

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS 6

Spécialité

Métallurgie et Matériaux

Présentée par

Céline Rubio

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 6

COMPREHENSION DES MECANISMES D'ADHESION DES BIOFILMS EN MILIEU MARIN EN VUE DE LA CONCEPTION DE NOUVEAUX MOYENS DE PREVENTION.

Soutenue le 5 Juillet 2002

devant le jury composé de :

M. P. Lejeune	Professeur INSA, Lyon I	Rapporteur
M. P.G. Rouxhet	Professeur UCL, Belgique	Rapporteur
M. P. Marcus	Directeur de recherche CNRS, ENSCP	Président
M. A. Bergel	Directeur de recherche CNRS, Toulouse	Examineur
M ^{me} C.M. Pradier	Directeur de recherche CNRS, ENSCP	Examineur
M ^{me} M.N. Bellon	Directeur de recherche INRA, Massy	Examineur
M ^{me} C. Compère	Ingénieur-Chercheur Ifremer, Brest	Examineur
M. J.P. Pautasso	Ingénieur DGA, Paris	Invité

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS 6

Spécialité

Métallurgie et Matériaux

Présentée par

Céline Rubio

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 6

COMPREHENSION DES MECANISMES D'ADHESION DES BIOFILMS EN MILIEU MARIN EN VUE DE LA CONCEPTION DE NOUVEAUX MOYENS DE PREVENTION.

Soutenue le 5 Juillet 2002

devant le jury composé de :

M. P. Lejeune	Professeur INSA, Lyon I	Rapporteur
M. P.G. Rouxhet	Professeur UCL, Belgique	Rapporteur
M. P. Marcus	Directeur de recherche CNRS, ENSCP	Président
M. A. Bergel	Directeur de recherche CNRS, Toulouse	Examineur
M ^{me} C.M. Pradier	Directeur de recherche CNRS, ENSCP	Examineur
M ^{me} M.N. Bellon	Directeur de recherche INRA, Massy	Examineur
M ^{me} C. Compère	Ingénieur-Chercheur Ifremer, Brest	Examineur
M. J.P. Pautasso	Ingénieur DGA, Paris	Invité

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué grâce à la collaboration de trois laboratoires : le service Matériaux et Structures de l'IFREMER de Brest, le Laboratoire de Physico-Chimie des Surfaces du CNRS (UMR 7045) et l'Unité de Bio-adhésion et d'Hygiène des Matériaux de l'INRA de Massy et au cofinancement de l'IFREMER et de la région Bretagne. Je remercie donc ces différents partenaires pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce sujet.

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma gratitude envers Chantal Compère pour m'avoir permis d'effectuer ce travail et pour m'avoir soutenue tout au long de ces années que nous avons passées dans le même bureau.

Je remercie Monsieur Philippe Marcus, d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse et de m'avoir accueillie dans le Laboratoire de Physico-Chimie des Surfaces. Je le remercie également d'avoir pris la présidence de ce Jury.

Je tiens aussi à exprimer ma sympathie envers Claire-Marie Pradier pour son aide et ses conseils au cours de ma thèse et plus particulièrement pendant la phase de rédaction. Nos longues discussions autour d'un thé m'auront permis de finaliser ce manuscrit, merci encore.

Il en est de même pour Marie-Noëlle Bellon-Fontaine, qui a accepté de m'encadrer et de me recevoir au sein de son unité.

Je remercie Monsieur Paul Rouxhet, professeur à l'Université Catholique de Louvain (Belgique), et Monsieur Philippe Lejeune, professeur à l'INSA (université de Lyon I), pour avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail. De même je remercie Monsieur Alain Bergel, chargé de recherche et directeur du LGP de Toulouse, et Monsieur Jean-Pierre Pautasso, ingénieur à la DGA de Paris, d'avoir consenti à participer à ce jury de thèse.

Je tiens à remercier les filles de *Micromer*, Monsieur Georges Barbier du laboratoire CMM de la DRV, Monsieur Jean Guezennec du service BMM de la DRV et Dominique Costa pour leur précieuse aide scientifique.

Je n'oublierai pas Jean Croquette et Pierre Chauchot, et les "permanents" des services Matériaux et Structure (maxou, Bertrand, Nico, Mich, Henri, Annie, Peter, les Dom, Denise,

Benoît et Elodie) et Essai et Métrologie qui m'ont accueillie avec beaucoup de gentillesse. Que ceux du LPCS (Christophe, Sandrine, Luis, M. Berthier, Mme Christine, Isa F, Lorena ...) et de l'ENSCP (Alain et Michèle Salmain) qui m'ont aidée et soutenue reçoivent aussi ma gratitude.

Petit message spécial aux thésards du LPCS : à votre tour ; et merci à mon Canard (BL), au grand cerf (AC), à Caliméro (NF), à Priscilla (ILR), Alex , Guillaume D., Julia, Loig Delph, Nath W., Kris, chouchou et tous ceux qui ont croisé mon chemin et avec qui j'ai partagé ces années Paris-Brest.

Enfin, je tiens tout particulièrement à exprimer ma profonde amitié envers Florence Mazéas pour toute l'aide qu'elle m'a apportée....

Je remercie enfin mes parents et mes proches pour m'avoir soutenue tout au long de mes études.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	9
CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	13
1. ADSORPTION DE MACROMOLÉCULES ORGANIQUES : FORMATION DU FILM PRIMAIRE.....	13
1.1. <i>Le film primaire en milieu marin</i>	13
1.2. <i>Adsorption de composés organiques sur des surfaces solides</i>	16
1.2.1. Facteurs influençant l'adsorption des molécules organiques.....	16
1.2.2. Modification structurale des macromolécules due à l'adsorption.....	18
2. CARACTÉRISATION DE LA SÉRUM ALBUMINE BOVINE ET DU POLYMÈRE A.....	19
2.1. <i>La Sérum Albumine Bovine (SAB)</i>	19
2.1.1. Composition et structure de la SAB.....	20
2.1.2. Propriétés physico-chimiques.....	23
2.1.3. Facteurs influençant la structure.....	24
2.2. <i>Le polymère A</i>	27
2.2.1. Structure.....	27
2.2.2. Liaisons de ligands inorganiques.....	28
3. LES BACTÉRIES.....	29
3.1. <i>Structure</i>	29
3.1.1. Paroi et capsule.....	31
3.1.2. Flagelles et pili.....	32
3.2. <i>Croissance et métabolisme</i>	32
3.2.1. Méthodes et techniques d'étude de la croissance.....	33
3.2.2. Facteurs influençant la croissance bactérienne.....	34
3.3. <i>Propriétés physico-chimiques des micro-organismes</i>	36
3.3.1. Détermination des caractéristiques électron-donneur, électron-accepteur des micro-organismes.....	36
3.3.2. La caractérisation physico-chimique des micro-organismes.....	37
4. L'ADHÉSION DES MICRO-ORGANISMES SUR DES SURFACES SOLIDES.....	37
4.1. <i>Modèles prédictifs de l'adhésion bactérienne sur des supports solides</i>	37
4.1.1. La DLVO.....	38
4.1.2. L'approche thermodynamique.....	39
4.2. <i>Facteurs influençant l'adhésion bactérienne</i>	40
4.2.1. Les facteurs liés au micro-organisme.....	40
4.2.2. Facteurs liés à la surface solide.....	41
4.3. <i>La consolidation de l'adhésion bactérienne et la formation du biofilm</i>	43
5. CONCLUSION.....	43
CHAPITRE 2 : MATÉRIELS & MÉTHODES.....	45
1. MATÉRIELS.....	45
1.1. <i>Les surfaces solides</i>	45
1.2. <i>Les macromolécules organiques</i>	46

1.3. Les milieux d'adsorption.....	46
1.3.1. L'eau de mer naturelle.....	46
1.3.2. L'eau de mer artificielle (EMA).....	47
1.3.3. Solutions salines.....	48
1.4. Sélection des bactéries.....	49
2. PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX.....	49
2.1. Protocole d'adsorption.....	49
2.2. Protocoles de caractérisation microbiologique.....	50
2.2.1. Coloration de Gram.....	50
2.2.2. Coloration de flagelles.....	50
2.2.3. Courbes de croissances.....	51
2.2.4. Préparation des suspensions bactériennes et des poudres bactériennes.....	51
2.2.5. Viabilité des bactéries pionnières en eau de mer artificielle.....	52
2.2.6. Viabilité des bactéries pionnières en eau de mer artificielle contenant 20 mg/L de SAB ou de polA.....	53
2.3. Protocole d'adhésion des bactéries sur des surface solides.....	53
2.3.1. Adhésion de bactéries en monoculture.....	53
2.3.2. Adhésion d'une communauté bactérienne.....	54
3. MÉTHODES D'ANALYSES.....	54
3.1. Dosage chimique des espèces organiques adsorbées.....	54
3.1.1. Dosage protéique.....	55
3.1.2. Analyse des résidus glycosidiques par chromatographie en phase gazeuse.....	55
3.2. La spectroscopie infra-rouge.....	57
3.2.1. L'analyse Infra-rouge par Transmission.....	57
3.2.2. L'analyse infra-rouge de surface par réflexion, IRRAS.....	58
3.2.3. L'analyse infra-rouge de surface par Réflexion Totale Atténuée (Attenuated Total Reflectance : ATR).....	59
3.3. La Spectroscopie de photoélectrons induite par rayons X, XPS.....	60
3.4. Adhésion Microbienne aux solvants (Microbial Adhesion to Solvents : MATS).....	61
3.5. Comparaison des techniques de surface.....	63
4. TECHNIQUES DE DÉNOMBREMENT.....	64
4.1. Dénombrement des bactéries viables cultivables.....	64
4.2. Dénombrement des bactéries totales.....	64
4.3. Observation et dénombrement des bactéries adhérentes par microscopie électronique à balayage (micromer).....	65
CHAPITRE 3 : LE FILM PRIMAIRE : ÉLABORATION ET CARACTÉRISATION.....	67
1. ELABORATION D'UN FILM PRIMAIRE MODÈLE EN EAU DE MER ARTIFICIELLE.....	67
1.1. Analyses par infra-rouge.....	68
1.1.1. Analyse infra-rouge des poudres de SAB et de polA.....	68
1.1.2. Analyses IRRAS des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L après immersion dans des solutions de SAB, de polA et d'un mélange des deux dissous en EMA.....	70
1.1.3. Cinétiques d'adsorption des macromolécules organiques sur un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L.....	71
1.2. Analyse de surface par XPS.....	73
1.3. Dosage de macromolécules adsorbées.....	81

1.4. Discussion, Conclusion.	82
2. EFFET DES SELS SUR L'ADSORPTION DE LA SAB ET DU POLA.	84
2.1. Adsorption des anions et cations sur un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L.	84
2.2. Effet du Magnésium et du Calcium sur l'adsorption de la SAB.	87
2.2.1. Adsorption de la SAB sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L immergés dans les solutions salines et rincés en eau milliQ.	87
2.2.2. Adsorption de la SAB sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L immergés dans les solutions salines et rincés en eau saline.	92
2.2.3. Discussion.	100
2.3. Effet du Magnésium et du Calcium sur l'adsorption du PolA.	106
2.3.1. Adsorption du PolA dans des solutions salines suivie d'un rinçage en eau milliQ.	106
2.3.2. Adsorption du polA dans les solutions salines et rinçage en eau saline.	109
2.3.3. Discussion.	114
2.4. Conclusion.	117
CHAPITRE 4 : SÉLECTION ET CARACTÉRISATION DES BACTÉRIES PIONNIÈRES.	119
1. SÉLECTION DES ISOLATS : NOVEMBRE 1998 - NOVEMBRE 1999 (MICROMER).	119
2. CARACTÉRISTIQUES MICROBIOLOGIQUES DES SOUCHES SÉLECTIONNÉES.	123
2.1. Caractéristiques biochimiques des isolats.	123
2.2. Caractéristiques microbiologiques des isolats.	124
2.2.1. Observation des isolats par Microscopie Electronique à Balayage.	124
2.2.2. Coloration de Gram.	125
2.2.3. Mobilité.	125
2.2.4. Courbes de croissance.	126
2.3. Préparation de la suspension d'essai : mise au point du protocole.	128
2.3.1. Observations microscopiques : état frais.	129
2.3.2. Etude des surnageants.	130
2.4. Viabilité des isolats en eau de mer artificielle stérile.	131
3. CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES ISOLATS.	132
3.1. Propriétés acido-basiques selon Lewis et Lifhitz van der Walls en eau de mer artificielle par MATS.	132
3.2. Propriétés acido-basiques selon Lewis et Lifhitz van der Walls en fonction de la force ionique.	134
3.3. Propriétés acido-basique selon Lewis et Lifhitz van der Walls en fonction de la composition de la solution.	135
3.4. Analyse des poudres bactériennes par Infra-rouge.	136
3.5. Analyse des poudres bactériennes par XPS.	138
3.6. Discussion.	142
4. CONCLUSION.	144
CHAPITRE 5 : ADHÉSION BACTÉRIENNE, RÔLE DU FILM PRIMAIRE.	147
1. ADHÉSION DES BACTÉRIES PIONNIÈRES SUR DES ÉCHANTILLONS D'ACIER INOXYDABLE AISI 316L, DE VERRE ET DE PTFE.	147

1.1. Adhésion des isolats sur des surfaces “nues”.....	148
1.2. Adhésion des isolats sur des surfaces solides conditionnées par un film primaire.	155
1.2.1. Adhésion de l’isolat D01 sur des échantillons d’acier inoxydable AISI 316L, de verre et de PTFE préconditionnés ou non par un film primaire.....	156
1.2.2. Adhésion de l’isolat D41 sur des échantillons d’acier inoxydable AISI 316L, de verre et de PTFE préconditionnés ou non par un film primaire.....	166
1.2.3. Adhésion de l’isolat DA sur des échantillons d’acier inoxydable AISI 316L, de verre et de PTFE préconditionnés ou non par un film primaire.....	175
1.3. Discussion.	185
2. ADHÉSION D’UNE COMMUNAUTÉ BACTÉRIENNE COMPOSÉE DES ISOLATS D01 ET D41 SUR DES ÉCHANTILLONS D’ACIER INOXYDABLE AISI 316L, DE VERRE ET DE PTFE.....	189
2.1. Discussion.	191
3. CONCLUSION.....	193
CONCLUSIONS – PERSPECTIVES.	197
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	203

INTRODUCTION

Tout matériau inerte immergé en eau de mer naturelle est recouvert après quelques semaines de matière organique, de bactéries, d'algues ainsi que de coquillages, phénomène que l'on nomme "fouling", anglicisme qui désigne les salissures. Malgré une littérature riche, les connaissances sur les mécanismes d'adhésion des bactéries sont limitées. La formation des biofilms est décrite comme se déroulant en plusieurs phases successives. En quelques minutes les échantillons sont recouverts d'un film organique généralement décrit comme étant homogène. Cependant peu d'études précises sur sa constitution existent, les auteurs parlant de protéines, de polysaccharides, de glycoprotéines, et/ou de substances humiques. Les premières souches bactériennes vont alors s'immobiliser sur ces matériaux. Cependant les propriétés physico-chimiques des bactéries marines ainsi que leur composition d'extrême surface n'ont pas encore été étudiées, une succession de genres bactériens ayant simplement été mis en évidence [1]. Ces bactéries, appelées bactéries pionnières de l'adhésion, vont ensuite déclencher des mécanismes adhésifs propres à chacune d'elles. Certaines souches bactériennes vont excréter des substances exopolymériques (polysaccharides, glycoprotéines ou lipopolysaccharides) qui vont leur permettre de s'ancrer plus solidement sur les surfaces solides et qui, en les entourant, vont leur servir de protection vis à vis de l'environnement. Les bactéries en se multipliant à l'intérieur de cet amas vont coloniser de façon hétérogène la surface solide et créer un écosystème microbien composé de bactéries, de microalgues et de substances organiques et inorganiques. Ce voile biologique se forme en quelques semaines et est suivi par la colonisation du matériau par des algues macroscopiques et des coquillages tels que les balanes, cette étape finale se nommant le "macro-fouling".

En milieu marin, la formation d'un biofilm sur des surfaces peut entraîner un grand nombre de problèmes tels que la biocorrosion, la dérive des systèmes optiques et des systèmes de mesure, l'augmentation de la résistance aux échanges de chaleur dans les circuits d'échangeurs, la réduction de la vitesse d'écoulement des fluides, c'est à dire de façon générale un déclin de la fonctionnalité et de la durée de vie des équipements. Par exemple, les salissures colonisant les coques des bateaux engendrent une surconsommation de carburant pour des performances équivalentes. Toutes les activités marines (offshore, aquaculture) sont confrontées aux problèmes engendrés par les biofilms.

Afin de prévenir ou de réduire la formation de ces biofilms, les industriels ont mis au point des moyens de lutte basés par exemple sur l'utilisation :

- de peintures antisalissures et de biocides à base d'agents chimiques tels que les organostanniques, les composés cuivrés et/ou les pesticides,
- de peintures ou de revêtements à base de silicone,
- de l'électrochimie.

Cependant, ces différentes méthodes de protection ne sont pas totalement satisfaisantes. Les peintures antisalissures contiennent des agents chimiques qui se sont souvent avérés nocifs pour l'environnement [2-4]. L'utilisation du Tributylétain (TBT), agent chimique provoquant des perturbations graves dans la reproduction et la croissance des mollusques, est interdite d'application pour les bateaux d'une longueur inférieure à 25 mètres et sera totalement interdit par l'Organisation Maritime Internationale d'ici 2008 (interdiction d'application au 1^{er} janvier 2003). Les peintures antisalissures contenant du cuivre ou des pesticides inquiètent un certain nombre de pays (le cuivre est soumis à des limitations de relargage au Canada et en Suède, l'Irgarol 1051 est interdit au Royaume-Uni). Les revêtements à base de silicone présentent une bonne efficacité pour les bateaux navigant mais sont peu efficaces pour les bateaux restant à quai et sont relativement coûteux (entre trois et quatre fois plus coûteux au litre que les peintures antisalissures à base de TBT). Les techniques électrochimiques, quant à elles, bien qu'efficaces, sont coûteuses et ne sont pas applicables sur les coques des bateaux navigant (technique utilisable uniquement dans les circuits d'eau de mer).

La mise sur le marché des produits biocides étant désormais soumis à réglementation (Directive du parlement européen et du conseil de l'union européenne n°98/8/CE), il apparaît essentiel de mettre au point de nouveaux procédés écologiques et efficaces limitant la formation des biofilms. Les organismes de recherche et les industriels étudient plusieurs voies de recherches basées, entre autres sur :

- l'utilisation de biocides d'origine marine incorporés dans des peintures (une grande partie de leur activité est souvent perdue une fois ces composés intégrés).
- l'utilisation de biopolymères statistiques répulsifs.

- la modification des propriétés physico-chimiques du support solide par greffage de fonctions chimiques repoussantes, greffage d'enzymes ou modification de l'hydrophobicité du matériau.

Notre travail porte sur les connaissances des interactions existant entre les bactéries et les matériaux recouverts du film primaire en vue de concevoir une modification contrôlée des propriétés physico-chimiques du support. Ceci nécessite une définition précise du rôle du film primaire sur l'adhésion bactérienne. Nous nous sommes donc posés cette question : “ la modification, et plus particulièrement l'élimination, du film primaire permettra-t-elle de limiter la formation du biofilm ?”

La première étape de cette démarche, développée dans cette thèse, est la formation d'un film primaire modèle sur un matériau et sa caractérisation physico-chimique. Elle sera suivie de la sélection et de la caractérisation des bactéries pionnières de l'adhésion pour ensuite déterminer quelles sont les interactions mises en jeu entre ces deux protagonistes.

Pour mener à bien ce projet, des techniques d'analyse de surface apportant des informations complémentaires seront utilisées : l'XPS (spectroscopie électronique induite par rayons X) et l'IRRAS (Infra Rouge de Surface par réflexion) pour obtenir des informations sur la structure et la composition d'une couche adsorbée ou des bactéries ; la MATS (Adhésion microbienne aux solvants) pour connaître les propriétés acido-basiques au sens de Lewis de la bactérie. A ces techniques d'analyse de surface seront ajoutées des dosages chimiques des macromolécules adsorbées afin de comparer les quantités de molécules adsorbées en milieu naturel et en milieu artificiel et des techniques de microbiologie classique pour dénombrer et visualiser les bactéries.

Ce manuscrit est découpé en cinq parties. La première traite des connaissances bibliographiques sur l'adsorption des molécules organiques et sur l'adhésion des bactéries. La deuxième présente les différents protocoles et techniques utilisés au cours de cette étude. Le troisième chapitre porte sur l'élaboration et la caractérisation du film primaire organique en eau de mer artificielle. Le chapitre quatre présente la sélection et la caractérisation physico-chimique des souches bactériennes pionnières de l'adhésion en eau de mer. Le dernier chapitre étudie et compare l'adhésion de trois micro-organismes sur des supports solides nus ou préconditionnés par un film organique afin de permettre l'identification du rôle du film primaire. Enfin, nous présenterons les principales conclusions de ce travail et les ouvertures vers des voies nouvelles de recherche.

CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.

Tout matériau immergé en eau de mer naturelle est couvert après quelques semaines d'un gel visqueux constitué de micro-organismes enveloppés d'une matrice exopolymérique. Ce gel appelé biofilm est hétérogène. Il est formé de régions denses dans lesquelles des micro-organismes sont entourés d'exopolymères et de régions moins denses parcourues par des canaux permettant la pénétration de macromolécules, de facteurs nutritionnels, d'oxygène, nécessaires au métabolisme des micro-organismes et le rejet des débris [5]. Ces micro-niches apportent de nombreux avantages dans un milieu souvent pauvre en nutriments : piégeage des facteurs nutritionnels, résistance aux antibiotiques. Néanmoins, le biofilm pose des problèmes industriels et son élimination est un enjeu économique et écologique (l'utilisation de biocides pose des problèmes environnementaux). Prévenir sa formation nécessite donc une bonne connaissance des modes de fixation des bactéries et de son développement.

Nous allons au cours de ce chapitre proposer une revue bibliographique des différentes phases de formation du biofilm : l'adsorption de molécules organiques formant le film primaire, l'adhésion et la prolifération bactérienne.

1. Adsorption de macromolécules organiques : formation du film primaire.

L'adsorption de macromolécules organiques (protéines, polysaccharides, lipides, substances humiques, glycoprotéines) est un phénomène inévitable et quasi instantané quand un matériau est immergé dans un fluide biologique ou dans un milieu liquide comme l'eau de mer naturelle [6, 7]. L'adsorption de composés organiques, en modifiant les propriétés chimiques et physico-chimiques de la surface des matériaux [8, 9], peut conduire à une modification de l'adhésion bactérienne sur les surfaces ainsi préconditionnées [10-12]. Après avoir présenté les connaissances acquises sur le film primaire en eau de mer naturelle, nous résumerons les données bibliographiques traitant de l'adsorption des macromolécules sur les matériaux.

1.1. Le film primaire en milieu marin.

Le milieu marin est un milieu assez pauvre en nutriments, dans lequel la concentration de carbone organique dissous (DOC pour "Dissolved Organic Carbon") est

comprise entre 1 et 4 mg/L en eau de mer de surface (profondeur inférieure à 1 mètre) et peut atteindre 20 mg/L pour les eaux côtières. Ce carbone, produit en grande partie par l'activité photosynthétique des algues, provient de plusieurs composés organiques [13, 14] :

- les substances humiques, représentant 50 à 75% du DOC, proviennent en grande majorité de la décomposition du phytoplancton. Ils peuvent être décomposés en deux types de composés organiques, les acides fulviques (85% des substances humiques) et les acides humiques (15% des substances humiques).
- les carbohydrates, représentant 5 à 10% du DOC, proviennent du phytoplancton. Il existe des monosaccharides libres dont la concentration moyenne est comprise entre 50 et 200 µg/L et des polysaccharides dont la concentration moyenne est comprise entre 50 et 500 µg/L. Des fluctuations diurnes et saisonnières sont observées, les plus hauts taux de carbohydrates étant observés l'après-midi et lors de la période du bloom (Avril-Juin). La majorité des carbohydrates sont des hexoses avec une prédominance du glucose, du fructose, de l'arabinose, du xylose, du galactose, du rhamnose, du fucose, du ribose, du mannose et du mélibiose.
- les acides aminés (a.a.), représentant 1,5 à 4% du DOC, peuvent être sous forme libre (10-40 µg/L) ou sous forme de polypeptides dont la concentration semble être 5 à 10 fois supérieure à celle des acides aminés libres.
- les acides carboxyliques et les phénols représentent 1% du DOC.
- les hydrocarbures représentent 0,5 à 1% du DOC. Le faible taux d'hydrocarbures en eau de mer naturelle est dû à un important échange entre l'air et l'eau.

Malgré cette diversité de composés organiques présents en eau de mer naturelle, le film primaire adsorbé sur une surface solide ne semble pas être majoritairement constitué que d'un seul [15] ou de deux types de macromolécules [7, 16] de faible ou de haut poids moléculaires [16]. Ces molécules organiques sont : des protéines [7, 16, 17], des carbohydrates [7, 18] ou des substances humiques [16, 19]. L'adsorption de ce film primaire sur différents matériaux est décrit comme étant un phénomène rapide, le maximum d'adsorption étant atteint en quelques heures [7, 20-22].

L'adsorption de ces macromolécules organiques sur un matériau engendre une modification physico-chimique de la surface :

- diminution de la charge de surface d'échantillons de verre, de résine, de quartz, de germanium, de PTFE et de platine probablement due à l'adsorption de substances humiques et/ou de protéines [16, 23, 24] et d'échantillons de fer, d'aluminium, de cuivre et d'or [22] due à l'adsorption de molécules non identifiées par Kristoffersen.
- modification des propriétés physico-chimiques, obtenues par mesures d'angles de contact, d'échantillons de platine, d'aluminium, de cuivre et d'or devenant plus hydrophobes [22, 24] et d'acier inoxydable AISI 316L devenant plus hydrophile [7] après immersion en eau de mer naturelle.

Le film primaire formé en eau de mer naturelle a longtemps été considéré comme homogène [25]. Des études récentes ont cependant montré qu'il était hétérogène [7, 26], des petits amas d'épaisseur variable (multicouches) étant adsorbés sur les matériaux. Un film hétérogène ne peut pas masquer totalement les propriétés physico-chimiques du substrat ; ceci explique les valeurs souvent élevées des écart-types observées par mesures d'angles de contact [7].

Ainsi, malgré ces quelques études sur le film primaire formé en eau de mer naturelle, l'adsorption proprement dite des macromolécules sur les substrats n'est pas encore totalement caractérisée ; la faible quantité de matériel organique adsorbé et la complexité des analyses chimiques et physico-chimiques à mettre en œuvre, contribuent à la difficulté de ce type de caractérisation.

Le recouvrement par des macro-molécules organiques de substrats a aussi été étudié dans le milieu dentaire, médical [27] et agro-alimentaire avec des travaux sur l'adsorption de mélanges organiques complexes tels que le jus de jambon [28], la salive [29], le sang [30] et les larmes [31].

De très nombreux auteurs ont étudié l'adsorption de la Sérum Albumine Bovine sur différents matériaux afin de mettre en évidence le changement de conformation des macromolécules au cours de l'adsorption [32] et le type de liaisons mises en jeu [33].

1.2. Adsorption de composés organiques sur des surfaces solides.

La formation d'un film organique sur les surfaces solides est décrite selon le schéma suivant [34, 35]: transport vers la surface, adsorption, réarrangement structural des macromolécules, désorption, transport vers le milieu aqueux. De nombreuses études, que nous allons résumer brièvement, portent sur la phase d'adsorption et la modification conformationnelle des macromolécules (principalement des protéines) suite à cette adsorption.

1.2.1. Facteurs influençant l'adsorption des molécules organiques.

La nature du matériau.

La nature du matériau (composition, pH de surface du matériau, hydrophobicité) peut influencer l'adsorption de macromolécules organiques.

Liu *et al.* [36] et Fukuzaki *et al.* [37] rappellent que l'adsorption des macromolécules organiques (polysaccharides et SAB) sur des échantillons métalliques (Fe_2O_3 et SiO_2 , TiO_2 , ZrO_2 , Al_2O_3) dépend du point isoléctrique de la surface considérée, de son degré d'hydroxylation et par conséquent du pH (Figure 1) :

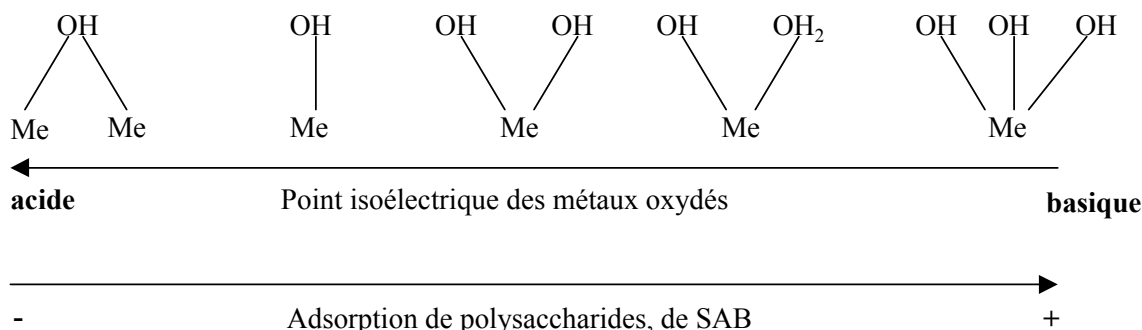


Figure 1 : Structures possibles de groupements hydroxyles de surface reliées au pH de surface et à l'adsorption de macromolécules organiques, - peu d'adsorption + beaucoup d'adsorption [36, 37].

Un point isoélectrique de surface élevé correspondant à une forte hydroxylation favorise l'adsorption des protéines comme des polysaccharides, alors qu'un point isoélectrique de surface acide défavorise l'adsorption des macromolécules organiques [36, 37].

L'adsorption de protéines dépend des caractéristiques énergétiques de surface. Elle est plus importante sur des substrats hydrophobes que sur des substrats hydrophiles : l'adsorption

de SAB dissoute en tampon phosphate (0,01M, pH = 7,4) s'effectue sur des échantillons dans l'ordre suivant : silane > PolyMethylMetAcrylate > verre [38] ; l'adsorption de SAB, Immunoglobuline G et fibrinogène dissous en tampon phosphate (0,1M, pH = 7,2) s'effectue sur des échantillons dans l'ordre silane \cong PTFE > polychlorure de vinyle > nylon [39], ce qui est en accord avec une hydrophobicité décroissante des matériaux.

Influence de la solution d'adsorption.

La solution d'adsorption (pH, force ionique, composition) peut influencer aussi fortement l'adsorption d'une macromolécule sur un substrat.

Influence du pH de la solution.

Les macromolécules vont adopter des conformations différentes en fonction du pH de la solution et ceci à cause des pH d'ionisation des groupements chimiques composant la molécule [40]. Par exemple, la SAB présente quatre conformations différentes en fonction du pH de la solution (ceci sera repris plus loin), chaque forme ayant une charge globale différente due aux différents pKa des chaînes latérales des acides aminés [40]. Ces différentes formes sont décrites à l'aide de l'infra-rouge et du dichroïsme circulaire et mettent en évidence des formes plus ou moins étendues de la molécule (ce point sera repris dans un paragraphe suivant) : les pourcentages d'hélices α et de feuillets β varient d'une forme à l'autre, modifiant la poche hydrophobe et donc la structure de la molécule [41]. Expérimentalement, l'adsorption de la SAB sur des échantillons de silice et de polystyrène est décrite comme étant maximum à un pH de la solution proche de son point isoélectrique (pI = 4,5) puisque peu de répulsions électrostatiques entre les molécules existent, la charge nette de la SAB étant alors égale à zéro [42].

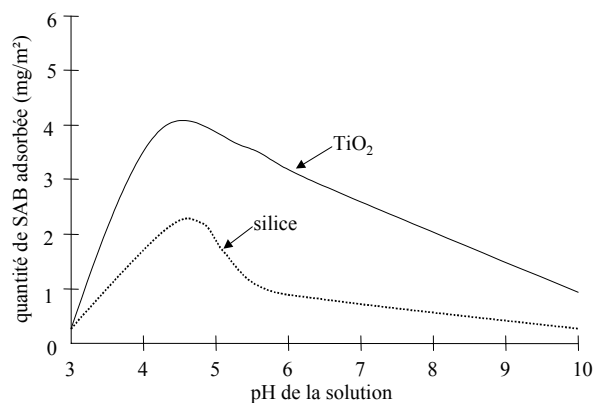


Figure 2 : Adsorption de SAB sur des échantillons de silice et de TiO₂ en fonction du pH [42].

Influence de la force ionique de la solution.

Toute molécule immergée en milieu aqueux est entourée d'une double couche ionique, son épaisseur dépendant de la force ionique de la solution. L'augmentation de la force ionique de la solution provoque :

- une diminution de l'adsorption de la SAB sur des membranes de cellulose régénérées [43] lorsque le pH de la solution est inférieur ou égal à 4,5.
- une augmentation de l'adsorption de SAB sur des membranes de cellulose régénérées [43], de verre et de PMMA [38] lorsque le pH de la solution est supérieur à 4,5.

Cette différence de comportement en fonction du pH correspond à un changement de charge, la SAB étant positivement chargée aux pH inférieurs à 4,5 et négativement chargée aux pH supérieurs à 4,5.

Néanmoins, quel que soit le pH, l'augmentation de la force ionique de la solution induit une diminution des répulsions électrostatiques entre molécules et peut provoquer leur agrégation sur une surface solide négativement chargée [43].

Influence de la concentration en matière organique.

Les isothermes d'adsorption relient le nombre de protéines adsorbées à la concentration protéique en solution. Typiquement, le nombre de protéines adsorbées augmente rapidement pour les concentrations faibles puis atteint une valeur limite, ce plateau étant interprété comme une saturation de la surface par des molécules protéiques [35].

1.2.2. Modification structurale des macromolécules due à l'adsorption

L'adsorption rapide de macromolécules organiques sur une surface solide est suivie par une phase de réarrangement structural [15, 35, 44, 45]. Cette modification de la structure secondaire est importante pour les protéines dites "douces" c'est à dire ayant une structure flexible (SAB, SAH, Immunoglobuline G) et plus faible pour les protéines dites "dures" c'est à dire ayant une structure rigide (chymotrypsine, ribonucléase) [46].

La modification conformationnelle dépend des caractéristiques énergétiques du matériau [35] :

- sur les substrats hydrophobes, les protéines s'étalent afin de créer un maximum d'interactions hydrophobes entre le substrat et la macromolécule. Ceci se traduit par une diminution du pourcentage d'hélices α et une augmentation de feuillets β et de structures inordonnées [45, 47]

- sur les substrat hydrophiles, les protéines ont tendance à se regrouper, les forces répulsives entre la macromolécule et la surface étant importantes [48].

L'adsorption organique est souvent décrite comme s'effectuant en multicouches [35, 44, 49]. Arnebrant *et al.* [44] indiquent que les molécules d'ovalbumine et de β -lactoglobuline dans une bicouche organique adsorbée sur des échantillons de chrome, ont une structure différente selon qu'elles sont en contact avec le matériau ou dans les couches supérieures, ces dernières ayant une structure proche de l'état natif.

2. Caractérisation de la Sérum Albumine Bovine et du Polymère A.

Selon le groupe BASIS [7, 50, 51], le film primaire formé en milieu marin est majoritairement composé de protéines et de carbohydrates. Les bactéries vont donc adhérer sur ce film organique dans les tous premiers temps de formation du biofilm. Afin de connaître les interactions physico-chimiques existant entre des micro-organismes et un substrat, il nous faut dans un premier temps élaborer un film primaire modèle aussi représentatif que possible de celui existant en milieu marin. Les deux macromolécules organiques choisies sont : la Sérum Albumine Bovine (une protéine dont la structure et les facteurs modifiant sa structure sont déjà bien connus) et le polymère A (carbohydrate bactérien produit par une bactérie marine). Les caractéristiques chimiques, structurales ainsi que les propriétés physico-chimiques de ces deux macromolécules sont présentées dans les paragraphes suivants.

2.1. La Sérum Albumine Bovine (SAB).

La Sérum Albumine Bovine est une protéine présente dans le lait, couramment utilisé dans plusieurs domaines de recherche (médecine, agro-alimentaire, environnement). Son nom provient du latin *albus* qui signifie blanc, couleur du composé obtenu après précipitation. De façon empirique, elle est définie ainsi : “ protéine soluble dans l'eau en absence de sels ”, définition qui permet de marquer l'opposition aux γ -globulines qui sont insolubles dans les mêmes conditions [52]. De façon un peu plus générale, Peters [40] avance comme critères de reconnaissance d'une sérum albumine: **a)** molécule soluble en solution aqueuse, **b)** molécule chargée négativement, **c)** molécule ayant un poids moléculaire d'approximativement

65000 Da, **d**) non glycoprotéine c'est à dire ne contenant pas de carbohydate dans sa constitution.

2.1.1. Composition et structure de la SAB.

Composition en acides aminés.

La composition en acides aminés de la SAB est publiée pour la première fois par Brown *et al.* en 1975 [53]. Elle est présentée dans le Tableau 1.

Acide aminé	nombre de résidus
Glycine : G	16
Alanine : A	46
Valine : V	36
Leucine : L	61
Isoleucine : I	14
Méthionine : M	4
Phénylalanine : F	27
Tryptophane : W	2
Proline : P	28
Serine : S	28
Thréonine : T	34
Cystéine : C	35
Tyrosine : Y	19
Asparagine : N	13
Glutamine : Q	20
Acide aspartique : D	41
Acide glutamique : E	59
Histidine : H	17
Lysine : K	59
Arginine : R	23
Total	582

Tableau 1 : Composition en acides aminés de la SAB [53].

Ses caractéristiques sont : une très faible quantité de résidus tryptophane et méthionine et un nombre élevé de résidus cystéine et d'acides aminés chargés (acide aspartique, acide glutamique, lysine et arginine).

De la composition en acides aminés nous pouvons déduire la composition atomique de la protéine, c'est à dire le nombre d'atomes de carbone, d'azote, d'oxygène et de soufre par molécule de SAB, Tableau 2.

Nombre d'atomes	C	N	O	S
SAB	2926	779	897	39

Tableau 2 : Composition atomique de la SAB (calculée à partir du Tableau 1).

Structure primaire.

La séquence d'acides aminés de la SAB est obtenue par Brown *et al.* en 1975 [53], et est présentée sur la Figure 3.

D¹THKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLIAFSQYLQQCPFDEHVKLVNELTEFAKTCVADESHAGCEKSLHTLFGDELCK
 VASLRETYGDMADCCEKEQPERNE¹⁰⁰CFLSHKDDSPDLPKLPDPNTLCDEFKADEKKFWGKYLYEIARRHPYFYA
 PPELLYANKYNGVFQECCQAEDKGACLLPKIETMREKVLTSARQLRC²⁰⁰ASIQKFGERALKAWSVARLSQKFPK
 AEFVEVTKLVTDLTKVHKECCHGDLLECADDRADLAKYICDNQDTISSKLECCDKPLLEKSHCIAEVEKDAIPE³⁰⁰
 DLPLTADFAEDKDVKNYQEAKDAFLGSFLYEYSRRHPEYAVSVLLRLAKEYEATLEECCAKDDPHACYTSVFDK
 LKHLVDEPQNLIKQNCQFEKLG⁴⁰⁰YGFQNAVIVRYTRKVPQVSTPTLVEVSRSLGKVGTRCCTKPESERMPCTED
 YLSLILNRLCVLHEKTPVSEKVTKCCTESLVNRRPCFSALTPDETYVPK⁵⁰⁰AFDEKLFTFHADICTLPDTEKQIKKQTA
 LVLLKHKPKATEEQLKTVMENFVAFVDKCCAADDKEACFAVEGPKLVVSTQTALA⁵⁸²

Figure 3 : Séquence de la SAB [53].

Structure secondaire.

A partir de la séquence présentée sur la Figure 4 et de la distribution des ponts disulfures, Peters proposa un repliement de la SAB [54], Figure 4.

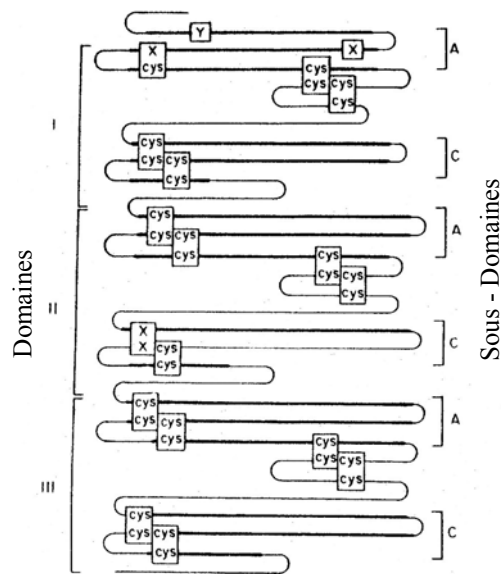


Figure 4 : Proposition de repliement de la SAB selon Peters [54].

La SAB est formée de trois domaines structuraux (I, II, III) homologues, chacun divisés en deux sous domaines A et C (chaque sous domaine étant homologue).

Structure tertiaire.

Jusqu'à présent, aucun cristal de SAB n'a pu être obtenu afin d'effectuer une étude de sa structure tridimensionnelle. Nous utiliserons les résultats obtenus à partir de la Sérum Albumine Humaine dont on peut prévoir une structure très proche (le pourcentage d'homologie de séquence entre la SAB et la SAH est de 76%, un acide aminé hydrophobe est remplacé par un autre acide aminé hydrophobe, un acide aminé hydrophile est remplacé par un autre acide aminé hydrophile de même charge).

La structure tridimensionnelle à pH = 7 de la SAH présentée sur la Figure 5 fut déterminée par diffraction de rayons X en 1992 par He [55] à partir de solutions de SAH dans du Polyéthylène glycol.

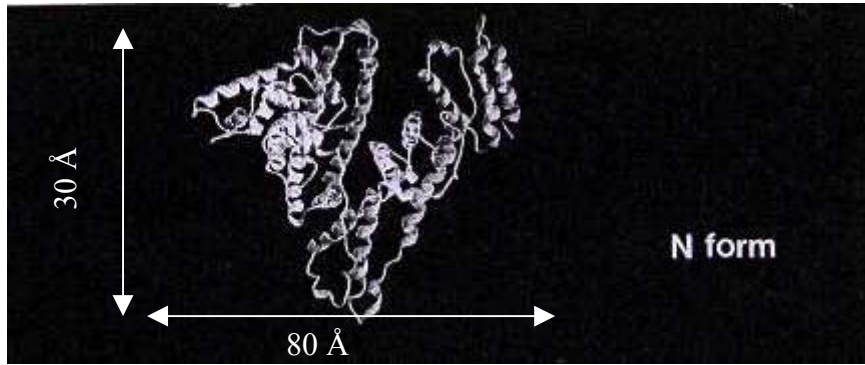


Figure 5 : Structure tridimensionnelle de la SAH à pH = 7 [55].

La SAH est formée de trois domaines homologues donnant à la protéine une forme de cœur à pH = 7. Ces domaines sont eux même formés de deux petits sous-domaines reliés entre eux par des ponts disulfures, Figure 6. La SAH comprend majoritairement des hélices α (67%) reliées par des chaînes flexibles d'acides aminés.

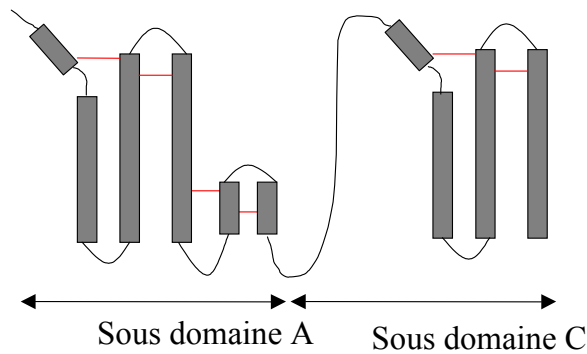


Figure 6 : Représentation schématique d'un domaine de la SAH [55] (en rouge, les ponts disulfures).

Les six sous-domaines présentent un motif commun formé de 4 hélices α . Les sous-domaines A et C sont liés entre eux par une chaîne flexible d'acides aminés, et les hélices sont maintenues dans cette structure tridimensionnelle par des interactions hydrophobes.

2.1.2. Propriétés physico-chimiques.

Les constantes physiques de la SAB sont rapportées dans le Tableau 3.

	SAB
Poids moléculaire (à partir du Tableau 2)	66267 g/mol
Point isolélectrique	4,5
Constante de sédimentation, S_{20w}	$6,7 \cdot 10^{-13} S$
Constante de diffusion, D_{20w}	$5,9 \cdot 10^{-7} \text{ dcm}^2/\text{s}$
Volume partiel spécifique, V_{20}	$0,733 \text{ cm}^3/\text{g}$
Viscosité intrinsèque, η	0,041 N

Tableau 3 : Constantes physiques de la SAB à pH = 7 [40] ($20w$: à 20°C dans l'eau).

Enfin, il est à noter que la distribution des charges sur la protéine à pH neutre n'est pas uniforme. Carter et Ho [41] ont montré une asymétrie, le domaine I portant 10 charges négatives, le domaine II en porte 8 alors que le domaine III n'en porte aucune.

2.1.3. Facteurs influençant la structure.

De nombreux facteurs extérieurs peuvent modifier la charge globale et la conformation de la SAB. Nous allons tâcher d'en donner quelques exemples dans les paragraphes suivants.

Le pH de la solution.

Plusieurs formes isomériques de la SAB sont décrites en fonction du pH de la solution dans laquelle elle est dissoute [56] comme indiqué dans le Tableau 4.

Formes isomériques					
pH de transition	2,7	4,5	8	10	
Nom	“Expanded” ”	“Fast”	“Normal”	“Basic”	“Aged”
% d'hélice α	35	45	55	48	48
charge globale*	100 +	99 +	18 -	19 -	60 -

Tableau 4 : Effet du pH sur les formes isomériques de la SAB [56] (* charge globale calculée d'après la composition et les pK des chaînes latérales des acides aminés ; + correspond à une charge positive, - correspond à une charge négative).

La forme N est la forme à pH neutre de la protéine. Cette forme a été décrite ci-dessus, dans le paragraphe concernant la structure tertiaire.

La transition de la forme N à la forme F (vitesse de transition de l'ordre de 100 ms.) provoque une ouverture de la molécule suite au déroulement du domaine III (Figure 7). Ceci est dû à la protonation des groupements carboxyles provoquant la déstabilisation des liaisons hydrogène [40]. Ce changement de structure entraîne une augmentation importante de la viscosité ainsi qu'une diminution de la solubilité.

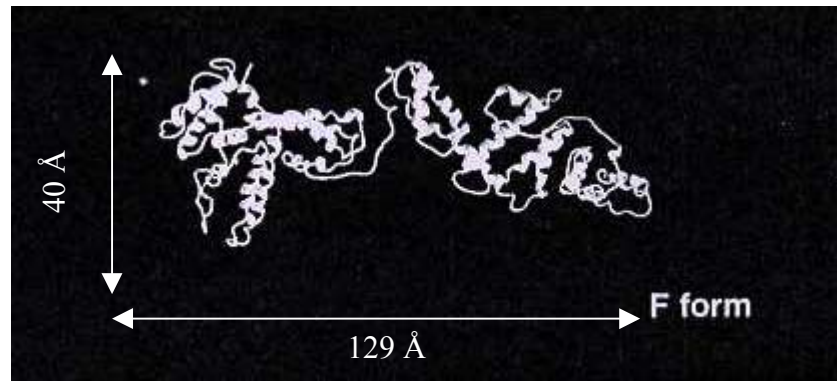


Figure 7 : Structure tertiaire de la SAB dans sa forme F [41].

La transition de la forme F à la forme E s'accompagne d'une autre expansion de la molécule, Figure 8. La protéine, morphologiquement ressemble alors à une suite de boules et de cordons.

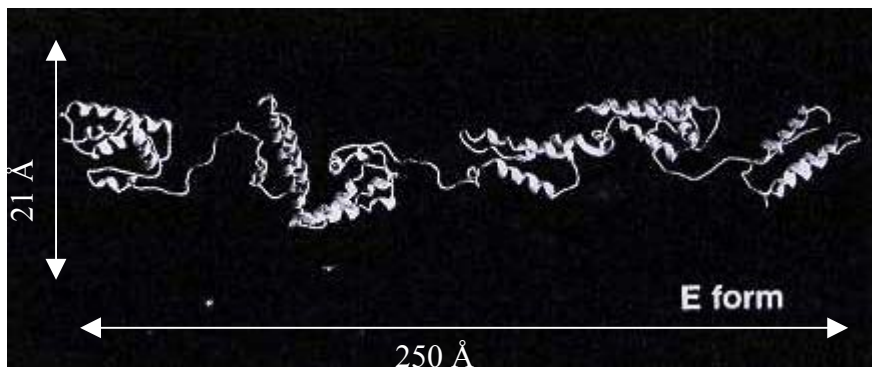


Figure 8 : Structure tertiaire de la SAB dans sa forme E [41].

La transition de la forme N à la forme B a pour conséquence une diminution du pourcentage d'hélices α accompagnée d'une augmentation du pourcentage de feuillets β et de structures désordonnées [57]. D'après Peters [40], sous cette forme, la SAB lierait plus fortement les ions calcium que sous sa forme N. Ce pH de transition correspond à la déprotonation du groupement amine terminal de la protéine. La structure de la forme B n'est pas encore, à ce jour, résolue cristallographiquement.

La transition de la forme B à la forme A est obtenue en laissant vieillir quelques jours une solution de Sérum albumine dont le pH est supérieur à 8. Une agrégation des molécules se traduit par une diminution de leur solubilité. La structure de la forme A n'a pas encore, à ce jour, été résolue cristallographiquement.

Les ligands inorganiques.

Les sérum albumines se lient en solution avec des ions inorganiques de façon réversible. Le Tableau 5 présente les constantes d'association de cations (K_{ass}) et de quelques anions (la plupart de ces constantes sont déterminées pour la SAH). Un certain nombre de sites de fixation des cations ou des autres ligands organiques sont identifiés (sites I à VI).

Ligand	n_1	$K_{ass_1} (M^{-1})$	n_2	$K_{ass_2} (M^{-1})$	Albumine	pH
Ca^{2+}	12	10^2			SAH	7
Mg^{2+}	12	10^2			SAH	7
Cu^{2+}	1	$9 \cdot 10^6$			SAB	7
Ni^{2+}	1	$3 \cdot 10^5$			SAH	7
Co^{2+}	2	$6,5 \cdot 10^3$	23	$1,6 \cdot 10^2$	SAH	7
Mn^{2+}	1	$2,4 \cdot 10^4$	5	$5 \cdot 10^2$	SAH	7
Cd^{2+}	17	$1,3 \cdot 10^3$			SAB	6
Zn^{2+}	17	$5,7 \cdot 10^2$			SAH	6
Cl^-	1	$7,2 \cdot 10^2$	4	$6,1 \cdot 10^1$	SAH	4,5
I^-	1	$6,15 \cdot 10^3$	4	$6,7 \cdot 10^2$	SAH	4,5
SCN^-	1	$3,35 \cdot 10^4$	4	$7,8 \cdot 10^2$	SAH	4,5

Tableau 5 : Liaison de petits ligands inorganiques (n_1 et n_2 : nombre de sites de liaison de forte et de plus faible affinité, K_{ass_1} et K_{ass_2} : constantes d'association des ions inorganiques avec les sites de première ou de seconde catégorie [58]).

Le site V qui lie de petits ions métalliques tels que Au^{2+} , Ag^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , mais aurait une affinité plus faible pour les ions Ca^{2+} , Mg^{2+} et Zn^{2+} a été décrit par Carter [41]. Ce site est localisé dans une crevasse à la surface de la protéine et est constitué d'un sulfure réactif (S^-) de la Cys 34 (son pKa est de 5).

La présence de Ca^{2+} et de Mg^{2+} liés à la protéine entraîne une augmentation de la tension de surface d'une monocouche de protéine à l'interface liquide-air, expliqué par un changement de conformation de la SAB en présence de ces cations [59].

Le Cu^{2+} et le Ni^{2+} se lient sur le site VI qui est situé dans la région N terminale de la protéine. Les ions sont complexés par 3 azotes : l'azote N_{term} , les deux azotes des acides aminés voisins pris dans la liaison peptidique et l'azote de la chaîne latérale de l' His_3 .

2.2. Le polymère A.

Le polymère A est un polymère bactérien issu de la bactérie hétérotrophe mésophile *Alteromonas macleodii* subsp *fijiensis* isolée dans une faille hydrothermale à 2000 m de profondeur dans la région Fidji nord [60]. La structure du polymère ainsi que les constantes d'association de petits ligands inorganiques sur ce polymère sont présentées dans ce paragraphe.

2.2.1. Structure.

De façon générale, les polysaccharides sont répertoriés en deux grandes classes :

- les homopolysaccharides lorsqu'un seul type de monosaccharides les compose,
- les hétéropolysaccharides lorsque plusieurs types de monosaccharides les composent.

Au sein de ces deux groupes, les polysaccharides bactériens peuvent être classés en trois catégories selon qu'ils contiennent des sucres neutres, des sucres acides ou des sucres aminés.

Le polymère A est un hétéropolysaccharide composé à 50% d'oses neutres : galactose, mannose et glucose, et à 50% d'oses acides : acide galacturonique et acide glucuronique [60, 61]. Sa composition et sa structure sont données sur la Figure 9.

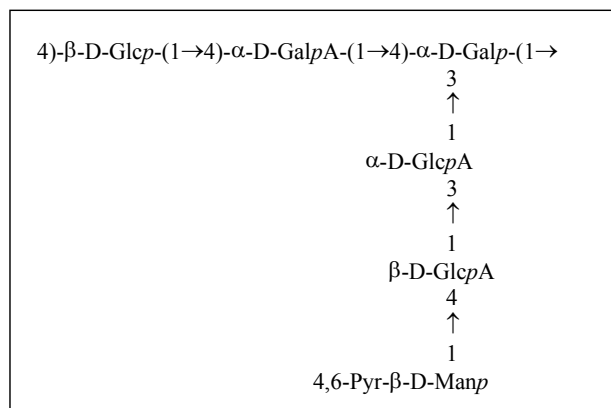


Figure 9 : Structure primaire du *polA* [61] (Glc : glucose, Gal : galactose, Man : Mannose, A : acide, Pyr : pyruvate, D : Dextrogyre).

Des hexosamines et des sulfates sont présents en très faibles concentrations et correspondent à des contaminations provenant du milieu de culture des micro-organismes ou de la phase d'isolation de ces exopolysaccharides.

Le poids moléculaire du polA est de l'ordre de 10^6 Da (2 ordres de grandeur plus élevé que la SAB) et son pKa est mesuré égal à 4,1 [62].

2.2.2. Liaisons de ligands inorganiques.

Des métaux lourds tels que le Plomb (Pb), le Cadmium (Cd) et le Zinc (Zn) se lient au polA [62]. Le Tableau 6 présente la capacité de liaison et la constante d'association du polymère A avec ces ions métalliques.

	Pb²⁺	Cd²⁺	Zn²⁺
Q (mg/g)	316	125	75
Kass (M⁻¹)	$1,4 \cdot 10^5$	$2,2 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^4$

Tableau 6 : Capacités de fixation (Q) et constantes d'association (Kass) d'ions métalliques avec le polA [Loaec, 1997 #670].

Zn²⁺ et Cd²⁺ se fixent probablement sur le même site puisque leur adsorption est compétitive [61]. Beaucoup de paramètres tels que le pH et la présence d'autres cations divalents tels que le calcium, reconnu pour être un agent gélifiant pour les polysaccharides acides, sont capables d'affecter la capacité du polA à lier ces ions métalliques [61].

Loaec [61] a montré dans le cas du polA que le site de liaison de Pb²⁺ était constitué par les atomes d'oxygène appartenant aux fonctions carboxyliques des 3 acides uroniques et par les atomes d'oxygène des liaisons glycosidiques, ces derniers servant à stabiliser le complexe.

La complexation de cations métalliques par le polA a pour conséquence la formation d'un gel, les cations univalents ne formant que des complexes faibles alors que les cations divalents ou trivalents forment des complexes plus stables [61]. Enfin, la formation du complexe métal-polA peut impliquer des réarrangements structuraux et conformationnels [61].

3. Les bactéries.

Il existe une très grande variété de bactéries se développant dans tous les milieux et se différenciant par leur forme, leur fonction, leur métabolisme [63]. Une bonne connaissance de ces micro-organismes (caractéristiques énergétiques, composition de surface, métabolisme) est nécessaire à la compréhension des mécanismes d'adhésion et de formation du biofilm.

En milieu marin, de nombreux genres bactériens ont été décrits. Les plus représentés sont : *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Alteromonas* [1].

3.1. Structure.

Les bactéries appartiennent au règne des procaryotes qui se différencient des eucaryotes par les caractéristiques rappelées dans le Tableau 7.

	Procaryotes	Eucaryotes
<i>Chromosome</i>	1	>1
<i>Plasmide</i>	≥ 0	-
<i>Membrane nucléaire</i>	-	+
<i>Réticulum endoplasmique</i>	-	+
<i>Mitochondries</i>	-	+
<i>Golgi</i>	-	+
<i>Microtubules</i>	-	+
<i>Peptidoglycane</i>	+	-
<i>Inclusions cytoplasmiques</i>	+/-	-

Tableau 7 : Différences caractéristiques entre procaryotes et eucaryotes (+ : présence, - : absence) [64].

La figure 10 présente le schéma d'une bactérie : l'ADN des micro-organismes est libre dans le cytoplasme, fortement condensé et associé à des protéines. Des inclusions peuvent être observées chez certaines bactéries, telles que des granules de polysaccharides, des inclusions lipidiques (Mycobactéries) utilisées toutes deux comme réserves, des granules de soufre (Thiobacilles), des vacuoles de gaz (bactéries pourpres et vertes), des carboxysomes (Cyanobactéries, bactéries dénitrifiantes...).

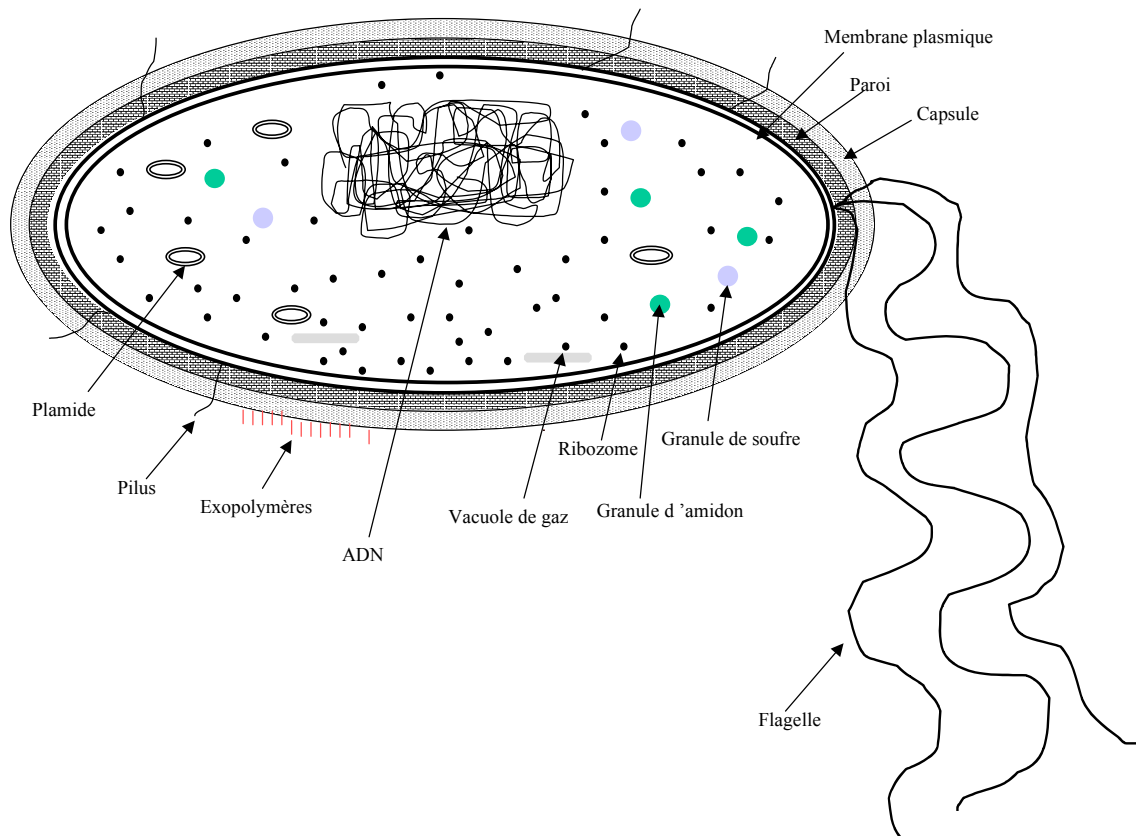


Figure 10 : Schéma d'une bactérie [64].

Selon un critère strictement morphologique, trois formes prédominantes sont observées dans la nature :

- les bactéries sphériques ou coccoïdes
- les bactéries cylindriques dites en bâtonnet
- les bactéries spiralées.

Mais il peut y avoir d'autres variantes, telles que les bactéries pédonculées et les formes filamenteuses.

Dans certaines conditions de stress : température excessive ou trop basse, pH inapproprié, carence nutritive... certains micro-organismes sont capables de développer des formes de résistance appelées spores. Ces formes, d'origines diverses, endospores, spores hyphales ou kystes, permettent la survie des bactéries durant de longs laps de temps. Des conditions favorables et notamment un milieu humide (la spore contient seulement 20% d'eau) sont nécessaires à sa germination et à la reprise de cycles végétatifs.

3.1.1. Paroi et capsule.

La paroi est une structure rigide permettant à la cellule microbienne de garder sa morphologie. La structure de la paroi diffère entre les Gram⁺ et les Gram⁻ comme indiqué sur la Figure 11.

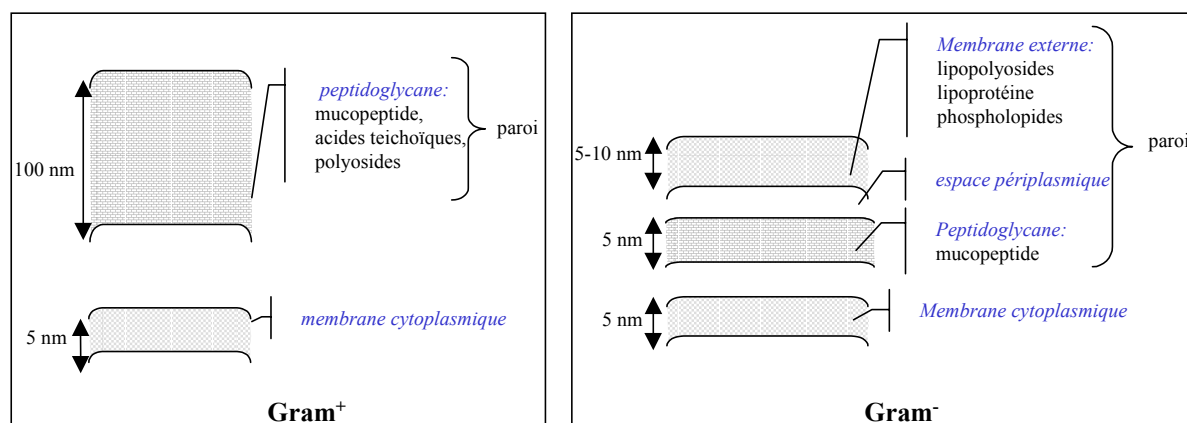


Figure 11 : Structure et composition des parois des bactéries Gram⁺ et Gram⁻ [64].

La coloration de Gram est une des premières étapes dans le classement des micro-organismes et repose sur une différence structurale entre ces deux types de paroi : existence ou non d'un espace, appelé espace périplasmique, entre la membrane externe et le peptidoglycane. En outre, une différence de composition chimique de cette paroi peut être aussi rapportée (Tableau 8).

	Gram ⁺	Gram ⁻
<i>mucopéptide</i>	+	+
<i>polypeptide</i>	+	+
<i>acide teichoïque</i>	+	- (sauf <i>E. coli</i>)
<i>acides aminés</i>	24-35 %	50%
<i>protéines</i>	- (sauf <i>S. faecalis</i>)	+
<i>lipides</i>	1 %	20 %
<i>lipopolysaccharides</i>	-	+
<i>lipoprotéines</i>	-	+

Tableau 8 : Composition chimique des parois des bactéries Gram⁺ et Gram⁻ (+ : présence, - : absence) [64].

Quelques bactéries synthétisent des polymères organiques qui se déposent en une couche plus ou moins épaisse et visqueuse au-dessus de la paroi. On appelle cette couche capsule si une frontière bien définie existe entre la paroi et cette couche.

Les composés organiques les plus externes (polysaccharides, protéines) vont permettre à la bactérie d'interagir avec l'environnement et notamment avec les surfaces [65].

3.1.2. Flagelles et pili

Les flagelles sont des appendices extracellulaires constitués de flagelline ancrée sur un corps basal dont la structure dépend du type de paroi du micro-organisme. Leur longueur est variable et peut atteindre jusqu'à dix fois le diamètre de la cellule bactérienne. Les flagelles permettent à la bactérie de se mouvoir dans son environnement et donc de se déplacer vers des milieux où les conditions sont plus favorables. La disposition des flagelles peut être polaire (à une extrémité), amphitriche (aux deux extrémités) ou péritriche (tout autour de la bactérie). Les bactéries à flagellation polaire et amphitriche peuvent encore se subdiviser en bactéries monotriches (un seul flagelle à chaque point d'ancrage) et en bactéries lophotriches (une touffe de flagelles).

Les pili ou fimbriae sont des appendices extracellulaires plus minces et plus petits que les flagelles. Ils sont constitués de piline (protéine) et sont ancrés dans la membrane cytoplasmique. Deux types de pili sont à ce jour décrits, les pili communs qui ont un rôle dans l'adhésion des bactéries et les pili sexuels dont le rôle est le transfert génétique d'ADN au cours de la conjugaison (échange d'informations génétiques entre deux bactéries).

Ces deux types d'appendices exocellulaires peuvent permettre les interactions entre les bactéries et les surfaces, ceux-ci permettant le passage du minimum secondaire évoqué plus loin dans la théorie de la DLVO [65, 66].

3.2. Croissance et métabolisme.

La croissance et le métabolismes des bactéries sont propres à chaque genre bactérien, permettant ainsi de les différencier [63, 64].

3.2.1. Méthodes et techniques d'étude de la croissance.

Les bactéries se multiplient par scissiparité. Ce mode de réplication se traduit par une croissance exponentielle des populations et obéit à l'équation :

$$n_t = n_0 \times 2^{\mu t} \quad \text{Eq1}$$

où n_t représente le nombre de bactéries dans une population donnée au temps t ; n_0 le nombre de bactéries dans la même population au moment de la première détermination; μ le taux de croissance, c'est à dire le nombre de doublement par unité de temps.

La mesure de la croissance bactérienne peut être effectuée selon plusieurs critères : la turbidimétrie (mesure d'une absorbance), le poids sec, le dénombrement des bactéries viables cultivables, le dénombrement de bactéries totales.

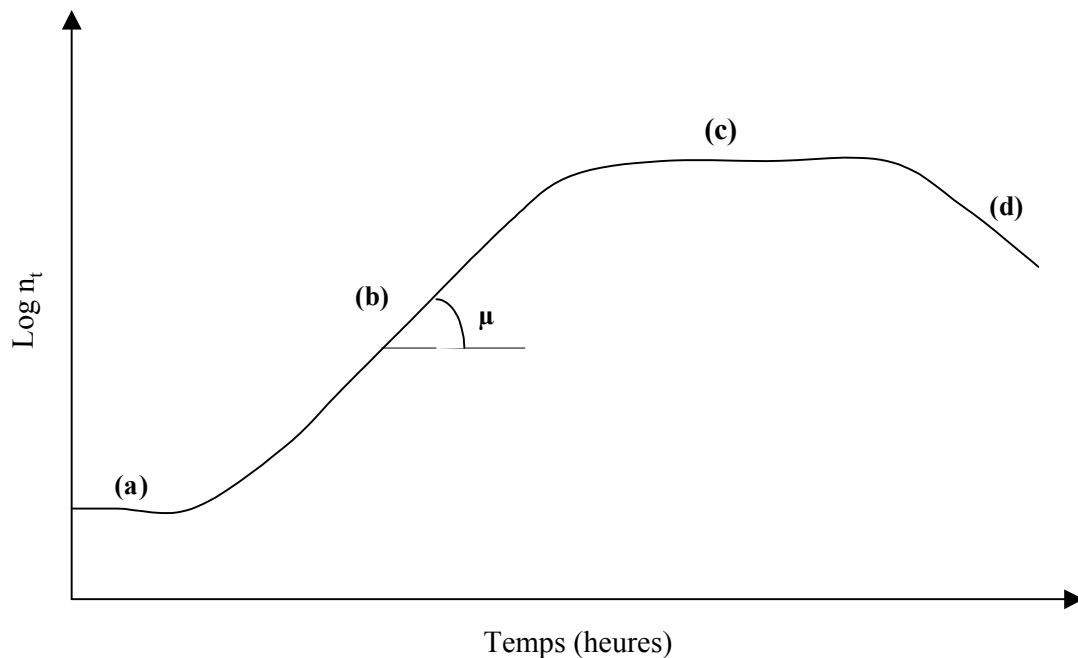


Figure 12 : Courbe de croissance bactérienne [67].

