



HAL
open science

Capteur électrochimique à fer pour la maîtrise de *L. pneumophila* : application à l'analyse de l'eau dans les tours aéro-réfrigérantes

Muhammad Nabiil Auckburally

► To cite this version:

Muhammad Nabiil Auckburally. Capteur électrochimique à fer pour la maîtrise de *L. pneumophila* : application à l'analyse de l'eau dans les tours aéro-réfrigérantes. Génie chimique. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2022. Français. NNT : 2022TOU30010 . tel-03710515

HAL Id: tel-03710515

<https://theses.hal.science/tel-03710515>

Submitted on 30 Jun 2022

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

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



THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Muhammad Nabiil AUCKBURALLY

Le 9 février 2022

Capteur électrochimique à fer pour la maîtrise de *L. pneumophila* : Application à l'analyse de l'eau dans les tours aéro-réfrigérantes

Ecole doctorale : **MEGEP - Mécanique, Energétique, Génie civil, Procédés**

Spécialité : **Génie des Procédés et de l'Environnement**

Unité de recherche :
LGC - Laboratoire de Génie Chimique

Thèse dirigée par
Pierre GROS et Christine ROQUES

Jury

M. Jean-Marc BERJEAUD, Rapporteur
M. Christophe INNOCENT, Rapporteur
Mme Christelle DESPAS, Examinatrice
Mme Christel CAUSSERAND, Examinatrice
M. Pierre GROS, Co-directeur de thèse
Mme Christine ROQUES, Co-directrice de thèse



THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Muhammad Nabil AUCKBURALLY

Le 9 février 2022

**Capteur électrochimique à fer pour la maîtrise de L.
pneumophila : Application à l'analyse de l'eau dans les
tours aéro-réfrigérantes**

Ecole doctorale : **MEGEP - Mécanique, Energétique, Génie civil,
Procédés**

Spécialité : **Génie des Procédés et de l'Environnement**

Unité de recherche :
LGC - Laboratoire de Génie Chimique

Thèse dirigée par
Pierre GROS et Christine ROQUES

Jury

M. Jean-Marc BERJEAUD, Rapporteur
M. Christophe INNOCENT, Rapporteur
Mme Christelle DESPAS, Examinatrice
Mme Christel CAUSSERAND, Examinatrice
M. Pierre GROS, Co-directeur de thèse
Mme Christine ROQUES, Co-directrice de thèse

Un gagnant est juste un rêveur qui n'a jamais cédé.

Nelson Mandela

À mes grands-parents...

Remerciements

Ces trois dernières années ont été marquées par la présence de certaines personnes à mes côtés, contribuant de près ou de loin à la réussite de cette thèse. A la suite de cette riche expérience personnelle et professionnelle, je souhaite à travers ces quelques lignes exprimer toute ma gratitude envers ces personnes.

Je tiens à remercier Jean-Marc BERJEAUD et Christophe INNOCENT de m'avoir fait l'honneur de rapporter mes travaux, Christelle DESPAS pour la participation au jury en tant qu'examinatrice et Christel CAUSSERAND pour l'évaluation des travaux et le rôle de présidente de jury à l'occasion de la soutenance. Je vous remercie pour vos commentaires et remarques ainsi que pour la discussion scientifique intéressante qui ont ajouté de la qualité et précision à ce travail de thèse.

Je remercie Pierre GROS, mon co-directeur de thèse, pour son excellent encadrement tout au long de la thèse. En dépit de votre emploi du temps très chargé, vous avez toujours su trouver du temps pour me suivre et me conseiller sur l'avancement du projet. Je vous suis reconnaissant pour la liberté que vous m'avez accordée au cours de la thèse et surtout de m'avoir transmis une partie de votre rigueur légendaire.

Je remercie évidemment Christine ROQUES, ma co-directrice de thèse, qui m'a fait confiance, moi, petit novice en microbiologie. Vos conseils et commentaires toujours avisés m'ont été d'une grande aide notamment vers la fin. Merci pour votre patience et votre bienveillance, la microbiologie ne me fait plus (trop) peur grâce à vous.

J'adresse aussi mes remerciements à Laurent BOUMATI, l'industriel du projet, qui m'a donné cette chance de découvrir le monde de l'entreprise et du traitement de l'eau. Merci pour votre implication notamment pour les heures passées avec ou sans moi sur la fabuleuse TAR prototype ! Je remercie bien évidemment tout le personnel sympathique de Resonet Services (Frédéric, Christelle, Arnaud, Alexis...) qui m'a toujours bien accueilli lors de mes visites à Gimont.

Je tiens à remercier David EVRARD qui a aussi fait partie de l'encadrement et a grandement contribué à la réussite de cette thèse. Merci pour tes conseils, tes remarques (sarcastiques ou pas), ton implication pour la publication mais surtout pour les repérages des épis dans mes cheveux pour que je comprenne qu'il est temps de faire un saut chez le coiffeur ! Ta bonne humeur quotidienne a sans doute facilité le déroulement de cette thèse.

Je souhaite aussi remercier Laure LATAPIE, Brigitte DUSTOU et Sandrine DESCLAUX pour leur disponibilité et aide lors des nombreuses analyses et formations. Un merci plus particulièrement à Laure pour sa participation active aux réunions d'avancement.

Un merci également à Aurélie LE RU de la FRAIB pour les heures passées à faire de magnifiques photos de biofilms et à Vincent BAYLAC du CIRIMAT pour les mesures réalisées avec le profilomètre optique.

Je n'oublie pas mes collègues du bureau 123 où j'ai passé de supers moments au cours de ces trois années. Je tiens donc à remercier Fatma et sa joie de vivre contagieuse, ainsi que Marion, chef des pauses goûters à temps plein et prof de géographie bretonne à ses heures perdues, qui a apporté de la convivialité au bureau. Je pense également à Guillaume, Yacine, Corentin, Christelle et Sabah. Je souhaite remercier tout particulièrement Souheila et Younes qui à travers leur stage ont apporté des résultats très intéressants relative à ma thèse.

Je tiens à remercier tous les doctorants et récents docteurs du LGC avec qui j'ai passé des moments agréables à l'intérieur ou à l'extérieur du labo. Je pense notamment à Christophe (le Viking), Julien (Captain), Julien (Jul 2.0), Guillaume (le Grand), Thomas, Paul, Dihia, Chloé, Sanatou, Chams, Ranine, Melissa, Yin, Pritam, Robin, Vincent, Cécilia, Adriana, Ana et Lisa. Je remercie bien évidemment Charaf qui, au fil des trois années, est devenu un ami de confiance même si nos opinions en matière de foot divergent complètement ! Je n'oublie pas les pauses café (très) tardives au LGC, moments sacrés pour oublier un peu la thèse.

Je remercie aussi le personnel de la FONDEREPHAR et les collègues de la Fac de Pharma : Ludovic, Jeanne, Maya, Marianne, Sophie et Tristan. Je tiens à remercier particulièrement Marie-Carmen MONJE qui m'a appris les rouages de la recherche et pour sa bienveillance continue envers moi.

J'en profite pour remercier mes amis de la « Team Mauritius » qui constituent ma famille à Toulouse. Merci à vous Keshav, Ritesh, Raïsha, Faez (le couz), Rushil pour tous les moments inoubliables passés ensemble et pour le soutien le jour de la soutenance.

Merci à toi Fraiha pour ton soutien et ta patience qui m'ont été précieux pendant cette thèse notamment lors de la dure étape de rédaction. Merci d'être cette personne spéciale pour moi.

Enfin, je suis reconnaissant envers ma maman et mon papa qui ont toujours cru en moi et ont fait d'énormes sacrifices pour que j'aie une éducation de qualité. J'espère vous avoir rendu fier en décrochant ce titre de docteur.

Sommaire général

Sommaire général

Avant-propos.....	23
Liste des abréviations	27
Introduction générale	33

Chapitre I : *Legionella pneumophila* (Lp) : de la problématique environnementale et sanitaire à une stratégie de détection

I. Généralités sur <i>Legionella pneumophila</i>	41
I.1 Historique	41
I.2 Taxonomie et caractéristiques phénotypiques	41
I.3 Pathogénicité et voie de transmission	44
I.3.1 La pathologie.....	44
I.3.2 Mode de transmission	47
I.3.3 Facteurs de virulence	49
I.4 Ecologie.....	50
I.4.1 Interaction avec les amibes	51
I.4.2 <i>Legionella pneumophila</i> et biofilms.....	52
I.4.3 L'état viable non-cultivable.....	54
I.4.4 Cas des tours aéro-réfrigérantes	57
II. <i>Legionella pneumophila</i> et le fer	65
II.1 Le fer	65
II.1.1 Propriétés chimiques	65
II.1.2 Présence dans l'environnement	67
II.2 Rôles du fer pour <i>Legionella pneumophila</i>	67

II.2.1 Voies d'acquisition et assimilation.....	68
II.2.2 Relation entre la concentration en fer et la croissance/persistence de <i>Legionella pneumophila</i>	70
II.2.3 Influence du fer sur les biofilms contenant <i>Legionella pneumophila</i>	72
III. Méthodes d'analyse du fer dans l'eau	73
III.1 Méthodes d'analyse de routine.....	73
III.1.1 Spectrométrie à plasma à couplage inductif	73
III.1.2 Spectrophotométrie.....	75
III.2 Méthodes de détection électrochimique	77
III.2.1 Les capteurs potentiométriques	78
III.2.2 Les capteurs ampérométriques	83
IV. Objectifs des travaux de thèse.....	92

Chapitre II : Elaboration d'un capteur électrochimique pour la détection du fer dans des solutions synthétiques

I. Réactifs et appareillage	97
I.1 Produits chimiques	97
I.2 Appareillage	98
I.3 Préparation de la surface de l'électrode	99
II. Méthodes électrochimiques employées	99
II.1 La voltammétrie cyclique.....	100
II.2 Voltammétrie sur électrode à disque tournant	102
III. Modification de la surface d'électrode par un film de Nafion®	104
III.1 Pourquoi la modification de surface ?.....	104
III.2 Généralités sur le Nafion®	106
III.3 Dépôt du Nafion® à la surface de l'électrode en CV	107

III.4 Caractérisation du film de Nafion®	108
III.4.1 Caractérisation physique par FTIR	109
III.4.2 Caractérisation physique par profilométrie.....	110
III.4.3 Caractérisation par des sondes redox.....	111
IV. Dosage du fer	113
IV.1 Méthode de détection	113
IV.2 Détermination des paramètres électrochimiques optimaux de mesure.....	115
IV.2.1 Electrolyte support et pH.....	115
IV.2.2 Concentration de la solution de Nafion®	119
IV.2.3 Temps de préconcentration	120
IV.3 Détection de Fe ²⁺ en milieu synthétique	121
IV.4 Détection de Fe ³⁺ en milieu synthétique	123
IV.4.1 Etude préliminaire	123
IV.4.2 Utilisation du réducteur hydroxylamine.....	125
V. Interface Solution/Nafion®-Electrode.....	128
V.1 Identification des espèces impliquées dans la réponse électrochimique	128
V.2 Compréhension de l'étape limitante du mécanisme de la réaction.....	129
V.3 Détermination du coefficient de diffusion de Fe ²⁺ dans la couche de Nafion®	133
VI. Performances analytiques du capteur	136
VI.1 Répétabilité, reproductibilité et sensibilité.....	136
VI.2 Exactitude	140
VI.2.1 Détermination de la concentration en Fe(II)	140
VI.2.2 Détermination de la concentration en Fe(III)	141
VI.3 Etude des interférents.....	142
VII. Conclusion	146

Chapitre III : Fer et formation de biofilm par *Legionella pneumophila*

I. Réactifs et appareillage	151
I.1 Produits chimiques	151
I.2 Appareillage	152
II. Méthodes employées.....	153
II.1 Détection électrochimique	153
II.2 Dénombrement des cellules du biofilm	153
II.2.1 Par numération des UFC	153
II.2.2 Par qPCR.....	154
II.3 Microscopie confocale à balayage laser	156
II.4 Analyses statistiques.....	158
III. Production du biofilm mono-espèce à <i>Lp</i> en conditions statiques.....	158
III.1 Souche bactérienne	158
III.2 Milieux de culture	159
III.2.1 Milieux gélosés.....	159
III.2.2 Milieux liquides	159
III.3 Formation de biofilms.....	161
III.4 Validation du protocole de formation du biofilm à <i>Legionella pneumophila</i>	162
IV. Impact du fer.....	164
IV.1 Le pyrophosphate ferrique.....	164
IV.2 Etude préliminaire de diverses conditions de culture en présence de fer	166
IV.2.1 Dosage du fer par le capteur électrochimique dans le milieu SBB modifié sans bactéries.....	169
IV.2.2 Etude des conditions 1 et 2	171
IV.2.3 Influence de la cystéine	175
IV.2.4 Etude des conditions 3 et 4	178

IV.3 Compréhension de l'impact du Fe(III)	183
IV.3.1 Cinétique de formation de biofilm avec le Fe(III)	183
IV.3.2 Etude de l'influence de la concentration de Fe(III)	184
IV.4 Compréhension de l'impact du Fe(II)	186
V. Conclusion	188

Chapitre IV : Vers un suivi de la concentration en fer pour contrôler la population de *Legionella pneumophila* dans les TAR

I. Matériels et méthodes	193
I.1 Produits chimiques	193
I.2 Appareillage	194
I.3 Méthode électrochimique employée	194
II. Essais avec eau de TAR	195
II.1 Présentation de la TAR prototype	195
II.2 Analyse complète de l'eau	197
II.3 Dosage du fer dans la TAR	198
III. Conclusion	203
Discussion.....	205
Conclusion générale et perspectives.....	211
Références bibliographiques	217
Annexes.....	243

Avant-propos

Les travaux présentés ont été réalisés dans le cadre d'une collaboration entre le Laboratoire de Génie Chimique (LGC) UMR 5503 et la société Resonet Services, Groupe Orizon. Ils ont bénéficié d'un soutien de l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT), au travers d'une bourse de thèse CIFRE.

Ces travaux ont donné lieu à la publication et aux communications suivantes :

Publication

Nabiil AUCKBURALLY, Souheila EL BIR, David EVRARD, Brigitte DUSTOU, Laure LATAPIE, Laurent BOUMATI, Christine ROQUES, Pierre GROS.

Elucidation of the stoichiometry of Fe(III) and Fe(II) complexes formed with 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol (5-Br-PADAP). Application to Fe(III) and Fe(II) Electrochemical Determination at Trace Level in Natural Water.

International Journal of Electrochemical Science, **2022**, 17, 220122. (Voir annexe)

Communications par affiche

Nabiil AUCKBURALLY, Laure LATAPIE, David EVRARD, Christine ROQUES, Laurent BOUMATI, Pierre GROS.

Electrochemical sensors for iron detection in artificial water systems.

71st ISE Annual Meeting, **2020**, Belgrade (Serbie).

Nabiil AUCKBURALLY, Laurent BOUMATI, Sophie PECASTAINGS, David EVRARD, Christine ROQUES, Pierre GROS.

Capteurs électrochimiques à fer pour la maîtrise de L. pneumophila dans les circuits d'eaux artificiels.

Journées d'Electrochimie, **2019**, Toulouse (France).

Résumés acceptés pour une communication orale

Nabiil AUCKBURALLY, Laure LATAPIE, David EVRARD, Christine ROQUES, Laurent BOUMATI, Pierre GROS.

Electrochemical sensors for iron detection in artificial water systems.

27th ISE Topical Meeting, **2020**, Salt Lake City (Etats-Unis).

Nabiil AUCKBURALLY, Laure LATAPIE, David EVRARD, Christine ROQUES, Laurent BOUMATI,
Pierre GROS.

Design of electrochemical sensors based on Nafion[®]-modified glassy carbon electrodes for iron detection in artificial water circuits.

18th International Conference on Electroanalysis, ESEAC, **2020**, Vilnius (Lithuanie).

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AdCSV	Adsorptive cathodic stripping voltammetry - Voltammétrie à redissolution cathodique après adsorption
AES	Atomic emission spectroscopy - Spectrométrie d'émission atomique
AMR	Analyse méthodique des risques
ARS	Agences régionales de santé
AuNDs	Gold nanodendrites - nanodendrites d'or
BCYE	Buffered charcoal yeast extract - Gélose tamponnée à l'extrait de levure et au charbon actif
Ct	Cycle threshold - Cycle seuil
CV	Carbone vitreux
DIP	2,2'-dipyridyl
ECS	Electrode au calomel saturée
EDS	Eau distillée stérile
EPS	Extracellular polymeric substances - Substances polymériques extracellulaires
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy - Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
HMDE	Hanging mercury drop electrode - Electrode à goutte pendante de mercure
ICP	Inductively coupled plasma - Plasma à couplage inductif
ICPE	Installations classées pour la protection de l'environnement
IEV	Ion exchange voltammetry - Voltammétrie à échange ionique
IIC	Inspection des installations classées

IL-rGO	Ionic liquid/reduced graphene oxide - Liquide ionique/oxyde de graphène réduit
IP	Iodure de propidium
ISE	Ion selective electrode - Electrode sélective d'ions
LOD	Limit of detection – Limite de détection
LOQ	Limit of quantification – Limite de quantification
Lp	<i>Legionella pneumophila</i>
LCV	<i>Legionella</i> -containing vacuole - Vacuole contenant les légionelles
MCBL	Microscopie confocale à balayage laser
Mip	Macrophage infectivity potentiator - Potentiateur d'infectiosité des macrophages
Nano-TiC	Nanoparticules de carbure de titane
NN	1-nitroso-2-naphthol
OCP	Open circuit potential – Potentiel en circuit ouvert
PCR	Polymerase Chain Reaction - Amplification en chaîne par polymérase
PPF	Pyrophosphate ferrique
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction - Amplification en chaîne par polymérase quantitative
ROS	Reactive Oxygen Species – Espèces réactives de l'oxygène
RSD	Relative standard deviation - Ecart types relatifs
SBB	Supplemented biofilm broth – Bouillon biofilm supplémenté
TAR	Tour aero-réfrigérante
TR	Taux de récupération

UFC	Unités formant colonies
UG	Unités génomes
VBNC	Viable but non cultivable – Viable non-cultivable
v-qPCR	Viability quantitative polymerase chain reaction
w/w	Weight proportion - Proportion massique

Introduction générale

En juillet 1976, plus de 4000 délégués se sont retrouvés à l'occasion du congrès annuel de trois jours organisé par la légion américaine à l'hôtel Bellevue-Stratford de Philadelphie (Etats-Unis). Quelques jours après cet événement, une pneumonie atypique avec des symptômes comprenant des essoufflements chroniques et de fortes fièvres a touché une centaine de légionnaires ayant assisté au congrès, dont une trentaine qui succombera des suites de cette mystérieuse maladie. Après une enquête acharnée de six mois, la bactérie *Legionella pneumophila* (*Lp*), jusque-là inconnue, a été identifiée comme étant la cause de cette maladie nommée maladie du légionnaire. Sa présence dans le système de climatisation de l'hôtel a conduit à la première épidémie reconnue de la maladie du légionnaire. Bien que cet épisode ait été résolu, la maladie du légionnaire n'a pour autant pas été confinée aux livres d'histoire car 45 ans plus tard, elle constitue toujours un risque sanitaire public avec des épidémies signalées annuellement.

La bactérie *Lp* est responsable de plus de 85 % de cas de maladie du légionnaire qui se caractérise par une infection pulmonaire aiguë pouvant entraîner la mort dans 10 à 15 % des cas. En France, la maladie du légionnaire est une maladie à déclaration obligatoire et est à l'origine de plus de 1300 hospitalisations chaque année. Elle est contractée lors d'une inhalation de microgouttelettes d'eau contaminée provenant de milieux ou réservoirs aquatiques.

Bien que la bactérie soit ubiquiste, elle se développe surtout dans les réseaux d'eau artificiels. La contamination humaine se fait via la formation d'aérosols à partir de ces réseaux, impliquant les fontaines (réseau d'eau froide), les bains à remous, les douches (réseau d'eau chaude sanitaire) ou les tours aéro-réfrigérantes (TAR) à voie humide. Ces dernières sont les systèmes les plus fréquemment incriminés dans le risque de contamination en raison de conditions de croissance microbiologique favorables (température de l'eau, conductivité, pH et présence de fer) conduisant à la présence de *Lp* à des taux élevés, y compris au sein de biofilms. Les TAR à voie humide sont des installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE) en raison du risque de contamination de populations avoisinantes lié à la production d'aérosols contaminés inhalables.

Si des opérations d'entretien sont réalisées régulièrement, à titre préventif, et si des traitements curatifs de nettoyage et de désinfection à base de biocides sont réalisés lors d'une contamination excessive pour limiter la persistance et la dissémination de la bactérie, les

gestionnaires de TAR font actuellement face à une problématique ambivalente. En effet, le risque sanitaire avéré lié à la présence de *Lp* conduit à une gestion irrationnelle des TAR, basée sur des traitements biocides préventifs « probabilistes » et fréquents qui ne s'inscrivent plus dans une démarche de maîtrise des usages et des rejets de ces produits nocifs pour l'environnement. D'ailleurs, selon la rubrique 2921 de la nomenclature de l'ICPE, la gestion du risque *Lp* doit être proportionnée et justifiée afin de limiter les rejets polluants dans l'environnement. Parallèlement, le règlement de l'Union Européenne ((UE) n° 528/2012), entré en vigueur le 1^{er} septembre 2013, a été mis en place pour encadrer l'usage et la vente de produits contenant des substances biocides. Dans cette optique, les substances actives et produits sont évalués sur la base de leur efficacité, mais également de leur toxicité et écotoxicité avant d'être autorisés.

Par ailleurs, les méthodes de surveillance microbiologique reconnues sont basées sur une détection de *Lp* sous forme cultivable et planctonique. Or, les connaissances actuelles sur l'importance des biofilms et la présence de formes viables non cultivables (VBNC) en leur sein, y compris dans les amibes, conduisent à envisager des approches anticipatives plus pertinentes.

Dans ce contexte, nous nous sommes particulièrement intéressés aux relations *Lp*/fer dans la genèse et la maîtrise des biofilms. Si les besoins en fer de *Lp* sont reconnus, la forme de fer (Fe(II) et Fe(III)) que nécessite la bactérie dans son milieu aquatique reste peu ou mal connue, surtout lors de l'initiation de la formation d'un biofilm, de sa maturation ou de la colonisation d'autres biofilms bactériens. Toutefois, il a été montré que des concentrations en fer total de l'ordre du micromolaire dans les réseaux d'eau artificiels contribuent à une présence accrue de *Lp*.

Ainsi, l'objectif global du projet repose sur la mise au point d'un système de détection du fer, et notamment des formes Fe(II) et Fe(III), permettant de suivre ce paramètre dans les eaux de TAR et d'anticiper ainsi l'évolution de la population de *Lp*.

Pour atteindre cet objectif, la clarification de la relation entre le fer et la persistance/croissance de *Lp* au sein de biofilms constitue un requis indispensable pour proposer une approche rationnelle, voire un algorithme de maîtrise de *Lp* dans les TAR en se basant sur un dosage des deux formes du fer à des concentrations micromolaires. L'option retenue pour réaliser ce dosage est la mise au point d'un capteur électrochimique répondant

à de nombreuses exigences en termes de performances analytiques ; un des enjeux majeurs étant de pouvoir quantifier les deux formes de fer lors des essais, afin d'affiner le comportement de *Lp* en fonction des concentrations des deux composants. L'utilisation de ce procédé innovant, associée à une meilleure connaissance du relationnel entre *Lp* et fer, pourrait conduire à un usage des produits biocides plus rationnel et plus respectueux de l'environnement par les industriels.

Ce travail de thèse est réalisé dans le cadre d'une collaboration entre la société Resonet Services (Groupe Orizon), spécialiste du traitement de l'eau de process dans l'industrie et les collectivités, et deux équipes de recherche du Laboratoire de Génie Chimique (LGC) : l'équipe « Capteurs Electrochimiques et Procédés », spécialisée dans la mise au point et le développement de capteurs électrochimiques pour le suivi et le contrôle des procédés, et l'équipe « Ingénierie des biofilms », reconnue pour ses compétences dans les domaines de la caractérisation des écosystèmes microbiens et notamment des biofilms.

Ce manuscrit s'articule autour de quatre chapitres :

Le premier chapitre présente la bactérie *Legionella pneumophila*, la pathologie associée et les voies de transmission. L'interaction de *Lp* avec son environnement est décrite, en particulier dans les TAR. La relation entre *Lp* et le fer est abordée notamment quand la bactérie est sous forme libre et dans un biofilm. Les différentes méthodes d'analyse du fer dans l'eau sont ensuite discutées. Les méthodes classiques d'analyse sont présentées, suivies d'un état de l'art comparatif des différentes méthodes électrochimiques (potentiométriques et ampérométriques). Le chapitre expose enfin les deux volets de recherche qui ont été explorés pour atteindre l'objectif principal de la thèse.

Le deuxième chapitre concerne l'élaboration du capteur électrochimique avec la modification et la caractérisation de la surface d'électrode. La méthodologie employée pour le dosage du Fe(II) et du Fe(III) en milieu synthétique est ensuite détaillée, ainsi que la présentation de l'étude des phénomènes au voisinage de l'interface modifiée. Les performances analytiques du capteur sont également abordées en fin de chapitre.

Le troisième chapitre est dédié à des essais de caractérisation du rôle du fer dans la capacité à former des biofilms par *Lp*. Les diverses méthodes employées sont présentées en mettant en évidence le mode de production du biofilm mono-espèce. L'évaluation de l'impact des deux

formes ioniques du fer sur le biofilm est ensuite réalisée. Une discussion faisant le lien entre les différents résultats obtenus et la bibliographie clôturera le chapitre.

Le quatrième et dernier chapitre aborde le suivi de la concentration en fer par le capteur électrochimique dans l'eau d'une TAR prototype développée chez Resonet Services. Les aspects techniques de la TAR sont détaillés ainsi que les essais réalisés sur l'eau avec et sans ajout de fer.

Une partie discussion s'ensuit faisant la relation entre le fer présent dans la TAR et le risque *Lp*.

Enfin, l'ensemble des résultats est repris dans une conclusion générale. Certains d'entre eux constituent encore une approche préliminaire et ouvrent la voie à de nombreuses perspectives.

Chapitre I

Legionella pneumophila (Lp) : de la
problématique environnementale et
sanitaire à une stratégie de détection

L'objectif de ce premier chapitre est d'exposer le contexte des travaux de la thèse. Une première partie est consacrée à la présentation de la bactérie *Legionella pneumophila* (*Lp*), de la pathologie associée et de son mode de dissémination et contamination/infection humaine. Sa présence et sa survie dans l'environnement aquatique, en particulier dans les tours aéro-réfrigérantes (TAR), sont aussi décrites. La deuxième partie concerne l'influence du fer sur la présence et le développement de la bactérie sous forme libre ou de biofilm. Les voies d'acquisition et d'assimilation du fer par la bactérie sont détaillées. Enfin, les méthodes classiques d'analyse du fer dans l'eau sont abordées ainsi que l'examen des capteurs électrochimiques existants, notamment les capteurs potentiométriques et ampérométriques.

I. Généralités sur *Legionella pneumophila* (*Lp*)

I.1 Historique

Pendant l'été 1976, lors de la 58^{ème} convention annuelle de la légion américaine à Philadelphie (États-Unis), une pneumopathie d'origine inconnue a touché 182 personnes. 29 d'entre elles ont succombé^[1]. Quelques mois plus tard, l'agent en cause s'est avéré être une bactérie non identifiée jusqu'alors, connue aujourd'hui sous le nom de *Legionella pneumophila*^[2]. Les personnes atteintes avaient inhalé des aérosols contenant la bactérie et ont contracté une pneumopathie aiguë appelée depuis maladie du légionnaire^[3]. L'enquête a démontré plus tard que le système de climatisation de l'hôtel où résidaient les légionnaires était contaminé et responsable de l'épidémie^[4].

I.2 Taxonomie et caractéristiques phénotypiques

Lp appartient à la famille des Legionellaceae (γ -protéobactéries) et au genre *Legionella*^[2] (couramment appelé légionelles). Depuis l'épidémie de Philadelphie en 1976, le nombre d'espèces et de sérogroupes (ensemble de caractéristiques antigéniques) répertoriés au sein du genre *Legionella* ne cesse de s'accroître. Il comprend actuellement plus de 60 espèces et 80 sérogroupes connus^[5]. Une partie de ces espèces et le nombre de sérogroupes associés sont listés dans le **tableau I.1**.

Espèce	Nombre de sérogroupes	Nombre de sérogroupes associés à la maladie
<i>L. pneumophila</i>	15	15
<i>L. bozemanii</i>	2	2
<i>L. dumoffii</i>	1	1
<i>L. micdadei</i>	1	1
<i>L. longbeachae</i>	2	2
<i>L. jordanis</i>	1	1
<i>L. wadsworthii</i>	1	1
<i>L. hackeliae</i>	2	2
<i>L. feeleeii</i>	2	2
<i>L. maceachernii</i>	1	1
<i>L. birminghamensis</i>	1	1
<i>L. cincinnatiensis</i>	1	1
<i>L. gormanii</i>	1	1
<i>L. sainthelensi</i>	2	2
<i>L. tucsonensis</i>	1	1
<i>L. anisa</i>	1	1
<i>L. lansingensis</i>	1	1
<i>L. erythra</i>	2	1
<i>L. parisiensis</i>	1	1
<i>L. oakridgensis</i>	1	1
<i>L. spiritensis</i>	1	0
<i>L. jamestowniensis</i>	1	0
<i>L. santicrucis</i>	1	0
<i>L. cherrii</i>	1	0
<i>L. steigerwaltii</i>	1	0
<i>L. rubrilucens</i>	1	0
<i>L. israelensis</i>	1	0
<i>L. quinlivanii</i>	2	0
<i>L. brunensis</i>	1	0
<i>L. moravica</i>	1	0
<i>L. gratiana</i>	1	0
<i>L. adelaidensis</i>	1	0
<i>L. fairfieldensis</i>	1	0
<i>L. shakespearei</i>	1	0
<i>L. waltersii</i>	1	0
<i>L. genomospecies</i>	1	0
<i>L. quateirensis</i>	1	0
<i>L. worsleiensis</i>	1	0
<i>L. geestiana</i>	1	0
<i>L. natarum</i>	1	0
<i>L. londoniensis</i>	1	0
<i>L. taurinensis</i>	1	0
<i>L. lytica</i>	1	0

<i>L. drozanskii</i>	1	0
<i>L. rowbothamii</i>	1	0
<i>L. fallonii</i>	1	0
<i>L. gresilensis</i>	1	0
<i>L. beliardensis</i>	1	0

Tableau I.1. Liste des principales espèces et des sérogroupes associés à *Legionella*^[6].

L'espèce *Lp* est responsable de plus de 85 % des cas de la maladie du légionnaire. Les 15 % restants sont répartis entre 19 autres espèces de *Legionella* dont *L. longbeachae*, *L. anisa*, *L. dumofii* et *L. gormanii*^[6]. En France, c'est le séro groupe 1 de *Lp* qui a été retrouvé dans plus de 95 % des isolats cliniques en 2019^[7].

Lp est un bacille aérobic strict à Gram négatif (faible coloration), non sporulé et non capsulé. La bactérie peut adopter une forme coccobacillaire de 0,3 à 0,9 µm de largeur et 2 µm de longueur ou une forme filamenteuse et allongée en culture avec une longueur de plus de 20 µm (**Fig. I.1**). Dans certains cas, une mobilité peut être détectée en lien avec la présence de flagelles en position polaire ou subpolaire^[8].



Figure I.1. *L. pneumophila* vue au microscope électronique à balayage en milieu liquide^[9].

La bactérie est chimio-organotrophe et ses sources d'énergie et de carbone proviennent surtout des acides aminés qu'elle utilise^[10]. *Lp* est aussi catalase positive, uréase négative et nitrate réductase négative. Sa paroi cellulaire très hydrophobe est riche en acides gras ramifiés^[11], ce qui est rare pour une bactérie à Gram négatif. Elle contient des ubiquinones (aussi connues comme coenzymes Q) qui sont activement impliquées dans la respiration

aérobie. Les ubiquinones présentent des chaînes latérales constituées de 9 à 14 unités isoprènes (contre 6 à 10 unités en général chez les bactéries à Gram négatif) et participent grandement à l'hydrophobicité de la paroi^[8].

La bactérie ne se développe pas sur des milieux de culture usuels mais nécessite des conditions particulières pour sa croissance. Le milieu de culture BCYE (*Buffered Charcoal Yeast Extract*) a été conçu par Feeley *et al.* en 1979 et est spécifique au développement des légionelles. Il est composé de fer (sous forme de pyrophosphate ferrique), de L-cystéine, de tampon ACES (acide N-(2-acétamido)-2-aminoéthanesulfonique), d'extrait de levure et de charbon actif et a un pH de 6,9^[12]. La température optimale de développement de *Lp* est de 37 °C mais certaines souches ont la capacité de se répliquer jusqu'à 44 °C^[13]. Les colonies formées sur ce milieu ont une couleur grisâtre, une consistance muqueuse et des tailles hétérogènes (**Fig. I.2**). Une observation à la loupe binoculaire montre un aspect en « verre fritté » des colonies.

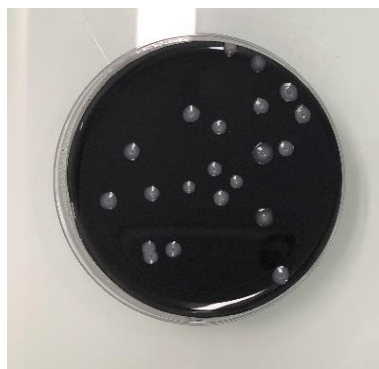


Figure I.2. Colonies de *Lp* sur milieu BCYE.

I.3 Pathogénicité et voie de transmission

I.3.1 La pathologie

Les bactéries du genre *Legionella* sont responsables de l'infection dénommée légionellose qui se présente classiquement sous deux formes cliniques distinctes : la maladie du légionnaire et la fièvre de Pontiac^[6]. Des formes asymptomatiques^[14] peuvent aussi exister ainsi que de rares formes extra-pulmonaires touchant surtout des patients immunodéprimés^[15].

Dans le langage courant, lorsque l'on fait mention du terme légionellose, cela renvoie surtout à la maladie du légionnaire du fait de sa gravité qui sera détaillée plus loin.

La fièvre de Pontiac est la forme bénigne de la maladie et apparaît sous forme épidémique. Elle ne cause pas d'infection pulmonaire et se traduit par des symptômes similaires à un état grippal. Plus de 70 % des malades développent les symptômes suivants : fièvre, fatigue, douleurs musculaires et articulaires, malaises, nausées et maux de tête et de gorge^[16,17]. Les personnes atteintes guérissent naturellement au bout de 2 à 5 jours^[18]. La période d'incubation de la maladie dure entre 30 et 90 heures^[16].

La maladie du légionnaire est, elle, caractérisée par une infection pulmonaire aiguë qui peut apparaître de façon sporadique ou lors d'une épidémie. La durée d'incubation de la maladie est alors de 2 à 14 jours^[19]. La fatigue, une fièvre légère et la toux sont généralement des symptômes au début de la maladie. Au fur et à mesure que la maladie progresse, une pneumonie et une détresse respiratoire apparaissent et d'autres organes du corps peuvent être touchés. Des myalgies, des troubles digestifs (diarrhées, nausées, vomissements) et des troubles neurologiques (confusion, délire) sont fréquents à ce stade.

Cependant, aucun signe clinique ou radiologique ne peut être considéré comme spécifique de la maladie. La légionellose doit être envisagée en présence d'une pneumonie aiguë associée à un faisceau d'arguments dont l'absence d'amélioration sous traitement par des bêta-lactamines correctement prescrites, un terrain favorable chez un patient présentant des signes extra-respiratoires (digestifs, neurologiques), un contexte épidémique ou l'identification de situations favorisantes (expositions à des aérosols, voyages récents).

Le diagnostic doit être posé rapidement car c'est une maladie à déclaration obligatoire en France. Pour toute personne présentant une pneumopathie confirmée par une radiographie des poumons montrant des opacités alvéolaires ou alvéolo-interstitielles non systématisées, souvent bi-lobaires et extensives avec plus ou moins un épanchement pleural, le diagnostic est établi à la suite d'une des analyses biologiques suivantes pour confirmer la présence et/ou le contact avec *Legionella*^[20] :

1. Recherche d'antigènes solubles de *Legionella* dans les urines par immunochromatographie sur membrane ou par la méthode immunoenzymatique ELISA (technique d'immunoabsorption par enzyme liée) ; cette technique permet de

détecter essentiellement les antigènes de *Lp* séro groupe 1. Les antigènes apparaissent précocement, dans les premiers jours suivant l'apparition des signes cliniques.

2. Mise en culture de tout prélèvement respiratoire bas (principalement aspiration trachéale, lavage broncho-alvéolaire et expectoration) ;
3. Détection de la présence de la bactérie par amplification génique par *Polymerase Chain Reaction* (PCR) à partir des prélèvements urinaires, lavages broncho-alvéolaires, et sérums.

La sérologie présente peu d'intérêt au niveau diagnostique et décision thérapeutique.

Des complications de cette pneumopathie peuvent entraîner une insuffisance respiratoire, une insuffisance rénale aiguë, une rhabdomyolyse (dégradation du tissu musculaire squelettique) et la mort dans 10 % à 15 % des cas. Des antibiotiques de type fluoroquinolones ou macrolides sont utilisés couramment pour le traitement de la maladie qui peut durer jusqu'à 30 jours chez les patients immunodéprimés ou présentant des formes sévères^[21].

Quand des cas positifs sont confirmés, les Agences Régionales de Santé (ARS) doivent être informées. Les données sont analysées et des enquêtes sont réalisées pour rechercher de nouveaux cas et les sources de contamination, que ce soit pour des cas isolés ou lors d'une épidémie communautaire ou nosocomiale. Parallèlement, les souches isolées et les prélèvements positifs et/ou d'intérêts (urines, sérum et prélèvements respiratoires) sont adressés au Centre National de Référence (CNR) situé à Lyon. Des mesures de contrôle et de prévention sont mises en place. Finalement, les ARS envoient un rapport à l'Agence nationale de santé publique qui réalise un suivi épidémiologique au niveau national^[22]. Par ailleurs, un réseau de surveillance européen a été mis en place l'ELDSNet (*European Legionnaires' disease Surveillance Network*), permettant notamment de répertorier les cas liés aux voyages.

- **Facteurs de risque et incidence**

Les individus présentant un risque élevé d'infection sont les personnes de plus de 50 ans, les fumeurs et anciens fumeurs, les personnes atteintes de diabète ou d'insuffisance rénale ou présentant déjà des pathologies chroniques pulmonaires ou cardiaques et les immunodéprimés, surtout après une corticothérapie prolongée ou une greffe d'organe^[23,24]. Les hommes sont plus fréquemment touchés que les femmes. La maladie est rare chez les individus de moins de 20 ans et très rare chez l'enfant^[25]. Par ailleurs, la grossesse n'est pas considérée comme un facteur à risque.

En 2019, 1816 cas de légionellose ont été déclarés en France, ce qui correspond à un taux d'incidence de 2,7/100000 habitants^[7]. Bien que ce chiffre soit inférieur au chiffre record de 2018 (2133 cas), on observe une tendance à l'augmentation du nombre des cas au fil des années (**Fig. I.3**). L'âge médian des cas en 2019 était de 65 ans et il y avait 2,4 fois plus d'hommes que de femmes parmi le nombre total de malades. Une exposition à risque a été signalée pour 39 % des cas recensés ; les voyages et les séjours hospitaliers comptent parmi les expositions à risque les plus fréquemment rapportées (24 %)^[7]. Cependant, malgré l'amélioration du diagnostic et de la déclaration, le nombre total de cas de légionellose reste sous-estimé car il est probable que des cas isolés, bénins et asymptomatiques ne soient pas identifiés/déclarés.

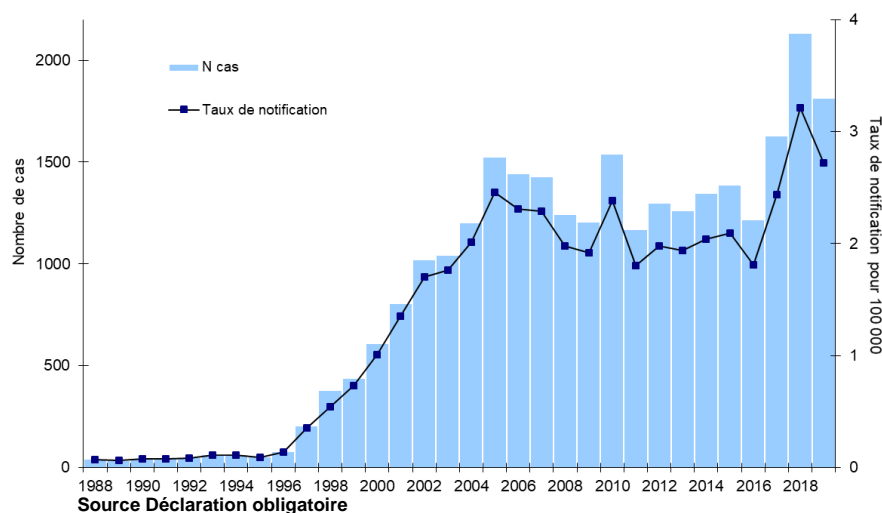


Figure I.3. Evolution du nombre et du taux annuel d'incidence des cas notifiés de légionellose de 1988 à 2019^[7].

I.3.2 Mode de transmission

La légionellose est contractée par l'inhalation des aérosols contaminés issus de réservoirs hydriques^[6]. Les aérosols doivent avoir une taille comprise entre 2 et 5 μm afin de pouvoir contenir une quantité significative de bactérie^[26] et pénétrer assez profondément dans l'appareil respiratoire^[27,28]. Etant donné le caractère opportuniste de la bactérie, le développement de la pathologie dépend de la dose infectante qui doit être suffisamment élevée ainsi que des facteurs de risque de l'hôte. Cependant, aucune information n'est

réellement disponible sur la quantification de la dose infectieuse compte tenu des différences dans la susceptibilité des hôtes et de la virulence variable de *Legionella*. L'inhalation de microgouttelettes infectieuses est considérée comme la seule voie de contamination. Récemment, une transmission de personne à personne de la maladie du légionnaire a été envisagée/signalée après une épidémie à Vila Franca de Xira au Portugal en 2014^[29].

- Cycle de réplication intracellulaire

Lors de son inhalation, la bactérie *Lp* arrive au niveau des alvéoles pulmonaires. La surface alvéolaire est composée majoritairement de pneumocytes mais aussi de macrophages qui représentent une niche de réplication pour la bactérie. La pathogénicité de *Lp* est largement liée au fait qu'elle peut envahir ces macrophages et s'y multiplier. Cette capacité d'invasion a été développée par la bactérie au fil du temps suite à des invasions de cellules (les amibes par exemple) naturellement présentes dans l'environnement^[30]. Les étapes d'infection des cellules hôtes sont similaires dans les deux cas (homme et environnement) et sont décrites dans la figure ci-dessous (**Fig. I.4**) lors d'une invasion d'une cellule phagocytaire.

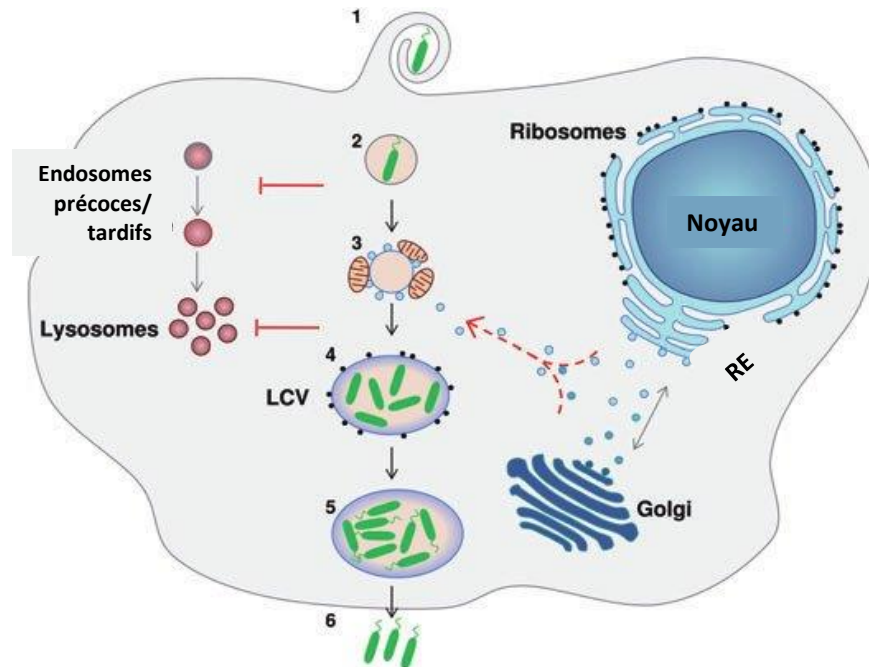


Figure I.4. Schéma des étapes de réplication intracellulaire de *Lp* dans un macrophage^[31].

Etape 1 : *Lp* pénètre dans le macrophage par phagocytose conventionnelle ou par phagocytose par enroulement (*coiling phagocytosis*)^[32].

Etape 2 : La bactérie se retrouve dans une vacuole naissante appelée phagosome et va empêcher l'interaction de ce phagosome avec la voie endosomale. Cela évite la fusion phagosome-lysosome et la mort de la bactérie^[33,34]. Le phagosome se transforme en une vacuole de développement de *Lp* appelée LCV (*Legionella-containing vacuole*).

Etape 3 : Dans le compartiment cytoplasmique, la vacuole s'entoure de mitochondries, de ribosomes et de vésicules provenant du réticulum endoplasmique^[35,36].

Etape 4 : La croissance de la LCV arrive à maturité et est riche en nutriments pour la bactérie^[37]. Les bactéries entrent alors dans une phase répllicative où elles se multiplient rapidement par fission binaire^[33,38]. Pendant cette phase, les bactéries ne sont ni mobiles ni cytotoxiques^[39].

Etape 5 : La LCV devient pauvre en nutriments à la suite de la répllication rapide des bactéries. Ces dernières entrent alors dans la phase transmissive où elles passent à leur forme infectieuse^[40,41]. Dans cet état, elles ont un fort pouvoir pathogène et deviennent mobiles grâce à l'acquisition de flagelles^[39].

Etape 6 : Les bactéries virulentes induisent une apoptose et une nécrose du macrophage^[42,43]. Elles sont ainsi libérées du milieu intracellulaire pour aller potentiellement infecter de nouveaux hôtes.

1.3.3 Facteurs de virulence

Comme d'autres bactéries opportunistes, *Lp* possède plusieurs structures de surface qui sont déterminantes pour sa fonction pathogène : le lipopolysaccharide (LPS), les flagelles, les pili de type IV, une porine de la membrane externe et les protéines Mip (*macrophage infectivity potentiator*). Ces structures favorisent d'abord l'adhésion aux cellules hôtes puis leur invasion^[30].

Avec les techniques de séquençage du génome, les gènes putatifs responsables de la virulence ont été identifiés. Ainsi, des systèmes de sécrétion de *Lp* facilitant l'infection des cellules hôtes ont été déterminés et sont présentés, avec leurs rôles respectifs, dans le **Tableau 1.2**.

Facteur de virulence	Rôles
Système de sécrétion de type IV (Dot/Icm^a)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Transfère près de 300 protéines différentes vers les cellules hôtes. 2. Empêche la fusion phagosome-lysosome. 3. Programme l'établissement de la LCV pour la réplication de <i>Lp</i> en son sein. 4. Facilite l'entrée et la sortie de <i>Lp</i> des cellules hôtes.
Système de sécrétion de type II (Lsp^b)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Favorise l'export d'au moins 25 protéines, 17 activités enzymatiques et un tensioactif. 2. Diminue la sécrétion des cytokines au niveau des macrophages infectés.
Système Tat^c	<ol style="list-style-type: none"> 1. Favorise la réplication de <i>Lp</i> au sein des macrophages. 2. Facilite la croissance de <i>Lp</i> en présence de quantités faibles en fer.

Tableau I.2. Systèmes de sécrétion à *Lp* et leurs rôles^[30,44,45].

^aDot/Icm : *defective in organelle trafficking/intracellular multiplication*

^bLsp : *Legionella secretion pathway*

^cTat : *twin-arginine translocation*

D'autres régions génomiques importantes pour l'infection des cellules hôtes ont été identifiées. Les loci *enh* (*enhanced entry*), *eml* (*early stage macrophage-induced locus*) et *milA* (*macrophage-specific infectivity locus A*) sont importants pour l'entrée bactérienne et la modification de la voie endosomale. Les loci *enh1* (*enhanced entry 1*) et *rib* (*release of intracellular bacteria*) sont impliqués dans la formation des pores lors de la nécrose^[44].

La virulence de *Lp* est aussi dépendante du fer et les voies d'acquisition impliquent plusieurs facteurs de sécrétion et de surface^[45]. Ces points seront détaillés dans la **partie II.2.1**.

I.4 Ecologie

Lp est une bactérie ubiquiste que l'on trouve dans les milieux aquatiques qui constituent ses principaux réservoirs. Elle colonise les milieux naturels tels que les rivières, les lacs et les

nappes phréatiques^[46,47]. Cependant sa concentration y est faible en lien avec la faible disponibilité en nutriments. En conséquence, des cas de légionellose y sont rarement associés^[48]. En revanche, les épidémies ou les cas sporadiques de légionellose sont principalement liés à la présence de *Lp* dans des installations hydriques artificielles^[6,49] à l'origine de la formation d'aérosols, telles que les tours aérorefrigérantes, les bains à remous, les spas, les fontaines, les brumisateurs, certains éléments des fauteuils dentaires et les réseaux d'eau (essentiellement des réseaux d'eau chaude) et les pommeaux de douche^[44]. Les aérosols produits contenant la bactérie peuvent alors être inhalés. La présence de la bactérie dans ces réseaux et installations est liée aux facteurs favorisant leur développement. Parmi eux, on peut citer des températures allant de 25 °C à 42 °C, l'eau stagnante, la corrosion, le tartre et les autres microorganismes et protozoaires présents^[44,50,51]. L'industrialisation et les constructions massives au cours de ces dernières décennies n'ont fait qu'augmenter le nombre de vagues épidémiques de légionellose^[6] chez l'homme. Ces caractéristiques démontrent à nouveau le caractère opportuniste de la bactérie et expliquent la détection d'épidémies communautaires et hospitalières récurrentes^[52,53]. En dépit de la distribution généralisée de la bactérie dans les systèmes aquatiques, le nombre de personnes contractant la maladie est très bas avec un taux d'incidence restant en dessous de 3 pour 100000 habitants, confirmant le caractère opportuniste et l'importance de la susceptibilité de l'hôte. La légionellose est un évènement exceptionnel pour les animaux. L'infection provoquent chez eux seulement une réponse sérologique marquée sans signes discernables de maladie clinique^[54].

1.4.1 Interaction avec les amibes

Les amibes sont un groupe de protozoaires présents dans les milieux aquatiques naturels et artificiels et qui se nourrissent de microorganismes par phagocytose. À la suite de milliers d'années d'interaction avec elles, *Lp* parvient aujourd'hui à éviter la digestion par les amibes et arrive surtout à se répliquer de façon intracellulaire selon un mode similaire à celui détaillé dans **la partie 1.3.2**^[55].

Les études environnementales ont démontré que les amibes permettent la survie de *Lp* dans la nature en leur offrant un habitat convenable^[56]. Treize espèces d'amibes retrouvées dans les systèmes d'eau artificiels supportant la répllication intracellulaire de *Lp* sont connues à ce

jour^[57]. Elles peuvent ainsi faire augmenter la population de *Lp* dans les milieux aquatiques qui deviennent alors des sources majeures de contamination. Des études ont démontré que même lorsque les conditions environnementales, telles que la température ou la disponibilité en nutriments, deviennent défavorables à son développement, la bactérie peut continuer à survivre à l'intérieur des amibes^[58]. Dans certains cas, la protection fournie par l'amibe empêche les effets destructifs des produits chimiques et biocides sur la bactérie dans les eaux traitées des installations artificielles^[59]. Cette relation entre amibes et *Lp* pourrait expliquer la raison pour laquelle l'élimination complète de la bactérie est difficile dans les réseaux d'eaux artificiels. Finalement, lors de leur passage dans les amibes, les bactéries deviennent plus virulentes et leur potentiel d'infection à l'encontre des macrophages augmente. Une étude a montré que des bactéries libérées de l'amibe *H. vermiformis* sont plus infectieuses et tuent les cellules hôtes plus efficacement que les bactéries cultivées *in vitro*^[60]. Les amibes jouent donc un rôle important à la fois dans la survie, la multiplication et la dispersion de *Lp* dans l'environnement et dans sa pathogénicité pour l'homme. Par ailleurs, les méthodes classiques de culture sur gélose ne permettent pas de mettre en évidence les bactéries présentes à l'intérieur des amibes si ces dernières ne sont d'abord pas lysées. Par conséquent, des techniques de biologie moléculaire sont utilisées, telles que la PCR quantitative ou la PCR conventionnelle basées sur l'amplification du gène *mip*^[61].

1.4.2 *Legionella pneumophila* et biofilms

1.4.2.1 Généralités sur les biofilms

Un biofilm est défini comme une communauté de microorganismes adhérents entre eux et/ou sur une surface biotique ou abiotique, et caractérisée par la sécrétion d'une matrice extracellulaire protectrice^[62]. Les biofilms sont actuellement considérés comme la forme d'existence prédominante des bactéries dans le monde (plus de 80 % des bactéries)^[63].

La plupart des biofilms comportent moins de 10 % de microorganismes en termes de masse de matière sèche par rapport à la matrice. Cette matrice est hautement hydratée (jusqu'à 97 % en eau) et, selon les microorganismes présents dans le biofilm, peut contenir jusqu'à 90 % de différents types de biopolymères appelés substances polymériques extracellulaires (EPS). Ces EPS sont composées de polysaccharides, protéines, glycoprotéines, acides nucléiques, lipides, phospholipides associés à des composants non organiques, notamment des cations,

l'ensemble assurant le maintien de la structure du biofilm. Les cellules dans le biofilm sont donc immobilisées, et certaines très proches les unes des autres, ce qui permet de réelles interactions^[64].

La formation d'un biofilm simple peut être représentée en quatre grandes étapes, et est détaillée ci-dessous (**Fig I.5**).

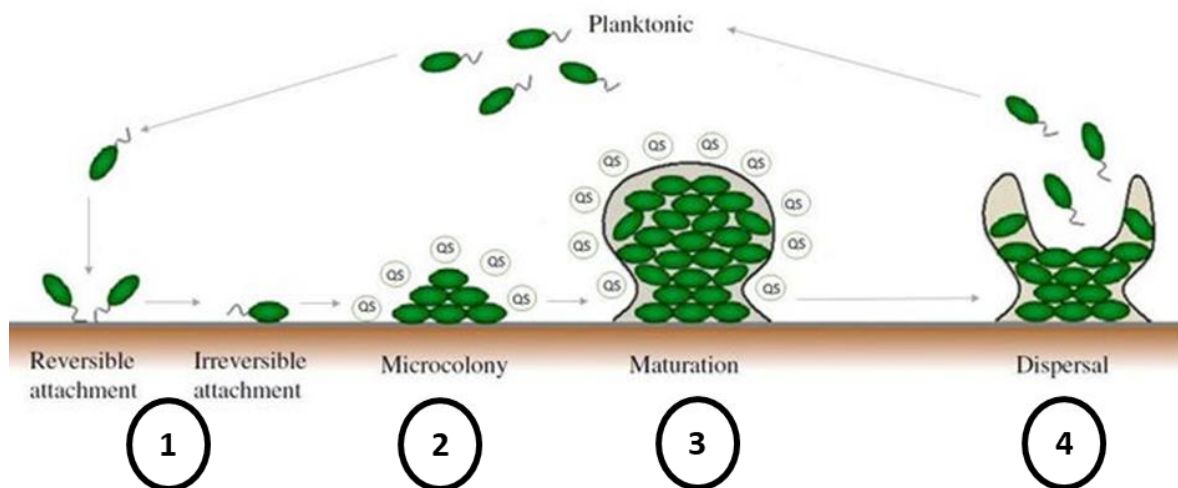


Figure I.5 Les différentes étapes de formation d'un biofilm^[65].

1. L'adhésion bactérienne : Des cellules planctoniques se rapprochent et s'attachent à une surface biotique ou abiotique, notamment grâce aux pili et flagelles, d'abord de façon réversible puis irréversible.
2. La croissance du biofilm : Les bactéries adhérentes se multiplient pour former des micro-colonies. Elles produisent de la matrice pour stabiliser fortement leur fixation à la surface et la cohésion des micro-colonies formées.
3. La maturation du biofilm : Elle est marquée par une sécrétion importante d'EPS et de polysaccharides par les microorganismes. Le biofilm se structure et ne doit pas être considéré comme « stable » mais plutôt avec une évolution constante^[66].
4. La dispersion du biofilm : Elle intervient à la suite de perturbations dans l'apport en nutriments et des conditions physico-chimiques du microenvironnement. Les liaisons intercellulaires et de la matrice extracellulaire se rompent et les bactéries, ou plutôt

des clusters de bactéries, se détachent et se dispersent. Ces dernières sont alors capables d'aller coloniser d'autres surfaces pour former de nouveaux biofilms^[67].

I.4.2.2 Les biofilms : niche écologique pour *Legionella pneumophila*

La formation d'un biofilm est une stratégie de survie pour les bactéries qui utilisent la matrice pour se protéger et concentrer les nutriments avec en parallèle un shift génomique leur permettant d'adapter leur métabolisme et leurs réponses aux conditions environnementales. Comme *Lp* est un microorganisme exigeant en matière de nutriments, le biofilm fournit les conditions nécessaires à sa survie et sa prolifération en dehors des cellules hôtes et en milieu oligotrophe^[48].

Dans les installations hydriques artificielles, la majorité des légionelles est associée à des biofilms complexes composés de différents microorganismes, ainsi que d'amibes^[68]. En effet, il semblerait qu'elles forment des micro-colonies au sein de biofilms déjà établis par d'autres espèces bactériennes^[69]. Par ailleurs, des études ont démontré que la présence d'amibes dans les circuits d'eaux permet le maintien et la croissance de *Lp* (développement intracellulaire) et augmente également la capacité de la bactérie à produire des polysaccharides, favorisant ainsi sa persistance dans les biofilms^[70]. Si les légionelles sont aujourd'hui ubiquitaires dans les circuits hydriques artificiels, c'est surtout via leur présence dans les biofilms^[69,71]. Ces derniers constituent un réservoir majeur de *Lp*, ce qui implique des opérations de nettoyage et de désinfection appropriées et régulières afin d'éviter toute contamination ou prolifération anormale.

L'association *Lp*/amibes/biofilms est considérée comme prépondérante. Cependant, des études antérieures réalisées au laboratoire ont pu mettre en évidence la capacité de *Lp* à former des biofilms mono-espèces, dans des conditions de laboratoire, permettant ainsi d'envisager l'évaluation des facteurs du microenvironnement sur la bactérie sous forme adhérente^[72-74].

I.4.3 L'état viable non-cultivable

L'état viable non-cultivable (VBNC –*viable but non-cultivable*) a été décrit pour la première fois en 1982 chez les bactéries *E. coli* et *Vibrio cholerae*^[75]. Depuis, cet état physiologique a

été décrit chez plusieurs autres espèces. L'état VBNC est considéré comme une stratégie de survie des bactéries (surtout à Gram négatif) en réponse à un stress. Il se caractérise par un déficit de croissance conduisant au fait que les bactéries ne peuvent plus se développer sur les milieux de culture classiques. Si elle est souvent due à un stress nutritionnel, l'entrée dans un état VBNC peut aussi être due à d'autres stress, tels des changements de température, de pH, d'osmolarité et à la présence de désinfectants chimiques entre autres^[76]. Les bactéries sont plus petites en taille, ont une activité métabolique réduite et présentent des modifications de la composition membranaire. Toutefois, cet état est réversible. Lorsque les conditions redeviennent favorables, les bactéries peuvent à nouveau avoir une croissance normale. L'état VBNC peut aider les bactéries à persister dans l'environnement en leur permettant de survivre plusieurs mois voire plusieurs années jusqu'à leur revivification^[77].

C'est en 1987 que l'état VBNC a été décrit pour la première fois chez des souches de *Lp*^[78]. Lorsqu'elles sont exposées à un stress, elles transitent vers la phase VBNC ou elles meurent. Dans les systèmes d'eau artificiels, *Lp* peut faire face à différents types de stress tels que des carences nutritionnelles, des traitements chimiques et physiques (chaleur, UV, chlore, ozone, eau de javel, monochloramine) ; *Lp* peut également passer à l'état VBNC en réponse à d'autres types de stress tels que les ultrasons^[79]. *Lp* possède la capacité de résister à ces stress et de survivre sous l'état VBNC en maintenant une intégrité membranaire et une certaine activité métabolique. Des études ont montré la revivification de *Lp* après son passage à l'état VBNC. Celle datant de 1987 a démontré le regain de cultivabilité de *Lp* sur milieu gélosé à la suite d'une infection de cellules d'embryon de poulet^[78]. Plus récemment, il a été établi que la revivification de *Lp* était possible grâce à l'enrichissement du milieu de culture en pyruvate et en glutamate^[80]. Toutefois, le retour à la cultivabilité de *Lp* a été surtout démontré après passage dans des hôtes amibiens tels que *A. castellanii*^[81,82] et *A. polyphaga*^[83,84]. En cas de présence de *Lp* à l'état VBNC dans les TAR, les amibes pourraient avoir un rôle important dans leur revivification et leur persistance. Par ailleurs, *Lp* peut conserver un pouvoir infectieux après sa revivification et est alors capable d'infecter les cellules épithéliales alvéolaires ou les macrophages^[85].

La découverte des formes VBNC des bactéries incluant *Lp* a engendré la mise au point de techniques permettant leur détection d'autant plus que ces formes peuvent présenter un risque sanitaire important du fait de l'absence de détection par méthode culturale

conventionnelle. Ces techniques se basent sur différents critères comme l'intégrité membranaire, l'absorption d'acides aminés marqués, les activités métabolique et respiratoire ou l'expression globale des gènes^[86]. Des alternatives culturelles sont proposées, notamment dans le contrôle des médicaments et cosmétiques, avec des étapes dites de revivification basées sur des phases d'incubation courtes en milieu de culture liquide afin de « lever » le stress. Toutefois, les approches impliquant la mise en culture ne paraissent pas suffisantes, notamment dans le cas de *Lp*, soulignant les limites de la méthode officielle de dénombrement des cellules viables cultivables selon la norme NF T90-431 (Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement de *Legionella* et de *Lp* - Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation), et donc l'absence de détection des formes VBNC pourtant potentiellement proliférantes et virulentes.

La *Viability* qPCR (v-qPCR) est une approche récemment développée dans le but de détecter et de quantifier des bactéries viables dans des échantillons environnementaux par une approche génomique. Son principe de fonctionnement est basé sur une extraction d'ADN (acide désoxyribonucléique) différentielle entre bactéries « intactes » ou mortes/endommagées, avec l'intégrité membranaire comme critère de viabilité. Ainsi, une première étape va permettre d'éliminer l'ADN extra-cellulaire ou provenant de cellules endommagées en le rendant insoluble par réaction avec le monoazoture de propidium ou le monoazoture d'éthidium^[87]. Dans ces conditions, seul l'ADN de cellules dont les membranes cellulaires sont intactes sera secondairement extrait, amplifié et quantifié par PCR quantitative (qPCR)^[88].

Une autre méthode consiste à la revivification des cellules VBNC chez les amibes qui démontre que les cellules sont bien viables et en capacité de proliférer et d'infecter^[80,81,84]. La revivification est confirmée lorsque la multiplication intracellulaire chez les amibes est observée ou lors d'une croissance secondaire sur gélose.

Une autre approche, non quantitative, consiste à utiliser des marqueurs d'ADN fluorescents, tels que le Syto™ 9 et l'iodure de propidium (IP) (*LIVE/DEAD BacLight bacteria viability kit*). Le Syto™ 9 pénètre dans toutes les cellules et se fixe sur l'ADN, induisant une fluorescence verte alors que l'IP n'entre que lorsque les membranes sont endommagées et poreuses en induisant une fluorescence rouge. Ce protocole a été utilisé lors de nos essais et est détaillé dans le **chapitre III partie II.3.**

Le couplage de plusieurs méthodes est souvent préconisé pour mieux caractériser les formes VBNC chez *Lp* notamment. Plusieurs études font état d'association des techniques telles que la mesure de l'activité estérase, le suivi de la production d'ATP, la cytométrie en flux ou la revivification à la suite d'une co-culture avec des amibes^[82,89,90].

I.4.4 Cas des tours aéro-réfrigérantes

Les tour aéro-réfrigérantes (TAR) sont des systèmes utilisés pour refroidir l'eau avec de l'air ambiant. Il existe deux types de TAR : à voie humide et à voie sèche. Ces dernières ne présentent pas de danger microbiologique car elles n'impliquent pas la formation de microgouttelettes contenant potentiellement *Lp*. Seules les TAR à voie humide seront considérées dans cette partie, qui sont utilisées dans les procédés industriels exothermiques et pour les bâtiments de grande taille tels que les universités, centres commerciaux, hôtels et hôpitaux.

I.4.4.1 Principe de fonctionnement

Dans une TAR à voie humide, l'eau chaude à refroidir arrive dans la partie haute de la tour où elle est pulvérisée en fines gouttelettes par les rampes de distribution. L'eau ruisselle ensuite sur une surface d'échange appelée '*packing*' qui, du fait de sa structure, augmente la surface de contact entre l'air ascendant et l'eau pour favoriser l'échange thermique. Le flux d'air se charge en humidité et induit donc la formation de gouttelettes d'eau qui s'échappent dans l'atmosphère. Un séparateur de gouttelettes (pare-gouttelettes) est installé sur la partie haute de la tour pour limiter au maximum la production d'aérosols. L'eau refroidie, quant à elle, tombe dans un bassin de rétention situé au pied de la tour et repart vers l'installation à refroidir. Un appoint en eau et une vidange sont régulièrement réalisés pour compenser la perte par évaporation et déconcentrer les éléments minéraux et organiques ainsi que les agents biologiques dans l'eau en circulation^[61]. Le schéma ci-dessous (**Fig I.6**) représente une TAR à voie humide avec ses différents dispositifs.

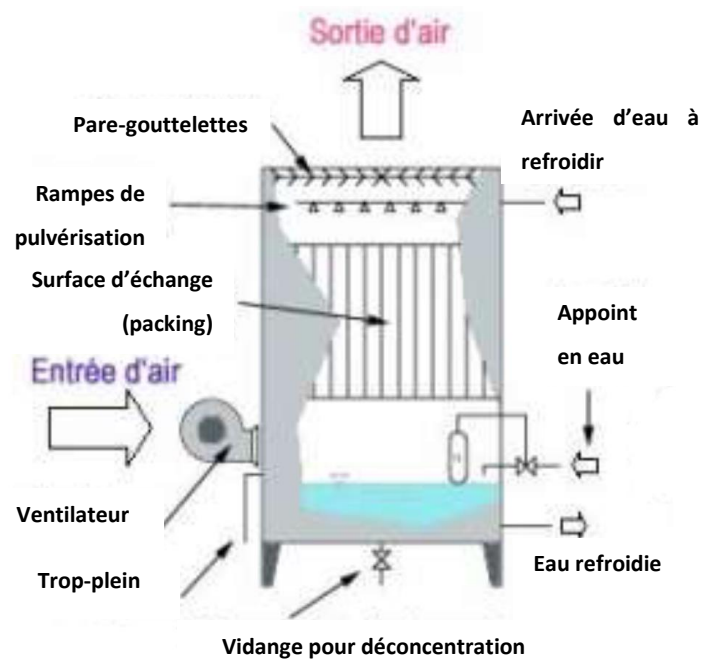


Figure I.6. Schéma d'une TAR à voie humide (d'après <https://www.usnef.fr>).

I.4.4.2 Risques de légionellose liés aux TAR

Les TAR représentent un environnement propice pour la formation de biofilms car elles comportent de grandes surfaces, comme le '*packing*', en contact avec l'eau en circulation ou stagnante (bassin de rétention). Elles présentent, en outre, des conditions d'incubation telles que la température, le débit d'eau et la quantité de nutriments disponibles, favorables à la croissance de nombreux microorganismes et protozoaires, présents sous forme libres, mais surtout au sein de biofilms. Parmi les microorganismes pathogènes retrouvés dans les TAR, *Lp* est celui considéré actuellement comme le plus dangereux et le plus persistant ; il est en conséquence le plus étudié. Il peut être véhiculé dans l'air, via le pare-gouttelettes, dans des gouttelettes inhalées par les humains et contaminer les populations avoisinantes^[61].

De très nombreuses épidémies de maladie du légionnaire ont été associées à des TAR. C'est le cas de 50 % de celles survenues entre 2006 et 2017 qui ont causé 60 % du nombre total de décès liés à la légionellose^[91]. Le **Tableau I.3** recense les épidémies les plus notables liées aux TAR de 1976 à 2017.

Ville / Pays et année	Nombre de cas signalés	Pourcentage de cas mortels
Philadelphie, Etats-Unis, 1976	182	16 %
Stafford, Royaume-Uni, 1985	68	32 %
Londres, Royaume-Uni, 1988	70	4 %
Melbourne, Australie, 2000	125	3 %
Murcie, Espagne, 2001	449	1 %
Cumbria, Royaume-Uni, 2002	179	4 %
Miyazaki, Japon, 2002	295	2 %
Pas-de-Calais, France, 2003	104	17 %
Lyon, France, 2005	34	0 %
Ontario, Canada, 2005	112	21 %
Pampelune, Espagne, 2006	146	0 %
Québec, Canada, 2012	170	8 %
New York, Etats-Unis, 2015	120	10 %
Lisbonne, Portugal, 2017	56	9 %

Tableau I.3. Liste non exhaustive des épidémies liées aux TAR entre 1976 et 2017^[1,61,92].

