

Laboratoire de Recherches sur les Macromolécules
Institut Galilée – Université Paris XIII

THESE

Présentée par

Nora HAMADOUCHE

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université Paris XIII

Discipline : Sciences de l'ingénieur
Spécialité : Génie Biologique et Médical

Interactions des bactéries marines responsables de la formation des biosalissures avec des matériaux biospécifiques

Soutenue le 5 décembre 2003 devant la commission d'examen :

Rapporteurs :

Mr. P. **LEJEUNE**
Mr. D. **LABARRE**

Professeur INSA, Lyon I
Professeur, Orsay

Examineurs :

M^{me} C. **COMPERE**
Mr. M. **KRAEMER**
Mr. D. **MULLER**
Mr. M. **JOZEFOWICZ**

Ingénieur-Chercheur Ifremer, Brest
Professeur, UFR Bobigny, Paris XIII
Professeur, Institut Galilée, Paris XIII
Professeur, Therapol

Remerciements

Ce travail a été effectué grâce à la collaboration de deux laboratoires : le service matériau et structure de l'IFREMER de Brest et Laboratoire de Recherches sur les Macromolécules, à l'Institut Galilée, Université Paris XIII, Villetaneuse, et au cofinancement de l'IFREMER et de la région Bretagne.

J'adresse mes remerciements à Monsieur Daniel Muller, Professeur à l'Université Paris XIII, de m'avoir accueilli dans son laboratoire et d'avoir accepté de diriger ce travail. Je le remercie également pour sa contribution à ce travail, notamment pour l'aide qu'il m'a apporté dans la rédaction de ce mémoire. Merci.

Je souhaite remercier Monsieur Marcel Jozefowicz, Professeur à l'Université Paris XIII, de m'avoir confié ce sujet. Je le remercie également pour avoir dirigé mes recherches et les précieux conseils qu'il m'a prodigué tout au long de ces années. Qu'il trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Je suis très honorée de la présence dans ce jury de Messieurs Philippe Lejeune, Professeur à l'INSA de Lyon et Denis Labarre Professeur à l'université Paris XI, je leur adresse également mes remerciements pour l'attention qu'ils ont accordé à ce travail

Je tiens également à remercier Monsieur Michel Kraemer, Professeur à l'université Paris XIII, pour avoir accepté de présider ce Jury.

Je tiens particulièrement à remercier Madame Chantal Compère, pour avoir participé activement à ce projet. Je la remercie également pour ces précieux conseils et pour toute l'aide qu'elle m'a apportée concernant la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie toutes les personnes rencontrées au Laboratoire qui ont contribué à rendre ces années inoubliables et plus particulièrement : Paolo, Bérengère Tissot, Arkaïa...

Je tiens tout particulièrement à exprimer mon amitié à Annie Vasnier, Thérèse Cormontagne dont la gentillesse n'a jamais faillit.

Je remercie de tout mon cœur mes amies, Elisabeth, Fatima, Zaina et Zohra pour leur présence à mes coté, dans les moments difficiles mais aussi dans les moments de joie. Je tiens à vous remercier chacune pour l'aide que vous avez apportée et pour avoir été tout simplement...là.

Enfin, je ne saurais terminer sans remercier ma famille qui m'a toujours soutenue tout au long de mes études. Je remercie en particulier mes parents, qu'ils trouvent ici l'expression de mon amour, ma sœur, mes frères ainsi que Acia et Yamina.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	11
-----------------------------------	-----------

PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION.....	13
--------------------------	-----------

CHAPITRE I : LES SALISSURES.....	15
---	-----------

I.- FORMATION DES BIOSALISSURES	16
I. 1. Adsorption moléculaire.....	16
I. 2. Adhésion bactérienne.....	18
I.2.1. Adhésion réversible.....	19
I.2.2. Adhésion irréversible.....	19
I.3. Les biofilms	20
II. LES BACTERIES MARINES.....	21
II. 1. Structure et morphologie de la bactérie.....	22
II.1.1. La capsule.....	22
II.1.2. Le Glycocalyx.....	22
II.1.3. La paroi	23
II.1.4. Le peptidoglycane.....	25
II.1.5. Fonction de la paroi.....	26
II.1.5. Flagelles et pili.....	26
II. 2. Le métabolisme et les caractéristiques de croissance.....	27
II.2.1. La croissance bactérienne.....	27
II.2.2. Effet de la température et de la pression	29
II.2.3. Influence de la concentration saline.....	30
II.2.4. Ecologie physiologique (Neidhardt et al, 1990).....	30
II. 3. Adhérence bactérienne.....	30
III. CONSEQUENCES DES BIOSALISSURES.....	33
III.1. la corrosion bactérienne.....	33
III.2. La biodétérioration des matériaux	36
III. 3. La résistance de frottement.....	36
III.4. La résistance au transfert de chaleur.....	37
III.4. Conséquences des biosalissures sur les capteurs optiques.....	37
IV. PREVENTIONS ET MOYENS DE LUTTE.....	37
IV. 1. Les peintures anti-salissures.....	38
IV. 2. Les nouvelles recherches	39

CHAPITRE II : LES BIOMATERIAUX	41
---	-----------

I. DEFINITIONS	41
II. LES POLYMERES BIOSPECIFIQUES	41
II.1. Les bases du principe J et J	42
II.2. Mise en évidence des sites biospécifiques à travers un exemple : Les dérivés phosphorylés du polystyrène à activité « DNA-like » (Jozefonvicz et Jozefowicz 1997).....	43
III. ADSORPTION DES PROTEINES A LA SURFACE D'UN MATERIAU	47
III.1 Mécanisme général de l'adsorption	47
III.2 La nature des interactions	50
3.2.1. Les interactions électrostatiques	51
3.2.2. Les interactions de Van der Waals.....	52
3.2.3. Les liaisons hydrogènes et interactions π - π	52
3.2.4. Les interactions hydrophobes.....	52
III.3. Les interactions spécifiques.....	53
IV. LES COPOLYMERES A ACTIVITE ANTI-COAGULANTE ET ANTI-COMPLEMENTAIRE	54
IV.1 Les polymères « héparin-like » insolubles.....	54
IV.2. Les polymères solubles	56
V. POLYMERES ET PARTICULES VIRALES.....	57
VI. POLYMERES ET CELLULES EUCARYOTES DE MAMMIFERES	58

VI.1. Les copolymères statistiques à base de polystyrène.....	59
VI.2. Les copolymères acryliques.....	61
VI. 3. Les dérivés du dextrane ou CMDBS à activité anti-proliférative.....	63
VII. LES COPOLYMERES ET DINOFLAGELLES MARINS.....	63
VIII. LES POLYMERES ET LES BACTERIES COMMENSALES DE L’HOMME.....	64
VIII.1. Les polymères solubles.....	65
VIII. 2. Les copolymères statistiques insolubles.....	65
CONCLUSION	70

PARTIE II : MATERIELS ET METHODES

CHAPITRE 1 : SYNTHESE ET CARACTERISATION DES COPOLYMERES STATISTIQUES

I. LA SYNTHESE.....	73
I.1. Matériels.....	73
I.2. Protocole de synthèse.....	73
II. CARACTERISATIONS.....	74
II. 1. Analyse élémentaire.....	74
II. 2. Le taux de gonflement.....	74

CHAPITRE 2 : ETUDE DES DIFFERENTS PARAMETRES LIES AUX SOUCHES BACTERIENNES

I. LES SOUCHES BACTERIENNES.....	75
I.1. Caractérisation.....	75
I.2. Conservation des souches.....	76
I.3. Les résistances aux antibiotiques.....	76
I.3.1. Objectif.....	76
I.3.2. Matériel.....	77
I.3.3. Méthodologie.....	77
I.4. Etalonnage de la concentration des bactéries par spectrophotométrie.....	77
II. LES CULTURES BACTERIENNES.....	78
III. ETUDE DES PARAMETRES DE MARQUAGE DES BACTERIES AVEC LA THYMIDINE TRITIEE.....	79

CHAPITRE 3 : ETUDES DE L’ADHERENCE DE D01 ET D41 SUR DIFFERENTS TYPES DE MATERIAUX.....

I. CONDITIONNEMENT DES MATERIAUX UTILISES.....	81
I.1. Conditionnement des copolymères dérivés du polystyrène.....	81
I.2. Conditionnement du PMMA, du PVC, du PS et de la cellulose.....	81
I.3. Conditionnement des billes de verre.....	82
I.4. Conditionnement des matériaux recouvert de HEMA.....	82
II. ADHERENCE DES BACTERIES SUR LES DIFFERENTS MATERIAUX DANS DIFFERENTES CONDITIONS.....	82

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

INTRODUCTION.....

CHAPITRE 1 : LA SYNTHESE ET CARACTERISATION DES COPOLYMERES STATISTIQUES A BASE DE POLYSTYRENE ... - 89 -

I. LA SYNTHESE.....	- 89 -
I.1. La chlorosulfonation.....	- 89 -
I.2. Le polystyrène sulfonate de sodium.....	- 91 -
I.3. Le polystyrène sulfamide d’ester méthylique d’acide aminé.....	- 91 -
I.4. Le polystyrène sulfamide d’acide aminé.....	- 93 -
II. CARACTERISATIONS.....	- 94 -
II.1. Caractérisation chimique par analyse élémentaire.....	- 94 -
II.1.1. Synthèse de PSSO ₂ Phe, PSSO ₂ PheMe, PSSO ₂ Ser, PSSO ₂ Trp, PSSO ₂ Ala, PSSO ₂ AlaMe et PSSO ₂ Eth.....	- 96 -

II.1.2. Synthèse des familles PSSO ₂ Asp, PSSO ₂ AspMe et PSSO ₃ Na.....	- 102 -
II.2. Taux de gonflement.....	- 105 -
II.2.1. Résultats.....	- 106 -
II.2.2. Discussion.....	- 108 -
II.3. Détermination des surfaces spécifiques des microsphères.....	- 109 -
III. CONCLUSION.....	- 112 -

CHAPITRE 2 : ETUDE DES DIFFERENTS PARAMETRES LIES AUX SOUCHES BACTERIENNES 113

INTRODUCTION.....	113
I. CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DE D01 ET D41.....	114
I.1. Etablissement d'antibiogrammes des souches D01 et D41a.....	114
I.2. Etude de la cinétique de prolifération des bactéries D01 et D41 en milieu riche.....	118
I.3. Discussion et conclusion.....	121
II. ETUDE DE LA PROLIFERATION DE D01 ET D41 DANS DIFFERENTES CONDITIONS.....	121
II.1. Influence de la température sur la prolifération bactérienne.....	122
II.1.1. Etude de la prolifération à 35°C.....	122
II.1.2. Etude à 12°C.....	122
II.2. Cinétique de prolifération de D01 et D41 en eau de mer.....	123
II.3. Influence du milieu dépourvu en matières organiques sur la prolifération bactérienne.....	124
II.3.1. La souche D01.....	126
II.3.2. La souche D41.....	126
II.3.3. Conclusion.....	129
II.4. Discussion et conclusion.....	129
III. ETUDE DU MARQUAGE METABOLIQUE DES SOUCHES PAR LA THYMIDINE TRITIEE.....	130
III.1. Objectifs et choix du marqueur.....	130
III.2. Incorporation de la thymidine par D01 et D41.....	131
III.3. Discussion et conclusion.....	133

CHAPITRE 3 : ETUDE DES INTERACTIONS DES BACTERIES AVEC LES MATERIAUX 135

INTRODUCTION.....	135
I. ETUDE DES PARAMETRES DE L'ADHESION.....	137
I.1. Isothermes d'adhésion de D01 et D41 sur le PSSO ₃ Na.....	137
I. 1. 1. Résultats.....	139
I. 1. 2. Discussion et conclusion.....	139
I. 2. Etudes cinétiques de l'adsorption des matières organiques sur les matériaux via l'adhésion des bactéries.....	140
I. 2. 1. Résultats.....	142
I. 2. 2. Discussion et conclusion.....	143
I. 3. Etude cinétique de l'adhésion bactérienne sur le PSSO ₃ Na et le PMMA.....	143
I. 3. 1. Cinétiques d'adhésion sur le PSSO ₃ Na.....	145
I. 3. 2. Cinétiques d'adhésion sur le PMMA.....	147
I. 3. 3. Discussion et conclusion.....	148
I. 4. Influence de l'état physiologique des bactéries sur l'adhésion bactérienne.....	151
I.4.1. Adhésion de D01 en phase exponentielle et en phase stationnaire de prolifération sur le PSSO ₃ Na et le PMMA.....	151
I. 4. 2. Adhésion de D41 en phase exponentielle et stationnaire de prolifération sur le PSSO ₃ Na et le PMMA.....	153
I. 4. 3. Discussion et conclusion.....	156
I. 5. Conclusion.....	157
II ETUDE DE L'ADHESION DES BACTERIES SUR LES MATERIAUX.....	159
Introduction.....	159
II. 1. Etude de l'adhésion des deux souches bactériennes sur les matériaux hydrophobes.....	159
II. 1. 1. Etude de l'adhésion de D01 et D41 sur le PMMA.....	160
II. 1. 2. Etude de l'adhésion de D01 et D41 sur le PS.....	167
II. 1. 3. Etude de l'adhésion de D01 et D41 sur le Polychlorure de Vinyle pré-incubé dans divers milieux.....	171
II.1.4. Etude de l'adhésion de D01 et D41 sur l'acétate de cellulose pré-incubé dans divers milieux.....	175
II. 1. 5. Conclusion.....	176

<i>II. 2. Etude de l'adhésion des deux souches bactériennes sur les copolymères statistiques dérivés du polystyrène.....</i>	<i>177</i>
II.2.1. Etude de l'adhésion de D01 et D41 sur le PSSO3Na et le PSSO3eth	178
II. 2. 2. Etude de l'adhésion de D01 et D41 sur les familles PSSO2Asp, PSSO2Phe et PSSO2Asp-O-Me	183
II.2.3. Discussion et conclusion	194
<i>II. 3. Etude de l'adhésion des deux souches bactériennes sur les matériaux hydrophiles</i>	<i>197</i>
II.3.1. Introduction	197
II.3.2. Etude de l'adhésion de D01 et D41 sur le verre.....	197
II.3.3. Etude de l'adhésion de D01 et D41 sur le PHEMA.....	201
II. 3. 4. Etude de l'adhésion de D01 et D41 sur la cellulose	203
II.3.5. Discussion et conclusion	207
DISCUSSION GENERALE	209
CONCLUSION GENERALE	221
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	223

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques du biofilm.....	14
Tableau 2 : Les facteurs influençant la nature des interactions impliquées dans l'adsorption des protéines.	51
Tableau 3 : Caractéristiques de D01 et D41	75
Tableau 4: Les acides aminés utilisés pour la substitution.....	- 92 -
Tableau 5 : Polystyrènes sulfamide de phénylalanine	- 97 -
Tableau 6 : Polystyrène sulfamide d'ester méthylique de phénylalanine.....	- 97 -
Tableau 7 : Polystyrènes sulfamide de sérine	- 97 -
Tableau 8 : Polystyrènes sulfamide d'ester méthylique de tryptophane	- 98 -
Tableau 9 : Polystyrènes sulfamide d'alanine.....	- 98 -
Tableau 10 : Polystyrènes sulfamide d'ester méthylique d'alanine	- 99 -
Tableau 11 : Polystyrène sulfamide d'éthanolamine	- 99 -
Tableau 12 : rendement de la chlorosulfonation de chaque famille	- 100 -
Tableau 13 : Taux de substitution en acides aminés des chacune des familles....	- 100 -
Tableau 14 : Polystyrènes sulfamide d'acide aspartique	- 103 -
Tableau 15: Polystyrène sulfamide d'ester méthylique d'acide aspartique	- 103 -
Tableau 16 : Polystyrène sulfonate de sodium	- 103 -

Tableau 17 : Densité et nombre de microsphères dans 1mg des copolymères statistiques.....	- 110 -
Tableau 18 : Caractéristiques de PSSO ₃ Na, PSSO ₂ Eth, PSSO ₂ Asp-o-Me, PSSO ₂ Phe, PSSO ₂ Asp	- 111 -
Tableau 19 : Modes d'action des différents antibiotiques sélectionnés.....	115
Tableau 20 : Sensibilité de D01 et D41 aux antibiotiques sélectionnés.....	116
Tableau 21 : Paramètres de prolifération des bactéries D01 et D41 en culture en suspension dans le Marine Broth à 20°C.....	120
Tableau 22 : Paramètres de prolifération des bactéries D01 et D41 en culture en suspension dans le marine broth à 12°C.....	122
Tableau 23 : Paramètres de prolifération des bactéries D01 et D41 en culture en suspension dans l'eau de mer naturelle à 20°C.....	124
Tableau 24 : Rapport cpm/cfu caractéristiques du marquage de D01 et D41 et temps optimal choisi, en phase exponentielle et stationnaire de prolifération.	134
Tableau 25 : Adhésion de D01 et D41 sur le PSSO ₃ Na incubé dans les différents milieux.	142
Tableau 26 : Résultats des cinétiques d'adhésion de D01 et D41 sur le PSSO ₃ Na et le PMMA.....	148
Tableau 27 : Adhésions de D01 et D41 sur le PSSO ₃ Na et le PMMA conditionnés par plusieurs types de milieux.....	156
Tableau 28 : Paramètres d'adhésion retenus pour chacune des souches	158
Tableau 29 : Adhésion de D01 et D41 sur le PMMA conditionné par divers milieux.	166
Tableau 30 : Adhésion de D01 et D41 sur le PVC dans différents milieux.....	173
Tableau 31 : Adhésion de D01 et D41 sur l'acétate de cellulose.	175
Tableau 32: Valeurs des taux d'adhésion de D01 et D41 sur le PSSO ₃ Na.....	180
Tableau 33 : Valeurs des taux d'adhésion de D01 et D41 sur le PSSO ₂ Eth.....	182
Tableau 34 : Adhésion de D01 et D41 sur le PSSO ₂ Phe	194
Tableau 35 : Adhésion de D01 et D41 sur les copolymères statistiques	195

TABLE DES FIGURES

<i>Figure 1: Les trois étapes de la formation du biofilm.</i>	16
<i>Figure 3 : La paroi chez les bactéries Gram+</i>	24
<i>Figure 4 : La paroi des Gram</i>	24
<i>Figure 5 : Exemple d'une courbe de croissance</i>	28
<i>Figure 6: Stade de corrosion précoce</i>	35
<i>Figure 7: Composition des polymères phosphorylés</i>	44
<i>Figure 8 : Capacité d'adsorption des anticorps anti-ADN en fonction du taux de phosphorylation des dérivés polystyrène sulfamide d'éthanolamine</i>	45
<i>Figure 9: Identification du site d'interaction d'anticorps anti-ADN de patients atteints de la maladie du Lupus Erythémateux Disséminé sur des copolymères phosphorylés dérivés du polystyrène. Comparaison des distances entre les groupements phosphodiester (PDE) du site biospécifique identifié sur les copolymères et celle des PDE de la molécule d'ADN.</i>	46
<i>Figure 10 Représentations graphiques de l'adsorption selon le modèle de Langmuir.</i>	49
<i>Figure 11 : Représentation schématique des interactions possibles entre une surface solide et une protéine</i>	50
<i>Figure 12 : Structure des différents motifs constituant les dextrans modifiés, ou CMDBS</i>	57
<i>Figure 13 : Prolifération des CEVCOH sur des copolymères statistiques substitués</i> 60	
<i>Figure 14 : Adhésion de Alexandrium minutum sur les polystyrènes sulfamide d'acide aminé méthyle ester</i>	62
<i>Figure 15 : Adhésion de Heterocapsa triquetra sur les polystyrènes sulfamide d'acide aminé méthyle ester.</i>	62
<i>Figure 16: Modulation de l'adhésion de Staphylococcus aureus (souche Cowan) par des copolymères statistiques dérivés du polystyrène préalablement recouverts par la fibronectine.</i>	65
<i>Figure 17 : Structure des terpolymères à base de poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA).</i>	66
<i>Figure 18 : Inhibition de l'adhésion bactérienne et de la prolifération des cellules fibroblastique sur des terpolymères acryliques comparés au PMMA</i>	67

<i>Figure 19 : Modulation de l'adhésion de Streptococcus pyogenes par des copolymères statistiques dérivés du polystyrène préalablement recouverts par la fibronectine.....</i>	<i>69</i>
<i>Figure 20 : Adhésion de S. pyogenes sur les films en copolymères à base de PVC préalablement incubés avec du plasma</i>	<i>68</i>
<i>Figure 21 : Inhibition de l'adhésion de S. pyogenes sur des copolymères fonctionnalisés à base de PMMA</i>	<i>68</i>
<i>Figure 25 : Polystyrène sulfamide d'ester méthylique d'acide aminé.....</i>	<i>- 93 -</i>
<i>Figure 26: Synthèse du polystyrène sulfamide d'acide aminé</i>	<i>- 94 -</i>
<i>Figure 27 Structure générale d'un copolymère statistique à base de polystyrène-</i>	<i>95 -</i>
<i>Figure 28 : Pourcentage de substitution en acide aminé en fonction du nombre de moles d'acides aminés introduit dans le milieu réactionnel.</i>	<i>- 101 -</i>
<i>Figure 29 (a, b) : Observation au microscope électronique des microsphères de polystyrène réticulé à 3% de divinylbenzène</i>	<i>- 104 -</i>
<i>Figure 30 Influence du taux de substitution en sérine sur le taux de gonflement-</i>	<i>106</i>
<i>Figure 31 : Influence du taux de substitution en phénylalanine sur le taux de gonflement.....</i>	<i>- 107 -</i>
<i>Figure 32 : Influence du taux de substitution en acide aspartique sur le taux de gonflement.....</i>	<i>- 107 -</i>
<i>Figure 33: Influence du taux de substitution en ester méthylique d'acide aspartique sur le taux de gonflement</i>	<i>- 108 -</i>
<i>Figure 34 : Représentation semi-logarithmique de la cinétique de prolifération de D01 en marine broth, à 20°C.</i>	<i>117</i>
<i>Figure 35 : Représentation semi-logarithmique de la cinétique de prolifération de D41 en marine broth, à 20°C.</i>	<i>117</i>
<i>Figure 36 : Représentation semi-logarithmique classique d'une prolifération bactérienne.....</i>	<i>119</i>
<i>Figure 37 : Représentation semi-logarithmique de la cinétique de prolifération de D41 en NaCl 36 ‰ , à 20°C.....</i>	<i>125</i>
<i>Figure 38 : Représentation semi-logarithmique de la cinétique de prolifération de D01 en ASW 36 ‰, à 20°C.....</i>	<i>126</i>

<i>Figure 39 : Représentation semi-logarithmique de la cinétique de prolifération de D41 en NaCl 36 ‰ , à 20°C.....</i>	<i>127</i>
<i>Figure 40 : Représentation semi-logarithmique de la cinétique de prolifération de D41 en ASW 36‰, à 20°C.....</i>	<i>127</i>
<i>Figure 41 : Représentation semi-logarithmique de la cinétique de prolifération de D41 en ASW 26‰, à 20°C.....</i>	<i>128</i>
<i>Figure 42 : Cinétique de radiomarquage de D01 à la thymidine tritiée</i>	<i>132</i>
<i>Figure 43 : Cinétique de radiomarquage de D41 à la thymidine tritiée</i>	<i>132</i>
<i>Figure 44 : Isotherme d'adhésion de D01 sur le PSSO₃Na (n=6).....</i>	<i>138</i>
<i>Figure 45 : Isotherme d'adhésion de D41 sur le PSSO₃Na (n=6).....</i>	<i>138</i>
<i>Figure 46 : Adhérence de D01 sur le PSSO₃Na pré-adsorbé par les matières organiques contenues dans le marine broth ,l'eau de mer naturelle et le NaCl 36‰. (n=3)</i>	<i>141</i>
<i>Figure 47 : Adhérence de D41 sur le PSSO₃Na pré-adsorbé par les matières organiques contenues dans le marine broth et l'eau de mer naturelle. (n=3)...</i>	<i>141</i>
<i>Figure 48 : Cinétique d'adhésion de D01 sur le PSSO₃Na en NaCl 36‰ (n=4)</i>	<i>144</i>
<i>Figure 49 : Cinétique d'adhésion de D41 sur le PSSO₃Na en ASW 26‰ (n=4).....</i>	<i>145</i>
<i>Figure 50 : Cinétique d'adhésion de D01 sur le PMMA en NaCl</i>	<i>146</i>
<i>Figure 51 : Cinétique d'adhésion de D41 sur le PMMA en ASW</i>	<i>147</i>
<i>Figure 52 : Adhésion de D01 en phase exponentielle et stationnaire sur le PSSO₃Na pré-incubé par le NaCl, l'EM et le MB.....</i>	<i>152</i>
<i>Figure 53 : Adhésion de D01 en phase exponentielle et stationnaire sur le PMMA pré-incubé par le NaCl, l'EM et le MB.....</i>	<i>152</i>
<i>Figure 54 : Adhésion de D41 en phase exponentielle et stationnaire sur le PSSO₃Na pré-incubé par l'ASW, l'EM et le MB.....</i>	<i>154</i>
<i>Figure 55 : Adhésion de D41 en phase exponentielle et stationnaire sur le PMMA pré-incubé par l'ASW, l'EM et le MB.....</i>	<i>154</i>
<i>Figure 56 : Structure du poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA).....</i>	<i>160</i>
<i>Figure 57 : Adhésion de D01 sur le PMMA incubé avec le NaCl, l'EM et le MB.</i>	<i>161</i>
<i>Figure 58 : Adhésion de D41 sur le PMMA incubé avec l'ASW, l'EM et le MB.</i>	<i>161</i>

Figure 59 : Adhésion de D01 sur le PMMA incubé avec le NaCl, l'EM, le MB, le MB200 et le plasma. (n=9)	163
Figure 60 : Adhésion de D41 sur le PMMA incubé avec l'ASW, l'EM, le MB, le MB200 et le plasma. (n=9).....	163
Figure 61 : Adhésion de D01 sur le PMMA conditionné avec la BSA puis avec le NaCl, l'EM, le MB, le MB200 et le plasma. (n=9).....	165
Figure 62 : Adhésion de D41 sur le PMMA conditionné avec la BSA puis avec l'ASW, l'EM, le MB, le MB200 et le plasma. (n=9).....	165
Figure 63 : Structure du poly(styrène), (PS)	167
Figure 64 : Adhésion de D01 sur le PS incubé avec le NaCl, l'EM, le MB, le MB200 et le plasma (n=9).....	168
Figure 65 : Adhésion de D41 sur le PS incubé avec l'ASW, l'EM, le MB, le MB200 et le plasma. (n=9).....	168
Figure 66 : Adhésion de D01 sur le PS conditionné avec la BSA puis avec le NaCl, l'EM, le MB, le MB200 et le plasma. (n=6).....	170
Figure 67 : Adhésion de D41 sur le PS conditionné avec la BSA puis avec l'ASW, l'EM, le MB, le MB200 et le plasma. (n=6).....	170
Figure 68 : Structure du poly(chlorure de vinyle), (PVC)	171
Figure 69 : Adhésion de D01 sur le PVC incubé avec le NaCl, l'EM et le MB. (n=6)	172
Figure 70 : Adhésion de D41 sur le PVC incubé avec l'ASW, l'EM et le MB. (n=6). 172	
Figure 71: Adhésion de D01 sur l'acétate de cellulose conditionnée dans divers milieux (n=3).....	174
Figure 72: Adhésion de D41 sur l'acétate de cellulose conditionnée dans divers milieux (n=3).....	174
Figure 73 : Structure de l'acétate de cellulose, (AC).....	175
Figure 74 : Adhésion de D01 sur le PSSO ₃ Na conditionné avec le NaCl, l'EM et le MB.....	179
Figure 75 : Adhésion de D41 sur le PSSO ₃ Na conditionné avec le ASW, l'EM et le MB.....	179
Figure 76: Adhésion de D01 sur le PSSO ₂ Eth conditionné avec le NaCl, l'EM et le MB.....	181

<i>Figure 77 : Adhésion de D01 sur le PSSO₂Eth conditionné avec le ASW, l'EM et le MB.....</i>	<i>181</i>
<i>Figure 78 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D01 en NaCl (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en acide aspartique méthyle ester.....</i>	<i>184</i>
<i>Figure 79 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D01 en EM (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en acide aspartique méthyle ester.....</i>	<i>184</i>
<i>Figure 80 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D01 en MB (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en acide aspartique méthyle ester.....</i>	<i>185</i>
<i>Figure 81 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D41 en ASW (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en acide aspartique méthyle ester.....</i>	<i>186</i>
<i>Figure 82 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D41 en EM (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en acide aspartique méthyle ester.....</i>	<i>186</i>
<i>Figure 83 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D41 en MB (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en acide aspartique méthyle ester.....</i>	<i>186</i>
<i>Figure 84 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D01 en NaCl (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en acide aspartique</i>	<i>188</i>
<i>Figure 85 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D01 en EM (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en acide aspartique....</i>	<i>188</i>
<i>Figure 86 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D01 en MB (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en acide aspartique.....</i>	<i>189</i>
<i>Figure 87 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D41 en ASW (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en acide aspartique</i>	<i>190</i>
<i>Figure 88 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D41 en EM (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en acide aspartique.....</i>	<i>190</i>
<i>Figure 89 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D41 en MB (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en acide aspartique....</i>	<i>190</i>
<i>Figure 90 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D01 en NaCl (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en phénylalanine .</i>	<i>192</i>

<i>Figure 91 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D01 en EM (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en phénylalanine.....</i>	<i>192</i>
<i>Figure 92 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D01 en MB (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en phénylalanine.....</i>	<i>192</i>
<i>Figure 93 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D41 en ASW (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en phénylalanine .</i>	<i>193</i>
<i>Figure 94 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D41 en EM (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en phénylalanine.....</i>	<i>193</i>
<i>Figure 95 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D41 en MB (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en phénylalanine.....</i>	<i>193</i>
<i>Figure 96 : Adhésion de D01 sur les copolymères statistiques en fonction du conditionnement.....</i>	<i>195</i>
<i>Figure 97 : Adhésion de D41 sur les copolymères statistiques en fonction du conditionnement.....</i>	<i>196</i>
<i>Figure 98: Adhésion de D01 sur le verre conditionné avec différents milieux.....</i>	<i>198</i>
<i>Figure 99 : Adhésion de D41 sur le verre conditionné avec différents milieux.....</i>	<i>198</i>
<i>Figure 100 : Adhésion de DO1 sur le PHEMA conditionné avec différents milieux.</i>	<i>200</i>
<i>Figure 101 : Schéma de la structure chimique du poly(hydroxyéthylméthacrylate) (PHEMA)</i>	<i>201</i>
<i>Figure 102 : Adhésion de D41 sur le PHEMA conditionné avec différents milieux..</i>	<i>202</i>
<i>Figure 103 : Schéma de la structure chimique de la cellulose.....</i>	<i>203</i>
<i>Figure 104 : Adhésion de DO1 sur la cellulose conditionnée avec différents milieux</i>	<i>204</i>
<i>Figure 105: Adhésion de D41 sur la cellulose conditionnée avec différents milieux</i>	<i>204</i>
<i>Figure 106: Adhésion de D01 sur les matériaux hydrophiles dans divers milieux ...</i>	<i>206</i>
<i>Figure 107 : Adhésion de D41 sur les matériaux hydrophiles dans divers milieux ..</i>	<i>206</i>

INTRODUCTION GENERALE

L'immersion de matériaux en milieu marin entraîne des conséquences, tant pour les matériaux que pour le milieu marin. D'une part, en effet, la mise en contact provoque des altérations des matériaux de nature mécanique, chimique, électrochimique ou biologique telles que, par exemple, la corrosion des alliages métalliques ou la formation de biosalissures. D'autre part, ces contacts transforment l'environnement marin en raison, par exemple, du relargage des produits de corrosion des métaux ou des produits cytotoxiques imprégnant les surfaces des matériaux destinés à éviter la formation de biosalissures.

