimica Acta*, **198**, 49-55 (2016)
- [102] A. Okamoto, R. Nakamura, K. Hashimoto, *In-vivo identification of direct electron transfer from Shewanella oneidensis MR-1 to electrodes via outermembrane OmcA-MtrCAB protein complexes*. *Electrochimica Acta*, **56**, 5526-5531 (2011)
- [103] A. R. Rowe *et al.*, *Tracking electron uptake from a cathode into Shewanella cells: implications for energy acquisition from solid-substrate electron donors*. *mBio*, **9**, e02203 (2018)
- [104] S. Beblawy, T. Bursac, C. Paquete, R. Louro, T. A. Clarke, J. Gescher, *Extracellular reduction of solid electron acceptors by Shewanella oneidensis*. *Mol. Microbiol.*, **109**, 571-583 (2018)



## Chapitre 2

# Caractérisation physique et chimique des nanofilms de fer

Les nanofilms - ou films ultrafins - sont des matériaux d'épaisseur nanométrique aux propriétés électriques, optiques ou thermiques particulièrement intéressantes. Contrairement aux études des processus de biocorrosion habituellement menés sur des échantillons massifs, nous avons choisi de mettre à profit la transparence partielle des nanofilms de fer déposés sur une lamelle de verre qui s'avèrent suffisamment stables pour suivre les premières modifications de surface ainsi que le comportement des bactéries sur ou au voisinage du fer au cours des premières étapes de ce processus de biocorrosion. Après avoir présenté la méthode de préparation de ces nanofilms de fer, du lavage au dépôt par évaporation thermique, la caractérisation physico-chimique des nanofilms sera discutée. Des mesures de spectrométrie photoélectronique X, de microscopie à force à atomique, de résistivité, d'absorption optique ou encore de réflectivité X permettront notamment de détailler la rugosité de la surface du nanofilm de fer ainsi que sa composition chimique.

## I. Contexte et objectifs

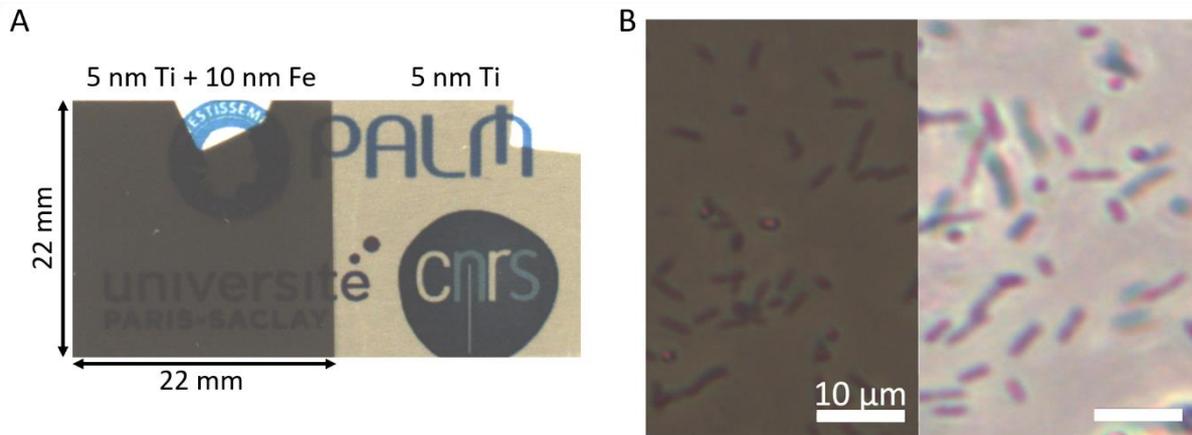
La découverte de la formation de films fins métalliques par déposition cathodique dans les années 1850 [1] constitue le préambule à d'importantes avancées dans les domaines de la micro-électronique, de l'optique ou encore de l'aviation [2,3]. L'intérêt pour les films fins tant métalliques que diélectriques (oxydes par exemple) repose sur leurs propriétés mécanique, thermique, électrique ou encore optique particulièrement intéressantes [4]. Prenons l'exemple de la carlingue des avions thermiquement protégée par quelques micromètres d'oxydes dont la propriété d'isolant thermique est ici exploitée [5]. Ces films fins sont également utilisés dans les revêtements optiques anti-reflets, les transistors [6] ou les cellules solaires [7]. La formation naturelle de fines couches d'oxydes rend aussi biocompatible les implants médicaux en titane (formation d'une fine couche d'oxyde de titane sur sa surface [8]) et confère une certaine résistance à la corrosion des métaux (formation d'une couche passive [9]).

Les recherches sur les films fins se limitent à une certaine gamme d'épaisseurs : typiquement entre quelques dixièmes de nanomètres et quelques dizaines de nanomètres. La définition d'un film fin est donnée par : « matériau solide et homogène, contenu entre deux plans parallèles étendus à l'infini selon deux directions (x,y) et restreints selon le troisième axe z, perpendiculaire au plan x-y ». L'épaisseur du film correspond alors à sa projection selon l'axe z. Les films fins sont classifiés selon leurs épaisseurs moyennes : les films ultrafins (de 0.1 à 10 nm), les films fins (de 10 à 100 nm) et les films plus épais (supérieure à 100 nm) [10].

Dans le cadre de notre étude sur le phénomène de biocorrosion du fer, nous avons choisi de mettre à profit ces films ultrafins pour tenter d'observer, in situ et en temps réel, les premières modifications de surface ainsi que le comportement des bactéries sur ou au voisinage de la surface lors des premières étapes de ce processus. En effet, les mesures sont habituellement menées sur des échantillons massifs, et donc très absorbants et de coefficients de réflexion faibles, empêchant toute observation de la surface lors des premières étapes de la dégradation du fer. En diminuant l'épaisseur du substrat, nous augmentons ainsi le coefficient de réflexion et diminuons l'absorption du matériau, permettant ainsi une observation de la surface par transmission optique dès la mise en contact des bactéries avec le métal. Une observation par réflexion serait également possible et donnerait accès à des informations supplémentaires notamment l'évolution de la structure du nanofilm (variation d'épaisseur de la couche d'oxyde par exemple). La mesure par transmission présente les avantages de pouvoir être mise en place à l'aide d'outils simples et de pouvoir suivre, simultanément à la dégradation du nanofilm, le comportement des bactéries dans le volume et sur la surface du nanofilm.

Nous avons choisi d'utiliser des nanofilms de fer de 10 nm d'épaisseur. En effet, ils présentent l'avantage d'être suffisamment transparents pour pouvoir effectuer des observations au microscope optique tout en mesurant une lumière transmise sur une grande gamme d'intensités lumineuses [11-13]. C'est ce que nous pouvons constater sur la Figure 2-1 où une image du nanofilm est présentée. A gauche, le substrat se compose d'une lamelle de verre sur laquelle une couche de titane (5 nm d'épaisseur) puis une couche de fer a été déposée (10 nm d'épaisseur). A droite, le substrat se compose uniquement d'une couche de titane de 5 nm

d'épaisseur déposée sur une lamelle en verre. On constate clairement que ces échantillons sont semi-transparents. De plus, une observation par microscopie optique inversée (Figure 2-1.B) montre également que les bactéries sont parfaitement discernables que le substrat soit composé du nanofilm de fer de 10 nm d'épaisseur (image de gauche) ou du verre (image de droite).



**Figure 2.1 – Semi-transparence des nanofilms de fer et visualisation des bactéries sur la surface.** (A) A gauche, image du nanofilm gris et semi-transparent de 10 nm d'épaisseur de fer déposé sur une pré-couche de titane de 5 nm d'épaisseur avec pour substrat initial une lamelle en verre. A droite, le nanofilm de 5 nm de titane seul sur du verre (B) Images prises au microscope optique inversé en mode contraste de phase. Les bactéries localisées à la surface ou au voisinage du métal (image de gauche) ou du verre (image de droite) sont facilement repérées.

Ce chapitre est dédié à la caractérisation physico-chimique du nanofilm de fer par différentes techniques optique, électrique et spectroscopique complémentaires : spectrométrie photoélectronique X, microscopie à force à atomique, résistivité, absorption optique et réflectivité X. Nous commencerons par la description de la préparation des échantillons et notamment du mode de dépôt utilisé, puis nous détaillerons les techniques utilisées et présenterons les résultats obtenus notamment sur la rugosité de la surface et sa composition chimique.

## II. Préparation des nanofilms de fer

Les techniques utilisées pour le dépôt des couches minces se divisent en deux catégories, celles impliquant un processus physique (vaporisation, sublimation directe d'atomes ou de molécules du matériau que l'on souhaite déposer) et celles impliquant un processus chimique (passage par des réductions, des décompositions chimiques pour obtenir le matériau à déposer avant condensation sur le substrat). La première catégorie, moins contraignante, est la plus employée pour le dépôt de couches minces. Elle se scinde elle-même en de nombreuses sous-catégories dont font partie le dépôt par évaporation ou par pulvérisation [14,15]. C'est cette première technique que nous avons choisie d'utiliser et qui sera détaillée dans la suite de cette partie.

Par ailleurs, les propriétés physiques et chimiques des nanofilms finalement obtenus vont grandement dépendre des paramètres choisis pour le dépôt : composition du substrat (matière, propriétés mécaniques ou électriques), vitesse de dépôt, composition de l'environnement de dépôt (niveau de vide, impuretés...), géométrie de la chambre (inclinaison du porte échantillon, distance source/nanofilm) ou encore des conditions de stockage post-dépôt [16-18]. C'est pourquoi, nous proposons d'explicitier, dans la suite de cette partie, le protocole de lavage des lames ainsi que l'ensemble des paramètres expérimentaux choisis.

### 1. Technique de dépôt utilisée : l'évaporation thermique sous vide

L'évaporation thermique sous-vide est un procédé de dépôt de couches minces dans lequel un matériau source, initialement solide ou liquide, composé de l'élément que l'on souhaite déposer est chauffé jusqu'à passer sous forme gazeuse. L'enceinte de dépôt étant mise sous vide, les atomes ou les molécules gazeuses alors émises possèdent un grand libre parcours moyen et migrent jusqu'au substrat avec peu (ou pas) de collisions sur les molécules de gaz présentes entre la source et le substrat. Détaillons chacune des étapes de ce processus ainsi que les problèmes soulevés (uniformité du dépôt, présence d'impuretés) avant de présenter les solutions proposées.

#### a. La mise sous-vide de l'enceinte de dépôt

Afin d'éviter au maximum la contamination de l'échantillon (nanofilm de fer) par des impuretés, le dépôt doit avoir lieu dans un environnement de vide élevé ( $10^{-8}$  -  $10^{-10}$  bar) voir d'ultra-vide ( $<10^{-12}$  bar) [19,20]. La vitesse de dépôt va également jouer sur la pureté de l'échantillon final. Celle-ci sont typiquement de l'ordre de 1 à 10 nm.s<sup>-1</sup>. La source pouvant initialement être sous forme solide ou liquide, elle va soit se sublimer soit se vaporiser. Les pressions de vapeur saturante sont typiquement autour de  $10^{-5}$  bar. Par ailleurs, les impuretés ou les contaminants éventuellement adsorbés à la surface de la source et de pression partielle plus basse que celle de la source seront les premiers à être vaporisés.

#### b. Description de la résistance chauffante

Comme son nom l'indique, l'évaporation thermique nécessite le chauffage du matériau source jusqu'à une température permettant sa vaporisation ou sa sublimation. La source peut être soit

vaporisée entièrement soit partiellement jusqu'à ce que l'épaisseur de dépôt souhaitée soit atteinte. Lorsque la température de sublimation ou de vaporisation est inférieure à 1500°C, la technique de chauffage par résistance chauffante est utilisée. Elle consiste à mettre en contact le matériau source avec une surface résistive chauffée par le passage d'un courant d'intensité élevée (supérieure à plusieurs centaines d'ampères) - effet Joule. Dans notre cas, les matériaux sources fusionnent puis se vaporisent. Afin de contenir le matériau source à l'état liquide et de pouvoir continuer à appliquer un chauffage continu, la résistance chauffante est en réalité une nacelle (Figure 2-2.C). Enfin, un refroidissement continu des éléments composant le circuit électrique, à l'exception du creuset, est assuré par une circulation d'eau extérieure afin d'éviter leur sublimation.

c. Mesure de la variation d'épaisseur du dépôt à l'aide d'un oscillateur à quartz

Pour suivre in situ la vitesse de dépôt au cours du temps, un cristal de quartz est utilisé. Le quartz est un matériau piézo-électrique, c'est-à-dire présentant la capacité de se déformer sous l'application d'un champ électrique. L'amplitude de la déformation est alors reliée à l'amplitude de la tension, c'est la caractéristique du piézo-électrique. L'application d'une tension alternative de haute fréquence, grâce à l'ajout de deux électrodes sur deux faces du cristal, va induire la propagation d'une onde acoustique dont la fréquence dépend de ses caractéristiques (orientation cristalline, sa taille, son élasticité...). Comme il possède un grand facteur de qualité, la moindre modification de fréquence de résonance pourra être détectée. Le quartz est disposé au plus près du porte échantillon sur lequel sont disposées les lamelles de verre. Au cours du dépôt, de la matière issue de la source va venir se déposer sur la surface du quartz (en même temps que sur la lamelle de verre) et modifier sa fréquence de résonance. Plus la masse du quartz augmente (lors du dépôt de la couche mince) plus sa fréquence va diminuer selon la relation de Sauerbrey :  $\Delta f = -\frac{2f^2}{S\rho c} \Delta m$  où  $\rho$  est la masse volumique du matériau déposé,  $c$  la célérité de l'onde acoustique établie au sein du quartz et  $S$  la surface recouverte. En calibrant le quartz, c'est-à-dire en lui fournissant l'impédance acoustique (liée aux conditions aux limites) et la densité volumique (liée à la fréquence) du matériau que l'on évapore, la variation de la fréquence de résonance va pouvoir indiquer en temps réel, l'épaisseur de matière déposée sur le substrat. Les modifications dans la fréquence des oscillations permettent de détecter un changement de masse de l'ordre d'un nanogramme par  $\text{cm}^2$ , soit moins d'une nanocouche de matériau [19].

d. Amélioration du dispositif

Afin de contrôler l'enclenchement de la phase de dépôt et de minimiser les contaminations (notamment la vaporisation de polluants) qui viendraient contaminer la surface de la lamelle en verre avant le dépôt, des obturateurs (shutters) sont utilisés. Ces derniers empêchent tout contact direct entre la source et l'échantillon tout au long du processus de fonte puis de vaporisation de la source. Ainsi, la surface de la lamelle en verre n'est mise au contact du faisceau de molécules gazeuses qu'au moment où la vaporisation de la source a eu lieu et que la vitesse de vaporisation est constante.

Par ailleurs, la fonte de la matière source est essentielle avant de passer à la vaporisation car elle permet une vaporisation uniforme de la source. Enfin, les lamelles de verre sont fixées suffisamment loin de la source afin de réduire l'énergie thermique émise par la source.

Comparée aux méthodes de dépôt par pulvérisation, l'évaporation thermique correctement optimisée présente des avantages non négligeables. Peu coûteuse, facile à utiliser, elle permet de réaliser des films homogènes de grande pureté [20]. Par ailleurs, l'énergie cinétique des atomes arrivant sur la surface étant faible, d'éventuels défauts de nucléation ou de dommages sont prévenus [21]. Le dépôt d'une épaisseur de 10 nm évite également la formation d'amas isolés visibles en deçà d'une épaisseur seuil déposée de 3 nm [22,23].

## 2. Protocole de lavage des lamelles de verre

Le nettoyage minutieux de la surface du substrat, soit de la lamelle en verre, est une étape critique pour s'assurer de la parfaite reproductibilité de la mesure, de l'adhésion et du dépôt homogène des nanocouches de fer ou de titane. Les lamelles de verre utilisées sont soit des lamelles de verre de microscope de taille 22x22 mm<sup>2</sup> soit des lamelles un peu plus épaisses pour les observations microscopiques de 25x25 mm<sup>2</sup>.

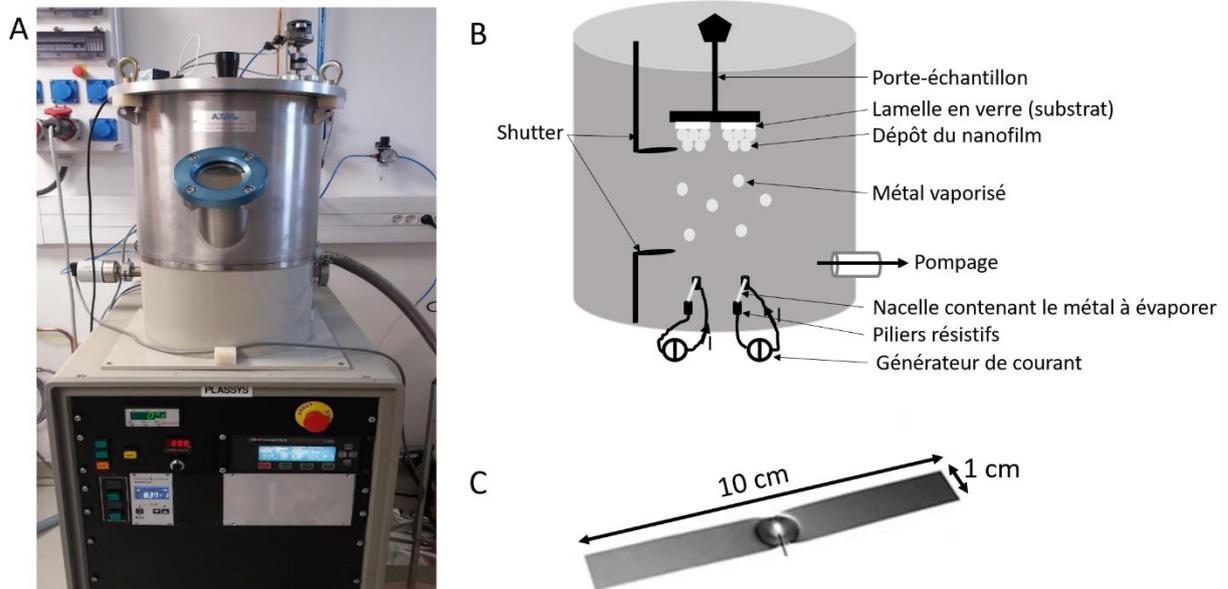
Deux protocoles de nettoyage ont été mis en place et conduisent tous deux au même résultat final. Le premier protocole consiste à immerger dans un bain d'acétone la lamelle de verre puis à la mettre sous sonication pendant une minute. Un rinçage à l'isopropanol est ensuite effectué avant un second bain de sonication dans l'isopropanol. Le séchage des lamelles est finalement réalisé avec de l'azote comprimé. Dans le second protocole, nous frottons manuellement et énergiquement la lamelle de verre avec un coton imbibé de CaCO<sub>3</sub> dissous dans du détergeant RBS (Sigma-Aldrich) dilué à 3% dans de l'eau distillée. La lamelle est ensuite rincée abondamment avec de l'eau ultra-pure et séchée avec de l'air sec comprimé.

## 3. Paramètres choisis pour les évaporations thermiques

Pour réaliser l'évaporation thermique, nous avons choisi comme matériaux sources du titane (Neyco, 99.99%) et du fer (Kurt J. Lesker, 99.95%) de grande pureté. L'évaporateur par effet Joule (Plassys) utilisé pour l'ensemble des dépôts est présenté en Figure 2-2.A et 2-2.B. Les lamelles de verre sont disposées sur le porte échantillon situé juste au-dessus de deux nacelles S9A en tungstène (Neyco) (Figure 2-2.C). L'un contient un petit cylindre solide de fer et l'autre un petit cylindre solide de titane. L'épaisseur du dépôt est contrôlée tout au long de l'évaporation grâce à l'oscillateur à quartz. La vitesse de dépôt est ajustée dans l'intervalle de 0.08-0.12 nm/s. Le dépôt se fait en quelques minutes. L'azote est utilisé pour la phase de remise à la pression atmosphérique.

A la sortie de l'évaporateur, les échantillons sont déposés sur une lingette (Kimtech) dans une boîte en plastique fermée et stockés dans des conditions normales de pression et de température pendant une à deux semaines. En effet, nous avons pu constater une plus grande stabilité du nanofilm lors de son immersion en milieu liquide plusieurs jours après l'évaporation.

Le nombre total d'échantillons étudiés au cours de la thèse est de 260 ; 65 évaporations ont donc été effectuées dont les premières sous la supervision de Sylvie Gautier, ingénieure au laboratoire, qui m'a formée à l'utilisation de l'évaporateur. Quelques problèmes techniques rencontrés sur l'évaporateur, notamment une panne qui l'a immobilisé pendant plusieurs mois, ont pu être solutionnés grâce à Sylvie, Raphaël Weil et Zhizhong Li, également ingénieurs au laboratoire.



#### 4. Remarque sur la possibilité de la formation d'un alliage fer-titane

Les évaporations du nanofil de 10 nm d'épaisseur de fer se font soit directement sur une lamelle de microscope en verre soit, le plus souvent, sur une pré-couche évaporée de 5 nm de titane. Cette pré-couche de titane, évaporée thermiquement juste avant le dépôt du film de fer, est une couche typiquement déposée lors de préparation de films ultrafins car elle garantit une adhésion forte du film sur le verre [24]. La présence ou l'absence de cette couche adhésive de titane, n'altère pas les résultats présentés dans toute la suite de ce manuscrit : la couche de fer adhère sur le verre même sans sous-couche de titane.

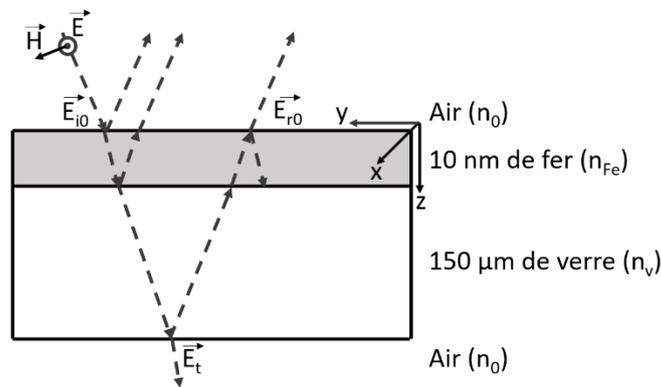
Lors de l'évaporation du fer sur la sous-couche de titane, nous pouvons envisager la possibilité d'un mélange entre le fer et le titane. En effet, ces derniers sont capables de former, à l'équilibre, des alliages stables de TiFe ou de TiFe<sub>2</sub> à haute température [25]. Cependant si

formation d'un tel alliage il y a, celui-ci resterait localisé au voisinage de l'interface car aucune trace de titane n'est détectée sur la surface du nanofilm lors de la mesure des spectres larges de spectrométrie photo-électronique X (Figure 2-12.C). La présence d'un tel alliage, ou plus simplement d'une grande adhésion du fer au titane, pourrait seulement être visible lors de la dissolution du dernier nanomètre de la couche de fer, zone où la sensibilité du montage optique empêche la détection de faibles changements d'épaisseur.

### III. Caractérisation de la semi-transparence optique du nanofilm

#### 1. Facteur de transmission/réflexion aux interfaces et absorption

Commençons par discuter des coefficients de transmission/réflexion aux interfaces sans tenir compte de l'absorption du fer [26]. Supposons un empilement de deux couches isotropes (Schéma 2-1) : une couche de verre, d'indice  $n_v = 1,51$  et d'épaisseur  $d_v = 150 \mu\text{m}$ , sur laquelle une couche de fer, d'indice réel (l'absorption n'est pas prise en compte ici sinon l'indice aurait été complexe et égal à  $2,52 + 3,36 i$ )  $n_{\text{Fe}} = 2,52$  [12,13,27,28] et d'épaisseur  $d_{\text{Fe}} = 10 \text{ nm}$ , est déposée. Les valeurs d'indice sont prises à la longueur d'onde de  $650 \text{ nm}$ . On note  $E_{i0}$ , le champ électrique de l'onde incidente près de l'interface air/fer ;  $E_{r0}$ , le champ total près de l'interface air/fer englobant les contributions des réflexions sur toutes les interfaces de l'échantillon et  $E_t$ , le champ transmis par tout l'échantillon situé près de l'interface verre/air.



**Schéma 2-1 – Schéma représentant le système bicouche fer/verre pour le calcul des coefficients de Fresnel.**

Les conditions de continuité aux interfaces des composantes tangentielle des champs électrique  $\mathbf{E}$  et magnétique  $\mathbf{H}$  couplées à la condition d'interférence entre les ondes réfléchies (et transmises) aux différentes interfaces, nous permettent d'exprimer la matrice de transfert, notée  $M$ , du système :

$$\begin{pmatrix} E_{i0} + E_{r0} \\ \gamma_0 (E_{i0} - E_{r0}) \end{pmatrix} = M \begin{pmatrix} E_t \\ \gamma_t E_t \end{pmatrix}$$

$$\text{avec } M = \begin{pmatrix} m_{11} & m_{12} \\ m_{21} & m_{22} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos(\delta_v) & i \frac{\sin(\delta_v)}{\delta_v} \\ i \sin(\delta_v) & \cos(\delta_v) \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} \cos(\delta_{\text{Fe}}) & i \frac{\sin(\delta_{\text{Fe}})}{\delta_{\text{Fe}}} \\ i \sin(\delta_{\text{Fe}}) & \cos(\delta_{\text{Fe}}) \end{pmatrix}$$

Sous incidence normale, on peut écrire que  $\gamma_i = n_i$  et  $\delta_i = 2\pi n_i \frac{d_i}{\lambda}$  où  $i = \{v \text{ et Fe}\}$  et  $\lambda = 650 \text{ nm}$ .

L'expression des coefficients de Fresnel, c'est-à-dire, du coefficient de transmission en amplitude, noté  $t$ , et du coefficient de réflexion en amplitude, noté  $r$ , est donnée par :

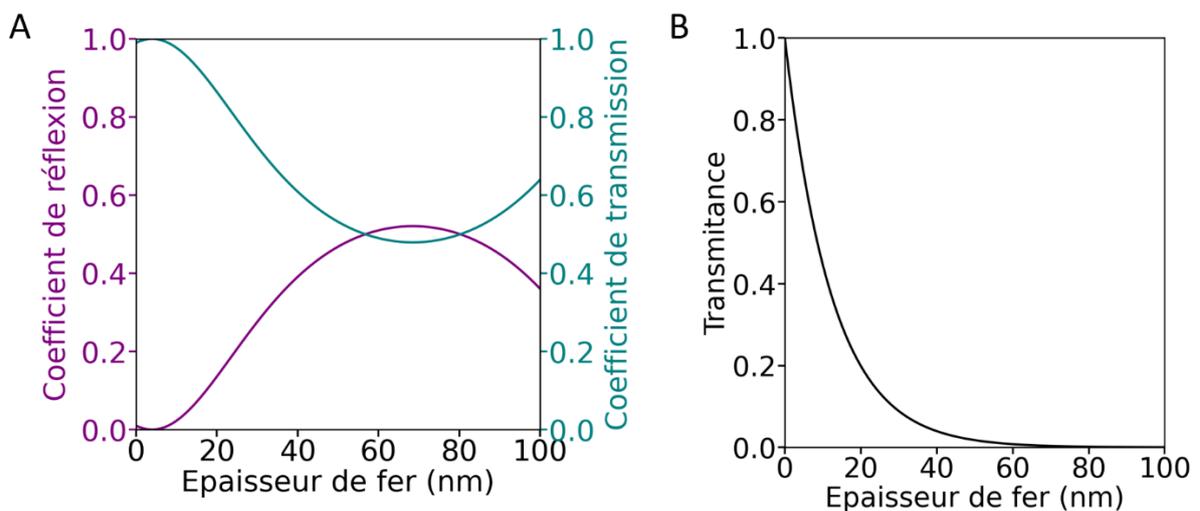
$$r = \frac{E_{r0}}{E_{i0}} = \frac{n_0 m_{11} + n_0^2 m_{12} - m_{21} - n_0 m_{22}}{n_0 m_{11} + n_0^2 m_{12} + m_{21} + n_0 m_{22}}$$

$$t = \frac{E_{t0}}{E_{i0}} = \frac{2 n_0}{n_0 m_{11} + n_0^2 m_{12} + m_{21} + n_0 m_{22}}$$

La figure 2-3.A présente les coefficients de transmission et de réflexion en énergie en fonction de l'épaisseur du nanofilm de fer. Ils sont respectivement égaux à  $t.t^*$  et  $r.r^*$  où  $t^*$  et  $r^*$  sont les conjugués de  $t$  et  $r$ . On constate qu'une épaisseur de 10 nm en fer permet de maximiser la valeur du coefficient de transmission, alors égal à 98 %, et minimiser la réflexion, alors égale à 2 %. On peut observer, qu'au-delà de 50 nm, la part entre réflexion et de transmission est presque à 50-50.

A présent que les coefficients de transmission/réflexion ont été déterminés, intéressons-nous à l'absorption du fer indépendamment des coefficients de transmission/réflexion aux interfaces. Pour cela nous pouvons utiliser la loi de Beer-Lambert indiquant une variation exponentielle de la transmittance en fonction de l'épaisseur de matériau absorbant traversé :  $T = \exp(-\alpha.z)$  où  $\alpha$  est le coefficient d'absorption pris égal à  $8,07.10^5 \text{ cm}^{-1}$  [12,13,27,28] et  $z$  l'épaisseur du nanofilm. Cette courbe est tracée sur la Figure 2-3.B pour des épaisseurs de fer comprises entre 0 et 100 nm. Pour 10 nm, on constate que la transmittance est de 45 %. A cette épaisseur, le nanofilm est donc semi-transparent. Pour des épaisseurs de fer supérieures à 30 nm, on constate que seulement 10 % de la lumière est transmise et que la sensibilité sur sa mesure diminue drastiquement.

Ainsi, le dépôt d'une épaisseur de 10 nm de fer sur une lamelle de verre semble être un bon compromis entre une grande transmittance et une maximisation/minimisation respectives des coefficients de transmission/réflexion.



**Figure 2.3 – Coefficient de réflexion et de transmission et absorption d'une couche de 10 nm de fer déposée sur du verre.** (A) Variations des coefficients de réflexion (courbe violette) et de transmission (courbe bleue) en énergie en fonction de l'épaisseur du nanofilm de fer. Ces coefficients sont calculés à partir des coefficients de Fresnel. (B) Variation de la transmittance calculée via la formule de Beer-Lambert en fonction de l'épaisseur du nanofilm de fer.

## 2. Mesure du coefficient d'absorption du nanofilm de fer : matériel et méthode

Dans la partie précédente, nous avons calculé la transmittance théorique d'un échantillon, d'épaisseur 10 nm, uniquement composé de fer. Toutefois, les nanofilms étant exposés à l'air une fois sortis de l'évaporateur, leur composition réelle est probablement plus complexe qu'une seule couche de fer déposée sur verre. Voyons donc si des mesures de transmittance, réalisées sur des échantillons réels de fer, peuvent nous donner des indications sur la composition chimique de ce dernier.

Pour ce faire, la densité optique de nanofilms de différentes épaisseurs a été mesurée directement à l'aide d'un spectrophotomètre commercial (Genesys 50, Thermoscientific) à la longueur d'onde de 650 nm. La valeur de référence de l'intensité lumineuse incidente (notée  $I_0$ ) est fixée par celle transmise par la lame de verre, composant le substrat des nanofilms. Les nanofilms de fer de différentes épaisseurs ont été préparés par évaporation thermique au laboratoire sans sous-couche de titane. Pour chaque épaisseur, la densité optique a été mesurée sur quatre échantillons distincts. L'ensemble des mesures est effectué dans l'air (sans contact avec le milieu liquide).

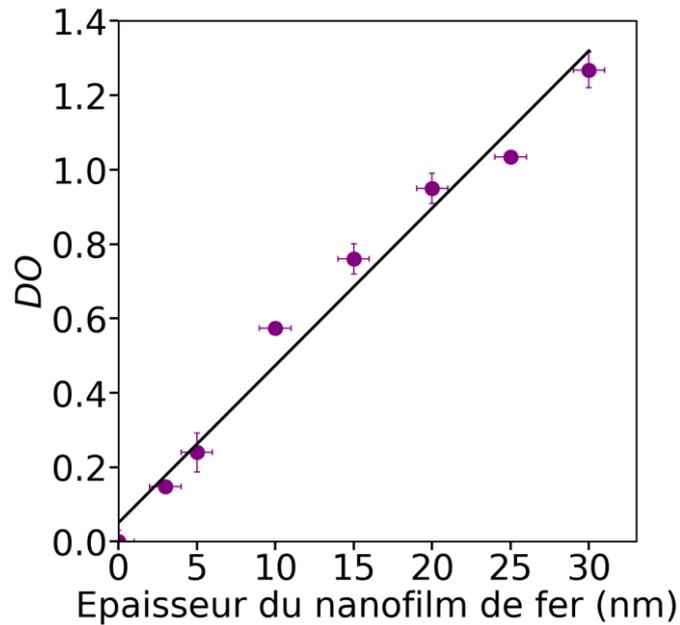
Cette technique est souvent utilisée pour caractériser l'énergie de gap des composés photovoltaïques [29-31] ou suivre la modification de structure de nanocouches utilisées comme revêtements de composants optiques [33,34]

## 3. Résultats des mesures d'absorption optique sur le nanofilm de fer

Les résultats d'absorption optique sont présentés sur la Figure 2-4. L'ensemble des données de densité optique mesurées pour des échantillons d'épaisseurs différentes en fer est ajusté par une droite dont la pente donne une valeur égale à  $(0,042 \pm 0,002) \text{ nm}^{-1}$ . On retrouve une relation linéaire entre la densité optique ( $DO$ ) et l'épaisseur de fer ( $DO = a \cdot e_{\text{Fe}}$ ). Toutefois, le coefficient d'absorption  $\alpha$  est défini via la loi de Beer-Lambert donnée par  $T = \exp(-\alpha \cdot z)$ . La définition  $T = 10^{-DO}$  nous permet d'exprimer  $\alpha$  en fonction de  $a$  :  $\alpha = a \cdot \ln(10)$ . On obtient donc une valeur expérimentale du coefficient d'absorption égale à  $(9,7 \pm 0,4) \cdot 10^5 \text{ cm}^{-1}$ . Cette valeur est proche de celle rapportée dans la littérature  $8,07 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-1}$  [12,13,27,28,34] pour le Fe(0). Notons, que cette mesure sera utilisée dans le chapitre 3 pour convertir des données brutes de densités optiques en épaisseurs de fer.

On peut remarquer qu'aucun changement de pente n'est observé lorsque l'épaisseur du nanofilm de fer atteint quelques nanomètres, correspondant à l'épaisseur typique de la couche d'oxyde. La seule présence de la couche d'oxyde aurait induit un coefficient d'absorption au moins dix fois plus petit que celui du Fe(0). En effet, la magnétite  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  a un coefficient d'absorption égal à  $0,29 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-1}$  et l'hématite  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  égal à  $0,19 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-1}$  [35]. Notons que la faible absorption de la lumière par les oxydes de fer, comparée à celle du Fe(0), ne nous permettra pas de suivre optiquement un changement de leur structure ou de leur épaisseur. D'autre part, la présence de Fe(0), même à de faibles épaisseurs, souligne que la croissance de la couche d'oxyde ne se fait pas au détriment d'une disparition de la couche de Fe(0) dans sa totalité.

Pour compléter, les mesures de la transmittance optique effectuées au spectrophotomètre à 650 nm sur différents échantillons donnent : pour 10 nm de fer déposé sur du verre, un facteur de transmission de 24 % ; pour 5 nm de titane déposé sur du verre, une transmittance de 54 % ; pour 10 nm de fer déposé sur du verre recouvert de 5 nm de titane, une transmittance de 10 %. Ces résultats soulignent la semi-transparence des nanofilms présentés sur la Figure 2-1.



**Figure 2-4 – Détermination du coefficient d'absorption du nanofilm de fer.** *La densité optique est mesurée pour différentes épaisseurs en fer des nanofilms à l'aide d'un spectrophotomètre commercial à 650 nm. Les nanocouches de fer ont été directement déposées sur une surface en verre, sans pré-couche de titane. La pente du meilleur ajustement linéaire (ligne noire) donne une valeur égale à  $(0,045 \pm 0,001) \text{ nm}^{-1}$  et  $R^2 = 2$ .*

#### **IV. Caractérisation des propriétés d'interface et de composition chimique du nanofilm par réflectivité X sous incidence rasante**

La technique de réflectivité X sous incidence rasante est particulièrement intéressante car elle permet d'avoir accès à la structure et à l'organisation interne des nanofilms en sondant le volume d'un échantillon selon une direction perpendiculaire à sa surface [36]. Il est ainsi possible de déterminer l'épaisseur de la couche, sa densité électronique, ses rugosités de surface ou d'interface (nanofilm-substrat ou oxyde-Fe(0)). Avec le développement de la fabrication de films ultrafins, cette technique est particulièrement utilisée et appréciée car elle est non destructive et donc directement applicable à l'échantillon d'intérêt [37]. Elle permet d'étudier en temps réel des changements de structure sous l'effet de modifications de pression, de température ou d'environnement gazeux. Elle peut être utilisée aussi bien sur des échantillons monocristallins, que polycristallins ou amorphes, monocouches ou multicouches, d'épaisseur submicronique à atomique (1 à 500 nm).

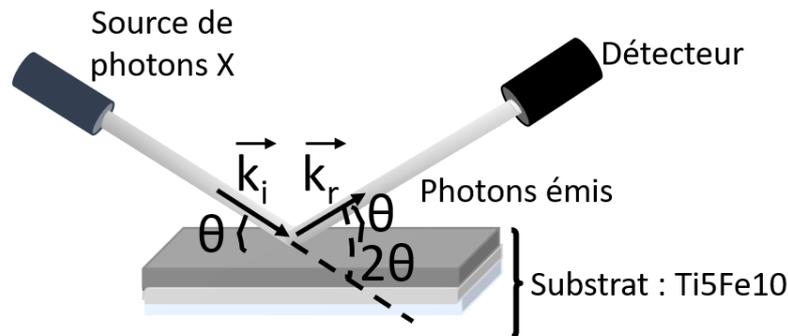
##### **1. Réflectivité de rayons X en incidence rasante : matériel et méthode**

Dans cette technique, l'interaction entre le faisceau de rayons X et l'échantillon se fait par diffusion élastique, c'est-à-dire que le faisceau produit à l'issue de l'interaction possède la même longueur d'onde que celle incidente. Selon les lois de Descartes, la propagation d'une onde électromagnétique, de vecteur d'onde  $\mathbf{k}_i$ , sur une interface entre deux milieux d'indices optiques différents va induire l'apparition d'une onde réfléchie (spéculaire ou diffusée) et d'une onde réfractée. Le vecteur d'onde de l'onde réfléchie spéculairement est noté  $\mathbf{k}_r$  (Figure 2-5). Notons que contrairement à l'optique géométrique, c'est l'angle de rasance, noté  $\theta$ , et non l'angle d'incidence qui est utilisé.

Le dispositif de mesure se compose d'une source de rayons X de longueur d'onde égale à 0,15406 nm (Cu- $K_\alpha$ ) collimatée sur l'échantillon à l'aide de différentes fentes (confinement latéral et longitudinal). L'utilisation de ces fentes induit une faible intensité du rayonnement incident et donc une variation limitée du signal de réflexion enregistrée. Afin de palier ce problème, un miroir parabolique associé à un monochromateur permet de produire un faisceau incident parallèle de grande luminosité. On peut souligner que plus l'épaisseur des nanofilms est importante, plus la résolution de la mesure devra être grande afin que le signal d'intérêt (des oscillations) soit correctement échantillonné. Dans notre cas, afin de limiter l'étendue du faisceau incident à la totalité de la surface du nanofilm, une lame de rasoir (le couteau) est placée au voisinage de la surface. Le nombre de photons reçu après réflexion est ensuite compté à l'aide d'un détecteur (photomultiplicateur) en fonction de l'angle de rasance. Les spectres de réflexion obtenus sont habituellement tracés en fonction de l'angle  $2\theta$ , formé entre la direction du vecteur d'onde incident et celle du vecteur d'onde réfléchi.

Avant chaque série de mesures, la surface de l'échantillon est alignée avec le faisceau incident et l'échantillon est positionné de façon à maximiser la valeur de l'intensité réfléchie. Le balayage des angles d'incidence est effectué sur un intervalle de  $2\theta$  compris entre  $0,2^\circ$  et  $6^\circ$ . Nous verrons par la suite que cela permet de visualiser l'angle critique et de stopper la mesure lorsque l'intensité réfléchie est égale à celle du bruit de fond. La résolution est égale à  $0,01^\circ$ .

Celle-ci nous permet un échantillonnage correct de nos mesures sachant que des oscillations de période  $0,5^\circ$  pour 10 nm sont attendues. La vitesse de scan est égale à  $0,8^\circ/\text{min}$ . Cette vitesse permet un bon compromis entre résolution et rapport signal/bruit. Pour chaque spectre, quatre scans successifs ont été réalisés afin de diminuer le rapport signal/bruit. L'ensemble des mesures a été fait sur un diffractomètre D8 Advance, Bruker grâce à l'aide de Zhizhong Li, ingénieur au laboratoire.



**Figure 2-5 – Schéma présentant le principe de la mesure par réflectivité X.** Une source de photons X de longueur d'onde  $0,15406 \text{ nm}$  et de vecteur d'onde noté  $k_i$  subit une réflexion spéculaire sur l'interface du nanofilm. Le faisceau réfléchi, de vecteur d'onde noté  $k_r$ , est envoyé vers un détecteur qui va mesurer son intensité en fonction de l'angle de rasance  $\theta$ , formé entre le vecteur d'onde incident et la surface du nanofilm.

## 2. Résultats des mesures de réflectivité X

Les résultats bruts, soit la variation de l'intensité réfléchie mesurée en fonction de l'angle  $2\theta$ , sont présentés sur la Figure 2-6.A. Différentes observations peuvent être faites.

- Premièrement, on observe un léger décrochage du signal sur les premières valeurs d'angle parcourues. Celle-ci s'explique par une projection du faisceau incident sur la surface de l'échantillon plus grande que la largeur de l'échantillon elle-même : seule une partie du faisceau incident est donc réfléchi conduisant à des valeurs d'intensité mesurées plus petites [38].
- Deuxièmement, on constate que le signal mesuré ensuite reste constant. Cette zone, appelée plateau de réflectivité, correspond aux valeurs d'angle de rasance pour lesquelles la réflexion du faisceau incident est totale [37]. Cette réflexion totale est possible à cause d'un indice de réfraction du fer plus petit que celui de l'air à la longueur d'onde des rayons X. Le faisceau passe alors d'un milieu plus réfringent (air) à un milieu moins réfringent (fer) induisant l'apparition d'un angle de rasance critique en deçà duquel la totalité du faisceau incident est réfléchi. Cet angle critique de réflexion totale, noté  $\theta_c$ , est égal à  $\arccos(n_2)$  où  $n_2$  est l'indice de réfraction du fer. Dans le cadre de théorie classique de la dispersion de Drude-Lorentz, applicable ici, l'indice de réfraction s'écrit sous la forme complexe :  $n = 1 - \delta + i\beta$ .  $\beta$  caractérise l'absorption et  $\delta$  est relié à la densité électronique  $\rho_e$  du matériau via la relation  $\delta = \frac{\lambda^2 * r_e}{2\pi} \rho_e$  avec  $r_e$  le rayon classique de l'électron. La valeur de l'angle critique, alors égale à  $\arccos(1 - \delta)$ ,

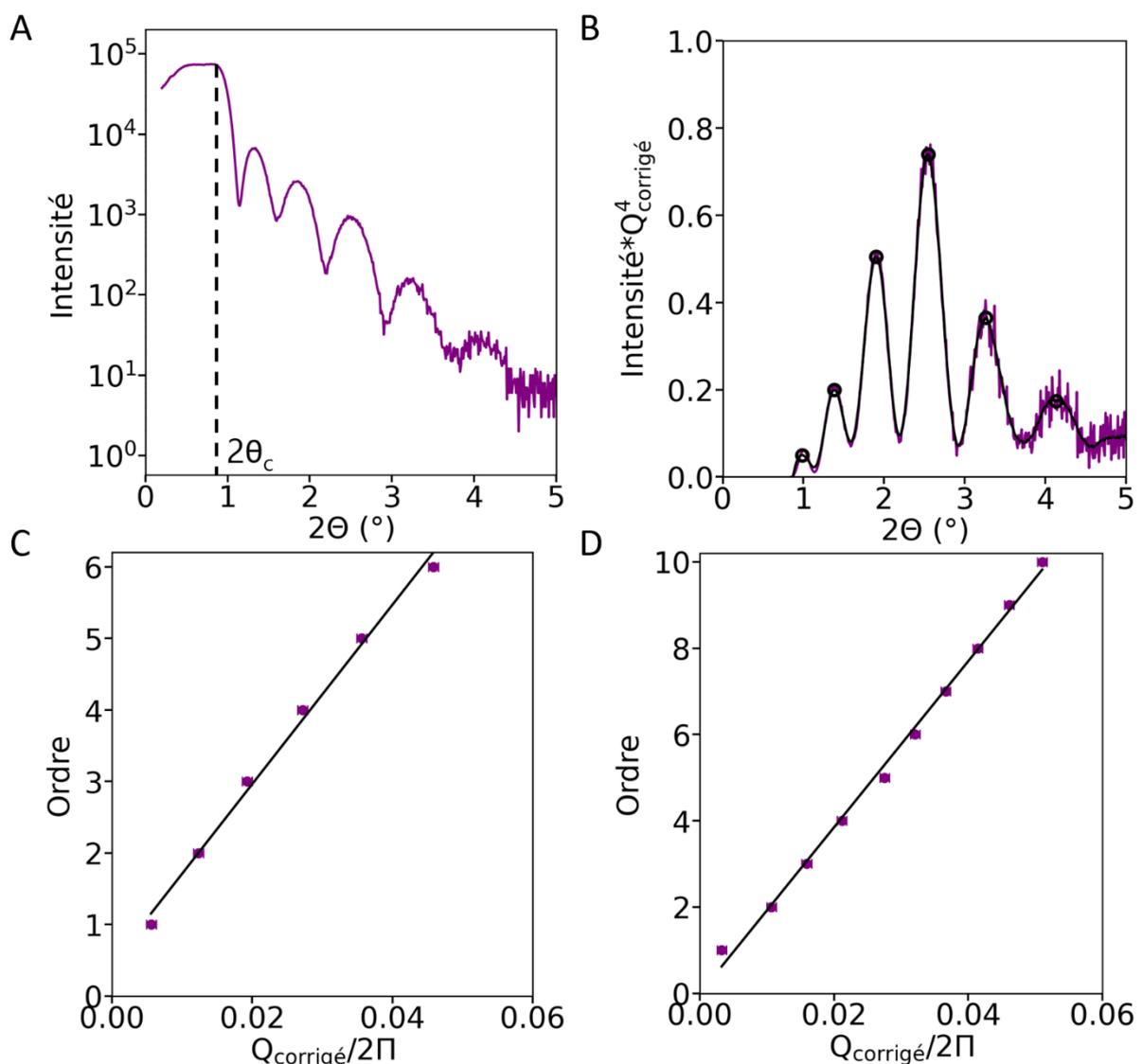
renseigne donc sur la densité électronique du nanofilm [37]. Sur la figure 2-6.A, l'angle critique est égal à 0,4366 correspondant à une valeur de  $\delta = 2,90.10^{-5}$ . Cette valeur est en accord avec celle attendue pour le fer égale à  $2,24.10^{-5}$  [logiciel REFLEX - 36].

- Troisièmement, on remarque qu'après ce plateau de réflectivité, l'intensité mesurée décroît rapidement. Cette diminution suit une loi en  $\theta^4$  que l'on peut retrouver par l'expression des coefficients de Fresnel dans l'approximation des petits angles. Cette loi d'échelle implique l'utilisation d'une échelle logarithmique sur l'axe des ordonnées afin de visualiser correctement les variations entre  $10^5$  à 1 u.a de l'intensité mesurée. Sur cette partie de courbe, la valeur de l'angle de rasance est supérieure à celle de l'angle critique : le faisceau incident va donc se scinder en un faisceau réfléchi et un faisceau réfracté qui va pouvoir se propager au sein du volume de fer et se réfléchir sur l'interface fer/verre. Ce sont les interférences constructives entre le faisceau réfléchi sur la surface de fer et celui réfléchi sur l'interface verre/fer qui vont donner lieu aux oscillations sur le spectre de réflectivité. Ces dernières sont appelées franges de Kiessing.

Plusieurs informations peuvent être extraites de ce spectre. Tout d'abord l'épaisseur du nanofilm. Celle-ci est associée à la période des oscillations : plus le film est épais, plus la période des oscillations sera petite. La régularité des oscillations indique une structure homogène du nanofilm [36]. Ensuite la densité électronique. Comme nous venons de le voir, la densité électronique influe sur la valeur de l'angle critique. Elle joue également sur l'amplitude des oscillations : plus la différence de densité entre le film et le substrat est élevée, plus l'amplitude des oscillations sera importante. Enfin, les valeurs de rugosité de la surface de fer ou de l'interface verre/fer. Ces effets sont davantage visibles aux grands angles (entre 0,4° et 0,6°) : plus la surface est rugueuse, plus la décroissance de l'intensité mesurée est abrupte ; plus l'interface entre le verre et le fer est rugueuse, plus l'amplitude des oscillations est faible [41].

Afin d'extraire l'épaisseur de la nanocouche de fer, le traitement proposé par Boher, visant à pointer la position angulaire des maxima, est utilisé [39]. En supposant une réflexion purement spéculaire, le vecteur d'onde de transfert  $\mathbf{Q}$  s'écrit  $\mathbf{Q} = \mathbf{k}_r - \mathbf{k}_i$  où  $\mathbf{k}_i$  et  $\mathbf{k}_r$  correspondent aux vecteurs d'onde incident et réfléchi. En reprenant le schéma du dispositif présenté sur la Figure 2-5, on peut exprimer la norme du vecteur d'onde de transfert  $Q$  par  $4\pi \frac{\sin(\theta)}{\lambda}$  où  $\lambda$  est la longueur d'onde incidente. Afin de simplifier les expressions, on introduit le vecteur diffusion  $Q_{\text{corrigé}}$  au sein de la couche de fer dont la norme est égale à  $\frac{4\pi}{\lambda} \sqrt{\cos^2(\theta_c) - \cos^2(\theta)}$ . Le calcul de la différence de marche entre le faisceau réfléchi sur la surface de fer et celui réfléchi sur l'interface verre-fer couplé à la condition d'interférences constructives donne lieu à l'expression :  $m = \frac{Q_{\text{corrigé}}}{2\pi} e + \frac{\Phi}{\lambda}$  où  $m$  est l'ordre d'interférence,  $\Phi$  le déphasage à la réflexion verre-fer et  $e$  l'épaisseur du nanofilm de fer. Ainsi, le tracé de  $m$  en fonction de  $\frac{Q_{\text{corrigé}}}{2\pi}$  permet d'avoir accès à l'épaisseur du nanofilm. Afin de faciliter, le pointé des maxima, Boher propose de corriger la courbe d'intensité par  $Q_{\text{corrigé}}^4$ , donnant le graphique (ligne violette) présenté sur la Figure 2-6.B où l'échelle des ordonnées est à présent linéaire. Afin d'extraire les maxima, un lissage des données est effectué en utilisant un filtre de type Savitzky-Golay afin des

paramètres choisis sont un polynôme d'ordre 3 et une fenêtre de lissage de 35 points (ligne noire). La position angulaire des maxima est finalement repérée numériquement par une méthode de détection des pics (cercles vides noirs) permettant de calculer les valeurs de  $Q_{\text{corrigé}}$  associée. La Figure 2-6.C représente la variation de  $m$  en fonction de  $\frac{Q_{\text{corrigé}}}{2\pi}$ . Comme attendu, la relation est bien linéaire et le coefficient directeur donne une valeur d'épaisseur du nanofilm de fer égale à  $(12,5 \pm 0,3)$  nm ce qui est en accord avec les 10 nm de dépôt contrôlés par l'oscillateur à quartz. Une analyse similaire est effectuée sur des échantillons de 20 nm en fer. La régression linéaire présente sur la Figure 2-6.D donne une valeur d'épaisseur égale à  $(19 \pm 3)$  nm. Sur les trois échantillons de 10 nm en fer analysés, l'épaisseur mesurée est en moyenne égale à  $(12,0 \pm 0,4)$  nm montrant une bonne fiabilité de la valeur annoncée par l'oscillateur à quartz.



**Figure 2-6 – Spectre de réflectivité X et extraction de la valeur de l'épaisseur du nanofilm de fer pour le système monocouche.** L'ensemble des figures (A-C) est obtenu pour un échantillon de fer de 10 nm d'épaisseur déposé sur du verre. (A) Données brutes : logarithme

de l'intensité réfléchiée mesurée en fonction de l'angle  $2\theta$ . La présence des oscillations est caractéristique des interférences constructives entre les rayons réfléchis sur la surface de fer et ceux réfléchis sur l'interface fer/verre. (B) Correction de l'intensité mesurée par le facteur  $Q_{\text{corrigé}}^4$  en fonction de l'angle  $2\theta$  (données brutes en violet). Les données sont lissées par un filtre de Savitzky-Golay avec un polynôme d'ordre 3 et une fenêtre de 35 points (ligne noire). La position angulaire des maxima est repérée numériquement (cercles vides noirs). (C) Ordre d'interférence en fonction du rapport  $Q_{\text{corrigé}}/2\pi$  calculé à partir de la position des maxima précédemment repérée (cercles pleins violets). Une régression linéaire des données donne une pente de  $(12,5 \pm 0,3)$  nm. (D) Même courbe que pour (C) mais avec un échantillon de 20 nm de fer évaporé sur du verre. L'ajustement linéaire donne une valeur d'épaisseur égale à  $(19 \pm 3)$  nm correspondant à la valeur attendue.

L'analyse se complique pour les échantillons multicouches (cas des échantillons de verre/titane/fer) ainsi que pour la détermination des rugosités de surface et d'interface. Dans ce cas, les données expérimentales sont généralement comparées aux données théoriques obtenues par la résolution des conditions de continuité des champs électriques et magnétiques sur chaque interface. L'ajustement sur l'ensemble des paramètres d'épaisseur, de rugosité et de densité est effectué par la méthode des moindres carrés. Pour ce faire, nous avons utilisé le logiciel REFLEX [40]. Le calcul théorique repose sur une approche par empilement de couches uniformes (stratification) avec la méthode d'Abélès [40] : la densité électronique est supposée parfaitement définie et continue sur chaque monocouche, chaque monocouche présente une épaisseur fixe et les conditions de continuité de cette densité aux interfaces est incluse dans la rugosité. Ce logiciel est particulièrement intéressant car il tient compte des différents paramètres expérimentaux (utilisation d'un couteau, taille du faisceau incident en comparaison de la taille de l'échantillon...). Toutefois, lorsque le profil de densité devient plus complexe, soit lorsque la nanocouche doit être divisée en un grand nombre de sous-couche pour décrire correctement le profil de densité, l'ajustement des données expérimentales devient difficile. La présence des couches superficielles d'oxyde de fer dont les rugosités d'interface (oxyde/oxyde et fer/oxyde) sont inconnues rend difficile le choix des paramètres initiaux et donc la bonne convergence de l'ajustement. C'est pourquoi, les valeurs de rugosité n'ont pas été extraites ici. Il serait particulièrement intéressant d'approfondir cette analyse pour avoir accès à une meilleure connaissance de la structure du nanofilm.

## V. Caractérisation de la topographie de la surface du nanofilm par microscopie à force atomique

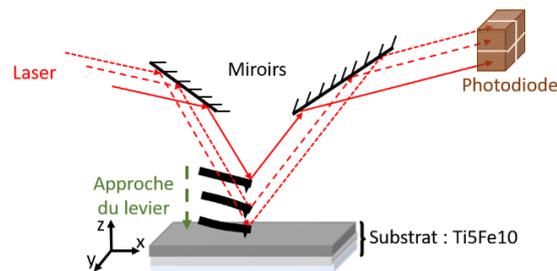
En complément de l'analyse par réflectivité de rayons X, donnant accès aux propriétés volumiques du nanofilm, nous proposons une caractérisation plus locale de la surface du nanofilm grâce à un microscope à force atomique. Cet outil s'appuie sur les forces d'interaction existant entre une pointe fine et la surface de l'échantillon à analyser afin d'effectuer une cartographie, point par point, de la surface avec une résolution nanométrique. Contrairement au microscope à effet tunnel, les analyses ne sont pas restreintes aux seuls échantillons conducteurs. La mesure peut se faire à pression atmosphérique sans destruction de l'échantillon.

### 1. Microscopie à force atomique : matériel et méthode

Le dispositif est décrit sur la Figure 2-7. La sonde se compose d'une pointe fixée au bout d'un levier, assimilable à un ressort. Les dimensions typiques du levier sont de 350  $\mu\text{m}$  de long, 35  $\mu\text{m}$  de large et 2  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. L'interaction entre la pointe et la surface de l'échantillon va induire une flexion du levier, mesurée par la déviation d'un faisceau laser. Pour cela, un faisceau laser est focalisé sur le dos du levier, qui, étant suffisamment lisse, va jouer le rôle de miroir et venir réfléchir le faisceau vers une photodiode quatre quadrants [41,42]. La différence d'intensité lumineuse reçue entre les moitiés supérieure et inférieure de la photodiode donne accès à la flexion du levier tandis que la différence entre les quadrants gauche et droit indique sa torsion [43,44]. Il est ainsi possible d'avoir accès aux forces verticales et latérales qui agissent sur la pointe connaissant à la fois l'amplitude de la déviation du levier via la mesure de la photodiode et la raideur du levier (loi de Hooke). La topographie de la surface est assurée par trois moteurs piézoélectriques : deux permettent de maintenir la pointe dans un plan parallèle à la surface de l'échantillon (x,y) et le dernier contrôle l'approche de la pointe vers le substrat selon la direction z perpendiculaire au plan (x,y). Afin d'éviter toutes vibrations parasites, le système est monté sur une table anti-vibration.

Trois modes d'utilisation de l'AFM sont possibles : en mode contact, contact intermittent ou non-contact. Le mode non-contact permet d'avoir accès aux forces de type Van der Waals, électrostatique, magnétique ou capillaire en balayant l'échantillon avec une distance constante entre la pointe et la surface de l'ordre de 10 à 100 nm. Le mode contact permet lui de retracer la topographie de la surface avec une grande résolution et d'avoir accès aux forces de répulsion ionique ou de friction et aux déformations élastiques ou plastiques. Pour notre étude, nous avons choisi d'utiliser un quatrième mode, développé par JPK et présent sur le Nanowizard III (Bruker Instruments, JPK Instruments AG, Berlin, Germany) : le mode Quantitative Imaging (QI mode). Ce mode approche/retrait à vitesse rapide permet de minimiser les forces latérales générées lors du balayage de l'échantillon par la pointe AFM. La force verticale (force de contact) maximale appliquée en chaque pixel est fixée par l'utilisateur permettant de ne pas endommager l'échantillon étudié. Ce dernier est donc particulièrement adapté aux mesures de forces sur des échantillons biologiques. Pour chaque point, la force entre la pointe et le substrat est mesurée en fonction de la distance entre la pointe et le substrat et tracée sur des courbes

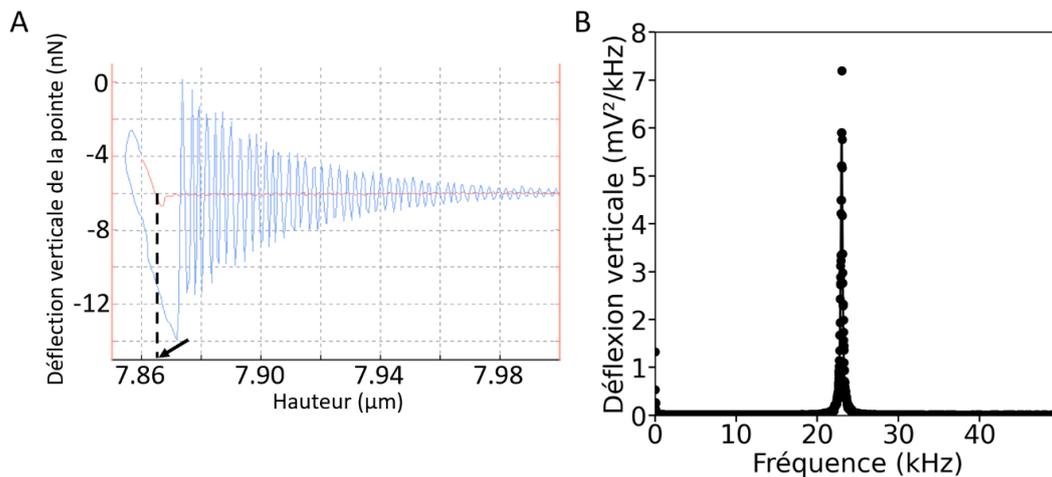
dites approche/retrait. Une courbe approche/retrait typiquement obtenue pour une mesure à l'air est présentée sur la Figure 2-8.A. La courbe rouge correspond à la courbe d'approche et se lit de la droite vers la gauche. La pointe s'approche progressivement de la surface puis sous l'action de forces attractives entre la pointe et la surface de l'échantillon, le levier se fléchit avant de rentrer en contact avec la surface (point de contact indiqué par la flèche). Dès lors, la déflexion varie linéairement avec la distance pointe-substrat : la rigidité de la surface est déduite par la pente de cette droite via la loi de Hooke. Une fois la force verticale maximale de commande atteinte (ici 2 nN), la pointe s'éloigne de la surface (courbe bleue avec une lecture de la gauche vers la droite). Elle reste initialement accrochée ou attirée par la surface jusqu'à une flexion de -14 nN puis se détache et oscille alors librement. La force atteinte juste avant les oscillations (ici -14 nN) correspond à la force d'adhésion de la pointe au substrat. Ces courbes permettent ainsi de mesurer la force d'adhésion de la pointe au substrat, la rigidité du substrat ainsi que sa topographie.