Classiquement, la croissance comporte quatre phases principales (a) la phase de latence pendant laquelle les bactéries s'adaptent à un état frais ; (b) la phase exponentielle où le taux de croissance caractéristique d'une souche et d'un milieu dans les conditions de culture est donné par la pente de la courbe ; (c) la phase stationnaire qui reflète souvent un équilibre entre la multiplication et la mort des cellules; (d) la lyse ou phase de mort cellulaire [67].

3.2.2. Facteurs influençant la croissance bactérienne

Les facteurs nutritionnels.

Certains éléments sont nécessaires à la croissance des micro-organismes :

- Le carbone qui peut être d'origine organique (bactéries hétérotrophes) ou provenir du CO₂ (bactéries autotrophes). Une bactérie est constituée en moyenne de 50% de carbone [63].
- L'azote dont l'origine peut être variée. Certaines bactéries sont capables d'assimiler l'ammoniac, les nitrates, l'azote atmosphérique et d'autres vont assimiler des acides aminés. Une bactérie est constituée en moyenne de 12% d'azote [63].
- Le phosphate et le soufre nécessaires aux bactéries pour synthétiser respectivement les acides nucléiques et les acides aminés soufrés sont principalement d'origine inorganique [63].
- Les facteurs de croissance (des composés organiques que les bactéries ne sont pas capables de synthétiser mais qui sont indispensables pour certaines souches bactériennes) : les acides-aminés, les bases et les vitamines.

Les facteurs physiques.

La température : Chaque bactérie possède une température optimale de croissance qui va déterminer son type, comme indiqué sur la Figure 13.

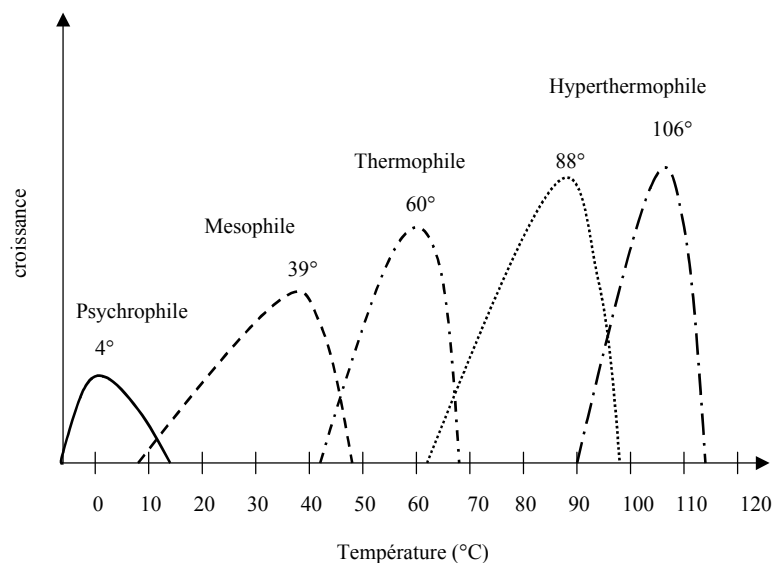


Figure 13 : Schéma reliant la croissance bactérienne à la température [63].

Les micro-organismes psychrophiles sont trouvés dans des environnements très froids, comme les glaces polaires. Les micro-organismes mésophiles sont trouvés dans les environnements agro-alimentaires, médicaux et environnementaux. Entre ces familles de micro-organismes, il existe les bactéries dites psychrotolérantes dont la température optimale de croissance est de 20°C mais qui sont capables de se développer entre 0 et 40°C. Ces bactéries sont trouvées dans les eaux, la terre des climats tempérés et dans certains produits réfrigérés. Les bactéries thermophiles et hyperthermophiles sont présentes dans les sources hydrothermales, le long du gradient de température.

Le pH : La plupart des bactéries se développent à pH neutre, mais certains micro-organismes ont besoin d'un milieu acide (bactéries acidophiles) ou d'un milieu basique (bactéries alkaliphiles) pour se développer, comme indiqué sur la Figure 14.

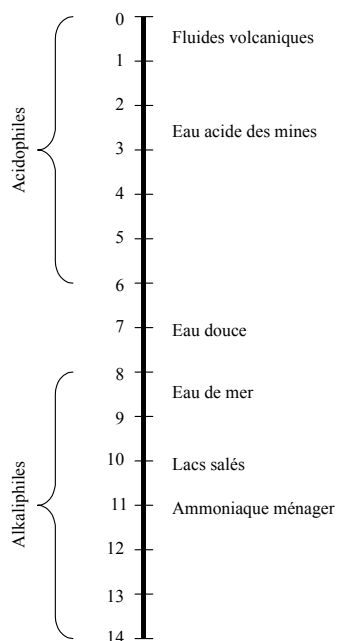


Figure 14 : Echelle de pH reliés à quelques environnements [63].

Il faut rappeler que bien que ces micro-organismes vivent dans des milieux plus ou moins acides, le pH intérieur est le plus souvent neutre afin de prévenir la destruction des macromolécules organiques dans la cellule.

L'oxygène : Les bactéries aérobies strictes ne sont pas capables de se développer en absence d'oxygène moléculaire, les bactéries anaérobies ne sont pas capables de se développer en présence d'oxygène moléculaire, les bactéries aéro-anaérobies sont capables de se développer dans tous les cas de figure, et les bactéries microaérophiles ont besoin d'oxygène mais en faibles quantités.

La pression osmotique : La tolérance osmotique des micro-organismes est décrite ainsi : bactéries non-halophiles (bactéries qui n'ont pas besoin de NaCl pour leur croissance), les formes halophiles (bactéries qui ont besoin de 0,1% de NaCl), les bactéries halophiles modérées (bactéries qui ont besoin de 2 à 20% de NaCl), et les bactéries halophiles extrêmes (bactéries qui ont besoin de 5 à 36% de NaCl).

3.3. Propriétés physico-chimiques des micro-organismes.

La caractérisation physico-chimique des micro-organismes est essentielle afin de comprendre les interactions entre un matériau et une bactérie ou afin de classer et d'identifier les micro-organismes. Nous allons résumer brièvement les méthodes utilisées et les connaissances acquises au cours de ces dernières années.

3.3.1. Détermination des caractéristiques électron-donneur, électron-accepteur des micro-organismes.

La MATS "Microbial Adhesion To Solvents", méthode mise au point par Bellon-Fontaine *et al.* [68] permet de déterminer les caractéristiques électron-donneur, électron-accepteur des micro-organismes. La majorité des micro-organismes jusqu'alors étudiés possèdent soit un caractère électron-donneur fort et un caractère électron-accepteur faible soit l'inverse [68, 69], indiquant une hydrophilie de surface plus ou moins marquée [70, 71].

La zétamétrie est une méthode permettant de déterminer la charge globale de surface des micro-organismes en mesurant leur mobilité à différents pH sous un champ électrique (pour cela, les micro-organismes ne doivent pas être doués d'une mobilité propre). Pelletier *et al.* [72] ont mis en évidence que des bactéries de même famille possédaient le même point isoélectrique. Rijnaarts *et al.* [73] ont quant à eux montré que les valeurs de points isoélectriques correspondaient à des compositions de parois cellulaires différentes :

- un point isoélectrique $\leq 2,8$ indique la présence de polysaccharides de surface contenant des groupements phosphates et/ou carboxylates.
- un point isoélectrique = 3 indique la présence de composés de surface amphiphiles.
- un point isoélectrique $\geq 3,2$ indique la présence de chaînes carbonées non chargées.

3.3.2. La caractérisation physico-chimique des micro-organismes.

L'infra-rouge est utilisé pour la taxonomie des micro-organismes [74-77]. Un spectre de bactérie peut alors être considéré comme une empreinte de chaque bactérie correspondant à un mélange de protéines, de carbohydrates et d'ADN – ARN [78, 79]. La classification bactérienne est effectuée par comparaison des intensités des bandes entre elles permettant un assez bon rapprochement des familles et des genres bactériens.[77]

La spectroscopie électronique par rayons X permet l'analyse de l'extrême surface des micro-organismes et donne des informations sur la composition [80, 81] :

- l'oxygène provient des carbohydrates, des protéines, du peptidoglycane et des acides teichoïques (ces derniers étant présents uniquement chez les bactéries Gram⁺),
- l'azote provient principalement des protéines,
- le carbone provient des hydrocarbures, des carbohydrates, des protéines, du peptidoglycane et des acides teichoïques.

Cette composition d'extrême surface peut être reliée aux caractéristiques énergétiques de surface. Selon van der Mei et Busscher [80], les micro-organismes présentant une hydrophobicité de surface sont plutôt riches en protéines alors que les bactéries présentant une hydrophilicité sont riches en composés oxygénés.

4. L'adhésion des micro-organismes sur des surfaces solides.

L'adhésion des micro-organismes sur une surface solide est un processus s'effectuant en plusieurs étapes : transport vers la surface, adhésion réversible, adhésion irréversible. Ces trois étapes sont nécessaires à la formation des biofilms. Le transport vers la surface solide peut s'effectuer soit grâce à la mobilité propre des bactéries soit grâce au mouvement du fluide (mouvement brownien, sédimentation, écoulement) dans lequel la bactérie est en suspension. Les deux phases suivantes, qui correspondent à l'adhésion bactérienne sont très étudiées et deux théories permettent de prédire l'attachement des micro-organismes sur différents types de surfaces solides.

4.1. Modèles prédictifs de l'adhésion bactérienne sur des supports solides.

Il existe deux approches de l'adhésion des micro-organismes sur les surfaces solides basées toutes deux sur la physico-chimie des interfaces.

4.1.1. La DLVO.

Cette théorie du nom de ces fondateurs Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek, prend en considération les forces électrostatiques et les forces de Van der Waals, sans tenir compte des interactions de Lewis (Figure 15).

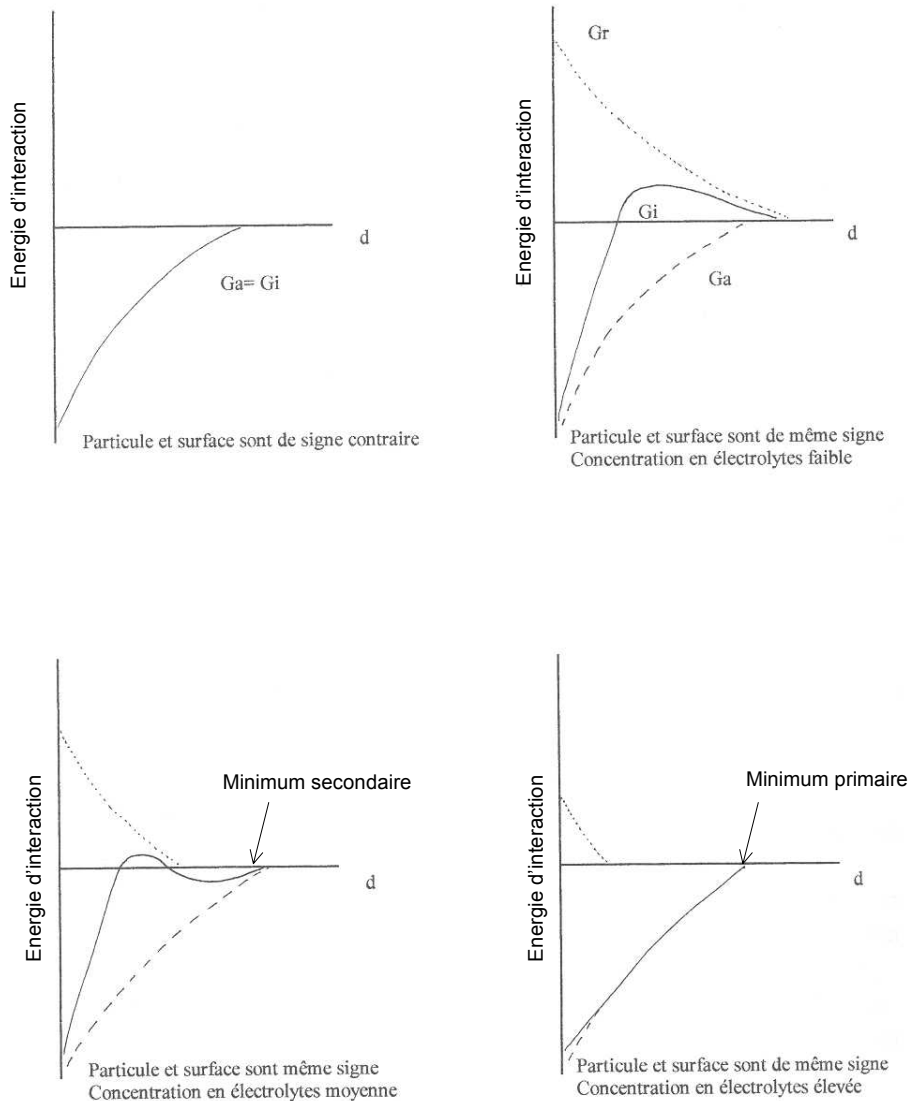


Figure 15 : Potentiel d'interaction (G_i : -) entre une particule et une surface en fonction de leur distance de séparation d ; G_a : interaction attractive de Lifshitz van der Waals - - -, G_r : interaction électrostatique répulsive

- Lorsque deux surfaces portent des charges de signes contraire, il y a toujours attraction, quelle que soit la distance d , G_i étant négatif.
- Lorsque deux surfaces portent des charges de même signe plusieurs cas de figure se présentent [28, 82] :

- à faible concentration en électrolytes dans le milieu suspensé, G_i est supérieur à 0 pour les distances empêchant la bactérie de s'immobiliser aux abords de la surface, ceci étant dû à une barrière de répulsion importante, la double couche ionique étant épaisse.

- à une concentration intermédiaire en électrolytes (10^{-4} à 10^{-1} moles/L) dans le milieu suspensé, G_i est inférieur à 0 pour des distances importantes, ce qui permet à la bactérie de s'immobiliser aux abords de la surface dans une zone appelée minimum secondaire, la barrière de répulsion étant plus faible. Dans cette zone, l'adhésion est réversible, G_i devenant positif pour des distances plus faibles et la bactérie ne pouvant pas entrer en contact intime avec la surface. Une adhésion irréversible peut néanmoins se produire grâce aux pilis ou par la sécrétion de molécules de petite taille pouvant franchir cette barrière de répulsion.

- à une forte concentration en électrolyte, G_i est toujours inférieur à 0 indiquant que le micro-organisme pourra s'immobiliser dans la zone nommée minimum primaire, zone plus proche de la surface et ainsi adhérer irréversiblement.

4.1.2. L'approche thermodynamique.

Cette approche considère l'adhésion bactérienne comme un état d'équilibre prenant en compte le point de contact et en négligeant les interactions électrostatiques [82]. Si les énergies de surface des différents partenaires, molécules, échantillons et milieu suspensé sont connues, on peut déterminer la variation d'énergie libre d'adhésion, ΔF_{adh} [83] :

$$\Delta F_{adh} = \gamma_{sb} - \gamma_{sl} - \gamma_{bl} \quad \text{Eq 2}$$

où γ_{sb} : énergie interfaciale surface-bactérie

γ_{sl} : énergie interfaciale surface-liquide

γ_{bl} : énergie interfaciale bactérie-liquide

L'adhésion est énergétiquement favorable si $\Delta F_{adh} < 0$, comme schématisé sur la Figure 16.

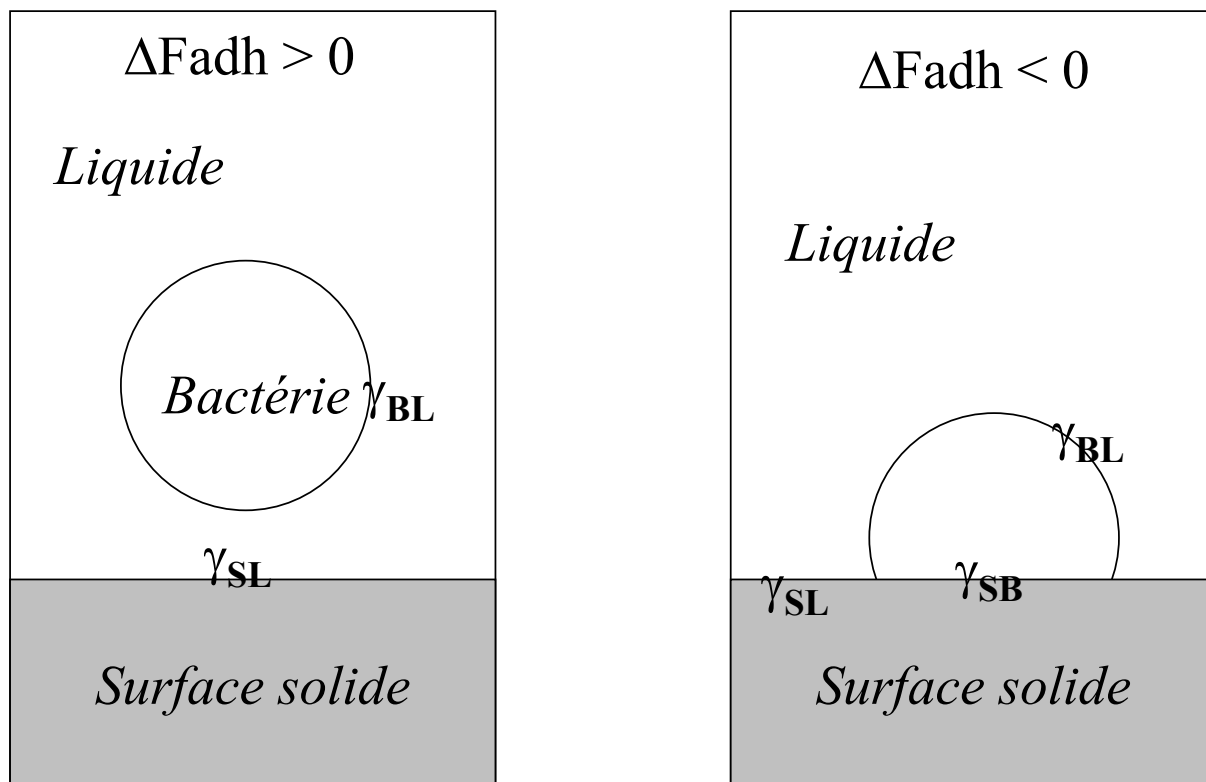


Figure 16 : Modèle prédictif de l'adhésion, où γ_{SL} , γ_{BL} et γ_{SB} correspondent respectivement à l'énergie de surface entre la surface solide et le liquide, entre la bactérie et le liquide, et entre la bactérie et la surface solide [83].

4.2. Facteurs influençant l'adhésion bactérienne.

Tout comme pour l'adsorption de molécules organiques, de nombreux facteurs peuvent influencer l'adhésion bactérienne par modification des caractéristiques du micro-organisme ou de la surface solide. Nous présentons dans les deux paragraphes suivants une liste non exhaustive des différents paramètres pouvant modifier l'adhésion bactérienne.

4.2.1. Les facteurs liés au micro-organisme.

Chaque famille de micro-organisme possède des propriétés physico-chimiques qui lui sont propres. Toute modification des caractéristiques énergétiques de surface des micro-organismes peut entraîner une augmentation ou une diminution de l'adhésion bactérienne [84]. Grivet *et al.* [84] ont par exemple mis en évidence que l'adhésion de quatre souches de *Streptococcus* sur des alliages dentaires dépend de leurs caractéristiques énergétiques, la souche la plus hydrophile présentant les plus faibles taux d'adhésion.

Il apparaît que le mode de préparation de la culture bactérienne peut avoir de grandes conséquences sur les propriétés physico-chimiques de surfaces des bactéries [85, 86]. Par exemple, la centrifugation des cultures permettant un "lavage" des micro-organismes peut rompre flagelles et pilis, modifiant la composition de surface des micro-organismes [66] et par conséquent les caractéristiques énergétiques de surface de la bactérie [87]. La disparition des flagelles et des pili peut perturber l'adhésion [66, 88-91], ces organites ayant un rôle très important dans les premières phases d'adhésion en permettant le déplacement vers la surface et le passage du minimum secondaire [92, 93].

La composition du milieu suspendant peut aussi avoir une influence sur l'adhésion bactérienne ; pH et force ionique en modifiant les composantes électrostatiques de la surface du micro-organisme [69, 70, 72] vont conduire à une adhésion différente des bactéries sur les supports solides [88, 94, 95]. Cependant, Peng *et al.* [96] ont présenté des résultats contradictoires où le taux d'adhésion ne varie pas en fonction du milieu suspendant.

4.2.2. Facteurs liés à la surface solide.

Pour étudier l'adhésion bactérienne sur les matériaux, il est important de prendre en compte le type de métal ou de matériau, l'hydrophobicité, la rugosité de surface, les procédures de nettoyage [97] et la présence ou non d'un film organique.

Une surface possède des imperfections (anfractuosités) dues au mode de préparation employé lors de l'usinage des matériaux. Intuitivement, les rainures semblent être un parfait environnement pour le développement bactérien puisque l'aire colonisable est augmentée et les sites d'adhésion plus nombreux. Les bactéries en se logeant dans ces imperfections peuvent alors être protégées des agressions extérieures (nettoyant-désinfectant, ultrasons) [97]. Cependant, l'effet de la rugosité sur l'adhésion bactérienne n'est pas clair :

- Kerr *et al.* ont observé une augmentation de l'adhésion bactérienne sur des échantillons de verre et d'acrylique immergés en eau de mer naturelle lorsque la rugosité augmente de 0,25 à 30 μm [98],
- Boulangé-Peterman *et al.* ont montré que l'augmentation de la rugosité d'une surface d'acier inoxydable AISI 304 entre 0,01 et 1 μm n'avait pas de conséquences sur l'adhésion de *Streptococcus thermophilus* [99] ; conclusion

identique pour Jansen et Kohlen sur des échantillons de polyuréthane dont la rugosité est comprise entre 0,4 et 1,4 μm [100],

- Scheuerman *et al.* ont conclu que la présence d'anfractuosités augmentait la quantité de *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens* adhérents sur des échantillons de silicone, mais qu'une rugosité supérieure à 10 μm n'avait aucun effet supplémentaire [90].

De façon générale, il est admis que les micro-organismes hydrophobes adhèrent fortement sur des matériaux hydrophobes alors que les micro-organismes hydrophiles adhèrent plus fortement sur des matériaux hydrophiles [84, 101-104]. Les caractéristiques énergétiques de surface des échantillons dépendent de plusieurs facteurs :

- La composition chimique de la surface solide étudiée (chrome, fer, nickel, cuivre, verre, PTFE), les différents types de matériaux présentant des caractéristiques physico-chimiques dissemblables, peut conduire à d'importantes différences d'adhésion bactérienne [97, 103].
- Le mode de nettoyage des surfaces solides, en modifiant les caractéristiques énergétiques d'échantillons d'acier inoxydable AISI 304, les rendant plus ou moins hydrophobes, influence l'adhésion de *Streptococcus thermophilus* [101].
- L'adsorption d'ion ferriques sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 304 [104], d'ions calcium et de cuivre ou de TBT sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316 [105] d'argent sur des échantillons de polyuréthane [100] va, en modifiant les propriétés de surface du matériau, provoquer soit la diminution soit l'augmentation de l'adhésion bactérienne.
- L'adsorption de composés organiques sur la surface solide entraîne la modification physico-chimique de la surface solide. Ce film organique masque en partie ou totalement les propriétés initiales de la surface [87, 106] et augmente l'adhésion [12] ou au contraire la diminue [10, 107]. Le conditionnement par des molécules organiques ne semble cependant pas éliminer l'adhésion bactérienne [106].

Ainsi, Garry [28] a mis en évidence que l'encrassement de bandes convoyeuses en polyuréthane par du jus de jambon augmentait l'adhésion et la survie de *Bacillus cereus* et

Bacillus subtilis alors que d'autres auteurs ont observé une diminution de l'adhésion de *Pseudomonas fragi* ou de *Staphylococcus aureus* respectivement sur des échantillons d'acier inoxydable, de chrome et de polyurethane recouvert d'un film de SAB [87, 108]. De même le conditionnement d'échantillons de silicone par le biosurfactant produit par *Streptococcus thermophilus* inhibe l'adhésion de *Candida albicans* [109]. De façon générale, ce nouvel interface, en modifiant la rugosité et les propriétés physico-chimiques du substrat, va devenir un des acteurs de l'adhésion bactérienne, le micro-organisme se liant au film conditionnant si les interactions sont assez fortes [110].

4.3. La consolidation de l'adhésion bactérienne et la formation du biofilm.

La consolidation de l'adhésion de bactéries marines s'effectue, selon Fletcher et Floodgate [111], par sécrétion d'un polysaccharide acide fibreux liant les bactéries à la surface et entre elles. Ces polysaccharides sont différents de ceux entourant la bactérie lorsque celle-ci est sessile [112]. La sécrétion de structures extracellulaires possédant des propriétés adhésives, telles que des polysaccharides et des protéines, semble être la seconde étape de formation du biofilm [111, 113, 114], ces molécules pouvant empêcher [109, 115] ou au contraire permettre la colonisation par d'autres micro-organismes [116].

Ainsi, Flemming [117] décrit le biofilm comme une matrice de substances exopolymériques dans laquelle des micro-organismes, des particules organiques et des substances dissoutes sont inclus. Ces substances exopolymériques, entourant les micro-organismes, forment à terme entre 50 et 95 % du poids sec du biofilm [5, 116, 117]. Les bactéries incluses dans le biofilm sont immobiles et modifient leurs caractéristiques phénotypiques par rapport aux bactéries sessiles : modification de la morphologie, des caractéristiques énergétiques, disparition des flagelles [104, 117, 118]. Pringent-Combaret *et al.* [119] a ainsi démontré que la transcription de 38% des gènes était modifiée au cours du développement du biofilm.

Cette matrice hétérogène permet enfin la protection des micro-organismes contre les biocides, ceux-ci étant complexés par les polysaccharides et les protéines [116].

5. Conclusion.

L'immersion d'échantillons solides dans un milieu aqueux naturel (eau de mer, eau douce, eau saumâtre) conduit à la formation dans un premier temps d'un film organique composé majoritairement de protéines et de polysaccharides sur lequel des bactéries vont

adhérer [7, 120]. Les interactions entre les bactéries et les substrats se feront donc par l'intermédiaire de ces molécules organiques adsorbées, ces interactions dépendant des caractéristiques énergétiques et des propriétés physico-chimiques des deux acteurs.

Nous avons pu voir au cours de ce chapitre que de nombreux facteurs interviennent dans la formation du biofilm : le substrat, le film primaire organique et les bactéries. Le phénomène de micro-fouling en milieu marin et plus particulièrement les premières phases d'adhésion des bactéries marines sur les substrats immergés n'a pas encore été totalement clarifié. Dans cette optique, nous allons essayer de caractériser, à l'aide de techniques physico-chimiques, d'une part les substrats recouverts d'un film organique, et d'autre part les bactéries, avant d'étudier l'adhésion de ces micro-organismes sur les substrats.

CHAPITRE 2 : MATERIELS & METHODES.

1. Matériels.

1.1. Les surfaces solides.

Trois types de matériaux, de composition et de propriétés physico-chimiques différentes, sont choisis pour conduire cette étude :

- l'acier inoxydable AISI 316L (Fe/Cr18/Ni10/Mo3, Goodfellow),
- le Polytetrafluoroéthylène $-(CF_2-CF_2)_n-$, Goodfellow) : PTFE ou Téflon[®],
- le verre (lames de microscopes).

Afin d'éliminer toute trace de contamination organique et microbologique les échantillons sont nettoyés préalablement aux essais d'adsorption et/ou d'adhésion selon différents protocoles spécifiques à chaque type de surface, comme indiqué sur la Figure 17.

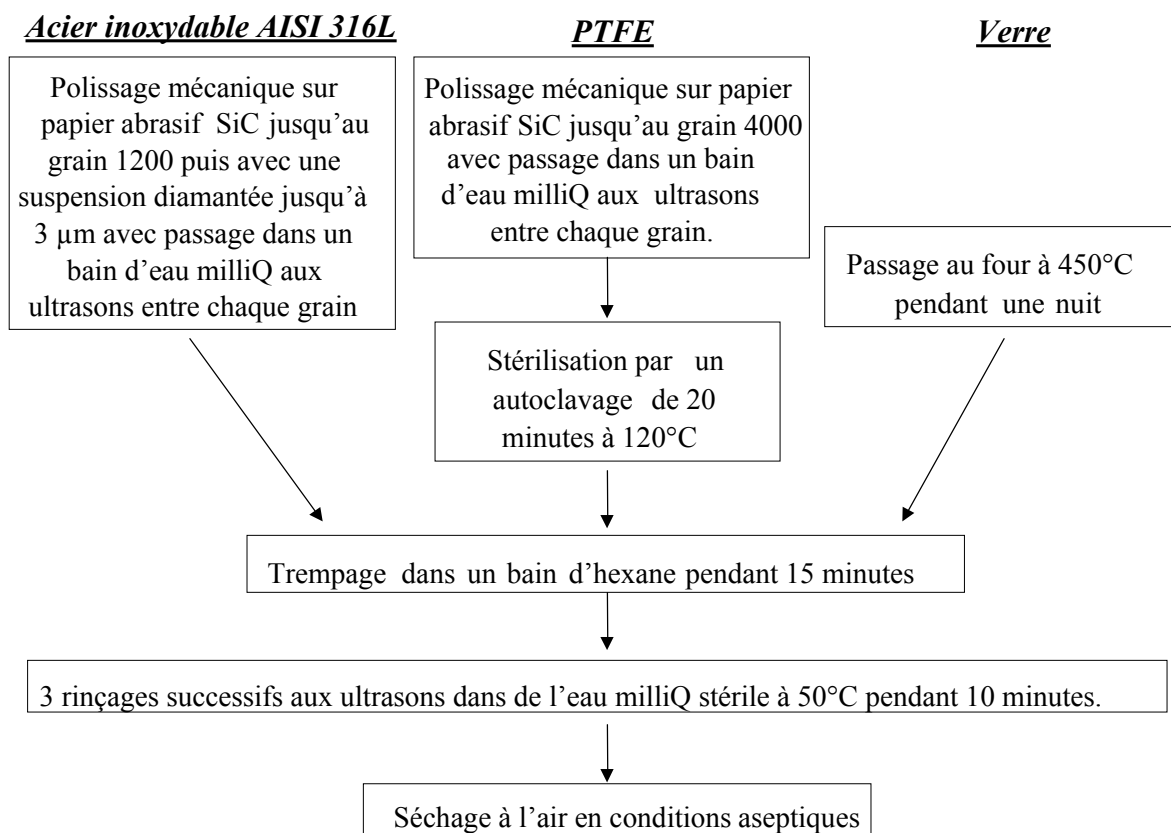


Figure 17 : Protocoles de nettoyage des différentes surfaces.

Les échantillons d'acier inoxydable AISI 316L et de PTFE sont polis jusqu'au grade 3 μm afin de créer une rugosité de surface homogène. Les échantillons de verre subissent un passage à 450°C pendant une nuit (élimination du carbone organique et des traces bactériennes). Les échantillons de PTFE sont autoclavés afin d'éliminer toute trace de contamination bactérienne, cette stérilisation n'a pas été effectuée pour l'acier inoxydable AISI 316L car cela modifierait la composition chimique du film passif [121]. Tous les matériaux sont ensuite nettoyés dans un bain d'hexane puis rincés trois fois dans un bain d'eau milliQ à 50°C. Avant toute analyse, les échantillons sont vieillies 24 heures à l'air en conditions aseptiques afin que le film passif de l'acier inoxydable AISI 316L se stabilise.

1.2. Les macromolécules organiques.

Afin de créer un film organique, deux macromolécules sont choisies :

- Une protéine : la Sérum Albumine Bovine, SAB, (fraction V, pure à 99,98%, Sigma, France)
- Un polysaccharide : le polymère A, polA, (polymère bactérien produit par la souche *Alteromonas macleodii subsp. fijiensis*).

Des solutions protéiques ou polymériques sont réalisées en dissolvant 20 mg/L de matière organique dans des solutions salines (solutions présentées dans le paragraphe suivant). Trois types de solutions organiques sont réalisées :

- 100% SAB : 20 mg/L de SAB.
- 100% polA : 20 mg/L de polA.
- 50% SAB / 50% polA : 10 mg/L de SAB et 10 mg/L de polA.

Après introduction des molécules organiques dans la solution aqueuse, celle-ci est laissée 24 heures sous une agitation de 250 tours/minutes afin d'assurer une complète dissolution des macromolécules.

1.3. Les milieux d'adsorption.

1.3.1. L'eau de mer naturelle.

Les expériences en eau de mer naturelle ont été réalisées sur 2 sites après pompage de l'eau de mer au large du môle de Sainte-Anne du Portzic (rade de Brest).

Le site 1 est situé sur le môle de l'Ifremer dans l'anse de Sainte-Anne du Portzic.

Le site 2 est situé au service matériaux et structure. L'eau pompée au niveau de Sainte-Anne du Portzic est acheminée après filtration grossière (afin d'éliminer poissons, alevins et crustacés) dans un château d'eau localisé sur le centre Ifremer Brest, stockée au maximum 24 heures et distribuée dans les différents laboratoires.

Les variations des paramètres physico-chimiques de l'eau de mer naturelle sur une année sont présentées dans le Tableau 9 :

Température (°C)	10-20
pH	8-8,3
Salinité (‰)	32-36
Conductivité (mS/cm)	32-45
Oxygène dissous (mol/L)	$3,4 \cdot 10^{-4} - 2,2 \cdot 10^{-4}$

Tableau 9 : Variations des paramètres physico-chimiques de l'eau de mer naturelle à Sainte-Anne du Portzic au cours des années 1975-1979 [122].

Selon Antoine [122], les paramètres physico-chimiques, cités dans le Tableau 1, sont relativement constants au cours des années 1975 à 1979.

1.3.2. L'eau de mer artificielle (EMA).

L'eau de mer artificielle est préparée selon la norme ASTM D1141-90. Deux solutions doivent être préalablement préparées en eau milliQ.

Solution 1 : MgCl₂, 6H₂O 555,6g/L
 CaCl₂ (anhydre) 57,9 g/L
 SrCl₂, 6H₂O 2,1 g/L

Solution 2 : KCl 69,5 g/L
 NaHCO₃ 20,1 g/L
 KBr 10,0 g/L
 H₃BO₃ 2,7 g/L
 NaF 0,3 g/L

A 245,34 g de NaCl et 40,94 g de Na₂SO₄ (anhydre) dissous dans 9 L d'eau distillée sont ajoutés 200 mL de la solution 1 et 100 mL de la solution 2 avant de compléter le volume à 10 L. Le pH est ajusté à 8,2 par addition de NaOH 0,1 M.

La solution est stérilisée par un autoclavage à 119°C pendant 20 minutes (le pH est contrôlé après stérilisation).

La composition finale de l'eau de mer artificielle ainsi préparée est donnée dans le Tableau 10.

<i>Composé</i>	<i>Concentration en g/L</i>	<i>Concentration en mol/L</i>
NaCl	24,53	$4,2 \cdot 10^{-1}$
MgCl ₂ , (6H ₂ O)	5,20	$2,5 \cdot 10^{-2}$
Na ₂ SO ₄	4,09	$2,9 \cdot 10^{-2}$
CaCl ₂ anhydre	1,15	$1 \cdot 10^{-2}$
KCl	0,695	$9 \cdot 10^{-3}$
NaHCO ₃	0,201	$2 \cdot 10^{-3}$
KBr	0,101	$8 \cdot 10^{-4}$
H ₃ BO ₃	0,027	$4 \cdot 10^{-4}$
SrCl ₂	0,025	$9 \cdot 10^{-5}$
NaF	0,003	$7 \cdot 10^{-5}$

Tableau 10 : Composition chimique de l'EMA selon la norme ASTM D1141-90.

La concentration finale en sels de l'eau de mer artificielle est de 36 g/L et sa force ionique est de 0,52 M.

1.3.3. Solutions salines.

Afin d'étudier l'effet des sels sur l'adsorption et la conformation des macromolécules organiques, cinq solutions de même force ionique que l'eau de mer artificielle sont réalisées en eau milliQ, les concentrations en calcium et en magnésium étant identiques à celles de l'eau de mer artificielle :

- NaCl : 36 g/L
- NaCl + CaCl₂ (anhydre) : 34,85 g/L + 1,15 g/L
- NaCl + MgCl₂,6H₂O : 30,8 g/L + 5,2 g/L
- NaCl + CaCl₂ (anhydre) : 33,17 g/L + 2,84 g/L où le nombre de moles de calcium est égal au nombre de moles de magnésium présentes en eau de mer artificielle
- NaCl + MgCl₂,6H₂O : 33,97 g/L + 2,03 g/L où le nombre de moles de magnésium est égal au nombre de moles de calcium présentes en eau de mer artificielle.

Le pH de ces solutions est ajusté à 8,2 à l'aide de NaOH ou de HCl 0,01M, puis les solutions sont stérilisées par un autoclavage de 20 minutes à 120°C avant utilisation (nous avons vérifié que le pH n'avait pas évolué après stérilisation).

1.4. Sélection des bactéries.

Afin de sélectionner les isolats bactériens pionniers adhérents les plus représentatifs, des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L, de PTFE et de verre sont immergés (après nettoyage selon le protocole défini § 1.1 du chapitre 2) horizontalement dans un bac d'eau de mer naturelle situé sur le môle à Sainte Anne du Portzic les 03 Novembre 1998 et 08 Novembre 1999.

Après 6 heures et 24 heures d'immersion les surfaces solides sont rincées par deux immersions dans une solution de NaCl 36g/L. Les bactéries adhérentes sont décrochées par écouvillonnage puis isolées, par Micromer, sur Marine Agar (Difco laboratories). Les bactéries hétérotrophes aérobies, anaérobies facultatives et anaérobies strictes, considérées comme prépondérantes, sont testées sur microplaques Biolog (tests biochimiques basés sur la capacité d'utilisation de sucres, d'acides aminés par les bactéries). Après construction du dendrogramme, un isolat par phénon est analysé sur galerie API 20NE (Api system) (tests biochimiques permettant une première caractérisation du genre bactérien).

La sélection et la caractérisation physico-chimique de deux isolats bactériens, la D01 et la D41, seront présentées dans le Chapitre 4. En plus de l'étude de ces deux isolats, nous avons tenu à étudier la souche productrice du *polA* : *Alteromonas macleodii* subsp *fijiensis*. Cette bactérie Gram négative, bactérie hétérotrophe et mésophile a été récupérée dans une faille hydrothermale à 2000 m de profondeur dans la région Fidji nord. [60].

2. Protocoles expérimentaux.

2.1. Protocole d'adsorption.

En milieu artificiel, l'adsorption est réalisée en immergeant les échantillons d'acier inoxydable AISI 316L, de verre ou de PTFE (échantillons suspendus verticalement à l'aide de crochets inox) dans les solutions salines sous une légère agitation de 250 tours/min. Un rapport constant surface/ volume de solution de 1 cm² pour 3,33 mL est maintenu pour toutes nos expérimentations. Après 5 min., 20 min., 40 min., 2 heures, 5 heures ou 24 heures les

échantillons sont rincés deux fois par immersion soit dans la même solution saline dépourvue de composés organiques, soit dans de l'eau milliQ.

Après séchage, le dosage d'espèces chimiques adsorbées est effectué selon la méthode de Bradford [123] pour les protéines et la méthode de Kamerling [124] pour les carbohydrates. Les analyses par infra-rouge et par spectroscopie de photoélectrons des échantillons préconditionnés sont effectuées au laboratoire de Physico-Chimie des Surfaces de l'ENSCP.

2.2. Protocoles de caractérisation microbiologique.

2.2.1. Coloration de Gram.

La coloration de Gram, qui permet de différencier les micro-organismes selon la structure de leur paroi, est la première étape d'identification bactérienne.

Expérimentalement, nous avons utilisé le test de coloration de Gram en plusieurs étapes, de Difco Laboratories selon le protocole suivant :

- effectuer un frottis,
- le fixer à la chaleur,
- recouvrir de Cristal violet (colorant) pendant 1 minute, puis rincer à l'eau milliQ,
- recouvrir de Iodine (mordant) pendant 1 minute, puis rincer à l'eau milliQ,
- décolorer à l'aide du décolorant pendant 40 secondes puis rincer à l'eau milliQ,
- contre-colorer à la Safranine pendant 40 secondes, puis rincer à l'eau milliQ.

Après séchage à l'air, les bactéries sont observées au microscope optique à l'aide d'un objectif à immersion. Une coloration rose indique que les bactéries sont Gram négatives, et une coloration violette qu'elles sont Gram positives.

2.2.2. Coloration de flagelles.

Des colorations de flagelles sont effectuées. Expérimentalement, un frottis non fixé à la chaleur est recouvert pendant 1 minute du colorant de flagelle (Difco Laboratories). Après rinçage des lames par de l'eau milliQ et séchage à l'air, les bactéries sont observées au microscope à l'aide d'un objectif à immersion. Les bactéries et leurs flagelles apparaissent en violet.

2.2.3. Courbes de croissances.

La croissance des isolats bactériens est effectuée en fermenteur (grand volume : 500 mL, bon échange gazeux) à 25°C sous une agitation de 250 tours/min. avec comme milieu nutritif le Marine Broth (Difco Laboratories). La croissance bactérienne au cours du temps est suivie par :

- mesure de densité optique (DO) à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Jenway 6400 par prélèvement de 1 mL de culture bactérienne toutes les ½ heures.
- dénombrement des bactéries viables cultivables en fonction du temps par prélèvement de 1 mL de culture bactérienne toutes les heures et étalement sur Marine Agar à la dilution appropriée.

A partir de ces résultats, nous avons déterminé le taux de croissance μ et le temps de génération T_g (temps de doublement d'une population), deux paramètres caractéristiques d'une souche bactérienne, d'un milieu nutritif et d'une température de croissance, comme décrit dans le chapitre 1 au paragraphe 3.2.

2.2.4. Préparation des suspensions bactériennes et des poudres bactériennes.

Les cinétiques d'adhésion et la caractérisation physico-chimique des bactéries sont effectuées à partir de suspensions ou de poudres bactériennes. Cependant, la présence d'exopolysaccharides, excrétés par les bactéries lors de la phase de culture, peut interférer avec les mesures de densité optique. Il est apparu nécessaire d'optimiser le mode de préparation des suspensions bactériennes afin de s'affranchir de ce problème. Les protocoles expérimentaux sont présentés ci-dessous :

- Les isolats bactériens, qui sont conservés en cryotubes (Marine Broth + 15% glycérol) à -80°C et à -20°C, sont régénérés par remise en suspension, après décongélation, dans 9 mL de Marine Broth (Difco laboratories).
- Après deux pré-cultures dans des tubes de Marine Broth de 24 heures chacune, un flacon contenant 99 mL de Marine Broth estensemencé par 1 mL de suspension bactérienne. La suspension est alors placée sous une agitation de 250 tours/min à 25°C pendant 24 heures pour les isolats D41 et DA et 17 heures pour l'isolat D01 (temps déterminés à partir des courbes de croissances et correspondant à la phase stationnaire de croissance).
- Les cultures bactériennes sont filtrées sur filtre GFC (Whatman) pour séparer les floes bactériens.

- Les cultures sont centrifugées (Sigma 3K15, rotor 12150-H) à 5000 g pendant 10 min. à 25°C.
- Après élimination du milieu de culture, les culots bactériens sont remis en suspension dans une solution de [NaCl]=36 g/L.
- Une seconde centrifugation est effectuée afin de « laver » les bactéries. Le protocole de Pembrey [94] préconise une centrifugation de 10 min. à 5000 g et à 25°C (protocole 1), alors que le protocole de Zheng [125] préconise une centrifugation de 30 min. à 11300 g et à 25°C (protocole 2). Ces deux protocoles seront étudiés.
- Après élimination du milieu de culture, les culot bactériens sont remis en suspension dans une solution de [NaCl]=36 g/L.
- La densité optique de la suspension bactérienne est ajustée à 0,8 à 400 nm, ce qui correspond approximativement à 10⁸ UFC/mL.

La reprise des culots bactériens dans une solution NaCl est seulement effectuée lors de la mise au point du protocole de préparation de la suspension d'essai.

Les suspensions bactériennes utilisées pour la caractérisation physico-chimique des isolats ou lors des expérimentations d'adhésion, sont effectuées en eau de mer artificielle stérile (lavages et suspension finale) afin d'être dans des conditions proches du milieu marin.

L'analyse des bactéries est effectuée par XPS et par infra-rouge. Pour cela, les bactéries sont préparées selon le protocole défini par Rouxhet [126]. Les suspensions bactériennes sont préparées avec le protocole 1 comme indiqué ci-dessus. Le culot bactérien récupéré après le dernier rinçage est resuspendu dans 2 mL d'eau de mer artificielle. La suspension est placée dans un tube en verre préalablement refroidi à -20°C ; puis le tube est immergé 15 minutes dans de l'azote liquide. Le tube contenant les bactéries congelées est placé dans le lyophilisateur (Christ alpha 1-2) pendant une nuit. Les poudres bactériennes sont ensuite conservées dans un dessiccateur avant analyse.

2.2.5. Viabilité des bactéries pionnières en eau de mer artificielle.

La viabilité des isolats en suspension dans l'eau de mer artificielle est étudiée en fonction du temps. Pour cela, une suspension bactérienne de chaque isolat est préparée comme indiqué dans le paragraphe précédent en eau de mer artificielle stérile et laissée à

température ambiante (25°C) pendant des temps allant de 0h à 168h. A différents temps de prélèvement, un dénombrement sur Marine Agar (Difco Laboratories) à la dilution appropriée est effectué afin de compter les bactéries viables cultivables.

2.2.6. Viabilité des bactéries pionnières en eau de mer artificielle contenant 20 mg/L de SAB ou de polA.

La viabilité des trois isolats bactériens en présence des molécules organiques est étudiée en fonction du temps. Pour cela, une suspension bactérienne de chaque isolat est préparée selon le protocole 1 du paragraphe 2.2.4. Le dernier culot bactérien est repris en eau de mer artificielle contenant soit 20 mg/L de SAB, soit 20 mg/L de polA et ajusté à 0,8 à 400 nm. Cette suspension est laissée à température ambiante (25°C) sous une légère agitation (250 tours/min) pendant 24 heures. A différents temps, un dénombrement sur Marine Agar (Difco Laboratories) à la dilution appropriée est effectué afin de compter les bactéries viables cultivables.

2.3. Protocole d'adhésion des bactéries sur des surface solides

2.3.1. Adhésion de bactéries en monoculture.

Les cinétiques d'adhésion sont effectuées sur des surfaces préconditionnées ou non par des macromolécules organiques selon le protocole décrit au paragraphe 2.1. Les supports solides sont alors mis en contact (horizontalement) avec une suspension bactérienne sous une légère agitation (250 tours/min.) dans des boîtes de pétri en gardant le rapport surface solide / volume de solution égal à 3,3 cm²/mL.

Les suspensions bactériennes sont préparées selon le protocole 1 présenté paragraphe 2.2.4, et la DO à 400 nm de la suspension bactérienne est ajustée à 0,8 ce qui correspond approximativement à une concentration de 10⁸ UFC/mL. Un dénombrement des bactéries viables cultivables est effectué sur Marine Agar (Difco Laboratories).

Après un temps de contact suspension bactérienne-surface solide de 2min., 20 min., 1h, 3h, 5h, 8h, 24h, 72h, 120h ou 168h, les surfaces sont rincées énergiquement dans trois bains successifs d'eau milliQ + NaCl (36g/L) afin d'éliminer les bactéries non adhérentes. Les bactéries viables cultivables adhérentes et totales adhérentes sont ensuite dénombrées.

Pour effectuer les analyses de surfaces par infra-rouge ou par XPS, les échantillons sont placés après rinçage dans un tube de verre préalablement refroidi dans un congélateur à

-20°C. Les tubes sont plongés dans de l'azote liquide pendant 15 min. afin de figer le film organique et le film bactérien créés en surface du matériau. Les échantillons sont ensuite placés dans le lyophilisateur et laissés une nuit afin d'éliminer l'eau adsorbée et l'eau contenue dans les cellules bactériennes. Les échantillons sont conservés dans un dessiccateur avant analyse.

2.3.2. Adhésion d'une communauté bactérienne.

Afin d'étudier les interactions pouvant exister entre plusieurs micro-organismes en suspension dans de l'eau de mer artificielle et leur conséquences sur l'adhésion, nous avons effectué des suspensions pluri-bactériennes.

Le protocole d'adhésion est similaire à celui présenté ci-dessus, les suspensions bactériennes des bactéries D01 et D41 sont préparées selon le protocole 1 du paragraphe 2.2.4 et la DO à 400 nm est ajustée à 0,8 en eau de mer artificielle. Les suspensions bactériennes sont ensuite mélangées en proportions 1:1 (v/v), correspondant approximativement à 2.10^8 UFC/mL. Après 30 min. de contact entre les bactéries et homogénéisation du mélange, le nombre de bactéries viables cultivables est déterminé sur Marine Agar (Difco laboratories).

Après 3 heures et 5 jours de contact suspension bactérienne–surface solide, les surfaces sont rincées dans trois bains successifs d'eau milliQ + NaCl (36g/L) et le dénombrement des bactéries viables cultivables et des bactéries totales est effectué comme indiqué dans le paragraphe précédent.

3. Méthodes d'analyses

3.1. Dosage chimique des espèces organiques adsorbées.

L'étude de l'adsorption des macromolécules organiques nécessite des dosages des espèces chimiques. Un dosage des macromolécules adsorbées sur l'échantillon n'étant pas possible sans décrochage de celles-ci, nous avons élaboré le protocole présenté ci-dessous et résumé sur la Figure 18.

Les macromolécules organiques adsorbées sont tout d'abord décrochées par ultrasons puis les solutions organiques sont concentrées par lyophilisation et récupération dans un volume plus petit. La présence de certains sels pouvant interférer avec la technique de dosage de Bradford [123], nous avons dialysé la solution organique.

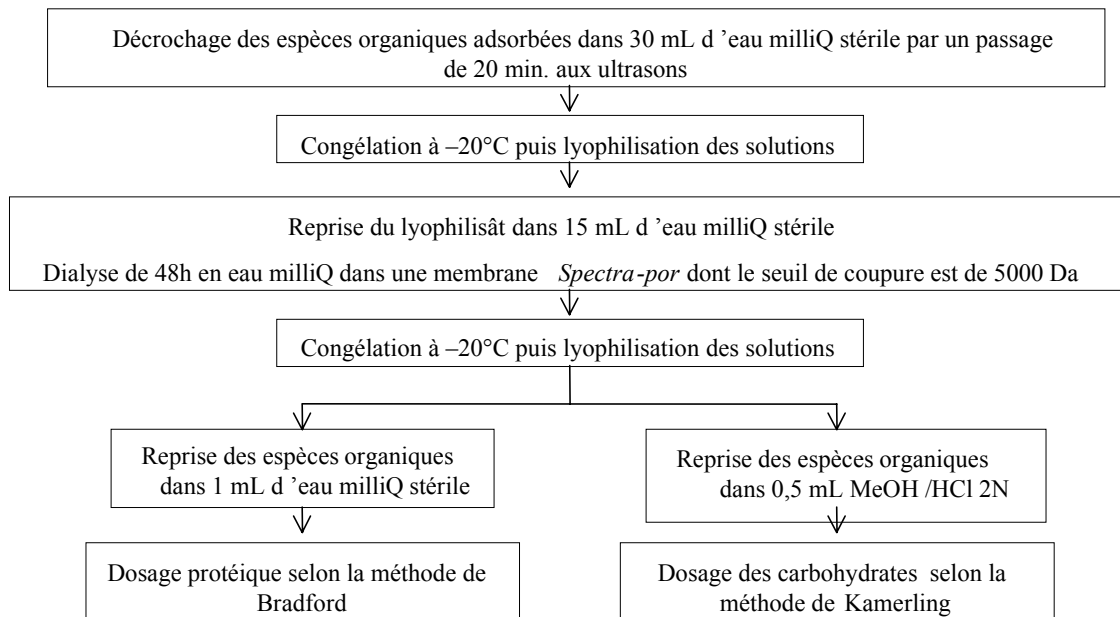


Figure 18 : Protocole de récupération / concentration des macromolécules organiques adsorbées.

3.1.1. Dosage protéique.

L'analyse quantitative des protéines, adsorbées sur les échantillons immergés en eau de mer artificielle contenant des protéines, puis récupérées selon le protocole établi ci-dessus, est effectuée selon la méthode de Bradford [123], technique couramment utilisée et sensible (détection possible entre 0,2 et 10 $\mu\text{g/mL}$). Cette méthode repose sur la complexation d'un colorant (le bleu de Coomassie) avec les groupements aromatiques et cationiques des acides aminés présents dans les protéines, provoquant une modification du spectre d'absorption (apparition d'une bande intense à 595 nm).

Dans un premier temps, une courbe de calibration entre 0 et 10 $\mu\text{g/mL}$ est réalisée en eau milliQ à partir d'une ampoule de SAB de concentration standard (Sigma, France). Expérimentalement, à 1 mL de solution à doser, 1 mL de réactif de Bradford est ajouté. La lecture de DO a lieu à 595 nm après avoir vortexé les tubes (la coloration est stable entre 5 et 60 min.). Ainsi, à partir des courbes de calibration, la quantité de protéines peut être calculée.

3.1.2. Analyse des résidus glycosidiques par chromatographie en phase gazeuse.

L'analyse qualitative et quantitative des carbohydrates, adsorbés sur les échantillons immergés en eau de mer artificielle contenant des polymères puis récupérés selon le protocole établi précédemment, est faite selon la méthode de Kamerling *et al.* [124] modifiée par

Montreuil *et al.* [127]. Pour cela, les polysaccharides présents subissent une méthanolyse qui libère les résidus glycosidiques. Ils sont identifiés et dosés sous forme de méthylglycosides N-acétylés O-triméthylsilylés par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Le dosage est rendu possible par l'ajout en début d'analyse de 20 µg d'étalon interne (myoinositol).

Expérimentalement, le lyophilisât est repris dans 500 µL de méthanol/HCl 2N. La suspension est alors portée à 100°C dans un bain à sec pendant 4 heures. Après refroidissement du méthanolysât, le pH est ajusté à 7 à l'aide de carbonate d'argent, puis on ajoute 50 µL d'anhydride acétique. Le mélange est alors laissé une nuit à l'obscurité. Le chlorure d'argent formé pendant la nuit est éliminé à l'aide d'une centrifugation de 5 min. à 3000 tours/min. Le surnageant est ramené à sec sous jet d'azote. Les résidus glycosidiques sont alors repris dans 50 µL de pyridine et 50 µL de sylon, et laissés 2 heures à température ambiante. Après évaporation sous jet d'azote, les méthylglycosides triméthylsilylés sont repris dans 500 µL de dichlorométhane et séparés par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne capillaire en silice fondue CP-SIL 5CB Chrompack (longueur : 50m ; diamètre interne : 0,25 mm et épaisseur de film : 0,27 µm) selon le protocole de montée en température suivant : 50°C maintenus pendant 1 minute, puis un gradient de 20°C/minutes jusqu'à 120°C, suivi d'un gradient de 2°C/minutes jusqu'à 240°C.

Les oses sont identifiés à l'aide de leur temps de rétention relatifs, présentés dans le Tableau 11, à partir de spectres de monosaccharides. Le spectre d'un monosaccharide est composé de plusieurs pics dont les temps de rétention relatifs sont présentés dans le Tableau 11.

La concentration de chaque ose est déterminée d'après l'aire totale sachant que l'aire de l'étalon interne correspond à 20 µg et en tenant compte du coefficient de rétention de chaque ose sur la colonne utilisée (ce coefficient a été déterminé précédemment en analysant des monosaccharides connus).

<i>sucre</i>	<i>coefficient de rétention</i>	<i>temps de rétention relatif</i>
Arabinose	0,77	0,43/0,44/0,47
Fucose	0,55	0,46/0,48/0,51
Galactose	0,81	0,67/0,71/0,71/0,74
Glucose	0,79	0,76/0,79
Mannose	0,79	0,67/0,70
Rhamnose	0,49	0,46/0,47
Ribose	0,73	0,45/0,46
Xylose	0,75	0,53/0,55
NGal	0,42	0,87/0,93
NGlc	0,5	0,86/0,91/0,96
Ac Gal	0,54	0,62/0,66/0,72/0,73
Ac-Glc	0,79	0,77/0,78

Tableau 11 : Coefficients de rétention et temps de rétention de quelques monosaccharides sur la colonne de chromatographie utilisée (NGal : N-acétyl Galactosamine, NGlc : N-acétyl Glucosamine, Ac : acide).

3.2. La spectroscopie infra-rouge.

La spectroscopie infra-rouge, technique basée sur l'absorption d'une radiation à une fréquence correspondant aux transitions entre différents états vibrationnels, permet l'identification de groupements moléculaires.

Au cours de notre étude, trois modes d'analyse par spectroscopie infra-rouge sont utilisés selon la nature du substrat à analyser :

- les poudres (bactéries ou macromolécules organiques) sont analysées par infra-rouge en transmission (pastille de KBr) ou en réflexion totale atténuée (ATR pour Attenuated Total Reflectance).
- Les échantillons d'acier inoxydable après adsorption de macromolécules ou adhésion de bactéries sont analysés par infra-rouge en réflexion spéculaire (FT-IRRAS).

Le principe et la procédure pour ces trois modes d'analyse sont maintenant détaillés.

3.2.1. L'analyse Infra-rouge par Transmission.

Des pastilles de KBr incluant le matériel à analyser sont formées en broyant 220 mg de KBr avec 1 mg de poudre bactérienne jusqu'à obtention d'une poudre ayant la consistance d'une farine. La poudre est alors pressée à 10 tonnes pendant 10 minutes. La pastille ainsi

formée est analysée en moyennant les signaux accumulés sur 20 scans à une résolution de 4 cm^{-1} , en utilisant un spectromètre Bowmem et un détecteur Mercure Cadmium Tellure (MCT) refroidi à l'azote liquide. L'échantillon à analyser est alors placé entre deux fenêtres de transmission à l'aide d'un portoir. Chaque spectre est enregistré par rapport à un spectre de référence qui correspond au portoir nu (sans pastille).

3.2.2. L'analyse infra-rouge de surface par réflexion, IRRAS.

La spectroscopie infra-rouge par réflexion – absorption est basée sur le principe de réflexion du champ électrique à la surface d'un métal et mesure l'absorption d'un faisceau infrarouge par une couche moléculaire présente en surface, Figure 19. Le champ électrique en surface comporte deux composantes :

- E_s , composante perpendiculaire au plan d'incidence ; la résultante après réflexion est proche de zéro quel que soit l'angle d'incidence.
- E_p , composante dans le plan d'incidence, elle même dissociée en $E_{p\perp}$ (perpendiculaire à la surface) et $E_{p\parallel}$ (parallèle à la surface). La résultante après réflexion de $E_{p\perp}$ est maximale à angle d'incidence élevé, c'est à dire à angle rasant (entre 80 et 90°), celle de $E_{p\parallel}$ étant très faible.

Il en résulte les points suivants :

- dans le cas des substrats métalliques, l'interaction d'un champ électromagnétique avec le dipôle oscillant d'un mode normal de vibration va donner lieu à une absorption infra-rouge, seulement si ce mode a une composante perpendiculaire à la surface.
- la sensibilité de cette technique de surface est maximale à angle rasant.

Cette sensibilité de la technique IRRAS permet d'observer des fractions de monocouche de surface. Les informations spécifiques susceptibles d'être obtenues par cette technique sont les suivantes : caractérisation des groupements chimiques à la surface métallique, orientation des espèces adsorbées, ordre dans la couche, et dans certains cas, nature des interactions absorbant-absorbant et absorbant-substrat.

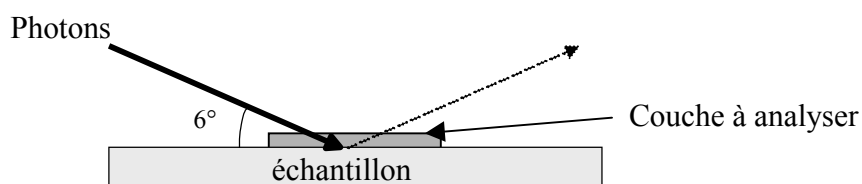


Figure 19 : Principe de l'analyse IRRAS.

Les surfaces réfléchissantes sont analysées à angle rasant (6°) à l'aide d'un spectromètre infra rouge à transformée de Fourier Magna IR 550 (Nicolet, France) et d'un détecteur MCT refroidi à l'azote liquide. Les spectres sont obtenus en moyennant les signaux accumulés sur 600 scans à une résolution de 4 cm^{-1} , chaque spectre étant enregistré par rapport à un spectre de référence (surface polie et nettoyée selon le protocole décrit en 1.1). La bande amide I, caractéristique des liaisons peptidiques de la protéine, est ensuite déconvoluée en utilisant le module "peak fitting" du logiciel "Origin" afin de caractériser la conformation des protéines adsorbées.

3.2.3. L'analyse infra-rouge de surface par Réflexion Totale Atténuée (Attenuated Total Reflectance : ATR).

Cette technique est basée sur les indices de réflectivité élevés de certains cristaux tels que le Ge, le ZnSe ou le Si. La lumière est réfléchiée N fois sur les deux faces du cristal (le nombre N dépend de l'angle θ d'incidence entre la lumière et le cristal, de l'épaisseur W du cristal et de la longueur L du cristal ATR selon l'équation $N = L/W \cos\theta$). A chaque réflexion l'onde évanescente pénètre les couches à analyser, et une partie de la lumière correspondant aux modes vibratoires des molécules rencontrées est adsorbée. La résultante est modifiée aux fréquences d'absorption des groupements fonctionnels présents dans la couche à analyser. Cette technique est adaptée à l'étude de poudres ou de matériaux tels que les films épais ($1\text{ }\mu\text{m}$). Ceux-ci doivent être en contact intime avec le cristal car l'intensité de l'onde évanescente décroît avec la distance (Figure 20).

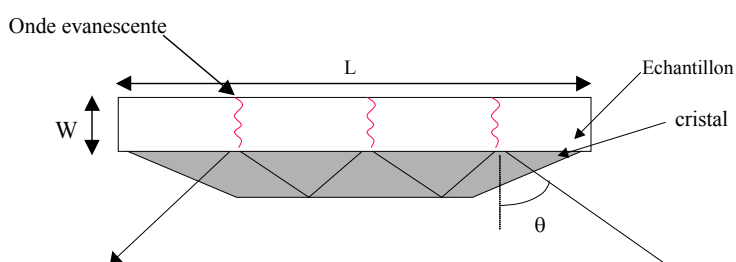


Figure 20 : Principe de l'analyse ATR.

Les poudres sont analysées à l'aide d'un spectromètre infra-rouge à transformée de Fourier Magna IR 550 (Nicolet, France) couplé à un détecteur MCT refroidi à l'azote liquide. L'accessoire "ATR" est placé dans le compartiment échantillon. Les spectres sont obtenus en moyennant les signaux accumulés sur 100 scans à une résolution de 4 cm^{-1} , chaque spectre étant enregistré par rapport à un spectre de référence (cristal plan de ZnSe propre).

3.3. La Spectroscopie de photoélectrons induite par rayons X, XPS.

La spectroscopie XPS, encore nommée ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical analysis) est une méthode d'analyse de surface qui utilise un flux de photons X d'énergie déterminée. La surface à analyser est irradiée par ce flux de photons X, dont l'énergie $h\nu$ dépend de l'anticathode utilisée (Mg ou Al). Si cette énergie est suffisante, ces photons peuvent arracher des électrons de niveaux de cœur des atomes présents dans les couches superficielles. Ces électrons éjectés possèdent une énergie cinétique qui dépend de l'énergie de liaison du niveau de cœur par la relation suivante :

$$h\nu = E_L + E_c + \Phi \quad \text{Eq 3}$$

$h\nu$: énergie du photon incident

E_L : énergie de liaison de l'électron

E_c : énergie cinétique de l'électron mesurée par le spectromètre

Φ : travail de sortie des électrons du spectromètre (ici égal à 3,95 eV)

Pour chaque atome, l'énergie de liaison d'un électron de niveau de cœur est caractéristique de son niveau d'énergie et de son état chimique (les atomes en établissant des liaisons et en échangeant des électrons de valence perturbent les niveaux d'énergie des électrons de cœur, permettant de déterminer dans quel type de liaison ils sont impliqués).

Les surfaces sont analysées à l'aide d'un spectromètre VG ESCALAB Mark II avec comme source de rayons X Al $K\alpha$ (1486,6 eV). La pression régnant dans la chambre d'analyse est de 10^{-9} mbar. Un spectre complet est enregistré sur un large domaine d'énergie (20 à 1200 eV) afin d'identifier les éléments présents en surface. Des spectres à haute résolution sont ensuite effectués dans les régions correspondant aux pics principaux des éléments identifiés (leur énergie de liaison est fournie dans le Tableau 12) :

- Fe $2p_{3/2}$, Cr $2p_{3/2}$, Ni $2p_{3/2}$, O 1s (éléments de la surface solide),
- C 1s, N 1s, O 1s (éléments constituant le composé organique),
- Na 1s, Cl $2p_{3/2}$, Ca $2p_{3/2}$, Mg KLL (éléments provenant de la solution).

Les mesures sont effectuées à 90° et à 45° (angle entre l'analyseur et la surface de l'échantillon), afin d'obtenir des informations sur la stratification éventuelle des éléments au sein de la couche de surface. Les spectres ainsi obtenus sont traités (soustraction des pics satellites, soustraction du bruit de fond selon la méthode de Shirley) et déconvolués afin d'obtenir les différentes composantes chimiques de l'élément. L'aire normalisée, qui permet

une comparaison des concentrations en surface de chaque élément, est obtenue à partir de l'équation :

$$\text{aire normalisée} = \text{aire du pic} / (Y * T_x * \lambda) \quad \text{Eq 4}$$

où Y correspond au facteur de Scofield (valeurs données dans le Tableau 12), T_x au facteur de transmission du spectromètre et λ au libre parcours moyen des électrons. Nous avons présenté cette aire dans la suite du document en estimant, en première approximation, que $T_x * \lambda = 1$.

	<i>Énergie de liaison (eV)</i>	<i>Y</i>
C _{1s}	285-290	1,00
N _{1s}	400-401	1,80
O _{1s}	530-535	2,93
Na _{1s}	1070-7072	8,52
Cl _{2p3/2}	200	1,51
Ca _{2p3}	350-352	3,35
Mg _{KLL}	305-310	0,27
P _{2p}	125-135	1,19
S _{2p}	160-175	1,68
Cr _{2p3/2}	570-584	7,69
Fe _{2p3/2}	700-718	10,82

Tableau 12 : Energies de liaison et valeurs des facteurs de Scofield des éléments chimiques observées pour chaque niveau électronique considéré.

3.4. Adhésion Microbienne aux solvants (Microbial Adhesion to Solvents : MATS).

Le caractère hydrophobe/hydrophile, acide/base au sens de Lewis des bactéries peut être déterminé à l'aide de la MATS, méthode mise au point par Bellon-Fontaine *et al.* [68]. Cette méthode repose sur l'affinité des micro-organismes pour différents solvants de propriétés physico-chimiques connues (Tableau 13) : un solvant monopolaire acide : le chloroforme, un solvant monopolaire basique : l'acétate d'éthyle, et deux solvants apolaires : le décane et l'hexadécane.

	γ_L^{LW}	γ_L^+	γ_L^-
Chloroforme	27,2	3,8	0
Acétate d'éthyle	23,9	0	19,4
Décane	23,9	0	0
Hexadécane	27,7	0	0

Tableau 13 : Caractéristiques énergétiques (mN/m) des solvants utilisés pour la MATS selon Bellon-Fontaine et al. [68] (γ_L^{LW} composante de Lifshitz van der Waals, γ_L^+ composante électron-accepteur et γ_L^- composante électron-donneur).

Ainsi, la différence d'affinité entre le chloroforme (solvant monopolaire acide) et l'hexadécane (solvant apolaire) nous renseigne sur le caractère électron-donneur d'une souche bactérienne, puisque les composantes de Van der Waals des deux solvants étant identiques. De même, la différence d'affinité entre l'acétate d'éthyle (solvant monopolaire basique) et le décane (solvant apolaire) nous renseigne sur le caractère électron-accepteur de cette même souche bactérienne, les composantes de Van der Waals des deux solvants étant identiques. L'estimation des caractéristiques électron-donneur et électron-accepteur ainsi que l'affinité pour les solvants apolaires nous permet de déduire le caractère hydrophile/hydrophobe de la souche.

Expérimentalement, à 2,4 mL de suspension bactérienne, préparée selon le paragraphe 2.2.4 et dont la densité optique à 400 nm est ajustée initialement à 0,8 (D_i), est ajouté 0,4 mL de solvant. L'ensemble est vortexé pendant 2 min. de façon à obtenir une émulsion. Les deux phases sont séparées par une décantation de 15 min. La phase aqueuse est alors prélevée et une mesure de la densité optique à 400nm à l'aide d'un spectrophotomètre Jenway 6400 ou un comptage des bactéries totales par microscopie en cellule de Mallassez sont effectués. Le pourcentage d'adhésion au solvant est alors donné par la relation suivante :

$$A (\%) = \frac{(D_i - D_f)}{D_i} \times 100 \quad \text{Eq 5}$$

Dans le cas d'une mesure de densité optique, D_i représente la densité optique initiale, et D_f représente la densité optique de la phase aqueuse après décantation. Dans le cas d'un dénombrement en cellule de Mallassez, D_i représente le nombre de bactéries introduites initialement et D_f le nombre de bactéries dénombrées après décantation.