La corrosion et le problème des biosalissures constituent les problèmes majeurs résultant de l'immersion de matériaux dans les milieux marins. La prévention de ces phénomènes représente un coût considérable en maintenance. En particulier, le contrôle des salissures biologiques (biofouling), des structures et appareils métalliques en immersion permanente ou temporaire, est estimé dans le monde à plus de 4,5 milliards de dollars par an (Guézennec, 1993).

La formation des biosalissures résulte d'une séquence d'événements qui se produit lors de l'immersion dans l'eau de mer :

Dans un premier temps, une couche de molécules organiques et inorganiques est adsorbée à la surface du matériau extrêmement rapidement. Elle atteint un état stationnaire à la fin d'une période de quelques minutes à quelques heures.

Dans un deuxième temps, cette couche de matière adsorbée sert de médiateur pour l'adhésion des bactéries présentes en suspension dans le milieu marin. Cette colonisation de la surface par les bactéries marines est rapide et un état stationnaire est atteint au bout d'une période de quelques heures à quelques jours.

Dans un troisième temps, d'autres organismes marins viennent coloniser la surface, les bactéries adhérentes recrutant ces autres organismes. L'ensemble de ces organismes vivants liés à la surface constitue les biosalissures.

INTRODUCTION GENERALE

La formation du biofilm entraîne de nombreuses conséquences dommageables. De nombreux travaux ont été consacrés à la colonisation et à l'étude de la biogenèse de cet assemblage.

En vue d'éviter la formation des biosalissures, les surfaces sont imprégnées de produits cytotoxiques relargués dans l'environnement immédiat des matériaux. Les dommages pour l'environnement en résultant ont conduit les autorités compétentes à interdire à terme l'utilisation de certains produits cytotoxiques. Il est donc devenu urgent de trouver des solutions alternatives permettant d'éviter la formation de ces biofilms.

Parmi ces solutions alternatives, nous avons choisi d'étudier, sur la base des travaux réalisés antérieurement au Laboratoire de Recherches sur les Macromolécules, la possibilité d'utiliser des copolymères statistiques biospécifiques pour réaliser des traitements de surface des matériaux métalliques, prévenant l'adhésion des bactéries en contrôlant la composition de la couche de protéines adsorbées à la surface des matériaux ainsi que leur conformation, permettant ainsi d'éviter l'adhésion bactérienne et par suite la genèse des biosalissures.

INTRODUCTION

Les données publiées au sujet des bioalissures marines sont abondantes. Dans cette revue, nous nous limiterons à l'étude de celles qui se rapportent d'une part à la formation des bioalissures, d'autre part aux organismes impliqués dans la première étape de cette formation, à savoir, les bactéries marines. Nous étudierons ensuite, les conséquences de ces bioalissures sur les différentes infrastructures marines ainsi que les différents moyens mis en œuvre pour en limiter la formation.

Dans un deuxième chapitre, nous aborderons le thème des biomatériaux. Les biomatériaux ont été largement étudiés et utilisés par le domaine médical. En effet, dans le but constant de créer des matériaux pouvant palier ou réparer différents organes humains, la recherche a réalisé des nombreux progrès ces dernières décennies. Au LRM, de nombreuses études ont permis de mettre au point des copolymères statistiques biospécifiques capables de se lier spécifiquement à diverses constituants du vivant. Ces polymères sont élaborés selon un principe : le principe J et J. Nous allons donc voir dans un premier temps les bases de ce principe, ainsi que la mise en évidence des sites biospécifiques. Nous décrirons ensuite les différentes lois selon lesquelles les protéines sont adsorbées à la surface d'un matériau. Nous terminerons sur les différents exemples de copolymères statistiques biospécifiques réalisés au LRM, notamment les copolymères statistiques à effet bactériostatique et bactériophobe.

- Les cellules sont la plupart du temps immobilisées
- Densité cellulaire élevée
- Développement de microcosme constitué d'espèces variées
- Hétérogénéité spatiale

GRADIENTS :

- Valeur du pH (acidification locale, 2 à 3 unités pH)
- Concentration de l'oxygène, métabolites, sels dissous et le potentiel redox

- Succession d'espèces variées composition en consortium selon les changements des conditions environnementales dans le biofilm.
- L'activité métabolique est contrôlée par les processus de transport.
- La taille des cellules, la prise de substrat, la formation des produits est différente comparée aux cellules en suspension.
- Une capacité plus importante d'adaptation et de régénération
- Résistance contre les substances toxiques
- Propriété de surfaces
 - Les surfaces recouvertes d'un biofilm sont souvent plus rugueuses que les substrats
 - Surfaces viscoélastiques qui adsorbent l'énergie cinétique
 - Les propriétés de surface du substrat sont masquées : des surfaces hydrophobes peuvent devenir hydrophiles.

Tableau 1 : Caractéristiques du biofilm. (adapté de Flemming, 1998)

CHAPITRE I : LES SALISSURES

Le nom donné à ce phénomène peut varier d'un auteur à un autre. Dans un souci de clarté et d'homogénéité nous fixerons de façon arbitraire les termes de la nomenclature en ce qui concerne les biosalissures. Ainsi, lorsque nous décrirons l'adsorption de molécules à la surface d'un matériau, nous parlerons de couche de molécules adsorbées. Lorsque nous ferons référence à l'adhésion des bactéries sur un matériau nous parlerons de couche de bactéries adhérentes. Enfin, nous réserverons le terme de biosalissures ou biofilm à l'ensemble des micro-organismes unicellulaires et pluricellulaires retrouvées sur les infrastructures marines.

Autre élément de définition ; est appelé biofouling, la fixation d'organisme vivant sur une surface. Le terme emprunté à l'anglais est désormais d'usage courant et utilisé par exemple dans le nom de peinture antifouling. Le terme français de salissure ou celui de voile biologique n'expriment pas forcément la dimension métabolique et la diversité du phénomène, c'est pourquoi les termes biofouling et biofilm sont utilisés.

Selon Flemming, (1998) les biosalissures sont un agglomérat de micro-organismes complexe. Ils sont enveloppés dans une matrice d'exopolysaccharides (EPS) et représente un système très hétérogène. Les différentes caractéristiques des biosalissures sont regroupées dans le tableau 1 (Flemming, 1998)

Les salissures sont un phénomène universel dû à la colonisation de surfaces souvent exposées à l'eau ou immergées dans un milieu aqueux par des organismes vivants opportunistes. Les solutions, dites «classiques», d'entretien ou de traitement des surfaces sont clairement inadaptées, et la recherche scientifique s'intéresse depuis quelques années à comprendre les mécanismes de la formation des biosalissures, afin de les contrôler aux stades critiques, à l'aide de techniques de fond appropriées. Les nombreux apports des physico-chimistes, des ingénieurs des matériaux et des biochimistes d'un côté, et des microbiologistes et écologistes de l'autre, ont permis de dégager un certain nombre de certitudes sur la formation des biosalissures, et en particulier sur les stades initiaux suivant immédiatement la «mise en service» des matériaux. Un schéma général, applicable au milieu marin, est décrit

figure 1, basé sur la bibliographie récente produite par les chercheurs de ces différentes disciplines.

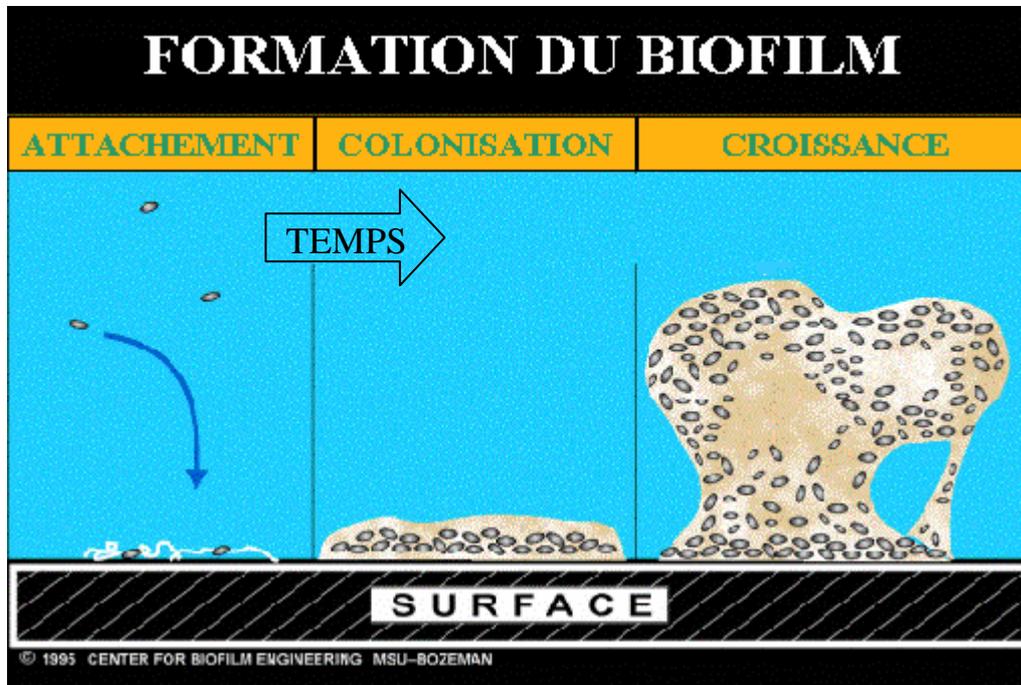


Figure 1: Les trois étapes de la formation du biofilm, (Dirckx, 1995).

Nous allons dans un premier temps voir comment ces biofilms se forment puis dans un second temps nous nous intéresserons aux organismes responsables du stade initial de formation : les bactéries.

I.- Formation des biofilms

I. 1. Adsorption moléculaire

Dès les premiers instants de contact avec l'eau de mer, il y a adsorption de composés chimiques surtout des macromolécules, telles que des composés azotés, des polysaccharides, des lipides, des liposaccharides, ainsi que des matières organiques. Cette adsorption de molécules qui s'effectue dans les minutes qui suivent la formation de l'interface solide-liquide est de ce fait considérée comme le début de la colonisation. L'importance de ce piégeage initial de la matière organique

dans la formation du biofilm a été suspectée par Zobell (1937, 1943) dans ses travaux précurseurs relatifs à l'effet des surfaces sur l'activité bactérienne. Il semble que les molécules adsorbées très rapidement sur la surface soient des macromolécules spécifiques d'origine biologiques, se liant au support par un grand nombre de sous-unités, ce qui rend très peu probable leur désorption.

Cette première adsorption modifie certaines propriétés de surface et facilite ainsi l'attachement et la croissance des bactéries, leur fournissant une source de carbone et d'énergie, Power (1988),

Walls (1998) et Compère *et al.* (2001) ont étudié les premières étapes de la formation du biofilm sur les aciers inoxydables immergés dans l'eau de mer naturelle dans différentes conditions. Il a été mis en évidence l'adsorption en premier lieu de protéines puis de carbohydrates, ce qui pouvait changer l'hydrophilicité de la surface, ce qui n'est pas contradictoire avec le fait que les polysaccharides favorisent l'adhésion bactérienne. Characklis (1983) a montré que ce film appelé aussi film primaire ne dépasse pas 0,1µm d'épaisseur et n'a donc aucun effet sur le flux ou les transferts de chaleur.

Des études ont été réalisées sur l'adsorption de molécules sur des échantillons d'acier inoxydable immergés dans l'eau de mer par spectroscopie ionique secondaire. Le but de ces caractérisations était de comprendre les mécanismes initiaux de l'adsorption de biomolécules pendant des temps relativement courts d'immersion (de 0 à 24 h). Il a été montré que d'une part il y avait une pré-contamination inévitable due à la manipulation de l'échantillon, d'autre part les molécules détectées semblent être des molécules organiques comme des composés azotés et l'oxygène. Il a été décrit également que l'adsorption du magnésium revêt semble t'il une importance capitale pour l'adsorption des protéines, ne particulier l'albumine bovine, Poleunis *et al.* (2002) ; Pradier *et al.* (2002).

I. 2. Adhésion bactérienne

Les cellules bactériennes se fixent sur presque toutes les surfaces immergées dans un environnement aquatique. Il semble toutefois que la nature et les propriétés de la surface servant de support ne soient pas sans importance. L'influence des irrégularités de la surface sur la colonisation d'un matériau n'est pour l'instant pas clairement établie, mais d'autres propriétés de ce support entrent également en jeu. L'une d'entre elles est la charge électrique de surface. Fletcher et Loeb (1979) ont montré, par exemple avec *Pseudomonas sp*, que, dans les deux heures suivant l'immersion, la fixation la plus importante des bactéries était observée sur les polymères hydrophobes ayant une charge de surface faible ou nulle comme le Téflon®, le polyéthylène, le polystyrène. Une adhérence modérée sur les matériaux hydrophiles à charge neutre (germanium) ou positive (platine) et une adhérence encore plus faible sur les matériaux hydrophiles à charge négative (verre, mica) ont été également observées. Shreve *et al* (1991) ont confirmé et complété ces résultats en étudiant la formation de biofilm de *Pseudomonas putida* sur 21 matériaux de propriétés différentes. Ils ont montré que les matériaux portant une charge nette (négative ou positive) étaient soumis à la plus forte colonisation, avec une cinétique de formation du biofilm globalement exponentielle. L'accumulation sur les matériaux hydrophobes non chargés représentait au bout de 16 jours environ 50% de celle des supports chargés, avec une cinétique approximativement linéaire, alors que la formation sur les matériaux hydrophiles non chargés s'avérait extrêmement faible. De plus, l'étude réalisée par Thompson, (1999), a montré que la modification, par ajout d'oxygène, des surfaces de polystyrène augmentait l'adhésion de *P.aeruginosa* de 55% en six heures. De même, Bezanson *et al* (1992) ont montré dans une étude *in situ* que la bactérie pathogène *Legionella pneumophila* colonisait plus vite et en plus grand nombre le polychlorure de vinyle (PVC) que le cuivre et le laiton. Les propriétés de surface de ces matériaux peuvent être modifiées et il a été montré par exemple que l'adhérence de bactéries marines sur le cuivre pouvait être augmentée par la polarisation anodique de la surface, libérant des ions cuivre dans le milieu (Gordon *et al*, 1981). La nature du matériau joue donc un rôle important dans la phase initiale de colonisation, même si préalablement à toute fixation, ce sont des molécules organiques et inorganiques qui s'adsorbent sur la surface. De plus, il a été

montré que ces molécules ne s'adsorbent pas de façon homogène sur la surface, créant ainsi des zones d'adhésion préférentielles (Poleunis *et al*, 2002).

Dans beaucoup d'étude, l'adhésion bactérienne n'est pas différenciée de la colonisation, qui inclut les effets de croissance ultérieure des cellules. De nombreux travaux ont toutefois montré que le processus d'adhésion était divisé en deux étapes initialement décrites par Marshall *et al* (1971) : une fixation réversible, suivie d'une fixation irréversible. Nous allons voir d'un premier temps l'adhésion réversible et dans un deuxième temps l'adhésion irréversible.

1.2.1. Adhésion réversible

Cette adhésion est décrite par Characklis (1983). Selon lui, les bactéries sont attirées par les surfaces mais restent mobiles grâce au mouvement brownien (non orienté) résultant de trois forces entre les bactéries et la surface : des liaisons électrostatiques, des liaisons Van Der Waals et des forces de tension interfaciales.

Selon Marshall *et al* (1971) l'adhésion réversible est le résultat de l'équilibre entre les énergies répulsives et les énergies attractives de Van Der Waals. Ainsi, une forte concentration en sels dans l'eau de mer favoriserait le maintien de bactéries comme *Pseudomonas sp.* à une faible distance de la surface du verre par une barrière répulsive. Le même phénomène de mobilité pendant la phase réversible a été décrit par Lawrence *et al* (1987) pour *Pseudomonas fluorescens*.

Cette phase est dite réversible car les bactéries peuvent être détachées par simple rinçage.

1.2.2. Adhésion irréversible

L'affinité spécifique entre des récepteurs membranaires et des composants reconnus en surface par les bactéries (de nature non covalente), ajoutée aux interactions permanentes avec la matrice polymérique des EPS est qualifiée d'irréversible lorsque le détachement des particules bactériennes nécessite une force mécanique extérieure (Characklis, 1983).

L'adhésion irréversible fixe les cellules de façon permanente à la surface, en générale à l'aide des EPS, et un traitement chimique ou mécanique plus sévère qu'un simple rinçage est nécessaire pour les détacher. Ces polymères

extracellulaires semblent pouvoir être produit soit avant soit après le contact cellule-surface. Il peut s'agir de protéines ou de lipopolysaccharides de la membrane externe de la cellule, d'excroissances de nature protéique ou de combinaisons complexes de polysaccharides. Ces composés parfois appelés adhésines, sont les seuls connus pour être responsables de l'adhésion sur les surfaces abiotiques. (Bryers, 1987). A l'exception de la plaque dentaire (pour laquelle la qualité abiotique du support est discutable), aucune interaction de type lectine-ligand n'a été démontrée dans ce cas.

Les processus d'adhésion sur les surfaces des bactéries en générale et des bactéries marines en particulier, seront étudiés dans le chapitre : bactéries marines.

I.3. Les biofilms

La définition que l'on donne au mot biofilm varie d'un auteur à l'autre. Prigent (1999) définit les biofilms comme des écosystèmes constitués de populations de micro-organismes, inclus dans une matrice d'exopolymères et généralement associés à des tissus, des matériaux abiotiques ou des interfaces. Les pellicules bactériennes qui contaminent les biomatériaux implantés dans l'organisme, les salissures des coques de bateaux, les flores et symbioses des tubes digestifs sont donc des biofilms, au même titre que les flocs de boues activées et les lichens. On constate que les structures d'adhérence responsables des interactions des micro-organismes avec les autres cellules sont de la même nature que celles qui leur permettent de s'attacher à des surfaces inertes.

Selon Beech et Flemming *et al* (2000) les biofilms sont constitués d'organismes extrêmement variés puisque :

- On peut trouver une vie microbienne à des températures extrêmes (-5°C en solution saline) ou des températures supérieures à 120°C au niveau des cheminées (fumeurs hydrothermaux) au fond des océans.
- Le pH peut aussi être variable allant de 0 pour l'espèce *Thiobacillus thiooxidans* à 13 comme pour l'espèce *Plectonema nostocorum* retrouvé dans les lacs très riches en Na_2CO_3 .
- Certaines bactéries barophiles vivant au fond des océans peuvent supporter une pression de 1000 bars.

- On retrouve aussi une grande diversité au niveau de la salinité puisque certaines espèces comme *Burkholderia capacia* peuvent se développer dans l'eau ultra pure avec une concentration en nutriments très faible, alors que d'autres espèces prolifèrent dans une eau saturée en sels comme les bactéries halophiles de la Mer Morte.
- Certaines espèces résistent aux radiations (des biofilms ont été retrouvés sur des lampes UV) et aux biocides.

Les bactéries présentent deux modes de vies, l'un planctonique, c'est à dire en suspension dans leur environnement aqueux, et l'autre sessile c'est à dire attaché à une matrice immergée dans le milieu. D'un mode de vie à l'autre, la croissance bactérienne diffère, et suite à l'adhésion, les bactéries modifient leur phénotype. Les bactéries d'une même espèce ou d'espèces différentes forment alors des micro-colonies constituant un biofilm. La majorité des biofilms naturels est composée de bactéries et d'organismes pluricellulaires (algues, champignons) (Palmer and White, 1997) Les biofilms composés uniquement de bactéries sont surtout des systèmes d'études en laboratoire. Ce type de biofilm à l'état naturel est retrouvé dans des sources d'eau chaude ou en milieu hyperbare. (Costerton et al 1995).

II. Les bactéries marines

Pseudomonas, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Acinetobacter* sont les genres les plus rencontrés dans le milieu marin, en particulier dans les biofilms.

La majorité des espèces marines est mobile et les bactéries Gram négatif dominent nettement (Brisou, 1995).

II. 1. Structure et morphologie de la bactérie

L'enveloppe des bactéries est constituée d'une capsule, d'un glycocalyx, de la paroi, et des peptidoglycanes (Prescott, 1993).

II.1.1. La capsule

C'est le constituant le plus superficiel de la bactérie mais il est variable. Il est constitué de polysaccharides acides (les sucres sont sous forme d'acides uroniques comme l'acide galacturonique, l'acide glucuronique, l'acide hyaluronique mais aussi sous forme de sucres phosphorés comme le ribitol-phosphate, ce dernier composant étant associé à certains pouvoirs pathogènes car empêche la phagocytose).

II.1.2. Le Glycocalyx

Constitué de fibres polysaccharidiques entourant la bactérie, sa présence est extrêmement fréquente. On observe ces fibres difficilement au microscope électronique. Le feutrage des fibres de glycocalyx est fréquent dans le cas de bactéries en conditions naturelles (environnement ou pouvoir pathogène). Le glycocalyx est responsable de l'attachement des bactéries à des supports inertes. Certaines structures différenciées du glycocalyx sont plus grosses et protéiques (fimbriae ou pili communs), permettant l'attachement des bactéries sur les cellules (*Escherichia.coli* de certaines infections urinaires), proches des pili, de structure voisine permettant aux bactéries de se fixer les unes aux autres dans certains processus d'échange génétique (cf. plasmides). Les structures du glycocalyx sont fixées à la paroi bactérienne.

II.1.3. La paroi

C'est l'enveloppe rigide qui assure l'intégrité de la cellule bactérienne et qui est responsable de la forme des cellules, et absente seulement chez les mycoplasmes.

La structure de la paroi détermine deux grands groupes, les bactéries gram-positives et les bactéries gram-négatifs, du nom d'une coloration spécifique. Les bactéries gram positives ont une paroi épaisse (20 à 80 nm), composée à 50% d'acide teichoïque en plus de la muréine. Les bactéries gram-négatives ont une paroi plus fine (10 à 15 nm), constituée de muréine pure. Elles se distinguent surtout des précédentes par la présence d'une seconde membrane, la membrane externe. L'espace situé entre les deux membranes, où se trouve la paroi, est appelé espace périplasmique (ou périplasme). (Figure 3 et 4)

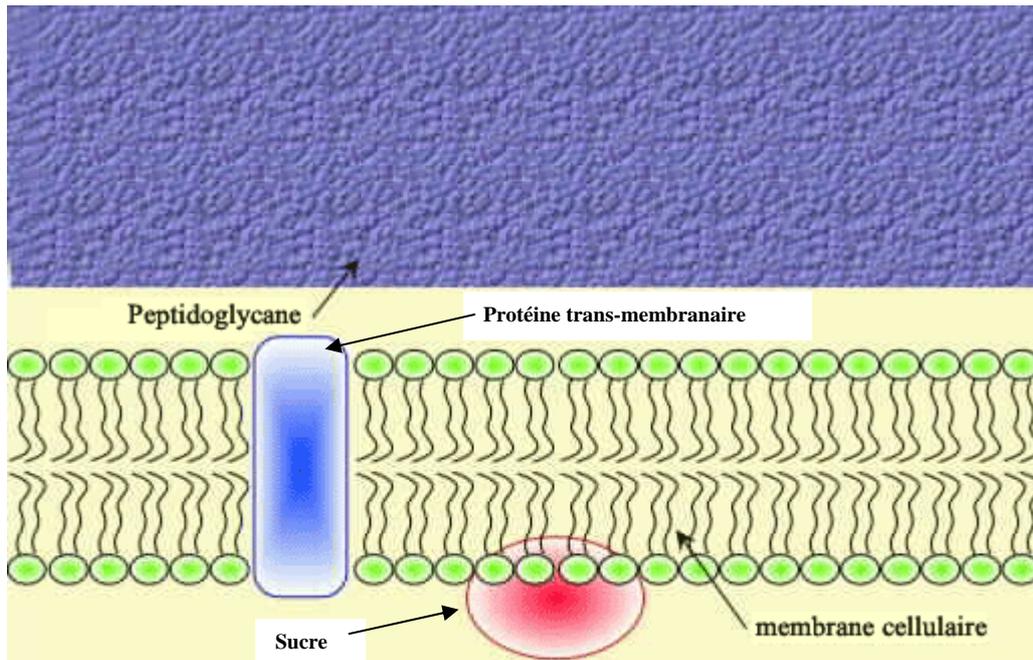


Figure 2 : La paroi chez les bactéries Gram+ ne comporte qu'une seule couche homogène de peptidoglycane (appelée également muérine) d'environ 20 à 80 nm. (Adapté de Prescott, 1993)

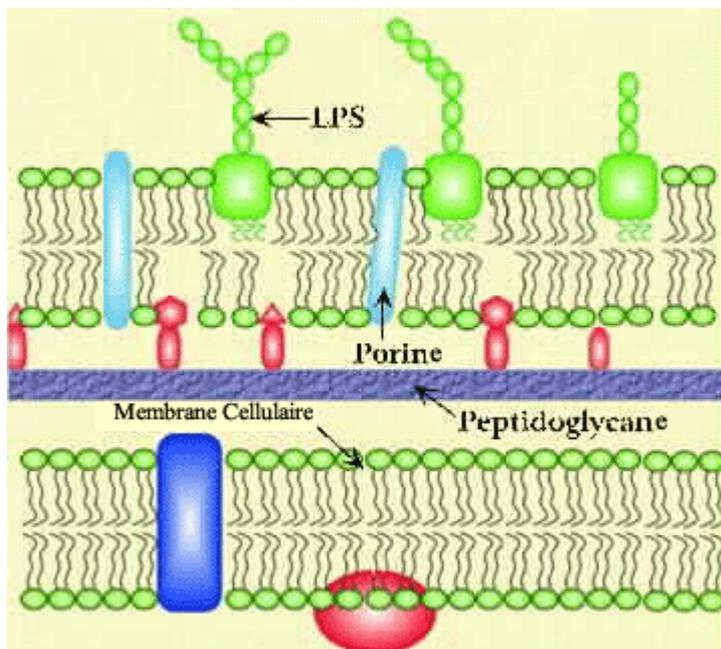


Figure 3 : La paroi des Gram - est beaucoup plus complexe. Elle est constituée de 1 ou 2 couches de peptidoglycane. (Adapté de Prescott, 1993)

La partie commune à toutes les parois bactérienne est le peptidoglycane.

II.1.4. Le peptidoglycane

Le peptidoglycane est un hétéropolymère : il est composé de chaînes glucidiques reliées les unes aux autres par des chaînons peptidiques. La macromolécule réticulée tridimensionnelle est ainsi constituée et sa solidité dépend de l'importance des interconnexions.

La structure de la membrane des bactéries Gram négatives constituant la majorité des bactéries marines, est décrite ci-dessous.

Nous savons que les bactéries gram-négatives sont entourées de deux membranes phospholipidiques composées chacune d'un double feuillet. La membrane interne est constituée pour plus de la moitié de sa masse par de très nombreux constituants polypeptidiques impliqués dans les transports, le métabolisme énergétique, la synthèse et l'exportation des constituants périphériques de la cellule. La région étroite située entre les deux membranes s'appelle le périplasme. On y trouve les peptidoglycanes, des oligosaccharides, des protéines solubles telles que des protéines de transport, des cytochromes *c* et quelques enzymes (phosphatase alcaline).

La membrane externe offre des caractères très spécialisés. Les deux feuillets lipidiques qui la composent sont très différents l'un de l'autre. La membrane externe contient un nombre assez restreint de protéines majeures (de 4 à 10) qui sont représentées en très nombreux exemplaires, de l'ordre de 50 000 à 200 000 par cellule. D'autres protéines, une cinquantaine environ, sont présentes en quantité plus faible et variable en fonction des conditions physiologiques. Parmi les protéines les plus abondantes se trouvent les porines, qui ménagent des canaux à travers la membrane pour le passage des petites molécules, et la lipoprotéine majeure de la paroi. Les liposaccharides (LPS) occupent le feuillet externe de la membrane et en sont l'élément caractéristique.

II.1.5. Fonction de la paroi

- Une fonction structurale. La membrane externe et les peptidoglycanes constituent une véritable paroi, mécaniquement solide, qui règle la forme de la cellule mais en même temps conserve assez de souplesse pour s'adapter à la croissance cellulaire et aux divisions.
- Une perméabilité sélective. Les porines ouvrent dans la membrane externe des canaux spécifiques et non spécifiques à de petites molécules hydrophiles et à des ions. En même temps, la paroi empêche la fuite vers l'extérieur, des protéines solubles du périplasme.
- Une protection. Les LPS maintiennent un feutrage dense et hydrophile autour de la cellule, contribuant à filtrer les molécules hydrophobes. Il a été remarqué aussi que les LPS avaient des propriétés adhésives qui contribuent à la formation des biofilms.
- Des récepteurs. On peut en distinguer 3 classes. La première est chargée de fixer des éléments nutritifs, ainsi les «complexants» du fer sont reconnus par ces récepteurs. La seconde classe de récepteurs consiste à reconnaître les pili d'une autre cellule avant conjugaison (permettant un échange de matériel génétique), où il semblerait que les LPS interviennent. Enfin une troisième classe de récepteurs «involontaires»: ils permettent la fixation de bactériophages et de colicines.
- L'exportation vers le milieu des produits sécrétés par les bactéries.

Il est important de noter que c'est grâce à cette paroi que la bactérie va interagir avec son environnement et plus particulièrement avec des surfaces (Brisou, 1995).

II.1.5. Flagelles et pili

De nombreuses bactéries possèdent au niveau de leur enveloppe externe, un ou plusieurs appendices appelés flagelles. Ils sont les organes locomoteurs des bactéries mobiles, qui sont ainsi capables de nager dans les environnements.

Les pili sont des appendices plus minces constitués de piline dont certains ont un rôle dans l'adhésion bactérienne et d'autres un rôle sexuel. (Prescott, 1993).

II. 2. Le métabolisme et les caractéristiques de croissance

II.2.1. La croissance bactérienne

La bactérie se multiplie par fission binaire : la bactérie grandit puis se divise en deux cellules filles séparées par un septum de division formé par la paroi cellulaire. Durant la division, l'ADN se duplique ainsi que les autres constituants. Divers systèmes enzymatiques de synthèse et de dégradation participent à la division cellulaire.