I.4.4.3 Gestion du risque de légionellose et surveillance microbiologique

En général, les TAR sont soumises à divers traitements réguliers. Très majoritairement de nature chimique, ces derniers sont réalisés contre la présence de tartre et de corrosion afin de permettre une bonne performance de la TAR^[61]. Un traitement contre la prolifération des légionelles est aussi essentiel du fait des risques de santé publique qu'elle peut présenter.

Selon la législation française, les TAR à voie humide sont des ICPE. La rubrique 2921^[93] de la nomenclature ICPE a été créée en 2004 et révisée successivement en décembre 2013 et juillet 2021 à la suite de plusieurs cas de légionellose liés à la prolifération et à la dispersion de légionelles par des TAR. Dans le cadre de cette rubrique, les systèmes de refroidissement évaporatifs par dispersion d'eau sont soumis à un enregistrement ou à une déclaration avec contrôle périodique par des organismes agréés suivant que la puissance du flux d'air est supérieure ou inférieure à 3000 kW.

Les arrêtés ministériels du 14 décembre 2013^[94,95] ont contribué à la mise en place de règlements plus stricts concernant la gestion du risque légionelles dans les TAR. L'objectif principal est de maintenir en permanence une concentration en légionelles inférieure à 10^3 unités formant colonies par litre (UFC/L) dans l'eau du circuit tout en limitant les impacts environnementaux. Un plan d'entretien préventif et curatif et la surveillance de l'installation doivent pour cela être définis dans un document spécifique de l'installation appelé analyse méthodique des risques (AMR). Ce document décrit aussi l'ensemble des facteurs de risques de prolifération et de dispersion des légionelles dans l'eau en circulation en prenant en compte la conception et l'implantation de l'installation ainsi que ses conditions de fonctionnement normales et exceptionnelles. Les AMR sont révisées annuellement ou tous les deux ans conformément à la réglementation afin de prendre en compte d'éventuelles évolutions au niveau de l'installation ou lors d'un changement de la stratégie de traitement de la TAR.

Le plan d'entretien préventif précise, pour toute la durée de fonctionnement de l'installation, les traitements qui sont efficaces dans la réduction de la population de légionelles et la limitation de la concentration en légionelles sous le seuil de 10^3 UFC/L. Il comprend :

1. Les opérations de nettoyage par action mécanique sur les parties accessibles de la TAR et par traitement chimique des parois.
2. Le traitement spécifique des eaux de la TAR. Les traitements se font surtout par des procédés chimiques qui seront détaillés plus tard dans ce chapitre.

Toutefois, la réglementation exige du gestionnaire de la TAR de justifier le choix des produits chimiques utilisés. Les caractéristiques, la fréquence d'utilisation et les quantités de produits ajoutées sont également contrôlées. De plus, l'optimisation de la stratégie de traitement pour la maîtrise de rejets liquides est exigée ainsi que la surveillance de ces rejets lorsqu'ils contiennent des biocides et des produits de décomposition. Par ailleurs, le traitement par des biocides non-oxydants n'est autorisé que lors de traitements curatifs, à moins que le gestionnaire ait prouvé qu'aucun traitement alternatif n'est possible.

Si la stratégie de traitement est changée, le gestionnaire est dans l'obligation d'informer l'inspection des installations classées (IIC) afin de prouver son efficacité en montrant durant deux mois les résultats d'analyses hebdomadaires de présence de légionelles jusqu'à l'obtention d'une concentration inférieure à 10^3 UFC/L.

Le plan d'entretien est accompagné d'un plan de surveillance. Ce dernier identifie l'ensemble des indicateurs à surveiller propres à l'installation (par exemple pH, conductivité, etc) pour s'assurer de l'efficacité des actions mises en œuvre dans le plan d'entretien et s'assurer de l'absence de risque de prolifération des légionelles. Ce plan détaille aussi les valeurs d'alerte et d'action des indicateurs et les mesures correctives associées.

La gestion du risque légionelles est réalisée par un personnel formé dont la formation est renouvelée tous les 5 ans.

- **Contrôle des installations**

La rubrique 2921 de la nomenclature ICPE exige trois types de contrôle :

1. L'analyse de la concentration des légionelles dans l'eau doit être réalisée une fois par mois ou tous les deux mois en fonctionnement normal pour les installations soumises respectivement à enregistrement et à déclaration. Un délai d'au moins 48 heures et d'une semaine au plus par rapport à une injection de biocide doit être respecté avant le prélèvement. La transmission des résultats à l'IIC doit être réalisée au plus tard 30 jours après la date de prélèvement. L'IIC doit aussi être informée lors d'un dépassement du seuil de 10^5 UFC/L ou de trois dépassements consécutifs du seuil de 10^3 UFC/L.
2. Un contrôle périodique sur site doit être fait une fois tous les 5 ans maximum par un organisme agréé. Cela ne concerne que les installations soumises à déclaration.
3. Un contrôle est réalisé par un organisme agréé à la suite de la mise en service de l'installation ou lors d'un dépassement de seuil de concentration de légionelles. Il comprend la visite de l'installation et la vérification des procédures associées. Un rapport est remis à l'issue du contrôle mentionnant des actions correctives ou préventives pouvant être mises en place.

Le contrôle des installations par sondage ou de manière aléatoire peuvent aussi être faits par l'IIC.

La recherche et le dénombrement des légionelles est fait par culture sur un milieu gélosé appelé GVPC (Glycine Vancomycine Polymyxine Cycloheximide) selon la norme NF T90-431 avec une quantification basée sur le nombre d'UFC. Les résultats intègrent à la fois le genre *Legionella* et l'espèce *Lp*, même si la réglementation ne concerne que les valeurs d'UFC/L de

Lp. Les valeurs intégrant les autres espèces de *Legionella* sont considérées comme indicatrices de la qualité globale de l'eau, notamment du risque de *Lp*. Les conditions de prélèvement ainsi que les paramètres physico-chimiques à suivre lors de ces prélèvements sont définis dans le guide FD T90-522 (Qualité de l'eau - Guide technique de prélèvement pour la recherche de *Legionella* dans les eaux). Seules les analyses réalisées selon la norme NF T90-431 par un laboratoire accrédité (COFRAC - Comité français d'accréditation) sont reconnues par les autorités réglementaires.

La norme NF T90-471 (Qualité de l'eau - Détection et quantification de *Legionella* et/ou *Lp* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR) propose une méthode basée sur la numération des unités génomes (UG). Cependant, à ce jour, les valeurs cibles définies pour les UFC n'ont pas été transposées en UG. Cette méthode n'est donc pas applicable pour les contrôles réglementaires mais est utilisée, du fait de sa rapidité, dans le cadre des autocontrôles réalisés par certaines structures (hôpitaux, centrales nucléaires, etc).

En résumé, les analyses de légionelles sur une TAR sont faites :

- mensuellement a minima, si elle est soumise à enregistrement ;
- bimestriellement a minima, si elle est soumise à déclaration ;
- bimensuellement pendant trois mois si un résultat d'analyse en légionelles $\geq 10^5$ UFC/L ;
- lors d'un résultat d'analyse en légionelles $\geq 10^3$ UFC/L ;
- lors de 3 résultats consécutifs en légionelles $\geq 10^3$ UFC/L et $< 10^5$ UFC/L ;
- tous les 15 jours jusqu'à obtenir 3 résultats en légionelles $< 10^3$ UFC/L ;
- lors de la présence de flore interférente ;
- après un arrêt prolongé ;
- hebdomadairement pendant deux mois pour les nouvelles installations et en cas de changement de stratégie de traitement préventif des eaux.

Par ailleurs, les mesures correctives appliquées en fonction des seuils sont précisées dans le **tableau I.4**.

Concentration en légionelles (UFC/L)	Mesures correctives à mettre en place
> 10 ³	<ul style="list-style-type: none"> • Analyse des causes • Intervention incluant nettoyage et désinfection avec obligation de résultats
>10 ⁵	<ul style="list-style-type: none"> • Arrêt immédiat de l'installation • Vidange, nettoyage, désinfection et deux contrôles successifs avant remise en service • Analyse de l'efficacité de la désinfection par le suivi de la concentration en légionelles tous les 15 jours • Recherche des sources de la dérive • Transmission d'un rapport à l'IIC

Tableau I.4. Mesures correctives appliquées en fonction des seuils de concentrations des légionelles dans les TAR.

- **Techniques de traitement**

D'une manière générale, plusieurs techniques de traitements préventifs et curatifs existent pour les circuits hydriques artificiels et sont regroupées en trois catégories : les traitements physiques (ultraviolets et membranes de filtration), les traitements thermiques (chaleur et pasteurisation) et les traitements chimiques (agents oxydants, non oxydants et ions métalliques)^[96]. Plus efficaces et particulièrement adaptés aux TAR, les traitements chimiques à base de biocides sont les plus couramment utilisés et sont appliqués en dosage choc ou en continu^[61]. Le principal mode d'action des biocides est la destruction des microorganismes. Des biodispersants ayant des propriétés tensioactives peuvent aussi être ajoutés, augmentant ainsi l'efficacité des biocides en leur permettant de mieux pénétrer les biofilms.

Les biocides oxydants agissent en oxydant les constituants cellulaires des microorganismes ; ils causent ainsi l'arrêt de fonctions cellulaires vitales. Ce type de désinfection peut être utilisé en traitement préventif ou curatif. Seule la dose résiduelle de biocide oxydant change : elle est beaucoup plus élevée lors d'un traitement choc curatif. Les biocides les plus couramment utilisés sont la monochloramine (NH₂Cl), le dioxyde de chlore (ClO₂), l'ozone (O₃) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Les produits bromés tels que le 3-bromo-1-chloro-5,5-

diméthylhydantoïne (BCDMH) ou le 2,4-dibromo-5,5-diméthylhydantoïne (DBDMH) sont aussi très employés et sont considérés comme étant les meilleurs biocides oxydants pour les TAR de par leur grande efficacité à des valeurs élevées de pH telles que celles rencontrées dans les TAR^[97,98]. En général les biocides oxydants sont peu coûteux, efficaces à faible dose et ont des rejets peu toxiques dans l'environnement. Cependant, ils peuvent être corrosifs pour l'installation^[61].

Les biocides non oxydants sont des molécules organiques de synthèse qui ont un mode d'action sélectif vis-à-vis des bactéries. Ils agissent sur des constituants cellulaires précis et causent une altération de leur métabolisme entraînant la mort des cellules. Ils sont utilisés essentiellement pour la désinfection curative dès lors que la concentration en légionelles est supérieure à 10^3 UFC/L ou lorsqu'un facteur de risque est identifié dans l'installation. Il est recommandé d'alterner deux biocides non-oxydants lors d'un traitement de choc pour éviter que les bactéries ne développent des résistances. Des composés organo-soufrés (isothiazolinones, thiocarbamate), organo-bromés (2,2-dibromo-3-nitro-propianoamide (DBNPA)), des ammoniums quaternaires et des aldéhydes^[98] sont les biocides non oxydants généralement utilisés. Bien que ces biocides demeurent peu corrosifs et efficaces à faibles doses, ils ont un coût élevé et produisent des rejets toxiques dans l'environnement lorsque l'eau de la TAR est purgée^[99].

Le règlement n° 528/2012 du Parlement européen et du Conseil européen du 22 mai 2012^[100] encadre la vente et l'utilisation des biocides. Ce règlement vise à améliorer le fonctionnement du marché des produits biocides dans l'UE, tout en garantissant un niveau élevé de protection de la santé humaine et de l'environnement. Par conséquent, la rubrique 2921 des ICPE a été révisée pour être en conformité avec le règlement de l'UE. De ce fait, l'injection de biocide oxydant en continu est favorisée pour les TAR et l'utilisation de biocides non oxydants est restreinte en raison de leur grande toxicité pour l'homme et l'environnement. La quantité de biocides injectée peut être réduite en utilisant des biodispersants en parallèle.

Si l'utilisation de biocides est efficace en termes de réduction du nombre d'UFC par unité de surface et de volume, il n'élimine pas totalement le risque de légionelles. Les biofilms et/ou amibes contenant *Lp* protègent la bactérie des effets des traitements biocides et les cellules

persistantes peuvent proliférer et coloniser à nouveau les surfaces de la TAR^[61]. Le passage à l'état VBNC de *Lp* peut ainsi être une raison supplémentaire de sa persistance dans les TAR.

II. *Legionella pneumophila* et le fer

II.1 Le fer

Derrière l'oxygène, le silicium et l'aluminium, le fer est le 4^{ème} élément le plus abondant de la croûte terrestre, constituant environ 5 % de sa masse. Le fer est aussi un élément essentiel pour le corps humain car il intervient dans plusieurs processus physiologiques comme le transport de l'oxygène par l'hémoglobine, la synthèse d'enzymes et le maintien de la pression osmotique dans les cellules par exemple^[101,102]. Le fer est tout autant important pour les bactéries car, parmi ses diverses fonctions, il joue un rôle dans les activités enzymatiques et dans la pathogénicité lors des interactions avec les cellules hôtes^[103].

II.1.1 Propriétés chimiques

Le fer existe en solution sous deux degrés d'oxydation : +II relatif à l'ion ferreux (Fe^{2+}) et +III relatif à l'ion ferrique (Fe^{3+})^[104]. Les potentiels standards d'oxydo-réduction relatifs à ces deux couples par rapport à l'électrode normale à hydrogène (ENH) à 25 °C sont donnés dans le **tableau I.5** ci-dessous. Si le fer n'est pas sous ses formes ioniques libres en solution, il est souvent précipité sous forme d'hydroxyde ferreux $\text{Fe}(\text{OH})_2$ ($K_s = 2.10^{-15}$) et d'hydroxyde ferrique $[\text{Fe}(\text{OH})_3]$ $K_s = 6.10^{-38}$.

Réaction	E^0 (V/ENH)
$\text{Fe}^{3+}_{(\text{aq})} + e^- \leftrightarrow \text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$	0,771
$\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})} + 2e^- \leftrightarrow \text{Fe}_{(\text{s})}$	-0.440

Tableau I.5. Potentiels standard d'oxydo-réduction à 25°C de Fe^{2+} et de Fe^{3+} ^[105].

En solution aqueuse, le potentiel électrochimique de l'élément dépend souvent de l'acidité du milieu. On représente cette dépendance à travers des diagrammes potentiel-pH ou

diagrammes de Pourbaix. Ils permettent de fournir des informations relatives à la stabilité des espèces chimiques et aux équilibres thermodynamiques qui peuvent se manifester entre elles. La **figure I.7** présente le diagramme de Pourbaix simplifié du fer dans l'eau à des concentrations diverses.

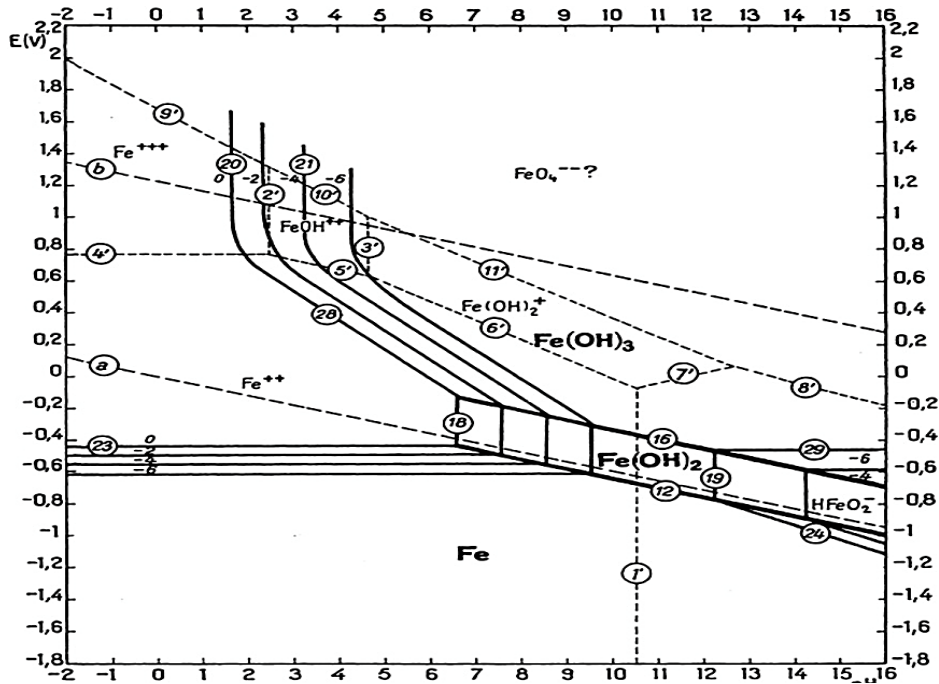


Figure I.7. Diagramme de Pourbaix du fer à des concentrations allant de 10^{-6} M à 1 M^[106].

Les ions Fe^{2+} s'oxydent spontanément en ions Fe^{3+} sous l'action de l'oxygène. La corrosion du fer conduit donc à la formation des ions ferriques (Fe^{3+}), de l'hydroxyde ferrique [$\text{Fe}(\text{OH})_3$], de l'hydroxyde ferreux [$\text{Fe}(\text{OH})_2$] et, dans des conditions très basiques, des ions HFeO_2^- . Par ailleurs, le domaine de pH dans lequel les ions Fe^{2+} existent sous forme libre à une concentration donnée est plus grand que celui des ions Fe^{3+} qui sont sous forme libre uniquement à des pH acides. Cela est dû à la différence de valeur des constantes de solubilité (K_s) des hydroxydes correspondants^[107]. Des complexes de Fe(III) tels que FeOH^{2+} et $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ peuvent aussi exister en solution, toutefois leur stabilité respective est peu documentée dans la bibliographie.

II.1.2 Présence dans l'environnement

Les processus naturels, les activités anthropiques et les microorganismes influent sur la concentration en fer dans la nature. Le fer est sous forme Fe(III) dans l'air en raison des conditions aérobies alors que sous terre, dans des conditions anoxiques, le Fe(III) est réduit en Fe(II) par des microorganismes à des pH acides^[104]. Dans les milieux aquatiques, le fer est présent à différentes concentrations micromolaires (μM) dans les eaux de rivière, nanomolaires (nM) dans les eaux côtières et picomolaires (pM) dans les eaux marines^[108]. Le Fe(II) est une espèce soluble dans l'eau. Dans les eaux riches en oxygène, il s'oxyde spontanément en Fe(III) qui se complexe avec la matière organique. Le Fe(III), bien qu'ayant une plus faible solubilité que le Fe(II), forme des complexes plus stables thermodynamiquement dans l'eau^[109].

II.2 Rôles du fer pour *Legionella pneumophila*

Le fer est un nutriment clé pour la croissance de *Lp* comme pour de nombreux agents pathogènes. La concentration nécessaire pour une croissance optimale est très variable mais plusieurs études préconisent une concentration en fer de l'ordre du micromolaire. Pour la culture *in vitro* de *Lp*, des sels de fer tels que le pyrophosphate ferrique (PPF), le chlorure ferrique, le nitrate ferrique et le sulfate ferreux sont employés^[110]. Le fer est utilisé comme cofacteur dans des réactions enzymatiques telles que la respiration et au cours de la réplication de l'ADN^[111]. Cependant un excès de fer peut se révéler toxique pour la bactérie car des radicaux libres, formés par la réaction de Fenton, peuvent endommager les membranes lipidiques, les protéines et les brins d'ADN^[112].

Comme évoqué dans la **partie I.3.3**, la virulence de *Lp* est dépendante du fer. Celui-ci est important pendant la réplication intracellulaire dans les cellules hôtes. Une étude a démontré que *Lp* est incapable de se répliquer dans des monocytes et macrophages qui ont été traités par un chélateur de fer^[113]. Par ailleurs, l'ajout de fer réalisé dans des macrophages de souris stimule la croissance intracellulaire de *Lp*^[114]. Une analogie peut être faite avec la présence accrue de fer dans les poumons de fumeurs qui sont plus à risque de contracter les formes graves de légionellose^[6,115]. Les légionelles cultivées dans des conditions pauvres en fer manifestent une pathogénicité moindre face à celles cultivées dans des milieux contenant la

quantité standard en fer^[116]. Les quantités en fer présentes dans l'environnement conditionnent donc l'infection des macrophages et autres cellules hôtes.

II.2.1 Voies d'acquisition et assimilation

Etant donné que le fer est un élément essentiel pour la survie, la réplication et la virulence de *Lp*, cette dernière a développé des mécanismes pour capter le fer de l'environnement ou des cellules hôtes et pour réguler son utilisation. Les gènes responsables de l'acquisition du fer sont contrôlés par Fur (*Ferric uptake regulator*), un régulateur transcriptionnel, qui détecte les teneurs en fer dans l'environnement proche de la bactérie^[117].

Les différentes voies d'acquisition et d'assimilation du fer par la bactérie sont détaillées ci-dessous.

II.2.1.1 Chélation par le sidérophore légiobactine

En 2000, il a été montré que *Lp* sécrète un sidérophore non-protéique de faible masse moléculaire, nommé légiobactine, qui possède une grande affinité pour le Fe(III)^[118]. Ce sidérophore est composé de deux résidus d'acide citrique liés par un pont putrescine et présente une structure similaire à la rhizoferrine, sidérophore sécrété par d'autres bactéries. La capacité de la légiobactine à se lier au Fe(III) vient de la présence des atomes d'oxygène sur des groupements carbonyle (**Fig I.8**)^[119]. La légiobactine est sécrétée pour stimuler la croissance de la bactérie lorsqu'elle se trouve dans des milieux carencés en fer, surtout en condition extracellulaire ou au sein d'un biofilm^[110,118]. La sécrétion est régulée par le gène *ccmC* présent sur le locus *ccm* (*cytochrome c maturation*) qui est situé dans la membrane interne de la cellule^[120].

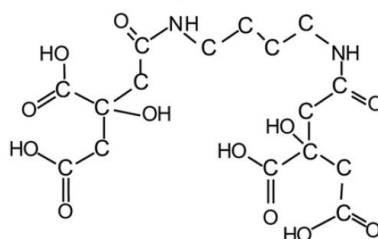


Fig I.8. La structure chimique de la légiobactine^[119]

La synthèse, le transport et la fonctionnalité de la légiobactine sont attribuables à 4 protéines : LbtA, LbtB, LbtC, LbtU. La LbtA, située dans le cytoplasme, est impliquée dans la biosynthèse de la légiobactine à partir de précurseurs. La LbtB est une protéine transmembranaire qui exporte le sidérophore vers l'espace extracellulaire. Après s'être lié avec un ion Fe^{3+} présent dans l'environnement cellulaire, le complexe Fe(III)-légiobactine est reconnu par la protéine réceptrice LbtU située sur la membrane externe de la bactérie. Elle assure l'import du complexe vers le périplasma. Finalement, le complexe passe par la membrane interne via la protéine transmembranaire LbtC et le Fe^{3+} est libéré dans le cytoplasme pour être potentiellement réduit en Fe^{2+} . La légiobactine peut ensuite être recyclée pour effectuer un nouveau cycle de récupération des ions Fe^{3+} [121]. Un schéma du parcours de la légiobactine est représenté ci-dessous (**Fig I.9**).

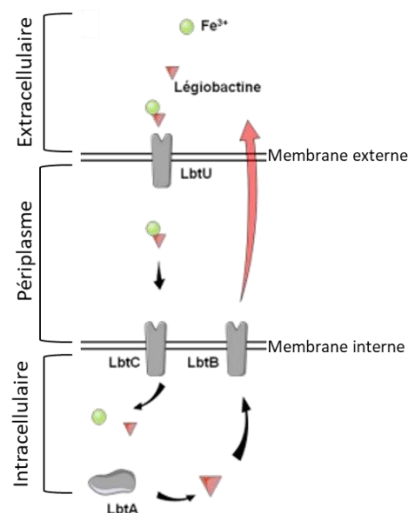


Figure I.9. Voie d'acquisition du fer ferrique par la Légiobactine^[122].

II.2.1.2 Transport par les protéines FeoB et FeoA

Lors du passage du complexe Fe(III)- légiobactine dans le périplasma, il est possible que le Fe^{3+} soit libéré pour être réduit en Fe^{2+} par des réductases périplasmiques^[123]. Ainsi, la protéine FeoB, présentant 10 domaines transmembranaires et située sur la membrane interne, se charge du transport du Fe^{2+} vers le cytoplasme où il est assimilé. Par ailleurs, le rôle de la protéine FeoA, localisée dans le cytoplasme, n'est pas suffisamment documenté à ce jour mais elle semble être indispensable à l'activité de FeoB. Ce système de transport est essentiel pour

la croissance de *Lp* en milieu intracellulaire comme extracellulaire, surtout dans des conditions où le fer est limitant^[124].

II.2.1.3 Autres voies

Les voies LbtABCU et FeoAB constituent les voies critiques pour l'acquisition du fer même s'il en existe plusieurs autres.

L'une d'entre elles implique la sécrétion par *Lp* d'un pigment brun nommé pyomélanine, composé de l'acide homogentisique et de l'acide homogentisique-mélanine. Ce pigment a la capacité de réduire le Fe(III) et ainsi permettre à la protéine FeoB de capter le Fe²⁺. Il est notamment sécrété, en absence d'activité de sidérophores, lorsque le milieu est pauvre en fer pour améliorer la capture du fer et stimuler la croissance bactérienne^[125]. Une autre voie implique le gène *iraB* (*iron acquisition/assimilation B*) qui code pour une protéine de 501 acides aminés. Elle est similaire aux protéines appartenant à la famille de PTR2 (transporteur peptidase) et à des transporteurs di- ou tri-peptides présents dans la membrane interne. La protéine IraB peut être impliquée dans l'import de peptides chargés de molécules de fer et participe à la croissance extracellulaire de la bactérie^[113]. Une étude récente a montré l'existence d'une voie comprenant une protéine membranaire appelée MaVN (*more regions allowing vacuolar colocalization N*) capable de transporter du Fe²⁺ du cytosol de la cellule hôte vers le LCV^[111]. Elle serait donc associée à la réplication intracellulaire de *Lp*^[126].

II.2.2 Relation entre la concentration en fer et la croissance/persistence de *Legionella pneumophila*

Des études ont été réalisées pour déterminer la concentration en fer nécessaire au développement optimal de *Lp* dans des milieux de culture liquides en laboratoire. Elles ont permis de montrer que la concentration en fer doit se situer entre 3 µM et 20 µM^[123,127,128]. En dessous d'une concentration de 2,3 µM, le milieu est considéré pauvre en fer. Les bactéries subissent alors un changement de morphologie comme le montrent les photographies de la **Figure I.10**. Elles adoptent une forme plus raccourcie en comparaison avec la forme plus ou moins allongée et filamenteuse qu'elles ont dans les conditions de culture standard^[127].

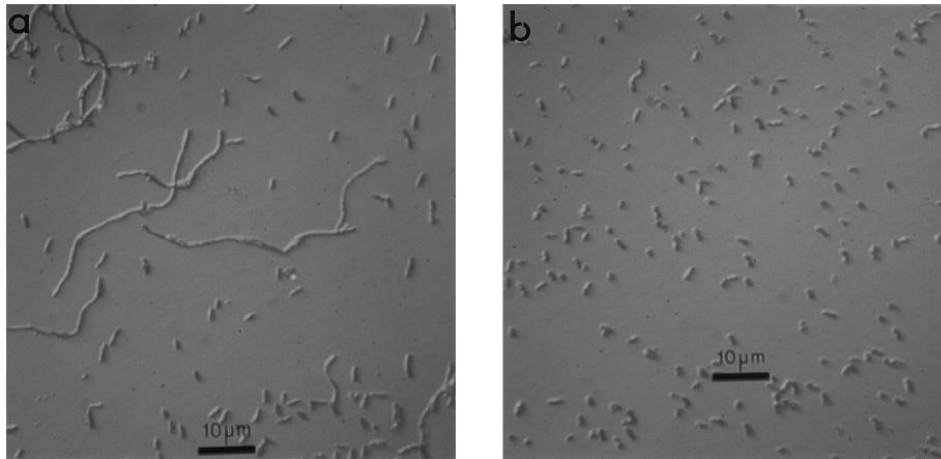


Figure I.10. *L. pneumophila* observée au microscope en contraste de phase^[127]. (a) Milieu en conditions standard de culture, [Fe] = 147 μM. (b) Milieu pauvre en fer, [Fe] = 0,13 μM.

Dans les installations hydriques artificielles, la concentration en fer requise pour la persistance de *Lp* diffère d'une installation à l'autre. Cela s'explique par un effet de matrice qui rend chaque eau différente. Des prélèvements provenant des installations d'eau chaude des hôtels, d'hôpitaux et de maisons de retraite notamment, ont montré la présence de *Lp* lorsque la concentration en fer total dans ces eaux est supérieure à 1,3 μM^[129-131]. Le risque de colonisation par la bactérie augmente d'un facteur égal à 2,2 lorsque la concentration en fer total est supérieure à 0,75 μM^[129]. Ce risque peut être 100 fois plus élevé si la concentration en fer total varie de 18 μM à 0,9 mM. En revanche, au-dessus de 0,9 mM, la bactérie subit des effets toxiques dus à la forte concentration en fer et ne se développe plus^[132]. Cependant, une étude récente effectuée sur des prélèvements d'eau de 30 TAR contaminées, a montré que 24 d'entre elles ont une concentration en fer supérieure à 5 mM^[133].

Ces données doivent cependant être considérées avec circonspection puisqu'elles correspondent toutes à des corrélations entre des concentrations en fer total et des populations planctoniques de *Lp* détectées par numération des UFC ou UG ou par suivi du poids sec des cellules.

Remarque : Cette étude bibliographique indique que la présence de *Lp* serait accrue dans les systèmes d'eau artificiels à partir des concentrations en fer total de l'ordre du micromolaire. Par ailleurs, les TAR gérées par le partenaire industriel Resonet Services contiennent en général des concentrations en fer en dessous de 10 μM. En lien avec les données de la

bibliographie, une gamme de concentration en fer comprises entre 2 et 10 μM a été définie en tant que gamme d'intérêt par le cahier des charges pour notre étude.

II.2.3 Influence du fer sur les biofilms contenant *Legionella pneumophila*

Le fer est un élément régulateur essentiel dans la formation de biofilms chez plusieurs espèces bactériennes comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Vibrio cholerae*^[134–136]. Ainsi, des chercheurs ont essayé d'établir le lien qui existe entre les biofilms mono-espèces à *Lp* et le fer. En 2008, Hindré *et al.* ont démontré qu'en présence de pyrophosphate ferrique à la concentration de 1,7 mM, qui est une concentration 5 fois plus élevée que la concentration en fer standard (0,34 mM) habituellement retrouvée dans les milieux, l'adhésion des cellules est nettement réduite, inhibant ainsi la formation de biofilm. Des concentrations trop élevées en fer sont donc néfastes à la formation du biofilm^[137]. Par ailleurs, d'autres études ont évoqué le fait que le niveau en fer disponible pour *Lp* puisse servir de signal parmi d'autres pour débiter le développement d'un biofilm^[134,137].

Les biofilms contenant *Lp* que l'on trouve dans les systèmes aquatiques sont des biofilms complexes^[48]. Ainsi, les mécanismes de survie de *Lp* dans les biofilms naturels sont assez variables ; ils diffèrent selon les types de bactéries qui constituent la base du biofilm ainsi que la présence de différents hôtes protozoaires et de facteurs environnementaux non microbiens.

Pour mieux comprendre l'impact du fer sur les biofilms contenant *Lp*, une étude sur des biofilms complexes a été réalisée en 2016 à l'Université de Poitiers. Une eau de rivière, dopée en *Lp* à une concentration de 10^6 UFC/mL, a été utilisée pour évaluer la formation de biofilms en présence ou non de chélateurs. L'ajout d'un chélateur du fer ferreux, le 2,2'-dipyridyl (DIP), a conduit à une augmentation la population de *Lp* (souche sauvage et mutants déficients dans l'acquisition du fer) dans le biofilm. Le chélateur n'a pas affecté la population des autres bactéries dans le biofilm ni la persistance d'amibes libres dans le biofilm. Le DIP contribuerait donc à la persistance de *Lp* dans le biofilm en protégeant les bactéries des effets indésirables du Fe^{2+} en lien avec une diminution de la production de ROS (*Reactive Oxygen Species*) lors de la réaction de Fenton^[138].

III. Méthodes d'analyse du fer dans l'eau

III.1 Méthodes d'analyse de routine

Diverses techniques analytiques existent pour la détection du fer dans l'eau. Parmi elles, on compte des techniques de spectrophotométrie^[139], de chromatographie^[140], de spectrométrie atomique^[141] et de chimiluminescence^[142]. Deux de ces techniques de référence qui seront utilisées dans le cadre de ce projet sont présentées dans cette partie.

III.1.1 Spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP- *Inductively Coupled Plasma*)

L'analyse d'un échantillon liquide par ICP est composée de plusieurs étapes. L'échantillon liquide est d'abord transformé en aérosol par un nébuliseur. L'aérosol est ensuite injecté dans un plasma généré par une torche à plasma. Le gaz plasmagène utilisé est généralement l'hélium, le néon ou l'argon. L'injection de l'aérosol dans le plasma se fait à très haute température (entre 6000 et 10000 °C) pour vaporiser, dissocier, atomiser et ioniser complètement l'élément à analyser. Le plasma, contenant des ions et électrons, est finalement dirigé vers l'analyseur. Il existe deux types d'analyseurs :

1. La spectrométrie d'émission atomique (AES) : Les électrons des atomes, excités par l'effet du plasma, retournent à leur état fondamental en émettant des raies dont la longueur d'onde est caractéristique de l'élément à analyser. L'intensité des raies est mesurée par un ou plusieurs monochromateurs pour quantifier l'analyte. La **figure I.11** présente le schéma du montage d'un ICP-AES.

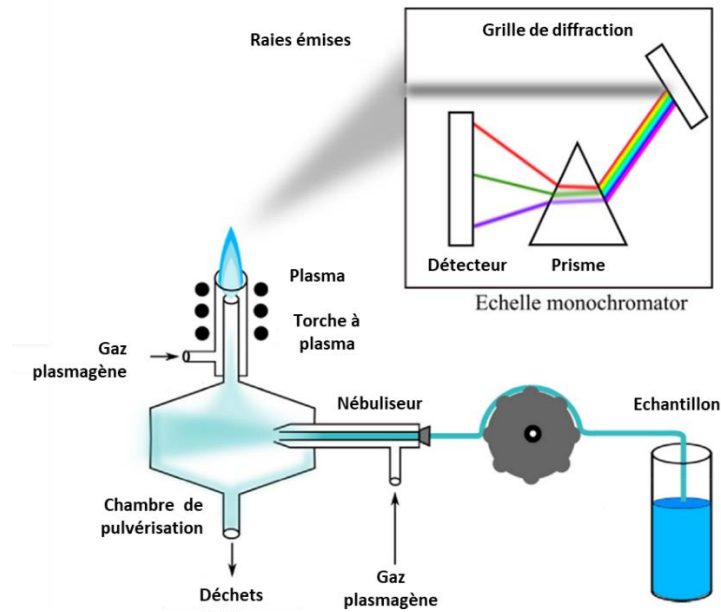


Figure I.11. Schéma du montage d'un ICP-AES^[143].

2. La spectrométrie de masse (MS) : Le plasma est transféré dans un système sous vide vers un ensemble de lentilles électrostatiques qui extrait les ions chargés positivement et les transporte vers un filtre de masse quadripolaire. Les ions sont séparés en fonction de leur rapport m/z . La quantification des ions est faite à l'aide d'un multiplicateur d'électrons à la sortie du quadripôle. Le montage classique d'un ICP-MS est présenté à la **figure I.12**.

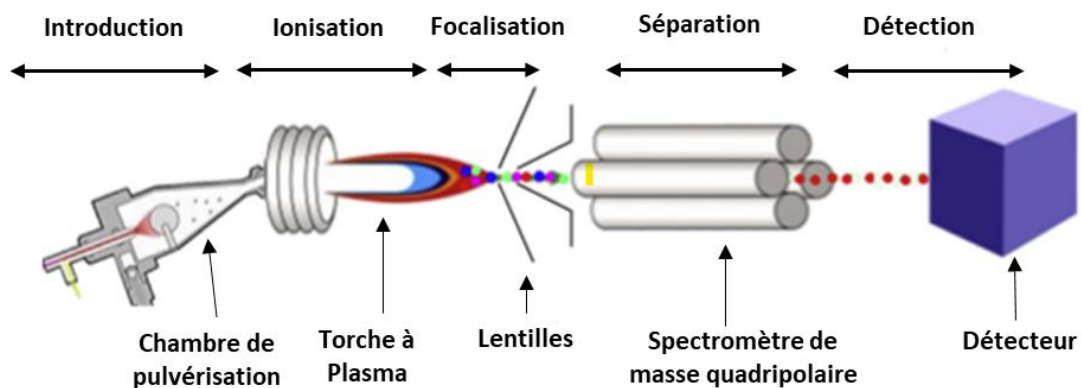


Figure I.12. Schéma du principe de l'ICP-MS^[144].

L'ICP présente la particularité d'être une technique d'analyse rapide et très sensible, permettant la détection du fer à l'état de traces. Cependant, elle ne permet pas de faire la spéciation du fer et est utilisée pour déterminer la concentration en fer total dans un échantillon.

Pour la technique ICP-AES, des limites de détection (LOD) de 17,9 nM^[145] et 19,8 nM^[146] ont été signalées pour la détermination du fer total. La limite de détection est plus basse lorsque l'ICP est couplée à la spectrométrie de masse. Dans ce cas, des LOD de 2 pM^[141] et 14 pM^[147] ont été relevées dans la bibliographie.

III.1.2 Spectrophotométrie

La spectrophotométrie est une méthode utilisée en routine pour l'étude quantitative des solutions contenant des métaux de transition et des composés organiques fortement conjugués. Le principe de l'analyse repose sur la loi de Beer-Lambert (**Equation I.1**) qui implique qu'à une longueur d'onde donnée, l'absorbance d'une entité chimique en solution est proportionnelle à sa concentration et à la longueur du trajet optique (distance sur laquelle la lumière traverse la solution). L'instrument utilisé pour cette technique est un spectrophotomètre UV-visible mettant en jeu des photons dont les longueurs d'onde sont dans le domaine de l'ultraviolet (100 nm à 400 nm), du visible (400 nm à 750 nm) ou du proche infrarouge (750 nm à 1400 nm). Il mesure l'intensité de la lumière (I) passant au travers d'un échantillon et la compare à l'intensité (I_0) de la lumière passant dans un échantillon de référence contenant le même solvant que celui utilisé pour l'échantillon, dans une cuve similaire. Le rapport (I/I_0), appelé transmittance (T), est généralement exprimé en pourcentage (%).

$$A_\lambda = -\log(T) = \varepsilon_\lambda l C$$

Equation I.1 Loi de Beer-Lambert

T : Transmittance (%)

A_λ : Absorbance de la solution pour une longueur d'onde λ

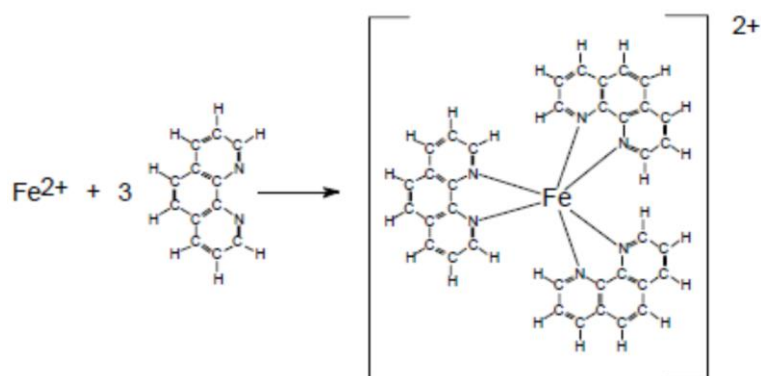
ε_λ : Coefficient d'extinction molaire de la substance absorbante en solution (L.mol⁻¹.cm⁻¹)

l : Longueur du trajet optique (cm)

C : Concentration de la substance absorbante (mol.L^{-1})

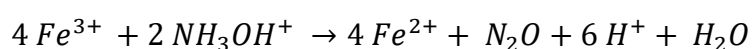
Cette méthode a l'avantage d'être simple, peu coûteuse et capable de distinguer les deux formes ioniques du fer en solution. Des ligands tels que le DIP^[148], le thiocyanate^[149], le ferrozine^[150] et la 1,10-phénanthroline^[139] peuvent se lier au fer (un seul état redox) pour former des complexes colorés et ainsi permettre sa détection dans le domaine du visible.

La 1,10-phénanthroline est le ligand choisi dans le cadre de cette étude étant donné son usage très courant dans la bibliographie. Elle réagit spontanément avec le Fe^{2+} selon une stœchiométrie 3 : 1 (**équation I.2**) pour donner un complexe rouge-orangé dans un domaine de pH compris entre 2 et 9. L'absorbance maximale du complexe se situe à une longueur d'onde de 510 nm.



Equation I.2. Réaction de formation du complexe Fe(II)-1,10-phénanthroline

Pour la détermination du fer total d'une solution, un réducteur tel que l'hydroxylamine est ajouté en milieu acide pour réduire les ions Fe^{3+} en Fe^{2+} (**équation I.3**) suivi de la complexation avec la 1,10-phénanthroline.



Equation I.3. Réaction de réduction du Fe^{3+} par l'hydroxylamine en milieu acide.

Ainsi, les concentrations du fer total et du Fe(II) pouvant être déterminées, la concentration de Fe(III) est déduite par soustraction^[151,152]. Une LOD de 0,36 μM a été obtenue par cette méthode^[152].

III.2 Méthodes de détection électrochimique

Les techniques de référence employées pour la détection du fer comportent des avantages tels que la sensibilité et la fiabilité des mesures. Cependant, elles présentent également des inconvénients non négligeables. Elles nécessitent toujours l'utilisation de réactifs, de procédures de prétraitement et d'instruments relativement coûteux, ce qui augmente le temps d'analyse et les coûts opérationnels. De plus, les dimensions et le poids des instruments limitent également leur utilisation sur le terrain. Comparativement, l'électrochimie apparaît comme une solution alternative crédible pour proposer des méthodes de mesure bien moins coûteuses alliant simplicité, rapidité, sensibilité et spécificité. Elles permettent aussi de réaliser des mesures *in situ* en continu. Les capteurs électrochimiques connaissent un développement considérable ces dernières années grâce à leur utilisation dans le contrôle des milieux aquatiques^[153–155].

Un capteur électrochimique est un outil analytique comprenant une partie assurant la reconnaissance chimique et une partie transduction qui convertit l'information chimique en un signal électrique mesurable. Le principe de fonctionnement d'un capteur électrochimique est schématisé à la **figure I.13**. Les capteurs électrochimiques peuvent être classés selon leur mode de transduction : potentiométrique, conductimétrique, ampérométrique ou impédancemétrique.

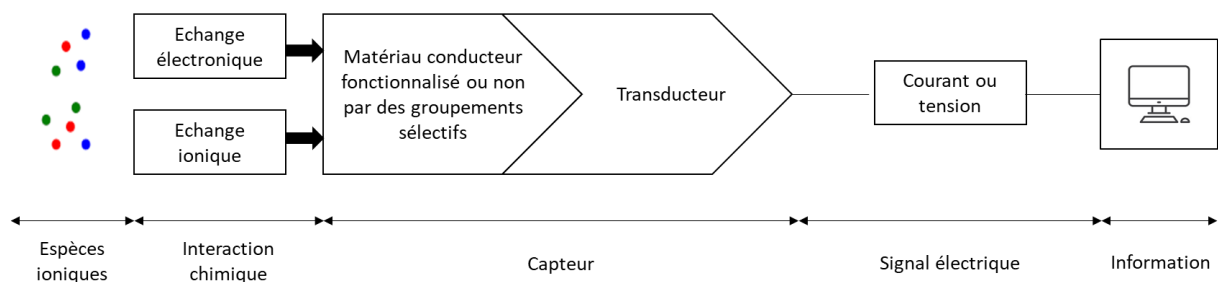


Figure I.13. Schéma montrant les principes de fonctionnement d'un capteur électrochimique^[156].

Dans cette partie sont détaillés les capteurs potentiométriques et ampérométriques qui ont été utilisés pour la détection du fer. Les capteurs conductimétriques ne présentent pas de sélectivité car ils mesurent la conductance relative à toutes les espèces ioniques en solution. La détection sélective du fer seul en solution n'est donc pas possible avec ce type de capteur. Peu d'études ont été faites avec les capteurs impédancemétriques car ils sont trop complexes à mettre en œuvre.

III.2.1 Les capteurs potentiométriques

Un capteur potentiométrique est composé d'une électrode indicatrice (redox, à membrane) et d'une électrode de référence. Ce type de capteur mesure la différence de potentiel entre ces deux électrodes à courant nul. Pour respecter cette condition de courant nul, l'impédance de l'appareil de mesure doit être élevée ($>10^{12} \Omega$).

L'électrode redox est constituée d'un matériau conducteur électronique dans une solution contenant le réducteur (Red) et l'oxydant (Ox) d'un même couple électrochimique. Il s'établit alors à l'interface l'équilibre chimique suivant : $x \text{ Ox} + n e^- \leftrightarrow y \text{ Red}$.

Le potentiel adopté par l'électrode indicatrice, appelé potentiel d'équilibre (E_{eq}), est donné par l'équation de Nernst (**équation I.4**).

$$E_{eq} = E_{Ox/Red}^0 + 2,3 \frac{RT}{nF} \log \frac{a_{Ox}^x}{a_{Red}^y}$$

Equation I.4. Equation de Nernst.

$E_{Ox/Red}^0$: potentiel standard du couple Ox / Red (V)

R : constante des gaz parfaits (= 8,314 J.K⁻¹.mol⁻¹)

T : température (K)

n : nombre d'électrons équivalents impliqués dans la réaction électrochimique

F : constante de Faraday (= 96484,5 C.mol⁻¹)

a_{Ox} : activité chimique de l'oxydant

a_{red} : activité chimique du réducteur

L'inconvénient majeur de l'électrode redox est sa non-sélectivité dans des eaux contenant plusieurs espèces électroactives. Un potentiel mixte est alors mesuré, qui résulte de la contribution de l'ensemble des espèces redox présentes, dont la valeur n'est pas prédictible thermodynamiquement.

Pour résoudre ce problème de sélectivité, des électrodes spécifiques (ISE- *Ion Selective Electrodes*) ont été conçues. Un exemple très connu d'ISE est l'électrode à pH. Les électrodes spécifiques mettent en jeu des équilibres ioniques aux interfaces entre des électrolytes liquides et des membranes constituées de matériaux conducteurs ioniques (électrolytes solides, polymères conducteurs ioniques, membranes liquides). La composition de la membrane fait qu'elle est spécifique d'un seul ion.

Une ISE comporte une électrode indicatrice plongée dans une solution interne contenant l'ion cible à une concentration connue et constante. Cette solution interne est séparée de la solution à doser contenant l'espèce cible par une membrane conductrice intégrant un ionophore spécifique de l'ion. Le montage et l'écriture symbolique simplifiée de la chaîne électrochimique d'une ISE sont présentés sur la **figure I.14**.

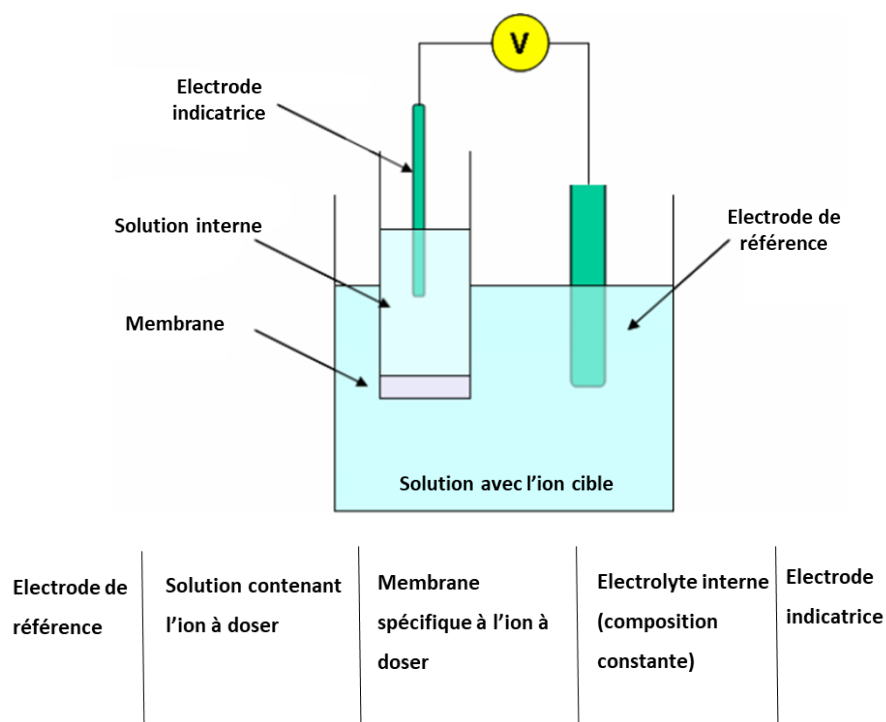


Figure I.14. Montage d'une ISE et l'écriture symbolique simplifiée de sa chaîne électrochimique correspondante.

Un potentiel de membrane (E_m) lié à l'activité de l'ion cible (I) dans la solution à doser est mesuré et décrit dans l'équation I.5.

$$E_m = A + 2,3 \frac{RT}{Z_i F} \log (a_i)$$

Equation I.5. Equation du potentiel de membrane E_m

A : Constante

R : constante des gaz parfaits (= 8,314 J.K⁻¹.mol⁻¹)

T : température (K)

F : constante de Faraday (= 96484,5 C.mol⁻¹)

a_i : activité de l'ion cible analytique

z_i : charge de l'ion à doser

Ces dernières années, plusieurs articles ont décrit la détection du fer dans les milieux aqueux par des capteurs basés sur des ISE. La majorité de ces articles concerne la détection de Fe³⁺ en tant que forme prédominante du fer dans l'eau^[109].

Les ISE élaborées pour la détection de Fe²⁺ ou de Fe³⁺ ont un temps de réponse rapide, compris entre 7 et 30 secondes^[157,158], et une durée de vie opérationnelle de 160 à 200 jours en moyenne^[158].

Pour assurer une bonne sélectivité vis-à-vis des ions Fe²⁺ ou Fe³⁺, un ionophore est incorporé dans la membrane spécifique. Les ionophores sont généralement des agents complexants neutres et lipophiles capables de se lier de façon réversible à un seul ion ou à un groupe restreint d'ions. Ainsi, ils ont un rôle de transporteur et facilitent l'insertion d'ions dans la membrane.

Les autres constituants de la membrane sont :

1. Le PVC (Polychlorure de vinyle) qui est un polymère thermoplastique assurant la dureté et la rigidité de la membrane ;
2. Des plastifiants tels que le o-NPOE (éther ortho-nitrophényl octylique) ou le DBP (phtalate de dibutyle) qui fournissent un peu de souplesse à la membrane, la rendant

par conséquent moins fragile. De plus, ils augmentent la plage de concentration de travail, la stabilité et la durée de vie de l'électrode^[159] ;

- Un additif chargé négativement tel que le NaTPB (tétraphénylborate de sodium) est souvent ajouté en faible quantité pour réduire la résistance ohmique, le temps de réponse de l'électrode et l'interférence anionique^[160-162].

Les caractéristiques de quelques ISE mises au point ces dix dernières années pour la détection du fer dans l'eau à des concentrations correspondant à notre gamme d'intérêt (2 à 10 µM) sont présentées dans le **tableau I.6**.

ISE Fe(III)						
Réf.	Matériau de l'électrode indicatrice	Ionophore	LOD (mol/L)	Domaine de linéarité (mol/L)	Sensibilité (mV/décade de concentration)	Domaine de pH
[162]	Argent	IBMYD ^a	5.10 ⁻⁸	10 ⁻⁷ à 10 ⁻¹	19,9	3,0 à 6,3
[164]	Graphite	PPT ^b	2.10 ⁻⁷	3.10 ⁻⁷ à 10 ⁻²	20,2	1,8 à 5,8
[164]	Non spécifié	MMCT ^c	9.10 ⁻⁶	9,1.10 ⁻⁶ à 10 ⁻¹	21,2	3,2 à 4,8
[166]	Argent	CBTPPP ^d	8,6.10 ⁻⁸	10 ⁻⁷ à 10 ⁻¹	21,6	2,0 à 3,8
[167]	Argent	TTA ^e	8,3.10 ⁻⁹	10 ⁻⁸ à 10 ⁻²	19,8	2,4 à 4,3
[168]	Graphite	MTMATT ^f	2.3.10 ⁻⁸	8,3.10 ⁻⁸ à 10 ⁻¹	19,5	1,5 à 6,5
[169]	Argent	b-18C6 ^g	8.10 ⁻⁷	10 ⁻⁶ à 10 ⁻¹	19,5	2,5 à 5,7
ISE Fe(II)						
[170]	Graphite	RC ^h	7,4.10 ⁻⁸	10 ⁻⁷ à 10 ⁻¹	29,4	1,5 à 6,5
[157]	Carbone sérigraphié	-	8,8.10 ⁻⁷	10 ⁻⁶ à 10 ⁻¹	29,7	3,5 à 5

Tableau I.6. Caractéristiques des ISE pour la détection de Fe³⁺ et Fe²⁺

IBMYD^a : 1,1-(iminobis(methan-1-yl-1-ylidene))-dinaphthalène-2-ol

PPT^b : 1-phenyl-3-pyridin-2-yl-thiourée

MMCT^c : S-methyl N-(méthylcarbamoxyloxy)-thioacetimidate

CBTPPP^d : 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-tris(4-phenoxyphényl)-porphyrine

TTA^e : (tris(3-(thiophénal)propyl)amine

MTMATT^f : 5-((3-méthylthiophene-2yl)méthylèneamino)-1,3,4-thiadiazole-2-thiol

B-18C6^g : benzo-18-crown-6

RC^h : rhodamine-diméthyliminocinnamyl

Les matériaux conducteurs électroniques les plus souvent utilisés comme électrode indicatrice sont l'argent (électrode de seconde espèce Ag/AgCl/Cl⁻) ou le carbone (électrode de pseudo-référence). Les ionophores sont des composés obtenus après synthèse organique : ils peuvent être des bases de Schiff (IBMYD, MTMATT, TTA), des porphyrines (CBTPPP) ou des macrocycles (b-18C6). Ils ont tous la particularité d'avoir une excellente affinité avec Fe²⁺ ou Fe³⁺ de par leurs propriétés de complexation. Seuls les travaux de Gholami *et al.*^[157] ne font pas l'usage d'ionophore. L'électrode indicatrice en carbone est dans ce cas fonctionnalisée par du polypyrrole et du SDS (dodécylsulfate de sodium), ce qui confère une charge négative à la surface de l'électrode, attirant ainsi les cations Fe²⁺.

Les LOD et les domaines linéaires de concentration répertoriés montrent que les ISE permettent de doser le fer sur une large gamme de concentration, quelquefois même à l'état de traces pour le Fe³⁺, c'est-à-dire à des concentrations en dessous de 10⁻⁷ M.

La sensibilité, aussi connue comme la pente Nernstienne, est une performance analytique évaluant le bon fonctionnement de l'ISE. D'après l'**équation I.5**, elle doit théoriquement être égale à 19,7 mV/décade et 29,5 mV/décade pour les ISE spécifiques de Fe³⁺ et Fe²⁺ à 25°C, respectivement. Les valeurs reportées dans le **tableau I.6** sont toutes proches de ces deux valeurs théoriques.

Les domaines de pH accessibles par les ISE indiqués dans le **tableau I.6** sont restreints par deux processus différents :

1. Une interférence des ions H^+ aux plus faibles valeurs de pH, car leur concentration devient trop élevée et la membrane perd en sélectivité vis-à-vis de Fe^{2+} ou de Fe^{3+} ;
2. La formation des hydroxydes de fer lorsque le pH augmente, ce qui diminue la concentration de $Fe(II)$ ou de $Fe(III)$ libre^[171].

Selon certaines études, il est possible d'étudier la spéciation du fer avec des ISE de $Fe(III)$ ^[167,172]. En effet, une mesure de la concentration du Fe^{3+} est réalisée dans l'eau avant et après l'ajout d'oxydants tels que H_2O_2 et NO_3^- qui vont convertir le $Fe(II)$ présent en $Fe(III)$. Ainsi, la concentration du fer total et du Fe^{3+} pouvant être connue, la concentration de $Fe(II)$ est déduite par soustraction.

III.2.2 Les capteurs ampérométriques

Un capteur ampérométrique est généralement composé d'un dispositif à trois électrodes avec une électrode de travail, une électrode de référence et une électrode auxiliaire. Le principe consiste à mesurer l'intensité dans le circuit principal comprenant l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire, due aux réactions électrochimiques qui ont lieu à chacune d'entre elles, en fonction du potentiel imposé à l'électrode de travail et exprimé par rapport à celui de l'électrode de référence.

Les capteurs ampérométriques mis au point pour la détection du fer dans l'eau emploient tous des techniques voltammétriques connues pour leur sensibilité. Elles se différencient par la consigne de potentiel imposé à l'électrode de travail. La courbe intensité-potentiel qui en résulte présente un pic ou une vague de courant dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de l'analyte dans l'eau quel que soit la consigne de potentiel. Le **tableau I.7** reprend les principales techniques voltammétriques utilisées dans le cadre de la détection du fer dans l'eau.

Technique	Potentiel imposé (E) vs temps (t)	Courbes Intensité (I) - potentiel (E)	Gamme de concentration détectée (mol/L)
Voltammétrie à balayage linéaire en régime transitoire (trait plein) ou voltammétrie cyclique (pointillé)			10^{-6} à 10^{-2}
Voltammétrie différentielle à impulsions			10^{-8} à 10^{-4}
Voltammétrie à vagues carrées			10^{-8} à 10^{-4}
Voltammétrie à redissolution anodique par balayage linéaire (trait plein) ou à vague carrée (pointillé)			10^{-11} à 10^{-6}
Voltammétrie à redissolution cathodique après adsorption par balayage linéaire (trait plein) ou à vague carrée (pointillé)			10^{-12} à 10^{-6}

Tableau I.7. Techniques voltamétriques utilisées pour la détection du fer dans l'eau^[173]. v

= vitesse de balayage ; i_p = intensité de pic ; ΔE = amplitude d'impulsion ; t_p = temps

d'impulsion ; f = fréquence ; t_d = temps de préconcentration

Les techniques électrochimiques présentées dans le **tableau I.7** se distinguent par la consigne en potentiel. La voltammétrie à balayage linéaire en régime transitoire et la voltammétrie cyclique sont peu utilisées à des fins d'analyse mais plutôt pour déterminer certaines propriétés électrochimiques des espèces redox ; elles permettent au mieux de déterminer au des concentrations micromolaires. Les techniques pulsées, comme la voltammétrie différentielle à impulsions et la voltammétrie à vagues carrées, sont caractérisées par une suppression partielle du courant capacitif permettant de mesurer des concentrations jusqu'à 10^{-8} M. Pour mesurer des concentrations encore plus basses (jusqu'à 10^{-12} M), les techniques décrites ci-dessus sont couplées aux méthodes de redissolution où une préconcentration de l'élément cible a lieu à la surface de l'électrode lorsqu'un potentiel constant est imposé sur une durée définie préalablement à la détection électrochimique. Pour toutes les techniques détaillées, le signal obtenu sur la courbe I-E présente une variation de l'intensité en fonction du potentiel imposé.

Pour la détection du fer dans les milieux aqueux, divers matériaux d'électrode ont été utilisés au fil des années, le mercure, le bismuth et le carbone étant les matériaux les plus employés et décrits dans la bibliographie. La majorité des publications concerne la détection du Fe(III), forme prédominante du fer dans les eaux environnementales^[109].

L'objectif de la partie suivante n'est pas de présenter une liste exhaustive de ces études mais de donner un aperçu global de différents capteurs électrochimiques développés au fil des années avec ces matériaux spécifiques. Ceux qui sont les plus en accord avec la gamme de concentration d'intérêt (2 à 10 μ M) fixée par le cahier des charges et les méthodes permettant de faire la spéciation du fer seront décrits en priorité. Ceci dit, il existe peu de publications faisant état de la détection du fer dans cette gamme de concentrations en raison des objectifs de performances analytiques liées aux concentrations plus basses en fer retrouvées dans les eaux naturelles (concentrations nM). La tendance actuelle des recherches vise plutôt à augmenter la sensibilité et à abaisser la LOD des méthodes actuellement développées^[171].

Pour chaque capteur présenté, une brève description sera faite sur les performances analytiques, la méthodologie utilisée et les résultats obtenus.

III.2.2.1 Electrodes à base de mercure (Hg)

Au cours du XX^{ème} siècle, les électrodes à base de mercure telles que les électrodes à goutte pendante de mercure (HMDE) et les électrodes à film de mercure ont été les plus employées pour la détection du fer dans l'eau^[109]. En effet, le mercure présente des avantages tels que la forte surtension de réduction du solvant et une grande sensibilité en présence de faibles concentrations d'analyte. La voltammétrie à redissolution cathodique après adsorption (AdCSV) est largement employée avec ce type d'électrode car elle permet d'abaisser les limites de détection grâce à l'étape de préconcentration. Cette méthode implique aussi l'utilisation de complexants de Fe(III) tels que le pyrocatechol, le 1-nitroso-2-naphthol (NN), le dihydroxonaphtalène (DHN) ou le Solochrome Violet RS (SVRS)^[174]. Quelques études intéressantes pour nos travaux sont présentées dans cette partie.

Pournaghi-Azar *et al.*^[175] ont mis au point une méthode de dosage du Fe(III) par l'utilisation d'une électrode de mercure à gouttes tombantes dans des échantillons géologiques. Le Fe(III) présent en solution est d'abord complexé par le chélateur oxine pour former du Fe(III)-oxinate puis la détection électrochimique par voltammétrie différentielle à impulsion (ou polarographie différentielle à impulsion) est réalisée. La courbe d'étalonnage est linéaire sur une gamme de concentrations comprises entre 2 et 80 μM (correspondant à notre gamme d'intérêt) et la LOD calculée est de 1,5 μM . En ajoutant du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans l'échantillon, tout le Fe(II) présent s'oxyde en Fe(III). Ainsi, la concentration en fer total peut être déterminée ainsi que la concentration en Fe(II) par soustraction.

Une autre approche a été mise au point par des chercheurs russes pour le dosage de Fe(III) dans des eaux naturelles et potables par AdCSV en utilisant une électrode en graphite recouverte de calomel (Hg_2Cl_2)^[176]. L'ajout du ligand pyrocatechol a permis la formation d'un complexe de fer préconcentré à l'électrode en appliquant un potentiel de 0,1 V pendant 30 s. Une LOD de 0,36 nM a été obtenue et la réponse du capteur est linéaire dans une gamme de concentration comprise entre 0,9 nM et 90 nM. En ajoutant du H_2O_2 dans l'échantillon, la détermination de la concentration en fer total a pu aussi être réalisée.

Un procédé exploitant également l'AdCSV avec une HMDE a été développé par Gledhill et Van den Berg^[177]. Le Fe(II) dissous dans l'échantillon est d'abord oxydé en Fe(III) en présence de H_2O_2 , et le Fe(III) forme un complexe avec NN qui s'adsorbe à la surface de l'électrode lors de l'étape de préconcentration pendant 1 min par application d'un potentiel de -0,05 V. Lors du

balayage cathodique, le complexe Fe(III)-NN est réduit en Fe(II)-NN. Une LOD de 0,8 pM a été atteinte avec cette méthode mais le domaine de linéarité du capteur n'est pas précisé. Cette technique a également été utilisée pour étudier la spéciation du fer dans l'eau. Le Fe(II) peut être masqué par ajout de 2,2'-bipyridine. Des détections ont été faites en absence et en présence de 2,2'-bipyridine pour obtenir des concentrations en fer total et en Fe(III) respectivement. La concentration en Fe(II) est alors obtenue par soustraction.

L'utilisation du mercure comme matériau d'électrode est moins courante de nos jours, principalement en raison de sa toxicité. En conséquence, d'autres matériaux d'électrode alternatifs connaissent un intérêt accru.

III.2.2.2 Electrodes à base de bismuth (Bi)

Depuis les années 2000, les électrodes de travail à base de bismuth connaissent un intérêt croissant car elles se positionnent comme l'alternative principale par rapport aux électrodes à base de mercure. La toxicité du bismuth et de ses sels est moindre que celle du mercure et le bismuth présente des propriétés analytiques relativement similaires^[178]. Cependant, en raison de son exploitation toute récente, seules quelques études portent sur la détection du fer. Les plus pertinentes pour nos travaux sont présentées ici.

Hu *et al.*^[179] ont développé un capteur pour la détection du Fe(III) par voltammétrie différentielle à impulsion avec une électrode en carbone vitreux sur laquelle sont déposées des microtiges de bismuth par *drop casting* (voir **chapitre II partie III.3**). Une LOD de 6,4 nM et une réponse linéaire du capteur comprise entre 0,02 et 10 µM (correspondant à la gamme de concentrations d'intérêt) ont été obtenues. En 2015, les mêmes auteurs^[180] ont mis au point une nouvelle méthodologie pour la détection du Fe(III) en utilisant à nouveau une électrode en carbone vitreux sur laquelle sont déposées par *drop casting* des nanofeuilles de bismuth ayant une épaisseur et une longueur moyenne de 3 à 4 nm et de 100 à 200 nm respectivement. La voltammétrie différentielle à impulsions est appliquée pour la détection de Fe(III) en présence des ions BrO₃⁻, qui agissent en tant que catalyseur oxydant à un pH inférieur à 2. Le fonctionnement peut être décrit comme suit : le Fe(III) est réduit en Fe(II) lors du balayage de potentiel et le Fe(II) formé est lui ré-oxydé rapidement en Fe(III) rapidement en présence de BrO₃⁻. Le Fe(III) réoxydé est réduit à la surface de l'électrode modifiée et contribue à nouveau au courant de réduction, engendrant une sensibilité grandement

améliorée^[181]. Dans les conditions optimales, le capteur présente une réponse linéaire au Fe(III) dans la gamme de concentrations comprises entre 0,01 μM et 20 μM (correspondant à notre gamme de concentrations) avec une limite de détection de 2,3 nM.

Dans une autre étude, Węgiel *et al.*^[182] ont élaboré une électrode de travail à bande annulaire de bismuth (illustrée dans la **figure I.15**) pour la détermination du fer total dans des eaux de ville et de rivière. L'avantage de ce type d'électrode est que sa surface est facilement régénérée en imposant un potentiel pendant quelques secondes. Le Fe(III) est d'abord complexé dans l'échantillon par la triéthanolamine (TEA). Puis, le complexe Fe(III)-TEA est réduit en Fe(II)-TEA par voltammétrie différentielle à impulsions en présence du catalyseur oxydant BrO_3^- . Selon les auteurs, cette méthode n'implique pas une préconcentration du complexe à la surface de l'électrode avant la détection électrochimique. L'intensité cathodique est proportionnelle à la concentration de Fe(III) sur une gamme comprise entre 18 nM et 8500 nM. La limite de détection est de 5 nM. Le même procédé a été utilisé pour la détection du fer à l'état de traces dans les rivières en 2005^[183]. Dans ce cas l'électrode de travail en carbone vitreux est recouverte d'un film de bismuth. Une LOD de 7,7 nM a été atteinte avec un domaine linéaire de concentrations comprises entre 25 nM et 1000 nM.

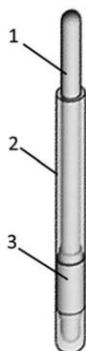


Figure I.15. Electrode à bande annulaire de bismuth composée de : (1) fil d'acier inoxydable, (2) résine époxy et (3) tube de bismuth.

III.2.2.3 Electrodes à base de carbone (C)

Le carbone représente un autre matériau alternatif au mercure car il possède des propriétés intéressantes telles qu'un large domaine d'électroactivité de l'eau et une surface permettant de nombreux types de modification pour abaisser les LOD et augmenter la sensibilité. De plus,

c'est un matériau inerte en solution, peu coûteux et respectueux de l'environnement. Les électrodes en carbone étaient déjà très utilisées pour la détection du fer avant l'usage du mercure. Le carbone vitreux, dont la surface active peut être modifiée, est le matériau carboné le plus employé pour la détection du fer^[174].

En 2001, Ugo *et al.*^[184] ont modifié une électrode en carbone vitreux avec une résine échangeuse de cations de type Nafion[®] (voir structure dans **chapitre II - Fig. II.5**) pour préconcentrer (à courant nul) et détecter le Fe(II) et Fe(III) en solutions aqueuses par voltammétrie cyclique. Suivant le sens de balayage des potentiels adopté, le Fe(II) ou le Fe(III) peut être détecté. La concentration en fer total peut ainsi être déduite. Par ailleurs, la mesure du potentiel en circuit ouvert (OCP) effectuée avant de commencer le balayage de potentiel peut donner une information sur le rapport de concentration des deux formes du fer incorporées dans le film de Nafion[®]. Cette méthode permet d'atteindre une LOD de 1,5 µM et la réponse du capteur est linéaire pour une concentration en Fe(II) ou Fe(III) jusqu'à 100 µM incluant notre gamme d'intérêt de concentration (2 à 10 µM).

Deux autres études portant sur la fonctionnalisation des électrodes en carbone vitreux par le Nafion[®] ont été rapportées en 2015 pour la détection du fer total dans des eaux côtières. D'autres composants ont toutefois été ajoutés à la surface des électrodes pour améliorer leurs performances analytiques. Dans la première étude^[185], la surface de l'électrode est modifiée par un film composé de liquide ionique/oxyde de graphène réduit (IL-rGO), de nanodendrites d'or (AuNDs) et de Nafion[®]. Dans le second cas^[186], l'électrode est d'abord modifiée par des nanoparticules de carbure de titane (nano-TiC) puis le Nafion[®]. Les deux électrodes sont illustrées sur la **figure I.16**. La détermination de la concentration en fer total est obtenue via la détection du Fe(III) en présence de l'oxydant NO₃⁻ par voltammétrie à vagues carrées. Ces électrodes modifiées IL-rGO/AuNDs/Nafion[®] et TiC/Nafion[®] présentent une réponse linéaire pour des concentrations en Fe(III) comprises entre 0,3 et 100 µM et entre 0,07 et 70 µM respectivement (correspondant à notre gamme de concentrations). Les LOD sont de 35 nM et 7,2 nM respectivement.