3.5. Comparaison des techniques de surface.

L'infra-rouge, l'XPS et la MATS sont trois techniques de caractérisation de surface donnant des informations différentes et complémentaires. Le Tableau 14 résume les caractéristiques des techniques utilisées dans cette étude.

	Profondeur d'analyse (nm)	Taille du point d'analyse(μm)	Sensibilité	Etat des échantillons
IRRAS	< 1000	5000 \times 1000	Equivalent d'une monocouche	sec
ATR	1000		Equivalent d'une monocouche	poudre
XPS	5-10	2000 \times 6000	Fraction d'une monocouche	sec
MATS	< 5	cellule bactérienne	cellule bactérienne	Suspension liquide

Tableau 14 : Caractéristiques des techniques de physico-chimie des surfaces utilisées dans cette étude.

Pour l'analyse des échantillons d'acier inoxydable nus, préconditionnés par un film primaire ou recouvert par un film bactérien, l'IRRAS et l'XPS sont utilisés. L'XPS permet l'analyse de l'extrême surface des échantillons (la profondeur d'analyse étant faible) et apporte des renseignements sur la composition de surface, sur l'état d'oxydation et d'hydroxylation du substrat, sur le taux de recouvrement et sur la stratification d'une couche organique adsorbée sur un échantillon métallique ; cette technique est utilisée sous ultra-vide, ceci pouvant provoquer une modification du film adsorbé et un décrochage des macromolécules adsorbées [128]. L'IRRAS permet l'analyse d'une monocouche ou d'une multicouche organique adsorbée sur un échantillon (la profondeur d'analyse étant de l'ordre du μm) et nous fournit des informations sur la quantité de matière présente en surface, sur les groupements impliqués dans l'adsorption et sur l'orientation des groupements chimiques des molécules adsorbées.

Les analyses bactériennes sont effectuées par infra-rouge, XPS et MATS. Les commentaires effectués ci-dessus pour l'XPS sont aussi valables pour ce type d'analyse ; l'analyse étant effectuée sur des poudres bactériennes. L'ATR est aussi réalisé sur les poudres bactériennes et fournit des informations sur les groupements chimiques composant la

bactérie ; la totalité de la cellule bactérienne étant analysée. La MATS est réalisée sur des bactéries en suspension dans de l'eau de mer artificielle et fournit des informations globales sur les caractéristiques acido-basiques au sens de Lewis d'extrême surface de la cellule bactérienne, cette technique ne permettant pas de mettre en évidence l'hétérogénéité de surface bactérienne.

Seule une utilisation combinée de ces techniques, tout en tenant compte des limites de chacune devrait nous permettre de mieux comprendre les interactions entre les micro-organismes et les substrats.

4. Techniques de dénombrement.

4.1. Dénombrement des bactéries viables cultivables.

Le dénombrement des bactéries viables cultivables adhérentes est effectué par étalement sur milieu gélosé (Marine Agar) de 100 µL de suspension bactérienne obtenue par décrochage des bactéries par 2 min. d'ultrasons dans un tube contenant 3 mL d'une solution de NaCl (36g/L) et dilution jusqu'à la concentration appropriée. La limite de détection de cette technique est de l'ordre de 5 UFC/cm², compte tenu du facteur de dilution effectué pour décrocher les bactéries.

4.2. Dénombrement des bactéries totales.

Le dénombrement des bactéries totales adhérentes est effectué par épifluorescence. Pour cela, après rinçage, les échantillons sont placés dans de l'eau de mer artificielle contenant 2,5 % de formaldéhyde (stérilisé par une filtration à 0,2 µm). Les surfaces sont alors placées au réfrigérateur jusqu'à analyse. Avant coloration, les échantillons subissent un dessalage. Les échantillons sont immergés dans des bains successifs de salinité décroissante (25% eau milliQ/75% eau de mer artificielle ; 50% eau milliQ/50% eau de mer artificielle ; 100% eau milliQ) pendant 10 min. chacun. Les échantillons sont ensuite plongés dans une solution d'acridine orange à 0,01% (m/v) pendant 5 min. puis rincées deux fois par trempage en eau milliQ. Les échantillons sont ensuite observés sous lumière UV à l'aide d'un microscope Olympus et d'un objectif à immersion (grossissement 100). La limite de détection de cette technique est de 10³ bactéries /cm².

Ces deux techniques de dénombrement nous permettront d'étudier :

- l'effet substratum dépendant de l'adhésion de trois isolats (D01, D41 et DA), sur des échantillons de verre, d'acier inoxydable AISI 316L et de PTFE,
- l'effet d'un préconditionnement des échantillons par des molécules organiques sur le nombre de bactéries adhérentes et sur leur viabilité.

4.3. Observation et dénombrement des bactéries adhérentes par microscopie électronique à balayage (micromer).

Après rinçage, les échantillons sont placés dans de l'eau de mer artificielle contenant 2,5 % de glutaraldéhyde (stérilisé par une filtration à 0,2 µm). Les échantillons sont alors placés au réfrigérateur jusqu'à analyse. Avant coloration, les échantillons subissent un dessalage. Les échantillons sont immergés dans des bains successifs de salinité décroissante (25% eau milliQ/75% eau de mer artificielle ; 50% eau milliQ/50% eau de mer artificielle ; 100% eau milliQ) pendant 10 min. chacun. Pour éviter la destruction des cellules, la déshydratation de l'échantillon, nécessaire avant l'analyse est réalisée en plongeant l'échantillon dans plusieurs bains successifs dont le degré en éthanol augmente (70% eau milliQ/30% éthanol, 50% eau milliQ/50% éthanol, 30% eau milliQ/70% éthanol, 10% eau milliQ/90% éthanol, 100% éthanol). Les échantillons sont ensuite métallisés par une fine couche d'or (200-300Å). L'observation est effectuée sur un microscope électronique à balayage

Hitachi S-3200N à la faculté des sciences de Brest/UBO.

Cette technique nous permettra de mettre en évidence la production ou non d'exopolymères par les bactéries au moment de l'adhésion ainsi que les taux de recouvrement des échantillons d'acier inoxydable par les bactéries (limite de détection de 10^4 bactéries/cm²).

CHAPITRE 3 : LE FILM PRIMAIRE : ELABORATION ET CARACTERISATION.

La première étape d'une étude visant à la compréhension des interactions entre les bactéries et un matériau solide est la caractérisation de chacun de ces éléments, le micro-organisme et la surface du matériau. Comme indiqué dans le chapitre 1, le groupe BASIS a montré que le film primaire formé en eau de mer naturelle à Brest est constitué majoritairement de protéines et de carbohydrates. A partir de cette observation, nous avons cherché à élaborer un film primaire modèle par adsorption d'une protéine et d'un polysaccharide sur des échantillons de verre, d'acier inoxydable AISI 316L et de PTFE. Après 24h d'immersion, les surfaces sont caractérisées à l'aide de techniques d'analyse physico-chimiques (infra-rouge, et XPS) et les macromolécules adsorbées sont dosées grâce à des méthodes biochimiques (dosage des protéines selon Bradford et des carbohydrates selon Kamerling).

1. Elaboration d'un film primaire modèle en eau de mer artificielle.

Une étude menée dans le service Matériaux et Structure de l'Ifremer Brest a montré que la composition d'un film primaire sur une surface solide en eau de mer naturelle varie d'une saison à l'autre. Les quantités de carbohydrates adsorbées sur un échantillon d'acier inoxydable immergé 24h en eau de mer naturelle varient entre 0,007 et 40,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, les plus fortes quantités étant retrouvées pendant la période du bloom (avril-juin). Les quantités de protéines adsorbées sur un échantillon d'acier inoxydable immergé 24h en eau de mer varient entre 0,03 et 0,12 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, sans évolution logique en fonction des saisons. Ces variations saisonnières ne permettent donc pas d'obtenir un film organique reproductible tout au long de notre étude.

Afin d'élaborer un film primaire reproductible et proche de celui formé en eau de mer naturelle, nous avons choisi l'eau de mer artificielle (EMA), contenant une protéine et un carbohydrate, comme milieu dans lequel seront immergés les échantillons. La protéine choisie est la Sérum Albumine Bovine (SAB) sur laquelle un grand nombre d'études ont déjà été effectuées et qui peut être achetée sous une forme très purifiée (fraction V, Sigma France). Le carbohydrate sélectionné est le polymère sécrété par une bactérie marine : *Alteromonas*

macleodii subsp fijiensis, et dénommé ici polA. Ces deux macromolécules sont dissoutes en eau de mer artificielle à des concentrations totales proches des valeurs observées en eau de mer naturelle : 20 mg/L (rappelons que la concentration en matière organique dissoute en eau de mer naturelle est comprise entre 1 et 20 mg/L [13]).

La procédure expérimentale est la suivante : des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L, de PTFE et de verre sont immergés dans des solutions de SAB, de PolA ou d'un mélange 50% SAB-50%PolA (on nommera ce mélange "mix" dans la suite du manuscrit) dont la concentration totale est de 20 mg/L (0,0002% m/v). Après adsorption, les échantillons sont rincés en eau de mer artificielle, séchés à l'air comprimé puis analysés par IRRAS et par XPS. Un dosage des macromolécules est aussi effectué, dosage des protéines selon Bradford [123] et des carbohydrates selon Kamerling [124]. Des analyses infra-rouge ont au préalable été effectuées sur les produits purs.

1.1. Analyses par infra-rouge.

1.1.1. Analyse infra-rouge des poudres de SAB et de polA.

Ces analyses préliminaires nous permettent d'identifier les signaux caractérisant la SAB et le polA lorsqu'ils sont à l'état de poudres pures. Des spectres infra-rouge obtenus en mode "ATR" sont enregistrés entre 4000 et 800 cm^{-1} (Figures 21).

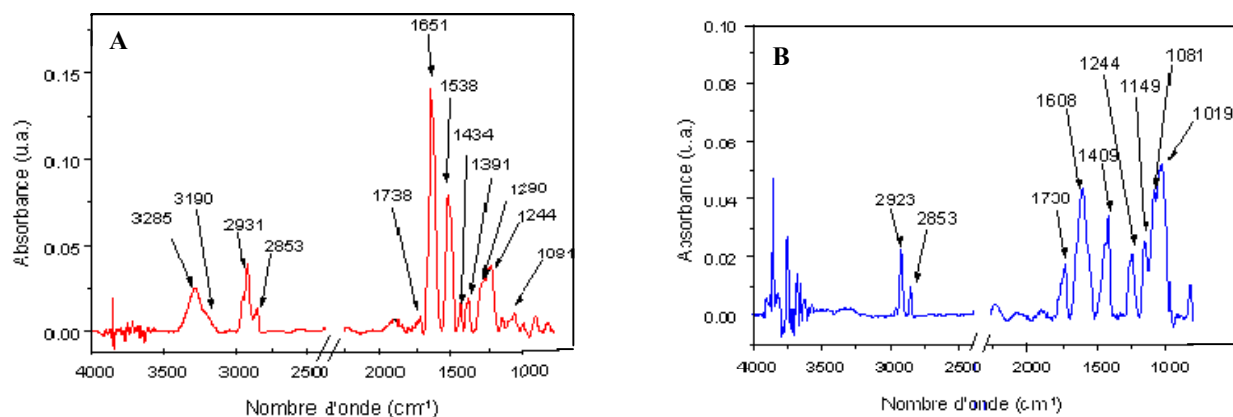


Figure 21 : Spectres infra-rouge des poudres de SAB (A) et de polA (B).

Les spectres infra-rouge de la SAB et du polA présentent quelques différences montrant que des groupements chimiques sont propres à l'un ou à l'autre des composés. Les bandes fines situées entre 3900 et 3600 cm^{-1} sont celles de la vapeur d'eau présente sur le chemin optique.

Les attributions de chaque pic à des groupements chimiques sont données dans le Tableau 15

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Attributions et Groupements chimiques de la SAB	Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Attributions et Groupements chimique du polA
3285	vNH, amine ou amides associées.	2923	v _{asym} CH de CH ₂
3190	vNH, amine primaire	2853	v _{sym} CH de CH ₂
2931	v _{asym} CH de CH ₂	1738	vC=O, acide
2853	v _{sym} CH de CH ₂	1608	v _{asym} COO ⁻ , acide carboxylique déprotoné.
1738	vC=O, acide	1409	v _{sym} COO ⁻ , acide carboxylique déprotoné.
1651	vC=O, amide I	1244	δ _{asym} CH ₃
1538	δNH et vCN, amide II	1149	vCO, COH et COC
1434	δ _{sym} CH, CH ₂	1081	
1391	v _{sym} COO ⁻ , acide carboxylique déprotoné	1019	
1290	vCN, amide III		
1244	δ _{asym} CH ₃		
1000-1100	vCO, COH et COC		

Tableau 15 : Attributions des pics à des groupements chimiques caractéristiques de la SAB et du polA.

Nous retiendrons, après analyse des poudres de chacune des espèces organiques les différences suivantes :

- les signaux infra-rouge caractéristiques de la SAB sont : une large bande centrée à 3285 cm⁻¹ attribuée aux fonctions amines, et deux bandes intenses centrées à 1650 et 1540 cm⁻¹ attribuées à la liaison peptidique.
- les signaux infra-rouge caractéristiques du polA sont : une bande centrée à 1738 cm⁻¹ attribuée à un acide carboxylique protoné, deux bandes centrées à 1610 et 1410 cm⁻¹ attribuées aux fonctions acides déprotonées (COO⁻) et un

massif constitué de bandes intenses entre 1150 et 1000 cm^{-1} attribuées aux fonctions alcools ou esters.

La position et l'intensité de ces bandes caractéristiques devraient nous permettre de différencier les deux composés organiques, lorsqu'ils sont présents sur une surface après immersion dans un mélange.

1.1.2. Analyses IRRAS des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L après immersion dans des solutions de SAB, de polA et d'un mélange des deux dissous en EMA.

Après 24h d'immersion des échantillons de d'acier inoxydable AISI 316L dans des solutions de SAB, de polA ou d'un mélange de ces deux composés organiques dissous en eau de mer artificielle (la concentration totale est de 20 mg/L), et rinçage en eau de mer artificielle, les échantillons sont analysés par IRRAS. Les spectres obtenus sont présentés sur la Figure 22.

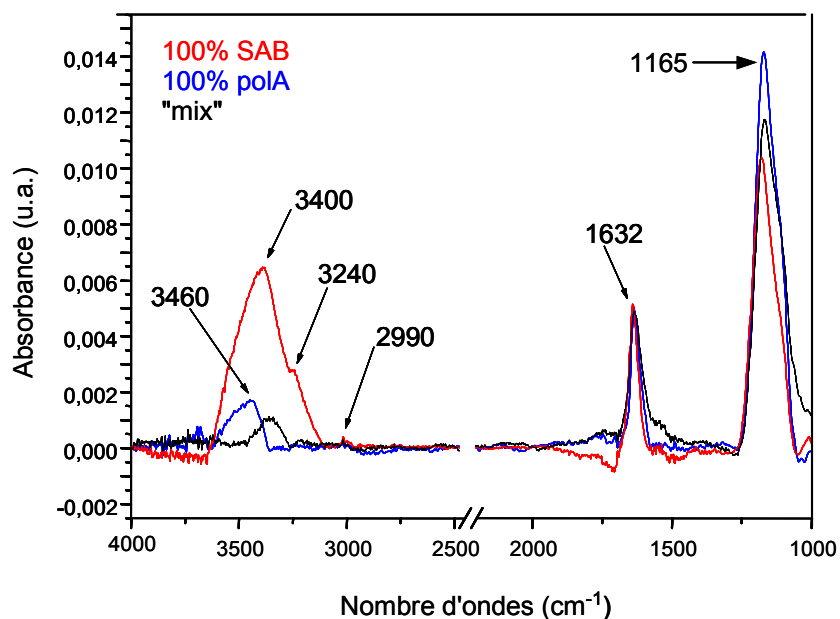


Figure 22 : Spectres IRRAS d'échantillons d'acier inoxydable AISI 316L après une immersion de 24h en eau de mer artificielle contenant 20 mg/L de polA, de SAB et du "mix" et rinçage en eau de mer artificielle.

Après immersion dans une solution de SAB, deux bandes caractéristiques de la protéine centrées à 3400 cm^{-1} et à 1632 cm^{-1} sont présentes. Notons que les variations de fréquences par rapport aux échantillons purs sont dues aux différents modes d'analyses et aux possibles changements conformationnels des molécules. Le massif très intense situé entre 1250

et 1050 cm^{-1} peut être attribué aux groupements COH, COC également présents dans la protéine, et à des groupements sulfates, ces derniers provenant de la solution. Pour la suite de notre étude, le suivi de l'adsorption de la SAB sur des surfaces solides sera effectué à partir de la bande amide I (les bandes amide I et II sont fréquemment considérées pour étudier l'adsorption et la conformation des protéines sur des surfaces par infra-rouge [32, 129-132]).

Après immersion dans une solution de polA, les bandes caractéristiques du carbohydrate centrées à 1165 cm^{-1} et à 1632 cm^{-1} sont présentes (variation de fréquence de cette bande pour les mêmes raisons qu'après immersion dans une solution de SAB). Nous pouvons noter la disparition de la bande centrée à 1738 cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$, d'un acide carboxylique) indiquant que toutes les fonctions acides du polymère sont déprotonées. La bande située entre 3700 et 3200 cm^{-1} est attribuée à l'existence de fonctions alcools, certaines liées entre elles par des liaisons H. Nous avons utilisé la bande des groupements carboxylates centrée à 1630 cm^{-1} pour suivre l'adsorption du polA sur les surfaces solides.

Après adsorption du mélange constitué de protéines et de carbohydrates, le spectre IRRAS présente un massif situé entre à 3500 et 3200 cm^{-1} attribué aux fonctions amines ou aux fonctions alcools liées par une liaison H ; une bande centrée à 1630 cm^{-1} pouvant aussi bien être attribuée au $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$ d'une fonction carboxylate qu'à la bande amide I d'une liaison peptidique et un massif intense et large centré à 1165 cm^{-1} attribué à des groupements COH, COC et sulfates provenant de l'eau de mer artificielle. Notons que le massif centré à 3240 cm^{-1} est de faible intensité par rapport à celui de la protéine seule et que la bande centrée à 1165 cm^{-1} est large et d'intensité intermédiaire à celle des deux macromolécules pures. Ceci semble indiquer que le film formé dans ces conditions est constitué majoritairement de carbohydrates.

Néanmoins, malgré quelques différences d'intensité relative entre les bandes des deux composés organiques adsorbés, il sera difficile de les différencier.

1.1.3. Cinétiques d'adsorption des macromolécules organiques sur un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L.

Les cinétiques d'adsorption (de 5 minutes à 24 h) de la SAB et du polA sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L immergés en eau de mer artificielle et rincés en eau de mer artificielle sont étudiées afin de déterminer le temps nécessaire pour atteindre le plateau d'adsorption. Des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L, nettoyés selon le protocole défini chapitre 2 paragraphe 1.3.1, sont immergés dans des solutions d'eau de mer

artificielle stérile contenant soit uniquement des protéines (solution 100% SAB), soit uniquement des carbohydrates (solution 100% polA), soit un mélange protéine - carbohydrate (solution 50% SAB / 50% polA). Après un rinçage en eau de mer artificielle stérile dénuée de tout composé organique et séchage sous air comprimé, les surfaces sont analysées par IRRAS. L'aire de la bande centrée à 1630 cm^{-1} caractérisant la SAB ou le polA est portée en fonction du temps d'immersion sur la Figure 23.

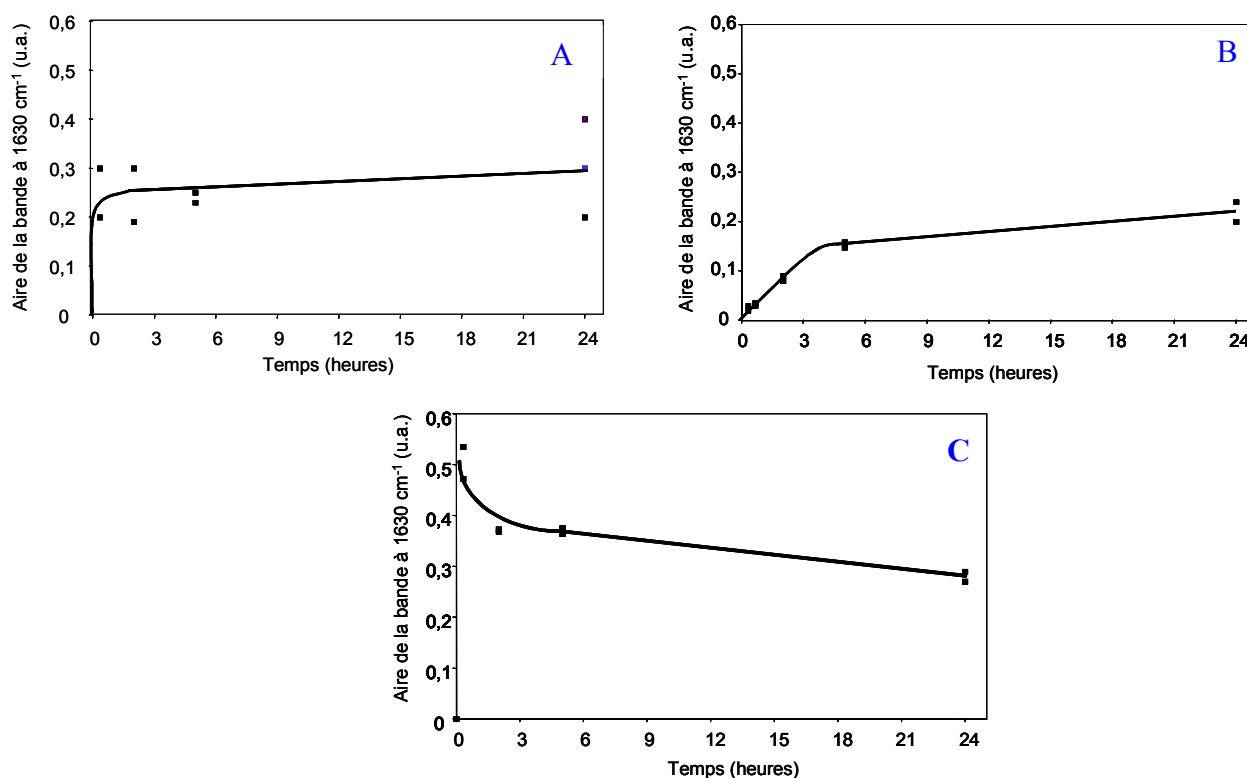


Figure 23 : Cinétiques d'adsorption de SAB et de polA dans des solutions A/ 100% SAB, B/ 100% polA, C/ « mix » sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L.

D'après les spectres de la Figure 23, la quantité de macromolécules adsorbées atteint un plateau en moins de 20 minutes pour la SAB et plus de 5 heures pour le polA.

La quantité de macromolécules adsorbées après immersion d'un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L dans une solution "mix" atteint un maximum en quelques minutes. L'aire de bande centrée à 1630 cm^{-1} est alors supérieure à celle obtenue après adsorption de la SAB ou du polA seuls. Après 20 minutes d'immersion, l'aire diminue pour atteindre, après 24h d'immersion, la même valeur que celle de la SAB ou du polA seuls. Cette cinétique, différente de celles observées lors de l'adsorption du polA ou de la SAB, peut être expliquée par la complexation en solution des protéines par les carbohydrates. Les deux composés s'adsorbent donc en même temps, expliquant ainsi cette forte valeur observée à 20 minutes. Il

est à noter que l'intensité de la bande centrée à 1165 cm^{-1} est toujours supérieure à celle centrée à 3240 cm^{-1} , même dans les temps courts, ceci étant principalement dû à la présence de sulfates. Aucun changement de prédominance de ces deux bandes n'est observé au cours de la cinétique, ce qui peut laisser penser que l'adsorption de la SAB et du polA n'est pas successive. La diminution de l'aire de la bande centrée à 1630 cm^{-1} peut être attribuée à une resuspension des composés organiques adsorbés suite à un réarrangement des macromolécules en contact avec la surface solide.

Un temps d'immersion de 24 heures sera retenu pour la suite des expériences.

1.2. Analyse de surface par XPS

Caractérisation de la surface propre.

Les spectres XPS (spectre général et spectres à haute résolution) d'un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L après nettoyage et vieillissement 24 heures à l'air en conditions aseptiques, sont présentés sur les Figures 24 à 29.

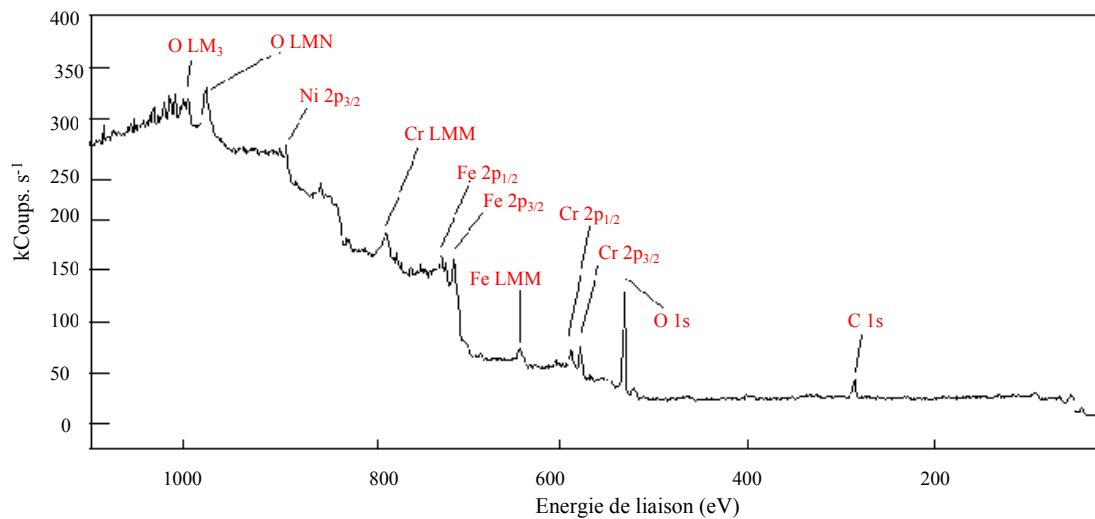


Figure 24 : Spectre général d'un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L après nettoyage.

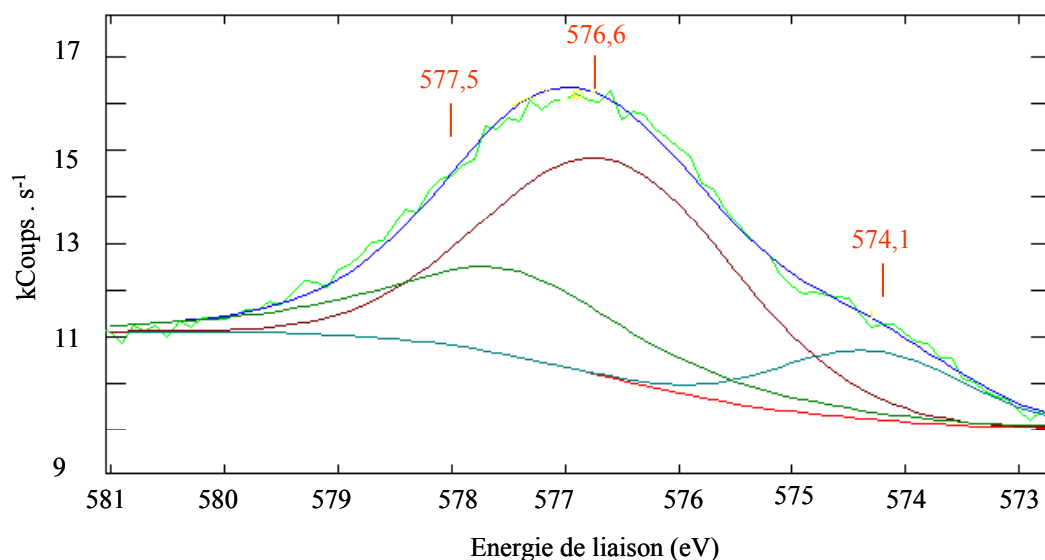


Figure 25 : Pic Cr $2p_{3/2}$ déconvolué du spectre d'un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L après nettoyage.

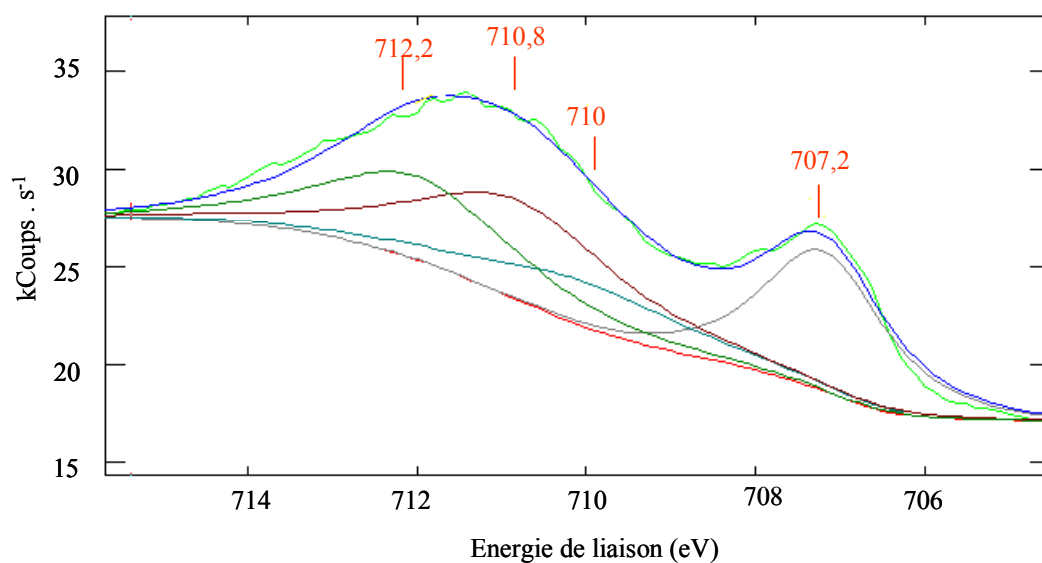


Figure 26 : Pic Fe $2p_{3/2}$ déconvolué du spectre d'un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L après nettoyage.

Après un vieillissement de 24h sous air, le spectre de Cr $2p_{3/2}$ déconvolué fait apparaître trois contributions attribuées aux groupements $\text{Cr}^0 2p_{3/2}$ à 574,1 eV, $\text{Cr}^{3+} 2p_{3/2}$ (Cr_2O_3) à 576,6 eV et $\text{Cr}^{3+} 2p_{3/2}$ ($\text{Cr}(\text{OH})_3$) à 577,5 eV et le spectre de Fe $2p_{3/2}$ déconvolué fait apparaître quatre contributions centrées à 707,2 eV pour le groupement $\text{Fe}^0 2p_{3/2}$, à 710 eV pour $\text{Fe}^{2+} 2p_{3/2}$ de l'oxyde, à 710,8 pour $\text{Fe}^{3+} 2p_{3/2}$ de l'oxyde et à 712,2 pour Fe $2p_{3/2}$ de l'hydroxyde. Les analyses à 90 et à 45° montrent que l'acier inoxydable est

recouvert d'un film passif qui est stratifié de la sorte : la couche la plus interne, épaisse de 30 Å, est constituée à 50% de d'oxyde de chrome (Cr_2O_3) et à 50% d'oxyde de fer ($\text{Fe}^{2+,3+}$) et la couche la plus externe, épaisse de 12 Å, est constituée à 45% d'hydroxyde de chrome ($\text{Cr}(\text{OH})_3$) et à 55% d'hydroxyde de fer [133].

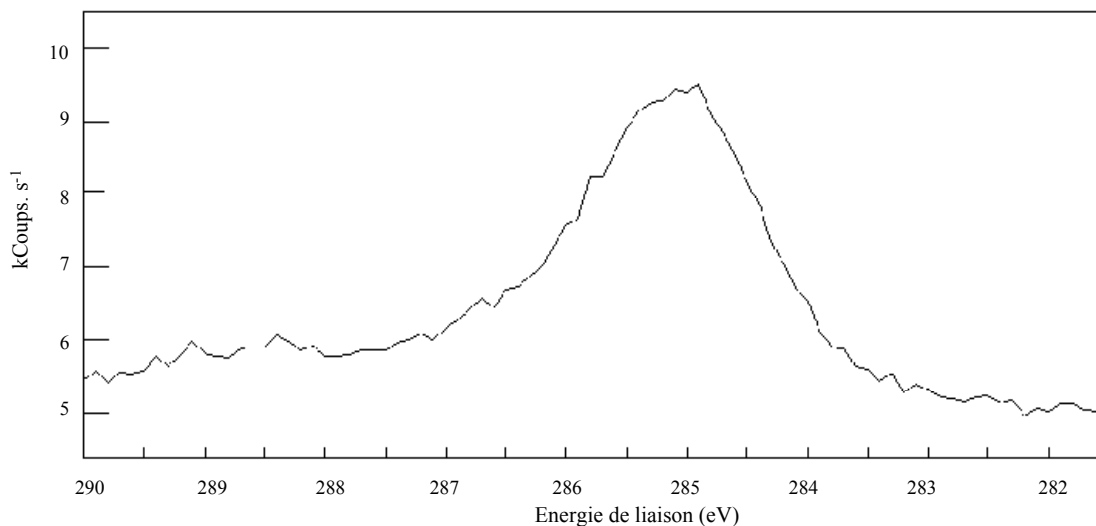


Figure 27 : Pic de Cls du spectre d'un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L après nettoyage.

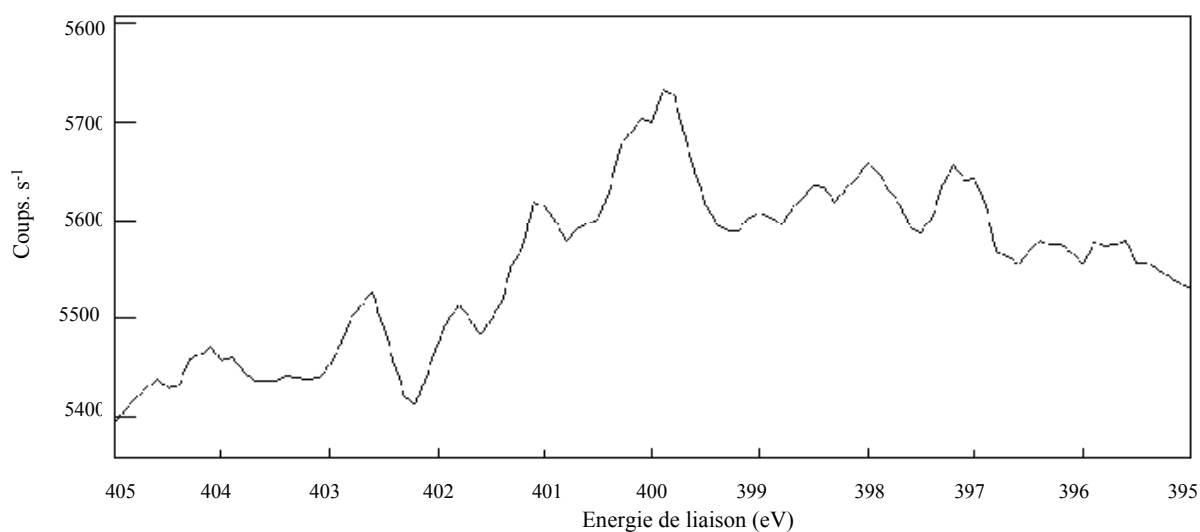


Figure 28 : Pic de NIs du spectre d'un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L après nettoyage.

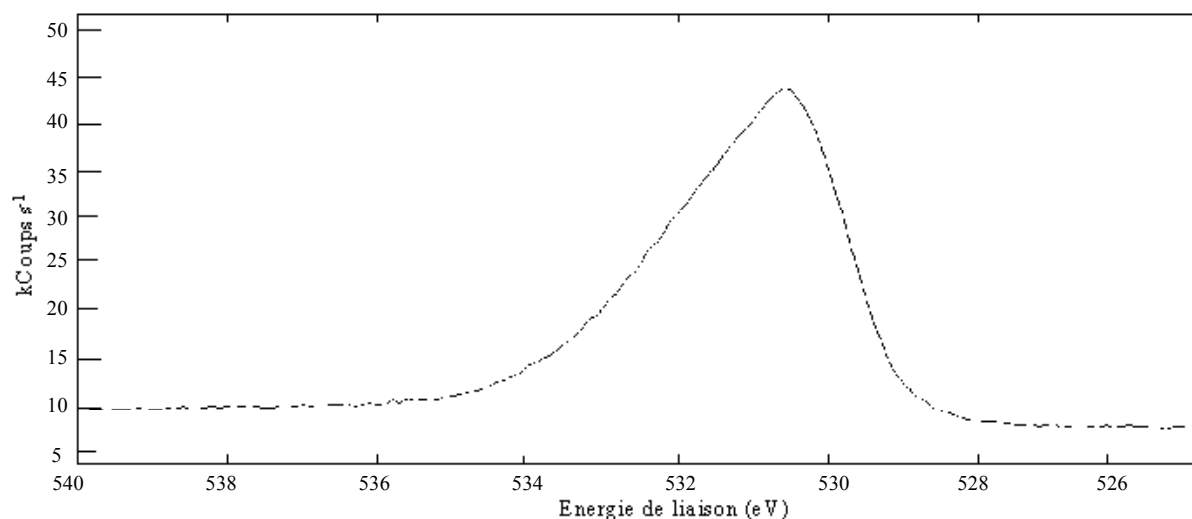


Figure 29 : Pic de O1s du spectre d'un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L après nettoyage.

Le spectre général (Figures 24) montre la présence de carbone et d'oxygène à la surface de l'échantillon d'acier inoxydable AISI 316L. Le carbone de contamination a un pic majoritaire à 285 eV, indiquant la présence de groupements CH sur l'échantillon (Figure 8). La quantité d'azote en surface est, d'après la Figure 28, extrêmement faible. Une couche organique de contamination existe donc en surface de l'échantillon, même après nettoyage, cette contamination provenant de l'atmosphère ou des solutions de rinçage, comme déjà évoqué par Boyd *et al.* [134] et par BASIS [7].

Avant immersion, les propriétés acido-basiques des échantillons sont mesurées à partir des mesures d'angles de contact effectués avec de l'eau (milliQ) du diiodométhane (Sigma) et du formamide (Sigma) et de l'équation de Van Oss [135] :

$$\gamma (\cos\theta + 1) = 2 \left[(\gamma_S^{LW} \gamma_L^{LW})^{1/2} + (\gamma_S^- \gamma_L^+)^{1/2} + (\gamma_S^+ \gamma_L^-)^{1/2} \right] \quad \text{Eq 6}$$

où γ est l'énergie de surface totale, γ^{LW} , γ^- , γ^+ , sont respectivement les composantes de Lifshitz van der Walls, électron-donneur et électron-accepteur de l'énergie de surface et S et L désignant les échantillons solides ou liquides.

L'acier inoxydable AISI 316L présente un caractère électron-donneur plus fort que son caractère électron-accepteur : $\gamma^- = 20,2$; $\gamma^+ = 2,2$ et un caractère de Lifshitz van der Walls de 35,4. Ces résultats indiquent une basicité de surface moyenne qui peut être reliée au point isoélectrique de l'ordre de 7-8 observé sur des oxydes de fer et des oxydes de chrome [36, 136]. Ce point isoélectrique étant lié au nombre d'hydroxyles liés au métal [36], la surface de

l'acier inoxydable doit être sous la forme Me-OH ou Me-(OH)₂, ces constatations sont en accord avec les données XPS indiquant que la surface est hydroxylée.

Caractérisation de surfaces après adsorption de molécules organiques.

Le spectre XPS d'échantillon d'acier inoxydable AISI 316L, après une immersion de 24 heures dans une solution "mix" puis rinçage en eau de mer artificielle, enregistré sur un large domaine est présenté sur la Figure 30.

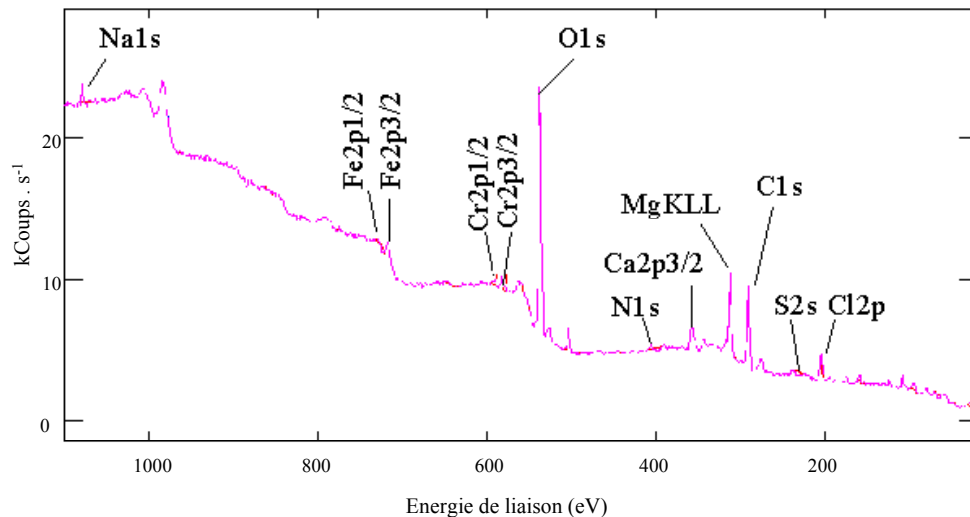


Figure 30 : Spectre général d'une surface d'acier inoxydable AISI 316L après une immersion de 24h dans une solution « mix » puis un rinçage en eau de mer artificielle.

Le spectre général montre la présence des éléments principaux du substrat (Fe et Cr), des éléments provenant de la solution (Na, Ca, Mg, Cl, S) et des éléments provenant des composés adsorbés (O, N, C). Les spectres d'échantillons d'acier inoxydable AISI 316L immergés 24h dans des solutions 100% SAB, 100% polA ou mix présentent les mêmes éléments, les fractions de carbone et d'azote différant selon les composés adsorbés.

Les spectres d'azote et de carbone enregistrés, à plus haute résolution, après adsorption de polA, de SAB ou de mix sur un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L sont présentés respectivement sur les Figures 31 et 32.

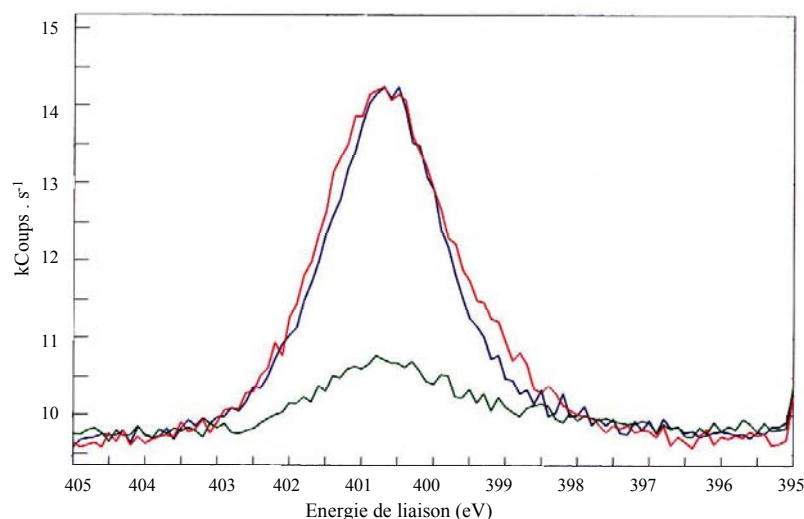


Figure 31 : Spectres N1s d'un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L après immersion dans une solution 100% SAB (rouge), 100% polA (vert) ou "mix" (bleu) et rinçage en eau de mer artificielle.

La Figure 31 fait apparaître de l'azote sur chaque échantillon, quelle que soit la molécule dissoute en eau de mer artificielle. L'intensité du pic d'azote est plus faible lorsque l'immersion est réalisée dans une solution 100% polA, son aire normalisée est de 754 coups.eV.s⁻¹ alors qu'elle est égale à 3416 coups.eV.s⁻¹ après immersion dans une solution de SAB et 3250 coups.eV.s⁻¹ après immersion dans une solution de mix. La détection d'azote organique sur l'acier inoxydable AISI 316L après immersion dans une solution 100% polA témoigne d'une contamination par des fonctions de type amine (un monomère du polA ne contient que des atomes de carbone, d'oxygène et d'hydrogène). Ces amines ont probablement été précipitées avec le carbohydate pendant la phase d'extraction-purification du polA.

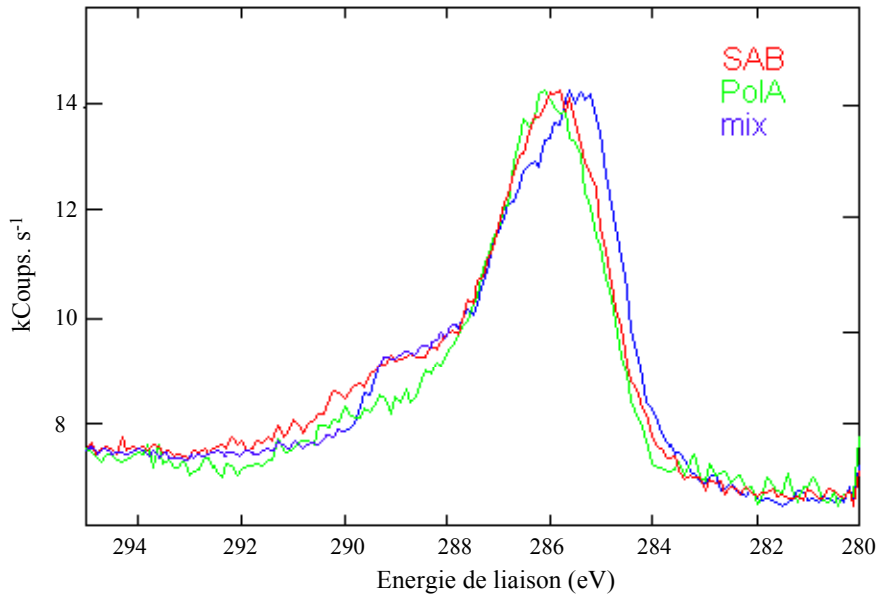


Figure 32 : Spectres C1s d'un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L après immersion dans de l'eau de mer artificielle contenant de la SAB, du polA ou un "mix" et rinçage en eau de mer artificielle.

Les spectres de carbone enregistrés après immersion d'un échantillon d'acier inoxydable dans les différentes solutions organiques varient avec la nature du composé en solution. Une déconvolution permet d'identifier les principaux groupements chimiques présents. Un pic du carbone déconvolué après immersion d'un échantillon d'acier inoxydable dans une solution de SAB est présenté sur la Figure 33.

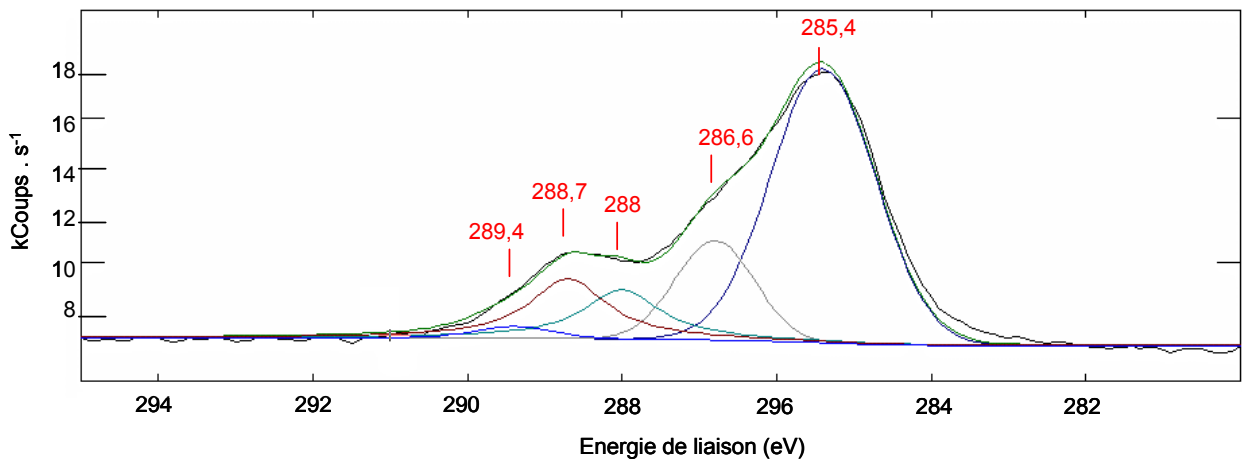


Figure 33 : Spectre de C1s déconvolué après immersion d'un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L dans une solution de SAB et rinçage en eau de mer artificielle.

Le spectre de C1s déconvolué fait apparaître plusieurs contributions attribuées aux groupements chimiques suivants : CH et CC à 285,4 eV, C-N à 286,6 eV, COC ou COH à 288 eV, NC=O à 288,7 eV et COOH à 289,4 eV pour la SAB et CH et CC à 285,4 eV, C-N à 286,6 eV, COC ou COH à 288 eV, C=O à 288,3 eV, NC=O à 288,7 eV et COOH à 289,4 eV pour le polA. La déconvolution des pics de carbone obtenus après immersion dans des solutions de SAB, de polA ou de mix a fait apparaître des proportions différentes de chacun des groupements chimiques. La proportion de ces intensités par rapport au carbone total est donnée dans le Tableau 16.

	SAB	polA	Mix
<i>C-N/Ctot</i>	0,16	0,16	0,21
<i>C-O/ Ctot</i>	0,10	0,20	0,25
<i>C=O/ Ctot</i>	-	0,07	0,14
<i>NC=O/Ctot</i>	0,13	0,02	0,05
<i>OC=O/Ctot</i>	0,02	0,10	0,09
<i>NIs/Ctot</i>	0,16	0,07	0,16

Tableau 16 : Aires normalisées à 90° du pic N1s et des contributions du pic C1s (cps.eV.s^{-1}) en fonction du type de molécule organique adsorbée sur un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L après immersion et rinçage en eau de mer artificielle.

La comparaison des contributions du C1s présentées en rouge d'une part et en bleu d'autre part indiquent que la SAB présente une plus grande proportion de groupements C-N et NC=O que de groupements C-O et OC=O, alors que nous observons l'inverse pour le polymère A. Après adsorption d'un mélange composé de SAB et de polA ("mix"), l'échantillon présente des résultats plus proches de ceux du polA que de ceux de la SAB (plus grande proportion de groupements C-O que de groupements C-N et de groupements OC=O que de groupements NC=O), résultat en accord avec l'infra-rouge (Figure 22).

Concernant la SAB, les données bibliographiques nous indiquent que le rapport N/C est de 0,27 alors que le calculons égal à 0,16. Ceci indique qu'une contamination carbonée est présente sur notre échantillon, même après adsorption d'une macromolécule. Notons,

néanmoins que les rapports NC=O/OC=O sont similaires à ceux calculés à partir de la composition de la SAB (théorique : 7,0; expérimental : 6,5).

1.3. Dosage de macromolécules adsorbées.

Le dosage des espèces chimiques adsorbées est effectué sur les trois types de matériaux après une immersion de 24 heures dans une solution d'eau de mer artificielle contenant 20 mg/L de SAB, de polA ou d'un mélange 50% SAB/50 % polA puis un rinçage en eau de mer artificielle. Les résultats de ces dosages sont présentés dans le Tableau 17.

		Acier inoxydable	PTFE	Verre
100% SAB	SAB ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	$0,014 \pm 0,004$	$0,028 \pm 0,01$	$0,012 \pm 0,005$
100% polA	polA ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	$0,2 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,2$
"mix"	SAB ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	$0,030 \pm 0,006$	$0,036 \pm 0,007$	$0,036 \pm 0,007$
	polA ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	$0,4 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$

Tableau 17 : Masses de SAB ou de polA adsorbées sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L, de PTFE et de verre après 24h d'immersion dans une solution 100% SAB, 100% polA et "mix" et rinçage en eau de mer artificielle (moyenne et écart-type calculés à partir de trois essais).

Après adsorption à partir d'une solution 100% SAB, la masse de protéine dosée est deux fois plus importante sur un échantillon de PTFE que sur l'acier inoxydable ou le verre, résultat en accord avec les données bibliographiques indiquant que l'adsorption de la SAB est favorisée sur des substrats hydrophobes [38].

Après adsorption à partir d'une solution 100% polA, la masse de polA dosée, compte tenu des écarts-type élevés, est similaire sur les trois matériaux.

Après adsorption des macromolécules organiques à partir d'une solution "mix", la masse de protéine adsorbée est plus grande qu'après immersion dans une solution 100% SAB. Cette augmentation n'est pas vérifiée pour les carbohydrates. L'augmentation de la quantité de SAB adsorbée après immersion d'un matériau dans une solution "mix" par rapport à une solution 100% SAB peut être expliquée par l'adsorption d'un complexe SAB-polA formé en solution. L'adsorption d'un complexe protéine-carbohydrate avait déjà été évoqué après analyse des cinétiques infra-rouge.

Notons que la masse dosée de polA est toujours d'un ordre de grandeur plus élevée que celle de SAB, mais correspond néanmoins à un nombre identique de molécules (M_{SAB} : 66 kDa, M_{polA} : 1000 kDa).

Néanmoins, il faut savoir que le traitement de décrochage par ultrasons, de dessalage et de concentration, nécessaire avant les dosages provoque la perte d'une fraction de protéines qui peut atteindre 50%. Il faut donc garder à l'esprit que les masses exprimées ici ne donnent que des indications relatives des masses organiques réellement adsorbées.

1.4. Discussion, Conclusion.

L'adsorption de macromolécules organiques sur des surfaces d'acier inoxydable AISI 316L a été suivie à l'aide de plusieurs techniques d'analyse de surface ainsi que par des dosages chimiques.

Les spectres infra-rouge des surfaces après adsorption des deux macromolécules présentent des pics centrés aux mêmes nombre d'ondes, rendant difficile leur distinction. Seule la variation d'intensité de la bande à $3700-3200\text{ cm}^{-1}$ a permis de différencier la SAB et le polA adsorbés et de montrer l'adsorption prédominante de polA après immersion dans une solution "mix". Ces spectres sont différents de ceux enregistrés à partir des poudres. Ils présentent en particulier un déplacement de la bande amide I vers les bas nombres d'ondes qui pourrait être dû à la complexation des acides aminés avec des sels [129] ; et un déplacement de la bande attribuée aux vibrations $\nu_{as}COO^-$ vers les hauts nombres d'ondes qui pourrait être dû à une liaison des fonctions carboxylates avec des cations [137].

Les cinétiques d'adsorption des deux macromolécules effectuées sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L immergés dans des solutions organiques, rincés puis séchés montrent que les plateaux sont atteints après des temps d'immersion différents : quelques minutes sont nécessaires au recouvrement par des protéines d'une surface immergée en eau de mer artificielle, plusieurs heures semblent nécessaire pour atteindre le maximum d'adsorption de polA. Ces résultats sont en accord avec ceux énoncés dans la littérature pour la SAB [37, 132, 138] ou pour des carbohydrates [138-140]. Lorsque l'adsorption est réalisée à partir d'une solution contenant des protéines et des carbohydrates, l'infra-rouge fait apparaître qu'une grande quantité de matière organique est adsorbée dès les premières minutes, le polA étant en plus grande proportion que la SAB. L'adsorption rapide de polA semble être due à une complexation en solution du polA par la SAB, la SAB étant connue pour se lier

facilement aux ligands organiques [58]. L'adsorption d'un complexe SAB-polA peut expliquer l'augmentation de SAB dosée après immersion des trois matériaux dans une solution "mix", la masse de polA dosée ayant peu varié.

Les dosages chimiques montrent qu'une masse dix fois plus grande de polA que de SAB est adsorbée sur un échantillon d'acier inoxydable ; les spectres infra-rouge présentent quant à eux des intensités de la bande centrée à 1630 cm^{-1} similaires. Ce dernier résultat n'est pas contradictoire puisque les coefficients d'extinction molaire de chacun des groupements (liaison peptidique pour la SAB et groupement carboxylate pour le polA) sont probablement différents.

Les spectres XPS des macromolécules adsorbées font apparaître du carbone, de l'oxygène et de l'azote. L'azote observé dans le polA provient d'amines liées au polymère et considérées comme une contamination. D'après l'analyse du spectre de carbone, la couche organique obtenue à partir d'un mélange de SAB et de polA est plus riche en carbohydrates qu'en protéines, résultat confirmé en IRRAS par une intensité plus faible du massif situé entre 3700 et 3200 cm^{-1} après adsorption du "mix". Nous utiliserons pour la suite du manuscrit le pic d'azote pour suivre l'adsorption de la SAB et la somme des contributions (CO) pour suivre l'adsorption du polA.

La comparaison du film primaire réalisé en milieu artificiel (50% SAB – 50% polA) et du film primaire marin étudié par le groupe BASIS montre que les mêmes groupements chimiques sont retrouvés en surface d'un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L (carbohydrates, protéines), avec à 24 heures une majorité de carbohydrates adsorbés. De plus, en eau de mer naturelle, hors période du bloom et sur un acier inoxydable, la quantité de carbohydrates adsorbés est entre $0,03$ et $2,6\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$ et la quantité de protéines adsorbées est entre $0,007$ et $0,11\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Le film primaire artificiel est donc un modèle satisfaisant de celui réalisé en eau de mer naturelle.

Une même procédure a été suivie pour former un film primaire artificiel modèle sur le PTFE et le Verre. Après immersion dans des solutions d'eau de mer artificielle contenant de la SAB, du polA ou un "mix", les résultats de dosages chimiques ont confirmé la présence de protéines et de carbohydrates.

2. Effet des sels sur l'adsorption de la SAB et du polA.

Comme exposé dans le chapitre 1, de nombreux paramètres tels que le pH, la force ionique ou la composition du milieu sont susceptibles de modifier l'adsorption de molécules organiques. Dans le cas de l'eau de mer, la présence de sels peut influencer ou modifier la formation du film primaire, comme évoqué par Bhosle *et al.* [139]. La structure du film primaire en eau de mer n'ayant pas encore été totalement caractérisée, à notre connaissance, nous tenterons de mettre en évidence l'effet de deux cations divalents, majoritaires en eau de mer, le magnésium et le calcium, sur l'adsorption de la SAB et du polA ainsi que sur la structure du film ainsi formé.

Afin d'obtenir des informations sur l'orientation des macromolécules adsorbées, sur le recouvrement de la surface, sur la stratification, nous avons utilisé deux techniques d'analyse de surface, l'IRRAS et l'XPS. Pour étudier l'effet des cations calcium et magnésium sur l'adsorption de deux macromolécules organiques, la SAB et le polA sont dissous dans différentes solutions salines (NaCl [36 g/L], NaCl + CaCl₂ [34,85 + 1,15 g/L], NaCl + CaCl₂ [33,17 + 2,84 g/L], NaCl + MgCl₂ [30,8 + 5,2 g/L], NaCl + MgCl₂ [33,97 + 2,03 g/L] et eau de mer artificielle) dont la force ionique et le pH sont égaux à ceux de l'eau de mer artificielle (0,52M et pH=8,2). De même, deux types de rinçage sont effectués, soit en eau milliQ soit dans la solution saline ayant servi à l'adsorption mais sans composés organiques.

2.1. Adsorption des anions et cations sur un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L.

L'analyse XPS d'échantillons d'acier inoxydable AISI 316L après une immersion de 24 heures dans des solutions salines dépourvues de molécules organiques, et rinçage en eau milliQ montre la présence d'éléments provenant de la surface solide (Fe, Cr et O), de la solution (Na, Ca, Mg, Cl, S), ainsi que du carbone (élément de contamination), comme indiqué sur la Figure 34. Le calcul des aires normalisées, permet d'estimer la proportion relative de chaque élément en surface d'un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L ; il est présenté dans le Tableau 18. L'intensité du magnésium a été mesurée à partir du pic Mg KLL, les pics Mg 2s et Mg 2p ayant respectivement une énergie de liaison très proche de celles du Fe 3s et du Cr 3p.

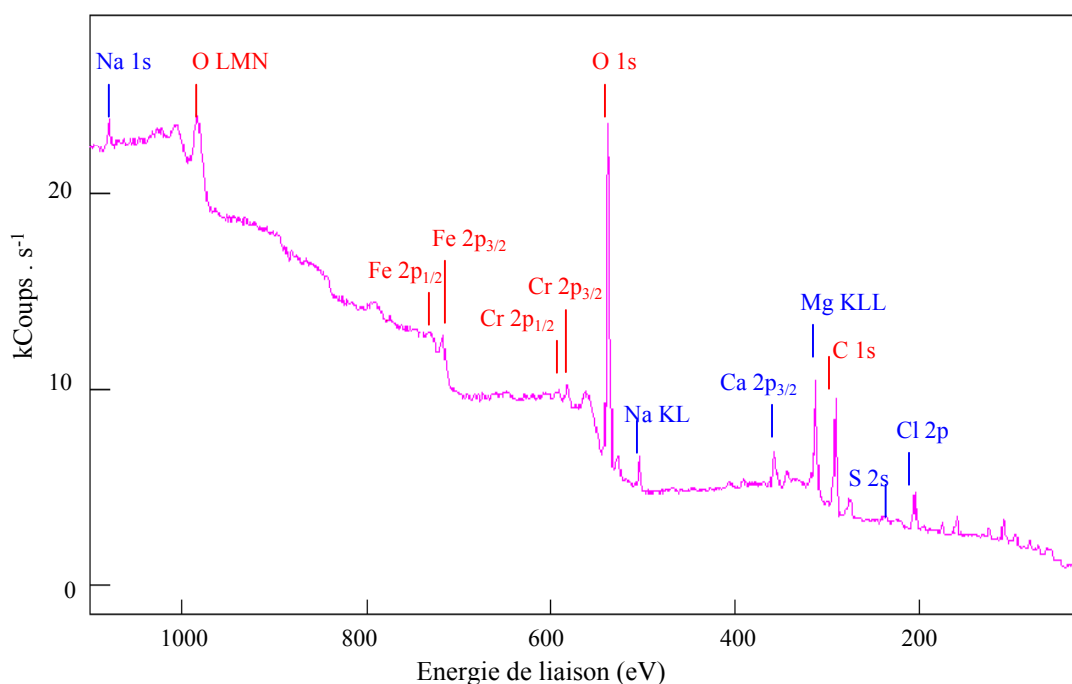


Figure 34 : Spectre XPS général d'un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L immergé 24 heures dans une solution d'eau de mer artificielle et rincé en eau milliQ.

Solution d'immersion	NaCl	NaCl + CaCl₂	NaCl + MgCl₂	EMA
Pics XPS				
(Fe 2p+Cr 2p)	10775	10931	12717	10078
Na 1s	1917	1110	771	1173
Cl 2p	598	563	353	1091
Ca 2p	-	383	-	254
Mg KLL	-	-	105	1186
S 2p	-	-	-	117
Cl/ Σ cations	0,31	0,37	0,40	0,41

Tableau 18 : Analyse XPS d'un échantillon d'acier inoxydable AISI SS 316L après immersion dans des solutions salines et rinçage en eau milliQ (aires normalisées en coups.eV.s⁻¹).

Les valeurs du tableau ci-dessus montrent que les ions ne s'adsorbent pas de façon équivalente sur l'acier inoxydable AISI 316L. Un "ordre" d'adsorption, en comparant les intensités mesurées après immersion dans les solutions NaCl, NaCl + CaCl₂ et NaCl + MgCl₂,

peut ainsi être établi : $[Na]_{surf} > [Cl]_{surf} > [Ca]_{surf} > [Mg]_{surf}$, alors qu'en solution le nombre de moles de calcium est 2,5 fois plus faible que celui de magnésium (molarités indiquées dans le chapitre 2 paragraphe 1.3.2).

Notons qu'après immersion en eau de mer artificielle l'intensité normalisée des ions magnésium augmente d'un facteur 10 par rapport à la solution NaCl + MgCl₂ alors que celle des ions calcium reste constante. Cette nette augmentation d'intensité du magnésium accompagnée de celle du chlore et de la présence de sulfates nous permet de penser que ce cation est en partie sous forme MgCl₂ et MgSO₄.

La dernière ligne du Tableau 18 présente le rapport de l'intensité du chlore sur la somme des intensités des cations adsorbés. Ce dernier semble augmenter légèrement en présence de cations divalents indiquant qu'une fraction du chlore doit être lié à ces cations soit sous forme de sels (NaCl, CaCl₂, MgCl₂) soit sous la forme : Cl-Ca-métal et Cl-Mg-métal; sans exclure pour autant qu'il soit directement lié au métal.

Après immersion dans une solution saline, les résultats XPS montrent que l'échantillon d'acier inoxydable présente en surface :

- les hydroxydes de fer et de chrome (Fe-OH ou Fe-(OH)₂),
- les cations sodium, calcium, magnésium et l'anion chlore adsorbés,
- des sels NaCl, MgCl₂, CaCl₂, MgSO₄.

Nous allons nous intéresser plus particulièrement aux cations calcium et magnésium, deux cations divalents connus pour se lier à la SAB, et essayer de mettre en évidence leur rôle sur l'adsorption de la SAB et du polA.

2.2. Effet du Magnésium et du Calcium sur l'adsorption de la SAB.

2.2.1. Adsorption de la SAB sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L immergés dans les solutions salines et rincés en eau milliQ.

Caractérisation des surfaces par IRRAS.

Les spectres IRRAS d'échantillons d'acier inoxydable AISI 316L après immersion dans des solutions salines (NaCl, NaCl + CaCl₂, NaCl + MgCl₂ et EMA) contenant 20 mg/L de SAB, et rinçage en eau milliQ sont présentés sur la Figure 35.

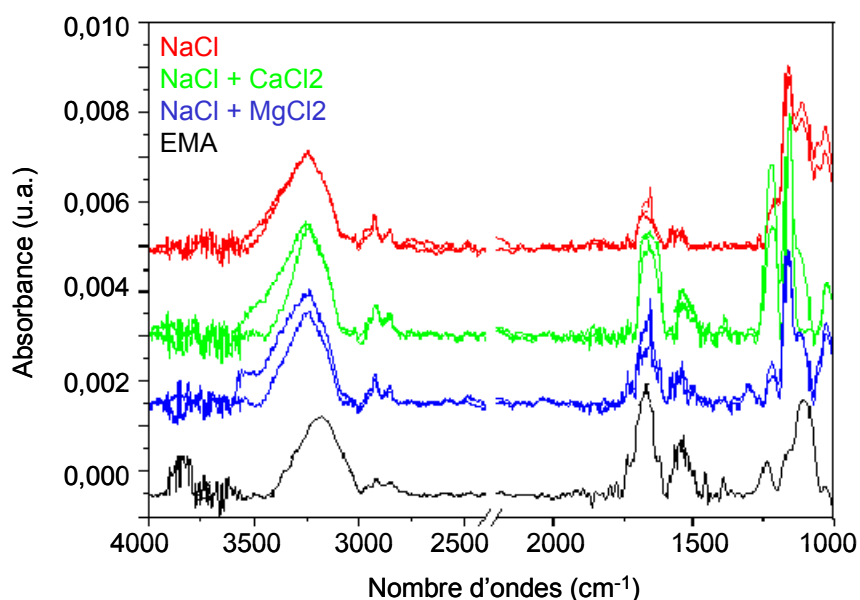


Figure 35 : Spectres IRRAS d'échantillons d'acier inoxydable AISI 316L après une immersion de 24 heures en solution saline contenant de la SAB, puis rinçage en eau milliQ.

Quelle que soit la solution d'adsorption, le spectre présente les bandes caractéristiques de la SAB : un massif entre 3500 et 3000 cm⁻¹, des bandes centrées à 2900 cm⁻¹, 2850 cm⁻¹, 1660 cm⁻¹, 1530 cm⁻¹ et un massif entre 1200 et 1000 cm⁻¹ attribués respectivement à la vibration ν_{NH} de fonctions amines, aux vibrations $\nu_{\text{asym}}\text{CH}$ et $\nu_{\text{sym}}\text{CH}$, à la vibration ν_{CO} d'un groupement HNC=O (amide I), à la vibration δ_{NH} d'un groupement HNC=O (amide II) et à la vibration ν_{CO} de fonctions alcools et esters.

Le rapport des intensités des pics amide I/amide II, reflétant la structure protéique, est présenté dans le Tableau 19.

<i>Solution saline</i>	<i>rapport amideI/amideII</i>
NaCl	2,2 ± 0,1
NaCl + CaCl₂	2,4 ± 0,2
NaCl + MgCl₂	2,3 ± 0,3
EMA	2,1

Tableau 19 : Rapport amide I/ amide II après immersion d'échantillons d'acier inoxydable AISI 316 L dans des solutions salines contenant 20 mg/L de SAB et rinçage en eau milliQ.

Le rapport amide I/ amide II est proche de 2,2 quelle que soit la solution d'adsorption laissant supposer qu'après un rinçage en eau milliQ les macromolécules adsorbées ont la même conformation, les macromolécules présentant majoritairement une structure secondaire en hélice α [131].

Enfin, l'évolution de l'aire de la bande amide I en fonction de la solution d'adsorption est présentée sur la Figure 36.