La croissance bactérienne est l'accroissement ordonné de tous les composants de la bactérie. Elle aboutit à l'augmentation du nombre de bactéries. Le nombre de bactéries double donc à chaque génération : le mode de croissance d'une cellule bactérienne est exponentiel. Le temps de génération q est le temps que dure un cycle de croissance. Le taux de croissance μ est le nombre de génération par unité de temps ($\mu=1/q$). Au cours de la croissance, il se produit, d'une part, un appauvrissement du milieu de culture en nutriments et, d'autre part, un enrichissement en sous-produits du métabolisme, éventuellement toxiques. La croissance d'une bactérie s'étudie en milieu liquide. Il existe 6 phases dont l'ensemble constitue la courbe de croissance.

Phase de latence : le taux de croissance nul ($\mu = 0$). La durée de cette phase dépend de l'âge des bactéries et de la composition du milieu. C'est le temps nécessaire à la bactérie pour synthétiser les enzymes adaptées au nouveau substrat (pas de phase de latence si repiquage sur milieu identique au précédent).

Phase d'accélération : il se produit une augmentation de la vitesse de croissance.

Croissance exponentielle : le taux de croissance atteint un maximum ($\mu=\max$). Cette phase dure tant que la vitesse de croissance est constante. Le temps de doublement des bactéries est le plus court. La masse cellulaire est représentée par des cellules viables (mortalité nulle).

Phase de ralentissement : la vitesse de croissance régresse. Il y a un épuisement du milieu de culture et une accumulation des déchets. Il existe un début d'autolyse des bactéries.

Phase maximale stationnaire : le taux de croissance devient nul ($\mu = 0$). Les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent.

Phase de déclin : le taux de croissance est négatif ($\mu < 0$). Toutes les ressources nutritives sont épuisées. Il y a accumulation de métabolites toxiques. Il se produit une diminution d'organismes viables et une lyse cellulaire sous l'action des enzymes protéolytiques endogènes. Cependant, il persiste une croissance par libération de substances libérées lors de la lyse (croissance cryptique). (Prescott, 1993)

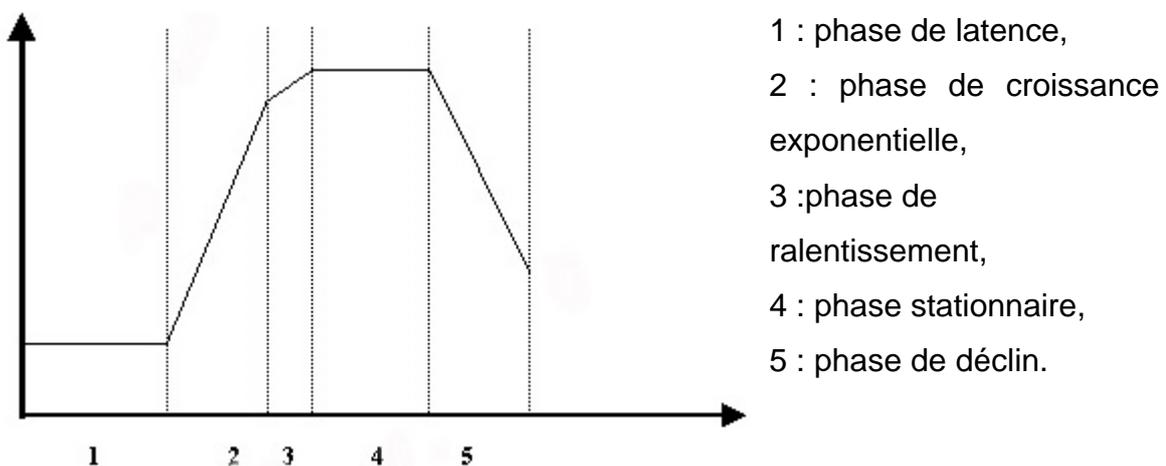


Figure 4 : Exemple d'une courbe de croissance (Neidhardt et al, 1990)

Les bactéries se reproduisent continuellement sous forme de cellules végétatives, tant que l'environnement leur est propice, imitant en cela beaucoup d'autres formes de vie unicellulaire. Donc lorsqu'elles ne sont pas entrain de se diviser, elles sont sur le point de le faire sauf pour certaines espèces qui peuvent former des spores si le milieu change. Le signe distinctif de la croissance bactérienne est la vitesse avec laquelle elle peut se produire. Une culture bactérienne, placée dans un milieu approprié du point de vue physique et nutritionnel, croît avec un taux caractéristique. On peut dire que la croissance n'est pas limitée tant que la concentration des nutriments ne devient pas limitante et que celle des composés toxiques n'atteint pas un niveau efficace. La croissance deviendra limitée du fait de changements dans le milieu provoqués soit par la croissance des bactéries elles-mêmes, soit par une altération d'origine externe des conditions chimiques ou physiques. Parmi les

perturbations les plus communes, on citera l'épuisement d'un ou plusieurs nutriments, la réduction de la disponibilité de l'oxygène, et l'accumulation d'acides ou d'autres produits du métabolisme.

Pendant la phase stationnaire, les cellules ne présentent pas une composition constante et par conséquent elles diffèrent du point de vue de leurs composants chimiques. (Neidhardt et al, 1990, Prescott, 1993)

II.2.2. Effet de la température et de la pression

N'étant pas rassemblées en tissus, comme le sont les cellules des plantes et des animaux, les bactéries doivent affronter leur environnement individuellement et de façon concertée car les agressions de l'environnement ont pour les cellules bactériennes un impact immédiat. Ainsi les bactéries ont développé des mécanismes qui les aident à s'accommoder d'un milieu changeant et parfois hostile démontrant ainsi une grande capacité d'adaptation à des conditions environnementales extrêmes. L'adaptation à la température, la pression et au pH est un des moyens utilisés par la bactérie pour affronter le milieu environnant. Ainsi, nous constatons l'existence de bactéries thermophiles (*Thermus aquaticus*) pouvant résister à des températures de plus de 100°C ou de bactéries psychrophiles (*Vibrio marinus*) résistant à des températures en dessous de 0. Par ailleurs, certaines bactéries vivant au fond des océans dites barophiles sont capables de résister à des pressions de plus de 300 bar (Neidhardt et al, 1990).

Dans un écosystème, la flore bactérienne autochtone est adaptée à son environnement. La température est l'un des paramètres les plus importants de cette adaptation, qui détermine ainsi dans quelles conditions une souche bactérienne peut être cultivée au laboratoire. Une classification des micro-organismes en fonction de leur sensibilité à la température a été adoptée. Ceux se développant à basse température sont dits **psychrophiles** ceux poussant à température ordinaire sont appelés **mésophiles** et ceux qui se développent à plus de 50°C sont appelés **thermophiles**. (Magot, 1998).

II.2.3. Influence de la concentration saline

Les espèces marines sont adaptées à la haute salinité des océans, mais on constate que ces germes ne supportent pas de variations trop importantes du taux de chlorure de sodium auquel elles sont accoutumées. Les bactéries marines sont donc halophiles, mais non halorésistantes (Brisou, 1995).

Comme dans le cas de la température, les micro-organismes ont été classés en fonction de la salinité de leur milieu. Il existe des bactéries pour lesquelles le sel n'est pas indispensable à la croissance mais qui peuvent se développer dans des milieux modérément salés : elles sont dites **halotolérantes** par opposition aux bactéries **halophiles** pour lesquelles la présence du sel est indispensable. (Magot, 1998).

II.2.4. Ecologie physiologique (Neidhardt et al, 1990)

Dans la plupart des milieux naturels, les bactéries ne vivent pas de façon isolée mais partagent un site avec d'autres membres du monde microbien, tels que des champignons, des protozoaires ou d'autres bactéries. Dans les situations naturelles, les bactéries doivent faire face à trois classes principales de problèmes :

- L'épuisement des nutriments dans le milieu
- La compétition pour les sites de surface
- L'exposition à des composés nocifs

La création d'un biofilm est un des moyens pour elles de résister aux pressions de l'environnement. En effet, en créant des microzones favorisant les échanges, il permet un apport plus important en nutriments, favorisant l'activité métabolique et les échanges génétiques. Le biofilm est donc une protection contre les agressions faisant parti d'une stratégie de survie dans les milieux peu propices à la vie bactérienne.

II. 3. Adhérence bactérienne

Le passage de la fixation réversible à la fixation irréversible nécessite un « travail » métabolique. Il existe donc un ou des stimuli qui incitent les cellules à se fixer ou non de façon permanente après contact avec la surface. Les mécanismes de transmission de ce signal ne sont pas élucidés. L'adhésion bactérienne aux surfaces

est due à trois facteurs, le premier est lié à la bactérie même, notamment à la surface bactérienne, le deuxième dépend beaucoup de la nature du matériau et le troisième dépend du milieu, de l'environnement et des composés présents dans cet environnement.

Mittelman *et al* (1990) ont observé que le rapport hydrate de carbone/protéines de la biomasse de *Pseudomonas atlantica* fixée augmentait avec les forces de cisaillement quand celles-ci sont faibles. Il est possible que cette modification soit due à la production accrue d'EPS, visant à stabiliser l'adhésion bactérienne. Ils observent également une diminution de la synthèse lipidique et l'attribuent à un stress dû aux forces de cisaillement. Certains auteurs ont observé que la capacité d'attachement irréversible était plus importante en milieu naturel que pour les souches cultivées en laboratoire. Ils ont estimé que cela était dû à une diminution de la production d'EPS, du fait de l'apparition de facteurs sélectifs présents dans le milieu naturel, comme les composés toxiques (Costerton *et al.*, 1985).

Les bactéries présentent à leur surface notamment sur leurs parois des structures comme les adhésines ou les pili permettant ainsi leur attachement. Selon Yu *et al.* (1991) les bactéries marines ont la capacité d'adhérer sur les particules contenant de la chitine. La chitine étant un homopolysaccharide composé de résidu β 1,4-Nacetyl-D-glucosaminopyranosyl. Par exemple, il a été démontré que *Vibrio furnissii* adhère sur trois types de sucres : N-acetylglucosamine, D-mannose, D-glucose. Une seule lectine Ca^{++} -dépendant est responsable de cette adhésion sur les trois sucres différents. Dans l'environnement, l'adhésion et le détachement dépendent complètement du taux de nutriments dans le milieu. Dans le cas d'un milieu pauvre les cellules se détachent et migrent vers des milieux plus favorables.

Baty (2000) a montré que pour certaines souches de bactéries marines comme *Pseudoalteromonas sp.*, l'adhérence sur de la chitine active la sur-expression du gène *chiA/chiB*. Ce gène induit l'expression d'une enzyme qui permet la dégradation de la chitine appelée chitinase lorsque les bactéries adhèrent sur des surfaces en chitine.

Une étude d'adhésion de *Shewanella putrefaciens* sur une surface d'acier inoxydable a montré que la présence d'une autre bactérie *Pseudomonas fluorescens* réduit le nombre de *S. putrefaciens* dans le biofilm. Le nombre de bactéries sur la surface a

été quantifiée en évaluant l'influence des facteurs environnementaux sur l'adhésion et la formation du biofilm. (Bagge *et al*, 2001).

L'étude d'adhésion sur des lamelles de verre avec une série de bactéries *Desulfomonile tiedjei*, *Syntrophomonas wolfei*, *Syntrophobacter wolinii*, et *Desulfovibrio* sp a permis d'étudier l'importance de la phase exponentielle de prolifération dans le processus d'adhésion ainsi que l'influence des propriétés électrostatiques et hydrophobes sur des substrats. Les résultats de cette étude indiquent que *S. wolfei* adhère dans des nombres considérablement plus élevés aux surfaces de verre que les trois autres espèces, de plus la carence de nutriment diminue considérablement l'adhérence de la souche *S. wolfe* et *Desulfovibrio G11*, et semble avoir moins d'effet sur l'adhérence des autres bactéries. La présence de fer sur le substrat augmente de manière significative l'adhérence de *S. wolfei* tandis que la présence des groupes hydrophobes de silice diminue l'adhérence de toutes les espèces. Il a été montré que la surface de chacune des quatre espèces est chargée négativement. Ces résultats permettent de mieux comprendre l'attachement dynamique des bactéries anaérobies dans les environnements anoxiques. (Van Schie *et al* 1999).

Un nombre important de facteurs physico-chimiques dans la définition de la surface au niveau moléculaire sont évalués pour leur effet sur l'adhésion de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. Des expériences portant sur des groupes variant en hydrophobicité greffés sur du verre ou sur la longueur de la chaîne ou encore sur la fonction chimique ont été réalisées avec ces bactéries. Des surfaces hydrophiles non chargées montrent une meilleure résistance à l'adsorption des protéines et à l'attachement des cellules. De plus, une corrélation claire est établie entre la chimie du substrat et les protéines d'adsorption. (Cunliffe *et al* 1999).

Ainsi, les différents exemples cités montrent que l'adhésion des bactéries marines suit un schéma classique. Tout comme les bactéries commensales, l'adhésion des bactéries marines dépend d'une part du type et de la nature du matériau et d'autre part de la présence ainsi que de la qualité des médiateurs présents. Cependant, même si il a été montré que l'adhésion bactérienne irréversible n'était possible que via des ligands, les types de médiateurs mis en jeu, n'a pas encore à ce jour été mis en évidence.

III. Conséquences des bioalissures

La plupart des activités marines sont confrontées aux effets des bioalissures : écran hydrodynamique, diminution des échanges thermiques, perte de propriétés optiques, accélération de la corrosion ou biodégradation. Les salissures biologiques sont donc à l'origine d'importants dommages ou entraves aux activités maritimes, en raison de la perte de vitesse des navires et de la surconsommation de carburant due à l'augmentation des forces de frottement, du développement des problèmes de corrosion et de la diminution de la sensibilité et des performances des capteurs optiques et acoustiques en immersion prolongée. Elles sont aussi la cause de l'augmentation du poids des bouées et des équipements flottants et crée un écran dans les échangeurs diminuant ainsi leur efficacité.

III.1. la corrosion bactérienne

A l'action naturellement corrosive de l'eau et aussi souvent à l'action oxydante liée à la présence de sels, s'ajoute l'action mécanique et biochimique (biocorrosion) des organismes sédentaires, qui se fixent et se développent sur les surfaces exposées. L'eau et les solutions aqueuses constituent de fait des milieux corrosifs. A la température ambiante, les solutions aqueuses sont également des milieux propices, voire nécessaires, au développement des organismes vivants. Il n'est donc pas surprenant qu'il y ait des interactions entre ces organismes et les matériaux, et de façon plus précise avec les bactéries. C'est pourquoi, au terme général de «corrosion en milieu vivant», on substitue le plus souvent celui de «corrosion bactérienne» quand la corrosion est due à l'action des bactéries et le terme de corrosion microbienne quand elle est due à l'action des micro-organismes. La corrosion bactérienne n'est pas due aux organismes même mais plutôt aux modifications locales de l'environnement causées par la présence des bactéries.

Beech et Flemming (2000) expliquent que le "MIC" (Microbially Influenced Corrosion) se réfère à la possibilité des micro-organismes de s'impliquer dans la détérioration des matériaux métalliques ou non. Ainsi les cinétiques de corrosion sont déterminées

par l'environnement physico-chimique à l'interface, par la concentration de l'oxygène, les sels, la valeur du pH, le potentiel rédox et la conductivité, tous ces paramètres pouvant être influencés par les micro-organismes se développant à l'interface.

D'autres organismes sédentaires peuvent ensuite s'attacher aux surfaces par les substances polymériques extracellulaires (EPS) pour former des assemblages, l'ensemble formant des biosalissures hétérogènes.

La corrosion bactérienne concerne de nombreux secteurs industriels, comme l'industrie pétrolière (extraction, transport, plates-formes en mer...), la distribution et le traitement des eaux, la géothermie, certains secteurs de l'industrie nucléaire et évidemment les activités navales.

Selon Féron et Thierry (1998), cette corrosion est le résultat de l'action de trois facteurs : les matériaux, les milieux et les bactéries, et est de nature électrochimique selon le schéma général suivant :



Selon Guézennec (1993), la corrosion induite par les micro-organismes peut être définie comme la conséquence de la présence physique et de l'activité d'une grande variété de micro-organismes sur les surfaces, selon des mécanismes faisant appel soit à une action directe (production de métabolites agressifs), soit à une action indirecte (intervention au niveau de réactions d'oxydo-réduction).

En se plaçant au niveau électrochimique, la présence d'un biofilm sur les surfaces métalliques modifie les potentiels.

Plusieurs types de bactéries sont impliqués dans la biocorrosion :

- Les bactéries sulfato-réductrices (des conditions anaérobies peuvent se développer sous la salissure) dont la respiration aboutit à la formation de sulfure par réduction de l'ion sulfate.
- Les bactéries thio-oxydantes, qui produisent de l'acide sulfurique en oxydant l'ion sulfure.

- Les bactéries ferro-oxydantes qui oxydent les ions ferreux ou manganeux pour former des chlorures ferriques ou manganiques dont l'hydrolyse conduit à la formation d'acide chlorhydrique.
- Les bactéries nitrifiantes ou dénitrifiantes ont aussi été mises en cause dans la biocorrosion.

Sur la figure 2, Geesey *et al* (1997) illustrent comment les bactéries transforment le fer Fe^{2+} de la surface en Fe^{3+} . Cette transformation occasionne la production de SO_4^{2-} , créant ainsi des points de corrosion.

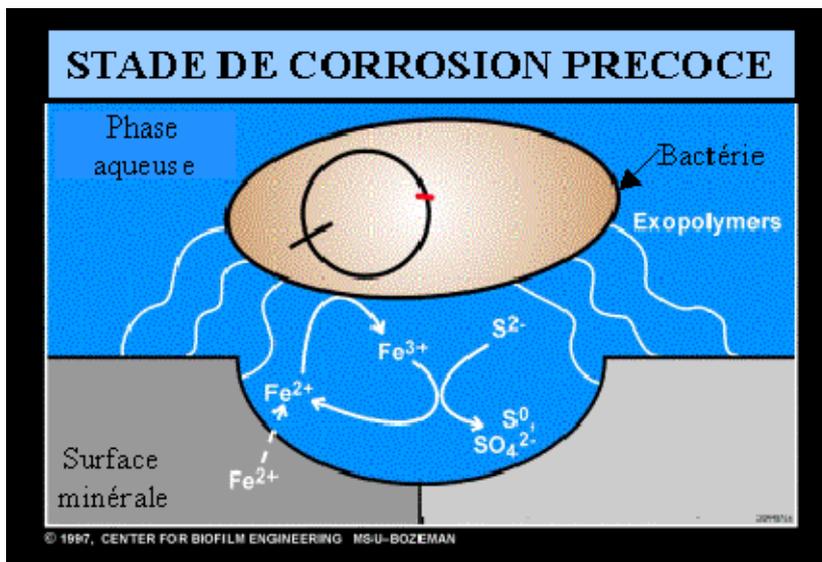


Figure 5: Stade de corrosion précoce, (Geesey *et. al.* 1997).

Des études ont également montré l'importance de la présence des EPS dans le processus de corrosion. Ainsi, les EPS produits par certaines bactéries ont une affinité particulière pour les ions cuivreux ($\text{Cu}_{(II)}$), et ce que le cuivre soit en solution ou forme un film sur une surface. Ainsi les auteurs émettent l'hypothèse que dans un biofilm sur une surface métallique, ce type d'EPS crée des cellules de concentration de cuivre qui se comportent de façon anodique par rapport aux zones adjacentes dépourvue du polymère (Geesey *et al.*, 1986).

III.2. La biodétérioration des matériaux

La biodétérioration peut-être définie comme l'ensemble des modifications des propriétés physico-chimiques, mécaniques,... d'un matériau ou matériel par action d'organismes vivants. L'adhésion des micro-organismes sur les polymères peut-être favorisée par différents paramètres comme l'existence de force de type Van der Waals ou les interactions électrostatiques qui exercent une attraction des micro-organismes vers le matériau. Les bactéries chargées négativement seront attirées par les matériaux portants des charges positives et repoussées lorsque les polymères sont chargés négativement. L'attraction due aux forces de Van der Waals est assez constante alors que les interactions électrostatiques de répulsion ou d'attraction sont aléatoires, réversibles car sujettes aux modifications environnementales (pH, force ionique en milieu liquide...). Ces deux mécanismes sont, dans la plupart des cas, insuffisants pour permettre une adhésion définitive des microorganismes sur le matériau. Lors d'essais *in vitro* avec des moisissures, il est souvent constaté que l'hydrophobicité des polymères gêne la fixation des moisissures lors de l'ensemencement. La fixation *in vitro* peut être artificiellement favorisée par l'ajout d'un surfactant. *In vivo*, les microorganismes capables de synthétiser des exo-polymères (polysaccharides) voient leur adhésion sur le polymère facilitée. Le polysaccharide joue le rôle de « colle » ou « d'adhésine » qui permet la fixation des microorganismes. La fixation par ce mode d'action est pratiquement irréversible et peut entraîner une biodégradation ultérieure. (Hilaire, 1998).

III. 3. La résistance de frottement

Selon Characklis (1983), le développement secondaire des bioalissures, surtout dans les milieux tropicaux (accrochage de mollusques, coraux), ajoute une surcharge pondérale considérable, en particulier sur les bouées et équipements flottants. Il ajoute également que la formation de ces bioalissures sur les coques des navires

entraîne une perte significative de vitesse augmentant ainsi les coûts du transport maritime.

III.4. La résistance au transfert de chaleur

La formation du voile biologique constitue un véritable problème par rapport aux échangeurs thermiques. Ainsi selon Characklis (1981), ce biofilm peut avoir une conséquence vraiment néfaste pour les échangeurs thermiques et les canalisations. Compère (1999) montre en outre qu'après 30 jours avec une circulation d'eau de mer de 1,5 m/s, un biofilm de 100 µm d'épaisseur se forme ce qui entraîne une diminution de 50% du transfert de chaleur à travers un tube de titane.

III.4. Conséquences des bio-salissures sur les capteurs optiques

La formation du biofilm sur les parties sensibles des capteurs immergés en longue durée peut causer de nombreux problèmes comme la déviation des réponses lors des collectes de données en continu en milieu marin. Par exemple, la formation de voiles biologiques sur les parties optiques des caméras génère une opacité progressive. IFREMER a tenté de pallier à certains de ces problèmes, en mettant en place divers dispositifs, par exemple un chlorateur installé à l'entrée d'une cellule de mesure comprenant plusieurs capteurs des paramètres physico-chimiques de l'eau de mer, ce dispositif permet la production de chlore (biocide) par électrolyse de l'eau de mer et diminue partiellement le biofilm. (Compère, 1999).

IV. Préventions et moyens de lutte

De nombreux chercheurs et industriels se sont penchés sur le problème de la formation du biofilm afin de comprendre les mécanismes et trouver des solutions. Actuellement, l'utilisation de peintures et revêtements antisalissures permet de réduire l'entretien de nombreuses surfaces immergées, mobiles ou statiques.

IV. 1. Les peintures anti-salissures

Afin de protéger la coque des navires, la carène reçoit un revêtement de finition dont le rôle est d'éviter la fixation d'organismes divers : algues, mollusques...

Les produits utilisés pour ce traitement, communément dénommés « peintures antisalissures » ou « anti-fouling », contiennent des substances toxiques qui se dissolvent peu à peu dans l'eau en constituant au voisinage de la carène une barrière défavorable à la survie des organismes.

Les différentes formulations de peintures anti-salissures disponibles sur le marché sont toutes constituées par une ou plusieurs matières actives toxiques incorporées dans un liant, auxquelles est additionné un solvant organique volatil qui facilite l'application et divers adjuvants qui assurent la cohésion et la pigmentation du film protecteur.

Les matières actives utilisées sont le plus souvent :

- Les oxydes métalliques comme l'oxyde cuivreux (Cu_2O) dont la proportion utilisée dans les peintures peut être de 40 à 90%. Cependant, cet oxyde présente l'inconvénient d'être une cause de corrosion s'il est appliqué sur des coques métalliques, s'il s'agit de coques d'aluminium.
- Les composés organo-métalliques à base de plomb ou d'étain comme le tributylétain. Cependant la réglementation internationale actuelle interdit l'application de ces composés sur des bateaux inférieurs à 25 m en raison de leur toxicité sur les mammifères et les mollusques bien qu'ils soient plus efficaces que les oxydes de cuivres.

Les biocides organiques sont des molécules comprenant des fonctions phénol ou thio associés aux oxydes. Cependant beaucoup de ces produits sont actuellement prohibés en raison de leur effet néfaste sur l'environnement. (Alzieu, 1982).

L'action biocide de ces traitements, certes efficace, s'exerce de manière non sélective sur les larves de nombreuses espèces de poissons et invertébrés, et peut induire à terme, la stérilité ou générer des malformations chez les consommateurs vertébrés en fin de chaîne alimentaire (poissons, oiseaux, mammifères). Dans la rade de Brest, il a été mis en évidence l'existence d'une zone fortement polluée par

les ions cuivres. Dans ce secteur, devenu complètement abiotique, les teneurs sont supérieures à la normale de 20 à 50 fois dans le sédiment et de 2 à 10 fois dans l'eau. (Alzieu, 1982)

Ces solutions classiques présentent peu de potentiel évolutif, et appellent à des innovations technologiques importantes, plus efficaces, non toxiques, peu coûteuses. De plus, 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)(2003), il apparaît essentiel de mettre au point de nouveaux procédés écologiques et efficaces limitant la formation des biofilms.

IV. 2. Les nouvelles recherches

De nombreuses recherches ont visé à diminuer, voir à éliminer la formation de ces biofilms. Ainsi, une équipe de chercheurs travaillant sur des substances issues de macroalgues marines a montré que ces substances avaient une action bactéricide. Sur cette base, les chercheurs ont proposé d'utiliser ces substances comme « antifouling » non toxique afin de réduire les biofilms marins. (Hellio *et al* 2001).

D'autres ont étudié la formation de biofilm sur des polymères artificiels. Ainsi, six polymères synthétisés pouvant être potentiellement utilisés dans les instruments sous-marin ont été exposés à une solution de bactéries marines en suspension dans de l'eau distillée ou dans une solution de surfactant. Cette solution a permis de réduire le fouling de 4 des 6 polymères. La présence du surfactant diminue l'énergie de surface des polymères et réduit l'importance des caractéristiques physiques comme la rugosité de surface sans changer les propriétés chimiques de surface. (Kerr *et al* 2001).

Ainsi la compréhension fine des mécanismes de fixation du film primaire sur les différents matériaux, alliages, résines et élastomères est indispensable à la mise au point de procédés antisalissures.

Le service Matériaux et Structures (TMSI-RED-MS, IFREMER, Brest) a entrepris depuis quelques années, l'étude des mécanismes fondamentaux de l'adhérence bactérienne en eau de mer, en particulier les stades primaires de la formation des « biofilms » (voiles bactériens) adhérant sur des surfaces diverses (verre, Téflon, acier

inoxydable), lisses et rugueuses (Rubio, 2002). La diversification des approches de caractérisation des biofilms y est rendue possible grâce à la collaboration de laboratoires universitaires spécialisés dans des techniques analytiques pertinentes (le groupe pluridisciplinaire européen BASIS, devenu GDR2614).

Parallèlement à cette démarche fondamentale, BASIS, a entrepris l'exploration de voies nouvelles de prévention des bio-salissures marines. L'objectif est de remplacer, à moyen terme, les peintures et vernis à base de métaux «lourds» actuellement utilisés pour empêcher les bio-salissures, bientôt frappés d'interdiction due à leur écotoxicité. Dans cette optique, plusieurs voies d'intervention sont privilégiées : i) la recherche de nouvelles enzymes lytiques et les applications pratiques pouvant en découler, ii) la recherche de surfaces à propriétés modulatrices de l'adhérence bactérienne par des copolymères statistiques à activité biologique spécifique.

CHAPITRE II : LES BIOMATERIAUX

I. Définitions

Depuis plusieurs années, des matériaux ont été conçus spécifiquement pour être utilisés comme biomatériaux. Un biomatériau est un matériau destiné à entrer en contact avec des systèmes biologiques pour évaluer, traiter ou remplacer. Définie à la conférence de la société européenne de Biomatériaux de Chester en 1991 cette définition concerne aussi bien les matériaux synthétiques que les matériaux d'origine naturelle. (Williams *et al*, 1992)

Tous ces matériaux sont conçus pour être mis en contact pendant un temps plus ou moins long avec un constituant biologique. Pendant ce contact, l'interface entre le matériau et le milieu vivant est le siège de nombreuses réactions liées à la réponse de l'hôte à la présence du matériau. Il apparaît nécessaire que ces réactions n'entraînent pas d'effets indésirables ou inappropriés mettant en cause l'utilité du matériau. Ainsi, apparaît la notion de biocompatibilité du matériau qui est définie comme la capacité d'un matériau à remplir ses fonctions, dans le cadre d'une application spécifique, en entraînant une réponse appropriée de la part du système biologique hôte. Ils ne doivent pas induire de toxicité ni par eux même, ni par leurs produits de relargage. (Jozefonvicz et Jozefowicz 1990)

Parmi les matériaux disponibles, les polymères sont largement utilisés pour la fabrication des biomatériaux. Ils peuvent être produits sous forme de poudre, de films, de tubes, de membranes ; ils peuvent être rigides ou déformables, hydrophiles ou hydrophobes, etc... Ainsi, des études réalisées au laboratoire de recherches sur les macromolécules (LRM) ont permis l'émergence d'une nouvelle classe de biomatériaux : les polymères biospécifiques.

II. les polymères biospécifiques

Les polymères biospécifiques élaborés selon un principe émis par Jozefonvicz et Jozefowicz (Principe J et J), sont obtenus par copolymérisation de monomères porteurs de groupements chimiques définis ou par fonctionnalisation statistique de

polymères insolubles ou solubles. Ceci aboutit à la création de sites particuliers sur le polymère, capables d'interagir spécifiquement avec des constituants du système vivant, leur permettant ainsi de développer une activité biologique spécifique. La probabilité d'apparition de tels sites dépend du taux de substitution du polymère par les groupements fonctionnels. (Jozefonvicz et Jozefowicz 1990)

II.1. Les bases du principe J et J

La plupart des molécules biologiques ont une structure organisée qui leur permet pour une reconnaissance moléculaire spécifique, leur conférant ainsi une activité biologique précise.

En 1894, E. Fisher postule que la reconnaissance moléculaire dans les systèmes récepteurs-messager est fondée sur le concept clé-serrure. Cette représentation devient la base sur laquelle reposent tous les modèles de sélectivité impliqués dans la communication inter-moléculaire en biochimie. En effet, elle traduit la complémentarité et la stéréospécificité des groupements chimiques, indispensables à une bonne transmission de l'information entre les molécules. Les interactions développées peuvent être de différents types : interactions ioniques, de Van der Waals-London, liaisons hydrogène et complexes π - π .