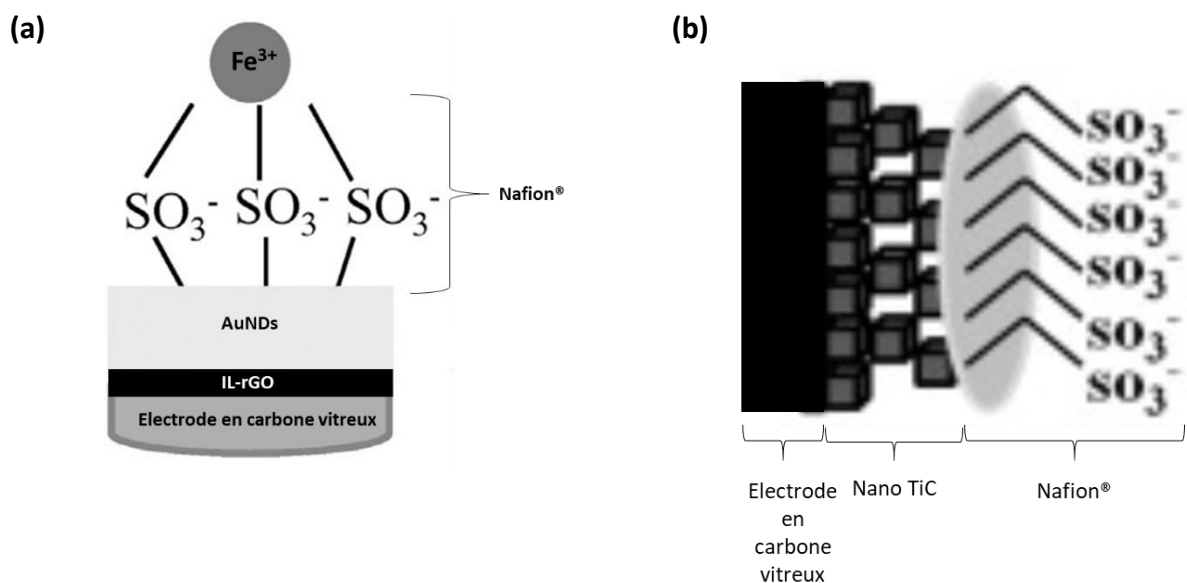


Figure I.16. Illustration de l'électrode en carbone vitreux (a) IL-rGO/AuNDs/Nafion® [185], (b) TiC/Nafion® [186].

La fonctionnalisation par le dépôt de Nafion® a été encore exploitée par Papadopoulou *et al.*^[187] qui ont modifié une électrode en graphite sérigraphiée afin de détecter le Fe(III) dans l'eau de ville. Une préconcentration de Fe³⁺ est d'abord réalisée sous agitation à courant nul dans l'échantillon (à pH = 2) avant la détection effectuée par voltammétrie à vagues carrées. Les intensités des pics cathodiques varient linéairement avec la concentration en Fe(III) pour des valeurs comprises entre 0,05 µM et 5 µM. La LOD est de 0,015 µM.

Un autre procédé de fonctionnalisation a été développé par Lin *et al.*^[188] qui ont modifié la surface d'une électrode en carbone vitreux par de l'oxyde de graphite réduit, du bleu de méthylène et des nanoparticules d'or. Le capteur a été utilisé pour le dosage du fer total via la détection du Fe(III) en présence de NO₃⁻ par voltammétrie différentielle à impulsions. La réponse du capteur est linéaire pour des concentrations de Fe(III) comprises entre 0,3 et 100 µM (correspondant à notre gamme de concentration) ; la LOD est de 15 nM.

Lu *et al.*^[189] ont développé un capteur pour la détermination du fer total dans les eaux potables en modifiant une électrode en carbone vitreux par le polysaccharide chitosane qui présente une forte affinité envers les métaux de transition, notamment le fer. Des ions oxalates (C₂O₄²⁻) sont ajoutés dans l'échantillon pour réduire le Fe(III) et complexer le Fe(II). La méthode de détection est l'AdCSV avec une étape de préconcentration pendant 2 min en

imposant un potentiel de 0,3 V. Une réponse linéaire est obtenue dans la gamme de concentrations comprises entre 0,36 μM et 5,4 μM avec une LOD égale à 0,18 μM .

- **Synthèse**

Cet état de l'art des différents capteurs ampérométriques a permis de mettre en lumière leurs spécificités et les performances analytiques en lien avec le cahier des charges du partenaire industriel.

Les capteurs à base de mercure sont plutôt développés pour la détection du fer à des concentrations très faibles (en dessous de 100 nM), qui ne correspond pas à notre gamme de concentrations d'intérêt (2 à 10 μM). De plus, l'usage du mercure est de plus en plus déconseillé du fait de sa toxicité et de ses effets néfastes sur la santé.

Le bismuth représente un matériau alternatif de premier plan. En raison de son utilisation relativement récente (à partir des années 2000), seules deux des publications étudiées font état du dosage du fer (Fe(III) notamment) dans notre gamme de concentrations d'intérêt sans pour autant mentionner s'il est possible ou non de déterminer la spéciation du fer en utilisant les méthodes décrites. Par ailleurs, l'élaboration de ces capteurs nécessite des étapes fastidieuses de synthèse au préalable avec l'utilisation de réactifs spécifiques afin d'obtenir notamment des microtiges ou des nanofeuilles de bismuth.

La panoplie de capteurs à base de carbone vitreux développés et documentés démontre leurs performances analytiques excellentes dans la gamme de concentrations complète ou partielle d'intérêt. Divers types de fonctionnalisation ont été décrits mais la modification des électrodes par le Nafion[®] est principalement utilisée, seul ou avec d'autres composés. Ses propriétés d'échange cationique, sa stabilité chimique, la facilité de manipulation et sa disponibilité commerciale justifient en partie son utilisation. Par ailleurs, si la spéciation a été démontrée par Ugo *et al.*^[184], la majorité des publications font état de la détection du fer total (en passant par une détection de Fe(III)) en présence de NO_3^- qui joue le rôle d'oxydant. La spéciation n'étant pas la priorité de ces études, il serait probablement possible de réaliser des détections en présence et en absence de NO_3^- pour la détermination de la concentration en fer total et en Fe(III) respectivement. La concentration en Fe(II) pourrait ainsi être déduite.

Dans le cadre de nos travaux, l'utilisation d'un capteur ampérométrique à base de carbone vitreux semble offrir les meilleures perspectives en terme de détection de Fe(II) et Fe(III) à des concentrations comprises entre 2 et 10 à μM .

IV. Objectifs des travaux de thèse

Les TAR à voie humide sont des installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE) en raison du risque de contamination lié à la production d'aérosols inhalables contenant *Lp*. Pour maîtriser le risque sanitaire, les gestionnaires de TAR sont contraints d'utiliser des quantités importantes de produits biocides, onéreux et nocifs pour l'environnement. Or, face aux règlements imposés selon la rubrique 2921 de la nomenclature ICPE, les industries doivent limiter les rejets polluants dans l'environnement. Par ailleurs, les méthodes de surveillance microbiologiques des TAR ne prennent pas en compte la présence de *Lp* sous forme biofilm ou VBNC. Des méthodes anticipatives plus appropriées doivent donc être envisagées.

Dans ce contexte, le lien étroit entre la présence de fer à des concentrations de l'ordre du micromolaire et *Lp*, qui a été exposé dans le **chapitre I**, sera utilisé au cours de nos travaux. Cela va d'abord permettre d'étudier le comportement de la bactérie sous forme biofilm en présence de Fe(II) et/ou Fe(III). Ensuite, un procédé de maîtrise de *Lp* innovant dans les TAR sera proposé en développant un capteur électrochimique à fer permettant de doser les deux formes du fer dans l'eau.

Une première partie du projet consistera à élaborer un capteur ampérométrique pour la détection et le dosage de Fe(II) et Fe(III) à des concentrations comprises entre 2 et 10 μM dans les eaux de TAR. Ce capteur devra répondre aux exigences en termes de sélectivité (dosage spécifique de Fe(II) et Fe(III)), de domaine linéaire de concentration de Fe(II) et Fe(III) et de limite de détection (LOD) en utilisant un protocole de mesure le plus simple possible et en mobilisant les moyens analytiques a minima. Une seconde partie comprendra l'étude de l'impact des formes Fe(II) et Fe(III) et de leur concentration sur la croissance de *Lp* en mode biofilm. L'originalité du travail repose sur la mise en application d'un modèle original de formation de biofilm mono-espèce à *Lp* mis au point et validé au sein de notre laboratoire^[73]. Bien que cette approche paraisse éloignée des conditions réelles, elle présente l'avantage de pouvoir évaluer spécifiquement les interactions *Lp*/fer. L'influence de la concentration de

chaque forme ionique du fer pour développer des biofilms sera étudiée afin de mieux comprendre l'implication du fer sur le devenir de la bactérie. L'objectif final est d'établir un lien entre la concentration de Fe(II) et/ou de Fe(III) et l'évolution potentielle de la population de *Lp* dans un milieu aqueux et plus spécifiquement dans une eau de TAR. Un suivi continu de l'eau de TAR par détermination de la concentration en Fe(II) et/ou Fe(III) pourrait permettre d'anticiper le(s) changements(s) de comportement de *Lp* et ainsi de proposer un usage et un dosage proportionné des biocides. Cela permettrait ainsi de mieux maîtriser le risque légionelles tout en réduisant les rejets nocifs dans l'environnement.

Chapitre II

Elaboration d'un capteur
électrochimique pour la détection du
fer dans des solutions synthétiques

Ce chapitre est consacré à la mise au point d'un capteur ampérométrique pour la détection de concentrations micromolaires de fer dans des solutions synthétiques. Le procédé analytique utilise une électrode en carbone vitreux fonctionnalisée par un film de Nafion®. Celui-ci est caractérisé par des mesures profilométriques, par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et par voltammétrie cyclique à l'aide de sondes redox. Une première partie est consacrée à la mise au point de la technique électroanalytique et à l'optimisation des divers paramètres opératoires. Les dosages des ions Fe²⁺ et Fe³⁺ sont ensuite réalisés dans des solutions synthétiques à des concentrations micromolaires.

Dans une seconde partie, l'interface solution/Nafion®-électrode est étudiée en utilisant des méthodes électrochimiques pour mieux comprendre le fonctionnement du capteur lors de la détection. Enfin, les performances analytiques du capteur sont évaluées (répétabilité, reproductibilité, sensibilité et exactitude du capteur). La sélectivité est également testée en présence de cations et d'anions généralement retrouvés dans les TAR pour voir comment ceux-ci interfèrent avec la réponse du capteur.

I. Réactifs et appareillage

I.1 Produits chimiques

Toutes les solutions sont préparées avec de l'eau ultra pure (Milli-Q, Millipore, 18,2 MΩ.cm).

Ci-dessous sont énumérés les différents réactifs utilisés lors des expériences :

- 1,10-phénanthroline monohydratée (C₁₂H₈N₂·H₂O) : *ACS reagent, ≥99 %, Sigma-Aldrich*
- Acétate de sodium (CH₃COONa) : *ACS reagent, 99 %, Aldrich*
- Acide acétique glacial (CH₃COOH) : *Laboratory reagent grade, ≥99 %, Fisher Scientific*
- Acide chlorhydrique (HCl) : *ACS reagent, ≥37 %, ; Honeywell Fluka*
- Chlorhydrate d'hydroxylamine (NH₂OH.HCl) : *AnalaR NORMAPUR®, ≥99 % ; VWR Chemicals*
- Chlorure de fer(III) hexahydraté (FeCl₃·6H₂O) : *99 % for analysis ; Acros Organics*
- Chlorure d'hexaammineruthénium(III) {[Ru(NH₃)₆]Cl₃} : *98 % ; Aldrich*
- Ethanol (C₂H₅OH) : *TechniSolv®, 90 % (V/V), VWR Chemicals*
- Hydroxyde de potassium (KOH) : *Pur en pastilles ; Prolabo*

- Nafion® : *D-520 dispersion, 5 % w/w (Proportion massique) dans l'eau et 1-propanol ; Alfa Aesar*
- Hexacyanoferrate(II) de potassium trihydraté $\{K_4[Fe(CN)_6].3H_2O\}$: *ACS reagent, ≥99 %, Fluka*
- Sulfate de fer(II) heptahydraté ($FeSO_4.7H_2O$) : *ACS reagent, 99 % ; Acros Organics*
- Sulfate de potassium (K_2SO_4) : *ReagentPlus®, ≥99 % ; Sigma-Aldrich*

Pour l'étude des interférents, les réactifs suivants ont été utilisés :

- Chlorure de calcium ($CaCl_2$) : *General purpose grade ; Fisher Scientific*
- Chlorure de magnésium ($MgCl_2$) : *Analytical reagent grade ; Fisher Scientific*
- Chlorure de potassium (KCl) : *+99 % ; Acros Organics*
- Chlorure de zinc ($ZnCl_2$) : *Purum p.a ; Honeywell Fluka*
- Nitrate de potassium (KNO_3) : *General purpose grade ; Fisher Scientific*
- Solution étalon d'ions chlorure (Cl^-) pour chromatographie ionique : *1 mg/mL dans H_2O ; SCP Science*
- Solution étalon d'ions phosphate PO_4^{3-} pour chromatographie ionique : *1 mg/mL dans H_2O ; SCP Science*
- Sulfate de cuivre(II) ($CuSO_4$) : *98 % ; Acros Organics*

Les solutions diamantées et les tapis de polissage utilisés pour le polissage des électrodes proviennent de chez *Presi*.

I.2 Appareillage

Les expériences électrochimiques sont réalisées à l'aide d'un montage classique à trois électrodes comprenant :

1. L'électrode de travail : un embout en carbone vitreux (CV) *Radiometer* de 3 mm de diamètre
2. L'électrode de référence : une électrode au calomel saturée (ECS) *Radiometer* séparée de la solution par une allonge de protection munie d'un embout en verre fritté. Cette allonge contient généralement la solution d'électrolyte support. Le potentiel de l'ECS par rapport à l'électrode normale à hydrogène est de +0,242 V à 25 °C.

3. La contre électrode : un fil de platine de chez *Orignalys*.

L'ensemble des électrodes est relié à un potentiostat (*Metrohm Autolab - PGSTAT 128N*) piloté par le logiciel *NOVA 2.1* via un ordinateur.

La caractérisation physico-chimique du film de Nafion® déposé à la surface de l'électrode est réalisée par le spectrophotomètre FTIR *IRAffinity-1S (Shimadzu)*, et par le profilomètre *S-neox (Sensofar)*.

I.3 Préparation de la surface de l'électrode

Avant utilisation de l'électrode en CV, un polissage mécanique est nécessaire. Cela permet d'éliminer toute impureté ou dépôt à la surface de l'électrode et d'avoir une surface plane, lisse et homogène présentant un effet miroir.

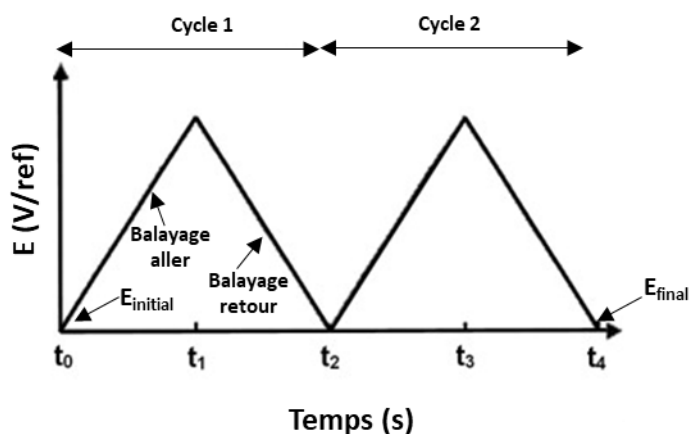
Le polissage est réalisé avec une polisseuse mécanique *Mecatech 234 (Presi)*. L'électrode est d'abord poncée sur du papier abrasif de carbure de silicium (SiC) pendant 10 à 20 secondes à 130 tours/min. L'électrode est ensuite polie avec 3 suspensions diamantées de granulométrie décroissante (9 µm, 3 µm et 1 µm) et avec des vitesses de rotation décroissantes (400, 300 et 200 tours/min) sur les tapis correspondants. Chaque étape de polissage dure 1 minute et l'électrode est rincée avec de l'acétone entre chaque tapis. Finalement, l'électrode est plongée dans un bécher contenant de l'éthanol et est placée dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes pour enlever les éventuels résidus restés à la surface de l'électrode après le polissage.

II. Méthodes électrochimiques employées

Deux méthodes électrochimiques ont été privilégiées. Pour la détection et le dosage du fer dans les solutions synthétiques, la voltammétrie cyclique a été adoptée. La détermination du coefficient de diffusion apparent (D_{app}) du fer dans le film de Nafion® a été réalisée par voltammétrie hydrodynamique sur une électrode à disque tournant.

II.1 La voltammétrie cyclique

La voltammétrie cyclique est une technique électrochimique en régime transitoire où le phénomène majeur de transport de matière est la diffusion. La solution à analyser n'est pas agitée et l'électrode est statique. Une rampe de potentiel de forme triangulaire est appliquée à l'électrode (**Fig. II.1**), avec un balayage « aller » suivi d'un balayage « retour ». Le potentiel appliqué (E) à l'électrode de travail est fonction de la vitesse de balayage (v) et du temps (t) selon l'équation II.1.



$$E = E_{\text{initial}} \pm vt$$

Equation II.1. Variation du potentiel appliqué en fonction du temps

Figure II.1. Consigne de potentiel appliqué à l'électrode de travail.

L'allure typique d'un voltammogramme cyclique dans le cas d'un système réversible en régime de diffusion pure est donnée dans la **figure II.2**. Par convention, le courant est positif en oxydation et négatif en réduction. En plus des analyses quantitatives, la voltammétrie cyclique permet d'obtenir des informations qualitatives sur des systèmes étudiés en oxydation et en réduction.

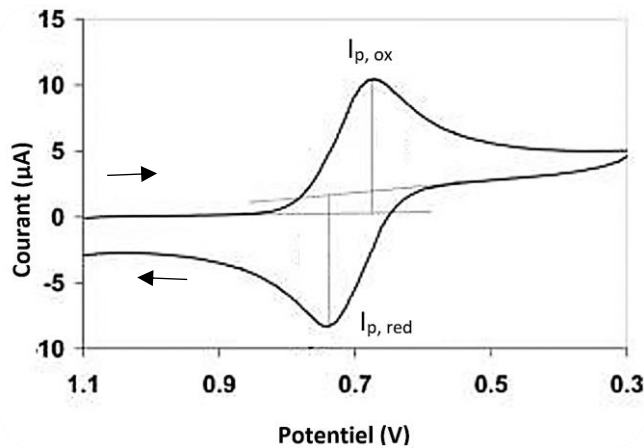


Figure II.2. Voltammogramme cyclique dans le cas d'un système rapide. $I_{p,ox}$: courant de pic anodique ; $I_{p,red}$: courant de pic cathodique.

Quel que soit le type de système redox (rapide, quasi-rapide ou lent), l'intensité du pic au balayage aller est directement proportionnelle à la concentration de l'espèce en solution et à la racine carrée de la vitesse de balayage si la réaction est limitée par la diffusion.

Dans le cas d'un système rapide, cette relation de proportionnalité est exprimée par l'équation de Randles-Sevcik (**équation II.2**).

$$i_p = \pm 2,69 \cdot 10^5 n^{\frac{3}{2}} A D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} C$$

Equation II.2. Equation de Randles-Sevcik.

i_p : courant de pic anodique ou cathodique (A)

n : nombre d'électrons échangés par mole d'espèce électrolysée

A : surface de l'électrode (cm^2)

D : coefficient de diffusion ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)

v : vitesse de balayage ($\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$)

C : concentration de l'espèce ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$)

Dans le cas où les espèces électroactives sont adsorbées à la surface de l'électrode et où la réaction est limitée par l'adsorption, le voltammogramme présente une allure symétrique de

type gaussien. L'intensité du pic est alors directement proportionnelle à la vitesse de balayage selon l'équation II.3.

$$i_p = \frac{n^2 F^2 A v \Gamma}{4 R T}$$

Equation II.3.

i_p : courant de pic anodique ou cathodique (A)

n : nombre d'électrons échangés par mole d'espèce électrolysée

A : surface de l'électrode (cm^2)

v : vitesse de balayage ($\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$)

Γ : concentration surfacique de l'espèce adsorbé ($\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$)

T : température (K)

R : constante des gaz parfaits (= $8,314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$)

II.2 Voltammétrie sur électrode à disque tournant

Dans cette méthode, l'électrode de travail est mise en rotation autour de son axe pendant tout le balayage linéaire de potentiel. Cette rotation rapide (entre 400 et 10000 tours par minute) entraîne un mouvement de la solution (phénomène de convection) en direction de l'électrode, qui favorise le transport de matière. C'est donc une technique en régime de diffusion stationnaire où la vitesse de transport de matière est infiniment plus rapide que la vitesse de transfert électronique hétérogène. Lors de la mesure, la couche de diffusion conserve une épaisseur constante et la vitesse de balayage (v) est faible.

L'allure d'une courbe I-E obtenue par cette méthode est représentée à la **figure II.3** pour l'oxydation et la réduction d'une espèce. La courbe atteint un palier, dit palier de diffusion, où le courant est limité par le transport de matière et n'augmente plus. Ce courant est appelé courant limite de diffusion (I_{lim}).

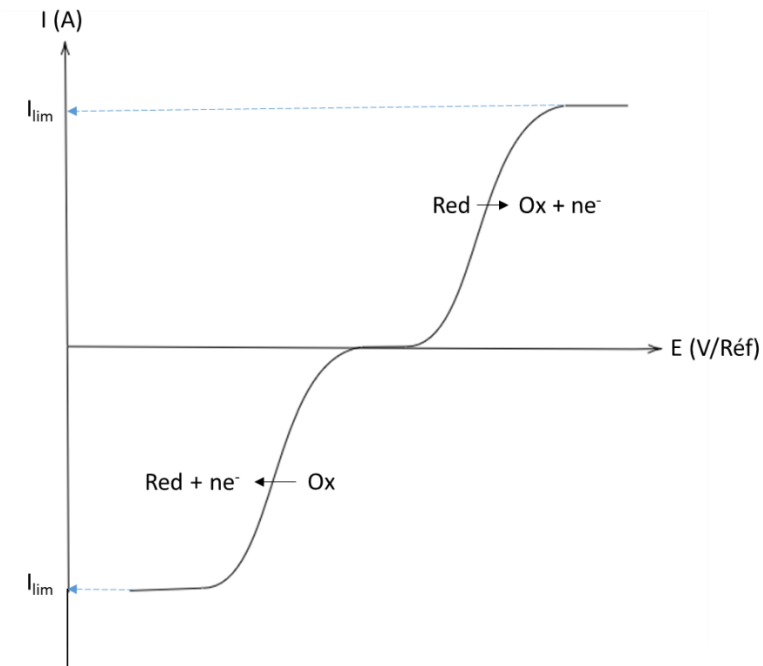


Figure II.3. Allure de la courbe I-E obtenue par voltammétrie linéaire sur électrode à disque tournant.

Le courant limite (i_{lim}) est exprimé au moyen de l'équation simplifiée de Levich (**équation II.4**).

$$i_{lim} = \pm n F A \frac{D}{\delta} C$$

Equation II.4. Equation simplifiée de Levich

n : nombre d'électrons échangés par mole d'espèce électrolysée

F : constante de Faraday (= 96484,5 C.mol⁻¹)

A : aire de l'électrode de travail (cm²)

D : coefficient de diffusion de l'espèce (cm².s⁻¹)

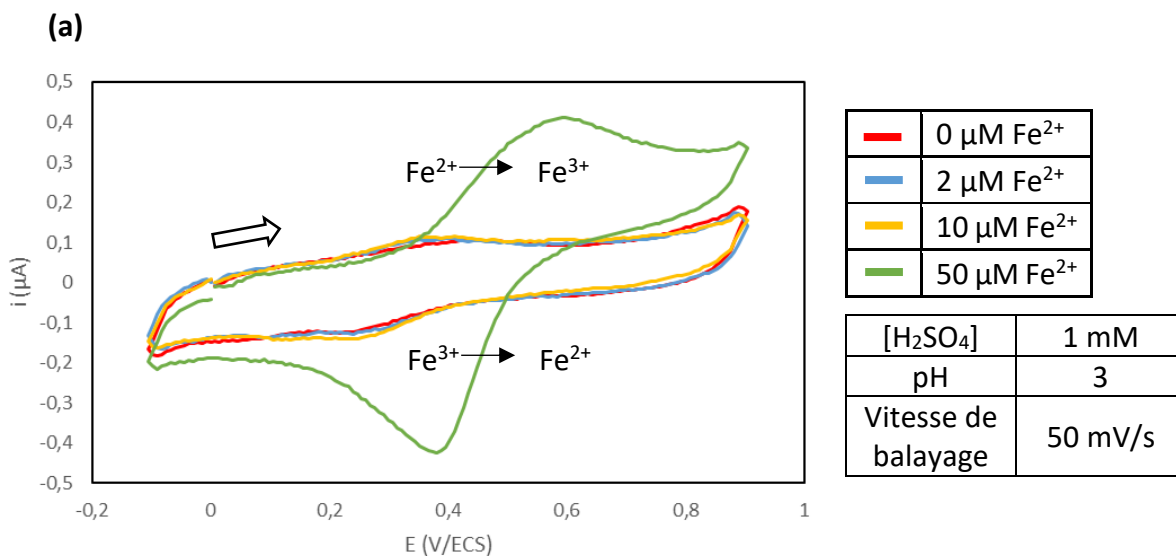
δ : épaisseur de la couche de diffusion (cm)

C : concentration de l'espèce en solution (mol.cm⁻³)

III. Modification de la surface d'électrode par un film de Nafion®

III.1 Pourquoi la modification de surface ?

Pour mettre en évidence l'importance de la fonctionnalisation de surface de l'électrode, des voltammogrammes cycliques (**Fig II.4**) ont été tracés avec une électrode en carbone vitreux plongée dans deux solutions électrolytiques différentes : H_2SO_4 (pH = 3) et K_2SO_4 (pH = 3,7) contenant les ions Fe^{2+} à diverses concentrations. Deux des trois concentrations en Fe^{2+} choisies sont dans la gamme de concentrations d'intérêt (2 à 10 μM). Les paramètres expérimentaux employés pour chacune des conditions opératoires sont précisés dans les tableaux.



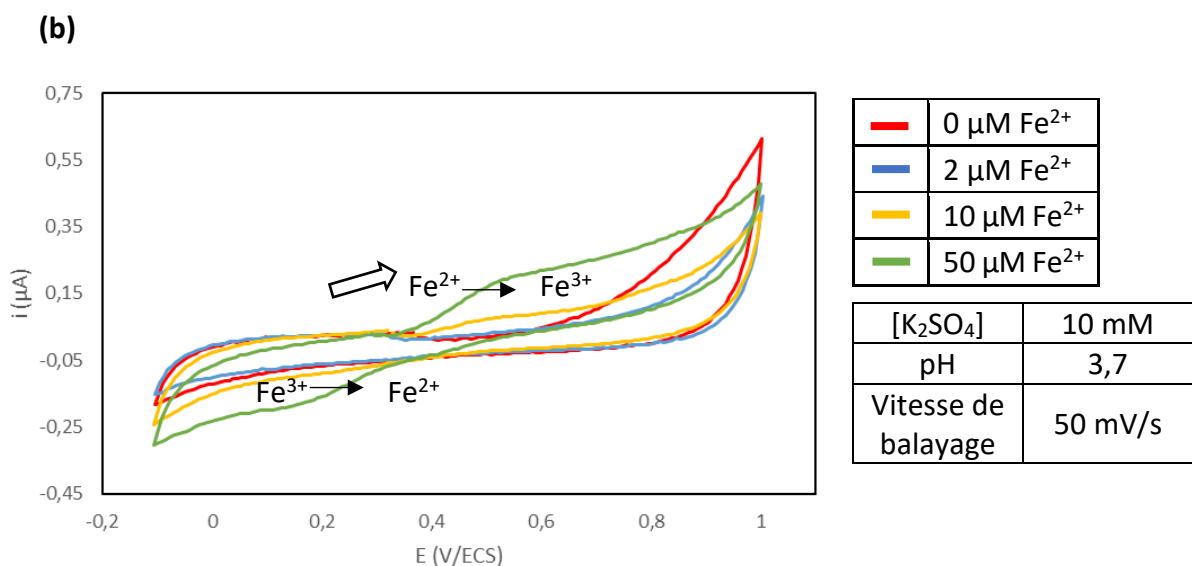


Figure II.4. Voltammogrammes cycliques tracés avec une électrode de CV dans une solution de (a) H₂SO₄ à 10⁻³ M (pH 3) et (b) K₂SO₄ à 10⁻² M (acidifié à pH 3,7) contenant différentes concentrations en Fe²⁺.

Pour les deux milieux choisis, les voltammogrammes cycliques tracés avec des concentrations en Fe²⁺ de 2 et 10 µM ne montrent pas de signal d'oxydation de Fe²⁺ en Fe³⁺ exploitable. Dans le cas de H₂SO₄, les voltammogrammes cycliques obtenus se superposent à celui enregistré dans l'électrolyte support seul (**Fig II.4.a**). Lorsque la concentration en Fe²⁺ est de 50 µM, le pic d'oxydation de Fe²⁺ est observable au potentiel de 0,59 V/ECS. Un pic de réduction de Fe³⁺, formé lors de l'oxydation de Fe²⁺ au balayage aller, est aussi enregistré à 0,38 V/ECS. Le système redox observé est donc quasi-réversible ($\Delta E_p = 210$ mV).

Une évolution quasi similaire des pics d'oxydation est observée en utilisant K₂SO₄ comme électrolyte support (**Fig II.4.b**). Cependant, un pic d'oxydation mal défini et d'intensité très faible (de l'ordre du nA) apparaît vers 0,48 V/ECS pour une concentration en ions Fe²⁺ de 10 µM. L'intensité du signal augmente lorsque la concentration en Fe²⁺ est de 50 µM ; un pic de réduction de Fe³⁺ apparaît aussi vers 0,19 V/ECS. Un système quasi-réversible ($\Delta E_p = 290$ mV) est à nouveau observé mais avec une cinétique plus lente que dans les conditions opératoires précédentes.

Il ressort de cette étude que la détection et le dosage de Fe²⁺ à des concentrations micromolaires n'est pas réalisable par voltammétrie cyclique sur une électrode en carbone vitreux non modifiée. Au vu de ces résultats, des expériences similaires avec le Fe³⁺ n'ont pas

été réalisées. Une fonctionnalisation de la surface de l'électrode est donc indispensable pour améliorer la sensibilité de la mesure.

III.2 Généralités sur le Nafion®

Le Nafion® est un fluoropolymère copolymère à base de tétrafluoroéthylène sulfonaté développé à la fin des années 1960 par l'entreprise américaine DuPont. Sa structure chimique (**Fig II.5**) se compose d'un squelette fluorocarboné, qui lui confère une stabilité mécanique et thermique, et d'un groupement sulfonate chargé négativement qui détermine ses propriétés d'échange cationique. Le groupement sulfonate est toujours lié à un contre-cation pour que l'électroneutralité de la membrane de Nafion® soit respectée^[190]. Les contre-cations associés sont généralement H⁺ ou Na⁺.

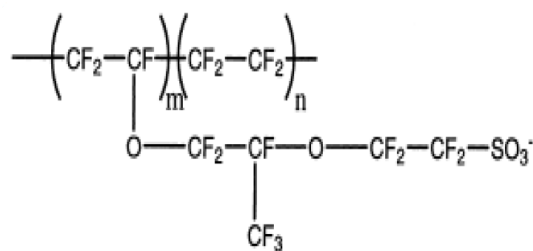


Figure II.5. Structure chimique du Nafion®.

Au sein du polymère, existent des interactions hydrophiles et hydrophobes du fait de la présence concomitante de la longue chaîne fluorée flexible (hydrophobe) et des groupements sulfonates (hydrophiles). Lors d'un contact avec le milieu aqueux, la partie hydrophile gonfle pour constituer un passage ionique au sein de la matrice. Une représentation de la morphologie du Nafion® est donnée à la **figure II.6** où les groupements sulfonates sont organisés sous forme de clusters sphériques de 4 nm de diamètre^[191]. Les clusters sont reliés entre eux par des canaux étroits de 1 nm de diamètre. Ces clusters et canaux participent ainsi à la conductivité ionique et par conséquent à l'échange cationique.

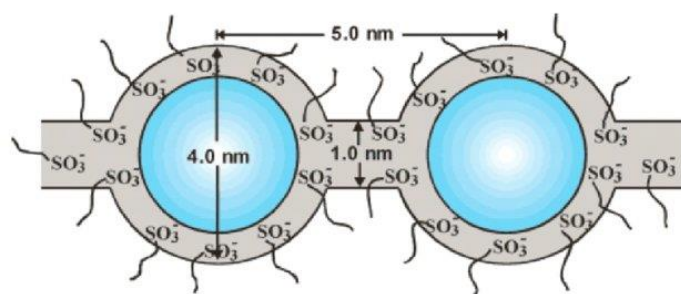


Figure II.6 Morphologie du Nafion® selon Gierke *et al.*^[191].

La bonne stabilité chimique et ses propriétés d'échange cationique font du Nafion® un élément de choix pour fonctionnaliser la surface d'une électrode et élaborer ainsi un capteur électrochimique pour la détection de cations métalliques en milieu aqueux. Le revêtement de Nafion® apporte au capteur sensibilité et sélectivité vis-à-vis des cations électroactifs^[192]. Ainsi des électrodes à base de matériaux tels que le platine^[193,194], le bismuth^[195] et le carbone^[196-198] ont été fonctionnalisées par un film de Nafion® pour la détection du fer^[184,187,193,199,200], du cadmium^[195,198,201], du plomb^[195,201], du chrome^[202], du mercure^[203] et de l'arsenic^[194] dans des eaux.

III.3 Dépôt du Nafion® à la surface de l'électrode en CV

En général, le revêtement de surfaces d'électrodes par le Nafion® s'effectue à partir de solutions commerciales principalement par 2 méthodes : le *drop casting* et le *dip coating*.

Le *drop casting* (**Fig II.7a**) consiste à déposer un volume connu de solution de polymère sur la surface de l'électrode, et à attendre l'évaporation du solvant pour obtenir une fine couche. Le *dip coating* (**Fig II.7b**), quant à lui, est une technique qui consiste à plonger l'électrode verticalement dans la solution de Nafion®. L'électrode est ensuite relevée rapidement à une vitesse constante et la surface est laissée à l'air ambiant pour le séchage.

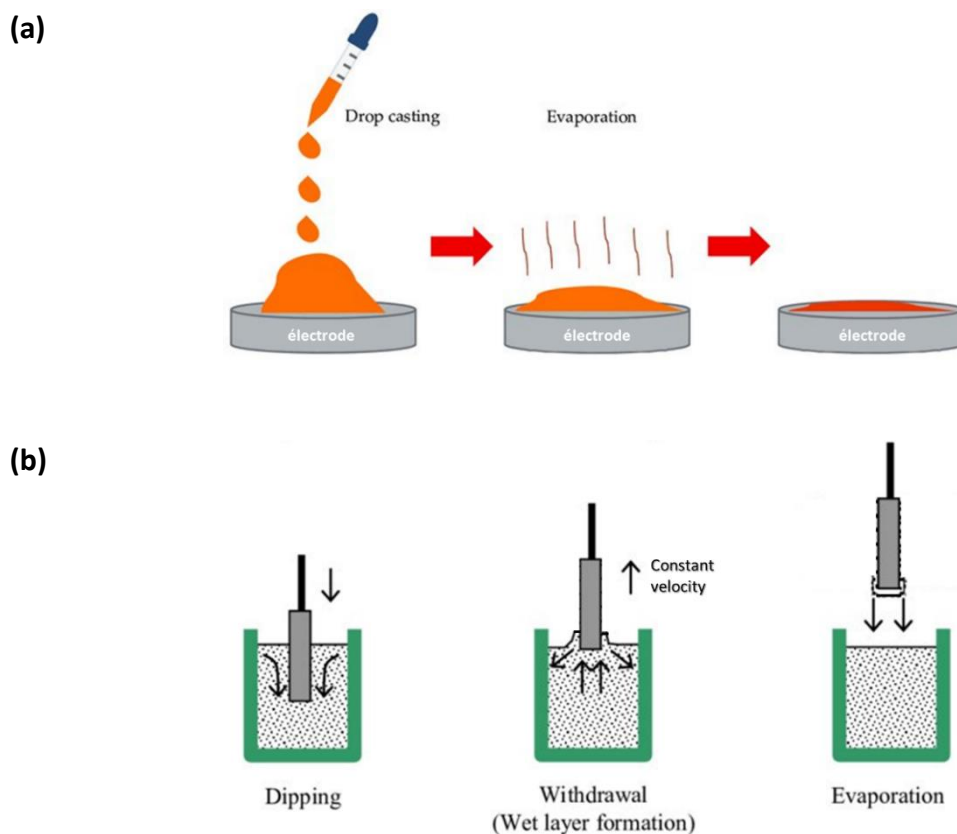


Figure II.7 Dépôt par (a) *drop casting*^[204] et (b) *dip coating*^[205].

Dans le cadre de nos travaux, la modification de la surface de l'électrode en CV par *drop casting* a été privilégiée en raison de sa simplicité : elle ne nécessite pas d'appareillage spécifique contrairement au *dip coating*. Ainsi, à la suite du polissage, l'électrode est laissée à l'air libre pendant quelques minutes pour laisser sécher la surface. 3 μL d'une solution de Nafion à 5 % w/w sont ensuite déposés à la surface de l'électrode à l'aide d'une micropipette. Le dépôt est laissé à l'air ambiant pendant au moins deux heures pour que la solution sèche avant l'utilisation de l'électrode. L'électrode fonctionnalisée est par la suite dénommée électrode en CV/Nafion®.

III.4 Caractérisation du film de Nafion®

Une fois déposé à la surface de l'électrode, le film de Nafion® est caractérisé par des mesures profilométriques, en FTIR et par voltammétrie cyclique à l'aide de sondes redox, afin d'observer l'efficacité, la morphologie et la distribution du dépôt sur l'électrode.

III.4.1 Caractérisation physique par FTIR

La spectroscopie FTIR est une technique d'analyse rapide pouvant identifier les fonctions chimiques des molécules présentes dans des échantillons solides, liquides ou parfois gazeux. C'est une technique non destructrice qui mesure la quantité de lumière absorbée par l'échantillon en fonction de la longueur d'onde émise par un faisceau infrarouge. En effet, chaque molécule absorbe la lumière infrarouge à des longueurs d'onde caractéristiques de ses modes vibrationnels. L'analyse du spectre infrarouge résultant permet ensuite d'identifier les molécules présentes dans l'échantillon.

La présence du film de Nafion® à la surface d'une électrode en CV est vérifiée en comparant le spectre FTIR d'une électrode en CV/Nafion® avec celui obtenu avec une électrode en CV non modifiée (**Fig II.8**).

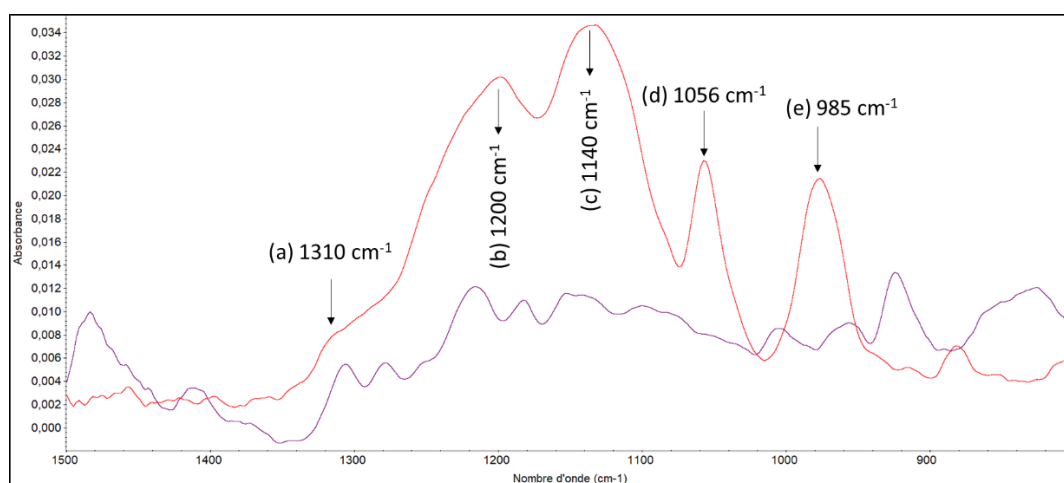


Figure II.8. Spectres FTIR d'une électrode en CV/Nafion® (en rouge) et d'une électrode en CV non modifiée (en violet).

Les deux spectres se distinguent nettement dans la gamme de longueur d'onde comprise entre 900 à 1400 cm^{-1} . Les 2 bandes majoritaires **b** et **c** correspondent aux élongations CF_2 asymétriques et aux élongations CF_2 symétriques du squelette fluorocarboné, respectivement. Les bandes **a** et **d** sont caractéristiques des élongations asymétriques et symétriques des groupements SO_3^- respectivement. La bande **e** est, elle, attribuable aux élongations symétriques des liaisons éthers C-O-C du polymère. Toutes les bandes attribuées aux liaisons présentes dans le Nafion® de la **figure II.8** sont en accord avec celles retrouvées

dans la littérature^[193,206]. Le spectre FTIR enregistré avec l'électrode CV/Nafion® permet donc de confirmer la présence du film à la surface.

III.4.2 Caractérisation physique par profilométrie

Le profilomètre optique est un outil de mesure sans contact utilisé pour évaluer avec précision l'état de surface (rugosité, géométrie, épaisseur) d'un matériau quelles que soient sa forme, sa texture, sa taille et son poids. Il est équipé d'un contrôleur intégré qui permet de faire une mesure de l'intégralité de la surface sous différents angles. Ainsi, des topographies 3D sont obtenues avec une grande résolution.

Deux électrodes en CV/Nafion® (dénommées électrode 1 et électrode 2) élaborées par dépôt de 3 µL d'une solution de Nafion à 5 % ont été analysées. Les profils de surfaces obtenus sont donnés dans l'**annexe 1** et les paramètres géométriques de la couche de Nafion® sur chaque électrode sont résumés dans le **tableau II.1**.

	Diamètre film Nafion® (mm)	Epaisseur film Nafion® à l'électrode (µm)
Electrode 1	4,79	2,33
Electrode 2	4,29	2,80

Tableau II.1. Largeur et épaisseur de la couche de Nafion® sur les 2 électrodes en CV/Nafion®.

Les valeurs du diamètre et de l'épaisseur des dépôts sur les deux électrodes sont sensiblement du même ordre de grandeur. Cela indique une reproductibilité relativement bonne de la méthode de fonctionnalisation. Il est à noter un débordement du film de Nafion® de la surface de l'électrode (diamètre = 3 mm) lorsqu'il s'étale. Par ailleurs, même si l'opération de *drop-casting* du Nafion® à l'électrode se fait manuellement, les différentes couches formées ne présentent pas des géométries très variables. Néanmoins, il est important que le volume de dépôt reste fixe pour qu'au moins le nombre de sites actifs sur lesquels ont lieu les échanges ioniques reste stable.

III.4.3 Caractérisation par des sondes redox

Pour caractériser l'état de surface de l'électrode en CV/Nafion[®] ainsi que ses propriétés électrocatalytiques, deux sondes redox, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ et $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$, ont été choisies. Elles sont fréquemment utilisées dans la bibliographie pour caractériser électrochimiquement les interfaces fonctionnalisées [207–210]. La voltammétrie cyclique a été utilisée comme technique électrochimique avec une étape de préconcentration en amont. Cette étape réalisée à courant nul est nécessaire pour accumuler les espèces redox dans la couche de Nafion[®] par échange ionique. Cette méthode particulière sera détaillée dans la **partie IV.1**.

III.4.3.1 Sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$

La **figure II.9** représente les voltammogrammes cycliques obtenus avec une électrode en CV/Nafion[®] et une électrode non modifiée plongées dans une solution de K_2SO_4 à 0,1 M contenant du $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ à 5 mM. L'électrode CV/Nafion[®] est élaborée par dépôt de 3 μL d'une solution de Nafion à 5 %. Les autres paramètres opératoires sont précisés dans le tableau.

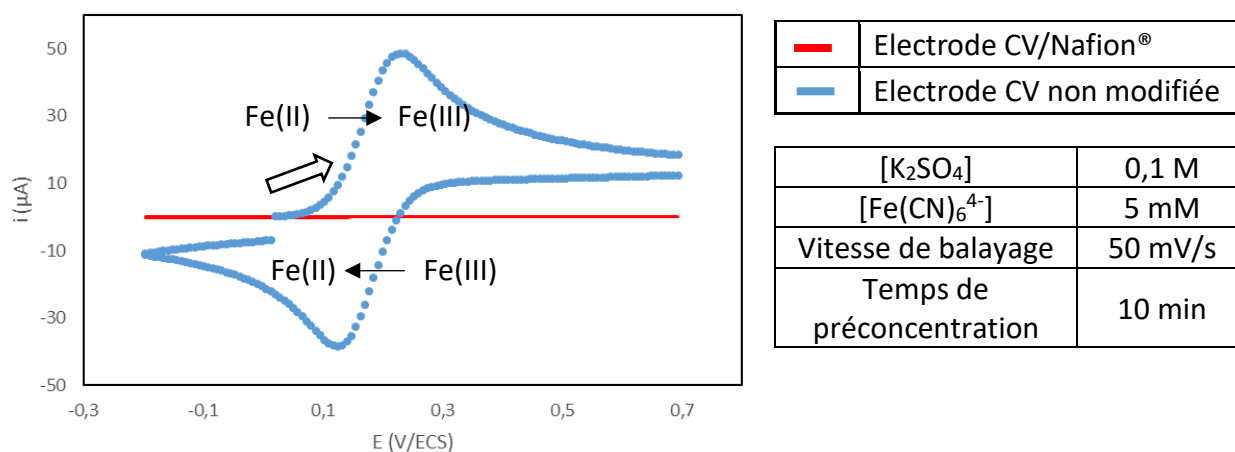


Figure II.9. Voltammogrammes cycliques tracés dans une solution K_2SO_4 0,1 M contenant $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ à 5 mM avec une électrode en CV/Nafion[®] (en rouge) et une électrode en CV non modifiée (en bleu).

Avec l'électrode non modifiée, un système quasi réversible ($\Delta E_p = 105$ mV) est obtenu, similaire à celui communément observé dans la bibliographie [211,212]. Sur l'électrode CV/Nafion[®], aucun pic n'est visible. Cela est dû à la charge négative et à l'encombrement

stérique du complexe $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ qui ne pénètre pas la membrane de Nafion[®], également chargée négativement par la présence des ions sulfonates. La couche de Nafion[®] empêche donc le transfert électronique à l'électrode. L'absence totale de signal démontre que la totalité de la surface de l'électrode est recouverte et que ce film ne présente pas d'imperfections de taille suffisante pour autoriser l'accès à la surface de ferrocyanure^[213]. Ainsi, l'emploi de cette sonde permet de vérifier l'intégrité de la couche de Nafion[®] à la surface de l'électrode.

III.4.3.2 Sonde $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$

La **figure II.10** représente les voltammogrammes cycliques obtenus avec les deux mêmes électrodes CV/Nafion[®] et non modifiée précédentes plongées dans une solution de K_2SO_4 à 0,1 M contenant du $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ à 5 mM. Les autres paramètres opératoires sont précisés dans le tableau.

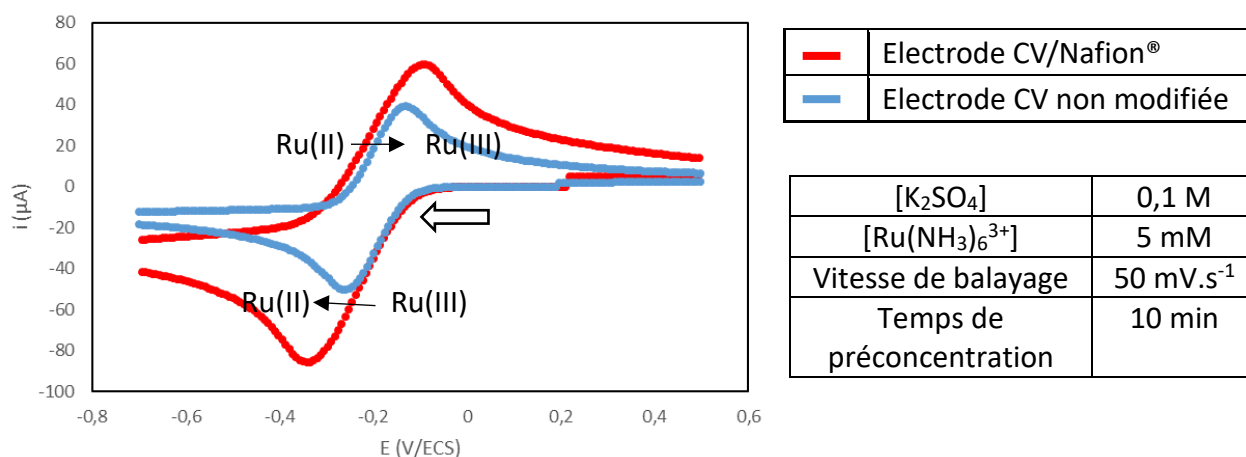


Figure II.10. Voltammogrammes cycliques tracés dans une solution K_2SO_4 0,1 M contenant $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ à 5 mM avec une électrode en CV/Nafion[®] (en rouge) et une électrode en CV non modifiée (en bleu).

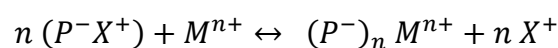
Un système quasi réversible est observé, que ce soit avec l'électrode en CV non modifiée (courbe bleue, $\Delta E_p = 127$ mV) ou avec l'électrode CV/Nafion[®] (courbe rouge, $\Delta E_p = 239$ mV), même si la cinétique de transfert électronique semble ralentie avec cette dernière. Néanmoins, les intensités de pic obtenues avec l'électrode fonctionnalisée ($I_{p, \text{red}} = 75$ μA et $I_{p, \text{ox}} = 74$ μA) sont supérieures à celles obtenues avec l'électrode non modifiée ($I_{p, \text{red}}$ et $I_{p, \text{ox}} = 47$ μA).

μA). Cette amplification de près de 60% des courants de pic confirme bien les échanges cationiques au sein du film de Nafion® qui préconcentre les ions $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ par le biais des groupements sulfonates. Cela disqualifie aussi l'hypothèse de l'encombrement stérique pour le ferrocyanure dans le cas précédent. La sensibilité de l'électrode est donc accrue avec le dépôt de la couche de Nafion® à la surface de l'électrode. Enfin, il est à noter que les signaux gardent une allure de type Cottrell.

IV. Dosage du fer

IV.1 Méthode de détection

La méthode choisie pour la détection électrochimique du fer est la voltammétrie à échange ionique (IEV). Elle couple la voltammétrie cyclique à une étape de préconcentration additionnelle à courant nul. Elle est particulièrement utilisée avec des électrodes fonctionnalisées par un film de polymère échangeur d'ions afin d'amplifier la sensibilité de la réponse ampérométrique. Au cours de l'étape de préconcentration, un équilibre d'échange ionique s'établit entre l'ion électroactif (analyte) présent dans la solution et le contre ion (X) associé au polymère. L'équation II.5 représente la réaction d'échange ionique dans le cas d'une préconcentration d'un analyte cationique sur une électrode recouverte d'un film polyanionique.



Equation II.5. Réaction d'échange ionique entre le contre ion X^+ et l'analyte M^{n+} .

P^- : sites d'échange d'ions dans le polymère

X^+ : contre-ion électroinactif (monochargé dans ce cas-là)

M^{n+} : analyte cationique électroactif

L'équilibre d'échange ionique dépend du coefficient de sélectivité (K) entre le cation/anion et le contre ion et peut être exprimé selon l'équation II.6 dans le cas d'un échange de cations monovalents.

$$K_X^M = \frac{[M^+]_p [X^+]_s}{[M^+]_s [X^+]_p}$$

Equation II.6. Expression du coefficient de sélectivité.

$[M^+]_p$: concentration de l'analyte dans la couche de polymère (mol.L⁻¹)

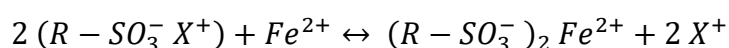
$[M^+]_s$: concentration de l'analyte dans la solution aqueuse (mol.L⁻¹)

$[X^+]_s$: concentration du contre ion dans la solution aqueuse (mol.L⁻¹)

$[X^+]_p$: concentration du contre ion dans la couche de polymère (mol.L⁻¹)

L'analyte accumulé dans le film est ensuite oxydé ou réduit par l'application d'une consigne de potentiel adaptée (voltammétrie cyclique dans notre cas). Le courant résultant est enregistré et relié à la concentration de l'analyte dans l'échantillon via un étalonnage. Cette méthode a été fréquemment utilisée dans la bibliographie pour la détection de cations métalliques^[184,214–217].

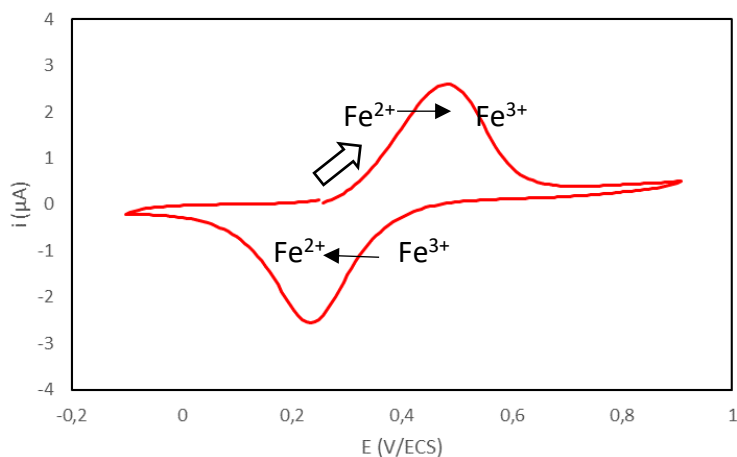
Pour notre étude, une procédure de détection des ions Fe²⁺ dans l'eau par IEV a été mise au point. L'électrode en CV/Nafion® est plongée dans la solution analytique contenant des cations Fe²⁺. La solution est agitée en faisant tourner l'électrode à une vitesse de 400 tours/min. L'étape de préconcentration est maintenue à courant nul pendant 10 minutes, au cours duquel l'échange ionique suivant a lieu (**équation II.7**) :



Equation II.7. Réaction d'échange ionique entre le contre ion X⁺ et Fe²⁺.

Un voltammogramme cyclique est ensuite tracé, d'abord en oxydation à partir du potentiel à courant nul, durant laquelle un pic relatif à l'oxydation des ions Fe²⁺ en Fe³⁺ est obtenu à 0,48 V/ECS. Lors du balayage retour, les cations Fe³⁺ formés lors du balayage aller sont réduits en ions Fe²⁺ ; un pic de courant est enregistré au potentiel de 0,23 V/ECS. Un système redox quasi-réversible ($\Delta E_p = 250$ mV) est ainsi observé. Un exemple de voltammogramme cyclique obtenu dans une solution K₂SO₄ 10 mM contenant les ions Fe²⁺ à 2,5 μM est donné à la **figure II.11**.

Contrairement au système observé avec $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, les pics tendent vers une forme gaussienne, ce qui suggère une contribution de l'adsorption lors de la réaction électrochimique.



$[\text{K}_2\text{SO}_4]$	10 mM
pH	3,7
Vitesse de balayage	$50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$
Temps de préconcentration	10 min

Figure II.11. Voltammogramme cyclique tracé avec une électrode en CV/Nafion® plongée dans une solution de K_2SO_4 10 mM contenant Fe^{2+} à 2,5 μM .

IV.2 Détermination des paramètres électrochimiques optimaux de mesure

Diverses conditions opératoires de mesure électrochimique, telles que le type et la concentration d'électrolyte support, la concentration de la solution de Nafion® à la surface de l'électrode en CV et le temps de préconcentration, ont été étudiées pour définir les paramètres optimaux de détection de Fe^{2+} .

IV.2.1 Electrolyte support et pH

Trois électrolytes supports différents ont été testés. Le **tableau II.2** indique la composition et le pH de chacun d'entre eux. Les autres conditions opératoires (concentration de la solution de Nafion® à 5% et préconcentration de 10 minutes) sont identiques pour toutes les expériences.

Electrolyte support	Concentration (mM)	pH
H ₂ SO ₄	1	2,8
HCl	1	3,1
K ₂ SO ₄	100	6,1
K ₂ SO ₄	10	5,8
K ₂ SO ₄ acidifié	10	3,7

Tableau II.2. Electrolytes supports utilisés.

La **figure II.12** représente les voltammogrammes cycliques obtenus avec l'électrode en CV/Nafion[®] plongée dans une solution d'électrolyte support de H₂SO₄ à 1 mM à pH 2,8 en absence et en présence de Fe²⁺ à la concentration de 5 μM.

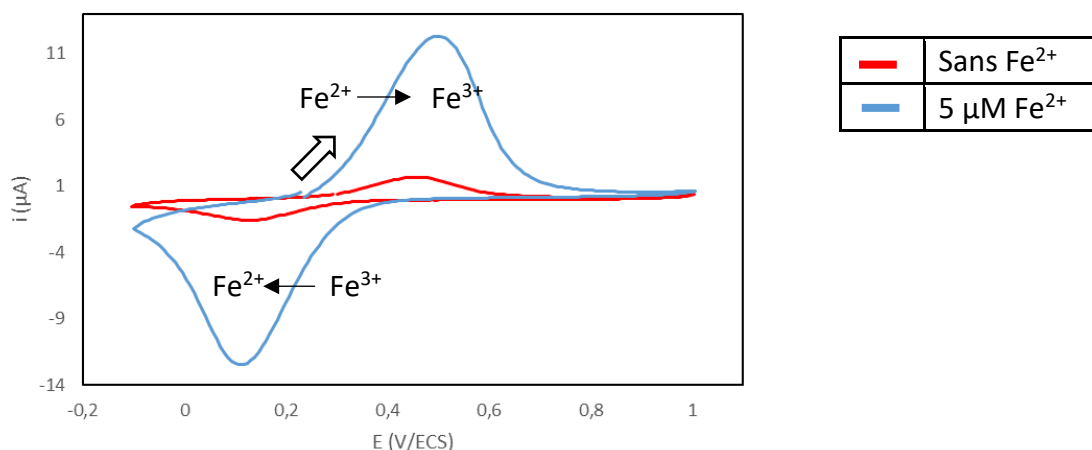


Figure II.12. Voltammogrammes cycliques tracés avec une électrode en CV/Nafion[®] plongée dans l'électrolyte support H₂SO₄ à 1 mM (pH 2,8) en absence et en présence d'ions ; v = 50 mV/s.

En présence d'ions Fe²⁺ (courbe bleue), le voltammogramme montre un signal d'oxydation net avec un potentiel de pic à 0,5 V/ECS, ainsi qu'un pic cathodique correspondant à la réduction des ions Fe³⁺ précédemment formés au potentiel de 0,12 V/ECS. Nous pouvons également noter de manière plus surprenante un signal en absence de fer, caractéristique de la présence d'un système redox inconnu (courbe rouge), avec des potentiels de pics anodique à 0,51 V/ECS et cathodique à 0,1 V/ECS. A notre connaissance, ce système redox n'a pas été mentionné jusqu'alors dans la bibliographie. Des voltammogrammes cycliques successifs ont été tracés

dans l'électrolyte support sur une période de trois heures (**Fig II.13**). Même si des réponses ampérométriques différentes sont observées et qu'aucune tendance claire ne se dessine au fur et à mesure des courbes tracées, l'intensité de ce signal n'est pas négligeable et pourrait interférer avec celui des ions Fe^{2+} . Des résultats analogues à ceux présentés aux **figures II.12** et **II.13** ont été obtenus en utilisant une solution de HCl à 1 mM (pH 3,1) comme électrolyte support. Aussi, ce système redox pourrait être lié à la concentration élevée de protons dans la solution. Par conséquent, les électrolytes support H_2SO_4 et HCl n'ont plus été utilisés par la suite.

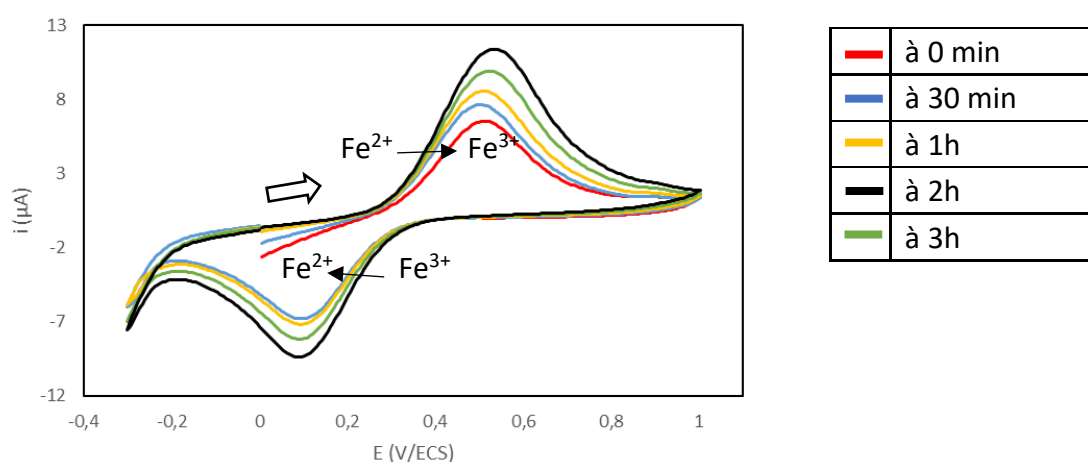


Figure II.13. Voltammogrammes cycliques tracés avec une électrode en CV/Nafion® plongée dans une solution électrolyte support H_2SO_4 à 1 mM (pH 2,8) avec une électrode en CV/Nafion®; $v = 50 \text{ mV.s}$.

Des expériences similaires ont été réalisées en utilisant une solution de K_2SO_4 comme électrolyte support. Plusieurs concentrations et plusieurs valeurs de pH ont été adoptées. Les résultats obtenus en absence et en présence d'ions Fe^{2+} à la concentration de $5 \mu\text{M}$ sont présentés à la **figure II.14**.

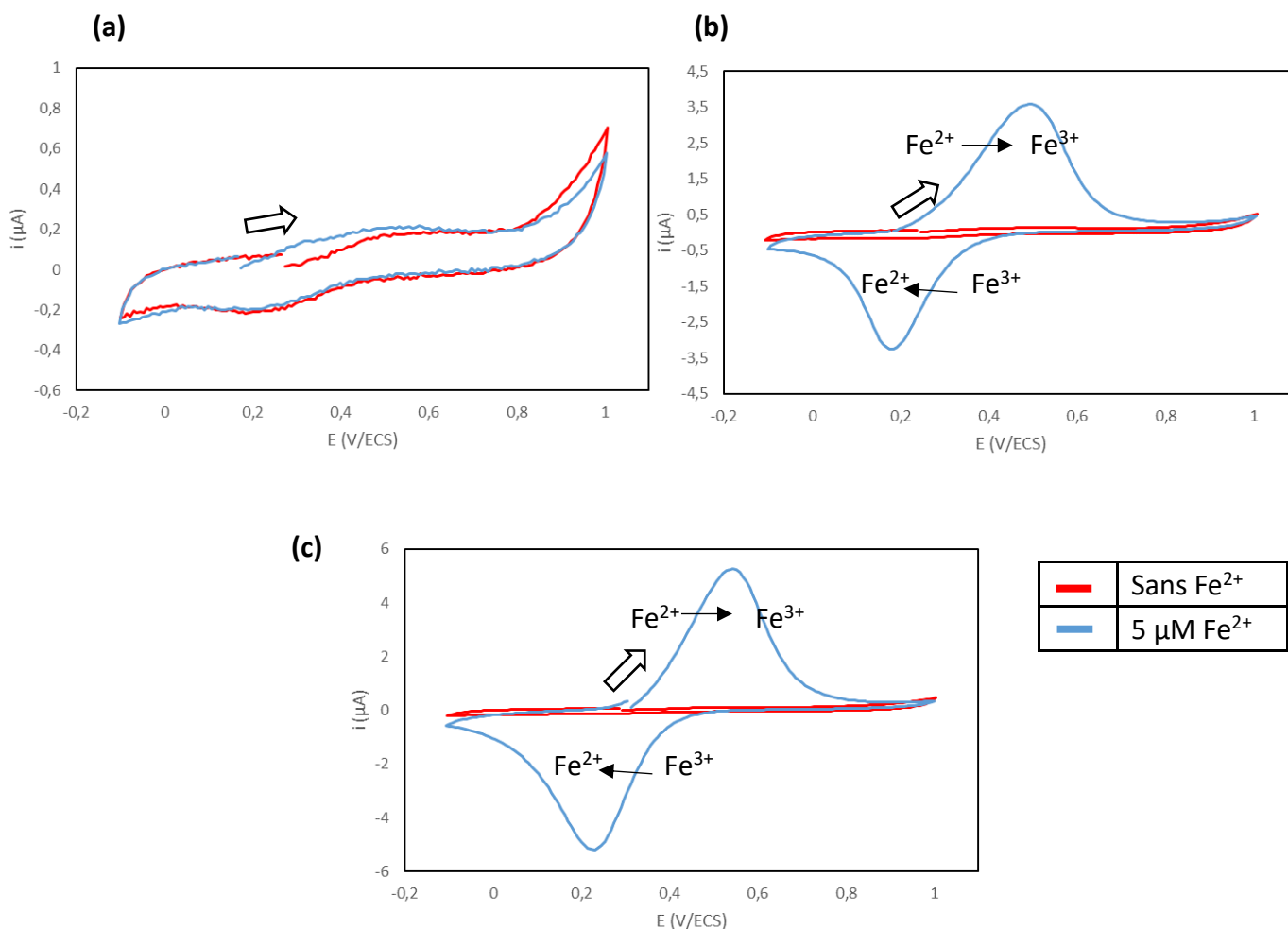


Figure II.14. Voltammogrammes cycliques tracés avec une électrode en CV/Nafion® plongée dans une solution de K_2SO_4 (a) 100 mM (pH 6,1) ; (b) 10 mM (pH 5,8) ; (c) 10 mM (pH 3,7), en absence et en présence de Fe^{2+} ; $v = 50$ mV/s.

Le voltammogramme tracé dans la solution de K_2SO_4 à la concentration de 100 mM ne montre aucun signal d'oxydation des ions Fe^{2+} (Fig II.14(a) courbe bleue). Ce résultat peut être expliqué par la concentration trop élevée des cations K^+ de l'électrolyte (200 mM) qui occupent majoritairement les sites actifs du Nafion® et interfèrent avec les ions Fe^{2+} lors de la réaction d'échange ionique^[184]. Lorsque la concentration de K_2SO_4 est abaissée à 10 mM, la réponse ampérométrique du système redox $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ est clairement observée (Fig. II.14(b) et (c) courbes bleues). Nous remarquons que les intensités des pics anodique et cathodique sont plus élevées pour le pH le plus acide ($I_{p,a} = 5,3$ μA à pH 3,7 contre $I_{p,a} = 3,6$ μA à pH 5,8). A pH 3,7, aucun courant mesurable n'est observé en absence de fer ; le signal attribué au proton peut donc être négligé (Fig. II.14(b)). En revanche, abaisser encore le pH a comme

conséquence l'apparition de ce signal interférent. Il y a donc un lien direct entre ce signal et la présence des ions H^+ en forte concentration. Cela est en accord avec l'hypothèse proposée plus haut.

Par conséquent, les expériences qui suivent ont été réalisées en utilisant une solution de K_2SO_4 à la concentration de 10 mM (pH 3,7) comme électrolyte.

IV.2.2 Concentration de la solution de Nafion®

Quatre concentrations différentes de solution de Nafion® ont été déposées à la surface de l'électrode. Pour chacune d'entre elles, un voltammogramme cyclique a été tracé en présence d'ions Fe^{2+} à la concentration de 5 μM . L'électrolyte support utilisé est une solution de K_2SO_4 à 10 mM (pH 3,7) et le temps de préconcentration est de 10 min.

La **figure II.15** montre l'évolution des intensités des pics d'oxydation de Fe^{2+} en fonction de la concentration de la solution de Nafion® déposée. Dans la gamme de concentration étudiée, comprise entre 0,5 et 5%, l'augmentation de la concentration de la solution de Nafion conduit, comme attendu, à une augmentation de la réponse ampérométrique. Cette tendance résulte de la présence d'un plus grand nombre de sites actifs disponibles dans le film pour assurer l'échange ionique avec les ions Fe^{2+} ^[199,218]. Cela contribue à augmenter localement la concentration en Fe^{2+} au voisinage de l'électrode. Des intensités de courant aisément mesurables ayant été atteintes avec une concentration de la solution de Nafion® à 5 %, des concentrations supérieures n'ont pas été étudiées.

Par conséquent, les expériences qui suivent ont été réalisées en déposant une solution de Nafion à 5 % w/w à la surface des électrodes.