**Figure 2-7 – Schéma présentant le dispositif de microscopie à force atomique.** La sonde se compose d'un levier au bout duquel est fixée une pointe nanométrique (levier en noir sur le schéma). Un faisceau laser, focalisé sur l'extrémité de levier, est réfléchi puis détecté par une photodiode quatre quadrants. Sous l'action des forces attractives ou répulsives entre la pointe et la surface de l'échantillon, le levier va se fléchir, induisant un décalage de la position du faisceau reçu sur la photodiode. Un ensemble de trois moteurs piézoélectriques assure le déplacement de la pointe par rapport à la surface de l'échantillon afin d'en réaliser une topographie.

Les mesures AFM ont été effectuées à l'air et en milieu de culture liquide (600  $\mu$ L de Luria Broth) à 23°C. Un premier type de pointe CSC37 sans revêtement métallique (aluminium) a été utilisé. Toutefois, les interférences issues de la réflexion du faisceau laser sur la surface métallique en fer faussaient la mesure de la hauteur de la pointe et empêchaient toute approche de la pointe à la surface pour les mesures faites à l'air. Une seconde pointe, présentant elle un revêtement métallique CSC37 Cr-Au (MikroMasch, <https://www.spmtips.com/afm-tip-hq-csc37-cr-au>), a permis d'augmenter la réflexion du faisceau sur la pointe plutôt que sur la surface de l'échantillon en fer et donc de réaliser l'approche de la pointe sur le substrat. Sa valeur nominale de rigidité, environ égale à 0,26 N/m, a été vérifiée avant chaque série de scans en mesurant le bruit thermique. Cette méthode consiste à laisser la pointe osciller librement dans l'air et à mesurer la déflexion du levier en fonction de la fréquence. La figure 2-8.B présente le spectre en fréquence classiquement obtenu. Un pic apparaît à la fréquence de résonance du levier. L'ajustement de ce pic (ligne noire) donne accès à la fréquence de résonance ici égale à

23,01 kHz. Connaissant la sensibilité (60 nm/V), la constante de raideur du levier peut être alors calculée. On obtient une valeur de 0,470 N/m ce qui est en accord avec la valeur donnée par le constructeur de 0,3 N/m. Les courbes approche/retrait sont enregistrées à une vitesse constante de 100  $\mu\text{m/s}$  pour une extension verticale maximale de 500 nm du piezo et une force verticale maximale fixée à 5 nN. La surface scannée est de 128x128 pixels. Une correction linéaire est appliquée sur les scans obtenus afin de s'affranchir de la non-horizontalité du substrat.



**Figure 2-8 – Données typiques extraites par AFM.** (A) Courbe approche-retrait typiquement obtenue pour une observation à l'air : la flexion mesurée du levier est tracée en fonction de la distance entre la pointe et la surface de l'échantillon. La courbe rouge correspond à la courbe d'approche et la courbe bleue à celle de retrait. Le point de contact entre la pointe et la surface est indiqué par une flèche. (B) Courbe de calibration de la constante de raideur du levier par la méthode du bruit thermique : la déflexion du levier est mesurée en fonction de la fréquence (cercles noirs pleins). L'ajustement du pic de résonance (ligne noire) donne accès la fréquence de résonance du levier égale à 23,01 kHz. La constante de raideur du levier peut ensuite être déduite.

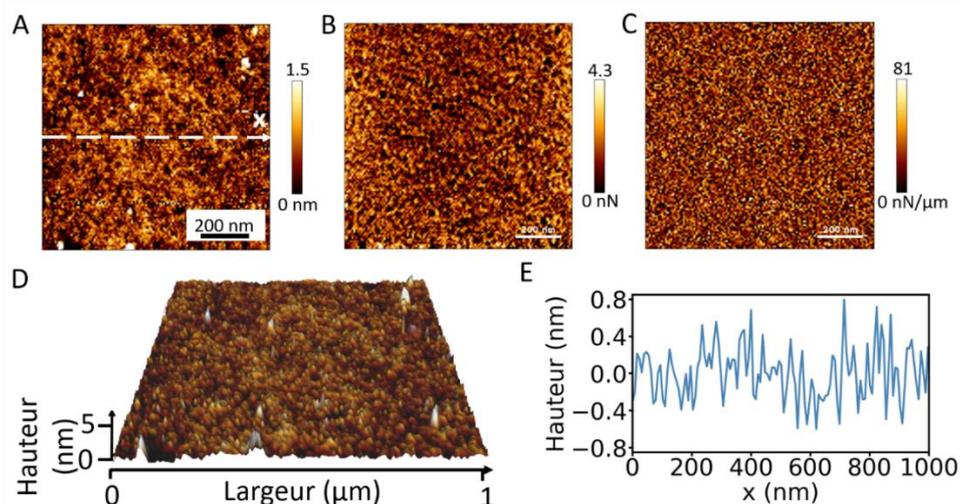
## 2. Résultats des mesures de microscopie à force atomique

La Figure 2-9 présente l'ensemble des résultats, c'est-à-dire des cartographies de la surface du nanofilm, obtenues par microscopie à force atomique. L'ensemble des images 2-9.A-D a été reconstruit à partir des courbes approche/retrait présentées sur la figure 2-8.A : chaque pixel correspond à une courbe approche/retrait.

La figure 2-9.A indique la topographie de la surface : pour chaque pixel, la position du point de contact entre la pointe et le substrat a été mesurée et tracée pour l'ensemble des 128 x 128 pixels<sup>2</sup> inclus sur une surface balayée de l'échantillon de 1  $\mu\text{m}^2$ . La valeur de hauteur en chaque pixel de la surface de l'échantillon est codée en fausses couleurs selon l'échelle indiquée sur la droite de l'image (0 à 1,5 nm). La figure 2-9.B rapporte la valeur de la force d'adhésion de la pointe à la surface du nanofilm en chaque pixel. La faible valeur de la force d'adhésion mesurée semble indiquer une faible contamination par des molécules organiques

souvent adhésives. La figure 2-9.C correspond, quant à elle, à la cartographie de la rigidité de la surface du nanofilm imposé par la rigidité du substrat en verre. La Figure 2-9.D expose une cartographie en trois dimensions de la hauteur de l'échantillon où la granularité de la surface du nanofilm apparaît clairement. La présence de ces grains est typique des nanofilms préparés par les processus de dépôts thermiques. En effet, lors du dépôt, le processus de croissance du nanofilm sur la surface a lieu en plusieurs étapes. Tout d'abord, des îlots initialement composés d'atomes adsorbés sur le substrat vont croître, puis fusionner progressivement les uns avec les autres jusqu'à former un film continu à l'état d'équilibre [45]. Lors de cette croissance, des grains (ou cristaux) et des joints de grains, correspondant à la liaison entre deux cristaux, vont se former. On distingue deux types de grains : ceux incorporés dans le volume du nanofilm, appelés grains cristallographiques (que l'on peut déterminer par diffraction de rayons X), et ceux en surface, appelés grains morphologiques [46]. La taille des grains et la densité des joints de grain dépendent de la vitesse d'évaporation et la température du substrat. On peut noter que plus l'épaisseur du nanofilm augmente, plus la taille des grains augmente et diminue la surface occupée par les joints de grains [47].

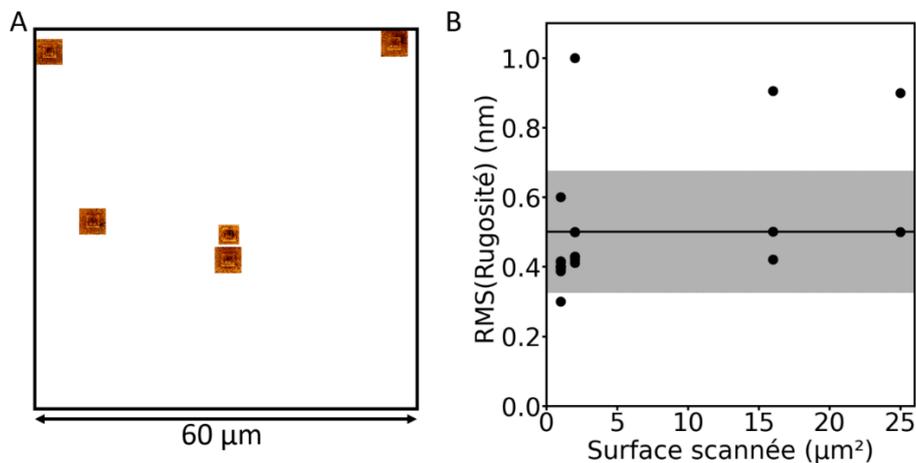
La Figure 2-9.E illustre un profil de hauteur suivant la coupe marquée par la ligne pointillée blanche sur la Figure 2-9.A. On constate que la dispersion des hauteurs est plus petite que 0,6 nm sur une distance d'un micromètre. La valeur moyenne de la rugosité (hauteur quadratique moyenne) sur l'ensemble de la surface scannée de l'image est égale à 0,4 nm, soit une valeur équivalente à quelques atomes sur une surface de  $1 \mu\text{m}^2$ . On peut aussi relever une taille de grains morphologiques d'une trentaine de nanomètres. Ces valeurs sont cohérentes avec celles rapportées dans la littérature pour des métaux thermiquement déposés à de faibles vitesses d'évaporation (autour de 0,1 nm/s) [46,48]. La Figure 2-10.B regroupe l'ensemble des mesures de la rugosité moyenne, effectuées en différents points, en fonction de la dimension de la surface du substrat analysé. On peut remarquer que celles-ci restent constantes autour d'une valeur moyenne de  $(0,5 \pm 0,2)$  nm soulignant l'importante homogénéité de l'échantillon.



**Figure 2-9 – Cartographie de la surface du nanofilm de fer obtenue par microscopie à force atomique. (A-B-C) Cartographie de la surface reconstituée à partir des courbes**

approche/retrait mesurées en chaque pixel. (A) Topographie de la surface, (B) force d'adhésion de la pointe au substrat, (C) rigidité de la surface. (D) Image en 3 dimensions représentant les variations de hauteur à la surface de l'échantillon : la structure granulaire de la surface est bien visible. (E) Coupe (profil) de la hauteur de la surface selon la ligne blanche pointillée tracée sur la Figure A.

Finalement, l'ensemble de ces résultats montre que la surface du nanofilm est uniforme et lisse (ou nano-rugueuse) notamment à l'échelle micrométrique correspondant à la taille d'une bactérie. Toutes les observations faites ici ont été reproduites sur plusieurs échantillons et en différents points de sa surface comme indiqué sur la Figure 2-10.A Cette image positionne l'ensemble des différents scans effectués sur la surface de l'échantillon autorisée par le déplacement de la pointe. Les mesures à l'air ou en milieu liquide donnent les mêmes résultats.



**Figure 2-10 – Homogénéité de la surface du nanofilm de fer.** (A) Image indiquant le positionnement de l'ensemble des surfaces micrométriques analysées sur l'échantillon (B) Données regroupant l'ensemble de valeurs moyennes de la rugosité mesuré sur les différents échantillons en fonction de la dimension de la surface scannée. On constate que celle-ci reste constante autour de  $(0,5 \pm 0,2)$  nm.

## VI. Caractérisation de la composition chimique du nanofilm par spectroscopie photo-électronique à rayons X (XPS)

La spectroscopie photo-électronique à rayons X (XPS) est une technique d'analyse quantitative permettant d'avoir accès à la composition atomique et chimique (état d'oxydation) des premières nanocouches à la surface de l'échantillon étudié.

### 1. Principe de la mesure XPS

Elle consiste à envoyer un faisceau monochromatique de rayons X sur la surface de l'échantillon à analyser dans un environnement sous ultra-vide. Si les photons X incidents ont une énergie suffisante pour extraire un électron d'un niveau d'énergie de cœur de l'atome, cet électron va être expulsé avec une valeur d'énergie cinétique discrète caractéristique de l'atome : c'est l'effet photoélectrique. Il est associé à la relation de conservation de l'énergie donnée par Einstein :  $h\nu = E_c + E_\phi + E_L$  où  $h\nu$  est l'énergie du rayon X incident,  $E_c$  est l'énergie cinétique du photoélectron relativement au niveau de Fermi,  $E_\phi$  est une constante associée à la fonction de travail de l'échantillon (permettant de tenir compte de la normalisation des énergies par rapport au niveau de Fermi),  $E_L$  est l'énergie de liaison de l'électron au sein de l'atome dont il s'est extrait. Ainsi, en mesurant l'énergie cinétique de chaque électron émis, il est possible de remonter à l'énergie de liaison de cet électron. La mesure consiste alors à compter le nombre d'électrons détectés sur un intervalle d'énergie donné et à le tracer en fonction de l'énergie de liaison. Le spectre alors obtenu représente la distribution en énergie des électrons émis : on y repère la présence de pics pour des valeurs discrètes d'énergie caractéristiques d'un atome donné. La position des pics donne des indications sur la nature de l'atome, l'aire sous le pic donne accès à sa concentration et les petits décalages par rapport à ce pic principal renseignent sur son état d'oxydation. En effet, l'environnement de l'atome (charge effective, nombre d'oxydation) va influencer sur l'énergie cinétique de l'électron extrait. [49-51]

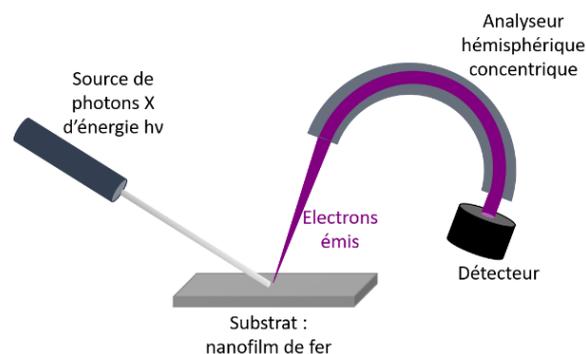
### 4. Spectroscopie photo-électronique à rayons X : matériel et méthode

L'expérience commence par le nettoyage de la surface des échantillons à l'aide d'un chiffon imbibé d'éthanol afin d'enlever d'éventuelles contaminations qui pourraient endommager la pompe à vide. S'en suit la mise sous ultravide de la chambre. Cette étape est essentielle puisqu'elle permet : d'éviter toute contamination de la surface par adsorption de gaz et d'éviter la diffusion des électrons éjectés entre la surface de l'échantillon et l'analyseur (optimisation du libre parcours moyen) [51,52].

La figure 2-11 présente un schéma du spectromètre utilisé. Le spectromètre K-Alpha (ThermoFisher Scientific) est équipé d'une source monochromatique de rayons X (Al  $K_{\alpha}$ , 1486.6 eV) de taille de faisceau égale à 400  $\mu\text{m}$ . L'analyseur d'énergie adopté ici est un analyseur hémisphérique utilisé en mode CAE (analyseur à énergie fixe). Il agit comme un filtre passe-bande qui ne laisse passer que les électrons d'une certaine gamme d'énergie cinétique. Sa résolution est déterminée par le choix de cette bande passante. Pour le spectre large, une bande passante en énergie de 200 eV et un pas de 1 eV sont choisis et pour le spectre fin, une bande passante de 20 eV avec un pas de 0,1 eV. Avant l'analyseur, se trouvent des lentilles

magnétiques qui ralentissent les électrons et courbent leur trajectoire pour les focaliser parfaitement entre l'entrée et la sortie de l'analyseur. L'application d'un champ variable en entrée de l'analyseur permet le scan en énergie. Par ailleurs, deux autres dispositifs non représentés sur la Figure 2-11 ont été utilisés. Tout d'abord, une « flood gun dual beam » est utilisée pour neutraliser la charge accumulée sous l'effet de l'irradiation par les photons X incidents [53]. Ensuite, un canon ionique est employé pour pulvériser l'échantillon nanocouche par nanocouche et ainsi avoir accès au profil de composition chimique en fonction de l'épaisseur de l'échantillon. La calibration de l'appareil a été faite par rapport à l'énergie de liaison du C1s fixé à 284,8 eV.

Deux spectres sont communément réalisés : un scan large (intervalle d'énergie de 1100 eV à 0 eV) afin d'obtenir une première information sur les éléments chimiques présents et un scan précis, centré en énergie sur les régions d'intérêt, afin de pouvoir quantifier la composition chimique. Dans notre cas, trois séances XPS effectuées à quelques mois d'intervalle, on permit l'analyse de six nanofilms de fer. Pour chaque échantillon, 4-5 spectres larges sont d'abord réalisés en cinq points différents afin de cartographier l'état chimique de la surface et vérifier son homogénéité. Ensuite, un spectre de plus grande résolution, centré autour du signal Fe 2p, est répété plusieurs fois pour vérifier l'intégrité du nanofilm suite à la mise sous vide et à l'illumination par le faisceau de rayons X.



**Figure 2-11 – Schéma du dispositif expérimental de spectrométrie photo-électronique X.**

*Une source monochromatique de photons X irradie la surface du nanofilm de fer. Par effet photoélectrique, des électrons des niveaux d'énergie de cœur des atomes situés sur les premières nanocouches de l'échantillon vont être extraits. Ces photoélectrons, d'énergie cinétique discrète, vont être envoyés vers un analyseur jouant le rôle d'un filtre passe-bande en énergie : seuls certains électrons d'énergie donnée seront sélectionnés. A la sortie, le détecteur va compter le nombre d'électrons en fonction de leur énergie cinétique.*

## 5. Résultats des mesures de spectrométrie photoélectronique de rayons X

Afin d'interpréter les différents pics présents sur les spectres en énergie obtenus par les mesures XPS (Figure 2-12), commençons par détailler les mécanismes principaux à l'origine de la forme du spectre :

- Les pics de grande intensité sont liés à l'émission des électrons de cœur situés sur les premières couches atomiques ; ces derniers pouvant être extraits sans perte d'énergie. Dans la plupart des cas ces pics sont symétriques. Toutefois, comme nous pouvons le voir sur le spectre étroit (Figure 2-12.A), le pic associé au fer (courbe bleue) présente une asymétrie. Cette observation est commune aux métaux et s'explique par le couplage du photoélectron avec les électrons de conduction.
- Le bruit de fond du spectre (ligne noire continue Figure 2-12.A) est quant à lui associé aux électrons ayant subi des collisions. On les retrouve également sur le spectre large sous forme de bosses à des énergies un peu plus élevées que celles du pic principal. Comme ce phénomène aléatoire a lieu en continu, le bruit de fond apparaît uniforme.

Ensuite, d'autres types d'émission « parasites » d'électrons peuvent rendre l'interprétation du spectre difficile :

- Emission des électrons Auger : lorsque l'atome, ionisé après l'émission du photoélectron, reste dans un état excité, celui-ci peut relaxer en émettant un nouvel électron conduisant à l'apparition d'un nouveau pic en énergie. L'énergie de ces derniers étant indépendante de l'énergie du rayon X incident, un changement de longueur d'onde de la source de rayons X permet de les identifier. Toutefois cette manipulation n'est pas toujours réalisable en pratique.
- Emission d'électrons « shake-up » : la probabilité non nulle que les atomes restent à l'état ionisé après l'émission du photoélectron peut conduire à l'apparition de pics d'énergie plus basse que celle attendue.
- Effet des rayons X satellites : les pics apparaissant aux très faibles énergies sur le spectre large (Figure 2-12.C) sont induits par des rayons X d'énergies autres que celle de 1486,6 eV. Ils sont également émis par la source [54].

L'ensemble de ces différents mécanismes d'émission rend compliqué l'analyse des spectres obtenus. C'est pourquoi, l'ensemble de l'analyse ci-après a été effectué conjointement avec Diana Dragoe, ingénieur de recherche à l'ICCMO (Université Paris-Saclay, Orsay). L'état chimique de tous les éléments détectés est déterminé en ajustant le spectre via le logiciel casaXPS. Un bruit de fond de type Shirley est soustrait et l'aire des pics est renormalisée en utilisant les facteurs de sensibilité Scofield.

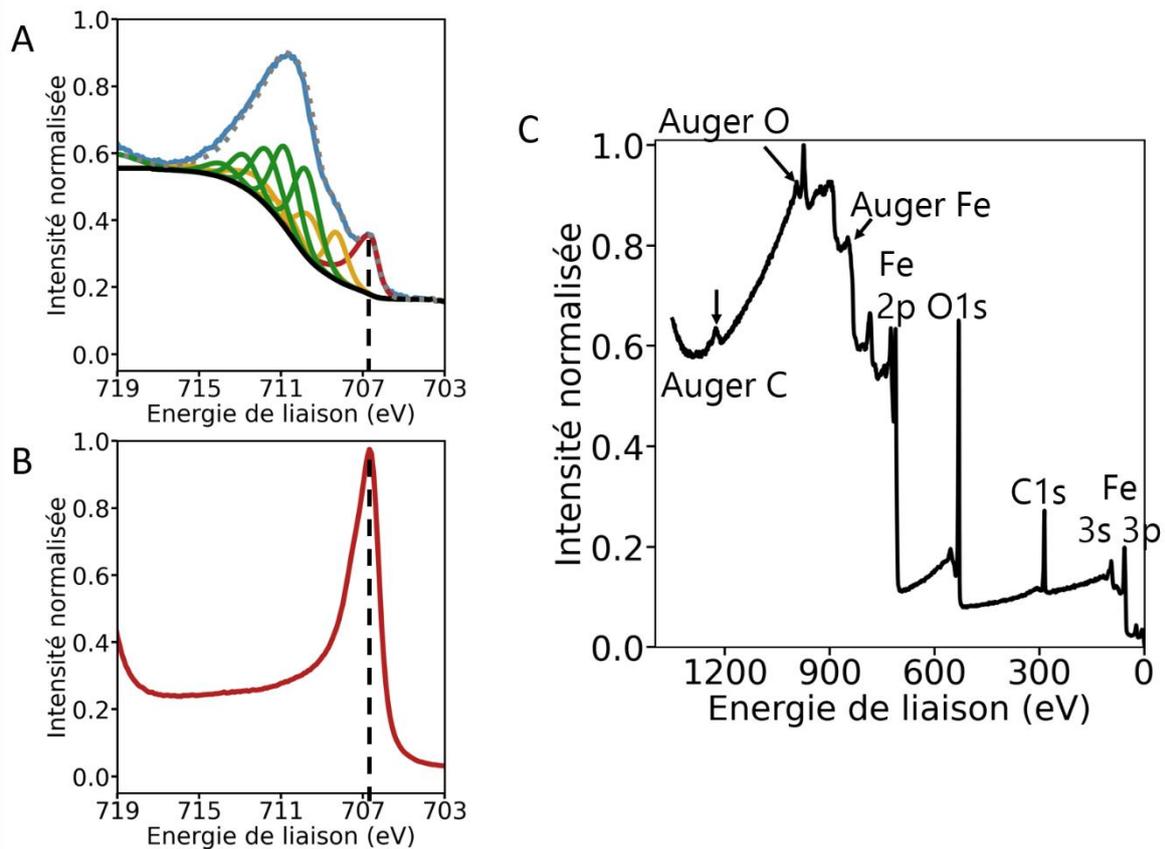
Le spectre large, présenté sur la Figure 2-12.C, montre la présence d'oxygène 1s à 50-70% (525-535 eV), de fer 2p à 20-35% (705-715 eV) et de carbone 1s à 15-25% (280-290 eV). Des résultats identiques sont obtenus sur différentes parties de la surface du nanofilm ainsi que sur plusieurs échantillons différents démontrant l'uniformité de la composition chimique de surface du nanofilm. La présence de carbone est attribuée à une contamination de la surface communément rapportée sur la plupart des échantillons exposés à l'air (atmosphère) [55]. Par ailleurs, une dégradation du creuset en tungstène contenant le pellet de fer lors de l'évaporation thermique peut avoir lieu. En effet, la mauvaise cristallisation du tungstène à hautes températures peut le rendre friable et engendrer des micro-cassures [24]. Nous avons donc vérifié qu'aucune contamination au tungstène n'était observée. De plus, aucun

composant utilisé dans la fabrication d'aciers inoxydables (nickel, chrome, aluminium), pouvant conférer une stabilité particulière au nanofilm face à la corrosion, n'a été détecté. Sur certains spectres, du calcium et du sodium peuvent être observés.

Un spectre plus étroit en énergie, centré sur le signal 2p du fer, a ensuite été mesuré (Figure 2-12.A). La séparation en multiplets (différents pics verts et jaunes) observée, est commune aux matériaux paramagnétiques ayant un nombre impair d'électrons de valence. En effet, après l'ionisation de l'atome, l'électron laissé non-apparié peut venir se coupler avec un autre électron non-apparié de l'atome suivant une multitude de configurations possibles. Le pic initial va alors se scinder en plusieurs composantes à l'origine des multiplets. C'est notamment le cas du Fe(II) et du Fe(III). Les pics sont analysés en utilisant un mélange de courbes gaussiennes et lorentziennes (70%-30%) pour le cas des oxydes et une ligne asymétrique de type LA (1,2,4,8,3) [56] pour le fer métallique. L'ajustement de la scission du multiplet [57] a été faite par le logiciel en suivant la procédure donnée dans [56,58] avec des contraintes sur les aires des pics et la position des pics. Il révèle la présence de Fe(0) à 10-20% (ligne rouge), Fe(II) à 25-30% (lignes jaunes) et Fe(III) à 50-60% (lignes vertes). Cette observation, conjuguée à la présence d'oxygène visible sur le spectre large, suggère que les premières nanocouches du nanofilm sont majoritairement composées de différents oxydes/hydroxydes/oxyhydroxydes de fer. Le second spectre étroit en énergie (Figure 2-12.B) est mesuré lors de l'abrasion sous flux d'ions du nanofilm. Il permet de déterminer la composition chimique des sous-couches où un unique état se dessine : le Fe(0) pur. Cette mesure d'abrasion n'a malheureusement pas été effectuée sur des échantillons évaporés sur une sous-couche de 5 nm de titane qui aurait pu apporter des informations sur la composition de l'interface fer/titane.

L'ensemble de ces mesures XPS montre donc clairement qu'une couche uniforme, majoritairement composée d'une structure hétérogène d'oxydes de fer, recouvre une sous-couche de fer au degré d'oxydation 0. L'ensemble du film est lui-même couvert d'une couche de contamination de carbone. Ces résultats sont en accord avec les résultats de Boamah et al. [59,60] où des nanofilms similaires présentent une couche supérieure d'oxydes de fer recouvrant totalement le Fe(0). Ces couches de surface, d'environ 3 nm d'épaisseur, apparaissent comme non-cristallines. Notons que, dans notre cas, la couche d'oxyde croît et recouvre rapidement l'ensemble de la surface exposée à l'air puisqu'elle est détectée sur des échantillons évaporés quatre heures avant l'analyse XPS.

Lors des premières expériences de biocorrosion, nous avons pu noter la fragilité de la couche de fer. Celle-ci était sujette à la formation de trous millimétriques lorsqu'elle était fraîchement préparée alors que des échantillons plus anciens (datant d'une semaine) étaient mécaniquement plus stables. La durée du contact de l'échantillon avec l'air ambiant semblait donc influencer sur la stabilité de la couche. Les analyses XPS révèlent une fraction réduite en Fe(0) comparée aux états oxydés pour les échantillons anciens, suggérant l'existence d'un lent processus de croissance de la couche d'oxyde à l'origine de la stabilisation de la couche mince.



**Figure 2-12 – Résultats des mesures obtenues par spectroscopie photoélectronique de rayons X.** Les spectres renormalisés présentent le nombre d'électrons comptés en fonction de l'énergie de liaison du photoélectron à l'atome (A-B) Spectres étroits en énergie centrés sur le signal 2p du fer : (A) Ajustement du signal (ligne grise en pointillés) et décomposition en multiplets des signaux associés au Fe(II) (lignes jaunes) et Fe(III) (lignes vertes) révélant la présence d'une fine couche d'oxydes de Fe(II) et Fe(III) (épaisseur de quelques nanomètres) recouvrant la surface du nanofilm. (B) Spectre obtenu suite à l'abrasion du nanofilm par faisceau ionique. Seul le signal du Fe(0) (courbe rouge) est détecté sous cette couche externe d'oxydes de fer. (C) Spectre large typiquement obtenu sur le nanofilm de fer.

## VII. Caractérisation des propriétés électriques du nanofilm

La caractérisation électrique des nanofilms est effectuée via une mesure quatre points de sa résistivité électrique. Cette dernière indique sa capacité à « résister » à la circulation d'un courant électrique, autrement dit à s'opposer aux déplacements des électrons libres au sein du réseau atomique composant la structure métallique. Dans le cas des nanofilms, la variation de la résistivité en fonction de l'épaisseur est particulièrement intéressante. En effet, l'épaisseur du conducteur est réduite et approche alors de la dimension du libre parcours moyen des électrons de conduction au sein du réseau métallique (de l'ordre de quelques nanomètres à une dizaine de nanomètres). Une augmentation des collisions électrons libres-phonons tant sur la surface du nanofilm [61] que sur ses irrégularités [62] ou encore sur les joints de grains entre deux cristaux [63] et sur les impuretés [64] vont engendrer une augmentation significative de la résistivité du nanofilm comparée à celle d'échantillons massifs [75,76].

### 1. Mesure quatre points de la résistivité électrique : matériel et méthode

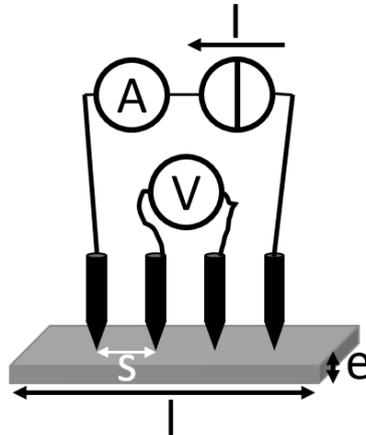
Afin de mesurer la résistivité des nanofilms de fer, une méthode bien connue et communément utilisée, notamment dans le suivi de la fabrication industrielle des semi-conducteurs, est employée : la mesure quatre points [67]. Originellement, cette méthode avait été développée par Wenner (1916) pour la mesure de la résistivité de la Terre [6].

Le montage est décrit sur la Figure 2-13. Il repose sur l'utilisation de quatre électrodes (ou pointes) toutes espacées de la même distance et alignées. Les deux pointes les plus externes injectent un courant électrique, noté  $I$ , et les deux pointes internes mesurent la différence de potentiel alors créée dans le nanofilm, noté  $V$ . L'utilisation d'électrodes spécifiques d'une part à l'injection du courant électrique et d'autre part à la mesure du potentiel induit permet de s'affranchir de la résistance de contact [69]. Cette résistance de contact étant dépendante des conditions de mesure, la supprimer permet de mesurer avec une plus grande précision les valeurs de résistance. La résistance du matériau alors mesurée, notée  $R_F$ , est égale à  $R_F = \frac{V}{I} \frac{\pi}{\ln(2)} CF$  où  $CF$  représente l'ensemble des facteurs correctifs liés à la dimension de l'échantillon (surface et épaisseur), à la taille ou au positionnement des électrodes par rapport aux bords de l'échantillon. Le facteur  $\frac{\pi}{\ln(2)}$ , provient de l'expression du potentiel induit par une source dipolaire (ici les deux électrodes externes qui sont également distancées). Comme notre échantillon est carré, la résistivité totale du nanofilm s'écrit alors  $\rho = e.R_F$ , où  $e$  est l'épaisseur du nanofilm.

Les facteurs correctifs liés à la dimension de l'échantillon ou à l'épaisseur nanométrique versus la distance entre les électrodes sont évalués via la résolution de l'équation de Poisson [70] et tabulés [71,72]. Dans notre cas, la largeur de l'échantillon égale à 22 mm et la distance entre les électrodes de 2 mm conduisent à des facteurs correctifs égaux à 4,53 (dû à la géométrie et à la valeur du rapport  $s/l$ ) et à 0,943 (dû à la finesse de l'échantillon). Par ailleurs, nous avons veillé à bien positionner les électrodes au milieu de l'échantillon afin de limiter les effets de bords. Schetze [73] souligne que lorsque les électrodes sont disposées à plus de quatre fois la distance inter-électrodes des bords de l'échantillon, la mesure de résistivité est indépendante

de la localisation des électrodes sur la surface de l'échantillon en raison de la répartition concentrique des lignes de courant induite autour des électrodes externes.

L'ensemble de nos mesures a été réalisé à l'air (pas de contact de la surface avec un milieu liquide) et à température ambiante (23°C).



**Figure 2-13 – Schéma présentant le montage de mesure à quatre points de la résistivité électrique.** La résistivité électrique des nanofilms de fer est mesurée via quatre électrodes alignées les unes par rapport aux autres. Un courant électrique est injecté par les deux pointes externes et la différence de potentiel induite au sein du nanofilm est mesurée entre les deux électrodes internes. Ici  $s = 2 \text{ mm}$ ,  $l = 22 \text{ mm}$  et  $e$  varie entre  $3 \text{ nm}$  et  $30 \text{ nm}$ .

## 2. Résultats des mesures de résistivité électrique

La Figure 2-14 présente les données de résistivité (cercles pleins violets) mesurées par la méthode quatre points en fonction de l'épaisseur du nanofilm de fer thermiquement évaporé.

Deux premières observations peuvent être faites. La première concerne la forte décroissance de la résistivité électrique lorsque l'épaisseur du nanofilm augmente de  $3 \text{ nm}$  à  $10 \text{ nm}$ . Cette forte diminution est suivie d'un plateau constant pour des épaisseurs de films plus grandes (jusqu'à  $30 \text{ nm}$ ). Sur toute la gamme d'épaisseur considérée ici, les valeurs de résistivité mesurées sont au moins deux fois plus élevées que la valeur communément obtenue pour les échantillons massifs de  $\text{Fe}(0)$  égale à  $0,10 \mu\Omega\cdot\text{m}$ . Deuxièmement, aucune discontinuité dans les valeurs de résistivité n'est observée pour les très petites épaisseurs du nanofilm (inférieures à  $5 \text{ nm}$ ). Ce résultat indique que le nanofilm déposé, dès  $3 \text{ nm}$  d'épaisseur, est suffisamment continu pour permettre le passage d'un courant électrique [74]. Cette constatation est cohérente avec les données rapportées dans la littérature montrant qu'une épaisseur de  $[0,7, 1,5] \text{ nm}$  est suffisante pour avoir un échantillon conducteur et qu'au-delà d'une épaisseur de  $[2,3, 3,5] \text{ nm}$  le film devenait continu. [22, 23].

Ensuite, différents modèles sont proposés pour ajuster les données de résistivité électrique de films métalliques polycristallins. Le plus courant est le modèle de Fuchs-Sondheimer (modèle F-S) [61]. Celui-ci reprend le modèle de conduction des électrons proposés par Thomson en y apportant plusieurs améliorations. D'une part, le libre parcours moyen ( $l_{pm}$ ) des électrons est

à présent calculé en moyennant l'ensemble des libres parcours des électrons à un instant donné, et non plus en moyennant l'ensemble des libres parcours d'un électron donné. D'autre part, deux types de collisions des électrons avec la surface sont pris en compte : par réflexion diffuse et par réflexion spéculaire. La proportion d'électrons réfléchis élastiquement sur l'interface est notée  $p$  [75]. Le modèle F-S formalise l'influence de la diminution de l'épaisseur par une contribution plus importante des effets de surface par rapport à ceux de volume quant à la réflexion des électrons. Cet effet de taille induit une brusque augmentation de la résistivité électrique du matériau aux petites épaisseurs. Dans ce cas, la variation de la résistivité en fonction de l'épaisseur est donnée par l'expression simplifiée [76] :

$$\frac{\rho_{FS}}{\rho_0} = \frac{1}{1 - \frac{3k}{2}(1-p) \int_1^\infty \frac{1}{t^3-t^{-5}} \frac{1-e^{-kt}}{1-pe^{-kt}} dt} \quad \text{avec } k = \frac{e_{Fe}}{l_{pm}}$$

avec  $e_{Fe}$  l'épaisseur du nanofilm,  $l_{pm}$  le libre parcours moyen,  $p$  la proportion d'électrons spéculairement réfléchis et  $\rho_0$  la résistivité volumique.

Toutefois, les structures granulaires des films obtenus par évaporation sont omises dans ce modèle. Or nous pouvons imaginer que plus la taille des grains cristallographiques est petite ou plus la densité des joints de grains est grande, plus les porteurs de charge rencontreront de centres diffuseurs et donc plus la résistivité volumique du matériau sera élevée [77]. La structure granulaire avec la présence de joints de grains ou de défauts structuraux internes semblent donc jouer un rôle majeur dans le parcours des électrons libres [78]. Afin d'en tenir compte, Mayadas et Shatzkes (modèle M-S) proposent un autre modèle dans lequel la réflexion des électrons sur les joints de grains est intégrée [79,80]. Dans ce cas, la résistivité du matériau s'écrit alors [81] :

$$\frac{\rho_{MS}}{\rho_0} = \frac{1}{1 - \frac{3}{2}\alpha + 3\alpha^2 - 3\alpha^3 \ln\left(1 + \frac{1}{\alpha}\right)} \quad \text{avec } \alpha = \frac{l_{pm}}{\xi} = \frac{R}{1-R}$$

avec  $R$  le coefficient de réflexion des électrons sur les joints de grains,  $D$  la taille des grains,  $l_{pm}$  le libre parcours moyen des électrons et  $\rho_0$  la résistivité du volume. La difficulté de ce modèle réside dans le choix de la relation entre la taille des grains et l'épaisseur du nanofilm. Certains proposent une relation linéaire, d'autres une relation proportionnelle ou plus complexe [82, 83].

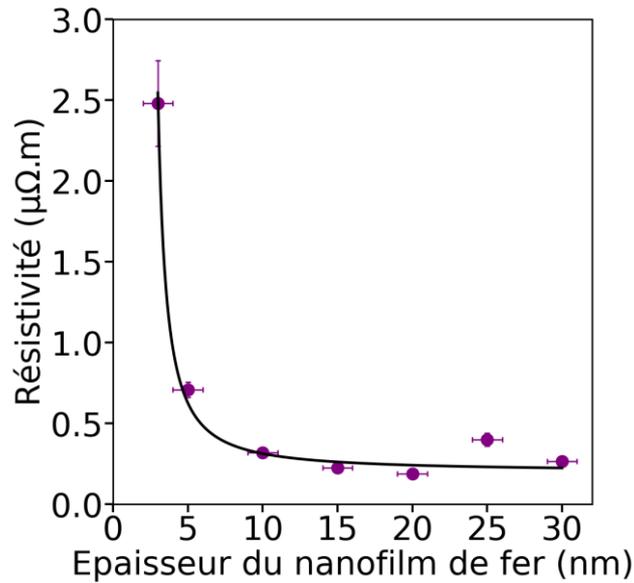
La combinaison de ces deux modèles est utilisée pour ajuster les données expérimentales et tracée sur la Figure 2-14. Cinq paramètres sont ajustés : le libre parcours moyen  $l_{pm}$ , la résistivité du volume  $\rho$ , le coefficient de réflexion spéculaire sur la surface  $p$ , le coefficient de réflexion spéculaire sur les joints de grains  $R$  et le facteur de proportionnalité entre la taille des grains et l'épaisseur du nanofilm  $\alpha$ . L'ajustement donne :

- Un libre parcours moyen égal à  $(3 \pm 1)$  nm, ce qui est en accord avec la valeur calculée à température ambiante par le modèle de Drude égale à 3 nm. Dans ce modèle, le libre parcours moyen est défini par :  $l_{pm} = \frac{m^*v^*\sigma_0}{n^*e^2}$  avec  $m$  la masse de l'électron,  $v$  la vitesse

des électrons à la surface de la distribution de Fermi,  $\sigma_0$  la conductivité volumique,  $n$  le nombre d'électrons par unité de volume et  $e$  la charge de l'électron.

- Une résistivité de  $0,20 \pm 0,01 \mu\Omega.m$  soit deux fois la valeur attendue pour le Fe(0) massif ( $0,10 \mu\Omega.m$ ) ce qui est couramment observé dans le cas de films ultra-fins [84].
- Un coefficient  $R$  est quant à lui égal à  $3.10^{-10}$  et le coefficient de proportionnalité  $\alpha = 3,5$ . Ce dernier est en accord avec les observations AFM sur lesquelles on peut mesurer une taille de grains trois fois supérieure à celle de l'épaisseur du nanofilm. On peut souligner que la présence du modèle M-S est principalement visible pour des épaisseurs supérieures à 15 nm [85]. Dans notre cas, il ne permet pas, seul, d'ajuster l'ensemble des données mais seulement celles jusqu'à 10 nm. La faible valeur du coefficient de réflexion indique l'importance des réflexions de type diffusante dans notre système ce qui est en accord avec la présence de petites aspérités tant surfaciques que volumiques.
- Un coefficient  $p$  égal à  $-2,8 \pm 0,5$ . Cette valeur négative est surprenante car elle est en dehors des bornes attendues dans le modèle F-S (entre 0 et 1) mais elle n'est pas un cas isolé [86]. D'autres modèles sont proposés pour améliorer le modèle F-S dont celui proposé par Zhou et al [87]. Il sépare explicitement les effets liés à la rugosité de la surface des autres types de réflexion sur la surface. Ainsi, l'ensemble des réflexions sur l'interface n'est plus uniquement contenu dans le paramètre spéculaire  $p$  mais dans deux termes :  $p = p_s + \Delta p$  où  $p_s$  est associé à la diffusion des électrons sur une surface lisse et  $\Delta p$  à celle sur les rugosités de la surface. En comparant les deux modèles, on obtient une expression de  $\Delta p$  égale à  $-4 \sqrt{\frac{2}{3}} \frac{\omega}{\xi}$  où  $\omega$  est la rugosité moyenne de la surface et  $\xi$  la longueur de corrélation latérale. Soulignons qu'ici  $\Delta p$  est négatif puisque la rugosité de l'interface induit une augmentation de la résistivité formalisée dans le modèle FS par une diminution du paramètre  $p$ .

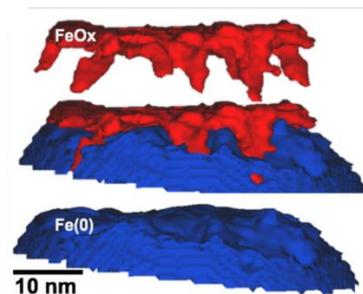
Finalement, on constate que de nombreux paramètres différents peuvent influencer sur la résistivité du nanofilm et isoler chaque contribution est difficile. Dans notre cas, la croissance de la couche d'oxyde à la surface du Fe(0) pourrait présenter de grandes irrégularités et davantage d'atomes d'oxygène [10, 88-90]. La réflexion des électrons sur l'interface rugueuse oxyde/métal ainsi que sa cristallinité domineraient alors les effets résistifs.



**Figure 2-14 – Dépendance de la résistance électrique en fonction de l'épaisseur du nanofilm de fer.** Les mesures de résistivité (cercles pleins violets) ont été réalisées à l'aide d'un montage à quatre points. Les facteurs correctifs liés à la géométrie et à l'épaisseur ultrafine ont été pris en compte. La courbe noire correspond à l'ajustement par le modèle de Fuchs-Sondheimer couplée avec celui de Mayadas et Shatzkes. Les cinq paramètres d'ajustement obtenus sont égaux à :  $(3 \pm 1)$  nm pour le libre parcours moyen,  $(0,20 \pm 0,01)$   $\mu\Omega.m$  pour la valeur de résistivité du volume,  $3.10^{-10}$  pour le coefficient de réflexion des électrons sur les joints de grains, 3,5 pour le coefficient de proportionnalité entre l'épaisseur du nanofilm et la taille des grains et  $(-2,8 \pm 0,5)$  pour le coefficient de diffusion spéculaire des électrons sur la surface.

## VIII. Conclusion

L'ensemble des méthodes de caractérisation de surface présentées ici nous a permis de découvrir que les nanofilms de fer présentent une surface granulaire nanorugueuse et homogène composée d'oxydes de Fe(II) et Fe(III) (avec une prédominance de Fe(III)). Les mesures de réflectivité X et d'absorption optique confirment la présence de Fe(0) soulignant que la croissance de la couche d'oxyde ne s'étend pas sur la totalité de l'épaisseur du nanofilm [9, 91,92]. La nanocouche d'oxyde recouvre entièrement la couche de Fe(0) sous-jacente comme proposé par Boamah et al (Figure 2-15). Par ailleurs, nous avons pu constater que l'épaisseur du nanofilm est suffisamment grande pour que la sous-couche de Fe(0) partage des propriétés volumiques communes avec une feuille épaisse de Fe(0) en termes de composition chimique et de propriétés électriques [61,71,85,86].



**Figure 2-15 – Modélisation reprise de l'article de Boamah et al [59] présentant la structure d'un nanofilm de fer. Hétérostructure du nanofilm de fer formé d'une couche d'oxyde de fer (rouge) recouvrant entièrement la couche de Fe(0) (bleu).**

En milieu liquide, l'hydratation ou l'hydroxylation de la couche d'oxyde ainsi que la possible adsorption d'autres molécules du milieu sur la surface sont susceptibles de venir modifier chimiquement la couche protectrice d'oxyde présente sur les nanofilms [93]. Toutefois, nous verrons dans le chapitre 4 que ces nanofilms, immergés en milieu aqueux, restent stables sur plusieurs jours. La couche d'oxyde présente sur les nanofilms semble donc induire une résistance particulière à la corrosion. Le processus de fabrication par évaporation des nanofilms de fer pourrait être à l'origine de cette résistance. En effet, celui-ci pourrait induire des contraintes mécaniques ou morphologiques qui renforceraient le caractère protecteur de la couche d'oxyde. La présence de grains plus petits que sur les échantillons massifs pourrait augmenter la stabilité du nanofilm en évitant l'insertion et la diffusion d'oxygène, de molécules d'eau ou d'autres atomes le long de son épaisseur [94]. D'autres études, portant sur les revêtements d'alliage de nanocristaux Ni-Cu, retrouvent cette grande résistance à la corrosion des structures nanocristallines comparée aux structures microcristallines. La plus grande densité de joints de grains dans les structures nanocristallines accélérerait la formation d'une couche stable, résistante et protectrice d'oxydes [95,96]. Cette grande stabilité de la couche passive présente sur nos échantillons pourrait être mise en parallèle avec celle protégeant les aciers inoxydables. En effet, bien qu'ayant une composition chimique différente, cette surcouche fine d'oxyde (de 1 à 3 nm d'épaisseur) est également considérée comme une couche passive protectrice, responsable de leur remarquable résistance à la corrosion [9]

Du fait de son épaisseur nanométrique et de son faible coefficient d'absorption optique, des modifications de structure ou d'épaisseur de la couche d'oxyde ne peuvent être suivies par de simples expériences optiques. Toutefois, nous verrons, dans le chapitre 4, que le signal optique transmis par le nanofilm de fer immergé dans un milieu liquide reste constant au cours du temps. Cette observation suggère que : 1) l'épaisseur de Fe(0) reste constante au cours du temps et donc que la couche d'oxyde ne croît pas au détriment du Fe(0), 2) aucune dissolution locale, à la sensibilité micrométrique près de notre mesure, suivie d'une régénération de la couche d'oxyde n'est constatée. Ces observations sont différentes de celles habituellement faites sur des aciers épais où les premières étapes de la corrosion sont considérées comme le lieu de dissolutions locales (piqûres) de la couche de fer associée à une reformation de la couche d'oxyde en quelques secondes [97]. La rugosité nanométrique et l'homogénéité des nanofilms pourraient ici prévenir la formation de piqûres - leur initiation étant fortement dépendante des conditions de surface du métal et habituellement reliée à des inhomogénéités physiques ou chimiques de surface ou des défauts [98].

Cette importante stabilité de la nanocouche de fer face à la corrosion permet d'envisager le renforcement de la protection d'échantillons métalliques massifs par le dépôt homogène d'une nanocouche de fer sur sa surface. Cette idée rejoint l'engouement des recherches autour des nano-recouvrements aux propriétés structurelle, optique et électrique particulièrement intéressantes [99].

## Références :

- [1] W. R. Grove, *On the electro-chemical polarity of gases*. Philos. Trans. R. Soc. Lond. **142**, 87 (1852)
- [2] H. Bach, D. Krause, *Thin Film on Glass*. Springer Science, Berlin (1997)
- [3] I. B. Freund, S. Suresh, *Thin Film Materials: Stress, Defect Formation and Surface Evolution*. Cambridge University Press, New York (2003)
- [4] S. Bashir, J. L. Liu, *Advanced Nanomaterials and Their Applications in Renewable Energy*. Elsevier Inc., Amsterdam, The Netherlands, 1–50 (2015)
- [5] R. A. Miller, *Thermal barrier coatings for aircraft engines: history and directions*. J. Thermal Spray Technol. **6**, 35 (1997)
- [6] E. P. Gusev, *Defects in SiO<sub>2</sub> and Related Dielectrics: Science and Technology*. Springer Science, Dordrecht (2000)
- [7] C. G. Grandqvist, *Solar Energy Mater. Solar Cells*, **91**, 1529 (2007)
- [8] F. Variola, J. H. Yi, L. Richert, J. D. Wuest, F. Rosei, A. Nanci, *Tailoring the surface properties of Ti6Al4V by controlled chemical oxidation*. Biomaterials, **29**, 1285-1298 (2008)
- [9] C.-O. A. Olsson, D. Landolt, *Passive films on stainless steels – chemistry, structure and growth*. Electrochim. Acta, **48**, 1093-1104 (2003)
- [10] D. S. Ghosh, *Basics of Ultrathin Metal Films and Their Use as Transparent Electrodes*. In *Ultrathin Metal Transparent Electrodes for the Optoelectronics Industry*. Springer, Heidelberg (2013).
- [11] M. N. Polyanskiy, *Refractive index database* (2014)
- [12] P. B. Johnson, R. W. Christy, *Optical constants of transition metals: Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, and Pd*. Phys. Rev. B, **9**, 5056-5070 (1974).
- [13] M. R. Querry, *Optical constants*. Missouri Univ-Kansas City (1985)
- [14] A. Korkin, E. Gusev, J. Labanowski, S. Luryi, *Nanotechnology for Electronic Materials and Devices*. Springer Science, New York (2007)
- [15] S. M. Rossnagel, *Thin film deposition with physical vapor deposition and related technologies*. J. Vac. Sci. Technol. A, **21**, S74 –S87 (2003)
- [16] R. Messier, *Toward quantification of thin film morphology*. J. Vac. Sci. Technol., **4**, 490-495 (1986)
- [17] J. A. Thornton, *Influence of apparatus geometry and deposition conditions on the structure and topography of thick sputtered coatings*. J. Vac. Sci. Technol., **11**, 666-670 (1974)

- [18] J. A. Thornton, *Study of the microstructure of thick sputtered coatings*. Thin Solid Films, **40**, 335-342 (1977)
- [19] J. M. Friedt, *Introduction à la microbalance à quartz : aspects théoriques et expérimentaux*. Bulletin de l'Union de Physiciens, **97**, 429-440 (2003)
- [20] K. Wasa, M. Kitabatake, H. Aichi, *Thin film materials technology: sputtering of control compound materials*. Springer Science (2004)
- [21] D. A. Jameel, *Thin film deposition process*. Int. J. Mod. Phys. and App., **1**, 193-199 (2015)
- [22] J. S. Agustsson, U. B. Arnalds, A. S. Ingason, K. B. Gylfason, K. Johnsen, S. Olafsson, J. T. Gudmundsson, *Electrical resistivity and morphology of ultra thin Pt films grown by dc magnetron sputtering on SiO<sub>2</sub>*. J. Phys.: Conf. Ser., **100**, 082006 (2008)
- [23] A. I. Maarof, B. L. Evans, *Onset of electrical conduction in Pt and Ni films*. J. Appl. Phys., **76**, 1047-1054 (1994)
- [24] D. H. Mattox, *Handbook of Physical Vapor Deposition (PVD) Processing: Film Formation, Adhesion, Surface Preparation and Contamination Control*. Noyes Publications, New Jersey (1998)
- [25] T. B. Massalski, H. Okamoto, P. R. Subramanian, L. Kacprzak, *Binary alloy phase diagrams*. ASM international, Cleveland (1990)
- [26] P. Kužel, *Electromagnétisme des milieux continus - Optique*. Licence de Physique, Institut Galilée, Université Paris-Nord, **2001**, 31-38 (2000).
- [27] M. A. Ordal, R. J. Bell, R. W. Alexander, L. A. Newquist, M. R. Querry, *Optical properties of Al, Fe, Ti, Ta, W, and Mo at submillimeter wavelengths*. Appl. Opt., **27**, 1203-1209 (1988)
- [28] W. S. M. Werner, K. Glantschnig, C. Ambrosch-Draxl, *Optical constants and inelastic electron-scattering data for 17 elemental metals*. J. Phys. Chem. Ref. Data, **38**, 1013-1092 (2009)
- [29] X. Liu, J. Chen, M. Luo *et al.*, *Thermal evaporation and characterization of Sb<sub>2</sub>Se<sub>3</sub> thin film for substrate Sb<sub>2</sub>Se<sub>3</sub>/CdS solar cells*. ACS Appl. Mater. Interfaces, **6**, 10687-10695 (2014)
- [30] K. Lu, J. Fang, H. Yan, X. Zhu, Y. Yi, Z. Wei, *A facile strategy to enhance absorption coefficient and photovoltaic performance of two-dimensional benzodione polymers via subtle chemical structure variations*. Organic Electronics, **14**, 2652-2661 (2013)
- [31] S. Dewolf *et al.*, *Organometallic halide perovskites: sharp optical absorption edge and its relation to photovoltaic performance*. J. Phys. Chem. Lett., **5**, 1035-1039 (2014)
- [32] M. F. Al-Kuhaili, M. Saleems, S. M. A. Durrani, *Optical properties of iron oxide ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) thin films deposited by the reactive evaporation of iron*. Journal of alloys and compounds, **521**, 178-182 (2012)
- [33] M. Ahmed, A. Bakry, A. Qasem, H. Dalir, *The main role of thermal annealing in controlling the structural properties of ITO thin film layer*. Optical Materials, **113**, 110866 (2021)

- [34] P. B. Johnson, R. W. Christy, *Optical constants of transition metals: Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, and Pd*. Phys. Rev. B, **9**, 5056-5070 (1974).
- [35] M. R. Query, *Optical constants*. Missouri Univ-Kansas City (1985)
- [36] G. Vignaud, A. Gibaud, *REFLEX: a program for the analysis of specular X-ray and neutron reflectivity data*. Journal of Applied Crystallography. J. App. Cryst., **52**, 201-213 (2019)
- [37] M. Yasaka, *X-ray thin-film measurement techniques*. The Rigaku Journal, **26**, 1-9 (2010)
- [38] A. Gibaud, S. Hazra, *X-ray reflectivity and diffuse scattering*. Current Science, 1467-1477 (2000)
- [39] P. Boher, *Caractérisation d'empilements de couches minces par ellipsométrie spectroscopique et réflectivité spéculaire des rayons X rasants* (2001)
- [40] F. Abélès, *La théorie générale des couches minces*. J. Phys. et le Radium, **11**, 307-309 (1950)
- [41] G. Meyer, N. Amer, *Novel optical approach to atomic force microscopy*. Appl. Phys. Lett., **53**, 1045-1447 (1988)
- [42] S. Alexander, L. Hellemans, O. Marti, J. Schneir, V. Elings, P. K. Hansma, M. Longmire, J. Gurley, *An atomic-resolution atomic-force microscope implemented using an optical lever*. J. Appl. Phys., **65**, 164-167 (1989)
- [43] O. Marti, J. Colchero et J. Mlynek, *Combined scanning force and friction microscopy of mica*. Nanotechnology, **1**, 141 (1990)
- [44] G. Meyer, N. M. Amer, *Simultaneous measurement of lateral and normal forces with an optical-beam-deflection atomic force microscope*. Appl. Phys. Lett., **57**, 2089-2091 (1990)
- [45] X. Yu, P. M. Duxbury, G. Jeffers, M. A. Dubson, *Coalescence and percolation in thin metal films*. Phys. Rev. B, **44** 13163 (1991)
- [46] J. S. Agustsson *et al.*, *Electrical resistivity and morphology of ultra thin Pt films grown by dc magnetron sputtering on SiO<sub>2</sub>*. J. Phys.: Conf. Ser., **100**, 082006 (2008)
- [47] C. V. Thompson, *Structure evolution during processing of polycrystalline films*. Annu. Rev. Mater. Sci., **30**, 159-190 (2000)
- [48] N. Mahmoodi *et al.*, *Room temperature thermally evaporated thin Au film on Si suitable for application of thiol self-assembled monolayers in micro/nano-electro-mechanical-systems sensors*. J. Vac. Sci. Technol. A, **35**, 041514 (2017)
- [49] J. F. Watts, *X-ray photoelectron spectroscopy*. Surface science techniques, **45**, 5 (1994)
- [50] C. S. Fadley, *X-ray photoelectron spectroscopy: Progress and perspectives*. Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena, **178**, 2-32 (2010)
- [51] S. Hoffman, *Auger and X-Ray Photoelectron Spectroscopy in Materials Science: a user oriented guide*. Springer Science, 528 (2012)

- [52] C. Chusuei, W. D. Goodman, *X-Ray Photoelectron Spectroscopy. In Encyclopedia of Physical Science and Technology*. Academic Press, New York, **17**, 921-938 (2002).
- [53] D. R. Baer *et al.*, *XPS guide: Charge neutralization and binding energy referencing for insulating samples*. J. Vac. Sci. & Tech. A, **38**, 031204 (2020)
- [54] J. Chastain, R. C. King Jr, *Handbook of X-ray photoelectron spectroscopy*. Perkin-Elmer Corporation, **40**, 221 (1992)
- [55] ThermoFisher Scientific. <https://xpssimplified.com/elements/carbon.php>
- [56] M. C. Biesinger, B. P. Payne, A. P. Grosvenor, L. W. M. Lau, A. R. Gerson, R. St. C. Smart, *Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides : Cr, Mn, Fe, Co and Ni*. Appl. Surf. Sci., **257**, 2717-2730 (2011)
- [57] R. P. Gupta, S. K. Sen, *Calculation of multiplet structure of core p-vacancy levels. II*. Phys. Rev. B., **12**, 15-19 (1975)
- [58] I. S. Molchan *et al.*, *Microscopic study of the corrosion behaviour of mild steel in ionic liquids for CO<sub>2</sub> capture applications*. RSC Adv., **5**, 35181-35194 (2015)
- [59] M. D. Boamah, E. H. Lozier, J. Kim, P. E. Ohno, C. E. Walker, T. F. Miller III, F. M. Geiger, *Energy conversion via metal nanolayers*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, **116**, 16210-16215 (2019)
- [60] D. Faurie-Wisniewski, F. M. Geiger, *Synthesis and characterization of chemically pure nanometer-thin zero-valent films and their surfaces*. J. Phys. Chem. C, **118**, 23256-23263 (2014)
- [61] K. Fuchs, *The conductivity of thin metallic films according to the electron theory of metals*. Math. Proc. Cambridge Philos. Soc., **34**, 100-108 (1938)
- [62] Y. Namba, *Resistivity and temperature coefficient of thin metal films with rough surface*. Japanese Journal of Applied Physics. Jap. J. Appl. Phys., **9**, 1326 (1970)
- [63] A. F. Mayadas, M. Shatzkes, *Electrical-resistivity model for polycrystalline films: the case of arbitrary reflection at external surfaces*. Phys. Rev. B, **1**, 1382 (1970)
- [64] J. S. Chawla, F. Gstrein, K. P. O'Brien, J. S. Clarke, D. Gall, *Electron scattering at surfaces and grain boundaries in Cu thin films and wires*. Phys. Rev. B, **84**, 235423 (2011)
- [65] F. Chen and D. Gardner, *Influence of line dimensions on the resistance of Cu interconnections*. IEEE Electron Device Letters. IEEE Electron Device Lett., **19**, 508-510 (1998)
- [66] D. Josell, S. H. Brongersma, and Z. Tókei, *Size-dependent resistivity in nanoscale interconnects*. Annual Review of Materials Research. Annu. Rev. Mater. Res., **39**, 231-254 (2009)
- [67] D. K. Schroder, *Semiconductor Materials and Device Characterization*. Wiley, New York (1990)
- [68] F. Wenner, *A method of measuring earth resistivity*. Bur. Stand. (U.S) Bull., **12**, 469-478 (1915)

- [69] B. Jones, *Resistance measurements on play-doh*. Phys. Teach., **31**, 48–49 (1993)
- [70] M. Yamashita, M. Agu, *Geometrical correction factor for semiconductor resistivity measurements by four-point probe method*. Jap. J. App. Phys., **23**, 1499 (1984)
- [71] Ossila. <https://www.ossila.com/pages/sheet-resistance-theory> (2021)
- [72] F. M. Smith, *Measurement of sheet resistivities with the four-point probes*. Bell System Technical Journal, **37**, 711-718 (1958)
- [73] A. P. Schetze, W. Lewis, C. Brown, W. J. Geerts, *A laboratory on the four-point probe technique*. American Journal of Physics, **72**, 149-153 (2004)
- [74] I. M. Rycroft, B. L. Evans, *The in situ characterization of metal film resistance during deposition*. Thin Solid Films, **290-291**, 283-288 (1996)
- [75] W. Zhang, S. H. Brongersma, O. Richard, B. Brijs, R. Palmans, L. Froyen, K. Maex, *Influence of the electron mean free path on the resistivity of thin metal films*. Microelec. Eng., **76**, 146-152. (2004)
- [76] J. S. Chawla, X. Y. Zhang, D. Gall, *Effective electron mean free path in TiN (001)*. J. App. Phys., **113**, 063704 (2013)
- [77] F. Cemin *et al.*, *Low electrical resistivity in thin and ultrathin copper layers grown by high power impulse magnetron sputtering*. J. Vac. Sci. Tech. A, **34**, 051506 (2016)
- [78] M. Vopsarioiu, M. J. Thwaites, G. V. Fernandez, S. Lepadatu, K. O'Grady, *Grain size effects in metallic thin films prepared using a new sputtering technology*. J. Optoelectron. Adv. Mater., **7**, 2713-2720 (2005)
- [79] E. E. Mola, J. M. Heras, *Numerical Evaluation of the Resistivity of Polycrystalline Metal Films With the Mayadas-Shatzkes Model*. Electrocomponent Science and Technology, **1**, 77-80 (1973)
- [80] D. Choi, *The electron scattering at grain boundaries in tungsten films*. Microelec. Eng., **122**, 5-8 (2014)
- [81] A.K. Pal, S. Chaudhuri, *Effect of grain-boundary scattering on the electrical resistivity of indium films*. J. Mater. Sci., **11**, 872–876 (1976)
- [82] S. Dutta *et al.*, *Thickness dependence of the resistivity of platinum-group metal thin films*. J. Appl. Phys., **122**, 025107 (2017)
- [83] J. M. E. Harper, C. Cabral Jr., P. C. Andricacos, L. Gignac, I. C. Noyan, K. P. Rodbell, and C. K. Hu, *Mechanisms for microstructure evolution in electroplated copper thin films near room temperature*. Journal of applied physics. J. Appl. Phys., **86**, 2516-2525 (1999)
- [84] B. Singh, N. A. Surplice, *The electrical resistivity and resistance-temperature characteristics of thin titanium films*. Thin Solid Films, **10**, 243-253 (1972)

- [85] W. Zhang, S. H. Brongersma, O. Richard, B. Brijs, R. Palmans, L. Froyen, K. Maex, *Influence of the electron mean free path on the resistivity of thin metal films*. Microelec. Eng., **76**, 146-152 (2004)
- [86] R. S. Smith *et al.*, *An evaluation of Fuchs-Sondheimer and Mayadas-Shatzkes models below 14nm node wide lines*. AIP Advances, **9**, 025015 (2019)
- [87] T. Zhou, P. Zheng, S. C. Pandey, R. Sundararaman, D. Gall, *The electrical resistivity of rough thin films : a model based on reflection at discret step edges*. J. Appl. Phys., **123**, 155107 (2018)
- [88] D. Dayal, P. Rudolf, P. Wibmann, *Thickness dependence of the electrical resistivity of epitaxially grown silver films*. Thin Solid Films, **79**, 193-199 (1981)
- [89] N. Redjda *et al.*, *Microstructural, electric and magnetic properties of FeCo thin films grown by thermal evaporation*. Thin Solid Films, **552**, 164-169 (2014).
- [90] J. W. Lim, M. Isshiki, *Electrical resistivity of Cu films deposited by ion beam deposition: Effects of grain size, impurities, and morphological defect*. J. Appl. Phys., **99**, 094909 (2006)
- [91] T. Ohtsuka, in *Characterization of corrosion products on steel surfaces*, Y. Waseda, S. Suzuki. Springer, Berlin, Heidelberg, 19-31 (2006)
- [92] D. D. Macdonald, *Passivity – the key to our metals-based civilization*. Pure Appl. Chem., **71**, 951-978 (1999)
- [93] V. Maurice, P. Marcus, *Progress in corrosion science at atomic and nanometric scales*. Prog. Mater. Sci., **95**, 132-171 (2018)
- [94] D. H. Abdeen, M. El Hachach, M. Koc, M. A. Atieh, *A review on the corrosion behaviour of nanocoatings on metallic substrates*. Materials, **12**, 210 (2019)
- [95] S. K. Ghosh, G. K. Dey, R. O. Dusane, A. K. Grover, *Improved pitting corrosion behaviour of electrodeposited nanocrystalline Ni–Cu alloys in 3.0 wt.% NaCl solution*. Journal of alloys and compounds, **426**, 235-243 (2006)
- [96] S. H. Mosavat, M. H. Shariat, M. E. Bahrololoom, *Study of corrosion performance of electrodeposited nanocrystalline Zn–Ni alloy coatings*. Corrosion Science, **59**, 81-87 (2012)
- [97] C. Punkt, M. Bölscher, H. H. Rotermund, A. S. Mikhailov, L. Organ, N. Budiansky, J. R. Scully, J. L. Hudson, *Sudden onset of pitting corrosion on stainless steel as a critical phenomenon*. Science, **305**, 1133 (2004)
- [98] Y. Wang, G. Cheng, Y. Li, *Observation of the pitting corrosion and uniform corrosion for X80 steel in 3.5% NaCl solutions using in-situ and 3D measuring microscope*. Corr. Sci., **111**, 508-517 (2016)
- [99] H. Khachatryan, S.-N. Lee, K.-B. Kim, and M. Kim, *Deposition of Al Thin Film on Steel Substrate: The Role of Thickness on Crystallization and Grain Growth*. Metals, **9**, 12 (2019)



## Chapitre 3

# Biocorrosion des nanofilms de fer : matériels et méthodes

La biocorrosion correspond à la corrosion influencée, directement ou indirectement, par la présence de micro-organismes supposant une imbrication particulière entre microorganismes, milieu de culture et métal [1]. Une caractérisation physique et chimique du métal choisi dans notre étude, à savoir le nanofilm de fer, a été présentée dans le deuxième chapitre de ce manuscrit. Ce nouveau chapitre sera, lui, consacré à la description des deux autres paramètres, soit les souches bactériennes et les milieux de culture, utilisés dans le cadre de nos expériences. Les différentes techniques expérimentales mises en place pour suivre le processus de dégradation de la couche de fer, in situ et en temps réel, seront également détaillées. Un montage de mesures optiques macroscopiques combiné à un dispositif de mesures électriques ainsi qu'une cellule de culture adaptée à des observations par microscopie optique seront exposés. Les protocoles de mesures de pH, dioxygène et concentration en  $\text{Fe}^{2+}$  seront précisés.

