

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLAB - BLIDA 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV

Filière Sciences Biologiques

Option : Microbiologie

Thème

Possibilité de production de piles biologiques à partir de bactéries

Présenté par :

***HINDA Chemaissa**

***MEKID Kawther**

Devant le jury :

Mr GUEDIOURA A.

MCA/USDB1

Président

Mme CHELGHOUM H.

MCB/USDB1

Examinatrice

Mme LOUNACI L.

MCB/USDB1

Promotrice

Promotion : 2021-2022

Remerciement



Avant tout, nous remercions Allah de nous avoir donné la force, la volonté et le courage afin d'accomplir ce modeste travail.

Ce mémoire, fruit d'un dur labeur et de beaucoup de sacrifices, a bénéficié de l'aide multiforme de plusieurs personnes à qui nous voudrions témoigner toute notre reconnaissance.

Nous remercions fortement notre promotrice Madame **LOUNACI L** Maitre de conférence à l'université Blida 1 qui nous avoir proposé ce thème de mémoire PFE, pour ses conseils, ses orientations, son soutien moral, ses encouragements et surtout pour sa patience du début jusqu'à la fin de ce travail.

Notre sincère gratitude s'adresse à Monsieur **GUEDIOURA A** Maitre de conférence à l'université Blida 1 de nous avoir fait l'honneur de présider notre jury de soutenance, tout en lui adressant notre respectueuse considération.

Nous tenons à remercier très sincèrement Madame **AIT SAADI N** Maitre de conférence à l'université Blida 1 d'avoir accepté d'examiner ce travail et de faire partie de notre jury.

Nous tenons à remercier tous les enseignants du Département de Biologie et tous ce qui ont participé de près ou de loin pour la réalisation de ce mémoire.

Dédicace

A ma chère mère, la source de ma force et de mon bonheur qui m'a soutenu et encouragé durant ces années d'études

À mon cher père qui a toujours été à mes côtés et qui m'a donné de l'amour et des soins pour faire de moi ce que je suis aujourd'hui

A mon cher frère, mon deuxième père Amine et sa femme Khadija

A ma chère sœur Asma et mon beau-frère abdelhak

A ma sœur et chère amie Imane

A mes petites frères Aboubaker et Yasser

A mes nièces Maram et Lina et mes neveux Iyad, Siradj et Sami

A mon binôme, sœur et chère copine Chemaïssa et à tout sa famille

A ma cousine Chourouk et à toute la famille Mekid et la famille Lazergui

A mes chers amis : Djamila et Houda.

Kawther

Dédicace

Je dédie ce travail à ma petite famille qui m'a encouragé et soutenu durant mes études :

A ma très cher mère HOURIA Affable, honorable, aimable : tu m'as donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir. Tout ce que je peux t'offrir ne pourra exprimer l'amour et la reconnaissance que je porte .En témoignage, je t'offre ce modeste travail pour te remercier pour tes sacrifices et l'«affection dont tu m'as toujours entouré.que dieu tu protège « Merci maman».

A mon cher père ALI J'aurais aimé que tu sois à mes côtés et que je puisse te serrer dans mes bras et te dire que ton rêve est devenu réalité. Je ne peux que vous demander de prier, que Dieu te fasse miséricorde et t'accorde son vaste paradis.

A mes chers sœur Nesrine et Houda

A mes nièces Darine , Mina et mes neveux Moaadh , Ayoub

A mes grands parents qui je souhaite une longue vie pleine de bonheur

A mon cher oncle Ahmed

A tous les membres de la famille HINDA et DEHRI

A mon binôme, sœur et meilleure amie Kawther et à toute sa famille

A mon fiancé, l'homme qui a toujours su me soutenir, à qui j'adresse tous mes respects à lui et à sa famille.

A mes très chères amies : Fatma, Chaïma, Intissar, Chaïma, Chichí, Houria,Chaïma

A mes collègues et toute la promo Microbiologie 2022 de l'université Saad Dahlab de Blida.

CHÉMAISSA

Résumé :

L'industrie dirige de plus en plus vers des sources d'énergies renouvelables, et les piles à combustible microbiennes correspondent à cette vision, car elles utilisent des micro-organismes organisés dans un biofilm électroactifs pour convertir la matière organique en énergie électrique à partir des réactions d'oxydo-réduction.

La bactérie anaérobie facultative modèle *Shewanella oneidensis* MR-1, connue par sa capacité de transférer des électrons aux métaux solides.

Dans cette étude bibliographique, les méthodes utilisées reposent sur une culture bactérienne de l'espèce choisie et l'utilisation des nanofilms de fer de 10 nm d'épaisseur pour suivre les premières modifications de surface ainsi que le comportement des bactéries sur ou au voisinage du fer au cours des premières étapes de la biocorrosion. Ces nanofilms partiellement transparents, sont obtenus par évaporation thermique et ont été caractérisés par des techniques complémentaires (absorbance optique, réflectivité X).

Les résultats obtenus montrent que le rendement de croissance de *Shewanella oneidensis* est élevé dans la présence d'électrode de travail à fort potentiel. L'adhésion bactérienne à la surface est élevée et homogène sur la membrane bactérienne pour un temps d'incubation court (Lherbette, 2021).

Mots clés : biofilm électroactif, énergies renouvelables, nanofilms de fer, pile à combustible microbienne, *Shewanella oneidensis* MR-1.

Abstract :

Industry is increasingly moving towards renewable energy sources, and microbial fuel cells fit that vision because they use micro-organisms organized in an electroactive biofilm to convert organic matter into electrical energy from oxydo-reduction reactions.

The optional anaerobic bacteria model *Shewanella oneidensis* MR-1, known for its ability to transfer electrons to solid metals.

In this bibliographical study, the methods used are based on a bacterial culture of the chosen species and the use of 10 nm thick iron nanofilms to monitor the first surface changes and the behaviour of bacteria on or around iron during the early stages of biocorrosion. These partially transparent nanofilms are obtained by thermal evaporation and have been characterized by complementary techniques (optical absorbance, X reflectivity).

The results obtained show that the growth yield of high and homogenous on the bacterial membrane for a short incubation time.

Keywords : electroactive biofilm, iron nanofilms, renewable energies, microbial fuel cell, *Shewanella oneidensis* MR-1.

ملخص :

تتجه الصناعة بشكل متزايد الى مصادر الطاقة المتجددة، وتناسب خلايا الوقود الميكروبية هذه الرؤية، حيث تستخدم كائنات دقيقة منظمة في غشاء حيوي كهربائي لتحويل المادة العضوية الى طاقة كهربائية من خلال تفاعلات الأكسدة والارجاع .

نموذج البكتيريا اللاهوائية الاختياري *Shewanella oneidensis* MR-1 ، معروف بقدرته على نقل الإلكترونات إلى المعادن الصلبة .

في هذا العمل، تستند الأساليب المستخدمة إلى زراعة بكتيرية لأنواع المختارة واستخدام أغشية نانوية حديدية بسمك 10 نانومتر لمراقبة التغيرات السطحية الأولى وسلوك البكتيريا على الحديد أو حوله خلال المراحل المبكرة من التفوق الحيوي. يتم الحصول على هذه الأغشية النانوية الشفافة جزئيًا عن طريق التبخر الحراري وتميزت بتقنيات تكميلية (الامتصاص البصري، الانعكاسية X)

تظهر النتائج التي تم الحصول عليها أن عائد نمو البكتيريا مرتفع في وجود قطب عمل عالي الإمكانيات. الالتصاق البكتيري بالسطح مرتفع ومتجانس على الغشاء البكتيري لفترة حضانة قصيرة

الكلمات المفتاحية : الطاقة المتجددة، خلايا الوقود الميكروبية، الأغشية الحيوية النشطة كهربائياً، أغشية نانوية حديدية

Glossaire

Biocorrosion : est celui retenu pour nommer l'action des micro-organismes sur tout type de matériaux, qu'il soit métallique, minéral ou encore organique.

Électrode de référence : est une électrode qui présente un potentiel d'électrode bien défini et stable, indépendamment de l'intensité du courant circulant à travers la cellule électrochimique dans laquelle il est inséré. Ils sont utilisés pour mesurer le potentiel électrochimique de potentiel cellulaire, qui est égale à la différence de potentiel entre l'électrode de travail et l'électrode de référence.

Électrode de travail : est une électrode dans un système électrochimique sur laquelle se produit la réaction d'intérêt, il est souvent utilisé avec une électrode auxiliaire et une électrode de référence dans un système à trois électrodes.

Microscope à force atomique : est un type de microscope à sonde locale permettant de visualiser la topographie de la surface d'un échantillon, ce type de microscope repose essentiellement sur l'analyse d'un objet point par point au moyen d'un balayage via une sonde locale, assimilable à une pointe effilée.

Nanowires : sont des appendices électriquement conducteurs produits par un certain nombre de bactéries notamment les genres *Geobacter* et *Shewanella*.

Potentiostat : est un appareil électronique destiné à l'étude des phénomènes électrochimiques, il mesure la différence de potentiel entre les électrodes de travail et de référence d'une cellule à trois électrodes.

Abréviation

AFM : microscope à force atomique

ATP : Adénosine-Triphosphate

BEA : biofilm électroactifs

BEAMR: bioelectrochemically assisted microbial reactors

BRMD : bactérie réductrice de métaux dissimilatrice

Cr (III) : Oxyde de chrome

Cr (VI) : chrome

CymA : cytochromes de type A

Ddp : déférence de potentiel

DMSO : Diméthyle Sulfoxyde

DO: densité optique

EET : transfert d'électron extracellulaire

ET : électrode de travail

Fe(III) : Oxyde de fer

ITO : oxyde d'indium-étain

LB: Luria-Broth

Mn(III) : oxyde de manganèse

Mn(IV) : Dioxyde de manganèse

NASA : National Aeronautics and Space Administration

NO₂ : Nitrite

NO₃ : Nitrate

PACM : pile à combustible microbienne

Rpm : Round per minute

SBE : système bioélectrochimique

TMAO : Oxyde de Triméthylamine

U (IV) : Oxyde d'uranium

U(VI): Uranium

Liste des figures

Figure 01 : Etapes de la formation et de la dispersion d'un biofilm bactérien	05
Figure 02 : Schéma expliquant le principe de la pile à combustible à hydrogène.....	08
Figure 03 : Schéma de pile à combustible A : totalement microbienne. B : semi microbienne	08
Figure 04 : Image de nanofils conducteurs.	10
Figure 05 : <i>Bacillus subtilis</i> injecte des toxines et extrait des nutriments via des nanotubes dans le cadre d'une relation de compétition avec <i>Bacillus megaterium</i>	11
Figure 06 : Les différents modes bactériens de transferts extracellulaires des électrons vers une électrode	12
Figure 07 : <i>Shewanella oneidensis</i> observée sous microscope électronique à transmission	14
Figure 08 : Représentation schématique du transport d'électron chez <i>Shewanella oneidensis</i> lorsque le Fer est utilisé comme accepteur terminal en condition anaérobie.....	16
Figure 09 : Chronoampérométrie.....	21
Figure 10 : Evaporateur à effet Joule	25
Figure 11 : Schéma présentant le principe de la mesure par réflectivité X	27
Figure 12 : Cartographies des bactéries à la surface de la lame d'ITO obtenues par microscopie à force atomique à l'issue du premier protocole de simple mise en contact des bactéries avec la surface du substrat	29
Figure 13 : Cartographies des bactéries à la surface de la lame d'ITO obtenues par microscopie à force atomique à l'issue de l'application d'un potentiel positif sur le substrat conducteur...	31
Figure 14 : Semi-transparence des nanofilms de fer et visualisation des bactéries sur la surface	32
Figure 15 : Détermination du coefficient d'absorption du nanofilm de fer	33
Figure 16 : Logarithme de l'intensité réfléchie mesurée en fonction de l'angle 2θ	34

Sommaire

Remerciements

Résumé

Abréviation

Liste des figures

Introduction	01
Chapitre 01 : partie bibliographique	03
1. L'énergie dans le monde	03
2. Les énergies renouvelables	03
a) L'énergie solaire	03
b) L'énergie éolienne	03
c) L'énergie hydraulique	04
d) La géothermie	04
e) La biomasse.....	04
3) Les biofilms microbiens	04
3.1) Définition	04
3.2) Formation de biofilm	04
3.3) Les biofilms électroactifs (EA)	05
4) Pile à combustible microbiennes	06
4.1) Historique	06
4.2) Généralité sur les piles à combustible	07
4.3) Principes de fonctionnement de pile à combustible.....	07
4.4) Notion de pile à combustible microbienne	08

4.4.1) Définition.....	08
4.4.2) Fonctionnement	09
4.4.3) Mécanismes bactériens de transfert des électrons.....	09
4.4.4) Les différents modes de transfert d'électrons.....	09
a) Transfert direct	10
b) Transfert indirect	11
4.4.5) Les bactéries électroactives.....	12
5) Shewanella oneidensis MR-1.....	13
5.1) Caractéristiques.....	13
5.2) Génétique	14
5.3) Les activités biologiques de Shewanella	14
5.4) Mécanisme de Shewanella oneidensis	15
a) Transfert direct des électrons par cytochrome multihémique.....	15
b) Transferts d'électrons à travers des appendices conducteurs : les nanowires.....	16
c) Transferts indirect	16
6) Domaine d'application de la pile microbienne à combustible	17
6.1) Production hydrogène.....	17
6.2) Traitement des eaux usées	17
6.3) Capteurs environnementaux.....	17
Chapitre 02 : Matériel et Méthodes.....	18
I) Matériel	18
1.1) Matériel non biologique.....	18
1.2) Matériel Biologique.....	18
II) Méthode	18

1) Protocole de culture bactérienne	18
2) Dépôt d'une goutte de culture bactérienne	19
3) Fixation des bactéries par application d'un potentiel positif à la surface du substrat conducteur	19
4) Caractérisation physique des nanofilms de fer	21
4.1)Préparation des nanofilmsde fer	22
4.2) Évaporation thermique sous vide	22
a)La mise sous-vide de l'enceinte de dépôt des couches minces de fer	22
b) Description de la résistance chauffante	23
c)Mesure de la variation d'épaisseur du dépôt à l'aide d'unoscillateur quartz.....	23
d) Amélioration du dispositif	24
4. 3) Protocole de lavage des lamelles de verre.....	24
4.4) Paramètres choisis pour les évaporations thermiques.....	25
5)Mesure du coefficient d'absorption du nanofilm de fer	26
6)Caractérisation des propriétés d'interface et de composition chimique du nanofilm par réflectivité X sous incidence rasante	26
6.1)Réflectivité de rayons X en incidence rasante.....	26
Chapitre 03 : Résultats et discussion	28
1) Résultat de culture bactérienne	28
2)Résultat de dépôt d'une goutte de culture bactérienne	28
3) Résultat de fixation des bactéries par application d'un potentiel positif à la surface du substrat conducteur	31
4) Résultats de caractérisation physique des nanofilms de fer	32
5) Résultats des mesures d'absorption optique sur le nanofilm de fer	32
6) Résultats des mesures de réflectivité X	33
7) Discussion générale	34

Conclusion et perspectives40

Références bibliographiques

Annexe

I. Introduction

L'épuisement des sources d'énergie fossile et la pollution grandissante de notre écosystème nous poussent à l'urgente nécessité de concevoir des outils nous permettant de retrouver une empreinte écologique compatible avec la biocapacité de la terre (**Lherbette, 2021**).