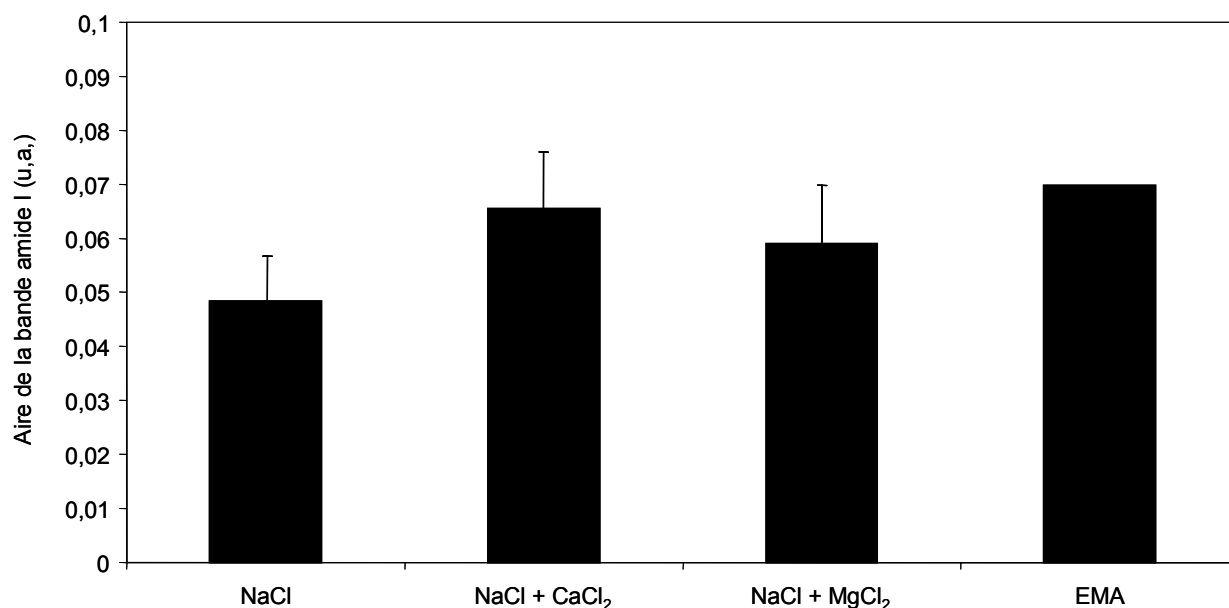


Figure 36 : Aire de la bande amide I d'échantillons d'acier inoxydable AISI 316L après immersion en solution saline puis rinçage en eau milliQ.

La nature de la solution d'adsorption, si les échantillons sont ensuite rincés en eau milliQ, affecte peu la quantité de SAB adsorbée. Notons néanmoins, une légère augmentation de la quantité de SAB adsorbée en présence de cations divalents.

Caractérisation des surfaces par XPS.

Les spectres XPS d'échantillons d'acier inoxydable AISI 316L, après une immersion de 24 heures en solutions salines et rinçage en eau milliQ, présentent les éléments caractéristiques de la surface solide (Fe 2p_{3/2} et Cr 2p_{3/2} et O 1s), de la solution d'adsorption (Na 1s, Cl 2p, Mg KLL, Ca 2p, S 2p) et de la SAB (N 1s, O 1s, C 1s). Le pic N 1s à 400 eV, caractéristique de groupements C-NH₂ présents dans les protéines [51] (Figure 37), sera utilisé pour suivre la quantité de SAB adsorbée en fonction de la solution d'adsorption. L'analyse de la surface, et en particulier les rapports N 1s/Ca 2p et N 1s / Mg KLL à deux angles d'analyse (90° et 45°), nous permettront de situer les cations calcium et magnésium par rapport à la macromolécule adsorbée (Tableau 20).

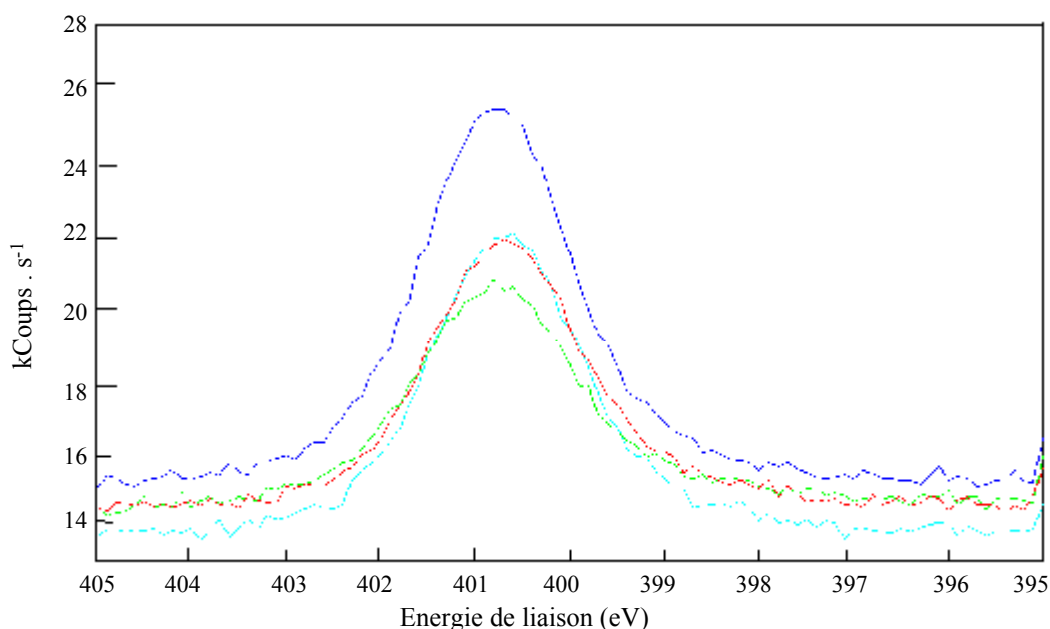


Figure 37 : Spectre N1s après 24 heures d'immersion d'un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L dans une solution de SAB dissoute en solution saline (rouge : NaCl ; vert : NaCl+CaCl₂ ; bleu :NaCl + MgCl₂ ; cyan : EMA) et rinçage en eau milliQ.

solution	NaCl	NaCl + CaCl₂	NaCl + MgCl₂	EMA
Pic XPS				
N 1s, $\theta = 90^\circ$	3765	3748	5972	4723 / 5677
(Fe 2p+Cr 2p), $\theta = 90^\circ$	8979	7917	5798	5564 / 6866
N 1s/Mg KLL, $\theta = 90^\circ$	-	-	47	6,9 / 7,9
N 1s/Mg KLL, $\theta = 45^\circ$	-	-	32	6 / 7,2
N 1s/Ca 2p, $\theta = 90^\circ$	-	8	-	18,6 / 28,4
N 1s/Ca 2p, $\theta = 45^\circ$	-	9	-	12,1 / 26,3

Tableau 20 : Analyse XPS, à deux angles d'analyse, d'échantillons d'acier inoxydable AISI 316L après immersion dans des solutions salines contenant de la SAB et rinçage en eau milliQ, intensités normalisées (cps.eV.s^{-1}) et rapports d'intensités.

On observe une faible variation de l'intensité d'azote et des signaux métalliques, la quantité de protéines adsorbées semblant être plus importante lorsque l'adsorption est réalisée dans une solution contenant du magnésium. Cette augmentation sera considérée avec précaution au vu de l'écart entre les valeurs mesurées pour deux expérimentations réalisées en eau de mer artificielle.

Les rapports N 1s/Mg KLL et N 1s/Ca 2p varient peu lorsque l'angle d'analyse passe de 90° à 45° . Ils sont néanmoins légèrement supérieurs à 90° qu'à 45° suggérant que les cations magnésium sont plutôt au dessus de la SAB.

En absence d'informations sur la structure de la couche adsorbée (couche organique + sels), nous émettrons deux hypothèses :

- si l'adsorption est discontinue, le taux de recouvrement, f , peut être calculé en supposant que les signaux des métaux sont totalement écrantés par la protéine là où elle est adsorbée :

$$I_s / I_s^0 = 1-f \quad \text{Eq 7}$$

- si l'adsorption est continue et homogène, l'atténuation des signaux du substrat par une couche protéique peut être décrit par l'équation suivante :

$$I_s = I_s^0 \exp(-d / \lambda \sin\theta) \quad \text{Eq8}$$

où I_s est l'intensité des signaux fer et chrome après adsorption des macromolécules, I_s^0 l'intensité des signaux du substrat avant adsorption, d l'épaisseur de la couche protéique dans le cas où elle est continue, λ le libre parcours moyen des électrons du niveaux $2p_{3/2}$ du chrome

et du fer à travers le film adsorbé (on prendra une valeur moyenne $\lambda=21,5 \text{ \AA}$ pour une couche organique sachant que $\lambda_{\text{Cr}2\text{p}3/2} = 20 \text{ \AA}$, $\lambda_{\text{Fe}2\text{p}3/2} = 23 \text{ \AA}$) [141] et θ , l'angle d'analyse entre la surface et l'analyseur. L'épaisseur d peut être calculée à partir de l'équation 8, qui devient une fois simplifiée pour $\theta=90^\circ$:

$$d = - \lambda \ln (I_s/I_s^0) \quad \text{Eq 9}$$

Les résultats de ces calculs sont reportés dans le Tableau 21.

	NaCl	NaCl + CaCl₂	NaCl + MgCl₂	EMA
I_s^0	10775	10931	12717	10078
I_s	8979	7917	5798	5564 / 6866
<i>f en %</i>	17	28	55*	32 / 42
<i>d (Å)</i>	3,9	6,9	16,9*	8,3 / 12,7

Tableau 21 : Taux de recouvrement (f) et épaisseur équivalente de la monocouche de SAB adsorbée (d) calculés d'après les équations 7 et 9 (I_s^0 : Intensité des signaux métalliques d'un échantillon d'acier inoxydable après immersion dans une solution saline sans SAB et rinçage en eau milliQ, I_s : Intensité des signaux métalliques d'un échantillon d'acier inoxydable après immersion dans une solution saline contenant 20 mg/L de SAB et rinçage en eau milliQ) * valeurs probablement légèrement surestimées car I_s^0 , après immersion en NaCl + MgCl₂, est étonnamment élevé par rapport aux autres valeurs.

Les plus forts taux de recouvrement, ou les épaisseurs les plus grandes, sont calculés pour les couches adsorbées obtenues après immersion dans une solution NaCl + MgCl₂ ou en eau de mer artificielle.

Notons que la faible augmentation de l'intensité du signal d'azote ne peut expliquer à elle seule l'atténuation des signaux du métal. Des sels (NaCl, CaCl₂, MgCl₂) sont donc déposés sur l'acier inoxydable, sels contribuant à la diminution des signaux émis par le substrat.

2.2.2. Adsorption de la SAB sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L immergés dans les solutions salines et rincés en eau saline.

Caractérisation des surfaces par IRRAS.

La Figure 38 présente les spectres IRRAS d'échantillons d'acier inoxydable AISI 316L après adsorption de SAB pendant 24 heures dans des solutions salines et rinçage par ces mêmes solutions mais dépourvues de SAB.

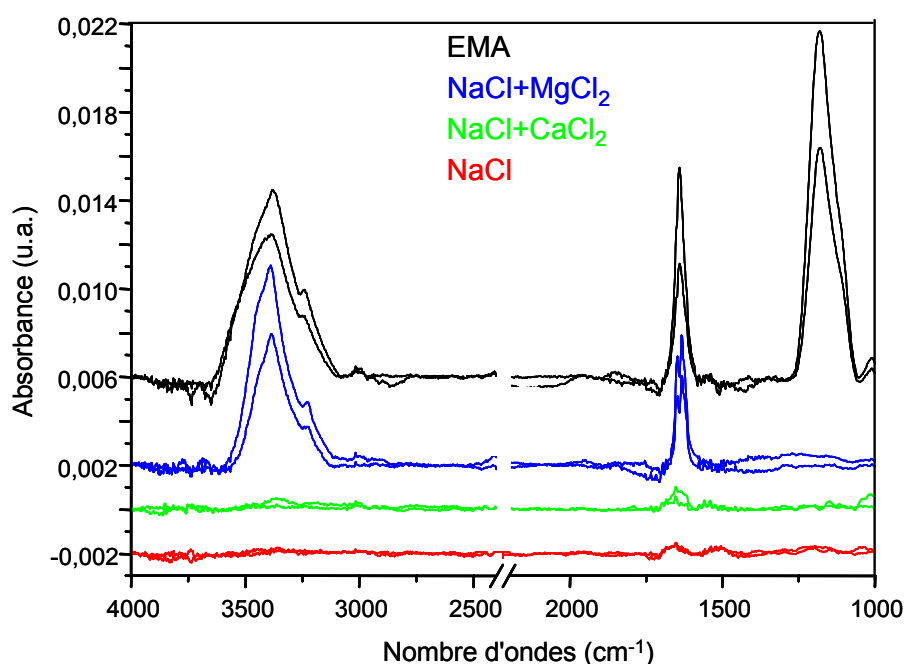


Figure 38 : Spectres IRRAS d'échantillons d'acier inoxydable AISI 316L après une immersion de 24 heures en solution saline contenant de la SAB puis rinçage en solution saline.

Une très forte augmentation de l'intensité de la bande amide I et du massif situé entre 3700 et 3200 cm^{-1} est observée lorsque la SAB est dissoute dans une solution NaCl + MgCl₂ ou dans l'eau de mer artificielle. La bande amide I, caractéristique des protéines, est 5 fois plus intense qu'après une adsorption dans une solution NaCl ou NaCl + CaCl₂.

La brutale augmentation du pic centré à 1165 cm^{-1} , observée après immersion et rinçage en eau de mer artificielle par rapport aux autres solutions, est due à la présence de sulfates dans l'eau de mer artificielle. Ces sulfates, déposés sur la surface après le rinçage, participent au signal attribué au νCO , COH et COC de la SAB.

Le Tableau 22 indique la position du maximum de la bande amide I en fonction de la solution d'adsorption.

	Position de la bande amide I (cm^{-1})
NaCl	1662 ± 2
NaCl + CaCl_2	1657 ± 5
NaCl + MgCl_2	1622 ± 6
EMA	1636 ± 2

Tableau 22 : Position de la bande amide I de SAB adsorbée sur un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L après immersion dans des solutions salines et rinçage par ces mêmes solutions dépourvues de SAB.

En présence de cations magnésium, un déplacement d'une trentaine de cm^{-1} de la bande amide I vers les bas nombres d'onde est observé. A ce déplacement de la bande amide I s'ajoute une forte diminution de la bande amide II. De Lozé [129] ayant indiqué que la bande amide II se déplaçait vers les hauts nombres d'onde en présence de cations divalents, nous pouvons supposer que la bande amide II est contenue dans la bande amide I.

La déconvolution de la bande amide I avec le programme "peak fitting" du logiciel Origin, en fixant les largeurs de bandes à 15 cm^{-1} et en utilisant une ligne de base linéaire est présentée sur la Figure 39.

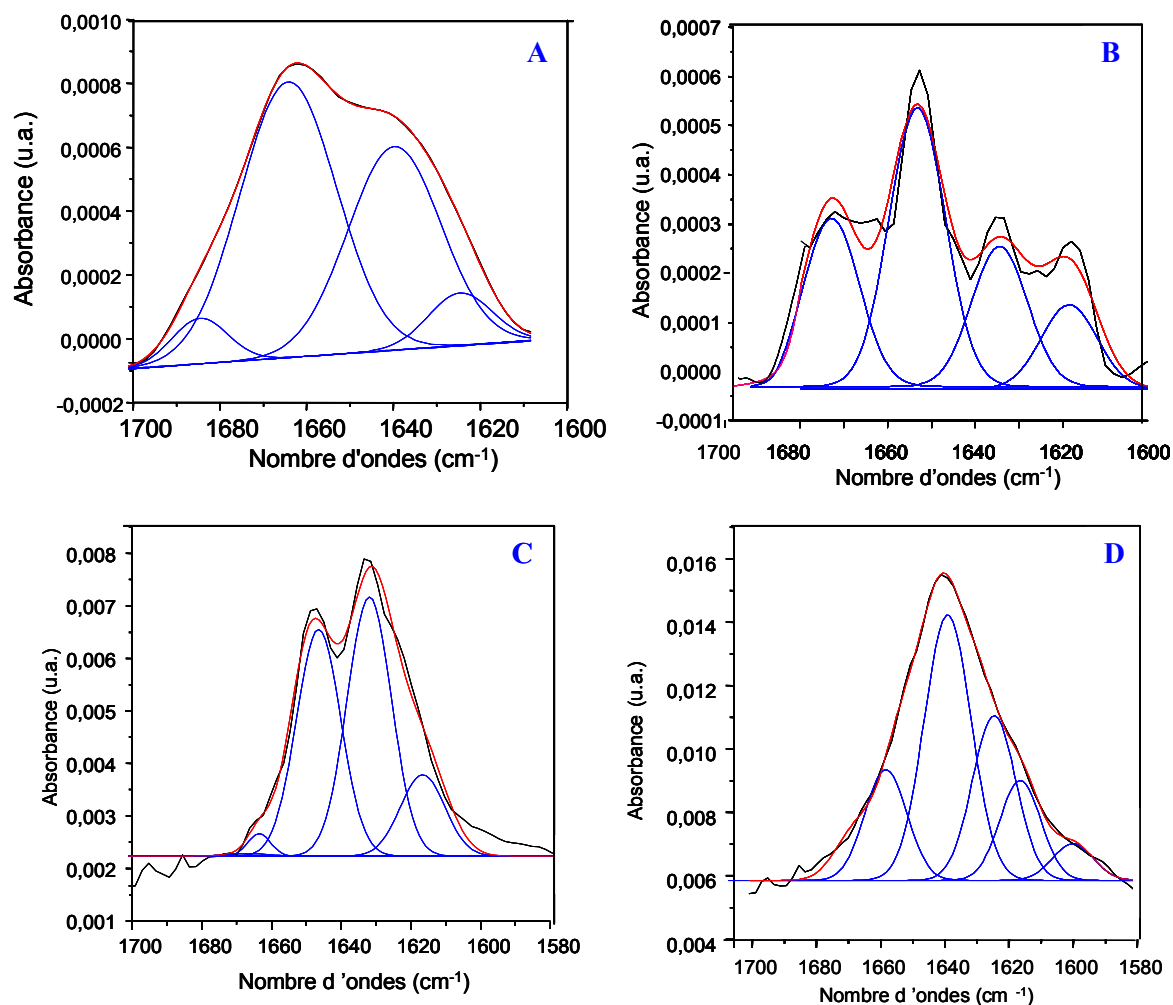


Figure 39 : Bande amide I déconvoluée après une adsorption de la SAB sur des échantillons d'acier inoxydable en NaCl (A), en NaCl + CaCl₂ (B), en NaCl + MgCl₂ (C) et en EMA (D).

Les bandes amide I peuvent être décomposées en contributions élémentaires centrées à 1684 cm⁻¹, 1664 cm⁻¹, 1639 cm⁻¹ et 1624 cm⁻¹, 1615 cm⁻¹ et 1599 cm⁻¹. Le signal centré à 1599 cm⁻¹ correspondrait à un résidu de la bande amide II [32, 129]. La fréquence de vibration du groupement C=O (correspondant à l'ensemble des pics entre 1684 et 1615 cm⁻¹) peut être corrélée à un type de structure secondaire ou d'environnement des groupements amides dans la protéine [32, 142]. Le Tableau 23 indique la fraction de groupements amides de chaque type pour chacune des solutions étudiées.

	NaCl	NaCl + CaCl ₂	NaCl + MgCl ₂	EMA
CO libre dans un environnement hydrophobe (1684 cm ⁻¹)	5	27	-	-
CO lié par une liaison H dans une hélice α (1664 cm ⁻¹)	50	44	5	18
CO hydraté (1637-1639 cm ⁻¹)	39	19	38	41
CO lié par une liaison H dans un feuillet β (1624-1625 cm ⁻¹)	6	10	42	26
CO lié par des liaisons H intermoléculaires (1615 cm ⁻¹)	-	-	15	15

Tableau 23 : Pourcentage de chaque contribution élémentaire de la bande amide I de SAB adsorbée sur un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L après immersion en NaCl, en NaCl + CaCl₂, en NaCl + MgCl₂ ou en EMA.

La bande amide I enregistrée sur un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L après immersion dans une solution NaCl ou dans une solution NaCl + CaCl₂ présente des contributions entre 1684 et 1625 cm⁻¹ avec un pic principal à 1664 cm⁻¹ correspondant à une structure en hélice α .

La bande amide I enregistrée sur un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L immergé dans une solution contenant du magnésium présente des contributions entre 1664 et 1615 cm⁻¹ avec un pic principal à 1637 - 1625 cm⁻¹ correspondant à une structure en feuillets β . Notons qu'une fraction de protéines semble liée entre elles par des liaisons H pour former des agrégats. Nous reviendrons plus loin sur l'attribution de ce pic centré à 1615 cm⁻¹ et discuterons d'un autre type d'interactions intermoléculaires possibles.

Il existe donc un effet très important du magnésium sur l'intensité et la position du signal infra-rouge caractéristique de la SAB. Il est à noter qu'en eau de mer artificielle le nombre de moles de magnésium est 2,5 fois plus grand que le nombre de moles de calcium. On peut donc se demander si l'effet de l'ion calcium serait le même que celui observé pour le magnésium à même concentration. L'adsorption de la SAB est maintenant réalisée dans deux solutions, l'une où le nombre de moles de calcium est égal à celui du magnésium en eau de mer artificielle ($n = 25 \cdot 10^{-3}$ mol/L, spectres en vert foncé) et l'autre où le nombre de moles de magnésium est égal à celui du calcium en eau de mer artificielle ($n = 10 \cdot 10^{-3}$ mol/L spectres en

bleu foncé). Les spectres infra-rouge enregistrés sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L après immersion dans des solutions NaCl + CaCl₂ ou NaCl + MgCl₂ sont présentés sur la Figure 40.

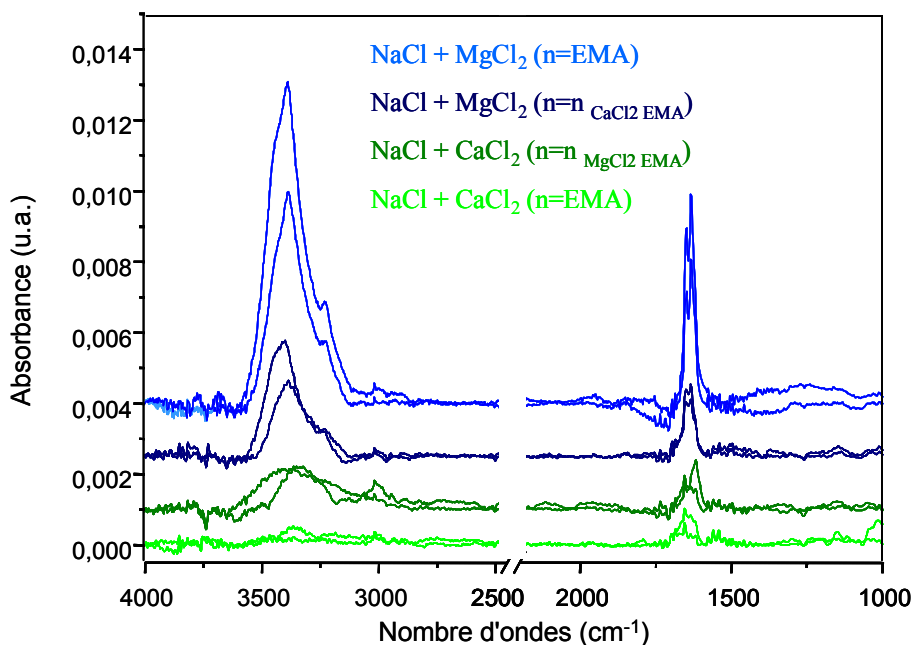


Figure 40 : Spectres IRRAS d'échantillons d'acier inoxydable AISI 316L après une immersion de 24 heures dans des solutions NaCl + CaCl₂ et NaCl + MgCl₂ de concentrations variables contenant 20 mg/L de SAB puis rinçage en solutions salines.

Lorsque le nombre de moles de magnésium est diminué d'un facteur 2,5, les intensités de la bande amide I et de la bande attribuée aux vibrations νNH diminuent d'un facteur 3. Au contraire, l'intensité de la bande amide I ne varie pas lorsque le nombre de moles de calcium augmente.

En résumé, pour un même nombre de moles de calcium et de magnésium, deux cas se présentent :

- à faible concentration en cations divalents, l'aire de la bande amide I varie peu avec la nature du cation,
- à forte concentration en cations divalents, l'aire de la bande amide I est 4 fois plus grande après immersion dans une solution NaCl + MgCl₂ que dans une solution NaCl + CaCl₂.

Ces résultats mettent en évidence un comportement différent des deux cations qui sera discuté plus tard.

Afin de mettre en évidence l'effet du rinçage et plus particulièrement des sels contenus dans la solution de rinçage sur la quantité de protéines adsorbées, l'aire de la bande amide I mesurée sur un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L après immersion dans des solutions salines contenant 20 mg/L de SAB et rinçage soit en eau milliQ, soit en solution saline est présentée sur la Figure 41.

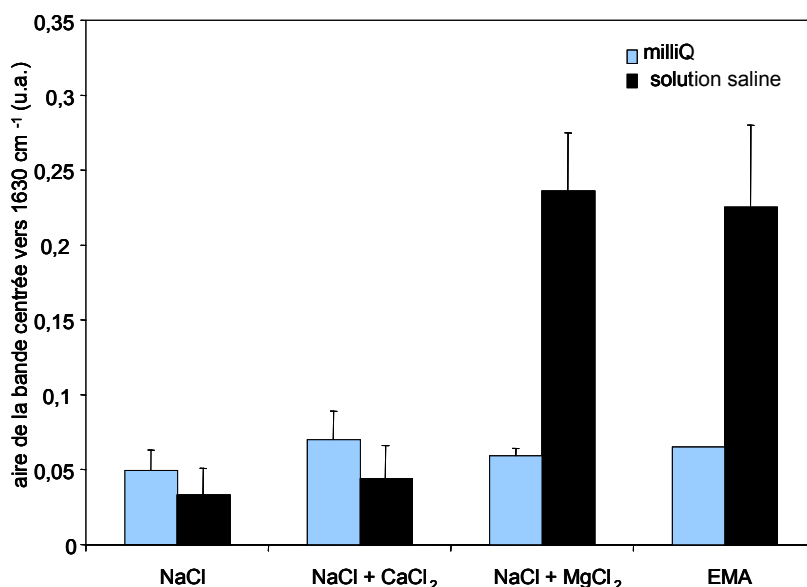


Figure 41 : Aires de la bande amide I sur un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L après 24 heures d'immersion en solution saline puis rinçage en solution saline ou en eau milliQ.

Le type de rinçage n'a aucune influence sur l'aire de la bande amide I après immersion dans des solutions NaCl et NaCl + CaCl₂. Au contraire, l'aire de la bande amide I diminue d'un facteur 5 après un rinçage en eau milliQ par rapport au rinçage dans les solutions salines lorsque l'immersion est réalisée en NaCl + MgCl₂ ou en eau de mer artificielle.

Notons qu'une dizaine de séries d'expériences IRRAS sur l'effet des sels a été effectuée, chaque série conduisant aux mêmes conclusions quant à l'effet promoteur du magnésium. Néanmoins, d'une série à l'autre, nous avons remarqué un certain écart sur l'aire de la bande amide I ; le mode de séchage des échantillons, difficilement parfaitement reproductible, semblant agir sur la largeur de la bande amide I [143], peut être une des causes de cet écart.

Caractérisation des surfaces par XPS.

L'analyse XPS d'échantillons d'acier inoxydable AISI 316L après immersion dans une solution d'eau de mer artificielle contenant 20 mg/L de SAB et rinçage en eau de mer artificielle montre la présence des mêmes éléments chimiques qu'après un rinçage en eau

milliQ, mais dans des quantités différentes, comme indiqué sur la Figure 42 et dans le Tableau 24.

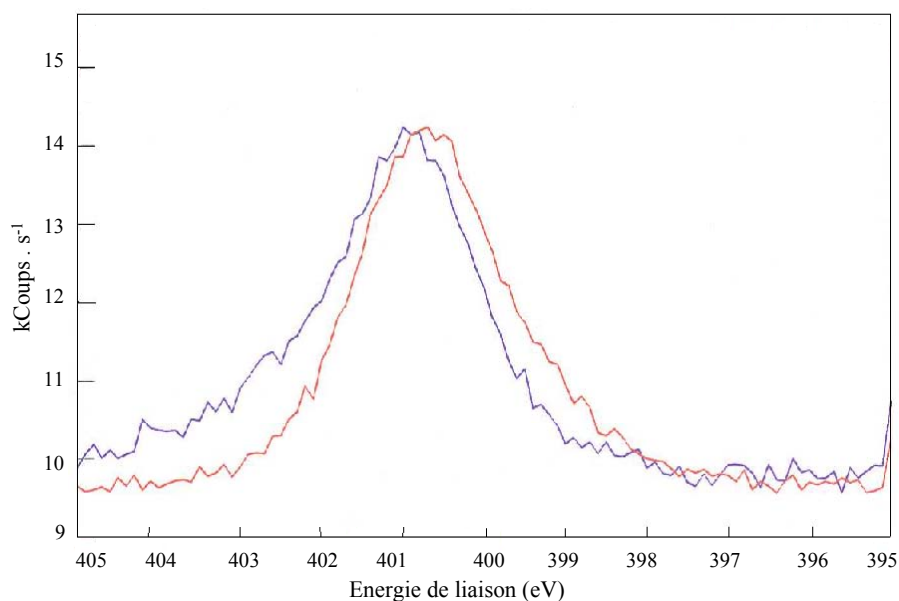


Figure 42 : Spectre N 1s après 24 heures d'immersion d'un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L dans une solution de SAB dissoute en eau de mer artificielle puis rincées en eau milliQ (rouge) ou en eau de mer artificielle (bleu).

Solution d'immersion	SAB en EMA rincé EMA	SAB en EMA rincé eau milliQ
Pics XPS		
Na 1s	1494	944 / 1066
Cl 2p _{3/2}	9473	1084 / 1174
Ca 2p _{3/2}	364	166 / 306
Mg KLL	5546	686 / 716
N 1s	3416	4723 / 5677
(Fe 2p _{3/2} + Cr 2p _{3/2})	1719	5564 / 6866
N 1s / Mg KLL ($\theta = 90^\circ$)	0,6	6,9 / 7,9
N 1s / Mg KLL ($\theta = 45^\circ$)	0,5	6 / 7,2
N 1s / Ca2p _{3/2} ($\theta = 90^\circ$)	9,3	18,6 / 28,4
N 1s / Ca 2p _{3/2} ($\theta = 45^\circ$)	4,2	12,1 / 26,3

Tableau 24 : Intensités normalisées (cps.eV.s^{-1}) des pics des espèces chimiques adsorbées sur un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L après adsorption de SAB en eau de mer artificielle puis rinçage en eau de mer artificielle ou en eau milliQ.

Après un rinçage en eau de mer artificielle, l'intensité normalisée de tous les pics relatifs aux sels augmente fortement comparativement à un rinçage en eau milliQ, les augmentations les plus importantes étant celles des pics Cl 2p_{3/2} et Mg KLL (facteur 8). Des sels sont donc probablement déposés sur l'échantillon. Dans un même temps, l'intensité des pics relatifs aux métaux diminue d'un facteur 3,7 alors que l'intensité du signal N1s ne diminue que d'un facteur 1,5.

L'atténuation des pics relatifs aux métaux après un rinçage en eau de mer artificielle est due à la présence d'une couche protéique adsorbée, mais aussi aux sels déposés sur la surface de l'échantillon. Ces sels ne forment pas une couche continue car les signaux des protéines et les signaux métalliques seraient alors beaucoup plus fortement atténués. Notons que nous ne pouvons pas exclure une atténuation des signaux relatifs à la protéine par ces sels.

Le rapport N 1s/Mg KLL varie peu quand l'angle d'analyse passe de 90° à 45°, indiquant qu'après rinçage en eau saline les cations magnésium et l'azote sont en moyenne au même niveau dans la couche adsorbée. La légère variation du rapport N 1s/Ca 2p, suivant l'angle d'analyse, semble indiquer que le calcium est au dessus de l'azote. Du CaCl₂ serait donc déposé sur les protéines. Le calcium et le magnésium semblent donc avoir des rôles différents dans l'adsorption de la couche protéique.

Dosage chimique de la SAB adsorbée.

Les résultats de dosages effectués après immersion d'échantillons d'acier inoxydable AISI 316L dans des solutions salines contenant 20 mg/L de SAB et rinçage par ces mêmes solutions dénuées de composés organiques sont présentés dans le Tableau 25.

	NaCl	NaCl + CaCl ₂	NaCl + MgCl ₂	EMA
Masse de SAB adsorbée (µg/cm ²)	0,023 ± 0,001	0,027 ± 0,003	0,032 ± 0,009	0,021 ± 0,002

Tableau 25 : Dosage des protéines adsorbées sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L immergés dans des solutions salines et rincés par des solutions salines (moyenne et écart-type calculés à partir de 3 expérimentations indépendantes).

Les masses de SAB dosées, après immersion d'échantillons d'acier inoxydable AISI 316L dans des solutions de SAB à 20 mg/L, varient peu avec le type de solution utilisée. Ce résultat est à première vue en contradiction avec les analyses de surface qui faisaient apparaître une plus forte quantité de SAB adsorbée quand l'adsorption avait lieu en présence de magnésium. Ce point sera discuté plus loin.

2.2.3. Discussion.

Après immersion des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L dans les solutions salines puis rinçage soit en eau milliQ soit en eau saline, les analyses de surface par IRRAS et par XPS ont montré la présence d'un film organique adsorbé très dépendant de la solution d'adsorption et du mode de rinçage utilisé.

Après rinçage en eau milliQ.

Les résultats obtenus par IRRAS montrent que l'aire de la bande amide I est constante quelle que soit la solution d'adsorption. Les rapports d'intensité des bandes amide I/ amide II proches de 2,1 suggèrent que les protéines ont globalement une structure tertiaire en hélice α quelle que soit la solution dans laquelle elles sont dissoutes [131].

Les résultats obtenus par XPS confirment l'existence d'un film de protéines, mince ou recouvrant uniquement une fraction de la surface, qui évolue un peu en fonction du milieu d'immersion. Dans l'hypothèse d'une monocouche continue adsorbée, les faibles valeurs d'épaisseur équivalente de monocouches calculées d'après les résultats XPS, comprises entre 3,9 et 16,9 Å (moyenne de l'ordre de 10 Å), sont inférieures aux valeurs de la littérature obtenues à partir de mesures AFM effectuées sur du mica [144] ou sur une surface de silice [42]. L'hypothèse d'une monocouche adsorbée semble donc peu probable, laissant alors penser que l'adsorption de la SAB sur l'acier inoxydable a lieu par petits amas. Les mesures Tof-SIMS, effectuées dans le cadre du groupe BASIS, ont d'ailleurs indiqué que l'adsorption de SAB sur un acier inoxydable est hétérogène, ce qui renforce la conclusion selon laquelle l'adsorption des protéines ne conduit pas à une monocouche continue. Quelle que soit la solution d'immersion, le film organique formé est hétérogène, composé de petits amas protéiques, recouvrant au maximum 55% de la surface dans le cas d'une adsorption dans une solution de NaCl + MgCl₂ (entre 32 et 42% en eau de mer artificielle).

Les résultats IRRAS et XPS nous amènent à discuter les modes de liaison possibles de la SAB avec l'acier inoxydable AISI 316L.

Les résultats XPS, obtenus après immersion d'un échantillon d'acier inoxydable dans une solution saline dépourvue de molécules organiques, ont montré que la couche externe du film passif est constituée d'hydroxydes de fer et de chrome, sur lesquels des cations

monovalents (sodium) divalents (calcium et magnésium) et des anions (chlore et sulfate) sont adsorbés.

Les données bibliographiques mentionnent deux types de liaison possibles entre la SAB et un acier inoxydable : liaison entre un ion métallique et un oxygène d'une fonction carboxyle de la protéine [33, 37], liaisons H entre les hydroxyles de surface et un oxygène d'une fonction carboxyle de la protéine [145]. Aucune donnée, à notre connaissance, n'implique les fonctions amines dans l'adsorption des macromolécules organiques ; Compère *et al.* [146] indiquent qu'une fonction CH_3NH_3^+ s'adsorbe très peu sur un oxyde de chrome. Aucun résultat ne permettant de mettre en évidence l'implication des fonctions amines dans l'adsorption de la SAB (rappelons que les chaînes latérales aminées sont protonées à ce pH), nous ne discuterons pas ce mode de liaison. Nous proposons donc trois types d'interactions possibles entre la SAB et un acier inoxydable immergé en eau de mer :

- Liaison H entre un hydroxyle de surface et un oxygène d'une fonction carboxyle de la protéine,
- Liaison entre un cation divalent (calcium et magnésium) adsorbé et un oxygène d'une fonction carboxyle de la protéine,
- Liaison entre les défauts de l'acier inoxydable, défauts formés en milieu salin par les piqûres dues aux chlorures ou à la protéine et laissant le métal (Me) sous forme M^{n+} , et un oxygène d'une fonction carboxyle de la protéine.

Après rinçage en eau saline.

L'adsorption de SAB dans des solutions salines suivie par un rinçage dans ces mêmes solutions dépourvues de SAB conduit à la formation d'un film protéique différent de celui observé après un rinçage en eau milliQ.

Les spectres IRRAS ne montrent aucune modification de l'intensité de la bande amide I après immersion en NaCl et NaCl + CaCl₂ alors qu'une très nette influence du mode de rinçage est visible lorsque l'adsorption a lieu dans des solutions contenant du magnésium. Nous avons tout d'abord observé, avec les solutions contenant du magnésium, une augmentation d'un facteur 5 de l'intensité de la bande amide I, indiquant une plus grande quantité de SAB adsorbée en présence de ce cation. Cette variation peut néanmoins correspondre à une augmentation moindre de la quantité de protéine, la présence de cations au voisinage des groupements C=O créant un champ électrique local qui pourrait amplifier l'intensité de la bande amide I.

L'augmentation de l'aire de la bande amide I, caractéristique des protéines, s'accompagne d'un déplacement de celle-ci vers les bas nombres d'onde, pouvant être due à la formation d'un complexe protéine-cation modifiant la conformation des protéines [129]. La déconvolution de la bande amide I a en effet montré une modification de la structure de la SAB adsorbée en fonction du type de cation présent. Le pic centré à 1615 cm^{-1} , présent uniquement après immersion dans les solutions de SAB contenant du magnésium, serait attribué à des protéines agrégées [32], les liaisons intermoléculaires étant formées par des liaisons H. Notons que cette interprétation provient de résultats obtenus à partir de SAB dissoute dans un tampon phosphate de faible force ionique. En eau de mer artificielle, solution de forte force ionique contenant des cations divalents, l'agrégation des protéines serait plutôt due à des liaisons intermoléculaires impliquant les cations divalents. Cette remarque est confirmée par les résultats XPS, montrant les cations magnésium et l'azote au même niveau. Nous ne pouvons néanmoins pas exclure la possibilité de liaisons H formées entre deux macromolécules.

La structure de la couche protéique peut donc être décrite de la sorte :

- en absence de magnésium, le film protéique a majoritairement une structure en hélice α
- en présence de magnésium, le film protéique a majoritairement une structure en feuillets β , une certaine proportion de macromolécules (15% selon le Tableau 23) formant des agrégats.

Un effet différent du calcium et du magnésium a pu être mis en évidence, à partir des résultats obtenus après immersion dans des solutions de concentrations variables en cations. Ainsi, l'augmentation du nombre de moles de calcium (celui-ci étant alors identique à celui du magnésium en eau de mer artificielle) n'entraîne, à la différence du magnésium, qu'une très faible augmentation de l'aire de la bande amide I. Nous avons vu précédemment que le magnésium participe à l'élaboration de la multicouche et que le calcium est plutôt au dessus de la couche adsorbée. Nous émettons donc deux hypothèses basées sur la taille des cations afin d'expliquer leur rôle plus ou moins cohésif :

- La cohésion de la couche formée en présence de magnésium est plus forte qu'avec le calcium, le rayon ionique du magnésium (0,066 nm) étant plus petit que celui du calcium (0,1 nm) (la liaison formée entre la SAB et le magnésium est alors plus forte).

- Selon les données bibliographiques, la SAB possède les mêmes sites de fixation pour les cations magnésium et calcium à $\text{pH} = 7$, sans que l'on connaisse précisément leur nature [58]. On sait aussi qu'à $\text{pH} > 8$ une modification structurale de la SAB a lieu [40, 41]. Il se peut donc qu'à faible concentration en cations, le calcium et le magnésium se lient à une première série de sites accessibles aux deux cations (les aires des bandes amide I sont similaires et légèrement plus importantes qu'en NaCl). A plus forte concentration en cations, seul le magnésium peut se lier à une seconde série de sites non accessibles au calcium. Cette hypothèse repose, comme la première, sur un effet stérique lié aux cations, et suppose que les cations divalents se lient à la SAB sur des sites de fixation bien définis.

Par ailleurs, les analyses XPS indiquent que des sels sont déposés de façon hétérogène sur l'acier inoxydable. Ces amas participent à l'atténuation des signaux métalliques et peut-être à l'atténuation des signaux relatifs aux protéines. Une faible diminution du signal d'azote est d'ailleurs mesurée en XPS, alors qu'une augmentation de l'aire de la bande amide I est observé en IRRAS. Cette apparente contradiction peut être due au fait que l'XPS ne permet l'analyse que de la couche la plus superficielle (dans ce cas précis l'épaisseur de la couche adsorbée est supérieure à 10 nm). Ainsi, l'adsorption des protéines en multicouches ne peut être quantifiée en XPS à cause de l'épaisseur des amas protéiques adsorbés et de la fine couche de sels déposée sur ces amas.

Les dosages ne montrent pas d'évolution de la quantité de SAB adsorbée. Ceci est en contradiction avec les résultats obtenus par infra-rouge et nous amène à discuter les résultats obtenus par ce type de dosage. Nous avons évoqué dans le paragraphe 1.3. les problèmes liés au mode de récupération/dialyse/lyophilisation, induisant la perte d'une grande partie du matériel organique. Il est aussi probable qu'on ne décroche pas l'intégralité du film adsorbé. La perte de matériel organique est peut être si importante qu'elle ne permet pas de mettre en évidence de faibles variations de masse de SAB adsorbée.

La comparaison des rinçages eau saline / eau milliQ indique que le second type de rinçage enlève une partie des espèces adsorbées, laissant sur l'échantillon une fraction de monocouche protéique. Cette première couche adsorbée subit, selon la bibliographie existante, un réarrangement structural permettant un plus grand nombre de liaisons entre la

protéine et le substrat et aurait donc une conformation différente de celle en solution [35, 44] et dépendante de l'hydrophobicité du substrat (les protéines sont étalées sur des substrats hydrophobes et regroupées sur des substrats hydrophiles) [35].

Selon notre étude, l'acier inoxydable AISI 316L est moyennement hydrophile (moins hydrophile que le verre, mais beaucoup plus que le PTFE). L'adsorption de la SAB sur des fonctions hydroxyles des métaux, mais aussi sur des cations divalents et sur des ions métalliques induit un réarrangement créant une structure plus hydrophobe (hélice α) que celle existante en solution. Les résultats XPS après rinçage en eau milliQ nous ont d'ailleurs montré que les cations divalents étaient plutôt au dessus de cette monocouche.

Après rinçage en eau saline, lorsque les solutions contiennent du magnésium, le film organique adsorbé est sous forme de multicouches, la couche la plus externe ayant selon les données bibliographiques une conformation proche de celle en solution [35, 44, 147]. Ces résultats nous indiquent donc que la couche la plus externe possède principalement une structure en feuillets β , une partie des protéines étant sous forme d'agrégats. Ceci nous incite à penser que les protéines en solution ont très probablement une structure en feuillets β , ces résultats étant en accord avec ceux de Qing *et al.* qui ont mis en évidence que la SAB adoptait une structure en feuillets β en présence de cations Zn^{2+} et Cd^{2+} , et que le zinc se liait à la SAB plus fortement que le cadmium, à cause de son plus petit rayon ionique (0,074 nm pour le zinc et 0,11 nm pour le cadmium) [57].

Les résultats IRRAS et XPS indiquent que les cations magnésium participent à l'élaboration de cet amas protéique en favorisant les liaisons entre les molécules. En eau de mer artificielle, l'adsorption protéique s'effectue donc en deux étapes : adsorption d'une monocouche de SAB dont la structure est en hélice α suivie de l'adsorption d'une seconde couche protéique dont la structure est en feuillet β , une partie des protéines étant liées entre elles par les ions magnésium.

Un schéma d'adsorption en eau de mer peut alors être proposé sur la Figure 43 :

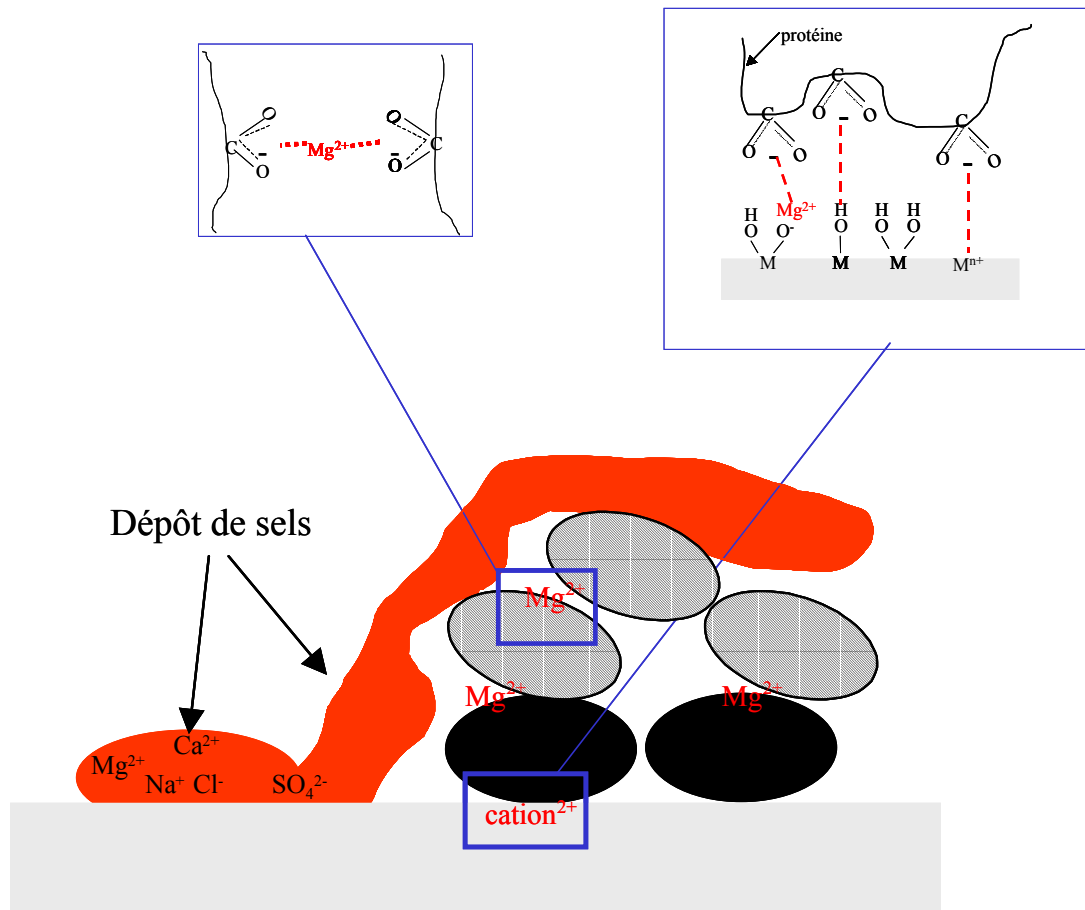


Figure 43 : Schéma d'adsorption de la SAB sur un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L (molécules noires : SAB présentant une structure en hélice α , molécules hachurées : SAB présentant une structure en feuillet β).

Ainsi, après cette étude sur l'adsorption de la SAB et le rôle de deux cations divalents (le calcium et le magnésium) sur la structure de ce film organique, nous allons nous intéresser à l'influence de ces mêmes cations sur l'adsorption d'un polymère bactérien.

2.3. Effet du Magnésium et du Calcium sur l'adsorption du PolA.

2.3.1. Adsorption du PolA dans des solutions salines suivie d'un rinçage en eau milliQ.

Analyse des surfaces par IRRAS.

Des spectres IRRAS d'échantillons d'acier inoxydable AISI 316L après une immersion de 24 heures dans des solutions salines contenant 20 mg/L de polA et rinçage en eau milliQ sont présentés sur la Figure 44.

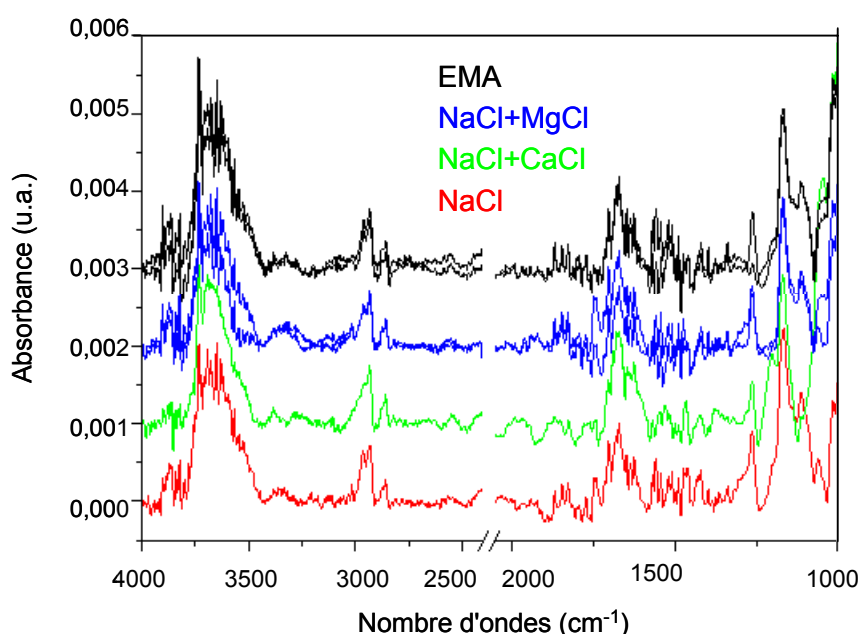


Figure 44 : Spectres IRRAS d'échantillons d'acier inoxydable AISI 316L après 24 heures d'immersion en solution saline contenant 20 mg/L de polA puis rinçage en eau milliQ.

Quelle que soit la solution d'adsorption, le spectre présente plusieurs pics caractéristiques du polA centrés à 3600 cm^{-1} , 2900 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} et un massif entre 1200 et 1000 cm^{-1} correspondant respectivement aux vibrations νOH de fonctions alcools, $\nu_{\text{asym}}\text{CH}$ et $\nu_{\text{sym}}\text{CH}$ de fonctions CH_2 et CH_3 , au νCOO^- d'acides carboxyliques et νCO de fonctions alcools ou esters. Les bandes fines présentes vers 3600 cm^{-1} et entre 1700 et 1500 cm^{-1} sont dues à la présence de vapeur d'eau sur le trajet optique.

L'évolution de l'aire de la bande centrée à 1650 cm^{-1} en fonction de la solution d'adsorption est présentée sur la Figure 45.

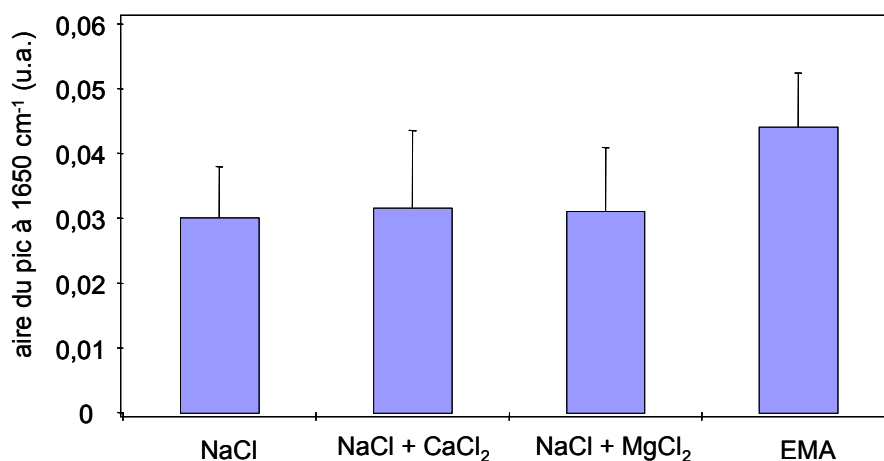


Figure 45 : Aire de la bande centrée à 1650 cm⁻¹ après immersion d'échantillons d'acier inoxydable AISI 316L en solution saline contenant 20 mg/L de polA puis rinçage en eau milliQ.

L'aire de la bande caractéristique du polymère varie peu avec la nature de la solution d'immersion. Il en est de même pour le massif centré entre 1200 et 1000 cm⁻¹ (résultats non présentés ici).

Analyse des surfaces par XPS

Les spectres XPS d'échantillons d'acier inoxydable AISI 316L après immersion en solution saline puis rinçage en eau milliQ présentent des pics des éléments caractéristiques de la surface solide (Fe 2p_{3/2}, Cr 2p_{3/2} et O 1s), de la solution d'adsorption (Na 1s, Cl 2p, Mg KLL et Ca 2p, S 2p) et du polA (O 1s, C 1s). Le pic N1s observé à 400 eV provient selon toute vraisemblance, et comme précédemment évoqué, d'une contamination du polymère par des groupement amines. La déconvolution du pic de carbone a montré la présence de contributions à haute énergie de liaisons : C-OH à 286,6 eV ; C=O à 287,3 eV et COOH à 289,4 eV caractéristiques du polA. La somme des intensités de ces pics élémentaires sera utilisée pour suivre la quantité de polA adsorbé en fonction des solutions d'adsorption (Figure 46).

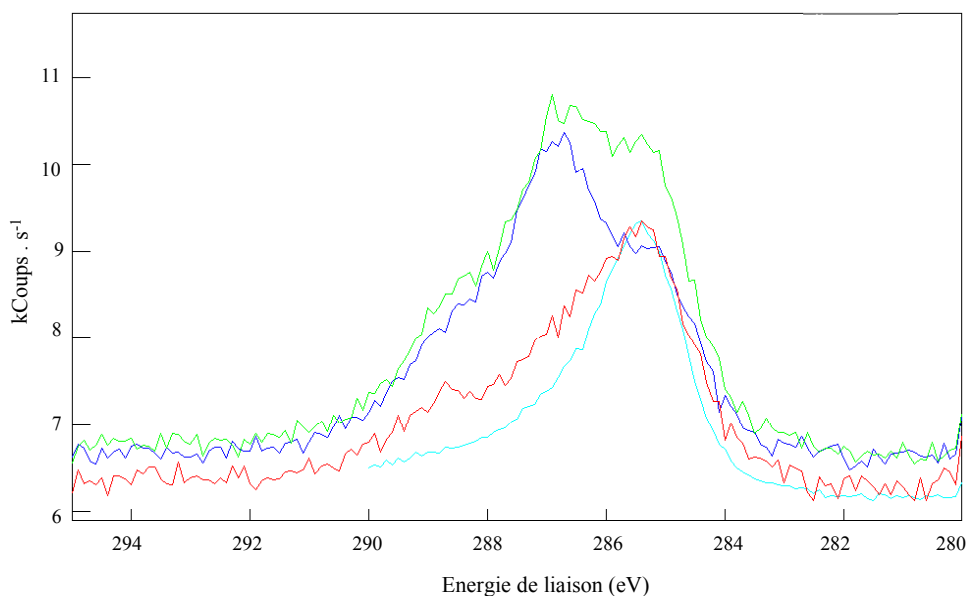


Figure 46 : Spectre de C 1s après 24 heures d'immersion d'un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L dans une solution de polA dissout en solution saline (rouge : NaCl ; vert : NaCl+ CaCl₂ ; bleu :NaCl + MgCl₂ ; cyan : EMA) et rinçage en eau milliQ.

L'analyse de la surface et en particulier les rapports $\Sigma\text{CO}/\text{Ca}$ et $\Sigma\text{CO}/\text{Mg}$ à deux angles d'analyse (90° et 45°) nous permettra de situer les cations calcium et magnésium par rapport à la macromolécule adsorbée. Le Tableau 26 présente ces différents résultats.

	NaCl	NaCl + CaCl ₂	NaCl + MgCl ₂	EMA*
$\Sigma\text{CO}, \theta = 90^\circ$	3518	7103	7897	6055 / 9295
(Fe 2p _{3/2} + Cr 2p _{3/2}), $\theta = 90^\circ$	10334	9838	9793	8263 / 7362
$\Sigma\text{CO}/\text{Mg}, \theta = 90^\circ$	-	-	47,7	1,3 / 5,7
$\Sigma\text{CO}/\text{Mg}, \theta = 45^\circ$	-	-	44,1	3,1 / 5,1
$\Sigma\text{CO}/\text{Ca}, \theta = 90^\circ$	-	25,3	-	15,7 / 20,1
$\Sigma\text{CO}/\text{Ca}, \theta = 45^\circ$	-	24,8	-	9,9 / 13,1

Tableau 26 : Analyse XPS d'échantillon d'acier inoxydable AISI 316L après immersion dans des solutions salines et rinçage en eau milliQ à deux angles d'analyse (cps.eV.s⁻¹), *les fortes différences observées pour toutes les intensités entre deux échantillons sont dues à des conditions d'analyse différentes.

Les contributions du carbone attribuées au polA augmentent d'un facteur proche de 2 lorsque l'adsorption a lieu dans les solutions contenant les cations divalents, calcium et/ou magnésium.

Après immersion en eau de mer artificielle, le rapport $\Sigma\text{CO}/\text{Ca}$ est légèrement plus élevé à 90° qu'à 45°, signifiant que le calcium est en moyenne légèrement au dessus du polymère. Le rapport $\Sigma\text{CO}/\text{Mg}$ ne varie pas sensiblement ; les cations magnésium et le polymère sont donc globalement au même niveau.

Le taux de recouvrement, f , ou l'épaisseur, d , d'une couche continue et homogène de polymère adsorbé sur un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L sont estimés à partir des équations 6 et 7 du paragraphe 2.2.1. Les résultats de ces deux calculs sont présentés dans le Tableau 27.

	NaCl	NaCl + CaCl₂	NaCl + MgCl₂	EMA
I_s^0	10775	10931	12717	10078
I_s	10334	9838	9793	8263 / 7362
f en %	4	10	23*	18 / 27
d (Å)	0,9	2,3	5,6*	4,3 / 6,8

Tableau 27 : Taux de recouvrement (f) et épaisseur équivalente de la monocouche adsorbée (d) ; * valeurs probablement légèrement surestimées car I_s^0 après 24 heures d'immersion en NaCl + MgCl₂ est étonnamment élevé par rapport aux autres valeurs.

Notons qu'une seule analyse a été effectuée pour la majorité des échantillons analysés par XPS. On peut donc estimer au vu des deux résultats obtenus après immersion en eau de mer artificielle, qu'une incertitude de l'ordre de 20% existe sur les valeurs d'intensité des substrats. Avec ces précautions, les résultats XPS indiquent que le recouvrement de la surface par le polymère est environ 1,5 fois plus faible qu'après immersion dans une solution de SAB. Ces résultats sont en accord avec les résultats infra-rouge montrant que peu de polymères sont adsorbés sur un échantillon après un rinçage en eau milliQ (cf figure 44).

2.3.2. Adsorption du polA dans les solutions salines et rinçage en eau saline.

Analyse des surfaces par IRRAS

La Figure 47 présente les spectres IRRAS d'échantillons d'acier inoxydable AISI 316L après une immersion de 24 heures dans des solutions salines contenant du polA et rinçage par ces mêmes solutions dépourvues de polA.

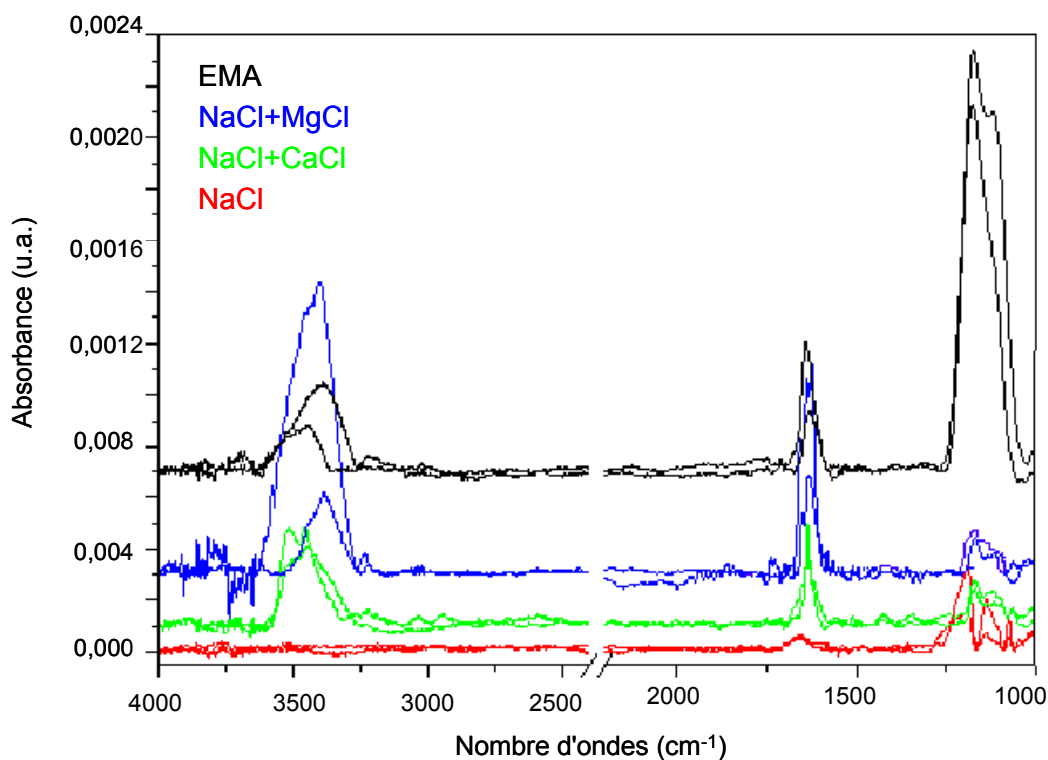


Figure 47 : Spectre IRRAS d'échantillons d'acier inoxydable AISI 316L après immersion en solution saline contenant 20 mg/L de polA et rinçage en solution saline.

Une très forte augmentation de l'intensité de la bande correspondant aux groupements carboxylates est observée lorsque le polA est dissous dans une solution NaCl + CaCl₂. Cette intensité est encore augmentée en présence de magnésium ; elle est alors identique à celle mesurée en eau de mer artificielle. Il en est de même pour le massif situé entre 3700 et 3250 cm⁻¹.

Le massif situé entre 1250 et 1000 cm⁻¹, attribué aux groupements hydroxyles et esters du polA, augmente brutalement lorsque l'adsorption est effectuée en eau de mer artificielle. Cette forte augmentation est en réalité probablement due à la présence de sulfates adsorbés et déposés après le rinçage en eau de mer artificielle. (ν_{SO} dans SO₄²⁻ : 1150-1080 cm⁻¹).

Notons que la bande attribuée à la vibration $\nu_{as}COO^-$ est déplacée vers les bas nombre d'ondes lorsque les solutions contiennent du calcium et/ou du magnésium comme indiqué dans le Tableau 28.

	Position de la bande attribuée au $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ (cm^{-1})
NaCl	1650 ± 1
NaCl + CaCl_2	1628 ± 1
NaCl + MgCl_2	1621 ± 5
EMA	1627 ± 5

Tableau 28 : Position de la bande attribuée au $\nu_{as}(\text{CO}_2^-)$ du polA adsorbé sur un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L après immersion dans des solutions salines contenant 20 mg/L de polA et rinçage par ces mêmes solutions salines dépourvues de polA.

Un déplacement de 25 cm^{-1} vers les bas nombres d'onde est observé dans le cas des solutions contenant du calcium et/ou du magnésium. Ceci peut être dû à un transfert d'électrons des groupements carboxyles déprotonés vers des cations divalents voisins affaiblissant la densité électronique de la liaison C=O. La difficulté accrue à dissoudre le polymère A en présence de calcium et de magnésium, observée lors de la préparation des solutions organiques, indique la formation d'un gel polymérique. Ce gel serait formé à l'aide des cations divalents.

Pour résumer, les aires infra-rouge de la bande attribuée aux fonctions carboxylates mesurées sur un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L après immersion dans des solutions salines contenant 20 mg/L de polA et rinçage soit en eau milliQ soit en solution saline sont présentées sur la Figure 48 afin de mettre en évidence l'effet du rinçage (effet des sels contenus dans la solution de rinçage sur la quantité de polymère adsorbé).

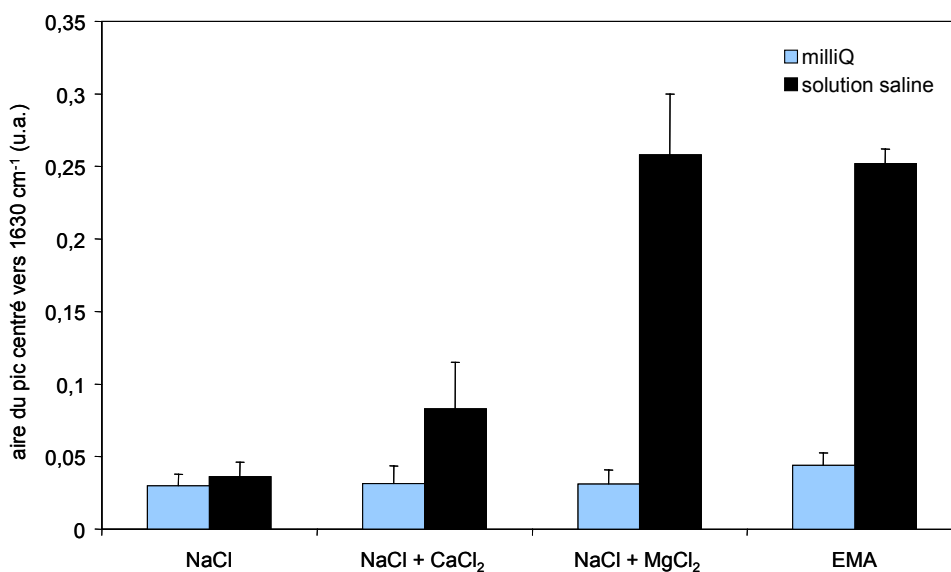


Figure 48 : Aires de la bande $\nu_{as}COO^-$ sur un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L après immersion en solution saline contenant 20 mg/L de polA puis rinçage en solution saline ou en eau milliQ.

Pour la solution NaCl, le type de rinçage n'a aucune influence sur l'aire de la bande attribuée aux fonctions carboxylates. Pour les solutions NaCl + CaCl₂, NaCl + MgCl₂ et EMA, cette aire diminue après un rinçage en eau milliQ par rapport au rinçage dans les solutions salines, les diminutions les plus importantes étant observées pour les solutions NaCl + MgCl₂ et EMA.

Analyse des surfaces par XPS

L'analyse XPS d'un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L, après 24 heures d'immersion dans une solution d'eau de mer artificielle contenant 20 mg/L de polA puis rinçage en eau de mer artificielle dénuée de polA, montre la présence des mêmes composés chimiques qu'après un rinçage en eau milliQ, mais dans des proportions différentes, comme indiqué dans le Tableau 29 et sur la Figure 49.

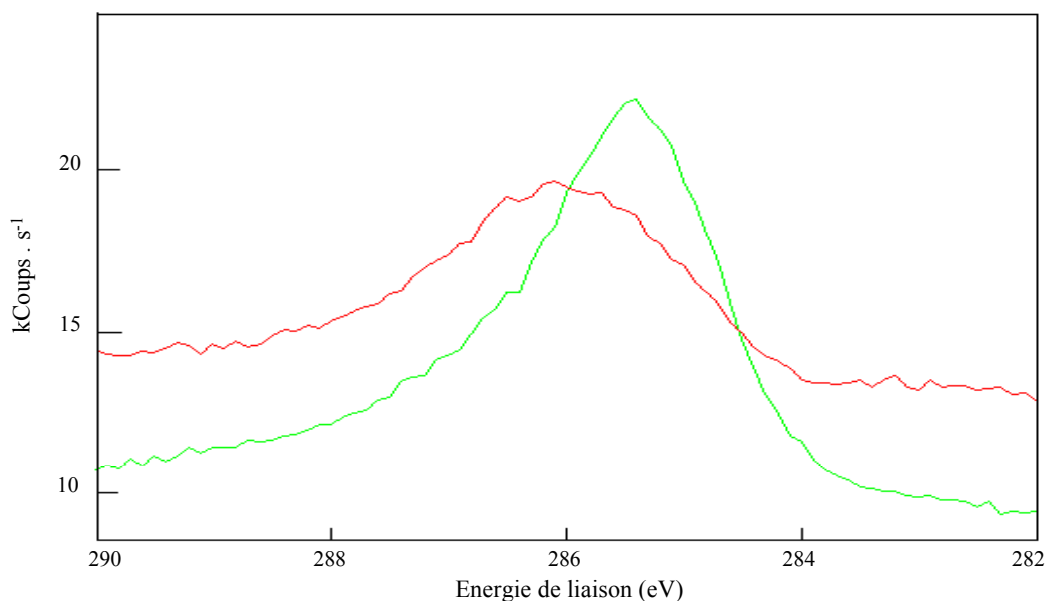


Figure 49 : Spectre de C 1s après 24 heures d'immersion d'un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L dans une solution d'eau de mer artificielle contenant 20 mg/l de polA et rinçage en eau milliQ (vert) ou en eau de mer artificielle (rouge).