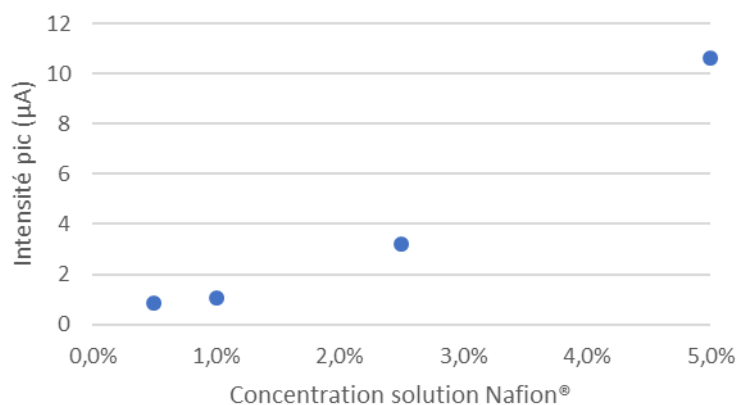


Figure II.15. Evolution des intensités des pics d'oxydation des ions Fe^{2+} en fonction de la concentration de la solution de Nafion® déposée à la surface de l'électrode en CV.

Voltammogrammes cycliques tracés dans K_2SO_4 à 10 mM (pH 3,7) contenant des ions Fe^{2+} à 5 μM . $v = 50$ mV/s.

IV.2.3 Temps de préconcentration

Le cahier des charges indiqué par le partenaire industriel précise que l'analyse du fer doit être relativement rapide afin de pouvoir réaliser plusieurs mesures en une heure et assurer ainsi un contrôle quasi continu des TAR. Ainsi, six temps de préconcentration à courant nul ont été étudiés avec une limite fixée à 15 minutes. Pour chaque condition opératoire, un voltammogramme cyclique a été tracé en présence d'ions Fe^{2+} à la concentration de 5 μM . L'électrolyte support utilisé est une solution de K_2SO_4 à 10 mM (pH 3,7) et la concentration de la solution de Nafion® déposée à la surface de l'électrode est de 5 %.

La **figure II.16** représente l'évolution de l'intensité des pics d'oxydation des ions Fe^{2+} en fonction du temps de préconcentration.

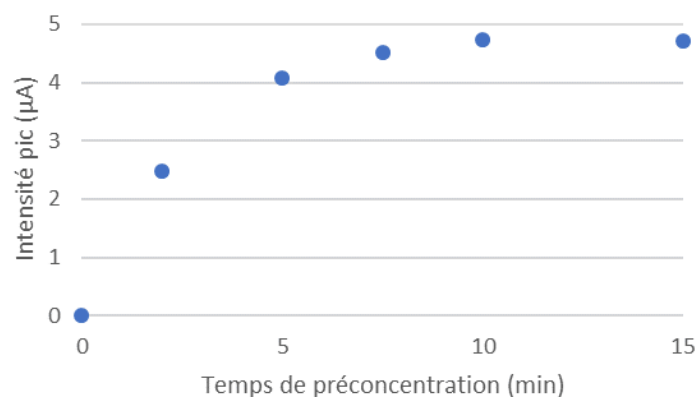


Figure II.16. Evolution des intensités des pics d'oxydation des ions Fe^{2+} en fonction du temps de préconcentration. Voltammogrammes cycliques tracés dans K_2SO_4 à 10 mM (pH 3,7) contenant des ions Fe^{2+} à 5 μM . $v = 50 \text{ mV/s}$.

Les résultats montrent que l'intensité du pic d'oxydation des ions Fe^{2+} augmente avec le temps de préconcentration jusqu'à atteindre une valeur maximale (4,7 μA) pour 10 min. Au-delà de 10 min, le courant mesuré est quasiment constant. La réaction d'échange ionique atteint un état d'équilibre pour lequel tous les sites actifs du polymère sont alors occupés. La concentration de Fe^{2+} dans le film de Nafion® est alors constante. Il est à noter aussi qu'en absence d'étape de préconcentration, un pic d'oxydation mal défini et de faible intensité est observé. Ce résultat montre donc l'importance d'intégrer une étape de préconcentration d'une durée suffisante dans le protocole de mesure.

Un temps de préconcentration à courant nul de 10 min a donc été utilisé dans les expériences qui suivent.

IV.3 Détection de Fe^{2+} en milieu synthétique

Afin de valider la procédure mise au point pour la détection de Fe^{2+} avec les paramètres opératoires fixés précédemment, des voltammogrammes cycliques (**Fig II.17**) ont été tracés pour des concentrations d'ions Fe^{2+} comprises entre 1 μM et 10 μM . Un étalonnage est réalisé par ajouts successifs de volumes d'une solution mère d'ions Fe^{2+} de concentration 1 mM.

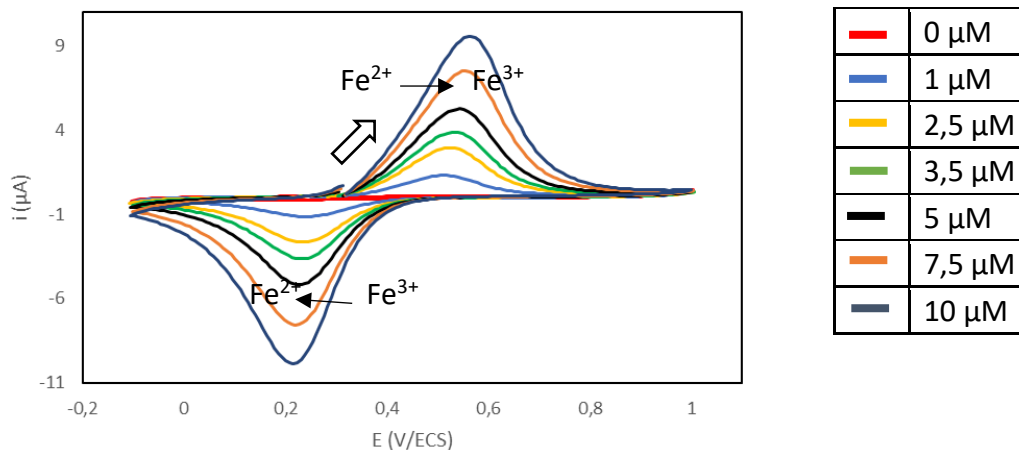


Figure II.17. Voltammogrammes cycliques tracés avec l'électrode en CV/Nafion® plongée dans K₂SO₄ à 10 mM (pH 3,7) en présence de concentrations croissantes de Fe²⁺ ; temps de préconcentration = 10 min ; v = 50 mV/s.

Les voltammogrammes montrent des pics d'oxydation de Fe²⁺ au potentiel de 0,52 V/ECS avec des intensités croissantes à la suite des ajouts successifs de Fe²⁺. La figure II.18 montre la droite d'étalonnage correspondante. La réponse ampérométrique évolue linéairement ($R^2 = 0,997$) dans toute la gamme de concentration étudiée (de 1 à 10 μM).

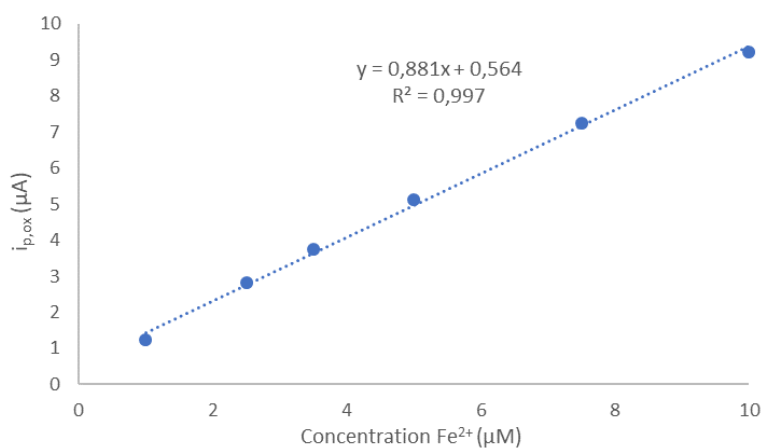


Figure II.18. Variation du courant de pic d'oxydation de Fe²⁺ en fonction de sa concentration.

IV.4 Détection de Fe³⁺ en milieu synthétique

IV.4.1 Etude préliminaire

La procédure employée précédemment pour établir la droite d'étalonnage des ions Fe²⁺ en solution synthétique a été reprise pour les ions Fe³⁺. Des voltammogrammes cycliques (**Fig. II.19**) ont été tracés avec plusieurs solutions contenant du Fe³⁺ à des concentrations comprises entre 1 et 10 μM. Le balayage des potentiels débute à partir du potentiel à courant nul vers des valeurs négatives. Les ajouts d'ions Fe³⁺ sont réalisés à partir d'une solution mère de HCl 10 mM contenant les ions Fe³⁺ à la concentration de 1 mM.

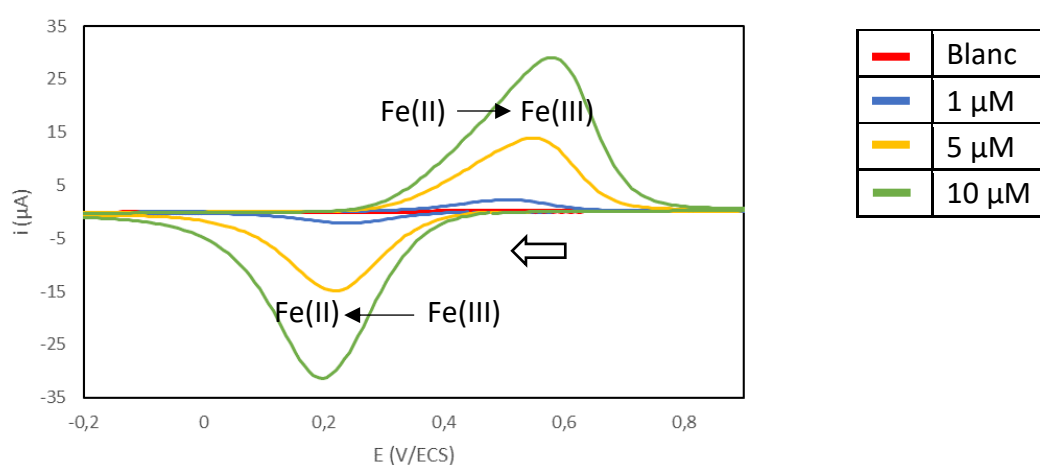


Figure II.19. Voltammogrammes cycliques tracés avec l'électrode en CV/Nafion® plongée dans une solution de K₂SO₄ 10 mM (pH 3,7) en présence de concentrations croissantes d'ions Fe³⁺ ; temps de préconcentration = 10 min ; $v = 50$ mV/s.

A pH 3,7 et dans la gamme de concentration étudiée, les ions Fe³⁺ ne sont plus sous forme ionique mais sous forme d'hydroxyde (voir diagramme de Pourbaix : **Fig. I.7** du **chapitre I**). Toutefois les voltammogrammes mettent en évidence un signal cathodique au potentiel de 0,19 V/ECS et d'intensité croissante lors des ajouts d'ions Fe³⁺.

Plusieurs publications font état de la présence de complexes solubles Fe(OH)²⁺ et Fe(OH)₂⁺ dans une gamme de pH comprise entre 2,5 et 7^[219–221]. Afin de déterminer les espèces majoritaires dans la solution électrolytique utilisée, une analyse de spéciation a été réalisée à l'aide du logiciel *Visual MINTEQ* pour une concentration de Fe(III) de 5 μM. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau II.3**. Ils montrent que la majorité du Fe(III) présent

(96,5 %) dans la solution est sous forme de complexes chargés positivement (FeSO_4^+ , FeOH^{2+} et $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$). Ces complexes peuvent donc participer aux échanges cationiques et s'accumuler dans le film de Nafion[®] lors de l'étape de préconcentration. Leur réduction électrochimique lors du balayage aller des potentiels, peut alors induire un signal cathodique.

Espèce	Pourcentage de la concentration totale en Fe(III) (%)
Fe^{3+}	1,364
$\text{Fe}(\text{SO}_4)_2^-$	2,156
$\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$	36,877
$\text{Fe}(\text{OH})_2^+$	26,786
$\text{Fe}(\text{SO}_4)^+$	32,81

Tableau II.3. Spéciation du fer dans une solution de K_2SO_4 10 mM (pH 3,7) contenant Fe(III) à la concentration de 5 μM (Calcul effectué à partir de *Visual MINTEQ*).

Cependant ces complexes sont relativement peu stables en solution ; par exemple les pK_a de $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ et de $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ sont égaux à -3,02 et -5,57 respectivement^[222]. La **figure II.20** montre deux voltammogrammes cycliques de la solution électrolytique de K_2SO_4 10 mM (pH 3,7) contenant 10 μM de Fe^{3+} , tracés juste après la préparation de la solution puis au bout de 30 minutes. On observe une baisse conséquente de 58 % de l'intensité du pic de réduction à 0,19 V/ECS (de 31 μA à 18 μA).

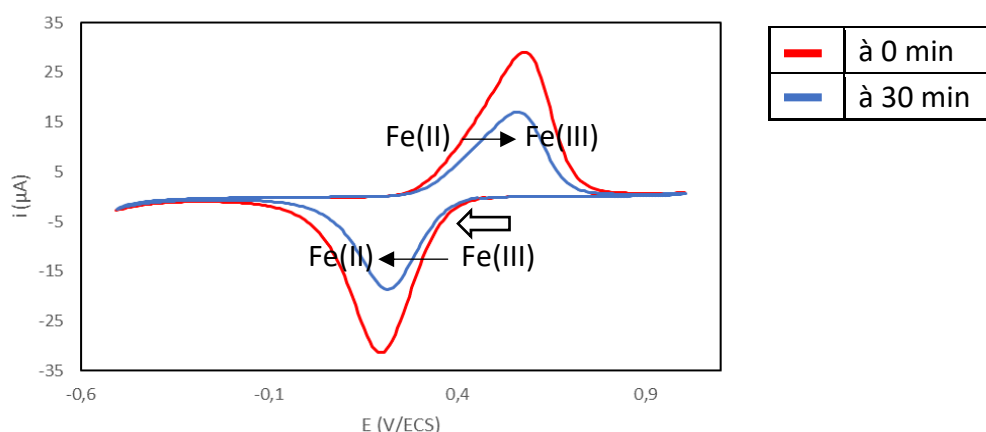
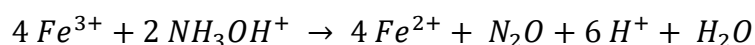


Figure II.20. Voltammogrammes cycliques tracés avec une électrode en CV/Nafion[®] plongée dans K_2SO_4 10 mM (pH 3,7) contenant initialement des ions Fe^{3+} à la concentration de 10 μM ; temps de préconcentration = 10 min ; $v = 50$ mV/s.

La procédure détaillée ci-dessus n'est donc pas adaptée pour le dosage de Fe^{3+} car des réactions de complexation ou de précipitation de Fe^{3+} peuvent conduire à des valeurs erronées de concentrations lors de la détection électrochimique. De plus, abaisser le pH de détection pour permettre aux ions Fe^{3+} d'être sous forme ionique libre ne peut être envisagé car cela conduirait à l'apparition des pics interférents observés dans la **partie IV.2.1**.

IV.4.2 Utilisation du réducteur hydroxylamine

Pour effectuer le dosage électrochimique des ions Fe^{3+} en milieu aqueux synthétique, une alternative consiste à les réduire auparavant en ions Fe^{2+} . Contrairement à Fe^{3+} , les ions Fe^{2+} sont sous forme ionique libre à pH 3,7 et leur dosage est possible, comme observé précédemment. La réduction totale de Fe^{3+} nécessite l'emploi d'un réducteur puissant en milieu acide. L'hydroxylamine (NH_2OH) est communément citée dans la bibliographie pour la réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} en solution aqueuse^[199,223–225]. La détection et le dosage des ions Fe^{3+} s'effectuent dès lors indirectement via le dosage des ions Fe^{2+} produits lors de la réaction de réduction de Fe^{3+} par l'hydroxylamine (**équation II.8**).



Equation II.8. Réaction de réduction de Fe^{3+} par l'hydroxylamine en milieu acide

Cependant, l'hydroxylamine est une espèce électroactive qui s'oxyde irréversiblement à des potentiels élevés, supérieurs à 0,9 V/ECS, sur des matériaux d'électrodes conventionnels^[226–228].

Pour vérifier l'électroactivité de l'hydroxylamine dans les conditions opératoires précédemment fixées, un voltammogramme cyclique a été tracé (**Fig. II.21**) dans la solution électrolytique retenue en absence et en présence d'hydroxylamine à la concentration de 0,5 mM.

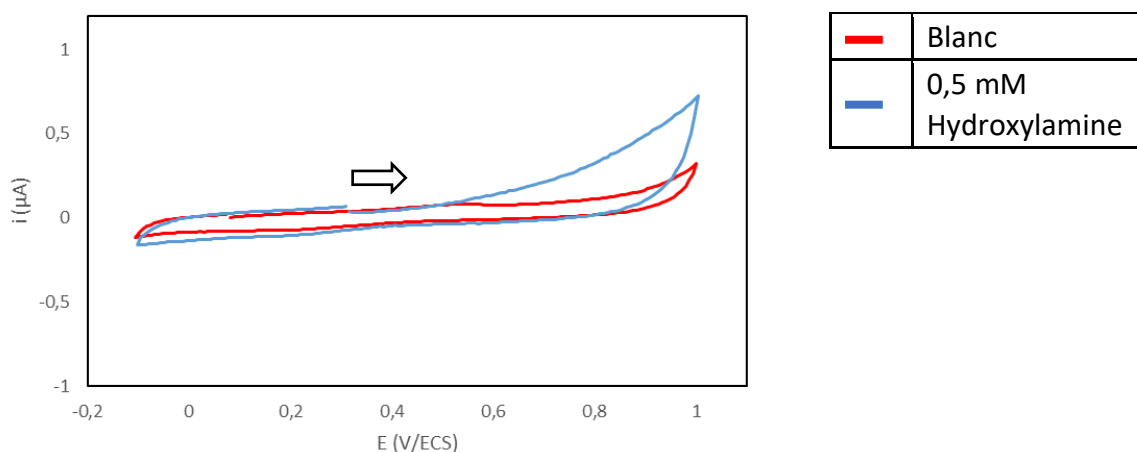


Figure II.21. Voltammogrammes cycliques tracés avec une électrode en CV/Nafion® plongée dans une solution de K_2SO_4 10 mM (pH 3,7) en absence et en présence d'hydroxylamine ; temps de préconcentration = 10 min ; $v = 50$ mV/s.

Même si les voltammogrammes cycliques obtenus dans les deux cas ne sont pas parfaitement superposables, nous pouvons toutefois noter l'absence de signal d'oxydation de l'hydroxylamine dans la fenêtre de potentiel comprise entre -0,1 V et 1 V. La présence de l'hydroxylamine ne devrait donc pas interférer avec la détection électrochimique indirecte de Fe^{3+} .

Afin de valider l'utilisation de l'hydroxylamine, un protocole de dosage indirect de Fe^{3+} a été mis en place. Une solution mère de HCl 10 mM contenant les ions Fe^{3+} à 1 mM est préparée. Un excès d'hydroxylamine (50 mM) est ensuite ajouté directement dans la solution mère pour réduire Fe^{3+} en Fe^{2+} .

La figure **II.22a** montre les voltammogrammes cycliques (**Fig. II.22a**) tracés dans la solution électrolytique de K_2SO_4 après ajouts successifs de la solution mère ainsi préparée. Les volumes ajoutés permettent de couvrir la gamme de concentration désirée (entre 1 μM et 10 μM).

Des pics d'oxydation de Fe^{2+} d'intensités croissantes apparaissent vers 0,55 V/ECS. Une courbe d'étalonnage (**Fig. II.22b**) reliant l'intensité du pic d'oxydation à la concentration de Fe^{3+} (réduit en Fe^{2+}) a permis de vérifier la linéarité de la réponse ($R^2 = 0,998$).

Ainsi, le protocole mis au point impliquant l'ajout d'hydroxylamine permet le dosage indirect de Fe^{3+} dans une solution aqueuse synthétique.

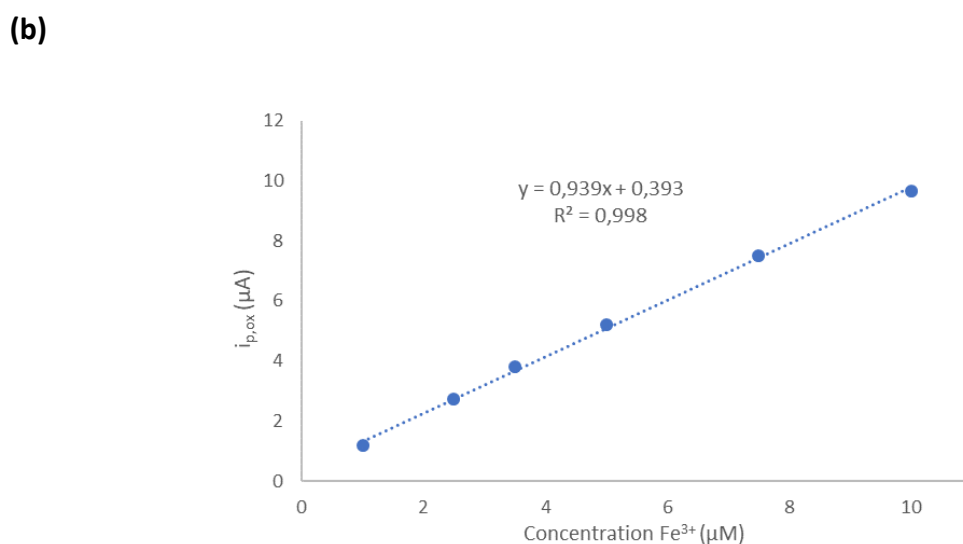
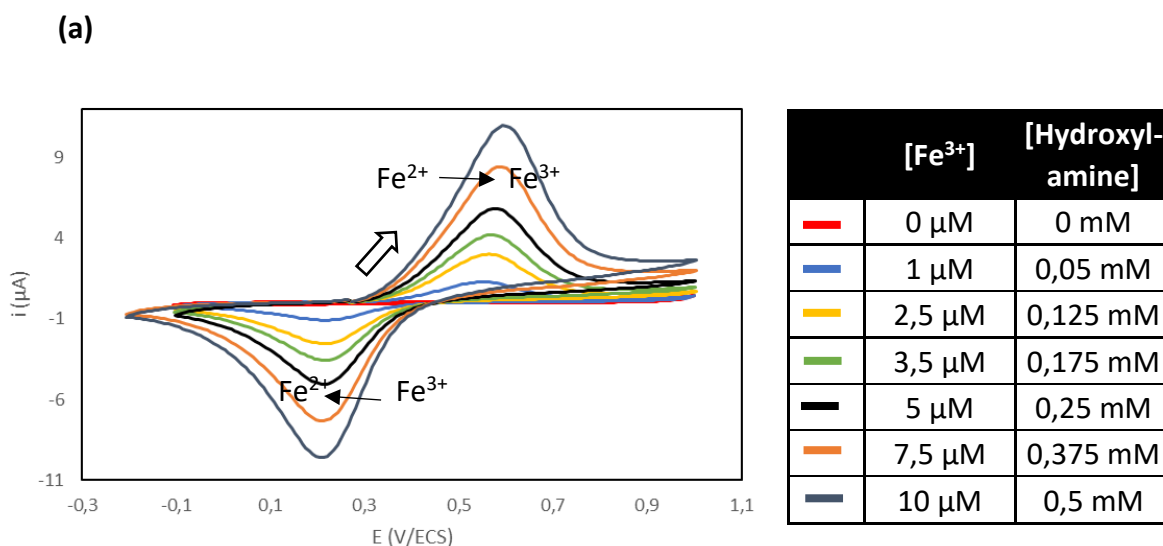


Figure II.22. (a) Voltammogrammes cycliques tracés avec une électrode en CV/Nafion® plongée dans une solution de K₂SO₄ 10 mM (pH 3,7) contenant des concentrations croissantes de Fe²⁺ ; temps de préconcentration = 10 min ; v = 50 mV/s. (b) Variation du courant de pic d'oxydation de Fe²⁺ en fonction de la concentration de Fe³⁺ (réduit en Fe²⁺).

L'électrode en CV/Nafion® élaborée au cours de cette partie permet donc de réaliser des détections de Fe²⁺ et de Fe³⁺ en milieu synthétique à des concentrations comprises entre 1 et 10 µM.

V. Interface Solution/Nafion®-Electrode

Afin de mieux comprendre les phénomènes se déroulant entre la solution électrolytique, le film de Nafion® et l'électrode en CV lors des étapes de préconcentration et de détection, une série d'expériences ont été réalisées.

V.1 Identification des espèces impliquées dans la réponse électrochimique

Les ions Fe^{2+} impliqués dans la réaction électrochimique peuvent en première analyse provenir de deux sources : ceux dissous en solution et ceux concentrés dans le film de Nafion. Afin d'avoir une connaissance plus fine des phénomènes qui ont lieu, l'expérience suivante a été menée : l'électrode en CV/Nafion® est plongée pendant 10 minutes dans la solution de K_2SO_4 10 mM à pH = 3,7 contenant les ions Fe^{2+} (étape de préconcentration). Un voltammogramme cyclique est ensuite tracé dans une nouvelle solution électrolytique ne contenant pas d'ions Fe^{2+} . La **figure II.23** reporte les intensités du courant de pic enregistrées pour des concentrations en ions Fe^{2+} dans la solution de préconcentration comprises entre 1 et 10 μM .

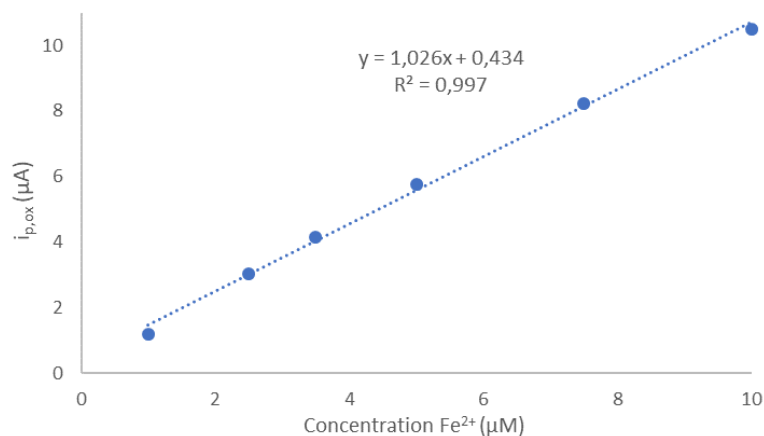


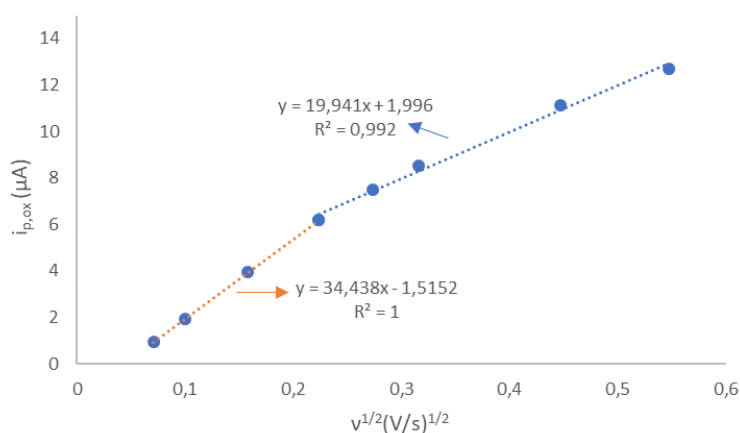
Figure II.23. Evolution de l'intensité du pic d'oxydation de Fe^{2+} en fonction de la concentration en Fe^{2+} dans la solution de préconcentration. Voltammogrammes cycliques tracés avec une électrode en CV/Nafion® plongée dans une solution de K_2SO_4 10 mM (pH 3,7) ; $v = 50 \text{ mV/s}$

Deux enseignements majeurs peuvent être tirés des résultats obtenus : d'une part la réponse ampérométrique évolue linéairement avec la concentration en ions Fe^{2+} . D'autre part, les intensités de pic sont comparables à celles obtenues lorsque les voltammogrammes sont tracés en présence d'ions Fe^{2+} (**Fig II.18**). Cela démontre d'une part l'efficacité de l'étape de préconcentration des ions Fe^{2+} dans le film de Nafion®. D'autre part, la réaction électrochimique implique très majoritairement les ions Fe^{2+} présents dans le film alors que la contribution de ceux dissous en solution est négligeable avec la vitesse de balayage des potentiels adoptée. Si cela n'avait pas été le cas, les signaux enregistrés ici auraient dû avoir des intensités moindres.

V.2 Compréhension de l'étape limitante du mécanisme de la réaction

Pour déterminer si la vitesse de la réaction d'oxydation de Fe^{2+} est contrôlée par la diffusion des espèces dans le film de Nafion® ou par l'adsorption des espèces à l'électrode, des voltammogrammes cycliques ont été tracés dans une solution contenant $10 \mu\text{M}$ de Fe^{2+} en faisant varier la vitesse de balayage (v) de 5 mV/s à 300 mV/s avec une préconcentration de 10 minutes entre chaque mesure. Les évolutions des intensités du pic d'oxydation en fonction de la vitesse de balayage et de la racine carrée de la vitesse de balayage sont représentées ci-dessous (**Fig. II.24**).

(a)



(b)

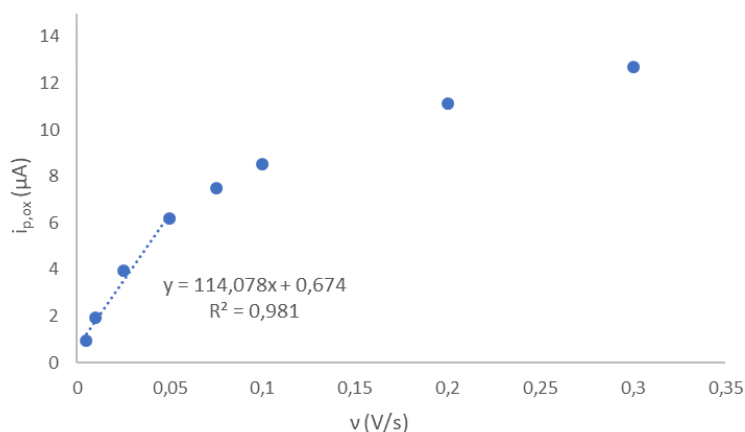


Figure II.24. Evolution des intensités du pic d'oxydation des ions Fe^{2+} en fonction (a) de la racine carrée de la vitesse de balayage des potentiels ; (b) de la vitesse de balayage des potentiels. Voltammétrie cyclique tracée avec une électrode en CV/Nafion[®] plongée dans une solution de K_2SO_4 10 mM (pH 3,7) contenant des ions Fe^{2+} à la concentration de 10 μM ; temps de préconcentration = 10 min.

Deux observations majeures peuvent être mises en avant :

1. Selon la **figure II.24(a)**, une relation linéaire est obtenue entre l'intensité du pic d'oxydation et la racine carrée de la vitesse de balayage ($R^2 = 0,992$) pour des valeurs comprises entre 50 et 300 mV/s . Cela semble indiquer que la vitesse de la réaction est contrôlée par la diffusion des espèces. En prenant en considération la présence du Nafion[®] à la surface de l'électrode, cela impliquerait une diffusion des espèces au sein de la couche.
2. Selon la **figure II.24(b)**, à des vitesses de balayage comprises entre 5 et 50 mV/s , une relation linéaire est obtenue entre l'intensité du pic d'oxydation et la vitesse de balayage ($R^2 = 0,981$). Cependant, une relation linéaire est aussi obtenue lors de la variation de l'intensité du pic d'oxydation et la racine carrée de la vitesse de balayage ($R^2 = 1$) selon la **figure II.24(a)**. Cela semble montrer que l'adsorption et la diffusion des espèces à l'électrode contribuent toutes deux à la vitesse de la réaction d'oxydation pour des vitesses de balayage faible ($< 50 mV/s$).

A la suite de de cette seconde observation, une méthode récemment décrite par l'équipe de Walcarius^[229] permettant de mieux comprendre la contribution respective de l'adsorption et de la diffusion à la réaction a été utilisée. Elle implique l'utilisation de l'**équation II.9** et de l'**équation II.10**. L'**équation II.9** représente l'intensité de pic (*i*) obtenu grâce à la contribution de l'adsorption (k_1v) et de la diffusion ($k_2v^{\frac{1}{2}}$). Le terme k_1v décrit le courant d'électrolyse impliquant les seules espèces adsorbées (**équation II.3**) ; le terme $k_2v^{\frac{1}{2}}$ provient de l'équation Randles-Sevcik (**équation II.2**) et exprime le courant qui concerne les espèces impliquées dans la diffusion. En divisant chacun des termes de l'**équation II.9** par $v^{1/2}$ on aboutit à l'**équation II.10**. Cette dernière va permettre de réaliser une exploitation graphique ultérieurement.

$$\begin{array}{ccc}
 i = k_1v + k_2v^{\frac{1}{2}} & \xrightarrow{\div v^{\frac{1}{2}}} & \frac{i}{v^{1/2}} = k_1v^{\frac{1}{2}} + k_2 \\
 \text{Equation II.9} & & \text{Equation II.10}
 \end{array}$$

i : intensité du pic d'oxydation (A)

v : vitesse de balayage des potentiels (V.s⁻¹)

k_1 : paramètre provenant de l'**équation II.3** représentant la contribution relative de l'adsorption

k_2 : paramètre provenant de l'**équation II.2** représentant la contribution relative de la diffusion

Les valeurs de *i* et *v* sont extraites des voltammogrammes cycliques tracés dans une solution contenant les ions Fe²⁺ à la concentration de 10 μM en faisant varier la vitesse de balayage des potentiels. En lien avec l'**équation II.10**, l'évolution de $\frac{i}{v^{1/2}}$ en fonction de $v^{\frac{1}{2}}$ a été tracée (**Fig. II.25**), La pente et de l'ordonnée à l'origine permettent d'atteindre les valeurs de k_1 et de k_2 .

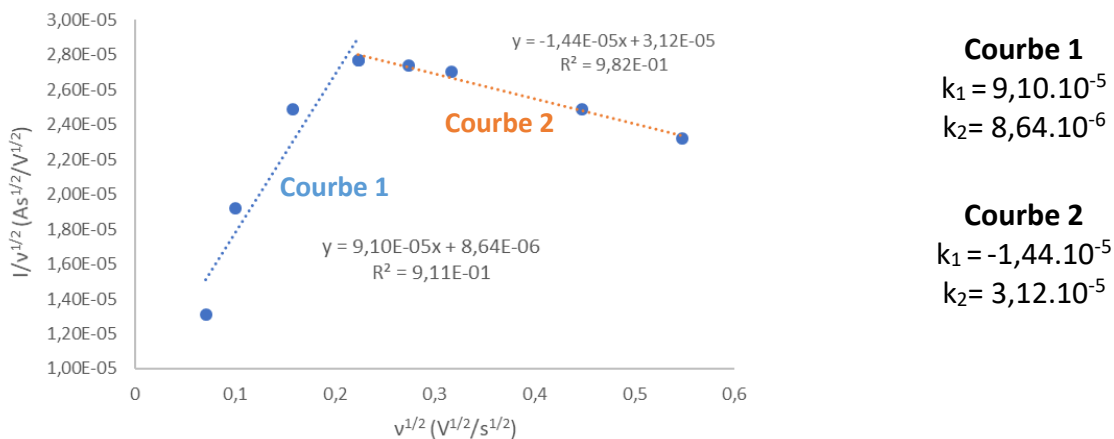


Figure II.25. Evolution de $\frac{i}{v^{1/2}}$ en fonction de $v^{1/2}$ et présentation des valeurs k_1 et k_2 résultantes.

Deux droites avec deux évolutions différentes ont été obtenues. Pour la courbe 1, la valeur de k_1 est 10,5 fois supérieure à celle de k_2 démontrant une limitation de la vitesse d'oxydation de Fe^{2+} principalement due à l'adsorption. Cette hypothèse s'applique pour des vitesses de balayage comprises entre 5 et 50 mV/s. Pour la courbe 2, une valeur négative de k_1 est obtenue ($-1,44 \cdot 10^{-5}$). Cela montre une influence nulle ou négligeable de l'adsorption sur la vitesse de la réaction qui est cette fois contrôlée par la diffusion des espèces. Cette hypothèse est applicable à des vitesses de balayage comprises entre 50 et 300 mV/s. Il est à noter qu'à 50 mV/s, qui correspond à la vitesse de balayage utilisée pour la détection du fer, il y a contribution des deux phénomènes sur la vitesse de la réaction.

Par ailleurs, la **figure II.26** présente des voltammogrammes cycliques tracés lors de cette étude avec des vitesses de balayage comprises entre 5 et 200 mV/s. Lorsque la vitesse de balayage augmente, le changement d'allure des pics d'oxydation est observé. Ils évoluent d'une forme plutôt gaussienne (typique des conditions de couche mince et en présence d'espèces adsorbées à l'électrode) vers une forme plutôt 'en bec de canard' avec une décroissance du courant post-pic selon l'équation de Cottrell (typique d'un comportement diffusif).

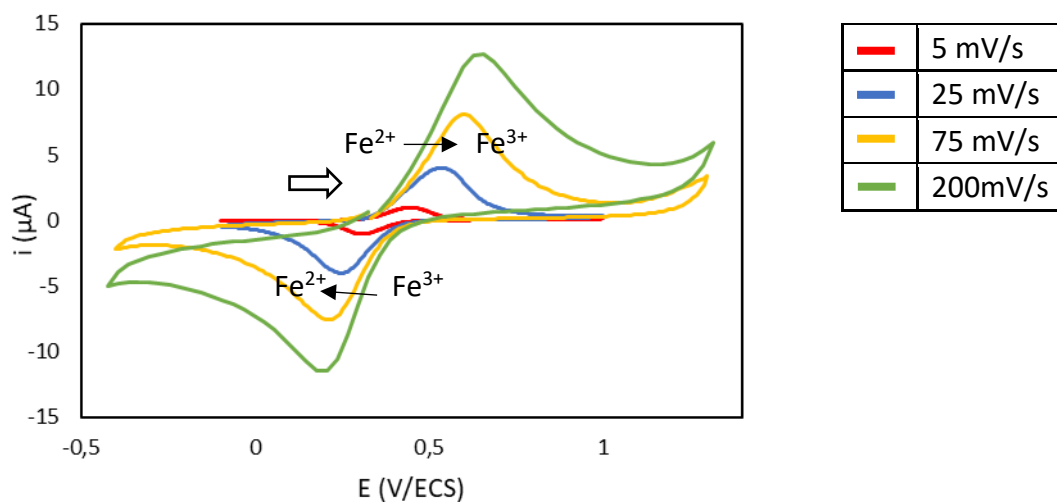


Figure II.26. Voltammogrammes cycliques tracés avec une électrode en CV/Nafion® plongée dans une solution de K₂SO₄ 10 mM (pH 3,7) contenant les ions Fe²⁺ à la concentration de 10 μM pour plusieurs vitesses de balayage des potentiels ; temps de préconcentration = 10 min.

Les observations faites au cours de cette étude sont caractéristiques des électrodes recouvertes d'une couche polymérique. La diffusion des espèces au sein du film est un phénomène qui contribue toujours à la cinétique de la réaction indépendamment des vitesses de balayage. Cela est prouvé par les observations des **figures II.24** et **II.25**.

A de faibles vitesses de balayage, la mesure électrochimique dure suffisamment longtemps pour permettre aux ions Fe²⁺ incorporés dans la couche de Nafion® de s'oxyder de manière exhaustive durant le balayage de potentiel. Cela procure ainsi une forme gaussienne au pic d'oxydation où $I_{p,ox}$ est proportionnelle à v . En augmentant la vitesse de balayage (ce qui entraîne une diminution du temps de mesure), le phénomène diffusionnel devient de plus en plus prépondérant au sein de la couche de Nafion® avec l'oxydation partielle des ions Fe²⁺ incorporés. Cela fait évoluer la forme du pic d'oxydation avec une allure mélangeant la forme gaussienne et celle en « bec de canard »^[230].

V.3 Détermination du coefficient de diffusion de Fe²⁺ dans la couche de Nafion®

Puisque la diffusion des ions Fe²⁺ a une influence sur la cinétique de la réaction électrochimique, le coefficient de diffusion de Fe²⁺ dans le Nafion® est un paramètre

important. La voltammétrie sur électrode à disque tournant avec l'électrode en CV/Nafion® a été employée pour déterminer sa valeur. L'agitation de la solution induite par la rotation de l'électrode permet d'établir une couche de diffusion hydrodynamique d'épaisseur constante. Cependant, si la rotation de l'électrode est suffisamment rapide, cette couche de diffusion devient tellement fine que l'épaisseur du film de Nafion® devient la barrière diffusionnelle majeure. Le coefficient de diffusion mesuré devient alors un coefficient de diffusion apparent (D_{app}) des ions Fe^{2+} à travers le film^[213].

Des voltammogrammes linéaires sont tracés avec l'électrode CV/Nafion n°1, dont la surface a été caractérisée par le profilomètre optique dans la **partie III.4.2**, et plongée dans la solution électrolytique contenant les ions Fe^{2+} à 5 μM . Les paramètres opératoires utilisés pour ces expériences sont précisés dans le **tableau II.4**. Les courbes sont enregistrées à des vitesses de rotation croissantes (**Annexe 2**) jusqu'à ce que le courant limite (I_{lim}) ait atteint une valeur maximale constante.

[Fe^{2+}]	5 μM
[K_2SO_4]	10 mM
pH	3,7
Bornes de potentiel	De 0 V/OCP à 1 V/ECS
Vitesse de balayage	10 mV/s
Pas de potentiel	0,00244 V
Vitesses de rotation testées	De 3000 à 10000 tours/ min

Tableau II.4. Paramètres opératoires utilisés lors de la mesure par voltammétrie sur électrode tournante.

A cette vitesse de rotation (ω_{lim}), l'épaisseur de la couche de Nafion® constitue le frein diffusionnel essentiel. A partir de l'équation simplifiée de Levich (**équation II.11**), la valeur du coefficient de diffusion apparent (D_{app}) de Fe^{2+} dans le film de Nafion® est calculée pour l'électrode 1.

$$D_{app} = \frac{I_{lim} \delta_{Nafion^{\circledR}}}{n F \pi r^2 C}$$

Equation II.11. Expression du coefficient de diffusion apparent (à partir de la relation de Levich)

I_{lim} : courant limite de diffusion (A)

n : nombre d'électrons échangés par mole d'espèce électrolysée

F : constante de Faraday (= 96484,5 C.mol⁻¹)

r : rayon de la couche de Nafion[®] recouvrant l'électrode de travail (= 0,15 cm)

D_{app} : coefficient apparent de diffusion de Fe²⁺ dans le film de Nafion[®] (cm².s⁻¹)

δ_{Nafion} : épaisseur de la couche de Nafion[®] (cm)

C : concentration de Fe²⁺ en solution (mol.cm⁻³)

Le **tableau II.5** rapporte la valeur obtenue ainsi que les données issues des mesures voltammétriques.

	Epaisseur couche Nafion [®] (μm)	I_{lim} (μA)	ω_{lim} (tours/min)	D_{app} (cm ² /s)
Electrode 1	2,33	0,467	8000	3,2.10 ⁻⁶

Tableau II.5. Paramètres physico-chimiques de l'électrode CV/ Nafion[®] n°1 obtenus par voltammétrie sur électrode tournante.

Une valeur de D_{app} égale à 3,2.10⁻⁶ cm²/s a été obtenue. Elle est d'un ordre de grandeur supérieur à celles retrouvées dans la bibliographie pour les ions Fe²⁺ et les cations divalents dans le Nafion[®] [231,232]. Cette différence peut provenir d'un taux d'hydratation supérieur du polymère étant donné que la solution commerciale de Nafion[®] utilisée est différente de celles utilisées dans la bibliographie. En effet, il a été démontré qu'une teneur en eau plus élevée au sein de la membrane Nafion[®] peut engendrer une mobilité accrue des cations grâce au gonflement des sites hydrophiles et par conséquent une augmentation de la vitesse de transport de matière au sein de la membrane^[231].

VI. Performances analytiques du capteur

Une fois l'électrode fonctionnalisée mise au point, les performances analytiques du capteur ont été établies. En premier lieu, la répétabilité et la reproductibilité des mesures ont été testées et la sensibilité du capteur a été évaluée pour des concentrations micromolaires. Ensuite, l'exactitude du capteur a été testée avec des solutions synthétiques de fer préalablement préparées. Enfin, une étude des interférents a été réalisée pour tester la sélectivité du capteur et pour valider son utilisation potentielle dans des eaux de TAR.

VI.1 Répétabilité, reproductibilité et sensibilité

Les procédures de dosage des ions Fe^{2+} et Fe^{3+} décrites dans les **parties IV.3** et **IV.4.2** respectivement ont été répétées trois fois avec une même électrode en CV/Nafion® afin d'évaluer la répétabilité des mesures. Les courbes d'étalonnages issues de l'exploitation des voltammogrammes cycliques ainsi que les écarts types relatifs (RSD) sont présentés à la **figure II.27**. Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) ont été obtenues par exploitation des droites par la méthode des moindres carrés sur le logiciel *Microsoft Excel* et les équations ci-dessous (**équations II.12** et **II.13**).

$$LOD = \frac{3 S_a}{b}$$

Equation II.12

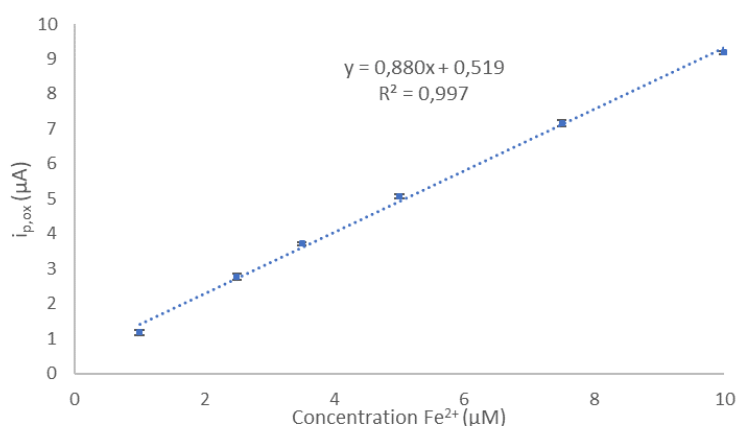
$$LOQ = \frac{10 S_a}{b}$$

Equation II.13

S_a : écart-type sur l'ordonnée à l'origine de la droite de régression

b : pente de la droite de régression

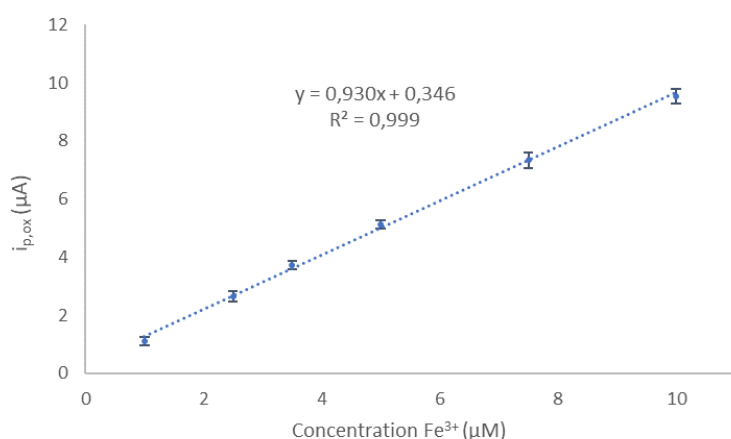
(a)



LOD	0,4 μM
LOQ	1,5 μM

$[Fe^{2+}]$ (μM)	RSD (%)
1	7%
2,5	3%
3,5	1%
5	1%
7,5	1%
10	1%

(b)



LOD	0,3 μM
LOQ	1,1 μM

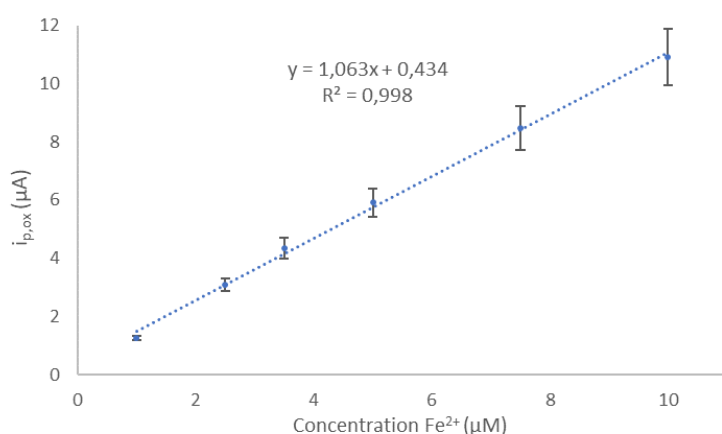
$[Fe^{3+}]$ (μM)	RSD (%)
1	13%
2,5	7%
3,5	4%
5	3%
7,5	4%
10	3%

Figure II.27. Droites d'étalonnage obtenues pour le dosage (a) des ions Fe^{2+} et (b) des ions Fe^{3+} après 3 séries de mesure par voltammétrie cyclique avec une électrode en CV/Nafion® plongée dans une solution de K_2SO_4 10 mM (pH 3,7) ; temps de préconcentration = 10 min ; $v = 50$ mV/s.

Que ce soit pour le dosage de Fe^{2+} ou de Fe^{3+} , les courbes d'étalonnage montrent une relation linéaire ($R^2 = 0,99$) entre l'intensité du courant du pic d'oxydation et la concentration des ions Fe^{2+} ou des ions Fe^{3+} réduits après 3 séries de mesures avec une même électrode en CV/Nafion®. De plus, les valeurs des écart types relatifs sont très faibles (< 10 % en majorité). Ces résultats démontrent la répétabilité satisfaisante des mesures du capteur.

La reproductibilité des mesures a aussi été testée en réalisant les mêmes étalonnages de Fe^{2+} et de Fe^{3+} en triplicata avec trois électrodes en CV/Nafion® différentes. Les courbes d'étalonnages issues de l'exploitation des voltammogrammes cycliques ainsi que les RSD sont présentées dans la **figure II.28**.

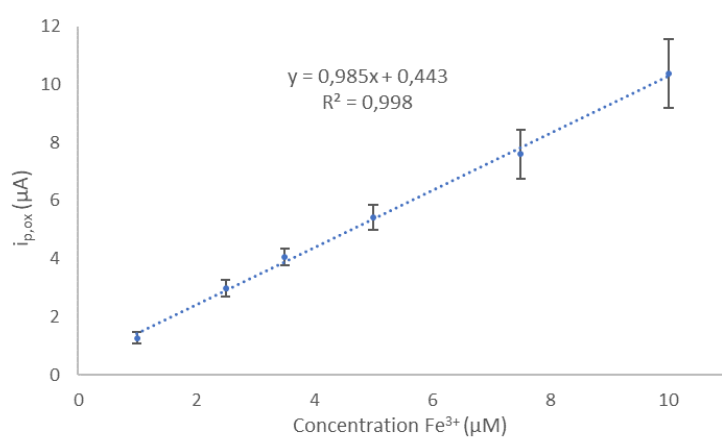
(a)



LOD	0,4 μM
LOQ	1,4 μM

$[\text{Fe}^{2+}]$ (μM)	RSD (%)
1	6%
2,5	7%
3,5	9%
5	8%
7,5	9%
10	9%

(b)



LOD	0,4 μM
LOQ	1,4 μM

$[\text{Fe}^{3+}]$ (μM)	RSD (%)
1	15%
2,5	10%
3,5	7%
5	8%
7,5	11%
10	11%

Figure II.28. Droites d'étalonnage obtenues pour le dosage (a) des ions Fe^{2+} et (b) des ions Fe^{3+} après 3 séries de mesure par voltammétrie cyclique avec 3 électrode en CV/Nafion® différentes plongées dans une solution de K_2SO_4 10 mM (pH 3,7); temps de préconcentration = 10 min ; $v = 50$ mV/s.

Les courbes d'étalonnage permettent de vérifier la linéarité ($R^2 = 0,99$) entre l'intensité du courant du pic d'oxydation et la concentration des ions Fe^{2+} ou des ions Fe^{3+} avec trois électrodes en CV/Nafion® différentes. Les écarts types sont cette fois-ci plus élevés, surtout pour des concentrations de Fe^{2+} ou Fe^{3+} supérieures à 5 μM . Cependant, conformément à l'exigence du cahier des charges, les écarts types relatifs sont inférieurs ou égaux à 15 %. Nous pouvons donc estimer que la reproductibilité des mesures est satisfaisante.

L'exploitation des différentes droites par la méthode des moindres carrées a permis de déterminer des valeurs de LOD de Fe^{2+} et Fe^{3+} comprises entre 0,3 et 0,4 μM . Les valeurs de LOQ de Fe^{2+} et Fe^{3+} sont, elles, comprises entre 1,1 et 1,5 μM . Ces performances démontrent ainsi la capacité du capteur à détecter des concentrations de Fe^{2+} et de Fe^{3+} dans la gamme de concentration d'intérêt (de 2 à 10 μM). Les valeurs de LOD et LOQ doivent cependant être considérées avec circonspection puisqu'elles résultent d'une exploitation graphique. Une meilleure estimation de ces valeurs peut être obtenue par voie expérimentale.

La pente des droites d'étalonnage obtenues par l'étude de la reproductibilité a été utilisée pour déterminer la sensibilité du capteur. Elle est égale à 1,063 $\mu A/\mu M$ pour Fe^{2+} et à 0,985 $\mu A/\mu M$ pour Fe^{3+} . Le **tableau II.6** rassemble ces performances et les sensibilités d'électrodes fonctionnalisées par un film de Nafion® retrouvées dans la bibliographie, utilisées pour la détection du fer dans la gamme de concentrations d'intérêt.

Réf	Interface et forme(s) de fer détectée(s)	Sensibilité ($\mu A/\mu M$)
Présente étude	CV/Nafion® Détection directe Fe^{2+} et indirecte Fe^{3+}	1,063 (Fe^{2+}) 0,985 (Fe^{3+})
[186]	CV/Nano-TiC/Nafion® Détection Fe^{3+}	0,93
[193]	Pt nanostructuré/Nafion® Détection Fe^{3+}	0,018
[185]	CV/IL-rGO/AuNDs/Nafion® Détection Fe^{3+}	0,39

Tableau II.6. Tableau comparatif des sensibilités d'électrodes fonctionnalisées par un film de Nafion®.

Nano-TiC : nanoparticules de carbure de titane

Pt-nanostructuré : platine nanostructuré

IL-rGO : liquide ionique/oxyde de graphène réduit

AuNDs : nanodendrites d'or

La comparaison des différentes interfaces montre que le capteur mis au point possède une plus forte sensibilité que les trois autres capteurs mentionnés, qui en outre ont des interfaces plus élaborées ou complexes. Cela démontre qu'une fonctionnalisation par le Nafion® uniquement permet d'atteindre des niveaux de sensibilité élevés.

VI.2 Exactitude

Afin de pouvoir utiliser le capteur en milieu réel, il est essentiel que celui-ci puisse déterminer les teneurs exactes en ions Fe(II) et Fe(III) et ce, rapidement. Ainsi, une étude préliminaire a été réalisée pour évaluer la justesse du capteur.

Une solution synthétique a été préparée avec la solution électrolytique de K_2SO_4 10 mM (pH 3,7) contenant un mélange équimolaire de de Fe(II) et de Fe(III) à la concentration de 3 μM (6 μM en fer total). Le dosage de ces deux espèces a ensuite été réalisé par ajouts dosés avec l'électrode CV/Nafion® en utilisant la procédure établie précédemment.

VI.2.1 Détermination de la concentration en Fe(II)

La solution analytique a été analysée directement avec l'électrode en CV/Nafion® par voltammétrie cyclique suivi de trois ajouts d'ions Fe^{2+} à la concentration de 1 μM . La **figure II.29** représente l'évolution du courant de pic avec les trois ajouts.

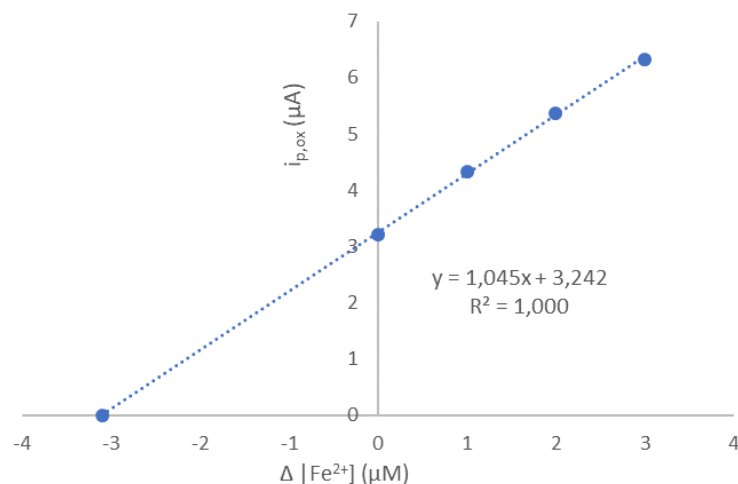


Figure II.29. Variation du courant de pic d'oxydation des ions Fe^{2+} en fonction des ajouts. Voltammétrie cyclique tracée avec l'électrode en CV/Nafion[®] plongée dans une solution de K_2SO_4 10 mM (pH 3,7) contenant des concentrations croissantes d'ions Fe^{2+} ; temps de préconcentration = 10 min ; $v = 50$ mV/s.

L'exploitation de l'équation de la droite permet de trouver une concentration en Fe(II) égale à 3,1 μM pour une concentration exacte de 3 μM . Le taux de récupération est donc égal à 103 %.

VI.2.2 Détermination de la concentration en Fe(III)

Le dosage de Fe(III) ne peut pas être réalisé directement car, au pH de la solution (pH = 3,7), la majorité du Fe(III) n'est pas sous forme ionique libre (voir **tableau II.3**). Aussi le protocole suivant a été adopté : la solution est acidifiée à un pH inférieur à 2 permettant à la totalité de Fe(III) d'être sous forme d'ions Fe^{3+} . L'hydroxylamine est ensuite ajoutée en excès à une concentration de 0,5 mM, réduisant la totalité des ions Fe^{3+} en Fe^{2+} avant que le pH de la solution soit ramené à 3,7. L'échantillon ne contenant plus que des ions Fe^{2+} , le dosage permet d'atteindre la concentration totale en fer total. Le protocole de détection par ajouts dosés décrit précédemment a ensuite été suivi avec trois ajouts d'ions Fe^{2+} à la concentration de 1,5 μM . La **figure II.30** représente la courbe obtenue à l'issue des trois ajouts.

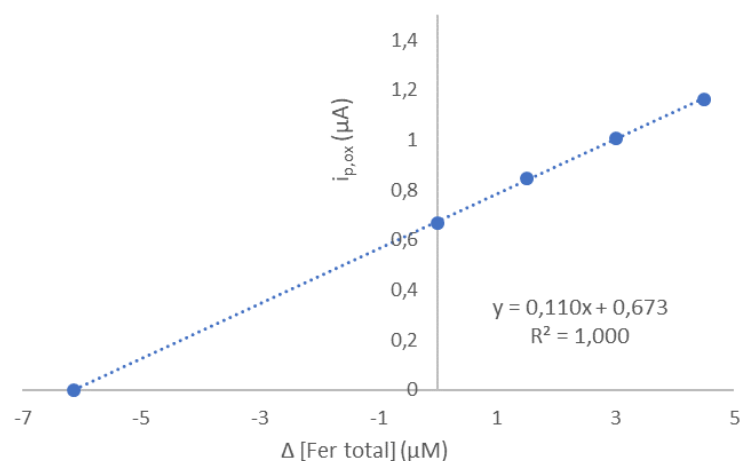


Figure II.30. Variation du courant de pic d'oxydation des ions Fe^{2+} en fonction des ajouts. Voltammétrie cyclique tracée avec l'électrode en CV/Nafion[®] plongée dans une solution de K_2SO_4 10 mM (pH 3,7) contenant des concentrations croissantes d'ions Fe^{2+} ; temps de préconcentration = 10 min ; $v = 50$ mV/s.

L'exploitation de l'équation de la droite permet de trouver une concentration de fer total égale à 6,1 μM . La concentration en Fe(III) dans la solution analytique est obtenue par soustraction de la concentration en Fe(II) retrouvée dans la **partie IV.2.1**. Ainsi, une concentration de Fe(III) à 3 μM a été retrouvée correspondant à un taux de récupération de 100 %.

Ces taux de recouvrement de la concentration de Fe(II) et de Fe(III) (respectivement de 103 % et 100 %) démontrent l'exactitude très satisfaisante du capteur. Ainsi, ces résultats sont de bon augure pour le dosage du fer en milieu réel.

VI.3 Etude des interférents

L'objectif du capteur étant de doser le Fe(II) et le Fe(III) dans des eaux de TAR, il est nécessaire d'évaluer sa sélectivité en présence d'autres cations et anions susceptibles de se retrouver dans ce milieu. Une étude de l'effet de certains interférents a ainsi été réalisée pour estimer leur influence sur la réponse électrochimique de l'électrode en CV/Nafion[®] vis-à-vis de la détection du fer. Les cations et anions qui ont été testés sont : Mg^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} ,

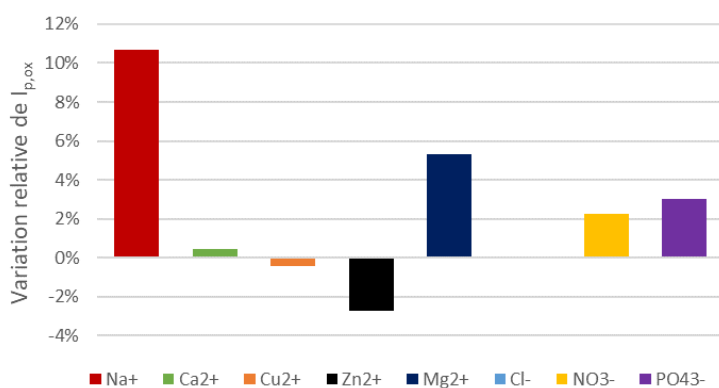
PO₄³⁻, NO₃⁻ et Cl⁻. Ces espèces sont généralement retrouvées dans les eaux de TAR et représentent les interférents potentiels majeurs selon une liste fournie par l'entreprise partenaire. A titre d'exemple, l'eau de TAR de l'Université Paul Sabatier (UPS), qui est gérée par Resonet, a été analysée par ICP-AES et chromatographie ionique afin de connaître les concentrations de ces éléments. Elles sont rapportées dans le **tableau II.7** à la concentration en fer total généralement présente, égale à 2,5 µM. On obtient ainsi des rapports de concentration globalement compris entre 1 et 100.

Interférant	Concentration (µM)	[Interférant]/[Fe]
Na ⁺	280	112
Ca ²⁺	< LOD	-
Cu total	8,9	3,6
Zn ²⁺	5,6	2,2
Mg ²⁺	49,6	19,8
Cl ⁻	158	63,2
NO ₃ ⁻	51,6	20,6
PO ₄ ³⁻	19	7,6

Tableau II.7. Concentration des espèces potentiellement interférentes présentes dans la TAR de l'UPS

La sélectivité du capteur a été évaluée en milieu synthétique en tenant compte de ces rapports de concentration : la réponse électrochimique de l'électrode en CV/Nafion® est mesurée dans la solution électrolytique contenant les ions Fe²⁺ à la concentration de 5 µM et en présence de chaque interférent à des concentrations de 5 µM (rapport 1:1), 50 µM (10:1) et 500 µM (100:1). La **figure II.31** rassemblent les résultats obtenus sous forme de variation relative du pic d'oxydation de Fe²⁺ par l'ajout de chaque interférent. Une variation de ±10 % a été définie comme étant non significative conformément au cahier des charges de l'industriel et à la bibliographie^[187,189].

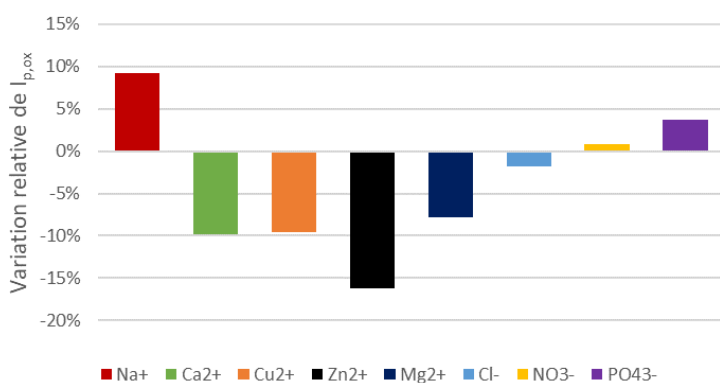
(a)



[Fe²⁺] = 5 μM

[Interfèrent] = 5 μM

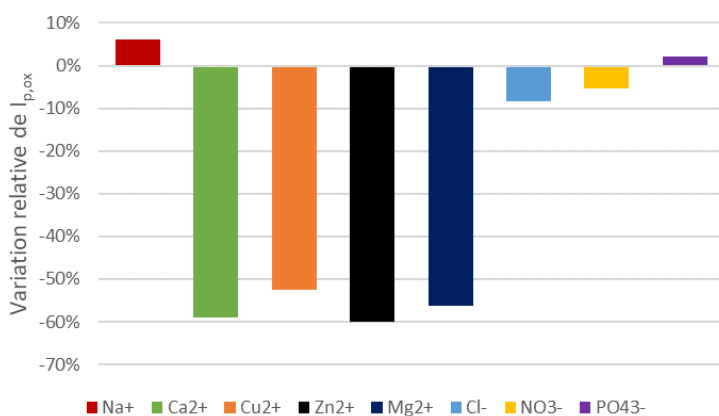
(b)



[Fe²⁺] = 5 μM

[Interfèrent] = 50 μM

(c)



[Fe²⁺] = 5 μM

[Interfèrent] = 500 μM

Figure II.31. Influence de la présence des espèces interférentes potentielles sur le pic d'oxydation des ions Fe²⁺ à 5 μM obtenu par voltammétrie cyclique avec l'électrode en CV/Nafion®. Concentration des interférents (a) 5 μM, (b) 50 μM et (c) 500 μM ; temps de préconcentration = 10 min ; v = 50 mV/s.

- **Cas 1 :** $\frac{[\text{Interférénts}]}{[\text{Fe}^{2+}]} = 1$

Pour des concentrations équimolaires d'interférénts et d'espèce cible, seul l'ion Na^+ a causé une variation jugée significative du pic d'oxydation de Fe^{2+} (+11 %). Cette valeur étant proche de la limite de tolérance, l'effet du Na^+ est estimé négligeable.

- **Cas 2 :** $\frac{[\text{Interférénts}]}{[\text{Fe}^{2+}]} = 10$

L'ion Zn^{2+} est le seul interférent qui a eu une influence significative sur l'intensité du pic d'oxydation de Fe^{2+} , engendrant une baisse de 16 %. Les autres cations divalents (Ca^{2+} , Cu^{2+} et Mg^{2+}) induisent une baisse du signal de Fe^{2+} mais qui est restée dans la limite de tolérance (± 10 %). Il semble que les ions Zn^{2+} possèdent une meilleure affinité envers le Nafion® en diffusant plus rapidement au sein de la membrane comparativement aux autres ions divalents^[231,233] et ainsi accentuant leur pouvoir interférent vis-à-vis de la détection de Fe^{2+} ^[186,194].

- **Cas 3 :** $\frac{[\text{Interférénts}]}{[\text{Fe}^{2+}]} = 100$

Tous les cations divalents (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} et Mg^{2+}) induisent une baisse significative de l'intensité du pic d'oxydation de Fe^{2+} , comprise entre 53 % et 60 %. La variation la plus importante est à nouveau engendrée par les ions Zn^{2+} (-60 %). Ces chutes de la réponse du capteur vis-à-vis des ions Fe^{2+} ne sont pas surprenantes avec un tel rapport de concentration (100:1) : les échanges ioniques avec les sites actifs du Nafion® impliquent plus facilement les espèces en plus grande concentration. Il faut cependant noter que les ions Na^+ n'ont comparativement pas engendré de variation significative de la réponse du capteur. En effet, les cations avec un nombre d'oxydation élevé interagissent avec le réseau polymérique du Nafion® plus fortement que les cations au nombre d'oxydation moins élevé en échangeant de préférence avec les sites sulfoniques ^[234]. Les anions, en revanche, n'ont en aucun cas induit de variation significative du courant d'oxydation de Fe^{2+} car la charge négative du Nafion® engendre une répulsion électrostatique. Un phénomène similaire a d'ailleurs été observé avec le complexe $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ dans la **partie III.4.3.1**.

Des expériences analogues ont été réalisées en présence d'un excès d'hydroxylamine à 0,5 mM afin d'évaluer la sélectivité du capteur lors de la détermination de la concentration en Fe(III) via le dosage du fer total. Les résultats obtenus ont montré des tendances similaires à celles obtenues en absence d'hydroxylamine pour les trois rapports de concentration étudiés.

VII. Conclusion

Dans ce chapitre, un capteur ampérométrique utilisant une électrode en carbone vitreux recouverte d'un film de Nafion® a été élaboré pour la détection de Fe²⁺ et Fe³⁺ à des concentrations micromolaires dans des milieux aqueux synthétiques.

En premier lieu, l'importance d'une fonctionnalisation de l'électrode a été démontrée par l'absence de pic d'oxydation de Fe²⁺ à des concentrations micromolaires avec une électrode non modifiée et en utilisant deux électrolytes support différents.