## I. Introduction

La biocorrosion est un phénomène surfacique impliquant de multiples réactions électrochimiques influencées ou induites par l'activité de micro-organismes. Compte tenu de la diversité de micro-organismes, de matériaux et d'environnements, la biocorrosion implique un grand nombre d'interactions, de mécanismes et de réactions chimiques possibles [1,2].

Dans le cadre de notre étude, nous avons choisi d'utiliser le fer comme matériau de par son rôle central dans de nombreuses fonctions biologiques indispensables au bon fonctionnement de la machinerie cellulaire (fabrication d'ADN, transport et stockage de l'oxygène...). Si la plupart des cellules vivantes assimilent le fer pour leur fonctionnement optimal, des organismes procaryotes telles que les bactéries ferri-réductrices sont également capables d'utiliser le fer ferrique situé à l'extérieur de leur membrane comme dernier maillon de leur chaîne de respiration cellulaire.

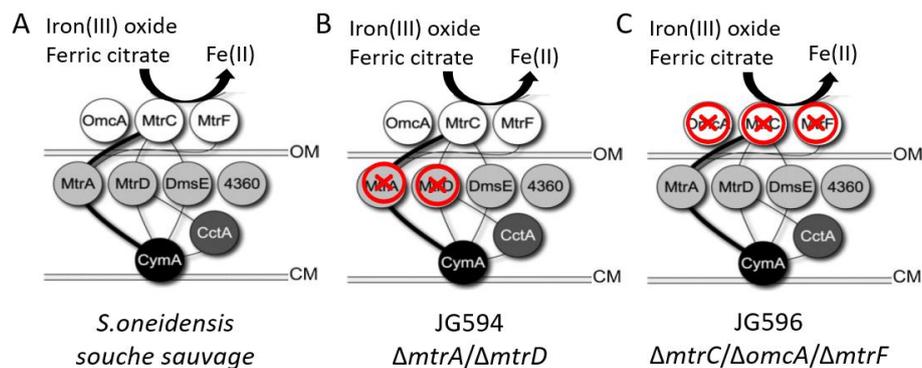
Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, différentes espèces bactériennes sont connues pour influencer le phénomène de biocorrosion. Nous avons choisi de nous centrer principalement sur la bactérie *Shewanella oneidensis* MR-1. Cette espèce bactérienne présente une grande versatilité respiratoire qui serait liée au nombre important de gènes (une quarantaine) codant pour des cytochromes de type-c au sein de son génome [3]. Certains de ces cytochromes ont été intensivement étudiés et caractérisés en raison de leurs implications dans la respiration extracellulaire de métaux insolubles tels que le fer, le chrome ou l'uranium. Parmi eux, on compte le système contenant les protéines OmcA, MtrA, MtrB et MtrC [4].

Ce chapitre commence par la présentation des différentes bactéries utilisées au cours des différentes expériences de biocorrosion du fer et leurs milieux de culture associés. Par la suite, l'ensemble des dispositifs expérimentaux mis en place pour caractériser ce phénomène de biocorrosion seront décrits. En particulier, l'étalonnage du montage de mesures optiques sera présenté. De plus, soulignons que certains outils ont été créés sur mesure au laboratoire afin de répondre le plus précisément possible à nos questionnements.

## II. Description des bactéries et des milieux de culture utilisés

### 1. Choix des différentes bactéries

*Shewanella oneidensis* MR-1 est une bactérie modèle anaérobie facultative connue pour sa capacité à réduire le fer ferrique (bactérie ferri-réductrice), soluble ou insoluble, à l'extérieur de sa cellule en condition anaérobie. Cette capacité est liée à la présence du système protéique Mtr, une chaîne de cytochromes decahèmes de type-c localisés sur la membrane externe (Figure 3-1). Afin de comprendre le rôle de ces cytochromes dans le processus de biocorrosion du fer, nous avons choisi d'étudier deux mutants délétés dans ces cytochromes [5]. Le premier, JG594 ( $\Delta mtrA/\Delta mtrD$ ) est délété du cytochrome *mtrA*, permettant de transférer les électrons de l'intérieur vers l'extérieur de la membrane externe, ainsi que d'un de ses homologues *mtrD*. Le second mutant, JG596 ( $\Delta mtrC/\Delta omcA/\Delta mtrF$ ), est délété du cytochrome *mtrC* et de ses deux homologues *omcA* et *mtrF* localisés sur l'extérieur de la membrane externe. Ils sont les derniers donneurs d'électrons de la chaîne du transfert extracellulaire d'électrons et permettent la réduction de l'accepteur terminal d'électrons impliqué dans la chaîne respiratoire situé à l'extérieur de la cellule (Fe(III)).



**Figure 3-1 – Présentation des mutants de *S. oneidensis*.** Figure reprise de l'article de D. Coursolle et J. Gralnick [5] indiquant par des croix rouges les cytochromes délétés pour chacun des mutants (b) JG594 et (c) JG596 en comparaison de (a) la souche sauvage *S. oneidensis*.

*S. oneidensis* est également capable de former des biofilms dont la présence dans les piles à combustible microbiennes induit une nette augmentation du rendement de la conversion bioélectrochimique. [6] En effet, la circulation des électrons au travers de la matrice polymérique extracellulaire composée de molécules redox est possible [7]. Pour quantifier l'importance de cette matrice polymérique sur le phénomène de biocorrosion, nous avons choisi d'analyser le comportement du mutant  $\Delta mxD$ , délété de l'opéron *mx*d responsable de la sécrétion de polysaccharides [8]. Dans un second temps, la production de pili conducteurs, vus comme des nanofils permettant la circulation des électrons entre les bactéries et un métal conducteur est une autre voie proposée dans l'EET. Leur rôle structurant est également cité. Des expériences préliminaires ont donc été menées sur un second mutant, obtenu dans l'équipe de Christophe Regard par insertion d'un transposon dans le gène *mshG*. La formation de pili de type IV ainsi inhibée chez ce dernier pourrait influencer son électroactivité [9].

Deux autres bactéries anaérobies facultatives, différentes des bactéries ferri-réductrices, sont choisies comme témoins : *Lactobacillus plantarum* (renommée récemment *Lactiplantibacillus plantarum* [10]) et *Escherichia coli* connues pour être non électroactives. Selon une revue récente de Light et al [11], des gènes codant pour la chaîne protéique membranaire permettant le transfert extracellulaire d'électrons (EET) seraient présents dans le génome de *L. plantarum*. Toutefois, des lacunes dans ces séquences de gènes ne permettent pas d'activer toute la chaîne de transfert d'électrons à l'extérieur de sa cellule. Ces bactéries ne peuvent donc pas utiliser le processus d'EET pour une éventuelle respiration cellulaire externe. Toutefois, le fer est un des éléments centraux de nombreux processus biologiques (transport et stockage du dioxygène, synthèse de l'ADN...). Comme la plupart des espèces vivantes, *E. coli* a donc besoin d'une certaine concentration cellulaire en fer pour son métabolisme et peu d'études parviennent à différencier les processus d'assimilation de ceux de dissimilation [12]. *L. plantarum* fait elle exception puisqu'elle a remplacé le fer par le manganèse dans son métabolisme et ne dépend donc que très peu de la présence de fer [13-15].

| Souches bactériennes   | Milieu de culture | Caractéristiques   | Référence                     |
|--|-------------------|--|-------------------------------|
| <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 sauvage  | Luria-Broth (LB)  | - semi-anaérobie facultative,<br>- besoin en fer,<br>- ferri-réductrice en milieu anaérobie.   | LGC Standards                 |
| <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 $\Delta mtrA/\Delta mtrD$                                  | LB                | - délété des cytochromes permettant de transférer les électrons du côté interne au côté externe de la membrane externe,<br>- capacité limitée à réduire le fer ferrique à l'extérieur de la cellule. | Coursolle et Gralnick (2010)  |
| <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 $\Delta mtrC/\Delta omcA/\Delta mtrF$                      | LB                | - délété des cytochromes permettant le passage des électrons à l'extérieur de leur cellule,<br>- capacité limitée à réduire le fer ferrique à l'extérieur de la cellule.                             | Coursolle et Gralnick (2010)  |
| <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 <i>mshG::miniTn5LacZ1; Kan<sup>r</sup> Rif<sup>r</sup></i> | LB + Kanamycine   | - incapacité à former des pili de type IV.   | Regeard - I2BC                |
| <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 $\Delta mxD$   | LB                | - incapacité à former de la matrice extracellulaire.   | Jourlin-Castelli et al (2019) |
| Témoins  | LB                | - non exoélectrogène (pas de respiration extracellulaire),<br>- besoin en fer dans leur métabolisme.   | Regeard - I2BC                |
|  |                   |  |                               |
|  | MRS broth         | - impossibilité de respiration extracellulaire car gène de l'EET incomplet,<br>- pas de besoin en fer remplacé par le manganèse.   | Institut Micalis - INRA       |
|  |                   | <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC8014  |                               |

**Tableau 3-1 – Tableau récapitulatif présentant l'ensemble des bactéries étudiées aux cours des expériences de biocorrosion. Notre étude se porte principalement sur *S. oneidensis*. Les deux autres bactéries (*E. coli* et *L. plantarum*) sont des témoins. Leur milieu**

de culture et leurs caractéristiques principales respectives en lien avec notre étude sont indiqués dans les deux dernières colonnes. Le pH de chaque milieu de culture est ajusté à 6,5.

## 2. Milieux de culture

Au cours des expériences décrites dans la suite de ce manuscrit, les bactéries choisies ont toutes été cultivées selon le même protocole. Seul le milieu de culture change. Pour les bactéries *S. oneidensis* et *E. coli*, le milieu classique Luria-Broth (L3522, Miller, Sigma Aldrich) est utilisé. Il sera appelé par la suite milieu LB. Le milieu est préparé à partir de la poudre LB diluée dans de l'eau ultra-pure à une concentration de 25g/L puis stérilisé dans un autoclave à 120°C pendant 15 min. Le pH final du milieu est de 6,5. D'autre part, c'est dans le milieu classique MRS broth (Nutri Select™, Sigma Aldrich) que l'espèce *L. plantarum* est cultivée. Cette fois ci, le milieu est chauffé jusqu'à dilution des 51g de poudre dans un litre d'eau ultra-purifiée à laquelle 1 mL de Tween® 80 a été ajouté. Le milieu est ensuite autoclavé à 121°C pendant 15 min. A la sortie de l'autoclave, le pH étant autour de 5,2, il est nécessaire de basifier le milieu pour retrouver un pH final de 6,5. Une solution de NaOH à 1 M est alors utilisée.

## 3. Protocole de culture des bactéries

Contrairement à *E. coli* ou *L. plantarum*, un nouvel isolement de *S. oneidensis* est effectué chaque semaine à partir d'une culture stock congelée dans du glycérol 20 % final à - 80°C striée sur boîte de LB agar. En effet, un ralentissement de la croissance des bactéries, en milieu liquide, a été observé lorsque les colonies prélevées étaient sur boîte LB Agar depuis plus d'une semaine. De couleur rouge/rose (coloration liée à l'activité des cytochromes) sur des isollements fraîchement préparés les colonies deviennent translucides au bout d'une semaine. Les isollements de *E. coli* ou *L. plantarum* peuvent, eux, être utilisés sur deux semaines consécutives.

Par la suite, une colonie isolée est prélevée, mise en suspension dans 5 mL de milieu LB et placée dans l'incubateur-shaker sous agitation à 200 rpm et 30°C pendant toute une nuit (environ 18h). Le lendemain, l'évolution de la densité optique (DO) de la préculture est contrôlée afin de vérifier la bonne croissance des bactéries. Celles-ci sont alors en phase stationnaire de croissance avec une densité optique autour de 1,4. Afin de relancer la croissance bactérienne, une dilution typique à 1/1000 dans du milieu LB est ensuite effectuée et disposée de nouveau dans l'incubateur-shaker à 200 rpm et 30°C. Les bactéries sont alors prélevées au début de leur phase exponentielle de croissance à une DO de 0,1 pour être inoculées dans la chambre de culture à la concentration souhaitée.

La densité optique est mesurée à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre GENESYS™ 40/50 visible/UV-visible. Une numération des bactéries a été effectuée sur une suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance. Ce dénombrement consiste à réaliser des dilutions en cascade à partir d'une suspension bactérienne de densité optique connue puis à étaler ces dilutions sur des boîtes LB agar. Le nombre de colonies formées (unité formant colonie) pour une dilution donnée est ensuite compté et fournit ainsi une indication sur le nombre de cellules/mL. Dans le cas de *S. oneidensis*, une DO de 1 correspond à

$7.10^8$  cellules/mL. Pour *E. coli*, les valeurs données par la littérature sont de  $2.10^8$  cellules/mL pour une DO égale à 1 et de  $2.10^7$  cellules/mL pour *L. plantarum* [16].

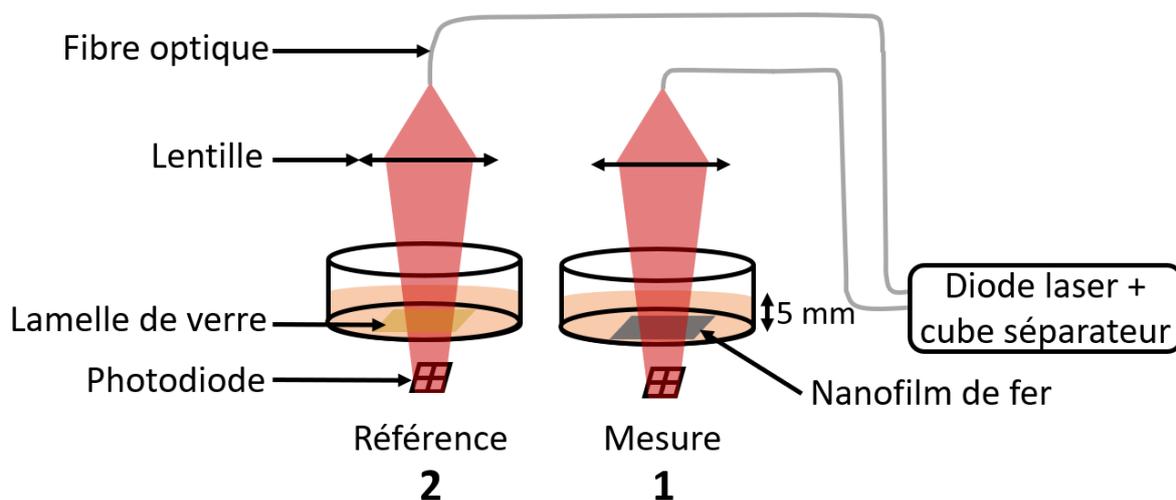
Dans la suite du manuscrit, les expériences décrites ont été réalisées à une température de 23-25°C. Les contaminations éventuelles ont toutes été contrôlées, après la réalisation des expériences, par analyse de la morphologie des colonies obtenues après isolement sur boîte. La lame de verre sur laquelle a été déposé le nanofilm de fer, décrit dans la partie précédente, est toujours disposée au fond de la chambre de culture, face en fer au contact de la suspension bactérienne.

### III. Description des techniques expérimentales développées pour le suivi de la biocorrosion

#### 1. Description du montage de mesures optiques macroscopiques

Pour cette expérience, la chambre de culture est une boîte de Petri cylindrique en polystyrène (boîte Sterilin, Thermo Scientific) de hauteur 2 cm et de diamètre 5 cm.

Le montage (Figure 3-2) se compose d'une diode laser (Melles Griot) émettant à 650 nm suivi d'un cube séparateur, permettant de diviser l'intensité lumineuse du faisceau incident en deux faisceaux de même intensité. Chacun de ces deux faisceaux est ensuite dirigé dans une fibre optique à la sortie de laquelle est disposée une lentille convergente de courte focale. Cette dernière permet de refocaliser le faisceau divergent en sortie de fibre sur 1 cm<sup>2</sup> du nanofilm de fer. La lumière transmise par l'échantillon est finalement collectée par une photodiode quatre quadrants (First Sensor) dont la surface est entièrement illuminée. La tension aux bornes de chaque quadrant est mesurée via une carte d'acquisition puis implémentée dans un programme Labview qui additionne ces quatre tensions et enregistre cette somme au cours du temps. Plus la valeur de tension est élevée plus l'intensité lumineuse transmise est élevée. Le schéma en Figure 3-2 retrace le trajet du faisceau lumineux au sein de la chambre de culture : il traverse d'abord les 10 mL du milieu de culture, contenant ou non des bactéries, puis le nanofilm de fer pour le montage de droite. L'échantillon du montage de gauche ne comprend lui que la solution liquide avec ou sans bactérie dans lequel une lamelle de verre est immergée. Il sert de référence à la mesure faite avec le nanofilm de fer.



**Figure 3-2 - Schéma du montage utilisé pour réaliser les mesures optiques.** A la sortie du cube séparateur, chaque faisceau laser est redirigé via une fibre optique vers une lentille convergente qui permet de focaliser le faisceau sur l'échantillon. Le faisceau du montage de droite (numéroté 1) traverse dans un premier temps le milieu de culture puis le nanofilm de fer déposé au fond de la boîte. Dans le montage de gauche utilisé comme référence (numéroté 2), le faisceau traverse uniquement le milieu liquide et la lamelle de verre. La lumière transmise est mesurée à l'aide d'une photodiode quatre quadrants.

## 2. Etalonnage du montage optique

L'objectif de l'étalonnage du montage de mesures optiques est de pouvoir convertir la tension mesurée aux bornes de la photodiode en une grandeur plus facilement interprétable : l'épaisseur de la couche de fer. Cette conversion nécessite d'extraire la variation temporelle du signal d'absorption du nanofilm de fer seul du signal d'absorption total associé à l'échantillon composé de la suspension bactérienne et du nanofilm de fer. La variation d'absorption liée aux bactéries est principalement due à la croissance des bactéries situées dans le volume du milieu liquide (turbidité) comparativement à celle liée aux bactéries situées sur ou au voisinage de la surface de la lamelle.

L'idée est ici de décomposer le signal d'absorption mesuré après la traversée de l'échantillon composé des bactéries et du nanofilm de fer en deux contributions (celle liée au nanofilm de fer seul et celle liée aux bactéries seules) et d'appliquer la relation d'additivité des densités optiques ( $DO_{\text{nanofilm+bactéries}} = DO_{\text{nanofilm}} + DO_{\text{bactéries}}$ ) pour extraire la densité optique du nanofilm de fer seul. Pour ce faire, quatre points sont à déterminer :

- 1) Détermination de la relation entre la tension aux bornes de la photodiode et la densité optique pour la contribution du nanofilm de fer seul,
- 2) Détermination de la relation entre la tension aux bornes de la photodiode et la densité optique pour la contribution des bactéries seules,
- 3) Détermination de la relation entre la tension aux bornes de la photodiode et la densité optique pour la contribution du nanofilm de fer et des bactéries,
- 4) Vérification de la relation d'additivité des densités optiques sur notre système.

Cette sous-partie commence donc par présenter l'ensemble des résultats obtenus pour ces quatre points. Seuls les résultats sur la photodiode 1 (photodiode de mesure) seront exposés mais le même comportement a été observé sur la photodiode 2 (photodiode de référence). Par la suite, la méthode de conversion de la tension mesurée aux bornes de la photodiode en épaisseur du nanofilm de fer sera décrite. Enfin, un contrôle de la fiabilité de l'étalonnage sera effectué en comparant une courbe de croissance bactérienne obtenue classiquement par mesure de la densité optique au spectrophotomètre avec celle enregistrée par mesure de la tension aux bornes de la photodiode, sur deux échantillons indépendants.

- a. Détermination de la relation entre tension aux bornes de la photodiode et densité optique

Dans toute cette partie, la première étape consiste toujours à mesurer la densité optique de l'échantillon étudié au spectrophotomètre (GENESYS™ 40/50 visible / UV-visible, Thermoscientific) à la longueur d'onde fixe de 650 nm (longueur d'onde du laser utilisé dans le montage de mesures optiques). Notons que la calibration du spectrophotomètre a été vérifiée à l'aide de quatre filtres à densité neutre dont l'absorption était fournie par le fabricant ( $DO = 0,5, 1, 2, 3$ ).

### i. Contribution du nanofilm

Commençons par déterminer la relation entre la tension aux bornes de la photodiode et la densité optique dans le cas le plus simple, celui où les échantillons sont des filtres de densité. Après avoir mesuré la densité optique de différents filtres au spectrophotomètre (le blanc est fait sur le verre seul), ces derniers ont été placés sur le montage de mesures optiques et la tension aux bornes de la photodiode a été mesurée. Les données obtenues sont représentées sur la Figure 3-3.A (cercles noirs pleins) par la variation de la transmittance en fonction de la tension. On constate que tous les points sont alignés selon une droite de pente  $(0,040 \pm 0,001) \text{ V}^{-1}$  à l'exception du dernier point d'ordonnée 1. La valeur de la pente est en adéquation avec la valeur attendue par la relation de proportionnalité entre la tension aux bornes de la photodiode et le flux lumineux incident (Annexe 3-1). En effet, la relation  $V_{\text{photodiode}} = R * \frac{\eta q \lambda}{hc} * \Phi = R * \frac{\eta q \lambda}{hc} * \Phi_0 * T$  avec  $R = 1 \text{ M}\Omega$ ,  $\eta = 0,82$ ,  $\lambda = 650 \text{ nm}$ ,  $\Phi_0 = 70 \text{ }\mu\text{W}$  (mesuré au puissance-mètre),  $h$  la constante de Planck,  $c$  la vitesse de la lumière dans le vide et  $q$  la charge d'un électron, donne un coefficient directeur égal à  $0,05 \text{ V}^{-1}$ . Quant à l'écart à la linéarité du dernier point, celle-ci s'explique par une tension mesurée (21 V) supérieure à la tension limite de 20 V imposée par la tension de polarisation de chaque photodiode égale à 5 V. Toutefois, cet écart à la linéarité ne nous impactera pas pour la suite de notre calibration car la densité optique de nos échantillons n'atteindra pas de telles valeurs de tension.

Par la suite, deux vérifications ont été effectuées :

- Influence de la boîte de Petri (décrite en Figure 3-2) sur la transmittance mesurée. Pour cela, chacun des filtres de densité précédemment utilisés a été placé dans la boîte de Petri cylindrique puis DO (mesurée au spectrophotomètre) et tension ont été relevées. Le résultat, présenté sur la Figure 3-3.A (cercles pleins gris), montre que les points se superposent à ceux précédemment obtenus : la boîte de Petri n'a donc aucune incidence sur le parcours des rayons lumineux.
- Influence de l'ajout de 10 mL d'eau à l'échantillon filtre + boîte de Petri. Le résultat présenté sur la Figure 3-3.A (cercles pleins bleus) indique une faible augmentation de la tension mesurée et donc de la lumière transmise. Cette observation est cohérente avec la réfraction des rayons lumineux sur l'interface air/eau pour un faisceau incident non parallèle. Les rayons lumineux vont avoir tendance à se rapprocher de la normale au dioptre lors du passage vers le milieu plus réfringent. Le faisceau converge donc davantage vers la photodiode.

La relation entre la transmittance optique et la tension mesurée aux bornes de la photodiode est donc bien linéaire dans le cas d'un échantillon composé de filtres de densité, équivalent à la contribution du nanofilm de fer.

### ii. Contribution des bactéries

Poursuivons avec la détermination de la relation entre la densité optique et la tension mesurée aux bornes de la photodiode dans le cas des bactéries seules.

L'analyse débute par l'utilisation d'une solution témoin de permanganate de potassium ( $\text{KMnO}_4$ ) présentant deux avantages : un profil d'absorption connu et reproductible, une préparation simple et rapide de solutions aqueuses de concentrations variables. Des échantillons de concentration variant entre 0,2 mM et 0,2 M ont donc été préparés et leur concentration contrôlée par la vérification de la loi de Beer-Lambert ( $DO = \alpha \cdot l \cdot C$  avec  $\alpha$  le coefficient d'absorption molaire,  $l$  l'épaisseur de solution traversée par le faisceau incident et  $C$  la concentration de la solution). Le protocole de mesure est le même que celui décrit dans la partie précédente : densité optique et tension aux bornes de la photodiode ont été relevées. L'eau distillée est choisie comme blanc pour la mesure au spectrophotomètre. Le volume de suspension bactérienne déposée dans la boîte de Petri étant choisi égal à 10 mL, une première série de mesures a été effectuée en versant 10 mL de solution de  $\text{KMnO}_4$  dans la boîte de Petri. Les résultats sont présentés sur la Figure 3-3.B (cercles pleins violets clairs). Ici la densité optique a été divisée d'un facteur 2 puisque l'épaisseur de solution traversée dans la boîte de Petri est de 0,5 cm alors qu'elle est de 1 cm dans la cuve du spectrophotomètre. Hormis les points de très petite et très grande transmittance, on constate un alignement des points selon une droite de pente  $0,045 \text{ V}^{-1}$ . On retrouve donc une valeur du même ordre de grandeur que celle attendue de  $0,05 \text{ V}^{-1}$ . Les points de très faible transmittance sortent de la gamme de linéarité car la tension aux bornes de chaque photodiode est inférieure à leur tension seuil de 0,6 V. Les points de très grande transmittance sont eux associés à la saturation de chaque photodiode. Une seconde série de mesures a été menée dans l'idée de quantifier l'influence du ménisque sur la variation de la transmittance mesurée aux bornes de la photodiode. Cette fois, la boîte de Petri est donc totalement remplie de solution de  $\text{KMnO}_4$  faisant disparaître l'interface air/liquide. Les résultats sont présentés sur la Figure 3-3.B (cercles pleins violets foncés). Ici la densité optique a été multipliée d'un facteur 2 puisque l'épaisseur de solution traversée dans la boîte de Petri est alors de 2 cm. Une augmentation de la tension mesurée et donc de la lumière transmise est constatée pouvant s'expliquer par la courbure de l'interface air/liquide assimilable à une lentille divergente qui a tendance à défocaliser le faisceau lumineux incident divergent et donc à diminuer le flux lumineux reçu sur les photodiodes.

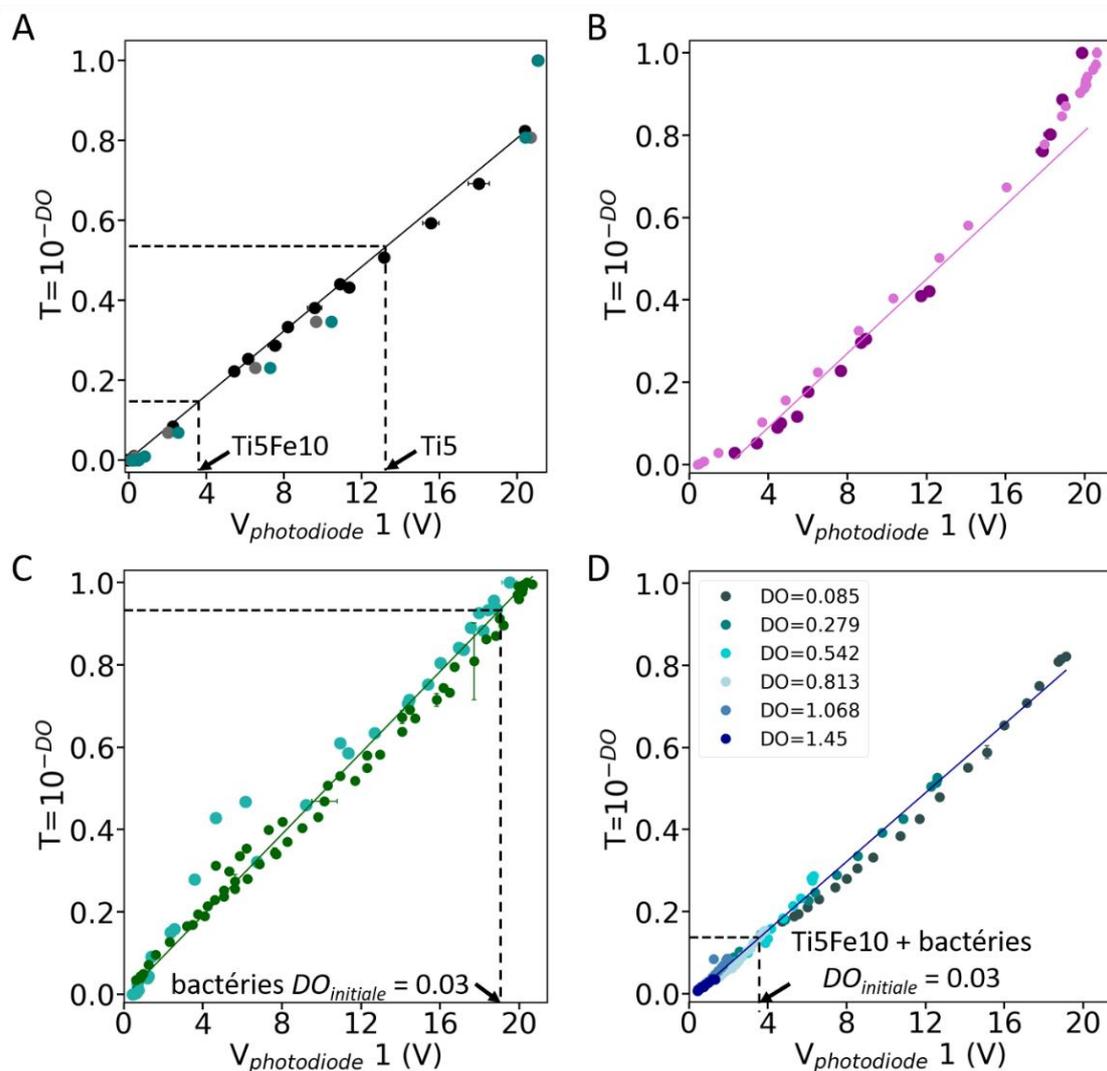
La seconde partie de l'analyse se focalise sur l'utilisation de notre échantillon d'intérêt : les bactéries. En effet, le mécanisme d'absorption de la lumière n'étant pas le même pour des solutions de  $\text{KMnO}_4$  que pour des solutions bactériennes (diffusion), il est important de vérifier que la relation entre transmittance et tension reste bien linéaire. Initialement, des solutions lactées de concentrations différentes ont été utilisées afin de faciliter les mesures. Ces solutions ont l'avantage de se comporter de façon similaire aux solutions bactériennes puisque la diminution de la transmission est aussi majoritairement due à la diffusion. Des solutions de concentration et donc de turbidités différentes ont été préparées. Un volume de 10 mL de milieu a été versé dans la boîte de Petri. Les valeurs de densités optiques mesurées au spectrophotomètre ont donc été divisées par deux. L'eau distillée et le milieu de culture sont choisis comme blancs respectifs des mesures effectuées au spectrophotomètre pour des échantillons de lait et de bactéries. Les données sont présentées sur la Figure 3-3.C (cercles pleins bleus). Les points s'alignent bien selon une droite de pente  $0,049 \text{ V}^{-1}$ . Une variation similaire est obtenue pour les bactéries (Figure 3-3.C, cercles pleins verts). La relation entre

transmittance optique et tension aux bornes de la photodiode est donc bien linéaire dans le cas où l'échantillon est composé de bactéries seules.

### iii. Contribution du nanofilm et des bactéries

A présent que les contributions à la transmission optique du nanofilm de fer seul et des bactéries seules ont été détaillées, intéressons-nous à celle de l'ensemble nanofilm et bactéries. Pour cette partie, l'échantillon se compose de solutions bactériennes de turbidité variable au fond desquelles est placé un filtre de densité. Les résultats sont présentés sur la Figure 3-3.D. Chaque série de points correspond à un filtre de densité différent dont la valeur d'absorption est annotée en légende. Comme pour les deux autres cas, le comportement linéaire de la photodiode est vérifié avec une droite de pente  $0,042 \text{ V}^{-1}$ .

La linéarité de la photodiode est donc vérifiée pour les trois types d'échantillons étudiés ce qui va simplifier le traitement des données.



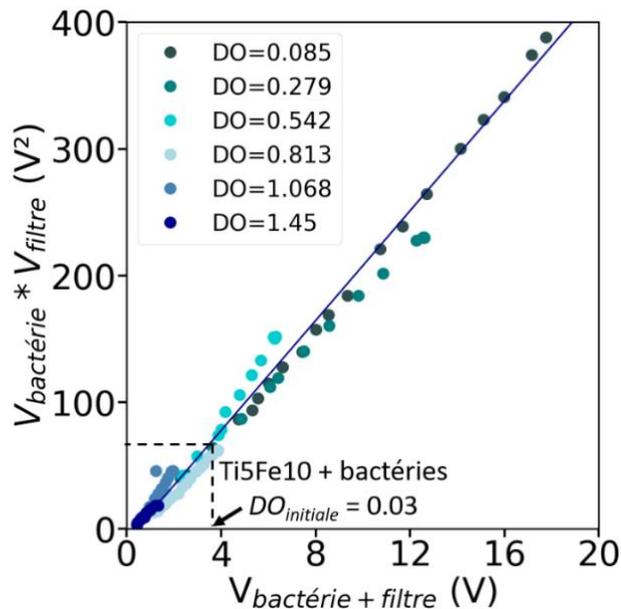
**Figure 3-3 – Relation entre tension aux bornes de la photodiode et transmittance optique.** La transmittance, calculée à partir de la densité optique mesurée au

spectrophotomètre, est tracée en fonction de la tension mesurée aux bornes de la photodiode de mesure (notée 1) pour quatre types d'échantillons différents (A) Cas de filtres de différentes densités (cercles pleins noirs). L'ajustement linéaire effectué par la méthode des moindres carrés (ligne continue noire) en omettant le point d'ordonnée 1 donne un coefficient directeur de  $(0,040 \pm 0,001) V^{-1}$ . Données relevées en plaçant les filtres de densité au fond d'une boîte de Petri (cercles pleins gris) et d'une boîte de Petri avec 10 mL d'eau (cercles pleins bleus). (B) Cas de solutions de permanganate de potassium de concentrations différentes lorsque la boîte de Petri est remplie de 10 mL de liquide (cercles pleins violets clairs) ou entièrement remplie (cercles pleins violets foncés). L'ajustement effectué (ligne continue violette) en omettant les premiers points et les derniers points donne un coefficient directeur égal à  $(0,045 \pm 0,001) V^{-1}$ . (C) Cas de solutions de lait (cercles pleins bleus) ou de bactéries (cercles pleins verts) de turbidités différentes. Les données ont été ajustées (ligne continue verte) en tenant compte de tous les points et un coefficient directeur de  $(0,049 \pm 0,001) V^{-1}$  est calculé. (D) Cas de filtres de densité combinés à des solutions bactériennes de turbidité différente. Un point de couleur donnée correspond à un filtre, dont la densité est indiquée en légende du graphe. L'ajustement (ligne continue bleue) donne un coefficient directeur de  $(0,042 \pm 0,001) V^{-1}$ .

#### b. Vérification de la loi d'additivité des densités optiques

Nous avons vu dans la partie précédente que chacune des contributions nanofilm seul, bactéries seules et l'ensemble bactéries + nanofilm présentait une caractéristique linéaire de la transmittance en fonction de la tension aux bornes de la photodiode. Autrement dit chacune des transmittances peut s'écrire sous la forme :  $T_{\text{nanofilm}} = \alpha_1 V_{\text{nanofilm}}$ ,  $T_{\text{bactéries}} = \alpha_2 V_{\text{bactéries}}$ ,  $T_{\text{nanofilm + bactéries}} = \alpha_3 V_{\text{nanofilm + bactéries}}$  où  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$  sont des constantes.

La relation d'additivité des densités optiques ( $DO_{\text{nanofilm+bactéries}} = DO_{\text{nanofilm}} + DO_{\text{bactéries}}$ ) est équivalente à la multiplication des transmittances  $T_{\text{nanofilm+bactéries}} = T_{\text{nanofilm}} \cdot T_{\text{bactéries}}$  et donc au produit des tensions  $V_{\text{nanofilm+bactéries}} = \frac{\alpha_1 \cdot \alpha_2}{\alpha_3} V_{\text{nanofilm}} \cdot V_{\text{bactéries}}$ . Comme la grandeur que l'on mesure sur le montage optique est la tension aux bornes de la photodiode, la relation d'additivité des densités optiques est vérifiée en traçant le produit  $V_{\text{nanofilm}} \cdot V_{\text{bactéries}}$  en fonction de  $V_{\text{nanofilm+bactéries}}$ . Les résultats sont présentés sur la Figure 3-4. Chaque série de couleur correspond à des solutions de turbidité en bactéries différente dans laquelle un filtre est immergé. La densité du filtre est indiquée dans la légende. On constate que les points s'alignent selon une droite de pente  $(21,68 \pm 0,01) V^{-2}$ . Cette valeur est en adéquation avec les coefficients directeurs ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$ ) calculés sur la Figure 3-3 donnant un coefficient directeur égal à  $(21,72 \pm 0,04) V^{-2}$ . La relation d'additivité des densités optiques est donc bien vérifiée sur notre montage.

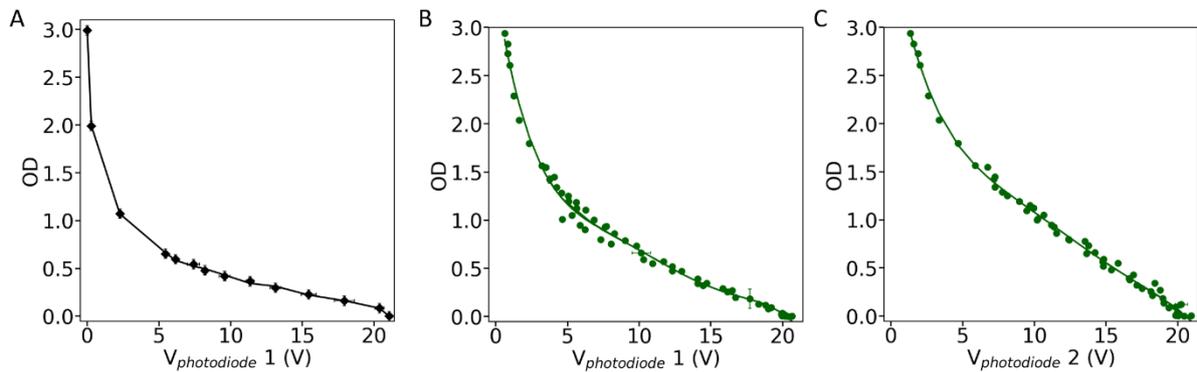


**Figure 3-4 – Vérification de la relation d’additivité des densités optiques.** *Le produit de la tension mesurée aux bornes de la photodiode pour l’échantillon contenant uniquement les bactéries (de turbidité différente) multipliée par la tension mesurée avec uniquement le filtre de densité (densité indiquée en légende) est tracé en fonction de la tension mesurée aux bornes de la photodiode pour l’échantillon composé de l’ensemble bactéries et filtre. Le coefficient directeur obtenu par l’ajustement linéaire des données est de  $(21,68 \pm 0,01) V^{-2}$ .*

- c. Description de la méthode de conversion de la tension aux bornes de la photodiode en épaisseur de fer

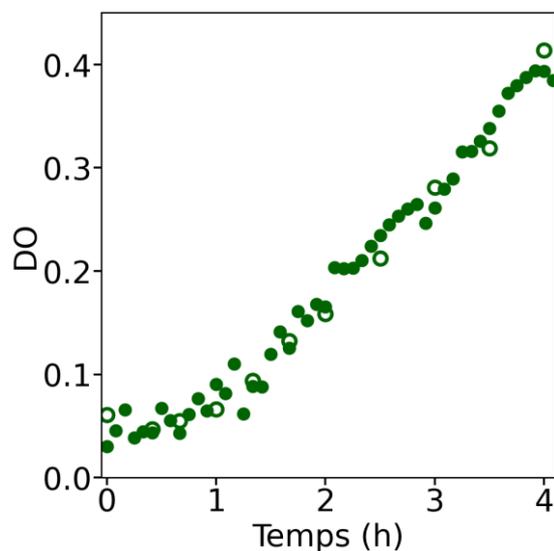
L’échantillon placé sur la photodiode de mesure se compose du nanofilm de fer immergé dans une solution de bactéries. Sur la photodiode de référence est placé l’échantillon contenant uniquement les bactéries inoculées dans les mêmes conditions que sur la première photodiode (même densité optique initiale, même volume) en présence uniquement d’une lamelle de verre. La tension aux bornes de chacune des deux photodiodes est mesurée au cours du temps. Les données brutes sont donc : la tension  $V_{\text{bactéries} + \text{nanofilm}}$  et la tension  $V_{\text{bactéries}}$  variant dans le temps. Chacune de ces deux tensions est convertie en densité optique respectivement à l’aide des ajustements des courbes d’étalonnage  $DO=f(V)$  décrits en figure 3-5.B et 3-5.C. Pour tracer les différentes courbes d’étalonnage  $DO=f(V)$ , les mesures précédemment présentées dans les Figures 3-3.A et 3-3.C ont été utilisées. Pour les Figures 3-5.B-C, les densités optiques n’ont pas été divisées par deux afin de garder la référence d’une absorption classiquement mesurée pour une épaisseur de milieu traversé de 1 cm. La relation d’additivité des DO est ensuite utilisée pour extraire la DO du nanofilm de fer seul :  $DO_{\text{nanofilm} + \text{bactéries}} = DO_{\text{nanofilm}} + DO_{\text{bactéries}}$ . Comme les courbes d’étalonnage  $DO=f(V)$  sont différentes pour les cas d’une solution de bactéries et du nanofilm, la  $DO_{\text{nanofilm}}$  précédemment extraite est alors reconvertie en tension à l’aide de la courbe inverse de  $V=f(DO)$  présentée sur la Figure 3-5.B. La tension est enfin retranscrite en densité optique associée aux filtres à l’aide de la courbe d’étalonnage présentée sur la Figure 3-5.A. La densité optique réelle du nanofilm est ainsi extraite. Finalement, la courbe de variation

de la densité optique en fonction de l'épaisseur du nanofilm de fer, présentée sur la Figure 2-4 (Chapitre 2), nous permet d'obtenir l'épaisseur de la nanocouche de fer.



**Figure 3-5 – Courbes d'étalonnage du montage de mesure optique.** La densité optique mesurée au spectrophotomètre est tracée en fonction de la tension aux bornes de la photodiode (A) Pour les filtres de différentes densités (losanges pleins noirs). Les données sont ajustées par une fonction polynômiale de degré 10 (courbe noire). (B-C) Pour des solutions turbides en bactéries (cercles pleins verts) avec la tension aux bornes de la (B) photodiode de mesure (annotée 1), (C) photodiode de référence (annotée 2). Les données sont ajustées par une fonction polynômiale de degré 5 (courbes vertes).

Afin de contrôler la fiabilité de l'étalonnage, une mesure témoin de croissance bactérienne a été réalisée. Deux échantillons ont été préparés dans les mêmes conditions : densité optique initiale égale à 0,03, température de croissance de 23°C en statique, volume de 10 mL de milieu versé dans une boîte de Petri. D'un côté la croissance bactérienne est suivie en utilisant le montage de mesures optiques (cercles pleins verts) : la tension aux bornes de la photodiode est mesurée au cours du temps pour un échantillon composé de bactéries seules et est ensuite convertie en densité optique à l'aide de la courbe d'étalonnage présentée sur la Figure 3-5.B. De l'autre côté, la croissance est suivie par des mesures de turbidité directement au spectrophotomètre (cercles verts vides). Pour chaque mesure, une boîte de Petri a été préparée afin de ne pas troubler les éventuels gradients établis dans ces conditions statiques. Le milieu est agité avant chaque mesure de densité optique. Les résultats sont présentés sur la Figure 3-6. On constate que les deux courbes se superposent parfaitement. L'étalonnage du montage de mesures optiques est donc fiable.



**Figure 3-6 – Vérification de la fiabilité de l'étalonnage.** Deux courbes de croissances sont enregistrées sur deux échantillons différents dans les mêmes conditions de croissance : température de 23°C, en statique et avec une densité optique initiale égale à 0,03. D'un côté la croissance est suivie en utilisant le montage de mesures optiques (cercles pleins verts). De l'autre côté, la croissance est suivie par des mesures de turbidité directement au spectrophotomètre (cercles verts vides).

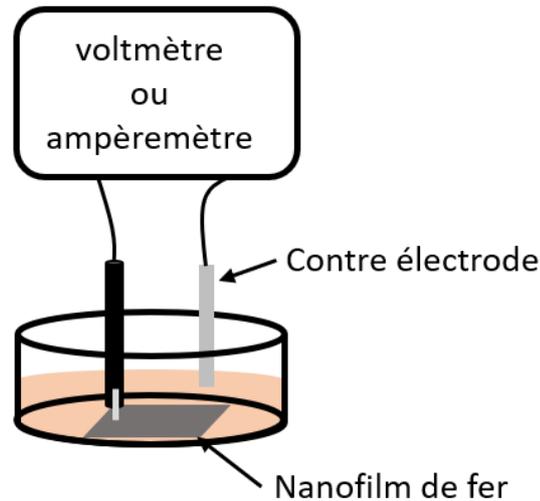
### 3. Description du montage de mesures électriques à deux électrodes

Afin de caractériser électriquement la biocorrosion du fer, un montage à deux électrodes a été utilisé. L'idée première était de mesurer la tension en circuit ouvert entre le nanofilm de fer et une électrode de référence Ag/AgCl (Pine Research - Equilibrium – France). Conjointement, des mesures d'intensité électrique ont été effectuées en connectant, cette fois, le nanofilm de fer et une contre électrode de platine (Goodfellow) à un ampèremètre. Bien que ces mesures d'intensité électrique ne caractérisent pas directement le processus de corrosion (couplage platine/fer), l'idée initiale était de quantifier l'intensité électrique libérée au cours du phénomène et de comparer ces valeurs à celles obtenues au sein des biopiles.

Ces mesures électriques (Figure 3-7) étant souvent conjointes aux mesures optiques, la chambre de culture utilisée ainsi que la disposition du nanofilm de fer au fond de la boîte de Petri sont identiques à celles représentées sur la Figure 3-2. L'appareil de mesure est interfacé et commandé via un programme LabView. Chaque point de mesure correspond à la valeur moyenne des 200 données mesurées sur une seconde et est enregistré avec son écart type.

Afin d'améliorer la qualité de la mesure d'intensité électrique, différentes configurations ont été testées. Premièrement, le choix de l'appareil de mesure. Initialement, un amplificateur Lock-in (MLFI – Zurich Instruments) a été utilisé conduisant à un écart type pour les mesures d'intensité électrique de l'ordre de  $2 \cdot 10^{-5}$  A. En le remplaçant par un multimètre standard (Agilent 34410A de résistance interne  $10^{10}$   $\Omega$ ), beaucoup moins sensible au bruit et donc bien plus adapté à notre mesure d'un signal de courant continu, l'écart type est passé à  $2 \cdot 10^{-7}$  A. Deuxièmement, le choix de l'électrode de contact avec le nanofilm de fer. Initialement, le

contact avec le nanofilm de fer s'opérait à l'aide d'une tige dorée entourée d'une gaine protectrice. Toutefois, l'étanchéité de la gaine protectrice n'était pas parfaite et une petite surface de la tige dorée restait en contact avec la solution liquide. Bien qu'inerte, le revêtement doré de la tige s'abîmait au fur et à mesure des nettoyages et des expériences. La possibilité d'utiliser une électrode en platine entièrement gainée (Pine Research - Equilibrium – France) a permis de s'assurer d'un point de contact ponctuel et donc qu'aucune réaction électrochimique fortuite parasiterait les mesures. Des observations similaires ont été observées pour les mesures de tension en circuit ouvert.



**Figure 3-7 - Schéma du montage utilisé pour réaliser les mesures électriques.** Une électrode en platine permet le contact avec le nanofilm de fer. Le circuit est fermé par une contre électrode en platine ou une électrode de référence Ag/AgCl.

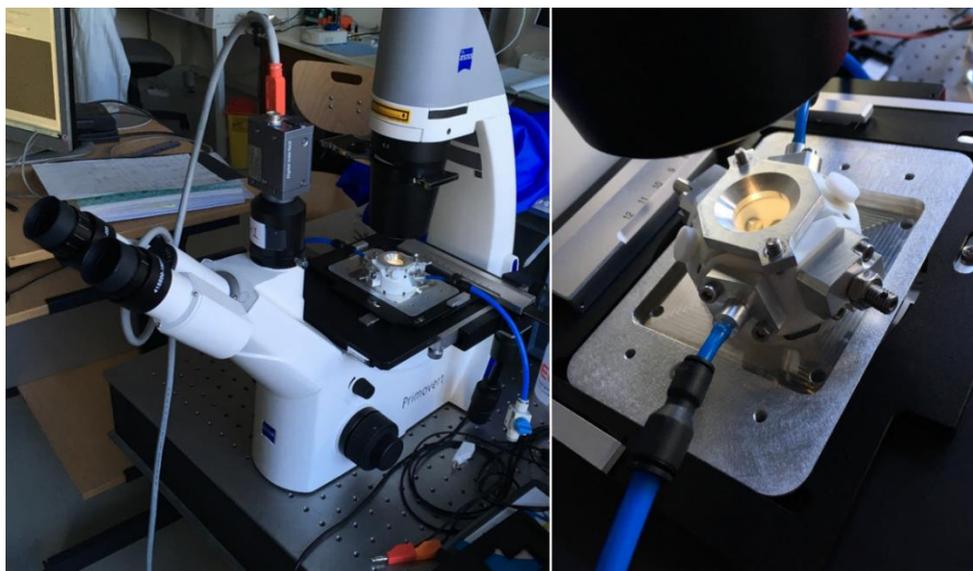
Indiquons que d'autres expériences, annexes à l'étude de la biocorrosion, ont été effectuées avec un montage de mesure électrique similaire où le nanofilm couplé à l'électrode de platine était remplacé par une feuille de platine de largeur 12 mm et de hauteur immergée 3,1 mm. Le milieu liquide était une simple solution de NaCl à 10 mM. Ces expériences avaient pour but de suivre l'évolution temporelle de l'intensité électrique mesurée entre les électrodes inertes lorsqu'une différence de potentiel était appliquée. Dès l'application du potentiel, un pic d'intensité électrique était observé suivi d'une décroissance exponentielle probablement liée à la formation de la double couche sur l'interface liquide/électrode. Nous avons également pu constater la présence d'un pic similaire lors de l'immersion de l'électrode dans un liquide. Plus la vitesse avec laquelle l'électrode de mesure est immergée dans la solution était élevée, plus la valeur maximale du pic d'intensité est grande. Cette observation pourrait être liée à la dynamique des ions à la surface et à la création de l'interface chargée par ces mouvements ioniques.

#### 4. Description du montage de microscopie optique

Nous cherchions à construire un dispositif nous permettant d'observer, à l'échelle microscopique, les bactéries en interaction avec le nanofilm de fer, tout en ayant la possibilité de réaliser simultanément des mesures électriques ou de régénérer le milieu liquide. Après de nombreux échanges avec Stéphane Cabaret (ingénieur au service mécanique du laboratoire), il a réussi à dessiner une chambre sur mesure répondant à l'ensemble des critères. La pièce a ensuite été fabriquée par Marc Bottineau (ingénieur du service mécanique) dans du polytétrafluoroéthylène (PTFE) chargé en fibres de verre. Elle est présentée sur la Figure 3-8.

Elle se compose de fenêtres en haut et en bas pouvant être scellées par tout type de substrat solide (lamelle de verre, lamelle de verre recouverte du nanofilm de fer) suffisamment transparent pour permettre une observation des bactéries sur la surface. Les expériences peuvent être réalisées dans des conditions anaérobies grâce à l'ajout d'une arrivée/sortie de gaz. Une régénération du milieu nutritif est également possible via l'addition d'une entrée/sortie de liquide. Enfin, des électrodes peuvent être insérées dans la chambre afin de réaliser en parallèle des mesures électriques. La cellule a été dessinée pour s'enclencher sur le plateau d'un microscope inversé à contraste de phase (ZEISS Primovert). Les bactéries sont visualisées sur la surface via un objectif 20 x de profondeur de champ 20  $\mu\text{m}$  et leurs mouvements enregistrés via une caméra (XCG GigE – Sony).

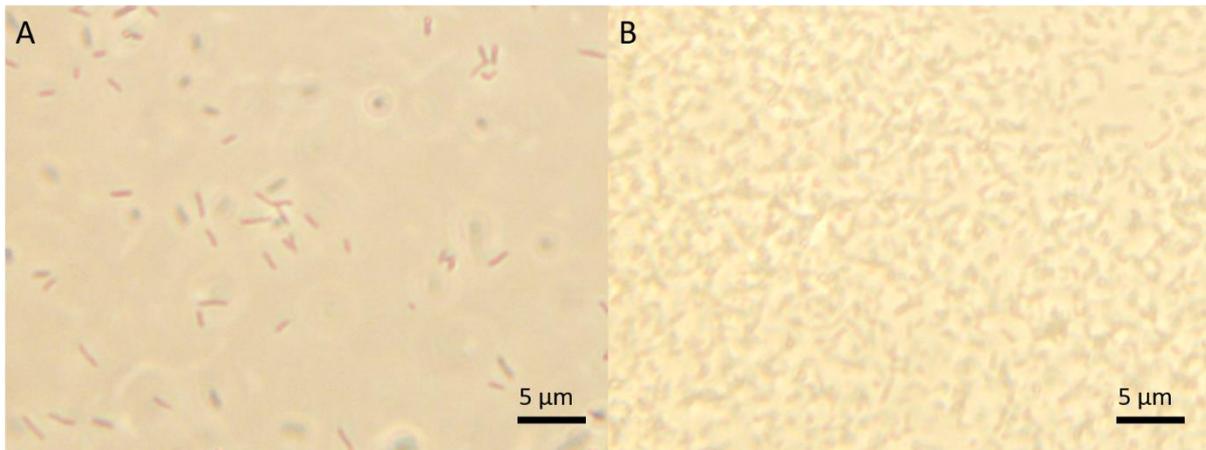
Dans nos expériences, le nanofilm de fer est placé sur le dessous de la cellule, face en fer orientée vers la culture bactérienne. Il est ensuite vissé contre un joint permettant ainsi de sceller le bas de la chambre. Un volume de 2,5 mL de milieu liquide est ensuite ajouté par le haut de la chambre. Une lame de verre vient à son tour sceller le haut de la chambre permettant ainsi de conserver un environnement stérile au sein du compartiment.