Le système clé-serrure possède plusieurs propriétés :

- Les interactions sont hautement spécifiques.
- Les clés et les serrures sont stéréospécifiques c'est-à-dire que les groupements chimiques complémentaires sont positionnés dans une conformation telle que le meilleur emboîtement est favorisé.
- Le nombre d'interactions possibles entre la clé et la serrure est relativement limité. Il est de l'ordre de trois à dix, si on se réfère aux substrats enzymatiques de faible masse moléculaire et de haute spécificité comme les sérines protéases impliquées dans la coagulation.
- Les clés et les serrures sont considérées comme « molles », en effet leur nature soit protéique, lipidique ou polysaccharidique leur confère une certaine flexibilité, permettant ainsi une meilleure adaptabilité.

Chaque constituant du système vivant étant entouré de nombreuses molécules qui sont autant de clés potentielles. La clé « choisit » sa serrure et inversement par compétition, obéissant ainsi à des lois thermodynamiques et cinétiques afin d'atteindre un état d'énergie libre minimum. (Jozefonvicz et Jozefowicz 1997)

Les copolymères ou polymères statistiques obtenu par copolymérisation de monomères porteurs de groupements chimiques définis ou par fonctionnalisation statistique aboutissent à la formation de séquences considérées comme des sites spécifiques capables d'interagir avec des composants du vivant. En effet, de nombreuses clés différentes sont formées le long de la chaîne macromoléculaire. Quand les copolymères statistiques sont placés dans un environnement physiologique donné, il se produit une compétition entre les « clés » pour la meilleure cible, donnant ainsi une combinaison « clé-serrure » la plus stable. Le nombre moyen de sites par chaîne ou par unité de surface dépend de la composition totale en fonctions chimiques du polymère. La probabilité d'apparition de tels sites dépendent du taux de substitution du polymère par les groupements fonctionnels. Ainsi, pour une composition comprise entre zéro et une substitution maximale en groupement chimique, le nombre de « sites » sélectionnés peut être maximum. Par conséquent, l'interaction sera maximale pour une composition globale du copolymère statistique pour lequel la probabilité d'apparition des sites sera maximale.

L'apparition de ces sites a été mise en évidence dans le cas des polymères « DNA-like ». Cet exemple que nous avons développé est intéressant car les sites biospécifiques présents à la surface de ces polymères ont été identifiés par des études de simulation numérique de type Monte Carlo. (Jozefonvicz et Jozefowicz 1997)

II.2. Mise en évidence des sites biospécifiques à travers un exemple : Les dérivés phosphorylés du polystyrène à activité « DNA-like » (Jozefonvicz et Jozefowicz 1997)

Le Lupus Erythémateux Disséminé ou LED est une maladie auto-immune caractérisée par la présence d'anticorps anti-ADN et/ou anticoagulants et/ou

anticardiolipine dans le sérum des malades. Les anti-coagulants circulants et plus généralement les anticorps anti-phospholipides conduisant à des manifestations hémorragiques ou thrombotiques jouent un rôle important dans cette maladie.

Il apparaît que l'ADN et les phospholipides, comme la cardiolipine, ont une structure chimique proche puisqu'ils contiennent des groupes phosphates espacés de façon régulière. Ces structures forment l'épitope d'anticorps anti-ADN et anticardiolipine. Au LRM, des dérivés phosphorylés du polystyrène ont été synthétisés en vue d'interagir spécifiquement, *via* le site de fixation à l'antigène, avec des anticorps développés par des patients atteints de LED. (Letourneur, 1992) Conformément au principe de synthèse développé par Jozefonvicz et Jozefowicz, il a été montré que ces interactions dépendent de la composition des copolymères phosphorylés. Ainsi, les anticorps anti-ADN présentent un maximum d'adsorption pour les polymères substitués à 30% en groupements phosphates. En revanche, les anticorps anti-phospholipides s'adsorbent préférentiellement sur les polymères substitués à 60% en groupements phosphates.

Dans le but de déterminer d'une part la structure chimique des sites biospécifiques sur ce type de polymères et d'autre part leur probabilité d'apparition, des études de simulation numérique de type Monte Carlo ont été réalisées. Afin de compléter cette étude, une nouvelle série de polymères a été synthétisée, ils sont composés de motifs de polystyrène non substitués (PS), de polystyrène sulfamide d'éthylamine (PSSEA) et de polystyrène sulfamide d'éthanolamide phosphorylé sous la forme mono- (PME) ou diester (PDE), à différents taux (Imbert 1994), Figure 7.

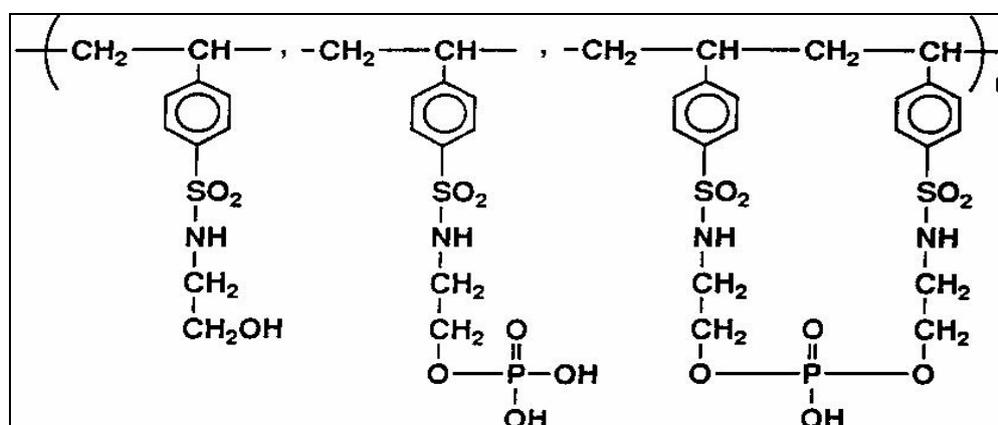


Figure 6: Composition des polymères phosphorylés (Jozefonvicz J. et al., 1997)

Les polymères substitués par un fort taux de groupements phosphates présentent un caractère « phospholipid-like » (Souirti, 1994). En effet, comme les phospholipides membranaires naturels, ces polymères sont capables de former des complexes binaires ou ternaires impliquant les facteurs de coagulation vitamine k-dépendants et les ions calcium. Les polymères substitués à un faible taux de phosphates présentent un caractère « DNA-like », se manifestant par une adsorption spécifique d'anticorps lupiques anti-ADN. La capacité de ces polymères à lier les anticorps anti-ADN par leur fragment f_{ab2} a été révélée par l'addition d'anticorps anti-Fc radiomarqué. Les résultats ont montré une adsorption maximale d'anticorps anti-ADN pour les copolymères dont le contenu en phosphates est de 20 à 24%, figure 8. (Jozefonvicz *et al.*, 1997)

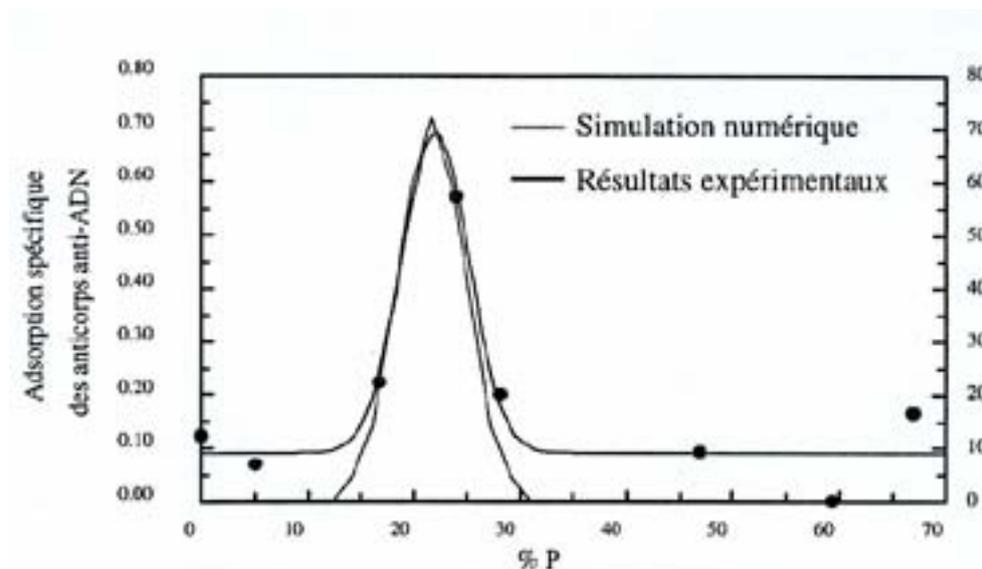


Figure 7 : Capacité d'adsorption des anticorps anti-ADN en fonction du taux de phosphorylation des dérivés polystyrène sulfamide d'éthanolamine (Jozefonvicz J. *et al.*, 1997)

Sur la base de ces résultats, les simulations numériques des sites « DNA-like » formés sur les polymères phosphorylés ont été entreprises. Elles ont permis la modélisation de la fonctionnalisation du polystyrène par des groupements phosphorylés de type phosphomono-ester et phosphodiester, qui obéit à une loi de Markov avec effet locaux. Des polymères virtuels représentatifs des polymères réels ont été obtenus.

Ces études, tant expérimentales que théoriques ont permis de tirer les conclusions suivantes : les anticorps anti-ADN provenant de sérum de patients lupiques sont capables de reconnaître les sites « DNA-like ». Les copolymères statistiques dérivés du polystyrène miment l'ADN en ce qui concerne leurs propriétés antigéniques vis à vis des anticorps lupiques anti-ADN.

La phosphorylation statistique de polystyrène hydroxylé résulte en la formation de séquences antigéniques « DNA-like ». Ces derniers sont constitués d'une combinaison de 7 groupements phosphodiester séparés par 2 unités monomères non substitués. Dans ces séquences apparaissent des sites antigéniques « DNA-like » constitués de 3 PDE contigus et séparés respectivement par des distances de 13.7, 20.1 et 33.8 Å. Ces distances sont voisines de celles entre des motifs PDE situés sur une génératrice du cylindre constitué par la double hélice d'ADN, séparés par les petits et grands sillons (figure 9).

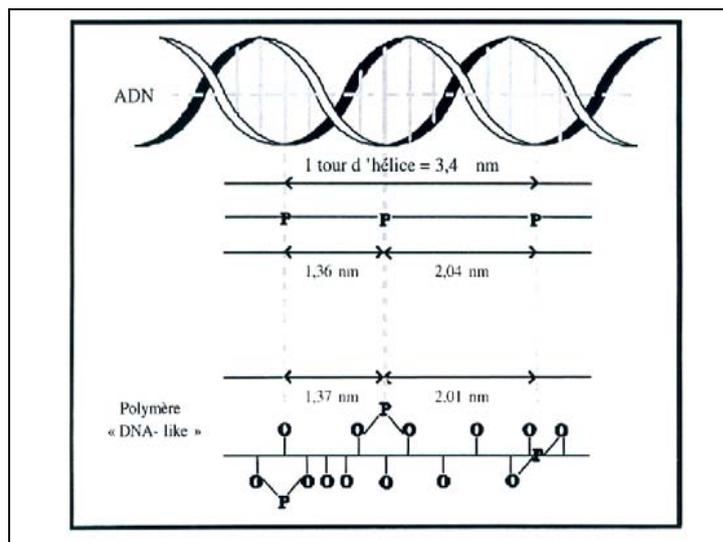


Figure 8: Identification du site d'interaction d'anticorps anti-ADN de patients atteints de la maladie du Lupus Erythémateux Disséminé sur des copolymères phosphorylés dérivés du polystyrène. Comparaison des distances entre les groupements phosphodiester (PDE) du site biospécifique identifié sur les copolymères et celle des PDE de la molécule d'ADN. (Jozefonvicz J. et al., 1997)

Les anticorps anti-ADN et anti-phospholipides qui ne diffèrent que par leurs sites de reconnaissance de l'antigène interagissent à la surface des polymères en fonction des topologies particulières de sites phosphorylés. Ces interactions de haute affinité se développent entre les déterminants idiotypiques de ces deux populations d'anticorps lupiques et des sites différemment distribués à la surface des polymères biofonctionnels.

La mise en œuvre d'immunoabsorbants spécifiques utilisant ces polymères pour le dosage biologique des anticorps lupiques voire même pour leur purification pourrait être envisagée.

III. Adsorption des protéines à la surface d'un matériau

L'adsorption de protéines est l'une des étapes initiales dans l'interaction entre un matériau et des composants biologiques. Afin de comprendre le comportement de l'interaction polymère/protéine, il est important d'étudier les mécanismes d'adsorptions des protéines ainsi que les interactions à l'interface de la solution de protéines et de la surface du polymère.

III.1 Mécanisme général de l'adsorption

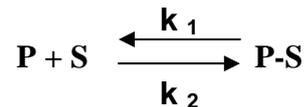
(Andrade, 1985)

Plusieurs types de techniques peuvent être utilisées pour étudier cette adsorption et ainsi déterminer différents paramètres comme les constantes caractéristiques de celle-ci. Ainsi, selon la théorie énoncée initialement par Langmuir (Langmuir, 1916) sur les phénomènes d'adsorption des gaz sur les surfaces solides, plusieurs conditions sont théoriquement nécessaires pour appliquer ce modèle :

- La substance adsorbée forme une monocouche
- Tous les sites d'adsorption à la surface sont identiques
- L'adsorption d'une molécule n'est pas influencée par les molécules déjà adsorbées (effet coopératif)

- L'adsorption doit être réversible et un équilibre doit se former entre les molécules adsorbées et les molécules en solution.

Dans le cas le plus simple, l'adsorption d'une protéine (P) à la surface d'un matériau (S) peut être symbolisée par l'équilibre suivant :



La formation du complexe P-S peut s'écrire sous la forme d'une constante d'équilibre :

$$K_a = \frac{[\text{PS}]}{[\text{P}] \cdot [\text{S}]}$$

Où K_a est la constante d'association ou constante d'affinité.

Les équations de conservation de la matière sont :

$$C_i = B + F$$

$$B_{\text{max}} = B + [\text{S}]$$

C_i : Concentration initiale en protéine

B : Concentration de protéine adsorbée [PS]

F : Concentration de protéine libre

B_{max} : Concentration totale des sites

Si τ est la fraction de surface recouverte par la protéine, avec

$$\tau = \frac{B}{B_{\text{max}}}$$

On obtient la relation suivante :

$$\frac{\tau}{1 - \tau} = K_a \cdot F$$

La représentation de Langmuir consiste à porter $\frac{\tau}{1 - \tau} = f(F)$; qui est en

en principe une droite passant par l'origine dont la pente représente la constante d'affinité. D'autres méthodes d'analyse graphique permettent de décrire l'adsorption de protéines à la surface des matériaux, telles que la représentation de Scatchard ou la représentation en double inverse, figure 10, (Andrade, 1985).

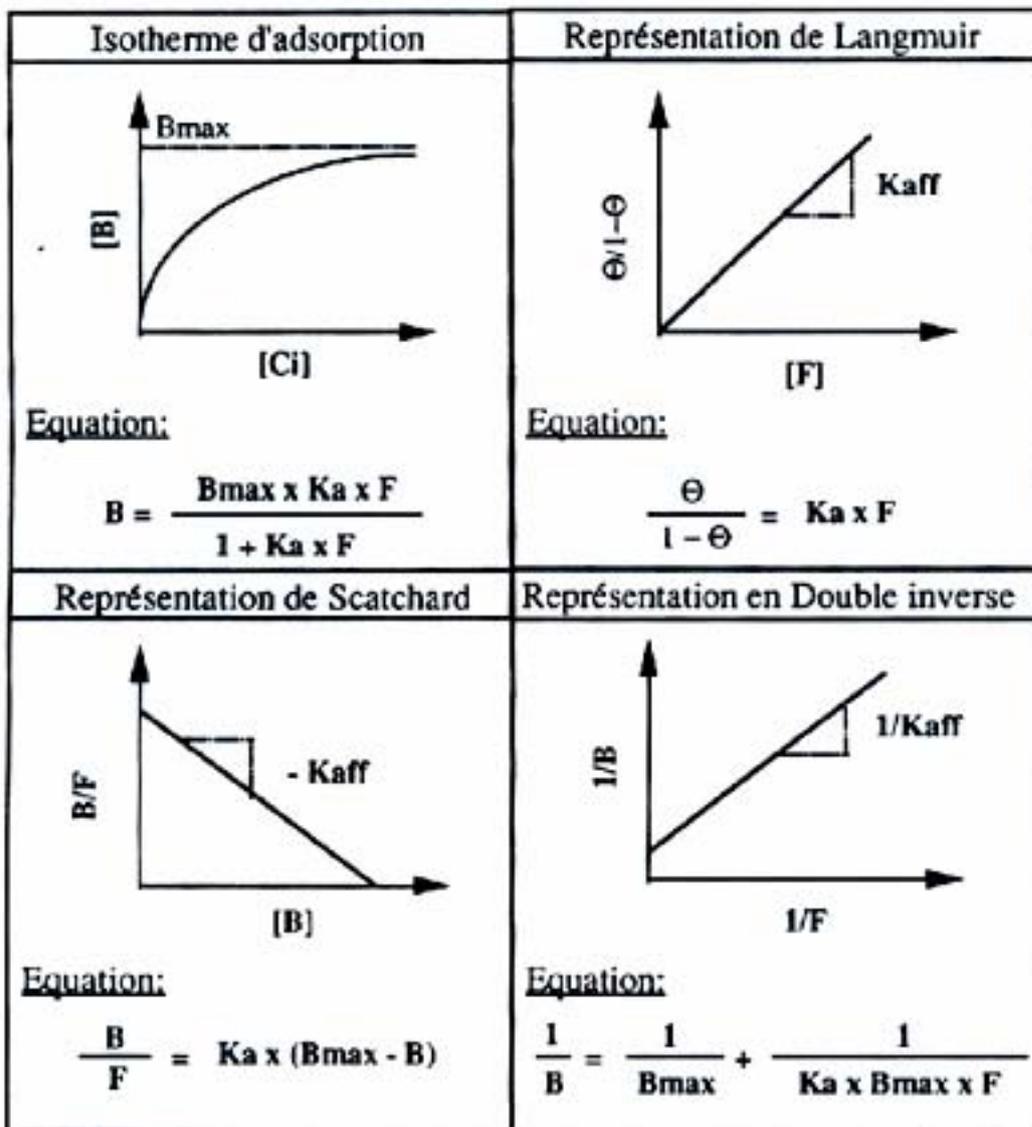


Figure 9 Représentations graphiques de l'adsorption selon le modèle de Langmuir. (Andrade, 1985).

III.2 La nature des interactions

La complexité du phénomène d'adsorption des protéines est largement reliée à l'hétérogénéité de la structure de la protéine et à celle des surfaces adsorbantes. Cette hétérogénéité peut engendrer des interactions de natures diverses qui sont liées à la présence à la surface du matériau et de la protéine, de domaines hydrophobes, polaires ou chargés, figure 11, (Andrade, 1985).

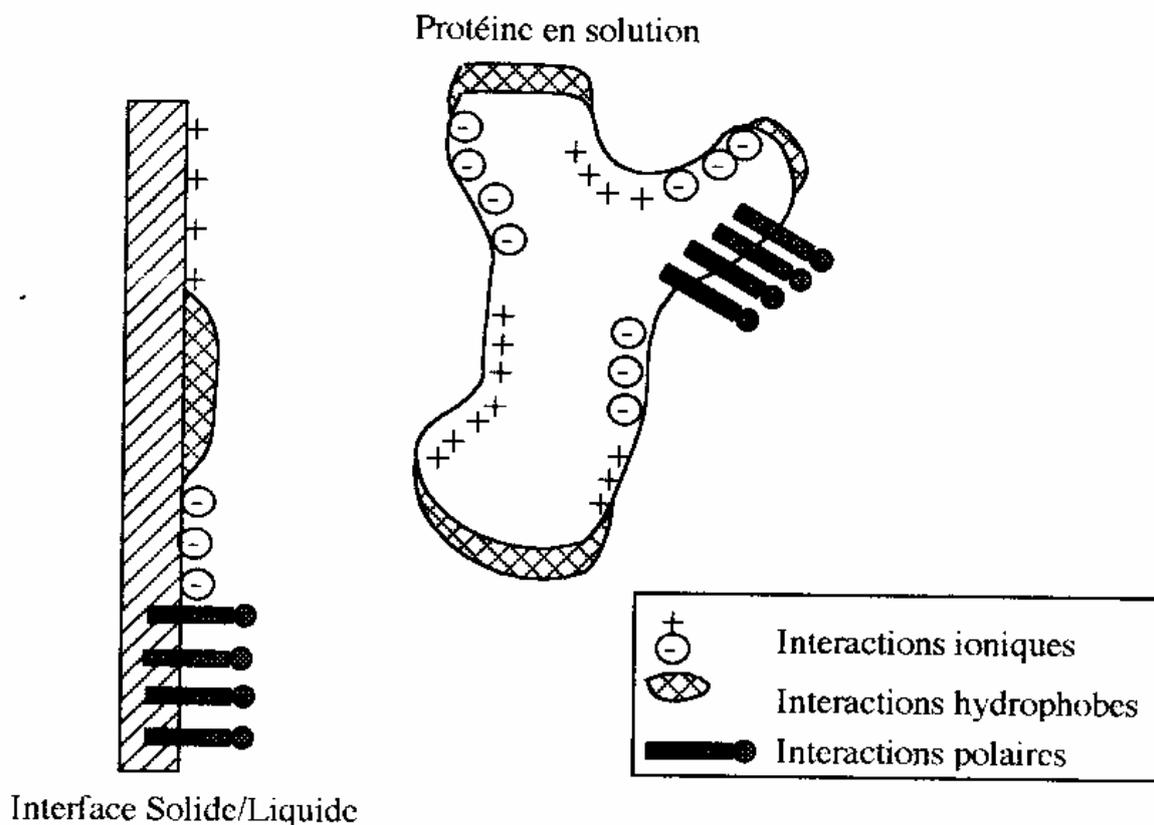


Figure 10 : Représentation schématique des interactions possibles entre une surface solide et une protéine

Les types d'interaction généralement développés entre les protéines et la surface sont : les interactions électrostatiques (appelées également ioniques), les interactions de Van der Waals, les liaisons hydrogènes, les interactions π - π et les interactions hydrophobes.

L'effet coopératif de toutes ces interactions détermine ainsi l'adsorption finale obtenue.

3.2.1. Les interactions électrostatiques

Chaque protéine développe une charge nette résultante de la somme des charges de chaque acide aminé qui la constitue, à laquelle il faut ajouter la charge des groupements amines et carboxyliques en position terminale de la chaîne. Les interactions ioniques se forment entre un résidu chargé de la protéine et les sites d'ancrage, de signe opposé, de la surface du matériau. Ces interactions ne permettent pas de diriger une protéine vers une surface, cependant une fois la protéine suffisamment proche de la surface, les forces électrostatiques peuvent induire l'établissement de liaisons entre la protéine et la surface. Un recouvrement des nuages de contre-ions de l'adsorbant et de la protéine se produit aboutissant à une interaction globale de type répulsif ou attractif.

L'importance de ces interactions dépend des conditions expérimentales dans lesquelles se font les processus conduisant à l'adsorption. Il est possible de modifier le troisième composant du système, le solvant, de façon à augmenter ou à défavoriser les interactions électrostatiques et en conséquence d'adsorber ou de désorber la protéine (Tableau 2).

Interaction	Description	Orientation?	Effet de l'augmentation	
			Température	force ionique
Ionique	interactions de coulomb dues aux charges opposées	non	↘	↘
Liaison H	interaction électrostatique due au caractère électropositif de l'atome H	oui liaison linéaire ≈ 3 Å	↘	↘
Transfert de charges	Surtout due aux interactions des noyaux π - π dans l'eau	oui analogue à la liaison H	↘	↗
Hydrophobe ou entropique	caractérisée par une déshydratation spontanée lors de l'interaction des résidus apolaires Effet entropique important et enthalpique faible	non	↗	↗

Tableau 2 : Les facteurs influençant la nature des interactions impliquées dans l'adsorption des protéines. (Andrade, 1985).

3.2.2. Les interactions de Van der Waals

Ces interactions sont les liaisons les plus faibles, elles ont pour origine la force d'attraction non spécifique des nuages électroniques de deux atomes ou molécules proches. Toutes les molécules peuvent former des liaisons de Van der Waals, aussi bien les molécules polaires que les non polaires. Comme il s'agit de liaisons faibles, elles sont efficaces dans les conditions physiologiques seulement si plusieurs atomes d'une molécule interagissent avec plusieurs atomes d'une autre molécule.

3.2.3. Les liaisons hydrogènes et interactions π - π

La liaison hydrogène ne peut s'établir qu'entre molécules possédant une charge nette ou une charge inégalement répartie. Cette liaison se forme entre un atome d'hydrogène donneur à charge positive et un atome accepteur électronégatif. Ce sont des interactions dipôle/dipôle produisant des énergies d'interactions comparables à de faibles liaisons covalentes. Elles interviennent notamment dans la stabilisation des hélices α et des feuilletts β de la structure secondaire des protéines. L'interaction par transfert de charge est aussi un processus important dans la stabilisation de la protéine et ses interactions avec une surface. Il s'agit d'un phénomène impliquant un groupe donneur et un groupe accepteur d'électrons. En solution aqueuse ce type d'interactions est essentiellement résultant d'effets entre les électrons π .

3.2.4. Les interactions hydrophobes

Les chaînes apolaires ou peu polaires sont difficilement solubles dans l'eau. Cette faible compatibilité entre l'eau et les molécules apolaires est désignée sous le nom d'effet hydrophobe. Cet effet n'est pas dû aux propriétés intrinsèques des chaînes apolaires mais aux propriétés de l'eau. Lorsque des chaînes non polaires sont introduites dans un milieu aqueux, les molécules d'eau repoussent les segments hydrophobes les uns vers les autres, puis se réorganisent par formation de liaisons hydrogène, autour de la poche hydrophobe qu'elles ont formée.

III.3. Les interactions spécifiques

La composition de la couche de protéines adsorbées est dépendante de la nature de la surface du matériau. L'adsorption des protéines à la surface de matériaux destinés à être mis en contact avec le milieu biologique a fait l'objet de nombreuses études. Notamment, comme cité plus haut, dans le cas des techniques de purification des protéines qui font appel aux méthodes chromatographiques, ce qui implique la confrontation de la protéine à une phase solide souvent de nature polymérique. Par ailleurs, la quantité de protéines adsorbées est dépendante du pH, de la force ionique et de la température. Ainsi, les protéines peuvent être désorbées de la surface par modification de ces paramètres ou par l'ajout de molécules compétitrices. Mais lorsque le temps de désorption est très supérieur au temps d'adsorption, le système est considéré comme irréversible.

Selon Soderquist et Walton (1980), qui ont étudié les cinétiques d'adsorption/désorption de 3 protéines (albumine, γ globuline et fibrinogène), le processus est défini en 3 étapes :

- Les protéines s'adsorbent très rapidement et atteignent un pseudo équilibre. Cette étape est encore réversible.
- Lorsque 50 à 60% de la surface est recouverte par les protéines, ces dernières subissent un lent changement de conformation dans le but d'optimiser leur interaction avec la surface. Ceci, entraîne une augmentation de leur entropie et la désorption devient moins probable.
- La probabilité de désorption des protéines diminue au cours du temps. Les protéines désorbées sont dénaturées et par conséquent moins aptes à subir les processus entropiques favorisant une nouvelle adsorption.

En effet, plus le temps de contact avec la surface est long, plus la protéine s'adsorbe en multipliant ses points d'ancrage, ce qui la conduit à modifier profondément sa structure (Andrade, 1985).

Dans les systèmes biologiques, plusieurs protéines sont généralement en compétition d'adsorption pour une même surface. Par exemple, dans le cas du plasma sanguin l'adsorption du fibrinogène est limitée à cause de son déplacement par d'autres molécules de masse molaire plus élevée. Ce phénomène est connu sous le nom d'effet Vroman. (Vroman et al, 1986). C'est à dire, qu'une protéine

abondante est rapidement adsorbée lorsqu'elle est mise au contact d'une surface. Puis dans un temps relativement court suivant l'adsorption, elle est déplacée par d'autres protéines, moins abondantes mais ayant une plus forte affinité pour la surface considérée. (Brash and Hoebett, 1987).

IV. Les Copolymères à activité anti-coagulante et anti-complémentaire

IV.1 Les polymères « héparin-like » insolubles

Les premiers résultats obtenus avec les copolymères statistiques dérivés du polystyrène ont porté sur l'activité anticoagulante, c'est à dire sur l'interaction entre ces résines et les facteurs de la coagulation. Ces résultats ont montré que la plupart des facteurs non activés ne sont ni adsorbés, ni modifiés, excepté le facteur V et la précalcicrine. En revanche la thrombine, l'antithrombine III et le facteur Xa s'adsorbent à la surface de ces polymères. En effet, il a été montré que des copolymères statistiques substitués avec des acides aminés comme l'acide glutamique étaient capables de catalyser la réaction d'inhibition de la thrombine par l'antithrombine comme le fait l'héparine. De plus, dans le cas de ces matériaux insolubles, l'inhibition de la protéase par l'antiprotéase semble être accélérée quand des complexes sont formés entre le polymère et les protéines. Ces polymères sont dits polymères «heparin-like». (Fougnot et al 1982).

D'autres facteurs de la coagulation vitamine K-dépendants comme la prothrombine (II), la proconvertine (VII), le facteur de Stuart (X) et le facteur anti-hémophilique B (IX) ont des propriétés moléculaires voisines : ils possèdent dans leur extrémité amino-terminale des acides γ carboxyglutamique nécessaires à la fixation sur les phospholipides membranaires par l'intermédiaire de ponts calciques. Ces facteurs jouent un rôle essentiel dans le processus de la coagulation. Ainsi, leur absence et leur synthèse en quantité insuffisante ou sous forme de protéines inactives prédisposent aux troubles de la coagulation. Les déficits en facteur II, X et VII sont

rare et les manifestations hémorragiques sont liées à l'importance du déficit. La plus grave des anomalies congénitales est l'hémophilie B qui correspond à une déficience en facteur IX.

L'hémophilie est une maladie génétique, un trouble héréditaire de la coagulation du sang. Chez l'hémophile, l'hémostase est perturbée par l'absence ou la déficience, d'un des 13 éléments (facteurs) qui contribuent à la formation d'un caillot solide, capable d'obturer de façon durable un vaisseau sanguin blessé (coupure, traumatisme) :

FACTEUR VIII pour l'hémophilie A

FACTEUR IX pour l'hémophilie B

Chez l'hémophile, le caillot se forme mais il est de mauvaise qualité. Il ne "tient" pas dans le temps et la cicatrisation ne peut se faire normalement, ce qui peut entraîner une reprise de l'hémorragie.

Le déficit en facteur VIII ou IX peut être total ou partiel. On dit, selon le cas, que l'hémophilie est "sévère" ou "modérée". Ce trouble de la coagulation touche essentiellement les garçons et très exceptionnellement les filles.

Beaucoup de chercheurs se sont tournés vers la thérapie génique. Cependant, cela implique des manipulations très complexes et leur développement pose des questions d'éthique. La thérapie génique vise à atteindre le gène du facteur VIII ou du facteur IX au cœur des cellules qui le fabriquent, et à remplacer le gène défectueux par un gène sain, de manière à rétablir la formation du facteur VIII ou IX manquant, ce qui permettrait le rétablissement de la fonction de coagulation du sang.