Ensuite, la surface de l'électrode a été modifiée par *drop casting* d'une couche d'un échangeur cationique, le Nafion®, caractérisée par trois méthodes : par FTIR, par profilométrie optique et par voltammétrie cyclique à l'aide de deux sondes redox. Le spectre FTIR a permis de confirmer la présence du Nafion® à la surface alors que le profilomètre optique a montré que le diamètre et l'épaisseur des dépôts sont relativement reproductibles d'une électrode à l'autre. L'absence de signal de l'électrode modifiée au contact du couple redox Fe(CN)₆^{3-/4-} a confirmé que le Nafion® est bien une membrane chargée négativement. Le tracé de voltammogrammes cycliques avec la sonde redox Ru(NH₃)₆^{2+/3+} a permis de vérifier le caractère échangeur cationique du Nafion® et son effet favorable sur la sensibilité de l'électrode avec l'augmentation des intensités des pics de plus de 50 % en comparaison des pics obtenus avec une électrode en CV non modifiée.

Un protocole de détection des ions Fe²⁺ a ensuite été mis en place. Il utilise la voltammétrie couplée à un temps de préconcentration à courant nul préalable à la détection. Les conditions de mesures ont été déterminées pas à pas ; elles sont résumées dans le **tableau II.8**.

Electrolyte support et pH	10 mM de K ₂ SO ₄ à pH 3,7
Concentration de la solution de Nafion® déposée	5 % w/w
Temps de préconcentration	10 min

Tableau II.8. Paramètres optimaux pour la détection électrochimique des ions Fe²⁺ avec une électrode en CV/Nafion®.

Le dosage de Fe²⁺ à des concentrations micromolaires a ensuite été mené. Une relation linéaire entre l'intensité du pic d'oxydation et la concentration de Fe²⁺ a été obtenue. Le dosage de Fe³⁺ a nécessité sa réduction préalable en Fe²⁺, par addition d'un excès d'hydroxylamine, car le Fe(III) n'est pas sous forme ionique libre dans les conditions de mesure adoptées. Ainsi, la détection de Fe³⁺ est réalisée indirectement via la détection de Fe²⁺, une relation linéaire entre l'intensité du pic d'oxydation et la concentration de Fe³⁺ ayant également été obtenue.

Les phénomènes ayant lieu lors de la détection de Fe²⁺, ont été plus finement étudiés. Premièrement, il a été démontré que la présence des ions Fe²⁺ dans la solution électrolytique n'est pas utile après l'étape de préconcentration car les ions ferreux en solution ne contribuent pas à l'intensité des pics d'oxydation observés. Ensuite, l'étude du mécanisme de la réaction redox a mis en évidence que le phénomène de diffusion dans le film de Nafion® contribue toujours à la vitesse de la réaction. Il est d'autant plus important lorsque la vitesse de balayage augmente. Finalement, le coefficient de diffusion de Fe²⁺ dans la couche de Nafion® (D_{app}) a été déterminé par la voltammétrie sur électrode tournante et une valeur égale à $3,2 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ a été obtenue.

Les performances analytiques du capteur ont été évaluées. Le capteur présente une répétabilité et reproductibilité satisfaisantes ($RSD \leq 15\%$) pour le dosage de Fe²⁺ et Fe³⁺ dans la gamme de concentrations d'intérêt (2 à 10 μM). Des valeurs de LOD et LOQ comprises entre 0,3 et 0,4 μM et 1,1 et 1,5 μM ont été déduites pour Fe²⁺ et Fe³⁺ respectivement. La sensibilité du capteur est de 1,063 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ pour le dosage de Fe²⁺ et de 0,985 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ pour le dosage de Fe³⁺. La justesse du capteur a aussi été évaluée : des taux de récupération de 100 % et 103 % ont été obtenus pour le dosage de Fe(II) et de Fe(III) respectivement. Enfin, une étude d'interférents potentiels a été réalisée avec des cations et anions souvent présents dans les eaux de TAR. A des concentrations équimolaires ou dix fois plus élevées que les ions Fe²⁺, l'influence des interférents est négligeable sur la réponse du capteur (sauf pour Zn²⁺ à une

concentration 10 fois supérieures à celle de Fe^{2+}). Pour des concentrations cent fois plus élevées, seuls les cations divalents tels que le Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} et Zn^{2+} ont causé une baisse significative du signal du pic d'oxydation de Fe^{2+} .

Le capteur ampérométrique ainsi élaboré peut être éprouvé dans des milieux réels pour la détermination des concentrations en Fe(II) et Fe(III) à des concentrations de 2 à 10 μM .

Chapitre III

Fer et formation de biofilm par

Legionella pneumophila

Au cours de chapitre, l'impact du Fe(II) et du Fe(III) sur la formation de biofilms mono-espèces à *Lp* en milieu liquide sera étudié. Dans un premier temps, un modèle de production de biofilm à *Lp* sera choisi et validé. Ensuite, les composants du milieu de culture liquide utilisé seront modifiés pour pouvoir évaluer l'influence du Fe(II) et Fe(III) le plus précisément et spécifiquement possible.

Quatre conditions majeures impliquant la présence du fer et/ou de la cystéine seront étudiées. L'analyse des biofilms formés pour chaque condition testée sera faite par numération des unités formant colonies (UFC), par quantification des unités génomes (UG) par réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR) et par microscopie confocale à balayage laser (MCBL). Le suivi de la concentration en fer dans le milieu de culture sans bactéries sera également réalisé avec le capteur électrochimique mis au point dans le chapitre II. Les résultats obtenus à partir des quatre conditions conduiront à d'autres analyses de biofilms en présence de Fe(II) et/ou Fe(III) par numération des UFC et par qPCR afin de mieux cerner l'influence des deux degrés d'oxydation du fer.

I. Réactifs et appareillage

I.1 Produits chimiques

Toutes les solutions et les milieux de culture mentionnés dans ce chapitre ont été préparés avec de l'eau ultra pure (Milli-Q, Millipore, 18,2 MΩ.cm) et de l'eau doublement distillée, respectivement. Ci-dessous sont précisés les différents composés utilisés lors des expériences :

- 1,10-phénanthroline monohydratée ($C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$) : *ACS reagent, ≥99 % ; Sigma-Aldrich*
- Acétate de sodium (CH_3COONa) : *ACS reagent, +99 % ; Aldrich*
- Acide acétique glacial (CH_3COOH) : *Laboratory reagent grade, ≥99 % ; Fisher Scientific*
- Acides casamino : *Vitamin assay ; Difco*
- Acide chlorhydrique (HCl) : *ACS reagent, ≥37 % ; Honeywell Fluka*
- Chlorhydrate d'hydroxylamine ($NH_2OH \cdot HCl$) : *AnalaR NORMAPUR®, ≥99 % ; VWR Chemicals*
- Chlorure de fer(III) hexahydraté ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) : *99 % for analysis ; Acros Organics*

- D-Lactose monohydraté : *ACS reagent ; Sigma*
- Extrait de levure : *Bacto™, Technical ; BD*
- Gélose trypticase soja (TSA) : *NutriSelect® Plus, Sigma-Aldrich*
- Hydroxyde de potassium (KOH) : *Pur en pastilles ; Prolabo*
- Iodure de propidium (IP) : *Invitrogen™*
- L-Cystéine chlorhydrate monohydraté : *Reagent grade, ≥98 %, Sigma-Aldrich*
- Nafion® : *D-520 dispersion, 5% w/w in water and 1-propanol ; Alfa Aesar*
- Dihydrogénophosphate de potassium (KH₂PO₄) : *ReagentPlus®, ≥99 % ; Sigma-Aldrich*
- Hydrogénophosphate de disodium (Na₂HPO₄) : *ReagentPlus®, ≥99 % ; Sigma-Aldrich*
- Pyrophosphate de fer(III) (Fe₄(P₂O₇)₃) : *Iron content, 10.5 – 12.5 % ; Aldrich*
- Sulfate de fer(II) heptahydraté (FeSO₄ · 7H₂O) : *ACS reagent, +99 % ; Acros Organics*
- Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO₄ · 7H₂O) : *ReagentPlus®, ≥ 99 % ; Sigma-Aldrich*
- Sulfate de potassium (K₂SO₄) : *ReagentPlus®, ≥ 99 % ; Sigma-Aldrich*
- Syto™ 9 : *Invitrogen™*

Les solutions diamantées et les tapis de polissage utilisés pour le polissage des électrodes proviennent de chez *Presi*.

I.2 Appareillage

Les expériences électrochimiques mentionnées dans ce chapitre ont été réalisées à l'aide d'un montage classique à trois électrodes comprenant :

4. L'électrode de travail : électrode en CV/Nafion®- un embout en carbone vitreux (CV) *Radiometer* de 3 mm de diamètre - recouvert de 3 µL d'une solution de Nafion® à 5 % (voir **Chapitre II**).
5. L'électrode de référence : une électrode au calomel saturée (ECS) *Radiometer* séparée de la solution par une allonge de protection munie d'un embout en verre fritté.
6. La contre électrode : un fil de platine de chez *Orignalys*.

L'ensemble des électrodes est relié à un potentiostat (*Metrohm Autolab - PGSTAT 128N*) piloté par le logiciel *NOVA 2.1* via un ordinateur.

Les essais microbiologiques ont été réalisés sous une hotte à flux laminaire II avec utilisation de matériel stérile à usage unique lorsque cela est possible.

Pour la quantification de l'ADN dans les échantillons par qPCR, le thermocycleur *iCycler (Bio-Rad)* avec le module optique *MyiQ Optical (Bio-Rad)* ont été utilisés.

La pureté et la quantité d'ADN extrait ont été mesurées à l'aide du spectrophotomètre pour microplaques *Multiskan™ GO (Thermo Scientific)*.

L'analyse de la structure tridimensionnelle des biofilms a été réalisée par microscopie confocale *spinning disk (Perkin Elmer)* à la plateforme d'imagerie de la Fédération de Recherche Agrobiosciences, Interactions et Biodiversité (FR AIB) située à Castanet-Tolosan. Le microscope est équipé d'un scanner laser (*Yokogawa CSU-X1*). L'objectif utilisé est un objectif x60 à immersion d'eau (*Nikon Fluor 60x/1 W*). L'acquisition simultanée de deux fluorochromes (Syto™ 9 et IP) a été réalisée sur deux caméras *electron multiplying charge coupled device (EMCCD -Hamamatsu C9100-13)*.

Les analyses de référence pour la détermination de la concentration en fer dans les milieux de culture ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre ICP-AES *Ultima 2 (Horiba)* et d'un spectrophotomètre UV-visible *Lambda 365 (Perkin Elmer)*.

II. Méthodes employées

II.1 Détection électrochimique

Pour le dosage du Fe(II) et du fer total dans les solutions synthétiques et les milieux de culture, la voltammétrie cyclique a été employée, avec une étape de préconcentration, à courant nul pendant 10 min en utilisant une électrode en CV/Nafion® (voir **chapitre II partie IV.1**). L'électrolyte support utilisé est K₂SO₄ à 10 mM (pH 3,7) et la vitesse de balayage est de 50 mV/s.

II.2 Dénombrement des cellules du biofilm

II.2.1 Par numération des UFC

Cinq dilutions successives au 1/10^{ème} ont été réalisées dans l'eau distillée stérile (EDS) à partir de la suspension obtenue après récupération des cellules adhérentes (voir **partie III.3**). 100 µL

d'échantillon et des dilutions successives ont été étalés sur milieu gélosé Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE, *bioMérieux*). Après 5 jours d'incubation à 37 °C, en aérobiose, le nombre de colonies a été déterminé. Celui-ci correspond au nombre initial de bactéries viables et cultivables présentes dans l'échantillon. La concentration bactérienne peut être calculée selon l'équation III.1.

$$C = \frac{N}{V \times F}$$

Equation III.1. Calcul de la concentration de bactéries viables et cultivables (UFC/mL de liquide de récupération).

C : concentration de bactéries viables et cultivables (UFC.mL⁻¹)

N : nombre de colonies (UFC) pour la dilution prise en compte (< 200 UFC)

V : volume d'échantillonensemencé (mL)

F : facteur de dilution pris en compte

Au cours de notre étude, les valeurs de la concentration des bactéries viables et cultivables sont converties en logarithme décimal d'UFC/cm² en prenant en compte le volume de la suspension contenant les cellules adhérees (2 mL) et la surface du puits (9,6 cm²). La LOD est de 0,32 log UFC/cm².

II.2.2 Par qPCR

Les analyses par qPCR ont permis de quantifier l'ADN présent (correspondant au nombre total de cellules viables-cultivables, viables-non cultivables et éventuellement non viables) dans la suspension obtenue après récupération des cellules adhérees.

L'extraction de l'ADN issu des cellules bactériennes du biofilm a été réalisée en utilisant le kit d'extraction *QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen)* en suivant les recommandations du fournisseur. A la fin de l'extraction, l'ADN a été récupéré dans 200 µL de tampon d'élution et stocké à -20 °C.

Au cours de notre étude, le kit commercial de qPCR, iQ SYBR® Green Supermix (*Bio-Rad*) a été utilisé. Les amorces utilisées sont LEG427F (5'-GTAAAGCACTTTCAGTGGGGAG-3') et LEG880R (5'-GGTCAACTTATCGCGTTTGCT-3')^[87]. Elles sont livrées par *Merck* et doivent être reconstituées à 100 µM par ajout d'eau ultra-pure (qualité biologie moléculaire, *Sigma*).

Le principe de la qPCR repose sur la mesure de l'amplification d'une région d'ADN ciblée tout au long de la réaction grâce à un fluorochrome.

La qPCR se déroule en 3 grandes étapes :

1. La dénaturation thermique à 95°C (3 min) de l'ADN double brins en ADN simple brin.
2. L'amplification en 40 cycles. Chaque cycle comporte une étape de dénaturation à 95 °C (15 s), une étape d'hybridation des amorces à 63,5 °C (30 s) et une étape d'élongation à 72 °C (30 s) durant laquelle l'enzyme Taq polymérase catalyse la synthèse des brins d'ADN complémentaires.
3. La réalisation de la courbe de fusion partant de 55 à 95 °C (10 min) permettant la vérification de la spécificité des produits amplifiés (amplicons).

Pour la quantification de l'ADN, la molécule SYBR Green est utilisée. Elle a la capacité de s'intercaler entre deux brins d'ADN et émettre une fluorescence à 520 nm. L'intensité de cette fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN nouvellement amplifiée. Moins il y a d'ADN dans l'échantillon de départ, plus il faudra de cycles pour atteindre un niveau de fluorescence supérieur au bruit de fond. Ce niveau est appelé le cycle seuil (Ct) et est donc spécifique à la quantité d'ADN initialement présente dans l'échantillon.

Les mix comportant l'ensemble des réactifs nécessaires à la réaction ont été préparés dans une microplaque 96 puits, selon les indications du **tableau III.1**. Chaque échantillon a été testé en triplicata. Des puits contenant le témoin négatif de PCR et d'extraction ont été réalisés en duplicata pour s'assurer de l'absence de contamination par un ADN exogène. Un témoin positif contenant l'ADN de l'échantillon et de l'ADN de quantité connue a aussi été analysé pour valider la non détection sur certains échantillons.

Composants	Volume (μL)
Echantillon d'ADN	5
IQ SYBR® Green Supermix	12,5
Amorce Forward (LEG427F)	0,5
Amorce Reverse (LEG880R)	0,5
Eau ultra-pure (qualité biologie moléculaire)	6,5

Tableau III.1. Mix préparé dans chaque puits pour la qPCR

- **Réalisation de la gamme étalon**

Afin de quantifier l'ADN en Unités Génomes par μL (UG/ μL), une gamme étalon a été établie à partir de l'ADN pur de *L. pneumophila subsp. pneumophila* Philadelphia-1 (ATCC 33152, American Type Culture Collection), dont la taille du génome est connue ($3,4 \cdot 10^6$ pb). L'ADN a été extrait d'une culture bactérienne et quantifié par spectrophotométrie. Une gamme étalon avec cinq concentrations d'ADN ($2,5 \cdot 10^1$, $2,5 \cdot 10^2$, $2,5 \cdot 10^3$, $2,5 \cdot 10^4$ et $2,5 \cdot 10^5$ UG/ μL) a été ensuite préparée. Ainsi, le Ct pour chaque point de la gamme étalon a pu être corrélé à une concentration d'ADN et une courbe d'étalonnage reliant les Ct à une concentration d'ADN a été construite.

La concentration obtenue en UG/ μL a été convertie en logarithme d'UG/ cm^2 au cours de notre étude en prenant en compte le volume de la suspension contenant les cellules adhérentes (2 mL) et la surface du puits ($9,6 \text{ cm}^2$). La LOD dépend de la courbe d'étalonnage de chaque essai réalisé en qPCR et se situe généralement en-dessous de $3 \log \text{UG}/\text{cm}^2$.

II.3 Microscopie confocale à balayage laser (MCBL)

La microscopie confocale est une technique de microscopie permettant de visualiser des coupes très fines d'un biofilm tout en distinguant son altitude dans l'axe de visée. Des images tridimensionnelles en haute résolution sont ainsi obtenues.

Les échantillons sont marqués à l'aide de fluorochromes. La source lumineuse est un laser qui balaye point par point l'échantillon selon l'abscisse et l'ordonnée. Le plateau contenant

l'échantillon est ensuite déplacé selon l'axe z et le balayage recommence. La fluorescence résultante est détectée à travers des petites ouvertures appelées *pinholes*. Les différentes coupes sont traitées informatiquement pour obtenir la structure tridimensionnelle de l'échantillon.

Au cours de notre étude, l'observation au microscope confocal a été faite directement dans les puits contenant les biofilms. Un double marquage fluorescent avec du Syto™ 9 et de l'iodure de propidium (IP) a été réalisé en ajoutant 0,5 µL de chaque marqueur dans les puits contenant les biofilms. Le Syto™ 9 peut diffuser à travers les membranes des cellules vivantes et mortes pour se lier aux acides nucléiques et émettre une fluorescence verte. Les longueurs d'ondes d'excitation et de détection sont respectivement de 488 nm et entre 500 et 550 nm. L'IP ne peut pénétrer que dans les cellules dont les membranes sont endommagées (dont une majorité de cellules mortes), se lier aux acides nucléiques et émettre un signal fluorescent rouge. Les longueurs d'ondes d'excitation et de détection sont respectivement de 561 nm et entre 580 et 655 nm.

Lors du double marquage, les cellules viables cultivables et non-cultivables apparaissent colorées en vert alors que les cellules avec membrane endommagée (majoritairement des cellules mortes) apparaissent en rouge comme le montre la **figure III.1**. En effet, l'IP déplace le Syto 9 car il possède une meilleure affinité pour se lier à l'ADN.

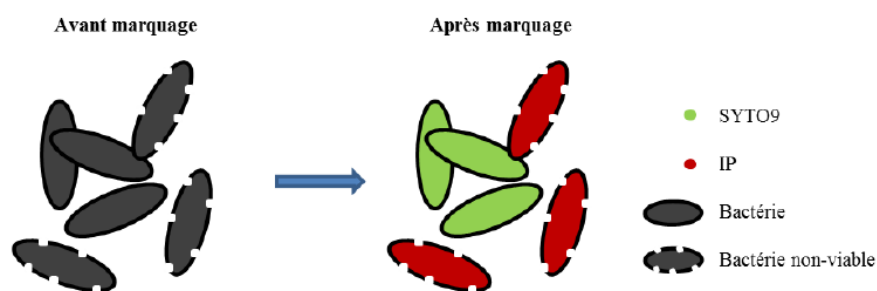


Figure III.1. Coloration des cellules à la suite du double marquage Syto® 9 et IP^[235].

Les images obtenues ont fait l'objet d'analyses qualitatives par le logiciel ImageJ (*Wayne Rasband, NIH*). L'extension *Volume Viewer* a été utilisée pour obtenir les reconstitutions volumiques des biofilms.

Lors de cette étude, la microscopie confocale a été essentiellement utilisée pour confirmer l'état viable/endommagé-mort des cellules. Trois acquisitions ont été réalisées pour chaque biofilm pour s'assurer de la reproductibilité des images.

II.4 Analyses statistiques

En ce qui concerne les dénombrements d'UFC/cm² et d'UG/cm², trois essais indépendants (n = 3) en triplicata (x3) ont été réalisés pour la plupart des expérimentations. Lorsque cela n'a pas été le cas, des précisions ont été apportées dans le texte et dans les légendes. En raison du contexte sanitaire lié à la COVID-19, des problèmes d'approvisionnement en gélose BCYE ont parfois conduit à la limitation des tests de dénombrement d'UFC.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type (n = 3). Un test *t* de Student a été réalisé pour comparer les quantifications bactériennes par qPCR et/ou par numération des UFC en fonction du nombre d'essais réalisés, accompagné d'un test de normalité (test de Shapiro-Wilk). Des valeurs de *p* inférieures ou égales à 0,01 indiquent des résultats statistiquement différents.

III. Production du biofilm mono-espèce à *Lp* en conditions statiques

III.1 Souche bactérienne

Au cours de ce travail, l'ADN pur de la souche *L. pneumophila subsp. pneumophila* Philadelphia-1 a été utilisée pour établir la gamme d'étalon pour la qPCR. La souche *L. pneumophila* Lens (CIP 108286, Collection de l'Institut Pasteur) a été utilisée pour former les biofilms mono-espèces de *Lp*. Cette dernière a été isolée lors de l'épidémie de légionellose dans le Pas-de-Calais entre novembre 2003 et janvier 2004^[236] et transmise par l'équipe Pathogénèse des légionnelles du CIRI (Centre International de Recherche en Infectiologie)^[74]. La souche a été conservée à -80 °C dans une solution cryoprotectrice glycérolée à 15 %.

III.2 Milieux de culture

III.2.1 Milieux gélosés

Avant chaque essai, *Lp* Lens est mise en culture sur gélose BCYE, incubée à 37 °C, en aérobiose, pendant 5 jours. Pour favoriser la croissance du genre *Legionella*, ce milieu nutritif est supplémenté en pyrophosphate ferrique (PPF) (0,25 g/L) et chlorhydrate de cystéine (0,4 g/L).

Pour s'assurer de l'absence de contamination lors des étapes de formation de biofilms mono-espèces à *Lp*, 100 µL des milieux liquides contenant les biofilms sont étalés sur gélose Trypticase Soja (TSA). Ce milieu permet la croissance d'un grand nombre de bactéries non exigeantes et qui peuvent être à l'origine de contaminations lors des essais. Nous considérons qu'il n'y a pas de contamination lorsqu'il y a absence de colonie sur le milieu après 72 heures d'incubation à 37 °C, en aérobiose.

III.2.2 Milieux liquides

La production de biofilms mono-espèces à *Lp* en milieu liquide est réalisée dans le milieu *Supplemented Biofilm Broth* (SBB). Ce milieu peu nutritif, conçu au sein du laboratoire en 2010, est constitué d'une base correspondant au *Biofilm Broth* (BB)^[72] utilisé pour l'étude des biofilms de bactéries non exigeantes, à croissance rapide, supplémentée en PPF et L-cystéine, à des concentrations dix fois inférieures à celles présentes dans le milieu BCYE. Ce milieu favorise le développement de *Lp* en mode biofilm plutôt qu'en mode planctonique^[72,73]. De plus, de par sa nature appauvrie en nutriments, ce milieu se rapproche des eaux de TAR. La composition du milieu SBB est décrite dans le **tableau III.2**.

Composants	Concentration (g/L)	Concentration (mol/L)	Concentration en fer (mol/L)
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,0005	1,8.10 ⁻⁶	1,8.10 ⁻⁶
Na ₂ HPO ₄	1,25	8,8.10 ⁻³	-
KH ₂ PO ₄	0,5	3,7.10 ⁻³	-
Acides casamino	0,1	-	-
Lactose	0,025	7,3.10 ⁻⁵	-
Extrait de Levure	0,1	-	-
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2	8,1.10 ⁻⁴	-
Fe ₄ (P ₂ O ₇) ₃	0,025	3,4.10 ⁻⁵	5,4.10 ⁻⁵
L-Cystéine	0,04	2,3.10 ⁻⁴	-

Tableau III.2. Composition du milieu liquide SBB (pH= 7,2)^[72].

Afin de déterminer l'influence de certains composés sur la formation du biofilm à *Lp*, des versions modifiées du milieu SBB ont été utilisées au cours de ce chapitre, pour la production du biofilm à *Lp*. Le **tableau III.3** donne la composition des différents milieux SBB modifiés. Le fer peut être apporté sous différentes formes et à différentes concentrations (en rouge) et la cystéine peut être enlevée (en bleu) selon les essais.

Composants	Concentration (g/L)	Concentration (mol/L)	Concentration en fer (mol/L)
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,0005	1,8.10 ⁻⁶	1,8.10 ⁻⁶
Na ₂ HPO ₄	1,25	8,8.10 ⁻³	-
Fe ₄ (P ₂ O ₇) ₃	0,025	3,4.10 ⁻⁵	5,4.10 ⁻⁵
FeCl ₃ . 6H ₂ O	0,015	5,5.10 ⁻⁵	5,5.10 ⁻⁵
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,015	5,5.10 ⁻⁵	5,5.10 ⁻⁵
KH ₂ PO ₄	0,5	3,7.10 ⁻³	-
Acides casamino	0,1	-	-
Lactose	0,025	7,3.10 ⁻⁵	-
Extrait de Levure	0,1	-	-
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2	8,1.10 ⁻⁴	-
L-Cystéine	0,04	2,3.10 ⁻⁴	-

Tableau III.3. Compositions des différents milieux SBB modifiés adaptés (pH= 7,2).

III.3 Formation de biofilms

Pour générer des biofilms mono-espèces à *Lp*, un protocole mis en place précédemment au Laboratoire de Génie Chimique a été utilisé^[72,73]. Ils ont été produits dans des microplaques à fond plat de 6 puits stériles en polystyrène (*Falcon*). Le protocole de production de biofilms avec mention des différentes étapes est détaillé dans la **figure III.2**.

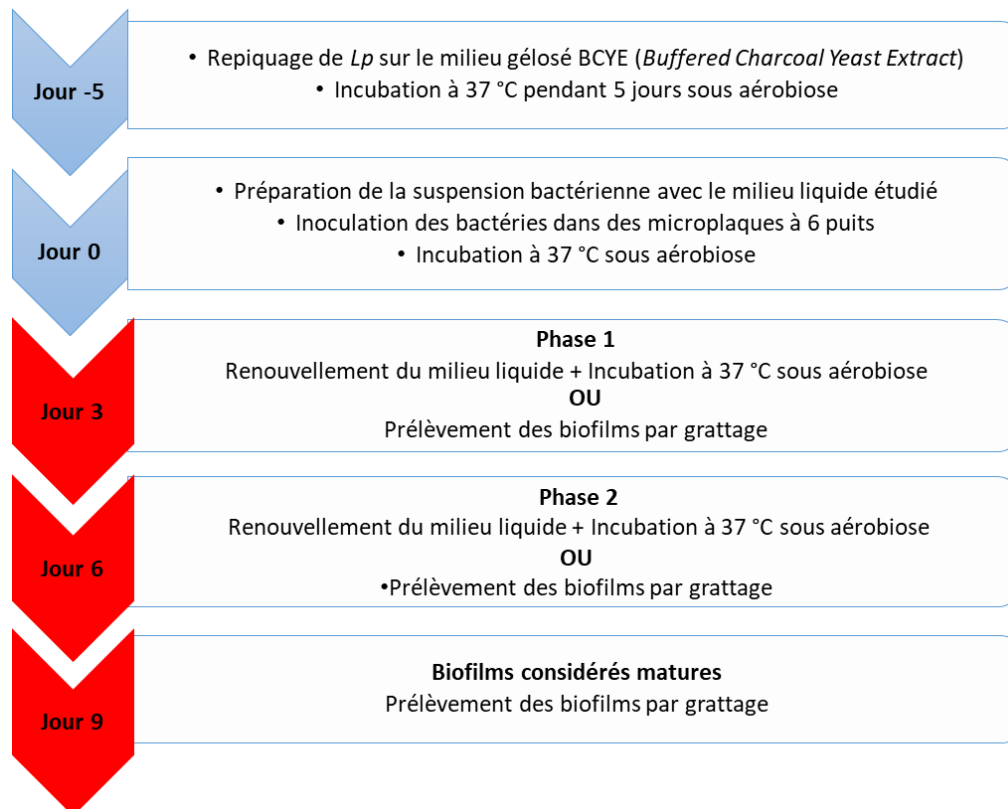


Figure III.2. Protocole simplifié de production de biofilms mono-espèces à *Lp*^[72,73].

A J -5, un repiquage sur BCYE est réalisé en prélevant un aliquot de la solution cryoprotectrice glycérolée conservée à -80°C contenant *Lp*. Le milieu est incubé à 37 °C, sous aérobiose, pendant 5 jours.

A J 0, et après contrôle de l'absence de contamination, quelques colonies isolées issues du repiquage sont prélevées à l'aide d'une oese et sont ensuite mises en suspension dans le milieu de culture liquide étudié, dans un tube à essai stérile. La transmission de la suspension est ajustée à 60 % (Densité optique à 600 nm = 0,22) afin d'obtenir une concentration bactérienne d'environ 10⁸ UFC/mL. Deux dilutions successives au 1/10^{ème} sont réalisées à

partir de la suspension, dans des tubes à essai stériles contenant le milieu de culture liquide, pour obtenir une concentration bactérienne d'environ 10^6 UFC/mL. Cette suspension à 10^6 UFC/mL est ensuite inoculée dans les puits de la microplaque pour un volume final de 6 mL/puits (concentration bactérienne = $6,25 \cdot 10^5$ UFC/cm²). La microplaque est ensuite incubée pendant une période de 3 à 9 jours à 37 °C, en condition aérobie, selon la phase de formation du biofilm à explorer.

Dans le cadre de ce protocole, nous avons défini J 9 comme correspondant à l'obtention d'un biofilm mature dans le milieu SBB standard^[72,73].

Si le temps d'incubation va au-delà de J 3, le milieu de culture liquide est renouvelé tous les 3 jours (à J 3 et/ou J 6), après 2 rinçages délicats avec de l'EDS, afin d'amener des nutriments, d'éliminer les produits issus du métabolisme ainsi que les bactéries planctoniques (non adhérentes ou relarguées à partir du biofilm) et favoriser ainsi la croissance du biofilm.

A J 3, J 6 et J 9, le biofilm peut être observé directement dans la microplaque par MCBL ou être prélevé pour dénombrer les bactéries du biofilm adhérentes au support par qPCR (voir **partie II.2.2**) ou par dénombrement des UFC sur gélose BCYE (**voir partie II.2.1**).

Pour le prélèvement du biofilm, après 2 rinçages successifs avec de l'EDS, 2 mL d'EDS sont ajoutés et les puits sont grattés avec une spatule de pesée à bout carré stérile pendant 1 min pour détacher les cellules du biofilm et désagréger les micro-colonies.

Après homogénéisation mécanique de la suspension ainsi obtenue durant 1 min (vortex), un mL de l'échantillon est utilisé pour la quantification des UG par qPCR et le mL restant est utilisé pour le dénombrement des UFC.

III.4 Validation du protocole de formation du biofilm à *Legionella pneumophila*

La méthode décrite ci-dessus a été testée pour contrôler l'obtention de biofilms à *Lp* en milieu SBB avec une concentration en fer total dans le milieu égale à 55 µM. Afin de confirmer la présence des biofilms, des observations en microscopie confocale (**Fig. III.3.(a)-(c)**) ont été réalisées à J 3, J 6 et J 9. Des quantifications de *Lp* sur gélose BCYE et par qPCR (**Fig. III.3.(d)**) ont aussi été effectués sur des biofilms matures à J 9.

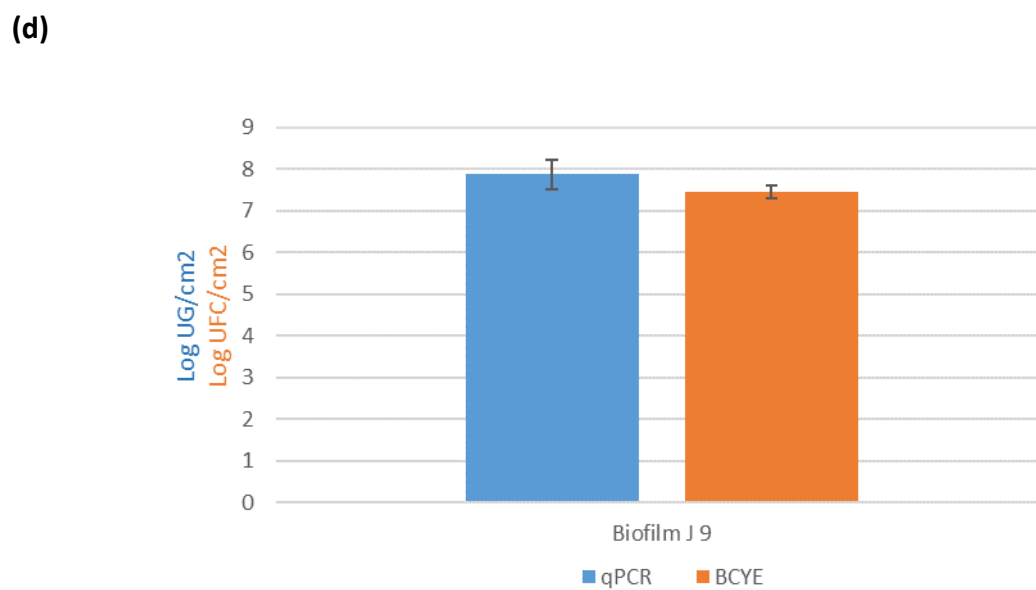
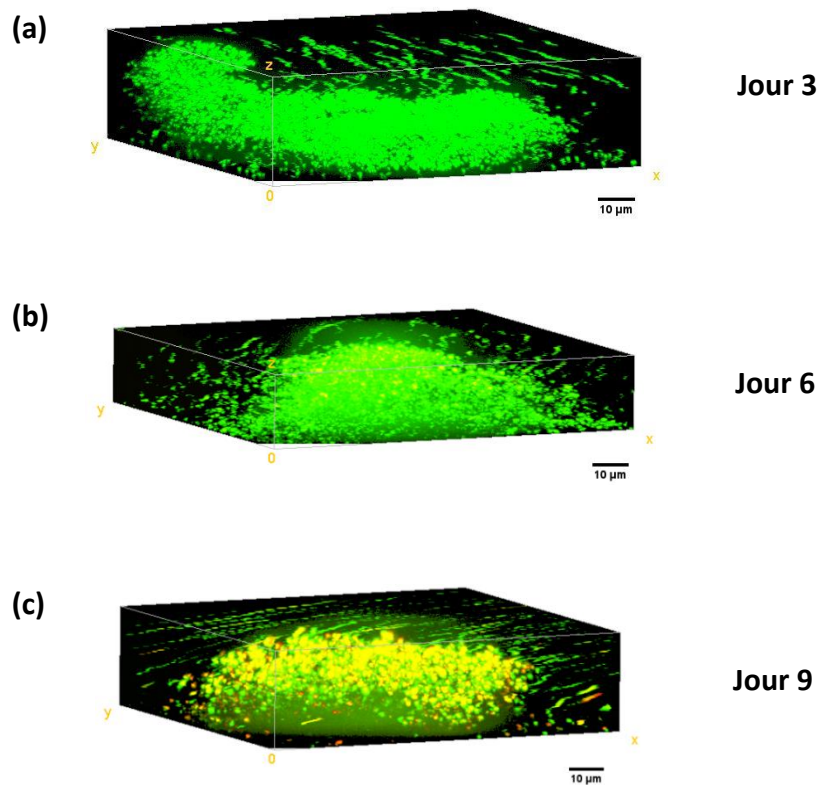


Figure III.3. (a) – (c) Images représentant des reconstitutions volumiques des biofilms à *Lp* observés par MCBL à J 3, J 6 et J 9 marqués au Syto® 9 et à l'IP. (d) Histogrammes représentant le dénombrement des bactéries du biofilm dans le milieu SBB par qPCR (en bleu) et sur gélose BCYE (en orange) à J 9. (n = 3x3, moyenne ± écart-type).

Les observations par MCBL à J 3, J 6 et J 9 démontrent la présence de biofilms à *Lp* dans le milieu SBB. A J 9, une épaisseur moyenne de 30 μm a été calculée à partir du biofilm observé. A J 3 et J 6, l'architecture du biofilm est majoritairement composée de cellules viables. A J 9, des cellules endommagées ou mortes sont détectées. Une différence non-significative ($p > 0,01$) est observée entre le dénombrement par qPCR ($7,87 \pm 0,27 \log \text{UG}/\text{cm}^2$) et sur gélose BCYE ($7,46 \pm 0,15 \log \text{UFC}/\text{cm}^2$), les bactéries présentant une membrane endommagée et observées à J 9 restant minoritaires (**Fig. III.3.(c et d)**). Ce modèle permet donc un apport de nutriments suffisant pour une croissance des bactéries adhérees sous forme biofilm et un maintien de ce biofilm jusqu'à J 9 avec une densité de cellules viables et cultivables supérieure à $7 \log/\text{cm}^2$.

Les observations et les résultats obtenus sont en accord avec ceux obtenus lors des travaux réalisés en 2010 au Laboratoire de Génie Chimique^[72,73] qui a consisté à la mise en place d'un milieu adapté à la culture *in vitro* de *Lp* en mode biofilm et en conditions statiques. Ainsi, ce modèle de production de biofilms mono-espèces à *Lp* avec le milieu SBB a été choisi en tant que témoin positif au cours de nos travaux.

IV. Impact du fer

Afin de pouvoir évaluer l'impact de la forme ionique du fer (Fe(II) ou Fe(III)) sur la formation du biofilm à *Lp*, il est important de s'assurer que le milieu de culture liquide contienne seulement l'une des deux formes. Par conséquent le choix de sels minéraux contenant du Fe(II) ou Fe(III) et des composants du milieu de culture est essentiel. De plus, étant donné que nos conditions de culture se déroulent en aérobiose, il s'avère difficile de maintenir le Fe(II) sous cette forme en raison de son oxydation spontanée.

Cette partie va détailler les essais réalisés sur des biofilms à *Lp* en présence ou non des 2 formes du fer ainsi que les observations résultantes.

IV.1 Le pyrophosphate ferrique

Dans la bibliographie, depuis une première utilisation en 1978^[12], le pyrophosphate ferrique (PPF) est devenu la source de fer et un supplément de croissance reconnu et est utilisée majoritairement dans les milieux pour la culture de *Lp*^[237-240].

Dans un premier temps, nous avons donc choisi le pyrophosphate ferrique en tant que source de Fe(III) dans notre milieu de culture. Cependant, étant donné que la formulation exacte du produit n'a pas été fournie par le fournisseur, une vérification de la composition en fer a été réalisée préalablement à son utilisation. Ainsi, des solutions de pyrophosphate ferrique ont été analysées à l'aide du capteur électrochimique à fer élaboré dans le **chapitre II**, ainsi que par spectrophotométrie en employant la méthode employant la 1,10-phénanthroline décrite dans la **partie III.1.2 du chapitre 1**.

Des voltammogrammes cycliques (**Fig. III.4**) ont été tracés, en oxydation d'abord, pour des concentrations de pyrophosphate ferrique comprises entre 1,6 μM et 4,7 μM dans l'électrolyte support K_2SO_4 , réalisées par des ajouts à partir d'une solution mère contenant 0,625 mM de pyrophosphate ferrique.

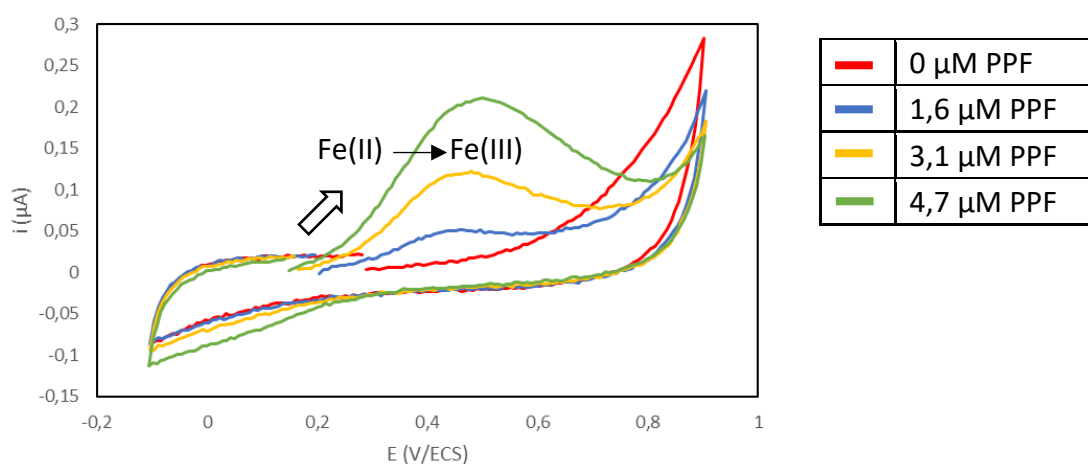


Figure III.4. Voltammogrammes cycliques tracés dans du K_2SO_4 (10 mM à pH 3,7) avec l'électrode en CV/Nafion® contenant des concentrations croissantes de PPF ; temps de préconcentration = 10 min ; $v = 50 \text{ mV/s}$.

Des pics d'oxydation de Fe(II) avec des intensités croissantes apparaissent vers 0,49 V/ECS sur les voltammogrammes cycliques, lors des ajouts successifs de pyrophosphate ferrique. Les résultats soulèvent l'hypothèse que le sel de pyrophosphate ferrique contient du Fe(II) en plus du Fe(III).

Pour confirmer cela, une analyse de 2 solutions de pyrophosphate ferrique provenant de 2 flacons différents a été réalisée par spectrophotométrie, en vue de déterminer la proportion de Fe(II) et Fe(III) dans le sel. Les résultats obtenus sont donnés dans le **tableau III.4**.

	Fe(II) (%)	Fe(III) (%)
Solution PPF 1	9,3	90,7
Solution PPF 2	8,0	92,0

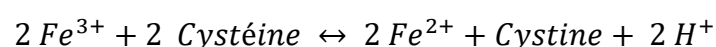
Tableau III.4. Proportions de Fe(II) et Fe(III) déterminées dans les sels de PPF suite à l'analyse spectrophotométrique.

Les résultats démontrent que les sels de pyrophosphate ferrique contiennent bien une petite quantité de Fe(II). Ainsi, le choix du pyrophosphate ferrique comme source de Fe(III) ne nous a pas paru adapté pour constituer un milieu de culture liquide ne contenant qu'une seule forme ionique du fer.

IV.2 Etude préliminaire de diverses conditions de culture en présence de fer

Afin d'évaluer l'influence de chaque forme ionique du fer sur la formation de biofilms mono-espèces à *Lp*, d'autres sources de Fe(II) et Fe(III) ont été choisies notamment FeSO₄ et FeCl₃, pour reconstituer le milieu de culture liquide. Le milieu de culture SBB a ainsi été modifié pour qu'il y ait présence d'une seule des deux sources de fer à la fois lors de différents essais. Par ailleurs, la concentration en fer dans le milieu a été initialement maintenue à 55 µM comme dans le milieu SBB de base.

Un composé présent dans le milieu SBB et susceptible d'avoir une influence sur la forme ionique du fer est la L-cystéine. En effet, cette dernière réduit le fer ferrique en fer ferreux selon la réaction d'oxydo-réduction spontanée suivante :



Equation III.2. Réaction de réduction de Fe³⁺ par la cystéine^[241].

Cependant, outre le pyrophosphate ferrique, la L-cystéine est aussi un supplément essentiel utilisé couramment dans les milieux de culture pour avoir une croissance optimale de *Lp*^[238,239,242]. Par conséquent, l'utilisation de L-cystéine a été conservée en présence du fer au cours de certains de nos essais à la même concentration (0,23 mM) que dans le milieu SBB.

Pour cette étude préliminaire, quatre conditions de formation de biofilms à *Lp* ont été étudiées. Elles sont listées dans le **tableau III.5**. La durée de production de biofilms sur 9 jours est adaptée car elle permet un temps suffisant pour l'étude de l'influence de chaque condition.

	Source de fer	Cystéine
Condition 1	FeCl ₃	Oui
Condition 2	FeSO ₄	Oui
Condition 3	FeCl ₃	Non
Condition 4	FeSO ₄	Non

Tableau III.5. Conditions de formation de biofilm à *Lp* testées.

Pour l'analyse des biofilms formés dans chaque condition testée, la quantification de *Lp* adhérentes obtenue par qPCR a été comparée à celle obtenue sur gélose BCYE, à J 9. La cinétique de croissance des biofilms a aussi été observée en microscopie confocale à J 3, J 6 et J 9 avec un double marquage fluorescent Syto® 9/IP.

Par ailleurs, le devenir du fer présent dans le milieu de culture liquide SBB modifié a été suivi pour chacune des quatre conditions, en absence de bactéries entre J 0 et J 3. Elle a été réalisée à l'aide du capteur électrochimique à fer élaboré dans le **chapitre II**. Il n'est pas nécessaire de suivre la cinétique au-delà de J 3 car le milieu de culture liquide est renouvelé et retourne alors à un état similaire à J 0.

La composition du milieu SBB modifié pour chacune des quatre conditions est donnée dans les tableaux ci-dessous :

Composants	Concentration (g/L)	Concentration (mol/L)	Concentration en fer (mol/L)
Na ₂ HPO ₄	1,25	8,8.10 ⁻³	
KH ₂ PO ₄	0,5	3,7.10 ⁻³	-
Acides casamino	0,1	-	-
Lactose	0,025	7,3.10 ⁻⁵	-
Extrait de Levure	0,1	-	-
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2	8,1.10 ⁻⁴	-
FeCl ₃ . 6H ₂ O	0,015	5,5.10 ⁻⁵	5,5.10 ⁻⁵
L-Cystéine	0,04	2,3.10 ⁻⁴	-

Tableau III.6. Composition du milieu SBB modifié pour la condition 1

Composants	Concentration (g/L)	Concentration (mol/L)	Concentration en fer (mol/L)
Na ₂ HPO ₄	1,25	8,8.10 ⁻³	
KH ₂ PO ₄	0,5	3,7.10 ⁻³	-
Acides casamino	0,1	-	-
Lactose	0,025	7,3.10 ⁻⁵	-
Extrait de Levure	0,1	-	-
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2	8,1.10 ⁻⁴	-
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,015	5,5.10 ⁻⁵	5,5.10 ⁻⁵
L-Cystéine	0,04	2,3.10 ⁻⁴	-

Tableau III.7. Composition du milieu SBB modifié pour la condition 2

Composants	Concentration (g/L)	Concentration (mol/L)	Concentration en fer (mol/L)
Na ₂ HPO ₄	1,25	8,8.10 ⁻³	
KH ₂ PO ₄	0,5	3,7.10 ⁻³	-
Acides casamino	0,1	-	-
Lactose	0,025	7,3.10 ⁻⁵	-
Extrait de Levure	0,1	-	-
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2	8,1.10 ⁻⁴	-
FeCl ₃ . 6H ₂ O	0,015	5,5.10 ⁻⁵	5,5.10 ⁻⁵

Tableau III.8. Composition du milieu SBB modifié pour la condition 3

Composants	Concentration (g/L)	Concentration (mol/L)	Concentration en fer (mol/L)
Na ₂ HPO ₄	1,25	8,8.10 ⁻³	
KH ₂ PO ₄	0,5	3,7.10 ⁻³	-
Acides casamino	0,1	-	-
Lactose	0,025	7,3.10 ⁻⁵	-
Extrait de Levure	0,1	-	-
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2	8,1.10 ⁻⁴	-
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,015	5,5.10 ⁻⁵	5,5.10 ⁻⁵

Tableau III.9. Composition du milieu SBB modifié pour la condition 4

IV.2.1 Dosage du fer par le capteur électrochimique dans le milieu SBB modifié sans bactéries

Les milieux SBB modifiés correspondant à chacune des 4 conditions testées ont été analysés par le capteur électrochimique pour la détermination de la concentration en Fe(II) et en fer total entre J 0 à J 3 en utilisant le protocole de détection établi dans le **chapitre II**. La soustraction des valeurs de concentration du fer total et de Fe(II) a permis d'obtenir la concentration en Fe(III) dans le milieu.

Parmi les éléments qui sont présents dans le milieu SBB modifié et qui ont fait l'objet de l'étude des interférents dans le **chapitre II partie VI.3**, seul le magnésium (présent sous forme Mg²⁺) aurait pu causer une diminution du signal lors des détections. Toutefois, même présent à des concentrations au moins 10 fois plus élevées que le fer dans le milieu, cela n'a pas influé la détermination du Fe(II) et du fer total lors de nos travaux dans ce chapitre, comme le démontre nos résultats.

Etant donné que le capteur permet de réaliser des dosages à des concentrations micromolaires, les milieux de culture SBB modifiés (pH= 7,2) ont été dilués au 1/10^{ème} avant la détection car ils contiennent une concentration initiale en Fe(II) ou Fe(III) de 55 µM. La dilution a été réalisée directement dans la cellule électrochimique contenant l'électrolyte support (10 mM K₂SO₄, pH = 3,7). Cette dilution ne modifie pas de manière significative le pH de la solution analytique qui reste autour de 3,7.

Pour le dosage de Fe(II), la solution analytique a été analysée directement avec l'électrode en CV/Nafion[®] par voltammétrie cyclique, suivie de trois ajouts de 1,5 µM de Fe²⁺. Pour doser le fer total, la solution électrolytique a été acidifiée à un pH inférieur à 2, suivi d'un ajout

d'hydroxylamine à une concentration de 0,5 mM (en excès). Le pH a ensuite été remonté à 3,7 avec une solution de KOH concentré. Finalement, la détection avec l'électrode en CV/Nafion® par voltammétrie cyclique suivie de trois ajouts de 1,5 μM de Fe^{2+} a été réalisée.

Pour une meilleure compréhension du procédé de dosage, un exemple des voltammogrammes cycliques et des courbes des ajouts dosés obtenus lors du dosage de Fe(II) et du fer total dans le milieu SBB modifié, à J 3 pour la condition 4, est donné dans les **figures III.5** et **III.6** respectivement.

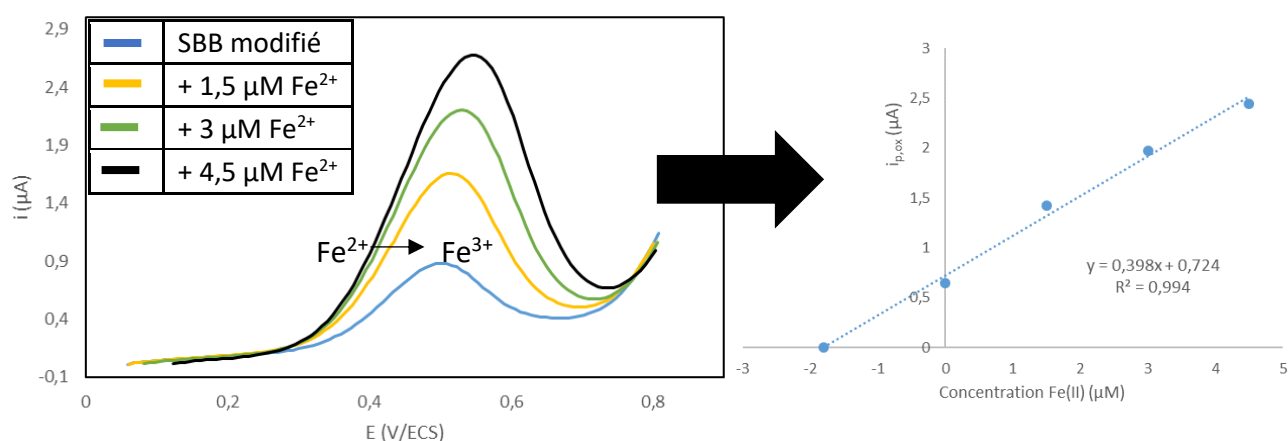


Figure III.5. A gauche : Voltammogrammes tracés avec l'électrode en CV/Nafion® dans du K_2SO_4 (10 mM à pH 3,7) après ajouts successifs de Fe^{2+} par ajouts dosés dans le milieu SBB modifié à J 3 pour la condition 4 ; temps de préconcentration = 10 min ; $v = 50$ mV/s. A droite : Variation de l'intensité du courant de pic d'oxydation en fonction de la variation de la concentration en Fe(II).

Des pics de courant d'oxydation de Fe^{2+} avec des intensités croissantes sont observables vers 0,54 V/ECS sur les voltammogrammes lors des ajouts successifs de Fe^{2+} . L'exploitation de la courbe d'étalonnage permet de déterminer la concentration en Fe(II) dans le milieu SBB à 18 μM .

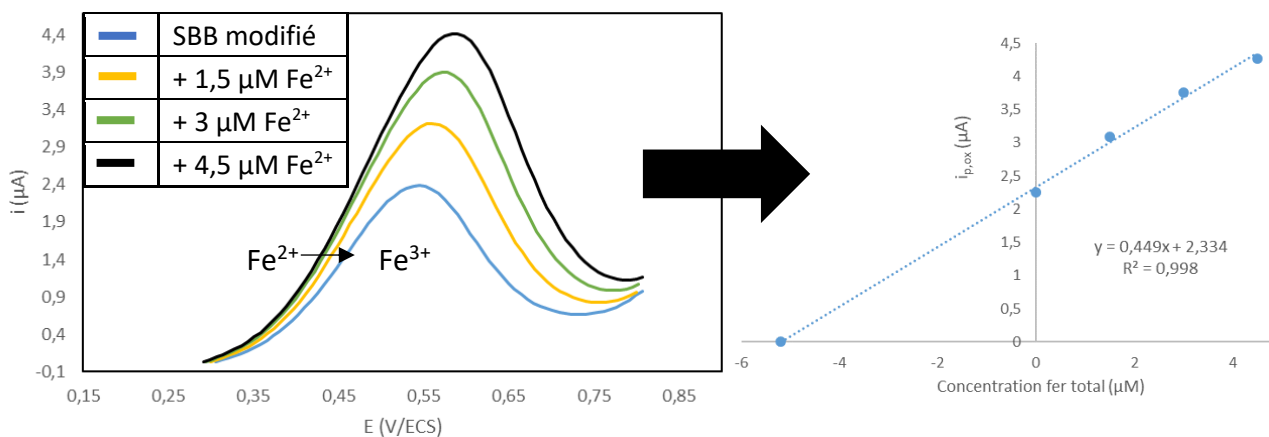


Figure III.6. A gauche : Voltammogrammes tracés avec l'électrode en CV/Nafion® dans du K₂SO₄ (10 mM à pH 3,7) après ajouts successifs de Fe²⁺ par ajouts dosés dans le milieu SBB modifié à J 3 pour la condition 4 ; temps de préconcentration = 10 min ; v = 50 mV/s. A droite : Variation de l'intensité du courant de pic d'oxydation en fonction de la variation de la concentration en fer total.

Pour le dosage du fer total, des pics de courant d'oxydation de Fe²⁺ avec des intensités croissantes sont observables vers 0,58 V/ECS sur les voltammogrammes lors des ajouts successifs de Fe²⁺. L'exploitation de la courbe d'étalonnage permet de déterminer la concentration en fer total dans le milieu SBB à 52 μM, ce qui correspond à un taux de récupération de 95 % si l'on se réfère à la concentration de 55 μM en fer total présente initialement dans le milieu (voir **tableau III.9**).

La différence entre les concentrations obtenues en fer total et Fe(II) permet de retrouver la concentration en Fe(III) qui est égale à 34 μM.

Le rapport des concentrations de Fe(II) et Fe(III) obtenues dans tous les milieux SBB modifiés entre J 0 et J 3 sera présenté au fur et à mesure de la description des résultats de l'étude des quatre conditions de formation de biofilm à *Lp*.

IV.2.2 Etude des conditions 1 et 2

Des biofilms à *Lp* ont été formés avec les milieux SBB modifiés suivant les conditions 1 (**tableau III.6**) et 2 (**tableau III.7**). Des observations en microscopie confocale (**Fig. III.7**) avec le double

marquage Syto™ 9/IP ont été effectués à J 3, J 6 et J 9. Des quantifications de *Lp* sur BCYE et par qPCR (**Fig. III.8**) ont été réalisés sur des biofilms à J 9.

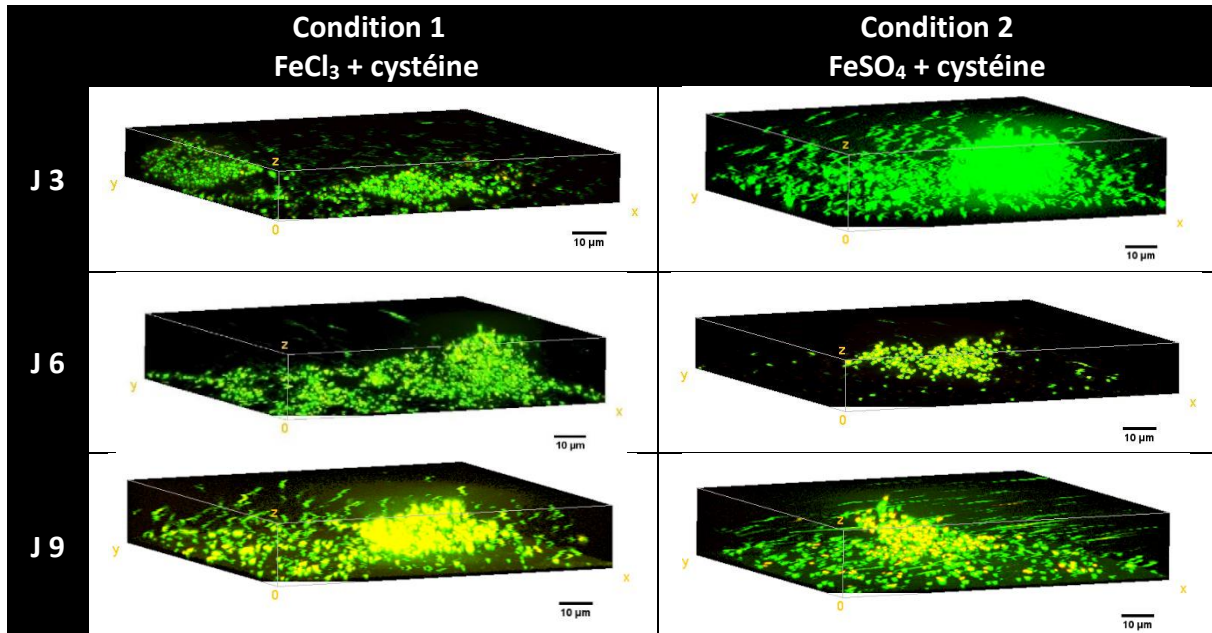


Figure III.7. Reconstitutions volumiques des biofilms à *Lp* marqués au Syto™ 9 et l'IP, relatifs aux conditions 1 et 2, à J 3, J 6 et J 9, observées par MCBL.

Pour les deux conditions, les observations en MCBL à J 3, J 6 et J 9 montrent la présence de biofilms à *Lp* avec majoritairement de cellules viables (marquées en vert). Si à J 3 et J 6 des cellules avec membrane endommagée sont peu visibles, elles sont bien observables à J 9 avec le recouvrement entre les couleurs rouge et verte qui font apparaître le biofilm en jaune à certains endroits. De plus, quelques cellules colorées en rouge sont aussi observables. L'épaisseur moyenne du biofilm mesurée à J 9 pour les conditions 1 et 2 est de 19 µm et 21 µm, respectivement.

Selon la **figure III.8**, le dénombrement par qPCR démontre une différence entre le nombre total de bactéries adhérees dans le puits relatif au témoin positif et dans les puits relatifs aux conditions 1 (différence de 0,4 log UG/cm²) et 2 (différence de 0,8 log UG/cm²). Ces différences apparaissent significatives ($p \leq 0,01$). Les dénombrements d'UFC de bactéries adhérees soulignent que les biofilms relatifs aux conditions 1 et 2 sont majoritairement constitués de cellules viables, avec une tendance similaire entre le témoin, la condition 1 et la condition 2 (différence non significative entre les dénombrements par qPCR et en UFC : $p >$

0,01). La biomasse adhérente détectée à J 9, pour les conditions 1 et 2, reste cependant élevée, supérieure à 6,6 log pour les UFC/cm² et 7 log pour les UG/cm².

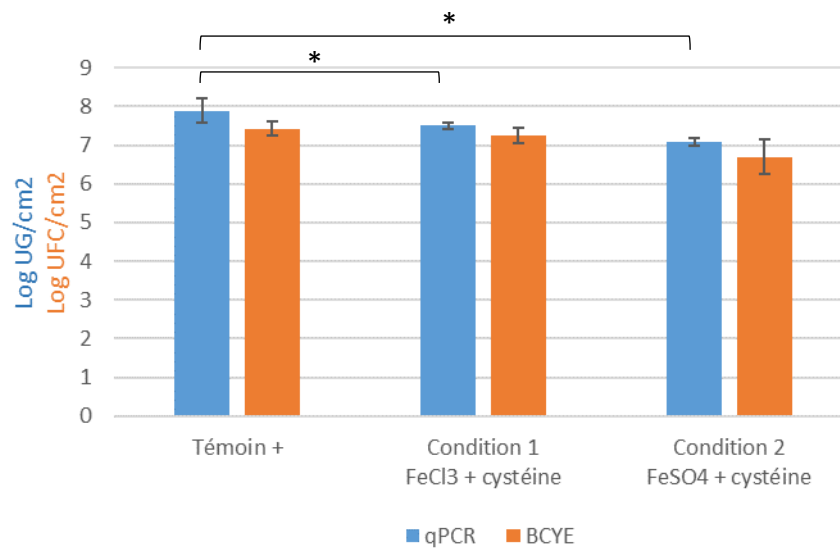
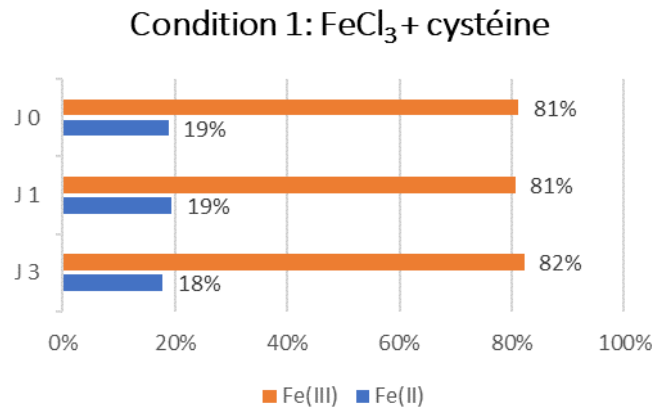


Figure III.8. Influence de Fe(II) et Fe(III) en présence de cystéine sur la population de *Lp* adhérente à J 9. Histogrammes représentant le dénombrement des bactéries du biofilm par qPCR (en bleu) et sur gélose BCYE (en orange) à J 9 dans les conditions 1 et 2 respectivement. (n = 3x3, moyenne ± écart-type) (*p ≤ 0,01).

La **figure III.9** montre la part relative de Fe(II) et Fe(III) au cours du temps. Lors du suivi de la concentration en fer dans le milieu SBB modifié en présence de FeCl₃ et cystéine (**Fig. III.9 (a)**), les résultats indiquent un rapport quasi-stable de la concentration Fe(II) et Fe(III) entre J 0 et J 3. Dans cette condition-là, on peut assumer que les deux formes du fer sont disponibles pour la bactérie à des concentrations quasi-constantes pendant toute la durée de formation du biofilm, ou du moins au moment des changements de milieu. Pour l'étude de la cinétique de SBB modifié en présence de FeSO₄ et cystéine (**Fig. III.9 (b)**), le Fe(II) était initialement majoritaire à J 0 (84 %). A partir de J 1, l'oxydation continue du Fe(II) à l'air ambiant fait que le Fe(III) devient rapidement la forme majoritaire dans le milieu SBB modifié.

(a)



(b)

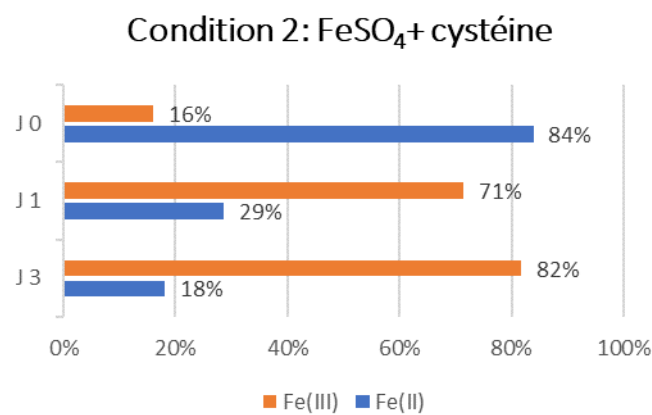


Figure III.9. Rapports des concentrations de Fe(II) et Fe(III) dans les milieux SBB modifiés entre J 0 et J 3, en absence de bactéries (a) condition 1 : en présence de FeCl₃ et de cystéine (b) condition 2 : en présence de FeSO₄ et de cystéine.

A la lumière des résultats obtenus lors de l'analyse des biofilms et du suivi de la concentration en fer dans le milieu de culture, il apparaît qu'une balance ionique des deux formes du fer existe ou s'établit rapidement, avec comme résultante une croissance significative du biofilm, même si les quantifications (UFC et UG) et les observations en microscopie confocale démontrent une supériorité du témoin positif. Ces résultats pourraient conduire à conclure que la forme initiale du fer est sans impact. Cependant, il ne faut pas négliger la présence de la cystéine qui est un supplément de croissance à *Lp* et qui pourrait induire un biais lors de l'évaluation de l'influence du fer. Par conséquent avant toute conclusion, il est important d'étudier l'influence de la cystéine lors de la formation du biofilm à *Lp*.

IV.2.3 Influence de la cystéine

Pour l'étude de l'influence de la cystéine, des biofilms à *Lp* ont été produits dans le milieu de culture SBB modifié selon trois paramètres :

1. En présence de cystéine et en absence de fer ;
2. En présence de fer (PPF et FeSO_4) et en absence de cystéine ;
3. En absence de fer et en absence de cystéine

La composition des milieux SBB modifiés utilisés selon ces 3 paramètres est décrite dans le **tableau III.10**.

(a)

Composants	Concentration (g/L)	Concentration (mol/L)
Na_2HPO_4	1,25	$8,8 \cdot 10^{-3}$
KH_2PO_4	0,5	$3,7 \cdot 10^{-3}$
Acides casamino	0,1	-
Lactose	0,025	$7,3 \cdot 10^{-5}$
Extrait de Levure	0,1	-
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2	$8,1 \cdot 10^{-4}$
L-Cystéine	0,04	$2,3 \cdot 10^{-4}$

(b)

Composants	Concentration (g/L)	Concentration (mol/L)	Concentration en fer (mol/L)
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0005	$1,8 \cdot 10^{-6}$	$1,8 \cdot 10^{-6}$
Na_2HPO_4	1,25	$8,8 \cdot 10^{-3}$	-
KH_2PO_4	0,5	$3,7 \cdot 10^{-3}$	-
Acides casamino	0,1	-	-
Lactose	0,025	$7,3 \cdot 10^{-5}$	-
Extrait de Levure	0,1	-	-
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2	$8,1 \cdot 10^{-4}$	-
$\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$	0,025	$3,4 \cdot 10^{-5}$	$5,4 \cdot 10^{-5}$

(c)

Composants	Concentration (g/L)	Concentration (mol/L)
Na ₂ HPO ₄	1,25	8,8.10 ⁻³
KH ₂ PO ₄	0,5	3,7.10 ⁻³
Acides casamino	0,1	-
Lactose	0,025	7,3.10 ⁻⁵
Extrait de Levure	0,1	-
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2	8,1.10 ⁻⁴

Tableau III.10. Compositions des milieux SBB modifiés (a) en présence de cystéine et en absence de fer (b) en présence de fer (Fe(II) et Fe(III)) et en absence de cystéine (c) en absence de fer et de cystéine.

Les biofilms ont été prélevés à J 9 et des dénombrements des UFC et des UG ont été réalisés. La **figure III.10** présente les quantifications/cm² réalisées sur les biofilms : (i) du témoin positif, (ii) en présence de cystéine et en absence de fer, (iii) en présence de fer et en absence de cystéine. Le dénombrement des UFC sur BCYE a été effectué sur un seul essai, à l'exception du témoin positif..

Par ailleurs, en absence de cystéine et de fer, aucune colonie n'a pu être observée sur BCYE à J 9 et au-delà, et aucune concentration en UG/cm² n'a pu être extraite à partir des essais par qPCR.

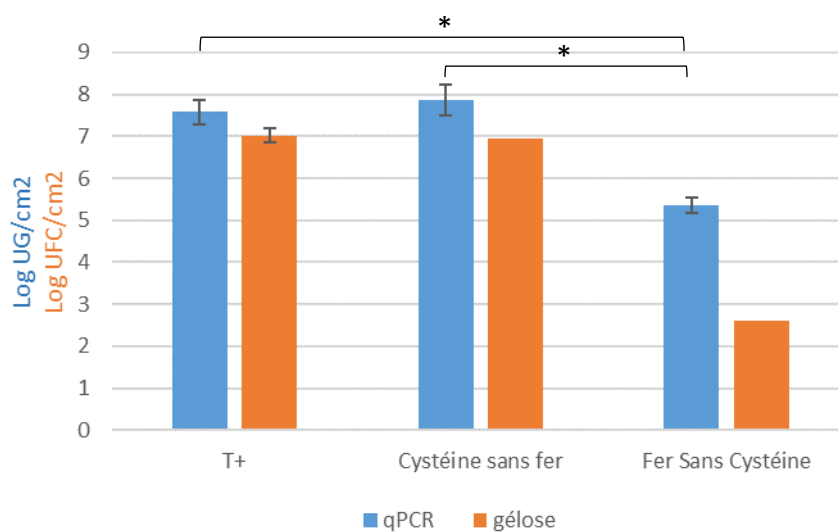


Figure III.10. Etude de l'influence de la cystéine. Histogrammes représentant le dénombrement des bactéries du biofilm par qPCR (en bleu ; n = 3x3, moyenne ± écart-type) et sur gélose BCYE (en orange ; n =3x3, moyenne ± écart-type ; n=1) à J 9 pour le témoin positif, la condition avec cystéine sans fer et avec fer sans cystéine. (*p ≤ 0,01).