Face à ce besoin, l'électromicrobiologie a attiré l'attention générale de la communauté des physiciens et microbiologistes. Fruit de l'observation de la capacité d'une communauté microbienne (**Bond et al., 2002**) de céder ou capter les électrons présents dans l'environnement extracellulaire (**Logan et al., 2019**).

Bien que des avancées significatives aient été opérées dans ces domaines, la diversité des mécanismes biologiques mis en jeu au cours de ces transferts extracellulaires d'électrons rend complexe le développement de systèmes à forts rendements électrochimiques, utilisables à grand échelle (**Lherbette, 2021**).

Dans ce contexte ; ce travail bibliographique a pour objectif l'étude expérimentale de quelques processus impliqués au cours de l'électroactivité bactérienne pour une approche pluri disciplinaire (interface physique - chimie - biologie) et multi-échelle (du nanoscopique ou macroscopique).

Un exemple de bactérie est choisi dans notre synthèse bibliographique, il s'agit de *Shewanella oneidensis* (**Lherbette, 2021**). Cette bactérie possède un métabolisme dissimilatoire du manganèse et des oxydes de fer. Parmi les propriétés notables de *S. oneidensis* MR-1 mentionnant sa capacité de transférer des électrons aux oxydes métalliques solides et sa remarquable polyvalence anaérobie (**Fredrickson et al., 2008**).

Notre étude bibliographique a pour but de :

- Etudier la possibilité de la fixation des bactéries (*Shewanella oneidensis* MR-1) par l'application d'un potentiel positif à la surface de substrat conducteur.
- La caractérisation physique des nanofilms de fer.
- Mesure de l'absorption optique sur le nanofilm de fer.
- Mesure de la réflectivité X.

Ce manuscrit se propose dans une première partie, d'établir une présentation bibliographique englobant des généralités sur les biofilms électroactifs, pile à combustible microbienne et les mécanismes de transfert des électrons de *Shewanella oneidensis* et la deuxième partie inclut la culture bactérienne et la caractérisation physique de nanofilms de fer et la troisième partie montre les résultats obtenus et leur discussion générale. Enfin, on termine par une conclusion générale et des perspectives.

Partie bibliographique

I. Partie bibliographique

1- L'énergie dans le monde :

Ces dernières années, une attention considérable a été accordée aux sources d'énergie renouvelables alternatives dans le monde entier (**Mohan et al., 2008**).

Compte tenu du caractère limité des réserves d'énergie primaire fossile, des répercussions sur l'environnement qui implique leur utilisation ou encore des risques et défis particuliers liés au nucléaire, une transition énergétique, reposant sur l'utilisation accrue de sources renouvelables d'énergie, est en œuvre partout dans le monde, selon des rythmes de progression différentes (**Collard, 2015**).

2- Les énergies renouvelables :

Il existe cinq principaux groupes d'énergies renouvelables : l'énergie solaire, l'énergie éolienne, l'énergie hydraulique, la géothermie, la biomasse.

a) L'énergie solaire :

Dans l'énergie solaire, il faut faire la distinction entre le photovoltaïque et le solaire thermique :

- Le premier type génère de l'électricité grâce à la conversion de la lumière du jour. Ce sont les photons, des composants de cette lumière, qui libèrent les électrons des cellules photovoltaïques présentes sur les panneaux solaires. Ces cellules sont constituées de matériaux semi-conducteurs dont le plus communément utilisé est le silicium.
- Le solaire thermique permet la production d'eau chaude grâce à des capteurs solaires (**Collard, 2015**).

b) L'énergie éolienne :

Un aérogénérateur, plus communément appelé éolienne, est un dispositif qui transforme une partie de l'énergie cinétique du vent en énergie mécanique disponible sur un arbre de transmission puis en énergie électrique par l'intermédiaire d'une génératrice. L'énergie éolienne est une énergie renouvelable non dégradée, géographiquement diffuse, et surtout en corrélation saisonnière (**Poitiers, 2003**).

c) L'énergie hydraulique :

L'énergie hydraulique utilise la force du courant qui passe à travers une centrale afin de faire tourner une turbine qui entraîne à son tour un générateur électrique qui injecte de l'électricité sur le réseau (Collard, 2015).

d) La géothermie :

La géothermie utilise la chaleur émanant des nappes aquifères présentes dans le sol pour fournir un système durable de chauffage pour les bâtiments (habitations, commerces, etc.) Si cette énergie géothermique peut être à l'origine de chaleur, elle permet également de produire de l'électricité moyennant l'utilisation de turbines (Collard, 2015).

e) La biomasse :

La biomasse concerne toutes les matières organiques qui peuvent produire de l'énergie suite à leur combustion ou à toute autre opération de transformation (Collard, 2015).

Dans cette étude, nous nous intéressons au domaine de la biomasse et plus précisément la technologie de production de piles biologiques à partir de bactéries.

3) Les biofilms microbiens :

3.1) Définition :

Un biofilm peut être défini comme une communauté sessile d'origine microbienne caractérisée par des cellules qui sont irréversiblement attachées à un substrat ou à une interface ou entre elles, sont intégrées dans une matrice de substances polymères extracellulaires qu'elles ont produites, et présenter un phénotype modifié en ce qui concerne le taux de croissance et la transcription des gènes (Donlan et Costeron, 2002).

3.2) Formation de biofilm :

La formation d'un biofilm est constituée de plusieurs étapes ; les bactéries doivent dans un premier temps, adhérer à une surface biotique ou abiotique. Cette étape requiert généralement la présence de molécules ou de structures particulières à la surface de la bactérie. Puis les cellules bactériennes vont s'agglutiner, se multiplier et former des microcolonies. Lors de

l'étape de maturation du biofilm, les bactéries synthétisent un exopolysaccharide et d'autres constituants de la matrice polymérique. Le biofilm mature représente une structure complexe et les bactéries de diverses régions du biofilm pourront exprimer des gènes différents. L'étape finale de la formation d'un biofilm est le détachement et la dispersion de cellules bactériennes. Ces cellules ont la capacité d'adhérer à de nouvelles surfaces et de reformuler un biofilm (Yannick *et al.*, 2014) (figure 01).

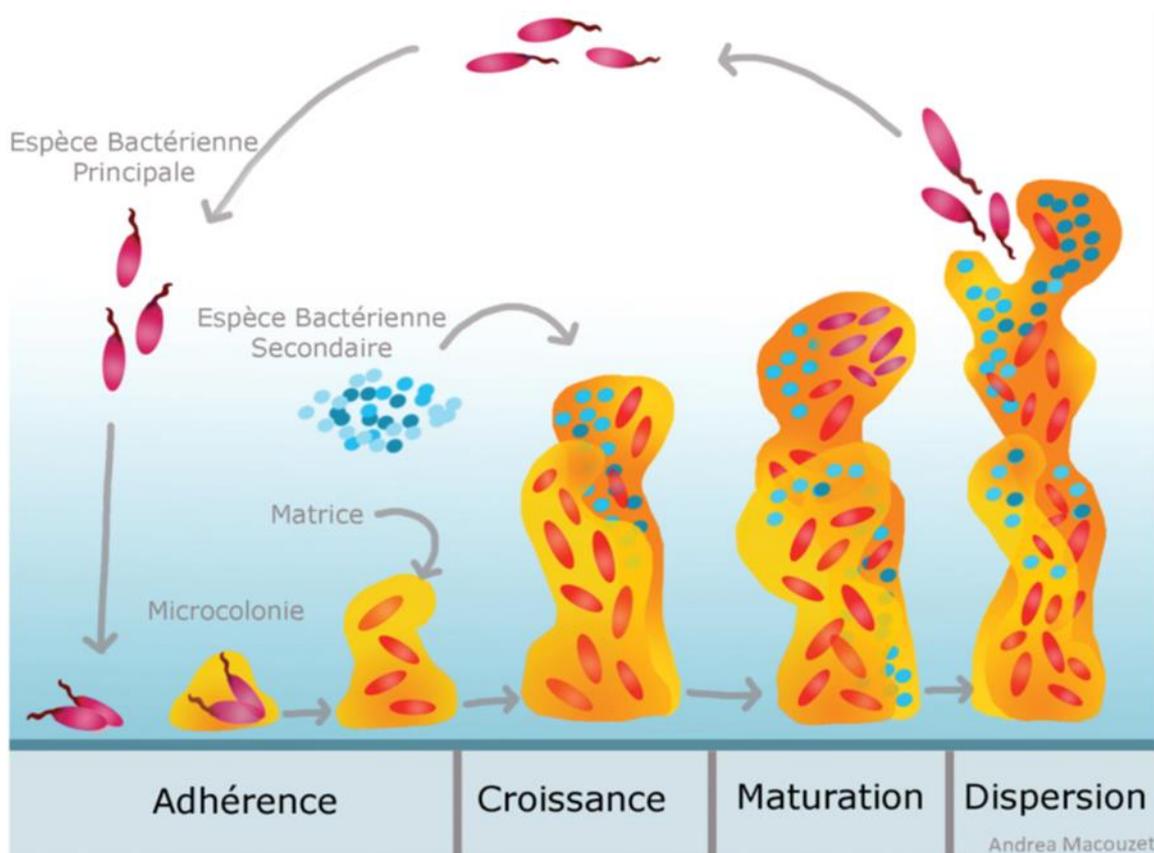


Figure 01 : Etapes de la formation et de la dispersion d'un biofilm bactérien (Yannick *et al.*, 2014).

3.3) Les biofilms électroactifs (EA) :

Le concept de biofilm électroactif a récemment émergé de quelques études qui ont découvert que certaines bactéries qui forment des biofilms sur des matériaux conducteurs peuvent obtenir une connexion électrochimique directe avec la surface de l'électrode en l'utilisant comme échangeur d'électrons, sans l'aide de médiateurs. Cette propriété électro-catalytique

des biofilms a été clairement liée à la présence de certaines souches spécifiques capable d'échanger des électrons avec substrats solides (**Erable et al., 2010**).

Les biofilms électroactifs peuvent être obtenus principalement à partir de sites naturels comme les sols, l'eau de mer et les sédiments d'eau douce. La capacité de certains micro-organismes à connecter leurs métabolismes directement dans une alimentation électrique externe est très existante et des recherches approfondies sont en cours pour explorer les possibilités d'applications des biofilms électroactifs. En effet, l'application la plus connue est probablement la technologie de pile à combustible microbienne capable de transformer la biomasse en énergie électrique (**Erable et al., 2010**).

4) Pile à combustible microbiennes :

4.1) Historique :(Schroder, 2007 ; Davis et Higson, 2007).

En 1790, Luigi Galvani a noté que les grenouilles ont la capacité de se crispier sous l'action de courant électrique. Cette découverte a montré que les processus biologiques ont la capacité d'induire une réaction biologique.

D'après le botaniste Michael Cresse Proter, l'énergie électrique peut être libérée de la désintégration microbienne des substrats organiques.

En 1931, d'équipe de Cohen Cambridge ont développé des batteries à combustible microbienne capable de générer des tensions de 35V.

Dans les années 60, la NASA (National Aeronautics and Space) déclenche le développement des piles à combustible microbiennes pour la transformation des déchets organique en énergie électrique.

En 1963, les premières piles à combustible microbienne ont été commercialisées et utilisé comme sources d'énergie dans les radios et appareils en mer, mais elles furent abandonnées car le cout faible des énergies fossiles et la complexité des processus bio électrochimique, d'autre part il existe d'autre technologie de la production alternative comme les photovoltaïques a été avancé rapidement.

Au début des années 2000, la pile microbienne a été développée avec les travaux de l'équipe de l'université Massachusetts (Boston) qui ont utilisé un dispositif constitué d'une électrode immergé connecté à une seconde enfouie dans les sédiments marins. Ils sont remarqué

l'apparition de courant électrique entre les deux électrodes qu'ont montré que le flux d'électrons étaient produit par la présence des microorganismes sous forme de biofilms sur l'anode, aussi bien que ces derniers sont capable d'oxyder des substances organiques présentes dans les sédiments par l'évacuation des électrons à l'électrode (**Ketep, 2012**).

4.2) Généralité sur les piles à combustible :

Est un système électrochimique dont le but de convertir l'énergie chimique en énergie électrique avec dégagement de chaleur. Elle est alimentée en hydrogène et oxygène qui vont permettre la réaction chimique. Elle est composée de deux électrodes : l'anode et cathode, séparé par un électrolyte. Dont les quels elle permet le passage des ions mais non les électrons (**Bedu et al., 2014**).

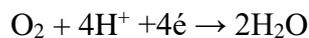
4.3) Principes de fonctionnement de pile à combustible : (Figure 02)

L'anode représente le lieu où se déroule oxydation d'hydrogène afin de produire deux protons et deux électrons selon la réaction suivante :



Les protons et les électrons issu vont circuler l'anode dans un circuit électrique externe avec la production de courant électrique.

D'autre part, les protons qui ont la capacité de traverser l'électrolyte, sont arrivés au niveau de cathode où vont combiner à la molécule d'oxygène et aux électrons (réduction d'oxygène) pour obtenir la molécule d'eau selon la réaction suivante :



On obtient alors la réaction globale suivante :



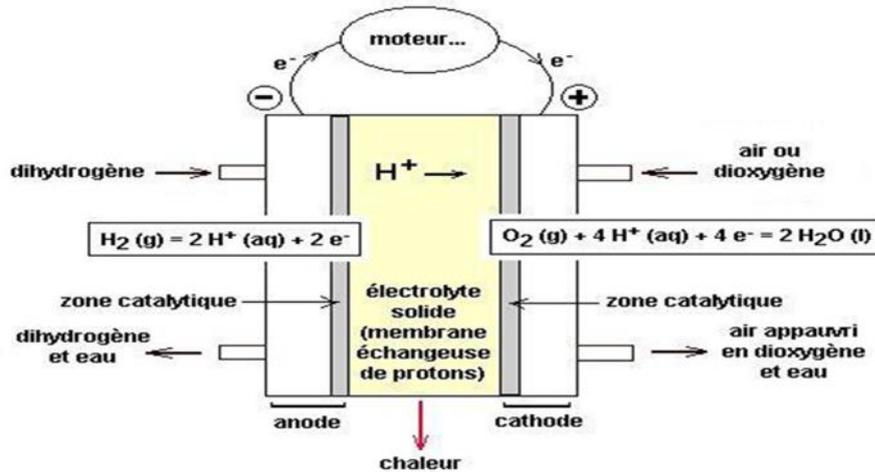


Figure 02 : Schéma expliquant le principe de la pile à combustible à hydrogène (Bedu et al., 2012).

4.4) Notion de pile à combustible microbienne :

4.4.1) Définition :

Est un système électrochimique utilise les microorganismes comme catalyseurs biologique pour une oxydation de matière organique ou inorganique à l'anode produisant les électrons et les protons H⁺ (Pièrre et al., 2015).