**Figure 3-8 - Chambre de culture utilisée sur le microscope optique** – Cette chambre de culture, fabriquée sur mesure au laboratoire, est composée de PTFE chargé en fibres de verre. Deux lamelles de verre démontables sont utilisées pour sceller le haut et le bas de la chambre

*gardant ainsi stériles les 2,5mL de milieu de culture inoculés dans la cellule. La chambre est disposée sur un microscope inversé à contraste de phase. Les bactéries sont visualisées grâce à un objectif longue distance 20 x ayant une profondeur de champ de 20  $\mu\text{m}$ .*

Afin de pouvoir observer clairement des bactéries isolées, les observations se réduisent aux premières heures après l'inoculation. Au-delà, le nombre croissant de bactéries s'accumulant dans le volume empêche de distinguer correctement chaque individu. Deux images, présentées sur la Figure 3-9, montrent qu'à partir d'une DO initiale de 0,03, plus aucune bactérie unique n'est observable au bout de trois heures d'incubation (croissance bactérienne et sédimentation des bactéries situées dans le volume sur la surface). On constate également, sur l'image de gauche, que les bactéries plus foncées se démarquent clairement du fond clair. Une analyse précise de l'intensité de chaque pixel pourra donc donner accès à la fois aux caractéristiques des bactéries et du substrat. Les différents programmes de traitement et d'analyse des images seront détaillés par la suite.



**Figure 3-9 – Observation des bactéries au microscope optique inversé à contraste de phase au grossissement 40 x sur une lame de verre.** (A) Observation 5 min après inoculation des bactéries dans la chambre de culture. Les bactéries sont parfaitement visibles et dénotent clairement du fond lumineux uniforme, (B) Observation après trois heures d'incubation. Aucune bactérie ne se distingue du fond lumineux diffus. Les bactéries sont ici en conditions statiques (sans agitation) dans un milieu riche LB (pH = 6,5) à 23°C.

#### 5. Mesures locales du pH et du dioxygène à l'aide de microsondes

Afin de caractériser le plus précisément possible l'environnement chimique local au voisinage de la nanocouche de fer (notamment l'évolution de la concentration en dioxygène des microsondes (Unisense, Denmark) à pH et à  $\text{O}_2$  ont été utilisées. La calibration de la microsonde à dioxygène (Ox-10 model, dimension externe de la pointe égale à 8-12  $\mu\text{m}$ ) s'effectue en deux points : l'eau saturée en dioxygène, correspondant à une concentration en  $\text{O}_2$  de 262,78  $\mu\text{mol/L}$ , et l'eau saturé en azote, associée à une concentration nulle en  $\text{O}_2$ . Dans le cas de la microsonde à pH (pH-25 model, dimension externe de la pointe = 20-30  $\mu\text{m}$ ), les trois points de calibration usuels à pH = 4, 7 et 10 sont utilisés.

L'approche de la microsonde à 20-40  $\mu\text{m}$  de la surface d'une lame en verre disposée au fond d'une boîte de Petri est contrôlée manuellement par un micromanipulateur (Märzhäuser Wetzlar, MM33 right) et suivi au microscope optique inversé. La mise au point du microscope a elle-même été spatialement calibrée à l'aide d'une platine de translation motorisée (M-126-CG1, PI Physik Instrumente) dont le positionnement est contrôlé au micromètre.

## 6. Mesure de la concentration en $\text{Fe}^{2+}$ par le test à la ferrozine

Afin de quantifier la capacité des bactéries à réduire le fer ferrique, un test à la ferrozine a été effectué. Ce test repose sur la complexation des ions  $\text{Fe}^{2+}$ , alors en partie issus de la réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  par les bactéries, avec la ferrozine. Le complexe  $\text{Fe}^{2+}$ -ferrozine donnant une coloration violette à la solution liquide, une mesure d'absorbance permet de remonter à la concentration en  $\text{Fe}^{2+}$  présent en solution.

Lors de ce test, une colonie isolée est prélevée, mise en suspension dans 5 mL de milieu de culture (LB pour *S. oneidensis* et *E. coli* et MRS pour *L. plantarum*) et placée dans l'incubateur-shaker sous agitation à 200 rpm et 30°C pendant toute une nuit (environ 18h). Le lendemain, une dilution au 1/1000 de la solution est effectuée et de nouveau disposée dans l'incubateur-shaker à 200 rpm et 30°C. Lorsque les bactéries atteignent une DO = 0,3, celles-ci sont prélevées puis inoculées à une DO = 0,1 dans leur milieu de culture respectif supplémenté de 1 mM ou 10 mM de citrate d'ammonium ferrique (Sigma-Aldrich). Cet échantillon constitue la solution mère.

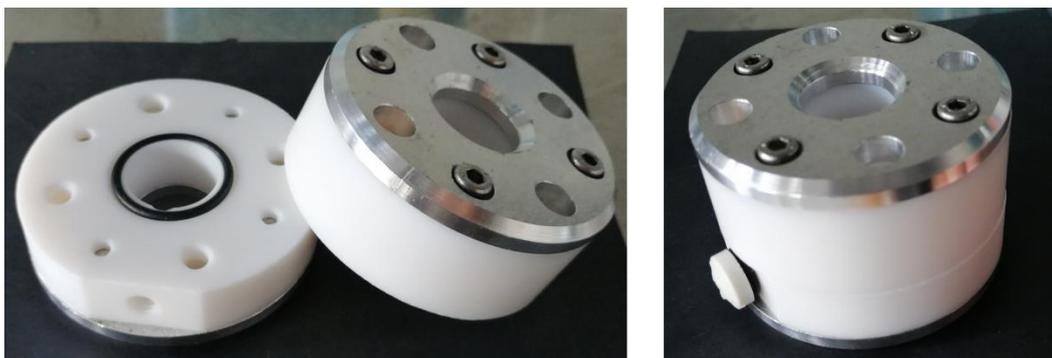
Comme deux conditions sont analysées, une première en anaérobiose stricte et une seconde en condition statique aérobie, deux protocoles distincts sont utilisés. Pour la condition anaérobiose stricte, des aliquots de 2 mL de la solution mère sont versés dans des tubes Eppendorf de 2 mL (alors complètement remplis). Ces derniers sont fermés et conservés sans agitation à 23°C. Dans ces conditions, un environnement anaérobiose est induit par les bactéries en moins de 15 min (Figure 4-11). Pour la condition statique aérobie, un volume de 10 mL de la solution mère est disposé dans la même chambre de culture que celle utilisée pour les mesures optiques ou électriques. Les boîtes sont laissées sans agitation à 23°C. Dans les deux cas, un échantillon par point de mesure est préparé afin de conserver les mêmes conditions sur l'ensemble des relevés. Lors d'une mesure, l'échantillon est agité et un aliquot de 1 mL est prélevé puis centrifugé à 12000  $g$  pendant 5 min. 100  $\mu\text{L}$  du surnageant est ensuite pipeté et dilué dans 900  $\mu\text{L}$  d'acide chlorhydrique à 0,5 M afin de décomplexer le  $\text{Fe(II)}$ . Après 5 min, 100  $\mu\text{L}$  de ce mélange est pipeté et ajouté à la solution de ferrozine décrite dans [17]. Il est important de noter que la solution tampon de pH égal à 9,5 doit être mélangée à la solution de ferrozine avant réaction avec l'hydroxylamine pour détecter la concentration réelle en fer total dans le milieu. Finalement, les absorbances sont lues sur un spectrophotomètre (GENESYS™ 40/50 visible / UV-visible) à 562 nm. Le chlorure de fer (II) sert à la calibration.

Soulignons que la croissance bactérienne est contrôlée en mesurant la  $\text{DO}_{600}$  en chaque point. De plus, afin de contrôler que la concentration totale en  $\text{Fe(III)}$  ajoutée soit bien de 1 mM ou 10 mM, un dosage du fer total, par l'hydroxylamine, dans une solution aqueuse témoin sans bactéries est réalisée. La concentration en fer mesurée est respectivement de  $(0,81 \pm 0,06)$  mM

ou  $(7,8 \pm 0,7)$  mM et reste constante au cours du temps (100 h). La composition de la poudre utilisée pour la fabrication du milieu de culture n'étant pas parfaitement connue, cette différence de concentration pourrait s'expliquer par des réactions chimiques entre une fraction du Fe(III) ajouté et des molécules présentes dans le milieu de culture. De plus, la masse molaire du citrate d'ammonium ferrique utilisé n'étant pas indiqué par le fabricant, une erreur sur le calcul de la masse molaire pourrait être à l'origine d'une partie de cet écart.

### 7. Description de la chambre de culture bi-compartmentée

Afin de pouvoir déterminer l'importance du contact direct/indirect lors du processus de biocorrosion du fer et plus particulièrement lors de son initiation, nous souhaitons créer un dispositif permettant de séparer spatialement les bactéries du nanofilm de fer. Suite à de nombreux échanges avec Stéphane Cabaret (ingénieur mécanique au laboratoire), une chambre bi-compartmentée, en PTFE chargé en fibres de verre, a été fabriquée sur mesure par le service mécanique du laboratoire (Figure 3-10). Elle se compose de deux compartiments que l'on peut chacun séparer en y intercalant une membrane semi-perméable. Pour nos expériences, la membrane utilisée présente des pores de taille 12 kDa (environ 1,5 nm [18]) permettant la libre circulation de petits métabolites (sidérophores, flavines...) mais empêchant le passage des bactéries. Ces membranes sont des boudins de dialyse que l'on a, au préalable, déposés pendant 10 min à 50°C dans un four Pasteur puis réhydratés dans du PBS stérile 1x sous agitation pendant 20 min. Des fenêtres en haut du compartiment supérieur et en bas du compartiment inférieur sont respectivement scellées par une lamelle de verre et une lamelle de verre recouverte du nanofilm de fer (face en fer dirigée vers le milieu de culture). Le compartiment inférieur est rempli de milieu de culture abiotique et le compartiment supérieur de 2 mL de milieu de culture contenant les bactéries à la densité optique initiale de 0,03. Pour l'analyse quantitative, cette chambre est placée sur le montage de mesures optiques.

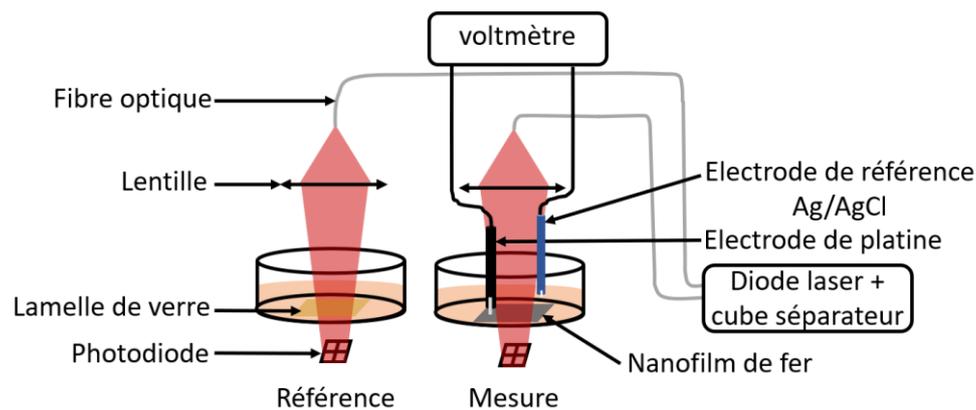


**Figure 3-10 - Chambre de culture bi-compartmentée** – *Composée de PTFE chargé en fibres de verre, cette chambre de culture se scinde en deux compartiments : un compartiment inférieur que l'on remplit de milieu de culture abiotique et un compartiment supérieur que l'on remplit de 2 mL de milieu de culture contenant les bactéries à la densité optique initiale de 0,03. Deux lamelles démontables viennent sceller le haut et le bas de la chambre. Les milieux contenus dans chacun des deux compartiments sont séparés par une membrane semi-perméable dont la taille des pores est de 12 kDa.*

#### IV. Conclusion

Dans ce chapitre, les bactéries ainsi que les milieux de culture associés ont été présentés. La majorité des expériences de biocorrosion, présentée dans le Chapitre 4, se focalisera sur *S. oneidensis* en milieu LB à pH neutre. Deux autres bactéries, *E. coli* et *L. plantarum*, respectivement non électroactives et n'ayant peu ou pas besoin d'assimiler du fer pour leur métabolisme, seront utilisées comme témoins. Par ailleurs, différents mutants de *S. oneidensis* présentant des déficiences dans leurs mécanismes de transfert extracellulaire d'électrons vers le fer ferrique seront testés.

L'ensemble des protocoles et des outils employés pour suivre pas à pas le phénomène de biocorrosion, du macroscopique au microscopique, a été décrit. A l'échelle macroscopique, un montage de mesures de transmittance optique combiné à un montage de mesures électriques à deux électrodes est utilisé (Figure 3-11). Une chambre, fabriquée au laboratoire, permet quant à elle de quantifier l'importance du contact direct entre les bactéries et le nanofilm de fer sur le phénomène de corrosion. Afin de caractériser le plus précisément possible l'environnement chimique du nanofilm de fer, des mesures de pH et de dioxygène viennent compléter l'étude. A l'échelle microscopique, un second dispositif expérimental a été dessiné sur mesure au laboratoire pour permettre de suivre le comportement des bactéries sur ou au voisinage du nanofilm de fer avant, pendant et après la dégradation du nanofilm de fer. Les résultats obtenus sur l'ensemble de ces dispositifs sont présentés dans le Chapitre 4.



**Figure 3-11 : Schéma présentant le montage de mesures optiques combiné au montage de mesures électriques.**

## Références :

- [1] B. J. Little, D. J. Blackwood, J. Hinks, F. M. Lauro, E. Marsili, A. Okamoto, S. A. Rice, S. A. Wade, H.-C. Flemming, *Microbially influenced corrosion – Any progress?* Corros. Sci., **170**, 108641 (2020)
- [2] Z. Lewandowski, H. Beyenal, in *Marine and Industrial Biofouling*. H.-C. Flemming, P. S. Murthy, R. Venkatesan, K. E. Cooksey. Springer, Berlin, 35-65 (2009)
- [3] T. E. Meyer *et al.*, *Identification of 42 possible cytochrome C genes in the Shewanella oneidensis genome and characterization of six soluble cytochromes*. Omics, **8**, 57-77 (2004)
- [4] S. Beblawy, T. Bursac, C. Paquete, R. Louro, T. A. Clark, J. Gescher, *Extracellular reduction of solid electron acceptors by Shewanella oneidensis*. Mol Microbiol., **109**, 571-583 2018
- [5] D. Coursolle, J. A. Gralnick, *Modularity of the Mtr respiratory pathway of Shewanella oneidensis strain MR-1*. Mol. Microbiol., **77**, 995-1008 (2010)
- [6] S. Dulon, S. Parot, M. L. Delia, A. Bergel, *Electroactive biofilms: new means for electrochemistry*. J. Appl. Electrochem., **37**, 173-179 (2007)
- [7] Y. Xiao *et al.*, *Extracellular polymeric substances are transient media for microbial extracellular electron transfer*. Sci. Adv., **3**, e1700623 (2017)
- [8] C. Gambari, A. Boyeldieu, J. Armitano, V. Méjean, C. Jourlin-Castelli, *Control of pellicle biogenesis involves the diguanylate cyclases PdgA and PdgB, the c-di-GMP binding protein MxdA and the chemotaxis response regulator CheY3 in Shewanella oneidensis*. Environ. Microbiol., **21**, 81–97 (2019).
- [9] L. A. Fitzgerald, E. R. Petersen, R. I. Ray, B. J. Little, C. J. Cooper, E. C. Howard, B. R. Ringeisen, J. C. Biffinger, *Shewanella oneidensis MR-1 Msh pilin proteins are involved in extracellular electron transfer in microbial fuel cells*. Process Biochem. **47**, 170–174 (2012)
- [10] J. Zheng *et al.*, *A taxonomic note on the genus Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **70**, 2782-2858 (2020)
- [11] S. H. Light *et al.*, *A flavin-based extracellular electron transfer mechanism in diverse Gram-positive bacteria*. Nature, **562**, 140 (2018)
- [12] B. M. R. Appenzeller, C. Yanez, F. Jorand, J.-C. Block, *Advantage provided by iron for Escherichia coli growth and cultivability in drinking water*. Appl. Environ. Microbiol., **71**, 5621-5623 (2005).
- [13] S. C. Andrews, A. K. Robinson, F. Rodríguez-Quiñones, *Bacterial iron homeostasis*. FEMS Microbiol. Rev., **27**, 215–237 (2003)
- [14] F. Archibald, *Lactobacillus plantarum, an organism not requiring iron*. FEMS Microbiol. Lett., **19**, 29-32 (1983)

- [15] J. E. Posey, F. C. Gherardini, *Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen*. *Science*, **288**, 1651-1653 (2000)
- [16] S. Sieuwerts, F. A. M de Bok, E. Mols, W. M. de Vos, J. E. T van Hylckama Vlieg, *A simple and fast method for determining colony forming units*. *Letters in Applied Microbiology*, **47**, 275-278 (2008)
- [17] J. Yuan, Y. Chen, G. Zhou, H. Chen, H. Gao, *Investigation of roles of divalent cations in *Shewanella oneidensis* pellicle formation reveals unique impacts of insoluble iron*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1830**, 5248-5257 (2013)
- [18] H. P. Erickson, *Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy*. *Biological procedures online*, **11**, 32-51 (2009)

### Annexe 3-1 : Principe de fonctionnement d'une photodiode

Une photodiode est un composé semi-conducteur, c'est-à-dire un isolant présentant une énergie de bande (ou énergie de gap) suffisamment petite pour qu'un électron est une probabilité non nulle de passer de la bande de valence à la bande de conduction. Elle est caractérisée par la présence d'une jonction P-N correspondant à la mise en contact d'une partie de semi-conducteur dopée en trous donc pauvre en électrons (zone P) et d'une seconde partie dopée, elle, en électrons (zone N). Lors du contact, des électrons de la zone N vont migrer vers les trous de la zone P (et inversement) produisant des cations au bord de la zone N et des anions au bord de la zone P. Cette différence de charge induit la création d'une zone, appelée zone de déplétion, où règne un champ électrique dirigé de la zone N vers la zone P. Ce champ électrique s'oppose au phénomène de diffusion qui a tendance lui à rediriger les porteurs dans la zone où ils sont minoritaires et donc de permettre l'équilibre de la jonction.

Lors de l'utilisation de la photodiode en photorécepteur, celle-ci va être connectée à un générateur de tension externe afin de la polariser en inverse (Figure 3-S1.B), c'est-à-dire forcer la circulation des électrons vers la zone N. Ainsi, au moment de l'illumination, chaque photon incident d'énergie supérieure à l'énergie de gap va créer une paire électron-trou où les électrons générés se déplaceront de la zone P vers la zone N produisant alors un photocourant inverse  $I_{ph}$ . Une photodiode peut donc être modélisée par une diode en parallèle d'un générateur de courant  $I_{ph}$  (Figure 3-S1.A). Le courant produit, noté  $I$ , est égal à  $I_d - I_{ph}$  et est mesuré par l'intermédiaire d'une résistance  $R$  placée en série de la photodiode.

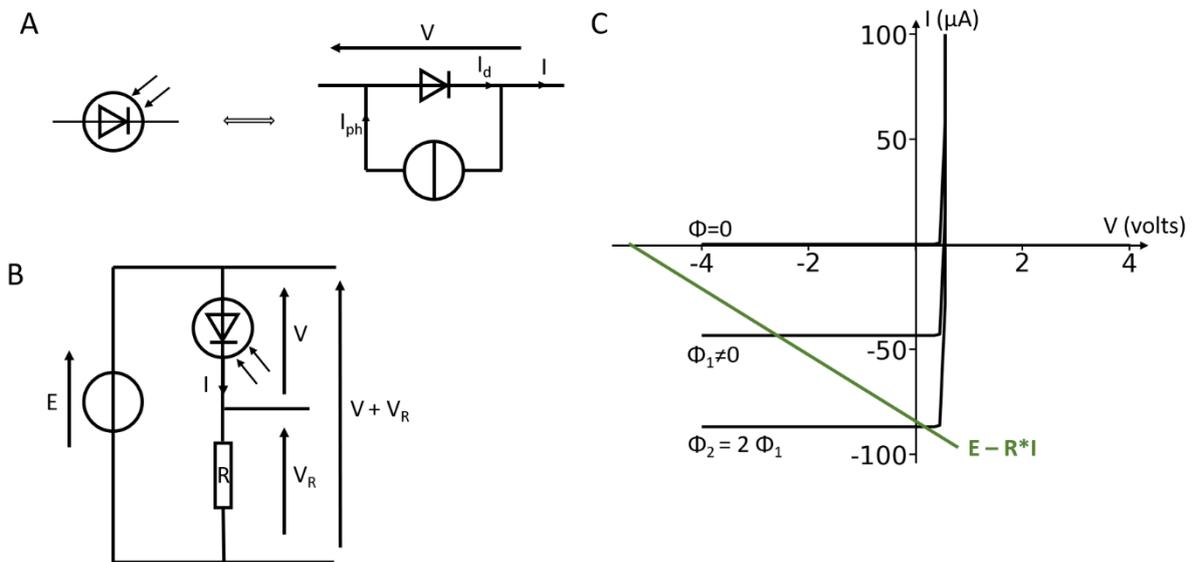
La diode a pour caractéristique courant-tension :  $I_d = I_s (\exp(\frac{qV}{kT}) - 1)$  avec  $I_s$  le courant d'obscurité,  $q$  la charge de l'électron,  $k$  la constante de Boltzman et  $T$  la température. Cette caractéristique correspond à la courbe  $I=f(V)$  (figure 3-S1.C) tracée à flux lumineux incident nul ( $\Phi = 0$ ).

Le photocourant est lui égal à  $\frac{\eta q \lambda}{hc} \Phi$ , avec  $\eta$  le rendement quantique de la photodiode,  $q$  la charge de l'électron,  $\lambda$  la longueur d'onde,  $h$  la constante de Planck,  $c$  la célérité de la lumière dans le vide et  $\Phi$  la puissance du flux lumineux incident. En polarisation inverse, lorsque le potentiel est suffisamment négatif,  $I_d = -I_s$ . La valeur du courant d'obscurité étant de l'ordre de 0,1 nA, celui-ci devient rapidement négligeable devant le photocourant créé et  $I = I_{ph}$ . L'intensité électrique circulant dans le circuit extérieur est alors proportionnelle au flux lumineux incident. Plus le flux lumineux incident augmente, plus la caractéristique se décale vers les valeurs de  $I$  négatives (Figure 3.C :  $\Phi < \Phi_1 < \Phi_2$ ).

Les points de fonctionnement de la photodiode correspondent aux points d'intersection entre la caractéristique  $I=f(V)$  et la droite de charge  $V = E - R \cdot I$  (droite verte sur la Figure 3-S1.C). Le comportement du photorécepteur est alors linéaire tant que les points de fonctionnement restent dans le quadrant ( $V < 0, I < 0$ ).

Dans notre montage de mesures optiques, nous avons choisi :  $E = -5$  V et  $R = 1$  M $\Omega$  afin d'avoir une grande sensibilité. Les mesures de tension étant réalisées via une carte d'acquisition, la résistance d'entrée est celle d'un amplificateur opérationnel soit de l'ordre de  $10^{12}$   $\Omega$ . De même,

la tension inverse maximale de la photodiode étant de 50 V, une polarisation sous 5 V annihile tout risque d'endommagement de la photodiode.



**Figure 3-S1 – Description d'une photodiode.** (A) Schéma électrique équivalent d'une photodiode polarisée en inverse : il se compose d'une diode parcourue par un courant  $I_d$  en parallèle avec un générateur de courant inverse  $I_{ph}$ . (B) Schéma du montage électrique utilisé pour la polarisation inverse de la photodiode : un générateur de tension continue  $E$  est branché aux bornes de la photodiode en série avec une résistance  $R$ . Cette configuration permet d'obtenir une réponse linéaire du capteur, (C) Caractéristiques courant-tension d'une photodiode sans éclairage (courbe annotée  $\Phi = 0$ ) puis sous éclairage ( $\Phi_1$  et  $\Phi_2$ ) induisant le décalage vers le bas proportionnel au flux lumineux incident. La droite de charge (ligne continue verte) correspond à la droite d'équation  $V = E - R \cdot I$ . Les points de fonctionnement de la photodiode correspondent aux points d'intersection entre la caractéristique sous éclairage et la droite de charge.

**Référence :** Sextant, *Optique expérimentale*. Collection enseignement des sciences, Hermann, éditeurs des Sciences et des Arts (1997)



## Chapitre 4

# Biocorrosion des nanofilms de fer : mesures et analyses

Ce chapitre propose d'étudier expérimentalement l'électroactivité bactérienne au travers de l'étude de la biocorrosion du fer à l'aide des différents outils décrits dans le chapitre précédent. L'originalité de l'approche réside dans l'utilisation de nanofilms de fer (10 nm d'épaisseur) optiquement semi-transparents permettant de visualiser, in situ et en temps réel, les bactéries au cours du processus de corrosion. Des mesures optiques macroscopiques, combinées à des mesures de courant électrique et de potentiel en circuit ouvert, nous permettent de suivre la dégradation du fer au contact d'une suspension bactérienne avec une résolution proche du nanomètre. Différentes expériences ont ensuite été menées pour comprendre l'influence de différents paramètres physiques, chimiques ou biologiques sur le déclenchement de la corrosion. La concentration initiale en bactéries, l'environnement chimique ou encore les bactéries mises en jeu (*Shewanella oneidensis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*) ont ainsi été modifiés. Des observations de microscopie optique ont également permis de suivre la localisation et la dynamique des bactéries au voisinage de la surface de fer avant, pendant et après la corrosion.

## I. Contexte et objectifs

Bien que le phénomène de biocorrosion soit l'objet de recherches intensives depuis plus d'un siècle [1,2], Little *et al* ont récemment souligné que des questions fondamentales autour des premières étapes initiant le phénomène de biocorrosion restaient encore sans réponse [3]. Les modèles traditionnels considèrent que les cinétiques de dégradation d'échantillons épais de métal sont gouvernées par la diffusion des espèces électro-chimiquement actives présentes dans le milieu liquide, notamment l'oxygène, vers la surface du métal. Bien que la dégradation ne soit pas visible immédiatement, l'initiation de la corrosion d'un métal immergé dans une solution oxygénée s'enclenche dès son contact avec les molécules d'oxygène à son voisinage [4,5]. Toutefois, cette hypothèse de déclenchement quasi-immédiat de la première phase de corrosion (phase d'initiation) reste difficile à vérifier expérimentalement puisque la réflexion/absorption de la lumière par le métal empêche une observation directe et simultanée des bactéries et de la modification de surface.

C'est pourquoi nous proposons de minimiser ces effets d'absorption/réflexion à la surface du métal en utilisant un substrat composé de films nanométriques de fer à la place d'échantillons épais. Ces nanocouches de fer, décrites dans le chapitre 2, présentent l'avantage d'être partiellement transparentes. Par ailleurs, le phénomène de biocorrosion est le plus souvent associé à une corrosion localisée, par piqûres, du fait de la présence de défauts ou d'inhomogénéités physico-chimiques de la surface [6,7]. Nous avons vu dans le chapitre 2 que les nanofilms de fer présentaient une surface homogène et de rugosité sub-nanométrique. Nous nous sommes demandés si une dégradation homogène et uniforme pouvait être induite par les bactéries et si oui par quels processus ? Des bactéries isolées pourraient-elles initier la corrosion du fer ? Quelles seraient les étapes de la dégradation du métal ? Quels phénomènes se dérouleraient sur la surface du métal - naturellement protégée par une couche d'oxyde de fer - pour induire la corrosion ?

Les expériences sont menées à température ambiante (23°C), dans des conditions statiques (pas d'agitation) et en atmosphère aérobie. La bactérie *Shewanella oneidensis* MR1 est étudiée ici dans un milieu riche permettant sa croissance. Ce chapitre présente une première étude du processus de biocorrosion dans sa totalité : de son initiation jusqu'à la dissolution complète du métal en quelques heures. Le métal et les bactéries sont visualisés in-situ et en temps réel dans le milieu de culture. L'ensemble des outils décrits dans le chapitre 3 est ici exploité pour observer et caractériser le phénomène de biocorrosion. Des mesures optiques couplées à des mesures électriques macroscopiques permettent de suivre l'amincissement et la cinétique de dégradation de la couche de fer. L'influence de différents paramètres physico-chimiques et microbiologiques sur l'initiation de la corrosion sera ensuite développée et complétée par des mesures à l'échelle micrométrique de pH et de concentration en dioxygène. Enfin, les observations et les analyses d'images, menées avec un microscope optique inversé en mode contraste de phase, seront présentées.

## II. Mise en évidence expérimentale du phénomène de biocorrosion

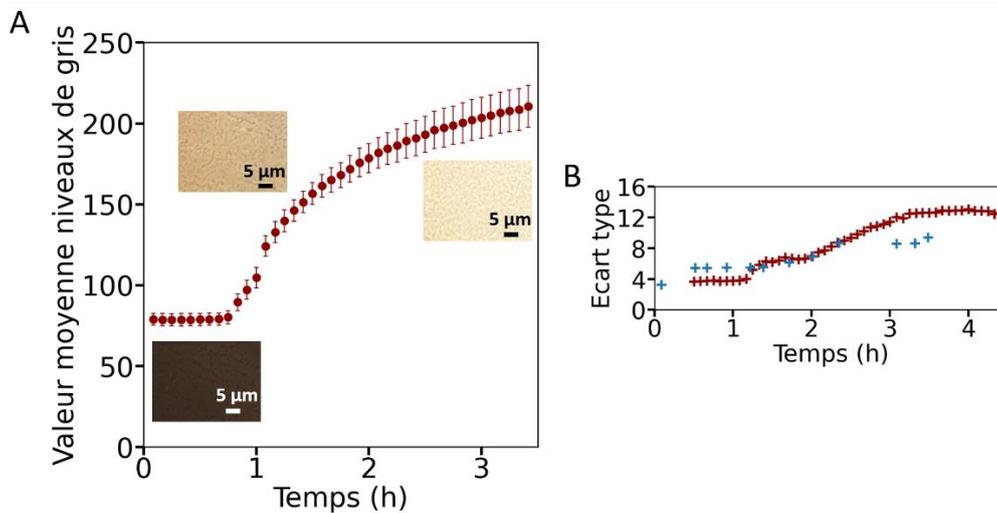
Dans cette partie, le comportement in-situ du nanofilm de fer immergé dans le milieu de culture liquide avec et sans bactéries est étudié en condition statique (sans agitation ni renouvellement du milieu). Un volume de milieu nutritif suffisant est choisi pour permettre la croissance bactérienne sans contrainte nutritive (dans les premières heures). La biocorrosion du fer est tout d'abord suivie par des mesures de microscopie optique puis analysée plus en détail par des mesures optiques et électriques macroscopiques. Chacune des expériences exposées a été répétée au moins trois fois pour s'assurer une certaine reproductibilité. Au total, 260 nanofilms ont été étudiés pendant la thèse.

### 1. Résultats des mesures au microscope optique : dégradation homogène du fer

Le microscope optique inversé en mode contraste de phase est ici utilisé pour observer, en temps réel, le comportement du nanofilm de fer à l'échelle micrométrique lorsqu'il est mis en contact avec la bactérie *S. oneidensis*. Des séquences de 50 images sont enregistrées toutes les cinq minutes à partir du temps d'inoculation  $t = 0$ . La valeur du niveau de gris de chaque pixel est extraite sur chaque image d'une séquence puis moyennée pour une image donnée. L'ensemble de ces valeurs moyennes est ensuite de nouveau moyenné sur une séquence pour donner la valeur moyenne des niveaux de gris à un temps d'incubation donné. L'analyse détaillée pixel par pixel sera présentée dans la dernière section. La Figure 4-1.A. présente la variation de la moyenne des niveaux de gris (par pixel) en fonction du temps ainsi que trois images enregistrées au début, 1 h 30 après l'inoculation et 3 h après l'inoculation. La noirceur de la première image contraste très nettement avec la luminosité de la dernière révélant sans ambiguïté la dégradation du nanofilm de fer et validant ainsi notre approche. Dans nos conditions d'illumination et de détection, la valeur moyenne des niveaux de gris (par pixels) augmente de 80 à 235, soit une valeur proche de 255. Le niveau 0 correspond à la couleur noire et le niveau 255 correspond au blanc codé sur 8 bits.

Trois observations sont particulièrement intéressantes ici. Premièrement, l'augmentation de la lumière transmise n'est pas monotone et présente un déclenchement de la dégradation qui est soudain (ici vers 45 min pour un échantillon inoculé à une densité optique de 0,07). Deuxièmement, les images insérées montrent que le fond de lumière transmise est uniforme au cours du temps indiquant une dégradation homogène du nanofilm de fer. En effet, une corrosion localisée aurait induit l'existence de zones très claires entourées de zones très sombres qui se serait traduit par des écarts types importants (barres d'erreur rouges sur la Figure 4-1.A). Ici, on peut voir sur la Figure 4-1.B que les écarts types augmentent de 4 à 12 niveaux de gris (croix rouges). Cette observation est similaire au cas d'un échantillon où les bactéries interagissent avec une lamelle de verre et non un dépôt de fer (croix bleues). L'augmentation de l'écart type est donc davantage reliée au nombre croissant de bactéries sur la surface qu'à la présence d'hétérogénéités lors de la dégradation du nanofilm de fer. Enfin, nous pouvons souligner que la dégradation est observée en seulement 3 h 30 et que l'éclaircissement du fond lumineux des images apparaît en moins d'une heure. Ce temps

d'expérience est court comparé au temps classiquement relevé dans la littérature qui se compte en jours, mois voire années.



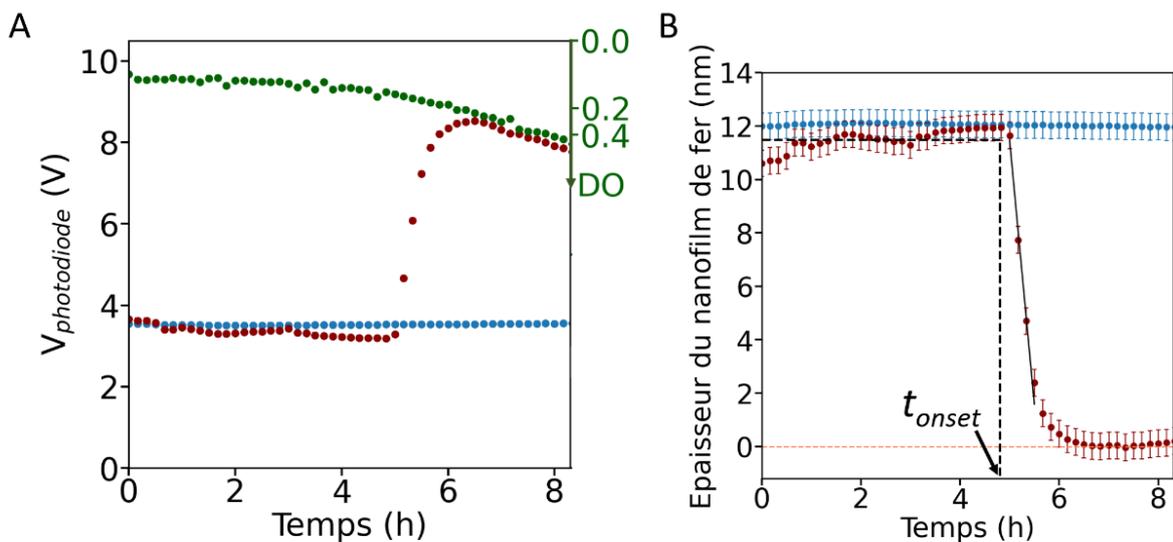
**Figure 4-1 – Observation de la dégradation du nanofilm de fer au microscope optique inversé.** (A) Variation temporelle des niveaux de gris (par pixel) extraits, pour chaque temps d'incubation, de la moyenne des niveaux de gris calculés sur les 50 images d'une séquence. Les trois images en insert montrent que le nanofilm de fer devient de plus en plus transparent au cours du temps, ce qui se traduit par une augmentation de la valeur moyenne des niveaux de gris. Ces images montrent aussi que cette transformation est homogène ce qui est confirmé par (B) la variation de l'écart type au cours du temps (croix rouges). En effet, des valeurs similaires sont obtenues dans le cas où le substrat est du verre (croix bleues) indiquant que cette variation est davantage liée à une croissance bactérienne qu'à une inhomogénéité de la dégradation. Les bactéries sont ici en conditions statiques (sans agitation) dans un milieu riche LB (pH = 6,5) à 23°C et inoculées à une densité optique de 0,07.

## 2. Mise en évidence de trois étapes dans la biocorrosion du fer

A présent que les observations microscopiques montrent qu'il est possible de suivre la dégradation d'une nanocouche de fer, nous allons pouvoir aller plus loin dans la description du processus et notamment des différentes étapes qui le composent ainsi que de leur cinétique.

Ici le montage de mesures optiques décrit sur la Figure 3-2 est utilisé. Sur la Figure 4-2.A est représentée la variation temporelle de la tension mesurée aux bornes de la photodiode de mesure pour trois échantillons différents (une tension élevée correspond à une intensité transmise élevée). Les deux premiers correspondent à deux échantillons de référence : d'une part, les bactéries seules sans le nanofilm (cercles verts), d'autre part, le nanofilm seul immergé dans un milieu de culture abiotique (cercles bleus). Dans le premier cas, la tension décroît de façon monotone avec le temps. Cela s'explique majoritairement par la croissance bactérienne en volume qui augmente la turbidité du milieu liquide et par l'accumulation sur ou au voisinage de la lamelle de verre des bactéries diminuant donc sa transmittance. La densité optique équivalente aux valeurs de tension mesurées est tracée sur l'axe de droite. Dans le second cas,

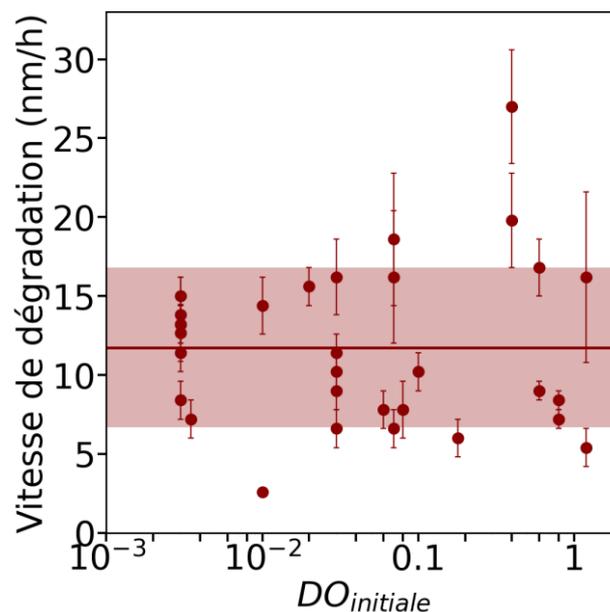
la tension reste constante au cours du temps, voisine de 3,5 V, indiquant une transmission de lumière constante et donc aucune dégradation du nanofilm immergé dans le milieu de culture sans bactérie. Cette valeur de 3,5 V est fixée par les coefficients de transmission/réflexion aux interfaces traversées ainsi que l'absorption des milieux traversés (titane et fer). La lame de verre joue un rôle négligeable puisque sa transmittance est de 92% soit 6 fois plus grande que celle de la couche de fer-titane. Le troisième et dernier échantillon (cercles rouges) correspond au cas du nanofilm en contact avec une suspension bactérienne inoculée à  $t=0$ . Comme attendu à la vue des résultats de microscopie optique, la variation temporelle de la tension aux bornes de la photodiode n'est plus monotone et trois phases peuvent être distinguées. Tout d'abord, une phase d'initiation de quelques heures au cours de laquelle aucune variation de signal n'est observée. Seule une très légère décroissance peut être constatée à cause de la croissance bactérienne. La durée de cette phase d'initiation est plus grande que celle observée sur la Figure 4-1 en raison d'une inoculation des bactéries à une densité optique plus faible (0,003) comme nous le verrons sur la Figure 4-12. Ensuite, une phase de dégradation au cours de laquelle le signal augmente. Enfin, une phase post-dégradation où le signal diminue de façon similaire à l'échantillon de référence composé de bactéries seules dû à la croissance bactérienne.



**Figure 4-2 – Observation de la dégradation du nanofilm de fer via le montage optique macroscopique.** (A) La tension aux bornes de la photodiode du montage de mesures optiques est mesurée au cours du temps pour trois types d'échantillons différents. Une augmentation de la tension signifie une augmentation de la lumière transmise. La variation du signal de référence composé des bactéries sans le nanofilm de fer (cercles verts pleins) indique que la croissance des bactéries contribue à la turbidité du milieu. La densité optique de la suspension bactérienne est graduée sur l'axe de droite. Lorsque l'on immerge le nanofilm dans une solution sans bactérie (cercles bleus pleins), la tension reste constante. Au contraire, lorsque le nanofilm est en contact avec une suspension bactérienne (cercles pleins rouges), l'intensité lumineuse transmise augmente brusquement après un certain temps d'incubation puis tend à décroître à cause de la croissance bactérienne. (B) La calibration du montage de mesures

optiques permet de remonter à la variation d'épaisseur du nanofilm de fer au cours du temps. Les mêmes variations que pour la tension aux bornes de la photodiode sont observées pour un milieu composé du nanofilm de fer respectivement sans bactérie (cercles pleins bleus) et avec bactéries (cercles pleins rouges). Dans ce dernier cas, la dégradation du métal apparaît soudainement à  $t = t_{onset}$  et se poursuit jusqu'à sa dégradation complète. Les bactéries sont ici en conditions statiques (sans agitation) dans un milieu riche LB ( $pH = 6,5$ ) à  $23^{\circ}C$  et inoculées à une densité optique de 0,003.

Dans la Figure 4-2.B est présentée la cinétique de la dégradation. L'épaisseur de la nanocouche de fer est extraite des mesures précédentes via la calibration de la tension mesurée aux bornes de la photodiode. On peut noter ici la sensibilité nanométrique de la détection atteinte grâce à la décroissance exponentielle de la lumière absorbée avec l'épaisseur combinée au coefficient d'absorption élevé du fer. Initialement constante autour de 10 nm, l'épaisseur de la couche de fer chute soudainement, à  $t = t_{onset}$ , vers zéro en une à deux heures. La vitesse de corrosion augmente brutalement à  $t = t_{onset}$ , atteint une valeur constante et finit par décroître lorsque l'on se rapproche des dernières couches de métal. Cette valeur de vitesse de corrosion, mesurée à 11 nm/h (ou de façon équivalente 0,10 mm/an – valeur moyennée sur l'ensemble des échantillons – Figure 4-3) est en accord avec celles reportées dans la littérature en conditions semi-aérobies [8].



**Figure 4-3 – Vitesse de dégradation du nanofilm de fer.** La vitesse de dégradation de la couche de fer correspond au coefficient directeur de l'ajustement linéaire réalisé sur la phase de dégradation de la courbe épaisseur versus temps. Elle est ici tracée en fonction de la densité optique initiale (en échelle log) pour l'ensemble des échantillons réalisés. On peut constater que cette valeur reste constante et égale à  $(11 \pm 3)$  nm/h en moyenne (trait continu rouge), soit 0,10 mm/an. La zone colorée en rouge délimite l'écart-type.

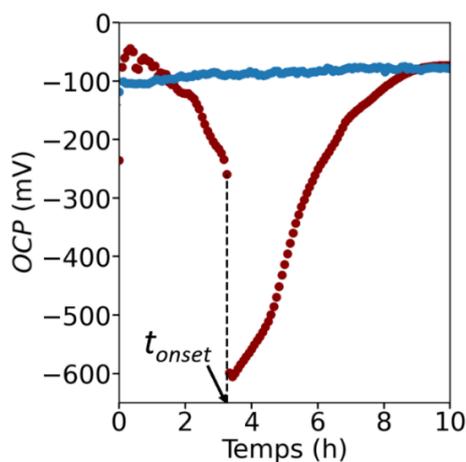
### 3. Résultats des mesures électriques enregistrées simultanément

Lors des mesures électriques, le dispositif électrique est couplé au montage de mesures optiques. Les deux signaux peuvent ainsi être enregistrés simultanément, in situ.

#### a. Mesures de tension en circuit ouvert

L'objectif des mesures de potentiel en circuit ouvert (*OCP*) est de pouvoir mettre en évidence les réactions électrochimiques en jeu lors de la dégradation de la couche de fer. Pour ces mesures, le nanofilm de fer et une électrode de référence Ag/AgCl immergée dans le milieu liquide sont connectés via un voltmètre. La Figure 4-4 présente les résultats obtenus pour deux échantillons : celui de référence sans bactéries (points bleus) et le second avec ajout de bactéries à  $t = 0$  (points rouges).

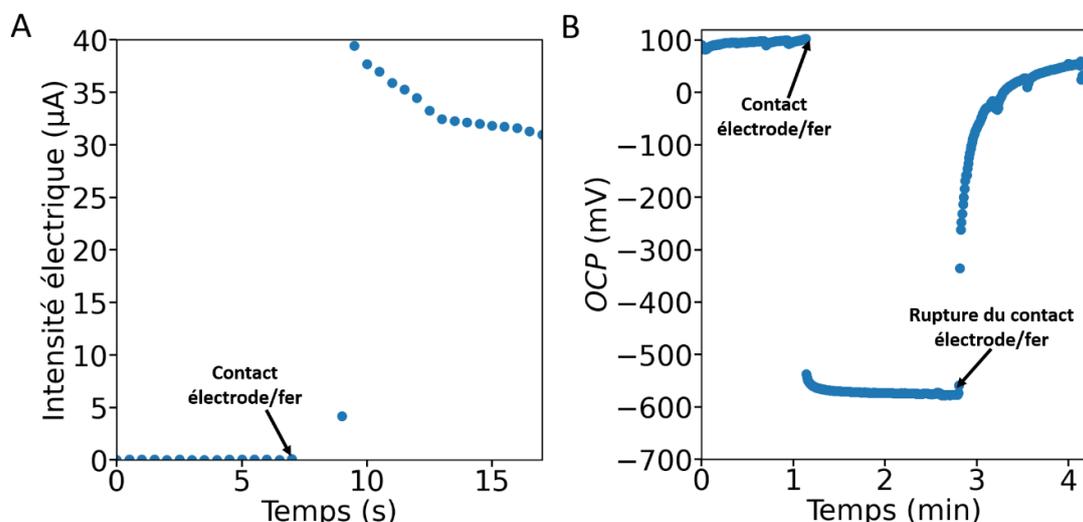
Pour l'échantillon de référence, les valeurs d'*OCP* restent constantes au cours de temps autour de la valeur de -100 mV vs Ag/AgCl ( $-60 \pm 40$  mV vs Ag/AgCl si on moyenne sur l'ensemble des échantillons). Cela souligne la grande stabilité de la couche passive d'oxydes de fer présente à la surface des nanocouches de Fe(0) sur des temps longs (72 heures pour notre enregistrement le plus long). Au contraire, l'échantillon contenant des bactéries présente une soudaine augmentation vers des valeurs plus négatives d'*OCP* à  $t = t_{onset}$  (déterminé par les mesures optiques parallèles). Un saut abrupt de -250 mV à -650 mV (vs Ag/AgCl) indique la rupture du film passif protecteur et le déclenchement de la corrosion. La diminution initiale plus lente, de -100 mV (vs Ag/AgCl) jusqu'à ( $-225 \pm 60$ ) mV (vs Ag/AgCl et en moyenne sur tous les échantillons), indique quant à elle une modification chimique progressive de la surface. Après la phase de corrosion, les valeurs d'*OCP* reviennent progressivement à leurs valeurs initiales. On peut noter la présence d'espèces chimiques rouges (probablement composées d'oxydes de fer résultant de la corrosion du nanofilm) sur le fritté de l'électrode d'Ag/AgCl à la fin de la mesure. Ce précipité altère les échanges de part et d'autre du fritté et affecte les valeurs d'*OCP* post-corrosion. De plus, un résidu de nanofilm de fer persiste à la fin de la mesure au niveau de la zone de contact avec le connecteur contribuant donc au signal final non nul.



**Figure 4-4 – Variation temporelle du signal OCP au cours de la dégradation du nanofilm de fer.** Le potentiel en circuit ouvert (*OCP*) est mesuré versus une électrode de référence

*Ag/AgCl à l'aide d'un voltmètre connecté au nanofilm de fer (sans sous-couche de titane) par une électrode en platine. Une chute brutale de -200 mV à -600 mV vs Ag/AgCl apparaît au début du processus de corrosion (cercles pleins rouges). Le second signal électrique, constant, est mesuré sur le nanofilm de fer immergé dans un milieu de culture abiotique (cercles pleins bleus). Les bactéries sont ici en conditions statiques (sans agitation) dans un milieu riche LB (pH = 6,5) à 23°C et inoculées à une densité optique de 0,03.*

Nous avons également mesuré les propriétés électriques volumiques d'une feuille épaisse de Fe(0) (Goodfellow – 0,1 mm d'épaisseur et de pureté 99,5%) dans les conditions similaires à l'expérience précédente. Une mesure d'intensité électrique effectuée à l'aide d'un ampèremètre (contre électrode en platine) est ajoutée. Cette feuille a été conservée à l'air et humidité ambiantes mais ne présente pas de signes visibles de rouille ou d'oxydation, indiquant un probable traitement contre la corrosion sèche. Juste après son immersion dans le milieu de culture liquide abiotique (sans bactéries), la feuille commence à se corroder (Figure 4-5). Un courant de l'ordre de 35  $\mu\text{A}$  (vs Pt) et une tension de corrosion de -570 mV (vs Ag/AgCl) sont enregistrés immédiatement après le contact du circuit extérieur avec la feuille de fer. La valeur de courant mesurée est associée à une surface immergée de la contre électrode de 40  $\text{mm}^2$ . La corrosion rapidement enclenchée (quelques secondes) sur les films de fer épais comparativement au délais observé sur les nanofilms confirment la grande stabilité des nanocouches protectrices d'oxyde de fer recouvrant le nanofilm de Fe(0) vis à vis de la couche protectrice couvrant le métal épais en milieu aqueux. De plus, les valeurs similaires de tension de corrosion suggèrent une corrosion semblable du nanofilm de Fe(0) au contact des bactéries et du Fe(0) épais sans les bactéries. Une fois les réactions électrochimiques entre le nanofilm de métal Fe(0) et le milieu de culture liquide enclenchées, aucune couche d'oxyde suffisamment protectrice n'a le temps de se reformer pour empêcher la dissolution du métal sous-jacent. La phase de corrosion (ou de dégradation) du nanofilm de fer semble donc indépendante des bactéries et purement électrochimique : le rôle des bactéries se limiterait au déclenchement de la corrosion et plus particulièrement à la rupture du film passif lors de la phase d'initiation.



**Figure 4-5 – Intensité électrique et potentiel de corrosion d'une feuille épaisse de fer.** Pour ces mesures, le film de fer épais est immergé dans le milieu de culture liquide abiotique

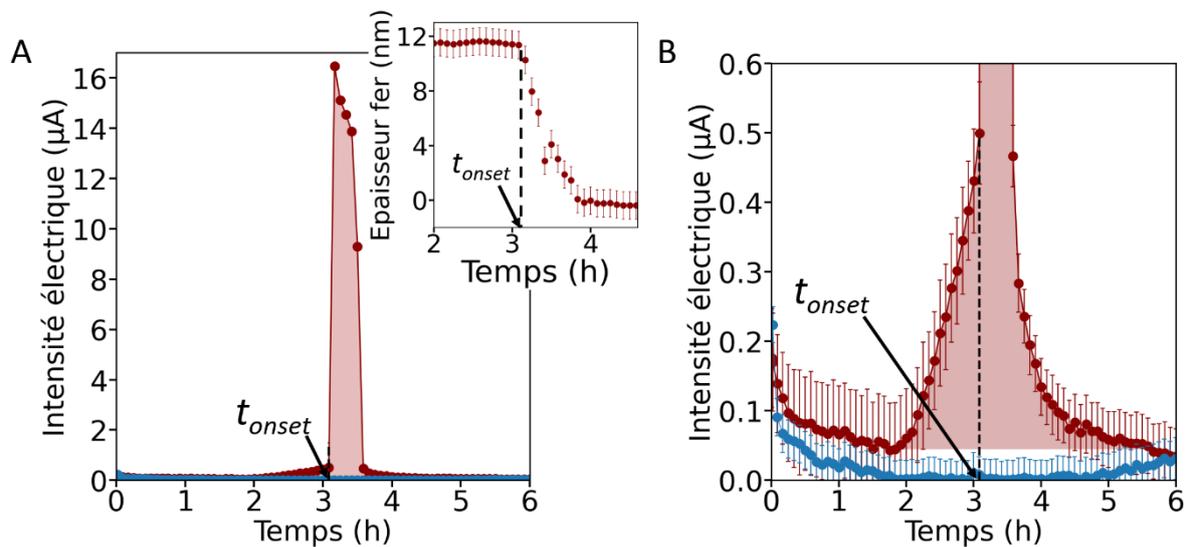
(sans bactéries) à  $t = 0$ . Une électrode en platine vient faire contact avec la surface de fer au temps indiqué par la flèche "Contact électrode/fer" puis se déconnecte de la surface au temps indiqué par la seconde flèche "Rupture contact". (A) L'intensité électrique est mesurée via un ampèremètre avec une contre-électrode en platine. Lors du contact, le signal électrique saute brusquement à  $40 \mu\text{A}$ . (B) Le potentiel en circuit ouvert (OCP) est mesuré à l'aide d'un voltmètre avec une électrode de référence Ag/AgCl. Le signal électrique chute brusquement à  $-570 \text{ mV}$  (vs Ag/AgCl) lors du contact électrode/fer puis revient à sa valeur initiale une minute après la rupture de contact.

#### b. Mesures d'intensité électrique

Suite aux mesures de potentiel en circuit ouvert, des mesures d'intensité électrique ont été effectuées. Bien que ne caractérisant pas directement le phénomène de corrosion puisque dans ce cas les sites anodiques et cathodiques ne sont plus situés sur la surface du nanofilm de fer, ces mesures nous permettent de visualiser les transferts d'électrons issus du couplage du fer avec le platine. L'idée est ici d'obtenir un ordre de grandeur du courant circulant dans notre système comparativement à celui obtenu dans les biopiles. Dans ce montage, un ampèremètre est relié au nanofilm de fer et à une contre électrode en platine, à moitié immergée dans la solution liquide.

La figure 4-6.A. présente les résultats enregistrés sur deux échantillons différents : un témoin sans bactéries (cercles bleus) et l'autre avec (cercles rouges). Pour le témoin, le courant électrique mesuré reste constant au cours du temps et de valeur inférieure à  $0,2 \mu\text{A}$ . Pour le second échantillon (avec les bactéries), un courant électrique supérieur à  $0,5 \mu\text{A}$  est mesuré au cours de la phase de dégradation et atteint une valeur maximale typique de  $15\text{-}20 \mu\text{A}$  (intensité de corrosion). A la fin du processus d'amincissement de la couche de fer, le courant a chuté de 90%. La position de  $t_{onset}$  indiquée sur le graphique a été déterminée par les mesures optiques réalisées en parallèle (graphique en insert Figure 4-6.A). Elle se superpose parfaitement à l'instant de la brusque augmentation du courant électrique mesurée indiquant la possibilité de suivre précisément la dégradation de la couche de fer également par cette mesure de courant électrique. Les phases d'initiation et de post-dégradation sont, elles, marquées par des valeurs de courant inférieures à  $0,1 \mu\text{A}$ . Toutefois, la Figure 4-6.B, centrée sur les faibles valeurs d'intensité électrique, montre une faible et lente augmentation du courant électrique une heure avant le début de la corrosion ( $t_{onset}$ ). Cette étape préliminaire de faible électroactivité, durant entre 30 minutes et 1h30 selon les échantillons, n'est pas détectable sur le signal optique qui, lui, reste constant. L'augmentation du signal électrique indique que des électrons commencent déjà à être cédés au métal avant même que la diminution de l'épaisseur de Fe(0) ne soit visible optiquement. Comme le fer contribue majoritairement à l'absorption du signal optique, une modification de structure ou d'épaisseur de la couche d'oxyde ne peut être distinguée sur nos mesures optiques. La présence de cette première étape de transfert d'électrons pourrait donc être liée à des modifications de structure des oxydes constituant la nanocouche superficielle passive recouvrant entièrement le Fe(0) elles-mêmes indirectement associées à la réduction du fer ferrique de cette nanocouche passive par les bactéries. Cette réduction n'est pas directement visible sur les mesures d'intensité électrique dont le signe reste constant tout au

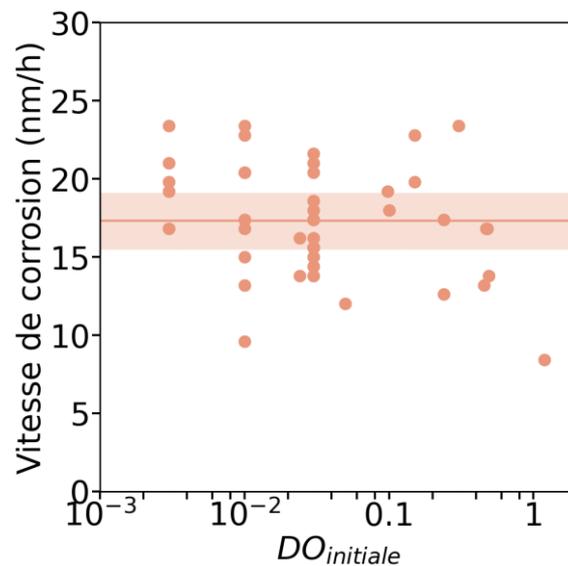
long de la mesure. Par ailleurs, la direction du flux d'électrons observée nous permet de conclure que les électrons circulent du nanofilm de fer vers la contre-électrode suggérant une dissolution anodique du métal et donc une corrosion du fer.



**Figure 4-6 – Variation temporelle de l'intensité électrique au cours de la dégradation du nanofilm de fer.** L'intensité électrique est mesurée à l'aide d'un ampèremètre connecté au nanofilm de fer (sans sous-couche de titane) via une électrode en platine. Une contre-électrode en platine vient fermer le circuit. (A) Un flux d'électrons associé à un courant mesuré de plus de  $10 \mu\text{A}$  est observé de façon concomitante à la dissolution optique du métal (marquée par la flèche noire et visible dans l'insert représentant la variation temporelle de l'épaisseur du nanofilm de fer) lorsque le métal est en contact avec une suspension bactérienne (cercles pleins rouges). Les électrons migrent du nanofilm de fer à la contre-électrode au travers du circuit électrique. Une réaction d'oxydation a donc lieu sur l'électrode "nanofilm" (anode) comme attendu lors d'un processus de corrosion. Le signal électrique reste, au contraire, négligeable (inférieur à  $0,1 \mu\text{A}$ ) lorsque le nanofilm est dans un milieu liquide abiotique (cercles pleins bleus). La zone ombrée en rouge indique l'aire sous la courbe permettant de calculer la charge. Elle est ici égale à  $0,045 \text{ C}$ . (B) Zoom sur des valeurs d'intensité électrique inférieures à  $0,6 \mu\text{A}$ . Les bactéries sont ici en conditions statiques (sans agitation) dans un milieu riche LB (pH = 6,5) à  $23^\circ\text{C}$  et inoculées à une densité optique de 0,03. NB : Une valeur négative du courant est mesurée dans nos conditions expérimentales mais seules les valeurs absolues sont représentées dans ce manuscrit pour une question de clarté.

D'autres observations peuvent également être extraites de ces données et notamment à propos de l'influence de la séparation spatiale des sites anodiques et cathodiques induit par la présence de la contre électrode. Premièrement, la dissolution du nanofilm de fer est plus rapide (Figure 4-7) puisqu'elle augmente de  $11 \text{ nm/h}$  sans le circuit électrique externe à  $17 \text{ nm/h}$  en présence de la contre électrode. Deuxièmement, une augmentation de la surface immergée de la contre-électrode induit un courant mesuré plus élevé ( $0,1 \text{ mA}$  soit une densité de courant de  $0,5 \text{ A/m}^2$ ). Ces deux observations indiquent que les réactions électrochimiques mises en jeu sont limitées par la surface de la cathode ou par les réductions cathodiques. La cinétique de corrosion uniforme observée sans le circuit électrique extérieur semble donc limitée par la

répartition spatiale et temporelle aléatoire des sites anodiques et cathodiques lorsqu'aucune électrode n'est connectée au nanofilm. De plus, il est possible d'évaluer la charge totale circulant à travers le circuit électrique par intégration des valeurs d'intensité sous le pic de la phase de dégradation (zone rouge ombrée de la Figure 4-6). Elle est ici égale à 0,045 C soit une valeur proche de 0,066 C, correspondant à la charge attendue si l'on suppose un électron transféré par atome de fer contenu dans 10 nm de nanofilm. Bien sûr, la charge attendue dépend de la stœchiométrie de la réaction et une analyse plus détaillée nécessiterait une meilleure connaissance de la structure et de la composition du nanofilm de fer ainsi que de sa couche d'oxyde. La prise en compte des valeurs d'intensité électrique avant  $t_{onset}$  lors de l'intégration ne modifie pas beaucoup la valeur obtenue de la charge qui devient alors égale à 0,050 C.