Solutions	polA en EMA rincé EMA	polA en EMA rincé eau milliQ*
Pics XPS considérés		
Na 1s, $\theta=90^\circ$	3292	404 / 1012
Cl 2p _{3/2} , $\theta=90^\circ$	14548	1438 / 4468
Ca 2p _{3/2} , $\theta=90^\circ$	3069	284 / 568
Mg KLL, $\theta=90^\circ$	6653	709 / 3681
Σ CO, $\theta=90^\circ$	3669	6055 / 9265
(Fe 2p _{3/2} + Cr 2p _{3/2}), $\theta=90^\circ$	1029	10005 / 6626
Σ CO / Mg KLL ($\theta = 90^\circ$)	0,5	1,3 / 5,7
Σ CO / Mg KLL ($\theta = 45^\circ$)	0,2	3,1 / 5,1
Σ CO / Ca 2p _{3/2} ($\theta = 90^\circ$)	1,2	15,7 / 20,1
Σ CO / Ca 2p _{3/2} ($\theta = 45^\circ$)	0,5	9,9 / 13,1

Tableau 29 : Intensités normalisées (cps.eV.s⁻¹) des pics des espèces présentes sur un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L après adsorption de polA en eau de mer artificielle puis rinçage en eau de mer artificielle ou en eau milliQ. *Les fortes différences observées entre ces deux séries de valeurs sont dues à des conditions d'analyses différentes.

Après un rinçage en eau saline, l'intensité normalisée de tous les pics relatifs aux sels augmente fortement. Dans un même temps, l'intensité des pics relatifs aux métaux diminue d'un facteur 6 et ceux des macromolécules d'un facteur 2. L'atténuation des signaux des métaux ne peut donc être attribuée totalement aux macromolécules, mais est due aussi à la couche de sel déposée sur l'échantillon. Cette couche est hétérogène, puisque les signaux métalliques et les signaux du polymère ne sont pas du tout atténués de façon équivalente.

La légère variation du rapport $\Sigma\text{CO}/\text{Ca } 2p_{3/2}$ suivant l'angle d'analyse, semble indiquer que le calcium est au dessus du polymère (les rapports sont plus élevés à 90° qu'à 45°) ; le résultat est moins net pour le magnésium mais semble indiquer la même tendance.

Dosage chimique du polA adsorbé.

Les résultats de dosages effectués sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L après immersion dans des solutions salines contenant du polA et rinçage par ces mêmes solutions dénuées de composés organiques sont présentés dans le Tableau 30.

	NaCl	NaCl + CaCl ₂	NaCl + MgCl ₂	EMA
Quantité de polA adsorbée ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	$0,11 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,03$	$0,18 \pm 0,04$	$0,21 \pm 0,07$

Tableau 30 : Dosage des carbohydrates adsorbés sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L immergés 24 heures dans des solutions salines contenant 20 mg/L de polA et rincés par ces mêmes solutions salines (moyenne et écart-type calculés à partir de trois expérimentations).

Les masses de polA dosées, après immersion d'échantillons d'acier inoxydable AISI 316L dans des solutions de polA à 20 mg/L, augmentent légèrement en présence de cations divalents.

2.3.3. Discussion.

Après immersion des échantillons d'acier inoxydable dans différentes solutions salines et rinçage soit en eau milliQ, soit en solution saline, les analyses de surfaces par IRRAS et XPS ont montré, comme pour la SAB, la présence d'un film organique adsorbé.

Après rinçage en eau milliQ.

Les résultats obtenus par IRRAS suggèrent que la quantité de polymère adsorbée ne varie pas en fonction de la solution d'adsorption alors que les résultats obtenus par XPS montrent une légère augmentation du signal attribué au carbone organique après immersion

dans des solutions contenant du calcium et/ou du magnésium. La légère augmentation de la quantité de polA adsorbé observée par XPS peut ne pas être vue en IRRAS, les bandes observées étant relativement faibles.

Les résultats IRRAS et XPS nous amènent à discuter les modes de liaison possibles du polA avec l'acier inoxydable AISI 316L. L'adsorption de polysaccharides sur des oxydes métalliques implique soit les groupements carboxyles [148] soit les groupements hydroxyles des polymères [36]. La présence d'hydroxyles de fer et de chrome, de cations divalents adsorbés et éventuellement de défauts dans la couche passive (piqûres), sont autant de sites possibles d'adsorption pour un polymère :

- liaison entre deux hydroxyles voisins du polA et un cation métallique hydroxylé (élimination d'une molécule d'eau) [149] : type I.
- liaison entre un oxygène d'une fonction carboxyle du polA et le métal sous forme M^{n+} (forme due à une piqûre par les chlorures) : type II.
- liaison Hydrogène entre un hydroxyle de surface et un oxygène d'une fonction carboxyle du polA : type III.
- liaison entre un oxygène d'une fonction carboxyle et/ou hydroxyle du polA et un cation divalent adsorbé sur la surface solide, comme décrit en solution par Loaec [61] : type IV.

Après rinçage en eau saline.

Les résultats obtenus par IRRAS montrent une nette influence du calcium et du magnésium sur l'adsorption du polA, l'aire de la bande attribuée aux fonctions carboxyles augmentant respectivement d'un facteur 3 et 6 par rapport à une solution NaCl. L'augmentation en présence de calcium n'atteint pas celle observée en présence de magnésium, ceci étant probablement dû à la différence de concentration existant entre les deux cations (il y a 2,5 fois moins de calcium que de magnésium en solution). De même, les dosages de polA adsorbé ont montré une légère augmentation de la quantité de macromolécules adsorbées en présence des cations calcium et magnésium. Néanmoins, les analyses XPS effectuées après rinçage en eau de mer artificielle montrent une diminution des aires relatives au PolA (ΣCO) par rapport aux aires mesurées après un rinçage en eau milliQ. Ceci peut être expliqué par le fait que, dans le cas d'amas de macromolécules, l'XPS n'est

sensible qu'à la couche organique la plus superficielle, la couche épaisse de sels déposée sur l'échantillon et les macromolécules contribuant à l'atténuation des signaux.

Les résultats IRRAS ont par ailleurs montré que l'augmentation de la bande centrée à 1630 cm^{-1} est accompagnée d'un déplacement vers les bas nombres d'onde, indiquant des interactions entre les cations divalents et le polA [150]. Ces cations divalents au sein de la couche organique neutralisent les charges négatives du polymère et provoquent ainsi l'agrégation des macromolécules [140].

Contrairement à la complexation de la SAB avec les sels, nos résultats ont montré que le polA se lie au calcium et au magnésium. D'après les données bibliographiques, plus le rayon ionique des cations est grand, plus la complexation avec des polysaccharides anioniques, tels que les alginates, est favorisée [151]. Cependant, il existe des exceptions concernant la complexation des polysaccharides par des cations calcium et magnésium. En effet, les "gellanes" lient aussi bien les cations calcium que magnésium [137]. Au vu des résultats obtenus par IRRAS, nous pouvons conclure que le polymère A présente un comportement similaire au gellane. Les résultats obtenus par Loac *et al.* [61] montrent d'ailleurs un même taux de complexation du cadmium (97 pm) et du zinc (74 pm) dont les rayons ioniques sont comparables respectivement à ceux du calcium et du magnésium.

Les résultats IRRAS indiquent de plus que le rinçage en eau milliQ provoque une resuspension du polA en redissolvant les cations divalents et en cassant les liaisons formées entre calcium et/ou magnésium et le polA. Le polA s'adsorbe donc en multicouches en présence de cations divalents, ce résultat étant en accord avec ceux de Vermöhlen *et al.* [148] avec des polyélectrolytes (acides polyacryliques, acides humiques).

Un schéma d'adsorption du polA en eau de mer peut être proposé sur la Figure 50.

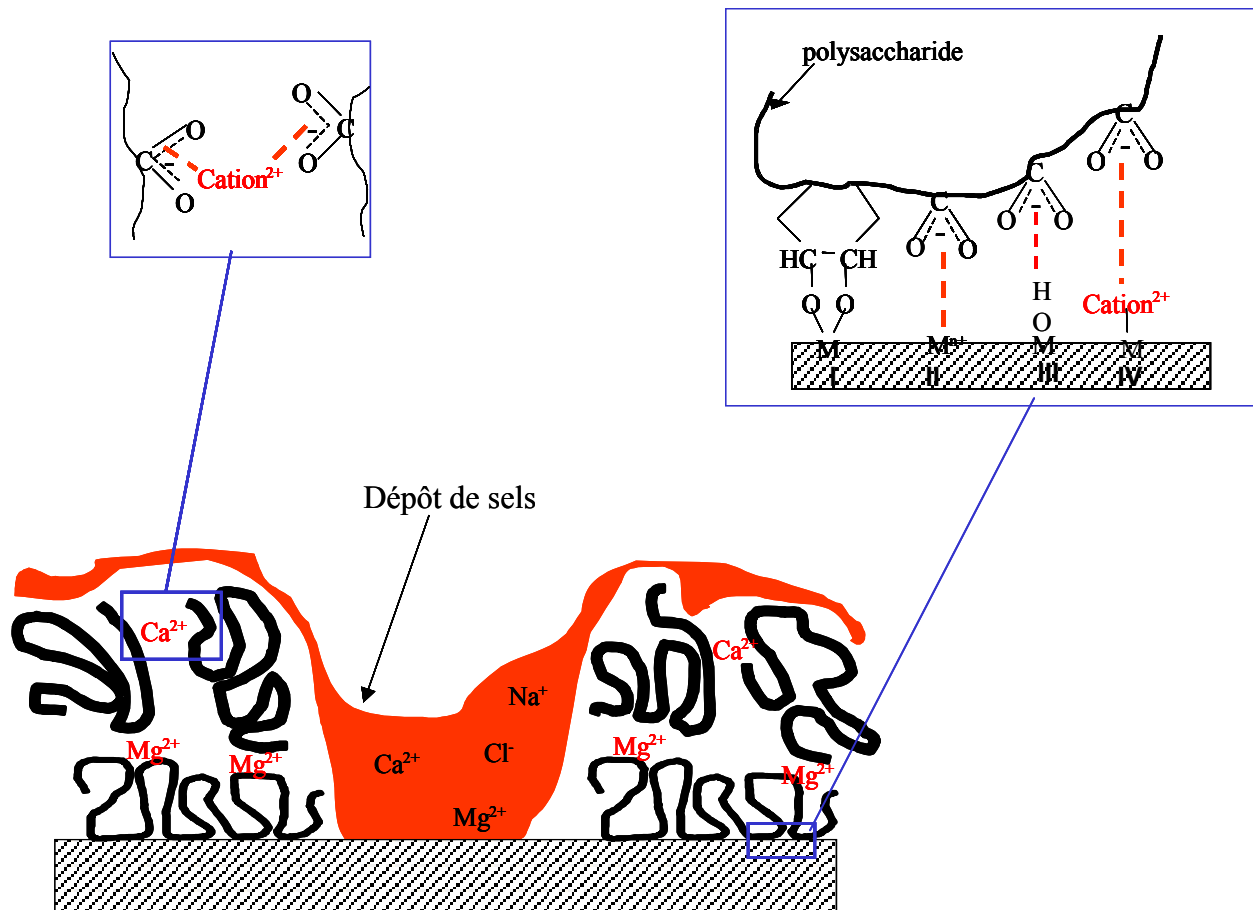


Figure 50 : Schéma d'adsorption du polA sur un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L immergé en eau de mer artificielle.

2.4. Conclusion.

Le film primaire formé en eau de mer naturelle est composé de protéines et de carbohydrates. L'étude menée dans ce chapitre nous a permis de mieux caractériser ce film, et de mettre en évidence l'importance des composants de l'eau de mer sur l'adsorption et la structure des macromolécules.

Quelle que soit la macromolécule étudiée nous avons pu mettre en évidence que l'adsorption des macromolécules s'effectue en multicouches organiques. La première couche semble être adsorbée sur l'acier inoxydable AISI 316L grâce à des liaisons formées entre une fonction carboxyle de la macromolécule et soit la surface, soit un magnésium ou un calcium adsorbé. Cette première couche organique est liée à une seconde à l'aide de cations divalents pontant les macromolécules entre elles, et formant ainsi une structure agrégative pour les protéines et un gel pour les polysaccharides (agrégation des polymères entre eux diminuant leur solubilité).

Pour ces deux macromolécules, nous avons observé un comportement différent. Tout d'abord le taux de recouvrement de l'acier inoxydable est plus faible avec le polymère qu'avec la protéine, respectivement de 23% et de 37% après 24 heures d'immersion d'un échantillon en eau de mer artificielle puis rinçage en eau milliQ. Nous avons aussi pu observer que seul le magnésium a la possibilité de se lier fortement à la SAB alors que calcium et magnésium peuvent se lier avec le polA.

En milieu naturel, ces mêmes cations divalents doivent permettre aux protéines et aux carbohydrates de former le film primaire en pontant les deux types de macromolécules entre elles. Cette caractérisation du film primaire n'a été possible que grâce à la corrélation de plusieurs techniques d'analyse des surfaces. L'infra-rouge et l'XPS ont fourni des informations sur la quantité de macromolécules adsorbées (monocouche uniquement pour l'XPS) ; de plus, l'IRRAS a permis la détermination de leur conformation et a mis en évidence la liaison des cations divalents avec les macromolécules, et l'XPS a procuré des renseignements sur la stratification des éléments au sein de la couche adsorbée et sur le caractère hétérogène du film organique.

Après une étude des propriétés de surface des bactéries pionnières nous essaierons de déterminer quelle influence ce film primaire peut avoir sur l'adhésion bactérienne.

CHAPITRE 4 : SELECTION ET CARACTERISATION DES BACTERIES PIONNIERES.

La caractérisation physico-chimique de bactéries marines pionnières est le deuxième point à étudier avant d'examiner les interactions entre le film primaire et ces dernières. Dans un premier temps, nous avons isolé et sélectionné des bactéries présentes en eau de mer naturelle dans les premières phases de formation du biofilm. Ces bactéries pionnières sont caractérisées par des techniques microbiologiques (coloration de gram, mobilité, courbes de croissance) puis par des techniques de physico-chimie des surfaces à l'aide de la MATS, de l'infra-rouge et de l'XPS.

1. Sélection des isolats : novembre 1998 - novembre 1999 (Micromer).

Des échantillons de PTFE, de verre et d'acier inoxydable AISI 316L sont immergés en eau de mer naturelle circulante et les bactéries adhérentes sont récupérées par écouvillonnage sur chaque type de matériau après 6 heures, 24 heures ou 48 heures d'immersion. Après étalement sur Marine Agar ou sur milieu PCA, milieu permettant la croissance de bactéries d'eau douce (Difco laboratories), les isolats les plus fréquemment rencontrés sur chaque matériau sont caractérisés à l'aide de tests microbiologiques classiques : détermination de leur morphologie et de leur mobilité par microscopie, observation de la pigmentation des colonies, coloration de gram, croissance à différentes températures, présence ou non de deux enzymes (catalase et oxydase) et croissance en milieu anaérobie (fermentation). Le Tableau 31 présente le pourcentage d'isolats arborant chacune de ces caractéristiques rapporté au total étudié (62 en 1998 et 47 en 1999).

La sélection des isolats bactériens pionniers étudiés dans cette thèse est effectuée à partir des résultats obtenus en Novembre 1998 [152]. Afin de vérifier la pertinence de nos choix et la reproductibilité de l'expérimentation, une étude similaire est aussi réalisée en Novembre 1999 [153].

	1998	1999
<i>Morphologie (bâtonnets)</i>	100 %	91,5 %
<i>Gram négatifs</i>	100 %	91,5 %
<i>Mobilité</i>	72,6 %	70,2 %
<i>Pigmentation</i>	12,9 %	19,1 %
<i>Croissance à 6°C</i>	83,9 %	63,8 %
<i>Croissance à 37°C</i>	43,5 %	55,3 %
<i>Croissance à 42°C</i>	12,9 %	19,1 %
<i>Croissance sur milieu PCA</i>	6 %	36 %
<i>Catalase positive</i>	98,4 %	95,7 %
<i>Oxydase positive</i>	72,6 %	61,7 %
<i>Capacité à effectuer la fermentation</i>	43,5 %	42,5 %

Tableau 31 : Caractéristiques microbiologiques des 62 isolats étudiés en 1998 et des 47 isolats étudiés en 1999 [152, 153].

Comme l'indique le Tableau 31, les caractéristiques des isolats prélevés en 1998 et en 1999 sont proches. Des populations bactériennes très voisines sont donc présentes en eau de mer naturelle lorsque les études sont effectuées à la même période de l'année.

On note cependant quelques différences : le pourcentage de bactéries en forme de bâtonnets, Gram négatives et mobiles est plus faible en 1999 qu'en 1998 ; le nombre de bactéries capables de se développer sur milieu PCA augmente en 1999 par rapport à 1998. Ces deux observations peuvent être expliquées par la présence de bactéries non marines parmi les micro-organismes récupérés. Ceci est probablement dû à une contamination bactérienne apportée par le crachin tombé en 1999 lors des expérimentations.

Les différents isolats sont ensuite analysés sur galeries biolog (Biolog cat#1001 GN Microplate, AES laboratories), galerie de tests biochimiques, et les résultats obtenus sont traités en taxonomie numérique afin de rapprocher les isolats ayant les mêmes caractéristiques biochimiques. La Figure 51 présente un dendrogramme récapitulatif des expérimentations de 1998 et 1999, les isolats testés en 1998 apparaissant en bleu et les isolats testés en 1999 en rouge. Une échelle reliant chaque isolat au temps de prélèvement et à la surface sur laquelle il a été prélevé est présentée en vis à vis.

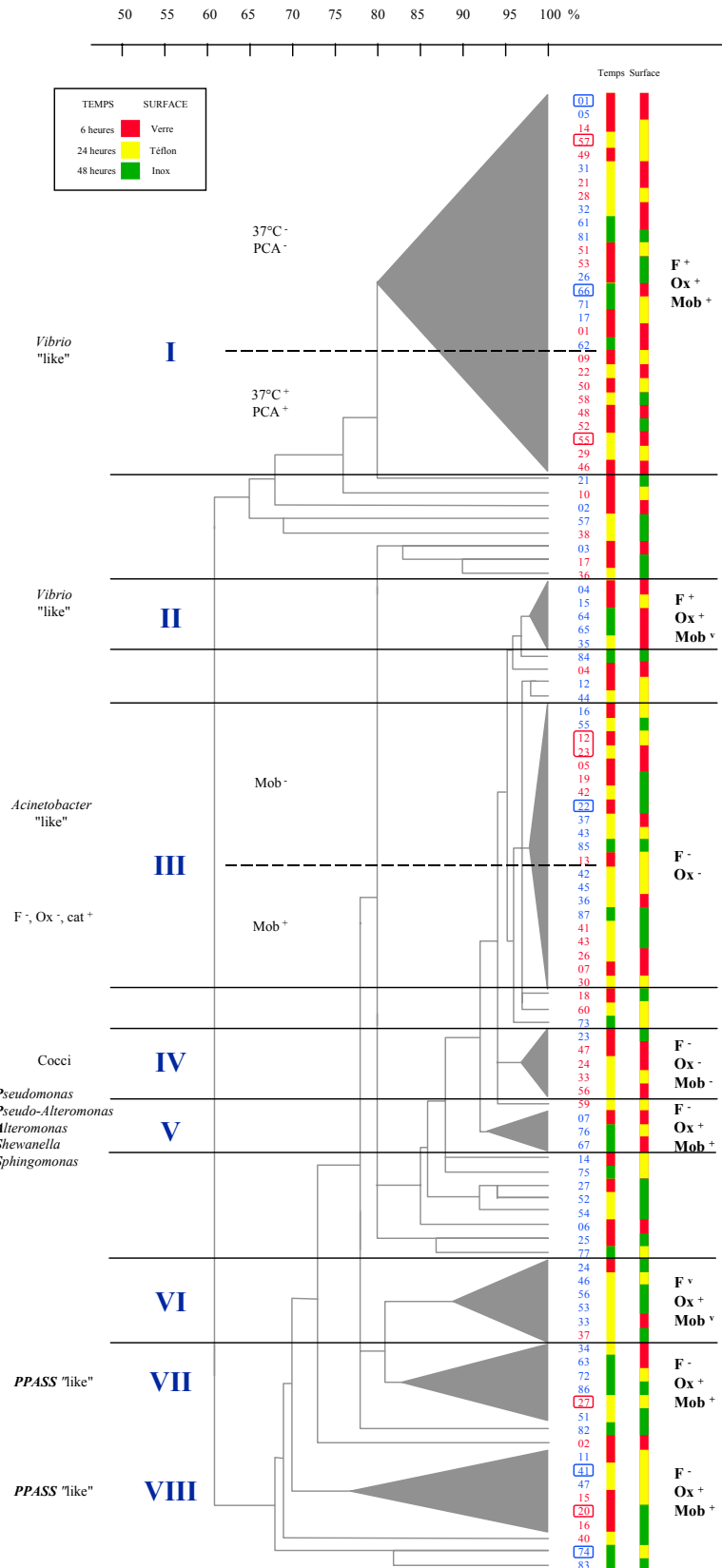


Figure 51 : Dendrogramme du regroupement des isolats de 98 et 99 (F : Fermentation, ox : oxydase, cat : catalase, Mob : mobilité ; PPASS : *Pseudomonas*, *Pseudo-alteromonas*, *Alteromonas*, *Shewanella*, *Sphingomonas* ; + : positive, - : négative).

Le traitement numérique des données Biolog présentées sur la Figure 51 conduit à la séparation des isolats en 8 phénons principaux. Ces 8 phénons regroupent 86 isolats sur les 109 testés. De façon générale, un phénon regroupe les isolats récupérés en 1998 et en 1999. Ceci confirme que les mêmes genres bactériens sont retrouvés en eau de mer naturelle d'une année sur l'autre pour une même saison d'immersion. De plus, notons qu'aucune corrélation simple n'existe entre le temps d'immersion et le type de matériau sur lequel les isolats ont été récupérés.

Les 8 phénons peuvent être décrits ainsi :

- les phénons I et II regroupent des isolats de type *Vibrio* like, bactéries fermentatives, oxydases positives et mobiles.
- le phénon III, regroupe 25 isolats de type *Acinetobacter* like, bactéries non fermentatives et oxydases négatives.
- le phénon IV regroupe des bactéries coccoïdes capables de se développer sur milieu PCA et à 42°C, comme expliqué plus haut, il est probable que ces bactéries proviennent d'une contamination.
- les phénons V, VII et VIII regroupent des isolats de type *Pseudomonas*, (*Pseudo*) *Altéromonas*, *Shewanella* et *Sphingomonas*, bactéries non fermentatives, oxydases positives et mobiles.
- le phénon VI est proche des phénons VII-VIII et ne se distingue d'eux que par les caractères variables à effectuer la fermentation et à être mobile.

11 isolats (encadrés sur la figure 1) appartenant à différents phénons sont ensuite analysés sur Galerie API 20 NE (Api system) ainsi que sur milieu glucosé (l'aspect muqueux de la colonie obtenue reflétant sa capacité à produire des exopolysaccharides). Les données obtenues nous amènent à sélectionner deux souches selon leur capacité à produire des exopolysaccharides, leur facilité de culture, leur appartenance à des phénons différents :

- D01 proche du genre *Vibrio* like (phénon I)
- D41 proche du genre *Pseudomonas* like (phénon VIII)

L'identification génotypique des isolats, réalisée au laboratoire CMM de l'Ifremer de Brest, par séquençage de l'ARN 16S a permis de rapprocher l'isolat D01 à 98,8% de *Vibrio splendidus* et à 98% de *Vibrio lentus* et l'isolat D41 à 96% de *Pseudomonas* sp.

A l'étude de ces deux isolats, nous ajouterons, la souche hétérotrophe et mésophile productrice du polymère A : *Alteromonas macleodii subsp fijiensis* (que nous appellerons DA).

Les caractéristiques microbiologiques et physico-chimiques de ces bactéries sont détaillées dans la suite de ce chapitre.

2. Caractéristiques microbiologiques des souches sélectionnées.

2.1. Caractéristiques biochimiques des isolats.

Les caractéristiques biochimiques des isolats sélectionnés, sont obtenues à partir des résultats des galeries Biolog (Biolog cat#1001 GN Microplate, AES laboratories) et des galeries API 20 NE (API system, Biomérieux). Les résultats sont donnés ci-dessous.

D01 : bactérie prélevée à t = 6 h sur des surfaces de verre. Les colonies formées sur Marine Agar sont rondes et légèrement bombées, blanches, de 3 mm de diamètre. Cette bactérie est Gram négative, fermentaire (bactérie anaérobie facultative), oxydase positive, catalase positive, mobile et faiblement muqueuse sur milieu glucosé. Par ailleurs, cette bactérie est capable d'utiliser pour sa croissance des sucres (cellobiose, D-fructose, D-galactose, α -D-glucose, maltose, D-mannitol, D-mannose et D-thréalose) et des acides aminés (alanine, asparagine, acide aspartique, acide glutamique, proline, sérine et thréonine).

D41 : bactérie prélevée à t = 24 h sur des surfaces de Téflon. Les colonies formées sur Marine Agar sont rondes et plates, de 3 mm de diamètre. Elles sont translucides dans les premiers temps mais prennent une teinte marron après quelques jours dans une étuve à 25°C. Cette bactérie est Gram négative, non fermentaire (bactérie aérobie), oxydase positive, catalase positive, mobile, très muqueuse sur milieu glucosé. Cette bactérie est capable d'utiliser pour sa croissance des sucres (arabinose, cellobiose, D-fructose, α -D-glucose, maltose, D-mannose, saccharose et D-thréalose) et des acides aminés (alanine, leucine, sérine et thréonine).

DA : Les colonies formées sur Marine Agar sont rondes et dentelées, blanches, de 5 mm de diamètre. Cette bactérie est Gram négative, fermentaire, mobile, très muqueuse sur milieu glucosé.

Ces trois isolats peuvent donc être décrits comme :

- *chimiohétérotrophes* : bactéries ayant pour source de carbone des molécules organiques.
- *mésophiles* : bactéries se développant à des températures moyennes (entre 4 et 37°C).
- *halophiles* : bactéries ayant besoin de sels pour se développer.

L'analyse des résultats des galeries Biolog indique que les isolats D01 et D41 sont capables d'utiliser comme source de carbone des sucres entrant dans la composition du polymère A et des sucres retrouvés majoritairement sur les échantillons d'acier inoxydable AISI 316L immergés en eau de mer naturelle à Brest entre les mois de février 1999 et février 2000 (le glucose, le galactose et le mannose).

Les principales caractéristiques propres à chacun des isolats D01, D41 et DA sont :

- D01 peut vivre en milieu anaérobie,
- D41 produit des exopolymères,
- DA peut vivre en milieu anaérobie et produire des exopolymères.

2.2. Caractéristiques microbiologiques des isolats.

2.2.1. Observation des isolats par Microscopie Electronique à Balayage.

Les photographies de bactéries sessiles obtenues par Microscopie électronique à balayage, après filtration sur un filtre 0,2 µm, sont présentées sur la Figure 52.

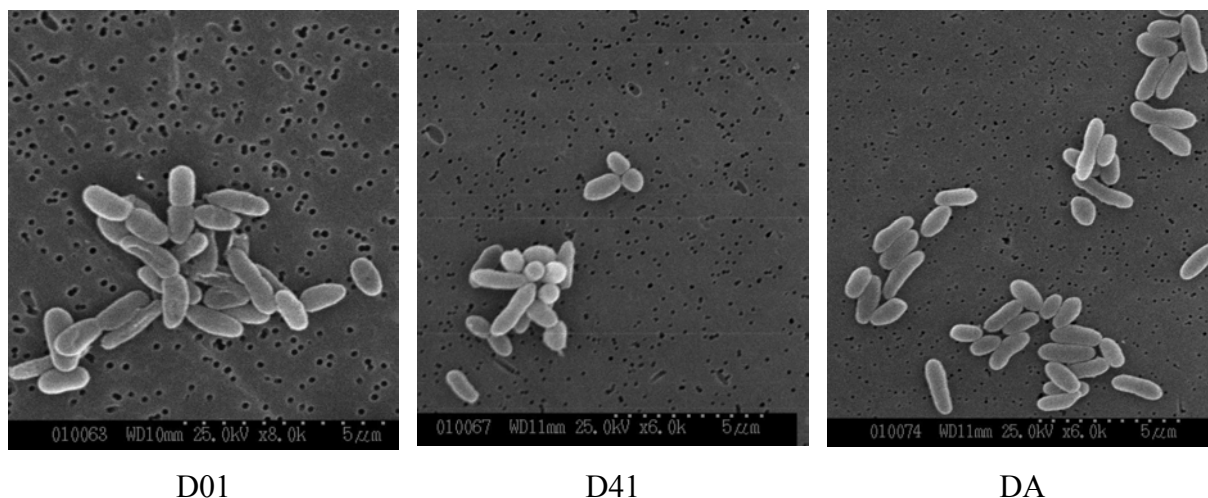


Figure 52 : Images des isolats bactériens obtenues par Microscopie électronique à balayage.

Les trois isolats se présentent sous forme de bâtonnets de 1 à 1,5 μm de long.

2.2.2. Coloration de Gram.

Les photographies résultant des colorations de Gram sont présentées sur la Figure 53.

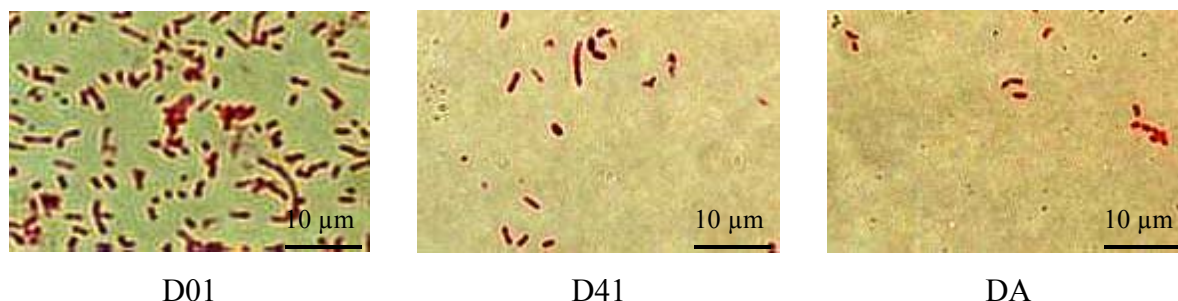


Figure 53 : Colorations de Gram des trois isolats.

Les trois isolats présentent une couleur rose typique des bactéries Gram négatives. Morphologiquement, les trois isolats se présentent sous forme de bâtonnets de petite taille, unitaires, regroupés par deux ou en chaînettes.

2.2.3. Mobilité.

Lors de l'observation microscopique des états frais, une mobilité des trois isolats est observée. Des colorations de flagelles sont effectuées afin de mettre en évidence leur point d'ancrage et leur répartition. Les photographies résultant de ces colorations sont présentées sur la Figure 54.

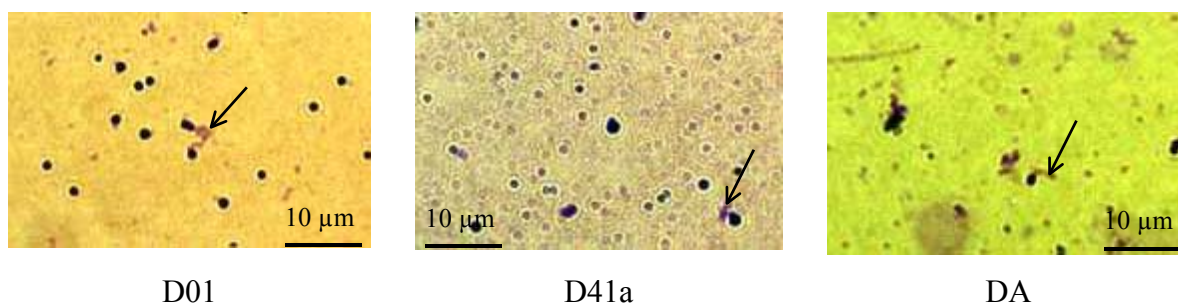


Figure 54 : Coloration de flagelle des trois isolats, les flèches pointent les flagelles.

La mobilité observée pour chaque isolat est attribuée à la présence d'un flagelle monotriche polaire (un seul flagelle à une extrémité). Toutefois, on ne voit pas sur les photographies présentées ci-dessus de flagelle sur toutes les bactéries car ces organites sont très fragiles et donc facilement abîmés lors de la procédure de coloration.

Les résultats des colorations de flagelles sont en accord avec les résultats d'identification des isolats obtenus par Micromer et les données bibliographiques [64]. En effet, la disposition des flagelles à la surface des cellules bactériennes peut varier d'une espèce ou d'un groupe bactérien à un autre, cette disposition étant un facteur d'identification. Par exemple, les *Pseudomonadaceae* et les *Vibrionaceae* sont des bactéries à ciliature polaire alors que les *Enterobacteriaceae* (*E. coli*) sont des bactéries à ciliature péritriche [64].

2.2.4. Courbes de croissance.

Il est maintenant clairement établi que les propriétés physico-chimiques de surface des micro-organismes dépendent de leur phase de croissance [28, 96]. Dans le but de "standardiser" nos protocoles expérimentaux, nous avons dans un premier temps effectué les courbes de croissance des trois souches sélectionnées. A partir de ces courbes, nous avons ensuite déterminé le temps nécessaire pour atteindre la phase stationnaire, le taux de croissance (μ) ainsi que le temps de génération (T_g) des cellules microbiennes.

Les courbes de croissance des différents isolats (à 25°C sous une agitation de 250 tours/min et en Marine Broth) obtenues par mesures turbidimétriques ($\lambda = 600 \text{ nm}$) ou par dénombrement des bactéries viables cultivables sur Marine Agar sont présentées sur les Figures 55, 56 et 57.

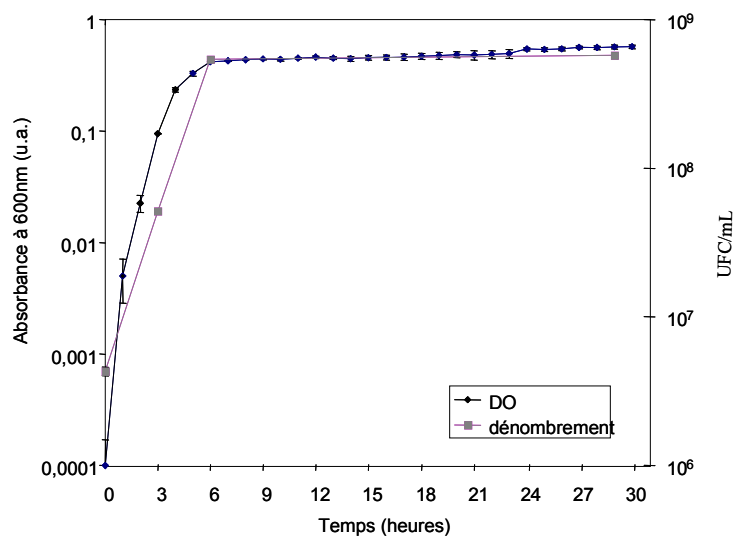


Figure 55 : Courbes de croissance à 25°C en Marine Broth de l'isolat D01 obtenues par turbidimétrie ou par dénombrement.

Pour la souche D01, la phase stationnaire est atteinte après 6 heures de culture, résultat déduit de l'une ou de l'autre des techniques utilisées.

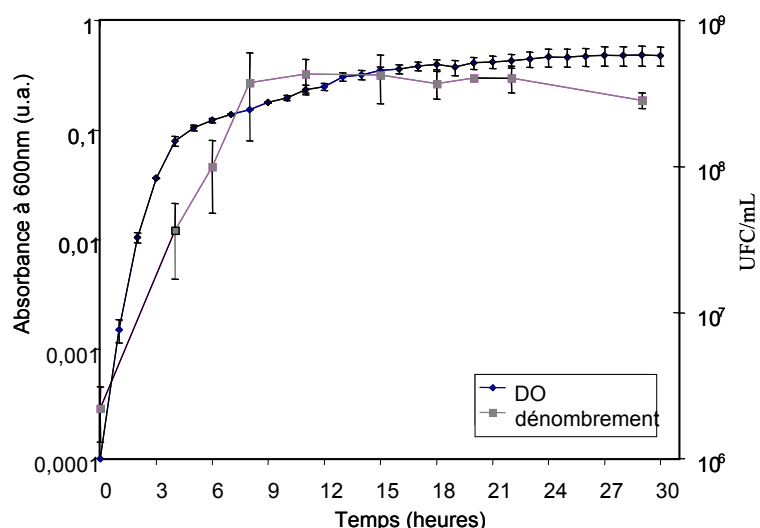


Figure 56 : Courbes de croissance à 25°C en Marine Broth de l'isolat D41 obtenues par turbidimétrie ou par dénombrement.

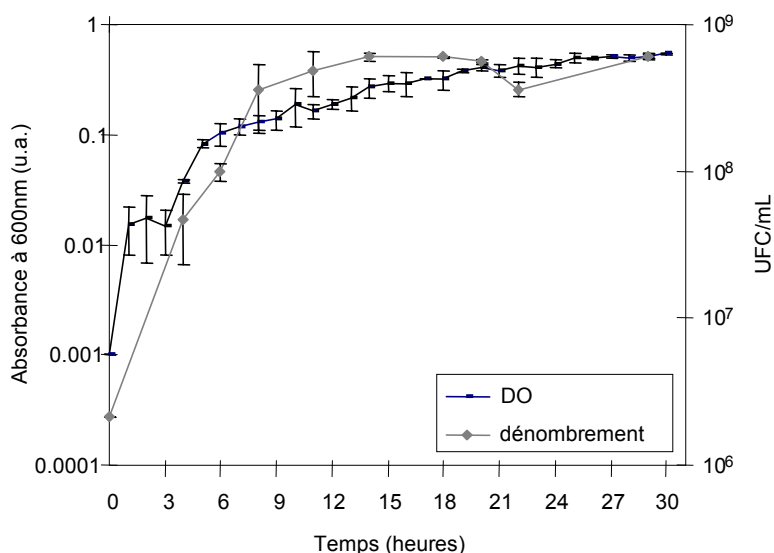


Figure 57 : Courbes de croissance à 25°C en Marine Broth de l'isolat DA obtenues par turbidimétrie ou par dénombrement.

Pour les souches D41 et DA, la phase stationnaire semble atteinte à des temps différents selon la technique d'étude. Ainsi, pour la souche D41 la phase stationnaire débute après 9 heures de culture d'après la technique de dénombrement et après 15 heures d'après la technique turbidimétrique. Pour la souche DA, la phase stationnaire débute après 10 heures selon la technique de dénombrement et après 13 heures selon la technique turbidimétrique. Ces différences observées pourraient être liées à la présence d'exopolymères produits par ces deux bactéries et excrétés dans le milieu de culture. Ces exopolymères perturberaient la mesure de densité optique en absorbant à la même longueur d'onde que les bactéries.

Sur la base des cinétiques obtenues par dénombrement des bactéries viables cultivables, nous avons calculé le taux de croissance (μ) ainsi que le temps de génération (Tg) pour chacune des souches étudiées. Ces résultats sont présentés dans le Tableau 32.

	μ (h ⁻¹)	Tg (h)
D01	1,16	0,26
D41	0,24	1,24
DA	0,12	2,45

Tableau 32 : Caractéristiques de croissance des isolats en Marine Broth et à 25°C.

Les isolats D41 et DA ont un temps de génération supérieur à celui de l'isolat D01, indiquant une croissance plus lente.

Pour la suite de notre étude, nous attendrons 24 heures après le dernier repiquage afin de placer toutes les bactéries en phase stationnaire de croissance.

2.3. Préparation de la suspension d'essai : mise au point du protocole.

Le paragraphe précédent a mis en évidence que les exopolymères excrétés par les bactéries pouvaient interférer avec les mesures de densité optique et donc fausser des résultats basés sur cette technique. Nous avons donc tenté d'optimiser le protocole de préparation de la suspension d'essai en cherchant à préserver au mieux les composés d'extrême surface des bactéries (flagelles et pili) tout en éliminant les composés chimiques du milieu de culture liés à la surface des micro-organismes.

Sachant que les propriétés physico-chimiques des micro-organismes dépendent fortement du mode de préparation de la suspension d'essai [94], deux protocoles de "lavage" des cellules bactériennes sont testés :

- le protocole 1 : centrifugation à 5000 g pendant 10 minutes
- le protocole 2 : centrifugation à 11300 g pendant 30 minutes.

Si le protocole 1 est généralement recommandé pour conserver l'intégrité des cellules microbiennes, le protocole 2 est utilisé pour séparer les exopolymères des micro-organismes.

Afin de comparer l'effet de ces deux protocoles sur les cellules bactériennes, la mobilité et la séparation des substances exopolymériques des bactéries sera étudiée pour chacun d'eux.

2.3.1. Observations microscopiques : état frais.

Nous avons observé par microscopie classique (état frais) les isolats en suspension dans le Marine Broth (n'ayant donc subi aucune préparation) puis en NaCl 36 g/L après préparation selon le protocole 1 ou le protocole 2. Les résultats de ces observations microscopiques sont regroupés dans le Tableau 33.

Isolat	Bactéries en suspension dans le Marine Broth.	Etat après le protocole 1	Etat après le protocole 2
D01	bactéries unitaires, regroupées par deux ou en chaînettes, peu mobiles	idem	idem
D41	bactéries unitaires, regroupées par deux ou en chaînettes, mobiles (tourbillons, lignes droites)	idem mais moins mobiles	idem mais très peu mobiles
DA	bactéries unitaires, regroupées par deux ou en chaînettes, mobiles (tourbillons, lignes droites)	idem	idem mais moins mobiles

Tableau 33 : Observations microscopiques de bactéries en suspension dans le Marine Broth puis après les deux protocoles de préparation de la suspension bactérienne.

En Marine Broth, les trois isolats présentent la même morphologie. Ils sont tous trois mobiles, l'isolat D01 l'étant un peu moins que les deux autres. Après préparation de la suspension d'essai selon le protocole 1, seul l'isolat D41 présente une baisse de la mobilité, indiquant que quelques flagelles sont détruits. Après préparation de la suspension d'essai selon le protocole 2, les isolats D41 et DA voient leur mobilité diminuer fortement. Une grande partie des flagelles sont donc détruits.

La réalisation de la suspension d'essai selon le protocole 2 provoque une forte diminution de la mobilité des bactéries indiquant une altération des flagelles. Or, ces organites de surface ont un rôle primordial dans l'adhésion des bactéries sur les supports [72, 91, 92, 154, 155], servant tant au transport vers la surface qu'au passage de la barrière de répulsion décrite dans la théorie de la DLVO.

2.3.2. Etude des surnageants.

Nous avons analysé les surnageants récupérés après la dernière centrifugation selon la méthode de Bradford [123] pour doser les protéines, et selon la méthode de Kamerling [124, 127] pour doser les carbohydrates. Ces dosages vont nous permettre de vérifier la nature et la masse de composés chimiques décrochés après le protocole 1 et après le protocole 2. Les résultats sont présentés dans le Tableau 34.

	Protocole	Masse de protéines ($\mu\text{g/mL}$ de culture)	Masse de résidus glycosidiques ($\mu\text{g/mL}$ de culture)
D01	1	$0,056 \pm 0,002$	$0,7 \pm 0,3$
	2	$0,085 \pm 0,003$	$1,6 \pm 0,4$
D41	1	$0,020 \pm 0,006$	$0,5 \pm 0,2$
	2	$0,040 \pm 0,006$	$0,7 \pm 0,4$
DA	1	$0,026 \pm 0,009$	$2,2 \pm 0,8$
	2	$0,054 \pm 0,006$	$3,1 \pm 0,9$

Tableau 34 : Masse de protéines et de carbohydrates dosés dans les surnageants (moyenne et écart-type sur 3 tests).

Quel que soit le protocole utilisé, la masse de protéines dosée est plus grande pour l'isolat D01 que pour les deux autres et la masse de carbohydrates dosée est plus grande pour l'isolat DA que pour les deux autres. Les quantités de protéines ou de résidus glycosidiques dosées sont plus importantes après utilisation du protocole 2 (11300 g) qu'après utilisation du protocole 1 (5000 g).

En résumé, le protocole 2 permet une meilleure séparation des substances exopolymériques mais altère plus fortement la mobilité des bactéries que le protocole 1. Après une centrifugation à 11300 g, les protéines dosées peuvent provenir des flagelles (constitués de flagelline) et les carbohydrates de morceaux de parois ou de carbohydrates de surface. Le protocole 2 permet le décrochage des substances exopolymériques adsorbées sur la bactérie et entraîne la destruction des organites extracellulaires et peut-être d'une fraction des cellules.

Le protocole 1 est moins destructif pour la cellule bactérienne (mobilité moins altérée, quantité de substances exopolymériques récupérées plus faible). Ainsi, dans un souci de protection des appendices exocellulaires, flagelles, pili, pouvant s'avérer important lors de

la phase primaire d'adhésion, le protocole 1 est choisi pour préparer les suspensions bactériennes utiles à la suite des expérimentations.

2.4. Viabilité des isolats en eau de mer artificielle stérile.

Le suivi de la viabilité des isolats D01, D41 et DA en eau de mer artificielle stérile au cours du temps est effectué par dénombrement des bactéries viables cultivables sur Marine Agar. Les courbes de viabilité, effectuées à partir de suspensions bactériennes remises en suspension en eau de mer artificielle et dont la densité optique ($\lambda = 600$ nm) est ajustée à 0,8, sont présentées sur la Figure 58.

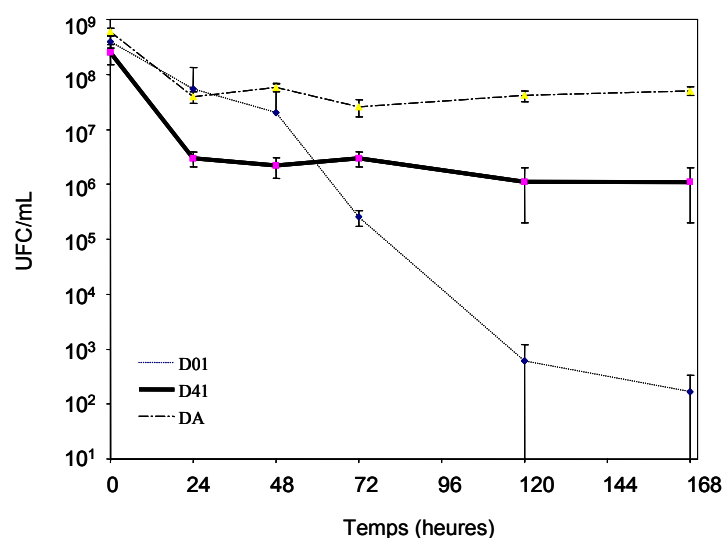


Figure 58 : Suivi du nombre de bactéries viables cultivables en eau de mer artificielle stérile en fonction du temps.

Une différence de comportement des trois isolats mis en situation de jeûne est observée. L'isolat D01 ne présente que très peu de bactéries viables cultivables après un temps de séjour de 120 heures en eau de mer artificielle stérile. Au contraire, les isolats D41 et DA sont toujours viables après 168 heures en eau de mer artificielle stérile, une diminution proche de 1 à 2 ordres de grandeur du nombre de bactéries viables cultivables étant néanmoins observée entre 0 et 24 heures.

La viabilité des isolats D41 et DA peut s'expliquer par l'excrétion dans le milieu de culture d'exopolymères métabolisés par ces deux micro-organismes, molécules permettant leur survie dans des conditions de jeûne.

Nous avons de plus suivi la viabilité des isolats D01, D41 et DA en eau de mer artificielle stérile contenant 20 mg/L de SAB ou de 20 mg/L de polA après 3 heures et 24 heures de contact. Les résultats de viabilité sont présentés sur la Figure 59.

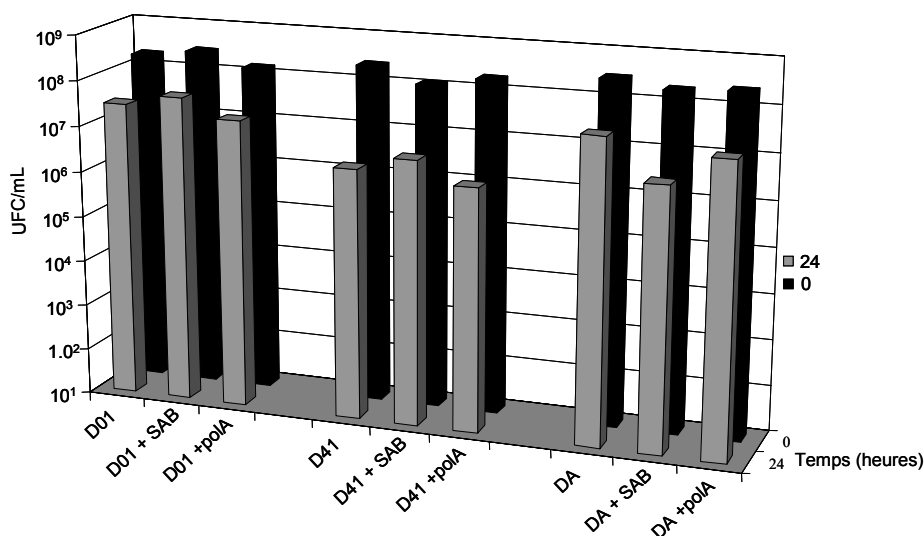


Figure 59 : Suivi du nombre de bactéries viables cultivables en eau de mer artificielle stérile en présence de 20 mg/L de SAB ou de polA.

Les deux macromolécules organique étudiées, la SAB et le polA, n'ont pas effet létal sur la viabilité des bactéries.

3. Caractérisation physico-chimique des isolats.

3.1. Propriétés acido-basiques selon Lewis et Lifhitz van der Walls en eau de mer artificielle par MATS.

Le milieu suspensif pouvant fortement modifier les propriétés physico-chimiques des isolats [28, 156], l'eau de mer artificielle est le milieu le plus adéquat pour étudier les propriétés acido-basiques et hydrophobes/hydrophiles des bactéries marines dans des conditions proches de leur milieu naturel.

Les résultats du test MATS pour chaque isolat, à partir de mesures de densité optique et de comptage des bactéries totales en cellule de Malassez, sont présentés sur les Figures 60 et 61.

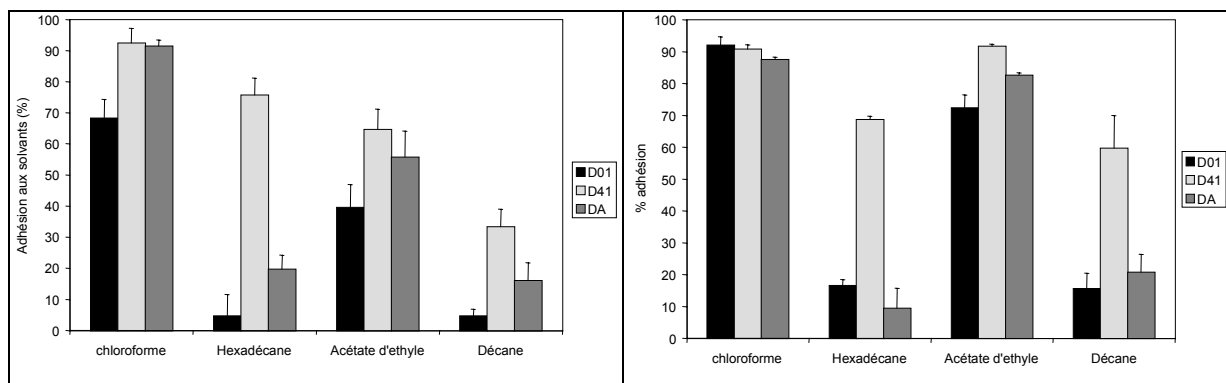


Figure 60 : Résultat du test MATS à partir de mesures de densité optique. Figure 61 : Résultat du test MATS à partir de comptages de cellules en suspension en EMA en cellule de Malassez.

Les deux protocoles d'analyse de la MATS (mesure de la densité optique et comptage des bactéries en cellule de Malassez) montrent des tendances identiques. Les isolats D01 et DA adhèrent fortement au chloroforme (solvant acide) et à l'acétate d'éthyle (solvant basique) et présentent une faible affinité pour les solvants apolaires, hexadécane et décane. On en déduit que les isolats D01 et DA présentent un fort caractère électron-donneur et un fort caractère électron-accepteur induisant une hydrophilie de surface marquée, propriété originale au regard des données généralement reportées [69, 72, 157]. Ces caractéristiques de surface ont déjà été observées mais pour des billes de polystyrène modifiées par greffage de fonctions carboxylates [104], ceci suggérant une grande proportion de ces fonctions chimiques à la surface des isolats D01 et DA.

L'isolat D41, présente quant à lui une forte adhésion à tous les solvants qu'ils soient polaires ou apolaires, acides ou basiques au sens de Lewis, l'affinité aux solvants polaires étant légèrement supérieure à l'affinité aux solvants apolaires. L'isolat D41 présente donc un faible caractère électron-donneur et un faible caractère électron-accepteur, le laissant paraître moins hydrophile que les deux autres. Des affinités similaires pour ces quatre solvants ont été observées pour les formes sporulées des bactéries *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus* par Garry [28] ainsi que pour les conodies de deux champignons *Aspergillus fugimatus* et *Aspergillus nidulans* [158].

3.2. Propriétés acido-basiques selon Lewis et Lifhitz van der Walls en fonction de la force ionique.

Afin de mettre en évidence le rôle des interactions électrostatiques à faible force ionique, nous avons étudié les caractéristiques énergétiques de chaque isolat en fonction de la force ionique (0,005 M ; 0,05 M et 0,5 M, eau de mer artificielle diluée dans de l'eau milliQ). Les résultats sont présentés sur la Figure 62

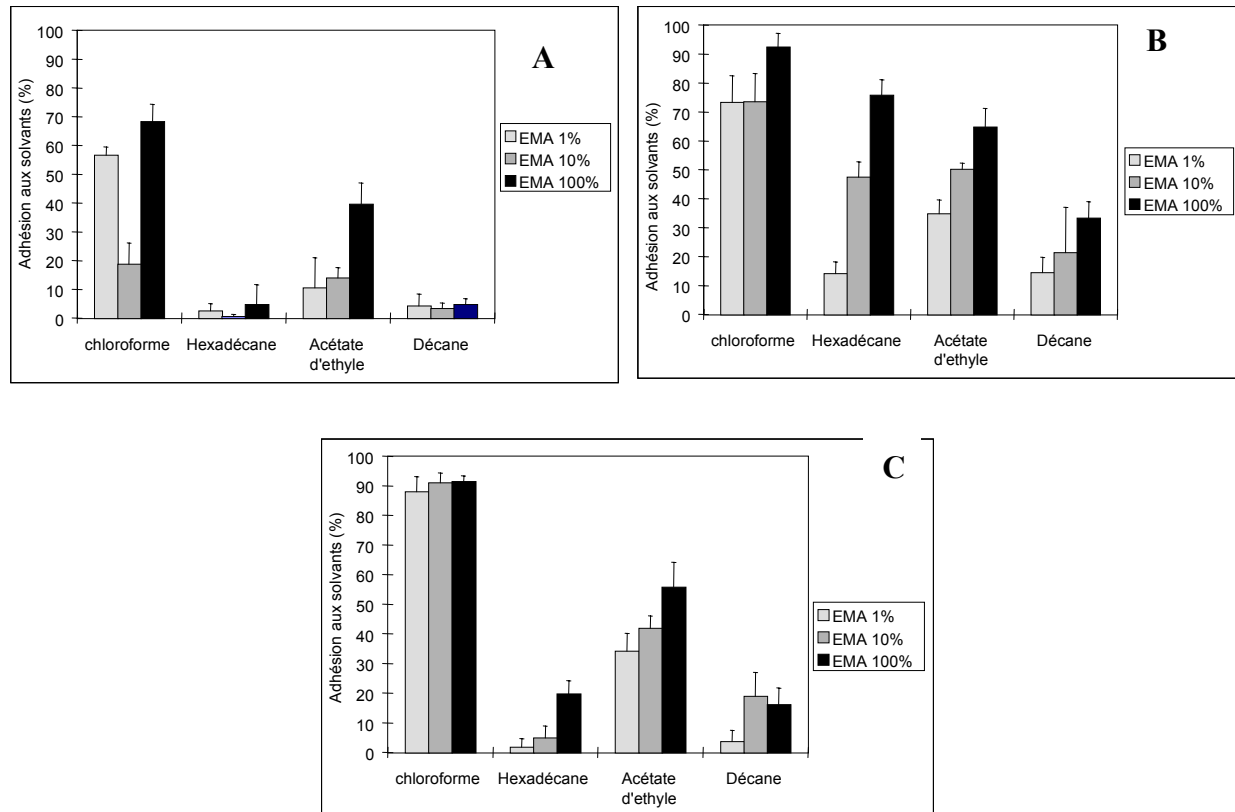


Figure 62 : Résultats du test MATS en fonction de la force ionique à partir de mesures de densité optique : A/ D01 ; B/ D41 ; C/ DA (moyenne effectuée sur six tests indépendants).

De façon générale, d'après les trois graphiques de la Figure 62, plus la force ionique baisse, plus l'affinité pour les solvants diminue à cause de l'apparition d'interactions électrostatiques répulsives. Néanmoins, la diminution des interactions bactériennes avec les solvants polaires et apolaires ne modifie que très légèrement les composantes acide-base selon Lewis des bactéries.

L'affinité de l'isolat D01 au chloroforme est plus importante à une force ionique de 0,005 M qu'à une force ionique de 0,05 M. Ceci signifie que soit des composés ont interféré avec ce solvant à 0,05 M, ces composés pouvant être des protéines de stress produites lors du passage à faible force ionique (les trois isolats sont halophiles) ; soit les résidus bactériens

présents dans le milieu suite à l'éclatement des cellules à 0,005 M ont entraîné une adhésion plus importante aux solvants.

L'affinité à l'hexadécane de l'isolat D41 diminue fortement quand la force ionique baisse. Ceci traduit une augmentation de son caractère électron-négatif et par conséquent de son hydrophilie de surface.

3.3. Propriétés acido-basique selon Lewis et Lifhitz van der Walls en fonction de la composition de la solution.

Afin de mettre en évidence un éventuel rôle des cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} et K^+) et des anions (sulfates) présents en eau de mer artificielle, nous avons étudié les propriétés acido-basiques des trois isolats dans une solution de NaCl à 36 g/L (force ionique comparable à celle de l'eau de mer artificielle). Les résultats sont présentés sur la Figure 63 et comparés aux résultats présentés dans le paragraphe 3.1.

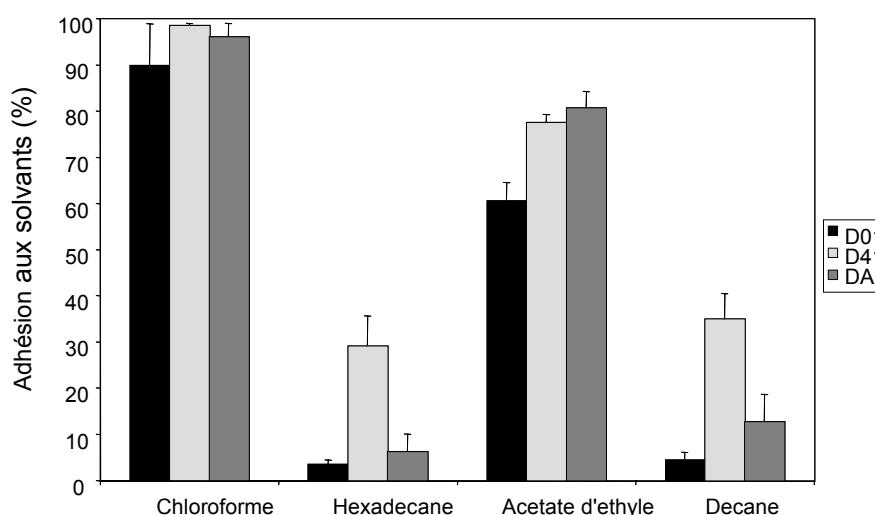


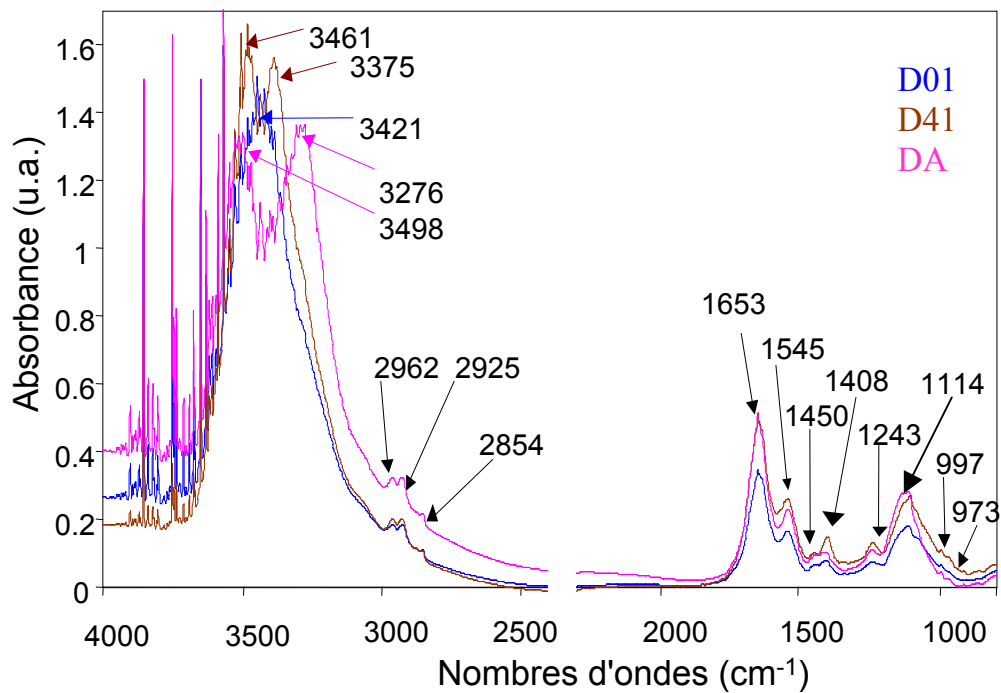
Figure 63 : Résultats du test MATS dans une solution NaCl (36 g/L) à partir de mesures de densité optiques.

La comparaison des données obtenues après remise en suspension des cellules dans une solution NaCl (36 g/L) ou dans de l'eau de mer artificielle montre une évolution de l'affinité des isolats D41 et DA pour l'hexadécane : pourcentage d'affinité passant de 76 en eau de mer artificielle à 29 en NaCl pour l'isolat D41 et de 19,7 à 6,3 pour l'isolat DA. Une telle évolution, également observée par Bos et Busscher [159] après ajout de 10 mM de CaCl_2 , MgCl_2 ou de BaCl_2 au tampon utilisé (2mM de phosphate de potassium et 50 mM de chlorure de potassium, pH = 6,8) pourrait s'expliquer par l'adsorption de cations divalents en surface de la cellule ou à l'extrémité des flagelles ou des structures exocellulaires. Notons que

les deux isolats présentant cette particularité, sont ceux produisant des substances exopolymériques. Des cations (calcium et magnésium) interagissent donc avec ces substances présentes sur la surface de la bactérie.

3.4. Analyse des poudres bactériennes par Infra-rouge.

L'analyse infra-rouge des isolats D01, D41 et DA est effectuée à partir de bactéries lyophilisées selon le protocole établi par Rouxhet *et al.* [126]. Les résultats obtenus, par infra-rouge en transmission ou en réflexion totale atténuée sur un cristal de ZnSe (ATR), sont présentés sur la Figure 64. Ces deux modes d'analyse sont utilisés, car l'un est plus sensible dans la gamme des bas nombres d'onde (l'ATR), alors que l'autre l'est dans celle des hauts nombres d'onde (transmission).



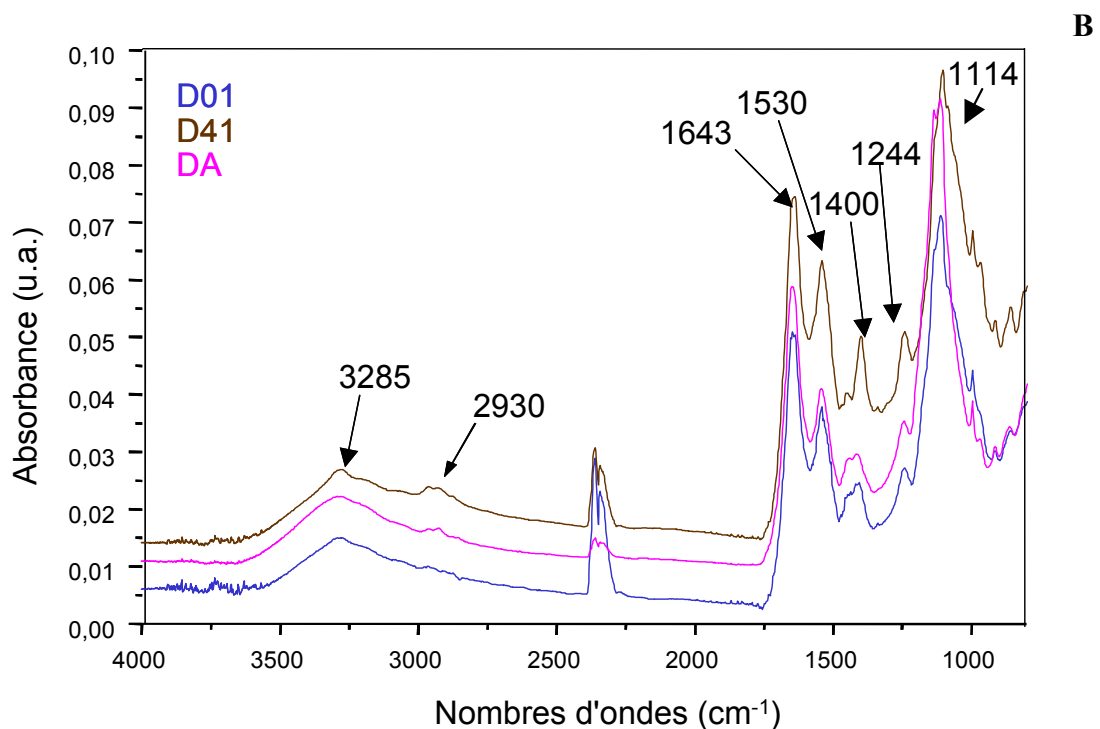


Figure 64 : Spectres IR des isolats bactériens : A/ analyse en transmission, B/ analyse “ATR”.

Les spectres des trois bactéries sont très similaires dans la gamme des bas nombres d’ondes mais présentent quelques différences intéressantes entre 3600 et 3200 cm^{-1} . L’analyse des trois spectres dans cette région spectrale montrent des contributions, propres à chacune des bactéries, centrées à 3421 cm^{-1} pour la D01, à 3461 cm^{-1} et 3375 cm^{-1} pour la D41 et à 3498 cm^{-1} et 3276 cm^{-1} pour la DA. Les bandes centrées à 3498 cm^{-1} , 3461 cm^{-1} , 3421 cm^{-1} , 3375 cm^{-1} et 3276 cm^{-1} , peuvent être attribuées respectivement aux vibrations νOH d’alcool libre, νNH d’amine primaire libre, νNH d’amine secondaire libre, νNH d’amine ou d’amide impliquées dans une liaison H et νOH d’un OH impliqué dans une liaison intramoléculaire. Les bandes centrées entre 2960 et 2850 cm^{-1} sont les vibrations νCH de groupements CH_2 .

La bande centrée à 1650-1640 cm^{-1} peut être attribuée à la vibration amide I ($\nu\text{C}=\text{O}$) des protéines ainsi qu’à la vibration $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$ de groupements carboxyliques, celle centrée à 1550-1530 cm^{-1} à la bande amide II des protéines (δNH (60%), νCN (40%)) et celle centrée à 1400 cm^{-1} à la vibration $\nu_{\text{sym}}\text{COO}^-$ de fonctions carboxylates. Le massif entre 1300 et 1200 cm^{-1} est attribué aux vibrations $\nu\text{P}=\text{O}$ des liaisons phosphodiester et à la vibration amide III des protéines (νCN (40%), δNH (30%), νCC (20%), δCO). Le massif entre 1100 et

1000 cm^{-1} est attribué à des vibrations νCO de fonctions alcools, esters ainsi qu'à la vibration νSO de groupements sulfates.

De faibles variations d'intensités relatives entre les trois bactéries sont observées pour les pics à 1530 cm^{-1} , 1400 cm^{-1} (les intensités sont plus grandes pour l'isolat D41) et pour le massif centré à 1114 cm^{-1} (l'intensité est plus grande pour l'isolat DA).

Le spectre infra-rouge d'une bactérie reflète bien un mélange complexe de protéines, de carbohydrates, d'ADN et d'ARN (ces deux dernières molécules sont mises en évidence par la présence de fonctions phosphodiesters). Suci *et al.* [78] ont d'ailleurs montré qu'un mélange dans des proportions appropriées de protéines/carbohydrate/ADN pouvait recréer un spectre identique à celui obtenu à partir de bactéries.

Au vu des faibles différences observées (différences d'intensité de bande et modification du spectre dans les hauts nombres d'ondes) et du fait que l'on n'analyse pas uniquement l'extrême surface des micro-organismes, il sera difficile de reconnaître les fonctions chimiques qui pourraient être impliquées dans les interactions des différents isolats avec les surfaces solides.