Elle peut être totalement microbienne lorsque la catalyse des réactions aux deux électrodes se fait grâce à des microorganismes (Figure 3A), ou semi microbienne dans le cas où la catalyse à la cathode est réalisée par des catalyseurs minéraux (Figure 3B) (ketep, 2012).

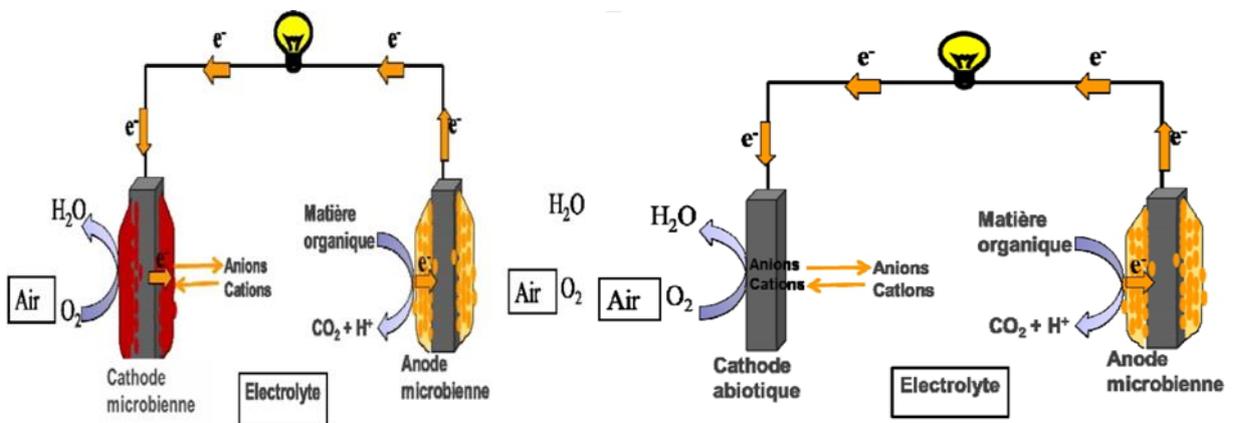


Figure 3 : Schéma de pile à combustible A : totalement microbienne. B : semi microbienne (Ketep, 2012).

4.4.2) Fonctionnement :

Elle est composée de deux chambre séparé par une membrane d'échange qui permet le passage des ions H^+ mais non à l'oxygène. L'un de ces chambres est nommé par la chambre cathodique dans lequel la cathode est plongée dans un milieu aérobie (riche en oxygène), la deuxième est nommé par la chambre anodique où elle contient la matière organique et les microorganismes dans un milieu anaérobie (absence d'oxygène) où ces derniers vont spontanément adhérer à la surface d'électrode et se développent sous forme de biofilm. Dont le quel ces derniers vont oxyder la matière organique en anaérobiose, et transférer les électrons à l'anode qui vont circuler via un fil conducteur pour passer à l'autre électrode cathode où ils intègrent avec l'oxygène pour produire l'eau (réaction de réduction de l'oxygène). Pour assurer le transfert des électrons entre les deux électrodes en insérant des matériaux conducteurs ou il est possible de convertir l'énergie chimique en énergie électrique (Abbas et al., 2017).

4.4.3) Mécanismes bactériens de transfert des électrons :

L'électroactivité repose sur la capacité des microorganismes à transférer, c'est-à-dire donner ou capter, des électrons à l'extérieur de leur membrane.

La respiration cellulaire correspond à un ensemble de réactions d'oxydo-réduction, où la dégradation de composés organiques conduit à la fabrication d'énergie, et d'autres composés organiques ou inorganiques nécessaires aux réactions d'assimilation.

En environnement aérobie, les bactéries vont utiliser le dioxygène comme accepteur terminal d'électrons. Par ailleurs, la bactérie *Shewanella oneidensis* MR-1 serait même capable, en anaérobiose, de percevoir le potentiel d'une électrode utilisée comme accepteur terminal d'électrons et d'ajuster sa voie de respiration cellulaire en conséquence (Lherbette, 2021).

4.4.4) Les différents modes de transfert d'électrons :

Comme mentionné précédemment, certaines bactéries capables de transférer des électrons à l'extérieur de leur membrane.

Il existe deux mécanismes de transfert extracellulaire d'électrons basé soit sur un contact direct par des cytochromes à membrane externe, soit sur l'utilisation de médiateurs excrétés (Logan, 2009) (Figure 04).

a) **Transfert direct :**

Le transfert direct nécessite la présence des protéines membranaires localisées à l'interface entre le cytoplasme bactérien et le milieu extracellulaire. Chez les bactéries Gram négatives comme *S. oneidensis*, le transfert direct implique des cytochromes de type C (Pinck, 2017).

Il y a aussi un deuxième mode de transfert direct implique des pili ou appendices ou nanofils conducteurs (nanowires) (Lherbette, 2021) (Figure 04).

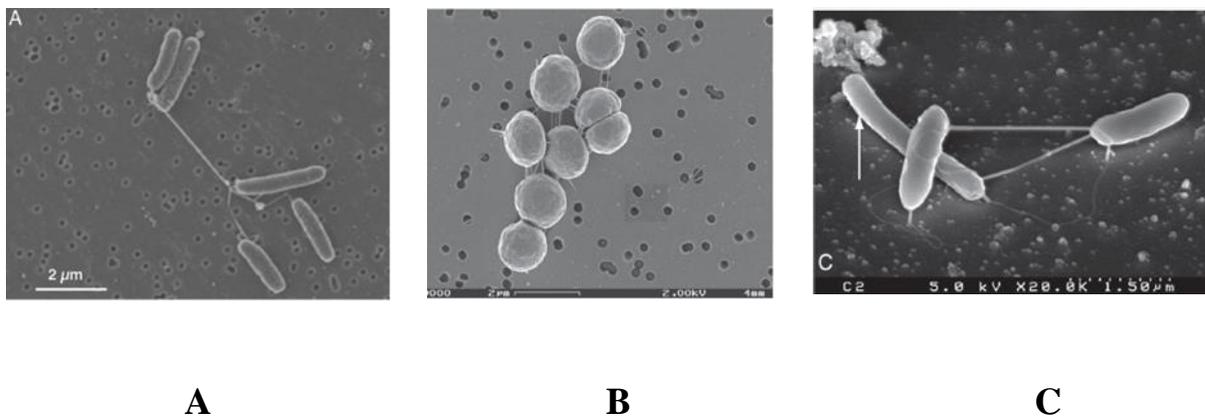


Figure 04 :Image de nanofils conducteurs. Images de microscopie électronique à balayage extraites de l'article (Gorby et al., 2006) montrant des nanofils produits par différentes bactéries. A : *S. oneidensis* MR-1, B : *Synechocystis* sp, C : *Pelotomaculum thermopropionicum* et *Methanothermobacter thermoautotrophicus* dans des cocultures méthanogènes montrant des nanofils reliant les deux genres.

Selon Belkhir et Marion, (2020) les nanowires permettant à *Bacillus subtilis* de délivrer des toxines directement dans le cytoplasme de *Bacillus megaterium*, et en permettant à *Bacillus subtilis* de puiser des nutriments chez *Bacillus megaterium* (Figure 05).

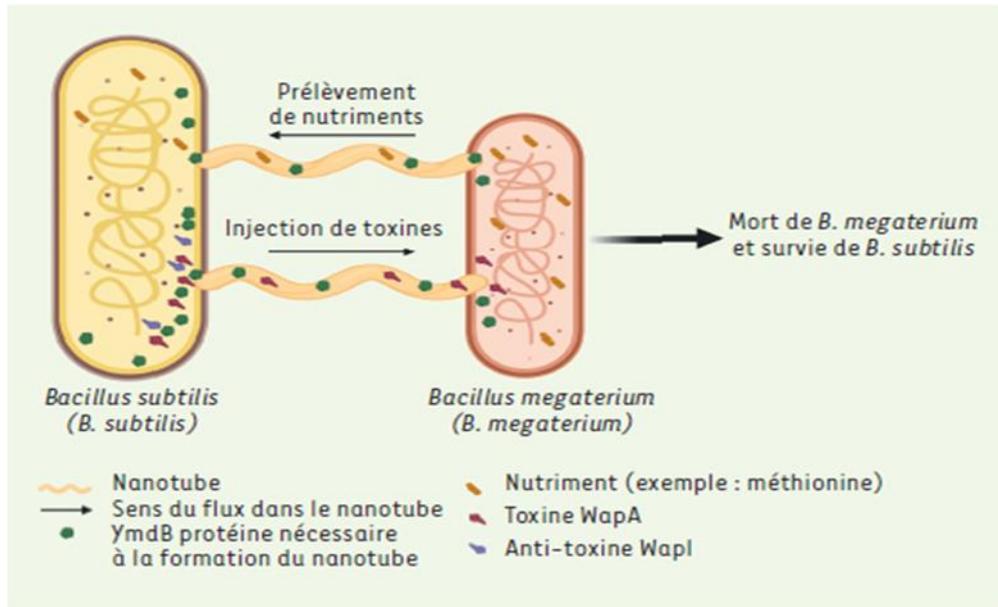


Figure 05 : *Bacillus subtilis* injecte des toxines et extrait des nutriments via des nanotubes dans le cadre d'une relation de compétition avec *Bacillus megaterium* (Belkhir et marion, 2020).

b) Transfert indirect :

Les mécanismes de transfert indirect entre une bactérie et une anode peuvent être classés selon la nature de l'espèce assurant la liaison entre la bactérie et l'électrode. Ils s'effectuent soit par l'intermédiaire de médiateurs exogène(s) ou produit(s) par la bactérie qui assurent le transfert d'électrons en effectuant des cycles d'oxydo-réduction soit par l'intermédiaire d'un métabolite produit par la bactérie s'oxydant à l'anode. Les médiateurs sous leur forme oxydée entrent dans la cellule et acceptent les électrons de la bactérie. Sous leur forme réduite ils les transfèrent alors à la surface de l'électrode en régénérant leur forme oxydée (Parot, 2007).

Notons qu'une espèce bactérienne n'utilisera pas nécessairement l'un ou l'autre de ces deux types de transfert, direct et indirect. Ces deux mécanismes peuvent en effet être conjoints et dépendants des conditions environnementales. Des études rapportent notamment la combinaison d'un transfert direct couplé à un transfert indirect chez la bactérie *S. oneidensis* (Lherbette, 2021) (Figure 06).

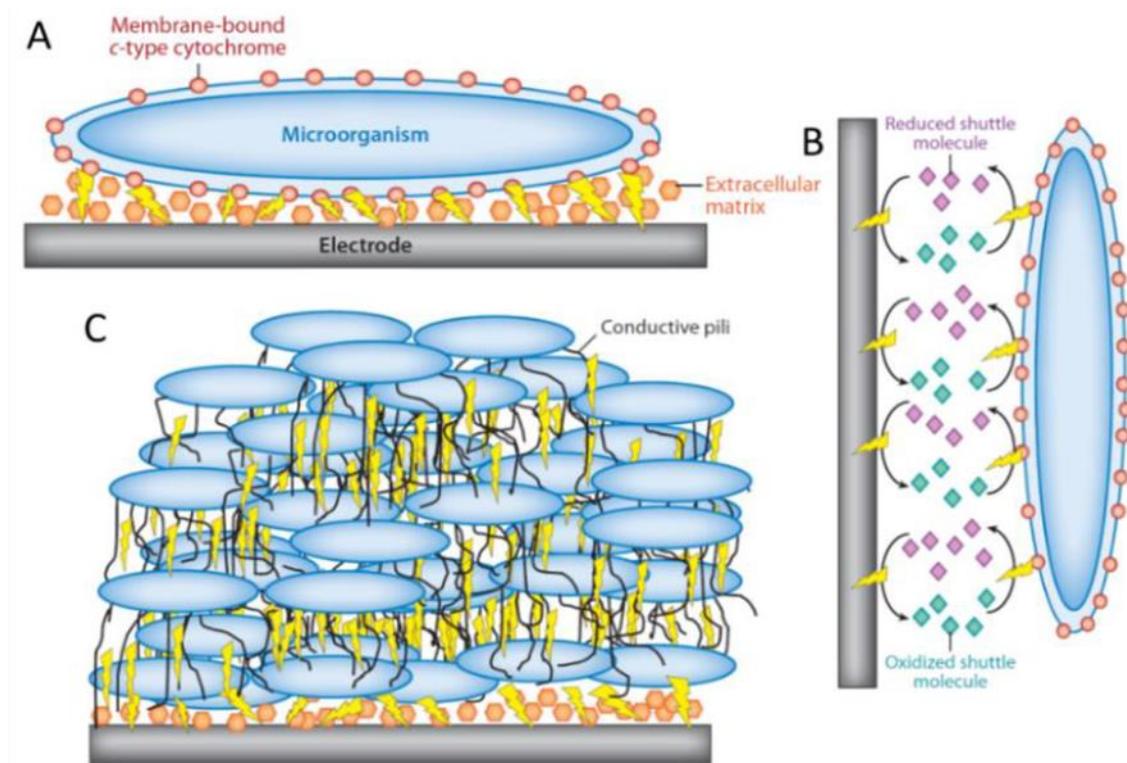


Figure 06 : Les différents modes bactériens de transferts extracellulaires des électrons vers une électrode. A : transfert direct implique cytochrome de type c. B : transfert indirect. C : transfert direct implique des pili conducteurs et de la matrice extracellulaire combiné aux cytochromes (Lherbette, 2021).

4.4.5) Les bactéries électroactives :

Les bactéries électroactives renferment une grande diversité et qui inclut :

- **Bactérie identifié sur les anodes des PACM microbiennes** : inclut la famille δ Protéobactéria, Geobacteraceae, parmi les membres de cette dernière les espèces les plus trouvés sur les électrodes appartiennent aux genres : Desulfuromonas et Geobacter.
- **Bactérie électroactives anodique** : principalement β Protéobactéria.
- **Bactérie électroactives cathodique** : contient notamment des bactéries de la famille Rhodobacter.

- **Bactérie Ferri-réductrices** : implique principalement le genre *Shewanella* (**Parot, 2007**).

Dans notre étude nous allons prendre la bactérie *S. oneidensis* comme un modèle utilisé dans la production Pile à Combustible Microbienne (PACM) en raison de ses propriétés électroactifs.

5) *Shewanella oneidensis* MR-1 :

5.1) Caractéristiques :

Le genre *Shewanella* comprend plus de 70 espèces et comprend des souches bactériennes isolées de divers écosystèmes, y compris les sédiments d'eau douce, les tranchées marines les plus profonde, la saumure d'huile, les corps de poissons et les aliments avariés (**Nealson et Scott, 2006 ; Hau et Gralnick, 2007 ; Lemaire et al., 2019**). Certaines de ces bactéries sont connues d'être des agents pathogènes des poissons et des animaux (**Janda et Abbott, 2014 ; Lemaire et al., 2020**).

La plupart d'entre eux sont facilement cultivables dans des milieux riches en nutriments avariés (**Nealson et Scott, 2006**). Sa température optimale pour la croissance se situe de 24 à 40°C (**Lemaire et al., 2019**).