A la suite des dénombrements réalisés, deux observations majeures peuvent être faites. Premièrement, nous constatons qu'il y a bien la formation de biofilms à *Lp* en présence de cystéine et en absence de fer. D'ailleurs, il n'existe pas de différence significative entre le nombre total de bactéries dénombrées (UG) dans le biofilm avec la cystéine seule et dans le témoin positif ($p > 0,01$). Le dénombrement des UFC réalisé pour cette condition confirme ce résultat. Deuxièmement, les biofilms formés en absence de cystéine contiennent des quantités totales de bactéries (UG) significativement inférieures à celles du témoin positif et à celles observées en présence de cystéine seule. Une différence d'au moins 2 log UG/cm² est observée. Par ailleurs, même si le dénombrement des UFC n'a pu être réalisé qu'une seule fois, on note une différence de plus de 2 log entre la quantification des UG et des UFC ce qui pourrait indiquer que le biofilm obtenu en absence de cystéine et en présence de fer comporte une part importante de cellules mortes ou cellules viables non-cultivables (VBNC).

Les résultats ci-dessus démontrent que la cystéine a un rôle plus déterminant que le fer lors de la croissance des biofilms à *Lp*, permettant le maintien de la viabilité et de la cultivabilité des bactéries. Dans la bibliographie l'importance de la cystéine a été étudiée sur la croissance

de *Lp* en mode planctonique. Il a été démontré que la croissance de *Lp* était fortement dépendante de la quantité de cystéine présente dans le milieu de culture^[243,244]. En son absence, une croissance partielle^[244] ou inexistante^[245,246] est observée.

Des quantifications similaires ont été obtenues entre le témoin positif et le biofilm obtenu en présence de cystéine et en absence de fer alors que ce dernier est classiquement considéré comme un nutriment clé de la croissance de *Lp*. Cependant, même si le fer n'a pas été ajouté au milieu de culture, il est toujours présent à l'état de traces avec l'ajout des autres composants. En effet, une analyse ICP-AES du milieu SBB modifié en présence de cystéine (référence **tableau III.10.(a)**) a permis de retrouver une concentration en fer total de 26 nM. Cela montre que des teneurs très faibles en fer pourraient être suffisantes (et nécessaires) pour la croissance de *Lp* en mode biofilm en présence de cystéine. Hindré *et al.*^[137] ont obtenu des résultats similaires en milieu riche en nutriments en présence de cystéine et en absence d'ajout de fer. Une autre étude a démontré que des traces de fer dans un milieu liquide étaient suffisantes pour supporter la croissance planctonique de *Lp*^[239].

Néanmoins, il est évident que pour l'étude de l'influence des différentes formes de fer sur la formation de biofilms à *Lp*, la cystéine ne peut pas être utilisée dans le milieu de culture de par son rôle dominant sur la croissance. Par conséquent, l'usage de la cystéine a été stoppé pour les travaux suivants. Etant donné que des biofilms ont pu être formés en présence de fer et en absence de cystéine (**Fig. III.10**), les conditions 3 et 4 ont été basées sur des études du rôle du Fe(II) et Fe(III) respectivement, en absence de cystéine.

IV.2.4 Etude des conditions 3 et 4

Des biofilms à *Lp* ont été formés en présence de 55 μM de FeCl_3 et 55 μM de FeSO_4 correspondant aux conditions 3 (**tableau III.8**) et 4 (**tableau III.9**) respectivement. Des observations en microscopie confocale (**Fig. III.11**) avec le double marquage Syto[®] 9/IP ont été effectués à J 3, J 6 et J 9. La quantification de *Lp* sur BCYE et par qPCR (**Fig. III.12**) a été réalisée sur des biofilms à J 9.

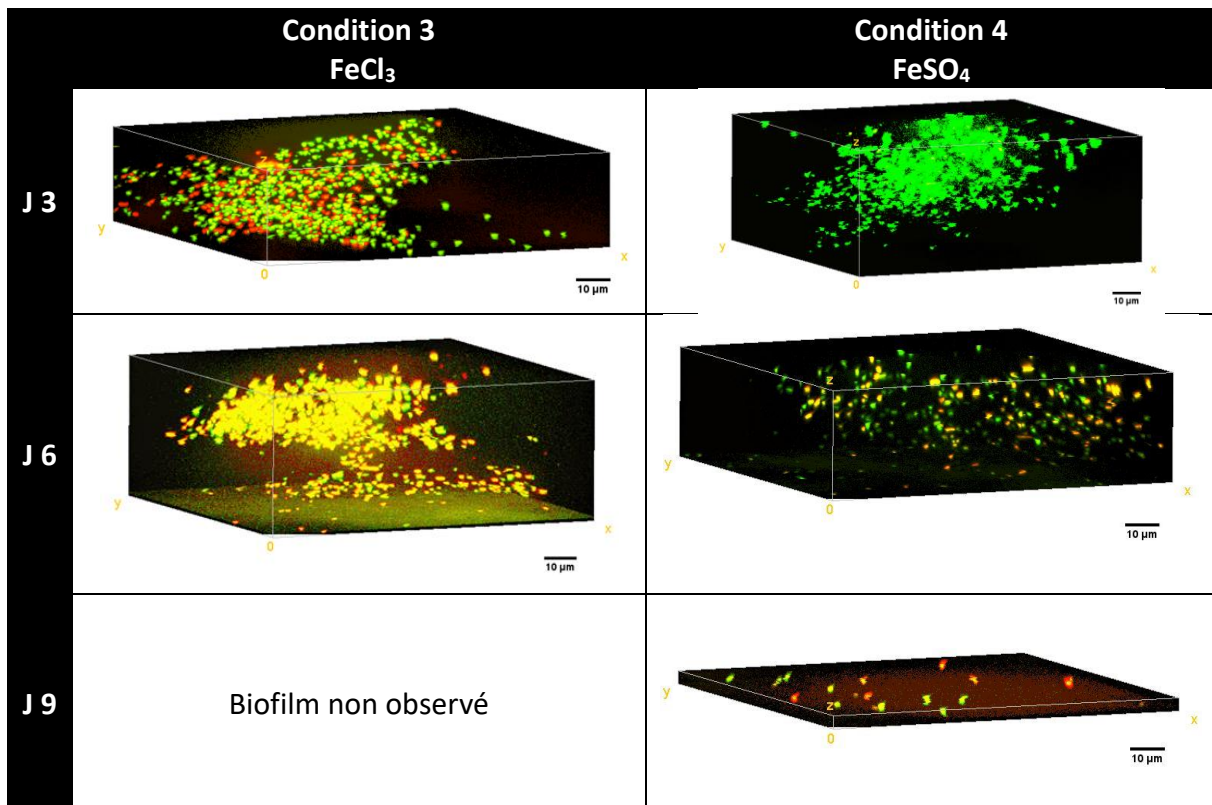


Figure III.11. Reconstitutions volumiques des biofilms à *Lp* relatifs aux conditions 3 et 4 à J 3, J 6 et J 9, marqués au Syto® 9 et l'IP, dans la condition 3 (FeCl₃) (à gauche) et la condition 4 (FeSO₄) (à droite).

Dans la condition 3, des cellules viables (en vert) et des cellules avec membrane endommagée (en rouge) sont bien discernables dans le biofilm dès J 3. A J 6, le biofilm a un aspect aérien avec une fine base de cellules adhérentes. La coloration jaune du biofilm témoigne de la présence d'une majorité de cellules avec membrane endommagée. A J 9, aucun biofilm n'a été observé.

Un biofilm à l'aspect aérien est observé dès J 3 pour la condition 4 avec une dominance de cellules viables (en vert). Nous constatons toujours un biofilm aérien à J 6 mais il est moins dense, avec la présence de cellules viables et de cellules avec membrane endommagée. A J 9, un tapis cellulaire très fin est observé avec seulement quelques cellules viables et quelques cellules ayant perdu leur intégrité membranaire. L'épaisseur du biofilm n'a pas pu être mesurée dans ce cas-là en raison de la présence de cellules isolées uniquement.

Les dénombrements réalisés sur les biofilms à J 9 (**Fig. III.12**) montrent qu'il y a une différence significative entre le nombre total d'UG dans le témoin positif ($7,88 \pm 0,31 \log \text{UG/cm}^2$) et dans le biofilm correspondant aux conditions 3 ($4,48 \pm 0,14 \log \text{UG/cm}^2$) et 4 ($5,29 \pm 0,38 \log \text{UG/cm}^2$). Une différence significative de $0,81 \log \text{UG/cm}^2$ est également retrouvée entre le nombre total d'UG dans le biofilm correspondant à la condition 3 et 4. Cependant, dans les deux cas, aucune bactérie n'a été dénombrée sur gélose BCYE ($n = 3$). Ces observations indiquent que les biofilms obtenus en absence de cystéine et en présence de fer à $55 \mu\text{M}$, qu'il soit initialement sous forme Fe(II) ou Fe(III) sont majoritairement constitués de cellules mortes et/ou de cellules viables non-cultivables.

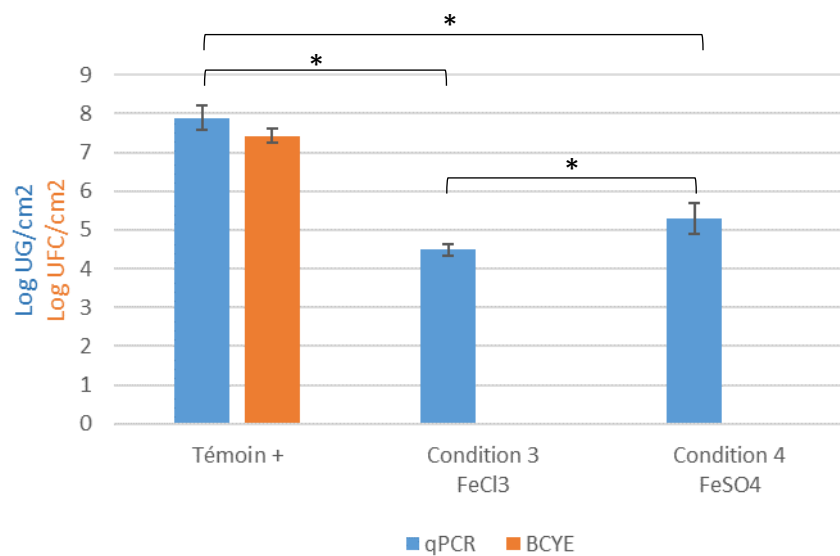
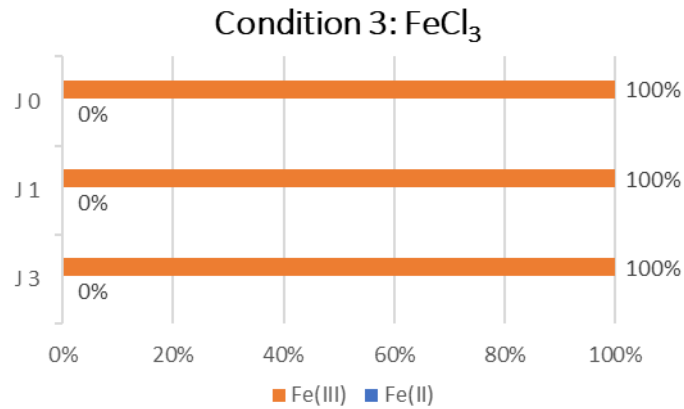


Figure III.12. Etude de l'influence de Fe(II) et Fe(III). Histogrammes représentant le dénombrement des bactéries du biofilm par qPCR (en bleu) et sur gélose BCYE (en orange) à J 9 pour le témoin positif et les conditions 3 (FeCl₃) et 4 (FeSO₄). ($n = 3 \times 3$, moyenne \pm écart-type) (* $p \leq 0,01$).

Le suivi de la concentration de fer dans le milieu SBB modifié pour la condition 3 (**Fig III.13(a)**), en absence de bactérie, a montré seul le Fe(III) est présent entre J 0 et J 3 comme attendu, puisqu'il n'y a pas de cystéine pour le réduire. Cela voudrait dire que les bactéries ont accès à une seule forme de fer lors de la formation du biofilm dans ce cas-là. Concernant la condition 4 (**Fig III.13(b)**), le Fe(II) seulement est présent initialement dans le milieu à J 0, puis il s'oxyde

graduellement en Fe(III) et ce dernier devient majoritaire (51%) à partir de J 1. Cela est probablement dû à l'oxydation continue du Fe(II) à l'air.

(a)



(b)

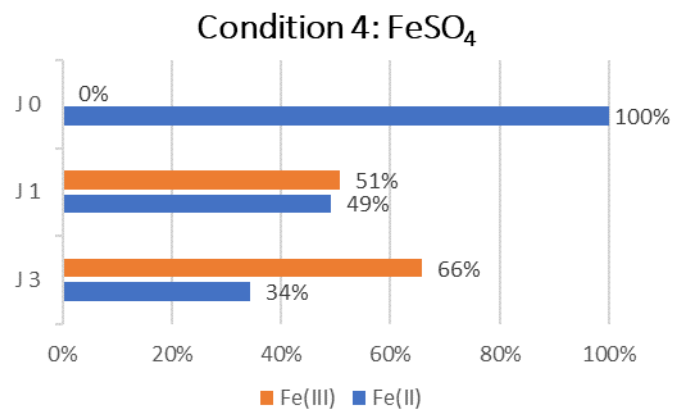


Figure III.13. Rapport des concentrations de Fe(II) et Fe(III) dans les milieux SBB modifiés entre J 0 et J 3 (a) en condition 3 (FeCl₃) (b) en condition 4 (FeSO₄).

A partir des résultats obtenus sous les conditions 3 et 4, plusieurs observations peuvent être faites.

En premier lieu, quelle que soit la forme de fer ajoutée dans le milieu SBB modifié, la quantité de bactéries dans le biofilm est inférieure à celle dans le biofilm du témoin positif. Cette diminution est confirmée par les images obtenues en MCBL où des biofilms moins denses ont été observés en comparaison avec ceux observés précédemment dans ce chapitre (en

présence de cystéine). Cette baisse de population bactérienne du biofilm peut être attribuée à l'absence de cystéine dans le milieu.

Par ailleurs, si des bactéries adhérees ont bien été dénombrées par qPCR, nous notons une absence de biofilms bien structurés lors des observations en MCBL à J 9 pour les conditions 3 et 4. Les quantifications d'UG indiquent que les cellules sont mortes et/ou viables non-cultivables (VBNC) étant donné qu'aucune colonie n'a été détectée sur BCYE. Cependant, à J 3, des biofilms avec des cellules viables sont bien observés par microscopie confocale si l'on se réfère au marquage IP, surtout pour la condition 4 (FeSO_4). A J 6, les biofilms observés relatifs aux 2 conditions présentent un aspect aérien avec une base fine mesurant moins de 6 μm laissant présager une faible adhésion à la surface du puits. La faible adhésion à la surface a d'ailleurs déjà été notée lors de la mise au point du modèle de biofilm par le laboratoire^[73]. Ainsi, pour les milieux SBB contenant FeCl_3 et FeSO_4 et déplétés en nutriments habituels (cystéine et PPF), une diminution progressive de la population adhéree est observée avec également un impact progressif sur la viabilité des cellules, avec désintégration des biofilms. Dans ces conditions, le devenir des cellules issues des biofilms doit être évalué, notamment par quantification des UFC et UG dans la phase planctonique. La désintégration des biofilms a pu être favorisée au cours de la manutention des microplaques pour les transporter jusqu'à la plateforme d'observation en MCBL.

Finalement, l'étude sur le suivi des deux formes de fer dans le milieu SBB modifié a montré qu'uniquement le Fe(III) peut être étudié seul. Le Fe(II) ne peut pas rester sous cette forme durant les 9 jours d'incubation car il s'oxyde spontanément à l'air ambiant en présence d'oxygène et cela crée une balance ionique des deux formes du fer dans le milieu SBB modifié, favorable à la forme Fe(III) dès J 1. Cependant, quelques constatations peuvent être faites. La quantité d'UG dans le biofilm contenant FeCl_3 est significativement inférieure à celle observée dans le biofilm contenant FeSO_4 . Par ailleurs, les observations en microscopie confocale indiquent une meilleure préservation de la viabilité cellulaire à J 3 en présence de FeSO_4 . Si nous considérons l'apport unique et partiel du Fe(III) dans les conditions 3 et 4 respectivement, il semblerait que le Fe(III) ait une influence négative sur le devenir de la population bactérienne au sein du biofilm. Dans les deux conditions, nous notons une phase d'adhésion et de prolifération cellulaire sous forme adhéree comme le démontrent nos observations à J 3, puis un arrêt de la croissance du biofilm avec destruction complète. La

forme Fe(II) pourrait donc avoir un rôle favorable lors de la première phase de formation du biofilm, mais la dominance par la suite de Fe(III) dans les deux conditions ne permet pas de conclure sur le rôle de la forme du fer aux temps ultérieurs.

IV.3 Compréhension de l'impact du Fe(III)

Afin de confirmer l'influence négative du Fe(III) sur la formation du biofilm, le suivi de la cinétique de croissance du biofilm à *Lp* a été réalisé en présence de FeCl₃ sur à J 3, J 6 et J 9. Une seconde série d'essais a consisté à former des biofilms à des concentrations différentes en FeCl₃ et à les analyser ensuite par dénombrement des UG et des UFC. Le milieu de culture utilisé dans les deux cas est celui utilisé pour l'étude de la condition 3 et est décrit dans le **tableau III.8**.

IV.3.1 Cinétique de formation de biofilm avec le Fe(III)

Des biofilms en présence de 55 µM de FeCl₃ et des biofilms du témoin positif ont été produits et analysés à J 3, J 6 et J 9 en réalisant des dénombrement des UFC sur BCYE et des UG par qPCR (**Fig III.14**).

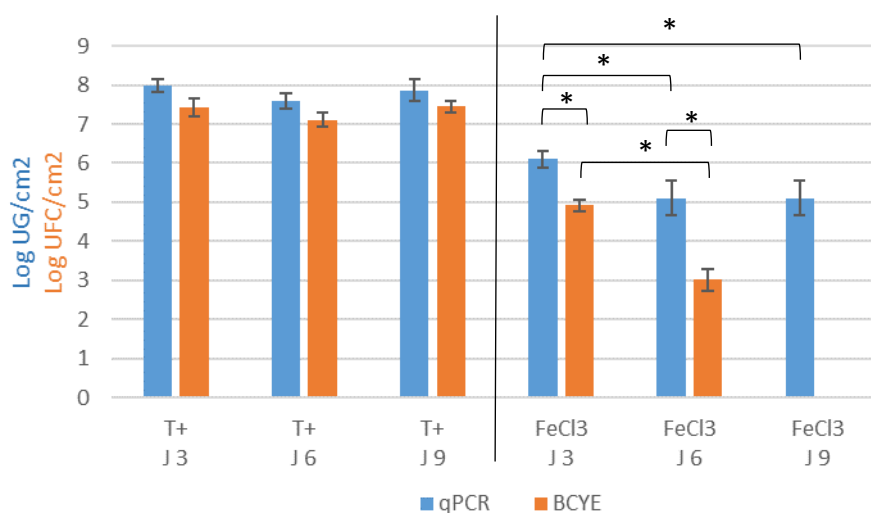


Figure III.14. Cinétiques de formation de biofilms du témoin positif et de la condition 3 (FeCl₃). Histogrammes représentant le dénombrement des bactéries du biofilm par qPCR (en bleu) et sur gélose BCYE (en orange) à J 3, J 6 et J 9 (n = 3x3, moyenne ± écart-type) (*p ≤ 0,01).

Que ce soit pour le biofilm du témoin positif ou pour le biofilm contenant du FeCl_3 , la biomasse bactérienne est déjà établie au bout de 3 jours. Toutefois, le nombre d'UG/cm² est inférieur d'environ 2 log pour la condition 3 par rapport au témoin positif. Si la biomasse adhérente ne varie pas significativement au cours du temps pour le témoin positif, elle diminue de manière significative, soit de 1 log d'UG/cm² entre J 3 et J 6 dans le biofilm contenant du FeCl_3 pour ensuite rester stable entre J 6 et J 9. Cette diminution pourrait s'expliquer par le décrochage d'amas bactériens faiblement adhérents lors du renouvellement du milieu de culture à J 3 et au cours de l'incubation ultérieure (référence **figure III.11**).

Si des bactéries viables et cultivables (UFC) sont présentes dans le biofilm contenant le FeCl_3 à J 3, leur taux est environ 100 fois inférieur à celui observé pour le témoin positif et une réduction de 1,9 log UFC/cm² est observée à J 6, alors que la population viables et cultivables du témoin positif reste stable. La non détection de cellules cultivables à J 9 est confirmée pour la condition 3. Ces résultats démontrent l'influence négative du Fe(III) (apporté dans le milieu de culture) sur la viabilité et la cultivabilité des bactéries du biofilm et une induction probable vers une mort cellulaire ou un passage vers l'état VBNC pour la bactérie.

IV.3.2 Etude de l'influence de la concentration de Fe(III)

Des biofilms à *Lp* ont été produits dans le milieu SBB modifié correspondant à la condition 3 (**tableau III.11**) en faisant varier la concentration du Fe(III). Trois concentrations ont été choisies lors de cette étude :

1. $[\text{Fe(III)}] = 5 \mu\text{M}$, qui est une concentration proche de celles retrouvées dans des TAR ;
2. $[\text{Fe(III)}] = 55 \mu\text{M}$, qui est la concentration habituelle dans les milieux de culture ;
3. $[\text{Fe(III)}] = 110 \mu\text{M}$, qui est le double de la concentration habituelle dans les milieux de culture et potentiellement une concentration en excès pour les bactéries.

Composants	Concentration (g/L)	Concentration (mol/L)	Concentration en fer (mol/L)
Na ₂ HPO ₄	1,25	8,8.10 ⁻³	-
KH ₂ PO ₄	0,5	3,7.10 ⁻³	-
Acides casamino	0,1	-	-
Lactose	0,025	7,3.10 ⁻⁵	-
Extrait de Levure	0,1	-	-
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2	8,1.10 ⁻⁴	-
FeCl ₃ . 6H ₂ O	0,0014 / 0,015 / 0,03	5.10 ⁻⁶ / 5,5.10 ⁻⁵ / 1,1.10 ⁻⁴	5.10 ⁻⁶ / 5,5.10 ⁻⁵ / 1,1.10 ⁻⁴

Tableau III.11. Composition des milieux SBB modifiés utilisés avec différentes concentrations de Fe(III).

Les biofilms ont été prélevés à J 9 et des dénombrements des UG par qPCR et des UFC sur BCYE (**Fig. III.15**) ont été réalisés. Les dénombrements sur BCYE ont été réalisés pour un essai uniquement avec trois replicats.

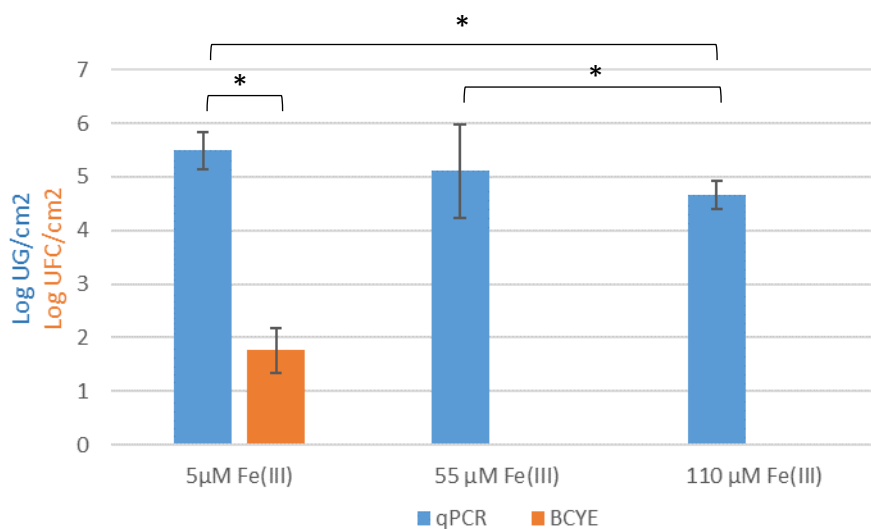


Figure III.15. Etude de l'influence de la concentration de Fe(III). Histogrammes représentant le dénombrement des UG du biofilm par qPCR (en bleu ; n = 3x3, moyenne ± écart-type) et des UFC sur gélose BCYE (en orange ; n = 1x3, moyenne ± écart-type) à J 9, en présence de 5 μM, 55 μM et 110 μM de Fe(III). (*p ≤ 0,01).

L'augmentation de la concentration en Fe(III) de 5 μM à 55 μM n'entraîne pas de baisse significative du nombre d'UG/cm². Cependant à 110 μM , le nombre total d'UG est réduit à $4,65 \pm 0,27 \log \text{UG/cm}^2$. Il est probable qu'à cette concentration, le biofilm commence à subir les effets néfastes de la forte concentration du Fe(III) inhibant sa croissance. Une observation similaire a été faite dans la bibliographie où l'utilisation d'une forte concentration en PPF (1,7 mM) a engendré à une baisse significative de la population de *Lp* adhérente^[137].

Par ailleurs, des cellules viables et cultivables ont été dénombrées uniquement pour le biofilm contenant 5 μM de Fe(III). Toutefois, cette concentration est faible ($1,76 \pm 0,42 \log \text{UFC/cm}^2$) par rapport au nombre total d'UG ($5,50 \pm 0,35 \log \text{UG/cm}^2$) et le dénombrement des UFC n'a pu être réalisé que sur un seul essai, nécessitant confirmation. Cela pourrait néanmoins démontrer qu'en diminuant la concentration en Fe(III) dans le milieu, les cellules du biofilm présentent une meilleure viabilité et cultivabilité.

IV.4 Compréhension de l'impact du Fe(II)

Comme nous avons vu précédemment, le Fe(II) ne peut pas être seul présent dans le milieu de culture en conditions aérobies. *Lp* étant aérobic stricte, elle a besoin d'oxygène pour se développer.

Toutefois, des expériences ont été réalisées en anaérobiose en présence de 55 μM de FeSO_4 afin d'optimiser le maintien de la forme Fe(II) lors de la production des biofilms de *Lp*. Le système d'anaérobiose utilisé est le *GENbag (bioMérieux)* qui induit une anaérobiose progressive au cours de la culture. Cependant, l'anaérobiose ne peut être maintenue au moment des renouvellements de milieu à J 3 et J 6. Le milieu de culture correspondant à la condition 4 a été utilisé (**Tableau III.9**).

Deux paramètres ont été testés :

1. Une production de biofilms en aérobiose jusqu'à J 3 puis en anaérobiose jusqu'à J 9.
2. Une production de biofilms en anaérobiose de J 0 à J 9.

Les témoins positifs ont été réalisés dans les mêmes conditions. Les biofilms ont ensuite été prélevés à J 9 et des dénombrements des UG par qPCR et des UFC sur BCYE (**Fig. III.16**) ont été réalisés. Le dénombrement sur BCYE a été effectué pour un essai uniquement sans replicats.

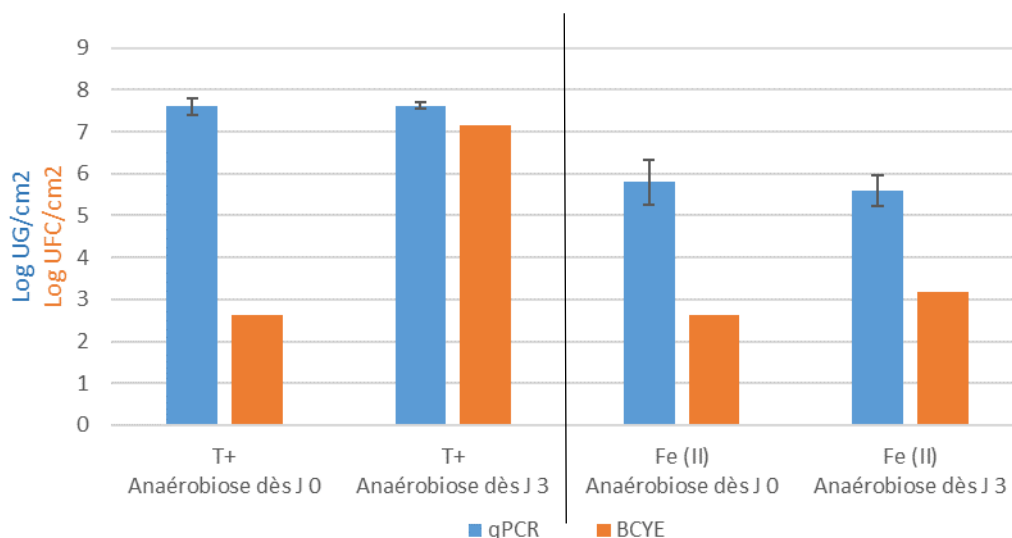


Figure III.16. Etude de l'impact de Fe(II) en anaérobiose à partir de J 0 ou à partir de J 3. Histogrammes représentant le dénombrement des UG du biofilm par qPCR (en bleu ; n = 3x3, moyenne ± écart-type) et des UFC sur gélose BCYE (en orange, n = 1) à J 9 dans les deux paramètres définies.

Des biofilms sont obtenus en anaérobiose que ce soit avec le témoin positif ou en présence de Fe(II). Dans le cas des témoins positifs, le nombre d'UG/cm² est similaire pour les deux paramètres (anaérobiose dès J 0 ou dès J 3). Les valeurs observées sont également similaires à celles notées lors de l'ensemble des essais en aérobiose (> 7 log UG/cm²). Une différence de plus de 4 log d'UFC/cm² est observée entre les deux paramètres, avec une cultivabilité supérieure lorsque l'anaérobiose est initiée à J 3. Cependant, le dénombrement des UFC n'a pu être réalisé qu'une fois. Cela montre que les bactéries adhèrent à la surface assez rapidement après la mise en culture et qu'elles arrivent à supporter dans une certaine mesure le manque en oxygène ou du moins que la quantité résiduelle d'oxygène présente dans nos conditions d'essai est suffisante.

En ce qui concerne les essais réalisés en présence de FeSO₄, nous notons une réduction des UG par 2 log UG/cm² environ par rapport aux témoins positifs respectifs. La différence est non significative (p > 0,01) entre les 2 paramètres d'essai (anaérobiose dès J 0 ou dès J 3). En ce qui concerne les bactéries cultivables, la valeur des UFC/cm² est similaire à celle notée pour le témoin positif dans le cas d'une anaérobiose dès J 0 (2,6 log UFC/cm²). Lorsque l'anaérobiose est initiée à J 3, la population cultivable est bien présente mais très inférieure (réduction de 4

log) à celle notée pour le témoin positif correspondant. Ces résultats montrent que la viabilité et cultivabilité des bactéries est mieux préservée en présence de Fe(II) par rapport au Fe(III).

V. Conclusion

Le fer a toujours été décrit comme étant un nutriment essentiel pour la croissance et la réplication de *Lp*^[128,247,248]. Au cours de ce chapitre nous avons essayé de déterminer l'impact des deux formes de fer (Fe(II) et Fe(III)) sur la croissance d'un biofilm mono-espèce de *Lp*.

Des biofilms mono-espèces à *Lp* ne sont jamais retrouvés dans l'environnement. Toutefois, plusieurs études ont montré la possibilité de former des biofilms mono-espèces à *Lp*^[137,240,249]. Le modèle de formation de biofilms mono-espèces à *Lp* sur lequel reposent les travaux de ce chapitre a été mis au point au LGC dans un milieu peu nutritif (SBB)^[72,73]. Pour valider ce modèle, des biofilms ont été produits dans le milieu SBB et il a été confirmé que, dans ces conditions, la grande majorité des bactéries adhérentes sont viables et cultivables. Dans ce milieu, il y a un apport en fer et en cystéine qui sont considérés comme des nutriments conduisant à une croissance optimale de *Lp*. Ainsi, le biofilm produit dans le SBB a été choisi en tant que témoin positif pour l'ensemble des essais présentés dans ce chapitre.

Afin d'étudier l'impact du fer, il a fallu choisir des sources de fer permettant de n'avoir qu'une seule forme de fer. Ainsi, en dépit de sa forte utilisation dans la bibliographie, le PPF n'a pas été choisi car des analyses électrochimiques et spectrophotométriques ont démontré la présence de Fe(II) et de Fe(III) dans ce sel. Par conséquent, le FeSO₄ et le FeCl₃ ont été choisis comme source de Fe(II) et Fe(III) respectivement dans le milieu de culture liquide SBB.

Quatre conditions de formation de biofilms à *Lp* ont été étudiées initialement. Chacune de ces quatre conditions concerne un milieu de culture SBB modifié avec un ajout de 55 µM de Fe(II) ou Fe(III) et en présence ou en absence de cystéine. Cependant, la cystéine a été définitivement retirée du milieu de culture car elle a un rôle dominant sur la croissance des biofilms et masque l'influence du fer. Les biofilms formés en son absence mais en présence de fer sont caractérisés par une quantité totale d'UG réduite par rapport au contrôle défini. De plus, la structure du biofilm est constituée en grande partie de cellules mortes ou viables non-cultivables. Pour rappel, la base du milieu SBB, sans cystéine et sans fer ne permet aucune détection de bactéries adhérentes.

Les biofilms observés en présence de FeCl_3 et de FeSO_4 (en absence de cystéine) présentent un aspect aérien avec la présence d'une fine base. Ceci pourrait correspondre à une adhésion plus « fragile » associée à une matrice extra-cellulaire moins dense.

L'étude de chacune des deux formes de fer a permis de tirer une conclusion majeure sur l'impact du Fe(III) sur les bactéries du biofilm. En effet, des biofilms peuvent se former en présence de Fe(III) avec une biomasse bactérienne rapidement établie au bout de 3 jours et qui peut rester stable en termes d'UG. Toutefois, la viabilité et la cultivabilité des bactéries adhérentes diminuent au cours du temps. Au bout de 9 jours, plus aucune bactérie viable et cultivable n'est dénombrée. Pour expliquer ce phénomène il faut prendre en compte le milieu de culture liquide SBB modifié ne contenant pas de cystéine. Le milieu est à pH 7,2 et le Fe(III) n'est pas sous sa forme ionique libre. En effet, le Fe(III) est surtout complexé par des ions hydroxydes et se retrouve majoritairement sous forme Fe(OH)_3 selon un calcul effectué via le logiciel *Visual MINTEQ*. En général, la bactérie fait usage de la voie d'acquisition primaire de Fe^{3+} en sécrétant le sidérophore Légionnaire^[121], possédant une affinité très forte envers les ions ferriques. Cependant, il est possible qu'en raison de l'absence de cystéine dans un milieu qui est déjà peu nutritif, la bactérie se retrouve dans un état de stress nutritif et donc de faible activité métabolique, avec une capacité de captation du fer réduite, alors que le fer présent dans le milieu n'est pas un facteur limitant en terme de concentration. En raison de ce fort stress nutritif, une réduction progressive des UG et de manière plus importante des UFC est détectée, indiquant qu'une partie des bactéries entre dans un état VBNC comme stratégie de survie et/ou meurt. Sous forme VBNC, elles ne peuvent pas se développer sur le milieu de culture BCYE mais conservent certaines caractéristiques des cellules viables, telles que l'intégrité cellulaire ou la virulence^[76]. Néanmoins, il a été montré qu'en présence d'amibes, les bactéries se trouvant dans l'état VBNC sont capables de repasser sous forme cultivable. Cela implique qu'elles sont donc encore capables d'envahir les amibes et de se répliquer^[81,84]. Le passage dans les amibes peut les rendre plus virulentes et infectieuses^[6].

Il a été difficile d'évaluer l'impact de Fe(II) sur les bactéries adhérentes du biofilm au vu de son oxydation rapide à l'air. Selon les résultats obtenus en anaérobiose, il semblerait que les effets observés sur la formation du biofilm et surtout le devenir des populations adhérentes soient moins marqués en présence de Fe(II) par rapport au Fe(III) . A pH 7,2, selon un calcul effectué via le logiciel *Visual MINTEQ*, près de 10 % du Fe(II) est sous forme Fe^{2+} libre, donc plus

facilement diffusible à travers les membranes externes des bactéries vers le périplasme^[250]. A partir du périplasme, le Fe^{2+} est ensuite transporté à travers la membrane cytoplasmique par le transporteur FeoB. Ainsi, cette acquisition simple et rapide de Fe^{2+} contribuerait dans une certaine mesure à garder la bactérie dans un état viable et cultivable. Cependant, lors de la réaction de Fenton à l'intérieur des cellules, le Fe^{2+} s'oxyde en Fe^{3+} , induisant la production de radicaux libres connus comme *Reactive Oxygen Species* (ROS). Ces espèces sont fatales pour la bactéries endommageant les membranes lipidiques, les protéines et les brins d'ADN. Dans une étude de Portier *et al.*^[138], la persistance de *Lp* a été suivi dans des biofilms complexes issus de l'eau de rivière contenant un concentration en fer total de 4 μM . L'ajout du chélateur 2,2'-dipyridyl (DIP), responsable de la complexation de Fe^{2+} , a permis l'augmentation de *Lp* (quantifiée en UG) dans les biofilms en la protégeant des effets néfastes du Fe^{2+} . Les auteurs relient ce phénomène à une diminution de la production de ROS. Lors de nos essais, nous retrouvons en général un taux plus faible d'UFC par rapport aux UG, en faveur d'un passage en VBNC et/ou d'une mortalité cellulaire. Cela est aussi le cas lors de l'étude de Fe(II) en anaérobiose. Ainsi, nous ne pouvons pas conclure sur les effets toxiques de Fe^{2+} sur le biofilm à *Lp*. Cependant, il faut souligner que des cellules viables et cultivables ont été obtenues dans la majorité des biofilms à *Lp* produits dans des milieux de culture contenant du Fe(II) au cours de nos essais.

Lors des différents essais réalisés, nous avons mis en évidence une perte de cultivabilité des cellules du biofilm en présence du fer (5 à 110 μM) qui pourrait correspondre à une mort cellulaire, mais également à l'évolution vers une forme VBNC. Une étude des formes de fer présentes dans les eaux de TAR permettrait de faire un premier lien entre les observations faites au cours de ce chapitre et le statut de *Lp* dans les biofilms.

Chapitre IV

Vers un suivi de la concentration en
fer pour contrôler la population de
Legionella pneumophila dans les TAR

L'objectif final du projet est de valider les performances analytiques du capteur électrochimique à fer en milieu réel, en suivant la concentration des deux formes du fer (Fe(II) et Fe(III)) dans l'eau de TAR.

Pour ce faire, une TAR prototype a été conçue, élaborée et mise en route dans les locaux Resonet Services (Gimont, France) pour simuler une eau de TAR en circulation. La composition de cette eau a été analysée par ICP-AES et par chromatographie ionique pour évaluer la concentration des espèces potentiellement interférentes. Puis, du Fe²⁺ et Fe³⁺ ont été ajoutés dans l'eau de la TAR avant le prélèvement d'un échantillon de cette eau enrichie. Finalement, des dosages de Fe(II) et de fer total ont été effectués par l'électrode en CV/Nafion® et les valeurs des concentrations mesurées ont été comparées à celles obtenues par des méthodes de référence (ICP-AES et spectrophotométrie UV-visible).

I. Matériels et méthodes

I.1 Produits chimiques

Toutes les solutions mentionnées dans ce chapitre ont été préparées avec de l'eau ultra pure (Milli-Q, Millipore, 18,2 MΩ.cm). Ci-dessous sont énumérés les différents réactifs utilisés lors des expériences :

- 1,10-phénanthroline monohydratée (C₁₂H₈N₂.H₂O) : *ACS reagent, ≥99 %, Sigma-Aldrich*
- Acétate de sodium (CH₃COONa) : *ACS reagent, +99 %, Aldrich*
- Acide acétique glacial (CH₃COOH) : *Laboratory reagent grade, ≥99 %, Fisher Scientific*
- Acide chlorhydrique (HCl) : *ACS reagent, ≥37 %, ; Honeywell Fluka*
- Chlorhydrate d'hydroxylamine (NH₂OH.HCl) : *AnalaR NORMAPUR®, ≥99 % ; VWR Chemicals*
- Chlorure de fer(III) hexahydraté (FeCl₃. 6H₂O) : *+99% for analysis ; Acros Organics*
- Ethanol (C₂H₅OH) : *TechniSolv®, 90 % (V/V), VWR Chemicals*
- Hydroxyde de potassium (KOH) : *Pur en pastilles ; Prolabo*
- Nafion® : *D-520 dispersion, 5 % w/w in water and 1-propanol ; Alfa Aesar*
- Sulfate de fer(II) heptahydraté (FeSO₄.7H₂O) : *ACS reagent, +99 % ; Acros Organics*
- Sulfate de potassium (K₂SO₄) : *ReagentPlus®, ≥ 99 % ; Sigma-Aldrich*

Les solutions diamantées et les tapis utilisés pour le polissage des électrodes proviennent de chez *Presi*.

Lors des analyses en ICP-AES et chromatographie ionique, des étalons purs provenant de chez *SCP SCIENCE* ou *SPEX CertiPrep* ont été utilisées pour établir les droites de calibration.

I.2 Appareillage

Les expériences électrochimiques mentionnées dans ce chapitre ont été réalisées à l'aide d'un montage classique à trois électrodes :

7. L'électrode de travail : Une électrode en CV/Nafion® constituée d'un embout en carbone vitreux (CV) *Radiometer* de 3 mm de diamètre recouvert de 3 µL d'une solution de Nafion® à 5 % w/w (voir **Chapitre II**).
8. L'électrode de référence : une électrode au calomel saturée (ECS) *Radiometer* séparée de la solution par une allonge de protection munie d'un embout en verre fritté.
9. La contre électrode : Un fil de platine de chez *Orignalys*.

L'ensemble des électrodes est relié à un potentiostat (Metrohm Autolab - PGSTAT 128N) piloté par le logiciel NOVA 2.1 via un ordinateur.

La spectrométrie ICP-AES (*Ultima 2 (Horiba)*) et la spectrophotométrie UV-visible (*Lambda 365 (Perkin Elmer)*) ont été utilisées comme méthodes de référence pour déterminer la concentration en fer et valider les résultats du capteur électrochimique.

L'analyse des espèces interférentes dans l'eau de TAR a été réalisée par spectrométrie ICP-AES (*Ultima 2 (Horiba)*) et par chromatographie ionique (*Dionex ICS-5000 (Thermo Scientific)*).

I.3 Méthode électrochimique employée

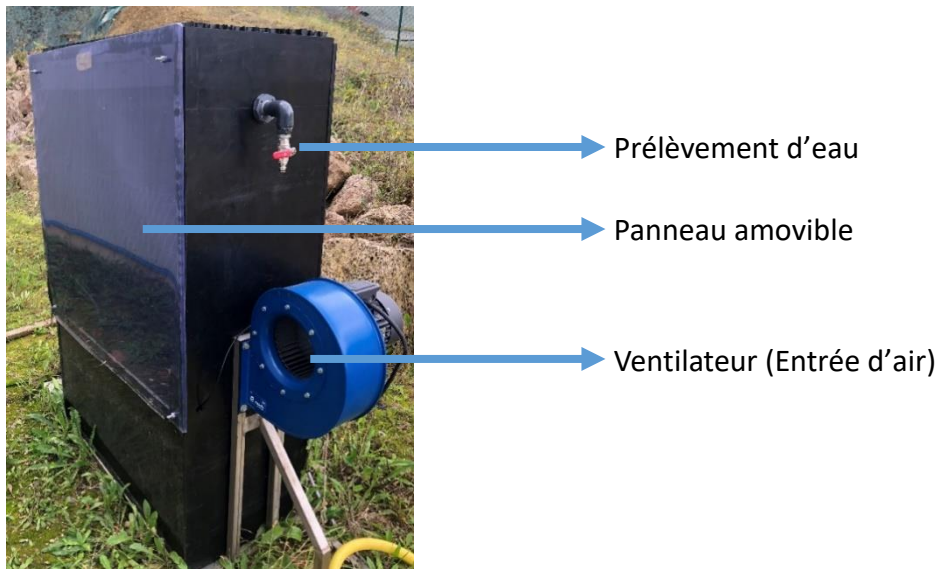
Le dosage électrochimique de Fe(II) et du fer total a été réalisé par voltammétrie cyclique couplée à une étape de préconcentration à courant nul pendant 10 min en utilisant une électrode en CV/Nafion® (voir **chapitre II partie IV.1**). L'électrolyte support utilisé est la solution de K₂SO₄ 10 mM (pH 3,7) et la vitesse de balayage des potentiels est de 50 mV/s.

II. Essais avec eau de TAR

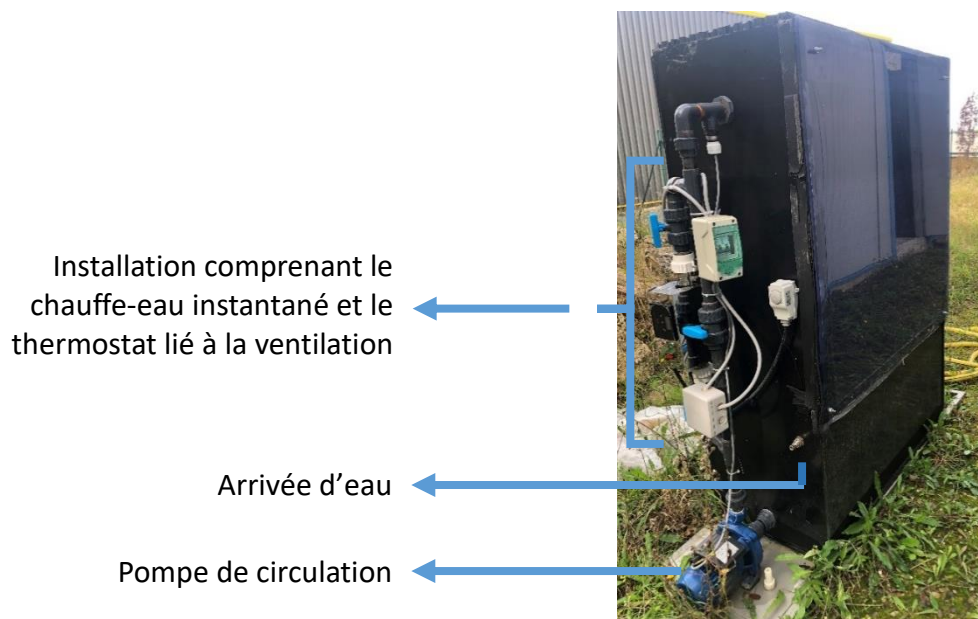
II.1 Présentation de la TAR prototype

Une TAR prototype à voie humide a été conçue, construite et mise en route en juin 2021 par l'entreprise partenaire Resonet Services afin de réaliser des essais avec l'eau en circulation. Le prototype, présenté ci-dessous (**Fig. IV.1**), possède les mêmes caractéristiques et principes de fonctionnement qu'une TAR réelle. La TAR prototype fait 98 cm de long, 45 cm de large et 185 cm de haut.

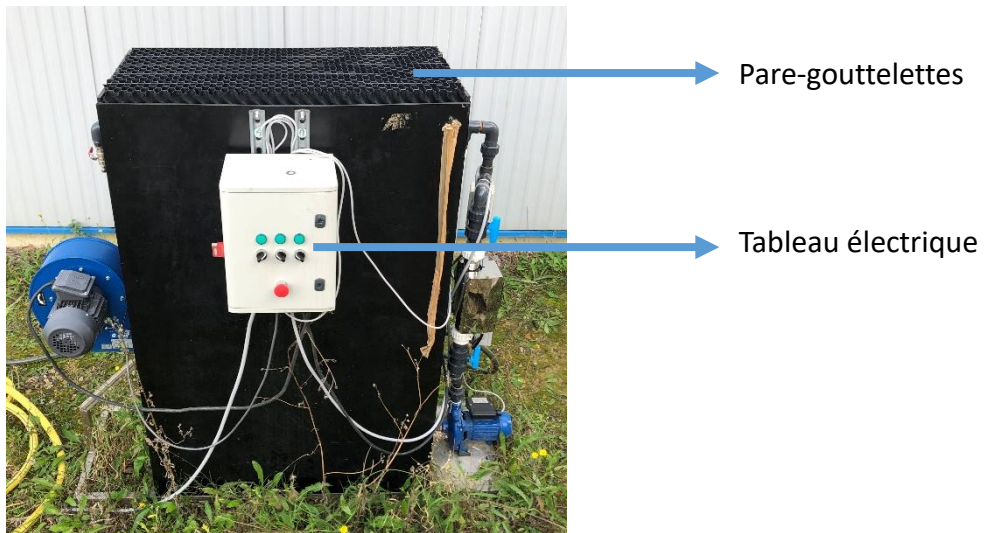
(a) Vue de droite



(b) Vue de gauche



(c) Vues de l'arrière et du dessus



(d) Vue de l'intérieur

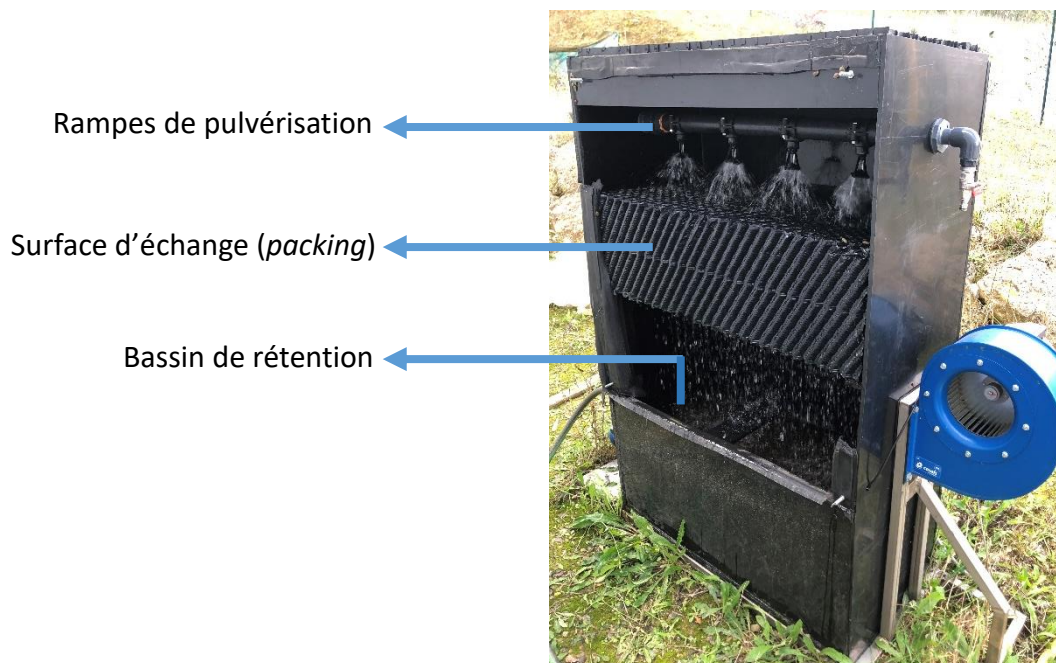


Figure IV.1. Présentation de la TAR prototype (a) vue de droite (b) vue de gauche (c) vue de l'arrière et du dessus (d) vue de l'intérieur.

La TAR est initialement alimentée en eau de ville pour remplir le bassin de rétention qui a une contenance de 154 L. Après le remplissage, l'eau se met à circuler vers le haut de la TAR grâce

à la pompe de circulation. Elle passe notamment par un conduit relié à un chauffe-eau instantané afin de mimer les températures retrouvées dans les TAR réelles (entre 25 et 45 °C). L'eau sort ensuite par les rampes de pulvérisation pour tomber sur la surface d'échange (*packing*) et ruisseler jusqu'au bassin de rétention. Puis, un nouveau cycle de circulation commence. Lorsque l'eau atteint la température limite fixée par le thermostat, le ventilateur situé en dessous du *packing* se met en route pour refroidir les gouttes tombantes. L'air rejeté est chargé en humidité et peut entraîner de fines gouttelettes. Il est évacué de la TAR par le pare-gouttelettes. Un appoint en eau, régulé par un flotteur dans le bassin de rétention, est réalisé de façon occasionnelle pour compenser les pertes dues à l'évaporation et à l'entraînement vésiculaire.

Les modules de contrôle et de protection des circuits électriques sont contenus dans le tableau électrique. Une sonde de mesure de pH installée dans le bassin de rétention est reliée à ce module. La valeur du pH de l'eau circulant dans la TAR est de 8,2.

Un robinet situé à la sortie des rampes de pulvérisation permet de prélever des échantillons d'eau. La TAR est mise en route au moins deux heures avant tout prélèvement, afin de permettre la réalisation de plusieurs cycles de refroidissement.

II.2 Analyse complète de l'eau

Avant de lancer des essais avec l'eau de la TAR, il est important de connaître la composition de cette eau. L'analyse a été réalisée par ICP-AES et par chromatographie ionique en se basant sur la liste des espèces fournie par Resonet Services, susceptibles d'être retrouvées dans les TAR. L'objectif de ce dosage est de déterminer la concentration des espèces potentiellement interférentes pouvant biaiser le dosage du Fe(II) et fer total par le capteur électrochimique. Les concentrations obtenues ont été comparées à une concentration en fer total de 2 µM qui correspond à la concentration minimale de notre gamme d'intérêt (2 à 10 µM). La **figure IV.2** indique le rapport de concentration obtenue pour chaque interférent (X) sur la concentration référence en fer total (2 µM).

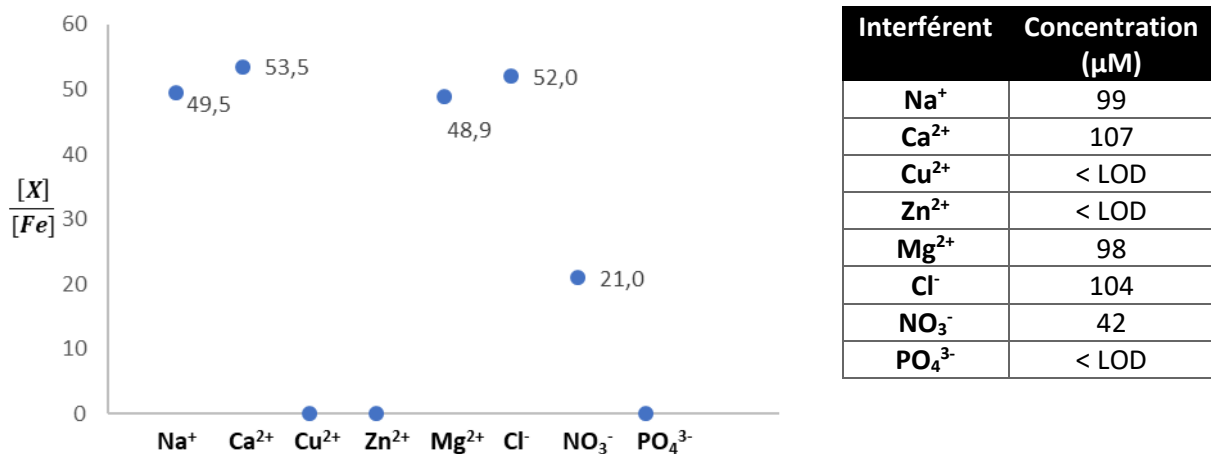


Figure IV.2. Graphique représentant le rapport de concentration de chaque interférent sur la concentration en fer total. A droite : Valeurs des concentrations de chaque interférent.

Dans l'eau de la TAR prototype, les concentrations en Cu^{2+} , Zn^{2+} et PO_4^{3-} sont très faibles (en dessous du nM) et ne sont pas détectables par ICP-AES ou par chromatographie ionique. Ces espèces ne gênent donc aucunement la détection du Fe(II) et du fer total par le capteur. Concernant les espèces Na^+ , Cl^- et NO_3^- , leur concentration est 49,5, 48,9 et 52 fois supérieure à la concentration de référence en fer, respectivement. Cependant, comme indiqué précédemment (**Chapitre II Fig. II.31**), de tels rapports de concentration n'engendrent pas de variation significative du signal d'oxydation de Fe^{2+} . En revanche, les rapports de concentration obtenus avec Ca^{2+} (53,5) et Mg^{2+} (48,9) devraient causer une baisse significative de la réponse du capteur.

II.3 Dosage du fer dans la TAR

Afin d'évaluer les performances analytiques du capteur en milieu réel, le dosage du Fe(II) et du fer total dans l'eau de TAR a été réalisé avec le protocole suivant :

- Ajout de fer dans l'eau de TAR

Etant donné la présence naturelle du fer dans les milieux aquatiques, la teneur en fer résiduelle a d'abord été déterminée dans l'eau de TAR par ICP-AES. Pour distinguer les formes du fer présentes (Fe(II) et Fe(III)), une analyse par spectrophotométrie a été réalisée en utilisant la 1,10-phénanthroline comme décrit dans la **partie III.1.2** du **chapitre 1**. Une concentration en fer total de 1 μM a été retrouvée par ICP-AES. L'analyse

spectrophotométrique a par ailleurs permis de confirmer que la totalité du fer retrouvée était sous forme Fe(III) uniquement.

Avant d'effectuer le dosage par l'électrode en CV/Nafion®, l'eau de TAR a été enrichie en fer afin de se rapprocher des concentrations en fer de notre gamme d'intérêt. 5 μM de Fe^{2+} sous forme FeSO_4 et 5 μM de Fe^{3+} sous forme de FeCl_3 ont été ajoutés dans le bassin de rétention de la TAR. Celle-ci a ensuite été mise en fonctionnement pendant deux heures pour permettre une bonne homogénéisation du Fe^{2+} et Fe^{3+} ajouté dans l'eau en circulation. Un échantillon d'eau d'un volume total de 2 L a ensuite été prélevé pour les dosages.

- Détermination de la concentration de Fe(II)

L'électrolyte support a été ajouté à 100 mL d'échantillon de façon à avoir une concentration de K_2SO_4 égale à 10 mM. La solution est ensuite acidifiée jusqu'à pH 3,7. La concentration en Fe^{2+} a ensuite été déterminée par la méthode des ajouts dosés. Des voltammogrammes cycliques sont tracés en faisant trois ajouts successifs d'ions Fe^{2+} à la concentration de 1,5 μM . Les courbes obtenues après chaque ajout sont illustrés dans la **figure IV.3**.

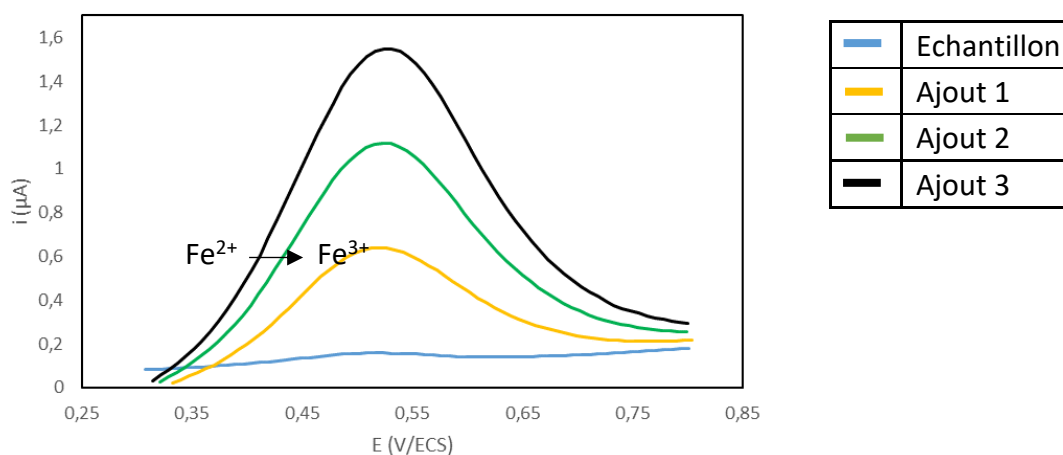


Figure IV.3. Voltammogrammes tracés avec l'électrode en CV/Nafion® dans K_2SO_4 10 mM (pH 3,7) après des ajouts successifs de Fe^{2+} dans un échantillon d'eau de TAR dopé en Fe(II) et Fe(III) ; temps de préconcentration = 10 min ; $v = 50$ mV/s.

Si un pic d'oxydation à 0,52 V/ECS pour l'échantillon seul est présent sur le voltammogramme, celui-ci est non mesurable en raison de sa très faible intensité. La teneur en Fe(II) dans l'échantillon ne peut donc pas être atteinte avec cette méthode car les ions Fe^{2+} sont présents

à une trop faible concentration. Ce résultat incite à penser que la totalité du Fe(II) ($\approx 100\%$) ajoutée dans la TAR a été oxydée en Fe(III).

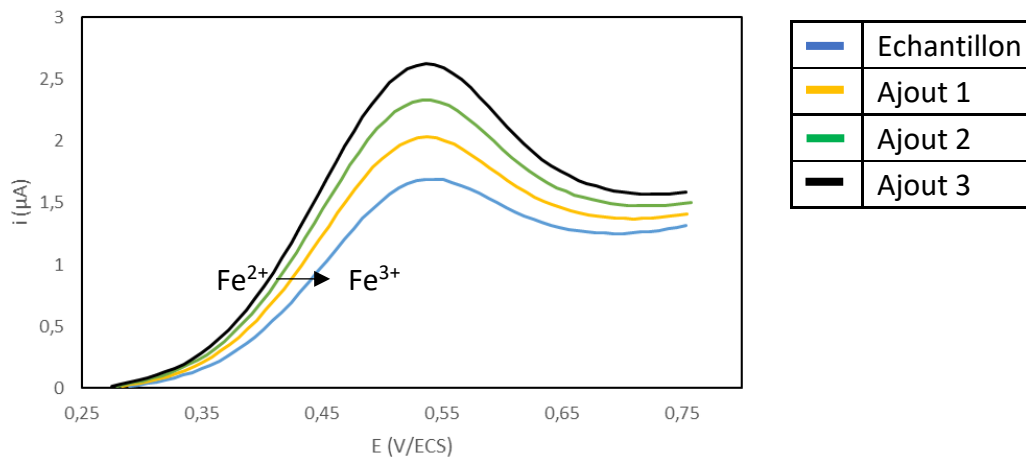
- Détermination de la concentration de Fe(III)

Afin de confirmer cette hypothèse, un dosage du fer total a été réalisé dans l'échantillon.

100 mL de l'échantillon sont acidifiés à un pH inférieur à 2 et un excès d'hydroxylamine (0,5 mM) est ensuite ajouté. L'échantillon est laissé sous agitation pendant 30 min pour réduire les ions Fe^{3+} en ions Fe^{2+} . L'électrolyte support K_2SO_4 est ensuite ajouté à la concentration de 10 mM et le pH est ramené à 3,7 par ajout de KOH concentré.

Des voltammogrammes cycliques sont tracés en faisant des ajouts successifs d'ions Fe^{2+} à la concentration de $1,5 \mu\text{M}$. Les courbes obtenues après chaque ajout et la droite d'étalonnage sont données dans la **figure IV.4**.

(a)



(b)

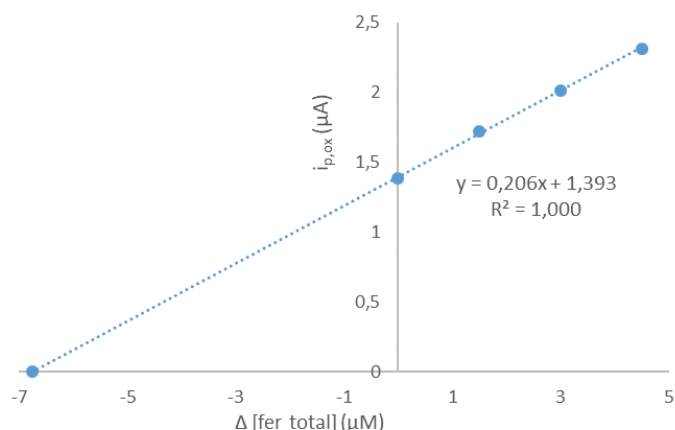


Figure IV.4. (a) Voltammogrammes tracés avec l'électrode en CV/Nafion® dans la solution de K_2SO_4 10 mM (pH 3,7) après des ajouts successifs de Fe^{2+} dans l'échantillon d'eau de TAR dopé en Fe(II) et Fe(III); temps de préconcentration = 10 min ; $v = 50$ mV/s. (b) Variation des intensités de pic d'oxydation en fonction des concentrations en Fe^{2+} ajoutées.

Les voltammogrammes tracés dans l'échantillon (**Fig IV.4.(a)**) présentent bien un pic d'oxydation de Fe^{2+} mesurable à 0,53 V/ECS contrairement à ce qui a été observé pour le dosage de Fe(II) seul (**Fig. IV.3**). A partir de la courbe des ajouts dosés, une concentration en fer total égale à 6,8 μM a été mesurée.

En enlevant la concentration en fer total résiduelle (1 μM) présente initialement dans l'eau de TAR, une concentration de fer total égale à 5,8 μM est obtenue. Considérant l'oxydation totale de Fe(II), cette valeur correspond à la concentration de Fe(III) uniquement.

L'échantillon d'eau de TAR a été analysé par ICP-AES et par spectrophotométrie afin de comparer les résultats à ceux du capteur électrochimique. Les valeurs sont rapportées dans les **tableaux IV.1(a)** et **IV.1(b)**.

(a)

	[Fer total] (μM)
ICP-AES	7,0
Electrode en CV/Nafion [®]	6,8 (TR = 97 %)

(b)

	[Fe(II)] (μM)	[Fer total] (μM)	[Fe(III)] calculée (μM)
Spectrophotométrie	Non-quantifiable	7,2	7,2
Electrode en CV/Nafion [®]	Non-quantifiable	6,8 (TR = 94 %)	6,8 (TR = 94 %)

Tableau IV.1. Concentrations en fer obtenues dans l'échantillon (a) par ICP-AES et par électrode en CV/Nafion[®] (b) par spectrophotométrie et par électrode en CV/Nafion[®]. TR : Taux de récupération.

Les concentrations en fer total obtenues par le capteur sont en accord avec celles obtenues par les méthodes de référence avec des taux de récupération allant de 94 à 97 %. De plus, les résultats de spectrophotométrie confirment l'absence de Fe(II) dans l'échantillon ; le fer est bien sous forme Fe(III) uniquement. Ces résultats démontrent la justesse du capteur en milieu réel. Enfin, la présence de Mg^{2+} et Ca^{2+} dans l'eau de TAR n'a pas d'impact sur le dosage du fer.

Il faut noter que tant les résultats issus des méthodes de référence que ceux produits par le capteur électrochimique ne sont pas en accord avec la quantité totale de fer présente dans l'eau de TAR enrichie. En effet, préalablement aux dosages, l'eau de TAR a au total été enrichie avec $5 \mu\text{M}$ de Fe^{2+} et $5 \mu\text{M}$ de Fe^{3+} , ce qui aboutit à une concentration en fer total égale à $11 \mu\text{M}$ en considérant la quantité de fer naturellement présente dans l'eau. Or les analyses indiquent une concentration en fer total égale à $6,8 \mu\text{M}$. Dans nos conditions, tout le Fe(II) ajouté est rapidement oxydé en Fe(III) après deux heures car en plus d'être en contact avec l'air ambiant en permanence, le ventilateur de la TAR entraîne un apport d'oxygène considérable lorsqu'il est déclenché^[251]. Au pH de l'eau de la TAR (pH = 8,2), le Fe(III) n'est pas sous forme ionique libre. Selon un calcul réalisé par le logiciel *Visual MINTEQ*, le Fe(III) se retrouve soit sous forme précipitée $[\text{Fe}(\text{OH})_3]$ ou complexée $[\text{Fe}(\text{OH})_2^+]$ et $[\text{Fe}(\text{OH})_4^-]$. Du fait de

son insolubilité, il est probable que le précipité d'hydroxyde de fer(III) se retrouve en bas du bassin de rétention, dans le *packing* ou dans la tuyauterie de la TAR. De ce fait, lors du prélèvement de l'échantillon, seules les formes complexées solubles ont été récoltées et détectées. Ceci peut expliquer la différence entre la concentration en fer total « réelle » dans la TAR (11 μM) et la concentration en fer total mesurée dans l'échantillon d'eau prélevé (6,8 μM).

III. Conclusion

Ce chapitre avait pour but d'évaluer les performances analytiques du capteur électrochimique à fer dans une eau de TAR.

La TAR prototype a été conçue, élaborée et mise en route. La composition de l'eau circulante a été déterminée par ICP-AES et par chromatographie ionique afin d'évaluer l'effet possible des interférents. L'eau de TAR a été enrichie en fer et des dosages de Fe(II) et fer total ont été réalisés. Tous les résultats montrent qu'il n'y a pas de Fe(II) car la présence de l'air ambiant et la ventilation entraînent son oxydation rapide en Fe(III). La détermination du fer total a permis de trouver une concentration de 6,8 μM en totalité sous forme de Fe(III). Les concentrations obtenues par l'électrode en CV/Nafion[®] sont en accord avec celles obtenues par les méthodes de références avec des taux de récupération supérieurs à 90 %. Cela confirme la justesse du capteur à fer en milieu réel et l'absence de l'impact du Mg^{2+} et Ca^{2+} sur le dosage électrochimique. Toutefois, seule une partie du fer est détectée en solution, une autre partie étant sous forme de précipité $\text{Fe}(\text{OH})_3$ au pH de l'eau circulante (= 8,2).

Discussion

Les analyses effectuées sur l'eau contenue dans le prototype de TAR et présentées dans le **chapitre IV** ont démontré la présence du fer sous forme Fe(III) uniquement. Cette observation est logique du fait des conditions d'oxygénation maintenues dans la TAR. Par conséquent, il est probable que le Fe(III) soit la forme majoritaire dans les TAR à voie humide. En effet, la bibliographie montre que dans les milieux aquatiques oxygénés, la présence de Fe(III) prédomine car le Fe(II), étant thermodynamiquement instable en présence d'oxygène, s'oxyde rapidement^[109]. Il a aussi été rapporté qu'une partie seulement du Fe(III) présent est dissoute dans l'eau du fait de sa complexation avec les groupements hydroxyles comme dans l'eau de la TAR prototype^[252–254].