3.5. Analyse des poudres bactériennes par XPS.

L'analyse de lyophilisats bactériens par XPS (Figure 65) a mis en évidence la présence de carbone (Figures 66 et 67), d'azote (Figure 68), d'oxygène (Figure 69), de phosphate, de soufre et d'anions et cations présents en eau de mer artificielle (solvant utilisé avant la lyophilisation) pour tous les isolats.

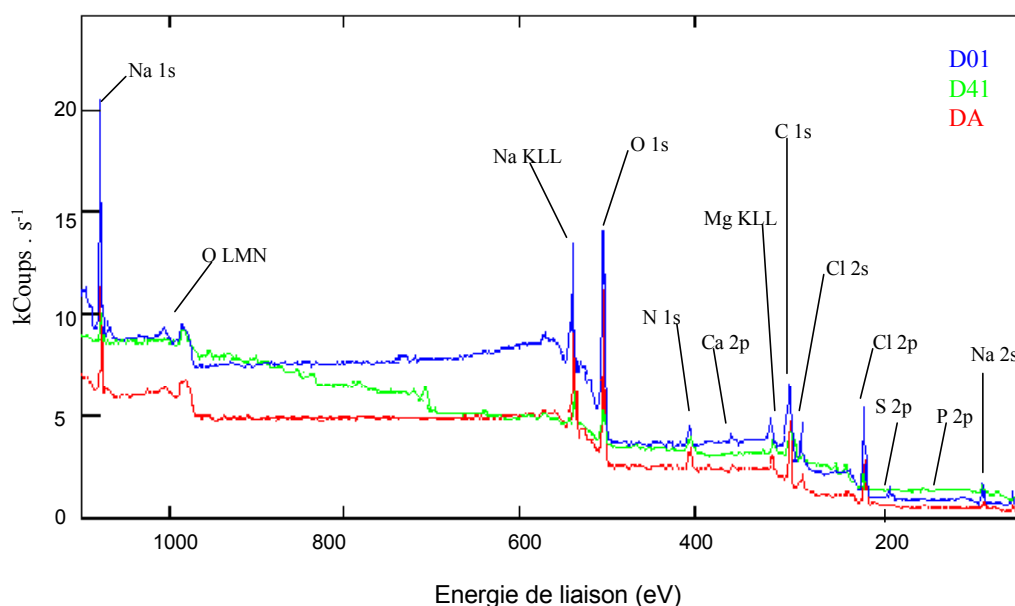


Figure 65 : Spectre XPS général des lyophilisats bactériens.

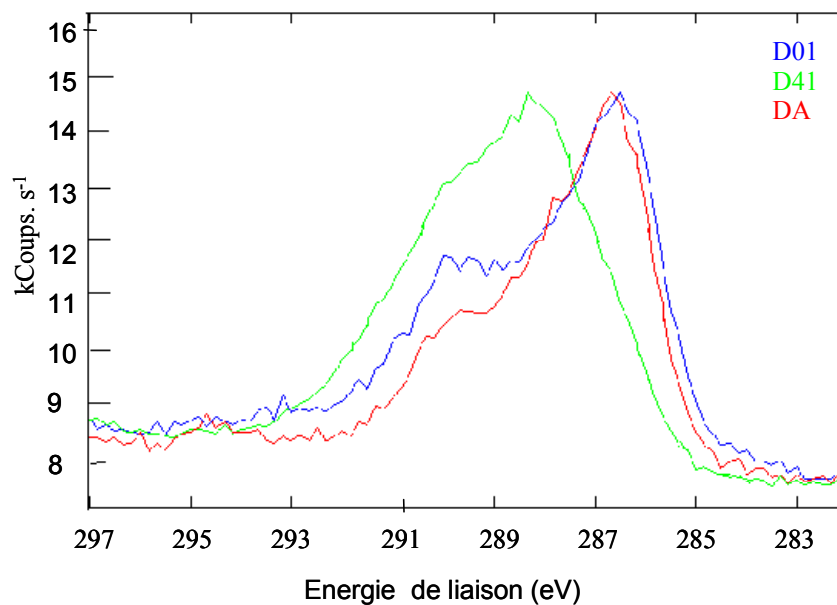


Figure 66 : Spectres XPS de C1s des trois isolats.

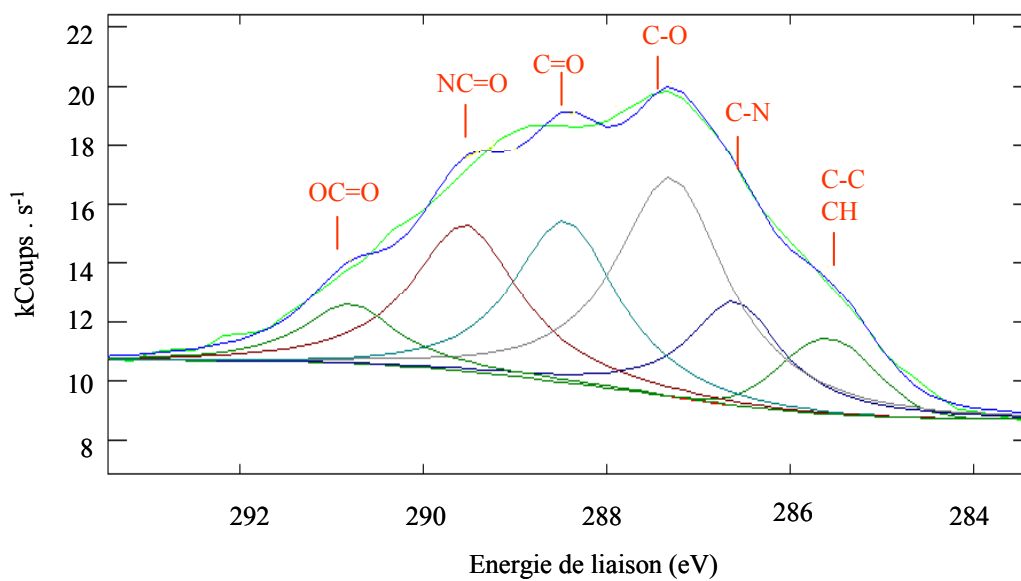


Figure 67 : Spectre XPS de C1s déconvolué de l'isolat D41.

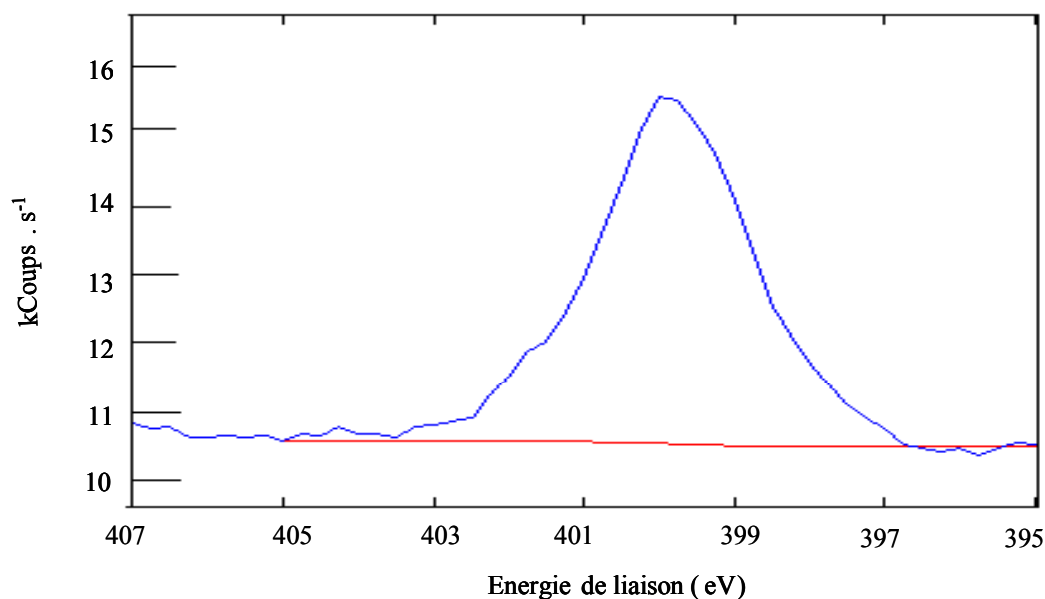


Figure 68 : Spectre XPS de N 1s de l'isolat D41.

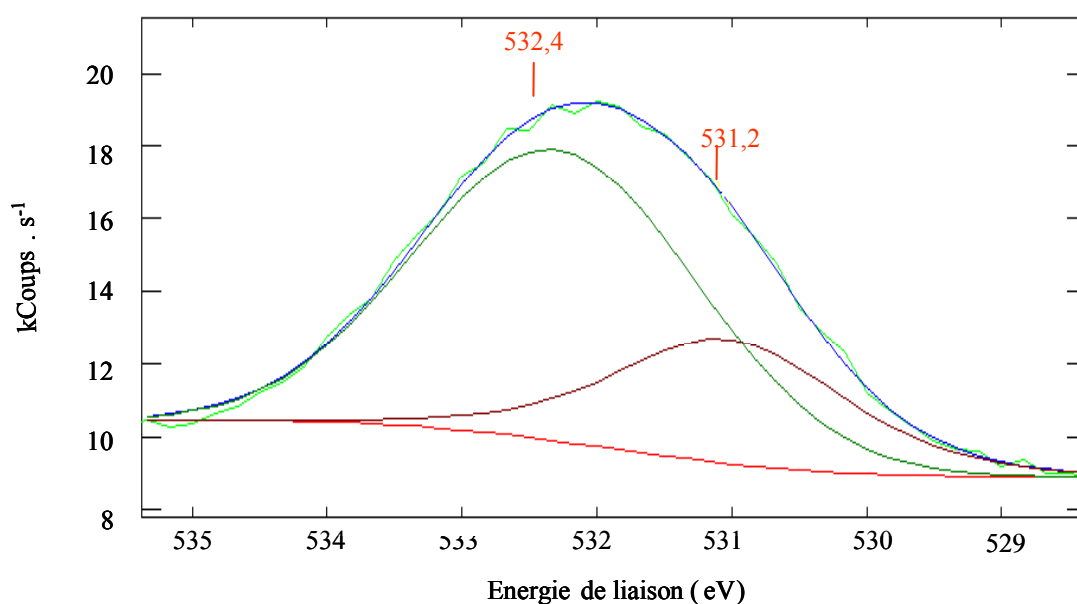


Figure 69 : Spectre XPS de O 1s de l'isolat D41.

Les pics des composés relatifs aux bactéries ont des énergies de liaison plus élevés de 5 eV par rapport aux énergies de liaison classiquement observées. Cet effet de charge est attribué à la grande quantité de composés organiques déposés sur le porte échantillon. Les spectres présentés sont recalibrés en prenant le centre du pic de N 1s centré à 400,3 eV.

Le spectre du carbone provenant des cellules bactériennes peut être décomposé en 6 contributions attribuées respectivement aux groupements CH à 285 eV, C-N à 285,8 eV, COC

ou COH à 286,6 eV, C=O à 287,3 eV, NC=O à 288,3 eV et COOH à 289,4 eV. Le pic d'azote centré à 400,3 eV est attribué à des amines ou des amides protonées caractérisant les protéines [81, 160, 161]. De même, le pic d'oxygène peut être décomposé en deux contributions, l'une centrée à 531,2 eV correspondant aux C=O et aux C-O et l'autre centrée à 532,4 eV correspondant aux OH, caractéristiques des protéines et des polysaccharides. Le pic P 2p centré à 134,3 eV est attribué aux groupements phosphates. Le pic S 2p centré à 170 eV indique la présence de groupements sulfates.

Le calcul des aires normalisées de chaque pic, rapportées à l'aire totale du pic de carbone, permet une estimation de la proportion de chaque élément en surface de la bactérie. Ce rapport est calculé pour deux analyses effectuées sur chacune des bactéries, il est présenté dans le Tableau 35.

	<i>D01</i>	<i>DA</i>	<i>D41</i>
<i>CH/Ctot</i>	0,18 / 0,14	0,15 / 0,08	0,11 / 0,15
<i>CN/Ctot</i>	0,24 / 0,22	0,14 / 0,19	0,28 / 0,25
<i>ΣCO/Ctot</i>	0,57 / 0,64	0,71 / 0,73	0,60 / 0,60
<i>N/Ctot</i>	0,23 / 0,15	0,17 / 0,08	0,31 / 0,19
<i>O/Ctot</i>	0,98 / 0,39	1,26 / 0,52	0,8 / 0,31
<i>P/Ctot</i>	0,03 / 0,01	0,02 / 0,02	0 / 0,01
<i>S/Ctot</i>	0,02 / 0,02	0,11 / 0,12	0,03 / 0,05

Tableau 35 : Aires normalisées (cps.eV.s^{-1}) des pics des espèces chimiques observées sur les isolats bactériens rapportées à l'aire totale du pic de carbone.

Les rapports CN/Ctot et N/Ctot indiquent que l'isolat D41 présente en surface légèrement plus de groupements aminés que l'isolat D01, lui même en possédant beaucoup plus que l'isolat DA.

Les rapports ΣCO/Ctot et O/Ctot indiquent que l'isolat DA posséderait plus de groupements oxygénés que l'isolat D01, lui même en possédant légèrement plus que l'isolat D41. L'oxygène provenant des protéines, des polysaccharides et des sulfates présents en surface de la bactérie, on peut, à la vue des rapports ΣCO/Ctot et O/Ctot d'une part et CN/Ctot d'autre part, conclure que l'isolat DA présente plus de polysaccharides en surface que les deux autres isolats (les rapports CO/Ctot sont plus importants pour l'isolat DA que pour les deux autres et ne sont pas dus à des protéines, le rapport N/Ctot étant faible).

Van der Mei et Busscher [81] indiquent que le pic de phosphate peut être dû à la teneur en acides teichoïques d'une bactérie. Ceci est vrai pour les bactéries gram positives. Dans notre cas, les trois isolats étant gram négatifs, nous pouvons penser que la présence de phosphates est due à celle de phospholipides, de lipoprotéines et de lipopolyosides composant la membrane extérieure du micro-organisme ou plus simplement à un résidu du milieu de culture. Les rapports P/Ctot sont constants pour les trois isolats et sont relativement faibles.

La présence d'un pic de sulfate est observée pour les trois isolats, mais il y a davantage de groupements RSO_4^- en surface de l'isolat DA qu'en surface des deux autres isolats.

3.6. Discussion.

Les caractéristiques physico-chimiques de chaque isolat ont été étudiées à l'aide de plusieurs techniques : la MATS, l'infra-rouge et l'XPS.

L'analyse des isolats bactériens à l'aide de la MATS (technique qui permet de déterminer les caractéristiques hydrophobes/hydrophiles et les propriétés électron-donneur et électron-accepteur de surfaces des micro-organismes) a conduit à diviser les isolats en deux groupes : d'une part les isolats D01 et DA qui présentent tous deux un caractère électron-donneur et un caractère électron-accepteur marqués, caractéristiques d'une surface hydrophile ; d'autre part l'isolat D41 qui présente un caractère électron-donneur et un caractère électron-accepteur faibles dénotant une surface moins hydrophile que celle des isolats D01 et DA. Les résultats obtenus en remettant les bactéries en suspension dans une solution NaCl ont permis de mettre en évidence que des cations étaient adsorbés à la surface des isolats en eau de mer artificielle. Ces cations modifient les propriétés acido-basiques des bactéries. Néanmoins, la modification de la force ionique ou de la composition du milieu suspendant ne met en évidence que de faibles variations des propriétés physico-chimiques de surface (les deux isolats hydrophiles restent fortement hydrophiles, et l'isolat moyennement hydrophile le reste aussi), comme déjà évoqué par Bos et Buscher [159] pour des *Streptococci*.

Les analyses infra-rouge effectuées sur les trois isolats ont montré des spectres relativement similaires. Ces spectres sont la résultante d'un mélange de 3 composés organiques : les protéines, les carbohydrates et le matériel génétique (ADN/ARN). Néanmoins, en plus de quelques différences d'intensité des bandes à 1530, 1400 et 1114 cm^{-1} entre les isolats, l'infra-rouge a mis en évidence la présence d'une bande à 3276 cm^{-1} pour

l'isolat DA attribuée à νOH d'un OH de polymère impliqué dans une liaison intramoléculaire (rappelons que cet isolat produit un carbohydrate). Les bandes infra-rouge à hauts nombres d'ondes traduisent quelques différences de compositions qui sont néanmoins faibles.

L'analyse des lyophilisats bactériens par XPS, seulement sensible aux couches les plus externes des cellules bactériennes, tend à démontrer que les mêmes groupements (CO, C=O, C-N, SO_4^{2-}) sont présents en extrême surface des trois bactéries mais en des proportions différentes, l'isolat DA présentant majoritairement des polysaccharides en surface, l'isolat D41 présentant majoritairement des protéines en surface et l'isolat D01 présentant des protéines et des polymères en surface.

Nous pouvons ainsi discuter les résultats des tests MATS à la lumière des résultats obtenus par XPS :

- l'isolat D01 présente, selon les résultats obtenus en MATS, un caractère électron-donneur fort qui peut être attribué (grâce à l'XPS principalement) à la présence de groupements RCOO^- et un caractère électron-accepteur fort qui peut être dû principalement à la présence de groupements RNH_2 et ROH en surface de la bactérie.
- l'isolat DA présente un caractère électron-donneur fort attribué principalement aux groupements RCOO^- et RSO_4^{2-} et un caractère électron-accepteur fort attribué principalement aux groupements ROH.
- l'isolat D41 présente un caractère électron-donneur faible et un caractère électron-accepteur faible attribués principalement à la présence de groupements RNH_2 en surface de la bactérie.

Concernant l'isolat D41, rappelons qu'il a été identifié majoritairement sur du PTFE (substrat hydrophobe). Selon Rijnaarts *et al.* [73], les bactéries adhérant en grand nombre sur des substrats hydrophobes présentent un point isoélectrique supérieur ou égal à 3,2 indiquant que ce micro-organisme est recouvert partiellement de protéines (micro-organisme hydrophobe). Ceci est en accord avec nos données XPS montrant une forte proportion de groupements aminés et une faible proportion de groupements oxygénés en surface de ce micro-organisme. Rappelons que, le spectre infra-rouge de l'isolat D41 présente des pics centrés à 3461 et 3375 cm^{-1} pouvant être attribués à des vibrations νNH de groupements amines ou amides (toutefois cette technique ne fournit qu'une analyse globale de la bactérie).

4. Conclusion.

Les bactéries marines étudiées dans ce chapitre présentent quelques différences dans leurs caractéristiques microbiologiques et leurs propriétés physico-chimiques de surface, résumées dans le Tableau 36.

	<i>D01</i>	<i>DA</i>	<i>D41</i>
Gram	négatif	négatif	négatif
mobilité	flagelle monotriche	flagelle monotriche	flagelle monotriche
Facteur nutritionnel	chimiohétérotrophe	chimiohétérotrophe	chimiohétérotrophe
Type respiratoire	oxydatif fermentaire	oxydatif fermentaire	oxydatif
production d'exopolymères	non	oui	oui
Temps nécessaire pour atteindre la phase stationnaire en Marine Broth	6 h	10 h	9 h
Viabilité en eau de mer artificielle stérile	120 h	Au moins 168 h	Au moins 168 h
MATS	hydrophile	hydrophile	Assez peu hydrophile
Bandes infra-rouge caractéristiques	3421 cm ⁻¹ (νNH)	3276 cm ⁻¹ (νOH de polymère)	3461 et 3375 cm ⁻¹ (ν _{as} NH ; ν _{sym} NH)
XPS, groupements majoritairement en surface des isolats.	RNH ₂ (+) ROH (+) ROR (+) RCOO ⁻ (+)	ROH (++) ROR (++) RCOO ⁻ (++) RSO ₄ ²⁻ (++)	RNH ₂ (++)

Tableau 36 : Caractéristiques microbiologiques et physico-chimiques des isolats *D01*, *D41* et *DA* (+ : proportion importante ; ++ : proportion très importante).

L'analyse des propriétés physico-chimiques de surface fait apparaître de grandes similitudes pour les isolats *D01* et *DA*. Les propriétés acido-basiques obtenues par MATS montrent des caractères électron-donneur et électron-accepteur forts attribués d'après les mesures XPS à la présence en surface de groupements RCOO⁻, RSO₄²⁻ et ROH pour l'isolat *DA*, et à la présence de groupements RCOO⁻, ROH et RNH₂ en surface de la bactérie *D01*. Les caractéristiques microbiologiques des différents isolats sont également très proches, seule

la production d'exopolysaccharides les différenciant. L'infra-rouge a par ailleurs confirmé l'existence de polymères par un pic centré à 3276 cm^{-1} , présent uniquement chez cet isolat. L'infra-rouge ne nous permet cependant pas de savoir si ces polymères sont en cours de synthèse dans la bactérie ou en surface. Nous avons pu observer que ces carbohydrates permettent la survie de l'isolat DA en eau de mer artificielle stérile pendant au moins 168 heures, alors que l'isolat D01 est peu viable cultivable après 120 heures. Cette caractéristique nous permettra peut être d'observer une influence des exopolysaccharides produits par les bactéries sur leur adhésion.

L'isolat D41 présente des caractéristiques physico-chimiques de surface très différentes de celles des deux autres souches étudiées, celui-ci étant moins hydrophile que les isolats D01 et DA. Concernant les caractéristiques microbiologiques, notons que cette bactérie ne peut pas effectuer la fermentation et donc ne peut pas vivre en conditions anaérobies, mais produit tout comme l'isolat DA des exopolymères. L'XPS et l'infra-rouge ont montré que ces exopolymères sont principalement de type protéique (groupement RNH_2 observé par XPS et pics infra-rouge à 3461 et 3375 cm^{-1}), résultat confirmé par la MATS puisque cet isolat est moins hydrophile que les deux autres bactéries.

CHAPITRE 5 : ADHESION BACTERIENNE, ROLE DU FILM PRIMAIRE.

Les études présentées dans les chapitres 3 et 4 nous ont permis de caractériser le film primaire et deux souches de bactéries pionnières de la colonisation (propriétés acido-basiques, propriétés physico-chimiques de surface). La dernière étape vers la connaissance des interactions entre le micro-organisme et un matériau préconditionné par un film organique est traitée dans ce chapitre. Nous allons essayer de répondre à la question posée au début de notre travail : la modification, et plus précisément l'élimination, du film primaire permettrait-elle de limiter la formation du biofilm ? Pour cela, l'adhésion de trois souches bactériennes (D01, D41 et DA) sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L, de verre et de PTFE, préconditionnés ou non par un film organique, est suivie à l'aide de techniques classiques de microbiologie (bactéries totales par microscopie à épifluorescence et bactéries viables cultivables après dilution - étalement sur Marine Agar) ainsi que par XPS et IRRAS.

Dans un second temps, l'eau de mer étant un milieu pluri-microbien, nous avons étudié l'adhésion de 2 souches bactériennes, D01 et D41, présentes dans une même suspension, sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L, de verre et de PTFE, préconditionnés ou non par un film organique, afin de mettre en évidence ou non un éventuel effet symbiotique entre les deux micro-organismes.

1. Adhésion des bactéries pionnières sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L, de verre et de PTFE.

Afin d'étudier l'adhésion des trois isolats sur différents substrats, les échantillons d'acier inoxydable AISI 316L, de verre et de PTFE conditionnés ou non par un film organique (formé suite à l'immersion dans des solutions 100% SAB, 100% polA ou mix) sont immergés dans une suspension bactérienne réalisée en eau de mer artificielle et dont la charge bactérienne est de 10^8 UFC/mL. Après des temps de contact compris entre 2 minutes et 168 heures, les échantillons sont rincés dans une solution NaCl à 36 g/L puis analysés à l'aide des techniques indiquées ci-dessus.

Une analyse statistique est effectuée afin de déterminer si les résultats obtenus en fonction des préconditionnements sont statistiquement différents ou non. Pour cela, nous avons utilisé l'analyse de variance ANOVA 1 du logiciel MATLAB en posant comme

hypothèses : H_0 , les préconditionnements donnent des résultats équivalents et H_1 , les préconditionnements donnent des résultats différents. En prenant un intervalle de confiance à 95%, l'hypothèse H_0 est rejetée si $P < 0,05$, indiquant que les résultats de dénombrement sont statistiquement différents.

1.1. Adhésion des isolats sur des surfaces “nues”.

Dans un premier temps, nous avons cherché à voir si il y avait un effet “substratum dépendant” lors de l'adhésion des trois bactéries (D01, D41 et DA) en réalisant les cinétiques d'adhésion sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L, de verre et de PTFE nettoyés selon le protocole défini dans le chapitre 2.

Dénombrement des bactéries viables cultivables adhérentes.

Les résultats des dénombrements de bactéries viables cultivables adhérentes en fonction du temps de contact sont présentés sur les Figures 70, 71 et 72 (les encarts sont des agrandissements pour les temps courts).

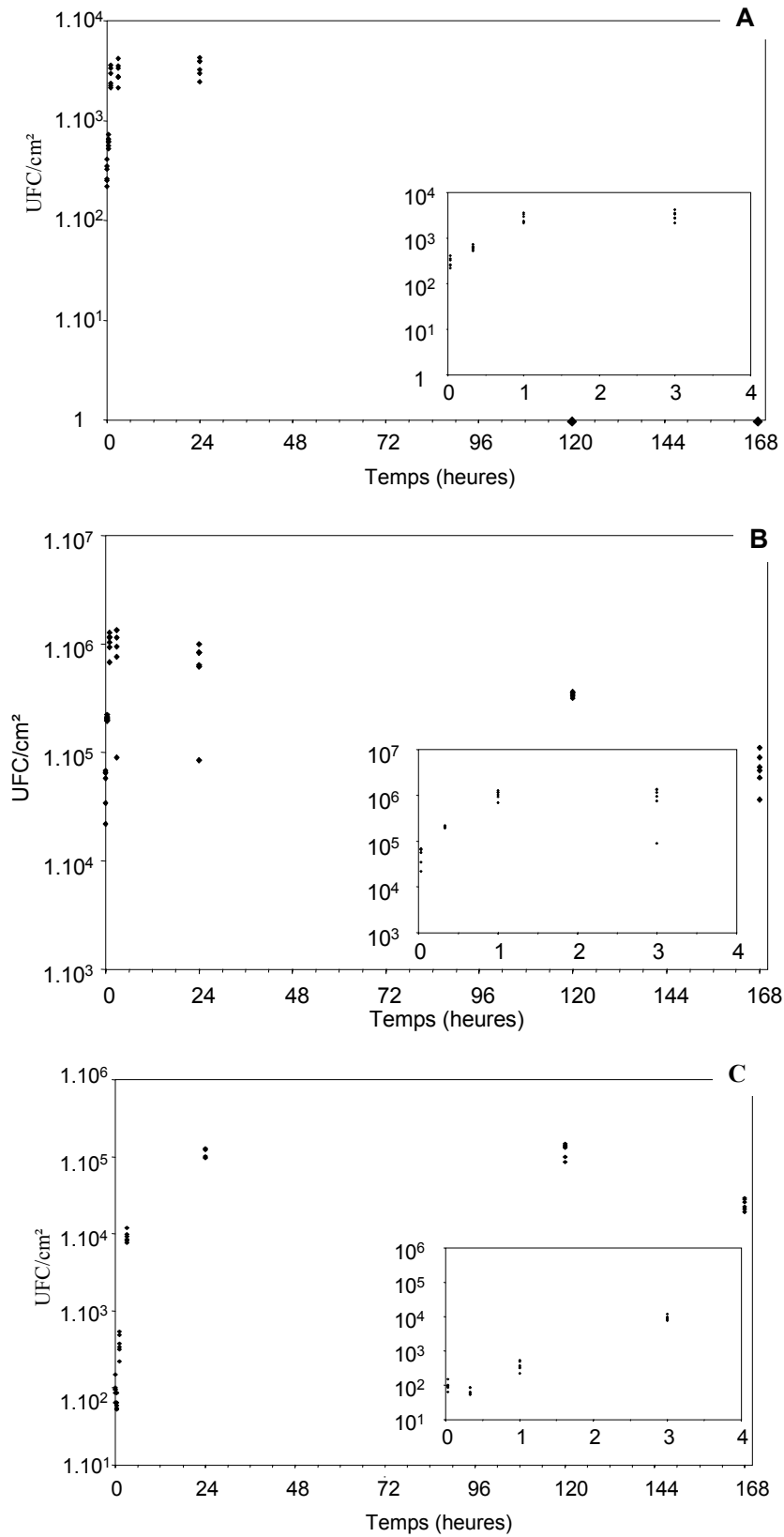


Figure 70 : Cinétiques d'adhésion des bactéries viables cultivables adhérentes, isolats D01 (A), D41 (B) et DA (C), sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L non préconditionnés entre 0 et 168 heures.

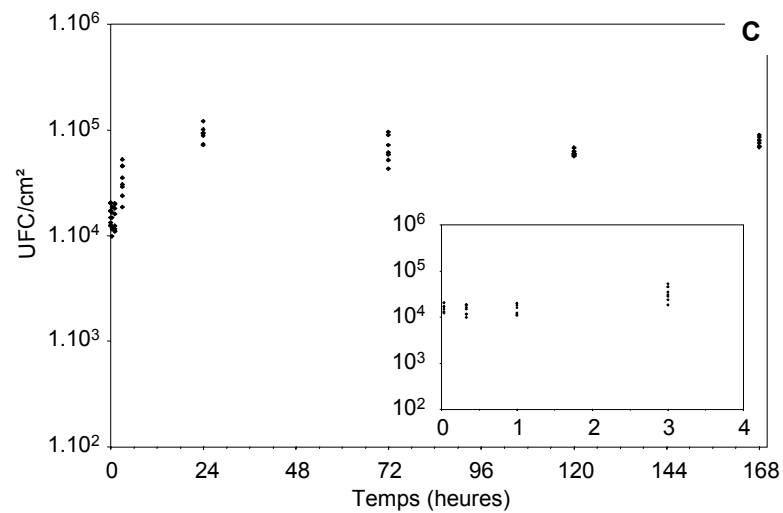
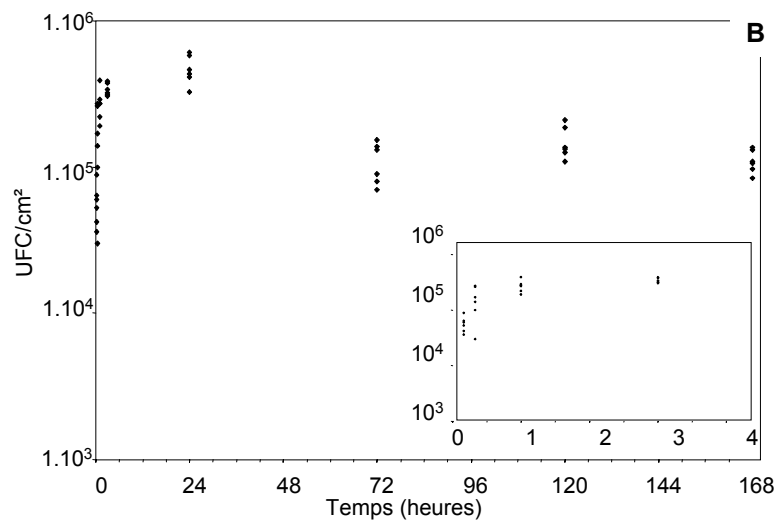
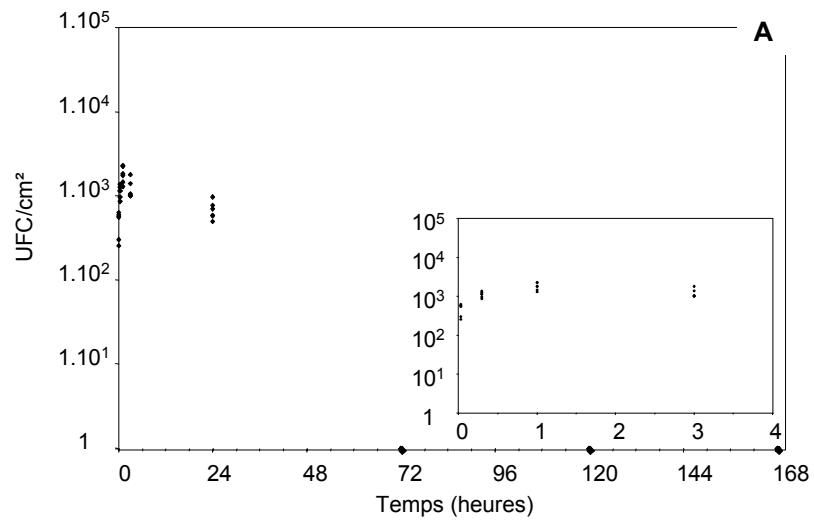


Figure 71 : Cinétiques d'adhésion des bactéries viables cultivables adhérentes, isolats D01 (A), D41 (B) et DA (C), sur des échantillons de verre non préconditionnés entre 0 et 168 heures.

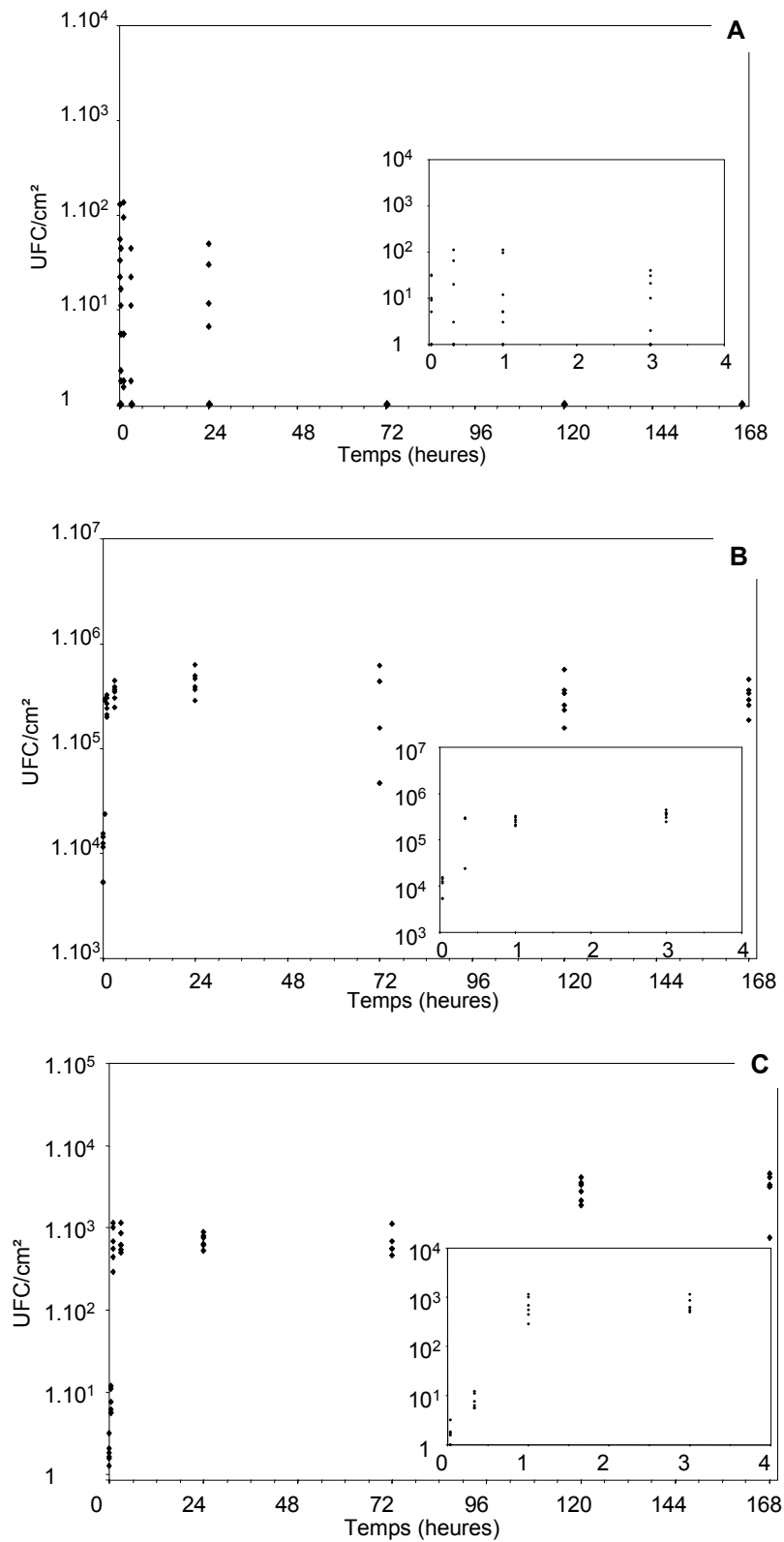


Figure 72 : Cinétiques d'adhésion des bactéries viables cultivables adhérentes, isolats D01 (A), D41 (B) et DA (C) sur des échantillons de PTFE non préconditionnés entre 0 et 168 heures.

Les isolats bactériens adhèrent rapidement sur les surfaces. Le nombre maximum de bactéries viables cultivables adhérentes est atteint en moins de 1 heure (sauf pour l'isolat DA qui atteint le plateau entre 3 et 24 heures). Le nombre de bactéries viables cultivables adhérentes est ensuite quasiment constant, la petite décroissance observée après 120 heures d'adhésion, pour l'isolat D41 sur du verre et de l'acier inoxydable et l'isolat DA sur de l'acier inoxydable, étant soit due à une mortalité suite à l'appauvrissement du milieu suspendant soit due à un décrochage bactérien.

Les courbes d'adhésion sur des échantillons d'acier inoxydable de verre ou de PTFE montrent que l'isolat D41 (10^5 bactéries /cm² sur le plateau) adhère en plus grande quantité que l'isolat DA (10^3 - 10^4 bactéries/cm² sur le plateau), lui même adhérant en plus grande quantité que l'isolat D01 (10^3 bactéries/cm² sur acier inox et sur verre).

Les isolats DA et D01 présentent un caractère "substratum dépendant", le nombre de bactéries viables cultivables adhérentes étant le plus élevé sur les échantillons d'acier inoxydable et de verre (de l'ordre de 10^5 UFC/cm² pour l'isolat DA et 10^3 UFC/cm² pour l'isolat D01) et minimum sur des échantillons de PTFE (de l'ordre de 10^3 UFC/cm² pour l'isolat DA et souvent inférieur à la limite de détection pour l'isolat D01). Ceci est en accord avec leurs propriétés hydrophobes/hydrophiles, puisque ces deux isolats présentent un fort caractère hydrophile et adhèrent ainsi plus facilement sur des substrats hydrophiles. Notons que l'isolat D01 adhère peu sur le PTFE ; le nombre de bactéries adhérentes est fortement dispersé indiquant que les forces d'adhésion mises en jeu sont probablement faibles. Le rinçage suffit donc à enlever un grand nombre de bactéries, ce nombre étant plus ou moins élevé selon le mode de rinçage (difficilement reproductible).

Aucun effet substratum dépendant n'est observé pour l'isolat D41, 10^5 UFC/cm² étant dénombré quel que soit la nature du matériau.

Dénombrement des bactéries totales adhérentes.

Le nombre de bactéries viables cultivables adhérentes et totales adhérentes après 3 heures et 120 heures de contact suspension bactérienne-support solide est présenté dans le Tableau 37.

<i>Isolat</i>	Temps de contact	<i>Acier inoxydable</i>		<i>Verre</i>		<i>PTFE</i>	
		viables	totales	viables	totales	viables	totales
D01	3h	$3.10^3 \pm 1.10^3$	$1.10^5 \pm 3.10^4$	$1.10^3 \pm 6.10^2$	$1.10^5 \pm 8.10^4$	$*-10^2$	*
	120h	*	$2.10^5 \pm 3.10^4$	*	$4.10^5 \pm 2.10^5$	*	*
D41	3h	$9.10^5 \pm 4.10^5$	$2.10^7 \pm 4.10^6$	$3.10^5 \pm 8.10^4$	$2.10^7 \pm 2.10^6$	$3.10^5 \pm 4.10^4$	$1.10^7 \pm 1.10^6$
	120h	$3.10^5 \pm 6.10^4$	$2.10^7 \pm 3.10^5$	$1.10^5 \pm 4.10^4$	$2.10^7 \pm 7.10^6$	$3.10^5 \pm 1.10^5$	$1.10^7 \pm 3.10^6$
DA	3h	$9.10^3 \pm 3.10^2$	$2.10^5 \pm 7.10^4$	$3.10^4 \pm 2.10^3$	$1.10^5 \pm 5.10^4$	$7.10^2 \pm 2.10^2$	$9.10^4 \pm 5.10^4$
	120	$1.10^5 \pm 7.10^4$	$3.10^5 \pm 1.10^4$	$6.10^4 \pm 1.10^3$	$7.10^5 \pm 2.10^4$	$3.10^3 \pm 1.10^3$	$2.10^5 \pm 5.10^4$

Tableau 37 : Nombre de bactéries viables cultivables adhérentes (UFC/cm²) et totales adhérentes (bactéries/cm²) après 3 heures et 120 heures de contact suspension bactérienne-support (* : inférieur au seuil de détection).

Quel que soit l'isolat étudié, le nombre de bactéries viables cultivables est nettement inférieur au nombre de bactéries totales (un ou deux ordres de grandeur).

Nous retiendrons que :

- le nombre de bactéries D41 totales adhérentes est supérieur d'au moins deux ordres de grandeur au nombre de bactéries D01 et DA adhérentes quel que soit le type de matériau.
- le nombre de bactéries D41 totales adhérentes est identique quel que soit le matériau utilisé, égal à 10^7 bactéries/cm² après 3 ou 120 heures de contact.
- le nombre de bactéries DA totales adhérentes est identique au nombre de bactéries D01 adhérentes sur les échantillons d'acier inoxydable et de verre (10^5 bactéries/cm²).
- le nombre de DA totales adhérentes est supérieur au nombre de D01 totales adhérentes sur le PTFE (10^5 bactéries/cm² pour l'isolat DA et quasiment toujours inférieur au seuil de détection pour l'isolat D01).

- après 120 heures d'adhésion, le nombre de D01 totales adhérentes est de 10^5 bactéries /cm² sur acier inoxydable et sur verre, alors que sur PTFE le nombre de D01 viables cultivables adhérentes est toujours inférieur au seuil de détection.

Notons qu'après 120 heures de contact entre la suspension bactérienne et les surfaces solides, l'adhésion des isolats D41 et DA se fait principalement sous forme de bactéries isolées mais aussi de petits amas, suggérant la formation en certains points de biofilms. Le dénombrement des bactéries est alors plus complexe mais est possible car les bactéries apparaissent de couleur orangée et les polymères de couleur verte. Gardons donc à l'esprit que les dénombrements de flore totales des bactéries D41 et DA après 120 heures d'adhésion sont sujettes à une légère incertitude. L'adhésion de l'isolat D01 reste quant à elle sous forme de bactéries unitaires quel que soit le temps de contact.

Analyse des surfaces solides par IRRAS.

Des analyses infra-rouge, en mode FT-IRRAS, sont effectuées sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L immergés pendant 3 heures dans des suspensions bactériennes puis rincés en solution NaCl (36 g/L). Ces spectres sont présentés sur la Figure 73.

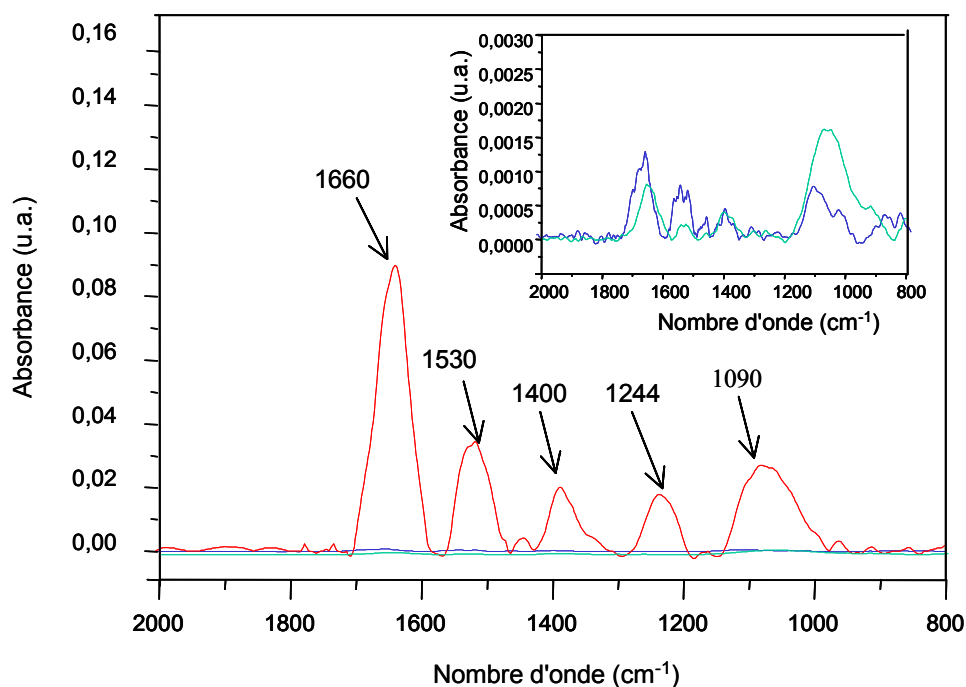


Figure 73 : Spectre IRRAS d'un échantillon d'acier inoxydable AISI 316L après 3h d'immersion dans une suspension bactérienne de D01 (spectre bleu), de D41 (spectre rouge) ou de DA (spectre vert) et rinçage en NaCl (36 g/L) (l'encart est un agrandissement de la figure principale dans le domaine des faibles intensités).

Après adhésion, les spectres infra-rouge des trois bactéries adhérant sur un acier inoxydable sont très similaires, et présentent des bandes centrées à 1660 cm^{-1} attribuée à la bande amide I des protéines et à la vibration $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$ de groupements carboxyliques, à 1530 cm^{-1} attribuée à la bande amide II des protéines, à 1400 cm^{-1} attribuée à la vibration $\nu_{\text{sym}}\text{COO}^-$ de groupements carboxyliques, à 1244 cm^{-1} attribuée à la bande amide III et à la vibration $\nu\text{P=O}$ de liaisons phosphodiester et à 1090 cm^{-1} attribuée à la vibration νCO de fonctions alcool ou ester et aux groupements sulfates. Ces bandes ont déjà été décrites dans le chapitre traitant de la caractérisation des bactéries pionnières et aucune différence notable n'est observée entre les bactéries sessiles et les bactéries adhérentes, les caractéristiques bactériennes énoncées dans le chapitre 4 étant retrouvées.

L'analyse des spectres IRRAS obtenus après adhésion de l'isolat D41 sur des échantillons d'acier inoxydable montre que les intensités des bandes sont cent fois plus intenses que celles obtenues après adhésion de D01 et de DA. Ces résultats sont en accord avec les dénombrements de bactéries totales adhérentes présentés précédemment et confirment que :

- l'isolat D41 adhère en nettement plus grande quantité que les isolats D01 et DA,
- le nombre de bactéries adhérentes sur l'acier inoxydable non conditionné est du même ordre de grandeur pour les isolats D01 et DA.

1.2. Adhésion des isolats sur des surfaces solides conditionnées par un film primaire.

Afin d'étudier le rôle du film primaire sur l'adhésion bactérienne des différents isolats, nous avons immergé des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L, de verre et de PTFE, préconditionnés ou non par un film organique, dans une suspension bactérienne pendant des temps de 2 minutes à 168 heures. Les bactéries adhérentes sont ensuite dénombrées par microscopie à épifluorescence pour les bactéries totales ou après décrochage par dilution étalée pour les bactéries viables cultivables.

1.2.1. Adhésion de l'isolat D01 sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L, de verre et de PTFE préconditionnés ou non par un film primaire.

Dénombrement des bactéries viables cultivables adhérentes.

Les résultats sont présentés sur les Figures 74, 75 et 76.

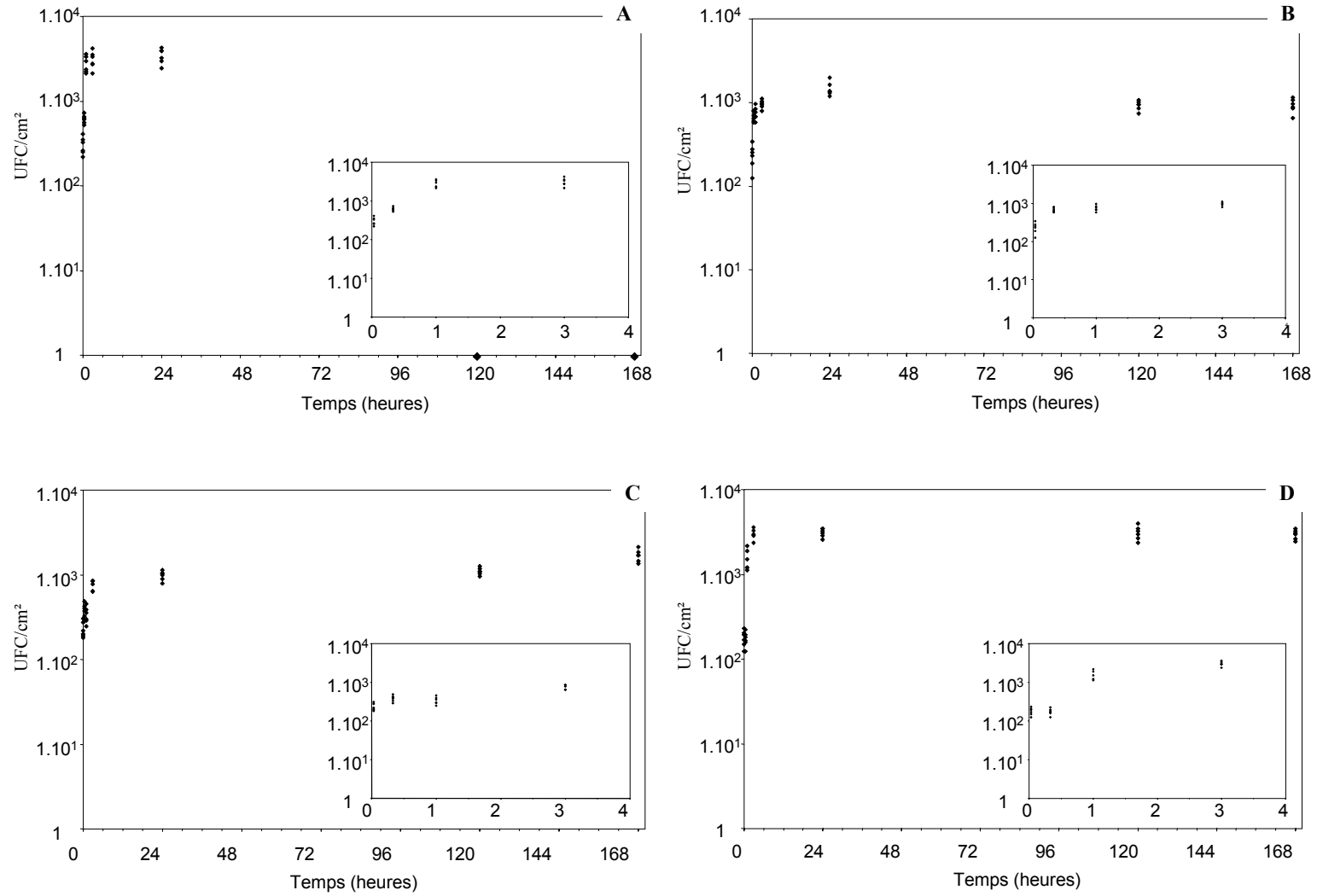


Figure 74 : Cinétiques d'adhésion des bactéries viables cultivables entre 0 et 168 heures de l'isolat D01 sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L non préconditionnés (A), préconditionnés par de la SAB (B), du polA (C) ou un mix (D).

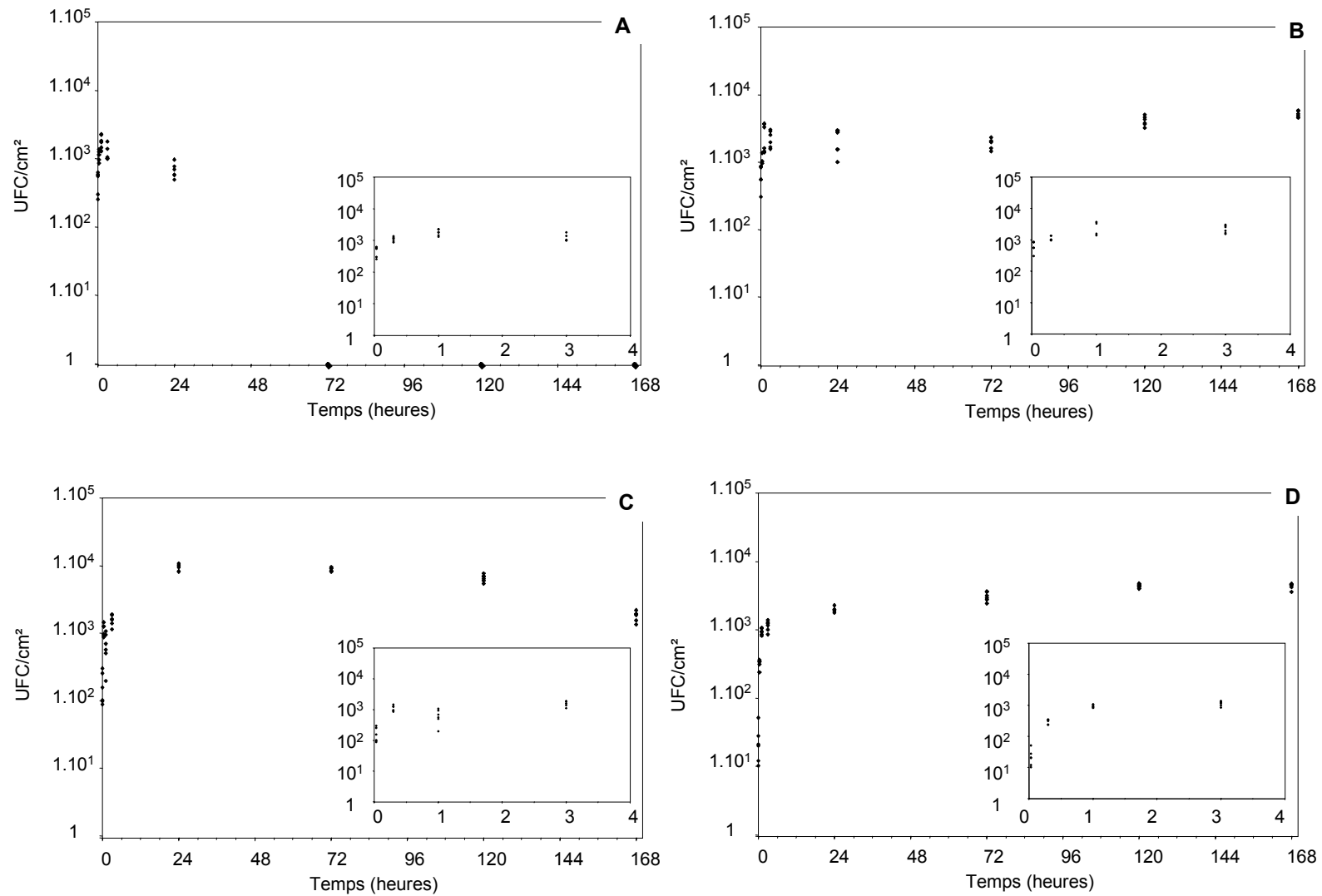


Figure 75 : Cinétiques d'adhésion des bactéries viables cultivables entre 0 et 168 heures de l'isolat D01 sur des échantillons de verre non preconditionnés (A), preconditionnés par de la SAB (B), du polA (C) ou un mix (D).

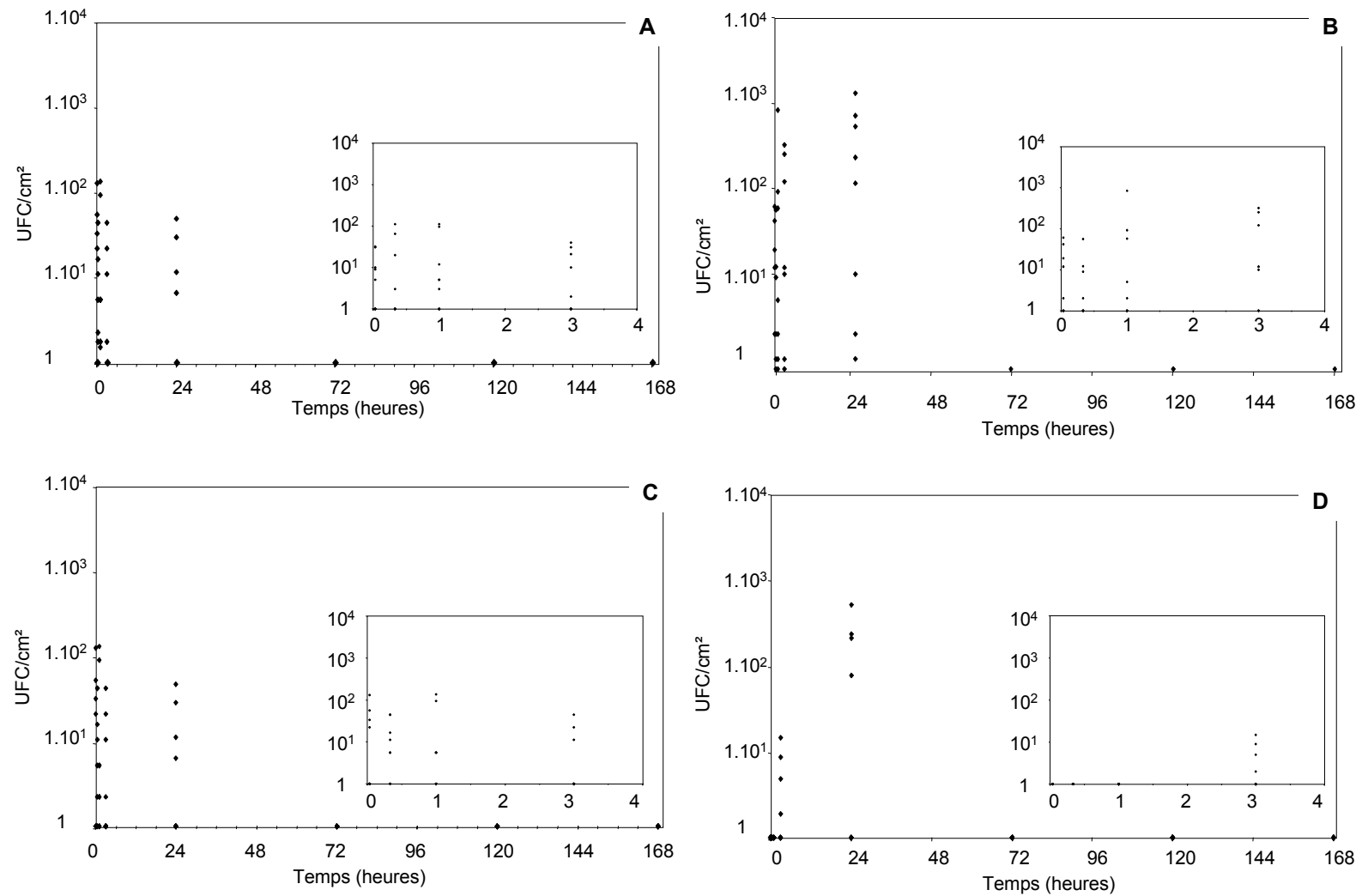


Figure 76 : Cinétiques d'adhésion des bactéries viables cultivables entre 0 et 168 heures de l'isolat D01 sur des échantillons de PTFE non préconditionnés (A), préconditionnés par de la SAB (B), du polA (C) ou un mix (D).

Les cinétiques d'adhésion de l'isolat D01 sur les échantillons d'acier inoxydable AISI 316L, de verre et de PTFE conditionnés par un film organique montrent que l'adhésion des bactéries est un phénomène rapide, comme sur des substrats non préconditionnés. Le nombre maximum de bactéries viables adhérentes est atteint en moins de 1 heure de contact suspension bactérienne-surface solide (sauf dans le cas d'une adhésion sur du verre conditionné par du polA, le maximum de bactéries adhérentes étant atteint entre 3 et 24 heures).

A temps courts (entre 2 minutes et 24 heures) :

- le nombre de bactéries viables cultivables adhérentes sur de l'acier inoxydable est légèrement plus faible après un préconditionnement par de la SAB ou du polA que sur un échantillon non préconditionné ou préconditionné par un mix ($P < 0,05$),
- le nombre de bactéries viables cultivables adhérentes est identique quel que soit le type de préconditionnement sur le verre et sur le PTFE ($P > 0,05$).

Enfin, nous pouvons remarquer qu'à temps longs (temps de contact supérieur à 24 heures) :

- le nombre de bactéries viables cultivables adhérentes sur des échantillons d'acier inoxydable ou de verre est compris entre 1.10^3 et 7.10^3 UFC/cm² lorsqu'un film primaire recouvre les surfaces solides alors que le nombre de bactéries est inférieur au seuil de détection lorsque les surfaces ne sont pas préconditionnées par un film primaire. Le film primaire permet donc la survie de cet isolat en servant de nutriment.

Nous pouvons noter que l'effet "substratum dépendant" observé sur les matériaux non préconditionnés est encore visible après préconditionnement par un film organique. En effet, qu'il y ait ou non un film organique, le nombre de bactéries viables cultivables adhérentes est de l'ordre de 10^3 UFC/cm² sur l'acier inoxydable et le verre et souvent inférieur au seuil de détection sur le PTFE. Ceci montre que le film primaire ne masque pas totalement les propriétés physico-chimiques des matériaux (l'adhésion n'est pas facilitée sur le PTFE en présence de molécules organiques). Ceci est en accord avec les données obtenues dans le chapitre 3 indiquant que le film primaire est hétérogène et ne recouvre au maximum que 42% de l'échantillon.

Dénombrement des bactéries totales adhérentes.

Les dénombrements de bactéries totales adhérentes par épifluorescence sur les échantillons d'acier inoxydable AISI 316L et de verre préconditionnés ou non par un film organique sont présentés sur la Figure 77.

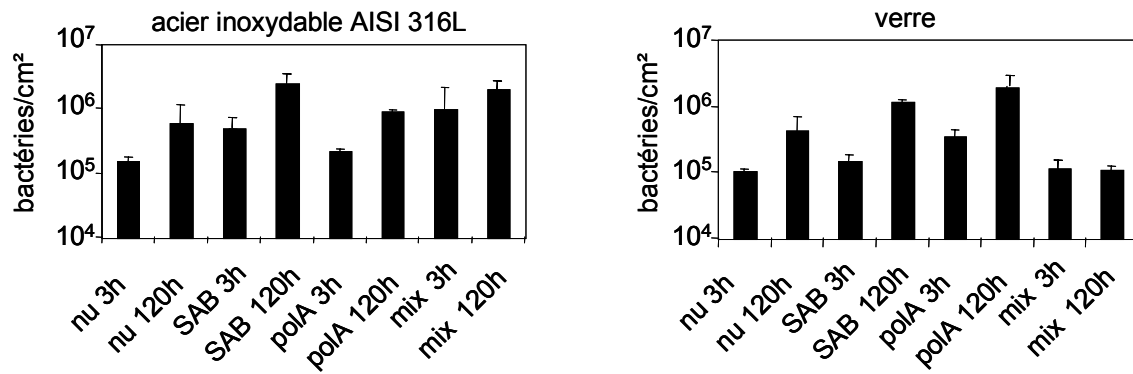


Figure 77 : D01 totales adhérentes sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L et de verre, préconditionnés ou non par un film organique formé à partir d'immersions dans des solutions 100% SAB, 100% polA ou mix, après 3 heures et 120 heures de contact suspension bactérienne - surface solide (moyenne de 3 essais indépendants).

Les résultats des dénombrements par épifluorescence sur les échantillons de PTFE ne sont pas présentés sur un graphique, aucune bactérie n'ayant été dénombrée sur ce matériau et ceci quel que soit le préconditionnement effectué et le temps de contact suspension bactérienne-surface solide.

Après 3 heures d'adhésion sur des échantillons d'acier inoxydable ou de verre, le nombre total de bactéries adhérentes est de 10^5 D01/cm² ; nombre qui augmente après 120 heures de contact substrat-suspension bactérienne pour atteindre 10^6 bactéries/cm².

Le nombre de bactéries totales adhérentes est supérieur au nombre de bactéries viables cultivables adhérentes indiquant soit que des bactéries sont mortes, soit qu'elles sont viables non cultivables. Après 3 heures d'adhésion, une différence de deux ordres de grandeur entre les bactéries viables cultivables et totales adhérentes existe alors qu'après 120 heures d'adhésion cette différence augmente encore pour se rapprocher de 3 ordres de grandeur lorsque les échantillons sont préconditionnés par un film organique et de 5-6 ordres de grandeur lorsque les échantillons ne sont pas préconditionnés. Ceci indique que des bactéries non cultivables sont adhérentes sur les substrats.

Le nombre de bactéries totales adhérentes ne varie pas en fonction du préconditionnement effectué et ceci quel que soit le matériau.

Analyse des surfaces par XPS.

Les spectres enregistrés sur les échantillons d'acier inoxydable AISI 316L, préconditionnés ou non par de la SAB ou du polA et immergés pendant 3 heures dans une suspension bactérienne, rincés en NaCl (36 g/L) présentent des éléments caractéristiques de la surface solide (Fe 2p_{3/2}, Cr 2p_{3/2} et O 1s), des solutions d'adhésion et de rinçage (Na 1s, Cl 2p_{3/2}, Ca 2p_{3/2}, Mg KLL et S 2p) et des isolats bactériens (C 1s, O 1s, N 1s, S 2p et P 2p). Comme indiqué dans le chapitre traitant de la caractérisation des bactéries pionnières :

- la déconvolution du pic de carbone (données traitées selon le chapitre 3) a montré la présence de 6 contributions : CH à 285 eV, C-N à 285,6 eV, COC ou COH à 286,8 eV, C=O à 287,3 eV, NC=O à 288,3 eV et COOH à 289,4 eV (Figure 78). La somme des contributions CN (pics à 285,6 eV et 288,3 eV) et la somme des contributions CO (pics à 286,8 eV, 287,3 eV et 289,4 eV) sont utilisées pour suivre l'adhésion des bactéries sur les supports.
- le pic d'azote centré à 401,3 eV est attribué à des amines ou des amides protonées caractérisant les protéines [51, 161] [81] (Figure 79).
- le pic d'oxygène se décompose en deux contributions : C-OH à 532,7 eV et COC ou C=O à 531,4 eV et est attribué à des protéines et à des polysaccharides.

Le Tableau 38 présente les aires normalisées des pics des espèces chimiques observées après analyse XPS d'échantillons d'acier inoxydable AISI 316L immergés 3 heures dans une suspension bactérienne.

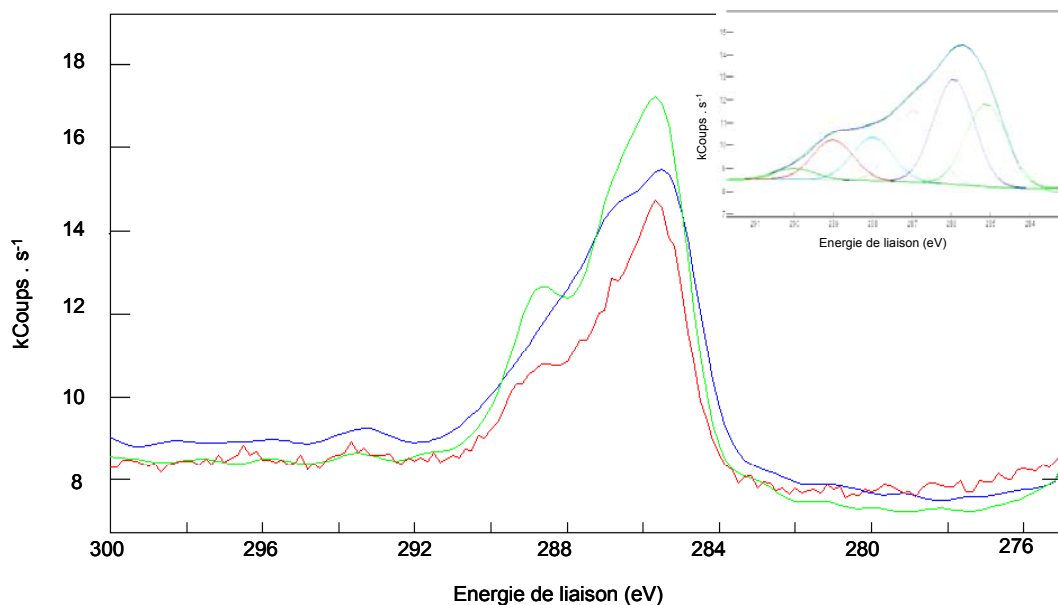


Figure 78 : Spectres XPS du C1s de l'isolat D01 après 3 heures d'adhésion sur un acier inoxydable nu (spectre rouge), préconditionné par de la SAB (spectre bleu) ou préconditionné par du polA (spectre vert) ; l'encart présente la déconvolution du pic de C1s de D01 sur un acier nu.