Les bactéries du genre *Shewanella* sont des γ - Protéobactéries à Gram négatif, hétérotrophes, anaérobie facultatif, Ce genre comprend environ 70 espèces. *S. oneidensis* MR-1 (Figure 7) est l'une des espèces les mieux étudiée et la plus diversifiée en raison de :

- ✓ Sa capacité d'utilisation d'une large gamme d'accepteur pour la respiration comme : O₂, Fumarate, NO₃⁻, NO₂⁻, Oxyde métallique.
- ✓ Sa capacité de réduction des radionucléides, et des métaux toxique (**Lemaire et al., 2020**).
- ✓ *S. oneidensis* est caractérisée par la présence d'un flagelle polaire lui permettant de se déplacer vers des milieux plus favorables.

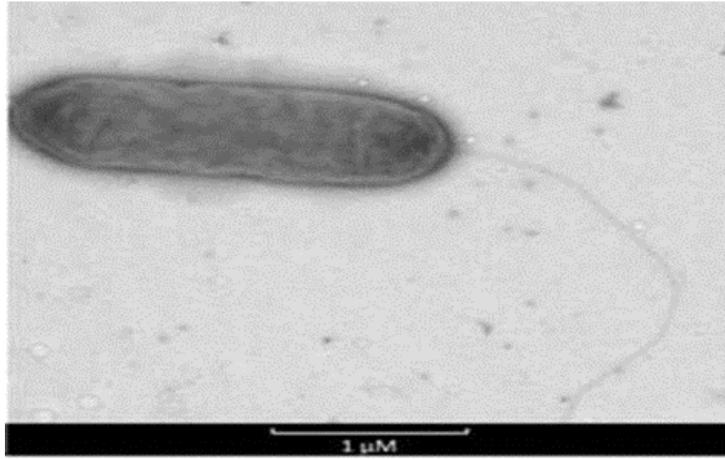


Figure 07 : *Shewanella oneidensis* observée sous microscope électronique à transmission (Honoré, 2017).

5.2) Génétique :

S. oneidensis est génétiquement proche de γ protéobactérie (*Vibrio cholerae*), avec un génome de plus de 5 millions de bases et 4590 gènes, elle possède également un plasmide de 184 gènes (Honoré, 2017).

5.3) Les activités biologiques de *Shewanella oneidensis* :

Cette souche bactérienne est capable de :

- Réduire l'uranium et le chrome à partir de l'état liquide dissous U(VI) et Cr(VI) aux oxydes insolubles U (IV) et Cr (III).
- Eliminer des polluants métalliques dilués dans les sites de stockage et les sites naturels.
- Immobiliser les métaux toxiques par la formation de sulfures métallique insoluble à partir de thiosulfate.
- La bioremédiation des sites polluants anoxiques en présence de Fer et manganèse comme accepteur finale d'électrons qui augmente l'oxydation des polluants organique dans les conditions anaérobies (Heidelberg et al., 2002).

5.4) Mécanisme de *Shewanella oneidensis* :

Une description détaillée de son mécanisme de transfert d'électron extracellulaire est présentée ici.

a) Transfert direct des électrons par cytochrome multihémique :

Les cytochromes multihémique produit par *S. oneidensis* contribuent aux mécanismes permettant à la bactérie la synthèse de carburant cellulaire ATP par l'exploitation l'énergie de nutriments disponible sous le processus de phosphorylation au niveau de strate ou catalysé par la molécule ATP synthase motrice à partir d'oxydation de la matière organique qui se déroule à l'intérieur de la cellule (au niveau de cytoplasme), les électrons issus de ce processus doit être transféré à travers un réseau de Redox protéine pour atteindre un accepteur finale d'électrons présent dans l'environnement bactérienne (**Breure et al., 2014**).

En anaérobiose (absence d'O₂), *Shewanella oneidensis* peut utiliser une gamme diversifié d'accepteur d'électrons tel que le Fumarate, Nitrate, Oxyde de Triméthylamine(TIMAO), Diméthyle Sulfoxyde (DMSO), Sulfite, Thiosulfate, Soufre élémentaire et des métaux oxydé comme Fe(III), Mn(III), Mn(IV) et U(VI) (**Breure et al., 2014**).

Cette polyvalence respiratoire rend *Shewanella oneidensis* mieux adapté dans les milieux aquatiques et les sédiments (**Breure et al., 2014**).

Les partenaires transfert d'électrons comprennent cytochrome et protéine Fe-S et quinol (QH₂) forment un réseau traversant le périplasma allant jusqu'à environnement extracellulaire, en anaérobiose ces partenaires impliquent dans des processus clés comme la réduction d'accepteur final d'électrons qui se produit en dehors du bacterium (au niveau de périplasma), et l'oxydation de matière organique introduit dans la cellule qui se déroule au niveau de cytoplasme (**Breure et al., 2014**).

Les électrons issus de ce processus sont transportés par NADH jusqu'à accepteur d'électrons membranaire et circulent ensuite dans membrane interne via un pool de quinol et arrivent jusqu'à CymA, les électrons sont alors transférés au système MTrAB, MTrC, OMCA, puis expulsé de la cellule (**Lherbette, 2021**) (Figure 8).

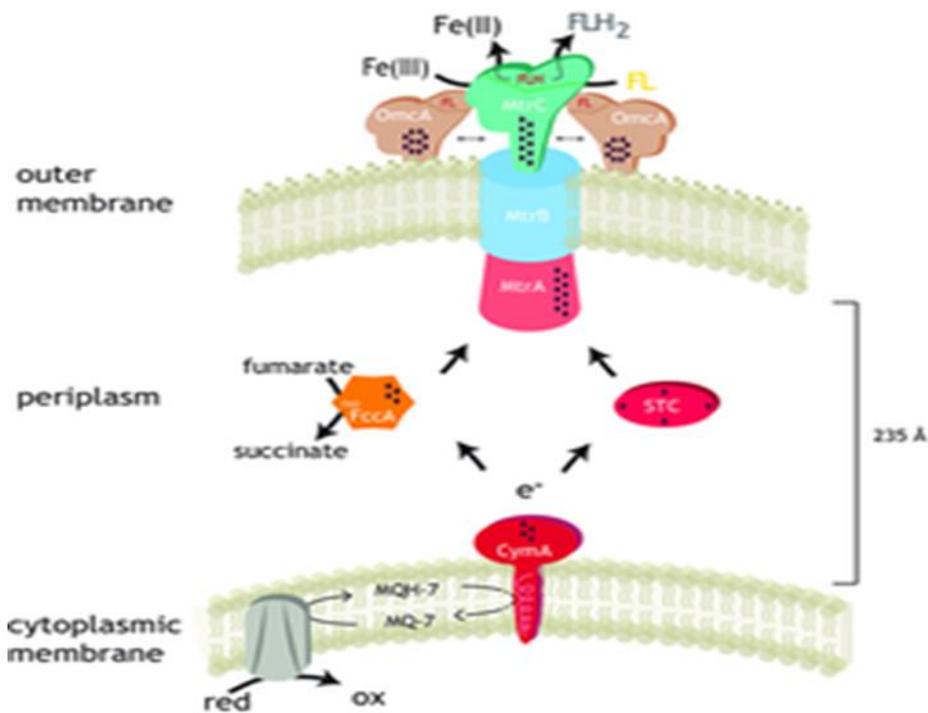


Figure 08 : Représentation schématique du transport d'électron chez *Shewanella oneidensis* lorsque le Fer est utilisé comme accepteur terminal en condition anaérobie (Lherbette, 2021).

b) Transferts d'électrons à travers des appendices conducteurs : les nanowires :

Les nanowires des appendices bactériens conducteurs, ont tous d'abord été décrits chez deux bactéries différentes : *Geobacter sulfurreducens* et *S. oneidensis*. Les nanowires sont habituellement classés en tant que mécanisme de transfert extracellulaire d'électron direct. Chez *S. oneidensis*, les nanowires ont été caractérisés en immunofluorescence et sont décrits comme des extensions périplasmiques de la membrane externe. Sur ces extensions membranaires, il est supposé que les cytochromes nécessaires aux transferts d'électrons sont présents (Pinck, 2017).

c) Transferts indirect :

Les transferts extracellulaires indirect d'électrons ont été décrits comme fortement dépendant de la présence de médiateurs autoproduits par la bactérie. Chez *S. oneidensis*, ces médiateurs seraient des dérivés des quinones : les flavines mononucléotides et les riboflavines. Cependant

Des études récentes ont démontré que les flavines et riboflavines étaient plutôt des cofacteurs associés aux cytochromes de la membrane externe MtrC et OmcA que des navettes à électrons (Pinck, 2017).

6) Domaine d'application de la pile microbienne à combustible :

La pile à combustible microbienne pourrait être utilisée dans plusieurs domaines : production d'hydrogène, traitement des eaux usées et capture environnementaux.

6.1) Production hydrogène :

Pile à Combustible Microbienne (PACM) peut être utilisée dans la production d'hydrogène gazeux (H_2) à partir des biosources massives, en ajoutant une petite tension via la réaction microbienne bioélectrochimiquement « exemple : Tor (BEAMR) », et en éliminant l'oxygène à la cathode, les bactéries produisent les protons et les électrons à l'anode qui peuvent se combiner à la cathode pour produire H_2 .

6.2) Traitement des eaux usées :

PACM peut être utilisé comme réacteur d'épuration qui permet de réaliser un traitement à un coût global inférieur en produisant un produit de valeur c'est-à-dire l'électricité (Bruce et al., 2012).

6.3) Capteurs environnementaux :

Les PACM éventuellement peuvent être utilisés comme capteurs environnementaux, notamment en milieu fluvial et en eau profonde comme l'océan (Tender et al., 2002).

Matériel et méthodes

II. Matériel et Méthodes :

Le travail n'est pas été réalisé au terrain.

II.1. Matériel :

1.1) Matériel non biologique :

Le matériel non biologique utilisé dans cette synthèse bibliographique (verrerie, les milieux de culture, les réactifs, les colorants et appareillages) sont représentés au niveau de l'annexe 1 et 2.

1.2) Matériel biologique :

Dans cette étude bibliographique, la bactérie *S. oneidensis* MR-1 (Lherbette, 2021) est choisi comme un modèle utilisé dans les différentes étapes expérimentales car cette dernière est connue pour sa capacité à réduire le fer ferrique (bactérie ferri-réductrice), soluble ou insoluble, à l'extérieur de sa cellule en condition anaérobie. Cette capacité est liée à la présence du système protéique Mtr, une chaîne de cytochromes decahèmes de type-c localisés sur la membrane externe (Coursolle et al., 2010).

II. Méthodes :

1) Protocole de culture bactérienne :

L'isolement de *Shewanella oneidensis* MR-1 est effectué chaque semaine à partir d'une culture stock congelée dans du glycérol 20 % final à - 80°C striée sur boîte de Luria-Broth (LB) agar.

Par la suite, une colonie isolée est prélevée, mise en suspension dans 5 mL de milieu LB et placée dans l'incubateur-shaker sous agitation à 200 rpm et 30°C pendant toute une nuit (environ 18h). Le lendemain, la variation de la densité optique (DO) de la préculture est contrôlée afin de vérifier la bonne croissance des bactéries.

Ensuite une dilution typique à 1/1000 dans du milieu LB est effectuée et disposée de nouveau dans l'incubateur-shaker à 200 rpm et 30°C afin de relancer la croissance bactérienne. Les bactéries sont alors prélevées au début de leur phase exponentielle de croissance à une DO de 0,1 pour être inoculées dans la chambre de culture à la concentration souhaitée.

Une numération des bactéries a été effectuée sur une suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance. Ce dénombrement consiste à réaliser des dilutions en cascade à partir d'une suspension bactérienne de densité optique connue puis à étaler ces dilutions sur des boîtes LB agar (Lherbette, 2021).

2) Dépôt d'une goutte de culture bactérienne :

Selon Lherbette, (2021) divers protocoles ont été utilisés pour le dépôt de la souche microbienne sur la surface de substrat :

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

L'observation des lames se fait à l'aide d'un microscope à force atomique (AFM).

3) Fixation des bactéries par application d'un potentiel positif à la surface du substrat conducteur :

Les bactéries sont en interaction avec la surface du substrat selon deux type : électrostatique (longue portée) et Van der Waals (courte portée). Lors de l'immersion d'une surface dans un électrolyte, cette dernière va acquérir une certaine charge de surface dépendant des propriétés physico-chimiques du milieu liquide (pH, point isoélectrique...).

L'adhésion des bactéries se ferait en deux étapes : une première étape d'adhésion réversible via l'attraction électrostatique des bactéries vers la surface. Selon la force ionique de

l'électrolyte, l'écrantage des charges initialement portées par la surface ou la membrane bactérienne sera plus ou moins important. Ainsi, les interactions électrostatiques liées au recouvrement des doubles couches du substrat et des bactéries seront plus ou moins grandes.

Suivie d'une seconde étape irréversible via l'attachement se fait lorsque les bactéries se situent au voisinage de la surface du substrat, celles-ci devraient être piégées par la force attractive de Van der Waals sans pouvoir s'en extraire sous le simple effet du mouvement brownien induisant alors leur attachement irréversible à la surface (**Lherbette, 2021**).

➤ Mode opératoire :

Une différence de potentiel (ddp) de +100 mV est appliqué entre le film d'ITO (Indium Tin Oxid) et une électrode de référence Ag/AgCl.

Des tests ont également été effectués :

- Modification de la valeur de la différence de potentiel appliquée entre la lame d'ITO et l'électrode de référence (+ 100 mV ou + 200 mV vs Ag/AgCl).
- Modification du temps d'incubation entre 1 h et 20 h.
- Modification de la concentration initiale en bactéries.
- Création d'un environnement anaérobie juste après la mise en contact des bactéries avec la surface par circulation d'un flux d'azote dans la chambre de culture pendant une heure.

Afin de s'assurer que ce potentiel reste constant au cours du temps un Potentiostat a été préféré, une méthode de chronoampérométrie est utilisée. Le courant circulant entre la contre électrode et l'électrode de travail (lame d'ITO) est mesuré, afin de contrôler la reproductibilité des processus électrique set le sens de circulation des électrons. Le montage ainsi que le Chronoampérogramme obtenu sont présentés sur la Figure 09 (**Lherbette, 2021**).