Par ailleurs, plusieurs études ont démontré que la présence accrue de *Lp* dans les systèmes d'eau chaude comme les TAR est associée à des concentrations en fer total supérieures à 1,3 μM ^[129–131]. Cependant, ces données concernent une corrélation entre le fer et les *Lp* planctoniques. Or si les bactéries sont sous forme libre dans ces eaux-là, elles proviennent majoritairement du détachement des biofilms qu'elles colonisent^[71,255]. Cependant, peu de données existent sur le rôle du fer sur *Lp* contenus dans les biofilms. Notre étude a permis d'appréhender la relation *Lp*/fer en lien avec le biofilm mono-espèce de *Lp*.

Les résultats présentés dans le **chapitre IV** démontrent qu'en présence de fer à des concentrations micromolaires dans les TAR, les bactéries se retrouveront dans une eau contenant Fe(III) majoritairement. En extrapolant les observations du **chapitre III** et en prenant en considération que l'eau de TAR est pauvre en nutriments, une des hypothèses est qu'une partie des bactéries du biofilm transitent vers la phase VBNC. Il a d'ailleurs été montré dans la bibliographie que les facteurs retrouvés dans les systèmes d'eaux artificiels tels que le manque de nutriments ou la présence de désinfectants chimiques peuvent induire le passage de *Lp* vers le mode VBNC^[79,256]. Pour continuer à persister dans les TAR en conditions de stress, il est possible que les bactéries du biofilm passent à l'état VBNC comme stratégie de survie. Elles peuvent aussi se détacher ou rester dans des biofilms pour aller infecter des amibes potentiellement présentes et se multiplier en leur sein^[81] en attendant des conditions favorables pour envahir à nouveau l'eau de TAR et coloniser les surfaces. D'ailleurs, il a été démontré que leur passage dans les amibes augmente leur capacité à sécréter des polysaccharides. Cela leur permet de coloniser ou d'établir rapidement des biofilms une fois sorties^[70].

La méthode de détection de *Lp* utilisée couramment sur les eaux de TAR, qui suit les recommandations en termes de maîtrise des TAR, est basée sur la technique de dénombrement sur gélose à partir d'un échantillon d'eau. Cette technique est inadaptée pour la détection de cellules VBNC d'autant plus que ces dernières peuvent persister pendant de longues périodes pouvant dépasser 4 mois même si les eaux sont traitées^[82]. Par ailleurs, la nature du prélèvement (eau des TAR) ne prend pas en compte des bactéries *Lp* présentes sous forme de biofilms, y compris sous forme VBNC au sein de ces biofilms, que ce soit libres ou intra-amibiennes. Ainsi, la population de *Lp* dans les TAR est sous-estimée. Des techniques telles que la cytométrie en flux ou la v-qPCR ont la capacité de détecter des bactéries VBNC. Toutefois, ces méthodes font usage de réactifs et d'appareillage conséquents et ne permettent pas de détections en temps réels^[79] à partir d'échantillons d'eau de TAR. Par ailleurs, la détection des bactéries VBNC au niveau des biofilms nécessite la validation de conditions de prélèvements « standardisées ».

En ce qui concerne la partie biofilm à *Lp* et fer, lors de nos essais, nous avons mis en évidence que l'augmentation de la concentration en fer dans le milieu se traduit par une diminution drastique de la population viable cultivable de *Lp*. Une hypothèse pourrait être le passage sous forme VBNC d'une partie de la population du biofilm. Ceci conduirait alors à la création d'un réservoir non détecté et difficilement détectable pouvant conduire, lors de la modification du milieu environnant (notamment la baisse de la teneur en fer), à une revivification sous forme cultivable.

Le capteur électrochimique à fer développé au cours de cette thèse peut représenter un mode de détection plus adapté et plus rapide, pour suivre l'évolution ou du moins le risque d'évolution de la population réelle de *Lp* dans les TAR en contrôlant la concentration en Fe(III) à des concentrations μM notamment. Il serait donc un outil « lanceur d'alerte » pour réaliser une désinfection adéquate ou effectuer un suivi de la population de *Lp* dans la TAR. La détection d'une concentration croissante en Fe(III) pourrait indiquer une baisse de la population cultivable de *Lp* dans les biofilms avec présence accrue de cellules VBNC ou mortes dans l'eau. En revanche, une tendance à la baisse de la concentration en Fe(III) pourrait démontrer un risque d'augmentation de la population de *Lp* dans les biofilms, avec également un risque de présence d'un grand nombre de cellules viables et cultivables pouvant être relarguées dans l'eau. Toutefois, ce mode de détection est encore à un stade préliminaire dans

la TAR. Afin de l'optimiser, une relation doit être trouvée entre l'évolution des différentes formes de la population totale de Lp et les différentes concentrations micromolaires en Fe(III) dans les eaux de TAR.

Conclusion générale et perspectives

Les travaux présentés dans ce manuscrit avaient pour but de proposer un procédé innovant pour la maîtrise du risque *Lp* dans les TAR afin d'avoir un usage des produits biocides plus rationnel et plus respectueux de l'environnement. Pour ce faire, nous avons effectué un suivi continu de la concentration micromolaire (de 2 à 10 μM précisément) en Fe(III) et Fe(II) dans l'eau de TAR à l'aide d'un capteur électrochimique. La mesure de leur concentration permettrait de surveiller les risques de changements de comportement de *Lp* et de lancer un traitement adéquat en biocides si besoin.

Dans un premier temps, un capteur ampérométrique à fer a été développé, basé sur une électrode en carbone vitreux fonctionnalisée par un film de Nafion[®] déposé par *drop casting*. L'interface CV/Nafion[®] a été caractérisée par FTIR, par profilométrie optique et par voltammétrie cyclique impliquant des sondes redox. Les résultats ont confirmé la présence du Nafion[®] à la surface de l'électrode avec un dépôt relativement reproductible d'une électrode à l'autre. Un protocole de détection des ions Fe²⁺ couplant la voltammétrie cyclique à une étape de préconcentration à courant nul a été établi et optimisé. La mesure de la concentration en Fe²⁺ et en Fe³⁺ a été validée dans la gamme de concentration visée (2 à 10 μM). Dans le cas de l'analyse des ions Fe³⁺, l'emploi du réducteur hydroxylamine a permis de réduire la totalité de Fe³⁺ en Fe²⁺ préalablement à la détection électrochimique. L'étude de l'interface solution/Nafion[®]-électrode a mis en évidence le phénomène de diffusion des ions Fe²⁺ dans le film de Nafion[®] limitant la vitesse de la réaction électrochimique, de façon plus ou moins prépondérante suivant la vitesse de balayage des potentiels. En ce qui concerne les performances analytiques, les travaux ont montré que la sensibilité du capteur est suffisante pour doser Fe²⁺ et Fe³⁺ dans la gamme de concentration d'intérêt avec une répétabilité et une reproductibilité satisfaisante. Enfin, l'examen de la sélectivité du capteur en présence d'espèces potentiellement interférentes régulièrement trouvées dans les TAR a aussi donné de bons résultats, puisqu'une modification significative de la réponse du capteur n'est observée que pour des concentrations en cations divalents 100 fois supérieures à celle de Fe(II) et de Fe(III).

La deuxième partie des travaux concerne l'étude de l'interaction *Lp*/fer impliquant la mise en application d'un biofilm mono-espèce de *Lp* dans un milieu peu nutritif sur 9 jours. L'influence du Fe(III) sur le biofilm a pu être déterminée avec une certaine précision : en sa présence, le biofilm présente un aspect aérien avec une base cellulaire fine. Au fil des jours, la population

de *Lp* diminue au sein du biofilm et transite vers la mort et/ou un état VBNC. Toutefois, il semble que la viabilité et la cultivabilité des bactéries augmentent lorsque la teneur en Fe(III) atteint la gamme de concentration d'intérêt. L'impact du Fe(II) est plus compliqué à définir en raison de son oxydation spontanée en milieu aérobie. Aussi, des biofilms ont été formés en anaérobiose afin de minimiser cette réaction d'oxydation. Une majorité de bactéries mortes ou dans un état VBNC est à nouveau observée dans le biofilm à J 9. Toutefois, à concentrations égales, la viabilité et la cultivabilité de *Lp* paraissent mieux préservées en présence de Fe(II) qu'en présence de Fe(III).

Enfin, le capteur à fer a été testé dans un prototype de TAR comme nouveau procédé de surveillance des concentrations en Fe(II) et Fe(III) et potentiellement des populations de *Lp*. La justesse du capteur s'est révélée très satisfaisante pour la détermination de la concentration en Fe(III) et en fer total avec des taux de récupération compris entre 94 % et 97 %. Par ailleurs, le Fe(II) n'a pas été détecté en raison de son oxydation complète engendrée par l'air ambiant et la ventilation de la TAR.

En conclusion de ces travaux, l'emploi du capteur à fer semble très prometteur comme procédé de maîtrise du risque *Lp* impliquant la surveillance du comportement de la population de *Lp* dans les TAR. Même si les résultats doivent, au moins pour la partie microbiologie, être considérés comme préliminaires, plusieurs perspectives peuvent être dégagées à divers niveaux.

Une meilleure estimation expérimentale des valeurs de LOD et LOQ du capteur à fer est nécessaire. Pour ce faire, des étalonnages de Fe²⁺ et de Fe³⁺ pourraient être effectués pour des concentrations comprises entre 1 nM et 1 µM par exemple en conservant le même protocole de détection. Il serait aussi essentiel d'évaluer la durée de vie opérationnelle du capteur à fer pour son utilisation potentielle en continu ou semi- continu dans une TAR. En effet, un suivi de la concentration en fer implique un certain nombre de mesures quotidiennes. Des dosages à des intervalles réguliers d'une même solution contenant une concentration donnée en Fe(II) et en Fe(III) permettraient de déterminer le nombre de mesures possibles avec le même capteur. Cela peut être réalisé dans un premier temps dans un milieu synthétique puis dans l'eau de la TAR prototype. A court terme, il serait intéressant d'intégrer

le capteur à fer dans la TAR prototype et concevoir une boucle d'échantillonnage permettant le dosage de Fe(II) et de fer total en ligne.

Afin de mieux définir le rôle du Fe(II) et du Fe(III) sur l'évolution du comportement de *Lp*, des essais complémentaires doivent être réalisés :

- L'évolution de la concentration en Fe(II) et en Fe(III) pourrait être déterminée dans le milieu de culture en présence des bactéries entre J 0 et J 9. Cela permettrait aussi d'évaluer la consommation du fer par *Lp*.
- L'impact du Fe(II) et du Fe(III) doit être étudié sur les bactéries planctoniques qui sont, dans notre modèle, mais également en conditions réelles, relarguées des biofilms de *Lp*. Le suivi de ces populations peut se faire en dénombrant les UG et les UFC.
- Les biofilms sont majoritairement constitués de bactéries mortes ou dans un état VBNC. Afin de définir la proportion de cellules mortes par rapport à celles en état VBNC, la *viability* qPCR (v-qPCR) peut être employée, qui consiste en un traitement préalable des suspensions bactériennes par le monoazoture d'éthidium. Il réagit avec l'ADN extracellulaire ou provenant des cellules endommagées/mortes et ces derniers ne sont pas amplifiés lors de la PCR. Par conséquent, seules les cellules viables pourront être détectées et quantifiées. La v-qPCR pourrait aussi être réalisée sur la population de cellules planctoniques relarguées dans le milieu de culture.
- Des essais de revivification des bactéries en état VBNC pourraient aussi être envisagés en effectuant une co-culture avec des amibes. Cela pourrait démontrer que cet état VBNC lié à la présence de Fe(II) ou Fe(III), est une stratégie de survie dans l'optique de redevenir viable et cultivable et par conséquent, présenter un potentiel infectieux.

Une dernière phase pourrait concerner le suivi des paramètres chimiques et microbiologiques de l'eau de TAR. En fonction des essais complémentaires proposés sur l'influence de Fe(II) et Fe(III) sur le comportement de *Lp*, un suivi de TAR en fonctionnement pourrait être réalisé, voire une contamination artificielle de la TAR mise au point avec la Société Resonet Services. Le suivi de la concentration en fer et du statut de la population *Lp* permettrait de valider le concept initial et son intérêt pour une meilleure évaluation du risque *Lp*.

Références bibliographiques

1. McDade, J.E.; Shepard, C.C.; Fraser, D.W.; Tsai, T.R.; Redus, M.A. Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *The New England Journal of Medicine* 1977, 297(22), 1197–1203.
2. Brenner, D.J.; Steigerwalt, A.G.; McDade, J.E. Classification of the Legionnaires' Disease Bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the Family Legionellaceae, familia nova. *Annals of Internal Medicine American College of Physicians*: 1979, 90(4), 656–658.
3. Lück, P.C.; Steinert, M. Pathogenese, diagnostik und therapie der *Legionella*-infektion. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 2006, 49(5), 439–449.
4. Winn, W.C. Legionnaires disease: historical perspective. *Clinical Microbiology Reviews* 1988, 1(1), 60–81.
5. Miyashita, N.; Higa, F.; Aoki, Y.; Kikuchi, T.; Seki, M.; Tateda, K.; et al. Distribution of *Legionella* species and serogroups in patients with culture-confirmed *Legionella* pneumonia. *Journal of Infection and Chemotherapy* 2020, 26(5), 411–417.
6. Fields, B.S.; Benson, R.F.; Besser, R.E. *Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. *Clinical Microbiology Reviews* 2002, 15(3), 506–526.
7. Santé Publique France. Bilan des cas de légionellose survenus en France en 2019. 2020, <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-et-infections-respiratoires/legionellose/articles/bilan-des-cas-de-legionellose-survenus-en-france-en-2019> (Jul 18 2021).
8. Chaabna, Z. Effets de deux procédés de traitement des tours aéro réfrigérantes vis-à-vis du développement des biofilms : cas particulier des légionnelles et des amibes. (Thèse de doctorat) Université de Grenoble: Grenoble, 2013.
9. Oliva, G. Regulatory circuits involved in *Legionella pneumophila* virulence : the role of Hfq and the cis-encoded sRNA Anti-hfq. (These de doctorat) Université Pierre et Marie Curie: Paris, 2016.
10. Benson, R.F.; Fields, B.S. Classification of the genus *Legionella*. *Seminars in Respiratory Infections* 1998, 13(2), 90–99.
11. Moss, C.W.; Weaver, R.E.; Dees, S.B.; Cherry, W.B. Cellular fatty acid composition of isolates from Legionnaires disease. *Journal of Clinical Microbiology* 1977, 6(2), 140–143.

12. Feeley, J.C.; Gorman, G.W.; Weaver, R.E.; Mackel, D.C.; Smith, H.W. Primary isolation media for Legionnaires disease bacterium. *Journal of Clinical Microbiology* 1978, 8(3), 320–325.
13. Konishi, T.; Yamashiro, T.; Koide, M.; Nishizono, A. Influence of temperature on growth of *Legionella pneumophila* biofilm determined by precise temperature gradient incubator. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2006, 101(6), 478–484.
14. Fukunaga, H.; Akagi, K.; Yabuuchi, E. Asymptomatic infection of *Legionella pneumophila* in four cases with pulmonary diseases. *Nihon Saikingaku Zasshi. Japanese Journal of Bacteriology* 1990, 45(5), 833–840.
15. Chitasombat, M.N.; Ratchatanawin, N.; Visessiri, Y. Disseminated extrapulmonary *Legionella pneumophila* infection presenting with panniculitis: case report and literature review. *BMC Infectious Diseases* 2018, 18, 467.
16. Pancer, K.; Stypułkowska-Misiurewicz, H. Pontiac fever-non-pneumonic legionellosis. *Przegląd Epidemiologiczny* 2003, 57(4), 607–612.
17. Glick, T.H.; Gregg, M.B.; Berman, B.; Mallison, G.; Rhodes, W.W.; Kassanoff, I. Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *American Journal of Epidemiology* 1978, 107(2), 149–160.
18. Fraser, D.W.; Deubner, D.C.; Hill, D.L.; Gilliam, D.K. Nonpneumonic, short-incubation-period Legionellosis (Pontiac fever) in men who cleaned a steam turbine condenser. *Science* 1979, 205(4407), 690–691.
19. Diederer, B.M.W. *Legionella spp.* and Legionnaires' disease. *Journal of Infection* 2008, 56(1), 1–12.
20. Fields, B.S.; Benson, R.F.; Besser, R.E. *Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. *Clinical Microbiology Reviews* 2002, 15(3), 506–526.
21. Benhamou, D.; Bru, J.-P.; Chidiac, C.; Etienne, J.; Léophonte, P.; Marty, N.; et al. Legionnaire's disease: definition, diagnosis and treatment. *Mèdecine Et Maladies Infectieuses* 2005, 35(1), 1–5.
22. Santé Publique France. Légionellose. 2021, <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-et-infections-respiratoires/legionellose> (Jul 17 2021).

23. Vogrin, A.J.; Hartland, E.L. Pathogenesis of *Legionella pneumophila* in Humans. In Human Emerging and Re-emerging Infections; John Wiley & Sons, Ltd: Hoboken, 2015, 575–590.
24. Stout, J.E.; Yu, V.L. Legionellosis. *New England Journal of Medicine* 1997, 337(10), 682–687.
25. Yu, V.L.; Lee, T.C. Neonatal legionellosis: The tip of the iceberg for pediatric hospital-acquired pneumonia?. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2010, 29(3), 282–284.
26. Baron, P.A.; Willeke, K. Respirable droplets from whirlpools: measurements of size distribution and estimation of disease potential. *Environmental Research* 1986, 39(1), 8–18.
27. Druett, H.A.; Henderson, D.W.; Packman, L.; Peacock, S. Studies on respiratory infection. I. The influence of particle size on respiratory infection with anthrax spores. *The Journal of Hygiene* 1953, 51(3), 359–371.
28. Harper, G.J.; Morton, J.D. The respiratory retention of bacterial aerosols: experiments with radioactive spores. *The Journal of Hygiene* 1953, 51(3), 372–385.
29. Borges, V.; Nunes, A.; Sampaio, D.A.; Vieira, L.; Machado, J.; Simões, M.J.; et al. *Legionella pneumophila* strain associated with the first evidence of person-to-person transmission of Legionnaires' disease: a unique mosaic genetic backbone. *Scientific Reports* 2016, 6(1), 26261.
30. Cianciotto, N.P. Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. *International Journal of Medical Microbiology* 2001, 291(5), 331–343.
31. Franco, I.; Shuman, H.; Charpentier, X. The perplexing functions and surprising origins of *Legionella pneumophila* type IV secretion effectors. *Cellular microbiology* 2009, 11, 1435–43.
32. Horwitz, M.A. Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: Engulfment within a Pseudopod coil. *Cell* 1984, 36(1), 27–33.
33. Horwitz, M.A. Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 1983, 158(4), 1319–1331.

34. Horwitz, M.A. The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 1983, 158(6), 2108–2126.
35. Tilney, L.G.; Harb, O.S.; Connelly, P.S.; Robinson, C.G.; Roy, C.R. How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. *Journal of Cell Science* 2001, 114(24), 4637–4650.
36. Shin, S.; Roy, C.R. Host cell processes that influence the intracellular survival of *Legionella pneumophila*. *Cellular Microbiology* 2008, 10(6), 1209–1220.
37. Sturgill-Koszycki, S.; Swanson, M.S. *Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. *The Journal of Experimental Medicine* 2000, 192(9), 1261–1272.
38. Abu Kwaik, Y. The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum. *Applied and Environmental Microbiology* 1996, 62(6), 2022–2028.
39. Molofsky, A.B.; Swanson, M.S. Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Molecular Microbiology* 2004, 53(1), 29–40.
40. Rasis, M.; Segal, G. The LetA-RsmYZ-CsrA regulatory cascade, together with RpoS and PmrA, post-transcriptionally regulates stationary phase activation of *Legionella pneumophila* Icm/Dot effectors. *Molecular Microbiology* 2009, 72(4), 995–1010.
41. Sahr, T.; Brüggemann, H.; Jules, M.; Lomma, M.; Albert-Weissenberger, C.; Cazalet, C.; et al. Two small ncRNAs jointly govern virulence and transmission in *Legionella pneumophila*. *Molecular Microbiology* 2009, 72(3), 741–762.
42. Alli, O.A.T.; Gao, L.Y.; Pedersen, L.L.; Zink, S.; Radulic, M.; Doric, M.; et al. Temporal pore formation-mediated egress from macrophages and alveolar epithelial cells by *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity* 2000, 68(11), 6431–6440.
43. Gao, L.Y.; Abu Kwaik, Y. Activation of caspase 3 during *Legionella pneumophila*-induced apoptosis. *Infection and Immunity* 1999, 67(9), 4886–4894.
44. Steinert, M.; Hentschel, U.; Hacker, J. *Legionella pneumophila*: An aquatic microbe goes astray. *FEMS microbiology reviews* 2002, 26, 149–62.
45. Zhan, X.Y.; Hu, C.H.; Zhu, Q.Y. *Legionella* pathogenesis and virulence factors. *Annals of Clinical and Laboratory Research iMedPub*: 2015, 3(2).

46. Fliermans, C.B.; Cherry, W.B.; Orrison, L.H.; Smith, S.J.; Tison, D.L.; Pope, D.H. Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology* 1981, 41(1), 9–16.
47. Costa, J.; Tiago, I.; da Costa, M.S.; Veríssimo, A. Presence and persistence of *Legionella spp.* in groundwater. *Applied and Environmental Microbiology American Society for Microbiology*: 2005, 71(2), 663–671.
48. Taylor, M.; Ross, K.; Bentham, R. *Legionella*, protozoa, and biofilms: interactions within complex microbial systems. *Microbial Ecology* 2009, 58(3), 538–547.
49. Orkis, L.T.; Harrison, L.H.; Mertz, K.J.; Brooks, M.M.; Bibby, K.J.; Stout, J.E. Environmental sources of community-acquired Legionnaires' disease: A review. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2018, 221(5), 764–774.
50. Katz, S.M.; Hammel, J.M. The effect of drying, heat, and pH on the survival of *Legionella pneumophila*. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 1987, 17(3), 150–156.
51. Stout, J.E.; Yu, V.L.; Muraca, P. Isolation of *Legionella pneumophila* from the cold water of hospital ice machines: implications for origin and transmission of the organism. *Infection control* 1985, 6(4), 141–146.
52. Principe, L.; Tomao, P.; Visca, P. Legionellosis in the occupational setting. *Environmental Research* 2017, 152, 485–495.
53. Herwaldt, L.A.; Marra, A.R. *Legionella*: a reemerging pathogen. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2018, 31(4), 325–333.
54. Fabbi, M.; Pastoris, M.C.; Scanziani, E.; Magnino, S.; Di Matteo, L. Epidemiological and environmental investigations of *Legionella pneumophila* infection in cattle and case report of fatal pneumonia in a calf. *Journal of Clinical Microbiology* 1998, 36(7), 1942–1947.
55. Mondino, S.; Schmidt, S.; Rolando, M.; Escoll, P.; Gomez-Valero, L.; Buchrieser, C. Legionnaires' disease: state of the art knowledge of pathogenesis mechanisms of *Legionella*. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 2020, 15(1), 439–466.
56. Barker, J.; Brown, M.R. Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology* 1994, 140(6), 1253–1259.
57. Molmeret, M.; Horn, M.; Wagner, M.; Santic, M.; Abu Kwaik, Y. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 2005, 71(1), 20–28.

58. Guerrieri, E.; Bondi, M.; Ciancio, C.; Borella, P.; Messi, P. Micro- and macromethod assays for the ecological study of *Legionella pneumophila*. *FEMS microbiology letters* 2005, 252(1), 113–119.
59. Borella, P.; Guerrieri, E.; Marchesi, I.; Bondi, M.; Messi, P. Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives. *Biotechnology Annual Review* 2005, 11, 355–380.
60. Brieland, J.K.; Fantone, J.C.; Remick, D.G.; LeGendre, M.; McClain, M.; Engleberg, N.C. The role of *Legionella pneumophila*-infected *Hartmannella vermiformis* as an infectious particle in a murine model of Legionnaire's disease. *Infection and Immunity* 1997, 65(12), 5330–5333.
61. Pagnier, I.; Merchat, M.; Scola, B.L. Potentially pathogenic amoeba-associated microorganisms in cooling towers and their control. *Future Microbiology* 2009, 4(5), 615–629.
62. Costerton, J.W.; Stewart, P.S.; Greenberg, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999, 284(5418), 1318–1322.
63. Richards, J.J.; Melander, C. Controlling bacterial biofilms. *Chembiochem* 2009, 10(14), 2287–2294.
64. Flemming, H.C.; Wingender, J. The biofilm matrix. *Nature Reviews. Microbiology* 2010, 8(9), 623–633.
65. Díez, B.; Rosal, R. A critical review of membrane modification techniques for fouling and biofouling control in pressure-driven membrane processes. *Nanotechnology for Environmental Engineering* 2020, 5(15).
66. Samrakandi, M.M.; Roques, C.; Michel, G. Sporocidic activity of sodium hypochlorite and peracetic acid alone or combined against free or fixed spores or on biofilm. *Pathologie-Biologie* 1994, 42(5), 432–437.
67. Tremblay, Y.D.N.; Hathroubi, S.; Jacques, M. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2014, 78(2), 110–116.
68. Stewart, C.R.; Muthye, V.; Cianciotto, N.P. *Legionella pneumophila* persists within biofilms formed by *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium sp.*, and *Pseudomonas fluorescens* under dynamic flow conditions. *PloS One* 2012, 7(11), 50560.

69. Rogers, J.; Keevil, C.W. Immunogold and fluorescein immunolabelling of *Legionella pneumophila* within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 1992, 58(7), 2326–2330.
70. Bigot, R.; Bertaux, J.; Frere, J.; Berjeaud, J.-M. Intra-amoeba multiplication induces chemotaxis and biofilm colonization and formation for *Legionella*. *PLOS ONE* 2013, 8(10), e77875.
71. Rogers, J.; Dowsett, A.B.; Dennis, P.J.; Lee, J.V.; Keevil, C.W. Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. *Applied and Environmental Microbiology* 1994, 60(5), 1585–1592.
72. Pécastaings, S.; Bergé, M.; Dubourg, K.M.; Roques, C. Sessile *Legionella pneumophila* is able to grow on surfaces and generate structured monospecies biofilms. *Biofouling* Taylor & Francis: 2010, 26(7), 809–819.
73. Pécastaings, S.; Roques, C. Production of *L. pneumophila* Monospecies Biofilms in a Low-Nutrient-Concentration Medium. In *Legionella: Methods and Protocols*; C. Buchrieser, H. Hilbi, Eds.; Humana Press: Totowa, 2013, 219–224.
74. Pécastaings, S.; Allombert, J.; Lajoie, B.; Doublet, P.; Roques, C.; Vianney, A. New insights into *Legionella pneumophila* biofilm regulation by c-di-GMP signaling. *Biofouling* 2016, 32(8), 935–948.
75. Xu, H.-S.; Roberts, N.; Singleton, F.L.; Attwell, R.W.; Grimes, D.J.; Colwell, R.R. Survival and viability of non culturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial Ecology* 1982, 8(4), 313–323.
76. Oliver, J.D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 2010, 34(4), 415–425.
77. Fakruddin, M.; Mannan, K.S.B.; Andrews, S. Viable but nonculturable bacteria: food safety and public health perspective. *ISRN microbiology* 2013, 2013, 703813.
78. Hussong, D.; Colwell, R.R.; O'Brien, M.; Weiss, E.; Pearson, A.D.; Weiner, R.M.; et al. Viable *Legionella pneumophila* Not Detectable by Culture on Agar Media. *Bio/Technology* 1987, 5(9), 947–950.
79. Kirschner, A. Determination of viable *legionellae* in engineered water systems: Do we find what we are looking for? *Water Research* 2016, 93.

80. Ducret, A.; Chabali er, M.; Dukan, S. Characterization and resuscitation of “non-culturable” cells of *Legionella pneumophila*. BMC Microbiology 2014, 14(1), 3.
81. Steinert, M.; Em ody, L.; Amann, R.; Hacker, J. Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. Applied and Environmental Microbiology 1997, 63(5), 2047–2053.
82. Alleron, L.; Merlet, N.; Lacombe, C.; Fr ere, J. Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment. Current Microbiology 2008, 57(5), 497–502.
83. Dusserre, E.; Ginevra, C.; Hallier-Soulier, S.; Vandenesch, F.; Festoc, G.; Etienne, J.; et al. A PCR-based method for monitoring *Legionella pneumophila* in water samples detects viable but noncultivable *Legionellae* that can recover their cultivability. Applied and Environmental Microbiology 2008, 74(15), 4817–4824.
84. Garc ia, M.T.; Jones, S.; Pelaz, C.; Millar, R.D.; Abu Kwaik, Y. *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. Environmental Microbiology 2007, 9(5), 1267–1277.
85. Epalle, T.; Girardot, F.; Allegra, S.; Maurice-Blanc, C.; Garraud, O.; Riffard, S. Viable but not culturable forms of *Legionella pneumophila* generated after heat shock treatment are infectious for macrophage-like and alveolar epithelial cells after resuscitation on *Acanthamoeba polyphaga*. Microbial Ecology 2015, 69(1), 215–224.
86. Ramamurthy, T.; Ghosh, A.; Pazhani, G.P.; Shinoda, S. Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. Frontiers in Public Health 2014, 2, 103.
87. Chang, B.; Sugiyama, K.; Taguri, T.; Amemura-Maekawa, J.; Kura, F.; Watanabe, H. Specific detection of viable *Legionella* cells by combined use of photoactivated ethidium monoazide and PCR/Real-time PCR. Applied and Environmental Microbiology 2009, 75(1), 147–153.
88. Delgado-Viscogliosi, P.; Solognac, L.; Delattre, J.-M. Viability PCR, a culture-independent method for rapid and selective quantification of viable *Legionella pneumophila* cells in environmental water samples. Applied and Environmental Microbiology 2009, 75(11), 3502–3512.
89. Allegra, S.; Berger, F.; Berthelot, P.; Grattard, F.; Pozzetto, B.; Riffard, S. Use of flow cytometry to monitor *Legionella* viability. Applied and Environmental Microbiology 2008, 74(24), 7813–7816.

90. Gião, M.S.; Wilks, S.; Azevedo, N.F.; Vieira, M.J.; Keevil, C.W. Incorporation of natural uncultivable *Legionella pneumophila* into potable water biofilms provides a protective niche against chlorination stress. *Biofouling* 2009, 25(4), 335–341.
91. Hamilton, K.A.; Prussin, A.J.; Ahmed, W.; Haas, C.N. Outbreaks of Legionnaires' disease and Pontiac fever 2006–2017. *Current Environmental Health Reports* 2018, 5(2), 263–271.
92. Chaudhry, R.; Sreenath, K.; Agrawal, S.K.; Valavane, A. *Legionella* and Legionnaires' disease: time to explore in india. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2018, 36(3), 324–333.
93. Décret n°2021-976. Rubrique 2921. Refroidissement évaporatif par dispersion d'eau dans un flux d'air généré par ventilation mécanique ou naturelle. 2021, https://aida.ineris.fr/consultation_document/10773 (Nov 28 2021).
94. Journal officiel électronique authentifié n° 0298. Arrêté du 14 décembre 2013 relatif aux prescriptions générales applicables aux installations relevant du régime de l'enregistrement au titre de la rubrique n° 2921 de la nomenclature des installations classées pour la protection de l'environnement. 2013, <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000028374941/> (Dec 1 2021).
95. Journal officiel électronique authentifié n° 0298. Arrêté du 14 décembre 2013 relatif aux prescriptions générales applicables aux installations relevant du régime de la déclaration au titre de la rubrique n° 2921 de la nomenclature des installations classées pour la protection de l'environnement. 2013, <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000028375083/> (Dec 1 2021).
96. Fanjeaux, C. *Legionella* et Légionellose : évolution des données épidémiologiques en France de 1987 à 2008. (Thèse de doctorat) Université Henri Poincaré: Nancy, 2010.
97. Keister, T. Electrolytic bromine: A green biocide for cooling towers. *Proceedings of the Water Environment Federation* 2007, 7, 546–552.
98. Putois, T. Etude du traitement de désinfection des eaux de refroidissement par le couplage H₂O₂/UV : Application à une tour aéroréfrigérante. (Thèse de doctorat) Université de Grenoble: Grenoble, 2012.
99. Lutey, R.W. Process cooling water. In *Handbook of Biocide and Preservative Use*; H.W. Rossmore, Ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, 1995, 50–82.

100. Journal officiel de l'Union européenne. Règlement (UE) n° 528/2012 du Parlement européen et du Conseil du 22 mai 2012 concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides. 2012, <http://data.europa.eu/eli/reg/2012/528/oj> (Dec 2 2021).
101. Abbaspour, N.; Hurrell, R.; Kelishadi, R. Review on iron and its importance for human health. *Journal of Research in Medical Sciences* 2014, 19(2), 164–174.
102. Sheftel, A.D.; Mason, A.B.; Ponka, P. The long history of iron in the universe and in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012, 1820(3), 161–187.
103. Messenger, A.J.M.; Barclay, R. Bacteria, iron and pathogenicity. *Biochemical Education* 1983, 11(2), 54–63.
104. Perez-Guzman, L.; Bogner, K.R.; Lower, B.H. Earth's ferrous wheel. *Nature Education Knowledge* 2010, 3(10), 32.
105. Bard, A.J.; Parsons, R.; Jordan, J. *Standard Potentials in Aqueous Solution*; CRC Press: Floride, 1985.
106. Pourbaix, M. *Atlas of Electrochemical Equilibria in Aqueous Solutions*; National Association of Corrosion Engineers: Texas, 1974.
107. D., J.V. Stability constants of metal-ion complexes (Sillen, Lars Gunnar; Martell, Arthur E.). *Journal of Chemical Education* 1965, 42(9), 521.
108. Van Berg, C.M.G.D.; Nimmo, M.; Abollino, O.; Mentasti, E. The determination of trace levels of iron in seawater, using adsorptive cathodic stripping voltammetry. *Electroanalysis* 1991, 3(6), 477–484.
109. Achterberg, E.P.; Holland, T.W.; Bowie, A.R.; Mantoura, R.F.C.; Worsfold, P.J. Determination of iron in seawater. *Analytica Chimica Acta* 2001, 442(1), 1–14.
110. Cianciotto, N.P. Iron Acquisition by *Legionella pneumophila*. *BioMetals* 2007, 20(3), 323–331.
111. Portier, E.; Zheng, H.; Sahr, T.; Burnside, D.M.; Mallama, C.; Buchrieser, C.; et al. IroT/mavN, a new iron-regulated gene involved in *Legionella pneumophila* virulence against amoebae and macrophages. *Environmental Microbiology* 2015, 17(4), 1338–1350.
112. Imlay, J.A. Pathways of oxidative damage. *Annual Review of Microbiology* 2003, 57, 395–418.

113. Viswanathan, V.K.; Edelstein, P.H.; Pope, C.D.; Cianciotto, N.P. The *Legionella pneumophila* iraAB locus is required for iron assimilation, intracellular infection, and virulence. *Infection and Immunity* 2000, 68(3), 1069–1079.
114. Gebran, S.J.; Newton, C.; Yamamoto, Y.; Widen, R.; Klein, T.W.; Friedman, H. Macrophage permissiveness for *Legionella pneumophila* growth modulated by iron. *Infection and Immunity* 1994, 62(2), 564–568.
115. Vikram, H.R.; Bia, F.J. Severe *Legionella pneumophila* pneumonia in a patient with iron overload. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2002, 34(10), 772–774.
116. James, B.W.; Mauchline, W.S.; Dennis, P.J.; Keevil, C.W. A study of iron acquisition mechanisms of *Legionella pneumophila* grown in chemostat culture. *Current Microbiology* 1997, 34(4), 238–243.
117. Hickey, E.K.; Cianciotto, N.P. An iron- and fur-repressed *Legionella pneumophila* gene that promotes intracellular infection and encodes a protein with similarity to the *Escherichia coli* aerobactin synthetases. *Infection and Immunity* 1997, 65(1), 133–143.
118. Liles, M.R.; Scheel, T.A.; Cianciotto, N.P. Discovery of a nonclassical siderophore, legiobactin, produced by strains of *Legionella pneumophila*. *Journal of Bacteriology* 2000, 182(3), 749–757.
119. Burnside, D.M.; Wu, Y.; Shafaie, S.; Cianciotto, N.P. The *Legionella pneumophila* siderophore legiobactin is a polycarboxylate that is identical in structure to rhizoferrin. *Infection and Immunity* 2015, 83(10), 3937–3945.
120. Yip, E.S.; Burnside, D.M.; Cianciotto, N.P. Cytochrome c4 is required for siderophore expression by *Legionella pneumophila*, whereas cytochromes c1 and c5 promote intracellular infection. *Microbiology* 2011, 157(3), 868–878.
121. Cianciotto, N.P. An update on iron acquisition by *Legionella pneumophila*: new pathways for siderophore uptake and ferric iron reduction. *Future Microbiology* 2015, 10(5), 841–851.
122. Portier, E. Rôle du fer sur *Legionella pneumophila* et sur sa persistance dans les biofilms naturels. (Thèse de doctorat) Université de Poitiers: Poitiers, 2014.
123. Poch, M.T.; Johnson, W. Ferric reductases of *Legionella pneumophila*. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* 1993, 6(2), 107–114.

124. Robey, M.; Cianciotto, N.P. *Legionella pneumophila* feoAB promotes ferrous iron uptake and intracellular infection. *Infection and Immunity* 2002, 70(10), 5659–5669.
125. Zheng, H.; Chatfield, C.H.; Liles, M.R.; Cianciotto, N.P. Secreted pyomelanin of *Legionella pneumophila* promotes bacterial iron uptake and growth under iron-limiting conditions. *Infection and Immunity* S.M. Payne, Ed.; 2013, 81(11), 4182–4191.
126. Christenson, E.T.; Isaac, D.T.; Yoshida, K.; Lipo, E.; Kim, J.-S.; Ghirlando, R.; et al. The iron-regulated vacuolar *Legionella pneumophila* MavN protein is a transition-metal transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2019, 116(36), 17775–17785.
127. James, B.W.; Mauchline, W.S.; Fitzgeorge, R.B.; Dennis, P.J.; Keevil, C.W. Influence of iron-limited continuous culture on physiology and virulence of *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity* 1995, 63(11), 4224–4230.
128. Reeves, M.W.; Pine, L.; Hutner, S.H.; George, J.R.; Harrell, W.K. Metal requirements of *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology* 1981, 13(4), 688–695.
129. Bargellini, A.; Marchesi, I.; Righi, E.; Ferrari, A.; Cencetti, S.; Borella, P.; et al. Parameters predictive of *Legionella* contamination in hot water systems: association with trace elements and heterotrophic plate counts. *Water Research* 2011, 45(6), 2315–2321.
130. Rakic, A.; Peric, J.; Foglar, L. Influence of temperature, chlorine residual and heavy metals on the presence of *Legionella pneumophila* in hot water distribution systems. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* -: 2012, 19(3).
131. Serrano-Suárez, A.; Dellundé, J.; Salvadó, H.; Cervero-Aragó, S.; Mendez, J.; Canals, O.; et al. Microbial and physiochemical parameters associated with *Legionella* contamination in hot water recirculation systems. *Environmental Science and Pollution Research International* 2013, 20.
132. States, S.J.; Conley, L.F.; Ceraso, M.; Stephenson, T.E.; Wolford, R.S.; Wadowsky, R.M.; et al. Effects of metals on *Legionella pneumophila* growth in drinking water plumbing systems. *Applied and Environmental Microbiology* 1985, 50(5), 1149–1154.
133. Vittal, R.; Raj, J.R.M.; Kumar, B.K.; Karunasagar, I. Iron content as an indicator for *Legionella* species in artificial water systems. *Medico Legal Update* 2021, 21(1), 803–808.

134. Banin, E.; Vasil, M.L.; Greenberg, E.P. Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2005, 102(31), 11076–11081.
135. Wu, Y.; Outten, F.W. IscR controls iron-dependent biofilm formation in *Escherichia coli* by regulating type I fimbria expression. *Journal of Bacteriology* 2009, 191(4), 1248–1257.
136. Mey, A.R.; Craig, S.A.; Payne, S.M. Characterization of *Vibrio cholerae* RyhB: the RyhB regulon and role of ryhB in biofilm formation. *Infection and Immunity* 2005, 73(9), 5706–5719.
137. Hindré, T.; Brüggemann, H.; Buchrieser, C.; Héchard, Y. Transcriptional profiling of *Legionella pneumophila* biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation. *Microbiology* 2008, 154(1), 30–41.
138. Portier, E.; Bertaux, J.; Labanowski, J.; Hechard, Y. Iron availability modulates the persistence of *Legionella pneumophila* in complex biofilms. *Microbes and Environments* 2016, 31(4), 387–394.
139. Armstrong, F.A.J. The iron content of sea water. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 1957, 36(3), 509–517.
140. Pohl, P.; Prusisz, B. Redox speciation of iron in waters by resin-based column chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2006, 25(9), 909–916.
141. Wu, J. Determination of picomolar iron in seawater by double Mg(OH)₂ precipitation isotope dilution high-resolution ICP-MS. *Marine Chemistry* 2007, 103(3–4), 370–381.
142. King, D.W.; Lounsbury, H.A.; Millero, F.J. Rates and mechanism of Fe(II) oxidation at nanomolar total iron concentrations. *Environmental Science and Technology* 1995, 29(3), 818–824.
143. Cherevko, S.; Mayrhofer, K.J.J. On-Line Inductively Coupled Plasma Spectrometry in Electrochemistry: Basic Principles and Applications. In *Encyclopedia of Interfacial Chemistry*; K. Wandelt, Ed.; Elsevier: Oxford, 2018, 326–335.
144. Aceto, M. The Use of ICP-MS in Food Traceability. In *Advances in Food Traceability Techniques and Technologies*; M. Espiñeira, F.J. Santaclara, Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, 2016, 137–164.
145. Carvalho, R.N.C.S.; Brito, G.B.; Korn, M.G.A.; Teixeira, J.S.R.; Dias, F. de S.; Dantas, A.F.; et al. Multi-element determination of copper, iron, nickel, manganese, lead and zinc in

- environmental water samples by ICP OES after solid phase extraction with a C18 cartridge loaded with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol. *Analytical Methods* 2015, 7(20), 8714–8719.
146. Karasakal, A. Determination of trace and major elements in vegan milk and oils by ICP-OES after microwave digestion. *Biological Trace Element Research* 2020, 197(2), 683–693.
 147. Biller, D.V.; Bruland, K.W. Analysis of Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, and Pb in seawater using the Nobias-chelate PA1 resin and magnetic sector inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Marine Chemistry* 2012, 130–131, 12–20.
 148. Cooper, L.H.N. The distribution of iron in the waters of the western english channel. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 1948, 27(2), 279–313.
 149. Rakestraw, N.W.; Mahncke, H.E.; Beach, E.F. Determination of iron in sea water. *Industrial and Engineering Chemistry, Analytical Edition* 1936, 8(2), 136–138.
 150. Stookey, L.L. Ferrozine---a new spectrophotometric reagent for iron. *Analytical Chemistry* 1970, 42(7), 779–781.
 151. Shehata, A.B.; Mohamed, G.G.; Gab-Allah, M.A. Simple spectrophotometric method for determination of iron in crude oil. *Petroleum Chemistry* 2017, 57(12), 1007–1011.
 152. Pehkonen, S. Determination of the oxidation states of iron in natural waters. A review. *Analyst* 1995, 120(11), 2655–2663.
 153. Cuartero, M. Electrochemical sensors for in-situ measurement of ions in seawater. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2021, 334, 129635.
 154. Alam, A.U.; Clyne, D.; Jin, H.; Hu, N.-X.; Deen, M.J. Fully integrated, simple, and low-cost electrochemical sensor array for in situ water quality monitoring. *ACS Sensors* 2020, 5(2), 412–422.
 155. Chu, N.; Liang, Q.; Hao, W.; Jiang, Y.; Liang, P.; Zeng, R.J. Microbial electrochemical sensor for water biotoxicity monitoring. *Chemical Engineering Journal* 2021, 404, 127053.
 156. Hezard, T. Développement d'un capteur pour mesurer en continu et in situ les teneurs en fer (III) et fer (II) ainsi que d'autres métaux dans les eaux d'exhaure des anciens sites miniers. (Thèse de doctorat) Ecole centrale de Paris: Châtenay-Malabry, 2005.

157. Gholami, M.; Rezayi, M.; Moozarm Nia, P.; Yusoff, I.; Alias, Y. A novel method for fabricating Fe²⁺ ion selective sensor using polypyrrole and sodium dodecyl sulfate based on carbon screen-printed electrode. *Measurement* 2015, 69, 115–125.
158. Ali, T.A.; Farag, A.A.; Mohamed, G.G. Potentiometric determination of iron in polluted water samples using new modified Fe(III)-screen printed ion selective electrode. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 2014, 20(4), 2394–2400.
159. Ali, T.A.; Mohamed, G.G.; El-Dessouky, M.M.I.; Mohamed, R.T.F. Modified carbon paste ion selective electrodes for the determination of iron (III) in water, soil and fish tissue samples. *International Journal of Electrochemical Science* 2013, 8(1), 1469–1486.
160. Gupta, K.C.; Jeanne D'Arc, M. Effect of concentration of ion exchanger, plasticizer and molecular weight of cyanocopolymers on selectivity and sensitivity of Cu(II) ion selective electrodes. *Analytica Chimica Acta* 2001, 437(2), 199–216.
161. Ammann, D.; Pretsch, E.; Simon, W.; Lindner, E.; Bezegh, A.; Pungor, E. Lipophilic salts as membrane additives and their influence on the properties of macro- and micro-electrodes based on neutral carriers. *Analytica Chimica Acta* 1985, 171, 119–129.
162. Bakker, E.; Pretsch, E. Lipophilicity of tetraphenylborate derivatives as anionic sites in neutral carrier-based solvent polymeric membranes and lifetime of corresponding ion-selective electrochemical and optical sensors. *Analytica Chimica Acta* 1995, 309(1), 7–17.
163. Babakhanian, A.; Gholivand, M.B.; Mohammadi, M.; Khodadadian, M.; Shockravi, A.; Abbaszadeh, M.; et al. Fabrication of a novel iron(III)–PVC membrane sensor based on a new 1,1'-(iminobis(methan-1-yl-1-ylidene))dinaphthalen-2-ol synthetic ionophore for direct and indirect determination of free iron species in some biological and non-biological samples. *Journal of Hazardous Materials* 2010, 177(1), 159–166.
164. Motlagh, M.G.; Taher, M.A.; Ahmadi, A. PVC membrane and coated graphite potentiometric sensors based on 1-phenyl-3-pyridin-2-yl-thiourea for selective determination of iron(III). *Electrochimica Acta* 2010, 55(22), 6724–6730.
165. Gupta, V.K.; Sethi, B.; Upadhyay, N.; Kumar, S.; Singh, R.; Singh, L.P. Iron (III) selective electrode based on S-Methyl N- (Methylcarbamoyloxy) thioacetimidate as a sensing material. *International Journal of Electrochemical Science* 2011, 6(3), 650–663.
166. Vlascici, D.; Fagadar-Cosma, E.; Popa, I.; Chiriac, V.; Gil-Agusti, M. A novel sensor for monitoring of iron(III) ions based on porphyrins. *Sensors* 2012, 12(6), 8193–8203.

167. Zamani, H.A.; Ganjali, M.R.; Faridbod, F.; Salavati-Niasari, M. Heptadentate Schiff-base based PVC membrane sensor for Fe(III) ion determination in water samples. *Materials Science and Engineering: C* 2012, 32(3), 564–568.
168. Bandi, K.R.; Singh, A.K.; Upadhyay, A. Construction and performance characteristics of polymeric membrane electrode and coated graphite electrode for the selective determination of Fe³⁺ ion. *Materials Science and Engineering: C* 2014, 36(1), 187–193.
169. Badakhshan, S.; Ahmadzadeh, S.; Mohseni-Bandpei, A.; Aghasi, M.; Basiri, A. Potentiometric sensor for iron (III) quantitative determination: experimental and computational approaches. *BMC Chemistry* 2019, 13(1), 131.
170. Kumar, N.; Bhalla, V.; Kumar, M.; Mahajan, R.K. Rhodamine-dimethyliminocinnamyl based electrochemical sensors for selective detection of iron (II). *Sensors and Actuators B: Chemical* 2014, 190, 127–133.
171. Laglera, L.M.; Monticelli, D. Iron detection and speciation in natural waters by electrochemical techniques: A critical review. *Current Opinion in Electrochemistry* 2017, 3(1), 123–129.
172. Yari, A. A novel iron(III) potentiometric sensor based on (E)-N'-((2-hydroxynaphthalen-3-yl)methylene)benzohydrazide. *International Journal of Electrochemical Science* 2016, 11, 6597–6608.
173. Buffle, J.; Tercier-Waeber, M.-L. Voltammetric environmental trace-metal analysis and speciation: from laboratory to in situ measurements. *Trends in Analytical Chemistry* 2005, 24(3), 172–191.
174. Lu, M.; Rees, N.V.; Kabakaev, A.S.; Compton, R.G. Determination of iron: Electrochemical methods. *Electroanalysis* 2012, 24(8), 1693–1702.
175. Pournaghi-Azar, M.H.; Fatemi, B.M. Simultaneous determination of ferric, ferrous and total iron by extraction differential pulse polarography: Application to the speciation of iron in rocks. *Microchemical Journal* 2000, 65(3), 199–207.
176. Stozhko, N.Yu.; Inzhevatova, O.V.; Kolyadina, L.I. Determination of iron in natural and drinking waters by stripping voltammetry. *Journal of Analytical Chemistry* 2005, 60(7), 668–672.
177. Gledhill, M.; van den Berg, C.M.G. Measurement of the redox speciation of iron in seawater by catalytic cathodic stripping voltammetry. *Marine Chemistry* 1995, 50(1), 51–61.

178. Wang, J.; Lu, J.; Kirgöz, Ü.A.; Hocevar, S.B.; Ogorevc, B. Insights into the anodic stripping voltammetric behavior of bismuth film electrodes. *Analytica Chimica Acta* 2001, 434(1), 29–34.
179. Hu, X.; Pan, D.; Han, H.; Lin, M.; Zhu, Y.; Wang, C. Preparation of bismuth-based microrods and their application in electroanalysis. *Materials Letters* 2017, 190, 83–85.
180. Hu, X.; Pan, D.; Lin, M.; Han, H.; Li, F. Graphene oxide-assisted synthesis of bismuth nanosheets for catalytic stripping voltammetric determination of iron in coastal waters. *Microchimica Acta* 2016, 183(2), 855–861.
181. Bobrowski, A.; Zarębski, J. Catalytic systems in adsorptive stripping voltammetry. *Electroanalysis* 2000, 12(15), 1177–1186.
182. Węgiel, K.; Robak, J.; Baś, B. Voltammetric determination of iron with catalytic system at a bismuth bulk annular band electrode electrochemically activated. *RSC Advances* 2017, 7(36), 22027–22033.
183. Bobrowski, A.; Nowak, K.; Zarębski, J. Application of a bismuth film electrode to the voltammetric determination of trace iron using a Fe(III)–TEA–BrO₃–catalytic system. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2005, 382(7), 1691–1697.
184. Ugo, P.; Moretto, L.M.; Rudello, D.; Birriel, E.; Chevalet, J. Trace iron determination by cyclic and multiple square-wave voltammetry at Nafion coated electrodes. Application to pore-water analysis. *Electroanalysis* 2001, 13(8–9), 661–668.
185. Li, F.; Pan, D.; Lin, M.; Han, H.; Hu, X.; Kang, Q. Electrochemical determination of iron in coastal waters based on ionic liquid-reduced graphene oxide supported gold nanodendrites. *Electrochimica Acta* 2015, 176, 548–554.
186. Lin, M.; Pan, D.; Hu, X.; Han, H.; Li, F. Titanium carbide nanoparticles/ion-exchange polymer-based sensor for catalytic stripping determination of trace iron in coastal waters. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2015, 219, 164–170.
187. Papadopoulou, N.A.; Florou, A.B.; Prodromidis, M.I. Sensitive determination of iron using disposable Nafion-coated screen-printed graphite electrodes. *Analytical Letters* 2018, 51(1–2), 198–208.
188. Lin, M.; Han, H.; Pan, D.; Zhang, H.; Su, Z. Voltammetric determination of total dissolved iron in coastal waters using a glassy carbon electrode modified with reduced graphene oxide, Methylene Blue and gold nanoparticles. *Microchimica Acta* 2014, 182(3–4), 805–813.

189. Lu, G.; Yao, X.; Wu, X.; Zhan, T. Determination of the total iron by chitosan-modified glassy carbon electrode. *Microchemical Journal* 2001, 69(1), 81–87.
190. Kim, Y.S.; Pivovar, B.S. Polymer Electrolyte Membranes for Direct Methanol Fuel Cells. In *Advances in Fuel Cells*; T.S. Zhao, K.-D. Kreuer, T. Van Nguyen, Eds.; Elsevier Science: Amsterdam, 2007, 187–234.
191. Gierke, T.D.; Munn, G.E.; Wilson, F.C. The morphology in Nafion perfluorinated membrane products, as determined by wide- and small-angle x-ray studies. *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition* 1981, 19(11), 1687–1704.
192. Espenscheid, M.W.; Ghatak-Roy, A.R.; Moore, R.B.; Penner, R.M.; Szentirmay, M.N.; Martin, C.R. Sensors from polymer modified electrodes. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases* 1986, 82(4), 1051–1070.
193. Nguyen, L.D.; Huynh, T.M.; Nguyen, T.S.V.; Le, D.N.; Baptist, R.; Doan, T.C.D.; et al. Nafion/platinum modified electrode-on-chip for the electrochemical detection of trace iron in natural water. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2020, 873, 114396.
194. Daud, N.; Yusof, N.; Tan, W.; Abdullah, A. Electrochemical sensor for As(III) utilizing CNTs/ Leucine/Nafion modified electrode. *International Journal of Electrochemical Science* 2012, 7(1).
195. Wang, L.; Jing, G.; Cui, T. Nafion coated flexible bismuth sensor for trace lead and cadmium determination. *Microsystem Technologies* 2018, 24(9), 3697–3704.
196. Gao, Z.; Li, P.; Zhao, Z. Determination of iron(II) with chemically-modified carbon-paste electrodes. *Talanta* 1991, 38(10), 1177–1184.
197. AyoubMahamane, A.; Guel, B.; Fabre, P.-L. Electrochemical behaviour of iron(II) at a Nafion-1,10-phenanthroline-modified carbon paste electrode: assessing the correlation between preconcentration potential, surface morphology and impedance measurements. *ChemXPress* 2014, 6(3), 71–90.
198. El-Shishtawy, R.; Al-Ghamdi, H.; Alam, M.M.; Al-amshany, Z.; Asiri, A.M.; Rahman, M. Development of Cd²⁺ sensor based on BZNA/Nafion/Glassy carbon electrode by electrochemical approach. *Chemical Engineering Journal* 2018, 352, 225–231.
199. Zhiqiang, G.; Peibiao, L.; Wang, G.; Zaofan, Z. Preconcentration and differential-pulse voltammetric determination of iron(II) with Nafion—1,10-phenanthroline-modified carbon paste electrodes. *Analytica Chimica Acta* 1990, 241(1), 137–146.

200. Yang, S.X.; Du, L.H.; Ye, B.X. Cathodic stripping voltammetry determination of trace iron with a chemically modified electrode. *Microchemical Journal* 1995, 52(2), 216–222.
201. Yantasee, W.; Charnhattakorn, B.; Fryxell, G.E.; Lin, Y.; Timchalk, C.; Addleman, R.S. Detection of Cd, Pb, and Cu in non-pretreated natural waters and urine with thiol functionalized mesoporous silica and Nafion composite electrodes. *Analytica Chimica Acta* 2008, 620(1), 55–63.
202. El-Shishtawy, R.M.; Rahman, M.M.; Sheikh, T.A.; Nadeem Arshad, M.; Al-Zahrani, F.A.M.; Asiri, A.M. A New Cr³⁺ electrochemical sensor based on ATNA/Nafion/Glassy carbon electrode. *Materials* 2020, 13(12), 2695.
203. Hussain, M.M.; Rahman, M.M.; Arshad, M.N.; Asiri, A.M. Hg²⁺ sensor development based on (E)-N'-Nitrobenzylidene-Benzenesulfonohydrazide (NBBSH) derivatives fabricated on a glassy carbon electrode with a Nafion matrix. *ACS Omega* 2017, 2(2), 420–431.
204. Bormashenko, E.; Bormashenko, Y.; Frenkel, M. Formation of hierarchical porous films with breath-figures self-assembly performed on oil-lubricated substrates. *Materials* 2019, 12(18), 3051.
205. Sánchez-Herencia, A. Water based colloidal processing of ceramic laminates. *Key Engineering Materials* 2007, 333, 39–48.
206. Ayato, Y.; Kunimatsu, K.; Osawa, M.; Okada, T. Study of Pt electrode/Nafion ionomer interface in HClO by in situ surface-enhanced FTIR spectroscopy. *Journal of The Electrochemical Society* 2006, 153(2), A203–A209.
207. Downard, A.J.; Prince, M.J. Barrier properties of organic monolayers on glassy carbon electrodes. *Langmuir American Chemical Society*: 2001, 17(18), 5581–5586.
208. Barfidokht, A.; Ciampi, S.; Luais, E.; Darwish, N.; Gooding, J.J. The influence of organic-film morphology on the efficient electron transfer at passivated polymer-modified electrodes to which nanoparticles are attached. *Chemphyschem* 2013, 14(10), 2190–2197.
209. Gervais, E.; Aceta, Y.; Gros, P.; Evrard, D. Study of an AuNPs functionalized electrode using different diazonium salts for the ultra-fast detection of Hg(II) traces in water. *Electrochimica Acta* 2018, 261, 346–355.

210. Fezai, F.; Séverac, C.; Gros, P.; Meireles, M.; Evrard, D. A new sensor with increased lifetime based on a mixed diazonium thick film/gold nanoparticles interface for Hg(II) trace detection. *Electroanalysis* 2020, 32(1), 1–6.
211. Moo, J.; Veksha, A.; Oh, W.-D.; Giannis, A.; W.D., C.; Lin, S.-X.; et al. Plastic derived carbon nanotubes for electrocatalytic oxygen reduction reaction: Effects of plastic feedstock and synthesis temperature. *Electrochemistry Communications* 2019, 101, 11–18.
212. Cordova-Huaman, A.; Jauja-Ccana, V.; Rosa-Toro, A. Low-cost smartphone-controlled potentiostat based on Arduino for teaching electrochemistry fundamentals and applications. *Heliyon* 2021, 7, e06259.
213. Reynolds, M. The “apparent” diffusion coefficient of electrons through a Nafion membrane. (Thèse de doctorat) University of Arkansas: Fayetteville, 2017.
214. Ugo, P.; Ballarin, B.; Daniele, S.; Mazzocchin, G.A. Electrochemical behaviour and preconcentration of uranyl(VI) at Nafion-coated glassy carbon electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 1992, 324(1–2), 145–159.
215. Ugo, P.; Ballarin, B.; Daniele, S.; Mazzocchin, G.A. Determination of trace amounts of Eu³⁺ and Yb³⁺ ions at Nafion-coated thin mercury film electrodes. *Analytica Chimica Acta* 1991, 244, 29–38.
216. Brett, C.M.A.; Fungaro, D.A.; Morgado, J.M.; Gil, M.H. Novel polymer-modified electrodes for batch injection sensors and application to environmental analysis. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 1999, 468(1), 26–33.
217. Monterroso, S.C.C.; Carapuça, H.M.; Duarte, A.C. Mixed polyelectrolyte coatings on glassy carbon electrodes: Ion-exchange, permselectivity properties and analytical application of poly-L-lysine–poly(sodium 4-styrenesulfonate)-coated mercury film electrodes for the detection of trace metals. *Talanta* 2006, 68(5), 1655–1662.
218. Limoges, B.; Degrand, C. Ferrocenylethyl phosphate: An improved substrate for the detection of alkaline phosphatase by cathodic stripping ion-exchange voltammetry. application to the electrochemical enzyme affinity assay of avidin. *Analytical Chemistry* 1996, 68(23), 4141–4148.
219. Kocaoba, S. Adsorption of Fe(II) and Fe(III) from aqueous solution by using sepiolite: speciation studies with MINEQL+ computer program. *Separation Science and Technology* 2020, 55(5), 896–906.

220. Millero, F. Speciation of metals in natural waters. *Geochemical Transactions* 2001, 2(57).
221. Warneck, P. The oxidation of sulfur(IV) by reaction with iron(III): a critical review and data analysis. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2018, 20(6), 4020–4037.
222. Bilgin, A.A.; Silverstein, J.; Hernandez, M. Effects of soluble ferri-hydroxide complexes on microbial neutralization of acid mine drainage. *Environmental Science & Technology American Chemical Society*: 2005, 39(20), 7826–7832.
223. Didukh, S.; Losev, V.; Borodina, E.; Maksimov, N.; Trofimchuk, A.; Zaporozhets, O. Separation and determination of Fe(III) and Fe(II) in natural and waste waters using silica gel sequentially modified with polyhexamethylene guanidine and tiron. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2017, 2017, 8208146.
224. Schnell, S.; Ratering, S.; Jansen, K.-H. Simultaneous determination of iron(III), iron(II), and manganese(II) in environmental samples by ion chromatography. *Environmental Science & Technology American Chemical Society*: 1998, 32(10), 1530–1537.
225. Pyenson, H.; Tracy, P.H. A 1,10-phenanthroline method for the determination of iron in powdered milk. *Journal of Dairy Science* 1945, 28(5), 401–412.
226. Shi, L.; Wu, T.; He, P.; Li, D.; Sun, C.; Li, J. Amperometric sensor for hydroxylamine based on hybrid nickel-cobalt hexacyanoferrate modified electrode. *Electroanalysis* 2005, 17(23), 2190–2194.
227. Rezaei, B.; Ensafi, A.A.; Jamshidi-mofrad, E. A sensitive electrochemical sensor for hydroxylamine determination: Using multiwall carbon nanotube paste electrode (MWCNTPE) and promazine hydrochloride as homogenous mediator. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2015, 211, 138–145.
228. Nasirizadeh, N.; Saber-Tehrani, M.; Reza, M.; Shishehbore, M.; Karimi, A.; Shirgholami, M. A new hydroxylamine electrochemical sensor based on an oxadiazol derivative and multi-wall carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. *Journal of Physical & Theoretical Chemistry* 2010, 7(2), 63–70.
229. Basnig, D.; Vilá, N.; Herzog, G.; Walcarius, A. Voltammetric behaviour of cationic redox probes at mesoporous silica film electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2020, 872, 113993.

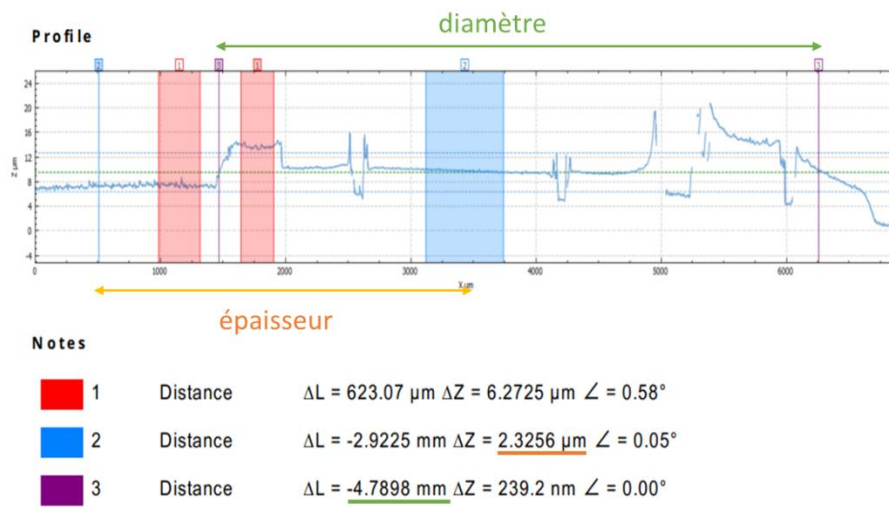
230. Ugo, P.; Moretto, L.M. Ion Exchange Voltammetry. In Ion Exchange Technology I: Theory and Materials; I. Dr., M. Luqman, Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2012, 403–435.
231. Goswami, A.; Acharya, A.; Pandey, A.K. Study of self-diffusion of monovalent and divalent cations in Nafion-117 ion-exchange membrane. *The Journal of Physical Chemistry B* 2001, 105(38), 9196–9201.
232. Ye, J.; Doblhofer, K. The electrochemical behaviour of iron(II/III) on Nafion coated electrodes. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* 1988, 92(11), 1271–1275.
233. Mehellou, A.; Delimi, R.; Benredjem, Z.; Innocent, C. Affinity of cation-exchange membranes towards metallic cations: Application in continuous electropermutation. *Separation Science and Technology* 2015, 50(4), 495–504.
234. Hongsirikarn, K.; Jr, J.; Greenway, S.; Creager, S. Effect of cations (Na^+ , Ca^{2+} , Fe^{3+}) on the conductivity of a Nafion membrane. *Journal of Power Sources* 2010, 195(21), 7213–7220.
235. Baudin, M. Couplage de rapporteurs génétiques et d'une molécule active pour l'étude de la dispersion de biofilms. [These de doctorat] Université Paris-Saclay (COMUE): Gif-sur-Yvette, 2017.
236. Santé Publique France Epidémie de légionellose dans le Pas-de-Calais. Novembre 2003 à janvier 2004. Rapport de la mission d'appui. 2004, <https://www.santepubliquefrance.fr/hauts-de-france/epidemie-de-legionellose-dans-le-pas-de-calais.-novembre-2003-a-janvier-2004.-rapport-de-la-mission-d-appui> (Oct 20 2021).
237. Greaves, P.G.; Sharp, G.; Macrae, A.D. Isolation of *Legionella pneumophila*. *Lancet* 1979, 313(8115), 551–552.
238. Ristroph, J.D.; Hedlund, K.W.; Gowda, S. Chemically defined medium for *Legionella pneumophila* growth. *Journal of Clinical Microbiology American Society for Microbiology*: 1981, 13(1), 115–119.
239. Barker, J.; Farrell, I.D.; Hutchison, J.G.P.Y. Factors affecting growth of *Legionella pneumophila* in liquid media. *Journal of Medical Microbiology Microbiology Society*,: 1986, 22(2), 97–100.

240. Piao, Z.; Sze, C.C.; Barysheva, O.; Iida, K.; Yoshida, S. Temperature-regulated formation of mycelial mat-like biofilms by *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology* 2006, 72(2), 1613–1622.
241. Jameson, R.F.; Linert, W. Complex formation followed by internal electron transfer: The reaction between cysteine and iron(III). *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly* 1991, 122(11), 887–906.
242. Warren, W.J.; Miller, R.D. Growth of Legionnaires disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in chemically defined medium. *Journal of Clinical Microbiology American Society for Microbiology*: 1979, 10(1), 50–55.
243. Ewann, F.; Hoffman, P.S. Cysteine metabolism in *Legionella pneumophila*: characterization of an l-cystine-utilizing mutant. *Applied and Environmental Microbiology* 2006, 72(6), 3993–4000.
244. Tesh, M.J.; Miller, R.D. Amino acid requirements for *Legionella pneumophila* growth. *Journal of Clinical Microbiology* 1981, 13(5), 865–869.
245. George, J.R.; Pine, L.; Reeves, M.W.; Harrell, W.K. Amino acid requirements of *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology American Society for Microbiology*: 1980, 11(3), 286–291.
246. Pine, L.; George, J.R.; Reeves, M.W.; Harrell, W.K. Development of a chemically defined liquid medium for growth of *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology American Society for Microbiology*: 1979, 9(5), 615–626.
247. Radtke, A.L.; O’Riordan, M.X.D. Intracellular innate resistance to bacterial pathogens. *Cellular Microbiology* 2006, 8(11), 1720–1729.
248. Schaible, U.E.; Kaufmann, S.H.E. Iron and microbial infection. *Nature Reviews. Microbiology* 2004, 2(12), 946–953.
249. Mampel, J.; Spirig, T.; Weber, S.S.; Haagensen, J.A.J.; Molin, S.; Hilbi, H. Planktonic replication is essential for biofilm formation by *Legionella pneumophila* in a complex medium under static and dynamic flow conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 2006, 72(4), 2885–2895.
250. Ge, R.; Sun, X. Iron trafficking system in *Helicobacter pylori*. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* 2012, 25(2), 247–258.

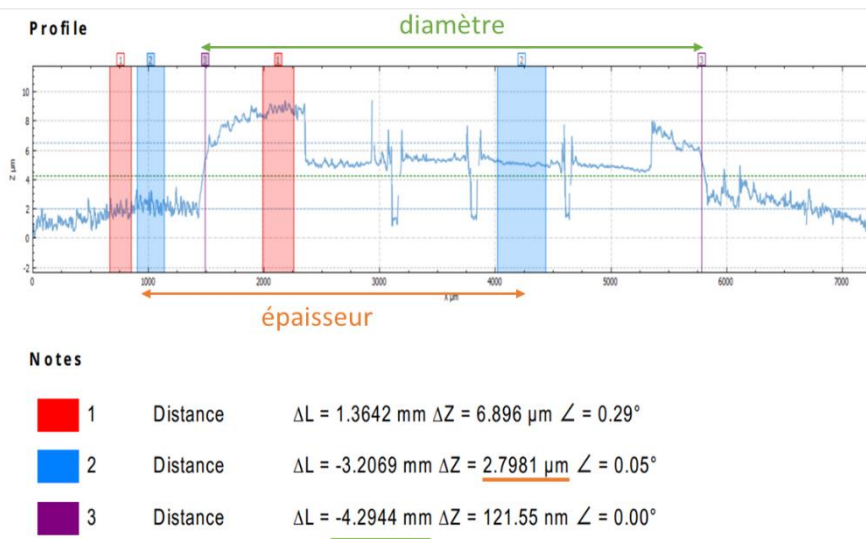
251. Alicilar, A.; Meriç, G.; Akkurt, F.; Şendil, O. Air oxidation of ferrous iron in water. *Journal of International Environmental Application and Science* 2008, 3(5), 409–414.
252. Byrne, R.H.; Kester, D.R. Solubility of hydrous ferric oxide and iron speciation in seawater. *Marine Chemistry* 1976, 4(3), 255–274.
253. Kuma, K.; Nishioka, J.; Matsunaga, K. Controls on iron(III) hydroxide solubility in seawater: The influence of pH and natural organic chelators. *Limnology and Oceanography* 1996, 41(3), 396–407.
254. Zafiriou, O.C.; True, M.B. Interconversion of iron(III) hydroxy complexes in seawater. *Marine Chemistry* 1980, 8(4), 281–288.
255. Di Pippo, F.; Di Gregorio, L.; Congestri, R.; Tandoi, V.; Rossetti, S. Biofilm growth and control in cooling water industrial systems. *FEMS Microbiology Ecology* 2018, 94(5).
256. Wingender, J.; Flemming, H.-C. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2011, 214, 417–423.