Actuellement, le traitement de ces anomalies consiste en un apport substitutif du produit manquant sous forme de fractions plasmatiques par voie transfusionnelle intraveineuse. Cependant, ce moyen thérapeutique présente deux dangers : un risque de transmission virale (hépatite et HIV) et un risque de coagulation intravasculaire (Dupey and Mohho, 1992). Afin de s'affranchir des complications thrombotiques, les fractions plasmatiques sont remplacées par des produits purifiés. Les applications nécessitant l'obtention de protéines purifiées sont nombreuses. Cependant, la faible concentration plasmatique des facteurs vitamine K-dépendants et les étapes nombreuses de leur purification rendent leur coût élevé. Par

conséquent, l'étude et la mise au point de nouveaux supports capables d'adsorber sélectivement les protéines vitamine K-dépendants présentent un intérêt particulier. Il a été démontré que des polystyrènes sulfamide d'éthanolamine phosphorylés étaient susceptibles de reconnaître spécifiquement certains facteurs de la coagulation vitamine K-dépendants et que la formation de sites spécifiques dépend du taux de substitution des résines en groupements phosphates. De plus, les constantes d'affinité des différents facteurs étudiés pour les résines fortement substituées (caractère « phospholipid-like ») présentent des différences sensibles. Ceci a laissé entrevoir la possibilité d'utiliser ces résines en chromatographie d'affinité pour séparer ces protéines vitamine K-dépendants (Souirti, 1994).

IV.2. Les polymères solubles

Le dextran est un polymère soluble constitué d'un enchaînement d'unités glycosyles reliées principalement par des liaisons α 1-6.

A l'origine, les dérivés du dextrane ont été synthétisés et caractérisés en vue de reproduire certaines propriétés de l'héparine (Mauzac *et al*, 1984). Ils possèdent 4 types d'unités glycosyles statistiquement distribuées le long de la chaîne macromoléculaire. Les unités glycosyliques non substituées (D), les unités glycosidiques substituées par des groupements carboxyméthyl (CM), des groupements benzylamines (B) et des groupements benzylamines sulfonates (S) forment les CMDBS, (Figure 12) La meilleure activité anticoagulante est obtenue pour des taux en CM supérieur à 50% et en S d'environ 15%. (Aubert *et al*, 1987). Une activité anticomplémentaire a été également observée avec un polymère composé de 40% de CM et de 10% de S, cette action repose sur l'inhibition de la formation de la C3-convertase amplificatrice (Mauzac *et al*, 1985).

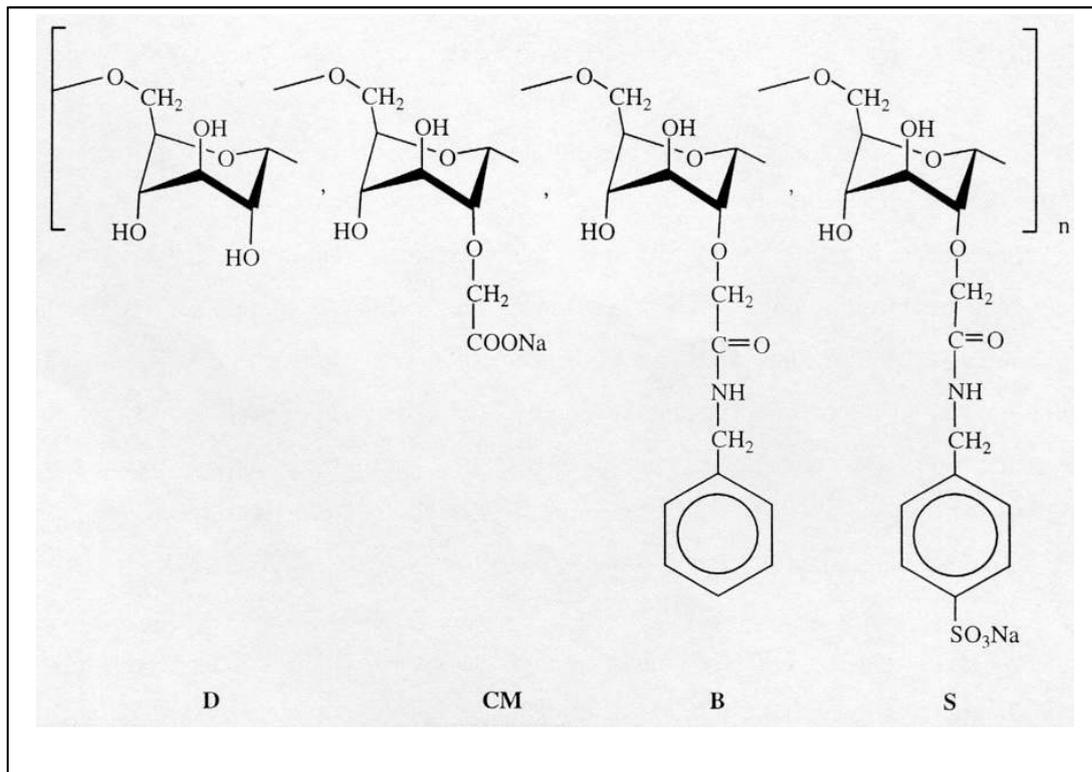


Figure 11 : Structure des différents motifs constituant les dextrans modifiés, ou CMDBS

V. Polymères et particules virales

Actuellement, de nombreuses maladies d'origine virale, comme les arboviroses s'étendent sous forme d'épidémie dans certaines régions du monde (Afrique, Asie, Amérique ...). Les plus connues sont causées par les virus de la fièvre jaune, de la rage, de la Dengue, Ebola et sont transmises pour la plupart par des insectes hématophages. Différentes techniques de détection telle que l'immunofluorescence, l'ELISA ou la PCR existent et sont utilisées pour la surveillance épidémiologique ainsi que pour les diagnostics. Cependant, ces techniques présentent des inconvénients majeurs tels que : le coût, temps de détection, sécurité du manipulateur.... Ainsi, au LRM une étude visant à l'élaboration de copolymères statistiques susceptibles d'établir des interactions spécifiques avec les glycoprotéines d'enveloppe virale a été réalisée dans le but de mettre au point un système de détection biologique spécifique.

En effet, des études (Crépinior, 2001) réalisées sur des particules virales en interaction avec des copolymères statistiques ont montré que les virus Babanki et Kedougou (groupement épidémiologique des arbovirus) sont capables de développer des interactions de différentes natures avec les copolymères statistiques, et que la spécificité de ces interactions dépend de la composition chimique des copolymères et présente un maximum pour une composition donnée (PS-SO₂Asp substitué à 42% et PS-SO₂Arg substitué à 20%). Ceci montre que la substitution statistique de groupements chimiques convenablement choisis (acide aspartique, arginine) sur la chaîne macromoléculaire de polystyrène, permet de créer des sites susceptibles d'interagir spécifiquement avec les glycoprotéines d'enveloppe des deux modèles viraux étudiés. (Crépinior, 2001)

Une autre étude (Berger, 2001) sur le virus Babanki et une autre souche virale appartenant également à la famille des arbovirus, le virus Zika a été réalisée dans le but d'élaborer des vaccins synthétiques. En effet, l'étude des interactions développées entre les immunoglobulines (IgG) antivirales de différents type d'IgG et différentes familles de copolymères de polystyrène fonctionnalisés substitués par différents taux d'acide aminé, a permis de montrer qu'il est possible de purifier les IgG antivirales par adsorption spécifique sur le polystyrène sulfamide d'acide aspartique substitué à 11%. Ce copolymère mime certaines séquences antigéniques des glycoprotéines d'enveloppe virale du virus Babanki. En outre, le polystyrène sulfamide de phénylalanine substitué à 49% présente une spécificité vis à vis des anticorps anti-Babanki, alors que le polystyrène sulfamide d'acide aspartique substitué à 8% présente des sites antigéniques commun aux deux virus. (Berger, 2001).

VI. Polymères et cellules eucaryotes de mammifères

La plupart des biomatériaux sont destinés à être placés au contact des tissus vivants. Ils sont, soit sous forme de greffe comme les implants osseux, les prothèses vasculaires ou encore les implants intra-oculaires, soit sous forme de processus extra corporel comme les cathéters ou encore les poches à sang. Il est donc

nécessaire pour le matériau d'être bio-actif, c'est à dire soit d'induire la prolifération des cellules soit au contraire de l'inhiber.

Le comportement des cellules au contact d'un biomatériau dépend en grande partie de la couche protéique adsorbée à sa surface. Cette couche protéique est principalement constituée de protéines d'adhésion cellulaire (fibronectine, vitronectine, fibrinogène etc ...) qui établissent un pont entre les cellules et la matrice extra-cellulaire et permettent ou non la délivrance de messages concernant l'étalement et la prolifération des cellules.

VI.1. Les copolymères statistiques à base de polystyrène

La plupart des cellules eucaryotes de mammifère ont besoin d'un support pour adhérer et proliférer. Les dérivés du polystyrène insoluble sont les composants de base des supports utilisés pour la culture des cellules de mammifères. Ainsi, les boîtes en polystyrène sont utilisées pour la culture cellulaire depuis 1965. La surface doit cependant subir des modifications chimiques et physiques pour permettre l'attachement cellulaire. (Curtis et al 1983).

Ainsi, des polymères constitués de billes de polystyrène réticulé, substitué par des groupements sulfonate de sodium (PSSO_3Na) et sulfamide d'acide aminé (PSSO_2AA), ont été développés et utilisés comme micro supports de différentes lignées cellulaires.

Ces polymères insolubles fonctionnalisés sont susceptibles de moduler la croissance, la morphologie et l'expression phénotypique des cellules. Les interactions cellules-polymères peuvent être directes ou médiées par des protéines d'adhésion comme la fibronectine, la vitronectine, etc. Dans ce cas, les effets du polymère dépendent de la conformation adoptée par la protéine de liaison (Stanislawski, 1993). En outre, la prolifération de cellules endothéliales de la veine du cordon ombilical humain (CEVCOH) en culture sur des copolymères recouverts de fibronectine est observée avec le polystyrène sulfonate de sodium (PSSO_3Na) et pas avec le polystyrène sulfamide d'acide aspartique (PSSO_2Asp), alors que les deux polymères ont la même affinité pour la fibronectine.

L'interaction est donc indirecte, c'est à dire, médiée par une protéine obligatoire, la fibronectine (Fn). Ceci a été démontré par la culture de CEVCOH sur les micros supports de PSSO_3Na pré-conditionnés par la fibronectine (Najab-benahyoun *et al.*, 1993). Les interactions entre PSSO_3Na et CEVCOH ont comme conséquence une prolifération normale des cellules et de la synthèse ainsi que de la sécrétion du facteur de Von Willebrand (VWF). L'interaction de ces cellules avec des copolymères substitués par l'acide aspartique montre une augmentation de la prolifération cellulaire (Figure 13). Les résultats prouvent que les différentes interactions biospécifiques peuvent se produire entre les cellules en culture, protéines médiatrice et copolymères statistiques biospécifiques substitués avec les groupes fonctionnels appropriés (Najab-benahyoun *et al.*, 1993).

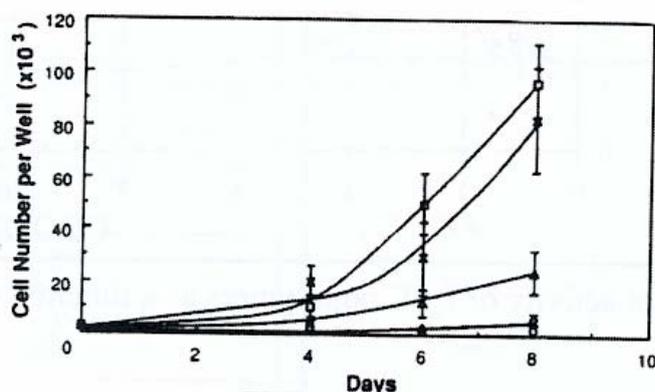


Figure 12 : Prolifération des CEVCOH sur des copolymères statistiques substitués

La prolifération de deux lignées humaines, les cellules Mac Coy (fibroblaste) et des cellules endothéliales, les cellules Eahy926 a également été étudiée en présence de fibronectine sur des dérivés de polystyrène substitués en faisant varier le taux de groupements sulfamide d'acide aspartique de 0 à 70%. Les résultats montrent que la prolifération des cellules est normale sur PSSO_3Na et qu'elle est inhibée dès que le taux de substitution en groupement sulfamide d'acide aspartique est supérieur à 20%, avec une inhibition supérieure à 80%. (Crépinior *et al.*, 1996)

VI.2. Les copolymères acryliques

La plupart des complications associées à l'implantation des lentilles intra-oculaire (LIO) est la cataracte secondaire. Elle se caractérise par une opacification de la capsule supérieure qui résulte d'une prolifération de cellules fibroblastiques et en règle générale, ces complications aboutissent au retrait de la lentille. Afin d'élaborer des lentilles intra-oculaires ayant une meilleure biocompatibilité, El Khadali *et al* (2002) ont étudié la prolifération d'un type de cellule fibroblastique (Mac Coy) sur des terpolymères acryliques obtenus par copolymérisation statistique de méthacrylate de méthyle (MMA), d'acide méthacrylique (MA) et de styrène sulfonate de sodium (NaSS). La synthèse de ces copolymères réalisée par voie radicalaire permet d'obtenir des groupements carboxylates et sulfonates statistiquement distribués le long de la chaîne macromoléculaire. Une modulation de la prolifération des cellules Mac Coy sur ces polymères est observée en fonction de leur composition en groupements fonctionnels. Une inhibition maximale de la prolifération cellulaire est observée sur un polymère contenant 15% de monomère ionique et dont la fraction molaire $\text{COO}^-/\text{COO}^- + \text{SO}_3^-$ est de 0,55. (El Khadali *et al*, 2002)

L'ensemble des résultats obtenus avec ces copolymères biospécifiques montre que la fonctionnalisation des chaînes macromoléculaires par des groupements sulfonate et carboxylate, réalisée par copolymérisation statistique de monomères appropriés ou par substitution statistique de polymères préformés, permet d'obtenir des copolymères capables de moduler la prolifération cellulaire en fonction de leur composition chimique. De plus, la modulation de la prolifération cellulaire observée résulte d'interactions spécifiques entre la surface du polymère et les cellules médiées par la fibronectine. Selon la composition chimique du polymère, la conformation de la fibronectine rendra accessible ou non certaines régions de la protéine, permettant ainsi l'adhésion des cellules et éventuellement l'activation ou non des messages intracellulaires responsables de la prolifération.

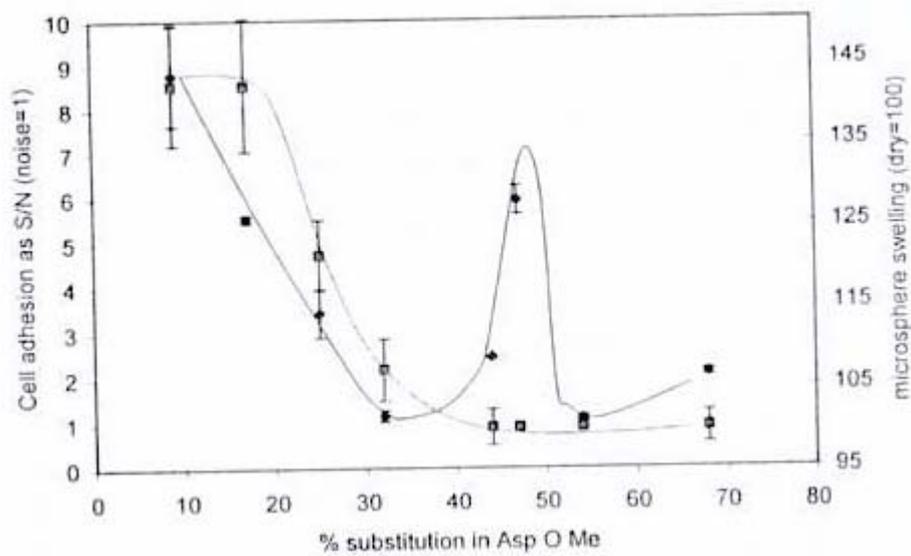


Figure 13 : Adhésion de *Alexandrium minutum* sur les polystyrènes sulfamide d'acide aminé méthyle ester. (La Barre et al. 2002)

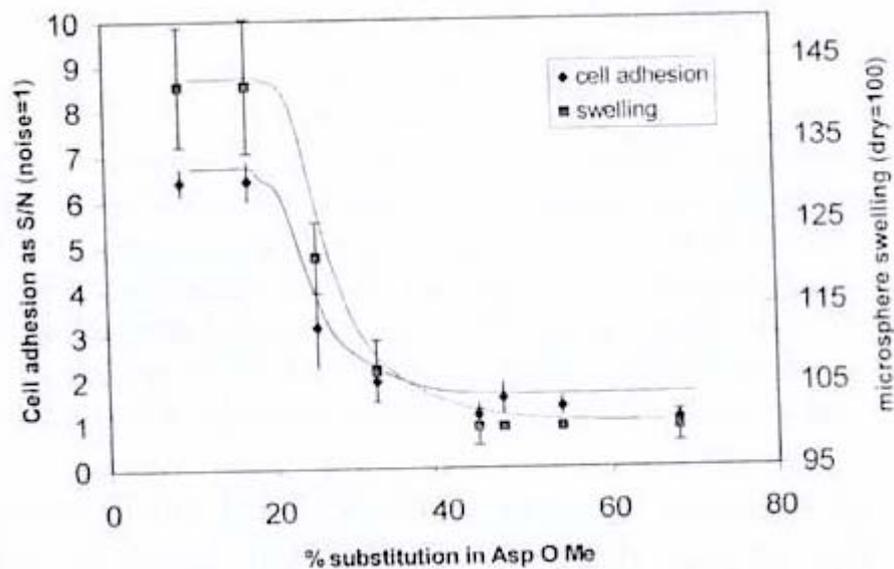


Figure 14 : Adhésion de *Heterocapsa triquetra* sur les polystyrènes sulfamide d'acide aminé méthyle ester. (La Barre et al. 2002)

VI. 3. Les dérivés du dextrane ou CMDBS à activité anti-proliférative

Nous avons vu ci-dessus que les CMDBS avaient la capacité d'inhiber la coagulation et le système du complément, activités dépendantes de la composition chimique globale et de la masse molaire moyenne de ces produits. Outre ces propriétés, de nombreux travaux (Avramoglou et Jozefonvicz, 1991) ont montré l'effet de ces molécules sur la régulation de la croissance cellulaire ou encore sur certains facteurs de croissance.

Par exemple, il a été montré que les CMDBS inhibent la prolifération des cellules musculaires lisses de l'aorte de rat *in vitro* et que cette inhibition dépend de la composition globale des produits et nécessite un pourcentage élevé d'unité B et S. (Avramoglou et Jozefonvicz, 1991). L'activité antiproliférative dépend de la masse molaire ; en effet il est nécessaire d'avoir 50 unités osidiques pour obtenir une séquence active (Logeart *et al* 1994).

De plus, selon Bagheri *et al* (1995), certains dérivés du dextran fixent de façon spécifique des facteurs de croissance, induisant ainsi une inhibition de l'effet mitogène de FGF2, TGF et du PDGF sur les fibroblastes de souris.

VII. Les copolymères et dinoflagellés marins

Face aux problèmes causés par les efflorescences micro-algales et aux moyens très limités pour détecter et endiguer ce phénomène, des recherches (La barre *et al*, 2002 ; El khadali 2003) ont été entreprises visant à étudier l'interaction entre les copolymères statistiques et une des microalgues responsables de ces efflorescences, *Alexandrium minutum*. Le but est de concevoir un matériau permettant une meilleure détection. Il a été montré l'existence d'une interaction biospécifique entre un copolymère statistique substitué à 47% en ester méthylique d'acide aspartique et cette microalgue. (Figure 14). Ce polymère est capable en effet de lier spécifiquement *A.minutum* par rapport à la microalgue *Heterocapsa triquetra* appartenant à une famille voisine. (Figure 15).

Ainsi, il a été montré pour la première fois que des copolymères biospécifiques avaient la capacité de se lier de façon spécifique avec le phytoplancton marin. Ces résultats pourraient inspirer une nouvelle génération de structures, pouvant être employés en aquaculture. Ces résultats ont fait l'objet d'un dépôt de brevet international. (La Barre et al. 2002)

VIII. Les polymères et les bactéries commensales de l'homme

L'évolution des infections nosocomiales coïncide avec le développement des matériaux et dispositifs à usage médical que sont les biomatériaux. Les infections sur corps étrangers peuvent avoir des conséquences très sévères menaçant même la survie du patient. Elles sont souvent réfractaires aux mécanismes de défenses de l'organisme et aux traitements antibiotiques nécessitant l'ablation des prothèses implantées. En effet, lorsqu'un corps étranger est mis en contact avec le système vivant, il subit rapidement une modification de ses propriétés de surface, due à son contact avec les fluides biologiques dont la composition varie selon le site d'insertion ou d'implantation du matériau. Comme nous l'avons vu ci-dessus, une des réponses précoces est l'adsorption des protéines à la surface du matériau, cette étape étant très importante dans l'attachement des bactéries. La recherche a mis au point de nombreux matériaux, notamment des polymères imprégnés d'antibiotiques ou de détergents, cette antibioprophylaxie combinée aux mesures d'hygiène et d'asepsie est actuellement une solution intéressante pour prévenir les infections. Cependant, ces matériaux posent le problème lié à la diffusion à long terme des agents antibiotiques.

Face à ce problème majeur, la recherche s'est tournée vers l'étude de nouveaux biomatériaux, dotés de propriétés inhibitrices de l'adhérence et de la prolifération bactérienne.

VIII.1. Les polymères solubles

Il a été montré que les copolymères biospécifiques dérivés du dextran (CMDBS) décrits plus haut, avaient en plus de leur activité anticoagulante, la capacité d'inhiber l'adhérence de *S. aureus* sur des lamelles de Poly (méthacrylate de méthyle) (PMMA) préalablement adsorbées par la fibronectine. L'activité de ces polymères a été comparée aux dextrans non substitués et à l'héparine. Il a été ainsi montré que cette activité dépend de la composition des polymères et que les dérivés du dextrane fortement substitués par des groupements carboxylate et sulfonate présentent un grand pouvoir inhibiteur sur l'adhérence de *S. aureus*. De plus, la capacité inhibitrice de ces polymères dépasse pour les fortes substitutions la capacité inhibitrice de l'héparine. (Vaudeaux *et al*, 1992).

VIII. 2. Les copolymères statistiques insolubles

Berlot (1998) durant sa thèse a montré également que des billes de polystyrène substituées par des groupements sulfonate avec sulfamide d'acide aspartique préalablement adsorbées par la fibronectine, possèdent la capacité de moduler l'adhérence de souches de *Staphylococcus aureus* (Figure 16). En effet, l'adhérence des bactéries est faible sur les polymères porteurs de groupements sulfonates seuls et augmente avec l'augmentation des groupements sulfamide d'acide aspartique.

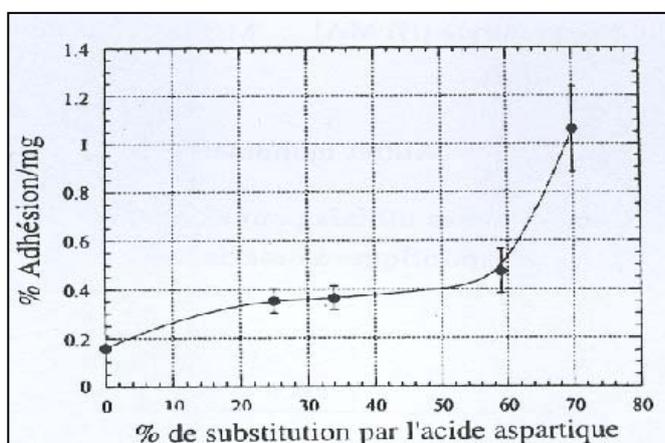


Figure 15: Modulation de l'adhésion de *Staphylococcus aureus* (souche Cowan) par des copolymères statistiques dérivés du polystyrène préalablement recouverts par la fibronectine (Berlot, 1998).

D'autres polymères ont été synthétisés par copolymérisation statistique, ils sont réalisés à partir de polychlorure de Vinyle (PVC) ou le polyméthacrylate de méthyle (PMMA). Ces derniers offrent l'avantage de présenter des propriétés mécaniques plus appropriées à l'usage médical. Les études réalisées sur les PVC fonctionnalisés préalablement adsorbés par la fibronectine montrent que ces polymères sont capables d'inhiber l'adhérence de *S. aureus* (souche Cowan I) par comparaison au PVC non fonctionnalisé. De plus, il a été mis en évidence que les PVC porteurs de groupements sulfonate seuls avaient une capacité d'inhibition supérieure à ceux porteurs de groupements carboxylate. (Berlot, 1998)

De même, les polymères à base de PMMA porteurs des fonctions carboxylate et sulfonate ont été synthétisés par copolymérisation radicalaire du méthyle methacrylate (MMA), d'acide mathacrylique (MA) et de styrène sulfonate de sodium (NaSS), (Aissaoui, 1997). (Figure 17)

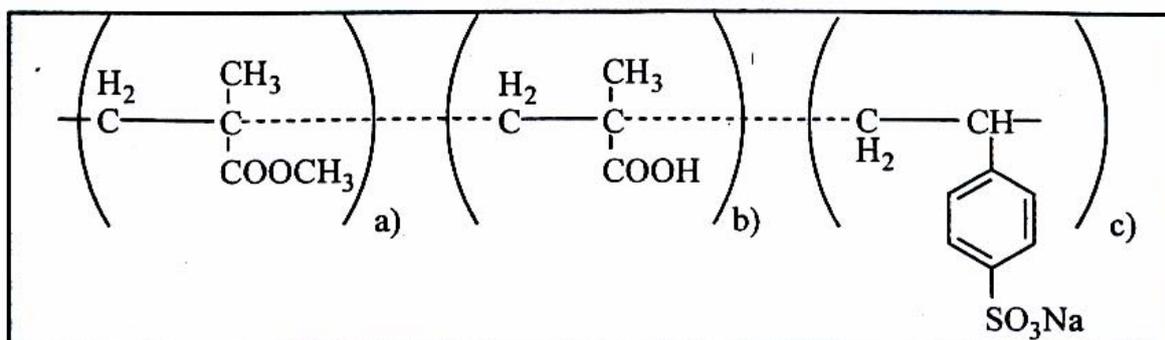


Figure 16 : Structure des terpolymères à base de poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA), (Aissaoui, 1997).

Les études réalisées avec la souche Cowan I montrent que ce polymère fonctionnalisé inhibent l'adhérence de cette souche en comparaison du polymère témoin : le PMMA. Ainsi, le pourcentage d'inhibition dépend du rapport des groupements fonctionnels (carboxylate et sulfonate) et peut atteindre 90% pour des rapports carboxylate/sulfonate inférieur à 4. (Figure 18) (Berlot 1998).

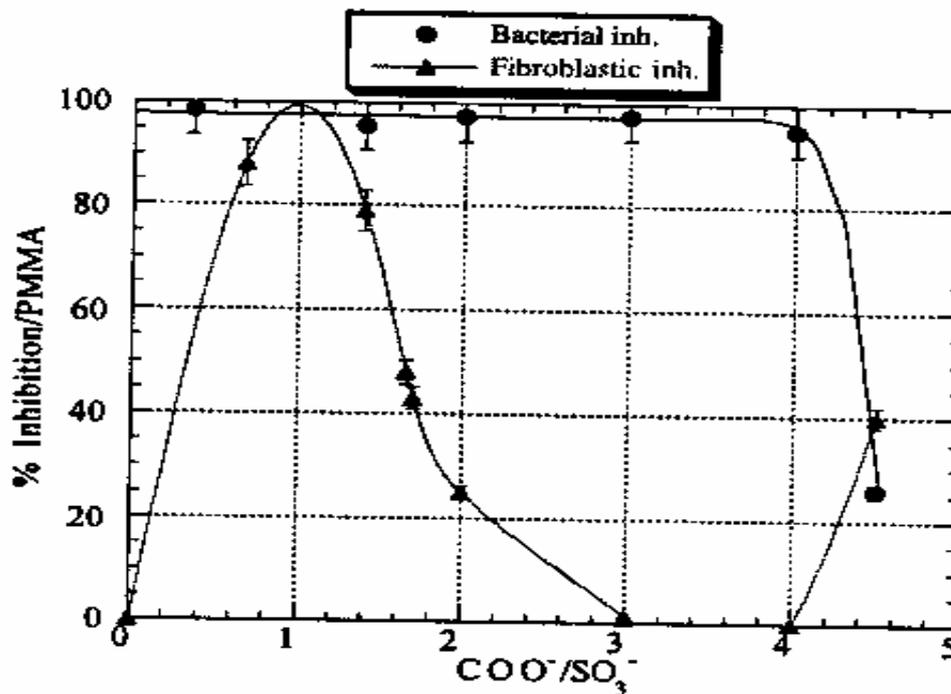


Figure 17 : Inhibition de l'adhésion bactérienne et de la prolifération des cellules fibroblastiques sur des terpolymères acryliques comparés au PMMA. (Berlot,1998).

De même Fadli (2000) a montré que pour *Streptococcus pyogenes* (souche impliquée dans les infections nosocomiales) l'adhésion sur les copolymères statistiques est fortement corrélée à l'état physiologique de la bactérie. De plus, comme pour *S.aureus*, il a été mis en évidence une modulation de l'adhésion et de la prolifération de cette souche par des microsphères de polystyrène fonctionnalisées par des groupements sulfonate et sulfamide d'acide aspartique préalablement adsorbées par la fibronectine. En effet, il a été montré que l'adhésion bactérienne est faible sur le polystyrène sulfonate de sodium porteur uniquement de fonctions sulfonate.