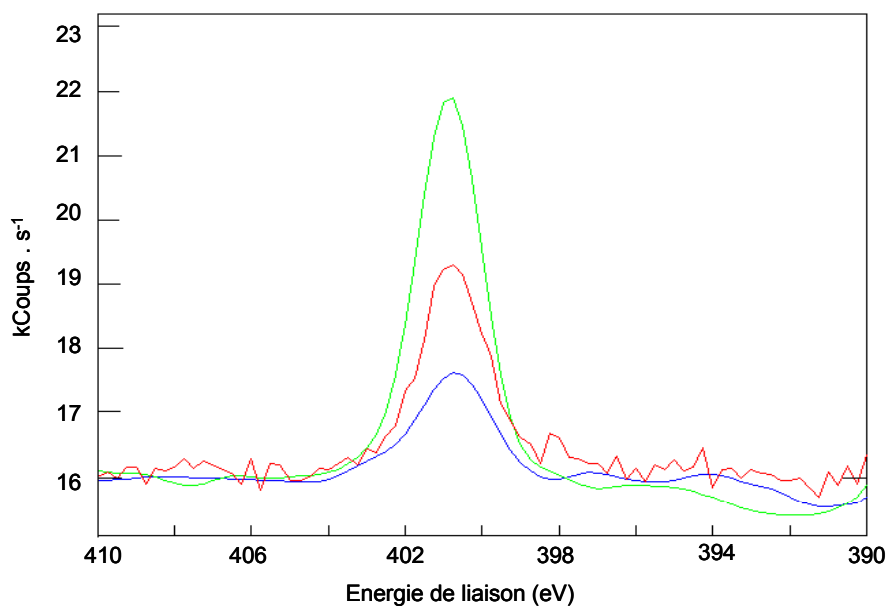


Figure 79 : Spectres XPS du N1s de l'isolat D01 après 3 heures d'adhésion sur un acier inoxydable nu (spectre rouge), préconditionné par de la SAB (spectre bleu) ou préconditionné par du polA (spectre vert).

	Inox nu	Inox + SAB	Inox + pol A
Na 1s	4368	5090	6439
Cl 2p_{3/2}	5426	5566	7485
Ca 2p_{3/2}	15	-	73
Mg KLL	187	16	104
S 2p	173	55	13
P 2p	514	404	843
Fe 2p_{3/2} + Cr 2p_{3/2}	5452	5529	6154
N 1s	1714	3724	1200
Σ CN	5739	6493	5066
Σ CO	5380	5369	5070
OC=O	99	77	215

Tableau 38 : Analyse XPS d'échantillons d'acier inoxydable AISI 316L préconditionnés ou non par un film organique composé de SAB ou de polA après 3 heures d'adhésion de l'isolat D01 et rinçage en solution NaCl (Coups.eV.s-1).

Notons que les signaux métalliques sont encore détectés. Considérant l'épaisseur d'une bactérie (>0,1 μm), ceci indique que l'adhésion bactérienne ne couvre pas toute la surface de l'échantillon. En supposant que les bactéries masquent totalement les signaux métalliques provenant de la surface recouverte, les taux de recouvrement calculés après adhésion de l'isolat D01 sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L "nus" ou préconditionnés par de la SAB ou du polA sont respectivement de 46%, 45% et 39%. Rappelons qu'après adsorption de SAB ou de polA sur un acier inoxydable, les taux de recouvrement étaient respectivement de 37 ± 5 % et de 23 ± 4 %.

Une analyse plus approfondie des contributions de l'azote et du carbone indiquent : une augmentation de l'aire du pic d'azote (facteur 2) lorsque l'échantillon est préconditionné par de la SAB par rapport à un échantillon nu et une augmentation de l'aire de la contribution OC=O (facteur 2) lorsque l'échantillon est préconditionné par le polA par rapport à un échantillon nu. Ceci révèle que les deux macromolécules organiques sont encore visibles. L'isolat D01 adhère donc en partie sur l'acier inoxydable nu et sur le film organique.

L'atténuation des signaux métalliques est donc due aux bactéries, aux macromolécules organiques ainsi qu'aux sels présents et déposés en surface de l'acier inoxydable, sels principalement sous la forme NaCl.

Analyse des échantillons par Microscopie Electronique à Balayage.

Les échantillons d'acier inoxydable nus sont observés par microscopie électronique à balayage après 3 heures et 120 heures de contact avec une suspension bactérienne et rinçage en NaCl (36 g/L). Les photos sont présentées sur la Figure 80.

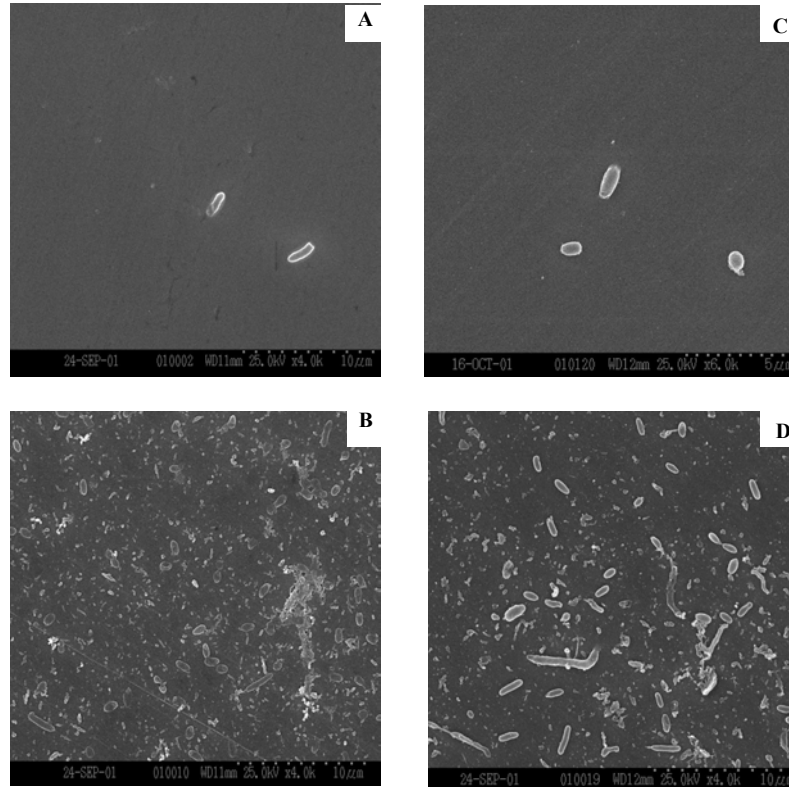


Figure 80 : Photographies de l'isolat D01 adhérant sur des échantillons d'acier inoxydable nu après 3 heures, photos A ($\times 4000$), et 120 heures, photo B ($\times 4000$), de contact et adhérant sur des échantillons d'acier inoxydable préconditionnés par du mix après 3 heures, photos C ($\times 8000$), et 120 heures, photo D ($\times 4000$).

Après trois heures d'adhésion, le nombre de D01 adhérente est faible que les échantillons soient nus ou préconditionnés. Le faible nombre de bactéries adhérentes vues sur les photos 80A et 80C correspond néanmoins à un recouvrement de l'ordre de 10^5 bactéries/cm².

Après 120 heures d'adhésion, nous notons que la colonisation est plus importante dans les deux cas observés ci-dessus. Il ne semble pas y avoir d'exopolymères excrétés par les bactéries.

1.2.2. Adhésion de l'isolat D41 sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L, de verre et de PTFE préconditionnés ou non par un film primaire.

Dénombrement des bactéries viables cultivables adhérentes.

Les cinétiques d'adhésion de l'isolat D41 sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L, de verre et de PTFE préconditionnés ou non par un film primaire sont présentées sur les Figures 81, 82 et 83.

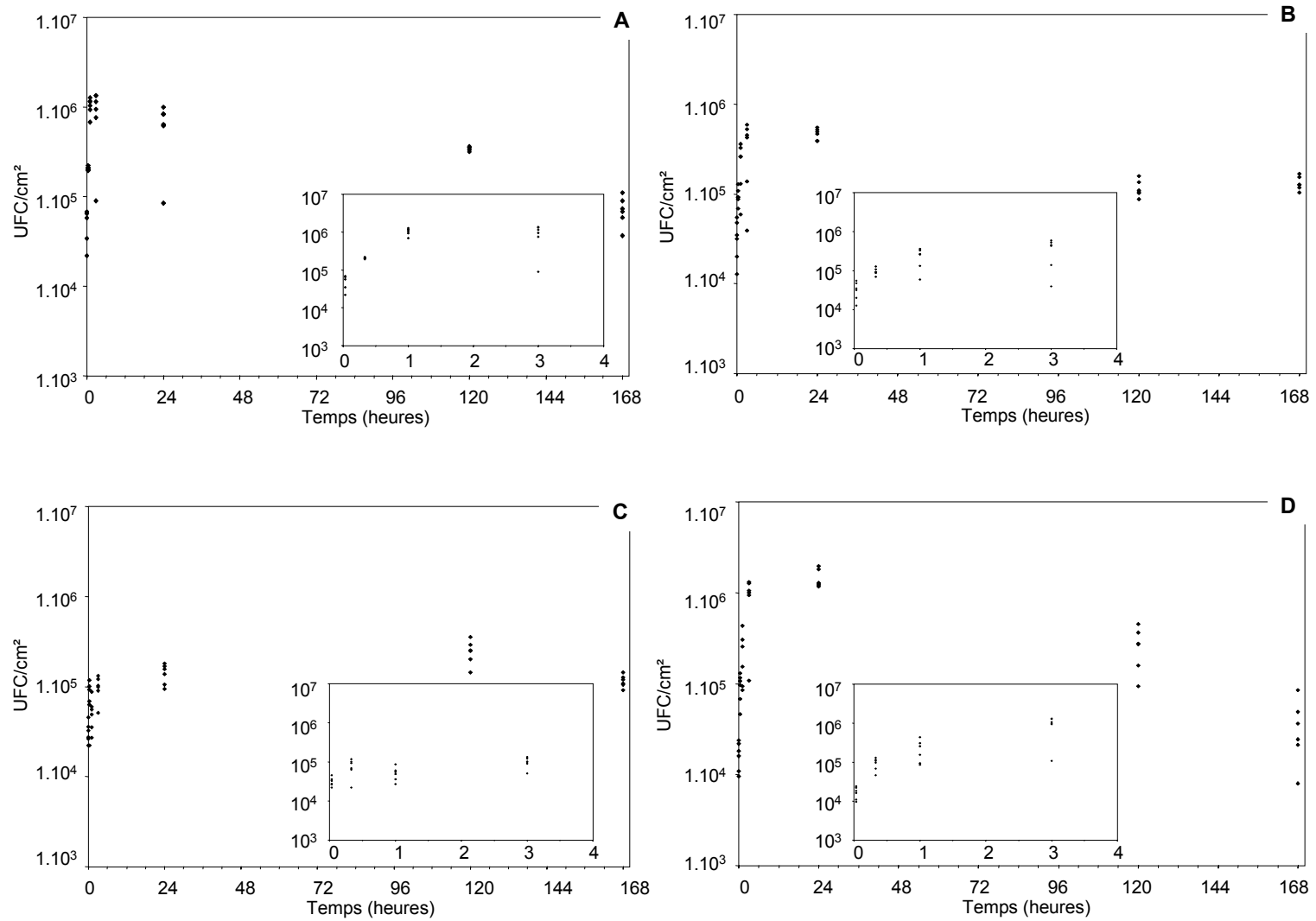


Figure 81 : Cinétiques d'adhésion des bactéries viables cultivables entre 0 et 168 heures de l'isolat D41 sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L non préconditionnés (A), préconditionnés par de la SAB (B), du *polA* (C) ou un mix (D).

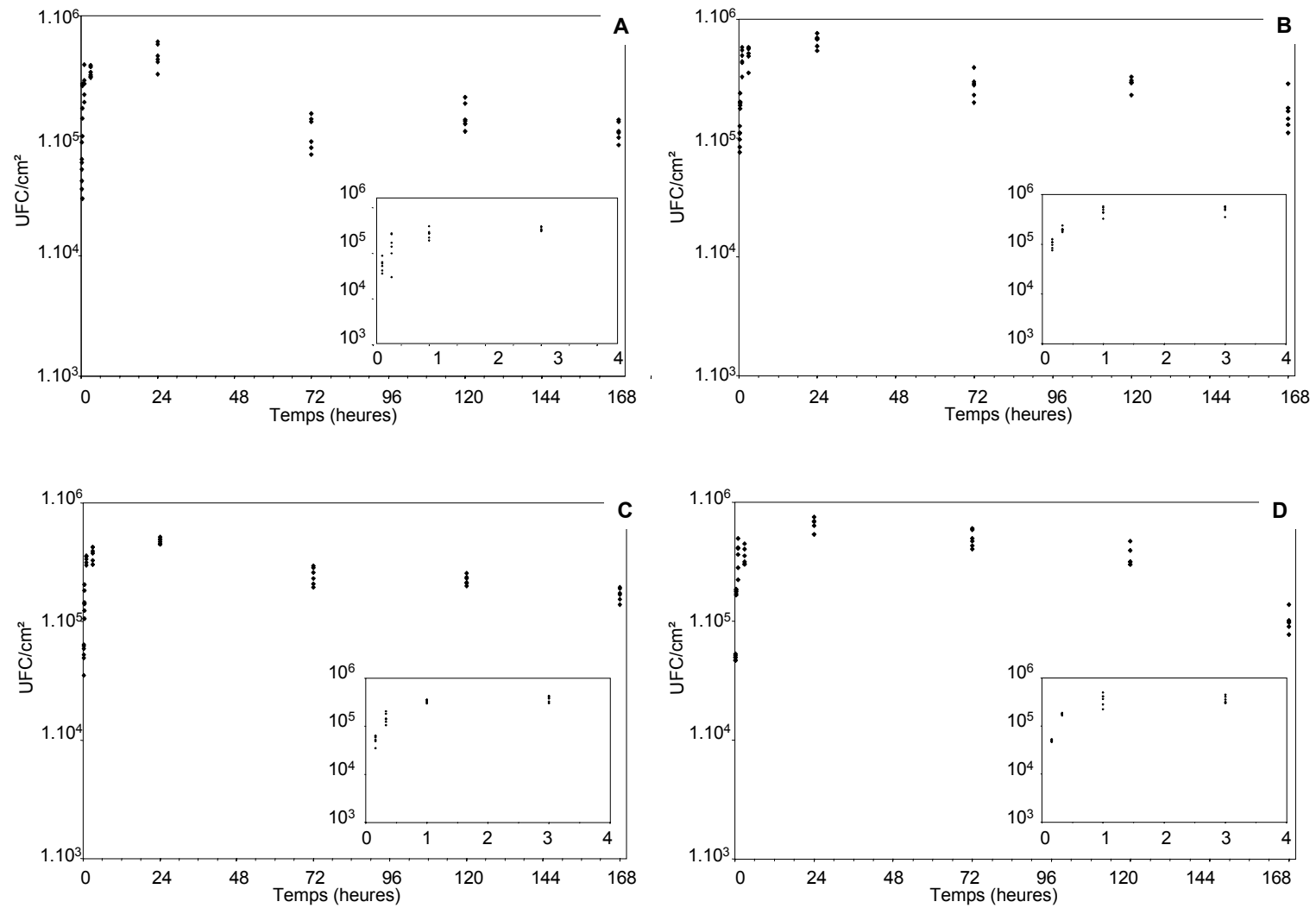


Figure 82 : Cinétiques d'adhésion des bactéries viables cultivables entre 0 et 168 heures de l'isolat D41 sur des échantillons de verre non preconditionnés (A), preconditionnés par de la SAB (B), du polA (C) ou un mix (D).

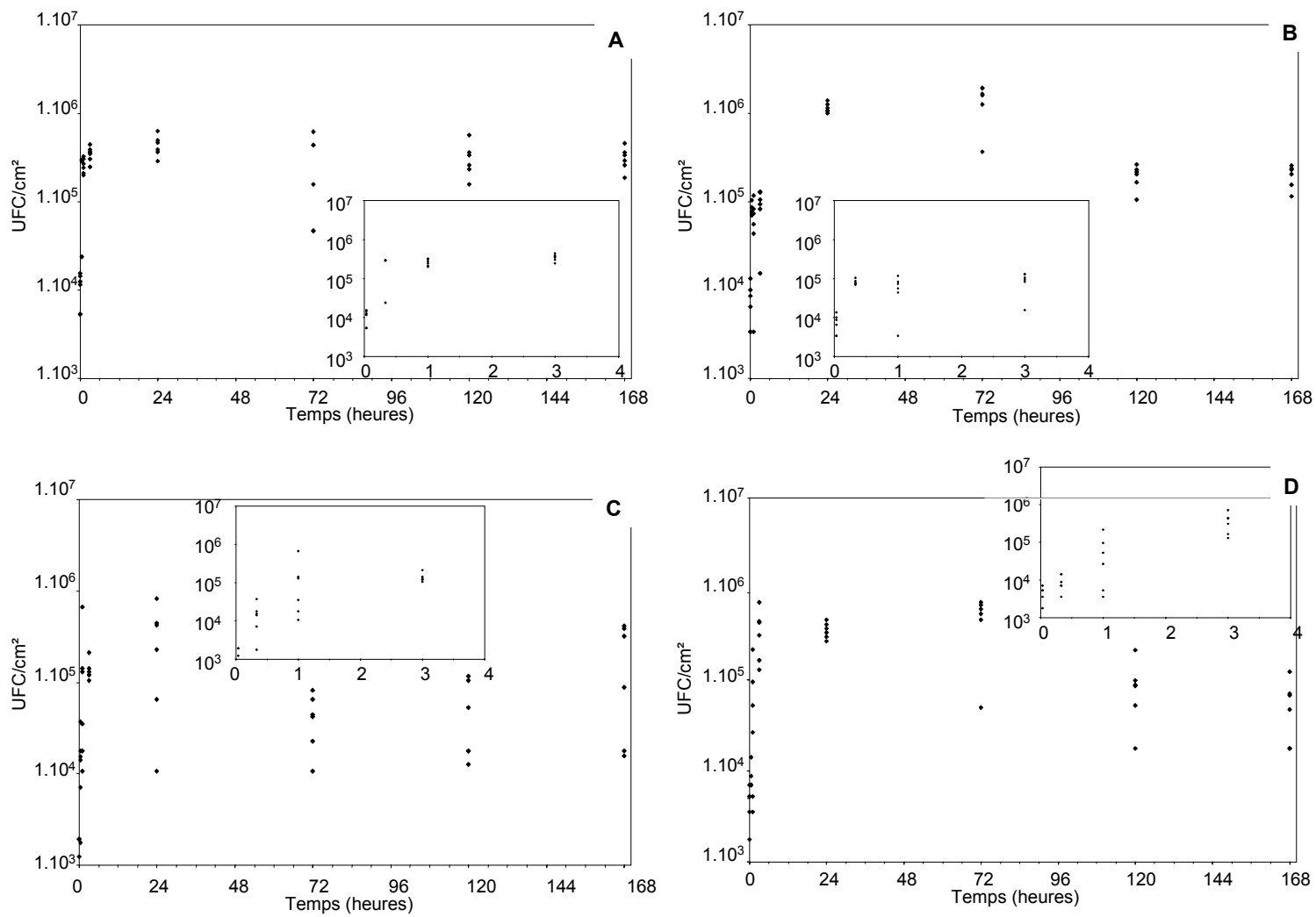


Figure 83 : Cinétiques d'adhésion des bactéries viables cultivables entre 0 et 168 heures de l'isolat D41 sur des échantillons de PTFE non préconditionnés (A), préconditionnés par de la SAB (B), du polA (C) ou un mix (D).

L'adhésion de l'isolat D41 est un phénomène rapide. Le nombre maximum de bactéries viables cultivables adhérentes est atteint rapidement (1 heure). Une analyse plus approfondie des Figures 81 à 83 indique que :

- quelle que soit la nature du matériau et le type de conditionnement, le nombre de bactéries viables cultivables est similaire (10^5 - 10^6 UFC/cm²). Les faibles différences existant sur l'acier inoxydable s'estompent après 72 heures ($P > 0,05$).
- l'adhésion de l'isolat D41 sur des échantillons de PTFE est plus dispersée que sur les autres matériaux, indiquant que les forces d'adhésion sont légèrement plus faibles sur ce type de matériau et que le rinçage enlève un certain nombre de bactéries faiblement adhérentes.

L'adhésion de cet isolat est différente de celle de l'isolat D01. Deux constatations peuvent être effectuées : le film organique n'est pas nécessaire à sa survie, les exopolymères excrétés par ce micro-organisme lui servant probablement de substrat nutritif ; le nombre de D41 viables cultivables adhérentes est très supérieur à celui de D01 (2 ordres de grandeur). L'adhésion de cet isolat est donc facile sur les trois types de matériaux testés et quel que soit le type de préconditionnement réalisé. Aucun effet "substratum dépendant", n'est mis en évidence.

Dénombrement des bactéries totales adhérentes.

Les résultats des dénombrements des bactéries totales par épifluorescence sur les échantillons d'acier inoxydable AISI 316L, de verre et de PTFE préconditionnés ou non par un film organique sont présentés sur la Figure 84.

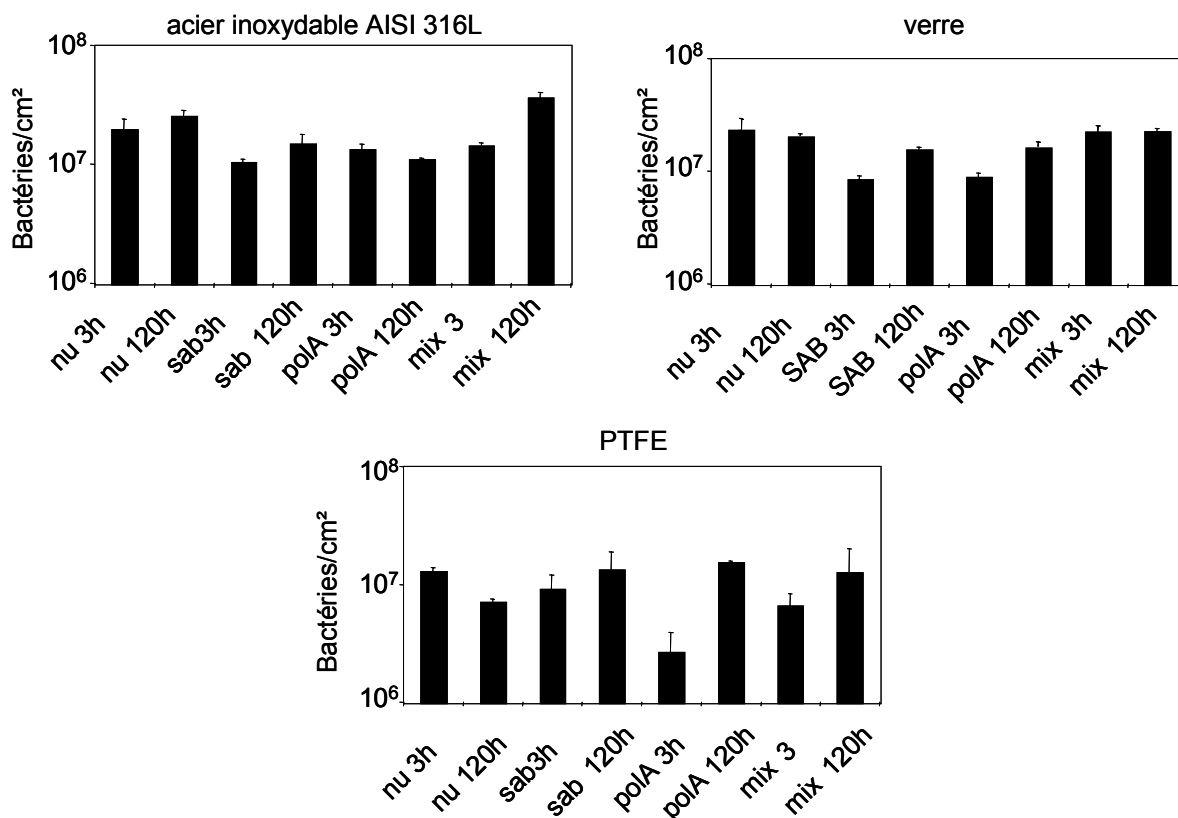


Figure 84 : D41 totales adhérentes après 3 heures et 120 heures de contact suspension bactérienne- surface solide sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L, de verre et de PTFE nus ou préconditionnés par de la SAB, du polA ou du mix (moyenne de 3 essais indépendants).

Le nombre de bactéries totales diffère du nombre de bactéries viables cultivables. Alors qu'en moyenne 10⁵- 10⁶ bactéries viables cultivables adhèrent par cm² sur les trois types de support, nous avons dénombré en moyenne 1.10⁷ bactéries totales/cm² sur ces mêmes substrats. Le nombre de bactéries totales adhérentes varie peu (moins d'un ordre de grandeur) entre 3 heures et 120 heures d'adhésion.

Le préconditionnement des échantillons par des molécules organiques ne modifie pas significativement le nombre de D41 totales adhérentes, et ceci quel que soit le type de matériau testé.

Analyse des surfaces par XPS.

L'analyse par XPS d'échantillons d'acier inoxydable AISI 316L immergés pendant 3 heures dans une suspension bactérienne puis rincés en NaCl (36 g/L) met en évidence la présence de pics caractéristiques de la surface solide (Fe 2p_{3/2}, Cr 2p_{3/2} et O 1s), de la solution de rinçage ou d'adsorption (Na 1s, Cl 2p_{3/2}, Ca 2p_{3/2}, Mg KLL, S 2p) et des isolats bactériens

(C 1s, O 1s, N 1s, et P 2p), comme indiqué après adhésion de l'isolat D01. Les figures 85 et 86 présentent les pics XPS de C1s et de N1s de l'isolat D41 après adhésion sur les échantillons d'acier inoxydable préconditionnés ou non par des macromolécules organiques. Le Tableau 39 présente les aires normalisées des pics des espèces chimiques observées.

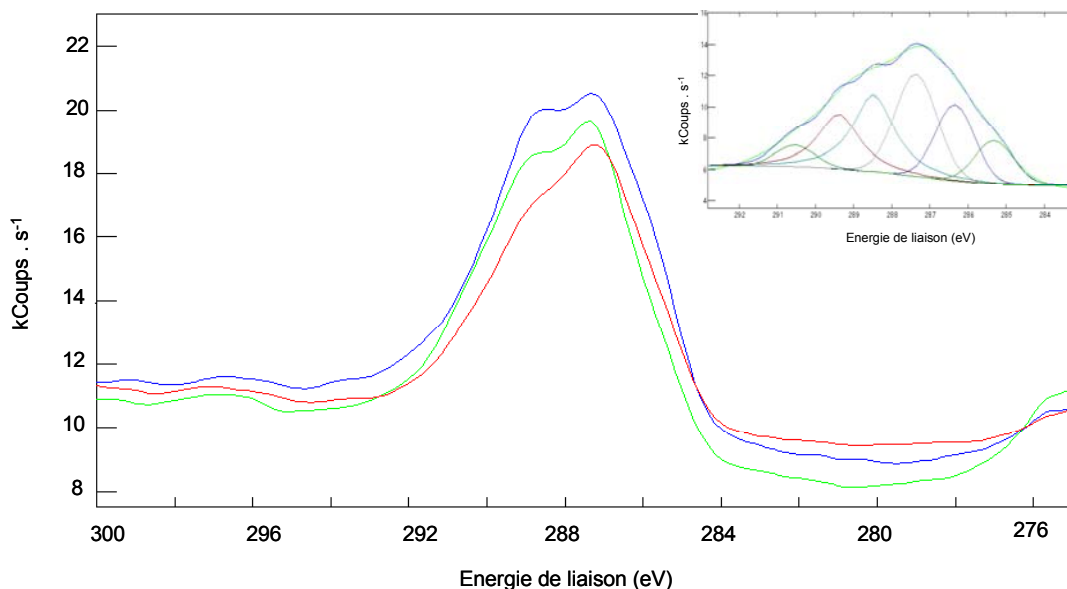


Figure 85 : Spectres XPS de C1s de l'isolat D41 après 3 heures d'adhésion sur un acier inoxydable nu (spectre rouge), préconditionné par de la SAB (spectre bleu) ou préconditionné par du polA (spectre vert) ; l'encart présente la déconvolution du pic de C1s de D41 sur un acier nu.

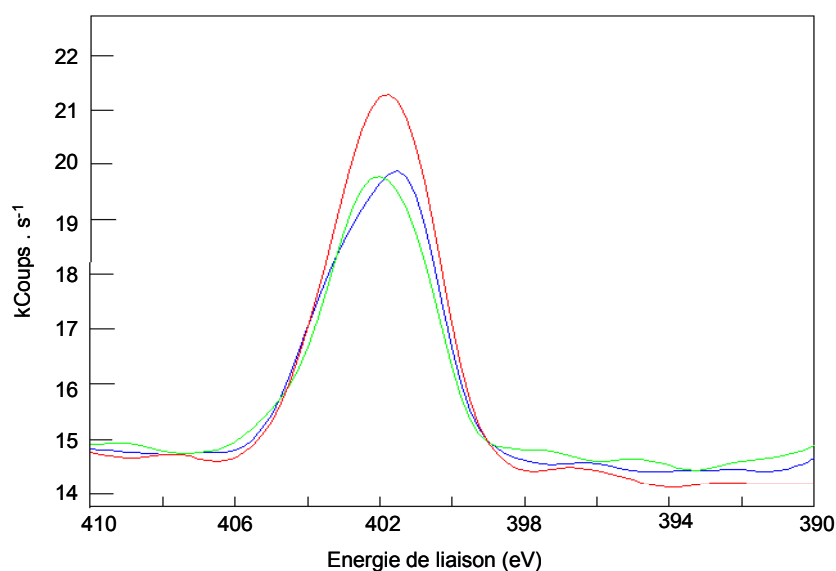


Figure 86 : Spectres XPS de N1s de l'isolat D41 après 3 heures d'adhésion sur un acier inoxydable nu (spectre rouge), préconditionné par de la SAB (spectre bleu) ou préconditionné par du polA (spectre vert).

	<i>Inox nu</i>	<i>Inox + SAB</i>	<i>Inox + pol A</i>
<i>Na 1s</i>	3800	7554	6304
<i>Cl 2p_{3/2}</i>	6137	9957	8980
<i>Ca 2p_{3/2}</i>	-	6	6
<i>Mg KLL</i>	207	5	105
<i>S 2p</i>	244	66	124
<i>P 2p</i>	756	751	456
<i>Fe 2p_{3/2} + Cr 2p_{3/2}</i>	363	1331	997
<i>N 1s</i>	6371	4862	5406
<i>Σ CN</i>	11490	9092	9637
<i>Σ CO</i>	18728	16522	15644
<i>OC=O</i>	2922	3397	2569

Tableau 39 : Analyse XPS d'échantillons d'acier inoxydable AISI 316L préconditionnés ou non par un film organique après 3h d'adhésion de l'isolat D41 et rinçage en solution NaCl (Coups.eV.s⁻¹).

Les signaux métalliques sont très fortement atténués par rapport à un acier inoxydable juste nettoyé mais encore détectables. Considérant l'épaisseur d'une bactérie (>0,1 µm), ceci signifie que l'adhésion bactérienne ne recouvre pas toute la surface. Les taux de recouvrement calculés (en supposant que les bactéries masquent totalement les signaux métalliques provenant de la surface recouverte) après 3 heures d'adhésion de l'isolat D41 sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L "nus" ou préconditionnés par de la SAB ou du polA sont respectivement de 96%, 87% et 90%. Ce taux de recouvrement ainsi que les signaux relatifs aux bactéries (N 1s, C1s, O 1s) est plus important que celui de l'isolat D01, confirmant que l'isolat D41 adhère en plus grande quantité que l'isolat D01 sur des échantillons d'acier inoxydable.

Au contraire de l'isolat D01, aucune augmentation du signal d'azote ou de la contribution OCO n'est observée lorsque les échantillons sont préconditionnés respectivement par de la SAB ou du polA. Ceci indique que les macromolécules organiques sont recouvertes par les bactéries.

Néanmoins, les dénombrements par épifluorescence ont comptabilisé 2.10^7 bactéries/cm² qui recouvrent, en supposant qu'une bactérie a une surface de 1 μm², uniquement 20% de l'échantillon. L'atténuation des signaux métalliques n'est donc pas uniquement due aux micro-organismes mais aussi aux sels déposés après rinçage dans la solution NaCl (36 g/L) dont l'intensité totale est 3 à 5 fois plus élevée qu'après une immersion en solution NaCl sans composés organiques ni bactéries (chapitre 3 paragraphe 2.1).

Analyse des échantillons par Microscopie Electronique à Balayage.

Les échantillons d'acier inoxydable nus sont observés par microscopie électronique à balayage après 3 heures et 120 heures de contact avec une suspension bactérienne et rinçage en NaCl (36 g/L). Les photos sont présentées sur la Figure 87.

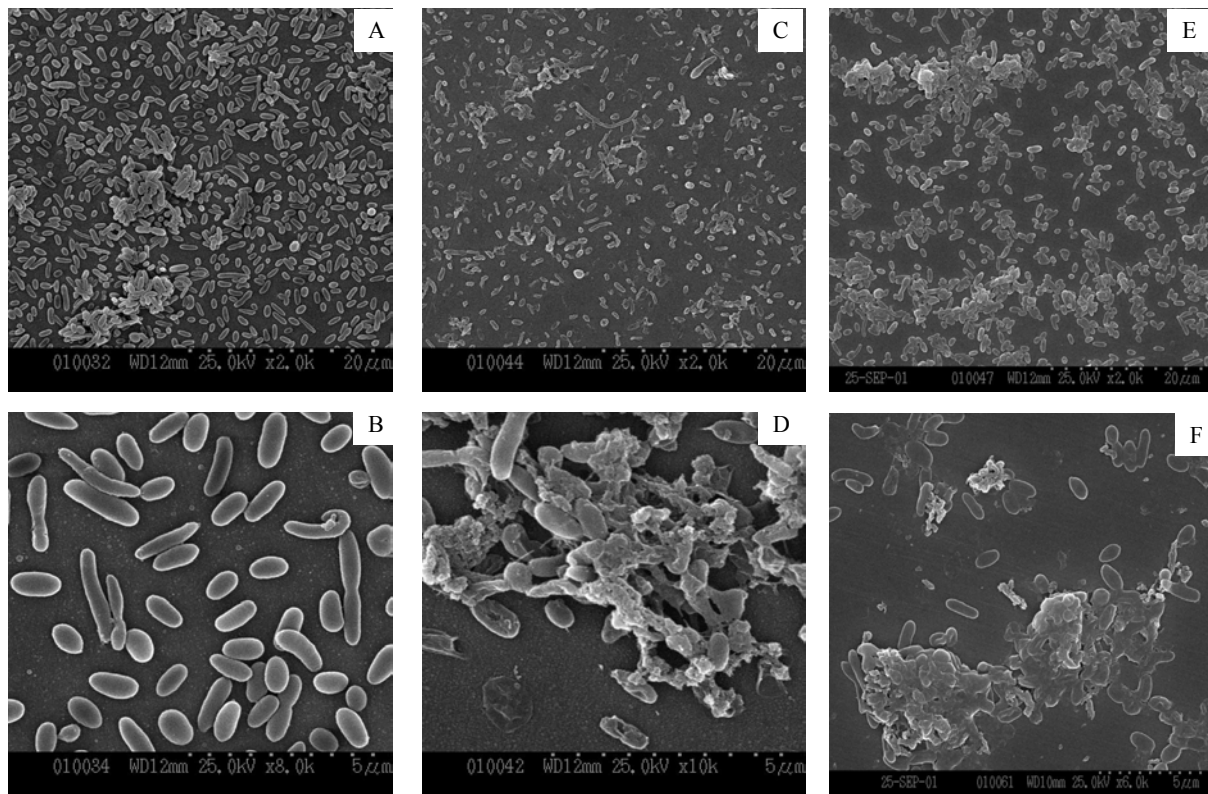


Figure 87 : Photographies de l'isolat D41 adhérant sur des échantillons d'acier inoxydable nus après 3 heures : photos A ($\times 2000$) et B ($\times 8000$) et 120 heures : photos C ($\times 2000$) et D ($\times 8000$) de contact ainsi que sur des échantillons préconditionnés par un mix après 120 heures de contact : photos E ($\times 2000$) et F ($\times 8000$).

Après 3 heures d'adhésion de l'isolat D41 sur des échantillons d'acier inoxydable, nous observons une colonisation homogène de la surface où différents types morphologiques

sont présents (cellules courtes et cellules plus allongées) indiquant probablement une modification induite par les mécanismes d'adhésion. A ce stade, la présence d'exopolymères n'est pas observée.

Après 120 heures de contact entre la suspension bactérienne et l'échantillon d'acier inoxydable, la présence d'exopolymères est clairement mise en évidence que l'échantillon soit ou non préconditionné par un film organique (photos D et F). Ces polymères enchâssent les bactéries créant de petits amas sur la surface dans lesquels les deux types morphologiques sont encore observés. Le nombre de cellules bactériennes adhérentes a peu évolué entre 3 et 120 heures d'adhésion.

1.2.3. Adhésion de l'isolat DA sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L, de verre et de PTFE préconditionnés ou non par un film primaire.

Dénombrement des bactéries viables cultivables adhérentes.

Les dénombrements de bactéries viables cultivables en fonction du temps de contact substrat-suspension bactérienne sont présentés sur les Figures 88, 89 et 90.

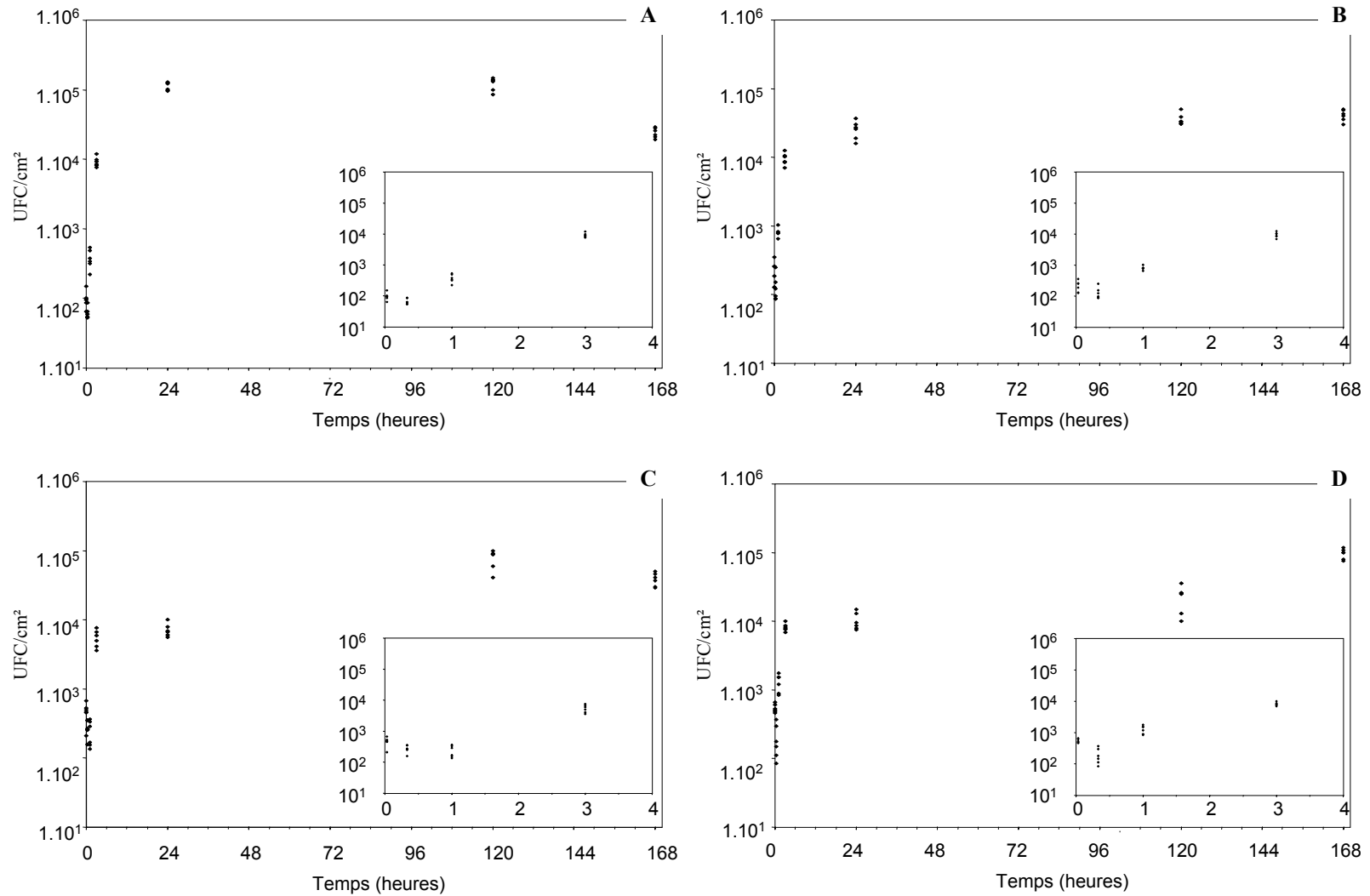


Figure 88 : Cinétiques d'adhésion des bactéries viables cultivables, entre 0 et 168 heures, de l'isolat DA sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L non préconditionnés (A), préconditionnés par de la SAB (B), du *polA* (C) ou un mix (D).

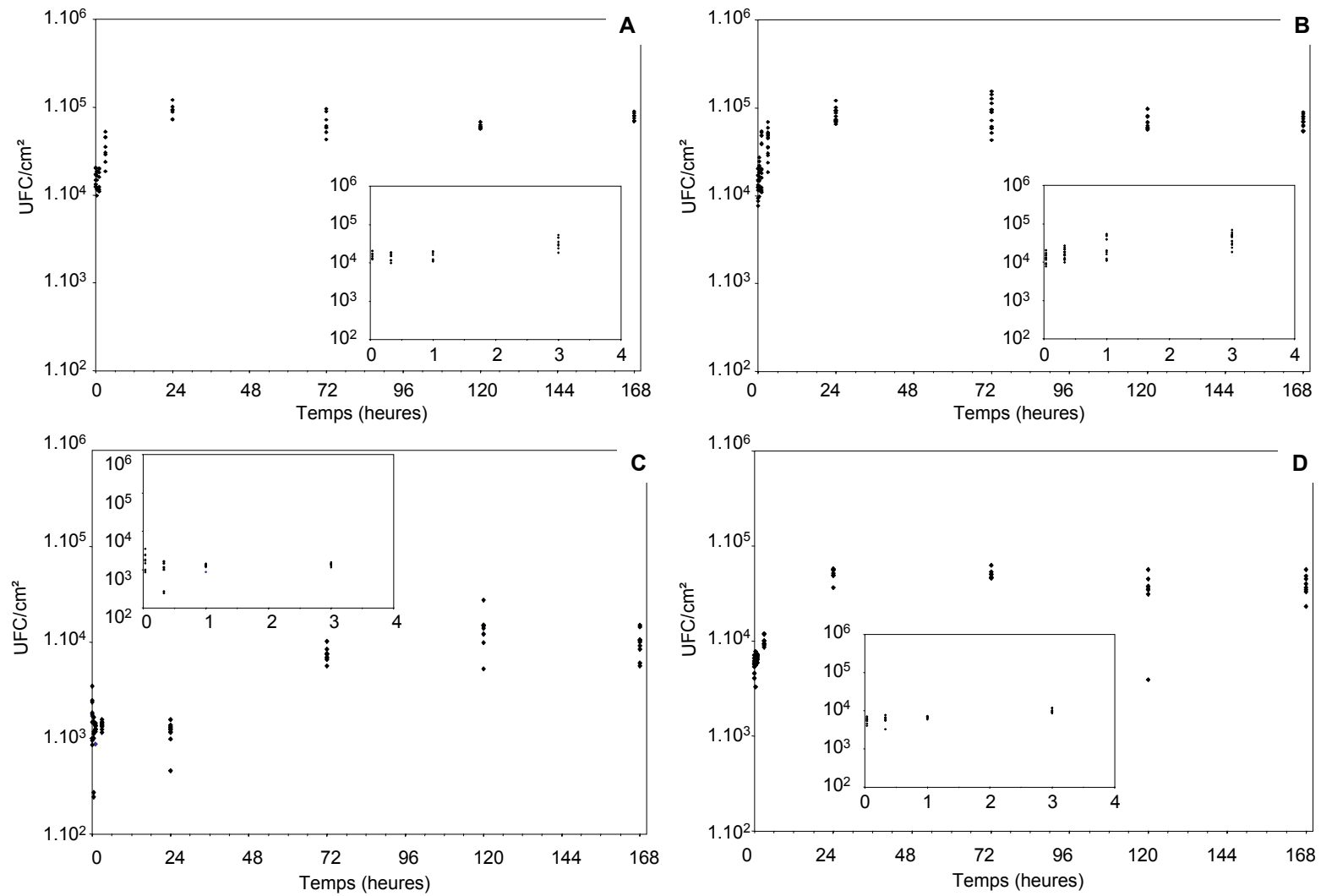


Figure 89 : Cinétiques d'adhésion des bactéries viables cultivables, entre 0 et 168 heures, de l'isolat DA sur des échantillons de verre non preconditionnés (A), preconditionnés par de la SAB (B), du *polA* (C) ou un mix (D).

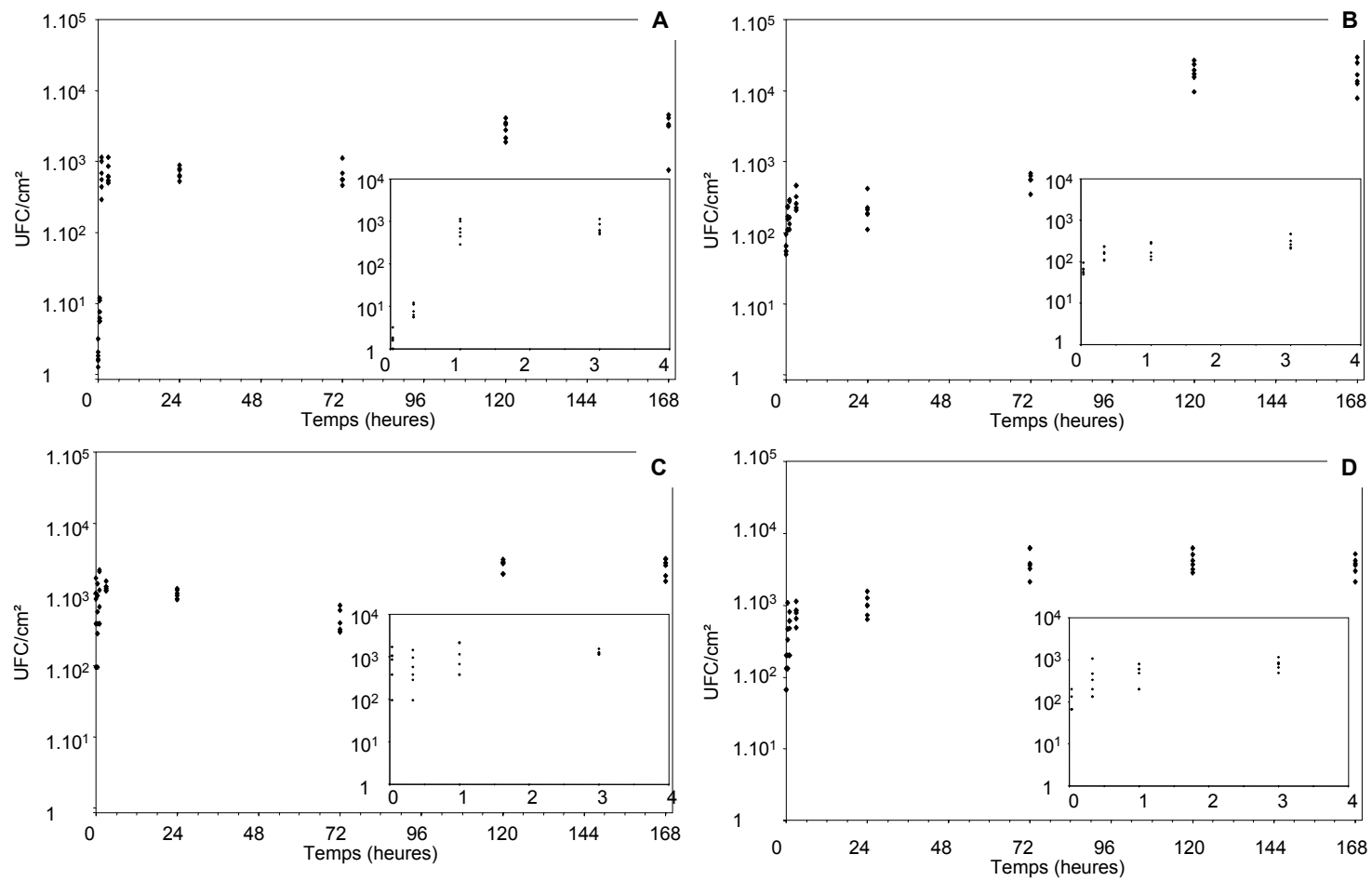


Figure 90 : Cinétiques d'adhésion des bactéries viables cultivables, entre 0 et 168 heures, de l'isolat DA sur des échantillons de PTFE non preconditionnés (A), preconditionnés par de la SAB (B), du polA (C) ou un mix (D).

Le nombre maximum de bactéries viables cultivables adhérentes est de l'ordre de 10^4 - 10^5 /cm² sur les échantillons d'acier inoxydable AISI 316L et de verre et de 10^3 - 10^4 /cm² sur le PTFE. Ainsi, les bactéries adhèrent en plus faible quantité sur les échantillons de PTFE, même après préconditionnement de ceux-ci par un film organique. Ceci indique que les propriétés physico-chimiques du matériau ne sont pas totalement masquées par le film préconditionnant puisque la souche DA, une bactérie hydrophile, a toujours des difficultés à adhérer sur un substrat hydrophobe.

Plusieurs points peuvent être mis en évidence à partir des Figures 88 à 90 :

- sur l'acier inoxydable, le préconditionnement par des molécules organiques a peu d'effet sur l'adhésion de l'isolat DA. Le préconditionnement par du polA ou du mix a un très léger effet inhibiteur de l'adhésion de l'isolat DA ($P < 0,05$).
- sur le verre, le conditionnement par le polA a un effet inhibiteur de l'adhésion pour l'isolat DA. De même, un très léger effet inhibiteur est à noter lorsque les échantillons sont préconditionnés par du mix ($P < 0,05$).
- sur le PTFE, le préconditionnement par des molécules organiques a un effet promoteur sur l'adhésion de l'isolat DA pour des temps inférieurs à 3 heures.

La diminution du nombre de bactéries viables cultivables adhérentes sur du verre et de l'acier inoxydable préconditionnés par du polA ou du mix peut être de deux ordres : répulsions électrostatiques entre les deux macromolécules portant la même charge (polA sur l'échantillon et polA en surface de la bactérie), répulsion de type hydrophobe/hydrophile. Aucune répulsion entre le polA adsorbé sur le PTFE et le polA en surface de la bactérie n'a été mise en évidence alors que les quantités de polA dosées sur les trois types de matériaux étaient équivalentes (chapitre 3 paragraphe 1.3). Ceci nous laisse supposer que le film organique composé de polA n'a pas la même conformation que celui créé sur le verre et sur l'acier inoxydable, les fonctions chimiques exposées étant différentes.

Dénombrement des bactéries totales adhérentes.

Les résultats des dénombrements des bactéries totales par épifluorescence sur les échantillons d'acier inoxydable AISI 316L, de verre et de PTFE préconditionnés ou non par un film organique sont présentés sur la Figure 91.

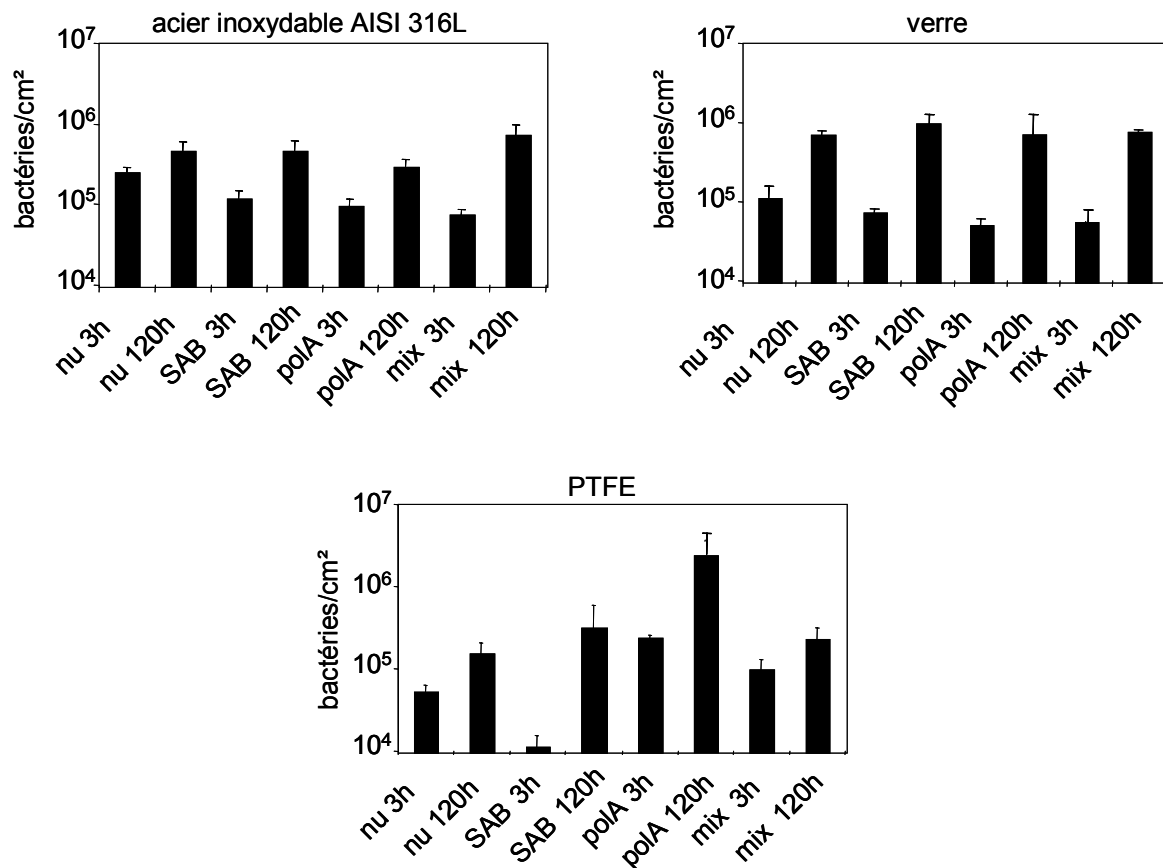


Figure 91 : DA totales adhérentes après 3 heures et 120 heures de contact suspension bactérienne- surface solide sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L, de verre et de PTFE préconditionnés ou non par de la SAB, du polA ou du mix (moyenne d'au moins 3 essais indépendants).

Le nombre de bactéries totales diffère du nombre de bactéries viables cultivables. Il y a une différence de 1 à 2 ordres de grandeur entre les bactéries viables cultivables et les bactéries totales.

Le nombre de bactéries totales adhérentes augmente entre 3 heures et 120 heures de contact suspension bactérienne – surface solide indiquant que des bactéries mortes sont adhérentes.

Le préconditionnement des échantillons d'acier inoxydable, de verre ou de PTFE par des molécules organiques ne modifie pas significativement le nombre de bactéries totales adhérentes.

Notons que le nombre total de DA adhérentes est globalement du même ordre de grandeur que le nombre de D01 et d'un ordre de grandeur plus faible que le nombre de D41 adhérentes.

Analyse des surfaces solides par XPS.

Des échantillons d'acier inoxydable préconditionnés ou non par un film primaire et immergés 3 heures dans une suspension bactérienne puis rincés en NaCl (36 g/L) sont analysés par XPS. Les Figures 92 et 93 présentent les spectres XPS de C1s et de N1s de l'isolat DA après 3 heures d'adhésion sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L préconditionnés ou non par de la SAB et du polA. Le Tableau 40 présente les aires normalisées des pics de quelques espèces chimiques.

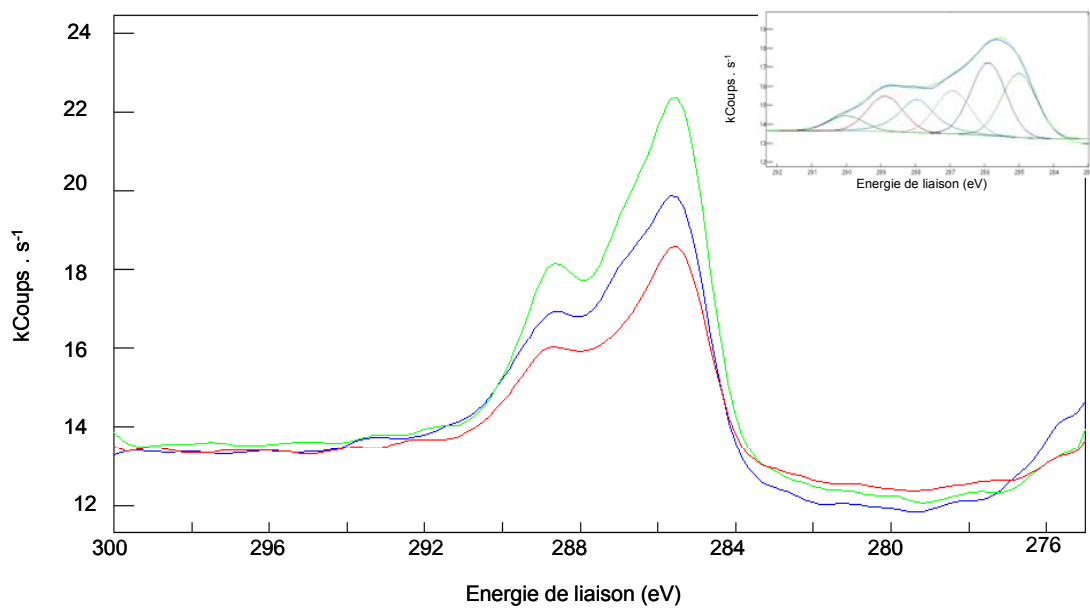


Figure 92 : Spectres XPS du C1s de l'isolat DA après 3 heures d'adhésion sur un acier inoxydable nu (spectre rouge), préconditionné par de la SAB (spectre bleu) ou préconditionné par du polA (spectre vert) ; l'encart présente la déconvolution du pic de C1s de D41 sur un acier nu.

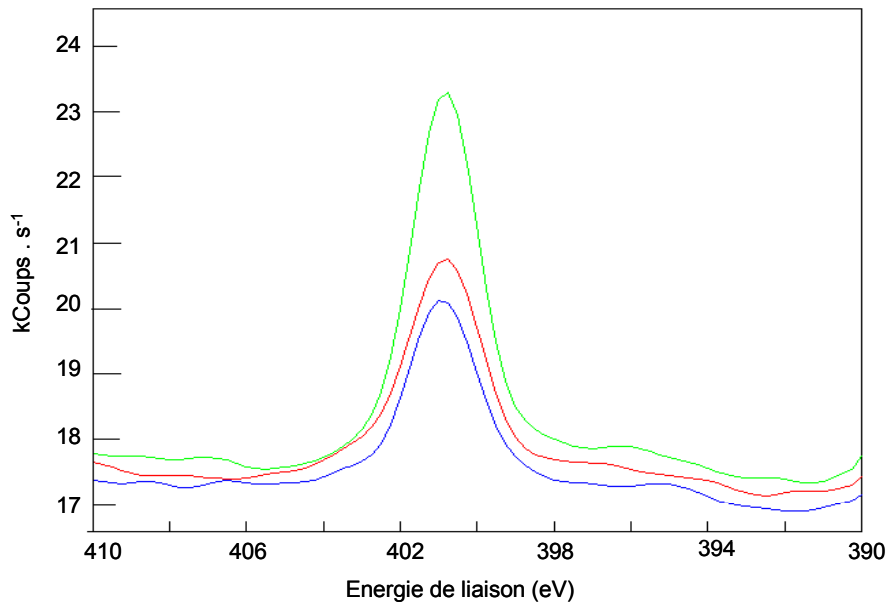


Figure 93 : Spectres XPS du N1s de l'isolat DA après 3 heures d'adhésion sur un acier inoxydable nu (spectre rouge), préconditionné par de la SAB (spectre bleu) ou préconditionné par du polA (spectre vert).

	<i>Inox nu</i>	<i>Inox + SAB</i>	<i>Inox + pol A</i>
<i>Na 1s</i>	6869	7151	9874
<i>Cl 2p_{3/2}</i>	9091	8759	11671
<i>Ca 2p_{3/2}</i>	-	-	33
<i>Mg KLL</i>	90	147	78
<i>S 2p</i>	-	-	-
<i>P 2p</i>	256	183	395
<i>Fe 2p_{3/2} + Cr 2p_{3/2}</i>	3405	5302	5415
<i>N 1s</i>	1993	3253	1866
Σ CN	5053	5964	4909
Σ CO	5014	5366	5018
<i>OC=O</i>	213	204	588

Tableau 40 : Analyse XPS d'échantillons d'acier inoxydable AISI 316L préconditionnés ou non par un film organique après 3h d'adhésion de l'isolat DA et rinçage en solution NaCl (Coups.eV.s⁻¹).

Les signaux métalliques sont encore visibles après adhésion de l'isolat DA et les taux de recouvrement calculés, en supposant que les signaux des métaux sont totalement atténués

par la bactérie, sont de 66%, 47% et 46% pour respectivement des échantillons nus et préconditionnés par de la SAB ou du polA. L'incertitude mesurée entre 2 analyses XPS a été estimée à 20%, dans le chapitre 3, il nous est donc difficile de conclure à un effet inhibiteur du préconditionnement à partir de ces derniers résultats.

Le Tableau 40 montre par ailleurs que l'aire du signal d'azote est plus important (facteur 1,6) lorsque les échantillons sont préconditionnés par de la SAB et que l'aire de la contribution OC=O du signal de carbone est plus grande (facteur 2) lorsque les échantillons sont préconditionnés par le polA. Ceci indique que le film primaire est encore visible. Les bactéries n'adhèrent donc pas uniquement sur le film organique.

La contribution OC=O du signal de carbone est plus grande pour l'isolat DA que pour l'isolat D01, indiquant que du polymère est présent en surface de l'échantillon. Ce résultat est confirmé par MEB, comme mis en évidence plus loin.

Notons de plus, que nous ne détectons pas de sulfates, alors que cet isolat en présentait un fort taux dans le chapitre 4. Les sulfates présents dans les polysaccharides sulfatés ou les fonctions acides (auxquelles étaient liés des sulfates provenant de l'eau de mer) pourraient intervenir dans la liaison de la bactérie sur le substrat.

Observation des échantillons par Microscopie Electronique à Balayage.

Les échantillons d'acier inoxydable nus ou préconditionnés par du mix sont observés par microscopie électronique à balayage après 3 heures et 120 heures de contact avec une suspension bactérienne et rinçage en NaCl (36 g/L). Les photographies sont présentées sur la Figure 94.

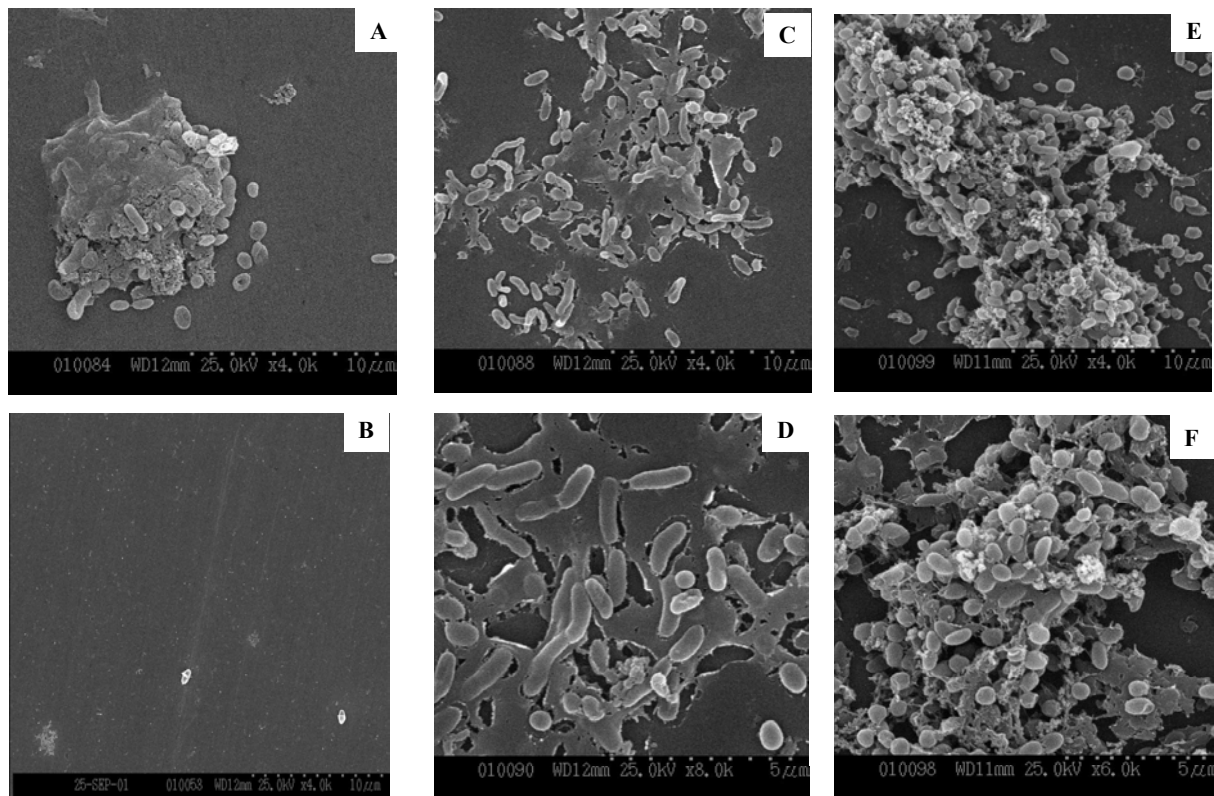


Figure 94 : Photographies MEB de l'isolat DA adhérant sur des échantillons d'acier inoxydable nus après 3 heures : photos A ($\times 4000$) et B ($\times 4000$) et 120 heures : photos C ($\times 4000$) et D ($\times 8000$) de contact ou sur un échantillon préconditionné par du mix après 120 heures d'adhésion : photos E ($\times 4000$) et F ($\times 8000$).

Après 3 heures de contact suspension bactérienne substrat, nous observons une adhésion bactérienne très hétérogène, des bactéries unitaires ainsi que des amas enrobés d'exopolymères étant présents sur la surface (photos A et B). Le préconditionnement des échantillons d'acier inoxydable par du mix n'a aucun effet sur l'adhésion à temps courts de cet isolat (les photos ne sont pas présentées mais sont identiques aux photos A et B). Dans les deux cas, le nombre de bactéries adhérentes est de l'ordre de 10^5 bactéries / cm^2 .

Après 120 heures d'adhésion, la colonisation du substrat est beaucoup plus homogène et plus importante (photos C et E). La production d'exopolymères est nettement mise en évidence sur les photos C à F. Sur les échantillons nus, les polymères forment un voile qui recouvre le substrat et les cellules bactériennes (photos C et D) alors que sur les échantillons préconditionnés par du mix, le voile de polymère présente une structure plus granuleuse, des agrégats bactériens étant alors observés (photos E et F).

1.3. Discussion.

Adhésion des isolats sur les échantillons d'acier inoxydable, de verre et de PTFE nus.

Nous avons étudié l'adhésion de trois souches marines, deux étant hydrophiles et une moyennement hydrophile, sur des échantillons de verre, d'acier inoxydable et de PTFE non préconditionnés dont les angles de contact à l'eau sont respectivement inférieur à 20° et sensiblement égaux à $73^\circ \pm 3^\circ$ et à $113^\circ \pm 1^\circ$. Les caractéristiques énergétiques de ces trois matériaux sont donc différentes : le verre est hydrophile, l'acier inoxydable moyennement hydrophile et le PTFE hydrophobe.

L'adhésion des isolats D01 et DA, les deux bactéries hydrophiles, sur les trois types de matériaux montre un effet substratum dépendant très net, c'est à dire un taux d'adhésion dépendant des propriétés physico-chimiques des matériaux et des bactéries (les isolats D01 et DA adhèrent moins sur des échantillons de PTFE que sur des échantillons de verre et d'acier inoxydable). Ceci indique donc que ces deux isolats adhèrent principalement par des interactions acide-base sur les substrats. Ceci est confirmé par les résultats obtenus par la MATS où l'adhésion aux solvants polaires se faisait principalement par les composantes acide-base selon Lewis. Cependant, ces propriétés physico-chimiques ne permettent pas d'expliquer à elles seules les différences d'adhésion observées sur le PTFE entre les isolats D01 et DA (très peu de D01 adhérentes/cm² et 10^3 à 10^5 DA adhérentes/cm²). En effet, au vue de la théorie de la DLVO, des bactéries ayant des composantes acide-base selon Lewis et Lifshitz van der Waals proches (chapitre 4, paragraphe 3.1), devraient avoir un comportement adhésif identique sur les différents matériaux. Il apparaît donc que la composition d'extrême surface (l'isolat DA est entouré de plus d'exopolysaccharides que l'isolat D01) et la production d'exopolymères par l'isolat DA permet le franchissement de la seconde barrière de répulsion évoquée dans la théorie de la DLVO et le renforcement de l'adhésion des bactéries sur des substrats sur lesquels l'adhésion est défavorable (les images MEB confirment que l'isolat DA est entouré d'exopolymères). Les forces d'adhésion entre la bactérie et le substrat sont alors plus importantes comme indiqué par Taylor *et al.* [26], un simple rinçage ne suffisant plus à détacher les bactéries.