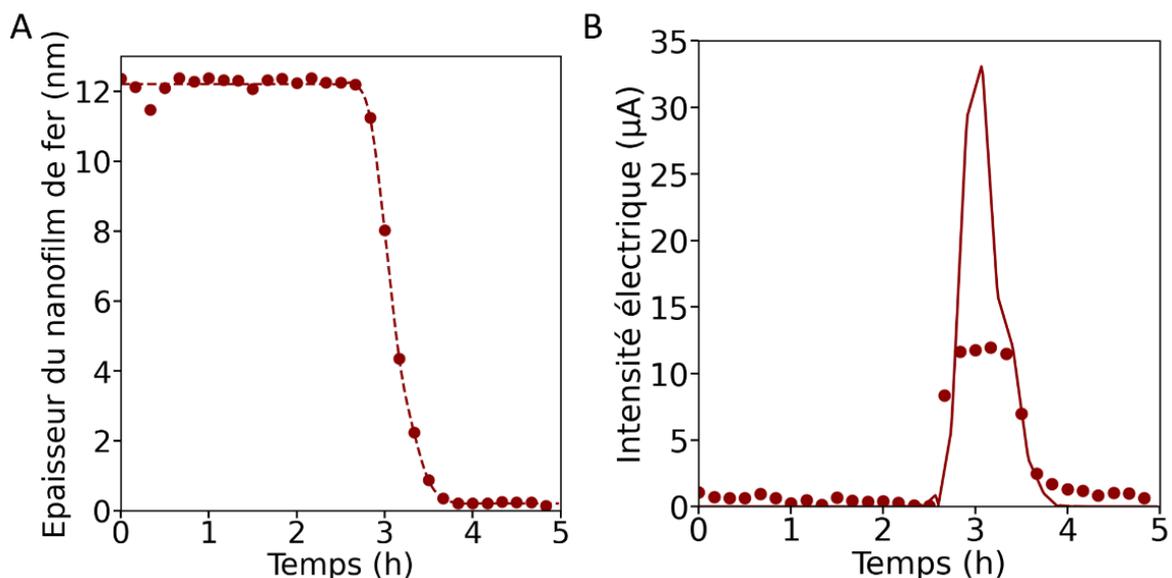
**Figure 4-7 – Vitesse de dégradation du nanofilm de fer en présence de mesures électriques.** La vitesse de dégradation de la couche de fer est tracée en fonction de la densité optique initiale (en échelle log) pour l'ensemble des échantillons réalisés avec mesures électriques (cercles pleins orange). On peut constater que cette valeur reste constante et égale à  $(17 \pm 3)$  nm/h en moyenne (trait continu orange), soit 0,15 mm/an. La zone colorée en orange délimite l'écart-type.

c. Lien entre l'intensité électrique mesurée et l'épaisseur du nanofilm de fer

Le montage de mesures optiques combiné au montage de mesures électriques nous a permis de suivre l'amincissement homogène du film de fer corrélé à un pic d'intensité électrique mesurée. En exprimant la charge en fonction de l'épaisseur de fer, nous pouvons écrire la relation suivante :  $I(t) = \frac{F \cdot S \cdot \rho \cdot n_e}{M_{Fe}} \frac{de}{dt}$  avec  $e$  l'épaisseur de fer,  $t$  le temps,  $F$  la constante de Faraday,  $S$  la surface du nanofilm de fer,  $\rho$  la masse volumique du fer,  $n_e$  le nombre d'électrons échangés par atome de fer,  $M_{Fe}$  la masse molaire de fer et  $I$  l'intensité électrique.

Afin de vérifier ce modèle, deux possibilités se présentent : calculer la dérivée de l'épaisseur et la comparer aux mesures d'intensités électriques ou bien l'inverse en intégrant les valeurs d'intensités électriques et en les comparant aux mesures d'épaisseurs. Les deux ont été

réalisées et conduisent aux mêmes résultats. Seule la première méthode sera détaillée ici car elle permet la comparaison avec les données brutes d'intensités électriques. Pour commencer, une extrapolation par une fonction quadratique avec un pas d'une minute est effectuée sur la courbe de variation de l'épaisseur en fonction du temps (points rouges Figure 4-8.A) dans le but de lisser les données (ligne en pointillés rouges). Ensuite, la dérivée numérique de l'épaisseur du nanofilm de fer par rapport au temps est calculée à partir des données de l'interpolation puis multipliée par le facteur  $\frac{F \cdot S \cdot \rho}{M_{Fe}}$ . Ce produit est finalement tracé en fonction du temps (ligne continue rouge - Figure 4-8.B). Les valeurs de l'épaisseur avant  $t_{onset}$  ont été moyennées afin d'éviter de brusques variations lors du calcul de la dérivée numérique. On constate que l'allure de cette courbe est similaire à celle de la variation temporelle de l'intensité électrique (points rouges - Figure 4-8.B). Toutefois, le maximum ainsi que l'aire totale sous la courbe, et donc la charge mesurée, diffèrent nettement. En effet, les mesures d'intensité électrique donnent une charge de 0,038 C et une intensité maximale de 12  $\mu\text{A}$  tandis que la courbe dérivée de l'épaisseur donne une charge de 0,060 C et une intensité maximale de 32  $\mu\text{A}$ . Ces différences s'expliquent par la méconnaissance du nombre d'électrons échangés au cours des réactions électrochimiques de corrosion du nanofilm de fer ainsi que des espèces chimiques mises en jeu. Le nombre d'électrons échangés en moyenne par atome serait ici de 2/3 pour voir les maxima des deux signaux se superposer. Par ailleurs, ce sont ici les masses molaire et volumique du fer qui ont été choisies pour faire le calcul. Le remplacement de ces paramètres par ceux associés à l'oxyde FeO ou Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ou Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ferait décroître de plus en plus cette valeur de maximum. Une interprétation plus approfondie de ces écarts nécessiterait une meilleure connaissance des espèces chimiques mises en jeu (mélange de fer et d'oxydes, quelles structures...).



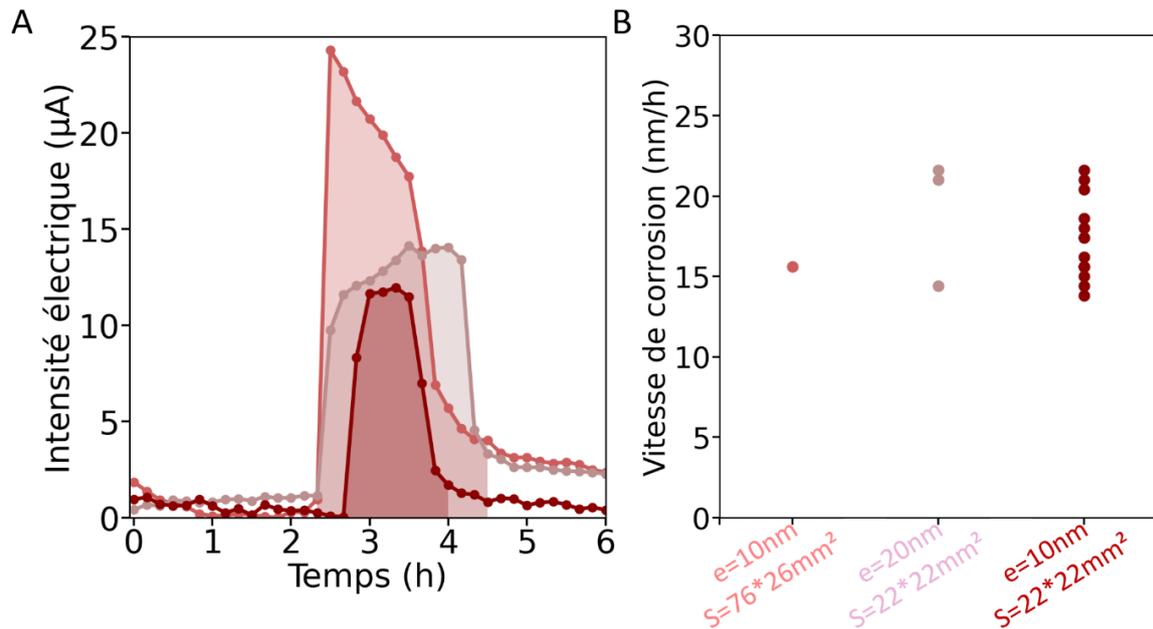
**Figure 4-8 – Relation de dérivation entre l'intensité électrique et l'épaisseur du nanofilm de fer.** (A) L'épaisseur du nanofilm de fer est tracée en fonction du temps (cercles pleins rouges). Une extrapolation par une fonction quadratique avec un pas d'une minute est effectuée dans le but de lisser les données (ligne en pointillés rouges). Les valeurs de l'épaisseur

avant  $t_{onset}$  sont moyennées afin de ne pas induire de brusques variations lors du calcul de la dérivée. (B) Variation temporelle de l'intensité électrique mesurée avec l'amplificateur Lock-in lorsqu'une électrode dorée est connectée au nanofilm de fer en présence d'une sous-couche de titane (cercles pleins rouges). A partir des données de l'interpolation ((A), ligne en pointillés rouges), la dérivée numérique de l'épaisseur de la couche de fer est calculée et multipliée par  $\frac{F \cdot S \cdot \rho}{M_{Fe}}$  avec  $F$  la constante de Faraday,  $S$  la surface du nanofilm de fer,  $\rho$  la masse volumique du fer et  $M_{Fe}$  sa masse molaire. Elle est finalement tracée en fonction du temps (ligne continue rouge).

#### d. Influence de la variation d'épaisseur ou de surface du nanofilm de fer

L'idée est ici de poursuivre l'analyse précédente en augmentant la surface du nanofilm de fer (76x26 mm<sup>2</sup>) à épaisseur constante (10 nm) et inversement, à surface constante (22x22 mm<sup>2</sup>) d'évaporer une épaisseur deux fois plus grande (20 nm). La Figure 4-9 présente les résultats pour ces deux échantillons (cercles pleins roses respectivement foncés et clairs) et l'échantillon témoin de 10 nm de fer sur une surface de 22x22 mm<sup>2</sup> (cercles pleins rouges). Dans chacune de ces expériences, la densité optique initiale en bactéries est égale à 0,03. La Figure 4-9.A présente les résultats obtenus par les mesures d'intensité électrique à l'aide de l'amplificateur Lock In. Dans cette configuration, une tige dorée est connectée au nanofilm de fer et une contre-électrode en platine vient fermer le circuit. Premièrement, on constate que le temps de déclenchement de la corrosion est similaire pour une surface ou une épaisseur plus grande du nanofilm de fer (l'écart de 20 min est en effet compris dans la dispersion des mesures observée sur la Figure 4-12 pour une DO initiale de 0,03). Ce résultat est confirmé par les mesures optiques, effectuées simultanément, indiquant les mêmes valeurs de  $t_{onset}$ . Cette observation peut être reliée à la valeur constante de l'épaisseur de la couche protectrice d'oxyde de fer mesurée par XPS, indépendamment de l'épaisseur de fer évaporée. La présence de la couche d'oxyde semble donc être le paramètre influant sur la durée de la phase d'initiation indépendamment de la surface exposée à la suspension bactérienne ou à l'épaisseur de Fe(0) sous-jacent. Deuxièmement, la durée de la phase de dégradation est multipliée par deux pour les échantillons de fer de 20 nm d'épaisseur comparée à ceux de 10 nm (2h10 pour 1h20). La dégradation de la couche de fer est toujours uniforme et homogène. Enfin, l'intégration de l'aire sous le pic d'intensité électrique indique une dégradation totale du nanofilm puisque la charge mesurée est égale à 0,044 C dans le cas du nanofilm de 10 nm et de surface 22x22 mm<sup>2</sup>, 0,102 C dans le cas du nanofilm de 20 nm et de surface 22x22 mm<sup>2</sup> et 0,120 C dans le cas du nanofilm de 10 nm et de surface 76x26 mm<sup>2</sup>. La charge est donc 2,3 fois plus grande pour une épaisseur de fer deux fois plus grande et 2,7 fois plus grande pour une surface 4 fois plus grande. La charge et l'intensité maximale de 24,3 µA mesurées pour l'échantillon de grande surface correspondent à une surface de contre-électrode immergée plus grande que dans les deux autres cas. En effet, une autre boîte de Petri et donc une autre configuration de montage a dû être utilisée en raison des grandes dimensions du substrat ce qui peut expliquer les écarts obtenus. La Figure 4-9.B présente les vitesses de corrosion obtenues via les mesures optiques dans chacun des cas précédents. On constate que celle-ci reste constante quel que soit

l'échantillon considéré. Rappelons que cette valeur de vitesse est fixée par la présence de la contre-électrode.



**Figure 4-9 – Influence de la surface et de l'épaisseur du nanofilm de fer sur tonset et la vitesse de corrosion.** (A) L'intensité électrique est mesurée à l'aide de l'amplificateur Lock In en connectant une tige dorée au nanofilm de fer. Trois cas sont présentés : le cas habituel d'une épaisseur de 10nm de fer et une surface de  $22 \times 22 \text{ mm}^2$  (cercles rouges pleins), pour une surface plus grande (environ  $20 \text{ cm}^2$ ) et une épaisseur de 10 nm (cercles rose foncé pleins) et pour une surface identique mais une épaisseur doublée (20 nm) (cercles rose clair pleins). Les zones ombrées indiquent la zone sur laquelle l'intensité électrique est intégrée pour le calcul de la charge. (B) La vitesse de corrosion, extraite des courbes de variation temporelle de l'épaisseur de la couche de fer, est tracée dans les trois mêmes cas que précédemment. Les bactéries sont ici en conditions statiques (sans agitation) dans un milieu riche LB (pH = 6,5) à  $23^\circ\text{C}$  et inoculées à une densité optique de 0,03.

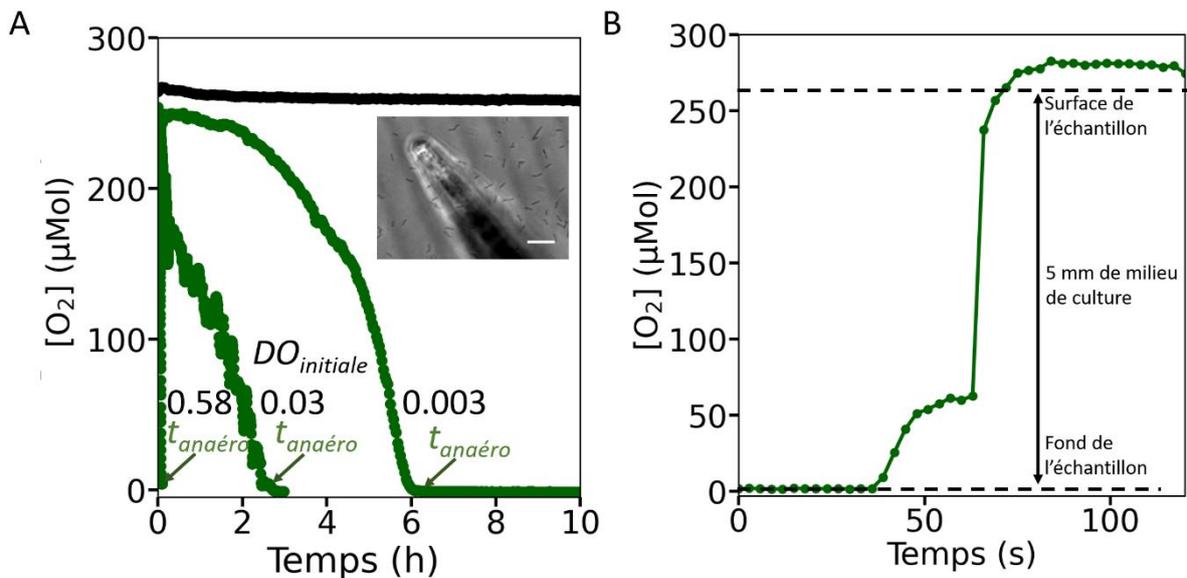
### III. Modification de l'environnement physico-chimique des nanofilms de fer

Nous avons vu dans la partie précédente que le déclenchement de la corrosion n'apparaissait pas immédiatement après immersion du nanofilm de fer dans le milieu bactérien mais plutôt au bout d'un certain temps d'incubation  $t_{onset}$ . La présence de cette phase d'initiation est surprenante et nous avons donc décidé d'étudier l'influence de paramètres environnementaux (physico-chimiques) et microbiologiques sur cette phase d'initiation afin de comprendre quels éléments déclenchent ce processus de corrosion et stimulent la rupture du film passif. Dans cette partie, seront détaillés les rôles du pH, de l'oxygène, de la concentration initiale en bactérie et de leur état physiologique, de l'ajout de Fe(III) soluble ou encore du contact direct entre les bactéries et le nanofilm.

#### 1. Evolution des concentrations locales de pH et de dioxygène

Les bactéries ferri-réductrices, dont fait partie *S. oneidensis*, sont connues pour enclencher leur processus de respiration cellulaire externe de métaux insolubles en condition anoxie. C'est pourquoi nous avons choisi de mesurer la concentration en dioxygène au voisinage (20-50  $\mu\text{m}$ ) d'une lame de verre déposée au fond d'une boîte de Petri. Le volume de milieu liquide versé est de 10 mL, afin de conserver les mêmes conditions pour toutes les expériences. Les cinétiques de décroissance de la concentration en dioxygène sont représentées sur la Figure 4-10.A. pour un échantillon témoin sans bactérie (cercles pleins noirs) et pour différentes concentrations initiales en bactéries (cercles pleins verts) : 0,003, 0,03 et 0,58. L'échantillon témoin, effectué sur le milieu de culture abiotique (sans bactéries), indique une concentration constante en dioxygène au cours du temps. La valeur est en moyenne égale à  $(257 \pm 3) \mu\text{Mol}$  ce qui est cohérent avec les valeurs de concentration en dioxygène dissous à la température de 23°C usuellement rapportées [9]. Pour l'échantillon le plus concentré, la disparition quasi-totale du dioxygène a lieu très rapidement (en cinq minutes) après l'inoculation. Pour un échantillon un peu plus dilué (densité optique initiale de 0,03), la concentration en dioxygène devient nulle 2h30 après inoculation. Enfin, pour l'échantillon le plus dilué, environ six heures sont nécessaires pour atteindre un environnement anaérobie au voisinage de la lame. Ces temps correspondant à une concentration nulle en  $\text{O}_2$  sont notés  $t_{anaéro}$ . Cet épuisement du dioxygène dissous au voisinage du nanofilm est lié à sa consommation par les bactéries pour leur respiration cellulaire. Plus l'échantillon est initialement dilué, plus il faudra attendre longtemps pour atteindre une certaine concentration en bactéries susceptible de consommer tout l'oxygène dissous. La densité optique des échantillons dilués ( $DO_{initiale} = 0,003$  et  $0,03$ ) a été mesurée au spectrophotomètre pour  $t = t_{anaéro}$ . Les résultats indiquent qu'une densité cellulaire constante autour de 0,13 est alors atteinte pour ces deux échantillons. L'image en insert montre la pointe de la microsonde presque nette dans le même plan que les bactéries situées sur la lamelle de verre indiquant qu'elle se trouve bien à quelques dizaines de micromètres de la surface en verre. Un gradient de dioxygène dirigé selon la hauteur du milieu liquide s'établit donc sur un intervalle de quelques minutes à six heures en fonction de la densité optique initiale de l'inoculum. Le gradient est présenté sur la Figure 4-10.B où la concentration en dioxygène a été mesurée lors de la remontée de la microsonde du fond de l'échantillon vers la surface du milieu liquide. La vitesse de remontée n'étant pas fixe, un plateau

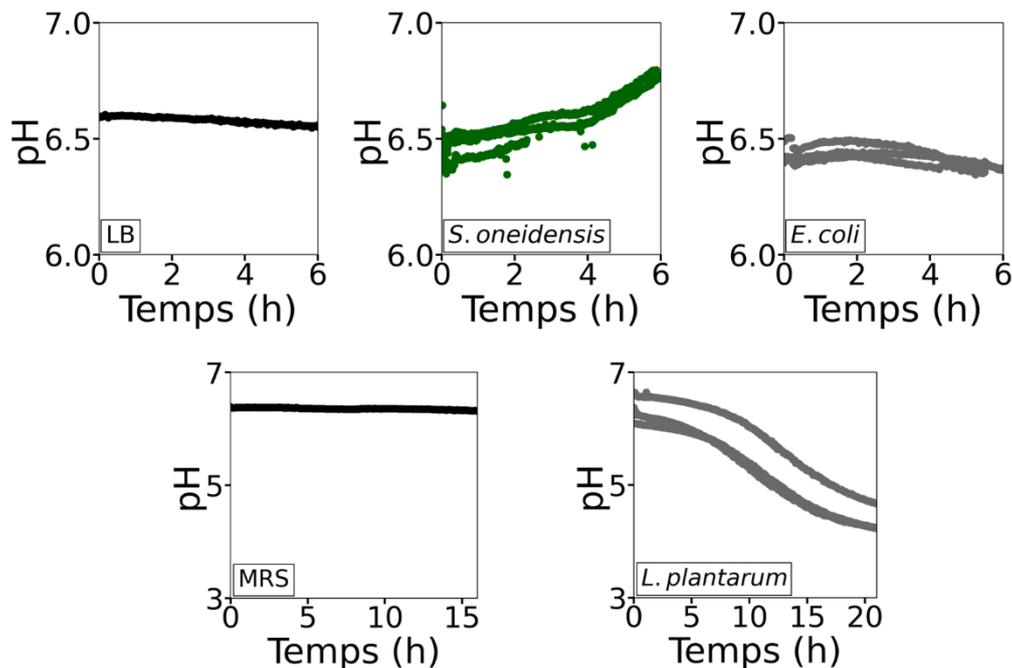
est observé autour de 75  $\mu\text{Mol}$  lorsque la sonde est immobile avant une remontée rapide jusqu'à la surface. On constate que sur les quelques millimètres de hauteur de l'échantillon, la concentration en dioxygène passe de 0  $\mu\text{Mol}$  à 260  $\mu\text{Mol}$  correspondant à la concentration en milieu oxygéné sans bactéries. Les bactéries nageant au sein du volume de milieu liquide sont donc dans un environnement mixte où zones anaérobie et aérobie sont en contact. La population bactérienne au sein du volume sera hétérogène et adaptée à des conditions environnementales différentes suivant leur localisation au sein du volume (surface, fond de la boîte...).



**Figure 4-10 – Variation temporelle de la concentration en dioxygène au fond de l'échantillon.** (A) La concentration en  $O_2$  est mesurée à l'aide d'une microsonde sur quatre échantillons : le milieu de culture abiotique (cercles pleins noirs) et trois milieux de turbidité initiale en bactéries différentes ( $DO_{initiale} = 0,003, 0,03$  and  $0,58$  – cercles pleins verts). L'image en insert (dont l'échelle est égale à  $20 \mu\text{m}$ ) montre que la microélectrode est placée au voisinage des bactéries situées sur la surface du substrat, soit à  $20\text{-}50 \mu\text{m}$  de la surface. Les différents temps  $t_{anaero}$  au bout desquels la concentration en dioxygène est nulle sont indiqués par des flèches vertes. (B) Concentration en dioxygène mesurée au cours de la remontée de la pointe du fond de l'échantillon vers la surface du milieu liquide. Les bactéries sont ici en conditions statiques (sans agitation) dans un milieu riche LB ( $\text{pH} = 6,5$ ) à  $23^\circ\text{C}$ .

Par ailleurs, le pH est également connu pour influencer la corrosion électrochimique du fer, un pH acide induisant la dissolution du Fe(0) solide (Figure 1-1 - diagramme de Pourbaix : instabilité thermodynamique du fer à  $\text{pH} < 4$ ). C'est pourquoi nous avons souhaité contrôler l'évolution de la valeur du pH au cours de la croissance bactérienne pour les trois souches utilisées : *S. oneidensis*, *E. coli* et *L. plantarum*. Une microsonde, disposée à la même hauteur que celle de dioxygène, permet de mesurer le pH localement. Les résultats sont présentés sur la Figure 4-11. On constate que le pH des milieux de culture abiotiques, LB et MRS (points noirs), reste constant au cours du temps et conservent une valeur proche de leur valeur initiale :  $6,5 \pm 0,05$  pour le LB et  $6,35 \pm 0,02$  pour le MRS. De même, une valeur constante est observée

pour une culture d'*E. coli* avec une valeur moyenne de  $6,37 \pm 0,07$ . Pour *S. oneidensis*, le milieu s'alcalinise très faiblement puisque le pH varie de 6,35 à 6,81 au cours des six heures d'incubation. On peut donc considérer que son pH reste fixe autour d'une valeur moyenne égale à  $6,54 \pm 0,07$ . Au contraire, une acidification notable du pH est constatée sur les échantillons de *L. plantarum* puisqu'après 21 heures d'incubation, le pH a diminué de 6,65 à 4,12. Cette décroissance est probablement liée au métabolisme fermentaire de *L. plantarum* qui tend à acidifier le milieu liquide environnant. L'ensemble de ces mesures de pH a été restreint aux durées sur lesquelles le phénomène de corrosion est observé sur notre système : soit 6 h pour *E. coli* et *S. oneidensis* et 21 h pour *L. plantarum*.



**Figure 4-11 – Variation temporelle du pH local au voisinage du nanofilm de fer.** La microsonde à pH est positionnée à 20-50  $\mu\text{m}$  de la surface du substrat situé au fond de la boîte de Petri. Cinq graphiques sont présentés. Trois concernent différentes bactéries, toutes inoculées à une densité optique initiale de 0,03 à 23°C : *S. oneidensis* (cercles verts pleins), *E. coli* and *L. plantarum* (cercles gris pleins). Les deux autres portent sur les deux milieux de culture abiotiques (cercles pleins noirs). Leurs pH restent constants au cours du temps autour de  $6,5 \pm 0,05$  pour le LB et  $6,35 \pm 0,02$  pour le MRS. Une valeur constante est également obtenue pour *E. coli* avec une valeur moyenne de  $6,37 \pm 0,07$ . Pour *S. oneidensis*, une très faible augmentation de 6,35 à 6,81 est enregistrée sur six heures d'incubation (avec une valeur moyenne de  $6,54 \pm 0,07$ ). Au contraire, une décroissance notable du pH est mesurée sur les échantillons de *L. plantarum*. Au bout de 21 heures d'incubation, le pH est passé de 6,65 à 4,12.

## 2. Influence de la densité optique de l'inoculum

Nous venons d'observer que la décroissance de la concentration en dioxygène dépend de la concentration initiale en bactérie. Voyons donc comment cette dernière influence la durée de la phase d'initiation, autrement dit la valeur de  $t_{onset}$ . De nombreux échantillons ont été préparés avec des turbidités initiales en bactéries variant entre  $10^{-3}$  à 1,2. Il est important de

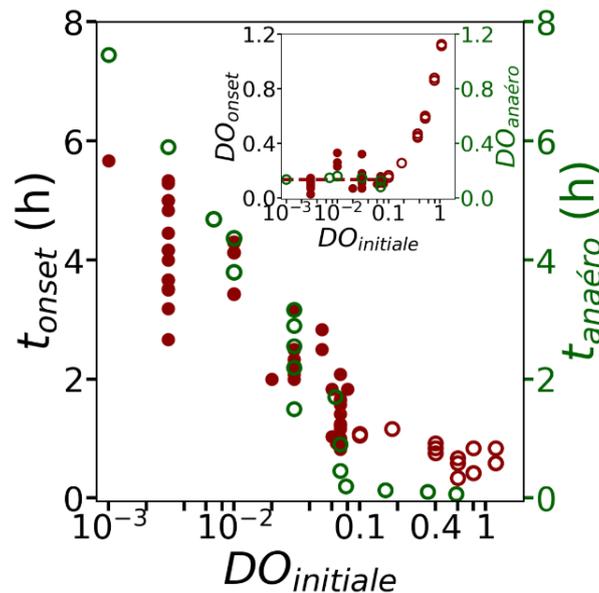
noter que quelle que soit la densité optique de l'inoculum ( $DO_{initiale}$ ), on observe une phase d'initiation suivie d'une corrosion homogène du nanofilm. La mesure du paramètre  $t = t_{onset}$  est donc possible pour l'ensemble des échantillons.

Toutes les valeurs sont regroupées dans le graphe en échelle semi-log de la Figure 4-12. Deux régimes de concentration apparaissent : un premier, associé à des valeurs de  $DO_{initiale}$  inférieures à 0,07 et un second pour des valeurs de  $DO_{initiale}$  plus élevées (supérieures à 0,07). Dans ce second régime, les valeurs de  $t_{onset}$  sont indépendantes des conditions initiales et en moyenne, la corrosion commence pour  $t_{onset} = 45 \pm 15$  minutes. Dans le premier régime, lorsque les cellules sont initialement plus diluées, on constate un retard dans le déclenchement de la corrosion. Globalement, les valeurs de  $t_{onset}$  décroissent de façon linéaire avec  $\log(DO_{initiale})$  ce qui peut être relié à un effet de croissance bactérienne. On peut également remarquer une dispersion des données, amplifiée aux faibles valeurs de  $DO_{initiale}$ . Cette dispersion peut être expliquée par la contrainte du milieu statique (sans flux) de notre expérience qui induit la présence de gradients de nutriments et d'oxygène [10] et donc une distribution des temps de dédoublement selon la direction du gradient.

Les valeurs de  $t_{anaéro}$  mesurées sur différents échantillons (Partie III.1) sont reportées sur la Figure 4-12 et comparées aux valeurs de  $t_{onset}$ . On remarque que ces deux temps caractéristiques sont proches dans le premier régime ( $OD_{initiale} < 0,07$ ) soulignant une forte corrélation entre l'apparition de condition anaérobie et la corrosion du fer. Au contraire, ces temps caractéristiques sont nettement différents dans le second régime ( $OD_{initiale} > 0,07$ ) : si l'oxygène disparaît en moins de dix minutes, 45 minutes restent nécessaires pour déclencher la corrosion. Ces résultats indiquent que bien que les conditions de micro-anaérobie soient établies, une période d'incubation additionnelle des bactéries dans cet environnement anaérobie est nécessaire pour déclencher la corrosion. Bien que ce temps supplémentaire de 45 minutes ne soit pas suffisamment long pour permettre un dédoublement bactérien (temps de division de 140 minutes sous ces conditions statiques), il serait suffisant pour que les cellules expriment les gènes impliqués dans l'interaction [11,12] avec la nanocouche protectrice d'oxyde de fer. De plus, on peut remarquer que la durée de cette période, précédant le déclenchement de la corrosion, est cohérente avec la durée de la pré-période d'électroactivité observée sur les mesures électriques.

L'enregistrement de la turbidité des échantillons bactériens sans nanofilm, sur le montage optique de référence parallèle, nous permet de déterminer les valeurs de densité optique de la suspension bactérienne pour n'importe quel temps d'incubation et en particulier pour  $t = t_{onset}$ . On suppose ici que la présence du nanofilm de fer ne modifie pas la croissance bactérienne du volume ce qui semble raisonnable à la vue de la croissance similaire des bactéries en présence d'une lame de verre et de la faible concentration en fer soluble libérée lors de la corrosion du nanofilm de fer (de l'ordre de 0,07  $\mu\text{M}$ ). Les valeurs correspondantes de densités optiques atteintes à  $t = t_{onset}$ , appelées  $DO_{onset}$ , sont tracées en fonction de la  $DO_{initiale}$  sur l'insert de la Figure 4-11. Nous trouvons que cette densité optique doit être constante et en moyenne égale à  $DO_{onset} = 0,13 \pm 0,06$  (équivalent à  $10^8$  colony-forming-units/ml) dans le premier régime. Comme attendu, elle augmente ensuite dans le second régime. De même, la

concentration de quelques échantillons a été mesurée au spectrophotomètre à  $t = t_{anaéro}$  (notée  $DO_{anaéro}$ ). On constate que ces valeurs de  $DO_{onset}$  et  $DO_{anaéro}$  sont identiques. Cela confirme le fait que la densité bactérienne volumique doit dépasser une valeur minimale pour à la fois faire complètement disparaître le dioxygène du micro-environnement autour du nanofilm de fer et induire la rupture de la passivation. Pour mémoire, des gradients spatiaux de concentration existent et cette densité volumique correspond à une valeur moyennée sur tout le volume éclairé par le faisceau laser.



**Figure 4-12 – Influence de la densité optique de l'inoculum sur le déclenchement de la corrosion.** La durée de la phase d'initiation, définie par  $t_{onset}$  et reportée sur l'axe vertical de gauche, est tracée en fonction de la densité optique initiale ( $DO_{initiale}$ ) du milieu liquide. Pour comparaison,  $t_{anaéro}$  (cercles verts vides) est représenté sur l'axe vertical de droite, et correspond à la durée nécessaire pour atteindre un environnement anaérobie strict au voisinage de la couche de fer. Dans l'insert, la densité optique atteinte à  $t = t_{onset}$  ( $DO_{onset}$ ), placée sur l'axe des ordonnées de gauche, est tracée en fonction de la densité optique initiale ( $DO_{initiale}$ ). L'axe des ordonnées de droite correspond lui à la densité optique atteinte à  $t = t_{anaéro}$  ( $DO_{anaéro}$ ). Deux régimes de concentration apparaissent : 1) pour des solutions initialement très diluées (cercles rouges pleins). La ligne pointillée rouge dans l'insert indique la densité optique la valeur moyenne de  $0,13 \pm 0,06$ . 2) pour des échantillons initialement très concentrés (cercles rouges vides). Les bactéries sont ici en conditions statiques (sans agitation) dans un milieu riche LB ( $pH = 6,5$ ) à  $23^{\circ}C$ .

### 3. Influence du contact entre les bactéries et la surface du nanofilm de fer

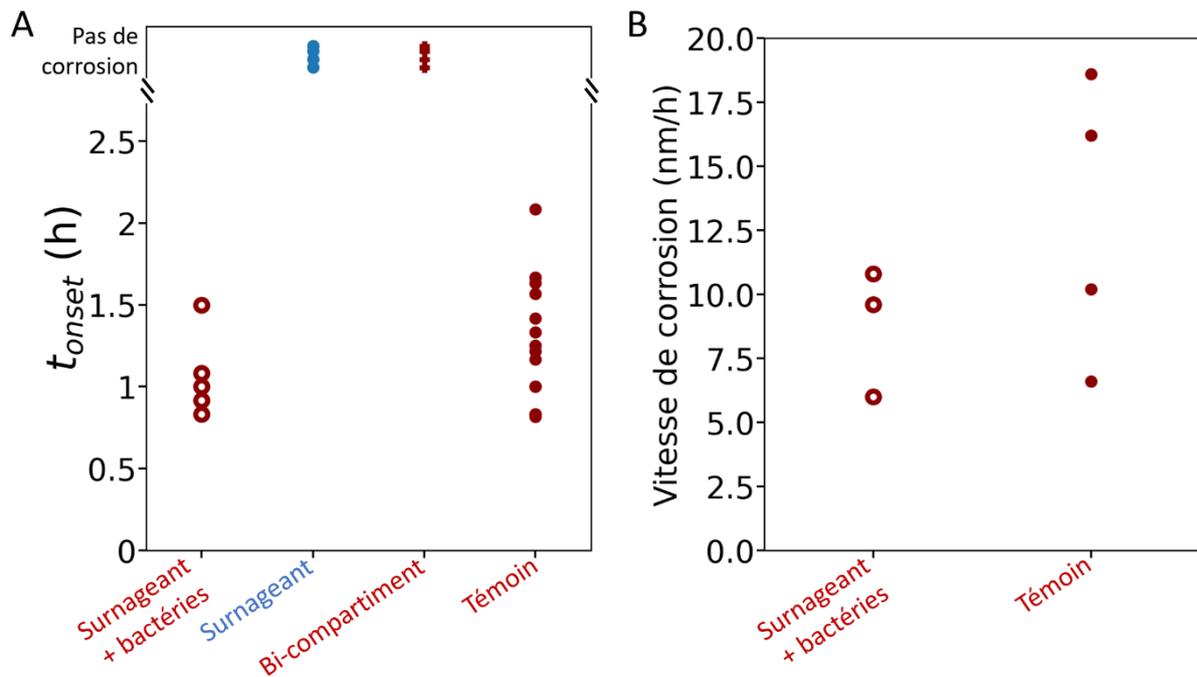
Observons à présent si ces conditions de concentration volumique seules sont suffisantes pour induire la corrosion du nanofilm.

Premièrement, le volume de 10 mL de milieu liquide contenant les bactéries au contact d'un nanofilm de fer est prélevé lorsque la dégradation du nanofilm de fer vient de s'enclencher (idem pour un pipetage après la dégradation complète du nanofilm) puis mis au contact d'un

nouveau nanofilm de fer. On constate que la corrosion de ce nouveau nanofilm ne commence pas immédiatement (cercles vides rouges – Figure 4-13.A) et qu'un temps supplémentaire d'une heure est nécessaire pour déclencher la corrosion. Ce temps supplémentaire pourrait s'expliquer par un effet de réoxygénation du milieu de culture lors du prélèvement/pipetage. Les bactéries se retrouveraient alors dans un environnement aérobie à une densité volumique supérieure à 0,07 (environ égale à 0,1). Cette configuration correspondrait à celle du second régime présenté sur la Figure 4-12 à la différence que les bactéries, préalablement en contact avec le nanofilm de fer, ont déjà enclenché les voies métaboliques permettant la respiration du Fe(III) solide. Bien que l'environnement anaérobie au voisinage du nanofilm de fer soit atteint en quelques minutes sous ces conditions, un temps supplémentaire resterait nécessaire pour enclencher la dégradation de la couche de fer. Il pourrait s'expliquer par le temps nécessaire aux bactéries pour percevoir et interagir avec la surface du nanofilm et/ou modifier progressivement la couche d'oxyde et de son environnement ionique. Deuxièmement, lorsque l'on dilue la suspension bactérienne juste après le déclenchement de la corrosion, celle-ci se poursuit comme si rien n'avait été modifié. Cela indique qu'une fois le processus de corrosion enclenché l'environnement physico-chimique au voisinage du nanofilm (concentrations volumiques en bactérie, anaérobie) n'a plus d'influence. Au contraire, si l'échantillon est dilué juste avant la corrosion, on constate que le déclenchement de la corrosion est retardé. Lors de la dilution, de l'oxygène est réintroduit dans le milieu de culture et la densité optique en bactéries repasse sous la valeur de 0,07 ce qui correspond cette fois à la configuration du premier régime décrit sur la Figure 4-12. Ce retard pourrait donc être lié au temps nécessaire au développement bactérien permettant l'apparition du gradient de la concentration en dioxygène et la restauration d'un environnement anaérobie au voisinage du nanofilm de fer. Dans ce même temps, les bactéries activeraient également les voies métaboliques permettant leur respiration du Fe(III) ou, dans une moindre mesure, son internalisation. Notons que la vitesse de corrosion reste la même sur l'ensemble de ces expériences (cercles vides rouges - Figure 4-13.B).

Troisièmement, le volume de 10 mL de milieu liquide contenant les bactéries au contact d'un nanofilm de fer est prélevé une fois la dégradation du nanofilm enclenchée puis centrifugé à 10000 *g* pendant 15 min et filtré (pores de 0,2  $\mu\text{m}$ ) pour ne conserver que le surnageant sans les bactéries. Celui-ci serait notamment composé des métabolites éventuellement sécrétés par les bactéries (telles que les flavines) et/ou de molécules situées sur la membrane des bactéries relarguées au cours de la centrifugation. La dispersion du contenu intracellulaire suite à la lyse de bactéries est peu probable à cette vitesse de centrifugation [13] puisque la rupture des deux membranes bactériennes nécessite une action mécanique plus brutale (billes de verre, sonication) ou enzymatique ou chimique (détergent). Lorsque ce surnageant est mis au contact d'un nouveau nanofilm de fer, on constate que celui-ci n'est pas corrodé (cercles pleins bleus – Figure 4-13.A). Les pipetages successifs induisent la réintroduction de dioxygène dissous dans le milieu liquide. L'environnement au voisinage du nanofilm de fer est donc probablement aérobie. Sous ces conditions, l'ensemble des molécules présentes dans le surnageant seules ne parviennent pas à induire la corrosion du nanofilm de fer.

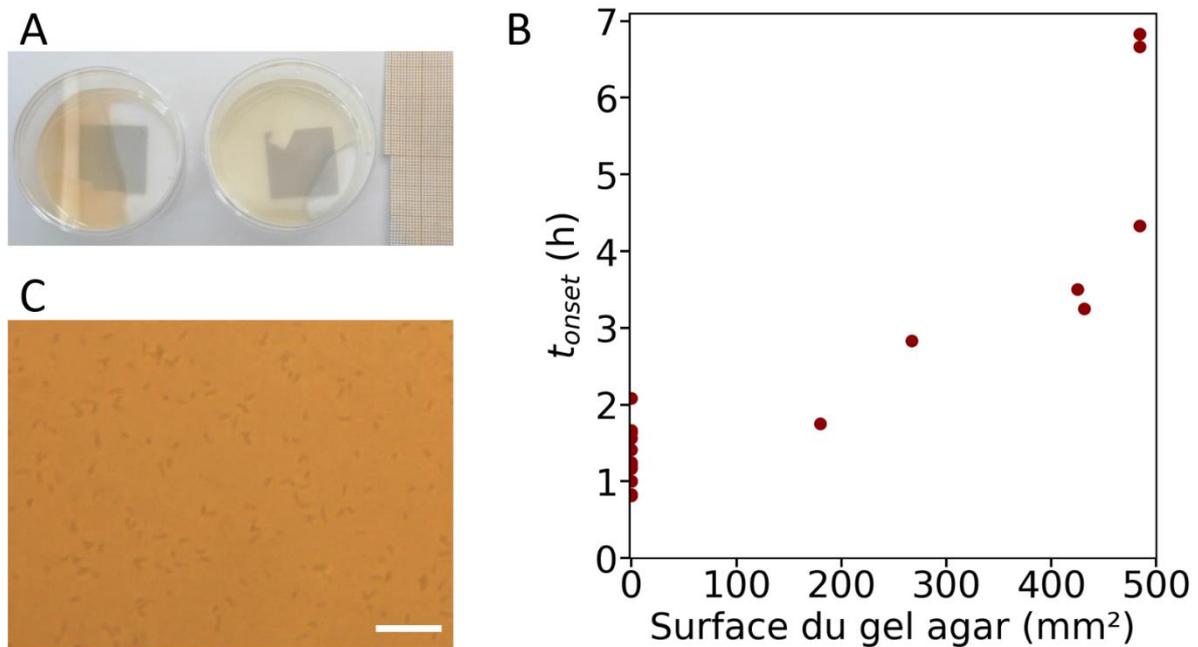
Enfin, les bactéries sont physiquement séparées du nanofilm de fer par une membrane semi-perméable dont la taille des pores est de 12 kDa. Cette taille est suffisante pour la libre circulation de petites molécules sécrétées telles que les sidérophores ou autres petits métabolites. De nouveau, aucune corrosion (croix rouges – Figure 4-13.A) n'est observée ce qui semble indiquer que le contact direct bactérie-nanofilm serait nécessaire au cours de la phase d'initiation.



**Figure 4-13 – Influence du surnageant et du contact bactérie-nanofilm sur le déclenchement de la corrosion.** (A) La durée de la phase d'initiation, quantifiée par la valeur de  $t_{onset}$ , est présentée pour quatre échantillons différents. Dans le premier cas, le surnageant avec les bactéries au contact d'un premier nanofilm de fer est prélevé au début de la corrosion et mis en contact avec un nouveau nanofilm de fer. Dans le second cas, bactéries et surnageant au contact d'une première lame de fer sont prélevés au début de la corrosion puis centrifugés. Seul le surnageant est ensuite mis au contact d'une nouvelle lame de fer. Dans le troisième cas, les bactéries sont physiquement séparées du nanofilm de fer par un boudin de dialyse dont la taille des pores (12 kDa) permet la circulation des petits métabolites. Le dernier cas correspond à l'échantillon témoin, c'est-à-dire l'expérience classique des bactéries au contact direct du nanofilm de fer. (B) La vitesse de corrosion, extraite des courbes de variation temporelle de l'épaisseur de la couche de fer, est tracée dans les deux cas précédents de corrosion. Elle est similaire dans les deux cas. Les bactéries sont ici en conditions statiques (sans agitation) dans un milieu riche LB (pH = 6,5) à 23°C et inoculées à une densité optique de 0,03.

Une dernière expérience est réalisée en recouvrant des surfaces plus ou moins grandes du nanofilm d'un gel de LB Agar stérile (15 g/L d'agar et 25 g/L de LB poudre dilués dans de l'eau MilliQ). Il est coulé lorsqu'il est revenu à une température proche de celle ambiante. L'ensemble des échantillons est inoculé à une même densité optique initiale égale à 0,03. Une photo des

échantillons prise à la fin de l'expérience est présentée en Figure 4-14.A. On constate que le gel est rougeâtre due à la présence d'un biofilm sur sa surface. La couleur grise du nanofilm correspond à la couche de titane. Sur le graphique (cercles pleins rouges Figure 4-14.B.) est tracée la variation de  $t_{onset}$  en fonction de la surface de gel agar recouvrant le nanofilm. On constate que plus la surface recouverte par le gel est grande, plus le déclenchement de la dégradation du nanofilm est retardé. Étonnamment, une corrosion, bien que retardée de plus de cinq heures, est observée même lorsque la surface du nanofilm est entièrement recouverte de gel (484 mm<sup>2</sup>). Ce résultat, à première vue en contradiction avec les résultats précédemment obtenus pour la cellule bi-compartmentée ou le surnageant seul (aucune dégradation observée), s'explique par la présence de bactéries entre le nanofilm et le gel d'agar visibles au microscope optique (Figure 4-14.C). Notons que, malgré la présence de gel, la corrosion reste homogène sur la totalité de la surface du nanofilm de fer. Le retard à la corrosion observé pour des surfaces croissantes du nanofilm recouvertes de gel peut s'interpréter par le temps nécessaire aux bactéries pour s'immiscer sous le gel. Ces expériences renforcent l'idée de la nécessité du contact des bactéries avec la surface.

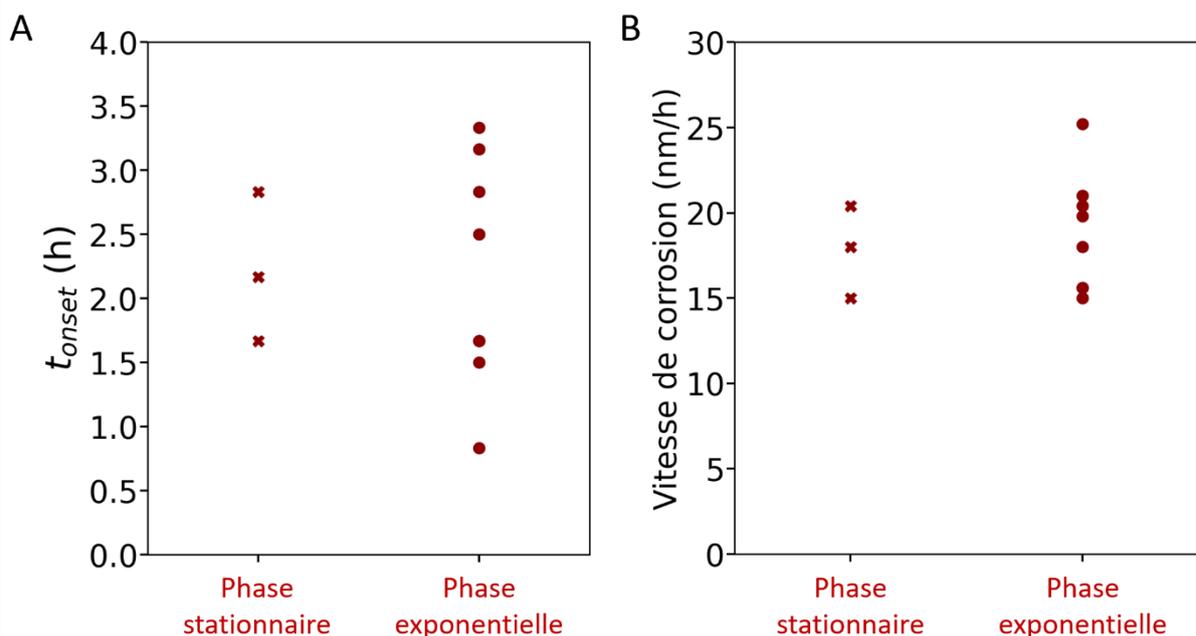


**Figure 4-14 – Influence de la présence d'un gel agar au contact de la surface du nanofilm sur le déclenchement de la corrosion.** (A) Images des échantillons prises à la fin de l'expérience. On y observe le gel agar recouvrant une surface plus ou moins importante du nanofilm. La couche de fer est entièrement corrodée. La coloration grise de la lame correspond à la sous-couche de titane. (B) Variation de  $t_{onset}$  en fonction de la surface du nanofilm recouverte par le gel d'agar : plus la surface recouverte est grande, plus le temps de déclenchement de la corrosion est retardé. (C) Observation au microscope optique inversé de la surface du film métallique au contact du gel agar après la corrosion : des bactéries sont clairement visibles. L'échelle correspond à 20  $\mu$ m. Les bactéries sont ici en conditions statiques

(sans agitation) dans un milieu riche LB (pH = 6,5) à 23°C et inoculées à une densité optique de 0,03.

#### 4. Influence de l'état physiologique des bactéries

Dans cette partie, l'état physiologique des bactéries nécessaire au déclenchement de la corrosion est analysé. Les bactéries sont inoculées, dans l'ensemble de nos expériences, à partir d'une solution où elles sont en phase exponentielle de croissance (cercles pleins rouges – Figure 4-15). Ici trois autres échantillons sont préparés cette fois à partir de bactéries en phase stationnaire de croissance (18 h) prélevées dans la préculture de la nuit (croix rouges – Figure 4-15). La densité optique initiale des échantillons est de 0,03. On constate que ces deux états physiologiques initiaux des bactéries n'influent ni sur la durée de la phase d'initiation ni sur la vitesse de corrosion. Le temps nécessaire pour enclencher un nouveau processus métabolique tourné vers l'interaction avec le fer dans un environnement anaérobie n'est pas retardé par l'inoculation du milieu avec des bactéries en phase stationnaire. Ici les mesures optiques et électriques ont été effectuées simultanément. Les valeurs de  $t_{onset}$  sont donc différentes pour l'échantillon témoin (phase exponentielle) par rapport à celles présentées sur la Figure 4-11 pour une  $DO_{initiale} = 0,03$  où aucune mesure électrique n'avait été effectuée simultanément aux mesures optiques. Nous avons pu remarquer une plus grande dispersion des valeurs de  $t_{onset}$  en présence du montage électrique. Notons que les valeurs de vitesses de corrosion sont fixées par la présence de la contre-électrode en platine.



**Figure 4-15 – Influence de deux états physiologiques des bactéries sur  $t_{onset}$  et la vitesse de corrosion.** (A) La durée de la phase d'initiation, marquée par la valeur de  $t_{onset}$ , est calculée dans deux cas : lorsque les bactéries sont inoculées alors qu'elles sont en phase stationnaire de croissance (croix rouges) et lorsque qu'elles sont inoculées alors qu'elles sont en phase exponentielle de croissance (cercles pleins rouges). (B) La vitesse de corrosion, extraite des courbes de variation temporelle de l'épaisseur de la couche de fer, est tracée dans les deux

mêmes cas que précédemment. Les bactéries sont ici en conditions statiques (sans agitation) dans un milieu riche LB (pH = 6,5) à 23°C et inoculées à une densité optique de 0,03.

## 5. Influence de l'ajout de Fe(III) soluble

### a. Mesure des vitesses de réduction du Fe(III) en anaérobie stricte

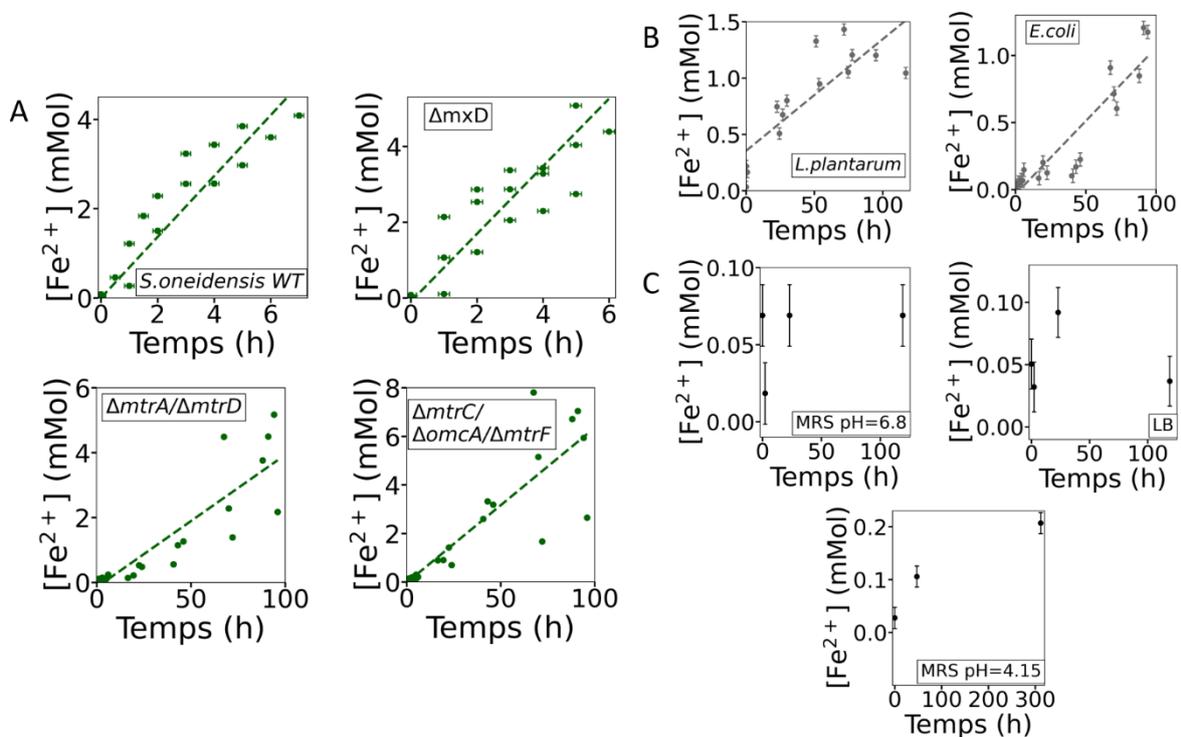
La plupart des espèces bactériennes connues assimilent le fer pour répondre à leur besoin en fer (constituant de certaines protéines) et d'autres interagissent avec le fer au travers de réactions dissimilatrices utilisant soit le Fe(II) comme donneur soit le Fe(III) comme accepteur d'électrons. L'espèce *L. plantarum* fait exception à la règle concernant l'assimilation. L'idée est donc ici de quantifier cette interaction avec le Fe(III) soluble en mesurant sa cinétique de réduction en Fe<sup>2+</sup> en condition anaérobie stricte par le test à la ferrozine (décrit dans le chapitre 3.III.6) pour l'ensemble des bactéries étudiées. Les mesures ont été faites sur des temps d'incubation variant de 6 à 100 heures. Pour chaque échantillon, la concentration en Fe<sup>3+</sup> soluble ajoutée est de 7,8 mM. La Figure 4-16 présente les résultats obtenus. Pour chaque bactérie, la mesure de la variation temporelle de la concentration en Fe<sup>2+</sup> nous permet d'extraire la vitesse de réduction du Fe<sup>3+</sup> grâce à un ajustement affine des données obtenues. Le coefficient directeur de cet ajustement donne le taux de réduction, appelé dans la suite  $k_{reduc}$ . Notons que le dosage des ions Fe(II) naturellement présents dans le milieu LB sans bactéries donne une concentration égale à 5 µM et 4 µM dans le milieu MRS.

La Figure 4-16.A. concerne *S. oneidensis* MR-1 et ses trois mutants (cercles pleins verts). On observe que la souche sauvage et le mutant  $\Delta mxD$  réduisent rapidement le fer soluble. Les échelles de temps sont ici restreintes aux six premières heures d'incubation. Au-delà de ces six heures, un régime stationnaire est constaté autour d'une concentration de (6,3 ± 0,2) mM en Fe(II) : les bactéries ne réduisent pas tout le fer soluble en solution. Cette observation est aussi faite par Gralnick et al [13] où 4 mM de Fe(II) est mesuré au maximum alors que 5 mM de citrate de fer a été ajouté. De notre côté, des expériences parallèles où le citrate d'ammonium ferrique est remplacé par le citrate de fer donnent des résultats similaires. La réduction est au contraire bien plus lente pour les deux mutants délétés dans les cytochromes de la voie Mtr. En effet, les différents ajustements (lignes vertes en pointillés) donnent un taux de réduction ( $k_{reduc}$ ) pour *S. oneidensis* WT égal à (0,68 ± 0,01) mM/h et (0,89 ± 0,02) mM/h pour le mutant  $\Delta mxD$  contrairement à des taux dix fois plus faibles pour les mutants  $\Delta mtrA/\Delta mtrD$  ((0,041 ± 0,001) mM/h) et  $\Delta mtrC/\Delta omcA/\Delta mtrF$  ((0,064 ± 0,001) mM/h). Le mutant délété dans les cytochromes les plus externes semble donc mieux réduire le fer que celui délété des cytochromes côté intérieur de la membrane externe. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles données dans la littérature qui sont de 0,7 mM/h pour la souche sauvage, 0,022 mM/h pour  $\Delta mtrA/\Delta mtrD$  et 0,013 mM/h pour  $\Delta mtrC/\Delta omcA/\Delta mtrF$  [13].

La Figure 4-16.B. présente les mesures effectuées sur *E. coli* et *L. plantarum* (cercles gris pleins). La cinétique de réduction est très lente puisqu'après cent heures d'incubation, moins de 1 mM de Fe(II) est mesuré. Les ajustements (lignes grises en pointillés) donnent un taux de réduction de (0,011 ± 0,001) mM/h pour *E. coli* et de (0,0098 ± 0,0004) mM/h pour *L. plantarum*. Ces résultats sont cohérents avec l'absence des voies de transferts classiques des électrons à

l'extérieur de leur cellule, diminuant drastiquement le rendement de la conversion Fe(III) en Fe(II). La Figure 4-16.C. expose les résultats des échantillons témoins (cercles noirs pleins) c'est-à-dire les milieux de culture abiotiques dont le pH final est neutre (6 – 7,5). On constate que la concentration en Fe(II) reste constante au cours du temps autour de la valeur de 0,05 mMol. Comme la bactérie *L. plantarum* est connue pour acidifier son environnement, un contrôle de la réduction du Fe(III) en condition acide (pH = 4,15) est également effectué. Une concentration résiduelle en Fe(II) égale à 0,2 mM est retrouvée après une grande période d'incubation (300 heures) mais reste similaire à celle obtenue pour le milieu ajusté à pH neutre sur 100 heures d'incubation.

Il est important de souligner que dans les conditions de l'expérience, les culots des bactéries (*S. oneidensis* et ses mutants) récupérés après centrifugation pour les temps longs d'incubation (supérieurs à 24h) restent rosés et non noirs comme observé en présence de magnétite [15]. Par ailleurs, la croissance bactérienne a été vérifiée par des mesures de densité optique au spectrophotomètre.