Annexes

Annexe 1. Profils de surface obtenus par le profilomètre pour les 2 électrodes CV/Nafion®.
 (en vert- diamètre du film de Nafion® ; en orange : épaisseur du film de Nafion®)

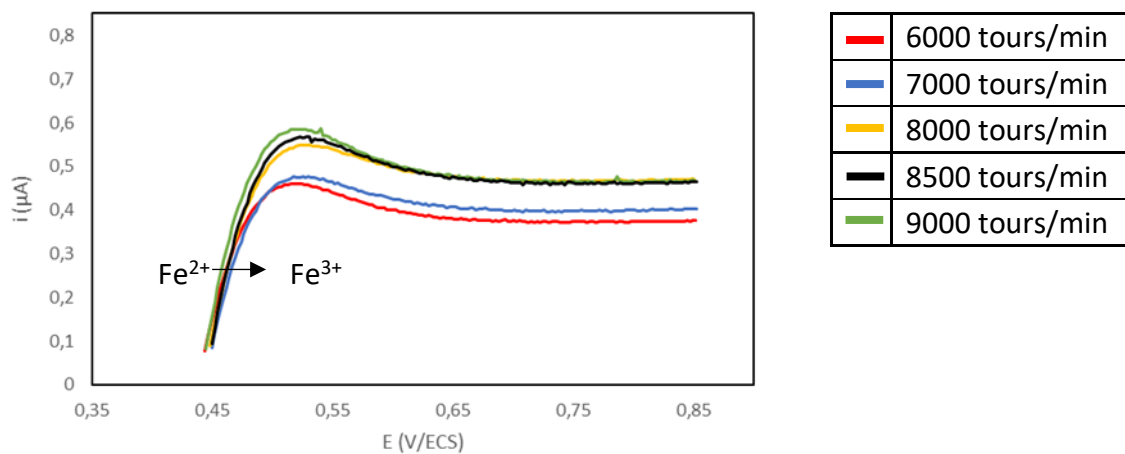


Electrode 1



Electrode 2

Annexe 2. Voltammogrammes tracés par voltammétrie sur électrode a disque tournant avec l'électrode en CV/Nafion® à des vitesses de rotation croissantes dans une solution K₂SO₄ (10 mM à pH 3,7) contenant 5 μM Fe²⁺ ; v = 10 mV/s.



Annexe 3

Publication: Elucidation of the stoichiometry of Fe(III) and Fe(II) complexes formed with 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol (5-Br-PADAP). Application to Fe(III) and Fe(II) Electrochemical Determination at Trace Level in Natural Water

La publication présentée ci-dessous a été soumise et acceptée dans « International Journal of Electrochemical Science ». Elle sera publiée dans le numéro de janvier 2022 (ID 161015, doi : 10.20964/2022.01.32). Cette publication est un travail annexe du projet de thèse qui s'inscrit dans la thématique de la détection du fer à des concentrations de l'ordre du micromolaire.

L'intérêt principal des travaux présentés dans la publication est de clarifier la stœchiométrie des complexes du Fe(II) et Fe(III) formés avec le ligand 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diéthylaminophénol (5-Br-PADAP). Ce dernier réagit avec le fer pour former rapidement des complexes (< 3 min). Ces complexes sont d'une part fortement colorés, permettant un dosage spectrophotométrique et d'autre part, présentent un effet de préconcentration important permettant un dosage par des méthodes électrochimiques. Toutefois, les travaux publiés ne sont pas unanimes quant à la stœchiométrie réelle des complexes Fe(III)/5-Br-PADAP et Fe(II)/5-Br-PADAP : suivant les publications, un rapport métal:ligand de 1:1 ou 1:2 est proposé. Au cours de nos travaux, des méthodes électrochimiques employant une électrode en or et des méthodes spectrophotométriques ont été utilisées pour établir définitivement la stœchiométrie de ces complexes.

Tout d'abord, une étude électrochimique par voltammétrie différentielle à impulsion (DPV) a été réalisée dans une solution contenant du Fe(III) et le 5-Br-PADAP (en excès). Des pics attribués à la réduction du ligand et du complexe Fe(III)/5-Br-PADAP ont été observés à -0,43 V et -0,51 V / ECS respectivement. Ensuite, des expériences complémentaires ont été réalisées par voltammétrie cyclique en employant différentes vitesses de balayage afin de déterminer l'étape du mécanisme limitant la vitesse des réactions à l'électrode. Les résultats indiquent que la réduction du ligand est contrôlée par l'étape de transport de matière. En revanche, il a été démontré que les phénomènes de diffusion et d'adsorption sont impliqués dans la réduction du complexe. Leur contribution respective à l'intensité du courant de pic cathodique a d'ailleurs été estimée (de 52 à 78% pour la diffusion et de 22 à 48% pour l'adsorption) par une méthode développée dans une publication récente^[1].

Dans un deuxième temps, des DPV ont été tracées dans une solution contenant une concentration fixe de Fe(III) ou Fe(II) avec des ajouts successifs de 5-Br-PADAP. L'évolution de $1/i_{p,complexe}$ en fonction de $1/[ligand]^n$ (où $n= 1, 2$ et 3), a été tracée pour chaque complexe. Les résultats ont permis de déterminer la stœchiométrie des complexes Fe(III)/5-Br-PADAP et Fe(II)/5-Br-PADAP : un rapport métal:ligand de 1:1 a été obtenu pour les deux complexes. Afin de confirmer cette stœchiométrie, une méthode spectrophotométrique nommée méthode de Bent-French a été utilisée. Des spectres entre des longueurs d'onde de 400 et 850 nm ont d'abord été enregistrés pour différentes concentrations des complexes Fe(III)/ 5-Br-PADAP et Fe(II)/5-Br-PADAP. Puis, l'évolution du logarithme décimal de l'absorbance a été tracée en fonction des différentes concentrations des deux complexes. A partir de la valeur des pentes, un rapport métal:ligand de 1:1 a pu être confirmé pour les deux complexes. Par ailleurs, les deux méthodes décrites ci-dessus ont aussi permis de déduire la constante de stabilité (β) des deux complexes. Une valeur β de l'ordre de 10^5 et 10^4 a été retrouvée pour le complexe Fe(III)/ 5-Br-PADAP et Fe(II)/5-Br-PADAP respectivement. Les valeurs obtenues étaient différentes de celles observées dans la bibliographie^[2].

La troisième partie de l'article concerne la détermination électrochimique de la concentration de Fe(II) et Fe(III) dans l'eau. En utilisant le 5-Br-PADAP en tant qu'agent complexant, la concentration de Fe(II) et de Fe(III) a pu être déterminée par DPV pour des concentrations comprises entre 1 et 10 μM . Une sensibilité de 0,0376 et 0,0063 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ a été obtenue pour la détection de Fe(III) et de Fe(II), respectivement. Finalement, cette méthode a été utilisée pour déterminer la teneur en Fe(II) et Fe(III) dans l'eau du Canal de Midi (Toulouse, France). Des concentrations égales à 2,3 μM et 1,7 μM ont été trouvées pour Fe(III) et Fe(II) respectivement, correspondant à une concentration totale en fer égale à 4,0 μM . L'analyse de l'eau par ICP-OES a permis de trouver une concentration totale en fer égale à 4,5 μM . Cela indique que le 5-Br-PADAP ne serait pas un agent complexant assez fort pour rompre les équilibres de complexation du fer avec la matière organique ou pour complexer quantitativement des espèces libres de Fe(III) ou de Fe(II).

1. Basnig, D.; Vilá, N.; Herzog, G.; Walcarius, A. Voltammetric behaviour of cationic redox probes at mesoporous silica film electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2020, 872, 113993.

2. Oszwałdowski, S.; Pikus, A. Reversed-phase liquid chromatographic simultaneous determination of iron(III) and iron(II) as complexes with 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol: Determination of iron(III) and iron(II) in water samples and ultrasound field effect on distribution of iron(III) and iron(II) in micellar solution. *Talanta* 2002, 58(4), 773–783.

Elucidation of the stoichiometry of Fe(III) and Fe(II) complexes formed with 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol (5-Br-PADAP). Application to Fe(III) and Fe(II) Electrochemical Determination at Trace Level in Natural Water

Nabiil Auckburally^{1,2}, Souheila El Bir¹, David Evrard^{1,}, Brigitte Dustou¹, Laure Latapie¹, Laurent Boumati², Christine Roques¹, Pierre Gros¹*

¹ Laboratoire de Génie Chimique, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, Toulouse, France

² Resonet Services, Zone Artisanale Lafourcade, 32200 Gimont

*E-mail: david.evrard@univ-tlse3.fr

Received: 26 September 2021 / *Accepted:* 25 October 2021 / *Published:* 6 December 2021

This work provides some new information on the complexes formed between Fe(III) and Fe(II) with 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol (5-Br-PADAP). The electrochemical behavior of both complexes was studied and their stoichiometry, which was uncertain till now, was definitely clarified as a 1:1 metal:ligand ratio on the basis of both electrochemical and spectrophotometric data. The stability constants $\log K$ for both complexes were also determined and found to be in the range 10^5 and 10^4 for Fe(III)/ and Fe(II)/5-Br-PADAP complex, respectively. Using 5-Br-PADAP as a complexing agent, the determination of Fe at trace level in water was achieved by adsorptive differential pulse voltammetry in the range 1 – 10 μM . Under optimized conditions, a sensitivity of 0.0376 and 0.0063 $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$ was found for Fe(III) and Fe(II), respectively. Tests on natural water from Canal du Midi were performed, and allowed values of 2.3 μM for Fe(III) and 1.7 μM for Fe(II) to be obtained. The corresponding value for total Fe was slightly lower than that found with ICP-OES measurements (ca. 4.0 vs. 4.5 μM , respectively), suggesting that 5-Br-PADAP is not a complexing agent strong enough to catch Fe cations in the complexes formed with organic matter nor to complex quantitatively free Fe(III) or Fe(II) species.

Keywords: Complex stoichiometry; 5-Br-PADAP complexation; iron speciation; electrochemical sensor; natural water samples

1. INTRODUCTION

Iron (Fe) is one of the most common element, as it is the fourth most abundant component of the Earth's crust [1]. It can be found in the environment in many soil mineral species, rocks and waters [2], and plays an important role in many systems related to environmental, industrial, biological or human health concerns [3]. Indeed, in healthy individuals, transferrin-bound Fe is used for hemoglobin synthesis in bone marrow, this haemoprotein being essential for the release of oxygen into the tissues to allow aerobic cellular respiration [4]. On the contrary, hyperferritinemia can cause cataract syndrome [5]. The key role of many siderophores able to complex iron during virulence for many bacterial pathogens has been widely demonstrated [6]. Fe is also essential for photosynthesis [7] and has been reported to be a limiting growth nutrient for phytoplankton in open seawaters [8]. It also plays a key role in ruling some biogeochemical cycles that influence the environmental availability of trace elements [9]. For instance, the reductive dissolution of hydrous ferric oxide by specific bacteria has been recently correlated to the presence of unusually high As(III) concentrations in Bangladeshi ground water [10]. Fe concentration may vary from nM or sub-nM in natural areas such as mid-ocean surface waters [11] up to mM in polluted urban areas [12] or acid mine drainage basins [13]. River waters often exhibit Fe concentrations in the μM range [14]. Although neither the World Health Organization nor the European Union has delivered a guideline value for Fe concentration in drinking water, permissible values usually range from 5 to 55 μM since higher concentrations make water become discolored and taste metallic [15]. Thus, the detection and quantification of Fe is of key interest for many research fields. Since Fe can be found as Fe^0 , Fe(II) and Fe(III), the determination of total Fe content is insufficient, and its speciation is of primary importance for meaningful analysis [16]. Indeed, thermodynamic and physicochemical properties of Fe species strongly depend on the metal oxidation state [15]. Considering only the most common oxidation states, Fe(II) is much more soluble than Fe(III) in water, but it is readily oxidized in the presence of oxygen [15], whereas Fe(III) forms very strong, thermodynamically stable complexes with numerous organic ligands despite of its low solubility [17].

The numerous techniques used for the determination of Fe concentration and speciation have been recently reviewed [18,19]. These latter include atomic absorption (AAS) or inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS), chemiluminescence and fluorescence. However, a rapid overview of the literature shows that spectrophotometry and electrochemistry are often preferred with respect to this latter concern [15,20], probably because of their low cost and portability. Whatever the chosen technique, a strategy frequently encountered consists in the use of an organic compound that acts as a complexing or chelating agent for Fe, and thus forms a complex the detection of which is favored because it exhibits a strong color or a significant preconcentration effect. Various ligands have been reported in the literature for this purpose, such as naphtol derivatives [21-24], 2,3-dihydroxynaphthalene [25-27], salicylaldoxime [28] or 2-(2-thiazolylazo)-p-cresol [29]. However, the complexation reaction times for these latter compounds have been reported to be quite long [30]. On the

contrary, 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol (5-Br-PADAP) has been found to form a chelate with Fe within a relatively short reaction time (ca. 3 min) [31-33]. This is mainly due to its electron-donating azo and hydroxyl groups that provide a high chelating affinity for Fe [30]. Although it has been reported in many papers, the interaction between 5-Br-PADAP and Fe, both in its Fe(III) and Fe(II) forms, is still not well understood yet: in particular, a discrepancy still exists about the actual stoichiometry of the Fe(III)/5-Br-PADAP and Fe(II)/5-Br-PADAP complexes between a 1:1 or 1:2 metal:ligand ratio (Table 1). Indeed, we found only two works in which the determination of the stoichiometry of the Fe(III)/5-Br-PADAP and Fe(II)/5-Br-PADAP complexes has been actually studied [31,34]. In the work by Oszwaldowski and Pikus [34], the metal:ligand ratio has been determined for both Fe(III) and Fe(II) complexes using the Bent-French method [35]. Both complexes have been found to exhibit a 1:2 ratio. The corresponding stability constants have been also determined and found to be very close: $10^{9.8}$ and 10^{10} for Fe(II) and Fe(III) complexes, respectively. Fu-sheng et al. have also reported a 1:2 stoichiometry and a stability constant $10^{13.3}$ for the Fe(III) complex [36]. On the contrary, in the report by Zhao et Jin [31], electrochemical means have been used for the determination of the stoichiometry, and a 1:1 metal:ligand ratio has been obtained for Fe(III)/5-Br-PADAP. Checking more carefully the electrochemical studies, some other different information appeared: depending on the considered work, 5-Br-PADAP has been found to exhibit two reduction peaks on Hg [31] and only one on glassy carbon and on reduced graphene oxide / gold nanoparticles modified electrodes [33], whereas Ghoneim claimed that it is actually electroinactive on a carbon paste electrode [37]. Zhu et al. did not mention any reduction peak for 5-Br-PADAP although they performed Fe(III) determination in the presence of a large excess of ligand [30].

Table 1. Detection and quantification of Fe³⁺ and Fe²⁺ using complexation with 5-Br-PADAP.

Detection technique	Target	Stoichiometry (metal:ligand)	Linear range (μ M)	LOD ^a (nM)	Ref.
Spectrophotometry	Fe ³⁺	1:2	up to 14	-	[36]
Spectrophotometry	Fe ²⁺	1:2	0.018 – 0.143	-	[38]
Spectrophotometry	Fe ²⁺	-	up to 11.6	-	[39]
Spectrophotometry	Fe ²⁺	1:2 *	0.358 – 8.95	322	[34]
	Fe ³⁺	1:2 *	0.358 – 8.95	322	
Spectrophotometry	Fe ²⁺	1:2	0.0895 – 2	14.3	[40]
Spectrophotometry	Fe ²⁺	-	0.0895 – 7.2	26.9	[32]
Spectrophotometry	Fe ²⁺	1:1	-	71.6	[41]
Spectrophotometry	Fe ²⁺	1:2	6.45 – 89.5	1970	[42]
Spectrophotometry	Fe ²⁺	1:2	-	610	[43]
Spectrophotometry ^b	Fe ²⁺	1:2	-	53.7	[44]
Spectrophotometry ^c	Fe ³⁺	-	0.358 – 89.5	179	[45]
Adsorptive LSV ^d	Fe ³⁺	1:1 *	0.00025 – 0.1	-	[31]
Derivative adsorption chronopotentiometry	Fe ³⁺	1:1	0.0067 – 0.17	2	[46]

Derivative adsorption chronopotentiometry	Fe ³⁺	1:1	-	-	[47]
SW ^e adsorptive cathodic stripping voltammetry	Fe ³⁺	?	0.00555 – 0.448	1.67	[37]
DP ^f adsorptive cathodic stripping voltammetry	Fe ³⁺	?	0.03 – 3	3.5	[33]
DP ^f adsorptive cathodic stripping voltammetry	Fe ³⁺	1:2	0.01 – 1	1.2	[30]

^a Limit of detection; ^b Second derivative spectrophotometry; ^c Third derivative spectrophotometry; ^d linear sweep voltammetry; ^e square wave voltammetry; ^f differential pulse voltammetry; * works in which a determination of the stoichiometry has been conducted.

In this work, we report on a new study which definitely establishes the stoichiometry of the Fe(III)/5-Br-PADAP and Fe(II)/5-Br-PADAP complexes. This latter was determined by both electrochemical and spectrophotometric experiments using different initial metal:ligand ratio. The stability constants β of the complexes were also evaluated and compared to values previously reported in the literature. Considerations on the electrochemical reduction process of both the complex and the free ligand are also provided. These results were used to extend the determination of Fe(II) and Fe(III) in the presence of 5-Br-PADAP to the μM concentration range. Tests in natural water from Canal du Midi were also conducted.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Chemicals

All chemicals were of analytical grade and used as received. 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5- diethylaminophenol (5- Br-PADAP) (C₁₅H₁₇BrN₄O, 98%), iron(III) chloride hexahydrate (FeCl₃ • 6 H₂O, 99%) and iron(II) sulfate heptahydrate (FeCl₂ • 7 H₂O, 99%) were purchased from Acros Organics. Sodium acetate (99%) was supplied by Aldrich. Acetic acid (99%) was obtained from Fisher. Absolute ethanol (99%), hydrochloric acid (30%, suprapur grade) and sulfuric acid (95%, Normapure grade) were provided by VWR Chemicals.

5-Br-PADAP was prepared as a 2 mM ethanol solution because of its poor solubility in water. All the other solutions were prepared using ultrapure water (Milli-Q, Millipore, 18.2 M Ω cm) and deaerated by bubbling Nitrogen during 10 min. A gas stream was maintained over the solutions during experiments.

2.2. Apparatus

All electrochemical experiments were performed at room temperature using a Metrohm μ -Autolab II or a PGStat 128N potentiostat interfaced to a personal computer and controlled with NOVA 2.1.5 software package. A classical three-electrode glass cell was used with a Metrohm platinum rod and a Radiometer saturated calomel electrode (SCE) connected to the

cell by a capillary as counter and reference electrode, respectively. All the potentials are expressed with respect to SCE. Working electrode was a 2-mm diameter gold (Au) rotating disk electrode from Radiometer.

UV-visible measurements were recorded on a Perkin Elmer Lambda 365 spectrophotometer using the UV Express software.

Inductive Coupled Plasma – Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES) was performed on a HORIBA Ultima 2 spectrometer using a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Fe standard solution in 4 % HNO_3 from SCP Science.

Organic matter digestion was conducted by UV treatment of natural water using a Medium Pressure UV Lamp Heraeus TQ 150. Samples were irradiated for 10 min.

2.3. Electrode preparation

The Au electrode was carefully polished by a 1 μM and 0.3 μM alumina slurry on a polishing cloth pad for 2 min each. Between each polishing step, the electrode surface was rinsed with Milli-Q water. Finally, the electrode was sonicated for 5 min in a 96% ethanol solution. Prior to measurements, the Au electrode was cleaned electrochemically in a deaerated 0.5 M H_2SO_4 solution by cycling the electrode potential between 0 V and 1.5 V at 100 mV s^{-1} until reproducible voltammograms were obtained.

2.4. Detection procedure

Electrochemical measurements were conducted in a 0.1 M acetate buffer (pH 6) as supporting electrolyte containing 30 μM 5-Br-PADAP. First, a potential of -0.12 V was applied for 6 min under stirring as a preconcentration step. Then a cathodic scan was recorded from -0.20 V to -0.60 V or from -0.11 to 0.70 V using differential pulse voltammetry (DPV) with the following conditions: pulse amplitude = 50 mV; step amplitude = 4 mV; pulse time = 50 ms; scan rate = 8 mV s^{-1} . These latter experimental conditions including the preconcentration step were used for all DPV measurements.

2.5. Water sampling and conditioning

Natural water dedicated to Fe(III) and Fe(II) determination was collected from Canal du Midi, on the campus of the Paul Sabatier University in Toulouse (43° 46' 34.7002'' N, 1° 15' 35.2015'' E). A sample was taken in a pre-cleaned 2L-Teflon bottle and immediately acidified overnight using 30% HCl (initial pH value: 7.56; final pH value: 1.9). Prior to ICP-OES analysis, the sample was filtered using a 0.45 μm membrane filter in order to remove impurities and matter in suspension. When necessary, the water samples were digested by UV treatment for 10 min.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Electrochemical study of free 5-Br-PADAP and Fe(III) and Fe(II) complexes with 5-Br-PADAP

The electrochemical behavior of free 5-Br-PADAP in solution was first examined. Figure 1 shows the differential pulse voltammogram (DPV) recorded for 30 μM 5-Br-PADAP in 0.1 acetate buffer (pH 6.0) on Au electrode (red line).

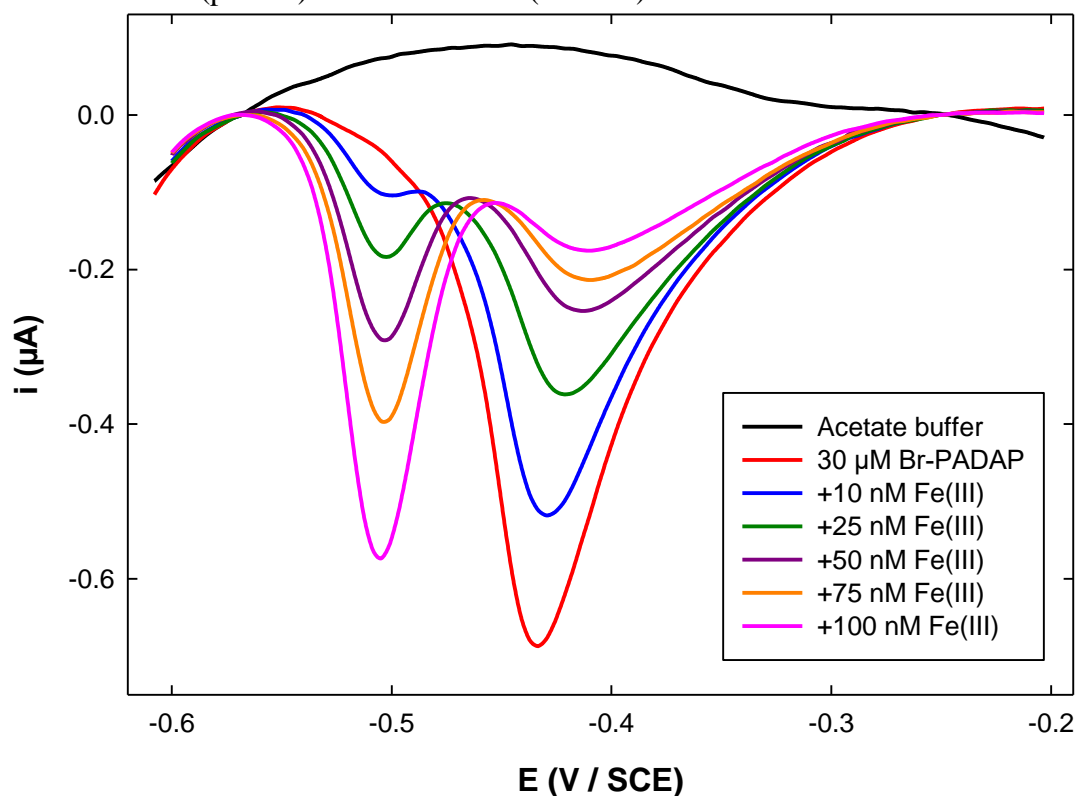


Figure 1. Differential Pulse Voltammograms recorded on Au electrode in 0.1 M acetate buffer (pH 6) (black line) containing 30 μM 5-Br-PADAP (red line) and increasing amounts of Fe(III) (other lines).

In order to mimic the experimental conditions used for Fe(III) determination and quantification, a preconcentration step (See Section 2.4.) was systematically applied before recording the DPV. The voltammogram exhibited a single reduction peak located at -0.43 V, which was attributed to 5-Br-PADAP reduction. This result including the peak potential value is in good agreement with the work by Zhu et al. who have reported a single reduction peak around -0.40 V for 5-Br-PADAP on both glassy carbon and reduced graphene oxide / gold nanoparticles modified electrodes [33], and in contradiction with another work from the same group in which no signal was observed despite of the presence of an excess 5-Br-PADAP [30]. The addition of 10 nM Fe(III) to the solution lead to the appearance of a small, second reduction peak located at -0.51 V together with a strong, unexpected decrease (around 25 %) in the peak

current corresponding to 5-Br-PADAP reduction (Figure 1, blue line). The new peak at -0.51 V was assigned to the reduction of the Fe(III)/5-Br-PADAP complex, in accordance with several previous reports [30,33]. This latter complex was formed according to the following reaction:



in which M stands for free Fe(III), L is 5-Br-PADAP and ML_n is the corresponding complex, n being the number of ligands coordinated to a metallic center. For the sake of clarity, the charges were omitted. It is worth noting that without the presence of 5-Br-PADAP in the solution, no signal was obtained on the DPV for a 10 nM Fe(III) concentration (not shown). Further addition of Fe(III) up to 100 nM induced an increase of the peak corresponding to the complex together with a decrease of the peak corresponding to free 5-Br-PADAP (Figure 1, green, violet, orange and pink lines). This behavior is consistent with a progressive complexation of Fe(III) by 5-Br-PADAP. However, it is noteworthy that while the increase in peak current for the complex and the decrease in peak current for free 5-Br-PADAP are in the same order of magnitude, the concentrations of Fe(III) and 5-Br-PADAP are actually not, this latter being at least in a 300-fold excess proportion. This observation clearly indicates that both reductions do not proceed via a similar pathway.

In order to clarify this result, complementary experiments were conducted by cyclic voltammetry using different scan rates. Figure 2A shows the evolution of 5-Br-PADAP reduction peak when scan rate was increased from 50 to 400 mV s^{-1} . The corresponding peak current increased with the increase in scan rate and the peak potential progressively shifted to more cathodic values from -0.51 to -0.61 V, in accordance with the irreversible character of the redox process. The peak current was found to be linearly dependent ($r^2 = 0.9826$) on the square root of the scan rate rather than on scan rate (Figures 2C and 2D, blue points), indicating that the reduction of 5-Br-PADAP is a mass transfer-controlled process. Similar experiments conducted on the Fe(III)/5-Br-PADAP complex (Figure 2B) showed that the corresponding peak current evolved in a linear trend ($r^2 = 0.9937$) as a function the square root of the scan rate (Figure 2C, red points), in accordance with another mass transfer-controlled redox process.

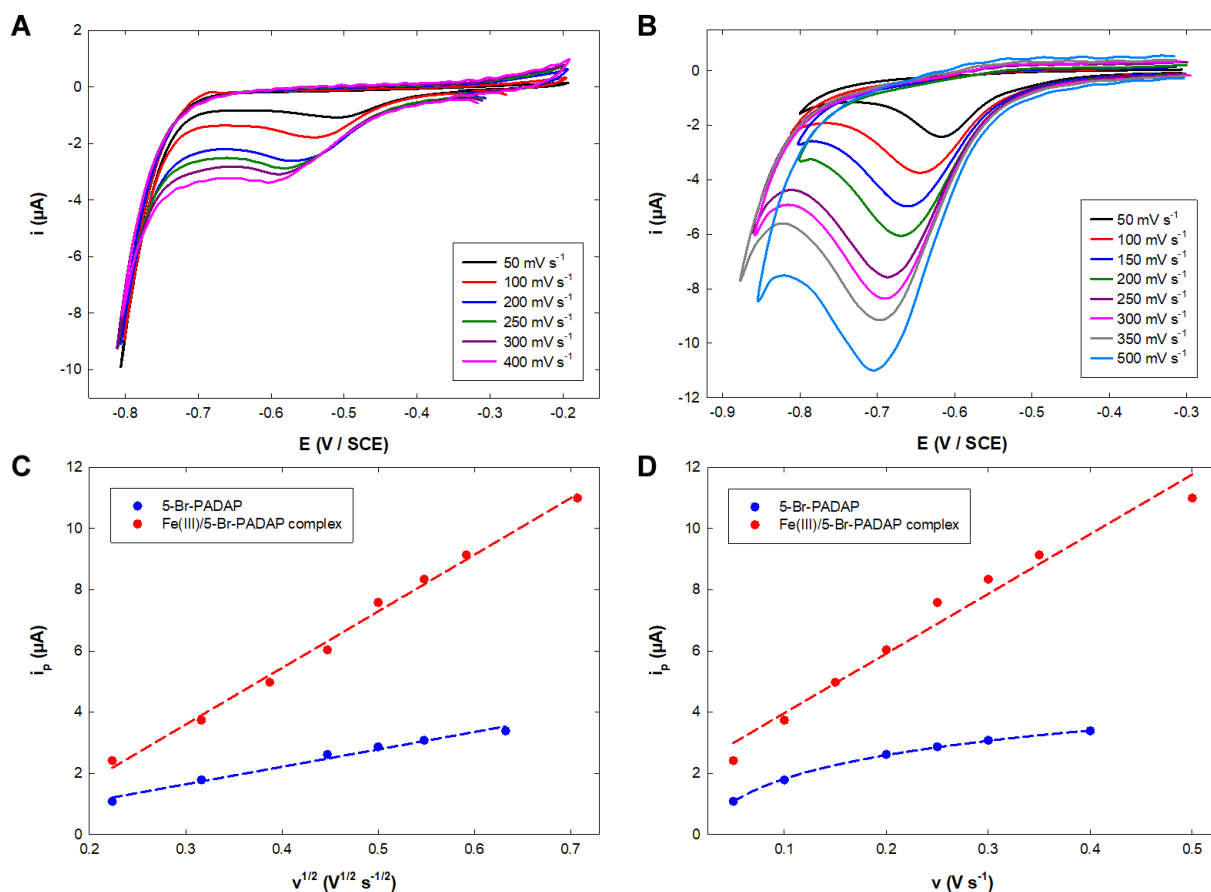


Figure 2. Cyclic voltammograms of (A) free 5-Br-PADAP and (B) Fe(III)/5-Br-PADAP complex recorded at different scan rates in 0.1 M acetate buffer (pH 6) on Au electrode. Evolution of the reduction peak current value of (blue) 5-Br-PADAP and (red) Fe(III)/5-Br-PADAP complex as a function of (C) square root of the scan rate and (D) scan rate.

However, in this case, and contrary to what was observed for free 5-Br-PADAP, the plot of the peak current as a function of the scan rate (Figure 2D, red points) also exhibited a roughly linear trend ($r^2 = 0.9693$), suggesting that adsorption of the complex on the electrode surface plays a role in its reduction process. In order to quantify this latter contribution, the treatment recently reported by the group of Walcarius was applied here (not shown) [48]. Briefly, this method allows to evaluate the respective contribution of adsorption and diffusion to the overall current by plotting a normalized current as a function of the square root of the scan rate. In our case, it was found that adsorption contributed between 22 to 48 % of the recorded current, depending on the scan rate used. This result is in accordance with the need for a preconcentration step, which currently consists in an adsorption step, for the complex detection at low concentration. Thus, this combination of two different processes for the reduction of the Fe(III)/5-Br-PADAP complex, one limited by mass transfer in the solution and the other by adsorption onto the electrode surface may explain the similarity in the peak current values observed for the complex reduction and free 5-Br-PADAP reduction although the complex concentration was significantly lower, 5-Br-PADAP being assumed to be unaffected by the preconcentration step. Another complementary experiment was performed in order to understand the strong decrease in peak current for free 5-Br-PADAP when adding Fe(III): the

same volumes of water were added to the 5-Br-PADAP-containing buffer solution, but without any Fe(III). A similar decrease in reduction peak current was noticed, although any complexation by Fe(III) could not be invoked (not shown). In fact, the decrease was due to the very poor solubility of 5-Br-PADAP in water, and subsequent progressive precipitation while adding water volumes, even if very small. This result probably explains why in the work by Zhu et al. [30] no reduction peak was observed for 5-Br-PADAP during Fe(III) detection, although the ligand was in large excess compared to metal ions.

3.2. Elucidation of the stoichiometry of the Fe(III)/5-Br-PADAP and Fe(II)/5-Br-PADAP complexes

The observation that 5-Br-PADAP reduction is a mass transfer-controlled process while Fe(III)/5-Br-PADAP complex reduction is limited both by diffusion and adsorption induces that a direct determination of the complex stoichiometry from the correlation of the amount of consumed ligand to the amount of added Fe(III), extracted from peak currents, would lead to an unrealistic value of the metal:ligand ratio. Thus, in order to elucidate the stoichiometry of the Fe(III)/5-Br-PADAP complex, an alternative electrochemical experiment was conducted in which successive amounts of ligand were added to a fixed concentration of metal. For each amount a DPV was recorded using the same experimental conditions as before. Figure 3A shows the resulting voltammograms. As expected, an increasing peak located around -0.51 V was observed, which corresponds to the reduction of the Fe(III)/5-Br-PADAP complex formed according to Reaction 1.

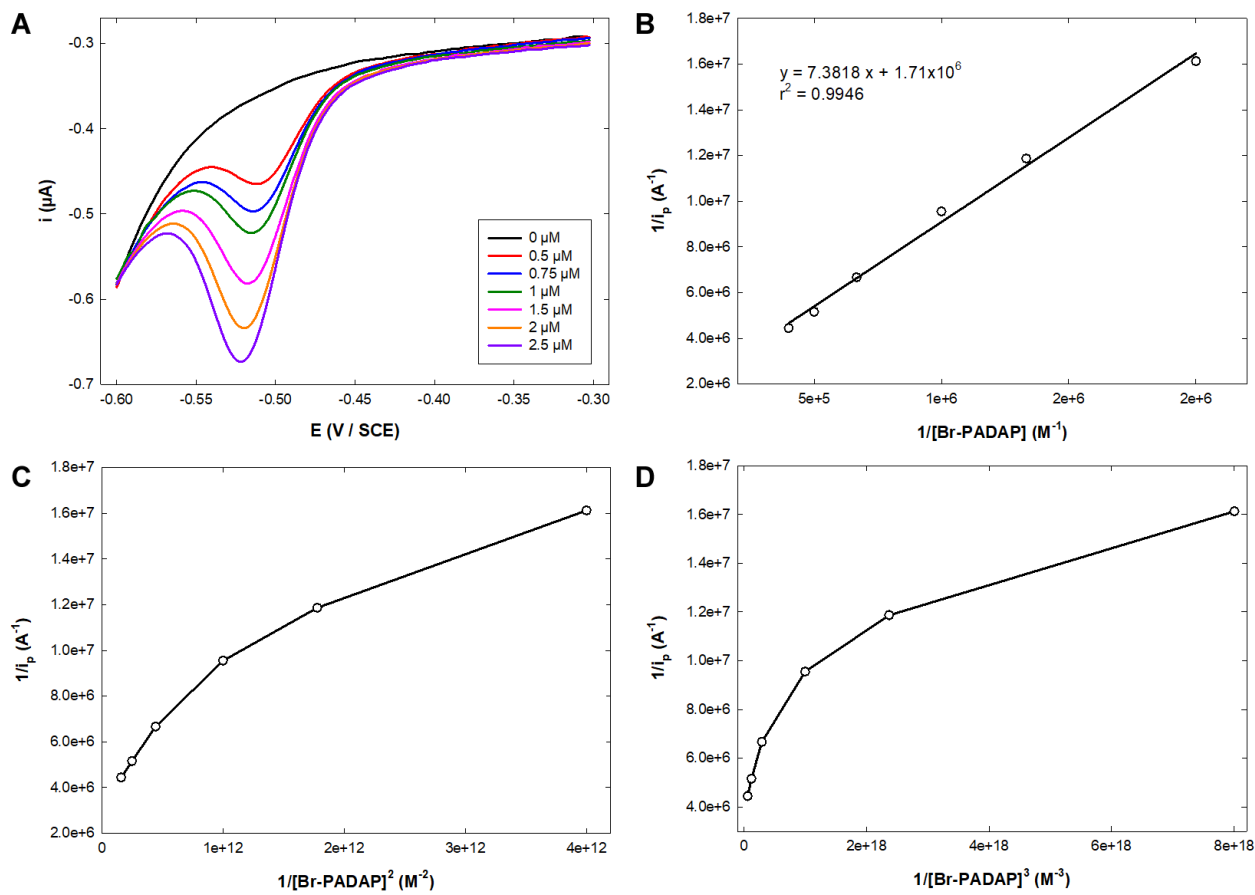


Figure 3. (A) Differential Pulse Voltammograms recorded on Au electrode in 0.1 M acetate buffer (pH 6) containing 2 μM Fe(III) and increasing amounts of 5-Br-PADAP. Plot of the inverse of the peak current corresponding to the reduction of the Fe(III)/5-Br-PADAP complex as a function of the inverse of 5-Br-PADAP concentration at the n power for (B) $n = 1$; (C) $n = 2$; (D) $n = 3$.

From this latter reaction, the stability constant β for the Fe(III)/5-Br-PADAP complex may be expressed as:

$$\beta = \frac{[\text{ML}_n]}{[\text{M}][\text{L}]^n} \quad (1)$$

Considering the adsorption process of the complex to be a key step in its electrochemical detection, Equation (1) can be adapted that way:

$$\beta = \frac{\Gamma_{\text{ML}_n}}{[\text{M}][\text{L}]^n} \quad (1')$$

in which Γ_{ML_n} represents the surface concentration of the adsorbed complex on the electrode surface (mol cm^{-2}). If we define $\Gamma_{\text{ML}_n}^{\text{total}}$ as the complex surface concentration if all the metal cations present in solution have reacted with the ligands, the mass balance equation can be written:

$$V [M] = A \left(\Gamma_{ML_n}^{total} - \Gamma_{ML_n} \right) \quad (2)$$

Considering the reduction peak current to be proportional to the corresponding complex surface concentration, it is possible to write:

$$\frac{[M]}{\Gamma_{ML_n}} = \frac{A}{V} \left(\frac{i_{p,max} - i_p}{i_p} \right) \quad (3)$$

in which A is the electrode active surface area and V is the volume of the solution. This latter expression can be rearranged to express the ratio $i_{p,max}/i_p$:

$$\frac{i_{p,max}}{i_p} = \frac{V}{A} \left(1 + \frac{[M]}{\Gamma_{ML_n}} \right) \quad (4)$$

Identifying the concentration ratio using Equation (1'), the following expression is finally obtained:

$$\frac{1}{i_p} = \frac{V}{A} \left(\frac{1}{i_{p,max}} + \frac{1}{\beta i_{p,max} [L]^n} \right) \quad (5)$$

Figures 3B, 3C and 3D show the plot $1/i_p$ as a function of $1/[L]^n$ for $n = 1, 2$ and 3 , respectively. From Equation (4), a linear plot is expected for the value of n which actually corresponds to the complex stoichiometry. Thus, this latter value was found to be $n = 1$, corresponding to a 1:1 Fe(III)/5-Br-PADAP ratio. This result is in accordance with the work by Zhao et Jin [31], who have used the same electrochemical method to get their result, but is in contradiction with the report by Oszwaldowski and Pikus [34], who have performed the determination of the stoichiometry using spectrophotometry and have found a 1:2 metal:ligand ratio. Using the regression equation from Figure 3B, it was possible to estimate the value of β from the intercept/slope ratio. A value $\beta = 2.3 \times 10^5$ was found, which suggests a much lower stability for the complex than that reported by Oszwaldowski and Pikus [34]. A similar treatment was applied to determine the stoichiometry of the Fe(II)/5-Br-PADAP complex, the oxidation of which appeared as a broad peak around 0.25 V (not shown). Using Equation (4) as for the Fe(III)/5-Br-PADAP complex, a 1:1 stoichiometry was found, together with a β value of 5.5×10^4 . Once again, this suggests a much lower stability for the Fe(II)/5-Br-PADAP complex than that reported by Oszwaldowski and Pikus [34].

In order to get more information and definitely prove the Fe(III)/5-Br-PADAP and Fe(II)/5-Br-PADAP complexes stoichiometry, an alternative determination was performed using spectrophotometry, following the Bent-French method [35]. Briefly, this method consists in a logarithmic treatment of both Equation (1) and the Beer-Lambert law which allows to write the following expression:

$$\log A = \log \varepsilon + \log l + \log \beta + \log [M] + n \log [L] \quad (6)$$

in which A is the absorbance, ε the molar extinction coefficient of the complex and l the length of the UV-visible cell, according to the Beer-Lambert law, and $\beta, n, [M]$ and $[L]$ are the same as previously defined. Thus, the plot $\log A$ as a function of $\log [L]$ while maintaining $[M]$ constant, allows the determination of n . Figure 4A shows the UV-visible spectra of both complexes in the range 400 – 850 nm. The shape of both spectra was comparable to that

reported by Oszwaldowski and Pikus and typical for such kinds of azo chelates [34]. The Fe(III)/5-Br-PADAP and Fe(II)/5-Br-PADAP complexes exhibited a maximum in absorbance at 527 and 555 nm, respectively. The value obtained for Fe(II)/5-Br-PADAP compared favorably to that found by Oszwaldowski and Pikus, but the value for Fe(III)/5-Br-PADAP (ca. 527 nm) was found to be significantly different. The reason for that could be the difference in the medium used for recording the spectra.

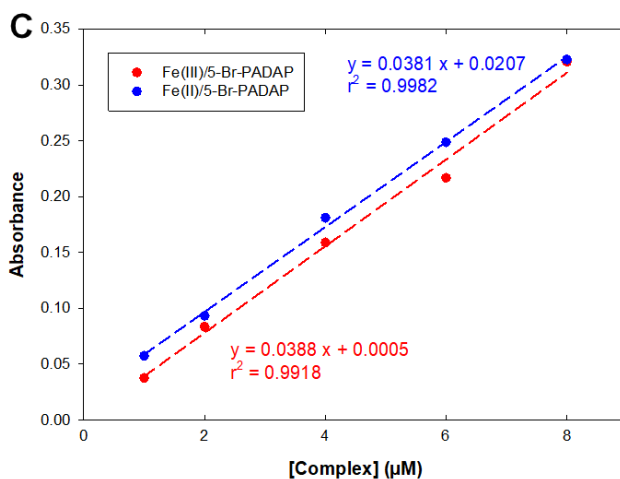
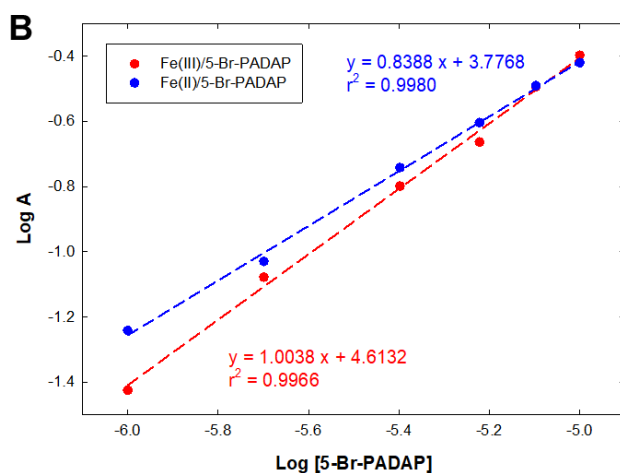
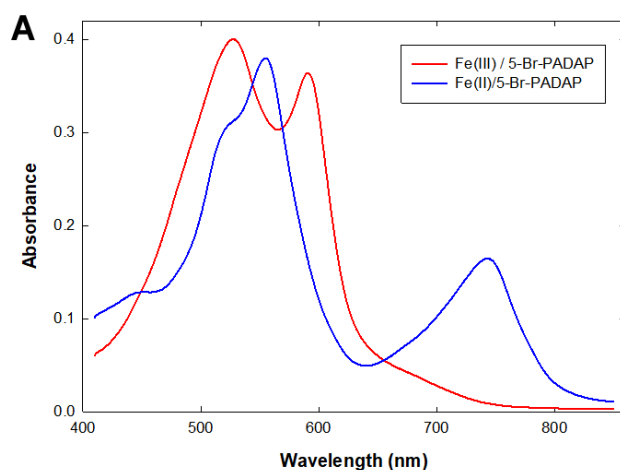


Figure 4. (A) UV-Visible spectra of the complexes Fe(III)/5-Br-PADAP and Fe(II)/5-Br-PADAP in a water/ethanol (4:1 volume) mixture; (B) Plot of the logarithm of the measured absorbance as a function of the logarithm of the concentration of added ligand for a 8 μM metal concentration; (C) Plot of the measured absorbance as a function of the complex concentration.

The addition of successive amounts of 5-Br-PADAP in alcohol solution to a given, constant concentration of Fe(III) or Fe(II) in excess in aqueous solution induced an increase in absorbance due to the formation of the corresponding complexes. For both complexes the graph $\log A$ vs. $\log [L]$ was plotted (Figure 4B). In both cases, a linear relationship was obtained, the slope of which allowed the value of n to be extracted: this value was found to be 1.00 and 0.84 for Fe(III)/5-Br-PADAP and Fe(II)/5-Br-PADAP complexes, respectively, thus definitely confirming the 1:1 stoichiometry determined by DPV experiments. These results are in contradiction with the finding by Oszwaldowski and Pikus who have also used the Bent-French method and have reported a 1:2 stoichiometry for both complexes [34]. However, in the corresponding report the graphs $\log A$ vs. $\log [L]$ were not provided, so that it is difficult to further discuss on the observed discrepancy.

Finally, the graphs A vs. complex concentration were plotted for both complexes (Figure 4C). Both exhibited a linear trend, in accordance with the Beer-Lambert law. From the slope of the curves which provided the ϵ value and using Equation (5), it was possible to estimate the stability constant β for both complexes: this latter was found 1.3×10^5 and 2.0×10^4 for Fe(III)/5-Br-PADAP and Fe(II)/5-Br-PADAP complexes, respectively. It is worth noting that, in order to decrease the uncertainty on the ϵ values, the UV-Visible measurements were performed in such a way that the water:alcohol volume ratio remained constant during the whole experiments. All the data upon the stoichiometry and the stability constant are summarized in Table 2.

Table 2. Stoichiometry and stability constant for Fe(III)/5-Br-PADAP and Fe(II)/5-Br-PADAP complexes determined by both UV-Visible and electrochemical measurements.

		Fe(III)/5-Br-PADAP	Fe(II)/5-Br-PADAP
Stoichiometry	DPV	1:1	1:1
	UV-Vis.	1:1	1:1
Stability constant	DPV	2.3×10^5	5.5×10^4
	UV-Vis.	1.3×10^5	2.0×10^4

Both β values obtained by spectrophotometry compared well with that previously determined by using DPV. Whatever the method used, the Fe(III)/5-Br-PADAP complex was found to be one order of magnitude more stable than the corresponding Fe(II)/5-Br-PADAP complex. Considering that there is no obvious reason for the stoichiometry to change while changing the oxidation degree of the metallic center from Fe(III) to Fe(II), these latter can be unambiguously assigned to be 1:1 on the basis of four different experiments.

3.3. Fe(III) and Fe(II) electrochemical determination using 5-Br-PADAP

Acetate buffer solutions containing low amounts of Fe(III) and Fe(II) were measured by adsorptive DPV after addition of 30 μM 5-Br-PADAP. Figure 5A shows the resulting curves obtained in the case of increasing amounts of Fe(III). The typical signal for the reduction of the Fe(III)5-Br-PADAP located around -0.51 V was observed, the peak current of which increased linearly with Fe(III) concentration (Figure 5B).

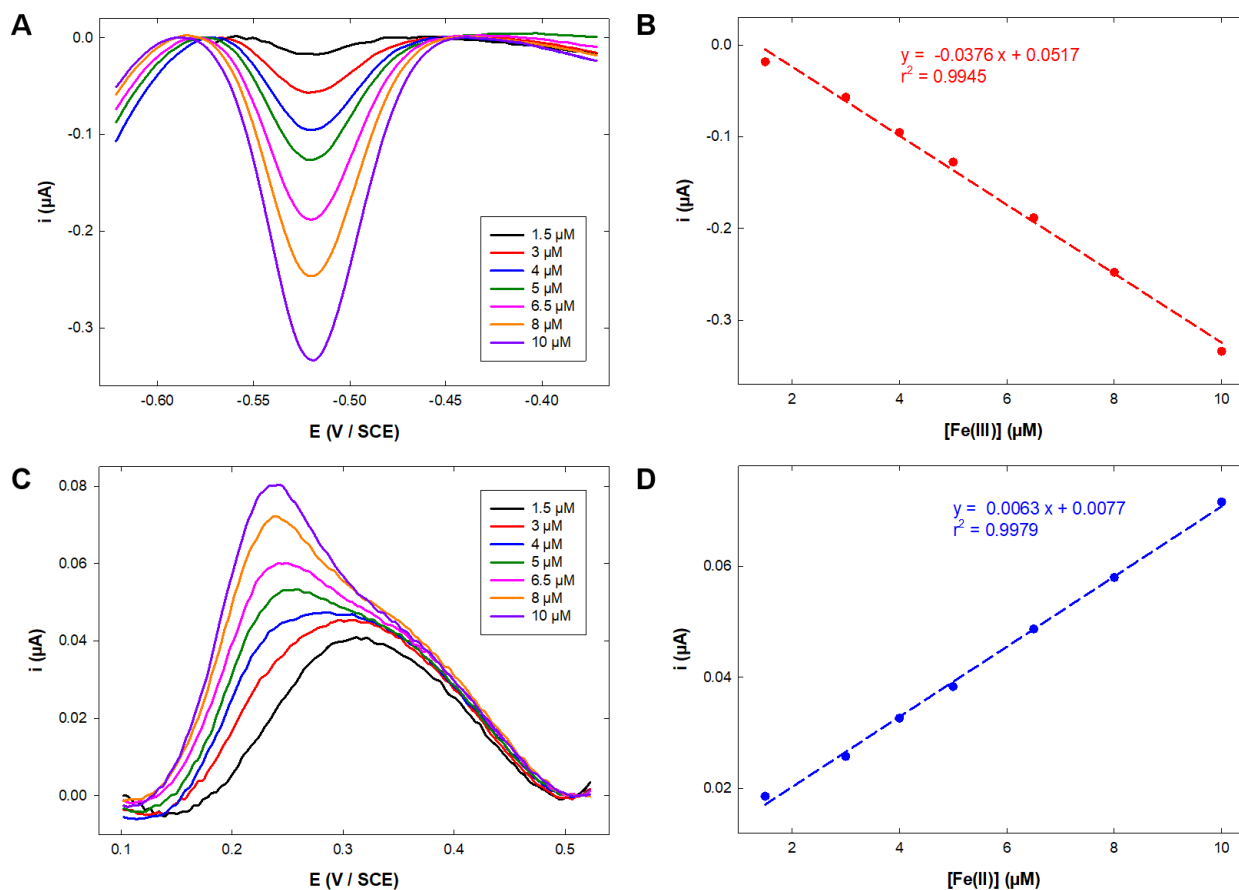


Figure 5. DPV recorded on Au electrode in 0.1 M acetate buffer (pH 6) containing 30 μM 5-Br-PADAP and increasing amounts of (A) Fe(III) and (C) Fe(II). Calibration plots obtained for (B) Fe(III) and (D) Fe(II).

The calibration plot exhibited a clear linear trend in the range 1 μM – 10 μM , with a sensitivity of $0.0376 \mu\text{A} \mu\text{M}^{-1}$. This result suggests that, despite of the poor solubility of 5-Br-PADAP in water, the method can be used for the determination of Fe(III) in concentration ranges higher than that reported by Zhu et al., whose upper concentration limit was 1 μM [33]. The same experiment was conducted with increasing amounts of Fe(II). In this case, a broad anodic peak was noticed around 0.31 V for the lowest Fe(II) concentrations (Figure 5C). While increasing Fe(II) concentration, this latter peak progressively changed to a narrower peak with

a more classical shape located at 0.25 V, associated to a post-peak shoulder. These signals were assigned to the Fe(II)/5-Br-PADAP oxidation, despite of the change in peak morphology which remained unclear to us. The plot of the peak current as a function of Fe(II) concentration provided a linear calibration plot in the range 1 μM – 10 μM with a corresponding sensitivity of 0.0063 $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$ (Figure 5D). It is worth noting that both of the recorded peak currents and the calculated sensitivity in the case of Fe(II) were much lower than that obtained in the case of Fe(III).

3.4. Analysis of a natural water sample

Tests were conducted on a natural water sample from the Canal du Midi collected on the campus of the university. After addition of concentrated HCl and stirring overnight, 25 mL of the sample were analyzed using the established procedure. With respect to Fe(III) determination, after addition of 30 μM 5-Br-PADAP a well-defined reduction peak at -0.49 V was observed together with a small, broad shoulder located around -0.40 V (not shown). The peak at -0.49 V was unambiguously assigned to the reduction of the Fe(III)/5-Br-PADAP complex on the basis of our previous observations. The shoulder was not attributed to any reduction of a species, since the natural sample was not treated, except acidification for conditioning purpose. Three successive amounts of Fe(III) were then spiked into the natural water sample, and the corresponding DPV were recorded, allowing a regression graph to be plotted (Figure 6A, full red points). From the equation of the plot, a concentration $[\text{Fe(III)}] = 1.3 \mu\text{M}$ was obtained for the natural water sample.

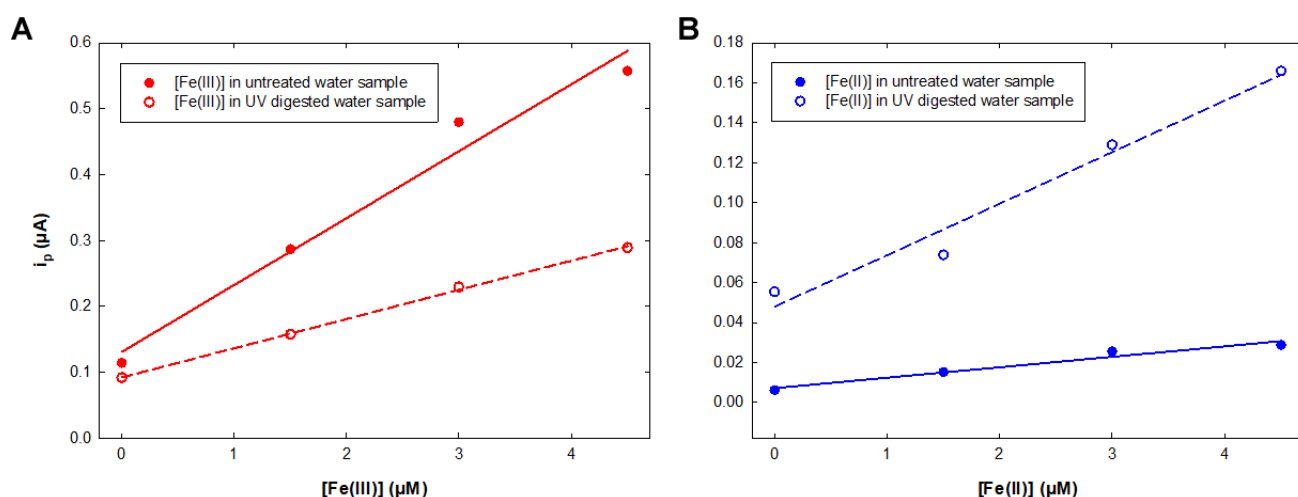


Figure 6. Regression plots obtained for three successive spike concentrations of (A) Fe(III) and (B) Fe(II) in (full color points) untreated or (empty color points) UV-digested natural water samples from Canal du Midi.

A similar procedure was used for the determination of Fe(II): in this latter case, an oxidation peak located at 0.23 V was observed, and spiking three successive amounts of Fe(II)

allowed to extract a concentration $[\text{Fe(II)}] = 1.4 \mu\text{M}$ (Figure 6B, full blue points). These values were compared to that obtained using the reference analysis technique, namely inductive coupled plasma - optical emission spectroscopy (ICP-OES) which provided a value for total Fe $[\text{Fe}] = 4.5 \mu\text{M}$. Thus, only 60 % of ${}^{\text{t}}\text{Fe}$ was recovered using the voltammetric analysis via 5-Br-PADAP complexation. This result suggested that 5-Br-PADAP is actually not a complexing agent strong enough to catch Fe(III) and Fe(II) from its corresponding complexes with organic matter. In order to support this hypothesis, the same analyses were conducted on a water sample from the Canal du Midi after organic matter UV digestion. The corresponding responses obtained after three successive spikes of Fe(III) and Fe(II) are depicted on Figure 6A and 6B (empty red and blue points, respectively). The corresponding values for Fe(III) and Fe(II) concentrations are summarized in Table 3. In this latter cases, values of $2.3 \mu\text{M}$ and $1.7 \mu\text{M}$ were found for Fe(III) and Fe(II) concentration, respectively. In accordance with the hypothesis of a strong complexation of Fe(III) and Fe(II) with organic matter, both concentration values were found to be higher than that obtained when the natural water sample did not experience any treatment for organic matter digestion. However, still only 89 % of ${}^{\text{t}}\text{Fe}$ was recovered, ca. $4.0 \mu\text{M}$. This latter result can be accounted for considering the values found in this work for the β values of Fe(III)/5-Br-PADAP and Fe(II)/5-Br-PADAP complexes, which suggest the existence of an equilibrium between free and complexed Fe(III) or Fe(II) species, and the subsequent detection of only a part of the present species.

Table 3. Fe speciation in untreated and UV-digested natural water samples from canal du Midi.

UV digestion	Fe(II) (μM) ^a	Fe(III) (μM) ^a	${}^{\text{t}}\text{Fe}$ (μM) ^b
No	1.4	1.3	2.7 (60%) ^c
Yes	1.7	2.3	4 (89%)

^a Determined by electrochemistry.

^b $[\text{Fe}] = [\text{Fe(III)}] + [\text{Fe(II)}]$.

^c The percentage of recovery was calculated from the ratio $[\text{Fe(III)}] + [\text{Fe(II)}] / [\text{Fe}]$, the latter concentration being obtained by ICP-OES.

4. CONCLUSIONS

In this work, the stoichiometry of the complexes formed between Fe(III) and Fe(II) with 5-Br-PADAP was definitely proved to be 1:1. On the basis of both electrochemical and spectrophotometric studies, the 4 different converging determinations that were conducted give a statistical power to this result. Contrary to free 5-Br-PADAP the reduction of which was proved to be a mass transfer-limited process, the reduction of the Fe(III)/5-Br-PADAP complex was found to be dependent on both diffusion and adsorption phenomena, thus highlighting the role of the preconcentration step in low Fe(III) determination in the presence of 5-Br-PADAP.

The Fe(III)/5-Br-PADAP complex was found to be one order of magnitude more stable than the corresponding Fe(II) complex. The method using 5-Br-PADAP complexation and subsequent preconcentration by adsorption on the electrode surface was demonstrated to be efficient in the 1 – 10 μ M concentration range for both Fe(III) and Fe(II). Tests in natural water samples from Canal du Midi showed that without pretreatment of the sample only Fe(III) and Fe(II) from the most labile complexes with organic matter can be determined, since 5-Br-PADAP is a complexing agent not strong enough to catch Fe(III) or Fe(II) from these latter. In order to access more reliable values for Fe(III) and Fe(II), a UV treatment of the sample appeared to be mandatory step.

References

1. K. H. Wedepohl, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 59 (1995) 1217.
2. S. R. Taylor and S. M. McLennan, *The continental crust: Its composition and evolution*, London (1985).
3. P. T. Lieu, M. Heiskala, P. A. Peterson and Y. Yang, *Mol. Aspects Med.*, 22 (2001) 1.
4. M. E. Conrad, J. M. Umbreit and E. G. Moore, *Am. J. Med. Sci.*, 318 (1999) 213.
5. T. Dandekar and M. W. Hentze, *Trends Genet.*, 11 (1995) 45.
6. M. Miethke and M. A. Marahiel, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 71 (2007) 413.
7. J. H. Martin and S. E. Fitzwater, *Nature (London)*, 331 (1988) 341.
8. J. H. Martin and R. M. Gordon, *Deep-Sea Res., Part A.*, 35 (1988) 177.
9. P. Ugo, L. M. Moretto, D. Rudello, E. Birriel and J. Chevalet, *Electroanalysis*, 13 (2001) 661.
10. J. H. T. Luong, E. Lamb and K. B. Male, *Anal. Methods*, 6 (2014) 6157.
11. J. H. Martin, R. M. Gordon, S. E. Fitzwater and W. W. Broenkow, *Deep-Sea Res., Part A.*, 36 (1989) 649.
12. J. W. Munger, J. M. Waldman, D. J. Jacob and M. R. Hoffmann, *J. Geophys. Res. Oceans*, 88 (1983) 5109.
13. D. B. Johnson, *Water, Air, Soil Pollut. Focus*, 3 (2003) 47.
14. C. M. G. van den Berg, M. Nimmo, O. Abollino and E. Mentasti, *Electroanalysis*, 3 (1991) 477.
15. M. Lu, N. V. Rees, A. S. Kabakaev and R. G. Compton, *Electroanalysis*, 24 (2012) 1693.
16. A. Kot and J. Namiesnik, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 19 (2000) 69.
17. X. Liu and F. J. Millero, *Mar. Chem.*, 77 (2002) 43.
18. S. Pehkonen, *Analyst (Cambridge UK)*, 120 (1995) 2655.
19. M. Lin, X. Hu, D. Pan and H. Han, *Talanta*, 188 (2018) 135.
20. L. M. Laglera and D. Monticelli, *Curr. Opin. Electrochem.*, 3 (2017) 123.
21. M. Gledhill and C. M. G. van den Berg, *Mar. Chem.*, 47 (1994) 41.
22. A. P. Aldrich and C. M. G. van den Berg, *Electroanalysis*, 10 (1998) 369.
23. T. Nagai, A. Imai, K. Matsushige, K. Yokoi and T. Fukushima, *Limnology*, 5 (2004) 77.
24. R. Segura, M. I. Toral and V. Arancibia, *Talanta*, 75 (2008) 973.
25. J. Gun, P. Salaun and C. M. G. van den Berg, *Anal. Chim. Acta*, 571 (2006) 86.
26. C. M. G. van den Berg, *Anal. Chem.*, 78 (2006) 156.

27. L. M. Laglera, J. Santos-Echeandia, S. Caprara and D. Monticelli, *Anal. Chem.*, 85 (2013) 2486.
28. E. L. Rue and K. W. Bruland, *Mar. Chem.*, 50 (1995) 117.
29. P. L. Croot and M. Johansson, *Electroanalysis*, 12 (2000) 565.
30. Y. Zhu, X. Hu, D. Pan, H. Han, M. Lin, Y. Lu, C. Wang and R. Zhu, *Sci. Rep.*, 8:2576 (2018)
31. J. Zhao and W. Jin, *J. Electroanal. Chem.*, 267 (1989) 271.
32. B. Peng, Y. Shen, Z. Gao, M. Zhou, Y. Ma and S. Zhao, *Food Chem.*, 176 (2015) 288.
33. Y. Zhu, D. Pan, X. Hu, H. Han, M. Lin and C. Wang, *Sensors Actuators B: Chem.*, 243 (2017) 1.
34. S. Oszwaldowski and A. Pikus, *Talanta*, 58 (2002) 773.
35. H. E. Bent and C. L. French, *J. Am. Chem. Soc.*, 63 (1941) 568.
36. W. Fu-sheng, Z. Yu-rui and Y. Fang, *Anal. Lett.*, 14 (1981) 241.
37. E. M. Ghoneim, *Talanta*, 82 (2010) 646.
38. M. Vitouchova, L. Jancar and L. Sommer, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 343 (1992) 274.
39. A. C. S. Costa, S. L. C. Ferreira, M. G. M. Andrade and I. P. Lobo, *Talanta*, 40 (1993) 1267.
40. H. Filik and D. Giray, *Food Chem.*, 130 (2012) 209.
41. A. Flavia de Oliveira e Silva, W. Victor de Castro and F. Pereira de Andrade, *Food Chem.*, 242 (2018) 205.
42. P. Phansi, K. Danchana, S. L. C. Ferreira and V. Cerda, *Food Chem.*, 277 (2019) 261.
43. C. Andreu, K. Danchana and V. Cerda, *Anal. Lett.*, 53 (2020) 2775.
44. K. Sozgen, Esmá, *Talanta*, 62 (2004) 971.
45. M. A. Taher and B. K. Puri, *Talanta*, 43 (1996) 247.
46. W. Jin and J. Wang, *Anal. Chim. Acta*, 245 (1991) 77.
47. W. Jin and K. Liu, *Anal. Chim. Acta*, 347 (1997) 257.
48. D. Basnig, N. Vilá, G. Herzog and A. Walcarius, *J. Electroanal. Chem.*, 872 (2020) 113993.

© 2021 The Authors. Published by ESG (www.electrochemsci.org). This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Résumé

L. pneumophila (*Lp*) est une bactérie pathogène opportuniste colonisant fréquemment les réseaux artificiels. Les bactéries présentes dans les microgouttelettes d'eau contaminée sont inhalées par l'être humain et, sous certaines conditions, peuvent conduire à une pneumopathie (maladie du légionnaire) létale dans 10 à 15 % des cas. Les tours aéroréfrigérantes (TAR) sont les systèmes les plus fréquemment incriminés dans la contamination en raison de conditions de croissance microbiologique favorables conduisant à la présence de *Lp* à des taux élevés, y compris au sein de biofilms. Si des opérations de nettoyage et de désinfection à base de biocides sont réalisées dans le cadre de l'entretien ou lors d'une contamination excessive, elles doivent être proportionnées et justifiées afin de limiter les rejets polluants dans l'environnement. Par ailleurs, il a été montré que la présence de *Lp* est accrue à partir de concentrations en fer de l'ordre du micromolaire dans l'eau. Si les besoins en fer de la bactérie sont reconnus, l'impact des formes Fe(II) et Fe(III) et des concentrations observées dans les eaux de TAR sur la population bactérienne reste inconnu, surtout lors de la formation du biofilm à *Lp*. L'objectif principal de ce travail est donc de définir la relation entre les deux formes du fer et la persistance/croissance de *Lp* afin de proposer le développement d'un procédé original basé sur l'électrochimie pour la maîtrise de *Lp* dans les TAR. Dans un premier temps, un capteur électrochimique fonctionnalisé par la résine cationique Nafion® permettant la détermination des concentrations micromolaires du Fe(II) et Fe(III) a été mis au point. Ensuite, l'influence du Fe(II) et Fe(III) sur la formation de biofilms mono-espèces à *Lp* a été étudiée en se basant sur un modèle existant. Cette étude a montré que la présence du Fe(III) contribue à la mort ou à la transition vers la phase viable-non cultivable (VBNC) des bactéries adhérees. Le capteur a finalement été testé en milieu réel dans une eau provenant d'une TAR prototype et un premier lien a pu être établi entre la présence du fer et le statut de *Lp* dans les eaux de TAR.

Mots clés : *Legionella pneumophila*, biofilm, fer, capteur électrochimique, tours aéroréfrigérantes

Abstract

L. pneumophila (*Lp*) is an opportunistic pathogenic bacterium which frequently colonizes artificial water systems. Bacteria present in contaminated microdroplets of water are inhaled by human beings and, under certain conditions, can lead to a lethal pneumopathy (Legionnaires' disease) in 10 to 15 % of cases. Cooling towers are systems which are the most frequently involved in contamination due to favorable microbiological growth conditions leading to the presence of *Lp* at high levels, within biofilms included. If cleaning and disinfection operations based on biocides are carried out as part of maintenance or during excessive contamination, they must be proportionate and justified to limit pollutant release into the environment. Besides, it has been shown that the presence of *Lp* is increased when iron concentrations are in the micromolar range in water. While the iron requirements of the bacterium are recognized, the impact of Fe(II) and Fe(III) on the bacterial population remains unknown, especially during the formation of the *Lp* biofilm. The main objective of this work is therefore to define the relationship between the two forms of iron and the persistence/growth of *Lp* to come up with the development of an original method based on electrochemistry for the control of *Lp* in cooling towers. Firstly, an electrochemical sensor functionalized by the cationic resin Nafion® allowing the determination of micromolar concentrations of Fe(II) and Fe(III) was developed. The influence of Fe(II) and Fe(III) on the formation of mono-species biofilms in *Lp* was then studied based on an existing model. This study showed that the presence of Fe(III) contributes to the death or the transition to the viable-non-cultivable (VBNC) state of adhered bacteria. The electrochemical sensor was finally tested in water samples taken from a cooling tower prototype and a first link was established between the presence of iron and the status of *Lp* in cooling tower waters.

Keywords: *Legionella pneumophila*, biofilm, iron, electrochemical sensor, cooling towers