L'adhésion de l'isolat D41 est importante sur tous les matériaux (2.10^7 bactéries/cm²) indépendamment de leurs caractéristiques énergétiques, aucun effet "substratum dépendant" n'est donc mis en évidence. L'adhésion de cet isolat s'effectue donc principalement par des interactions hydrophobes (interactions de Lifshitz van der Waals) sur les substrats. Cette

hypothèse est confirmée par les résultats de la MATS où cet isolat adhère aux solvants principalement par des interactions de Lifshitz van der Waals. Il semble aussi que l'isolat D41, tout comme l'isolat DA, masque localement les propriétés physico-chimiques des substrats et s'ancre plus solidement sur les différents substrats en produisant des exopolymères [113].

Les isolats D01, D41 et DA sont mobiles et de tailles identiques, les différences de cinétiques d'adhésion entre 0 et 24 heures observées (le plateau d'adhésion est atteint en moins d'une heure pour les isolats D01 et D41 et entre 3 et 24 heures pour l'isolat DA) peuvent donc être attribuées directement à leur composition d'extrême surface, les isolats D41 et D01 présentant plus de protéines en surface que l'isolat DA qui est couvert de polysaccharides. Ceci est en accord avec les cinétiques d'adsorption des différentes molécules organiques : protéines et polysaccharides. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 3, les protéines s'adsorbent plus rapidement que les polysaccharides sur des échantillons d'acier inoxydable.

Toutes les techniques analytiques, indiquent que l'isolat D41 adhère en plus grande quantité que les isolats D01 et DA :

- les bandes infra-rouge sont plus intenses de deux ordres de grandeur pour l'isolat D41 que pour les isolats D01 et DA.
- les taux de recouvrement XPS calculés à partir de l'atténuation des signaux métalliques sont de 46% pour l'isolat D01, 96% pour l'isolat D41 et 66% pour l'isolat DA.
- les taux de recouvrement calculés à partir des dénombrements bactériens par épifluorescence sont de 0,1% pour l'isolat D01, 20% pour l'isolat D41 et de 0,2% pour l'isolat DA.
- Les images obtenues par microscopie électronique à balayage montrent un plus fort recouvrement des échantillons d'acier inoxydable par l'isolat D41 que par les isolats D01 et DA.

Ces résultats soulèvent une contradiction apparente entre l'XPS et les dénombrements. Au vu du nombre de bactéries dénombrées par épifluorescence et de l'aire moyenne d'une bactérie ($\approx 1 \mu\text{m}^2$), on attendrait un recouvrement de la surface de quelques pour cent, et en tout cas beaucoup plus faible que celui calculé à partir des données XPS. Ceci

peut être dû à la contribution des sels et des macromolécules excrétées par les bactéries sur l'atténuation des signaux des métaux.

L'infra-rouge, à défaut d'être une technique d'extrême surface pour l'analyse des micro-organismes peut être utilisée comme une méthode rapide et efficace de détection de bactéries adhérentes sur les différents supports.

Adhésion des isolats sur les échantillons d'acier inoxydable, de verre et de PTFE préconditionnés par un film organique.

Dans un second temps, nous avons étudié l'adhésion des trois isolats marins sur des échantillons préconditionnés par un film organique composé de SAB, de polA ou d'un mélange de ces deux macromolécules (mix) afin de déterminer le rôle du film primaire sur l'adhésion de micro-organismes marins.

L'effet "substratum dépendant" observé pour D01 et DA est encore visible après préconditionnement par un film organique. Si le film primaire ne recouvre au maximum que 42 % de l'échantillon d'acier inoxydable (chapitre 3) et en supposant qu'il en est de même sur les échantillons de verre et de PTFE ; nous pouvons affirmer que le film conditionnant ne parvient pas à masquer totalement les propriétés énergétiques des matériaux.

Les différents résultats d'adhésion sur les trois types de matériaux et en fonction des préconditionnements montrent de légers effets du film primaire, principalement à temps courts, sur l'adhésion des bactéries marines. Par exemple, pour l'isolat DA nous avons observé un effet inhibiteur du polA adsorbé sur du verre ou promoteur des macromolécules adsorbées sur du PTFE, ces différences d'adhésion dépendant donc des propriétés hydrophobes/hydrophiles des bactéries et des propriétés physico-chimiques des matériaux préconditionnés. Pour des temps supérieurs à 24 heures, ces différences s'estompent pour les bactéries D41 et DA, la production d'exopolymères, confirmée par microscopie électronique, masquant localement les caractéristiques énergétiques de surface des matériaux. A temps longs, pour des temps supérieurs à 72 heures, la viabilité de l'isolat D01 est conservée en présence du film primaire, indiquant qu'il sert de substrat nutritif pour les bactéries ne produisant pas d'exopolymères.

Les résultats XPS ont par ailleurs montré, dans nos conditions analytiques, que les bactéries ne recouvrent pas toutes les macromolécules organiques, la signature du film conditionnant étant retrouvée même après adhésion des isolats D01 et DA. L'absence de

persistance des signaux protéiques et polysaccharidiques après adhésion de l'isolat D41 est due au fort taux de recouvrement calculé après adhésion de cette bactérie (87-90%).

Dans les conditions de notre étude (film primaire hétérogène et monoculture bactérienne), le préconditionnement des échantillons par des molécules organiques n'a que peu d'effet sur l'adhésion des trois isolats. Ceci est dû à l'hétérogénéité du film conditionnant qui doit donc être pris en compte lors des études effectuées sur l'adhésion bactérienne. Ainsi les différences de comportement de *P. fragi* observées par Rubio *et al.* [162] sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 304 et de chrome préconditionnés par de la SAB à partir d'une solution à 0,01 ou 1 g/L peuvent être dues à une meilleure homogénéité du film adsorbé à forte concentration, les caractéristiques du substrat étant alors masquées totalement par les protéines (les caractéristiques énergétiques du substrat après adsorption de SAB à 1g/L sont identiques à celles de la solution protéique). Les autres études effectuées avec la SAB sont réalisées à partir de solutions fortement concentrées (1 à 5 g/L), induisant une diminution de l'adhésion de *Pseudomonas sp.* sur des boîtes de pétri [163] ou de *Lactobacillus sp.* sur des peaux de saucisson [164].

En résumé, notre étude a montré que deux des trois bactéries marines étudiées, les isolats D01 et DA, présentent un effet "substratum dépendant", leur adhésion étant fortement diminuée sur les substrats hydrophobes. Cet effet "substratum dépendant" est moins important pour l'isolat DA que pour l'isolat D01, les exopolymères produits par l'isolat DA permettant un meilleur ancrage en consolidant l'adhésion de l'isolat DA. Il est aussi apparu que la composition d'extrême surface des bactéries influence l'adhésion dans les premiers temps de l'adhésion (temps inférieurs à 24 heures). Les bactéries possédant beaucoup de protéines en surface (D41) adhèrent plus rapidement que les bactéries n'en possédant pas (DA).

En ce qui concerne le film primaire, nous pouvons affirmer, que dans nos conditions, son rôle n'est pas essentiel pour l'adhésion des bactéries marines. Les résultats XPS nous ont confirmé, pour deux des trois isolats (D01 et DA), que la signature protéique et polysaccharidique du film préconditionnant était visible indiquant que les bactéries n'adhèrent pas préférentiellement sur les macromolécules. Néanmoins, quelques différences ont pu être observées pour l'isolat DA, confirmant que l'effet inhibiteur ou promoteur de l'adhésion dépend des caractéristiques énergétiques du substrat et du micro-organisme. Il faut enfin rappeler que le film primaire permet la survie des bactéries ne produisant pas d'exopolymères en servant de substrat nutritif.

2. Adhésion d'une communauté bactérienne composée des isolats D01 et D41 sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L, de verre et de PTFE.

En eau de mer naturelle il existe de nombreuses bactéries de genres et d'espèces différents. Afin d'essayer de recréer un micro-système bactérien, nous avons étudié l'adhésion d'une communauté bactérienne constituée des isolats D01 et D41. L'isolat D01 est une bactérie hydrophile ne produisant pas d'exopolymères alors que l'isolat D41 est une bactérie moins hydrophile produisant des substances exopolymériques.

Dénombrement des bactéries viables cultivables adhérentes.

L'adhésion de bactéries viables cultivables sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L, de verre et de PTFE est suivie après 3h et 120h de contact suspension bactérienne–surface solide, Figure 95.

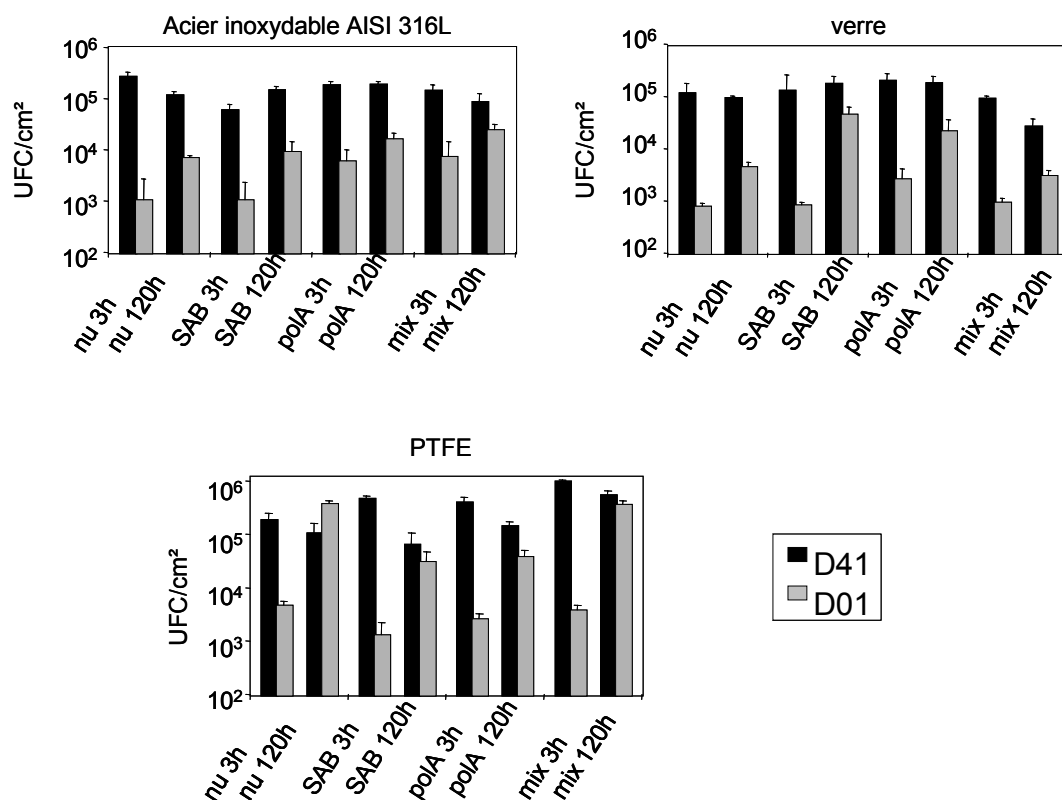


Figure 95 : Nombre de bactéries viables cultivables adhérentes après 3 heures et 120 heures d'immersion des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L, de verre et de PTFE dans une communauté bactérienne composée des isolats D01 et D41.

A temps courts, 3 heures de contact suspension bactérienne–support solide:

- le préconditionnement par des molécules organiques n'a aucun effet sur l'adhésion de l'isolat D41. Quel que soit le type de matériau et le préconditionnement effectué, il y a 10^5 D41 viables cultivables par cm^2 . Cette quantité est légèrement inférieure à celle observée précédemment dans le cas des monocultures.
- Le nombre de D01 viables cultivables adhérentes par cm^2 ne varie pas en fonction du type de matériau et du type de préconditionnement organique effectué (10^3 - 10^4 UFC/ cm^2 , ce nombre est du même ordre de grandeur que celui observé dans le cas des monocultures sur des échantillons de verre et d'acier inoxydable). Notons que l'isolat D01 adhère sur le PTFE et atteint 6.10^3 UFC/ cm^2 alors que ce n'était pas le cas en monoculture.

A temps longs, 120 heures de contact suspension bactérienne–support solide :

- le nombre de D41 viables cultivables adhérentes n'a pas évolué de façon significative sur les différents types de substrats, qu'ils soient ou non préconditionnés par des molécules organiques.
- le nombre de D01 viables cultivables a légèrement augmenté quel que soit le type de matériau et le type de préconditionnement organique (10^4 UFC/ cm^2 sur le verre et l'acier inoxydable et 10^5 UFC/ cm^2 sur le PTFE) alors que l'on était proche ou inférieur à la limite de détection en monoculture. L'adhésion de l'isolat D01 est très facilitée sur le PTFE en présence de l'isolat D41. Il est difficile de dégager un effet promoteur ou inhibiteur du préconditionnement sur l'adhésion de l'isolat D01.

Dénombrement des bactéries totales adhérentes.

Les dénombrements des bactéries totales adhérentes par épifluorescence sur les échantillons d'acier inoxydable AISI 316L, de verre et de PTFE préconditionnés ou non par un film primaire sont présentés sur la Figure 96.

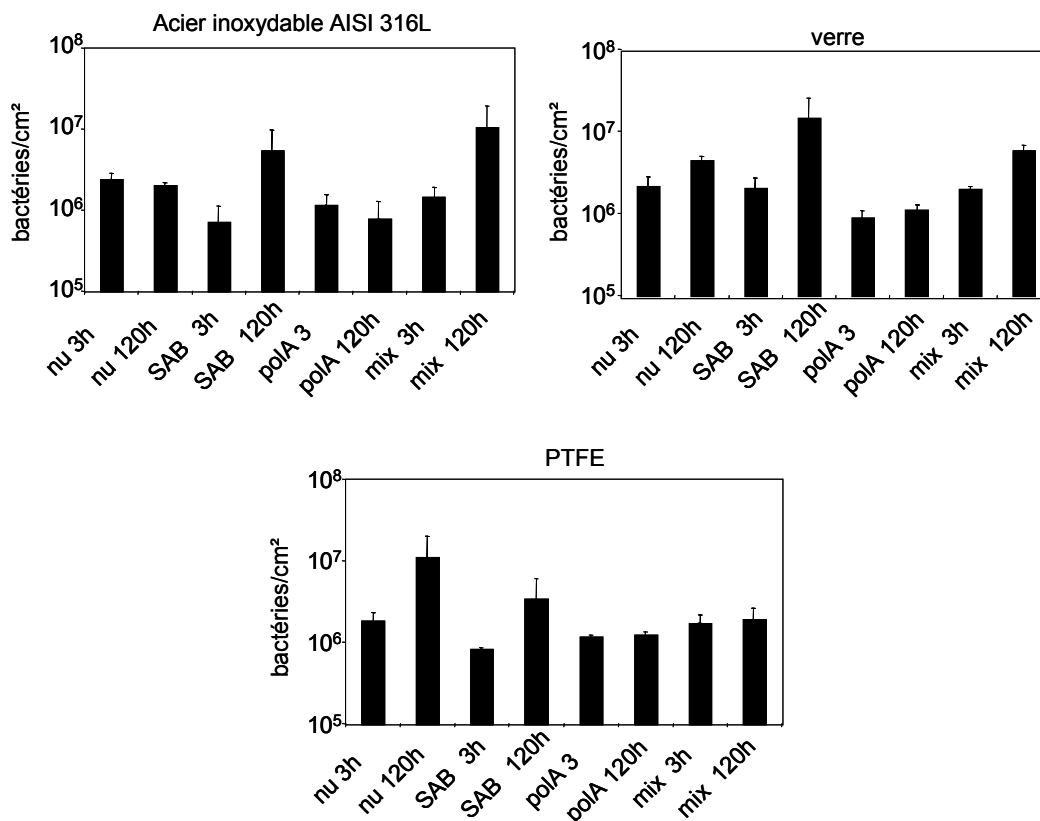


Figure 96 : Bactéries totales adhérentes après 3 heures et 120 heures de contact communauté bactérienne- surface solide sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L, de verre et de PTFE (moyenne d'au moins 3 essais indépendants).

Le nombre de bactéries totales adhérentes est supérieur au nombre de bactéries viables cultivables d'un ordre de grandeur. La proportion de bactéries viables cultivables par rapport aux bactéries totales est donc plus important quand les bactéries sont en co-culture que lorsqu'elles sont en monoculture.

Le nombre de bactéries totales adhérentes ne varie pas de façon significative sur les échantillons d'acier inoxydable, de verre et de PTFE nus ou préconditionnés par des molécules organiques.

Notons que le nombre de bactéries totales adhérentes est légèrement inférieur à celui observé pour l'isolat D41 en monoculture.

2.1. Discussion.

Après 3 heures d'adhésion, la quantité de D41 viables cultivable adhérentes est identique à celle observée en monoculture (10⁵ UFC/cm²), et ceci quel que soit le type de support et le préconditionnement effectué. Pour l'isolat D01, le taux de bactéries viables

cultivables est identique à celui observé en monoculture sur les échantillons d'acier inoxydable AISI 316L et de verre, mais bien plus important sur PTFE (10^3 UFC/cm² en co-culture). L'adhésion simultanée des deux isolats a facilité l'adhésion de D01 sur le PTFE.

Après 120 heures d'adhésion, la quantité de D41 viables cultivables adhérentes est identique à celle observée à 3 heures. Pour l'isolat D01, le taux de bactéries viables cultivables adhérentes a augmenté et a atteint 10^4 - 10^5 UFC/cm², taux supérieur à celui observé en monoculture. De plus, en absence de film primaire, l'isolat D01 est viable après 120 heures d'adhésion, ce qui n'était pas le cas en monoculture.

Le nombre de bactéries totales adhérentes est de 10^6 - 10^7 bactéries/cm² quel que soit le matériau alors que, pour les monocultures, le nombre de D41 adhérentes est de 10^7 - 10^8 bactéries/cm² et le nombre de D01 de 10^5 - 10^6 bactéries/cm² sur acier inoxydable et sur verre. Le nombre de bactéries adhérentes dénombrées après adhésion d'une communauté bactérienne est donc inférieur au nombre de D41 adhérentes lorsque les bactéries sont en monoculture. La co-adhésion des deux isolats a donc diminué le nombre total de bactéries, ceci étant probablement dû à des répulsions entre les deux micro-organismes. Dans le même temps, nous pouvons noter que la viabilité de l'isolat D41 (bactérie majoritaire sur la surface) est meilleure en co-culture qu'en monoculture (10^6 - 10^7 D41/cm² en monoculture et 10^7 - 10^8 D41/cm² en co-culture).

Mueller *et al.* [165] ont indiqué, dans le cas de co-cultures de *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens*, que la bactérie adhérent le plus facilement et le plus rapidement domine les premiers temps de colonisation. Dans notre étude, l'isolat D41 prédomine pour tous les temps de colonisation, l'isolat D01 se développant avec l'aide de l'isolat D41, notamment sur les échantillons de PTFE. On peut d'ailleurs supposer qu'à temps plus longs, la quantité de D01 sera identique à la quantité de D41 viables cultivables adhérentes. Ce mélange a, de plus, permis la survie de l'isolat D01 à temps longs sur des substrats non préconditionnés par des molécules organiques.

La présence de molécules organiques adsorbées sur les différents matériaux n'a pas permis de mettre en évidence de différences d'adhésion importantes des isolats D01 et D41, probablement pour les mêmes raisons que celles énoncées dans le paragraphe précédent : hétérogénéité du film primaire, excrétion d'exopolymères par l'isolat D41.

3. Conclusion.

L'adhésion de bactéries marines sur des échantillons d'acier inoxydable, de verre et de PTFE étudiée dans ce chapitre a confirmé l'importance des propriétés acido-basiques et de Lifshitz van der Waals de surface des micro-organismes et des matériaux et a permis de mettre en évidence plusieurs points rappelés dans le Tableau 41.

	DA	D01	D41
Hydrophilie de surface	++	+	+/-
Composition d'extrême surface	polysaccharides	polysaccharides et protéines	protéines
Excrétion d'exopolymères	++	-	++
Temps pour atteindre le nombre maximum de bactéries adhérentes	3-24 heures	2 min-1 heure	2 min-1 heure
Taux d'adhésion sur acier inoxydable (nombre de bactéries totales adhérentes/nombre de bactéries en suspension)*100	0,2 %	0,1%	20%
Effet substratum dépendant	+	++	-
Effet du film primaire	Temps courts	+/-	-
	Temps longs	-	++

Tableau 41 : Rappel des caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques des trois isolats bactériens et principaux résultats obtenus après adhésion des isolats sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316L, de verre et de PTFE préconditionnés ou non par un film organique (++ : très important, + : important, +/- : faible - : inexistant).

L'adhésion des trois isolats bactériens est irréversible dès 2 minutes de contact entre la suspension bactérienne et les substrats. Ceci indique que l'adhésion des bactéries est un phénomène extrêmement rapide lorsque la suspension bactérienne est fortement concentrée (10^8 bactéries/mL), rappelons que l'eau de mer naturelle contient 10^6 bactéries/mL. A la vue de ce résultat, nous pouvons affirmer que, dans les conditions testées, il n'y a pas succession entre la formation du film primaire et l'adhésion des premières bactéries sur les substrats.

Les résultats des différentes techniques analytiques s'accordent pour affirmer que l'isolat D41 adhère en plus grande quantité que les deux autres isolats sur des échantillons d'acier inoxydable. Après 3 heures d'adhésion, les taux de recouvrement calculés par XPS

sont estimés à environ 90% pour l'isolat D41 et à 45-60% pour les isolats D01 et DA. Ce taux de recouvrement ne correspond pas en fait aux bactéries seules mais aussi à la présence de macromolécules organiques et de sels associés aux bactéries sur la surface solide. Les composés inorganiques semblent donc être présents dès les premiers temps d'adhésion.

Les différents résultats d'adhésion nous ont permis de mettre en évidence le caractère "substratum dépendant" des isolats D01 et DA, deux bactéries fortement hydrophiles. Néanmoins, les propriétés acido-basiques et de Lifshitz van der Waals seules ne permettent pas d'expliquer les différences d'adhésion entre les isolats D01 et DA, mettant ainsi en évidence l'importance des exopolymères excrétés par les bactéries. Ces exopolymères, en renforçant les forces d'adhésion, leur permettent un meilleur ancrage sur les échantillons dont les propriétés acido-basiques et de Lifshitz van der Waals leur sont défavorables.

Nous avons, de plus, pu noter l'importance des exopolymères excrétés par les bactéries, ceux-ci masquant localement les propriétés énergétiques des matériaux afin de permettre une adhésion forte et rapide. Enfin, les exopolymères bactériens permettent une meilleure survie des bactéries en état de jeûne.

La composition chimique de surface des différents isolats influe sur les cinétiques d'adhésion. En effet, nous avons pu remarquer que les isolats présentant beaucoup de protéines en surface (D01 et D41) adhéraient plus rapidement que l'isolat DA qui en présente peu, ce qui est en accord avec les cinétiques d'adsorption des macromolécules ; le maximum d'adsorption est atteint en quelques minutes pour les protéines et en quelques heures pour les polysaccharides.

L'adhésion des isolats D01 et D41 en co-culture nous a permis de mettre en évidence que l'isolat D41 aide l'isolat D01 à adhérer sur le PTFE (matériau sur lequel il n'adhérait pas en monoculture) et qu'il permet la survie de l'isolat D01 à temps longs sur les différents échantillons non préconditionnés. Cependant, nous avons pu noter que le nombre total de bactéries adhérentes était inférieur à celui dénombré après adhésion de l'isolat D41 en monoculture (un ordre de grandeur inférieur) alors que le nombre de bactéries viables est resté le même. La diminution du nombre de bactéries totales peut s'expliquer par des répulsions existant entre les deux types de micro-organismes qui n'ont pas les mêmes propriétés acido-basiques et de Lifshitz van der Waals ou plus simplement par une meilleure viabilité de l'isolat D41.

En ce qui concerne le rôle du film primaire, nous avons pu mettre en évidence qu'il ne jouait pas un rôle primordial dans l'adhésion des bactéries marines étudiées dans les conditions de notre étude. Cependant, un léger effet inhibiteur ou promoteur du film primaire sur l'adhésion des isolats D01 et DA a pu être mis en évidence dans les temps courts d'adhésion et dépend des caractéristiques énergétiques des micro-organismes et des propriétés physico-chimiques des substrats. Un effet plus prononcé du film primaire peut cependant exister dans le cas de bactéries entourées de molécules organiques, comme c'est le cas en eau de mer naturelle. Les macromolécules organiques en modifiant les caractéristiques physico-chimiques des bactéries peuvent aussi modifier le comportement bioadhésif des bactéries pionnières.

CONCLUSIONS – PERSPECTIVES.

Nous avons présenté la caractérisation du film primaire en milieu marin, celle de deux souches de bactéries pionnières et d'une bactérie marine hydrothermale ainsi qu'une étude des interactions entre 3 types de matériaux et les micro-organismes. Ce travail a permis de répondre à plusieurs questions et d'en soulever d'autres. Les différentes conclusions apportées grâce à nos études sont rappelées succinctement ci-dessous et quelques ouvertures vers des travaux complémentaires sont données.

Nous avons établi que le film primaire formé en milieu marin sur une surface d'acier inoxydable AISI 316L est hétérogène ne couvrant que 40% de la surface. Le film primaire ne peut donc pas masquer totalement les caractéristiques énergétiques des matériaux étudiés. Il est composé d'une première couche de composés organiques adsorbés à la surface solide et sur lesquels d'autres macromolécules sont liées. La cohésion de cet amas est assurée par les cations calcium et magnésium présents en eau de mer. Nous avons aussi mis en évidence que les macromolécules au sein de ce film organique ne possèdent pas la même conformation lorsqu'elles sont en contact avec l'acier inoxydable et lorsqu'elles sont dans la seconde couche protéique. Ainsi, la première couche protéique adsorbée sur un acier inoxydable immergé en eau de mer artificielle présente une structure secondaire en hélice α , alors que la seconde couche présente une structure en feuillet β , repliement dénotant une plus grande hydrophilicité des macromolécules, les protéines étant liées entre elles par des cations magnésium. Le polA, quant à lui, s'adsorbe probablement selon un schéma de boucles et de queues polysaccharidiques, une seconde couche étant liée à cette première à l'aide de cations calcium et magnésium. Un mélange de ces deux macromolécules en solution conduit à la formation d'un complexe SAB-polA s'adsorbant à la surface de l'échantillon. Ce complexe permet au polA de s'adsorber plus rapidement (quelques minutes au lieu des 5 heures nécessaires lorsque le polA est seul en solution) et à la SAB de s'adsorber en plus grande quantité, le polymère A restant majoritaire dans le film organique. Néanmoins, la nature précise des interactions entre les macromolécules et les supports solides immergés en eau de mer artificielle n'est pas encore totalement élucidée. Le rôle des sels sur l'adsorption de la première couche organique fait encore aujourd'hui l'objet de recherches plus poussées. Nous devons par exemple déterminer si les cations adsorbés sur une surface d'acier inoxydable

favorisent ou non l'adsorption de la première couche organique et le cas échéant quelles sont les fonctions chimiques impliquées.

Les deux bactéries pionnières (D01 et D41), sélectionnées à partir d'échantillons d'acier inoxydable AISI 316L, de verre et de PTFE en eau de mer naturelle, ainsi que la souche *Alteromonas macleodii subsp. fijiensis* (DA) ont des compositions chimiques proches, des groupements similaires ayant été mis en évidence par l'infra-rouge. Cette technique donnant une analyse totale des micro-organismes met néanmoins en évidence quelques différences d'intensités entre les trois bactéries et l'apparition d'une bande attribuée à des polysaccharides pour l'isolat DA (la technique ne permet pas de préciser si les polymères sont en surface ou dans la bactérie). Malgré des compositions globales proches, les bactéries étudiées présentent des propriétés acido-basiques et de Lifshitz van der Waals différentes que nous avons pu relier, grâce à l'XPS, à leur composition d'extrême surface :

- l'isolat DA, bactérie fortement hydrophile, présente majoritairement en surface des groupements RCOO^- , RSO_4^{2-} et ROH ;
- l'isolat D01, bactérie hydrophile présente en surface des groupements RCOO^- , ROH et RNH_2 ;
- l'isolat D41, bactérie moins hydrophile que les deux autres voire hydrophobe, présente majoritairement en surface des groupements RNH_2 .

Nous avons enfin pu avancer que les exopolymères produits par les isolat DA et D41, ne sont pas de même nature : polysaccharidique pour l'isolat DA et protéique pour l'isolat D41. Nous devons néanmoins déterminer si les sulfates présents en surface de l'isolat DA sont de type organique (R-O-SO_3^-) ou inorganique (SO_4^{2-}).

Concernant l'adhésion bactérienne, nous avons mis en évidence, dans nos conditions, que l'adhésion irréversible des bactéries marines ne nécessite que quelques minutes, un grand nombre de bactéries adhérant sur les différents matériaux après 2 minutes de contact entre la suspension bactérienne et le substrat. Il est vrai que le taux de bactéries en suspension est plus élevé de deux ordres de grandeur en laboratoire qu'en eau de mer naturelle, cependant nous pouvons remettre en cause la séquence selon laquelle la formation d'un film primaire mature est suivie par l'adhésion bactérienne. L'adhésion des bactéries pionnières peut intervenir en même temps que se forme le film primaire.

Nous avons de plus pu montrer que la composition chimique d'extrême surface des bactéries est très importante dans les premiers temps d'adhésion. En effet, nous avons noté

que les bactéries possédant d'avantage de protéines en surface adhèrent plus rapidement que les bactéries possédant majoritairement des polysaccharides. Ces résultats sont en accord avec les cinétiques d'adsorption des macromolécules organiques, les protéines atteignant le plateau d'adsorption en quelques minutes alors que plusieurs heures sont nécessaires pour les polysaccharides. Les résultats XPS nous permettent aussi de proposer deux mécanismes d'adhésion très différents pour les isolats D41 d'une part et DA et D01 d'autre part. En effet, il semble que l'isolat D41 dont le taux d'adhésion est très élevé sur tous les matériaux adhérerait à l'aide d'interactions hydrophobes alors que les isolats D01 et DA adhéreraient à l'aide de fonctions acides. Ces deux hypothèses de mécanismes d'adhésion sont confirmés par la MATS puisque cette technique indique que l'isolat D41 adhère aux solvants par des interactions de Lifshitz van der Waals alors que les isolats D01 et DA adhèrent majoritairement aux solvants à l'aide d'interaction acide-base selon Lewis.

Nos travaux ont de plus mis en évidence qu'il existait un effet "substratum dépendant" pour les isolats D01 et DA, deux bactéries hydrophiles, adhérant en plus faible proportion sur les substrats hydrophobes. Cependant, les différences d'adhésion observées sur PTFE entre les deux isolats hydrophiles ne peuvent être expliquées uniquement par leurs propriétés acido-basiques et de Lifshitz van der Waals. Ainsi, nous avons montré que l'adhésion des isolats bactériens produisant des exopolymères était favorisée sur les matériaux défavorables à leur adhésion (le PTFE pour l'isolat DA), les exopolymères permettant un meilleur ancrage des bactéries sur les substrats. Concernant, l'isolat D41, aucun effet substratum dépendant n'a été mis en évidence, les exopolymères excrétés semblant masquer localement les propriétés physico-chimiques des matériaux. L'adhésion d'une co-culture de D01 et de D41 masque les effets "substratum dépendants" observés en monoculture, l'adhésion de l'isolat D41 favorisant alors l'adhésion de l'isolat D01.

Cette étude a permis de confirmer deux aspects du rôle du film primaire :

- il masque une partie des propriétés physico-chimiques de surface des matériaux, et ainsi modifie légèrement, dans les tous premiers temps, l'adhésion bactérienne. L'augmentation ou la diminution du nombre de bactéries adhérentes dépend des propriétés acido-basiques et de Lifshitz van der Waals des bactéries et des propriétés physico-chimiques des matériaux (augmentation du nombre de DA adhérentes sur du PTFE préconditionné par des molécules organiques, diminution du nombre de DA adhérentes sur du verre et de l'acier préconditionné par du polA).

- il sert de substrat nutritif pour les bactéries ne produisant pas d'exopolymères et permet leur survie à temps longs lorsqu'elles sont en monoculture. Au contraire, l'isolat D01 survit en absence de film primaire lorsque l'isolat D41 adhère simultanément, les exopolymères produits par l'isolat D41 lui servant alors de substrat nutritif.

Mais, nous pouvons affirmer que le film primaire n'est pas nécessaire à l'adhésion bactérienne, les bactéries n'adhérant pas préférentiellement sur les macromolécules organiques adsorbées. En effet, les résultats XPS ont permis de noter que la signature du film organique était encore visible après adhésion bactérienne.

L'hétérogénéité du film primaire qui ne permet pas de masquer totalement les propriétés physico-chimiques du substrat, explique certainement les effets inhibiteur ou promoteur peu marqués du film primaire sur l'adhésion bactérienne.

Plusieurs autres points restent à étudier :

- l'adhésion de bactéries immergées en eau de mer artificielle contenant des composés organiques, sur des substrats conditionnés ou non par un film primaire. En effet, la présence de protéines et de polysaccharides en suspension peut changer les caractéristiques énergétiques des bactéries ainsi recouvertes de molécules organiques et modifier ensuite leur adhésion.
- les interactions spécifiques existant entre les bactéries et le support solide conditionné ou non par un film primaire. L'infra-rouge, qui s'est avérée dans notre cas inadaptable car toute la cellule bactérienne était analysée, pourrait peut-être fournir des informations sur la nature des liaisons entre le substrat et la bactérie en utilisant des fractions de bactéries (uniquement utilisation de la paroi) ou en bloquant certaines fonctions chimiques de surface.

Ainsi, à la question posée au début de ce manuscrit : “la modification, et plus particulièrement l'élimination, du film primaire permettra-t-elle de limiter la formation du biofilm?”, la réponse apportée est nuancée, mettant ainsi en évidence la complexité du problème. En effet, l'absence de film organique ne permettra pas l'élimination du biofilm, les bactéries n'adhérant pas préférentiellement sur les macromolécules organiques et leur survie

ne dépendant pas de ce film préconditionnant lorsque les bactéries sont en communauté. Nous proposons donc plutôt de modifier le film primaire par exemple en :

- greffant des enzymes (protéases et polymérase) qui, en détruisant les exopolymères, empêcheraient l'ancrage des bactéries sur les supports solides,
- utilisant des copolymères statistiques à activité biologique inhibiteur de l'adhésion bactérienne, ces copolymères étant des arrangements de groupements chimiques choisis (thèse de Nora Hamadouche en cours),
- fonctionnalisant la surface en greffant des molécules, par exemple en jouxtant des molécules hydrophobes et hydrophiles ou en adsorbant des molécules de différentes tailles et de différentes réactivités chimiques.

Quelle que soit la voie suivie pour les études prochaines, au vu des résultats obtenus au cours de ces travaux, il semble souhaitable de former un film homogène après greffage d'une fonction chimique puisque chaque hétérogénéité du film pourra être un site d'adhésion pour les bactéries.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Fera, P., *Etude de la colonisation par les bactéries de surfaces immergées en milieu marin.* 1985, Université de Bretagne Occidentale: Brest. p. 203.
2. Smith, B.S., *Male characteristics on female Mud snails caused by antifouling bottom paints.* Journal of Applied Toxicology, 1981. **1**(1): p. 22-25.
3. de Sousa, G., et al., *Toxic effect of several types of antifouling paints in human and rat hepatic or epidermal cells.* Toxicol. Lett., 1998. **96-97**: p. 41-46.
4. Alzieu, C., *Environmental impac of TBT : the french experience.* The science of the total environment, 2000. **258**: p. 99-102.
5. Costerton, J.W., *Structure of biofilms*, in *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*, Z.L.a.H.C.F. G.G. Geesey, Editor. 1994, Lewis Publication. p. 1-14.
6. Baier, R.E., *Organic films on natural waters : their retrieval, identification, and modes of elimination.* Journal of geophysical research, 1972. **77**(27): p. 5062-5075.
7. BASISgroup, *Kinetics of conditioning layer formation on stainless steel immersed in sea water.* Biofouling, 2001. **17**(2): p. 93-172.
8. Schakenraad, J.M., et al., *The effect of protein adsorption on substratum surface free energy, infrared absorption and cell spreading.* Biofouling, 1989. **1**: p. 193-201.
9. Schakenraad, J.M. and H.J. Busscher, *Cell-polymer interactions : the influence of protein adsorption.* Colloids and Surface B : Biointerface, 1989. **42**: p. 331-343.
10. Pratt-Terpstra, I.H., A.H. Weerkamp, and H.J. Busscher, *Adhesion of Oral Streptococci from a flowing suspension to uncoated and albumine-coated surfaces.* Journal of general microbiology, 1987. **133**: p. 3199-3206.
11. Van der Mei, H.C., J. Noordmans, and H.C. Busscher, *The influence of a salivary coating on the molecular surface composition of oral streptococci as determined by Fourier Transform Infrared spectroscopy.* Infrared physico chemistry, 1990. **30**(2): p. 143-148.
12. Bradshaw, D.J., et al., *Effect of Conditioning Films on Oral Microbial Biofilm Development.* Biofouling, 1997. **11**(3): p. 217-226.
13. Horne, R., ed. *Marine chemistry.* Wiley interscience ed. 1969, John Wiley & Sons: New York, London, Sydney, Toronto.
14. Thurman, E.M., *Organic geochemistry of natural waters.* 1985, Denver: Martinus Nijhoff/Dr W. Junk. 488.
15. Horbett, T., *Protein adsorption on biomaterials.* 1982. **17**.
16. Neihof, R. and G. Loeb, *The surface charge of particulate matter.* Limnology and oceanography, 1972. **17**: p. 7-16.

17. Chamberlain, A.H.L. and R. van Woerkom. *The effects of adsorbed marine organics on microbial fouling*. in *6th international biodeterioration symposium*. 1986. Washington DC.
18. Bunte, C. and M. Simon, *Bacterioplankton turnover of dissolved free monosaccharides in a mesotrophic lake*. *Limnology and oceanography*, 1999. **44**(8): p. 1862-1870.
19. Edwards, R., *Marine dissolved organic matter, isolation and role in primary fouling*. 1982, university of surrey: surrey.
20. Bhosle, N.B. and A.B. Wagh, *Amino Acids in biofilm material on aluminium panels immersed in marine waters*. *Biofouling*, 1997. **11**(2): p. 149-166.
21. Loeb, G. and R. Neihof, *Adsorption of an organic film at the platinum-seawater interface*. *Journal of marine research*, 1977. **35**: p. 283-291.
22. Kristoffersen, A., et al., *Evidence for the formation of organic films on metal surfaces in seawater*. *Journal of colloid and interface science*, 1982. **86**(1): p. 196-203.
23. Neihof, R. and G. Loeb, *Dissolved organic matter in seawater and the electric charge of immersed surfaces*. *Journal of marine research*, 1974. **32**: p. 5-12.
24. Loeb, G. and S. Wajsgas, *Surface energy of plastics and the attachment of marine bacteria*. *Act of Organic Coating and Plastic Chemistry*, 1977. **37**: p. 662-666.
25. Loeb, G.I. and R.A. Neihof, *Marine Conditioning Films*. "Applied Chemistry at Protein Interfaces in "Advances in Chemistry Series", Ed. R.E. Baier, Amer. Chem. Soc. Washington,, 1975. **145**: p. 319-335.
26. Taylor, G.T., et al., *Influence of surface properties on accumulation of conditioning films and marine bacteria on substrata exposed to oligotrophic waters*. *Biofouling*, 1997. **11**(1): p. 31-57.
27. Castner, D. and B. Ratner, *Biomedical surface science : Foundations to frontiers*. *Surface science*, 2002. **500**: p. 28-60.
28. Garry, P., *Propriétés physico-chimiques de surfaces en polyuréthane et conséquences sur l'encrassement et l'adhésion de Bacillus subtilis et Bacillus cereus*, in *thèse de doctorat de l'université Claude Bernard-Lyon I*. 1997, claudes Bernard-Lyon I: Lyon. p. 124.
29. Ueda, A., *Adsorption of salivary proteins and serum proteins to titanium*. *J. Osaka Dent. Univ*, 1998. **32**(2): p. 59-65.
30. Andrade, J., V. Hladly, and R. Van Wagenen, *Effect of plasma protein adsorption on protein conformation and activity*. *Pure & Appl. Chemistry*, 1984. **56**(10): p. 1345-1350.
31. Williams, T.J., M. Willcox, and R.P. Schneider, *Interactions of bacteria with contact lenses : the effect of soluble protein and carbohydrate on bacterial adhesion to contact lenses*. *Photometry and Vision Sci.*, 1998. **75**(4): p. 266-271.
32. Servagent-Noinville, S., et al., *Conformational changes of bovine serum albumin induced by adsorption on different clay surfaces : FTIR Analysis*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2000. **221**: p. 273-283.

33. Omanovic, S. and S.G. Roscoe, *Electrochemical studies of the adsorption behaviour of bovine serum albumin on stainless steel*. Langmuir, 1999. **15**(23): p. 8315-8321.
34. Hlady, V., J. Buijs, and H. Jennissen, *Methods for studying protein adsorption*. Methods in enzymology, 1999. **309**: p. 402-429.
35. Mc Guire, J. and V. Krisdhasima, *Surface chemical influences on protein adsorption kinetics*. Food Technology, 1991. **Dec**: p. 92-96.
36. Liu, Q., Y. Zhang, and J. Laskowski, *The adsorption of polysaccharide onto mineral surfaces : an acid-base interaction*. International journal in mineral processing, 2000. **60**: p. 229-245.
37. Fukuzaki, S., H. Urano, and K. Nagata, *Adsorption of bovine serum albumin onto metal oxide surfaces*. Journal of fermentation and bioengineering, 1996. **81**(2): p. 163-167.
38. Lee, S.H. and E. Ruckenstein, *Adsorption of proteins onto polymeric surfaces of different hydrophilicities : a case of study with bovine serum albumin*. Journal of colloid and Interface Science, 1988. **125**(2): p. 365-379.
39. Absolom, D., W. Zingg, and A. Neumann, *Protein adsorption to polymer particles : role of the surface properties*. Journal of the biomedical materials research, 1987. **21**: p. 161-171.
40. Peters, T., *Serum albumin*. Advances in Protein chemistry, 1985. **37**: p. 161-245.
41. Carter, D.C. and J.X. Ho, *Structure of serum albumin*. Advances in protein chemistry, 1994. **45**: p. 153-205.
42. Su, T.J., et al., *Effect of pH on the adsorption of bovine serum albumin at the silica/water interface studied by neutron reflexion*. Journal of physico chemistry B, 1999. **103**: p. 3727-3736.
43. Jones, K.L. and C.R. O'melia, *Protein and humic acid adsorption onto hydrophilic membrane surfaces : effect of pH and ionic strength*. Journal of membrane science, 2000. **165**: p. 31-46.
44. Arnebrant, T., et al., *Bilayer formation at adsorption of proteins from aqueous solutions on metal surfaces*. Progress in colloid & polymer science, 1985. **70**: p. 62-66.
45. Lu, D.R. and K. Park, *Effect of surface hydrophobicity on the conformational changes of absorbed fibrinogen*. J. colloid and interface science, 1991. **144**(1): p. 271-281.
46. Baron, M., et al., *Chymotrypsin adsorption on montmorillonite : enzymatic activity and kinetic structural analysis*. Journal of colloid and interface science, 1999. **214**: p. 319-332.
47. Lenk, T., et al., *IR spectral changes of bovine serum albumin upon surface adsorption*. Journal of biomedical materials research, 1989. **23**: p. 549-569.
48. Moulin, A.M., et al., *Measuring surface induced conformational changes in proteins*. Langmuir, 1999. **15**: p. 8776-8779.

49. Boulkanz, L., et al., *Adsorption mechanism of human serum albumin on a reversed phase support by kinetic, chromatographic and FTIR methods*. Journal of colloid and interface science, 1997. **188**: p. 58.
50. BASIS, *Adsorption of proteins on an AISI 316 stainless steel surface in natural seawater*. surface and Interface Analysis, 2000. **30**: p. 45-49.
51. BASISgroup. *First steps of biofilm formation on stainless steels in natural seawater*. in *Forum for applied biotechnology*. 1998. Brugge, (Sept 24-25).
52. Peters, T., *Serum Albumin*. Advances in clinical chemistry, 1970. **13**: p. 37-111.
53. Brown, J.R., *Structure of bovine serum albumin*. Fed Proc, 1975. **34**: p. 591.
54. Peters, T., *Serum Albumin : recent progress in the understanding of its structure and biosynthesis*. Clinical chemistry, 1977. **23**(1): p. 5-12.
55. He, X.M. and D.C. Carter, *Atomic structure and chemistry of HSA*. Nature, 1992. **58**: p. 209-214.
56. Foster, J.F., *Albumin structure*, in *Albumin structure, function and uses*, V.M. Rosenoer, M. Oratz, and M.A. Rothschild, Editors. 1977, Pergamon: Oxford. p. 53-84.
57. Qing, H., et al., *Effects of pH and metal ions on the conformation of bovine serum albumin in aqueous solution, an ATR FTIR spectroscopic study*. Spectrochimica acta part A, 1996. **52**: p. 1795-1800.
58. Kragh-Hansen, U., *Molecular aspects of ligand binding to serum albumin*. Pharmacological reviews, 1981. **33**(1): p. 17-53.
59. Miwa, T., et al., *Ca²⁺ responsive extensible monolayer membrane of calmodulin-albumin conjugate*. Bioconjugate chemical, 1991. **2**: p. 270-274.
60. Raguenes, G., et al., *Description of a new polymer-secreting bacterium from deep-sea hydrothermal vent, Alteromonas macleodii subsp fijiensis, and preliminary characterization of the polymer*. Applied and Environmental Microbiology, 1996. **62**(1): p. 67-73.
61. Loaec, M., *Etude de la chélation des métaux lourds, plomb, cadmium et zinc par quatre exopolysaccharides bactériens d'origine hydrothermale*, in *chimie fine*. 1998, UBO: Brest. p. 1179.
62. Loaec, M., R. Olier, and J. Guezennec, *Uptake of lead, cadmium and zinc by novel bacterial exopolysaccharide*. Water Research, 1997. **31**(5): p. 1171-1179.
63. Madigan, M., J. Martinko, and J. Parker, *Biology of microorganisms*. ninth edition ed. 2000: Prentice hall Inc.
64. Larpent, J.P. and M. Larpent-Gourgaud, *Eléments de microbiologie*. 1985, Paris: Hermann.
65. Oliveira, D.R., *Physico-chemical aspects of adhesion*, in *Biofilms; science and technology*, L.F. Melo, et al., Editors. 1992, Kluwer academic: Dordrecht. p. 45-58.
66. Neu, T.R., *Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces*. Microbiological reviews, 1996. **Mar**: p. 151-166.

67. Cunin, R., *Introduction à la génétique bactérienne*, ed. Vigot. 1993, Paris.
68. Bellon-Fontaine, M.N., J. Rault, and C.J. Van Oss, *Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells*. Colloids and Surfaces B:Biointerfaces, 1996. **7**: p. 47-53.
69. Briandet, R., et al., *Listeria monocytogenes Scott A : cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions*. Applied and environmental microbiology, 1999. **65**(12): p. 5328-5333.
70. Bunt, C., D. Jones, and I. Tucker, *The effects of pH, ionic strength and polyvalent ions on the cell surface hydrophobicity of Escherichia coli evaluated by the BATH and HIC methods*. International journal of pharmaceutics, 1995. **113**: p. 257-261.
71. Ahimou, F., et al., *Influence of electrical properties on the evaluation of the surface hydrophobicity of Bacillus subtilis*. Journal of microbiological methods, 2001. **45**: p. 119-126.
72. Pelletier, C., et al., *Cell surface characteristics of Lactobacillus casei subsp casei, Lactobacillus paracasei subsp paracasei and Lactobacillus rhamnosus strains*. Applied and environmental microbiology, 1997. **May**: p. 1725-1731.
73. Rijnaarts, H., et al., *The isoelectric point of bacteria as an indicator for the presence of cell surface polymers that inhibit adhesion*. Colloids and Surface B : Biointerface, 1995. **4**: p. 191-197.
74. Helm, D., et al., *Classification and identification of bacteria by FTIR spectroscopy*. Journal of general microbiology, 1991. **137**: p. 69-79.
75. Hedrick, D., et al., *Rapid differentiation of archaeobacteria from eubacteria by diffuse reflectance fourier transform IR spectroscopic analysis of lipid preparations*. Journal of microbiological methods, 1991. **13**: p. 67-73.
76. Stevenson, H. and O. Bolduan, *Infrared spectrophotometry as a means for identification of bacteria*. Science, 1952. **116**: p. 111-113.
77. Mariey, L., et al., *Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics*. Vibrational spectroscopy, 2001. **26**: p. 151-159.
78. Suci, P., et al., *Combined light microscopy and ATR FTIR spectroscopy for integration of biofilm structure, distribution and chemistry at solid-liquid interfaces*. Applied and environmental microbiology, 1997. **63**(11): p. 4600-4603.
79. Naumann, D., D. Helm, and H. Labischinski, *Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy*. Nature, 1991. **351**: p. 81-82.
80. Van der Mei, H.C. and H.J. Busscher, *The use of X-Ray Photoelectron spectroscopy for the study of oral Streptococcal cell surfaces*. Advance in dental research, 1997. **11**(4): p. 388-394.

81. van der Mei, H.C., J. de Vries, and H.C. Busscher, *X-ray photoelectron spectroscopy for the study of microbial cell surfaces*. Surface Science reports, 2000. **39**: p. 1-24.
82. Bos, R., H.C. Van der Mei, and H.J. Busscher, *Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions-its mechanisms and methods for study*. FEMS Microbiological Revue., 1999. **23**: p. 179-230.
83. Absolom, D.R., et al., *Surface thermodynamics of bacterial adhesion*. Applied and Environmental Microbiology, 1983. **July**: p. 90-97.
84. Grivet, M., et al., *Effect of hydrophobicity on in vitro streptococcal adhesion to dental alloys*. journal of material science : materials in medicine, 2000. **11**: p. 637-642.
85. Pedersen, K., et al., *Statistic evaluation of the influence of species variation, culture conditions, surface wettability and fluid shear on attachment and biofilm development of marine bacteria*. Ach. Microbiology, 1986. **145**: p. 1-8.
86. Bruinsma, G., et al., *Effects of cell surface damage on surface properties and adhesion of Pseudomonas aeruginosa*. Journal of microbiological methods, 2001. **45**: p. 95-101.
87. Rubio, C., *Caractérisation de l'adsorption de la SAB sur des surfaces de chrome et dacier inoxydable AISI 304, conséquences sur l'adhésion de Pseudomonas fragi KI..* 1998: Orsay. p. 25.
88. Stanley, P.M., *Factors Affecting the Irreversible Attachment of Pseudomonas aeruginosa to Stainless Steel*. Canadian Journal of Microbiology, 1983. **29**: p. 1493-1499.
89. Austin, J.W., et al., *Thin agregative fimbriae enhance Salmonella enteritidis biofilm formation*. FEMS Microbiol. letters, 1998. **162**: p. 1295-301.
90. Scheuerman, T.R., A.K. Camper, and M.A. Hamilton, *Effects of substratum topography on bacterial adhesion*. Journal of colloid and interface science, 1998. **208**: p. 23-33.
91. Vidal, O., et al., *Isolation of an Escherichia coli K-12 mutant strain able to form biofilm on inert surfaces:involvement of a new ompR allele that increase curli expression*. Journal of bacteriology, 1998. **May**: p. 2442-2449.
92. O'Toole, G.A. and R. Kolter, *Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development*. Moleculcular microbiology, 1998. **30(2)**: p. 295-304.
93. Vatanyoopaisarn, S., et al., *Effect of flagella on initial attachment of listeria monocytogenes to stainless steel*. Applied and environmental microbiology, 2000. **66(2)**: p. 860-863.
94. Pembrey, R.S., K.C. Marshall, and R.P. Schneider, *Cell surface analysis techniques:what do cell preparation protocols do to cell surface properties?* App. Env. Microbiol., 1999. **65(7)**: p. 2877-2894.
95. Jana, T., et al., *Influence of growth and environmental conditions on cell surface hydrophobicity of Pseudomonas fluorescens in non-specific adhesion*. Canadian journal of microbiology, 2000. **46**: p. 28-37.

96. Peng, J., W. Tsai, and C. Chou, *Surface characteristics of Bacillus cereus and its adhesion to stainless steel*. International journal of food microbiology, 2001. **65**: p. 105-111.
97. Boulangé-Petermann, L., *Process of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability : a review with special reference to food industry*. Biofouling, 1996. **10**(4): p. 275-300.
98. Kerr, A., et al., *Some factors affecting the accumulation of biofouling*. Journal of marine biology Ass. U.K., 1999. **79**(2): p. 357-359.
99. Boulangé-Petermann, L., J. Rault, and M.N. Bellon-Fontaine, *Adhesion of Streptococcus Thermophilus to Stainless Steel with Different Surface Topography and Roughness*. Biofouling, 1997. **11**(13): p. 201-216.
100. Jansen, B. and W. Kohnen, *Prevention of biofilm formation by polymer modification*. Journal of industrial microbiology, 1995. **15**: p. 391-396.
101. Boulangé-Petermann, L., B. Baroux, and M.N. Bellon-Fontaine, *The Influence of Metallic Surface Wettability on Bacterial Adhesion*. Journal of adhesion science and technology, 1993. **7**(3): p. 221-230.
102. Humphries, M., et al., *The Use of Graft Copolymers to Inhibit the Adhesion of Bacteria to Solid Surfaces*. FEMS Microbiology Ecology, 1987. **45**: p. 297-304.
103. Ong, Y.L., et al., *Adhesion forces between E.coli bacteria and biomaterial surfaces*. Langmuir, 1999. **15**: p. 2719-2725.
104. Briandet, R., J. Herry, and B.-F. MN, *Determination of the van der waals, electron donor and electron acceptor surface tension components of static gram positive microbial biofilms*. Colloids and Surface B : Biointerface, 2001. **21**: p. 299-310.
105. Tang, R.J. and J.J. Cooney, *Effects of marine paints on microbial biofilm development on three materials*. J. Indus.Microbiol. & Biotechnol., 1998. **20**: p. 275-280.
106. Baier, R.E., *Surface Properties Influencing Biological Adhesion*, in *Adhesion in Biological Systems*, E.R.S. Manly, Editor. 1970, Academic Press. p. 15-48.
107. Fletcher, M., *The effect of proteins on bacterial attachment to polystyrene*. Journal of general microbiology, 1976. **94**: p. 400-404.
108. Flemming, R.G., et al., *Bacterial colonisation of functionalised polyurethanes*. biomaterials, 2000. **21**: p. 273-281.
109. Busscher, H.J., et al., *Streptococcus thermophilus and its biosurfactants inhibit adhesion by Candida spp. on silicone rubber*. Applied and environmental microbiology, 1997. **Oct**: p. 3810-3817.
110. Bellon-Fontaine, M.N. and O. Cerf, *Mécanismes d'adhésion des micro-organismes aux surfaces : Facteurs influant sur l'adhésion*. Cahier Scientifique et Technique, IAA, 1991. **Janvier-Février**: p. 13-17.

111. Fletcher, M. and G.D. Floodgate, *An Electron-Microscopic Demonstration of an Acidic Polysaccharide Involved in the Adhesion of a Marine Bacterium to Solid Surfaces*. Journal of General Microbiology, 1973. **74**: p. 325-334.
112. Kalaji, M., et al., *Chemical and structural characterization of exopolymers produced by Pseudomonas sp. NCIMB 2021 in continuous culture*. Microbiology, 1999. **145**: p. 1-7.
113. Dufrière, Y.F., J.P. Boonaert, and P.G. Rouxhet, *Adhesion of Azospirillum brasilense: role of proteins at the cell-support interface*. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces, 1996. **7**: p. 113-128.
114. Neu, T.R. and K.C. Marshall, *Microbial "Footprints"- A New Approach to Adhesive Polymers*. Biofouling, 1991. **3**: p. 101-112.
115. Kisugi, J., et al., *Biopolymers from marine invertebrates. Characterization of an antibacterial protein, dolabellin A, from the albumen gland of the sea hare, Dolabella auricularia*. Chemical pharmacological bulletin, 1992. **40**(6): p. 1537-1539.
116. Wimpenny, J.W.T., S.L. Kinniment, and M.A. Scourfield, *The Physiology and Biochemistry of Biofilm*. "Chap 4 in ""Microbial Biofilms : Formation and Control"", Society for Applied Bacteriology, 1993: p. 51-94.
117. Flemming, H. *introduction : biofilm as a particular form of microbial life*. in *Biofouling and biocorrosion in industrial water systems*. 1990. Stuttgart.
118. Costerton, D.E., et al., *Microbial Biofilms*. Annual review of microbiology, 1995. **45**: p. 711-745.
119. Prigent-Combaret, C., et al., *Abiotic surface sensing and biofilm dependent regulation of gene expression in Escherichia coli*. Journal of bacteriology, 1999. **181**(19): p. 1-10.
120. Meyer, A., R. Baier, and R. King, *Initial fouling of non toxic coatings in fresh, brackish and sea water*. The canadian journal of chemical engineering, 1988. **66**(1): p. 55-62.
121. Le Bozec, N., *Réaction de réduction de l'oxygène sur des aciers inoxydables en eau de mer naturelle. Influence du biofilm sur les processus de corrosion..* 2000, UBO: Brest. p. 191.
122. Antoine, E., *Station d'essais de sainte anne du Potzic, paramètres physico-chimiques et observations microbiologiques*. 1980, Ifremer.
123. Bradford, M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding*. Analytical biochemistry, 1976. **72**: p. 248-254.
124. Kamerling, J.P., et al., *Characterisation by gas-liquid chromatography mass spectrometry of permethylsilyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycolipids*. Biochemistry journal, 1975. **151**: p. 491-495.
125. Zheng, X., P.L. Bishop, and K. B.K., *Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms*. Water science technics., 1999. **39**(7): p. 211-218.

126. Rouxhet, P.G., et al., *Application of X-Ray Photoelectron Spectroscopy to Micro-organisms*. Colloids and Surfaces B. Biointerfaces, 1994. **2**: p. 347-369.
127. Montreuil, J., et al., *Glycoproteins*, in *Carbohydrates analysis, a practical approach*, K.J.F. Chaplin M.F., Editor. 1986, Irl press: Oxford. p. 143-204.
128. Paynter, R.W. and R. B.D., *The study of interfacial proteins and biomolecules by X-Ray Photoelectron Spectroscopy*, in *Surface and interfacial aspects of biomedical polymers*, A. J.D., Editor. 1985, Plenum press: New York. p. 189-216.
129. de Lozé, C., M. Baron, and F. Fillaux, *Interactions of the CONH group in solution. Interpretation of the infrared and raman spectra in relationship to secondary structures of peptides and proteins*. journal de chimie physique, 1978. **75**(6): p. 631-649.
130. Ishida, K.P. and P.R. Griffiths, *Adsorption of proteins and polysaccharides at aqueous-solid interfaces by infrared internal reflexion spectrometry, in situ investigation*, in *FTIR Spectroscopy in colloid and interface science*, D.R. Scheuing, Editor. 1991. p. 208-224.
131. Ishida, K.P. and P.R. Griffiths, *Comparison of the Amide I/II Intensity Ratio of Solution and Solid-State Proteins Samples by Transmission, Attenuated Total Reflectance and Diffuse Reflectance Spectrometry*. Applied Spectroscopy, 1993. **47**(5): p. 584-589.
132. Zeng, H., K.K. Chittur, and W.R. Lacefield, *Analysis of bovine serum albumin adsorption on calcium phosphate and titanium surfaces*. Biomaterials, 1999. **20**: p. 377-384.
133. Costa, D., *seawater adsorption on chromium and stainless steel surface*. 2002.
134. Boyd, R., et al., *The cleanability of stainless steel as determined by X-ray photoelectron spectroscopy*. Applied surface science, 2001. **172**: p. 135-143.
135. Van Oss, C.J., R.J. Good, and M.K. Chaudhury, *Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems*. Chemical Review, 1988. **88**: p. 927-941.
136. Parks, G. and P. de Bruyn, *The zero point of charge of oxides*. Journal of physico-chemistry, 1962. **66**: p. 967-972.
137. Tang, J., M. Tung, and Y. Zeng, *Compression strength and deformation of gellan gels formed with mono and divalent cations*. Carbohydrate polymers, 1996. **29**(1): p. 11-16.
138. Ishida, K.P. and P.R. Griffiths, *Investigation of Polysaccharide Adsorption on Protein Conditioning Films by Attenuated Total Reflection Infrared Spectrometry. I Germanium surfaces*. J. of Colloid and Interface Science, 1993. **160**: p. 190-200.
139. Bhosle, N., et al., *Influence of divalent cations and pH on adsorption of a bacterial polysaccharide adhesin*. J. Colloid Interface Sci., 1998. **205**: p. 89-96.
140. Chiappa, L., et al., *Polymer adsorption at the brine/rock interface : the role of electrostatic interactions and wettability*. journal of petroleum science and engineering, 1999. **24**: p. 113-122.
141. Bain, C. and G. Whitesides, *Attenuation lengths of photoelectron in hydrocarbon films*. Journal of physico-chemistry, 1989. **93**: p. 1670-1673.

142. Matsui, T., et al., *Study of plasma proteins adsorbed on polymer surfaces by Fourier transform infrared spectrometry*. Journal of bioengineering, 1978. **2**: p. 539-541.
143. Jakobsen, R., F. Wasacz, and J. Brasch, *The relationship of bound water to the IR amide I bandwidth of albumin*. Biopolymers, 1986. **25**: p. 639-654.
144. Mori, O. and T. Imae, *AFM Investigation of the Adsorption Process of Bovine Serum Albumin on Mica*. Colloids and Surfaces B: Interfaces, 1997. **9**: p. 31-36.
145. Dobson, K. and A. Mc Quillan, *In situ infrared spectroscopic analysis of the adsorption of aliphatic carboxylic acids to TiO₂, ZrO₂, Al₂O₃ et Ta₂O₅ from aqueous solutions*. Spectrochimica acta part A, 1999. **55**: p. 1395-1405.
146. Compere, C., et al., *Modeling of the adsorption on Cr₂O₃ clusters of small molecules and ions present in seawater. A preliminary non-empirical study*. New Journal of Chemistry, 2000. **24**: p. 993-998.
147. Kirchman, D., D. Henry, and S. Dexter, *Adsorption of proteins to surfaces in seawater*. Marine chemistry, 1989. **27**: p. 201-217.
148. Vermöhlen, K., et al., *Adsorption of polyelectrolytes onto oxides- the influence of ionic strength, molar mass and Calcium ions*. Colloids and surface A : physicochemical and engineering aspects, 2000. **163**: p. 45-53.
149. Jucker, B., H. Harms, and A. Zehnder, *Adsorption of bacterial surface polysaccharide on mineral oxides is mediated by hydrogen bonds*. Colloids and Surface B : Biointerfaces, 1997. **9**: p. 331-343.
150. Said, A. and R. Hassan, *Thermal decomposition of some divalent metal alginate gel compounds*. Polymer degradation and Stability, 1993. **39**: p. 393-397.
151. Angyal, S., *Complexes of metal cations with carbohydrates in solution*. Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry, 1989. **47**: p. 1-43.
152. micromer, *Caractérisation de microfiores associées à des surfaces (verre, PTFE et inox) immergées en eau de mer circulante*. 1999: Brest. p. 1-10.
153. micromer, *Caractérisation de microfiores associées à des surfaces (verre, PTFE et inox) immergées en eau de mer circulante : partie 2*. 2000: Brest. p. 1-10.
154. Bouttier, S., et al., *Role of electrostatic interactions in the adhesion of Pseudomonas fragi and Brochothrix thermophacta to meat*. Colloids and Surfaces B:Biointerfaces, 1994. **2**: p. 57-65.
155. Rogers, H.J., *Adhesion of micro-organisms to surfaces : some general considerations of the role on the envelope*, in *Adhesion of micro-organisms to surfaces*, J.M.a.P.R. Ed D.C. Ellwood, Editor. 1979, Publ Society for General Microbiology (Special Publication no 2), Academic Press. p. 29-55".
156. An, Y.H. and R.J. Friedman, *Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces*. Journal of biomedical material research, 1998. **43**(3): p. 338-348.

157. Kiely, L., N. Olson, and G. Mortensen, *The physicochemical surface characteristics of Brevibacterium linens*. Colloids and Surface B : Biointerface, 1997. **9**: p. 297-304.
158. Girardin, H., et al., *The role of the rodlet structure on the physicochemical properties of Aspergillus conidia*. Letters in applied microbiology, 1999. **29**: p. 364-369.
159. Bos, R. and H. Busscher, *Role of acid base interactions on the adhesion of oral streptococci and actinomyces to hexadecane and chloroform influence of divalent cations and comparison between free energies of partitioning and free energies obtained by extended DLVO analysis*. Colloids and Surface B : Biointerface, 1999. **14**: p. 169-177.
160. BASISgroup. *A study of the initial stages of biofilm formation on stainless steel immersed in natural seawater*. in *Proc. Euromat 98*. 1998. Lisbon, Portugal: Sociedade Portuguesa de Materiais.
161. Dufrière, Y., et al., *X-ray photoelectron spectroscopy analysis of whole cells and isolated cell walls of gram positive bacteria : comparison with biochemical analysis*. Journal of bacteriology, 1997. **179**(4): p. 1023-1028.
162. Rubio, C., et al., *Characterization of bovine serum albumin adsorption on the chromium and AISI 304 stainless steel, consequences for the Pseudomonas fragi K1 adhesion*. Colloids and Surface B : Biointerface, 2002. **24**: p. 193-205.
163. Fletcher, M. and K.C. Marshall, *Bubble Contact Angle Method for Evaluating Substratum Interfacial Characteristics and its Relevance to Bacterial Attachment*. Applied and Environmental Microbiology, 1982. **44** **1**: p. 184-192.
164. Barriga, M. and J. Piette, *Reduction of adhesion of a Lactobacillus sp. to collagen sausage casing by proteins*. Food research international, 1996. **29**(3-4): p. 249-257.
165. Mueller, R.F., et al., *Characterisation of initial events in bacterial surface colonization by two pseudomonas species*. Biotech. and Bioeng., 1992. **39**: p. 1161-1170.

RESUME

La formation des biofilms sur les matériaux immergés en milieu marin engendre un déclin de la fonctionnalité et de la durée de vie des équipements. Au vu des problèmes écologiques engendrés par les peintures antisalissures, nous avons cherché à caractériser plus précisément les interactions physico-chimiques existant entre les bactéries et les matériaux afin d'élaborer de nouveaux moyens de prévention.

Dans un premier temps, nous avons formé un film primaire modèle, obtenu par adsorption d'une protéine (SAB) et d'un polymère bactérien, physico-chimiquement proche de celui observé en eau de mer naturelle. Ce film organique est hétérogène, couvrant au maximum 42% de la surface solide, et l'adsorption organique s'effectue sous forme de multicouches, les macromolécules étant pontées entre elles par des cations magnésium et calcium.

Dans un deuxième temps, la caractérisation par XPS et MATS de deux bactéries pionnières dans la formation des biofilms, *Vibrio splendidus* (homologie de séquence ARN de 98,8%) d'une part et *Pseudomonas* sp. d'autre part, et de *Pseudoalteromonas macleodii* subsp. *fijiensis* a permis de relier les propriétés acido-basiques et de Lifshitz van der Waals des bactéries à leur composition d'extrême surface : les bactéries fortement hydrophiles présentent majoritairement en surface des polysaccharides alors que les bactéries faiblement hydrophiles présentent des protéines.

Enfin, l'adhésion bactérienne sur des échantillons de verre, d'acier inoxydable AISI 316L et de PTFE préconditionnés ou non par un film organique a mis en évidence, dans nos conditions expérimentales, que : la formation du film primaire et l'adhésion bactérienne peuvent être simultanées ; les vitesses d'adhésion des bactéries peuvent être reliées à leur composition d'extrême surface ; les exopolymères excrétés par les bactéries leur permettent de s'ancrer sur les matériaux ; et enfin que les bactéries n'adhèrent pas seulement sur le film primaire.

Mots clefs : biofilm, adhésion bactérienne, adsorption, IRRAS, XPS, MATS, caractérisation physico-chimique, bactéries marines, Eau de mer.

ABSTRACT

Biofilm formation on surfaces immersed in sea water induces equipment damages. Recently, studies focused on the environmental impact of antifouling paints have shown that some active chemical compounds are harmful to the aquatic environment. Hence, it appears fundamental to study physico-chemical interactions existing between marine bacteria and various substrata to conceive new ecological products or antifouling processes.

First, we model an artificial primary organic film, formed by the adsorption of BSA and polysaccharide, as close as the one formed in natural seawater. This organic film is heterogeneous (only 42% of the surface is covered) and organic adsorption occurs in a multi-layer scheme, molecules bounded each others by calcium and magnesium ions.

Second, three marine bacteria, *Vibrio splendidus* (98,8% of RNA/RNA homology), *Pseudomonas* sp. and *Pseudoalteromonas macleodii* subsp. *fijiensis*, are characterised by analytical surface techniques. The combination of the results obtained by XPS and MATS shows that bacterial acido-basic properties can be explained by differences in surface compositions : highly hydrophilic bacteria exhibit polysaccharides whereas slightly hydrophilic bacteria exhibit proteins on their surfaces.

Finally, bacterial adhesion on glass, stainless steel AISI 316L and PTFE samples which are or are not covered with an organic film points out that, in our laboratory conditions, primary organic film formation and bacterial adhesion may occur at the same time. Next, we show that kinetics of adhesion can be explained by bacterial surface composition and that polymers excreted by bacteria allow them to firmly attach to surfaces. Then, XPS and microbiological results lead us to say that bacteria don't only attach to the primary organic film.

Key-word : biofilm, bacterial adhesion, adsorption, IRAS, XPS, MATS, physico-chemical characterisation, marine bacteria, sea water.