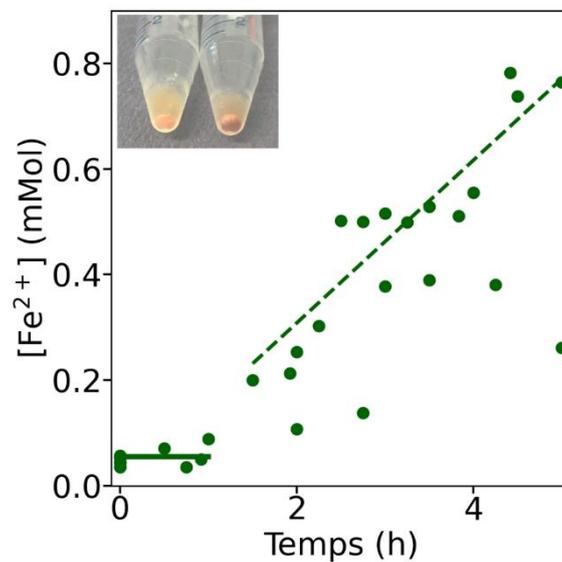
grises en pointillés). Le taux de réduction calculé est de  $(0,011 \pm 0,001)$  mM/h pour *E. coli* et de  $(0,0098 \pm 0,0004)$  mM/h pour *L. plantarum*. (C) Résultats relevés pour les milieux de culture abiotiques (cercles pleins noirs). Le milieu LB est associé à *S. oneidensis* et *E. coli* tandis que le milieu MRS est utilisé pour *L. plantarum*. Chacun de ces milieux à un pH final neutre (6 – 7,5). Comme *L. plantarum* est connue pour acidifier son environnement, un contrôle de la réduction du Fe(III) en condition acide (pH = 4,15) est également effectué. Les bactéries sont ici en conditions statiques (sans agitation) dans un milieu riche LB (pH = 6,5) pour *S. oneidensis* et *E. coli* et MRS (pH = 6,5) pour *L. plantarum* à 23°C et inoculées à une densité optique de 0,1.

b. Mesure des vitesses de réduction du Fe(III) en condition statique aérobie

Afin de se rapprocher davantage des conditions réelles de nos échantillons contenus dans les boîtes de Petri, l'étude de la réduction du Fe(III) est menée en condition aérobie. Les mêmes boîtes de Petri que celles utilisées pour les mesures optiques sont utilisées laissant donc une interface air/liquide en contact permanent avec le dioxygène de l'air. Pour chaque point de mesure, une boîte contenant des bactéries inoculées à une densité optique de 0,1 dans 10 mL de milieu de culture avec 10 mM de citrate d'ammonium ferrique est préparée. De même que pour les conditions d'anaérobie stricte, la concentration totale en fer mesurée par réduction à l'hydroxylamine puis dosage à la ferrozine donne une concentration totale en fer de  $(7,5 \pm 0,5)$  mM. Le gradient de concentration en dioxygène avec des conditions d'anaérobie au fond de la boîte est atteint en 15 min, selon la Figure 4-12 ( $DO_{initiale}=0,1$ ). Avant chaque prélèvement et mesure, l'échantillon est homogénéisé par agitation. Le test à la ferrozine est ensuite effectué sur le surnageant dilué au 1/10 dans une solution d'HCl pendant 30 minutes. Ce temps plus grand dans la solution d'HCl permet de solubiliser davantage de fer et d'avoir un signal plus marqué. Cette amélioration est surtout visible lorsque la concentration en fer est au seuil de sensibilité du spectrophotomètre. Les résultats sont présentés sur la Figure 4-17. On observe une phase de latence suivie d'une augmentation linéaire de la concentration en Fe(II) en fonction du temps. La concentration en Fe(II) mesurée au cours de cette phase de latence est en moyenne égale à 0,05 mM ce qui correspond à la concentration mesurée dans les échantillons témoins de milieu LB avec 10 mM de Fe(III) ajouté (Figure 4-16.C). L'ajustement linéaire sur la partie linéaire de courbe donne un taux de réduction égal à  $(0,15 \pm 0,05)$  mM/h, soit 4,5 fois plus petit que le taux mesuré en conditions d'anaérobie stricte. Cette observation est cohérente avec une utilisation moindre du fer pour la respiration cellulaire anaérobie qui ne concerne alors qu'une petite partie des bactéries planctoniques du milieu liquide. Soulignons que la concentration en Fe<sup>2+</sup> réellement issue de la réduction du Fe<sup>3+</sup> par les bactéries pourrait être sous-estimée à cause de l'oxydation compétitive du Fe<sup>2+</sup> par le dioxygène présent dans le milieu. Aucune interaction entre le fer soluble et les bactéries n'est mesurable au cours de la première heure d'incubation. Par ailleurs, on peut constater que la concentration maximale en fer réduite atteinte dans la phase stationnaire qui suit ces cinq heures d'incubation est en moyenne égale à 2,5 mM, inférieure au 7,5 mM de Fe(III) initialement ajouté. Le Fe(III) n'est donc pas réduit en totalité.

Contrairement aux mesures en anaérobie stricte, on observe ici un noircissement de la solution sur les temps longs (au-delà de cinq heures d'incubation) alors qu'une pellicule s'est formée

au niveau de l'interface air/liquide. Le culot de cellules récupéré après centrifugation passe également du rosé au noir indiquant la présence d'oxyde de fer  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  comme observé par Yuan et al [15] (Figure 4-17, insert). Enfin, on observe une croissance plus rapide des bactéries dans ses conditions d'aérobie statique puisqu'après cinq heures d'incubation, la densité optique de la suspension bactérienne est égale à 0,6 contre 0,2 en anaérobie stricte. Cela rejoint la dispersion des temps de dédoublement observée sur la Figure 4-11 liée à une croissance en volume plus rapide des bactéries proches de la surface et donc d'un environnement plus riche en dioxygène dissous comparé à la croissance des bactéries au fond de la boîte en anaérobie. Ce résultat attendu rappelle que bien que *S. oneidensis* soit une espèce présentant une grande versatilité respiratoire, il reste énergétiquement favorable de respirer du dioxygène, ce qui conduit peu de bactéries à se tourner vers une respiration anaérobie du fer soluble. N'oublions pas qu'une partie du  $\text{Fe(III)}$  soluble peut également être réduite pour assimilation.



**Figure 4-17 - Cinétique de réduction du  $\text{Fe(III)}$  en condition statique aérobie.** La variation temporelle de la concentration en  $\text{Fe(II)}$  est mesurée par le test à la ferrozine pour la bactérie *S. oneidensis* (cercles pleins verts). L'ajustement affine (ligne verte en pointillés), effectué sur les points après la phase de latence, nous donne un taux de réduction  $k_{\text{reduc}}$  égal à  $(0,15 \pm 0,05)$  mM/h. De plus, une phase de latence d'une heure est observée pour une concentration en fer de moyenne 0,05 mM (ligne verte continue). En insert est présentée une photo des culots de cellules obtenus après centrifugation pour l'échantillon initial (gauche) et après 24 h d'incubation (droite). Les bactéries sont ici en conditions statiques (sans agitation) dans un milieu riche LB ( $\text{pH} = 6,5$ ) supplémenté de  $(7,5 \pm 0,5)$  mM de citrate d'ammonium ferrique à  $23^\circ\text{C}$  et inoculées à une densité optique de 0,1.

### c. Décalage du déclenchement de la corrosion

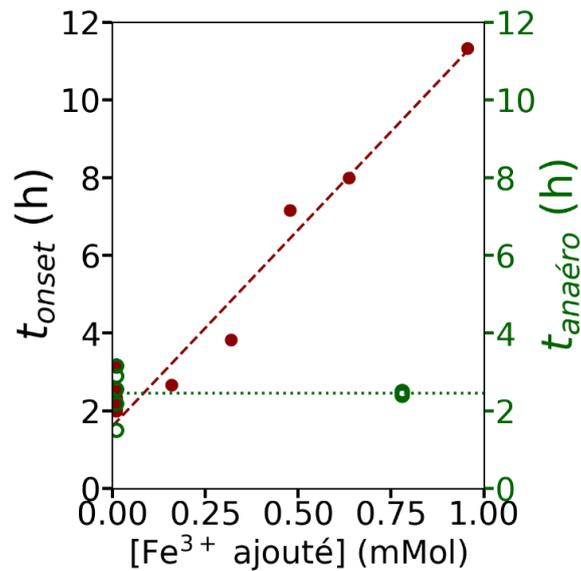
A présent que nous savons qu'un gradient de dioxygène s'établit au sein du milieu liquide et que nous connaissons les taux de réduction du  $\text{Fe(III)}$  soluble par *S. oneidensis*, voyons comment ces facteurs peuvent rentrer en compétition avec la rupture du film passif d'oxyde de fer précédant le déclenchement de la corrosion. Autrement dit, voyons si une compétition

peut exister entre du Fe(III) soluble ajouté et le Fe(III) solide contenu dans la couche protectrice d'oxyde lors du processus d'interaction des bactéries avec le fer.

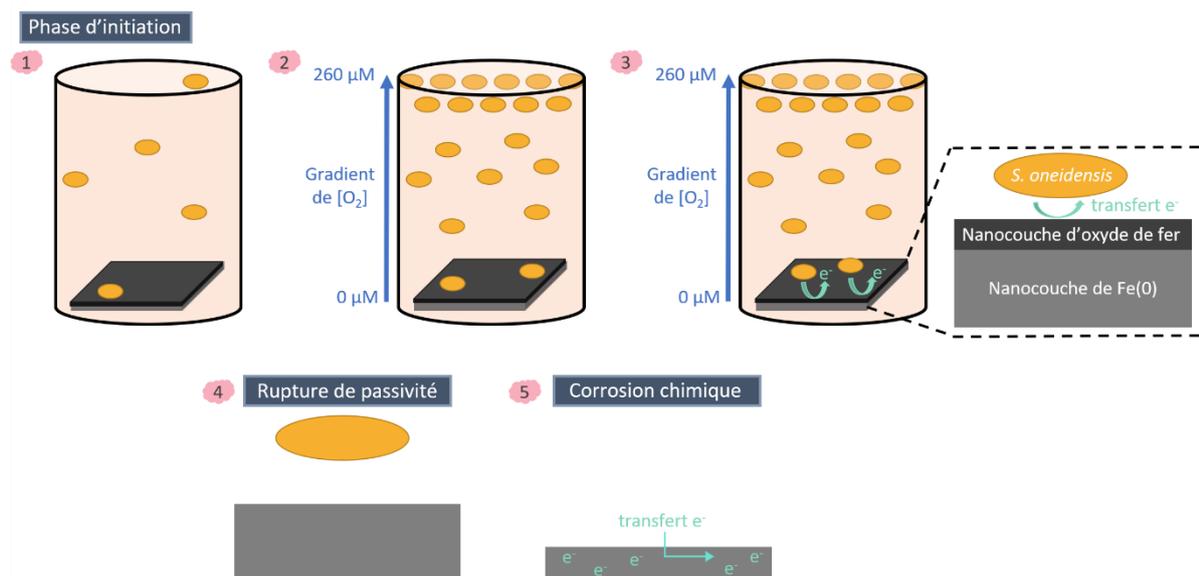
Pour ce faire, différentes concentrations en Fe(III) soluble ont été ajoutées dans le milieu de culture liquide. Soulignons, au passage, que le milieu de culture lui-même contient une quantité initiale de molécules de fer solubles (de l'ordre de 10-20  $\mu\text{M}$  [16]). Les résultats sont donnés sur la Figure 4-18. On constate que la présence de molécules de fer solubles additionnelles décale de façon significative la durée de la phase d'initiation puisque l'ajout de 1 mM de citrate d'ammonium ferrique retarde le processus de corrosion de 12 h. Toutefois, aucun changement n'est observé ni dans la vitesse de croissance des bactéries ni dans la consommation de dioxygène puisque les valeurs de  $t_{\text{anaéro}}$  restent constantes et égales à  $(2,5 \pm 0,5)$  h en moyenne.

Si l'on reprend le taux de réduction calculé sur la Figure 4-16 ( $k_{\text{reduc}} = (0,15 \pm 0,01)$  mM/h), 1 mM de Fe(III) devrait être réduit en 6h45. Toutefois, des expériences complémentaires, menées sur des échantillons contenant initialement 1 mM de Fe(III) soluble, ont montré que la concentration en Fe(II) restait constante autour de 0,05 mM au cours des six premières heures d'incubation. Ce temps de 6h45, calculé pour une plus grande concentration en Fe(III) disponible dans le milieu de culture, sous-estime donc le temps nécessaire à la réduction totale du Fe(III) soluble. De plus, les précédentes mesures de cinétiques de réduction nous indiquent également que le Fe(III) ajouté n'est pas réduit en totalité puisqu'un palier est atteint après 10 h d'incubation. Le délai observé de 10 h ne peut donc être uniquement expliqué par une compétition entre fer soluble et fer solide lors du processus de respiration cellulaire. Ce résultat peut être relié à la présence de gradients tant de dioxygène (conditions aérobiques à l'interface air/liquide et microenvironnement anaérobie à proximité du nanofilm) que de concentration bactérienne. On peut proposer le scénario suivant (Schéma 4-1). Après inoculation dans le milieu de culture, les bactéries se développent et consomment l'oxygène dissous. Une fois une certaine concentration en bactéries atteinte, un gradient de concentration en dioxygène apparaît et un environnement local anaérobie au fond de la boîte finit par se créer. La plupart des bactéries migre vers l'interface air/liquide (où elles formeront une pellicule observable après 12 h d'incubation) afin de conserver un accès au dioxygène énergétiquement plus favorable. D'autres bactéries vont, elles, modifier leur métabolisme de respiration pour se tourner vers la respiration du fer au contact des molécules de Fe(III) solubles plus facilement accessibles. Une fois le processus métabolique enclenché, elles vont pouvoir interagir avec l'oxyde de fer protecteur situé sur la surface du nanofilm de Fe(0) alors présent en plus grande quantité (plus grande surface active que les quelques molécules de Fe(III) restantes). La réduction de cette couche d'oxyde provoque finalement la rupture du film passif et la corrosion chimique du Fe(0). A ce phénomène vient s'ajouter l'assimilation possible du fer par les bactéries pour leur propre métabolisme. Toutefois, soulignons que l'assimilation du fer mobilise une quantité de fer bien moins importante que celle requise dans le processus de respiration. Finalement, dans un environnement aussi complexe, il est également surprenant de trouver une variation linéaire de la concentration en fer soluble en fonction du temps. Elle tend à suggérer à la fois un effet additif et cumulatif dans lequel chaque molécule de fer décale

la corrosion par le même temps compte tenu d'une faible densité en bactéries concernées par cette respiration anaérobie.



**Figure 4-18 – Influence de l’ajout de Fe(III) soluble sur le déclenchement de la corrosion.** Dans cette expérience, du citrate d’ammonium ferrique à différente concentration est ajouté au milieu de culture contenant des bactéries à la densité optique initiale de 0,03. Pour chaque concentration, les valeurs de  $t_{onset}$  sont extraites des mesures optiques (cercles rouges pleins – axe vertical de gauche). En parallèle, le temps caractéristique  $t_{anaéro}$  a été mesuré pour l’échantillon contenant 0,75 mMol de Fe(III) (cercles verts vides – axe vertical de droite). Les lignes pointillées rouges et vertes représentent respectivement les ajustements linéaire et constant des données. Les bactéries sont ici en conditions statiques (sans agitation) dans un milieu riche LB (pH = 6,5) à 23°C.



**Schéma 4-1 – Schéma simplifié présentant le scénario possible à l’origine de la dégradation de la couche de fer.** (1) Inoculation des bactéries dans le milieu de culture en

environnement aérobie. (2) Croissance bactérienne combinée à une consommation du dioxygène dissous. Au-delà d'une certaine concentration en bactéries, apparition d'un environnement anaérobie au fond de la boîte (gradient de concentration en dioxygène). La plupart des bactéries migre vers l'interface air/liquide mais d'autres vont changer de métabolisme de respiration. (3) Respiration ou assimilation du fer ferrique d'abord soluble (plus facilement accessible) puis solide au sein de la nanocouche protectrice d'oxyde de fer situé sur la surface du nanofilm de Fe(0) (4) Rupture du film passif suite à la réduction de cette couche d'oxyde (5) Corrosion chimique du Fe(0).

## 6. Influence de différentes bactéries sur la corrosion du nanofilm de fer

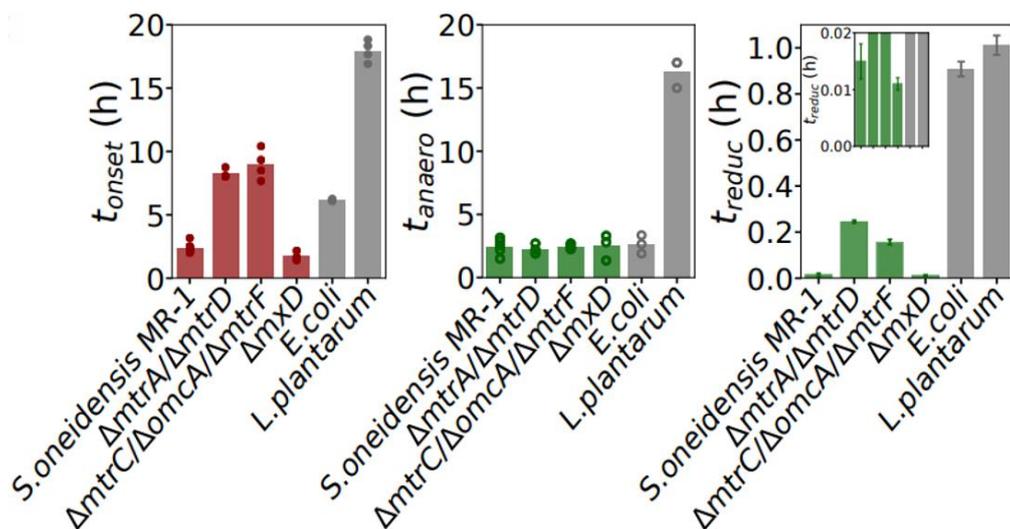
Nous avons vu dans les parties précédentes que la réduction du fer soluble intervenait avec une efficacité plus ou moins grande selon la bactérie mise en jeu. Voyons donc comment ces six bactéries différentes vont influencer le déclenchement de la corrosion.

Trois temps caractéristiques sont déterminés et reportés sur trois graphiques présentés sur la Figure 4-19 :  $t_{onset}$ ,  $t_{anaéro}$  et  $t_{reduc}$ . Le temps noté  $t_{reduc}$  correspond au temps requis pour réduire les quelques molécules de fer soluble présentes dans le milieu de culture (10  $\mu$ M) à un taux égal à celui calculé sur la Figure 4-16 ( $k_{reduc}$ ). Bien que ce temps soit fictif, il permet de donner une indication sur la capacité des bactéries à réduire le fer soluble. Pour chacune des différentes bactéries, les densités initiales sont fixées à 0,03.

Commençons par les résultats obtenus pour la souche sauvage de *S. oneidensis* et les deux mutants délétés dans les cytochromes de type-c situés sur la membrane externe ( $\Delta mtrA/\Delta mtrD$  et  $\Delta mtrC/\Delta omcA/\Delta mtrF$ ). Les expériences de mesures optiques indiquent que ces deux mutants induisent une corrosion uniforme du nanofilm après une phase d'initiation significativement plus longue (8h15 - 9 h) que pour la souche sauvage (2h20 en moyenne). Une comparaison plus approfondie de ces deux mutants ne peut être effectuée en raison de la dispersion des données. On remarque également qu'un environnement anaérobie au voisinage du nanofilm de fer est obtenu en deux à trois heures, tant pour ces deux mutants que pour la souche sauvage. L'absence des cytochromes de type-c n'induit donc pas de ralentissement de la consommation de dioxygène. Au contraire, les valeurs de  $t_{reduc}$  (histogramme de droite, Figure 4-19) indiquent que les mutants auront besoin d'un temps dix fois plus grand pour réduire la même quantité de fer ferrique comparée à la souche sauvage. L'ensemble de ces résultats montre que : i) les cytochromes de type-c composant la partie finale de la voie Mtr seraient impliqués dans l'initiation de la corrosion du nanofilm de fer; ii) les deux mutants sont capables d'interagir avec le fer via la mise en place de voies alternatives (peut-être indirectes) toutefois moins efficaces; iii) le déclenchement de la corrosion semble corrélé avec la capacité de réduction du fer soluble par les bactéries couplée à l'apparition de l'environnement anaérobie. L'impact moins important des mutations, sur  $t_{onset}$  plutôt que sur  $t_{reduc}$  pourrait s'expliquer par la sécrétion extracellulaire de flavines, des petites molécules navettes pour les électrons, qui interagiraient préférentiellement avec le fer soluble comparativement au fer insoluble [17].

Concernant le troisième mutant,  $\Delta mxD$ , on peut constater un comportement similaire à celui de la souche sauvage pour l'ensemble des temps caractéristiques. Cela confirme qu'à la vue de la courte durée de nos expériences (moins de 24 h), l'absence de matrice extracellulaire ne semble pas influencer le processus de corrosion. Enfin, les résultats préliminaires obtenus sur le mutant déficient en pili de type IV semble indiquer les mêmes valeurs de  $t_{onset}$  et de vitesses de corrosion soulignant que, dans nos conditions expérimentales, le rôle des pili de type IV semble mineur. Cela rejoint le résultat obtenu par Shirodkar et al [18]. Toutefois ces mesures sont à reproduire pour être confirmées.

Passons à présent aux résultats sur *E. coli* et *L. plantarum*. Initialement choisis comme témoins négatifs, le premier graphique indique que ces deux bactéries sont pourtant capables d'induire la transition vers la corrosion mais pour des temps bien plus longs que *S. oneidensis*. En effet, un temps d'environ 6 h est nécessaire pour déclencher la corrosion chez *E. coli*. Il est de 18 h pour *L. plantarum*. Soulignons, toutefois, que *E. coli* a un temps de génération de 220 minutes sous nos conditions expérimentales contre 140 minutes pour *L. plantarum* et *S. oneidensis*. Malgré ces différences de croissance, l'environnement anaérobie local au voisinage de la lame est obtenu dans le même temps que *S. oneidensis* pour *E. coli* ( $t_{anaéro} = 2-3$  h), indiquant une consommation du dioxygène plus rapide chez *E. coli*. Au contraire, un temps caractéristique  $t_{anaéro} = 15-18$  h est nécessaire pour *L. plantarum* bien que son temps de dédoublement soit du même ordre que celui de *S. oneidensis* dans nos conditions. Cette vitesse lente de consommation du dioxygène se retrouve dans la littérature [19]. Enfin, un temps caractéristique de réduction de cinquante-cinq minutes est nécessaire pour réduire les 10  $\mu\text{M}$  de fer soluble présent dans le milieu de culture chez *E. coli* ce qui est proche de celui mesuré pour *L. plantarum* égal à une heure. Il correspond à la plus faible activité parmi la division des Firmicutes [20].



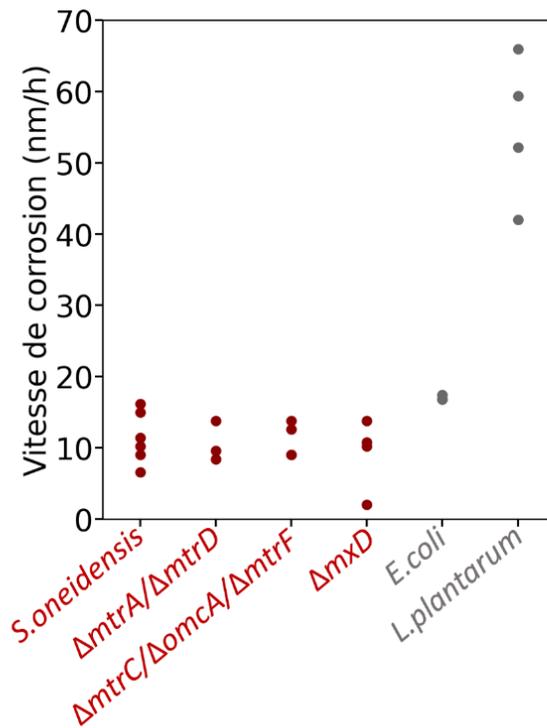
**Figure 4-19 – Influence de différentes bactéries sur la corrosion du nanofilm de fer.** Trois temps caractéristiques, mesurés ou déduits, sont représentés pour *S. oneidensis* et ses trois mutants ( $\Delta mtrA/\Delta mtrD$ ,  $\Delta mtrC/\Delta omcA/\Delta mtrF$  (délétions dans les cytochromes de type-c) et  $\Delta mxD$  (délétion dans la fabrication d'EPS) -  $t_{onset}$ , cercles rouges pleins et histogrammes ;  $t_{anaero}$  and  $t_{reduc}$  cercles verts vides et histogrammes) et deux autres bactéries, *E. coli* et *L. plantarum*

(cercles gris et histogrammes). Les deux temps caractéristiques,  $t_{onset}$  et  $t_{anaero}$ , sont directement mesurés pour l'ensemble des différentes bactéries comme indiqué dans les parties II-2 et III-1. Le dernier temps caractéristique,  $t_{reduc}$  est lui déduit des mesures de cinétique de réduction du Fe(III) soluble en condition anaérobie stricte décrite dans la partie III-5-a. Sachant que le milieu de culture contient environ  $10 \mu\text{M}$  de fer soluble, ce temps  $t_{reduc}$  correspond au temps nécessaire pour réduire  $10 \mu\text{M}$  de fer(III) soluble avec un taux de réduction  $k_{reduc}$ .

Des expériences supplémentaires, menées sur ces deux dernières bactéries, apportent des informations complémentaires. D'une part, l'utilisation du boudin de dialyse avec *E. coli* montre que la corrosion est toujours observée, dans les mêmes valeurs de  $t_{onset}$  même lorsque l'on sépare physiquement les bactéries du nanofilm. Cela suggère que la rupture de passivité peut être médiée par des petites molécules solubles sécrétées. Ce résultat est en accord avec les études menées sur les processus de réduction du fer par *E. coli* qui sont liés aux effets combinés d'enzymes, de molécules navettes d'électrons comme les flavines ou de sous-produits de fermentation [20]. Ces sous-produits de fermentation pourraient, en effet, dissoudre par acidification le Fe(III). Toutefois les mesures de pH présentées sur la Figure 4-11 semblent indiquer un rôle moindre de l'acidification dans le déclenchement de la corrosion puisque celui-ci reste constant autour de 6,37.

Par ailleurs, la dégradation tardive induite par *L. plantarum* apparaît différente des autres puisqu'elle ne dure que quelques minutes. Les mesures du pH (Figure 4-11), réalisées à partir d'un milieu de culture initialement neutre, montre qu'il décroît jusqu'à atteindre une valeur entre 3,5 et 4,5 selon les échantillons. Une dégradation liée à la solubilisation de la couche passive sous forte condition acide anaérobie est donc privilégiée ici (voir le diagramme de Pourbaix, Figure 1-1). L'ajustement de la variation temporelle de l'épaisseur du nanofilm de fer nous donne une vitesse de corrosion en moyenne égale ( $50 \pm 10$ ) nm/h (Figure 4-20), soit cinq fois plus rapide que pour *S. oneidensis*. Une mesure optique effectuée avec un nanofilm de fer immergé dans une solution d'acide chlorhydrique à pH=4,58 donne une vitesse de corrosion égale à ( $54 \pm 6$ ) nm/h ce qui renforce la probabilité d'une corrosion par acidification du milieu.

Pour l'ensemble des autres bactéries, la vitesse de corrosion, mesurée via le montage de mesures optiques, est égale à ( $12 \pm 5$ ) nm/h (Figure 4-20). Cette vitesse est indépendante de la bactérie (*S. oneidensis* MR-1 sauvage ou mutante, *E. coli* sauvage), ce qui est cohérent avec les résultats obtenus par les mesures d'OCP indiquant des valeurs de potentiel (vs Ag/AgCl) similaires dans la phase de corrosion du nanofilm de fer et la corrosion abiotique du fer épais. Le rôle des bactéries ou l'influence de la présence de cytochromes semblent se limiter au déclenchement de la corrosion. Toutefois, une contribution des bactéries lors de la phase de corrosion pourrait être envisageable puisqu'il a récemment été montré que *S. oneidensis* était capable d'utiliser le Fe(0) comme donneur d'électrons dans son mécanisme respiratoire.



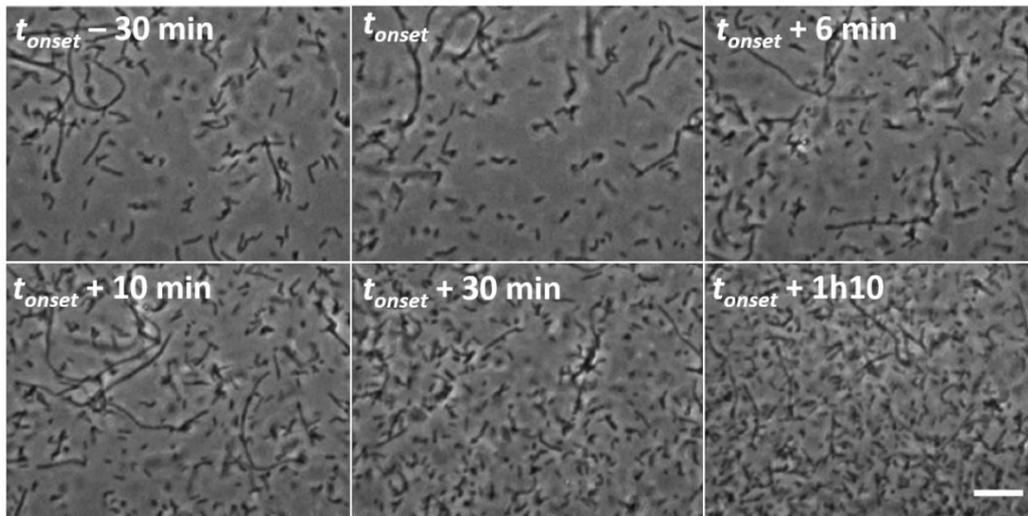
**Figure 4-20 – Vitesse de corrosion du nanofilm de fer pour différentes bactéries.** La vitesse de corrosion de la couche de fer, extraite de la variation temporelle de l'épaisseur de la couche de fer, est ici tracée pour différentes bactéries : *S. oneidensis* et ses trois mutants (cercles rouges pleins), *E. coli* et *L. plantarum* (cercles gris pleins). On constate que cette valeur reste constante et égale à  $(11 \pm 4)$  nm/h en moyenne pour les quatre premières bactéries. Pour *L. plantarum*, la vitesse de corrosion est, elle, égale à  $(55 \pm 9)$  nm/h. Les bactéries sont ici en conditions statiques (sans agitation), dans un milieu riche LB (pH = 6,5) pour *S. oneidensis* et *E. coli* et MRS (pH = 6,5) pour *L. plantarum*, à 23°C et inoculées à une densité optique de 0,03.

#### IV. Observation au microscope optique

Nous avons vu dans la partie précédente l'avantage de travailler avec des lames semi-transparentes permettant de déterminer précisément l'initiation de la corrosion à partir de la variation des valeurs moyennes des niveaux de gris tout en visualisant les bactéries sur la surface. Ces données sont facilement extraites des images enregistrées et ne requièrent aucun traitement d'images particulier. L'accès à une analyse quantitative de la densité ou encore de la dynamique bactérienne nécessite elle davantage de traitement d'images. Dans cette partie, la variation temporelle de la densité surfacique bactérienne avant, pendant et après la corrosion sera présentée et comparée au comportement d'un échantillon de référence associé à une lamelle en verre comme substrat. Par la suite, la vitesse instantanée ainsi que la persistance de localisation des bactéries sur le substrat seront discutées. Le détail du traitement d'images sera explicité au cas par cas.

##### 1. Analyse de la densité surfacique des bactéries en fonction du temps d'incubation

La Figure 4-21 expose les images de la surface enregistrées à des temps d'incubation croissants. Plusieurs informations peuvent être tirées d'une inspection visuelle rapide de ces images. Premièrement, on constate que les bactéries sont distribuées de façon homogène sur la surface de l'échantillon et ce, quel que soit le temps d'incubation. Deuxièmement, aucun amas de biofilm n'apparaît sur les trois premières heures d'incubation. Cette observation reste également vérifiée sur d'autres échantillons inoculés à une densité bactérienne plus faible et donc associés à des temps d'incubation plus longs. En raison du nombre croissant de bactéries sur la surface, nos observations se restreignent en général aux quatre premières heures après inoculation afin de permettre la distinction entre individus et même sur ces longs temps d'incubation, aucun amas de biofilm n'est visible. Ce résultat est confirmé par des observations macroscopiques de croissance bactérienne qui montrent l'apparition d'une pellicule de biofilm juste sous l'interface air-liquide au bout de douze heures d'incubation dans un milieu riche. Sur nos images, les bactéries sont majoritairement présentes sous forme isolée ou en chaînette. La présence de ces chaînes n'est pas systématique sur l'ensemble de nos échantillons. Troisièmement, on observe, juste après le déclenchement de la corrosion, un afflux soudain de bactéries vers la surface marqué par une augmentation de la densité surfacique en bactéries. Afin de quantifier l'ensemble de ces premières constatations, un traitement et une analyse des images sont menés via un programme Python [22].

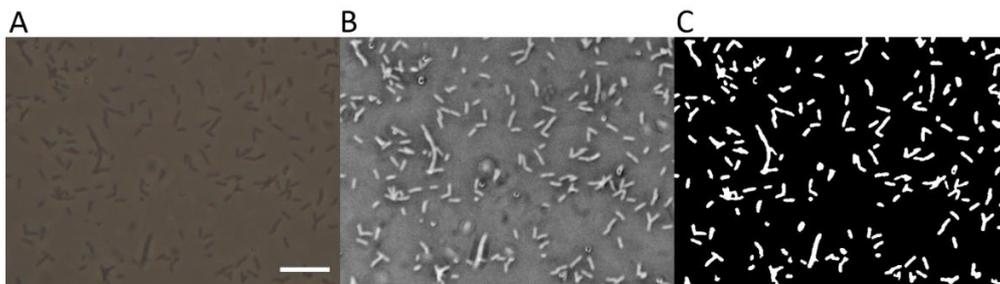


**Figure 4-21 – Visualisation des bactéries à la surface du nanofilm de fer pour différents temps d’incubation.** *Présentation de six images enregistrées sur un même échantillon à des temps d’incubation croissants visualisées au microscope optique inversé en mode contraste de phase. Les temps d’incubation sont indiqués par rapport au temps de déclenchement de la corrosion,  $t_{onset}$ . Ici, la corrosion se déclenche après 1 h 40 d’incubation. L’échelle, donnée sur la dernière image, correspond à 20  $\mu\text{m}$ . Les bactéries sont ici en conditions statiques (sans agitation) dans un milieu riche LB ( $\text{pH} = 6,5$ ) à 23°C et inoculées à une densité optique de 0,07.*

Le programme décrit dans [23] nous a permis d’extraire sans ambiguïté les surfaces couvertes par les bactéries. Ce programme débute par une conversion des images colorées enregistrées au microscope optique inversé en mode contraste de phase en des images en niveaux de gris. Celles-ci sont renormalisées et l’échelle inversée de sorte que les bactéries initialement foncées apparaissent claires. A cause du processus de corrosion, l’intensité moyenne des images varie en fonction du temps d’incubation. Afin de s’affranchir de ces variations, la valeur de chaque pixel d’une image est divisée par la variation maximale d’amplitude observée sur celle-ci. Cela permet alors de garder un contraste constant (facilitant la détection des bactéries) et de pouvoir comparer les séquences d’images entre elles. Les images (A) et (B) de la Figure 4-22 présentent le résultat obtenu. Par la suite, différents filtres sont utilisés. Tout d’abord un filtre médian est appliqué. Il permet de s’affranchir des valeurs aberrantes de pixels, dénotant clairement de la valeur moyenne des niveaux de gris pris sur une bactérie, tout en conservant une luminosité et des contours d’objets nets. Ensuite, un filtrage gaussien est réalisé afin de s’affranchir d’une éventuelle inhomogénéité lumineuse du fond (ce n’est pas le cas sur l’image présentée sur la Figure 4-21.A). Enfin, un dernier filtre est appliqué pour s’affranchir des bruits de fond liés à l’enregistrement de la caméra par exemple. Ce filtre va calculer les dérivées locales et les minimiser ce qui va tendre à rendre légèrement flous les bords des objets contenus sur l’image. L’image est ensuite « segmentée » : les bactéries sont extraites du reste de l’image, grâce à un seuillage automatique reposant sur la méthode d’Otsu (choix de la taille des bactéries en pixel, du seuil de niveaux de gris différenciant les bactéries du fond). Cela nous évite, pour chaque image, d’avoir à extraire le seuil d’intensité séparant les bactéries du bruit à partir de l’histogramme de distribution des intensités. Le seuillage automatique a été contrôlé

en comparant le nombre de bactéries comptées visuellement ("à la main") du nombre de bactéries comptées par le traitement numérique. La taille des objets à chercher a été fixée à 50 pixels sachant qu'une bactérie mesure  $16 \times 7$  pixels<sup>2</sup>. Enfin, une binarisation de l'image a été effectuée : les bactéries sont colorées en blanc et le fond en noir (Figure 4-22.C). Le nombre de pixels blancs est compté sur chaque image donnant ainsi l'aire occupée par les bactéries. En divisant cette aire par la surface totale de l'image (soit  $640 \times 480$ ), nous obtenons la fraction de surface, notée par la suite densité de surface bactérienne.

Si l'on repart de la dernière image binarisée obtenue par le traitement numérique (Figure 4-22.C) et que l'on vient la superposer à l'image initiale (Figure 4-22.A), on constate que toutes les zones blanches se superposent aux bactéries de l'image. L'ensemble des bactéries étant détecté, notre méthode d'analyse est validée. Pour réaliser la superposition, le fond noir de l'image binarisée est converti en fond transparent et les bactéries conservent leur couleur initiale. La première image de la Figure 4-27, annotée 0 s car correspondant à l'instant initial, présente ce résultat.

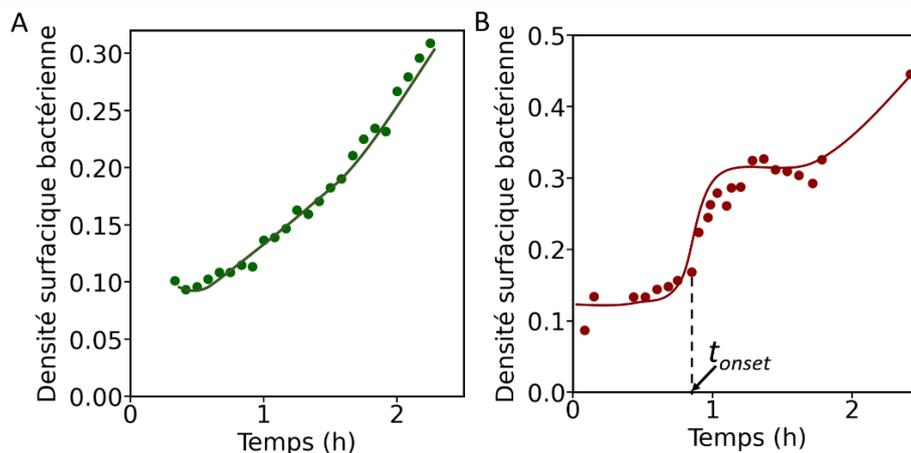


**Figure 4-22 - Détail du traitement d'images utilisé pour extraire la densité surfacique en bactéries.** (A) Image initiale enregistrée au microscope optique inversé en mode contraste de phase. L'échelle correspond à  $20 \mu\text{m}$ . (B) Conversion des images en niveaux de gris et inversion de l'échelle : le blanc devient le noir et réciproquement afin d'augmenter le contraste. (C) Image obtenue après l'application des différents filtres, la segmentation et la binarisation.

La densité de surface bactérienne est calculée et présentée en fonction du temps d'incubation sur la Figure 4-23 pour deux échantillons différents : un échantillon de référence pour lequel les bactéries interagissent avec une lamelle de verre (Figure 4-23.A) et un second échantillon dit "classique" où les bactéries sont au contact du nanofilm de fer (Figure 4-23.B). Pour l'échantillon de référence, au cours des trois heures qui suivent l'inoculation des bactéries, la densité de surface augmente progressivement de 0,1 à 0,3. Notons que la densité surfacique initiale dépend de l'échantillon et peut varier entre 0,05 et 0,15 dans nos conditions d'expériences. Un autre type de variation temporelle de densité a été observé pour d'autres échantillons où la densité reste cette fois quasiment constante au cours du temps (augmentation de l'ordre de 15 %). L'ensemble des observations indiquent que la densité surfacique augmente faiblement malgré une densité volumique croissante en bactéries. Cette faible augmentation suggère que l'«attachement» des bactéries sur la surface, s'il y en a, ou tout du moins leur contact, est réversible et de courte durée. En effet, des bactéries allongées, fermement attachées à la surface et s'y divisant auraient conduit à une augmentation

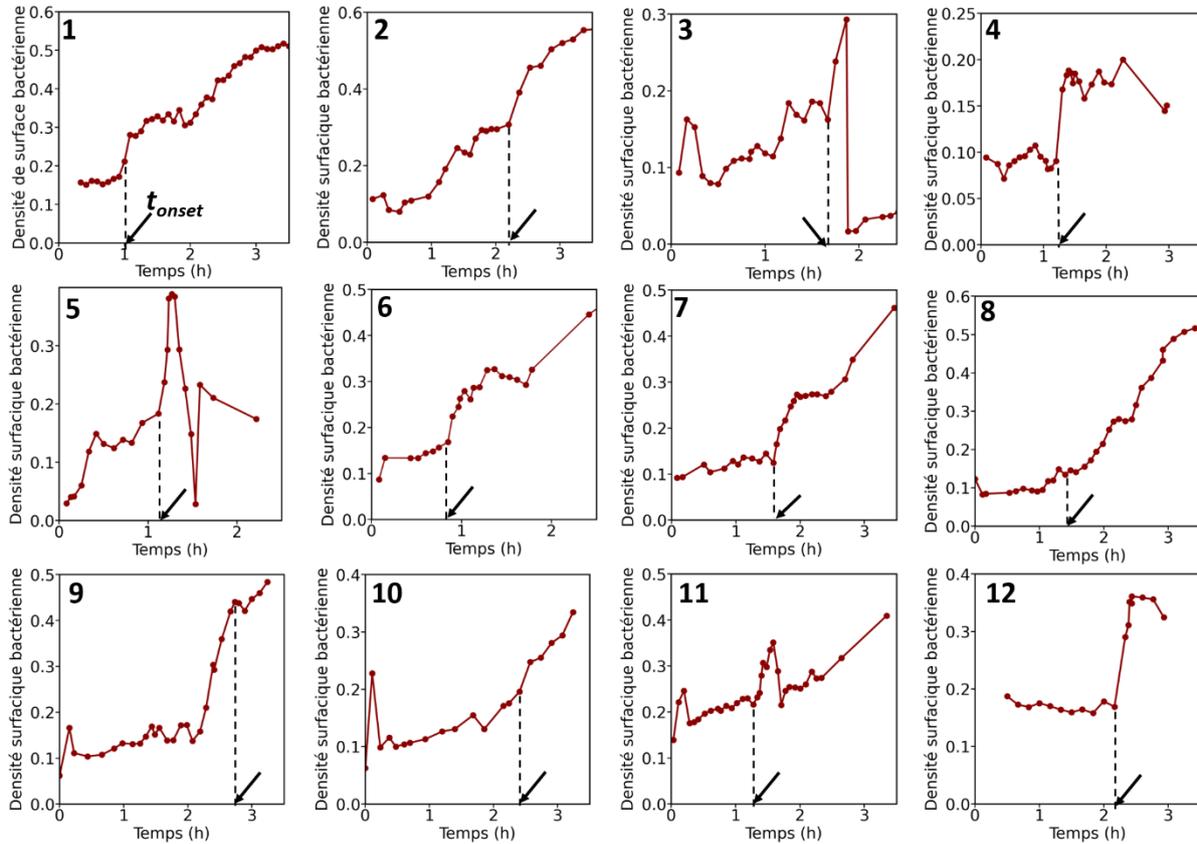
exponentielle de la densité en fonction du temps. L'analyse de ce temps de séjour au voisinage de la surface sera développée dans la sous-partie suivante.

Les résultats obtenus pour le second type d'échantillon, lorsque les bactéries interagissent avec le nanofilm de fer sont présentés sur la Figure 4-23.B pour un échantillon et sur la Figure 4-24 pour l'ensemble des échantillons analysés. Sur la Figure 4-23.B, on retrouve une densité de surface initialement constante autour de la valeur de 0,12, comme pour l'échantillon de référence, mais cette fois, une brusque augmentation de 0,15 à 0,3 apparaît par la suite, sur un intervalle d'une trentaine de minutes. Cette soudaine variation (similaire à une fonction de Heaviside) apparaît juste après le déclenchement de la corrosion indiqué par la flèche noire. Ce temps du déclenchement de la corrosion ( $t_{onset}$ ) est déterminé de façon indépendante à partir de la variation temporelle des valeurs moyennes des niveaux de gris (Figure 4-1). La Figure 4-24 indique que, malgré des allures de courbes différentes, une augmentation de la densité surfacique en bactéries est quasiment systématiquement observée sur l'ensemble de nos échantillons juste après le déclenchement de la corrosion. Cette augmentation marque le soudain afflux de bactéries sur ou au voisinage du nanofilm de fer (profondeur de champ de 20  $\mu\text{m}$ ). Cet afflux de bactéries peut s'expliquer par la solubilisation du nanofilm du fer qui relargue progressivement des ions ferriques ou ferreux au voisinage de la couche mince. Un gradient local de concentration en fer apparaît et est détecté par les bactéries [24] qui se dirigeraient alors vers la région la plus riche en fer afin de le capter pour l'utiliser dans leur processus de respiration anaérobie et, dans une moindre mesure, d'assimilation. Étonnamment, alors que le métal s'amincit progressivement pendant une ou deux heures, l'afflux de bactéries s'arrête au bout de trente minutes. Si l'on suppose le relargage d'un ion par atome de fer contenu dans 10 nm du nanofilm de fer,  $10^6$  atomes de fer seraient relargués au voisinage du nanofilm. Les bactéries interagissant déjà avec un milieu liquide riche en fer, elles n'ont pas spécifiquement besoin de changer leur métabolisme vers une plus grande assimilation de fer pour maintenir l'homéostasie [24,25]. Une augmentation de la densité surfacique de bactéries similaire à celle de l'échantillon de référence est ensuite observée.



**Figure 4-23 – Variation temporelle de la densité surfacique en bactéries.** La densité surfacique bactérienne est ici tracée en fonction du temps pour deux échantillons différents. Les lignes continues ne sont que des guides pour les yeux. (A) Echantillon de référence : les

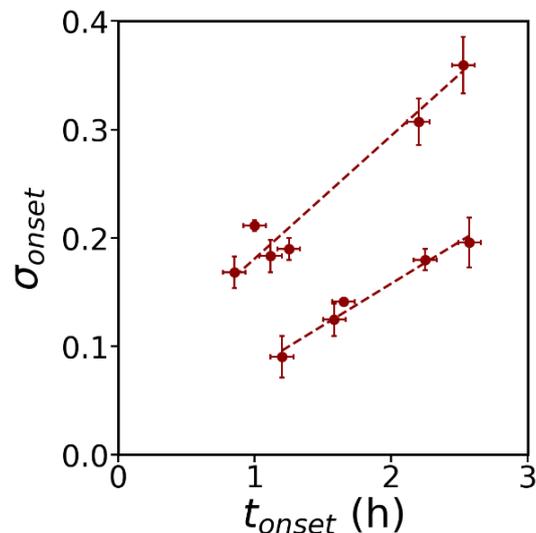
bactéries sont au contact d'une surface en verre (cercles verts pleins). (B) Echantillon classique : les bactéries interagissent avec le nanofilm de fer (cercles rouges pleins). Le temps  $t_{onset}$  du déclenchement de la corrosion, extrait de la variation temporelle de la moyenne des niveaux de gris, est indiqué par une flèche noire.



**Figure 4-24 – Variations temporelles de la densité de surface bactérienne au contact du nanofilm de fer.** La densité de surface en bactéries est mesurée en fonction du temps selon le même traitement numérique qu'indiqué en Figure 4-21. Les résultats sur douze échantillons différents sont présentés. Pour chaque échantillon, le déclenchement de la corrosion  $t_{onset}$ , déterminé par l'analyse des valeurs moyennes de niveaux de gris, est marqué par une flèche noire. Les graphiques 5, 6 et 7 ont été obtenus pour des nanofilms de fer directement évaporés sur du verre (sans sous-couche adhésive de titane). Sur tous les autres échantillons, une pré-couche de titane a été déposée.

Nous avons vu sur les deux figures précédentes que, selon les échantillons, le processus de corrosion peut commencer à des temps  $t_{onset}$  variables (entre 1 h et 2h30) ainsi qu'à des densités de surface très différentes (variant entre 10 et 40 %). La densité de surface mesurée à  $t_{onset}$  est notée par la suite  $\sigma_s^{onset}$ . Tous les points collectés ( $t_{onset}$ ,  $\sigma_s^{onset}$ ) sont présentés sur la Figure 4-25. Les barres d'erreur sur chaque mesure sont de moins de 10 %. On constate que les données sont très dispersées mais qu'elles semblent toutefois former deux groupes distincts où la relation entre  $\sigma_s^{onset}$  et  $t_{onset}$  serait linéaire. En effet, en réalisant un ajustement par une fonction affine sur ces deux groupements de données, on obtient un coefficient de corrélation de l'ordre de 1 et des coefficients directeurs égaux à  $(0,08 \pm 0,01) \text{ h}^{-1}$  et  $(0,11 \pm 0,01) \text{ h}^{-1}$

indiquant que ces deux droites sont quasiment parallèles entre elles. Cette observation est étonnante et difficile à interpréter. Contrairement aux mesures volumiques (Figure 4-12) où une certaine valeur de densité optique devait être atteinte pour enclencher la corrosion, il n'y a pas ici de valeur donnée de densité de surface critique à atteindre pour enclencher le processus de corrosion. La nécessité du contact direct entre les bactéries et le nanofilm de fer (Figure 4-13.A) pourrait expliquer cette relation entre densité de surface bactérienne et temps de déclenchement de la corrosion. Davantage d'échantillons doivent être réalisés afin d'obtenir une meilleure statistique et distinguer une possible corrélation.



**Figure 4-25 – Densité surfacique bactérienne à l’instant  $t = t_{onset}$  en fonction du temps de déclenchement de la corrosion  $t_{onset}$ .** Deux groupes de données semblent apparaître suivant chacun une variation linéaire. Les deux lignes rouges pointillées correspondent aux meilleurs ajustements des données par une fonction affine. Les pentes extraites ( $(0,08 \pm 0,01) h^{-1}$  et  $(0,11 \pm 0,01) h^{-1}$ ) indiquent une variation linéaire parallèle des deux groupements.

Sur les séquences de 50 images que nous avons pu enregistrer à différents temps d’incubation, nous avons observé un comportement surprenant des bactéries. Juste après le déclenchement de la corrosion, lorsque les bactéries affluent au voisinage du nanofilm, on constate que leurs déplacements sont très rapides proche de la surface. Afin de quantifier cette observation, les bactéries ont été repérées et leurs déplacements suivis pour extraire leur trajectoire et ainsi calculer leur vitesse instantanée. La suite de cette partie est ainsi consacrée à la description de la dynamique des bactéries avant, pendant et après le processus de corrosion.

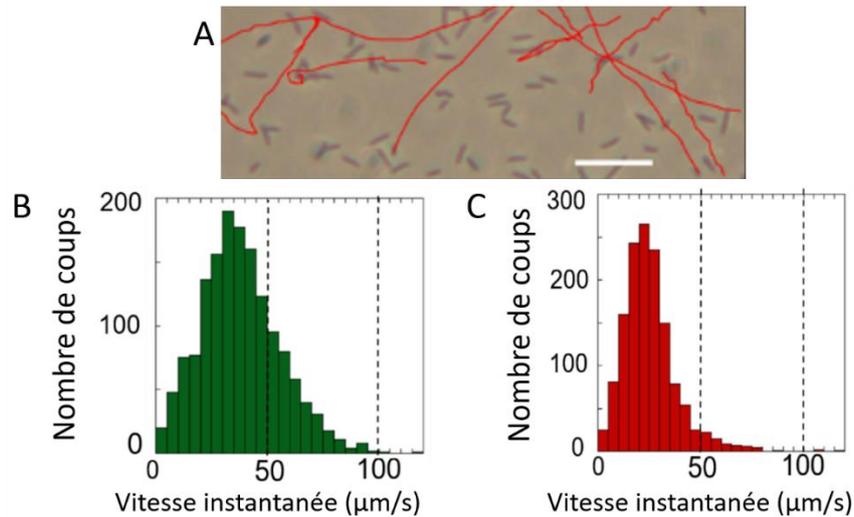
## 2. Analyse de la dynamique des bactéries

### a. Vitesse de déplacement des bactéries sur ou au voisinage de la surface

Sur l’ensemble des séquences d’images enregistrées (non montré ici), des mouvements locaux et rapides des bactéries sur ou au voisinage de la surface du nanofilm de fer (profondeur de champ de  $20 \mu m$ ) étaient observés juste après le déclenchement de la corrosion. Afin de quantifier cette observation, la position des bactéries est repérée sur chaque image. Chacun des points est ensuite relié pour retracer leur trajectoire (lignes rouges continues sur la Figure

4-26.A). Connaissant leurs positions à chaque instant, leurs vitesses instantanées peuvent alors être calculées par dérivée numérique [26]. Les résultats sont présentés sur la Figure 4-26 pour deux échantillons différents. La Figure 4-26.B concerne un échantillon de référence où les bactéries sont fraîchement inoculées dans un milieu riche en oxygène à partir d'une culture sous agitation dans l'incubateur-shaker. Le substrat est ici une lamelle de verre. On observe une distribution des vitesses instantanées centrées sur la valeur moyenne de  $(38 \pm 18) \mu\text{m/s}$ . Dans ce cas de figure, les bactéries (ou leur projection sur la surface pour celles qui sont au voisinage) se déplacent sur de grandes distances en ligne droite, sans changement de direction (runs). La Figure 4-26.C correspond, elle, à des bactéries au contact du nanofilm de fer juste après le déclenchement de la corrosion. La vitesse moyenne ici mesurée est égale à  $(25 \pm 13) \mu\text{m/s}$ . Ces deux valeurs sont en accord avec des vitesses rapportées dans la littérature [23, 27,28]. Comme très peu de bactéries nagent au voisinage de la surface avant le déclenchement de la corrosion, le peu de statistique ne nous permet pas de déterminer précisément la vitesse de nage lors de la phase d'initiation.

Les mouvements rapides des bactéries observés lors du relargage d'ions ferriques/ferreux au voisinage de la surface – issus de la dissolution de la couche fer - sont comparables (bien qu'un peu plus lents) à ceux observés en milieu fortement oxygéné. La faible différence s'explique par les contraintes environnementales présentes sur l'échantillon 2 où la densité de bactéries est tellement importante que les bactéries vont rapidement se heurter les unes aux autres et donc ralentir. Cette observation est vérifiée sur l'ensemble des échantillons quelle que soit la valeur de  $\sigma_{onset}^s$ . Ce comportement semblable des bactéries en milieu fortement oxygéné ou en présence du relargage d'ions ferriques/ferreux en environnement anaérobie pourrait sous-entendre une influence équivalente sur le métabolisme bactérien des ions ferriques/ferreux en anaérobie et de l'oxygène en aérobie pour *S. oneidensis*. On peut noter que l'on retrouve une réponse de motilité similaire de *S. oneidensis* dans un environnement anaérobie, appelé « electrokinesis » ou « congregation », durant la dissolution de particules de  $\text{MnO}_2$  [23, 28]. Dans cette étude, les mouvements rapides sont localisés à proximité des particules solides qui se dissolvent comme dans notre cas. Les séquences d'images indiquant un mouvement flagellaire des bactéries, on peut également relier cette observation à une réponse chimiotactique des bactéries face au relargage d'ions ferrique/ferreux.



**Figure 4-26 – Comparaison de vitesses instantanées des bactéries dans un milieu fraîchement oxygéné et juste après le déclenchement de la corrosion.** (A) Image brute obtenue au microscope optique inversé des bactéries sur une surface en verre. L'échelle correspond à 20  $\mu\text{m}$ . Le suivi des bactéries entre chaque image d'une séquence (40 ms entre chaque image environ) permet de tracer les trajectoires des bactéries sur l'ensemble de la séquence (courbes rouges sur l'image). Les histogrammes des vitesses instantanées des bactéries sont représentés pour deux échantillons : (B) Echantillon de référence (barres vertes) : les bactéries sont prélevées de l'incubateur shaker puis diluées dans un milieu fraîchement oxygéné et mises au contact d'une lamelle de verre. De longs déplacements sont alors observés avec une vitesse moyenne de  $(38 \pm 18) \mu\text{m/s}$ ; (C) Echantillon classique (barres rouges) : les vitesses sont mesurées sur des échantillons de bactéries au contact du nanofilm de fer juste après le déclenchement de la corrosion. Les mouvements des bactéries sont alors rapides et de courts déplacements sont observés avec une vitesse moyenne de  $(25 \pm 13) \mu\text{m/s}$ . Les bactéries sont ici en conditions statiques (sans agitation) dans un milieu riche LB (pH = 6,5) à 23°C et inoculées à une densité optique de 0,07.

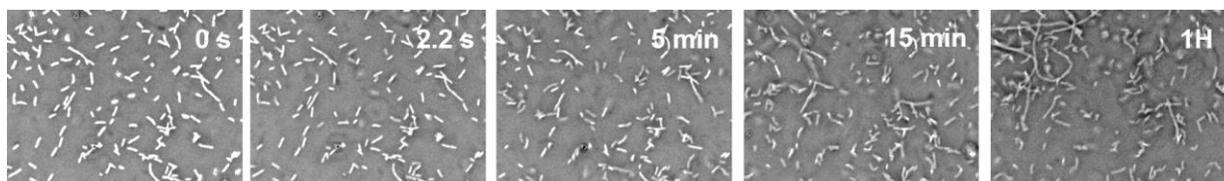
b. Régénération rapide des bactéries au contact de la couche de fer

Dans cette partie, nous allons nous intéresser à la mobilité des bactéries sur ou au voisinage de la surface du substrat. Pour cela, nous allons repartir des images binarisées présentées sur la Figure 4-21 et chercher des méthodes pour quantifier à quel point les bactéries persistent, sans mouvement, sur la surface ou au contraire, comment la population surfacique se régénère, en particulier au cours de la phase d'initiation du processus de corrosion. Nous appellerons bactéries sessiles, les bactéries vivantes immobiles (sans mouvement).

La méthode que nous avons choisie d'adopter repose sur la définition d'une fonction appelée fonction de localisation ayant pour variable le temps. Cette fonction varie entre 0 et 1. Elle prend la valeur de 0 lorsque la totalité des sites précédemment occupés est complètement abandonnée, et la valeur de 1 si la totalité des sites reste occupée (aucun déplacement). Elle repose sur l'analyse d'images détaillée sur la Figure 4-27. L'idée est de partir de l'image de

droite (annotée 0 s) enregistrée à l'instant initial  $t = 0$  et de comparer le niveau de gris de chaque pixel d'une image à l'autre de la séquence (50 images enregistrées sur 2,2 secondes). Lorsque le niveau de gris d'un pixel change entre deux images (dû au mouvement des bactéries) son niveau de gris prend alors la valeur du niveau de gris du fond. En comparant les valeurs des pixels d'une image à l'autre dans la séquence et en réajustant successivement leur niveau, l'image résultante (seconde image de la Figure 4-27 annotée 2.2 secondes) contient seulement les pixels blancs où aucun déplacement n'a été détecté sur l'ensemble de la séquence ; le reste des pixels est considéré comme un fond transparent. Ainsi, il est possible de déterminer la surface restant occupée par une bactérie, ou par une partie de la bactérie, sur une certaine période de temps. Une analyse similaire a été réalisée en comparant cette fois l'image initiale (annotée 0 s) à trois autres images enregistrées 5, 15 et 60 minutes après l'instant initial. Ces quatre images ont été enregistrées successivement sur le même échantillon.

On remarque que les surfaces blanchies, occupées par les bactéries, disparaissent progressivement au fur à mesure de l'allongement du temps d'incubation. D'autres bactéries (non blanchies puisque nouvelles) arrivent et régénèrent la population bactérienne en surface. Ces dernières sont visibles mais plus faiblement contrastées. Au bout d'une heure, l'ensemble de la population surfacique est régénéré : plus aucune aire blanche n'est observée. On constate que les bactéries localisées sur ou proche de la surface métallique ne sont pas attachées suffisamment fort au métal pour rester localisées sur le même site tout au long de la phase d'initiation de la corrosion, d'une durée d'une heure dans les conditions expérimentales choisies ici (inoculation à une densité optique de 0,07). Toutefois, la densité de surface restant constante ou augmentant légèrement durant la phase d'initiation (Figure 4-22), de nombreuses nouvelles bactéries arrivent sans cesse pour recoloniser la surface.



**Figure 4-27 - Visualisation des bactéries (ou d'une partie de leur surface) restant immobiles au cours du temps.** La première image (image de droite) est enregistrée à l'instant initial, noté  $t = 0$  s. Elle est obtenue par le traitement numérique détaillé en Figure 4-21 mais, cette fois, l'image binarisée finale est superposée à l'image initiale en convertissant le fond noir de l'image binarisée en fond transparent. La seconde image est la dernière de la séquence des 50 images enregistrées sur 2,2 secondes. Ici seuls les sites restés occupés par une bactérie (ou une partie de la bactérie) au cours de 2,2 secondes de la séquence apparaissent en blanc. Les trois images suivantes correspondent à des temps d'incubation croissants.

La fonction de localisation quantifie ces variations d'aires blanchies en calculant, pour chaque image de la séquence, la fraction entre aires blanchies sur l'image analysée par rapport aux aires blanchies sur l'image initiale. Cette fonction est semblable à une fonction de corrélation puisqu'elle décrit l'évolution de la localisation des bactéries à différents temps d'observations. On retrouve bien que : si la totalité des sites précédemment occupée est complètement abandonnée alors cette fonction est nulle et si la totalité des sites reste occupée (aucun

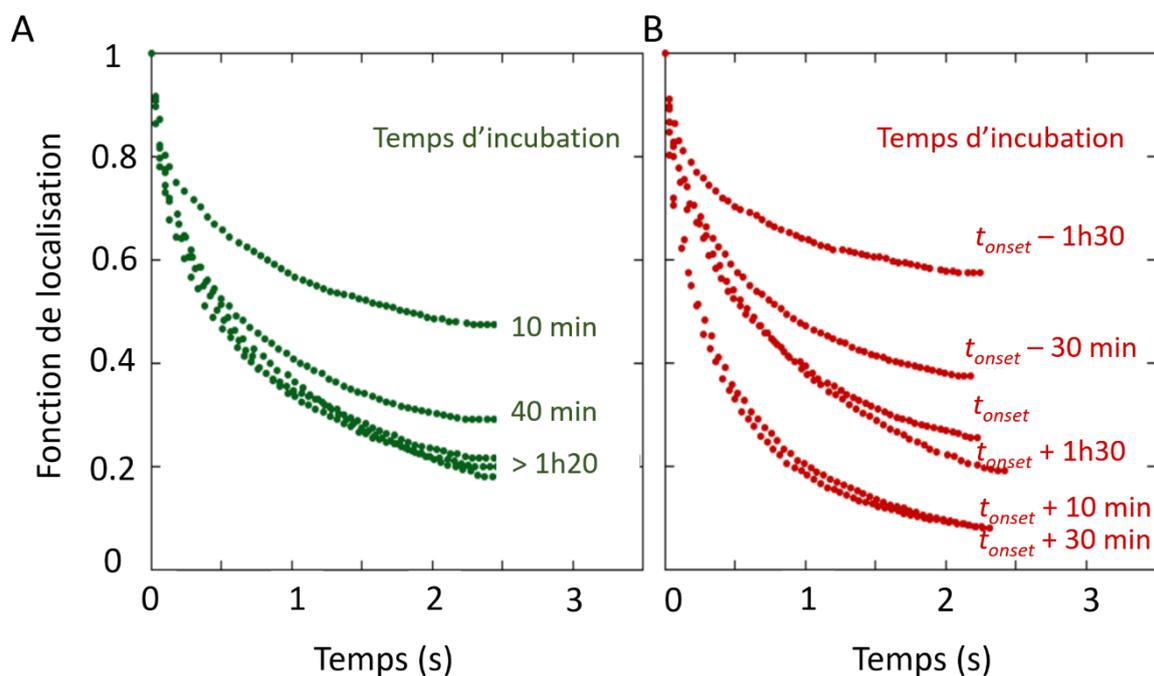
déplacement) alors elle est égale à 1. Deux processus peuvent contribuer à la décroissance de cette fonction : 1) un amincissement progressif de l'aire des sites occupés induit, par exemple, par les petits déplacements autour de leur position d'équilibre à cause de l'agitation thermique, 2) des extinctions soudaines sur des surfaces importantes dues aux détachements des bactéries ou d'importantes réorientations (rotation de 90° autour de leur axe). La variation temporelle de cette fonction est présentée pour deux échantillons différents sur la Figure 4-28.