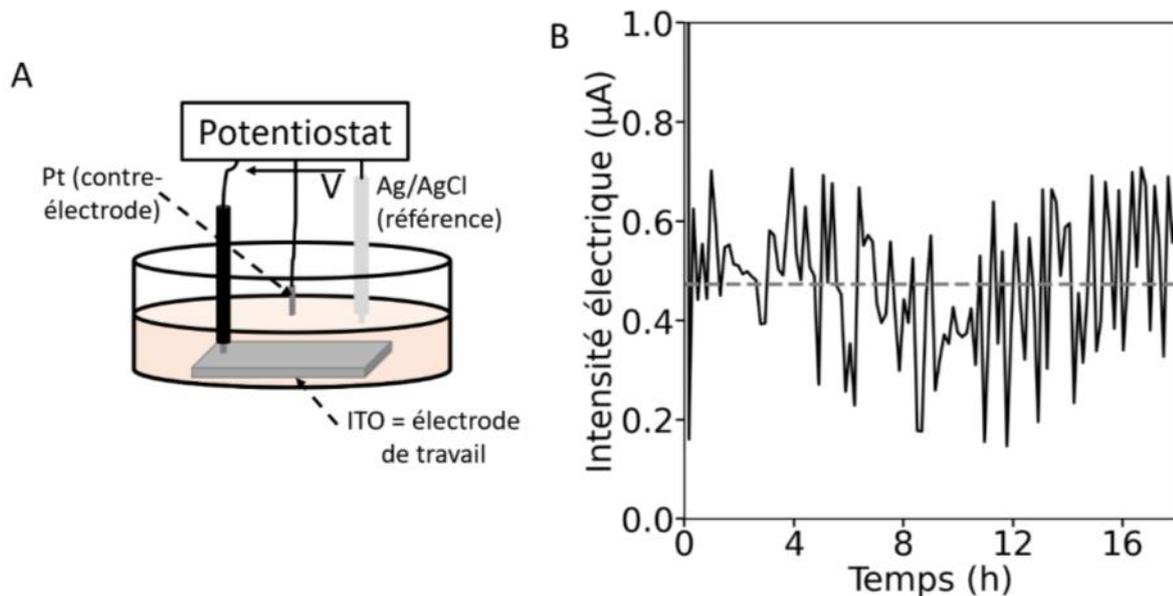


Figure 09 : Chronoampérométrie. (A) Montage électrique à trois électrodes utilisé pour appliquer un potentiel positif constant V de +100 mV entre la surface d'ITO et l'électrode de référence Ag/AgCl. Le contact entre la couche d'ITO et le circuit électrique extérieur est effectué à l'aide d'une tige de platine gainée. La contre électrode est une feuille de platine. L'ensemble des mesures électriques est effectué à l'aide d'un potentiostat. (B) L'intensité électrique mesurée entre la contre électrode (platine) et l'électrode de travail (ITO) est mesurée au cours du temps. Après une première mesure d'intensité électrique élevée (égale à 10,5 μA), le courant reste constant autour de la valeur moyenne de 0,47 μA (ligne grise en pointillés) (Lherbette, 2021).

4) Caractérisation physique des nanofilms de fer :

Les nanofilms - ou films ultrafins - sont des matériaux d'épaisseur nanométrique aux propriétés électriques, optiques ou thermiques particulièrement intéressantes. Ces films fins sont utilisés dans des revêtements optiques anti-reflets et les transistors (Lherbette, 2021), ils sont également utiles comme collecteurs de courant dans les cellules solaires (Grandqvist, 2007).

Lherbette (2021) a choisi de mettre à profit la transparence partielle des nanofilms de fer d'intensités lumineuses de 10 nm d'épaisseur déposés sur une lamelle de verre qui s'avèrent

Suffisamment stables pour suivre les premières modifications de surface ainsi que le comportement des bactéries sur ou au voisinage du fer au cours des premières étapes de ce processus de biocorrosion (Querry, 1985 ; Polyanskiy, 2014).

4.1) Préparation des nanofilms de fer :

Le dépôt des couches minces sur les surfaces massives est réalisé par un processus basé sur la physique à l'échelle atomique ou moléculaire (Rossnagel, 2003), on peut le résumer comme suit :

- **Processus physique** : est moins contraignante et la plus employée pour le dépôt de couches minces (Lherbette, 2021). Ce processus comprenant l'évaporation thermique et la pulvérisation (Rossnagel, 2003).

4.2) Évaporation thermique sous vide :

L'évaporation thermique sous-vide est un procédé de dépôt de couches minces dans lequel un matériau source, initialement solide ou liquide, composé de l'élément que l'on souhaite déposer est chauffé jusqu'à passer sous forme gazeuse.

L'enveloppe de dépôt est placée sous vide, les atomes qu'émettent les molécules de gaz ont alors une grande valeur moyenne libre et migrent vers le substrat avec peu (ou pas) de collision des molécules de gaz présentes entre la source et le substrat (Lherbette, 2021).

a) La mise sous-vide de l'enceinte de dépôt des couches minces de fer :

Afin d'éviter au maximum la contamination de l'échantillon (nanofilm de fer) par des impuretés, le dépôt doit lieu dans un environnement de vide élevé (10⁻⁸ – 10⁻¹⁰ bar) voir d'ultra-vide (< 10⁻¹² bar). La vitesse de dépôt affectera également la pureté d'échantillon final, ceci est généralement de l'ordre de 1 à 10 nm.s⁻¹. La source pouvant initialement être sous forme solide ou liquide, elle va soit se sublimer soit se vaporiser (Lherbette, 2021).

b) Description de la résistance chauffante :

Le matériau source doit être chauffé jusqu'à une température permettant sa vaporisation ou sa sublimation. La source peut être soit vaporisée entièrement soit partiellement jusqu'à ce que l'épaisseur de dépôt souhaitée soit atteinte. La technique de chauffage par résistance chauffante est utilisée Lorsque la température de sublimation ou de vaporisation est inférieure à 1500°C.

Elle consiste à mettre en contact le matériau source avec une surface résistive chauffée par le passage d'un courant d'intensité élevée (supérieure à plusieurs centaines d'ampères) effet Joule (Lherbette, 2021).

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

Le quartz est un matériau de structure cristalline asymétrique possède la propriété de piézoélectrique, qui présente le principe de couplage entre l'application d'un champ électrique et le déplacement d'un matériau possédant cette propriété, La résonance électrique d'un résonateur à quartz est une conséquence de la résonance mécanique du disque. L'application d'une différence de potentiel entre les électrodes crée un champ électrique dans le quartz, d'où déplacement mécanique. Si le signal d'excitation est généré par un potentiel alternatif, il se produit la propagation d'une onde acoustique dans le matériau.

Le quartz possède un grand facteur de qualité, donc il est possible de détecter le changement de la fréquence de résonance.

Une légère variation de masse d'une des électrodes induit une légère baisse de fréquence de résonance du quartz, Cet effet a été modélisé par l'équation de Sauerbrey :

$$\Delta f = - \frac{2f^2}{A\rho c} \Delta m$$

Où :

ρ : est la masse volumique du quartz,

c : la célérité d'une onde acoustique dans la coupe du quartz,

A : l'aire de recouvrement des électrodes.

Cette équation est utilisée depuis longtemps pour suivre le dépôt sous vide de couches fines en microélectronique ou en optique en insérant un résonateur à quartz dans la chambre d'évaporation (**Friedt, 2003**).

d) Amélioration du dispositif :

Afin de contrôler l'implication de l'étape de dépôt et de minimiser la contamination qui pourrait contaminer la surface de la lamelle en verre avant le dépôt, des obturateurs sont utilisés. Ces derniers empêchent tout contact direct entre la source et l'échantillon tout au long du processus de fonte puis de vaporisation de la source. Ainsi, la surface de la lamelle en verre n'est mise au contact du faisceau de molécules gazeuses qu'au moment où la vaporisation de la source a eu lieu et que la vitesse de vaporisation est constante (**Lherbette, 2021**).

D'autre part, la fusion du matériau source est essentielle avant le passage à la vaporisation car elle permet à la source de se vaporiser uniformément. Enfin, les lamelles de verre sont fixées suffisamment loin de la source afin de réduire l'énergie thermique émise par la source (**Lherbette, 2021**).

4.3) Protocole de lavage des lamelles de verre :

Le nettoyage minutieux de la surface de lamelle en verre est une étape importante pour s'assurer de la parfaite reproductibilité de la mesure, de l'adhésion et du dépôt homogène des nanocouches de fer ou de titane. Les lamelles de verre utilisées sont soit des lamelles de verre de microscope de taille 22x22 mm² soit des lamelles un peu plus épaisses pour les observations microscopiques de 25x25 mm² (**Lherbette, 2021**).

Lherbette (2021) a utilisé deux protocoles de nettoyage et conduisent tous deux au même résultat final.

Le premier protocole consiste à immerger dans un bain d'acétone la lamelle de verre puis à la mettre sous sonication pendant une minute. Un rinçage à l'isopropanol est ensuite effectué avant un second bain de sonication dans l'isopropanol. Le séchage des lamelles est finalement réalisé avec de l'azote comprimé.

Dans le second protocole, Lherbette (2021) a frotté manuellement et énergiquement la lamelle de verre avec un coton imbibé de CaCO₃ dissous dans du détergent RBS (Sigma-Aldrich)

dilué à 3% dans de l'eau distillée. La lamelle est ensuite rincée abondamment avec de l'eau ultra-pure et séchée avec de l'air sec comprimé.

4.4) Paramètres choisis pour les évaporations thermiques :

Lherbette (2021) a choisi comme matériaux sources du titane (Neyco, 99,99%) et du fer (Kurt J. Lesker, 99,95%) de grande pureté. L'évaporateur par effet Joule (Plassys) utilisé pour l'ensemble des dépôts est illustrés en Figure 10.A et 10.B. Les lamelles de verre sont disposées sur la porte échantillon situé juste au-dessus de deux nacelles S9A en tungstène (Neyco) (Figure 10.C). L'un contient un petit cylindre solide de fer et l'autre un petit cylindre solide de titane. L'oscillateur à quartz pour contrôler l'épaisseur du dépôt tout au long de l'évaporation. La vitesse de dépôt est ajustée dans l'intervalle de 0,08-0,12 nm/s. Le dépôt se fait en quelques minutes. L'azote est utilisé pour la phase de remise à la pression atmosphérique.

A la sortie de l'évaporateur, les échantillons sont déposés sur une lingette (Kimtech) dans une boîte en plastique fermée et stockés dans des conditions normales de pression et de température pendant une à deux semaines.

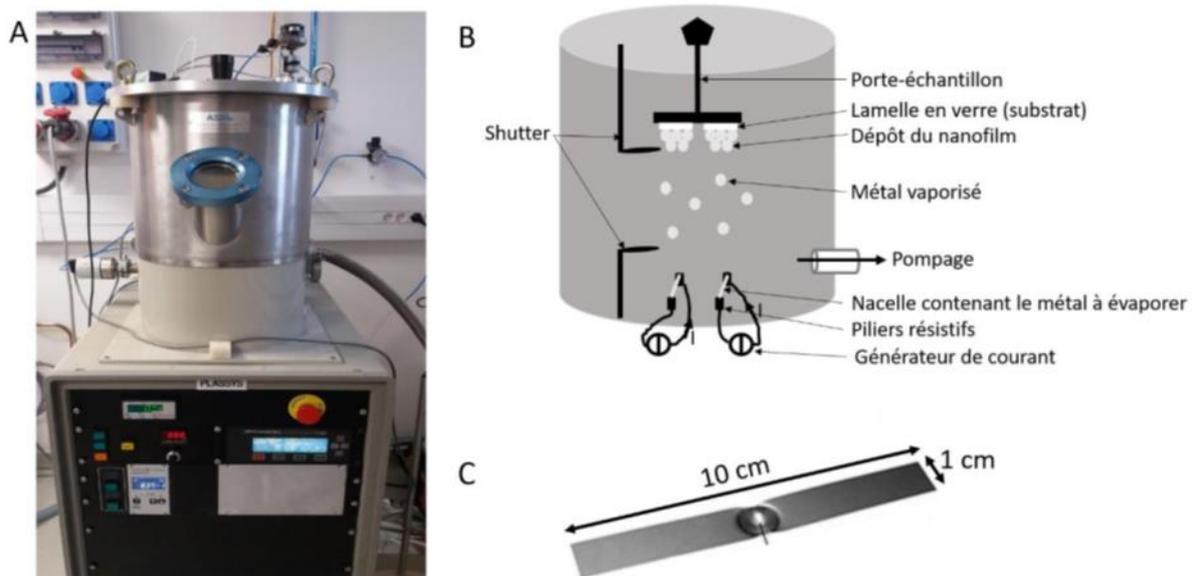


Figure 10 : Evaporateur à effet Joule. (A) Image prise de l'évaporateur par effet Joule Plassys. (B) Schéma présentant l'intérieur de l'évaporateur. (C) Nacelle en tungstène (S9A, Neyco) utilisée pour effectuer les évaporations (Lherbette, 2021).

5) Mesure du coefficient d'absorption du nanofilm de fer :

La densité optique de nanofilms de différentes épaisseurs a été mesurée directement à l'aide d'un spectrophotomètre commercial (Genesys 50, Thermoscientific) à la longueur d'onde de 650 nm. La valeur de référence de l'intensité lumineuse incidente (notée I_0) est fixée par celle transmise par la lame de verre, composant le substrat des nanofilms.

Les nanofilms de fer de différentes épaisseurs ont été préparés par évaporation thermique au laboratoire sans sous-couche de titane. Pour chaque épaisseur, la densité optique a été mesurée sur quatre échantillons distincts. L'ensemble des mesures est effectué dans l'air (sans contact avec le milieu liquide) (Lherbette, 2021).

6) Caractérisation des propriétés d'interface et de composition chimique du nanofilm par réflectivité X sous incidence rasante :

La capacité des rayons X et de la réflectivité neutronique à étudier les films minces indépendamment de leur environnement, de leur température, de leur pression, ainsi que leur capacité à sonder les interfaces enfouies, fait souvent de ces techniques un choix pertinent pour obtenir des informations statistiques globales sur les interfaces structurées à l'échelle nanométrique des films minces (Vignaud et Gibaud, 2019).

D'autre part, elle permet de déterminer les paramètres des couches minces, y compris l'épaisseur, la densité et rugosité de surface ou d'interface (résultant de la rugosité de surface et interdiffusion) de manière non destructive (Yasaka, 2010). Elle permet d'étudier en temps réel des changements de structure sous l'effet de modifications de pression, de température ou d'environnement gazeux. Elle peut être utilisée aussi bien sur des échantillons monocristallins, que polycristallins ou amorphes, monocouches ou multicouches, d'épaisseur submicronique à atomique (1 à 500 nm) (Lherbette, 2021).

6.1) Réflectivité de rayons X en incidence rasante :

L'interaction entre le faisceau de rayons X et l'échantillon se fait par diffusion élastique, c'est-à-dire que le faisceau produit à l'issue de l'interaction possède la même longueur d'onde que celle incidente. Selon les lois de Descartes, la propagation d'une onde électromagnétique,

de vecteur d'onde k_i , sur une interface entre deux milieux d'indices optiques différents va produire l'apparition d'une onde réfléchie (spéculaire ou diffusée) et d'une onde réfractée.

Le dispositif de mesure se compose d'une source de rayons X de longueur d'onde égale à 0,15406 nm (Cu- $K\alpha$) collimatée sur l'échantillon à l'aide de différentes fentes qui induit une faible intensité du rayonnement incident et donc une variation limitée du signal de réflexion enregistrée. Pour résoudre ce problème, un miroir parabolique associé à un monochromateur permet de produire un faisceau incident parallèle de grande luminosité (Lherbette, 2021).