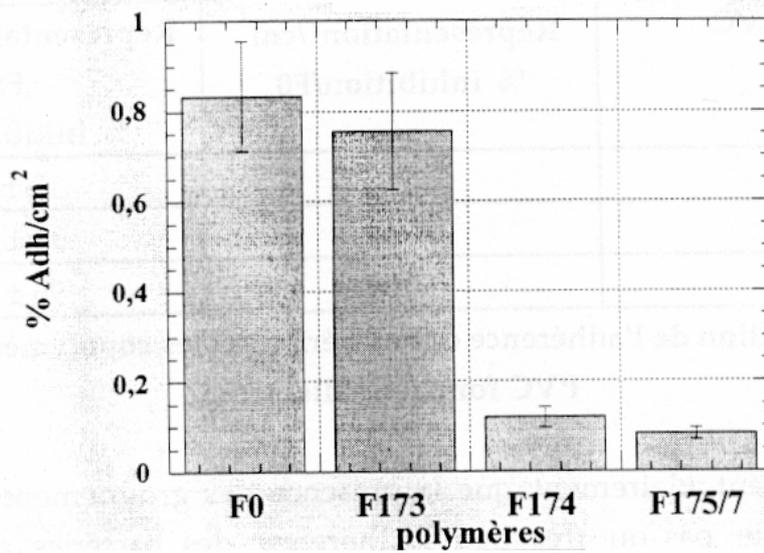


Figure 18 : Adhésion de *S. pyogenes* sur les films en copolymères à base de PVC préalablement incubés avec du plasma. (Fadli, 2000)

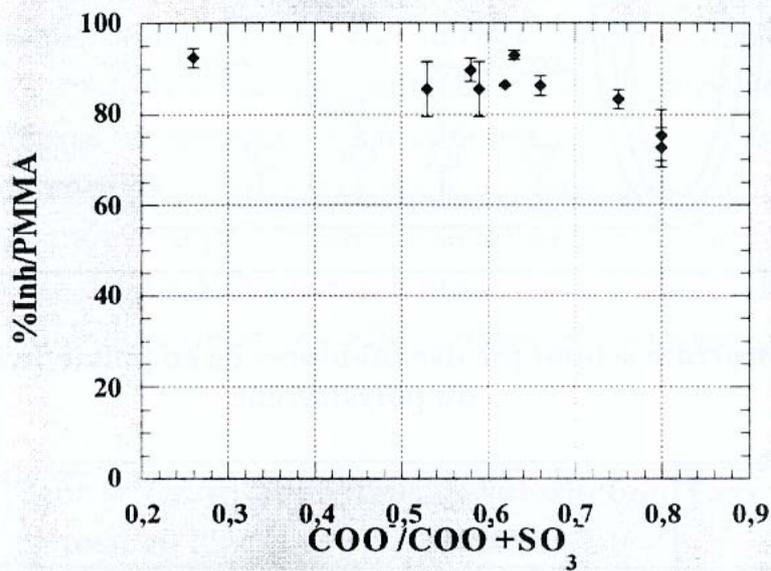


Figure 19 : Inhibition de l'adhésion de *S. pyogenes* sur des copolymères fonctionnalisés à base de PMMA

D'autre part, cette adhésion bactérienne augmente avec l'augmentation du pourcentage de substitution du polystyrène par l'acide aspartique (Figure 19)

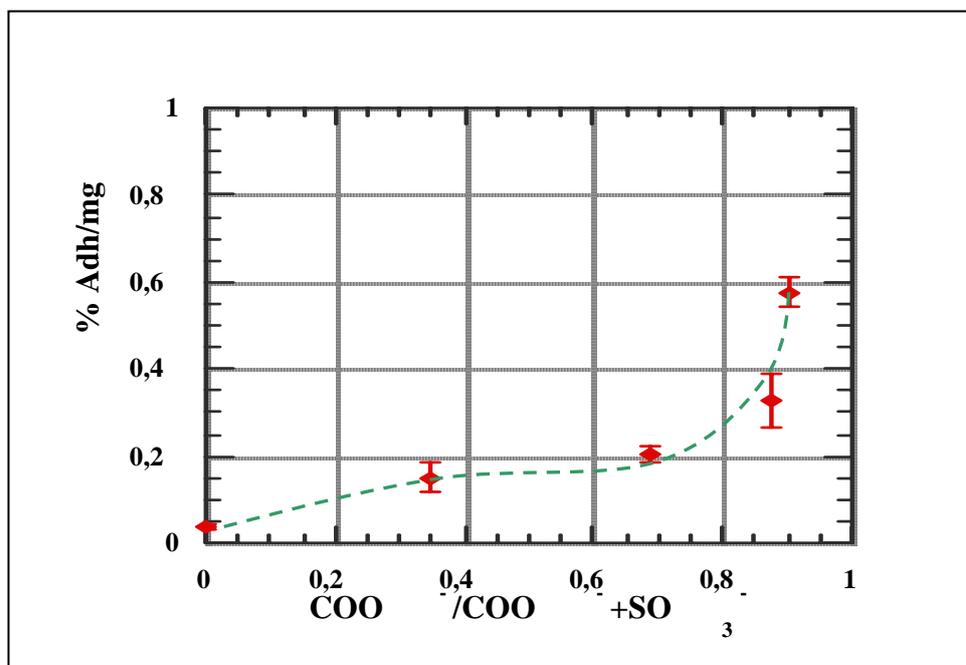


Figure 20 : Modulation de l'adhésion de *Streptococcus pyogenes* par des copolymères statistiques dérivés du polystyrène préalablement recouverts par la fibronectine (Fadli, 2000).

Il a été montré que non seulement il y avait une modulation de l'adhérence de *S. pyogenes* mais également une modulation de la prolifération sur les copolymères statistiques à base de polystyrène, de polychlorure de vinyle (PVC), et les résultats ont montré une adhésion sur deux PVC fonctionnalisés plus faible que sur le PV0, témoin non fonctionnalisé. (Figure 20) et de poly(métacrylate de méthyle) (PMMA). Sur les polymères à base de PMMA les pourcentages d'inhibition peuvent atteindre une valeur de 90% pour des rapport $COO^- / COO^- + SO_3^-$ inférieurs à 0,4. (Figure 21) Il a été également montré pour *S.pyogenes* que l'adhérence sur ces polymères augmentait la résistance à la pénicilline G.

Ainsi, on remarque que les copolymères statistiques biospécifiques peuvent avoir non seulement une influence sur l'adhérence de bactéries mais aussi sur leur métabolisme et leur système de défense. (Fadli, 2000).

Conclusion

Il ressort donc que les copolymères statistiques peuvent avoir des actions biospécifiques dans le domaine biomédical (activité anticoagulante, modulation de l'adhésion cellulaire et des bactéries impliquées dans les infections nosocomiales) et environnemental, sur des organismes unicellulaires marins. Face au problème causé par les biosalissures marines, il est donc intéressant d'étudier l'interaction de ces polymères avec les bactéries impliquées dans les biosalissures, notamment les bactéries pionnières. Ainsi le Service Matériaux et Structures de TMSI (IFREMER) en collaboration avec le LRM a entrepris l'ouverture d'un nouveau programme consistant en l'étude de l'adhérence de bactéries pionnières sur ces copolymères afin d'en sélectionner un ou plusieurs dont l'action sera d'inhiber l'adhésion de ces bactéries.

Cette autre voie s'appuie sur les acquis de la recherche sur les biomatériaux à usage médical, et dont certains sont susceptibles de moduler la prolifération de bactéries pathogènes, en modifiant la conformation de leurs protéines de liaison. L'événement initial permettant l'adhésion des bactéries sur tout matériau est en effet l'adsorption à sa surface de protéines en solution, avec changement de la conformation de ces protéines, selon la nature du matériau sur lequel elles sont adsorbées. Les recherches menées au Laboratoire de Recherches sur les Macromolécules incluent l'étude des interactions spécifiques entre les copolymères statistiques et des composants cellulaires ou des protéines i) du sang (facteurs de coagulation, facteurs d'activation du système du complément), des anticorps, ii) d'autres tissus ou organismes pathogènes (affinité de contact biospécifique, directe ou médiée par des protéines de liaison, avec des cellules eucaryotes et procaryotes, et des virus).

L'étude est basée sur le principe de base que les copolymères statistiques peuvent interagir de manière spécifique avec des composants membranaires de cellules eucaryotes ou au contact des protéines médiatrices de l'adhésion bactérienne. La synthèse peut s'opérer i) par fixation de groupements chimiques convenablement choisis, le long d'une chaîne macromoléculaire préformée, créant ainsi différents motifs ou ii) par copolymérisation de monomères porteurs de fonctions souhaitées. Dans les deux cas, la distribution des fonctions chimiques est statistique, et obéit au

hasard de Markov avec effets locaux, selon le principe de fonctionnalisation statistique établi par Jozefowicz et Jozefonvicz (1997). Les propriétés biospécifiques observées (adhésion et transmission intracellulaire d'un signal de prolifération ou de non-prolifération, modulation de l'expression phénotypique) sont dues à l'apparition à la surface du polymère de sites (arrangement de motifs) mimant des ligands naturels de récepteurs ou de sites de liaison de protéines. L'apparition de tels sites dépend de la composition finale du copolymère.

Nous proposons de synthétiser des substrats - modèles (copolymères statistiques à base de polystyrène) substitués avec différents groupements chimiques à des taux variables, puis d'identifier les résines présentant une activité bactériophobe et /ou bactériostatique sur des souches bactériennes marines impliquées dans les salissures marines.

L'objectif de ces travaux est d'aboutir à une formulation pour enduit polymérique destiné à protéger toute surface en immersion dans de l'eau de mer, de la formation de salissures d'origine vivante. Ces résultats pourraient permettre la mise au point de revêtements ou de traitement de surfaces dont les performances sont réduites par les salissures marines, et dont l'entretien régulier est problématique.

PARTIE II
MATERIELS ET METHODES

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES COPOLYMERES STATISTIQUES

I. La synthèse

I.1. Matériels

Les microsphères de polystyrène (porosité 400 angströms environ) réticulé par 3% de divinylbenzène (BioBeads SX3) sont fournies par Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA. Réactifs et solvants : acide chlorosulfonique (ACS), triéthylamine (RP), (di)méthyl ester des acides L-aspartique, L-alanine, L-phénylalanine, L tryptophane, L-sérine, L-proline, L-arginine, L-asparagine et L-hydroxyproline proviennent de Sigma Aldrich (St. Quentin Fallavier, France), la soude (qualité synthèse) chez Fluka Riedel de Haën (groupe Sigma, St. Quentin Fallavier, France), le dichlorométhane (DCM) (RP) et l'acide chlorhydrique (12,1M) sont fournis par Carlo Erba (Val de Rueil, France). Les analyses élémentaires sont réalisées par le laboratoire d'analyse au Centre National de la Recherche Scientifique à Vernaison d'une part et Gif-sur-Yvette d'autre part.

I.2. Protocole de synthèse

Les microsphères de polystyrène sont débarrassées de leurs impuretés de fabrication par lavages, successivement avec : une solution de 1M NaOH, eau biosmosée, une solution de 1M HCl, eau biosmosée (3h chaque fois), avant filtration et séchage sous vide à 50°C. Le protocole qui suit a été répété pour chacune des familles de copolymères pour obtenir autant de résines de compositions spécifiques (8 à 10 membres). En résumé : 2,5 g de résine de PSX3 lavée et séchée est mis à gonfler pendant une nuit dans 75 ml de dichlorométhane (DCM) dans un ballon, puis attaquée pendant 90 min à 40°C par l'acide chlorosulfonique en excès, sous agitation et reflux. L'acide chlorosulfonique est évacué par filtration, et la résine rincée rapidement sur fritté, successivement avec du DCM distillé, de l'acétone distillée, et de nouveau du DCM. La résine récupérée est placée dans 100 ml de

DCM contenant l'acide aminé dissout (sur le base de 0,11 mole par mole de PSX3 sec). La condensation de l'acide aminé est opérée par l'ajout de deux équivalents molaires de triéthylamine avec agitation douce sur un agitateur à rouleaux pendant 48 h, puis on ajoute un 3^{ème} équivalent de triéthylamine avec 12 h d'agitation supplémentaire. Chaque copolymère est filtré et lavé 1 h dans de l'éthanol pur pour éliminer les traces de DCM. L'hydrolyse douce par NaOH 10⁻² M (six fois NaOH puis lavages à l'eau biosmosée à pH constant) est effectuée sur la moitié pondérale de chaque membre des différentes familles. L'hydrolyse forte avec NaOH 2M est effectuée sur l'autre moitié des échantillons, en réalisant une série de traitement par des solutions de soude diverses (10⁻², 10⁻¹, 1, 2, 1, 10⁻¹, 10⁻² M). Après séchage sous vide à 50°C jusqu'à poids constant, l'analyse élémentaire d'un échantillon de chaque résine conduit à une détermination des éléments C, N, Na et Cl, et à l'estimation de la composition de chaque produit (% des motifs constitutifs).

II. Caractérisations

II. 1. Analyse élémentaire

Les résultats obtenus permettent de déterminer la composition des copolymères. Cette caractérisation est réalisée par le Service de Microanalyse ICSN-CNRS à Gif-sur-Yvette.

II. 2. Le taux de gonflement

Le taux de gonflement (TG) est déterminé à partir de la détermination du volume sec (Vs) et gonflé (Vg) de chaque échantillon dans le milieu. Il est important de réaliser cette expérience dans le milieu dans lequel le polymère va être utilisé, dans notre cas il s'agit du NaCl 36‰ ou ASW (Artificial sea water) 26‰. Dans la suite du manuscrit nous utiliserons le terme de « tampon » pour désigner ce milieu.

Le taux de gonflement est calculé suivant la formule suivante :

$$\text{TG} = (\text{Vg} - \text{Vs}) / \text{Vs}$$

Où TG est le taux de gonflement, Vg le volume gonflé et Vs le volume sec.

CHAPITRE 2 : ETUDE DES DIFFÉRENTS PARAMÈTRES LIÉS AUX SOUCHES BACTÉRIENNES

I. Les souches bactériennes

I.1. Caractérisation

Les souches choisies sont la souche D01 (de type *Vibrio*) et la souche D41a (de type *Pseudoalteromonas*). Ces deux souches sont isolées à partir de biofilms expérimentaux ayant fourni 66 souches bactériennes distinctes (rapport IFREMER décembre 1998 - Janvier 1999 ; Rubio, 2002). Elles présentent les caractéristiques suivantes :*

D01	D41a
Genre <i>Vibrio</i>	Genre <i>Pseudoalteromonas</i>
Isolée sur du verre	Isolée sur du Téflon
Faiblement muqueuse	Très muqueuse
Mise en culture facile	Mise en culture facile
Croissance à 6°C	Croissance à 6°C
Pas de croissance à 37°C	Croissance à 37°C
Fermentative	Non fermentative
Bâtonnets Gram négatifs, pas de pigmentation	

Tableau 3 : Caractéristiques de D01 et D41

1.2. Conservation des souches

Chacune des deux souches marines est mise à proliférer dans un milieu organique spécialement enrichi en sels minéraux, le bouillon marin ou *Marine Broth* (MB) afin d'avoir une suspension bactérienne dense. Cette suspension est étalée sur agar marin ou *Marine Agar* (MA) afin d'obtenir un tapis bactérien. Les bactéries sont alors récoltées et suspendues dans un milieu de conservation, du MB (1ml/cryotube) supplémenté de 15% de glycérol. Les cryotubes sont ensuite entreposés à -20°C , puis à -80°C . Avant utilisation, un cryotube est décongelé et ensemencé sur MA selon la technique d'épuisement afin d'obtenir des colonies bien isolées (utilisables un mois pour expérimentation). L'utilisation régulière de souches cryoconservées permet d'éviter une dérive phénotypique significative pendant le cours des travaux sur une même souche (la variabilité à l'antibiorésistance, par exemple, est indicative et est commodément mise en évidence par l'établissement d'antibiogrammes comparatifs).

1.3. Les résistances aux antibiotiques

1.3.1. Objectif

Le but de ces expériences est de mesurer la sensibilité initiale de souches sélectionnées, et d'observer l'éventuelle évolution du profil antibiogramme de chaque souche en monoculture. La sensibilité aux antibiotiques est un trait phénotypique dont l'évolution est indicative de mutations de la souche initiale. Le test antibiotique doit donc être pratiqué régulièrement sur des réensemencements successifs à partir de souches cryoconservées.

1.3.2. Matériel

Les matériels biologiques sont les souches bactériennes (D01 et D41a sélectionnées sur un biofilm marin). Les antibiotiques utilisés sont : la vancomycine, les sulfanilamides, la tétracycline, la kanamycine, la rifampicine, l'érythromycine. D'autre part les milieux utilisés sont les mêmes que ceux cités auparavant : Marine Agar 2216 (Difco), Marine Broth 2216 (Difco), eau de mer naturelle et artificielle, ainsi que des solutions de NaCl.

1.3.3. Méthodologie

Le principe est de mettre en présence des bactéries marines étalées sur une gélose avec des disques contenant un antibiotique donné. L'antibiotique diffuse dans la gélose et dans le cas où la souche bactérienne est sensible à l'antibiotique, il apparaît une zone autour du disque clair sans bactéries, la sensibilité à l'antibiotique étant proportionnelle à la taille de la zone claire.

1.4. Etalonnage de la concentration des bactéries par spectrophotométrie

Le but est d'établir une courbe reliant les quantités de bactéries en suspension avec la densité optique de cette suspension.

La courbe étalon est établie à partir d'une culture de nuit de deux souches bactériennes *D01* et *D41*, réalisée par incubation d'une colonie isolée sur gélose MB dans un 1 mL de milieu MB. Différentes concentrations de bactéries sont préparées. La densité optique des suspensions bactériennes est déterminée à une longueur d'onde de 595 nm. Parallèlement, des dénombrements sont effectués à partir des concentrations bactériennes préparées par prélèvement d'aliquotes, dilutions et étalements sur géloses. Cette méthode de dénombrement permet d'avoir le nombre de bactéries vivantes alors que la DO comptabilise la totalité des bactéries.

II. Les cultures bactériennes

Le but des expériences de culture bactérienne sur les différents milieux est d'établir les paramètres nécessaires afin d'obtenir des courbes standard de cinétiques de prolifération des souches.

Plusieurs cinétiques sont réalisées à partir de différents inocula afin de savoir si la population bactérienne de départ influence la durée des phases de prolifération et la biomasse obtenue pour chacune des deux souches

Différentes températures (12°C, 20°C, 35°C) sont aussi testées afin de déterminer l'influence de la température sur la croissance bactérienne, et les limites éventuelles de tolérance de chaque souche.

Enfin, plusieurs type de milieux sont testés afin d'utiliser une formulation appropriée à chacune des deux souches, et de déterminer les limites de tolérance éventuelles de viabilité et /ou de prolifération. Ces milieux sont préparés de façon à garantir une concentration standard minimale ou reproductible. Les milieux utilisés sont les suivants :

- Marine Broth 2216 de Difco (MB) à 37,4 g par litre d'eau biosmosée
- Eau de mer naturelle filtrée appauvrie en matière organique (EM) par passage sur cartouches C18 et Fluorisyl, fourni par DEL (Ifremer Brest)
- Eau de mer avec des nutriments minéraux (milieu f/2 de Guillard, comprenant NaNO_3 , NH_4PO_3 , traces de sels métalliques), fourni par DEL (Ifremer Brest)
- Chlorure de sodium pur à 36 pour mille (Sigma)
- Eau de mer artificielle (ASW) 26 pour mille (Sigma, ASWf, sea salts) composée de 46,943% de chlorure, 26,04% de sodium, 6,44% de sulfate, 3,16% de magnésium, 0,996% de calcium, 0,927% de potassium, 0,362% de bicarbonate, 0,072% de bromure, 0,016% de strontium.

III Etude des paramètres de marquage des bactéries avec la thymidine tritiée

Le but de cette étude est d'obtenir une méthode de marquage pour une population bactérienne dont on veut mesurer la capacité d'adhésion sur des microsphères de polystyrène fonctionnalisé.

Le marquage métabolique des bactéries à la thymidine permet une quantification indirecte des bactéries sur les polymères étudiés.

Il est nécessaire d'établir en parallèle un protocole de marquage radioactif, afin de choisir un temps optimal d'incubation avec le radiomarqueur, c'est à dire un niveau d'incorporation convenable en phase de prolifération exponentielle et en phase stationnaire, tout en nous assurant que la thymidine tritiée n'affecte pas la prolifération des souches bactériennes

La thymidine tritiée est un nucléotide directement incorporable dans le chromosome ou les plasmides des bactéries, donc assurant un marquage stable. La détection de la radioactivité β permet une estimation reproductible des populations adhérentes, après lavage et élimination des cellules non-adhérentes.

Le protocole utilisé est directement inspiré de ceux utilisés auparavant au laboratoire pour le radiomarquage de la souche pathogène *Streptococcus pyogenes* ou *staphylococcus aureus*. (Fadli, 2000 ; Berlot, 1998)

Deux types de cultures sont utilisés pour nos expériences d'adhérence ; une culture en phase logarithmique obtenue après 3 heures de prolifération en suspension et une culture en phase stationnaire obtenue après 12 heures de prolifération. Le radiomarquage de ces deux types de cultures est effectué comme suit :

Pour l'étude du radiomarquage des bactéries en phase logarithmique de prolifération, une suspension bactérienne de 10^7 ufc/mL est incubée pendant 3 heures à 20°C dans du milieu MB contenant 50 μ Ci de ^3H thymidine (Amersham). A l'issue de cette incubation, les bactéries sont lavées 3 fois avec du tampon par

centrifugation à 3500 tours/min puis re-suspendues à une concentration de l'ordre de 10^6 ou 10^7 ufc/mL dans le tampon.

De même, pour l'étude du radiomarquage des bactéries en phase stationnaire de prolifération, la suspension bactérienne est marquée avec ce traceur pendant 19h avec une quantité d'élément radioactif de 100 μ Ci. Les bactéries sont lavées et re-suspendues de la même manière que pour les expériences en phase exponentielle de prolifération.

Plusieurs dilutions sont effectuées à partir des deux cultures, logarithmique et stationnaire. Des aliquotes sont prélevées et sont étalées sur la gélose après dilutions appropriées. Un comptage du nombre ufc est réalisé après 24 heures d'incubation à 20°C. La radioactivité des solutions bactériennes est également déterminée à l'aide du compteur de radioactivité β .

Ainsi, un rapport R (cpm/ufc) est déterminé, ce rapport va permettre de mesurer l'efficacité du marquage, sachant que plus R est grand plus le marquage est efficace.

CHAPITRE 3 : ETUDES DE L'ADHERENCE DE D01 ET D41 SUR DIFFERENTS TYPES DE MATERIAUX

I. Conditionnement des matériaux utilisés

Les différents matériaux utilisés pour étudier l'adhésion des deux souches bactériennes sont :

- des lamelles de PMMA (2 cm²)(Goodfellow)
- des lamelles de polystyrène (PS) (2 cm²) (Goodfellow)
- des lamelles de polychlorure de Vinyle (PVC) (2 cm²)
- des lamelles de cellulose (2 cm²) (Goodfellow)
- des surfaces recouvertes de PHEMA (3.965 cm²) (Johnson & johnson)
- des billes de polystyrène fonctionnalisés (copolymères statistiques) (20 mg)
- des billes de verre (100 mg) (Sigma)

Selon la nature ou la forme des matériaux, différents types de conditionnement sont réalisés dans le but, d'une part de débarrasser les matériaux de leurs impuretés et d'autre part de réaliser une préparation des matériaux à l'adhésion des bactéries. Chaque type de conditionnement est détaillé ci-dessous.

1.1. Conditionnement des copolymères dérivés du polystyrène

1g de polymère est mis à gonfler 1 nuit à température ambiante sous agitation dans 50 mL d'eau pure. Le polymère est ensuite stérilisé 2 fois dans 50 mL d'éthanol pendant 12 heures. Il est ensuite lavé 8 fois pendant 1 heure avec une solution de NaCl à 36 ‰ avant d'être conservé à 4°C à une concentration de 100 mg/mL. Pour chaque expérimentation une quantité de 20 mg est utilisé.

1.2. Conditionnement du PMMA, du PVC, du PS et de la cellulose

Les films sont découpés sous forme de lamelles carrées de 2 cm² de surface. Ils sont ensuite lavés :

3 fois pendant 3 heures dans du NaCl 1,5 M,

3 fois pendant 3 heures dans de l'eau ultra-pure,

3 fois pendant 3 heures dans du NaCl à 36 ‰.

Les lamelles sont ensuite mises dans des plaques de culture 24 puits, stérilisées pendant 30 mn et enfin conservées à 4°C dans une solution de NaCl à 36 ‰ stérile.

1.3. Conditionnement des billes de verre

Pour chaque expérience, 100 mg de billes de verre sont stérilisés à l'autoclave (120 °C pendant 15 mn). Les billes sont ensuite lavées 3 fois avec une solution de NaCl à 36‰ stérile et conservées à 4°C.

1.4. Conditionnement des matériaux recouvert de HEMA

Les matériaux recouverts de hydroxyéthyl méthacrylate (HEMA) sont déjà stériles et sont utilisés en état après 2 rinçages avec une solution de NaCl à 36 ‰ stérile.

II. Adhérence des bactéries sur les différents matériaux dans différentes conditions

Une étude de l'adhésion des bactéries sur différents matériaux est réalisée dans différentes conditions afin de déterminer si la pré-adsorption, ainsi que le temps de pré-adsorption de matières organiques sur la surface modifie cette adhésion.

Pour ce faire, les cultures sont réalisées soit en phase exponentielle, soit en phase stationnaire de prolifération. Les matériaux sont conditionnés dans les milieux suivants :

- Milieu tampon sans matière organique (NaCl ou eau de mer artificielle)
- Bouillon marin (Marine broth)
- Eau de mer naturelle (Fournie par Ifremer, TMSI)
- Plasma humain
- Solution d'albumine bovine (0,4 g/L)

Dans le cas des études d'adhésion en milieu sans matière organique, les échantillons (lamelles ou billes) sont utilisés directement sans traitement préalable, à l'exception de ceux nécessaires pour leur conditionnement et leur stérilisation.

L'étude de l'adhésion des bactéries en milieu bouillon marin, eau de mer naturelle est effectuée en utilisant le même protocole : L'échantillon est incubé avec 1 ml de solution pendant 2h à 20°C sous agitation puis il est lavé par une solution saline (NaCl 36‰ pour D01 et ASW 26‰ pour D41) et incubé avec les bactéries marquées pendant 2h sous agitation)

Ainsi, pour déterminer les différents temps d'incubation des solutions avec les matériaux ainsi que des matériaux avec les bactéries, une série de cinétiques d'adsorption et d'adhésion est réalisée.

La détermination de bactéries adhérentes est réalisée par comptage radioactif comme décrit précédemment.

Dans le cas du plasma humain, un protocole similaire est utilisé à température ambiante.

Enfin, dans le cas du traitement par l'albumine bovine, les échantillons sont incubés avec 1 ml d'albumine à 0,4 g/L, pendant 45 minutes à température ambiante sous agitation. Puis, ils sont lavés par le milieu choisi (NaCl 36‰ pour D01 et ASW 26‰ pour D41) et mis en contact avec les bactéries comme précédemment.

PARTIE III
RESULTATS ET DISCUSSION

INTRODUCTION

Nous avons décrit dans la revue critique des données publiées, le problème posé par la formation des biosalissures sur les matériaux immergés en milieu marin. Actuellement, les moyens utilisés pour réduire l'entretien des surfaces immergées sont les peintures anti-salissures, cependant ces peintures efficaces les premiers temps contiennent des substances toxiques qui sont relargées dans la mer. De ce fait, de nouvelles réglementations vont interdire l'utilisation de ce genre de peinture.

Un axe biotechnologique majeur est la conception de nouveaux revêtements (peintures, vernis...) dits «*antisalissures*» destinés à protéger les structures et appareils immergés en eau de mer. Une étude générale est menée depuis quelques années par le Service Matériaux et Structures de l'IFREMER (Brest) pour, d'une part étudier les phénomènes de corrosion d'origine biologique, d'autre part comprendre les mécanismes de la formation des biofilms bactériens, afin de prévenir ou de ralentir leur développement.

Afin de mettre au point une technologie permettant de protéger les revêtements destinés à être immergés en eau de mer, nous avons émis l'hypothèse suivante : des copolymères élaborés selon le principe « J et J » émis par Josefonicz et Jozefowicz possèdent à leur surface des sites particuliers capables d'interagir spécifiquement avec des molécules du système vivant.

En vue de tester cette hypothèse, nous avons mis en œuvre une stratégie d'étude qui consiste à identifier des copolymères statistiques susceptibles d'empêcher ou de ralentir l'adhésion de bactéries marines initiatrices de biosalissures marines et d'en décourager la prolifération. Ces copolymères modèles présentant les meilleures activités peuvent servir plus tard à la conception des revêtements nouveaux.

Pour ce faire, nous avons entrepris de tester l'adhésion bactérienne directe et médiée sur des matériaux témoins hydrophobes et hydrophiles sous forme de film ou de billes ainsi que des copolymères statistiques sous forme de microsphères.

Cette partie « résultats et discussion » est divisée en trois chapitres.

Le premier chapitre est consacré à la synthèse des copolymères statistiques ainsi qu'à leur caractérisation. Le but est de synthétiser une bibliothèque de copolymères

statistiques insolubles à partir de polystyrène fonctionnalisé avec des acides aminés ou dérivés représentatifs de fonctions chimiques pertinentes (aliphatique, aromatique, alcool, acide, basique...).

Le deuxième chapitre est consacré d'une part à l'étude des paramètres de prolifération afin de définir les paramètres de culture permettant d'obtenir des proliférations contrôlées (reproductibles) de deux souches isolées du milieu naturel, et représentatives des bactéries retrouvées dans les biosalissures. D'autre part, il s'intéresse à l'étude des paramètres du marquage métabolique liés aux souches bactériennes afin d'établir un protocole de marquage métabolique radioactif des bactéries et permettre ainsi la mesure des populations adhérentes.

Enfin, le troisième chapitre a pour sujet l'étude de l'adhérence des bactéries proprement dite. Ainsi, les étapes proposées sont :

- La mise au point d'une méthodologie pour mesurer l'adhésion et la prolifération de deux souches de bactéries pionnières de l'adhésion sur les familles de copolymères statistiques constituant la bibliothèque de résines.
- La sélection des matériaux qui modulent l'adhésion et la prolifération des souches dans les conditions choisies.

La bibliothèque «polystyrène substitué» est donc constituée d'autant de familles que de substituants (résidus d'acides aminés ou de leurs esters méthyliques), chaque famille comprenant autant de membres que de taux de substitution en acides aminés ou dérivés.

L'adhésion bactérienne pour chaque membre de la famille est analysée, (mise en présence de cultures standardisées de souches bactériennes pertinentes), et les différences dans les populations bactériennes adhérentes seront comparées entre chaque membre, par rapport à des compositions témoins (autres polystyrènes substitués), et en fonction de leur différence de comportement dans le milieu (le taux de gonflement et donc la surface accessible aux bactéries varie selon la composition de chaque résine). Les meilleures «compositions» sont retenues, caractérisées (constantes d'affinité, capacités maximales de liaison...), et étudiées en fonction du type d'interaction (directe ou médiée par une protéine de liaison) existant entre les matériaux et les bactéries. Les caractéristiques d'adhésion de ces polymères sont déterminées et doivent permettre de définir le type d'interaction (directe ou médiée par une ou plusieurs protéines de liaison) mise en jeu dans l'interaction. Ceci peut

nous conduire à définir les conditions pour obtenir un matériau qui diminue l'adhésion des bactéries marines.