Commençons par l'échantillon de référence (cercles verts pleins). Ici les bactéries sont au contact d'une lamelle de verre. Chaque courbe correspond à l'analyse des 50 images enregistrées sur 2,2 secondes à un temps d'incubation donné, indiqué sur le côté droit du graphique. La courbe la plus haute décrit le comportement des bactéries, au voisinage de la lamelle de verre, 10 minutes après l'inoculation. Mathématiquement, cette courbe peut être décrite par des sommes de fonctions exponentielles décroissantes associées à des temps caractéristiques différents. Tout d'abord, une première décroissance rapide de 1 à 0,8 est mesurée en 150 ms. Elle est suivie d'une décroissance plus lente de 0,8 à 0,5 sur les deux secondes suivantes. En examinant visuellement les mouvements des bactéries sur les images de la séquence, on a pu remarquer que la première décroissance est due aux runs rapides des bactéries nageant dans le liquide au voisinage de la surface en verre (profondeur de champ de 20  $\mu\text{m}$ ). Une fraction de 20 % des bactéries peut donc être considérée comme nageant. On en déduit donc que la seconde partie des courbes est, elle, associée à des bactéries non-nageantes et davantage immobiles. Comparée à un temps d'incubation de 30 min ou 1 h 20 où la valeur finale atteint respectivement 0,3 et 0,2, la valeur finale de 0,5, mesurée pour le temps d'incubation de 10 min, indique que les premières bactéries restent localisées et sans mouvement sur de longues périodes de temps. Après 1 h 20 d'incubation, les courbes se superposent les unes aux autres indiquant une dynamique semblable. Il devient alors difficile de séparer la contribution de chacun des types de mouvements au ratio. Pour les très grands temps d'incubation (supérieurs à 3 h), la concentration en bactéries augmente et elles suivent alors davantage un mouvement d'agitation thermique.

Intéressons-nous maintenant au second échantillon (cercles rouges pleins) associé au comportement des bactéries en contact ou au voisinage d'une couche de fer de l'initiation à la fin de la corrosion. Ici, les différents temps d'incubation sont indiqués par rapport au temps  $t_{onset}$  d'initiation de la corrosion. Au cours de la phase d'initiation (temps négatif), les courbes sont très similaires aux courbes précédemment enregistrées pour des échantillons sans métal. De même, plus d'une heure après le déclenchement de la corrosion, les courbes convergent vers cette courbe unique précédemment mesurée pour des temps d'incubation supérieurs à 1 h 20 (Figure 4-28.A). Aucune différence d'interaction ou d'affinité spécifique avec le substrat en fer n'est donc observée sur nos échantillons. Les seules distinctions clairement observées concernent les premières minutes après l'initiation de la corrosion ( $t_{onset} + 10$  min et  $t_{onset} + 30$  min). La fonction décroît rapidement puisqu'elle passe de 1 à 0,2 en une seconde avant de tendre vers 0,1 sur les 1,2 secondes restantes. La délocalisation des bactéries est donc quasiment immédiate et totale : les bactéries sont particulièrement actives et suivent des

mouvements locaux rapides (Figure 4-26.C). Un renouveau presque complet de la population bactérienne est donc observé juste après le déclenchement de la corrosion.

La dynamique et l'évolution de la densité de surface similaires des bactéries en interaction avec le fer, avant et après la corrosion, ou en interaction avec le verre pourraient s'expliquer par la présence d'une densité de charge surfacique négative sur ces deux substrats dans nos conditions. La membrane des bactéries étant également chargée négativement, elles ne seront pas nécessairement plus attirées par l'une de ces surfaces (verre ou fer). En effet, les densités de charges surfaciques sont de l'ordre de  $-2.10^3 \text{ e}/\mu\text{m}^2$  pour le verre [29],  $-4.10^4 \text{ e}/\mu\text{m}^2$  pour la couche externe de fer [30] et  $-5.10^6 \text{ e}/\mu\text{m}^2$  pour les bactéries [31] conduisant à un écrantage des charges obtenu par la théorie DLVO similaire et donc à des interactions du même ordre de grandeur.



**Figure 4-28 – Analyse quantitative de l’immobilité des bactéries basée sur l’étude d’une fonction de localisation.** La fonction de localisation (similaire à une fonction de corrélation) prend la valeur de 1 si la totalité des sites reste occupé (aucun déplacement) et de 0 si la totalité des sites est complètement abandonnée. Les deux graphiques présentent la variation de la fonction de localisation sur 2,2 secondes pour les deux échantillons habituels : (A) Echantillon de référence où les bactéries sont au contact d’une lamelle de verre (cercles verts pleins), (B) Echantillon où les bactéries sont en contact avec le nanofilm de fer (cercles rouges pleins). Chaque courbe correspond à l’analyse des 50 images enregistrées sur 2,2 secondes à un temps d’incubation donné, indiqué sur le côté droit du graphique.

## V. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré que l'utilisation de nanofilms de fer semi-transparentes était particulièrement intéressante et prometteuse pour suivre le processus de biocorrosion du fer in-situ en milieu aérobie dans sa globalité. La stabilité du nanofilm permet notamment de déterminer sans ambiguïté le déclenchement de la corrosion ( $t_{onset}$ ). L'une des observations les plus surprenantes reste la rupture soudaine du film passif induite par la présence de bactéries suivie d'une dégradation homogène et uniforme du fer. Trois phases distinctes composent donc le processus de biocorrosion : initiation, corrosion et post-corrosion. Au cours de la phase d'initiation, il a été démontré que les bactéries, initialement dans un milieu statique aérobie, consomment le dioxygène dissous dans le milieu liquide et créent ainsi un gradient de concentration en dioxygène dont la concentration sera nulle au voisinage du nanofilm de fer. Selon la densité initiale en bactéries, le temps nécessaire pour atteindre cet environnement anaérobie local est plus ou moins grand et retarde donc d'autant le changement de métabolisme des bactéries vers une respiration anaérobie des oxydes de fer (et dans une bien moindre mesure, vers une assimilation des ions ferreux/ferriques) composant la nanocouche protectrice présente sur le nanofilm de Fe(0). Cette interaction des bactéries avec la couche d'oxydes finit par induire sa rupture. Le Fe(0) est alors au contact du milieu liquide aqueux induisant sa dissolution progressive selon les réactions de corrosion chimique. L'ajout de fer soluble dans le milieu liquide retarde le déclenchement de la corrosion et suggère donc une compétition entre le fer soluble plus facilement disponible et le fer oxydé solide plus difficilement accessible. Toutefois, les bactéries n'ont pas à consommer la totalité des ions ferriques/ferreux contenus dans le milieu avant de déclencher le processus de corrosion.

L'analyse des images obtenues par microscopie ne révèle aucun comportement bactérien apparent préfigurant le déclenchement de la corrosion : pas d'activité bactérienne particulière (formation précoce de biofilm par exemple), pas d'affinités spécifiques des bactéries pour le nanofilm de fer et pas de persistance de localisation des bactéries à la surface du métal sur toute la durée de la phase d'initiation. Bien que la population surfacique de bactéries se régénère continuellement, certaines cellules pourraient rester suffisamment longtemps au contact du nanofilm de fer pour détecter la présence de la surface (peut-être grâce à MTP [23]) et lui transférer des électrons. Par ailleurs, de tels contacts et transferts sont probablement trop courts ou répartis de façon suffisamment homogène sur l'ensemble de la surface pour ne pas modifier localement la couche supérieure d'oxyde et générer des gradients du potentiel électrique à l'origine de piqûres. Toutefois, les observations microscopiques permettent de mettre en évidence la réponse chimiotactique des bactéries face à la dissolution du nanofilm de fer. Elle est quantifiée par le soudain afflux de bactéries au voisinage du nanofilm (observée sur la plupart des échantillons) associé à des mouvements rapides au cours des trente premières minutes suivant le déclenchement de la corrosion. Ces mouvements actifs, possiblement flagellaires, rejoignent ceux observés par Lovley et al [32] sur *Geobacter* en direction de Fe(II) ou Mn(II). Une fois la corrosion des dernières nanocouches de fer enclenchée, les bactéries reprennent un comportement similaire à celui observé sans métal.

Les mesures d'intensité électrique et de potentiel en circuit ouvert alertent sur la modification électrochimique du nanofilm. En effet, une pré-phase de transfert d'électrons au métal et une pré-augmentation (en valeur absolue) des valeurs de potentiel en circuit ouvert sont mesurées. Malgré la faible conductivité de la couche d'oxyde [33,34], des transferts de charges peuvent avoir lieu en son sein. Des modifications de structure ou de composition de l'interface liquide-oxyde pourraient donc influencer la valeur du potentiel dans la sous-couche de Fe(0) et induire sa dissolution.

L'absence de corrosion lors des mesures dans la cellule bi-compartmentée semble souligner l'importance des contacts directs de *S. oneidensis* avec la couche d'oxyde insoluble lors de la phase d'initiation même si la sécrétion parallèle de molécules navettes n'est pas exclue. Le rôle de ce contact direct peut être relié à la formation d'appendices ou d'excroissances membranaires conducteurs, sur lesquels des cytochromes de type-c sont présents, permettant le transfert extracellulaire d'électrons lorsque les cellules sont dans un environnement anaérobie. [35]. Lors de la respiration cellulaire anaérobie, le transfert externe des électrons impliquant la voie Mtr est activé et les bactéries transfèrent leurs électrons à la nanocouche d'oxyde située à l'extérieur de leur cellule par contact direct [36]. Cette voie est la plus efficace pour l'EET. Les expériences complémentaires menées sur les mutants délétés dans les cytochromes de la membrane externe confirment l'importance de cette voie dans l'interaction avec la nanocouche d'oxyde de fer. En effet, ces derniers parviennent à déclencher le processus de corrosion mais sur une échelle de temps quatre fois plus longue. La possibilité de déclencher le processus de corrosion (malgré l'absence de MtrA/D ou MtrF/C) serait probablement liée à la forte redondance fonctionnelle due à la présence des 42 gènes codant pour les cytochromes de type c dans le génome de *S. oneidensis* [37]. Une récente étude suggère que les cytochromes périplasmiques seraient bien plus diversifiés et flexibles que précédemment observé [38]. Les expériences réalisées sur *E. coli* and *L. plantarum*, nos deux témoins initiaux, montrent que ces deux bactéries sont capables d'induire la transition vers la corrosion des nanofilms de fer. Elles sont certes moins rapides que *S. oneidensis* mais cette observation rappelle que la transformation et la dissolution du fer environnant est une propriété remarquable partagée par un grand nombre d'espèces bactériennes [39,40].

Contrairement aux études réalisées sur les feuilles massives de fer pendant plusieurs jours, mois voire années, la corrosion des nanofilms débute ici après seulement quelques heures d'incubation. Comme aucun biofilm n'a eu le temps de se former sur la surface, aucune hétérogénéité n'apparaît et l'environnement physique et chimique homogène sur l'ensemble de la surface du nanofilm conduit à sa corrosion homogène et uniforme. Inversement, sous d'autres conditions expérimentales favorisant par exemple la sécrétion de matrice et donc la formation de biofilm ou l'apparition d'hétérogénéités à la surface du nanofilm, les premières étapes de piqûre pourraient être analysées.

La corrosion, comme tout processus de transformation de la matière, commence par des interactions entre sa surface et le milieu environnant. L'utilisation de nanocouches combinée à des montages de mesures optiques et électriques, du macroscopique au microscopique permet d'avoir accès à de nombreuses informations sur les premières étapes de ces

interactions. L'observation in-situ des bactéries au travers d'une épaisseur nanométrique d'un matériau d'intérêt pourrait donc offrir de nouvelles possibilités quant à la compréhension des actions bactériennes au sein d'autres processus tels que la biodégradation de plastique ou la bioremédiation de polluants solides.

## Références :

- [1] W. P. Iverson, *Microbial corrosion of metals*. Adv. Appl. Microbiol. **32**, 1-36 (1987)
- [2] J. F. D. Stott, *What progress in the understanding of microbially induced corrosion has been made in the last 25 years? A personal viewpoint*. Corros. Sci. **35**, 1-4, 667-673 (1993)
- [3] B. J. Little, D. J. Blackwood, J. Hinks, F. M. Lauro, E. Marsili, A. Okamoto, S. A. Rice, S. A. Wade, H.-C. Flemming, *Microbially influenced corrosion – Any progress?* Corros. Sci. **170**, 108641 (2020)
- [4] R. E. Melchers, T. Wells, *Models for the anaerobic phases of marine immersion corrosion*. Corros. Sci. **48**, 1791-1811 (2006)
- [5] A. Marciales, Y. Peralta, T. Haile, T. Crosby, J. Wolodko, *Mechanistic microbiologically influenced corrosion modeling- a review*. Corros. Sci. **146**, 99-111 (2019)
- [6] Y. Wang, G. Cheng, Y. Li, *Observation of the pitting corrosion and uniform corrosion for X80 steel in 3.5% NaCl solutions using in-situ and 3D measuring microscope*. Corr. Sci. **111**, 508-517 (2016)
- [7] G.T. Burstein, C. Liu, R.M. Souto, S.P. Vines, *Origins of pitting corrosion*. Corros. Eng. Sci. Technol. **1**, 39 (2004)
- [8] D. Féron, D. Crusset, *Microbial induced corrosion in French concept of nuclear waste underground disposal*. Corros. Eng. Sci. and Techn. **49**, 540-547 (2014)
- [9] E. Gnaiger, *O2k quality control 1: polarographic oxygen sensors and accuracy of calibration*, Mitochondrial Physiology Network, **6**, 1-20 (2020)
- [10] M. Ardré, *Dynamique de formation des biofilms de Bacillus subtilis à l'interface eau-air : expériences et modélisation*. PhD thesis. Université Paris Sud - Paris XI, France (2014)
- [11] S. Klumpp, Z. Zhang, T. Hwa, *Growth rate-dependent global effects on gene expression in bacteria*. Cell. **139**, 1366-1375. (2009).
- [12] H. Bremer, P. P. Dennis, *Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate*. Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology, **2**, 1553-69 (1996)
- [13] B.W. Peterson, P.K. Sharma, H.C. Van der Mei *et al.* *Bacterial cell surface damage due to centrifugal compaction*. Applied and environmental microbiology, **78**, 120-125 (2012)
- [14] D. Coursolle, J. A. Gralnick, *Modularity of the Mtr respiratory pathway of Shewanella oneidensis strain MR-1*. Mol. Microbiol. **77**, 995-1008 (2010)
- [15] J. Yuan, Y. Chen, G. Zhou, H. Chen, H. Gao, *Investigation of roles of divalent cations in Shewanella oneidensis pellicle formation reveals unique impacts of insoluble iron*. Biochim. Biophys. Acta, **1830**, 5248-5257 (2013)

- [16] H. Abdul-Tehrani, A. J. Hudson, Y.-S. Chang, A. R. Timms, C. Hawkins, J. M. Williams, P. M. Harrison, J. R. Guest, S. C. Andrews, *Ferritin mutants of Escherichia coli are iron deficient and growth impaired, and fur mutants are iron deficient. J Bacteriol.* **181**, 1415–1428 (1999)
- [17] N. J. Kotloski, J. A. Gralnick, *Flavin electron shuttles dominate extracellular electron transfer by Shewanella oneidensis. mBio,* **4** (2013)
- [18] R. A. Bouhenni, G. J. Vora, J. C. Biffinger *et al.*, *The role of Shewanella oneidensis MR-1 outer surface structures in extracellular electron transfer. Electroanalysis* **22**, 856-864 (2010)
- [19] M. Gregory, I. Fridovich, *Oxygen metabolism in Lactobacillus plantarum, J. Bacteriol.* **117**, 166 (1974)
- [20] S. H. Light, L. Su, R. Rivera-Lugo *et al.*, *A flavin-based extracellular electron transfer mechanism in diverse Gram-positive bacteria. Nature,* **562**, 140-144 (2018).
- [21] J. B. McKinlay, J. G. Zeikus, *Extracellular iron reduction is mediated in part by neutral red and hydrogenase in Escherichia coli. Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3467 (2004)
- [22] S. Van-der-Walt, J. L. Schönberger, J. Nunez-Iglesias, F. Boulogne, J. D. Warner, N. Yager, E. Gouillart, T. Yu *et al.*, *Scikit-image: Image processing in Python. PeerJ.* **2**, e453 (2014)
- [23] J. Bois, G. Chure.  
[http://justinbois.github.io/bootcamp/2016/lessons/l39\\_segmentation.html](http://justinbois.github.io/bootcamp/2016/lessons/l39_segmentation.html)
- [24] H. W. Harris, I. Sanchez-Andrea, J. S. McLean, E. C. Salas, W. Tran, M. Y. El-Naggar, K. H. Nealson, *Redox sensing within the genus Shewanella. Front. Microbiol.* **8**, 2568 (2018)
- [25] Z. Dong, S. Guo, H. Fu, H. Gao, *Investigation of a spontaneous mutant reveals novel features of iron uptake in Shewanella oneidensis. Sci. Rep.* **7**, 1-12 (2017)
- [26] J. C. Crocker, D. G. Grier, *Methods of Digital Video Microscopy for Colloidal Studies. J. Colloid Interf. Sci.* **179**, 298–310 (1996)
- [27] J. Li, M. F. Romine, M. J. Ward, *Identification and analysis of a highly conserved chemotaxis gene cluster in Shewanella species. FEMS Microbiol. Lett.* **273**, 180-186 (2007)
- [28] H. W. Harris, M. Y. El-Naggar, O. Bretschger, M. J. Ward, M. F. Romine, A. Y. Obraztsova, K. H. Nealson, *Electrokinesis is a microbial behavior that requires extracellular electron transport. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **107**, 326-331 (2010)
- [29] S. H. Behrens, D. G. Grier, *The charge of glass and silica surfaces. J. Chem. Phys.* **115**, 6716-6721 (2001)
- [30] M. D. Boamah, E. H. Lozier, J. Kim, P. E. Ohno, C. E. Walker, T. F. Miller, F. M. Geiger, *Energy conversion via metal nanolayers. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **116**, 16210-16215 (2019)
- [31] M. J. Wilhelm, M. S Gh, T. Wu, Y. Li, C. M. Chang, J. Ma, H.L. Dai, *Determination of Bacterial Surface Charge Density Via Saturation of Adsorbed Ions. Biophysical Journal* (2021)

- [32] S.E. Childers, S. Ciuffo, D.R. Lovley, *Geobacter metallireducens* accesses insoluble Fe (III) oxide by chemotaxis. *Nature* **416**, 767-769 (2002)
- [33] S. V. Yanina, K. M. Rosso, *Linked reactivity at mineral-water interfaces through bulk crystal conduction*. *Science* **320**, 218 (2008)
- [34] J. E. Katz, X. Zhang, K. Attenkofer *et al.*, *Electron small polarons and their mobility in iron (oxyhydr)oxide nanoparticles*. *Science* **337**, 1200 (2012)
- [35] S. Pirbadian S. E. Barchinger, K. M. Leung *et al.*, *Shewanella oneidensis MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 12883-12888 (2014)
- [36] M. Breuer, K. M. Rosso, J. Blumberger, *Electron flow in multiheme bacterial cytochromes is a balancing act between heme electronic interaction and redox potentials*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 611-616 (2014)
- [37] T. E. Meyer, A. I. Tsapin, I. Vandenberghe, L. de Smet, D. Frishman, K. H. Nealson, M. A. Cusanovich, J. J. van Beeumen, *Identification of 42 possible cytochrome C genes in the Shewanella oneidensis genome and characterization of six soluble cytochromes*. **8**, 57-77 (2004)
- [38] D. Ding, M. Wu, Y. Liu, *Genome-scale mutant fitness reveals versatile c-type cytochromes in Shewanella oneidensis MR-1*. *Mol. Omics*, **17**, 288-295 (2021)
- [39] B.E. Logan, R. Rossi, A. Ragab, P.E. Saikaly, *Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems*. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 307 (2019)
- [40] D. R. Lovley, *Microbial Fe(III) reduction in subsurface environments*. *FEMS Microbiol. Rev.*, **20**, 305-313 (1997)



## Chapitre 5

# Etude préliminaire de la densité de charge à la surface des bactéries

Ce chapitre débute par une description du protocole de mesure de la densité de charge surfacique des bactéries à l'aide d'un microscope à force atomique (AFM) en milieu liquide [1]. Ce dispositif permettrait de pouvoir visualiser, à l'échelle nanométrique, les voies de transfert extracellulaire des électrons tels que les appendices cellulaires ou les nanofils conducteurs produits par les bactéries. Cette méthode repose sur l'apparition d'une déflexion résiduelle d'un levier conducteur possiblement induit par un transfert de charges entre la membrane des bactéries et la pointe AFM. Nous verrons que ces mesures nécessitent une adhésion préalable des bactéries à un substrat conducteur suffisamment importante pour résister aux forces latérales induites par le balayage de la surface par la pointe AFM. La suite de ce chapitre sera donc dédiée à la présentation de trois protocoles visant à obtenir une adhésion rapide des bactéries à un substrat conducteur. Les objectifs sont ici d'obtenir une adhésion des bactéries : 1) sans utiliser de traitement de surface (agar, polylysine...) afin de pouvoir étudier les bactéries dans des conditions physiologiques au cours de la mesure, 2) en contrôlant l'ensemble des paramètres expérimentaux afin d'obtenir un protocole reproductible et potentiellement adaptable à d'autres espèces bactériennes, 3) sans formation de matrice extracellulaire sur la surface de la bactérie exposée à la pointe AFM afin de pouvoir sonder directement la membrane bactérienne. Partant d'un protocole simple de dépôt d'une goutte de milieu de culture bactérienne sur la couche d'oxyde d'indium-étain (ITO), deux protocoles aux paramètres mieux contrôlés (cellule micro-fluidique et application d'un potentiel positif sur la surface d'ITO) seront proposés. Les résultats de ces trois protocoles seront discutés.

## I. Contexte et objectifs

Dans cette partie nous commencerons par présenter rapidement la technique de mesure de la densité surfacique proposée par C. Marlière et al [1] avant de détailler différents objectifs à atteindre pour parvenir à reproduire ce protocole sur la bactérie *S. oneidensis* MR-1.

### 1. Méthodes de mesures électriques par AFM

Bien que facilement mesurables à l'air ou dans le vide, l'observation des propriétés diélectriques devient particulièrement difficile en milieu liquide. En effet, lors de l'immersion d'un substrat en milieu liquide, sa surface va se charger (adsorption d'ions, réaction chimique de ces groupements atomiques de surface avec des composés chimiques de l'électrolyte). Les contre-ions mobiles en solution vont venir s'accumuler au voisinage de la surface et former ce que l'on appelle une double couche électrique. Cette double couche électrique se scinde en deux zones. Dans la première zone, les ions sont fortement adsorbés à la surface et situés à égale distance de celle-ci (couche compacte de type Helmholtz). Dans la seconde zone, la mobilité des ions par diffusion au sein du milieu liquide est prise en compte et c'est alors la distribution de Boltzmann qui régit la distribution des ions (couche de Gouy-Chapman). Cette double couche électrique, d'épaisseur égale à la longueur de Debye, écranne les charges présentes à la surface du substrat et diminue alors les forces d'interactions électrostatiques. Ainsi, sonder les propriétés diélectriques à l'échelle nanométrique en milieu liquide sans influencer la distribution initiale de charge est complexe. Pour parer à ce problème, les propriétés diélectriques locales sont habituellement sondées grâce à l'application de tensions alternatives dont la fréquence est plus grande que celle de relaxation diélectrique (de l'ordre du MHz) ou sur des distances sonde-substrat plus grandes que la longueur de Debye (une dizaine de nanomètres) [2]. Toutefois, ces techniques ne permettent pas d'avoir accès à la structure de la double couche électrique elle-même et donc à la répartition des charges sur la surface sous-jacente (dans notre cas la membrane bactérienne). D'autres méthodes sont également utilisées pour étudier la charge de surface des bactéries. Parmi elles, celle de la titration potentiométrique : initialement en milieu acide, de la soude est progressivement ajoutée à une suspension bactérienne de concentration connue et sa surconsommation par les bactéries est mesurée. Toutefois, cette technique s'avère difficilement interprétable car certaines bactéries présentent un comportement métabolique actif face à cette alcalinisation du milieu. Une seconde technique repose sur la mesure de la vitesse de déplacement des bactéries sous l'effet d'un champ électrique : c'est la microélectrophorèse [3]. Différents modèles théoriques ont été proposés pour expliquer les données expérimentales de mobilité électrophorétique obtenues. S'appuyant initialement sur les modèles colloïdaux (sphères dures), ces derniers ont grandement été améliorés et adaptés aux systèmes biologiques alors décrits comme une sphère centrale dure recouverte d'une couche hétérogène de polymères souples chargés [4]. Toutefois ces techniques, bien que combinant approches microscopique et macroscopique [5], ne permettent pas d'avoir accès directement au comportement individuel des bactéries ou aux modifications individuelles de la charge de surface induites par les interactions avec des bactéries environnantes.

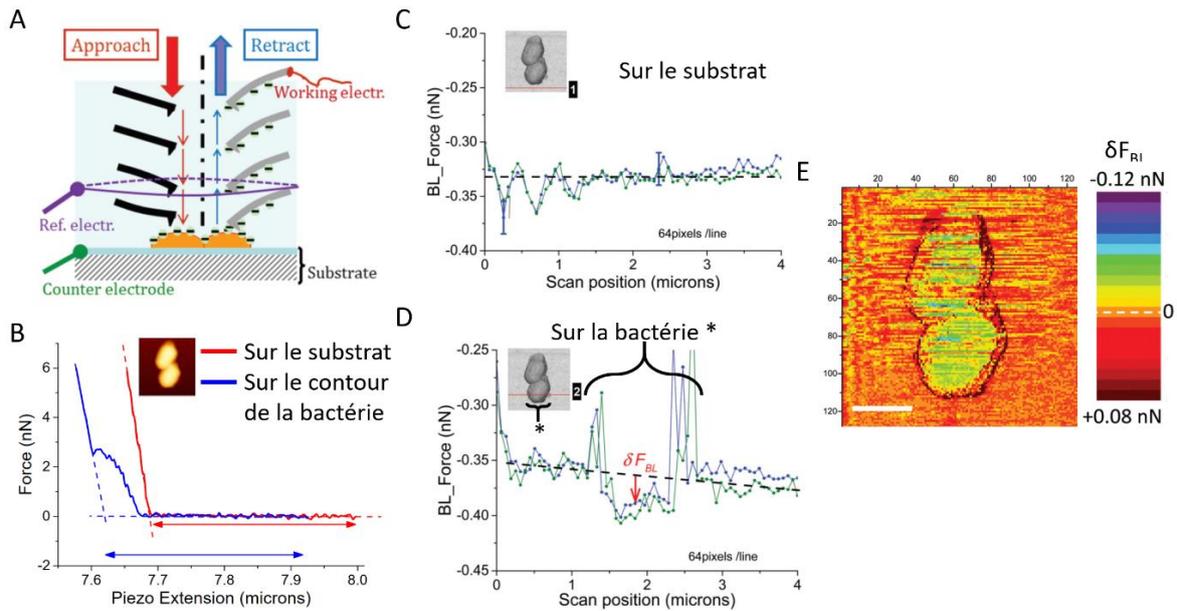
L'idée originale proposée dans cette méthode est d'adapter des mesures d'électrocapillarité classiques, reliant densité surfacique de charge et contrainte mécanique, à un levier métallique de microscope à force atomique pour cartographier la distribution de charges (ie la structure de la double couche électrique) situées sur la membrane d'une bactérie individuelle, *in vivo* et dans des conditions physiologiques. Le milieu liquide alors utilisé présente une force ionique suffisamment élevée pour que les méthodes classiques de mesures de charges ne puissent être utilisées. La méthode de mesure proposée repose sur l'utilisation de l'équation électrocapillaire [6], reliant une variation de tension superficielle à une modification de charge électrique à la surface du levier, couplée à l'équation de Shuttleworth [7], permettant de relier tension superficielle et contraintes mécaniques surfaciques. La grandeur que l'on quantifie ici est celle de la contrainte mécanique induite par une évolution vers un nouvel état d'équilibre de la double couche électrique du levier AFM suite à son contact avec la double couche électrique autour de la membrane bactérienne. En effet, une contrainte et donc une courbure du levier sera mesurable par un décalage du faisceau réfléchi sur la photodiode. Ce paramètre peut être extrait des courbes approche/retrait, donnant la variation de la force d'interaction versus la distance entre la pointe et l'échantillon, loin de la zone de contact répulsive ( $> 10$  nm). Comme nous l'avons vu sur la Figure 2-8, une courbe approche/retrait, mesurée pour un pixel, peut être divisée en deux parties : une première à grande distance du substrat (plus grande que plusieurs longueurs d'onde de Debye) où l'état électrique de la double couche du levier est fixe et une deuxième, aux plus courtes distances, où les doubles couches électriques de la pointe et des bactéries entrent en contact. Dans ce second cas, la double couche de la pointe AFM va évoluer vers un nouvel état d'équilibre induisant un changement de contrainte de surface du levier, détecté par une modification de la valeur de force d'interaction sur les courbes approche/retrait comparativement au signal mesuré loin de la surface.

Pour réaliser ces mesures, le montage présenté sur la Figure 5.1.A est utilisé. Il consiste à fonctionnaliser une pointe AFM pour l'utiliser en tant qu'électrode de travail dans un montage potentiostatique à trois électrodes. Les deux autres électrodes sont le substrat conducteur sur lequel les bactéries sont déposées (contre-électrode) et une électrode de platine pour référence. Un potentiel de 0 mV est appliqué entre l'électrode de travail et l'électrode de référence et le courant est mesuré entre l'électrode de travail et la contre électrode. Des courbes approche/retrait sont enregistrées sur l'ensemble de la surface au cours du balayage de la pointe AFM.

Les valeurs de la force d'interaction, entre la pointe AFM et le substrat avant le régime répulsif sont évaluées sur la courbe d'approche (Figure 5.1.B, courbe rouge). Cette force d'interaction correspond à la force de la ligne de base notée  $F_{BL}$ . Pour extraire ce paramètre, un ajustement linéaire de la courbe d'approche est effectué sur deux zones distinctes : premièrement, sur les faibles valeurs d'extension du piezo et plus précisément entre la position du piezo lorsque la force maximale est atteinte (ici 6 nN) et 10 nm (ici entre 7,50 et 7,51  $\mu$ m), deuxièmement sur les grandes valeurs d'extension du piezo comprises entre 200 nm et la plus grande valeur prise par l'extension du piezo (ici de 7,8 à 8  $\mu$ m). Ces ajustements sont représentés par les lignes rouges en pointillés sur la Figure 5.1.B. Toutes les valeurs de force prises par la ligne de base

entre le point d'intersection des deux ajustements précédents (ici  $7,7 \mu\text{m}$ ) et l'extension la plus grande du piezo (ici  $8 \mu\text{m}$ ) sont moyennées pour donner la valeur de  $F_{\text{BL}}$ . La zone où est effectué ce moyennage est indiquée par une flèche rouge sur la Figure 5.1.B.

Les valeurs de  $F_{\text{BL}}$  sont alors tracées pour chaque pixel du scan AFM sur les graphiques présentés Figure 5.1.C. On constate que le signal sur le substrat est constant autour d'une valeur moyenne indiquée par la ligne noire en pointillés. Au contraire, les valeurs de  $F_{\text{BL}}$  diminuent lorsque l'on sonde la surface de la bactérie (Figure 5.1.D). Sur le contour de la bactérie, des variations importantes de  $F_{\text{BL}}$  sont relevées. Ces dernières sont liées à la méthode utilisée pour extraire les valeurs de  $F_{\text{BL}}$ . En effet, la courbe d'approche bleue présentée sur la Figure 5.1.B est celle typiquement obtenue lorsque la pointe se rapproche du contour de la bactérie. On constate l'apparition d'une bosse dans le signal d'approche avant d'atteindre la zone répulsive liée à l'importance de forces d'interaction latérales lorsque la pointe se situe sur le contour de la bactérie. La moyenne de la force sur la plage indiquée par la flèche bleue va donc conduire à des grandes valeurs de  $F_{\text{BL}}$ . Si l'on revient à la Figure 5.1.D, on peut souligner que la partie intéressante du signal est celle située entre ces deux pics correspondant au comportement de  $F_{\text{BL}}$  à la surface de la bactérie : un signal plus petit que la valeur moyenne calculée sur le substrat (indiquée par la ligne noire en pointillés) est observé. La différence, notée  $\delta F_{\text{BL}}$ , entre la valeur de la force  $F_{\text{BL}}$  à un pixel donné par rapport à la valeur moyenne de  $F_{\text{BL}}$  déterminée sur le substrat (indiquée par la ligne noire en pointillée) est calculée en chaque pixel. Elle est représentée sur l'ensemble de la surface de la bactérie sur la Figure 5.1.E. On remarque que la valeur de cette force homogène est bien plus petite sur l'ensemble de la bactérie comparativement au substrat. Le recoupement de ces mesures de force  $\delta F_{\text{BL}}$  avec les mesures d'intensité électrique effectuées simultanément sur la durée du scan montre que, sous des conditions bien choisies de constante de temps, une corrélation apparaît entre ces deux grandeurs. Le coefficient de proportionnalité (modulo le temps) alors obtenu entre ces deux grandeurs permet de convertir les données de force en données de densité surfacique de charge.

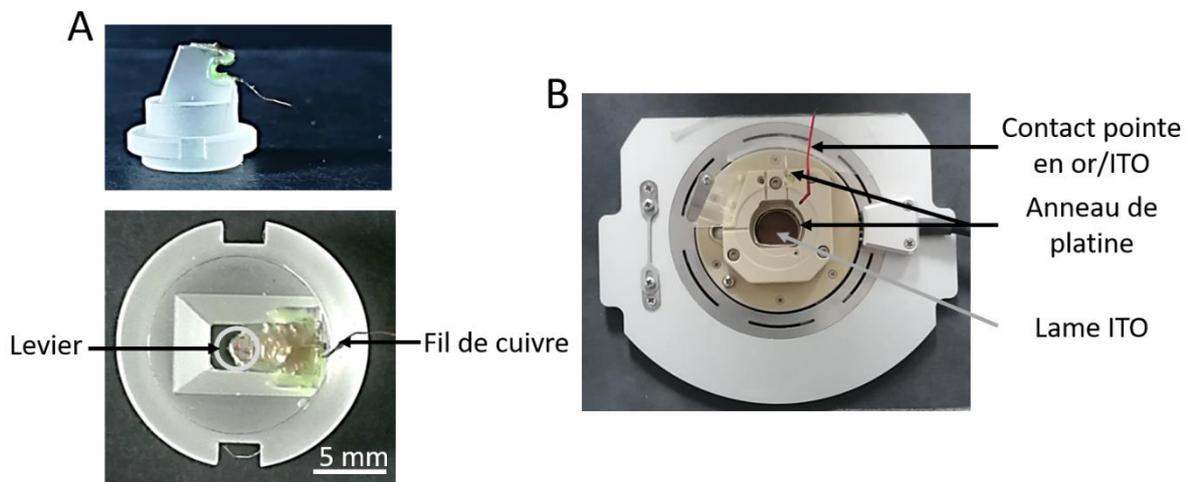


**Figure 5-1 - Présentation du montage de mesures de charges de surface sur la membrane de la bactérie *Rhodococcus wratislaviensis*.** (A) Schéma présentant le montage et le principe de la mesure. Un montage à trois électrodes est utilisé ici : une électrode de référence en platine, une contre-électrode correspondant à un substrat conducteur et la pointe AFM comme électrode de travail. (B) Courbes d'approche enregistrées sur le substrat (ligne bleue continue) et sur les contours de la bactérie (ligne continue rouge). Les lignes pointillées indiquent les ajustements linéaires des données permettant de définir l'intervalle (marqué par les doubles flèches) sur lequel les valeurs de force prises par la ligne de base seront moyennées. (C-D) Variation spatiale du signal  $F_{BL}$  en différents endroits de l'échantillon (C) Balayage de la surface du substrat, (D) Balayage sur la surface de la bactérie comme indiqué par le trait rouge sur l'image en insert. Le signal  $\delta F_{BL}$  est défini comme l'écart entre la valeur mesurée de  $F_{BL}$  en chaque pixel et celle de l'ajustement linéaire des données enregistrées sur le substrat. (E) Cartographie de la force  $\delta F_{BL}$  : un signal négatif sur toute la surface de la bactérie est observé. (Figures reprises de l'article [1]).

## 2. Objectifs

Le premier objectif était de reproduire le protocole de fonctionnalisation de la pointe présenté dans la thèse de S. Dhahri [8]. Pour le reprendre rapidement, l'idée est de transformer la pointe en une électrode via la connexion d'un fil de cuivre de 0,1 mm de diamètre à la plaquette sur laquelle le levier est fixé (Figure 5-2.A). Pour cela, la plaquette portant le levier est initialement fixée au bloc de verre, à l'aide d'une colle époxy, de même que le fil de cuivre est isolé afin de ne pas interférer avec le milieu liquide. Un mélange de colle époxy conductrice permet ensuite de faire la connexion entre le fil de cuivre (dénudé à son extrémité) avec la plaquette. La connexion sur la totalité du système est vérifiée par une mesure de résistance à l'ohmmètre. Finalement, l'ensemble, à l'exception du levier, est recouvert d'un vernis dilué dans de l'acétone afin d'assurer son isolation électrique.

L'utilisation du potentiostat est alors possible avec pour trois électrodes : la pointe AFM fonctionnalisée, un fil de platine de 0,6 mm de diamètre entourant le porte échantillon et en contact avec le milieu liquide (la forme circulaire lui permet d'être à égale distance de l'électrode de travail et de la contre-électrode) et une pointe en or au contact de la couche conductrice d'ITO (Figure 5-2.B). Le levier PPP-CONTPt (Nanosensors, Neuchatel, Switzerland) est choisi car il présente l'avantage d'avoir une faible constante de raideur (0,4 N/m), permettant l'imagerie des bactéries, et une faible résistivité (0,015  $\Omega$ .cm), rendant possible l'utilisation du levier en électrode de mesure grâce à la présence d'un revêtement bi-couche de 25 nm de chrome et d'un alliage de iridium/platine.



**Figure 5-2 – Instrumentation permettant les mesures électriques par microscopie à force atomique.** (A) Image du levier fonctionnalisé par contact électrique à un fil de cuivre à l'aide d'une colle époxy conductrice. Le levier est au préalable fixé sur le bloc de verre via une colle époxy. Le fil de cuivre est, quant à lui, maintenu autour du bloc de verre afin de ne pas interférer avec le milieu liquide. Ce levier constitue l'électrode de travail lors de la mesure électrique. (B) Image de la cellule électrochimique (ECCell®, JPK) : la lame d'ITO est placée sur le porte-échantillon et scellée à l'aide de vis insérées dans la partie supérieure et démontable du porte-échantillon. Cette partie supérieure présente une pointe en or qui assure la connexion de la lame d'ITO à un fil conducteur (fil rouge indiqué sur l'image), constituant ainsi la contre électrode. Un anneau de platine entoure la zone de dépôt du milieu liquide et joue le rôle de l'électrode de référence.

Le second objectif est d'obtenir des bactéries suffisamment adhérentes pour résister aux forces latérales induites par le balayage de la pointe AFM. Cette adhésion doit se faire en utilisant le moins de contaminants possible afin de pouvoir étudier les bactéries en conditions physiologiques au cours de la mesure. De plus, la densité surfacique en bactéries doit être suffisante pour permettre de cartographier plusieurs bactéries tout en s'assurant de visualiser des bactéries isolées. L'élimination de toutes bactéries nageantes ou de molécules adhérentes (matrice extracellulaire ou autre polymère) est également nécessaire pour ne pas contaminer la pointe au cours de la mesure.

Enfin, le troisième objectif est d'obtenir le facteur de conversion permettant de convertir une cartographie de forces en cartographie de charges de surface à l'aide du potentiostat.

Avant de détailler les différents protocoles d'adhésion testés, une étape commune à l'ensemble de ces protocoles concerne le nettoyage de la surface du substrat. Celui-ci est détaillé ci-après.

### 3. Lavage des lames d'ITO

Comme proposé par C. Marlière [1], le substrat conducteur utilisé pour l'ensemble des expériences décrites dans ce chapitre est une lame de verre borosilicate recouverte d'une fine couche d'oxyde d'indium-étain (Neyco, Paris, France). Afin de s'adapter au porte échantillon du microscope à force atomique, cette lame est de dimensions 24 x 24 mm<sup>2</sup> et épaisse d'un millimètre. Ce type de substrat est particulièrement adapté aux mesures électriques AFM en raison de sa transparence (transmittance de l'ordre de 80% dans le visible [Neyco]) et de sa faible résistivité (ici de l'ordre de 50 Ω.cm). Le mode de dépôt par pulvérisation est choisi par Neyco et conduit à l'obtention d'une couche parfaitement homogène et faiblement rugueuse dont l'épaisseur contrôle la transparence et les propriétés de conduction (chapitre 2). Cette lame n'est recouverte d'oxyde d'indium-étain que sur l'une de ces faces, repérée par une mesure de résistance à l'ohmmètre. Le dépôt des bactéries est toujours effectué sur cette face.

Le nettoyage minutieux de la surface est une étape essentielle pour éviter toute contamination de la surface des échantillons qui pourrait interférer avec les mesures AFM. Le protocole de nettoyage utilisé est le suivant. Tout d'abord, la surface est frottée manuellement et énergiquement à l'aide d'un coton imbibé d'une poudre à fine granulométrie de CaCO<sub>3</sub> dispersée dans une solution aqueuse diluée de RBS à 3%. Ensuite, la lame est abondamment rincée avec de l'eau ultra-pure puis séchée avec de l'air sec comprimé. Ces étapes sont réalisées juste avant le dépôt des bactéries sur la surface afin d'éviter le dépôt de toutes nouvelles impuretés sur la surface.

## II. Tests préliminaires : dépôt d'une goutte de culture bactérienne sur la surface du substrat

Notre recherche a débuté par une expérience simple de mise en contact d'une suspension bactérienne avec le substrat conducteur. Différents paramètres expérimentaux, tels que la densité optique de l'inoculum, le volume de milieu bactérien au contact de la lame, le temps d'incubation (temps d'interaction des bactéries avec la surface) ou encore le mode de « lavage » de la surface après l'incubation, ont été modifiés indépendamment les uns des autres afin de les optimiser.

### 1. Matériels et méthodes

Le premier dispositif s'inspire de celui proposé dans les travaux de thèse de S. Dhahri [8] où un protocole d'adhésion naturelle de cyanobactéries avait été établi. Celui-ci repose sur le dépôt d'un petit volume de bactéries au centre de la lame que l'on laisse sédimenter pendant 15 min avant de prélever le surplus de liquide, sécher puis rincer la surface de la lame. La reproduction telle quelle de ce protocole ne permet pas une adhésion suffisante et reproductible de notre espèce bactérienne (*S. oneidensis*) sur la surface pour résister à un balayage AFM. L'étape centrale semble être celle de l'évaporation du liquide (séchage) qui est difficile à contrôler car dépendante de nombreux paramètres extérieurs (vitesses du flux laminaire de notre hotte, température, humidité de la pièce). De plus, l'évaporation peut induire des modifications métaboliques et structurales à cause des variations de pression osmotique.

Divers protocoles ont donc été testés pour passer outre cette phase de séchage :

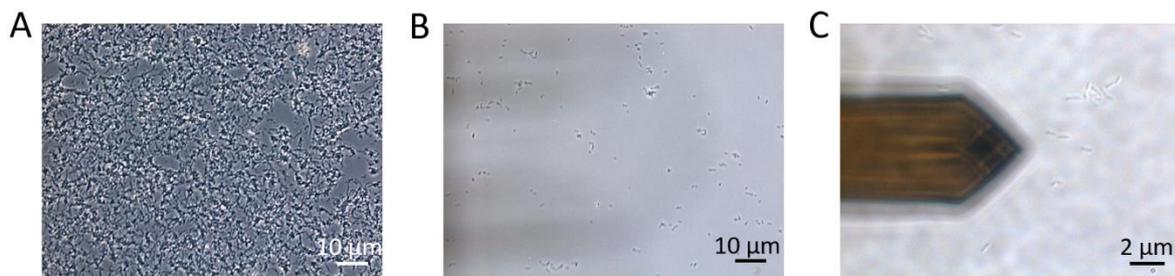
- Dépôt du petit volume de bactéries au centre de la lame suivi d'un temps d'incubation plus long passant de 15 min à 1 h 30,
- Incubation en deux temps : 1) dépôt d'une goutte de milieu liquide contenant des bactéries au centre de la lame, 2) première incubation d'une durée de 1 h 30, 3) pipetage du dépôt puis renouvellement du milieu liquide au voisinage de la lame par ajout de 10 mL de LB, 4) seconde incubation dont les durées testées ont varié de 1 h 30 à une semaine (avec régénération du milieu nutritif tous les jours dans ce cas),
- Modification de la densité optique de l'inoculum,
- Utilisation de différentes méthodes de « lavage » de la surface de la lame : circulation d'un flux de liquide le long de la surface de la lame inclinée à 45° ou laissée à l'horizontale suivant des étapes successives d'aspiration/écoulement de milieu de culture stérile à l'aide d'une pipette. Notons que dans toute la suite de ce chapitre, on appellera « lavage » de la surface, la circulation d'un flux de liquide abiotique (LB ou sérum physiologique) par pipetages successifs.

### 2. Résultats et discussions

L'ensemble de ces tests a permis d'isoler deux paramètres critiques : la durée de la seconde phase d'incubation et le lavage de la lame avant observation AFM. En effet, une seule phase d'incubation, quelle que soit sa durée, n'a jamais permis l'observation de bactéries immobiles

sur la surface. D'autre part, la modification de la densité optique de l'inoculum n'a pas eu d'impact significatif sur la densité surfacique de bactéries, ce qui rejoint les observations microscopiques réalisées dans le Chapitre 3.

Commençons par nous concentrer sur l'influence du second paramètre : l'étape de lavage de la lame. Sans cellule micro-fluidique, flux contrôlé ou observations microscopiques de la surface de la lame, il était difficile d'obtenir une densité de surface en bactéries reproductible. En fonction de la vitesse du flux du liquide induite par le pipetage et donc de l'intensité du cisaillement provoqué sur les bactéries au contact de la lame, la densité de surface pouvait varier de celle visible sur l'image A (Figure 5-3) à une densité de surface nulle. Afin d'obtenir la densité de surface souhaitée pour la mesure AFM, c'est-à-dire suffisamment dense pour pouvoir balayer la surface de plusieurs bactéries (augmenter la statistique de la mesure) mais suffisamment peu peuplée pour observer des bactéries isolées, la meilleure méthode de lavage consiste à insérer directement la lame d'ITO dans le porte échantillon de la cellule et à créer ensuite un flux de liquide de faible vitesse par pipetage lent du liquide. La densité surfacique est alors contrôlée en direct par observation au microscope optique (Axio Observer. Z1, Carl Zeiss, Göttingen, Germany) et permet d'obtenir la densité surfacique idéale (Figure 5-3.B-C).

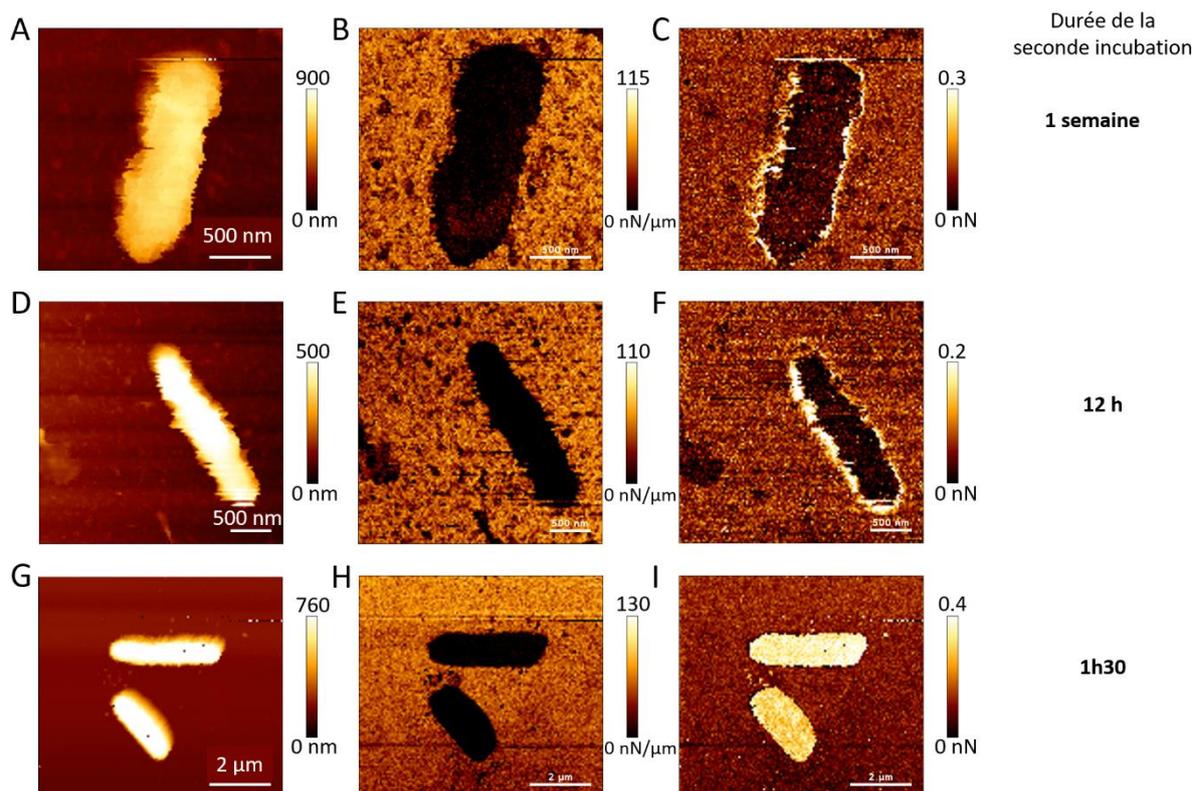


**Figure 5-3 - Densité surfacique en bactéries permettant le repérage de bactéries isolées.** Images de la surface de la lame d'ITO prises au microscope optique inversé (A) avant lavage (grossissement 10x). On observe la présence de nombreux amas et une densité surfacique en bactéries importante. (B) après lavage par aspirations/renouvellements successifs du milieu de culture à l'aide d'une pipette (grossissement 10 x). On constate que la densité surfacique en bactéries est beaucoup plus faible permettant le repérage de bactéries isolées. (C) On constate que plusieurs bactéries isolées sont présentes au sein du champ d'observation (grossissement 40 x). Le levier, net dans le même plan que les bactéries (profondeur de champ près), est au contact de la surface d'ITO. Les bactéries sont ici en conditions statiques (sans agitation) dans un milieu riche LB (pH = 6,5) à 23°C et inoculées à une densité optique de 0,1.

Intéressons-nous à présent au premier paramètre : la durée de la seconde incubation. Les résultats sont présentés sur la Figure 5-4, pour des temps d'incubation décroissants de la première à la dernière ligne, sous la forme des cartographies obtenues par microscopie à force atomique dans 600 µL de milieu LB. Chaque pixel a été construit à partir des données extraites des courbes approche/retrait mesurées en chaque point, et chaque image compte 128x128 pixels<sup>2</sup>. Le levier utilisé ici est un levier CSC38/no Al (MikroMasch, <https://www.spmtips.com/afm-tip-hq-csc38-no-al>) de constante de raideur 0,03 N/m. La force

maximale (Set point) commandée est de 2 nN et l'extension maximale du levier (Z length) fixée à 500 nm. La première colonne indique la topographie des bactéries, la seconde cartographie la rigidité mécanique et la troisième la force d'adhésion de la pointe au substrat (surface d'ITO ou de la bactérie). Sur les cartographies de hauteur, on peut remarquer que plus le temps d'incubation diminue, plus les bactéries sont longues (1,7  $\mu\text{m}$  à 3  $\mu\text{m}$ ) et leurs contours nets. La hauteur obtenue sur les données des Figures 5-4.A et 5-4.G est de l'ordre du micromètre ce qui est cohérent avec la valeur attendue. Les contours flous et la hauteur plus faible qu'attendue sur la Figure 5-4.D pourraient indiquer la lyse de la bactérie. Les cartographies de rigidité montrent que la rigidité mécanique de la surface est homogène sur l'ensemble des bactéries et bien plus faible que celle du substrat. Enfin, les cartographies d'adhésion présentent des informations intéressantes. Pour des temps d'incubation courts, les forces d'adhésion de la pointe à la surface de la bactérie sont élevées et homogènes sur l'ensemble de la surface de la membrane bactérienne exposée à la pointe. Au contraire, pour des temps d'incubation longs, les forces d'adhésion sont particulièrement intenses sur les contours et sur la surface de la bactérie dirigée vers la lame (la bactérie reste immobile sous des scans AFM successifs) mais faibles sur le reste de la surface exposée à la pointe AFM. Ces grandes forces d'adhésion peuvent être reliées à la sécrétion de matrice extracellulaire ou d'appendices (pili, tubes polymériques) particulièrement adhésifs à l'origine de la formation des biofilms. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par l'utilisation des mutants  $\Delta\text{mx}D$  et pili négatif présentés dans le chapitre 3. Notons que la présence d'une zone de plus grande adhésion sur le contour de la bactérie pourrait également provenir d'un effet parasite induit par une interaction de la pointe avec la bactérie non plus ponctuelle mais également via son flan.

Comme les temps d'incubation prolongés semblent ici induire la lyse des bactéries, le meilleur protocole semble donc être celui correspondant à la dernière ligne (Figures 5-4.G-I) : 1) le dépôt de 200  $\mu\text{L}$  de milieu de culture contenant des bactéries à une densité optique de 0,1 au centre de la lame d'ITO, 2) première incubation pendant 1 h 30, 3) pipetage du dépôt puis renouvellement du milieu liquide au voisinage de la lame par ajout de 10 mL de LB, 4) deuxième incubation pendant 1 h 30, 5) lavage de la lame sous le microscope optique comme décrit sur la Figure 5-3. Toutefois, la présence de forces d'adhésion élevées sur la surface de la bactérie peut suggérer la présence de matrice extracellulaire sur sa surface et donc l'impossibilité de sonder directement la membrane bactérienne. De plus, l'obtention de bactéries parfaitement immobiles sous plusieurs balayages successifs de la pointe AFM n'a pu être reproduite que deux fois sur huit expériences. Ce manque de reproductibilité nous a donc conduit à vouloir élaborer un nouveau protocole, plus contrôlé, via l'utilisation d'une cellule micro-fluidique.



**Figure 5-4 - Cartographies des bactéries à la surface de la lame d'ITO obtenues par microscopie à force atomique à l'issue du premier protocole de simple mise en contact des bactéries avec la surface du substrat. Cartographie reconstituée à partir des courbes approche/retrait mesurées en chaque pixel. (A,D,G) Topographie de la surface, (B,E,H) Rigidité mécanique, (C,F,I) Adhésion de la pointe au substrat. Les deux premières lignes sont associées à des protocoles présentant des temps de seconde incubation longs (une semaine pour la première ligne avec régénération du milieu nutritif tous les jours, 12h sur la deuxième ligne et 1h30 sur la dernière).**

### III. Fixation des bactéries à l'aide d'un montage micro-fluidique

Ce protocole d'adhésion des bactéries est inspiré de celui proposé par Lee et al [9]. Dans cette publication, l'adhésion des bactéries à un substrat est étudiée à l'aide d'une chambre micro-fluidique. Ils montrent qu'au cours des premières étapes d'interaction avec la surface (< 20 h), la population bactérienne sur ou au voisinage de la surface se compose essentiellement de cellules faiblement attachées avec un temps de résidence de moins de trente secondes au voisinage de la surface, soit bien moins que le temps de génération. Aucune division bactérienne en surface n'est observée. Au contraire, lorsqu'ils récupèrent ces bactéries, précédemment au contact de la surface, et qu'ils les exposent à une nouvelle surface, ils constatent que les bactéries restent davantage attachées à la surface et que la croissance de la population surfacique après 8 h d'incubation devient exponentielle (division des bactéries sur la surface). Grâce à la première phase de contact des bactéries avec la surface, ces dernières se sont adaptées et peuvent alors enclencher leur processus de division cellulaire plus rapidement lors de la seconde exposition. De plus, les cellules filles générées vont, elles aussi, présenter un plus grand attachement à la surface. Ils expliquent ce phénomène par une augmentation du niveau intracellulaire de molécules AMPc (un effecteur agissant probablement sur une protéine régulatrice centrale telle que la protéine réceptrice d'AMPc) se transmettant aux générations suivantes. Une augmentation de la production de pili et de matrice extracellulaire couplée à l'arrêt du fonctionnement des flagelles va alors être observée chez les bactéries.

#### 1. Matériels et méthodes

##### a. Description du milieu de culture utilisé

Comme dans le protocole proposé par Lee et al [6], une solution tampon M63 sera utilisée. Celle-ci contient 3 g/L de phosphate de potassium monobasique, 7 g/L de phosphate de potassium dibasique et 2 g/L de sulfate d'ammonium. A partir de ce tampon, deux milieux de culture sont préparés. Un premier, utilisé pour réaliser la préculture et la dilution, se compose du tampon M63 supplémenté de 1 mM de  $MgSO_4$ , 0,02 g/L de glucose et 0,05 g/L de casaminoacides. Dans ce milieu, le temps de génération des bactéries sous agitation est de 60 min, ce qui est proche de celui observé en milieu riche LB (50 min). Un second milieu, plus pauvre en nutriments sera lui utilisé pour les expériences dans la cellule micro-fluidique afin de ralentir la croissance bactérienne (temps de génération égal à 100 min). Il se compose du tampon M63 supplémenté de 1 mM de  $MgSO_4$ , 0,005 g/L de glucose et 0,0125 g/L de casaminoacides. Chacun de ces milieux est préparé dans de l'eau déionisée puis stérilisé par passage à l'autoclave pendant 15 min à 120°C. De la même façon que pour les cultures en milieu LB, une préculture est préparée par mise en suspension d'une colonie isolée sur gel LB Agar dans 5 mL de milieu puis placée dans l'incubateur-shaker sous une agitation de 200 rpm à 30°C pendant toute une nuit. Le lendemain, la densité optique ( $DO_{600nm}$ ) des bactéries, mesurée à 600 nm, est typiquement autour de 1,2. Une dilution au 1/1000 est effectuée dans le même milieu de culture puis replacée à l'incubateur shaker dans les mêmes conditions que celles de la nuit. Lorsque la  $DO_{600nm}$  atteint 0,4, les bactéries sont inoculées dans la cellule de micro-fluidique à une densité de 0,01 dans le second milieu de culture.

- b. Description du montage
  - i. Fabrication de la cellule micro-fluidique

La cellule micro-fluidique utilisée au cours de nos expériences est présentée sur la Figure 5-5.A. Le canal, de 18 mm de long sur 8 mm de large, est découpé dans une feuille de PDMS (PF-40-x4, Gel-Pack) de 165  $\mu\text{m}$  d'épaisseur à l'aide d'une machine de découpe (Portrait 3, Silhouette). Il est présenté sur la Figure 5-5.B. La conception de la pièce a été discutée avec les membres des services mécanique et instrumentation du laboratoire et a ensuite été réalisée par leurs soins. Un premier test a été fait avec une cellule de forme rectangulaire mais celle-ci s'était avérée trop fragile et ne permettait pas d'appliquer une pression uniforme sur l'ensemble du canal. La forme de croix, présentée sur la Figure 5-5.A, a été préférée. La cellule se décompose en deux parties. La partie inférieure, dans laquelle la lame d'ITO peut être insérée, est en résine (composée de photopolymères) et a été construite à l'imprimante 3D. La partie supérieure, en plexiglas, est quant à elle percée de deux trous filetés permettant de visser deux connecteurs, composant l'entrée et la sortie du canal. L'étanchéité est assurée par l'utilisation d'un joint torique serré entre le plexiglas et le connecteur. L'idée est de déposer le canal en PDMS sur la face conductrice de la lame d'ITO et d'enserrer ce canal en vissant la partie supérieure à la partie inférieure. Il faut veiller à ce que le canal soit bien centré sur les connecteurs et qu'aucune bulle d'air ne se forme sur les bords du canal.