Lherbette (2021) a utilisé une lame de rasoir placée au voisinage de la surface afin de limiter l'étendue du faisceau incident à la totalité de la surface du nanofilm. Le nombre de photons reçu après réflexion est ensuite compté à l'aide d'un détecteur (photomultiplicateur) en fonction de l'angle de rasance. Les spectres de réflexion obtenus sont habituellement tracés en fonction de l'angle 2θ , formé entre la direction du vecteur d'onde incident et celle du vecteur d'onde réfléchi (Figure 11).

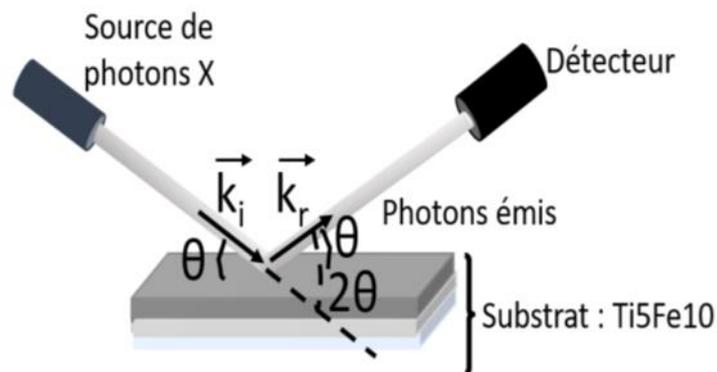


Figure 11 : Schéma présentant le principe de la mesure par réflectivité X. le vecteur d'onde est noté k_i , Le vecteur d'onde de l'onde réfléchie spéculairement est noté k_r , l'angle de rasance est noté θ formé entre le vecteur d'onde incident et la surface du nanofilm (Lherbette, 2021).

Résultats et discussion

III. Résultats et discussion :

1) Résultat de culture bactérienne :

Selon Lherbette, (2021) un ralentissement de la croissance des bactéries, en milieu liquide, a été observé lorsque les colonies prélevées étaient sur boîte LB Agar depuis plus d'une semaine. De couleur rouge/rose (coloration liée à l'activité des cytochromes) sur des isolements fraîchement préparés les colonies deviennent translucides.

Après 18 heures, les bactéries sont en phase stationnaire de croissance avec une densité optique autour de 1,4.

Le nombre de *S. oneidensis* à une DO de 1 correspond à 7,108 cellules/ml.

2) Résultat de dépôt d'une goutte de culture bactérienne :

Lherbette (2021) a constaté qu'une seule phase d'incubation, quelle que soit sa durée, n'a jamais permis l'observation de bactéries immobiles sur la surface. D'autre part, la modification de la densité optique de l'inoculum n'a pas eu d'impact significatif sur la densité surfacique de bactéries.

Donc, cet auteur s'intéresse à la durée de la seconde incubation. Les résultats sont présentés sur la Figure 12, pour des temps d'incubation décroissants de la première à la dernière ligne sous forme de cartographies obtenues par microscopie à force atomique.

La première colonne présente la topographie des bactéries, la seconde cartographie la rigidité mécanique et la troisième la force d'adhésion de la pointe au substrat (surface d'ITO ou de la bactérie).

Sur les cartographies de hauteur, plus le temps d'incubation diminue, plus les bactéries sont longues (1,7 μm à 3 μm) et leurs contours nets (A, D, G).

Les cartographies de rigidité montrent que la rigidité mécanique de la surface est homogène sur l'ensemble des bactéries et bien plus faible que celle du substrat (B, E, H).

Les cartographies d'adhésion (C, F, I) montrent que :

- Pour des temps d'incubation courts, les forces d'adhésion de la pointe à la surface de la bactérie sont élevées et homogènes sur l'ensemble de la surface de la membrane bactérienne exposée à la pointe.

- Pour des temps d'incubation longs, les forces d'adhésion sont particulièrement intenses sur les contours et sur la surface de la bactérie dirigée vers la lame mais faibles sur le reste de la surface exposée à la pointe AFM.

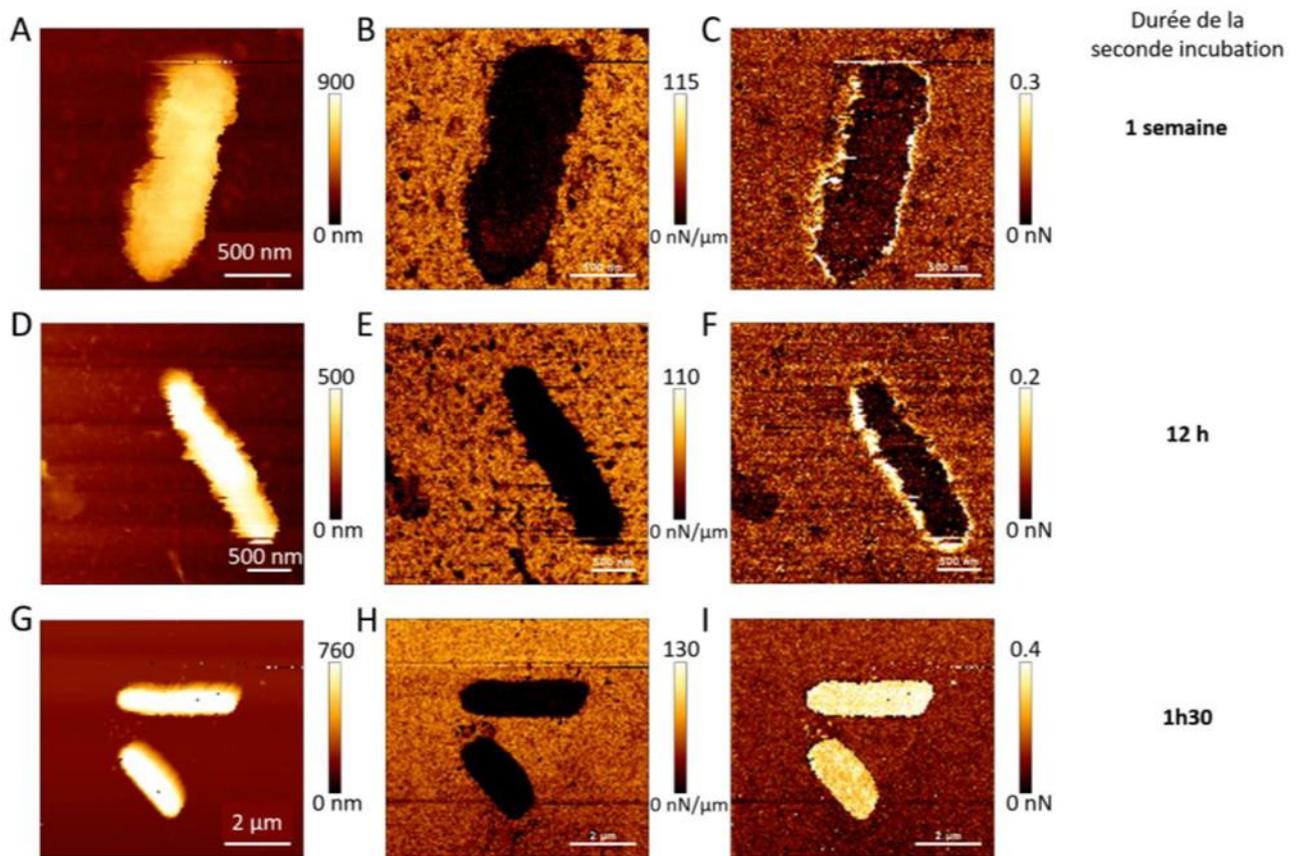


Figure 12 : Cartographies des bactéries à la surface de la lame d'ITO obtenues par microscopie à force atomique à l'issue du premier protocole de simple mise en contact des bactéries avec la surface du substrat. Cartographie reconstituée à partir des courbes approche/retrait mesurées en chaque pixel. (A, D, G) Topographie de la surface, (B, E, H) Rigidité mécanique, (C, F, I) Adhésion de la pointe au substrat. Les deux premières lignes sont associées à des protocoles présentant des temps de seconde incubation longs (une semaine pour la première ligne avec régénération du milieu nutritif tous les jours, 12h sur la deuxième ligne et 1h30 sur la dernière) (Lherbette, 2021).

3) Résultat de fixation des bactéries par application d'un potentiel positif à la surface du substrat conducteur :

Les cartographies présentées sur la Figure 13(A, C) sont les résultats obtenus d'un protocole où un potentiel de + 200 mV (vs Ag/AgCl) a été appliqué sur la lame d'ITO sur 20 h en condition aérobie (Lherbette, 2021).

- La première observation que l'on peut faire est celle de la forme ronde des bactéries de diamètre égal à 420 nm et immobiles.
- Une hauteur de l'ordre de 500 nm homogène sur l'ensemble de la bactérie. Cette hauteur est deux fois plus petite que celle attendue.
- Une rigidité uniforme sur l'ensemble de la bactérie y compris sur l'halo d'épaisseur plus fine en haut de la bactérie correspondant probablement à des extensions membranaires.
- Une force d'adhésion faible sur la membrane de la bactérie exposée à la pointe.

Les cartographies présentées sur la Figure 13 (D,F) sont les résultats obtenus d'un protocole où un potentiel de + 100 mV (vs Ag/AgCl) a été appliqué sur toute une nuit en condition anaérobie.

- Observation des bactéries allongées de 2 μm de long et de hauteur 1 μm , typiques des valeurs attendues et immobiles.
- Une rigidité uniforme sur l'ensemble de la bactérie.
- La présence d'une zone particulièrement adhérente sur le contour de la bactérie.

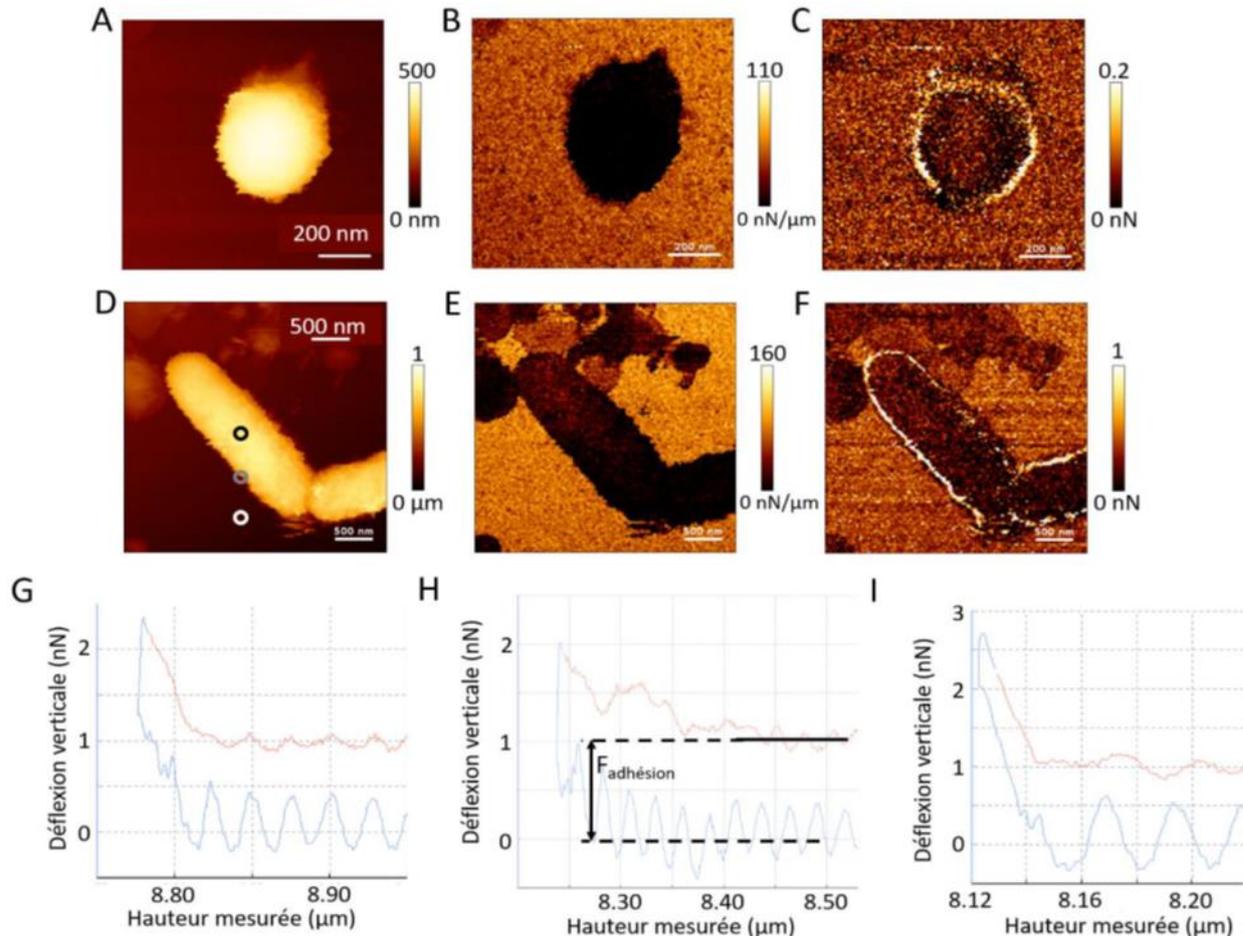


Figure 13 : Cartographies des bactéries à la surface de la lame d'ITO obtenues par microscopie à force atomique à l'issue de l'application d'un potentiel positif sur le substrat conducteur (Lherbette, 2021).

Les courbes approche/retrait obtenues sur le substrat, sur le bord de la bactérie, et sur la bactérie de la cartographie Figure 13 (D) sont présentées respectivement sur les Figures 13 (G, I).

- Une allure de la courbe d'approche obtenue sur le contour de la bactérie similaire à celle présentée sur la Figure 13 (B) (ligne bleue continue).
- Les oscillations présentes sur les courbes d'approche (courbes rouges) pour des grandes valeurs de hauteur proviennent des oscillations résiduelles apparues lors du retrait de la pointe : lors de son retrait, la pointe se détache d'une zone présentant une certaine adhésion et va donc se mettre à osciller librement.

4) Résultats de caractérisation physique des nanofilms de fer :

La figure 14 montre le résultat de l'étude réalisée par Lherbette (2021). A gauche, le substrat se compose d'une lamelle de verre sur laquelle une couche de titane (5 nm d'épaisseur) puis une couche de fer a été déposée (10 nm d'épaisseur). A droite, le substrat se compose uniquement d'une couche de titane de 5 nm d'épaisseur déposée sur une lamelle en verre. Il a constaté la semi-transparence des échantillons. De plus, une observation par microscopie optique inversée (Figure 14B) montre également que les bactéries sont parfaitement discernables que le substrat soit composé du nanofilm de fer de 10 nm d'épaisseur (image de gauche) ou du verre (image de droite).