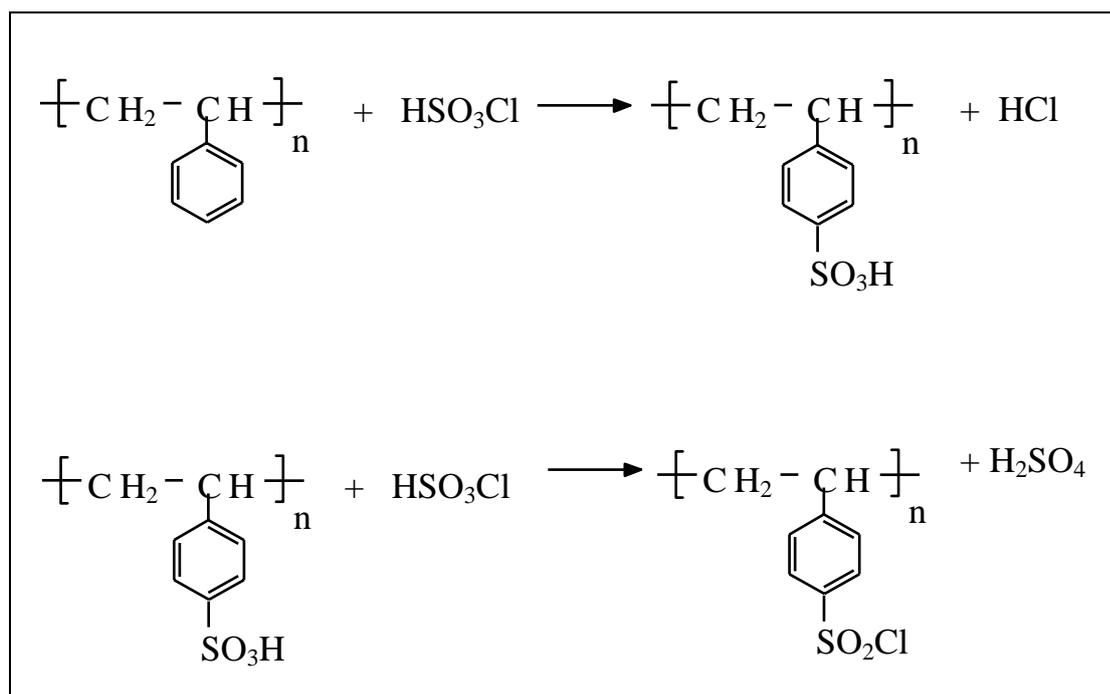


Figure 21 : La réaction de chlorosulfonation

CHAPITRE 1 : LA SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES COPOLYMERES STATISTIQUES A BASE DE POLYSTYRENE

Huit familles de copolymères statistiques substitués par des acides aminés, un copolymère statistique substitué par l'éthanolamine et le polystyrène sulfonate de sodium sont synthétisées et étudiées.

I. La synthèse

La fonctionnalisation de polystyrène par des fonctions chimiques diverses (ici, des résidus de L-acides aminés et ester mono ou di-méthyle d'acides aminés) s'opère dans des conditions de synthèse déterminées. Le matériau de départ se présente sous forme de billes insolubles (le polystyrène est réticulé à 3% de divinylbenzène), d'un diamètre compris entre 35 et 75 μm à l'état sec. La fonctionnalisation de ces polymères s'effectue selon une réaction en trois étapes dont la première est la chlorosulfonation du polystyrène en présence d'acide chlorosulfonique qui conduit au dérivé polychlorosulfonyle. Ce dérivé est un intermédiaire de synthèse, son hydrolyse basique conduit à l'obtention des différents poly (styrène sulfonate de sodium) et sa condensation avec les résidus ester mono ou di-méthyle d'acides aminés suivie d'une hydrolyse basique conduit à l'obtention des poly (styrène sulfamide d'acide aminé). La synthèse ainsi le matériel est décrit dans le chapitre matériels et méthodes

1.1. La chlorosulfonation

La réaction de chlorosulfonation (Figure 22) des billes de polystyrène (PS) est réalisée en milieu anhydre. Elle se traduit par la substitution nucléophile des groupements phényles du polystyrène par des groupements chlorosulfonyle (SO_3Cl). Le poly (parachlorosulfonyle styrène) (PSSO_2Cl) est obtenu en deux étapes et nécessite deux équivalents d'acide par unité de styrène.

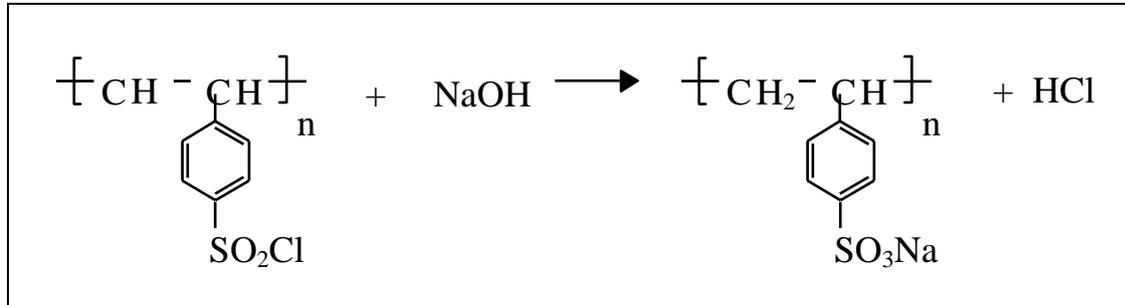


Figure 22 : La synthèse du PSSO₃Na par hydrolyse basique du PSSO₂Cl

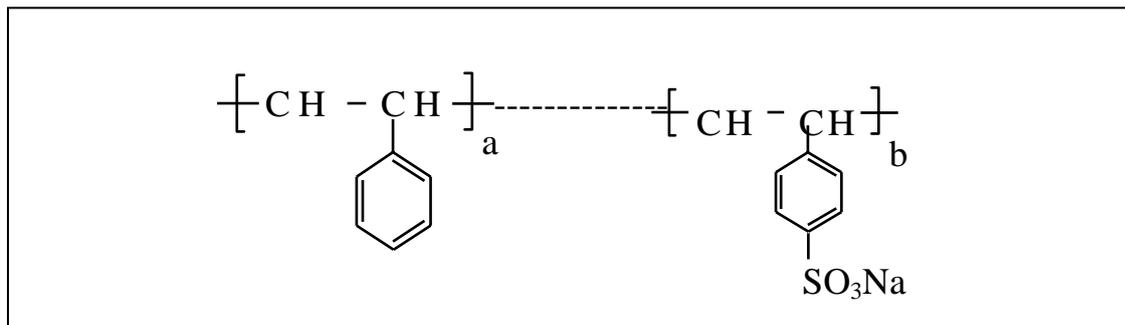


Figure 24 : La structure du polystyrène sulfonate de sodium

En effet, la première molécule d'acide chlorosulfonique va transformer le PS en PS-SO₃H avec un dégagement d'acide chlorhydrique et la deuxième molécule va transformer le PS-SO₃H en PS-SO₂Cl avec un dégagement d'acide sulfurique. Des études réalisées antérieurement ont montré qu'un large excès de 10 moles d'acide chlorosulfonique est nécessaire pour obtenir un rendement de chlorosulfonation maximum. (Berger, 2001)

1.2. Le polystyrène sulfonate de sodium

Le produit obtenu, le chlorure de polystyrène sulfonate (PSSO₂Cl) est assez instable, puisque les fonctions -Cl sont rapidement hydrolysées par les molécules d'eau contenues dans l'air. C'est la raison pour laquelle la résine est conservée dans le dichlorométhane.

Le PSSO₂Cl est immédiatement hydrolysé par une solution de soude 10⁻² M pour obtenir le polystyrène sulfonate de sodium (PSSO₃Na) (Figure 23).

La réaction de chlorosulfonation n'étant pas totale, on obtient de fait un copolymère statistique composé de motifs styrènes et styrènes sulfonate de sodium (figure 24). En effet, seule une partie des motifs styrènes est transformée en fonction parachlorosulfonyl styrène. De ce fait, seuls ces motifs sont hydrolysés en styrène sulfonate de sodium.

Le taux de soufre, déterminé par l'analyse élémentaire, nous permet de déterminer la composition du copolymère. L'analyse élémentaire du chlore, permet de vérifier l'efficacité des lavages.

1.3. Le polystyrène sulfamide d'ester méthylique d'acide aminé

Comme nous l'avons vu pour le PSSO₃Na, le PSSO₂Cl est très instable, il est rapidement utilisé pour la condensation avec l'ester méthylique de l'acide aminé.

Les dérivés d'acides aminés sont sous la forme chlorhydrate de leur ester méthylique, de ce fait, ils sont pour la plupart solubles dans le dichlorométhane.

Ainsi l'utilisation de la forme ester méthylique permet de diriger la réaction. Le but étant de faire réagir la fonction $-NH_2$ avec la fonction $-SO_2Cl$ et afin d'éviter les réactions parasites entre les fonctions $-COOH$ et $-SO_2Cl$ les fonctions carboxyliques sont « protégées » par la fonction $-CH_3$.

Les acides aminés choisis pour la substitution sont présentés dans le tableau 4.

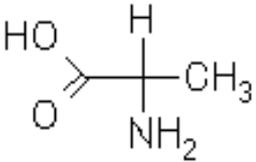
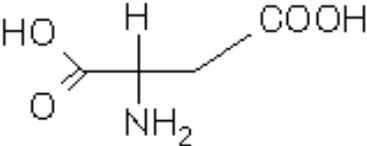
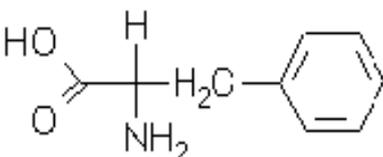
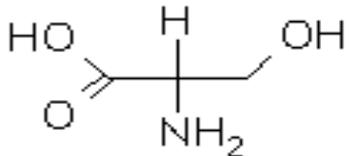
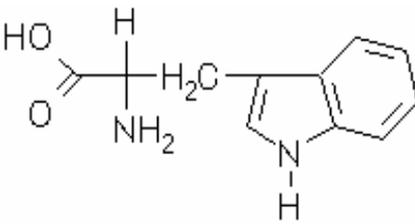
Nom	Formule	Propriétés et nature du groupement R
Alanine		Aliphatique non polaire, caractère hydrophobe
Acide aspartique		Carboxylate chargé négativement, caractère hydrophile
Phénylalanine		Aromatique, caractère hydrophobe
Sérine		Fonction alcool, polaire non chargé, plutôt hydrophile
Tryptophane		Fonction indole, caractère hydrophobe

Tableau 4: Les acides aminés utilisés pour la substitution.

La leucine, la phénylalanine et le tryptophane possèdent des propriétés hydrophobes. L'acide aspartique présente un caractère plutôt hydrophile alors que son ester méthylique est plutôt hydrophobe.

Le PSSO₂Cl réagit en milieu anhydre avec les fonctions amines de l'acide aminé. Cette réaction de condensation est réalisée en présence d'un excès de triéthylamine qui piège l'acide chlorhydrique libéré pendant la réaction.

La réaction de condensation de l'acide aminé n'est pas totale et après une hydrolyse à la soude 10⁻² M on obtient un copolymère comportant des motifs styrène, styrène sulfonate de sodium et styrène sulfamide d'ester méthylique d'acide aminé. (Figure 25).

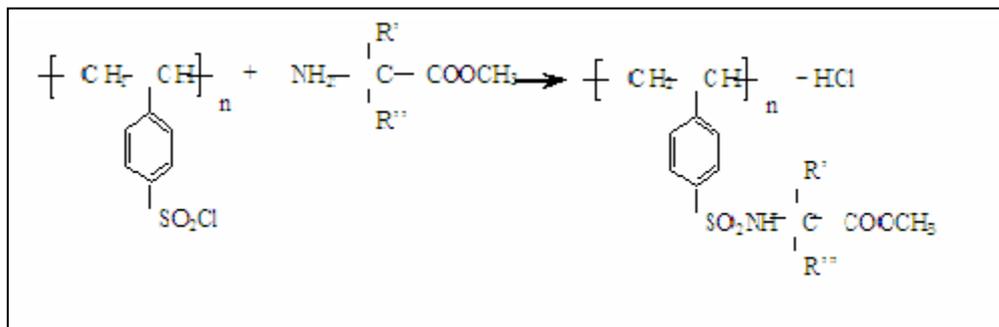


Figure 25 : Polystyrène sulfamide d'ester méthylique d'acide aminé

L'analyse élémentaire du soufre et de l'azote permet de déterminer le taux de soufre et de l'azote, et la composition en motifs des copolymères. Comme pour le PSSO₃Na, le taux de motifs en styrène dépend du rendement de la chlorosulfonation. L'analyse élémentaire du chlore, qui doit donner un taux de chlore très faible, permet de vérifier si les lavages avec la solution de soude sont suffisants.

1.4. Le polystyrène sulfamide d'acide aminé

La condensation de l'acide aminé est réalisée en utilisant un protocole similaire. Ce copolymère est obtenu par hydrolyse forte des polystyrènes sulfamide d'ester méthylique d'acide aminé. L'hydrolyse est effectuée par des lavages successifs avec une solution de soude de concentration croissante de 10⁻² M à 2M. La réaction et le copolymère obtenu sont représentés sur la figure 26.

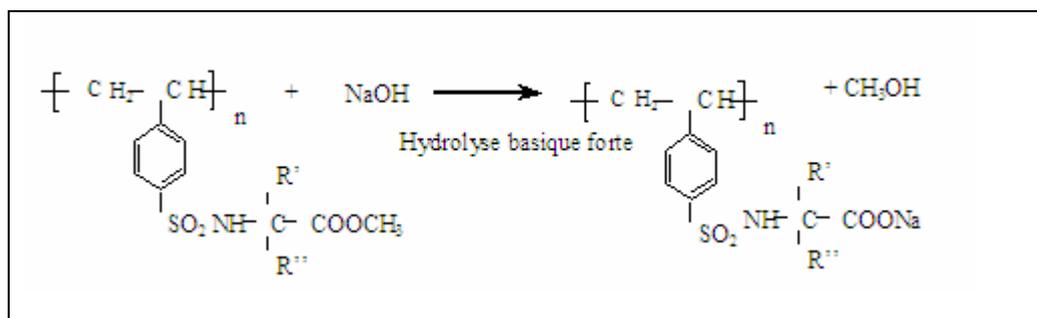


Figure 26: Synthèse du polystyrène sulfamide d'acide aminé

Comme pour le polystyrène sulfamide d'ester méthylique, l'analyse élémentaire du soufre et de l'azote permet de déterminer le taux de soufre et de l'azote, et la composition en motif du polymère. La solution de soude utilisée ici étant très concentrée (2M), le taux de chlore obtenu par analyse élémentaire est très faible pour ces résines.

II. Caractérisations

Tous les polymères sont caractérisés par analyse élémentaire. En outre, la mesure du taux de gonflement des copolymères est effectuée comme indiquée dans le chapitre "matériels et méthodes".

II.1. Caractérisation chimique par analyse élémentaire

La teneur en azote (N), en soufre (S), en sodium (Na) et en chlore (Cl) déterminée par analyse élémentaire permet de définir la composition chimique de chacun des copolymères statistiques. Ainsi, selon la nature du substituant, les copolymères sont constitués des unités monomères suivantes :

- Polystyrène non substitué (PS)
- Polystyrène sulfonate de sodium (PSSO₃Na)
- Polystyrène sulfamide d'acide aminé (PSSO₂AA) ou d'éthanolamine (PSSO₂OH)
- Polystyrène sulfamide d'ester méthylique d'acide aminé (PSS₂AAoMe)

Les différents motifs monomériques dans la structure macromoléculaire résultant de la synthèse des copolymères statistiques sont les suivants :

STYRENE

STYRENE SULFONATE DE SODIUM

STYRENE SULFAMIDES D'ACIDE AMINES CHOISIS

sous forme de sel sodé (R2 = résidu , R1 = Na), de monométhylester (R2 = résidu , R1 = Me) ou de diméthylester (R2 = résidu avec carboxylate méthylié , R1 = Me) (Figure 27)

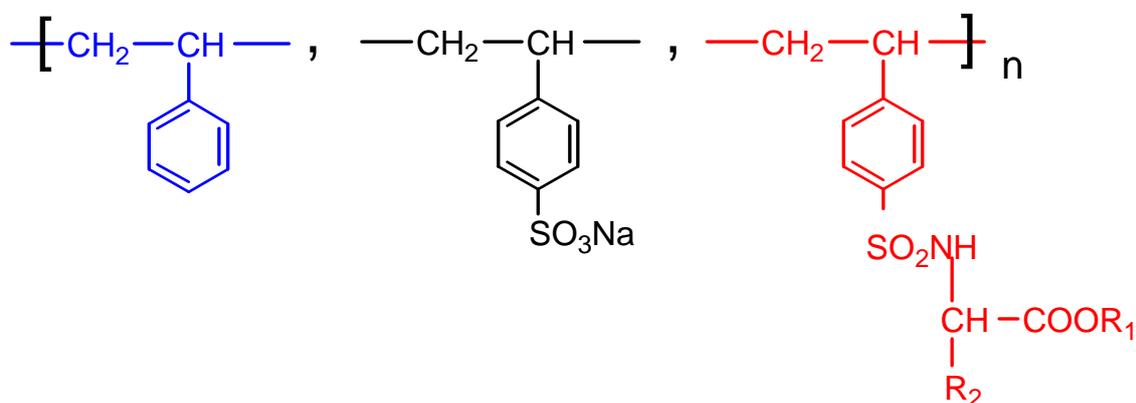


Figure 27 : Structure générale d'un copolymère statistique à base de polystyrène

Une bibliothèque de copolymères statistiques a été constituée en collaboration avec D. Fourreau, Z. Fadli, E. Goncalves, Z. El Khadali, T. Brahmi

Huit familles de copolymères avec plusieurs taux de substitution ont été synthétisées et les acides aminés utilisés sont les suivants : la phénylalanine (Phe) et son ester méthylique (PheMe), la serine (Ser), le tryptophane (Trp), l'alanine (Ala) et son ester méthylique (AlaMe), l'acide aspartique (Asp) et son ester méthylique (AspMe).

Les polystyrènes sulfonates de sodium (Na) et sulfamide d'éthanolamine (Eth) sont synthétisés avec un taux de substitution maximum.

II. 1. 1. Synthèse de PSSO₂Phe, PSSO₂PheMe, PSSO₂Ser, PSSO₂Trp, PSSO₂Ala, PSSO₂AlaMe et PSSO₂Eth

Une première série de synthèse de polymères biospécifiques a été réalisée à température ambiante avec un temps de chlorosulfonation de 35 minutes. Les familles synthétisées avec ce protocole sont les suivantes :

- Le PSSO₂Phe
- Le PSSO₂PheMe
- Le PSSO₂Ser
- Le PSSO₂Trp
- Le PSSO₂Ala
- Le PSSO₂AlaMe
- Le PSSO₂Eth

La composition finale du produit est représentée par : PS_x SO_{2y} AA_z

Où x est le pourcentage de motifs styrène

y est le pourcentage de motifs styrène sulfonate

z est le pourcentage de motifs styrène sulfamide d'acide aminé, acide aminé méthyle ester ou d' ou d'éthanolamine.

Les compositions de ces polymères exprimées en milliéquivalents de l'élément dosé par analyse élémentaire par gramme de polymère et en pourcentage d'unités monomères sont regroupées dans les tableaux 5 à 11.

Polymères	Analyse élémentaire		Composition (% motifs)		
	S(meq/g)	N (meq/g)	PS	-SO ₃ Na	- SO ₂ AA
Phe 6	13,10	0,43	21	73	6
Phe 14	12,30	0,97	21	65	14
Phe 20	11,18	1,37	27	53	20
Phe 33	9,28	2,11	37	30	33
Phe 36	10,11	2,16	27	37	36
Phe 53	9,20	2,90	26	21	53
Phe 60	9,32	3,02	21	19	60
Phe 67	9,15	3,31	18	15	67

Tableau 5 : Polystyrènes sulfamide de phénylalanine

Polymères	Analyse élémentaire		Composition (% motifs)		
	S(meq/g)	N (meq/g)	PS	-SO ₃ Na	- SO ₂ AA
PheMe 8	12,44	0,63	28	64	8
PheMe 16	11,74	1,16	28	56	16
PheMe 25	11,10	1,70	28	47	25
PheMe 37	10,97	2,26	21	42	37
PheMe 47	9,97	2,77	26	27	47
PheMe 47	8,89	2,89	36	17	50

Tableau 6 : Polystyrènes sulfamide d'ester méthylique de phénylalanine

Polymères	Analyse élémentaire		Composition (% motifs)		
	S(meq/g)	N (meq/g)	PS	-SO ₃ Na	- SO ₂ AA
Ser 11	13,48	0,85	20	69	11
Ser 16	13,03	1,14	22	62	16
Ser 33	13,32	2,14	11	56	33
Ser 29	10,69	2,19	38	33	29
Ser 28	9,86	2,21	46	26	28
Ser 33	9,51	2,59	47	20	33

Tableau 7 : Polystyrènes sulfamide de sérine

Polymères	Analyse élémentaire		Composition (% motifs)		
	S(meq/g)	N (meq/g)	PS	-SO ₃ Na	- SO ₂ AA
TrpMe 7	10,80	0,54	40	53	7
TrpMe 19	11,87	1,18	18	63	19
TrpMe 21	9,89	1,44	36	43	21
TrpMe 33	9,64	1,96	29	36	33
TrpMe 46	10,16	2,34	13	41	46
TrpMe 57	9,62	2,68	11	32	57

Tableau 8 : Polystyrènes sulfamide d'ester méthylique de tryptophane

Polymères % théorique	Analyse élémentaire		Composition (% motifs)		
	S(meq/g)	N (meq/g)	PS	-SO ₃ Na	- SO ₂ AA
Ala 1	12,13	0,07	35	64	1
Ala 2	13,44	0,16	23	75	2
Ala 5	12,66	0,38	29	66	5
Ala 11	11,73	0,92	36	53	11
Ala 13	9,91	1,13	50	37	13
Ala 32	12,53	2,27	22	46	32
Ala 43	12,62	2,89	18	39	43
Ala 46	11,65	3,19	27	27	46
Ala 53	11,75	3,57	24	23	53

Tableau 9 : Polystyrènes sulfamide d'alanine

Polymères	Analyse élémentaire		Composition (% motifs)		
	S(meq/g)	N (meq/g)	PS	-SO ₃ Na	- SO ₂ AA
AlaMe 3	12,72	0,23	29	68	3
AlaMe 6	14,12	0,44	13	81	6
AlaMe 8	12,34	0,61	32	60	8
AlaMe 20	13,26	1,36	16	64	20
AlaMe 26	12,46	1,85	23	51	26
AlaMe 33	11,99	2,34	25	42	33
AlaMe 48	12,32	3,02	15	37	48
AlaMe 55	12,17	3,42	14	31	55

Tableau 10 : Polystyrènes sulfamide d'ester méthylique d'alanine

Polymères	Analyse élémentaire		Composition (% motifs)			Taux de gonflement
	S(meq/g)	N (meq/g)	PS	-SO ₃ Na	- SO ₂ OH	
PSSO ₂ eth	13,12	5,27	16	6	76	12 %

Tableau 11 : Polystyrène sulfamide d'éthanolamine

Dans tous les cas le chlore est retrouvé à l'état de trace, c'est-à-dire inférieur à 0,2 mg pour 100g.

Les études réalisées ultérieurement au LRM (Z. Fadli 2000, R. Siali-Lakhiari 1997, M.C. Berger 2001, J. Crépinior 2000) ont montré que les pourcentages de substitution dépendent de deux paramètres : Le rendement de la chlorosulfonation et le rendement de la condensation de l'acide aminé. Le rendement de la condensation de l'acide aminé dépend de la quantité, de la solubilité de l'acide aminé dans le dichlorométhane et des conditions de la réaction.

Dans un premier temps, nous allons comparer les rendements de la chlorosulfonation dans les conditions expérimentales choisies. Le pourcentage d'unités styrène ainsi que le rendement de la chlorosulfonation de chacune des familles sont présentés dans le tableau 12.

Familles de polymères	Pourcentage d'unités styrène %	Rendement de la chlorosulfonation %
PSSO ₂ Phe	25 ± 6	75 ± 6
PSSO ₂ PheMe	28 ± 8	72 ± 8
PSSO ₂ Ser	31 ± 15	69 ± 15
PSSO ₂ TrpMe	25 ± 12	75 ± 12
PSSO ₂ Ala	29 ± 10	71 ± 10
PSSO ₂ AlaMe	21 ± 8	79 ± 8

Tableau 12 : Pourcentage d'unités styrène et rendement de la chlorosulfonation de chaque famille

L'ensemble des résultats montre que le pourcentage d'unités styrène (PS) non substitués varie, non seulement au sein d'une même famille, mais également d'une famille à l'autre. Ainsi, le rendement peut passer de 69 % à 79% avec des écarts types très importants (plus de 10%), révélant ainsi une chlorosulfonation difficilement reproductible. Cette irréproductibilité est liée aux conditions expérimentales, comme le temps de réaction de la chlorosulfonation ou bien la quantité d'acide chlorosulfonique utilisée, ou encore la température de cette réaction. Ceci pose un problème majeur, en effet, un rendement de moins de 70% agit directement sur le rendement de la condensation, qui va se révéler très faible.

Les taux de substitution en dérivés d'acide aminé, sous forme acide ou ester méthylique, obtenus pour chacune des familles varient. (Tableau 13).

Familles de polymères	Taux de substitution en acides aminés %
PSSO ₂ Phe	6 à 67
PSSO ₂ PheMe	8 à 50
PSSO ₂ Ser	11 à 33
PSSO ₂ TrpMe	7 à 57
PSSO ₂ Ala	1 à 53
PSSO ₂ AlaMe	3 à 55

Tableau 13 : Taux de substitution en acides aminés des chacune des familles

Dans le meilleur des cas, ce taux maximum de substitution est de 67%. Ce taux est atteint avec un rendement de chlorosulfonation de 82%. Ceci permet à nouveau de mettre en évidence l'importance d'un rendement de la chlorosulfonation élevé et reproductible.

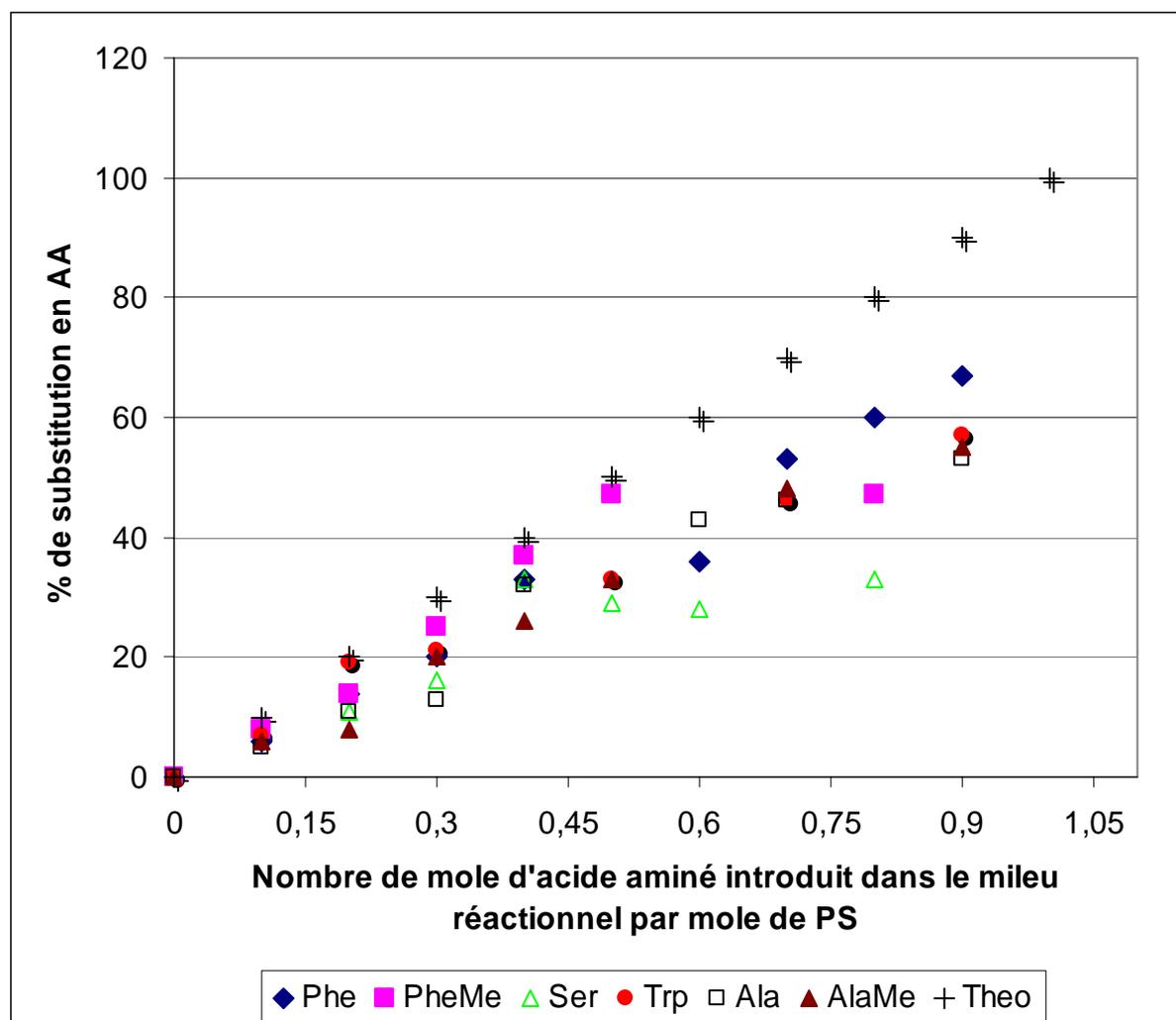


Figure 28 : Pourcentage de substitution en acide aminé en fonction du nombre de moles d'acides aminés introduit dans le milieu réactionnel.

La figure 28, représente les rendements de la réaction de condensation de l'acide aminé obtenus pour chaque famille de polymères préparés. Ainsi, pour une faible quantité d'acide aminé (0,4 mole) introduit, le pourcentage de substitution en acides aminés se rapproche du pourcentage théorique (« Theo » sur la courbe). Par contre,

dès que la quantité d'acides aminés introduite est augmentée, le pourcentage de substitution est plus faible (s'éloignant ainsi de la courbe théorique).

Ce phénomène est vraisemblablement lié à la différence de solubilité des différents acides aminés dans le solvant (dichlorométhane), mais aussi au rendement de la chlorosulfonation. Ceci est visible dans le cas des résines substituées par la sérine, où on observe un taux de substitution qui plafonne à 30%, avec un rendement de chlorosulfonation qui varie de 80% à 50%.

Cependant, le rendement de la chlorosulfonation n'est pas le seul paramètre à prendre en compte pour un rendement maximal de substitution. Il faut aussi tenir compte de la solubilité de l'acide aminé dans le dichlorométhane. Si on prend l'exemple des polymères substitués par le tryptophane, on remarque que pour une quantité élevée d'acide aminé introduit, le rendement de la condensation n'est que de 57%, alors qu'il aurait dû être théoriquement de 89%, équivalent au rendement de la chlorosulfonation pour ce copolymère à savoir 89%. En effet, 89% des motifs PS sont chlorosulfonés et sont donc susceptibles de réagir avec l'acide aminé. Le même phénomène est observé dans le cas du polystyrène sulfamide de l'ester méthylique d'alanine substitué à 55%.