- ii. Description du montage de micro-fluidique

Le montage micro-fluidique complet est présenté sur la Figure 5-5.C. A gauche se trouve une bouteille dans laquelle est versé le milieu de culture M63 faiblement supplémenté de 1 mM de  $\text{MgSO}_4$ , 0,005 g/L de glucose et 0,0125 g/L de casaminoacides. Un tube en silicone (de diamètres intérieur 3 mm et extérieur 5mm, Tygon, Saint Gobain Performance, France) reliant la bouteille à l'entrée du canal micro-fluidique est serré contre la tête d'une pompe péristaltique en rotation (Pompe à cassette multi-canaux 205 U, Watson Marlow). La vitesse de rotation, contrôlée manuellement, régule le flux de liquide au sein de la cellule. A la sortie du canal, un second tube dirige la solution liquide vers la bouteille de droite (bouteille poubelle) via le mouvement de rotation inverse de la tête de la pompe. L'entrée d'air de la bouteille de gauche est protégée par un filtre de 0,22  $\mu\text{m}$  afin d'éviter toute contamination bactérienne du milieu de culture.

- iii. Protocole utilisé pour le nettoyage du dispositif de micro-fluidique

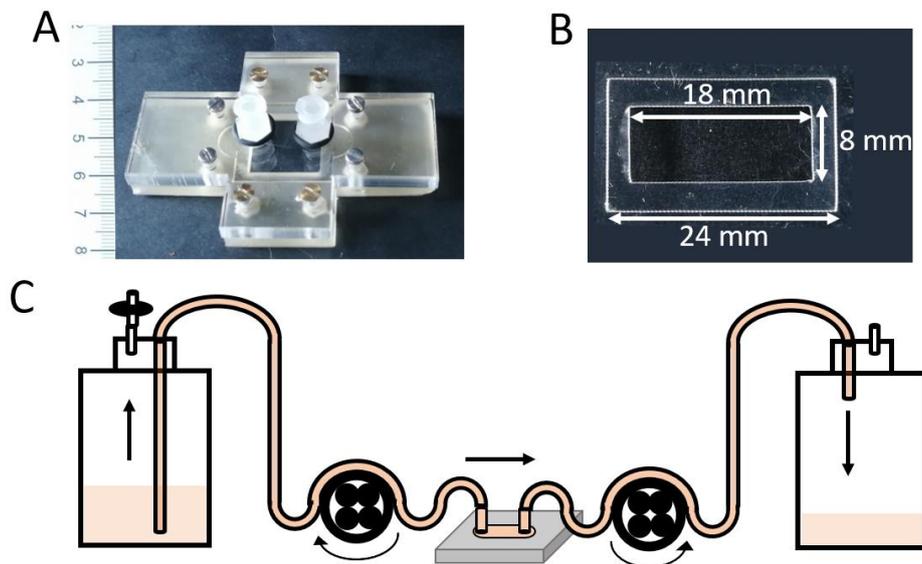
Avant chaque expérience, l'ensemble du dispositif est nettoyé bloc par bloc afin d'éliminer toute source de contaminations (chimique ou bactérienne). Le protocole de nettoyage diffère de celui utilisé pour le lavage de la lame d'ITO car l'élimination de toutes traces de  $\text{CaCO}_3$  dans les tubes en silicone serait difficile. Les deux parties de la cellule micro-fluidique, ainsi que les connecteurs, sont « stérilisés » à l'éthanol. Une circulation d'eau savonneuse suivie de celle d'un mélange eau stérilisée-éthanol est opérée sur l'ensemble des tuyaux utilisés, avant d'être rincé à trois reprises à l'eau déionisée stérile. Enfin, la bouteille contenant le milieu de culture a préalablement été stérilisée par passage à l'autoclave pendant 15 min à 120°C. Une fois l'ensemble de ces étapes de nettoyage effectué, la lame d'ITO et le canal en PDMS sont insérés

dans le montage en croix présenté Figure 5-3.A. Les tubes sont connectés et la circulation du milieu de culture à un flux de 30 mL/h est enclenchée. Avant le début de l'expérience, il est contrôlé qu'aucune bulle d'air n'est présente sur l'ensemble du parcours du milieu liquide [10].

iv. Protocole d'inoculation des bactéries dans le montage de micro-fluidique

Dans notre protocole, le canal micro-fluidique est tout d'abord détaché du reste du montage afin d'inoculer les bactéries diluées à une densité optique de 0,01 dans le canal micro-fluidique. S'en suit une période d'incubation de 30 min à une température de 23°C en statique. A l'issue de ces trente minutes, la cellule est reconnectée au dispositif micro-fluidique. Afin d'éviter la formation de bulles d'air entre le tube d'alimentation en milieu de culture et le connecteur d'entrée de la cellule, ce dernier est totalement rempli de milieu de culture et le débit choisi à la sortie du tube d'alimentation est assez important pour empêcher la capture d'une bulle d'air lors de la connexion. Après cette étape délicate, un flux de 30 mL/h est appliqué pendant 5 min afin d'enlever toutes les bactéries qui n'ont pas adhéré à la surface au cours de la phase d'incubation. Enfin, les bactéries sont soumises à une contrainte de flux minimum, associée à un débit de 0,5 tours/minute (5 mL/h), pendant toute une nuit. Le lendemain, un flux croissant de milieu liquide est appliqué afin d'enlever les amas bactériens formés au cours de la nuit et ainsi obtenir des bactéries isolées.

Tout au long du protocole, la surface de la lame d'ITO est observée au microscope optique inversé en mode contraste de phase (*ZEISS Primovert*), au travers de l'objectif 20 x. Une prise d'images toutes les cinq minutes, au cours des phases d'incubation de 30 min et toute la nuit, est contrôlée par un programme Labview.

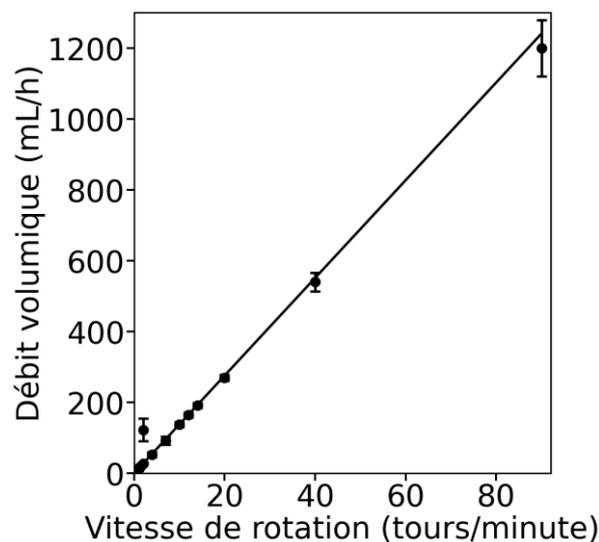


**Figure 5-5 - Description du montage micro-fluidique.** (A) Image de la cellule micro-fluidique usinée au laboratoire. La lame d'ITO vient s'insérer dans la partie inférieure en résine, fabriquée à l'imprimante 3D. La partie supérieure en plexiglas est, elle, percée afin de venir

visser les deux connecteurs. Ces deux parties se vissent l'une à l'autre et appliquent une pression uniforme sur l'ensemble du canal en PDMS disposé sur la lame d'ITO. Les deux connecteurs se situent alors aux bords du canal en PDMS. (B) Image du canal en PDMS de 8 mm de largeur, 18 mm de longueur et 165  $\mu\text{m}$  d'épaisseur découpé, au laboratoire à l'aide d'une machine de découpe. (C) Schéma présentant le montage dans son ensemble : une bouteille contenant le milieu de culture stérile alimente la circulation de liquide au sein du canal. Ce flux de liquide est assuré par une pompe péristaltique permettant l'afflux et l'influx de liquide à l'entrée et à la sortie du canal.

### c. Etalonnage du débit de la pompe

Le débit volumique de liquide circulant dans le canal est contrôlé par la vitesse de rotation de l'enroulement dans la tête de pompe. Afin d'avoir la correspondance entre ces deux grandeurs, un étalonnage du débit volumique en fonction de la vitesse de rotation de la pompe a été effectué. Le débit volumique a été évalué en mesurant le temps mis pour qu'un volume de 20 mL d'eau, déterminé à l'éprouvette graduée, sorte de la pompe. Les données pour différentes vitesses de rotation sont présentées sur la Figure 5-6. On constate que la relation est linéaire avec un coefficient directeur égal à  $(0,230 \pm 0,004)$  mL/tour.



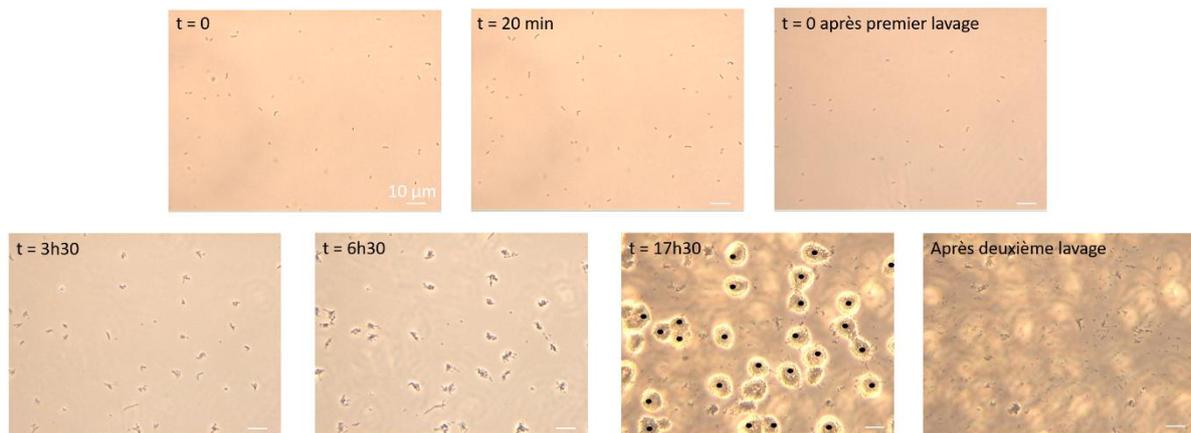
**Figure 5-6 - Etalonnage du débit volumique de la pompe.** Le débit volumique de la pompe est tracé en fonction de la vitesse de rotation de l'enroulement dans la tête de pompe (cercles pleins noirs). L'ajustement linéaire des données (droite noire) donne un coefficient directeur égal à  $(0,230 \pm 0,004)$  mL/tour.

## 2. Résultats et discussions

L'installation de la cellule micro-fluidique sur le microscope optique inversé à contraste de phase, permet d'imager en temps réel la surface de la lame d'ITO tout au long de l'expérience. Dans un premier temps, l'idée est donc de contrôler optiquement l'interaction des bactéries avec la surface (immobilité des bactéries sur la surface, division cellulaire). Dans un second temps, la force d'adhésion sera quantifiée par observations AFM.

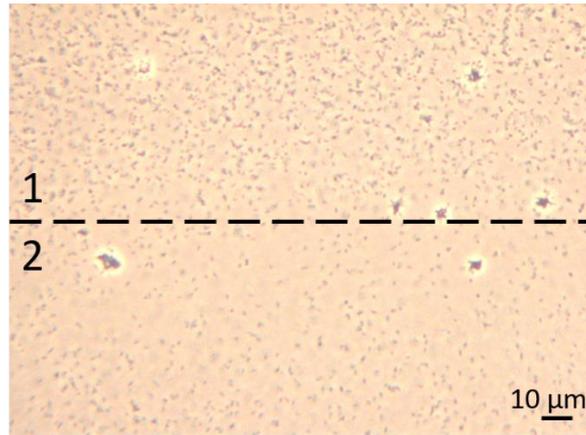
a. Résultats obtenus au microscope optique inversé à contraste de phase

La Figure 5-7 présente les images obtenues au grossissement 20 x à différents temps de l'expérience. Sur la première image, associée au temps initial d'inoculation des bactéries dans la cellule micro-fluidique, on constate la présence de quelques bactéries isolées et immobiles sur la surface. Après une période d'incubation de 20 minutes, on constate l'apparition d'une dizaine de bactéries supplémentaires au contact de la surface. Comme aucune division cellulaire (en surface) n'est observée, toutes ces nouvelles bactéries correspondent à d'anciennes bactéries nageant au sein du volume de milieu liquide. Les séquences d'images enregistrées au cours de cette phase d'incubation montrent que d'autres bactéries viennent au contact de la surface seulement quelques secondes avant d'en repartir. On remarque également que, bien que la plupart des bactéries en surface restent immobiles, d'autres effectuent de courts déplacements sur la surface ou tournent autour de leur point d'accroche à la surface (la bactérie n'est pas fixe sur l'ensemble de sa surface). Un premier lavage sous un flux de 30 mL/h pendant 5 min a permis d'enlever les bactéries non adhérentes, comme l'atteste la faible densité surfacique en bactéries sur l'image annotée  $t = 0$  après premier lavage (Figure 5-7) semblable à celle obtenue à l'instant initial. Toutefois, la cellule étant déplacée pour le positionnement des tuyaux à l'entrée et à la sortie de la cellule, le positionnement des bactéries initialement sur la surface ( $t = 0$ ) ne peut être comparé à celui sur la troisième image. Les trois images suivantes présentent l'évolution de la densité surfacique en bactéries au cours de la phase d'incubation sur toute la nuit – 3 h 30, 6 h 30 et 17 h 30 après le premier lavage. Chaque point noir sur l'image finale ( $t = 17$  h 30) indique la position d'une bactérie présente sur la première image ( $t = 0$  après premier lavage). On remarque que chaque bactérie présente sur l'image initiale va se diviser et conduire à la formation d'amas bactériens localisés englués dans une matrice diffusante. Cette observation est particulièrement intéressante car elle nous indique que ce sont les bactéries initialement localisées sur la surface qui seront à l'origine des amas bactériens ; très peu de nouvelles bactéries vont se détacher des amas et coloniser une autre zone de la surface. Dès les premiers temps d'incubation ( $> 1$  h 30), on remarque l'apparition d'un halo diffusant autour des bactéries indiquant probablement la sécrétion de matrice extracellulaire. Notons qu'il serait intéressant d'observer si ce halo est toujours présent chez le mutant  $\Delta mxD$ . A l'issue de cette deuxième phase d'incubation, une nouvelle étape de lavage est réalisée. Celle-ci est plus intense que la première (flux croissant jusqu'à 60 rpm) et permet de détacher l'ensemble des biofilms formés et de retrouver des bactéries, pour la plupart, isolées. Optiquement, les bactéries présentes sur la surface sont immobiles et semblent donc permettre une observation par microscopie à force atomique.



**Figure 5-7 - Suivi de l'évolution de la densité de surface en bactéries au sein du canal microfluidique.** Images de la surface de la lame d'ITO insérée dans la cellule micro-fluidique à différents temps d'incubation (indiqués sur chaque image). Elles ont été prises au microscope optique inversé à contraste de phase (ZEISS Primovert), grossissement 20 x. L'échelle est de 10 µm sur l'ensemble des images. Sur l'image annotée « t = 17h30 », les points noirs indiquent la position des bactéries sur l'image initiale annotée « t = 0 après premier lavage ». Sur les images annotées t = 3h30, t = 6h30 et t = 17h30, les bactéries sont sous un flux de 5mL/h de milieu tampon M63 supplémenté de 1 mM de MgSO<sub>4</sub>, 0,005 g/L de glucose et 0,0125 g/L de casaminoacides à 23°C et inoculées à une densité optique de 0,01.

Différents paramètres ont été modifiés afin de tenter de raccourcir le temps de préparation des échantillons : restriction à une seule phase d'incubation, allongement du temps d'incubation initial, incubation initiale dans un milieu plus riche ou à une température plus élevée. Un temps d'incubation d'une heure (de l'ordre du temps de division cellulaire) à température ambiante (23°C) dans le milieu M63 supplémenté de 1 mM de MgSO<sub>4</sub>, 0,005 g/L de glucose et 0,0125 g/L de casaminoacides semble permettre d'obtenir des bactéries immobiles et donc potentiellement adhérentes sur la surface. En vérifiant la répartition spatiale de la densité surfacique en bactéries à l'issue de la première phase d'incubation (en statique), nous avons pu constater la présence de gradients de concentration en bactéries (Figure 5-8). En effet, au voisinage des bords du canal (zone 1 de la Figure 5-8), la densité en bactéries était beaucoup plus importante et les bactéries beaucoup plus motiles que les bactéries au centre du canal (zone 2 de la Figure 5-8). Lors de la mise sous flux pour la deuxième phase d'incubation, ce résultat n'est plus observé. Ce phénomène peut s'expliquer par la présence d'une concentration en dioxygène plus importante sur les bords qu'au centre du canal - l'oxygène pouvant diffuser au travers des bords en PDMS - lors de la phase d'incubation en milieu statique, favorisant la migration des bactéries vers les bords du canal.



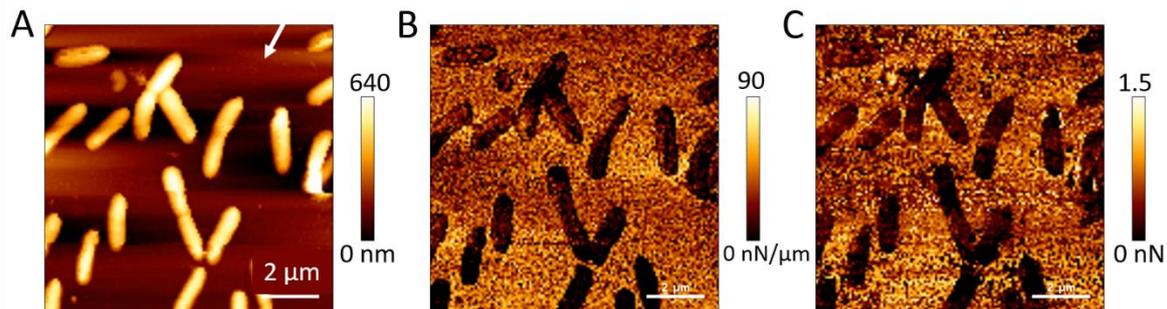
**Figure 5-8 - Inhomogénéité de la densité de surface en bactéries au sein du canal micro-fluidique.** Image prise au microscope optique inversé à contraste de phase (ZEISS Primovert), grossissement 20x. La ligne noire en pointillés démarque deux zones de densité surfacique bactérienne différentes. La zone 1 est la plus proche des bords du canal et présente une densité surfacique en bactéries élevée avec des mouvements de nage rapide, semblables à ceux observés en milieu oxygéné. Au contraire, la zone 2, plus proche du centre du canal, présente une densité surfacique en bactéries plus faible et des bactéries immobiles. Les bactéries sont ici observées dans un milieu tampon M63 supplémenté de 1 mM de  $MgSO_4$ , 0,005 g/L de glucose et 0,0125 g/L de casaminoacides à 23°C.

b. Résultats obtenus au microscope à force atomique

L'ensemble des paramètres (résolution =  $128 \times 128$  pixels<sup>2</sup>, set point = 2 nN, Z length = 500  $\mu$ m, type de levier CSC38 no Al) permettant d'aboutir aux cartographies de microscopie à force atomique présentée sur la Figure 5-9 est le même que celui indiqué pour les balayages de la Figure 5-4. La mesure s'effectue dans 600  $\mu$ L de milieu M63 supplémenté de 1 mM de  $MgSO_4$ , 0,005 g/L de glucose et 0,0125 g/L de casaminoacides.

La Figure 5-9.A indique la topographie des bactéries. On peut noter la présence de nombreuses bactéries d'environ 2  $\mu$ m de long dont certaines sont reliées entre elles. Ces dernières seraient peut-être en fin de division cellulaire. Leur hauteur est de l'ordre de 640 nm, ce qui correspond à celle attendue [11], et leurs contours sont bien dessinés. La présence de zones de hauteur non nulle sur le substrat (pixels marron/rouge indiqués par une flèche blanche sur la Figure 5-9.A) semble indiquer la présence d'une surcouche fine sur la surface. La cartographie de rigidité présentée Figure 5-9.B montre que la rigidité de la surface des bactéries est homogène et plus faible que celle du substrat. Toutefois, la valeur plus faible de la rigidité maximale mesurée hors bactéries (90 nN/m comparé à 120 nN/m) semble confirmer la présence d'une surcouche de type polymérique sur la surface de la lame d'ITO. Enfin, la cartographie d'adhésion montre que la surface du substrat est plus adhésive que la surface des bactéries et que ces valeurs de forces d'adhésion, de répartition bimodale, sont homogènes à la fois sur les bactéries et sur le substrat. Ces résultats peuvent s'interpréter soit par la présence d'une surcouche fine à la surface de la lame d'ITO ou bien encore par un artefact lié à la contamination de la pointe AFM

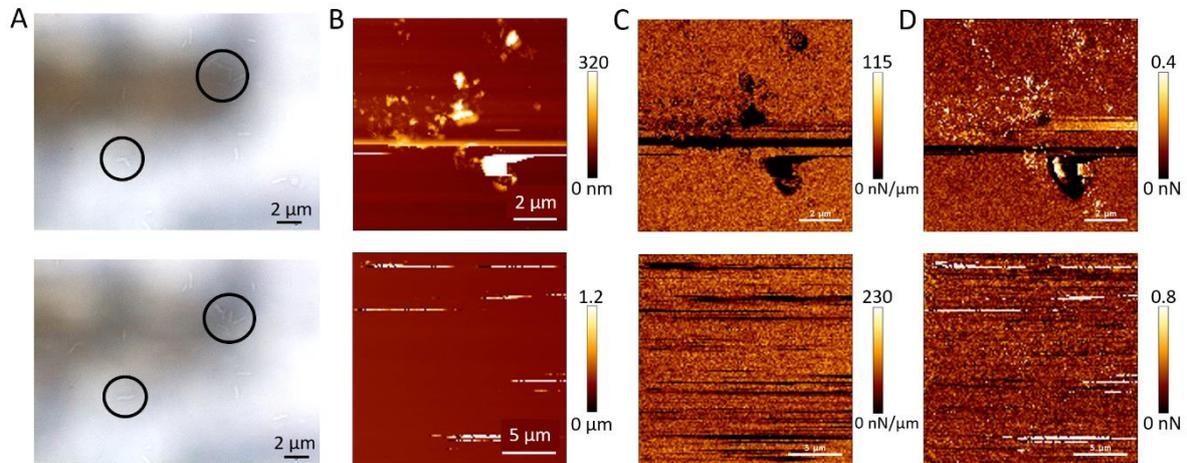
par de la matrice extracellulaire ou une partie de membrane bactérienne qui s'y serait fixée lors de la phase d'approche de la pointe vers la surface.



**Figure 5-9 - Cartographies des bactéries à la surface de la lame d'ITO obtenues par microscopie à force atomique à l'issue du protocole de micro-fluidique.** *Cartographie reconstituée à partir des courbes approche/retrait mesurée en chaque pixel. (A) Topographie de la surface, (B) Cartographie de la rigidité de la surface, (C) Cartographie de l'adhésion de la pointe au substrat. Les bactéries sont ici observées dans un milieu tampon M63 supplémenté de 1 mM de  $MgSO_4$ , 0,005 g/L de glucose et 0,0125 g/L de casaminoacides à 23°C.*

Ces premières observations par AFM encourageantes n'ont malheureusement pu être reproduites qu'en de très rares occasions. L'ensemble des autres échantillons présentait plutôt des cartographies comme celles présentées sur la Figure 5-10.B-D. Les images sur la première ligne sont caractéristiques du détachement de la bactérie du substrat au cours du scan AFM et ce malgré la présence d'une zone adhésive (Figure 5-10.D, haut). Les bactéries ne sont probablement pas accrochées sur l'ensemble de leur surface mais seulement à une de leurs extrémités. On retrouve cette même observation chez *E. coli* et *P. aeruginosa* [12]. Lors d'un balayage, la partie non adhérente se met en mouvement et induit la réorientation ou le décrochement de la bactérie. Cet effet est visible sur les images de microscopie optique (Figure 5-10.A) où les bactéries entourées de cercles noirs ont changé d'orientation entre le début (image du haut) et la fin du scan (image du bas). Les traînées de hauteur (ou d'adhésion) élevées visibles sur les images de la deuxième ligne soulignent le passage de bactéries sous la pointe lors d'une phase d'approche de la pointe au substrat. La présence de ces bactéries nageant au voisinage de la surface empêche toute visualisation de la surface. Ainsi nous vérifions que l'observation des bactéries apparaissant immobiles en microscopie optique ne signifie pas qu'elles soient suffisamment adhérentes sur l'échantillon pour mener à bien les observations AFM. L'utilisation de la cellule micro-fluidique n'a pas apporté les résultats espérés quant à l'élaboration d'un protocole d'adhésion rapide et contrôlée des bactéries au substrat. Pour revenir aux résultats de Lee et al, la seconde phase d'incubation semble cruciale pour induire une réponse d'adhésion et une croissance bactérienne exponentielle sur la surface. On retrouve cette observation sur les images optiques où la sécrétion de matrice semble débiter 1 h 30 après le début de la deuxième phase d'incubation. Notre protocole d'adhésion, utilisant la cellule micro-fluidique sur deux temps d'incubation, semble donc envisageable si l'on accepte des temps de préparation d'échantillons plus longs ou que l'on

souhaite s'intéresser aux propriétés adhésives de la matrice extracellulaire. Toutefois, la recherche d'un protocole rapide nous a conduits à la mise en place d'une troisième méthode, celle de l'application d'un potentiel positif à la surface de la lame d'ITO dont les résultats sont présentés dans la partie suivante.



**Figure 5-10 - Cartographies typiques de la surface de la lame d'ITO obtenues par microscopie à force atomique lorsque les bactéries ne sont pas correctement adhérees.** (A) Images optiques prises, au grossissement 40 x, avant (image du haut) et après (image du bas) un balayage de la surface par la pointe AFM : des bactéries semblant immobiles sur l'image du haut (entourées d'un cercle noir) ont disparu ou se sont déplacées sur la surface empêchant toute cartographie de leur surface. (B-D) Cartographie reconstituée à partir des courbes approche/retrait mesurée en chaque pixel. (B) Topographie de la surface, (C) Cartographie de la rigidité de la surface, (D) Cartographie de l'adhésion de la pointe au substrat.

#### **IV. Fixation des bactéries par application d'un potentiel positif à la surface du substrat conducteur**

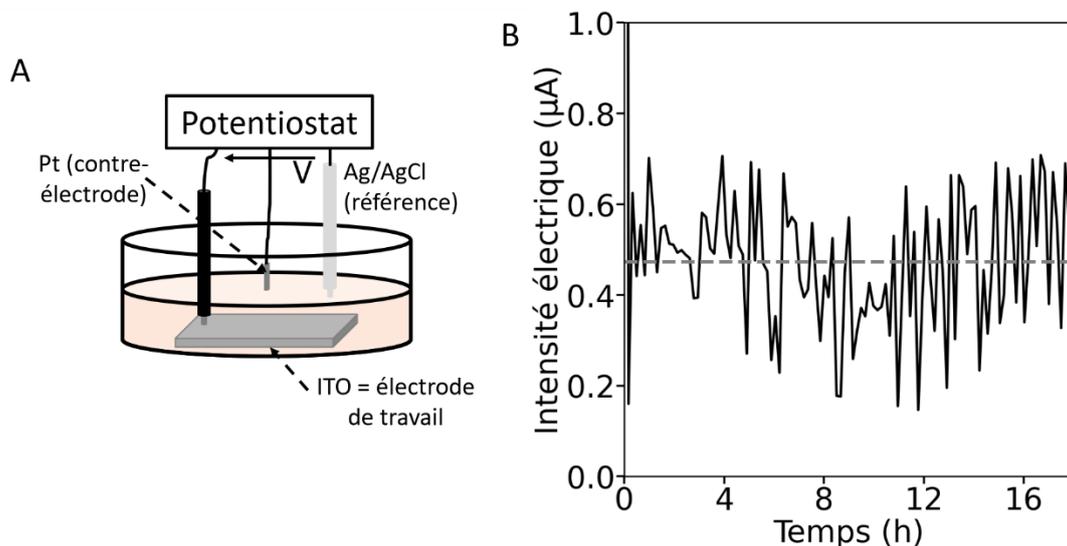
Dans le modèle d'adhésion couramment proposé [13], la suspension bactérienne est assimilée à une suspension colloïdale dans laquelle les bactéries sont en interaction de type électrostatique (longue portée) et Van der Waals (courte portée) avec la surface du substrat : c'est la théorie DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek). Lors de l'immersion d'une surface dans un électrolyte, cette dernière va acquérir une certaine charge de surface dépendant des propriétés physico-chimiques du milieu liquide (pH, point isoélectrique...). La théorie DLVO indique alors que des contre-ions vont venir s'accumuler au voisinage de la surface créant ainsi une double couche électrique. Ce phénomène a lieu à la fois à la surface du substrat et de la membrane des bactéries. Selon la force ionique de l'électrolyte, l'écrantage des charges initialement portées par la surface ou la membrane bactérienne sera plus ou moins important. Ainsi, les interactions électrostatiques liées au recouvrement des doubles couches du substrat et des bactéries seront plus ou moins grandes. Par la suite, lorsque les bactéries se situent au voisinage de la surface du substrat, celles-ci devraient être piégées par la force attractive de Van der Waals sans pouvoir s'en extraire sous le simple effet du mouvement brownien induisant alors leur attachement irréversible à la surface. L'effet des liaisons hydrogène, également de courte portée et d'intensité plus importante que la liaison de van der Waals, est aussi à prendre en compte dans le piégeage des bactéries au voisinage de la surface. L'adhésion des bactéries se ferait en deux étapes : une première étape d'adhésion réversible via l'attraction électrostatique des bactéries vers la surface suivie d'une seconde étape irréversible via l'attachement par des nanofibres (flagelles, pili) ou des polymères extracellulaires (chaîne de polysaccharides) [13].

Ainsi, on remarque que, dans la littérature, les méthodes électriques sont souvent utilisées pour lutter contre la formation de biofilms en inhibant notamment la première étape d'adhésion des bactéries à un substrat solide grâce à la création de charges négatives sur sa surface. Nous proposons ici d'utiliser le protocole inverse, c'est-à-dire créer des charges positives sur la surface pour favoriser l'adhésion des bactéries sur cette surface. Notons que ces charges positives sur la surface ne doivent être présentes qu'au cours de la phase d'adhésion et qu'elles doivent disparaître lors des mesures électriques par AFM afin de ne pas perturber le signal.

##### **1. Matériels et méthodes**

Dans un premier temps, une différence de potentiel (ddp) de + 100 mV entre le film d'ITO et une électrode de référence Ag/AgCl est appliquée. Des tests ont également été effectués avec une valeur de ddp égale à + 200 mV. Initialement, cette tension continue a été appliquée par un générateur basse fréquence (Waveform Generator 33500B Series, Agilent). Toutefois, afin de s'assurer que ce potentiel reste constant au cours du temps entre la couche d'ITO (électrode de travail) et l'électrode de référence, un potentiostat a été préféré (WaveNow<sup>XV</sup>, Pine Research, Equilabrium, France). Une méthode de chronoampérométrie est utilisée. Le courant circulant entre la contre électrode, une feuille de platine de 5 mm de large sur 12 mm de haut et d'épaisseur 250  $\mu\text{m}$  (GoodFellow), et l'électrode de travail (lame d'ITO) est mesuré, afin de

contrôler la reproductibilité des processus électriques (non faradiques) et le sens de circulation des électrons. Le montage ainsi que le chronoampérogramme obtenu sont présentés sur la Figure 5-11. Sur le schéma du montage, la connexion entre la surface d'ITO et le circuit électrique extérieur s'effectue à l'aide d'une tige en platine gainée (Pine Research - Equilibrium – France). Le chronoampérogramme présente une variation temporelle de l'intensité électrique autour d'une valeur moyenne de 0,47  $\mu\text{A}$ . Toutefois la valeur du premier point est bien plus élevée puisqu'elle est égale à 10,6  $\mu\text{A}$ . Ce pic d'intensité, suivi d'une décroissance exponentielle est classiquement observé lors des mesures de chronoampérométrie à cause de l'application d'une marche de potentiel de 0 à + 100 mV. L'observation d'un signal électrique constant souligne le comportement résistif du système dont la résistance équivalente est de l'ordre de  $2.10^7 \Omega$ . Cette résistance est due à la somme de la résistance de contact entre l'électrode et la solution avec la résistance de la solution liquide (conductivité du milieu de culture mesurée à  $1,8 \text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$ ) La valeur que nous trouvons est similaire à celle obtenue dans [1]. De plus, nous pouvons noter que le signe de l'intensité électrique reste positif tout au long de l'expérience, indiquant une charge positive de la surface.



**Figure 5-11 - Chronoampérométrie.** (A) Montage électrique à trois électrodes utilisé pour appliquer un potentiel positif constant  $V$  de +100 mV entre la surface d'ITO et l'électrode de référence Ag/AgCl. Le contact entre la couche d'ITO et le circuit électrique extérieur est effectué à l'aide d'une tige de platine gainée. La contre électrode est une feuille de platine. L'ensemble des mesures électriques est effectué à l'aide d'un potentiostat. (B) L'intensité électrique mesurée entre la contre électrode (platine) et l'électrode de travail (ITO) est mesurée au cours du temps. Après une première mesure d'intensité électrique élevée (égale à 10,5  $\mu\text{A}$ ), le courant reste constant autour de la valeur moyenne de 0,47  $\mu\text{A}$  (ligne grise en pointillés).

## 2. Résultats et discussions

Différents tests ont été réalisés :

- Modification de la valeur de la différence de potentiel appliquée entre la lame d'ITO et l'électrode de référence (+ 100 mV ou + 200 mV vs Ag/AgCl),

- Modification du temps d'incubation entre 1 h et 20 h,
- Modification de la concentration initiale en bactéries,
- Création d'un environnement anaérobie juste après la mise en contact des bactéries avec la surface par circulation d'un flux d'azote dans la chambre de culture pendant une heure (utilisation de la cellule présentée sur la Figure 3-8 du Chapitre 3).

Ces différents tests nous ont permis de remarquer que les paramètres critiques de ce protocole étaient : la valeur du potentiel à appliquer (+100 mV vs Ag/AgCl), la durée de la phase d'incubation (20 h) et la création de l'environnement anaérobie. En effet, la densité optique de l'inoculum n'a ici aucune influence et les temps d'incubation trop courts (< 5 h) ne permettent pas l'observation de bactéries adhérentes par AFM.

L'ensemble des paramètres (résolution = 128x128 pixels<sup>2</sup>, set point = 2 nN, Z length = 500 µm, type de levier CSC38 no Al) de balayage AFM est le même que celui indiqué pour la Figure 5-7. La mesure s'effectue dans 600 µL de milieu LB. Comme dans la partie I, la densité surfacique en bactérie est contrôlée avant tout scan AFM : la lame d'ITO est insérée sur le porte échantillon et un flux de liquide de faible vitesse est appliqué par pipetages lents successifs jusqu'à obtenir une densité surfacique en bactéries - observée directement au microscope optique - souhaitée.

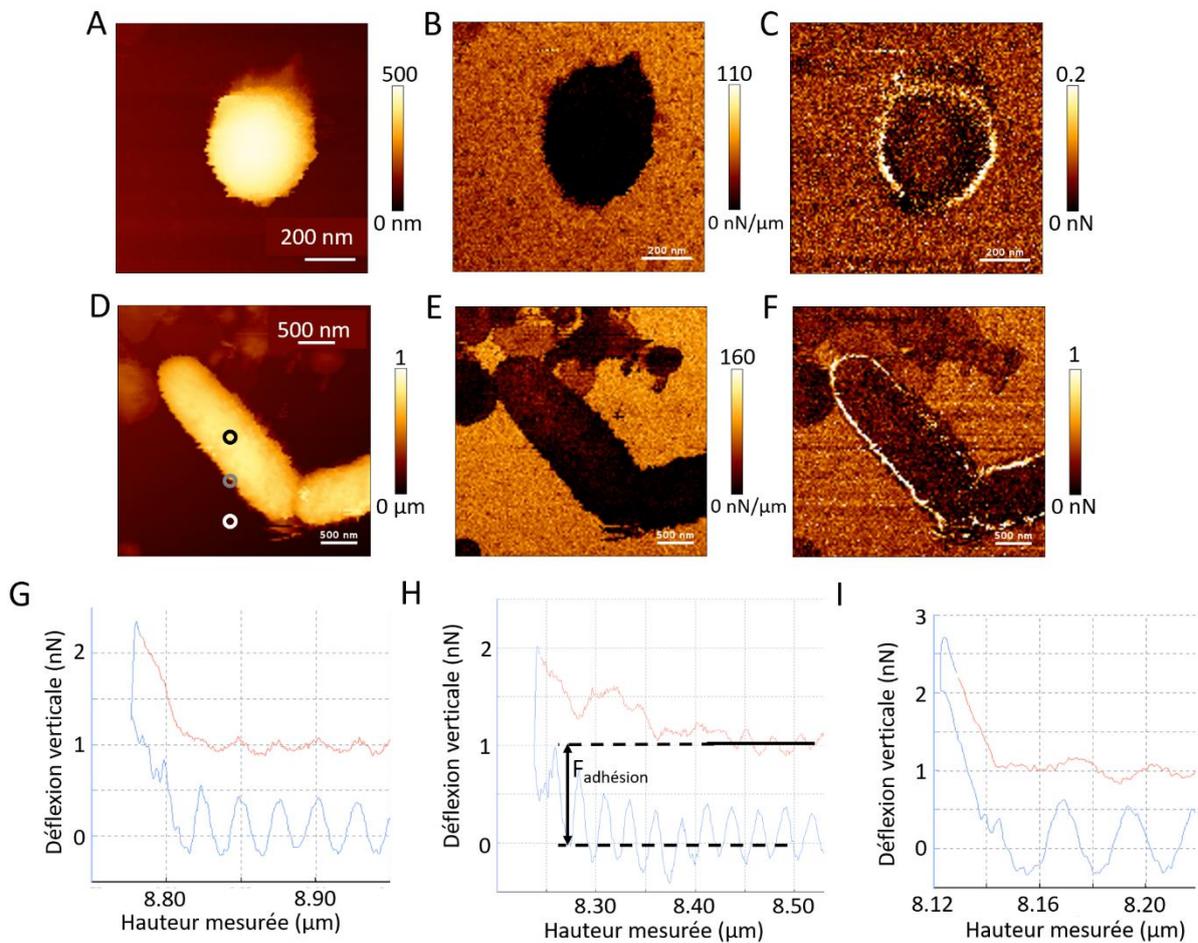
Les cartographies présentées sur la Figure 5.12.A-C sont les résultats d'un protocole où un potentiel de + 200 mV (vs Ag/AgCl) a été appliqué sur la lame d'ITO sur 20 h en condition aérobie. La première observation que l'on peut faire est celle de la forme ronde des bactéries de diamètre égal à 420 nm. La cartographie de hauteur indique une hauteur de l'ordre de 500 nm homogène sur l'ensemble de la bactérie. Cette hauteur est deux fois plus petite que celle attendue. La cartographie de rigidité montre une rigidité uniforme sur l'ensemble de la bactérie y compris sur le halo d'épaisseur plus fine en haut de la bactérie correspondant probablement à des extensions membranaires. Enfin, la cartographie de la force d'adhésion indique une force d'adhésion faible sur la membrane de la bactérie exposée à la pointe semblant indiquer l'absence de matrice extracellulaire sur ce côté de la surface. Au contraire, l'immobilité de la bactérie sous plusieurs scans successifs indique la présence de force d'adhésion importante de la bactérie au substrat. La présence de bactéries rondes, que l'on retrouve dans des milieux limitants comme la phase stationnaire de croissance, semble indiquer que les contraintes appliquées sont trop fortes pour permettre le développement de bactéries allongées, forme habituellement observée par *S. oneidensis* en phase de croissance exponentielle [8]. Un autre protocole où, cette fois, un potentiel de + 100 mV a été appliqué sur toute une nuit en condition anaérobie est testé. Les résultats sont présentés sur la Figure 5-12.D-F. La Figure 5-12.D montre des bactéries allongées, de 2 µm de long et de hauteur 1 µm, typiques des valeurs attendues. La cartographie de rigidité (Figure 5-12.E) présente une rigidité uniforme sur l'ensemble de la bactérie. Les zones de faibles rigidités, en haut à gauche de l'image, correspondent probablement à la présence de débris cellulaires dont la hauteur est plus faible. Enfin la Figure 5-12.F indique la présence d'une zone particulièrement adhérente sur le contour de la bactérie (force de 1nN). Ce résultat pourrait indiquer la sécrétion de matrice extracellulaire ou la formation d'appendices d'adhésion par les bactéries permettant leur

fixation à la surface. Les bactéries sont ici restées immobiles au cours de plusieurs scans AFM successifs indiquant une adhésion importante de la bactérie au substrat. Au contraire, la force d'adhésion est faible sur la membrane exposée à la pointe. L'ensemble de ces données semble indiquer que ce protocole est particulièrement adapté à l'obtention de bactéries suffisamment adhérentes pour pouvoir être imagées par AFM. Toutefois des tests plus précis de viabilité cellulaire comme celui du Live/Dead doivent être effectués pour vérifier que les bactéries adhérentes sont bien vivantes.

Les courbes approche/retrait obtenues sur le substrat, sur le bord de la bactérie, et sur la bactérie de la cartographie Figure 5-12.D sont présentées respectivement sur les Figures 5-12.G-I. On retrouve une allure de la courbe d'approche obtenue sur le contour de la bactérie similaire à celle présentée sur la Figure 5-1.B (ligne bleue continue). Notons que l'allure de la courbe de retrait est différente de celle obtenue à l'air et présentée sur la Figure 3-6 (chapitre 3 de ce manuscrit). En effet, les courbes d'approche et de retrait, au-delà de la zone de contact répulsive, ne se superposent plus. Cette différence s'explique par la force de traînée appliquée sur le levier AFM lors des mouvements dans le milieu liquide visqueux. Les oscillations présentes sur les courbes d'approche (courbes rouges) pour des grandes valeurs de hauteur proviennent des oscillations résiduelles apparues lors du retrait de la pointe : lors de son retrait, la pointe se détache d'une zone présentant une certaine adhésion et va donc se mettre à osciller librement. Dans notre cas, la décroissance du régime amorti n'est pas suffisamment rapide pour permettre à la pointe de retrouver un état stable avant une nouvelle approche. Pour corriger cela, nous aurions dû augmenter la hauteur de retrait de la pointe entre deux balayages ou diminuer la vitesse de scan.

Ces observations concordent avec d'autres résultats présentés dans la littérature. L'adhésion des bactéries à une surface chargée positivement est également observée par Hong et al [14] grâce aux interactions électrostatiques entre surfaces de charges opposées qui favoriseraient une adhésion irréversible des bactéries au substrat solide. Toutefois, la valeur du potentiel positif doit rester faible puisque des potentiels trop élevés (de l'ordre de 800 mV) diminuent la viabilité des cellules. [15]. Par ailleurs, d'autres études soulignent l'existence de processus de croissance et de division cellulaires singuliers des bactéries adhérentes à des surfaces chargées positivement. Des bactéries de plus petites tailles associées à des temps de croissance plus faibles sont observées sur des surfaces chargées positivement comparativement à celles chargées négativement [16]. D'autres études indiquent même que, bien que les bactéries (tant gram-positives que négatives) adhèrent plus rapidement à une surface chargée positivement que négativement, les bactéries gram-négatives ne se divisent pas sur une surface chargée positivement contrairement aux bactéries gram-positives (une croissance exponentielle étant constatée pour les deux catégories au contact d'une surface chargée négativement). Cela serait lié aux trop fortes interactions électrostatiques attractives avec la surface qui induiraient une adhésion des bactéries tellement importante qu'elle réprimerait l'élongation nécessaire à la division cellulaire. [17]. On pourrait également imaginer que la polarisation positive du substrat empêche la diffusion de particules nécessaires à la respiration cellulaire et donc à la croissance

bactérienne. Enfin, on peut souligner que l'ensemble de ces forces s'applique également aux bactéries filles qui auront donc davantage tendance à rester au voisinage de la surface.



**Figure 5-12 - Cartographies des bactéries à la surface de la lame d'ITO obtenues par microscopie à force atomique à l'issue de l'application d'un potentiel positif sur le substrat conducteur.** Cartographie reconstituée à partir des courbes approche/retrait mesurée en chaque pixel. (A,D) Topographie de la surface, (B,E) Cartographie de la rigidité de la surface, (C,F) Cartographie de l'adhésion de la pointe au substrat. Les images sur la première ligne sont associées aux paramètres expérimentaux suivants : application d'un potentiel de + 200 mV (vs Ag/AgCl) sur toute une nuit en condition aérobie. La deuxième ligne correspond, elle, à l'application d'un potentiel de + 100 mV (vs Ag/AgCl) sur toute une nuit en condition anaérobie. La densité optique de l'inoculum pour ces deux séries de mesures est de 0.03. La tension appliquée est contrôlée à l'aide d'un potentiostat. (G-I) Courbes approche-retrait à l'origine des cartographies D à F prises en différents pixels marqués par des cercles vides sur la cartographie D : sur la bactérie (G, cercle vide noir), au bord de la bactérie sur la zone adhésive (H, cercle vide gris), sur le substrat (I, cercle vide blanc). Les bactéries sont ici observées dans un milieu riche LB (pH = 6,5) à 23°C.

## V. Conclusion

Nous avons vu dans ce chapitre, la difficulté à établir un protocole efficace et reproductible d'adhésion des bactéries à la surface d'un substrat conducteur. L'ensemble des résultats obtenus par les trois protocoles, du simple dépôt d'une goutte de milieu de culture bactérienne à l'utilisation d'une cellule micro-fluidique ou l'application d'un potentiel positif sur la couche conductrice d'ITO, semble souligner l'importance de deux phases d'incubation ou au moins d'une phase longue d'incubation sur toute une nuit pour obtenir des bactéries suffisamment adhérentes pour les cartographies AFM.

Le paramètre clé du premier protocole résidait dans l'évaporation du surplus de liquide avant le rinçage. Celui-ci étant trop difficile à contrôler dans notre cas, ce protocole ne semble pas utilisable. L'utilisation d'une cellule micro-fluidique sur des temps courts d'incubation est inadaptée dans nos conditions de culture car aucune bactérie n'est suffisamment adhérente pour permettre de réaliser son image AFM. Toutefois, la sécrétion de matrice extracellulaire 1 h 30 après le début de la deuxième phase d'incubation serait peut-être une possibilité à exploiter si l'on souhaite étudier les propriétés de la matrice extracellulaire. Enfin, le protocole avec application d'un potentiel positif de + 100 mV en condition anaérobie sur toute une nuit semble être celui qui répond à toutes les attentes : les cartographies par AFM semblent indiquer la présence de bactéries viables adhérant à la surface et dont la membrane exposée à la pointe AFM est peu adhérente. Ce protocole nécessite donc d'être étudié plus attentivement et un contrôle par fluorescence de la viabilité des cellules (mesurée via l'intégrité ou non des membranes cellulaires) par un test Live/Dead doit être fait pour vérifier que les bactéries sont bien vivantes. Le lavage de la lame à l'aide d'aspiration/écoulement successifs de milieu de culture visualisé directement sur le microscope utilisé pour les mesures AFM permet d'obtenir une densité surfacique en bactéries idéale et de minimiser le nombre de bactéries nageantes facilitant ainsi les observations AFM.

A présent que la pointe est fonctionnalisée et que le protocole d'adhésion semble converger, les mesures électriques vont pouvoir être mises en place. Un premier balayage à potentiel nul permettra d'obtenir la cartographie de forces. L'utilisation du potentiostat permettra ensuite d'extraire le facteur de conversion entre la cartographie de forces et la cartographie de charges. L'ensemble des programmes permettant l'analyse des données reste également à écrire.

## Références :

- [1] C. Marlière, S. Dhahri, *An in vivo study of electrical charge distribution on the bacterial cell wall by atomic force microscopy in vibrating force mode*. *Nanoscale*, **7**, 8843-8857 (2015)
- [2] T. L. Sounart, H. V. Panchawagh, R. L. Mahajan, *Frequency-dependent stability of parallel-plate electrostatic actuators in conductive fluids*. *Appl. Phys. Lett.*, **96**, 203505 (2010)
- [3] E. Dague, J. Duval, F. Jorand *et al*, *Probing surface structures of Shewanella spp. by microelectrophoresis*. *Biophysical Journal*, **90**, 2612-2621 (2006)
- [4] E. Dague, *Physico-chimie des interfaces bactérie – solution aqueuse*. PhD thesis. Université Henri Poincaré – Nancy 1, France (2006)
- [5] G. Francius, P. Polyakov, J. Merlin *et al*, *Bacterial surface appendages strongly impact nanomechanical and electrokinetic properties of Escherichia coli cells subjected to osmotic stress*. *PloS one*, **6**, e20066 (2011)
- [6] A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. Wiley, New York, 2nd edn (2001)
- [7] R. Shuttleworth, *The surface tension of solids*. *Proc. Phys. Soc. A*, **63**, 444 (1950)
- [8] S. Dhahri, *Analyse topographique, mécanique et électrochimique à l'échelle sub-micrométrique de processus pilotés par les bactéries*. PhD thesis. Université Montpellier 2, France (2013)
- [9] C. K. Lee *et al.*, *Multigenerational memory and adaptive adhesion in early bacterial biofilm communities*. *Proc. Nat. Ac. Sci.*, **115**, 4471-4476 (2018)
- [10] T. Tolker-Nielsen, C. Sternberg, *Growing and analyzing biofilms in flow chambers*. *Current protocols in microbiology*, **21**, 1B-2 (2011)
- [11] K. Venkateswaran *et al.*, *Polyphasic taxonomy of the genus Shewanella and description of Shewanella oneidensis sp. nov.* *International Journal of Systematic Bacteriology*, **49**, 705-724 (1999)
- [12] M. C. Duvernoy *et al.*, *Asymmetric adhesion of rod-shaped bacteria controls microcolony morphogenesis*. *Nat. Commun.*, **9**, 1120 (2018)
- [13] K. Hori, S. Matsumoto, *Bacterial adhesion: from mechanism to control*. *Bioch. Eng. J.*, **48**, 424-434 (2010)
- [14] S. H. Hong, J. Jeong, S. Shim, H. Kang, S. Kwon, K. H. Ahn, J. Yoon, *Effect of electric currents on bacterial detachment and inactivation*. *Biotech. Bioeng.*, **100**, 379-386 (2008)
- [15] T. Nakayama, H. Wake, K. Ozawa, H. Kodama, N. Nakamura, T. Matsunaga, *Use of a titanium nitride for electrochemical inactivation of marine bacteria*. *Env. Sci. Tech.*, **32**, 798-801 (1998)

[16] J. P. Busalmen, S. R. de Sánchez, *Electrochemical polarization-induced changes in the growth of individual cells and biofilms of Pseudomonas fluorescens (ATCC 17552)*. Appl. Env. Microbiol., **71**, 6235 (2005)

[17] B. Gottenbos, D. W. Grijpma, H. C. Van Der Mei, J. Feijen, H. J. Busscher, *Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering Gram-positive and Gram-negative bacteria*. J. antimicrob. Chemoth., **48**, 7-13 (2001)



# Conclusion générale

Au début de ce projet de thèse, la thématique électrochimique constituait un nouvel axe de recherche. L'objectif de la thèse était donc avant tout d'explorer différentes voies d'étude de l'électroactivité bactérienne par une approche pluridisciplinaire (physique, chimie et biologie) et multi-échelle (du macroscopique au microscopique).

Ce travail s'est principalement focalisé sur l'étude de la biocorrosion du fer par la bactérie *S. oneidensis*. L'idée d'utiliser des nanofilms avait déjà été suggérée au sein de l'équipe et des tests préliminaires semblaient indiquer la possibilité de suivre le phénomène de biocorrosion par des mesures optiques et électriques sur un nanofilm de fer. L'objectif consistait donc à poursuivre cette piste de recherche en créant l'ensemble du dispositif expérimental permettant de quantifier ce phénomène de biocorrosion.

La première étape (Chapitre 2) du travail de thèse a consisté à caractériser les propriétés physique et chimique de ces nanofilms, thermiquement évaporés au laboratoire, dont la stabilité observée en milieu abiotique semblait particulièrement intéressante. Tout d'abord, l'analyse des propriétés d'absorption optique du fer nous a amené à choisir une épaisseur de 10 nm de fer afin de minimiser les valeurs des coefficients de réflexion/transmission aux interfaces et d'obtenir une transparence suffisamment importante pour pouvoir visualiser les bactéries sur la surface en transmission optique et permettre une grande sensibilité dans la variation de l'intensité lumineuse transmise. Des mesures de spectroscopie photoélectronique à rayons X et de microscopie à force atomique nous ont permis de découvrir que les nanofilms de fer présentaient une surface granulaire nanorugueuse et homogène composée d'oxydes de Fe(II) et Fe(III) (avec une prédominance de Fe(III)). Les mesures de réflectivité X en incidence rasante et de résistivité électrique soulignent, quant à elles, la présence d'une couche de Fe(0) partageant des propriétés volumiques - électrique et chimique - communes à une feuille épaisse de Fe(0). Le point à souligner ici concerne la résistance particulière du nanofilm de fer à la corrosion abiotique lors de son immersion en milieu aqueux sur plusieurs jours. Celui-ci semble protégé par la présence de la couche d'oxydes dont la stabilité pourrait provenir de la méthode de dépôt utilisée. En effet, la faible taille des grains et la présence d'une plus grande densité de joints de grain permettraient d'empêcher la diffusion de molécules corrosives au travers de la couche d'oxydes.

La seconde étape (Chapitre 3) concernait la mise en place du dispositif expérimental permettant de suivre pas à pas le phénomène de biocorrosion de l'échelle macroscopique à l'échelle microscopique. Pour cela, un montage de mesures de transmittance optique a été construit et étalonné puis combiné à un montage de mesures électriques à deux électrodes. Deux dispositifs expérimentaux ont été dessinés et fabriqués sur mesure au laboratoire : l'un pour nous permettre d'étudier l'influence du contact direct entre les bactéries et le nanofilm de fer sur le phénomène de biocorrosion et le second pour suivre le comportement des bactéries sur ou au voisinage du nanofilm de fer avant, pendant et après la dégradation du nanofilm de fer.

La dernière étape (Chapitre 4) repose sur l'utilisation de ce dispositif expérimental pour caractériser le phénomène de biocorrosion du nanofilm de fer en présence de la bactérie *S. oneidensis* en milieu aqueux à pH neutre. L'ensemble des expériences a montré que l'utilisation de nanofilms semi-transparents était un outil particulièrement intéressant et prometteur pour suivre pas à pas le processus de biocorrosion in situ et en temps réel. Trois phases distinctes ont été mises en évidence : initiation, corrosion homogène et uniforme et post-corrosion. La suite de notre étude s'est particulièrement focalisée sur la recherche de l'origine de cette phase d'initiation. Les résultats montrent que lors de la phase d'initiation, les bactéries consomment le dioxygène dissous dans le milieu liquide créant alors un gradient de concentration en dioxygène dont la valeur nulle au voisinage du nanofilm de fer sera atteinte plus ou moins rapidement selon la concentration initiale en bactéries. Une fois cet environnement anaérobie local atteint, un changement de métabolisme des bactéries pourrait conduire à une respiration anaérobie des oxydes de fer et/ou une assimilation des ions ferreux/ferriques composant la nanocouche passive sur le nanofilm de Fe(0). Cette interaction des bactéries avec la couche passive finirait par induire sa rupture et le Fe(0) sous-jacent, alors au contact du milieu aqueux, se dégraderait selon les réactions de corrosion chimiques. Ce scénario semble confirmé par différents points :

- L'ajout de fer (III) soluble dans le milieu liquide retarde le déclenchement de la corrosion et suggère donc une compétition entre le fer soluble plus facilement assimilable et le fer oxydé solide plus difficilement accessible,
- Les mesures d'intensité électrique et de potentiel en circuit ouvert indiquent une potentielle modification électrochimique du nanofilm avant la visualisation optique du déclenchement de la corrosion. Malgré la faible conductivité de la couche d'oxyde, des transferts de charges peuvent avoir lieu en son sein. Des modifications de structure ou de composition de l'interface liquide-oxyde pourraient influencer la valeur du potentiel dans la sous-couche de Fe(0) et induire sa dissolution,
- Le retard du déclenchement de la corrosion lors de l'utilisation de mutants délétés dans les cytochromes de la membrane externe – connus pour être impliqués dans le transfert extracellulaire des électrons vers les oxydes ferriques chez *S. oneidensis* en milieu anaérobie - indique l'importance de cette voie dans l'interaction avec la nanocouche d'oxyde de fer

L'analyse des images obtenues par microscopie ne révèle pas d'activité bactérienne particulière (formation précoce de biofilm par exemple) ni d'affinités spécifiques des bactéries pour le nanofilm de fer lors de la phase d'initiation. Toutefois, elles permettent de mettre en évidence la réponse chimiotactique des bactéries face à la dissolution du nanofilm de fer, quantifiée par le soudain afflux de bactéries au voisinage du nanofilm au cours des trente premières minutes suivant le déclenchement de la corrosion. Enfin il est intéressant de souligner que les expériences réalisées sur *E. coli* and *L. plantarum*, nos deux témoins initiaux, montrent que ces deux bactéries sont capables d'induire la transition vers la corrosion rappelant que la transformation et la dissolution du fer environnant est une propriété remarquable partagée par un grand nombre d'espèces bactériennes même non exoélectrogènes.

L'ensemble des résultats présentés ici indique que l'utilisation de nanocouches combinée à des montages de mesures optiques et électriques, du macroscopique au microscopique permet d'avoir accès à de nombreuses informations sur les premières étapes d'interactions des bactéries avec la surface d'un substrat. Ce dispositif pourrait donc offrir de nouvelles possibilités quant à la compréhension des actions bactériennes au sein d'autres processus tels que la biodégradation de plastique ou la biorémédiation de polluants solides.

Dans cette étude, les perspectives à court terme seraient d'utiliser une autre méthode de dépôt des couches minces, comme la pulvérisation, afin de modifier l'état de surface du nanofilm de fer et d'étudier les différences de mécanisme de corrosion (piqûres ?) et de comportements de bactéries sur la surface. A plus long terme, l'objectif serait de fabriquer des mutants par délétion de *S. oneidensis* où un mécanisme à l'origine de son électroactivité serait inhibé. Ce travail a déjà été initié au laboratoire dans l'idée de déléter les gènes *nqrF* et *pub-putA-putB*, codant respectivement pour une NADH déshydrogénase et la production de putrébactine (sidérophores). Pour le premier mutant, la chaîne respiratoire serait ainsi inhibée dès ces premières étapes ce qui nous permettrait de discerner le rôle prépondérant de l'assimilation ou de la respiration du fer dans le processus de biocorrosion. Le second mutant permettrait de comprendre l'influence de la sécrétion de sidérophores dans l'acquisition du fer. On pourrait également envisager de construire un mutant flavine négatif. La technique utilisée ici est celle de la recombinaison homologue. Un plasmide non répliquatif chez *S. oneidensis*, contenant la séquence de gènes en amont et en aval du gène à supprimer, est inséré par conjugaison dans la bactérie. Le plasmide va alors s'intégrer dans le génome de *Shewanella* par recombinaison homologue. Une seconde recombinaison homologue est ensuite opérée où le plasmide sera excisé conduisant à la suppression du gène d'intérêt. Actuellement, l'amplification par PCR des 500 paires de bases en amont et en aval des gènes d'intérêt ainsi que leur fusion a été réalisée avec succès. La linéarisation du vecteur par les enzymes BamHI et SpeI est également actée.

Terminons par un court résumé du Chapitre 5. Parmi les différents protocoles d'adhésion des bactéries à un substrat conducteur testés, le plus prometteur semble être l'application d'une différence de potentiel de + 100 mV (vs Ag/AgCl) pendant vingt heures sur la surface du substrat conducteur dans un environnement anaérobie. Ce protocole conduit à des bactéries en forme de bâtonnet (forme attendue en phase de croissance exponentielle) suffisamment adhérentes au substrat pour résister aux forces latérales induites par le balayage de la pointe AFM. Des mesures de charges de surface vont donc pouvoir être envisagées afin de visualiser, à l'échelle nanoscopique, les transferts extracellulaires d'électrons via des modifications de cette charge surfacique. Ces mesures pourraient également permettre de mettre en évidence la présence ou la formation d'excroissances conductrices pour le transfert extracellulaire direct des électrons chez *S. oneidensis*. A plus long terme, il pourrait être intéressant de coupler ces mesures à la microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF) pour suivre les transferts d'ions au voisinage de la membrane bactérienne. L'idée serait, par la suite, de suivre les modifications des transferts d'ions ou de charge surfacique sous l'effet de sollicitations mécaniques de la membrane bactérienne (par flux de liquide, AFM ...).