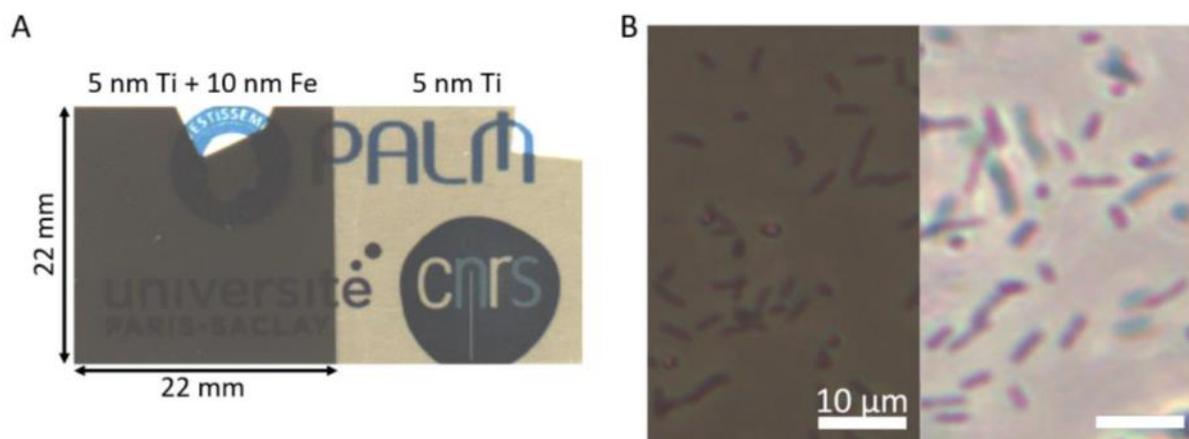


Figure 14 : semi-transparence des nanofilms de fer et visualisation des bactéries sur la surface. A gauche, image du nanofilm gris et semi-transparent de 10 nm d'épaisseur de fer déposé sur une pré-couche de titane de 5 nm d'épaisseur avec pour substrat initial une lamelle en verre. A droite, le nanofilm de 5 nm de titane seul sur du verre (B) Images prises au microscope optique inversé en mode contraste de phase. Les bactéries localisées à la surface ou au voisinage du métal (image de gauche) ou du verre (image de droite) sont facilement repérées (Lherbette, 2021).

5) Résultats des mesures d'absorption optique sur le nanofilm de fer :

Les résultats obtenus par sont présentés sur la Figure 15. L'ensemble des données de densité optique mesurées pour des échantillons d'épaisseurs différentes en fer est ajusté par une droite dont la pente donne une valeur égale à $(0,042 \pm 0,002) \text{ nm}^{-1}$. Lherbette (2021) a retrouvé une relation linéaire entre la densité optique (DO) et l'épaisseur de fer ($DO = a \cdot e_{\text{Fe}}$). Cependant, le coefficient d'absorption est déterminé par la loi de Beer-Lambert donnée par $T = \exp(-\alpha \cdot z)$.

Lherbette (2021) a exprimé α en fonction de a : $\alpha = a \cdot \ln(10)$ à partir de la définition $T = 10^{-DO}$.il obtient donc une valeur expérimentale du coefficient d'absorption égale à $(9,7 \pm 0,4) 10^5 \text{ cm}^{-1}$.

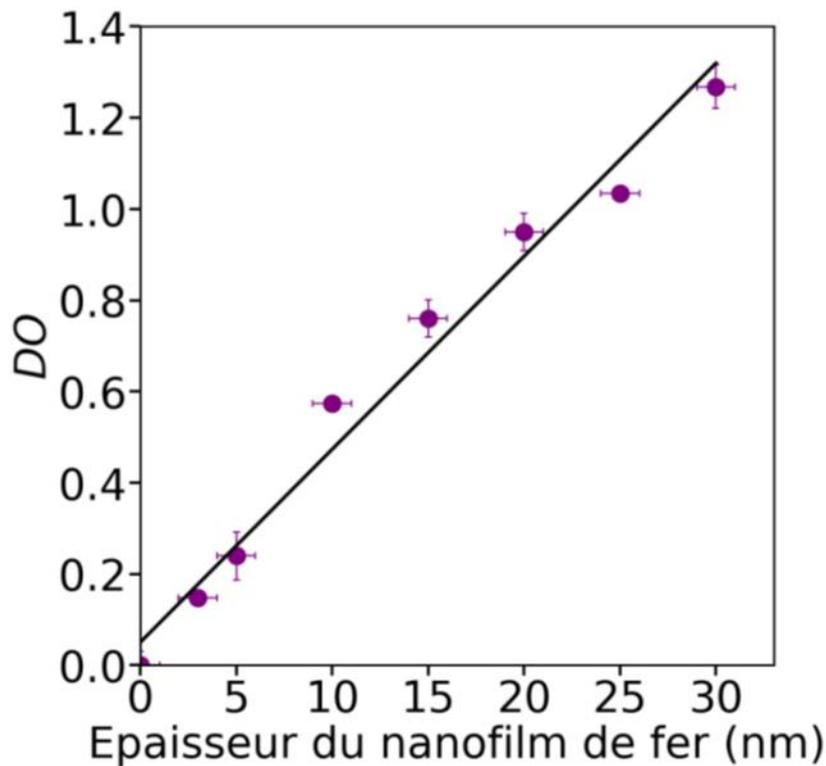


Figure 15 : détermination du coefficient d'absorption du nanofilm de fer. La densité optique est mesurée pour différentes épaisseurs en fer des nanofilms à l'aide d'un spectrophotomètre commercial à 650 nm. Les nanocouches de fer ont été directement déposées sur une surface en verre, sans pré-couche de titane. La pente du meilleur ajustement linéaire (ligne noire) donne une valeur égale à $(0,045 \pm 0,001) \text{ nm}^{-1}$ et $R^2 = 2$ (Lherbette, 2021).

6) Résultats des mesures de réflectivité X :

Les résultats bruts, soit la variation de l'intensité réfléchie mesurée en fonction de l'angle 2θ , sont présentés sur la Figure 16 (Lherbette, 2021). Différentes observations peuvent être faites :

Tout d'abord, le signal est légèrement réduit aux premières valeurs d'angle parcourues.

Deuxièmement, le signal mesuré ensuite reste constant.

Troisièmement, après cette stabilisation de la réflectivité, l'intensité diminue rapidement.

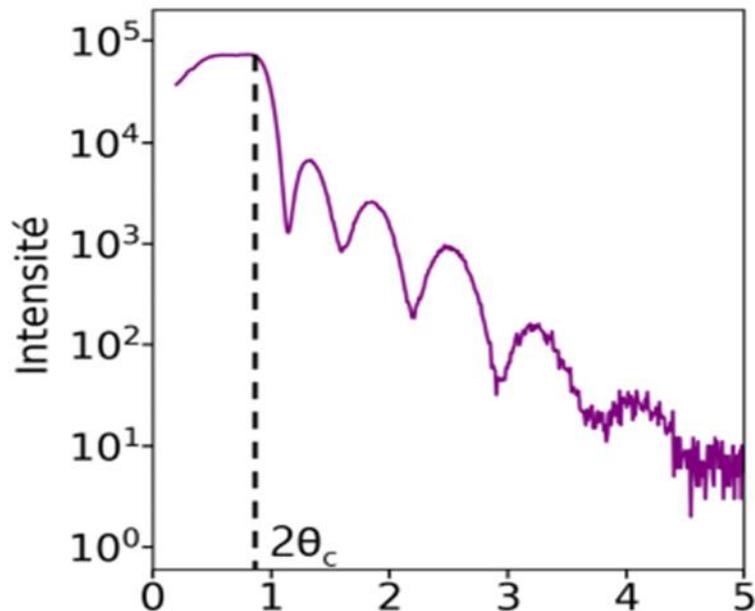


Figure 16 : logarithme de l'intensité réfléchie mesurée en fonction de l'angle 2θ (Lherbette, 2021).

7) Discussion générale :

Shewanella oneidensis est un organisme modèle utilisé dans l'étude du transfert d'électrons extracellulaire (EET) vers des accepteurs d'électrons insolubles avec une application directe vers le développement de carburant à partir de cellules microbiennes (MFC). Le phénomène d'EET est associé à des organismes considérés comme des « Bactéries Réductrices de Métaux Dissimilatrices » (BRMD), qui ont été impliqués dans le cycle naturel des métaux et des nutriments dans l'environnement (Nelson et Scott, 2006).

Dans d'autres organismes modèles BRMD tels que *Geobacter* spp. les cytochromes de type c liés à la membrane externe sont connus pour être impliqués dans le transfert direct d'électrons vers l'oxyde métallique ou la surface d'électrode (Marsili et al., 2008).

La compréhension des caractéristiques électrochimiques est essentielle pour l'utilisation et le contrôle de biofilms électroactifs (BEA) dans les systèmes bioélectrochimiques (SBE) appliqués à la biotechnologie, puisque la tension de la cellule est directement liée à la puissance de sortie de la pile à combustible microbienne, et la tension chargée est liée aux

dépenses d'électricité dans les cellules d'électrolyse microbienne. Les caractéristiques électrochimiques du BEA ont été analysées à l'aide de SBE à trois électrodes connectées à des potentiostats (**Marsili et al., 2008**).

Dans les SBE, le BEA se développe en association avec une électrode de travail (ET) « dans notre étude plaque d'ITO », et les activités électrochimiques du BEA sont mesurés sous forme de courants électriques via des électrodes de travail, dont la direction et la quantité sont déterminées par divers facteurs, y compris les potentiels d'ET, les composés chimiques dans les électrolytes, la quantité de cellules microbiennes connectées à l'ET, et potentiels métaboliques microbiens (**Patil et al., 2012**).

Par exemple, en présence de produits chimiques réduits (donneurs d'électrons pour BEA) dans un électrolyte et un ET à haut potentiel, un courant anodique (transfert d'électrons des cellules BEA vers ET) est généré, alors que, en présence de produits chimiques oxydés (accepteurs d'électrons pour BEA) et d'un ET à faible potentiel, un courant cathodique (transfert d'électrons de ET vers les cellules BEA) est généré (**Doyle et Marsili, 2015**).

La chronoampérométrie est une méthode de culture de biofilm électroactif et analysant leurs activités électrochimiques (mesurées en courant anodique ou cathodique) à un potentiel ET constant (**Doyle et Marsili, 2015**), qui peut également être utilisé pour la bioconversion assistée par électricité de produits chimiques dans l'électrofermentation (**Ikeda et al., 2021**).

Hirose et al., (2018) ont mené une étude sur les mesures chronoampérométriques des courants anodiques de la souche *S. oneidensis* MR-1 à différents potentiels d'électrodes de travail et ont constaté que les rendements de croissance (mesurés en protéines synthétisées sur l'ET par électrons transférés sous forme de courant anodique) sont élevés dans la présence d'ET à fort potentiel.

Selon les résultats de Lherbette (2021), La hauteur des bactéries (*S. oneidensis* MR-1) sur la lame d'ITO est de l'ordre du micromètre ce qui est cohérent avec la valeur attendue. Les contours flous et la hauteur plus faible pourraient indiquer la lyse de la bactérie.

De même, Champigneux (2018) a étudié l'impact de la topographie de surface des électrodes sur le développement du biofilm et sur ses performances électro-catalytiques. La formation de biofilms électroactifs de *Geobacter sulfurreducens* a été étudiée sur des électrodes d'or présentant des topographies bien contrôlées, sous la forme de rugosité, porosité, réseau de piliers, à des échelles allant du nanomètre à quelques centaines de micromètres. La présence

de microrugosité a permis d'accroître les densités de courant d'un facteur 8 par rapport à une surface lisse et son effet a été quantifié à l'aide du paramètre S_a .

Dumas (2007) a réalisé des expériences effectuées en réacteur d'électrolyse sur la souche *Geobacter sulfurreducens* portant sur la catalyse électro-microbienne de l'oxydation de l'acétate, d'une part et de la réduction du fumarate d'autre part. Du côté anodique, des différences de densités de courant apparaissent sur graphite, DSA® et acier inoxydable ($8A/m^2$, $5A/m^2$ et $0,7A/m^2$ respectivement). Ces écarts sont attribués aux différences de rugosité des matériaux plutôt qu'à leur nature. Une étude par spectroscopie d'impédance montre que le biofilm électroactif qui se développe sur l'acier inoxydable ne semble pas modifier les couches d'oxydes du matériau, seul le potentiel imposé reste déterminant. Du côté cathodique, l'acier inoxydable a permis d'obtenir des densités de courant plus de vingt fois supérieures à celles obtenues avec des électrodes de graphite.

Concernant l'adhésion bactérienne au plaque d'ITO utilisée par Lherbette (2021), les cartographies d'adhésion présentent des informations intéressantes. Pour des temps d'incubation courts, les forces d'adhésion de la pointe à la surface de la bactérie sont élevées et homogènes sur l'ensemble de la surface de la membrane bactérienne exposée à la pointe. Au contraire, pour des temps d'incubation longs, les forces d'adhésion sont particulièrement intenses sur les contours et sur la surface de la bactérie dirigée vers la lame (la bactérie reste immobile sous des scans AFM successifs) mais faibles sur le reste de la surface exposée à la pointe AFM. Ces grandes forces d'adhésion peuvent être reliées à la sécrétion de matrice extracellulaire ou d'appendices (pili, tubes polymériques) particulièrement adhésifs à l'origine de la formation des biofilms. Notons que la présence d'une zone de plus grande adhésion sur le contour de la bactérie pourrait également provenir d'un effet parasite induit par une interaction de la pointe avec la bactérie non plus ponctuelle.

Dans l'étude de Lherbette (2021), les temps d'incubation prolongés semblent induire la lyse des bactéries, selon cet auteur, le meilleur protocole semble donc être celui correspondant au dépôt de 200 μ L de milieu de culture contenant des bactéries à une densité optique de 0,1 au centre de la lame d'ITO, première incubation pendant 1 h 30 puis pipetage du dépôt puis renouvellement du milieu liquide au voisinage de la lame par ajout de 10 mL de LB, deuxième incubation pendant 1 h 30 puis lavage de la lame sous le microscope optique. Toutefois, la présence de forces d'adhésion élevées sur la surface de la bactérie peut suggérer la présence de matrice extracellulaire sur sa surface et donc l'impossibilité de sonder

directement la membrane bactérienne. De plus, l'obtention de bactéries parfaitement immobiles sous plusieurs balayages successifs de la pointe AFM n'a pu être reproduite que deux fois sur huit expériences.

Les travaux de Dumas (2007) sur l'adhésion de *G. sulfurreducens* sur les différents types de matériaux en cellule à écoulement cisailé, suggère que les biofilms résistent bien aux contraintes hydrodynamiques et ne se détachent pas en-dessous d'une valeur seuil du taux de cisaillement.

Les résultats trouvés par Lherbette (2021) sur la fixation des bactéries par application d'un potentiel positif à la surface du substrat conducteur en utilisant un protocole où un potentiel de + 200 mV (vs Ag/AgCl) a été appliqué sur la lame d'ITO sur 20 h en condition aérobie. La première observation de la forme ronde des bactéries de diamètre égal à 420 nm. La cartographie de hauteur indique une hauteur de l'ordre de 500 nm homogène sur l'ensemble de la bactérie. Cette hauteur est deux fois plus petite que celle attendue. La cartographie de rigidité montre une rigidité uniforme sur l'ensemble de la bactérie y compris sur le halo d'épaisseur plus fine en haut de la bactérie correspondant probablement à des extensions membranaires. Enfin, la cartographie de la force d'adhésion indique une force d'adhésion faible sur la membrane de la bactérie exposée à la pointe semblant indiquer l'absence de matrice extracellulaire sur ce côté de la surface. Au contraire, l'immobilité de la bactérie sous plusieurs scans successifs indique la présence de force d'adhésion importante de la bactérie au substrat. La présence de bactéries rondes, que l'on retrouve dans des milieux limitants comme la phase stationnaire de croissance, semble indiquer que les contraintes appliquées sont trop fortes pour permettre le développement de bactéries allongées, forme habituellement observée par *S. oneidensis* en phase de croissance exponentielle (Dhahri, 2013).

Un autre protocole où, cette fois, un potentiel de + 100 mV a été appliqué par Lherbette (2021) sur toute une nuit en condition anaérobie est testé. Les résultats montrent des bactéries allongées, de 2 μm de long et de hauteur 1 μm , typiques des valeurs attendues. La cartographie de rigidité présente une rigidité uniforme sur l'ensemble de la bactérie. Les zones de faibles rigidités, correspondent probablement à la présence de débris cellulaires dont la hauteur est plus faible. Enfin la présence d'une zone particulièrement adhérente sur le contour de la bactérie (force de 1nN) pourrait indiquer la sécrétion de matrice extracellulaire ou la formation d'appendices d'adhésion par les bactéries permettant leur fixation à la surface.

Les bactéries sont ici restées immobiles au cours de plusieurs scans AFM successifs indiquant une adhésion importante de la bactérie au substrat. Au contraire, la force d'adhésion est faible sur la membrane exposée à la pointe. L'ensemble de ces données semble indiquer que ce protocole est particulièrement adapté à l'obtention de bactéries suffisamment adhérentes pour pouvoir être imagées par AFM.

En effet, les courbes d'approche et de retrait, au-delà de la zone de contact répulsive, ne se superposent plus. Cette différence s'explique par la force de traînée appliquée sur le levier AFM lors des mouvements dans le milieu liquide visqueux. Les oscillations présentes sur les courbes d'approche (courbes rouges) pour des grandes valeurs de hauteur proviennent des oscillations résiduelles apparues lors du retrait de la pointe : lors de son retrait, la pointe se détache d'une zone présentant une certaine adhésion et va donc se mettre à osciller librement. Dans l'étude de Lherbette (2021), la décroissance du régime amorti n'est pas suffisamment rapide pour permettre à la pointe de retrouver un état stable avant une nouvelle approche. Ces observations concordent avec d'autres résultats présentés dans la littérature. L'adhésion des bactéries à une surface chargée positivement est également observée par Hong et *al.*, (2008) grâce aux interactions électrostatiques entre surfaces de charges opposées qui favoriseraient une adhésion irréversible des bactéries au substrat solide.

Toutefois, la valeur du potentiel positif doit rester faible puisque des potentiels trop élevés (de l'ordre de 800 mV) diminuent la viabilité des cellules (Nakayama et *al.*, 1998). Par ailleurs, d'autres études soulignent l'existence de processus de croissance et de division cellulaire singuliers des bactéries adhérentes à des surfaces chargées positivement.

Des bactéries de plus petites tailles associées à des temps de croissance plus faibles sont observées sur des surfaces chargées positivement comparativement à celles chargées négativement (Busalme et Sánchez., 2005).

D'autres études indiquent même que, bien que les bactéries (tant Gram-positives que négatives) adhèrent plus rapidement à une surface chargée positivement que négativement, les bactéries Gram-négatives ne se divisent pas sur une surface chargée positivement contrairement aux bactéries Gram-positives (une croissance exponentielle étant constatée pour les deux catégories au contact d'une surface chargée négativement). Cela serait lié aux trop fortes interactions électrostatiques attractives avec la surface qui induiraient une adhésion des bactéries tellement importante qu'elle réprimerait l'élongation nécessaire à la division cellulaire (Gottenbos et *al.*, 2001).

Lherbette (2021) suggère que la polarisation positive du substrat empêche la diffusion de particules nécessaires à la respiration cellulaire et donc à la croissance bactérienne. Cet auteur souligne que l'ensemble de ces forces s'applique également aux bactéries filles qui auront donc davantage tendance à rester au voisinage de la surface.

Lherbette (2021) a choisi de mettre à profit des films ultrafins de fer pour tenter d'observer, in situ et en temps réel, les premières modifications de surface ainsi que le comportement des bactéries sur ou au voisinage de la surface lors des premières étapes de ce processus. En effet, les mesures sont habituellement menées sur des échantillons massifs, et donc très absorbants et de coefficients de réflexion faibles, empêchant toute observation de la surface lors des premières étapes de la dégradation du fer. En diminuant l'épaisseur du substrat, nous augmentons ainsi le coefficient de réflexion et diminuons l'absorption du matériau, permettant ainsi une observation de la surface par transmission optique dès la mise en contact des bactéries avec le métal. Une observation par réflexion donnerait accès à des informations supplémentaires notamment l'évolution de la structure du nanofilm (variation d'épaisseur de la couche d'oxyde par exemple).

Conclusion et perspectives

IV. conclusion et perspectives

Ce travail bibliographique de projet de fin d'étude est dédié à développer une nouvelle filière de la production d'énergie propre et renouvelable à partir de la technologie des piles à combustible bactériennes.

Le fonctionnement de pile à combustible microbienne concerne les réactions bioélectrochimiques situées entre trois éléments principaux : l'anode, la cathode et les microorganismes électroactives. Plusieurs facteurs influencent ces réactions anodiques et cathodiques : l'électroactivité bactérienne, la nature du matériau cathodique et le mécanisme de transfert des électrons.

Dans ce manuscrit, nous nous sommes intéressées au mécanisme de transfert d'électron extracellulaire de *Shewanella oneidensis* MR-1, Parmi les propriétés notables de *S. oneidensis* MR-1 mentionnons sa capacité de transférer des électrons aux oxydes métallique solides et sa remarquable polyvalence anaérobie.

D'autre part, cette étude bibliographique consiste l'utilisation des nanofilms de fer de 10nm d'épaisseur pour suivre les premières modifications de surface ainsi que le comportement des bactéries sur ou au voisinage du fer au cours des premières étapes de la biocorrosion.

Les résultats obtenus montrer que le rendement de croissance de *S. oneidensis* MR-1 est élevé dans la présence d'électrode de travail à fort potentiel (ITO). L'adhésion bactérienne à la surface est élevé et homogène sur la membrane bactérienne pour un temps d'incubation court.

Les résultats obtenus par les auteurs sont encourageants et ouvrent des perspectives dans le future proche à savoir :

- La recherche et l'amélioration de la production de piles biologiques par l'utilisation d'un mélange de divers souches bactériennes électroactives.
- Le choix d'un modèle bactérien de meilleur rendement de densité de courant en piles biologiques.

Les références :

Abbas SZ, Rafatullah M, Ismail N, Syakir MZ, 2017, - A review on sediment microbial fuel cells as a new source of sustainable energy and heavy metal remediation : mechanisms and future prospective, International journal of energy research, v : 41, p : 1242-1264.

Bedu E, Golli A, Quinio P, Abdul Aziz J, 2014, - Pile à combustible et production de H₂ à partir d'un panneau solaire. Rapport de projet P6 sujet 39 (26/05/2014) : Insa Rouen-Institut National Des Sciences Appliquées, p : 43.

Breure, Rosso KM, Blumberger J, But JN, 2014, - Multi-haem cytochromes in *Shewanella Oneidensis* MR-1 : structure, functions and opportunities, v:12 , p : 1-27.

Busalmen JP et Sánchez SR, 2005, -Electrochemical Polarization-Induced Changes in the Growth of Individual Cells and Biofilms of *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 17552). Applied and Environmental Microbiology, v :71, p: 6235- 6240.

Collard F.,2015, les énergies renouvelables Article disponible en ligne à l'adresse <https://www.cairn.info/revue-courrier-hebdomadaire-du-crisp-2015-7-page-5.htm> pages: 19-24.

Coursolle, Dan, Gralnick, Jeffrey A, 2010, - Modularity of the Mtr respiratory pathway of *Shewanella oneidensis* strain MR-1. Journal Article, p: 995-1008.

Davis F et Higson PJS, 2007, - Biofuel cells—Recent advances and applications, in : Biosensors and Bioelectronics, v :22, p : 1224-1235.

Dhahri S, 2013. Analyse topographique, mécanique et électrochimique à l'échelle sub-micrométrique de processus pilotés par les bactéries. Thèse de doctorat de l'université montpellier II.

Donlan RM et Costerton JW, 2002, - Biofilms : survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiol Reviews .p:167-193.

Doyle LE et Marsili E, 2015, - Methods for enrichment of novel electrochemically-active microorganisms. Bioresource Technology, v : 195, p : 273-282.

Dumas C, Basséguy R, Bergel A, 2007, - Exploring electrode materials for microbially assisted electricity production by *Geobacter sulfurreducens*. In : 58th International Congress of the International Society of Electrochemistry (ISE).

Erable B, Duteanu N, Dumas C, 2010, - Application of electro-active biofilms Article in Biofouling , v : 26 , p : 57-71.

Gottenbos B, Grijpma DW, van der Mei HC, Feijen J, Busscher HJ, 2001, - Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering Gram-positive and Gram-negative bacteria. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v : 48, p : 7–13.

Guillaume V et Gibaud A, 2019, - reflex: a program for the analysis of specular X-ray and neutron reflectivity data. Journal of Applied Crystallography, v: 52, p: 201-213.

- Hau HH et Gralnick JA, 2007**, - Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *Annus. Rev. Microbial*, v :61, p : 237-258.
- Heidelberg JF, Paulsen LT et al, 2002**, - Genome sequence of the dissimilatory metal ion reducing bacterium *Shewanella Oneidensis*. *Nature Publishing Group*, p: 1118-1123.
- Hirose A, Kasai T, Aoki M, Umemura T, Watanabe K, Kouzuma A, 2018**, - Electrochemically active bacteria sense electrode potentials for regulating catabolic pathways. *Nature Communications*, v : 9, p : 1-10.
- Hong SH, Jeong J, Shim S, Kang H, Kwon S, Ahn KH, Yoon J, 2008**, - Effect of electric currents on bacterial detachment and inactivation. *Biotechnology and bioengineering*, v : 100, p : 379-386.
- Honoré F, 2017**. Etude du chaperon moléculaire Hsp90 chez la bactérie modèle *Shewanella Oneidensis*. Thèse de doctorat : Sciences de la Vie et de la Terre : Ecole pratique des hautes études, p : 1-209.
- Ikeda S, Takamatsu Y, Tsuchiya M, Suga K, Tanaka Y, Kouzuma A, Watanabe K, 2021**, - *Shewanella oneidensis* MR-1 as a bacterial platform for electro-biotechnology. *School of Life Sciences, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences*, p : 1-10.
- Janda JM et Abbott SL, 2014**, - The genus *Shewanella*: from the bring depths below to human, in: *Critical Reviews in Microbiology*, v: 40, p: 293-312.
- Ketep F, 2012**. Pile à Combustible Microbienne pour la production d'électricité couplée au traitement des eaux de l'industrie papetière. Thèse de doctorat de l'université de Grenoble : Matériaux, mécanique. Génie Civil, électrochimie.
- Lemaire ON, Honaré FA, Tempel S, Fortier EM, Leimkuhler S, Mejean V, Iobbi-Nivol C, 2019**, - *Shewanella* de colorations LDS1 chromate Resistance. *Appl Environ Microbial* , p: 1-15.
- Lemaire ON, Méjean V, Lobbi-Nivol C, 2020**, - The *Shewanella* genus : ubiquitous organisms sustaining and preserving aquatic ecosystems. *FEMS Microbial. Rev*,v: 44, p:155-170.
- Lherbette M, 2021**. Exploration multi-échelle de l'électroactivité bactérienne au travers de l'étude de la biocorrosion du fer. Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay : Physique.
- Logan BE et Regan JM, 2006**, - Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Department of Civil and Environmental Engineering, Penn State University, University Park, PA 16802, USA*, v :12, p : 512-518.
- Marsili E, Rollefson JB, Baron DB, Hozalski RM, Bond DR, 2008**, - Microbial Biofilm Voltammetry : Direct Electrochemical Characterization of Catalytic Electrode-Attached Biofilms. *American society for microbiology applied and environmental microbiology*, v : 74, p : 7329-7337.
- Nakayama T, Wake H, Ozawa K , Kodama H , Nakamura N , Matsunaga, 1998**, - Use of a Titanium Nitride for Electrochemical Inactivation of Marine Bacteria. *Environ. Sci. Technol*, v : 32, p : 798–801.

- Nealson KH et Scott J, 2006**, - Ecophysiology of the genus *Shewanella*. The prokaryotes, v: 6, p: 1133-1151.
- Park DH et Zcikus JG, 2003**, - improved fuel cell and electrode designs for producing electricity from microbial degradation. In :biotechnology and bioengineering, v : 81, p :348-355.
- Parot S, 2007**. Biofilms électroactifs : formation, caractérisation et mécanismes. Thèse de docteur de l'Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Patil SA, Hägerhäll C, Gorton L, 2012**, - Electron transfer mechanisms between microorganisms and electrodes in bioelectrochemical systems. Bioanalytical Reviews, v : 4, p : 159–192.
- Pierre A, Cédric A, Suzie B, Christion R, 2015**, - Pile à Combustible Microbienne. Ecole centrale Lyon, p : 51.
- POITIERS F, 2003**. Etude et commande de génératrices asynchrones pour l'utilisation de l'énergie éolienne Thèse de doctorat : Electronique et Génie Electrique à l'Ecole polytechnique de l'Université de Nantes.
- Polyansking MN, 2014**, - Refractive index database.
- Querry MR, 1985**, - Optical constants Missouri Univ-Kansas City.
- Rossnagel SM, 2003**, - Thin film desposition with physical vapor desposition and related technologies. Journal of Vacuum Science ET Technology A: Vacuum, and Films, v: 21, p: 74-87.
- Schroder, 2007**, - Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency. Physical chemistry chemical physics, v : 9, p: 2619-2629.
- Tender LM et al, 2002**, - Harnessing Microbially Generated power on the Seafloor. Nat. Biotechnology, v : 20, p : 821-825.
- Yannick DN, Skander H, Mario J, 2014**, - Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. Article in Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire, p : 110-115.
- Yasaka M, 2010**, - X-ray thin-film measurement techniques V. X-ray reflectivity measurement. The RigakuJournal, v: 26, p: 1-9.

Annexe

Composition de milieu de culture Luria Broth (LB)
<p>Des peptides et des peptones de caséine (Tryptone)</p> <p>Des vitamines (Vitamine B incluse)</p> <p>Des oligo-éléments (azote, soufre, magnésium)</p> <p>Des minéraux</p>

Verrerie	Appareil usuel
<p>Pipette Pasteur</p> <p>Lame de rasoir</p> <p>Lame de verre</p>	<p>Incubateur shaker</p>

Appareils utilisées	Image
Electrode de référence	
Microscope à force atomique	
Electrode de travail	
Film ITO	
Evaporateur par effet joule (plassys)	

Spectrophotomètre commercial