Nous avons cherché à améliorer le protocole de synthèse de deux manières. D'une part, en augmentant la durée de la chlorosulfonation, qui passe de 35 minutes à 1h30, d'autre part, en réalisant la réaction à une température constante et contrôlée de 40°C.

II.1.2. Synthèse des familles PSSO₂Asp, PSSO₂AspMe et PSSO₃Na

Ce nouveau protocole de synthèse est utilisé pour synthétiser la famille de polystyrène sulfamide d'acide aspartique (PSSO₂Asp), la famille de polystyrène sulfamide d'ester méthylique d'acide aspartique (PSSO₂AspMe) ainsi que le polystyrène sulfonate de sodium (PSSO₃Na).

L'ensemble des résultats concernant la composition des résines, exprimée en milliéquivalents de l'élément dosé par gramme de polymère et en pourcentage d'unités monomères est regroupé dans les tableaux 13 à 15.

Polymères	Analyse élémentaire		Composition (% motifs)		
	S(meq/g)	N (meq/g)	PS	-SO ₃ Na	- SO ₂ AA
Asp 3	13,53	0,17	20	77	3
Asp 13	12,61	0,91	20	67	13
Asp 21	11,24	1,41	25	53	22
Asp 29	10,63	1,85	24	47	29
Asp 45	10,56	2,51	18	37	45
Asp 57	9,51	3,06	22	20	57
Asp 67	9,13	3,40	21	12	67

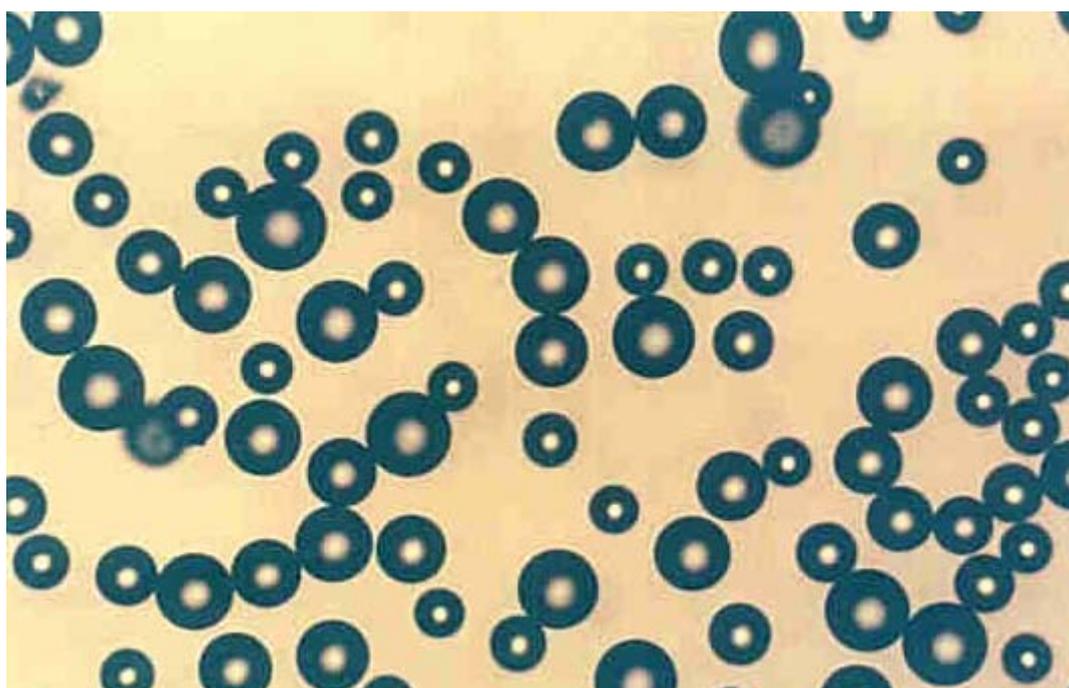
Tableau 14 : Polystyrènes sulfamide d'acide aspartique

Polymères	Analyse élémentaire		Composition (% motifs)		
	S(meq/g)	N (meq/g)	PS	-SO ₃ Na	- SO ₂ AA
AspMe 6	12,78	0,47	24	70	6
AspMe 20	12,46	1,32	17	63	20
AspMe 32	12,11	1,96	13	55	32
AspMe 42	11,28	2,42	15	43	42
AspMe 53	10,88	2,89	13	34	53
AspMe 59	10,46	3,15	14	27	59
AspMe 64	10,33	3,33	13	23	64
AspMe 72	9,82	3,63	15	13	72

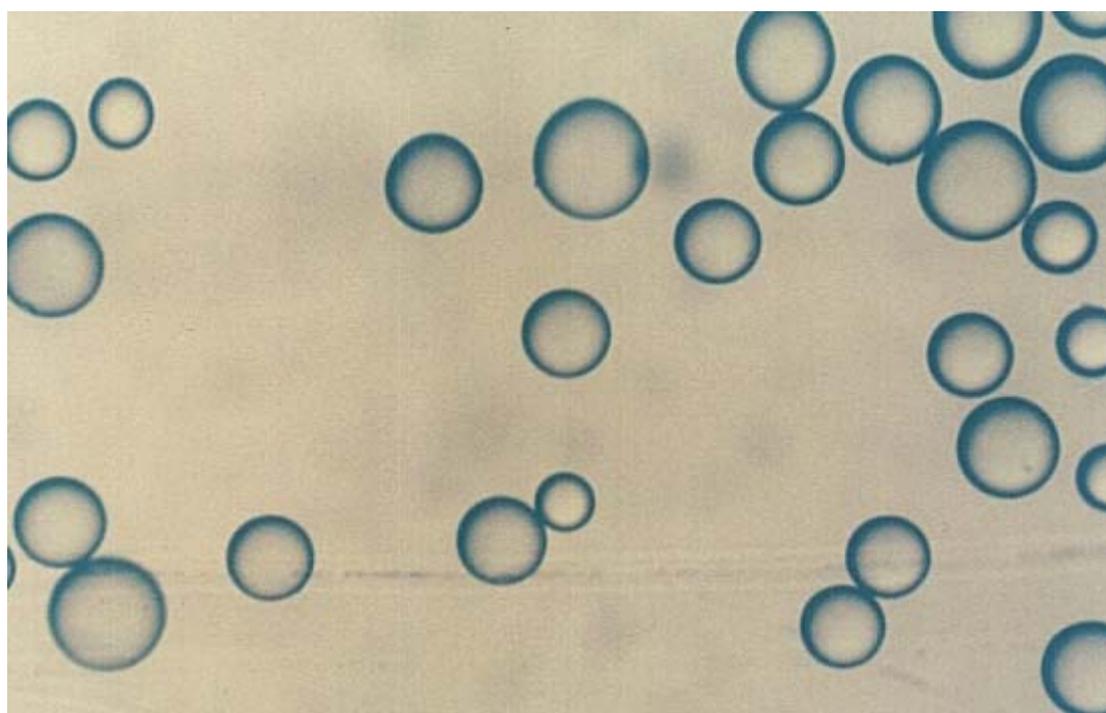
Tableau 15: Polystyrène sulfamide d'ester méthylique d'acide aspartique

Polymères	Analyse élémentaire		Composition (% motifs)			Taux de Gonflement %
	S(meq/g)	N (meq/g)	PS	-SO ₃ Na	- SO ₂ AA	
PSSO ₃ Na	14,01	/	18	82	/	150

Tableau 16 : Polystyrène sulfonate de sodium



a) Microsphères à l'état sec



b) Microsphères à l'état gonflé

Figure 29 (a, b) : Observation au microscope optique des microsphères de polystyrène réticulé à 3% de divinylbenzène (grossissement x125)

A partir des tableaux 13, 14 et 15, il est possible de calculer un rendement de la chlorosulfonation pour chaque famille de polymère. Ce rendement est de :

82 ± 2 % pour les PSSO₂Asp

84 ± 3 % pour les PSSO₂AspMe

82% pour le PSSO₃Na

On remarque que le rendement de la réaction est supérieur à 80% dans ces conditions alors qu'il était à peine de 70% dans le cas du premier protocole. La deuxième observation concerne l'écart type qui est beaucoup moins élevé (2 ou 3 %) alors qu'il était d'au moins 10% dans le cas des autres familles. Ceci, montre que les améliorations apportées au protocole permettent de mieux contrôler la réaction et la composition des produits.

L'analyse du rendement de la condensation de l'acide aminé montre que ce rendement dépend directement de la solubilisation de l'acide aminé dans le dichlorométhane. Les acides aminés utilisés ici se solubilisent relativement bien, puisque les produits obtenus montrent une gamme de substitution assez large. En effet, des taux de substitutions entre 3% et 67% pour l'acide aspartique, entre 6% et 72% pour l'ester méthylique d'acide aspartique sont obtenus.

Par ailleurs, le taux de gonflement de chaque copolymère est déterminé. Cette mesure est nécessaire, puisque les expériences d'adhérence avec les bactéries sont réalisées en milieu aqueux. Ce milieu modifie les capacités de gonflement des billes entraînant ainsi une modification de la surface accessible aux bactéries.

II.2. Taux de gonflement

Le taux de gonflement TG des copolymères statistiques est déterminé à partir de la mesure du volume total apparent des billes à l'état sec (V_{Ts}) (Figure 29a) et du volume gonflé (V_{Tg}) (Figure 29b) dans une solution saline. Il est important de réaliser cette mesure dans le milieu dans lequel le polymère va être utilisé; dans notre cas il s'agit d'une solution saline de NaCl 36 ‰.

Dans le cas de particules sphériques de même taille, le volume réel (V_r) est relié au volume mesuré (V_m) par la relation $V_r = 0,6 \times V_m$. (0,6 = 1 - 0,4 ; 0,4 étant le volume interstitiel entre les billes). Le taux de gonflement est alors calculé par la relation suivante :

$$\mathbf{TG = \tau = 0,6 (V_{Tg} - V_{Ts}) / 0,6V_{Ts} = V_{Tg} - V_{Ts} / V_{Ts}}$$

II.2.1. Résultats

Les variations du taux de gonflement des familles de polymères suivantes, Ser, Phe, Asp et AspO en fonction du taux de substitution sont reportées respectivement sur les figures 30, 31, 32, et 33. Les valeurs du taux de gonflement calculé pour le PSSO₂Eth et le PSSO₃Na sont présentées dans les tableaux 11 et 15.

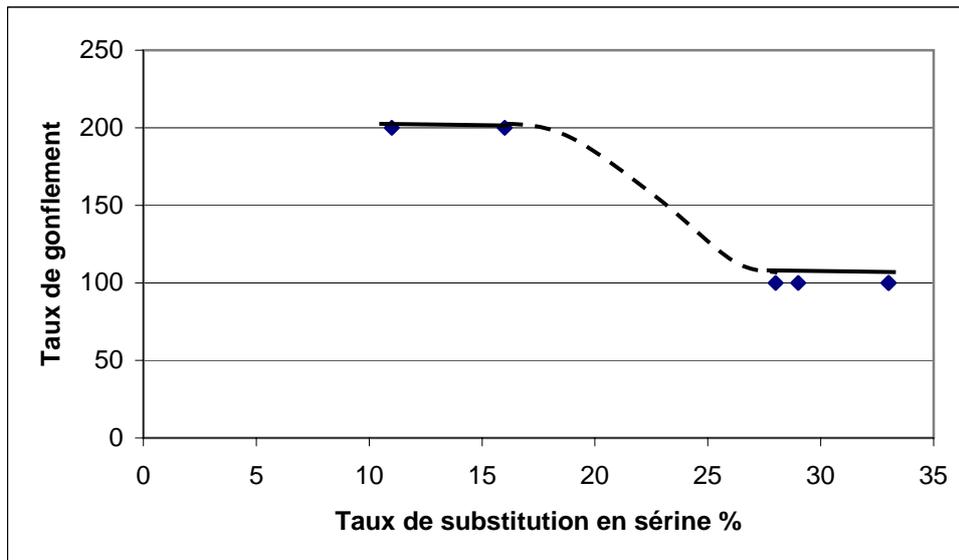


Figure 30 : Influence du taux de substitution en sérine sur le taux de gonflement (Axe des ordonnées en %)

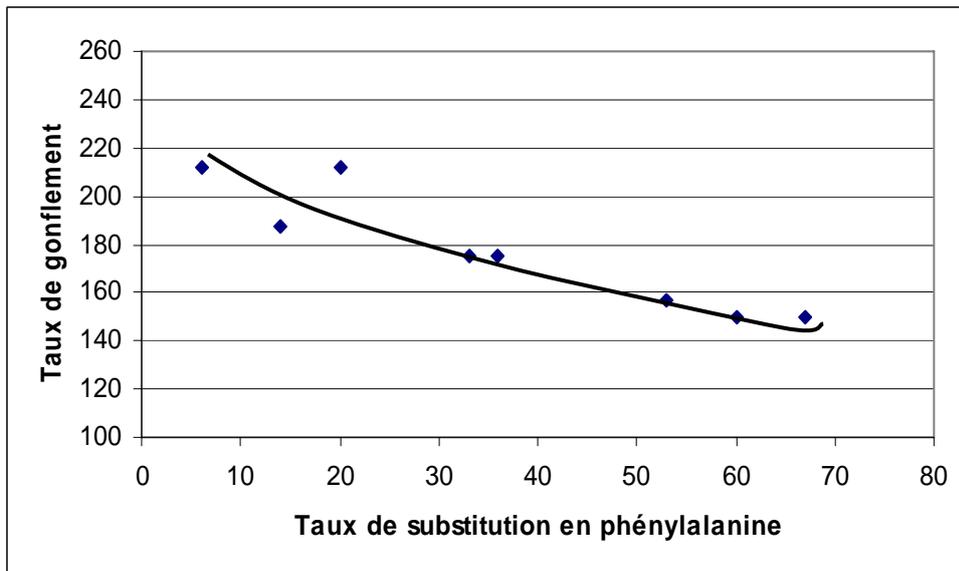


Figure 31 : Influence du taux de substitution en phénylalanine sur le taux de gonflement (Axe des ordonnées et abscisse en %)

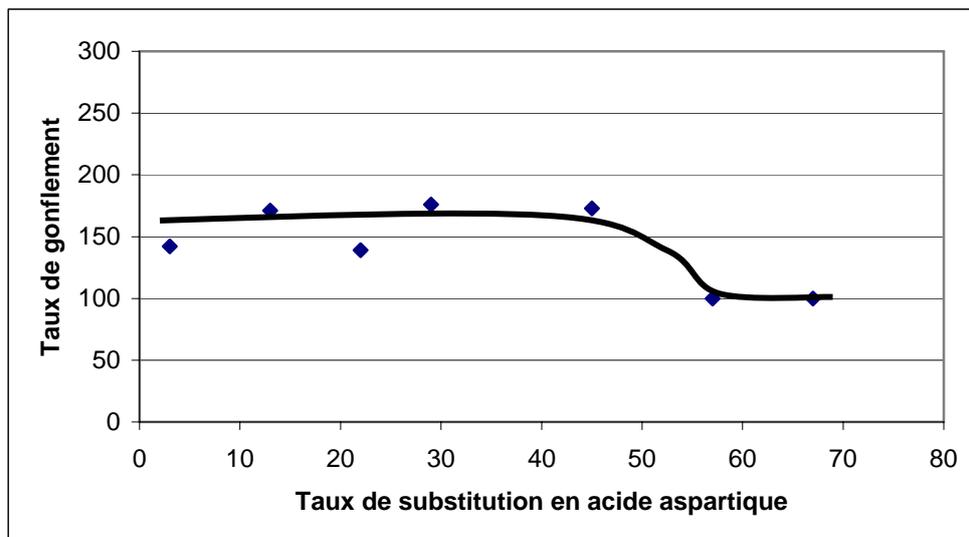


Figure 32 : Influence du taux de substitution en acide aspartique sur le taux de gonflement (Axe des ordonnées et abscisse en %)

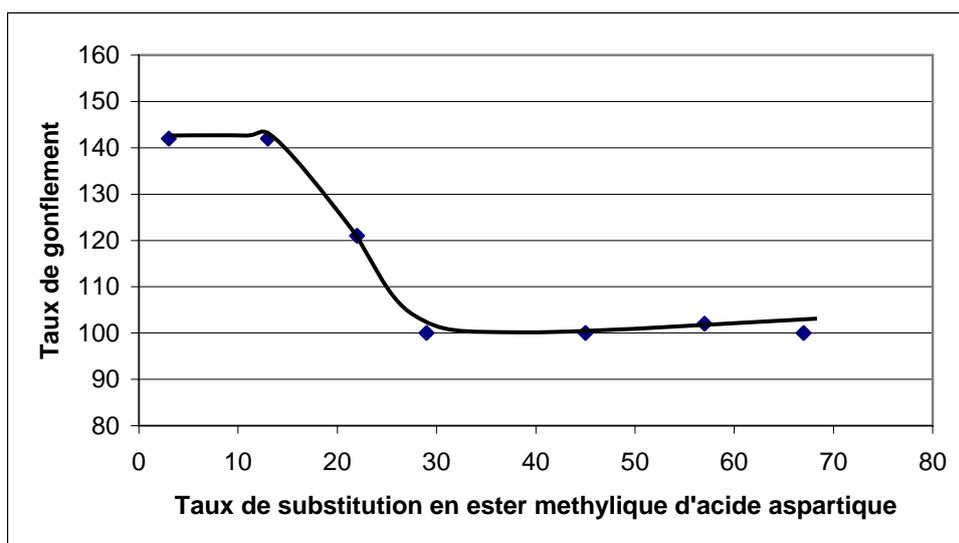


Figure 33: Influence du taux de substitution en ester méthylique d'acide aspartique sur le taux de gonflement (Axe des ordonnées et abscisse en %)

Le taux de gonflement reflète la variation du volume des billes. Il apparaît que le gonflement des billes varie de façon significative avec la nature du substituant ainsi qu'avec le taux de substitution. Pour les quatre familles présentées ici, on remarque deux zones distinctes sur les graphiques. La première qui correspond aux taux de substitutions les plus faibles présente un taux de gonflement qui varie alors que la deuxième partie (taux de substitutions élevés) montre un taux de gonflement relativement constant sauf pour la phénylalanine qui varie tout autant.

II.2.2 .Discussion

L'examen des résultats montre que le taux de gonflement peut refléter le caractère hydrophile des polymères selon la nature des acides aminés substitués.

Plus le taux de substitution augmente, plus le caractère hydrophobe diminue, ce qui entraîne une diminution du taux de gonflement.

Dans le cas du polystyrène sulfonate de sodium, ce polymère présente un taux de gonflement légèrement plus élevé que celui des polystyrènes sulfamides d'acide aspartique et ester méthylique d'acide aspartique. Ceci est sans doute lié au caractère plus hydrophile des groupements sulfonates de sodium.

Dans le cas des polystyrènes sulfamide d'acide aspartique, d'ester méthylique d'acide aspartique, de phénylalanine et de sérine, le taux de gonflement diminue lorsque le pourcentage de substitution augmente, ce qui semble montrer que l'hydrophobicité du polymère croît avec l'augmentation du taux de fixation de ces fonctions.

La variation du gonflement des billes entraîne une variation de leur surface accessible de deux façons. D'une part, la surface géométrique développée par les billes (en première approximation sphérique) varie en fonction de l'inverse du rayon des sphères. D'autre part, le gonflement entraîne la formation de porosités plus ou moins ouvertes accessibles aux protéines et/ou aux bactéries en fonction de leur diamètre.

Par voie de conséquence, la surface accessible aux bactéries varie en fonction du taux de gonflement et il est essentiel pour pouvoir comparer l'adhésion sur les différents matériaux de déterminer la surface spécifique des résines poreuses (cm^2/mg) réellement accessible aux bactéries.

II.3. Détermination des surfaces spécifiques des microsphères

Les matériaux témoins utilisés comme références (PMMA, PS, ...) sont sous forme de film et ont une surface exprimée en cm^2 . Afin de pouvoir comparer les résultats d'adhésion sur les deux formes de supports, la détermination de la surface spécifique des copolymères statistiques s'est avérée nécessaire. Pour cela, nous avons calculé la surface spécifique des microsphères en tenant compte de leur taux de gonflement. Le mode de calcul, présenté ci-dessous permet seulement une évaluation en première approximation car la distribution en taille des microsphères n'est pas connue.

Dans un premier temps, le nombre de microsphères (N) contenues dans 1 milligramme de copolymères statistiques sec, a été déterminé en utilisant le poids et est donné par la formule suivante :

$$P = 4\pi \times R_s^3 / 3 \times d \times N$$

P étant la masse

R_s est le rayon moyen des microsphères à l'état sec, dont la valeur est : $2,5 \cdot 10^{-3}$ cm (le diamètre moyen des billes à l'état sec étant compris entre 30 et 70 μm).

d est la densité propre à chaque polymère, elle est de l'ordre de 1,5.

N le nombre de billes

Cependant, compte tenu des changements survenus lors de la réaction de substitution statistique des polymères, la densité précise a été évaluée pour chaque type de polymères, en se basant sur le calcul suivant :

$$d = P/V_s$$

avec

$$V_s = 0,6 \times V_{\text{total apparent}}$$

V_s est le volume des microsphères à l'état sec, qui correspond au volume total apparent (V_{T_s}) corrigé par le facteur 0,6, qui tient compte du volume interstitiel entre les microsphères.

Ainsi, les mesures de poids et de volume du PSSO_3Na , du PSSO_3Eth , des $\text{PSSO}_2\text{Asp-o-Me}$, des PSSO_2Phe et des PSSO_2Asp permettent de déterminer les densités (ou masse volumique) de chacun de ces polymères, ce qui permet de calculer le nombre N de microsphères de polymères par milligramme de résine.

	Densité (d)	Nombre de billes (N)/ mg
$\text{PS}_{18}\text{SO}_3\text{Na}_{82}$	1,23	$1,24 \cdot 10^4$
$\text{PS}_{16}\text{SO}_{2(8)}\text{Eth}_{76}$	1,56	$9,79 \cdot 10^3$
$\text{PSSO}_2\text{Asp-o-Me}$	1,82	$8,39 \cdot 10^3$
PSSO_2Phe	1,80	$8,48 \cdot 10^3$
PSSO_2Asp	1,75	$8,73 \cdot 10^3$

Tableau 17 : Densité et nombre de microsphères dans 1mg des copolymères statistiques.

Le tableau 17 montre que le PSSO_3Na a une densité de 1,23 et celle du PSSO_2Eth légèrement supérieure est de 1,56, alors que pour les différentes familles de polymères substitués par les acides aminés les densités sont plus élevées de l'ordre de 1,80.

Ainsi compte tenu de ces densités, il apparaît que pour une masse donnée le nombre de microsphères est plus élevé pour le $\text{PS}_{18}\text{SO}_3\text{Na}_{82}$.

La surface spécifique (S) des microsphères gonflées est évaluée en utilisant la relation suivante :

$$S = 4\pi \times R_g^2 \times N$$

R_g représente le rayon des microsphères à l'état gonflé

N représente le nombre de billes contenu dans 1 mg de polymère

On calcule R_g à partir des relations sur la mesure du taux de gonflement (τ) ainsi que du volume (V) d'une microsphère.

$$\tau = V_g - V_s / V_s \times 100$$

et $V = 4\pi \times R^3 / 3$

Soit $V_{Tg} = (\tau / 100 + 1) \times V_{Ts}$

et donc $R_g = (\tau / 100 + 1)^{1/3} \times R_s$

Pour chacun des trois polymères les surfaces spécifiques sont reportées dans le tableau 18.

	Taux de gonflement (τ) %	Densité (d)	Nombre de bille / mg (N)	Surface spécifique cm^2/mg
$\text{PS}_{18}\text{SO}_3\text{Na}_{82}$	144	1,23	$1,24 \cdot 10^4$	1,78
$\text{PS}_{16}\text{SO}_{2(8)}\text{Eth}_{76}$	12	1,56	$9,79 \cdot 10^3$	0,82
$\text{PSSO}_2\text{Asp-o-Me}$	$100 < \tau < 142$	1,82	$8,39 \cdot 10^3$	$1,04 < S < 1,17$
PSSO_2Phe	$150 < \tau < 212$	1,80	$8,48 \cdot 10^3$	$1,17 < S < 1,41$
PSSO_2Asp	$160 < \tau < 260$	1,75	$8,73 \cdot 10^3$	$1,26 < S < 1,60$

Tableau 18 : Caractéristiques de PSSO_3Na , PSSO_2Eth , $\text{PSSO}_2\text{Asp-o-Me}$, PSSO_2Phe , PSSO_2Asp

Les résultats montrent que la surface spécifique de PSSO₃Na, de 1,78 cm²/mg est la plus élevée et que celle de PSSO₂Eth (0,82 cm²/mg) est la plus faible. Cette approximation, qui nous affranchit de la variation du volume des microsphères liée au gonflement, va nous permettre de comparer les différents polymères entre eux.

III. Conclusion

Dans cette première partie, le but de notre travail est de constituer une bibliothèque de copolymères statistiques. Huit familles de polymères sont synthétisées avec des gammes de substitution en acide aminé assez large, le nombre de copolymères synthétisés s'élevant à 60. Les différentes synthèses permettent d'optimiser le protocole de chlorosulfonation et de substitution en acide aminé ou dérivés.

En outre, la mesure du taux de gonflement ainsi que la détermination des densités, permet d'évaluer, en première approximation, la surface spécifique développée par chacun des polymères. Cette approximation va permettre de comparer les valeurs d'adhésion des bactéries sur les copolymères statistiques avec d'autres supports comme le verre ou le PMMA.

CHAPITRE 2 : ETUDE DES DIFFERENTS PARAMETRES LIES AUX SOUCHES BACTERIENNES

Introduction

L'objectif de notre travail est de mettre en évidence et d'étudier les interactions pouvant exister entre les bactéries marines impliquées dans la formation des biofilms et des matériaux bactériostatiques et bactériophobes. Avant d'entreprendre l'étude de l'adhérence proprement dite des bactéries, des études préliminaires sont nécessaires afin de déterminer les paramètres de prolifération, d'incorporation du traceur ainsi que des paramètres de l'adhésion. Les bactéries que nous avons sélectionnées sont nommées arbitrairement D01 et D41.

Les souches D01 et D41a utilisées dans cette étude, font partie d'une collection de 66 souches bactériennes distinctes, isolées à partir de biofilms expérimentaux. Ces souches ont été sélectionnées puis caractérisées (galeries Biolog, Api ...) par **Micromer**. La souche D01 est un *Vibrio splendidus* (avec une homologie de séquence ARN de 98,8%) et D41a est en cours d'identification (information C.Compère).

Cette sélection, proposée par le Service Matériaux et Structures de l'IFREMER de Brest, est basée sur le fait que ces deux souches sont d'une part pionnières dans l'adhésion, facilement cultivables, d'autre part de types différents puisqu'elles ont été récupérées sur des matériaux différents. En particulier, lors de l'expérimentation, il s'est avéré que D41a a une tendance à synthétiser plus d'exopolysaccharides que D01.

Dans un premier temps, une étude concernant une caractérisation phénotypique des deux souches est réalisée par l'établissement d'antibiogrammes ainsi que de profils cinétiques en milieu riche. Nous verrons par la suite une méthodologie permettant l'étude de la prolifération des deux souches dans différents milieux et la détermination d'un milieu appauvri adapté à chacune des souches.

I. Caractérisation phénotypique de D01 et D41

Les bactéries, en général, sont sensibles aux mutations intervenant dans leur génome, entraînant ainsi un ou plusieurs changements phénotypiques. Notre étude sur ces bactéries vise à mettre en évidence des interactions spécifiques entre la paroi bactérienne et des surfaces spécifiques ; ces mutations peuvent induire des erreurs dans l'interprétation des résultats d'adhérence.

Afin de remédier à ces difficultés, une étude de caractérisation sur les deux souches a été réalisée, reposant sur l'établissement d'antibiogrammes et l'étude cinétique de prolifération des deux souches en milieu riche. La sensibilité aux antibiotiques et le profil cinétique de prolifération sont deux traits phénotypiques dont l'évolution est indicative de la mutation de la souche initiale.

1.1. Etablissement d'antibiogrammes des souches D01 et D41a

L'établissement des antibiogrammes pour chaque souche va permettre de déterminer la sensibilité ou la résistance de chacune des deux souches à des antibiotiques, sélectionnés selon leur mode d'action. Par la suite, un test antibiotique peut être pratiqué régulièrement sur les réensemencements successifs à partir de souches cryo-conservées, ce qui permet de vérifier la validité des souches utilisées.

Les antibiotiques sont classés selon quatre modes d'action :

- Action sur la synthèse de l'ADN et de l'ARN, avec une action surtout bactériostatique, puisque ces antibiotiques bloquent les enzymes nécessaires à la transcription de l'ADN en ARN.
- Action sur la synthèse des protéines, avec des antibiotiques qui bloquent la traduction de l'ARN messager en protéines actives.
- Action sur la synthèse des peptidoglycanes : le peptidoglycane est l'un des constituants majeur de la structure de la paroi ; les antibiotiques agissant sur l'inhibition de sa synthèse, peuvent avoir comme résultat la lyse de la bactérie.
- Action sur la paroi bactérienne : ces antibiotiques se fixent sur la membrane externe, ce qui a pour conséquence une augmentation de la rigidité et de la perméabilité de la membrane.

Antibiotiques	Modes d'action
La pénicilline	Inhibition de la synthèse des peptidoglycanes
La streptomycine	Inhibition de la traduction des ARN messagers en protéines
Le chloramphénicol	Inhibition de la synthèse des peptidoglycanes
La kanamycine	Inhibition de la traduction des ARN messagers en protéines
La céfotaxime	Inhibition de la synthèse des peptidoglycanes
L'érythromycine	Inhibition de la synthèse des protéines
La rifampicine	Inhibition de la synthèse des ARN messenger
La vancomycine	Inhibition de la synthèse des peptidoglycanes
La tétracycline	Inhibition de la synthèse des protéines
Les sulfamides	Inhibition de la synthèse des acides nucléiques

Tableau 19 : Modes d'action des différents antibiotiques sélectionnés

Différents antibiotiques peuvent être utilisés et leur action est décrite dans le tableau 19.

Les antibiogrammes sont réalisés en utilisant la méthode des disques selon le protocole décrit dans le chapitre 'Matériels et Méthodes'.

La sensibilité des deux souches sélectionnées vis-à-vis des différents antibiotiques est déterminée (S = sensible à l'antibiotique et R = résistant à l'antibiotique) et les résultats sont reportés dans le tableau 20.

	D01	D41
pénicilline	S	R
streptomycine	S	R
chloramphénicol	S	S
néomycine	S	S
kanamycine	S	S
céfotaxime	S	S
érythromycine	S	S
fosfomycine	S	R
rifampicine	S	S
vancomycine	R	R
tétracycline	R	R
sulfamides	S	R

Tableau 20 : Sensibilité de D01 et D41 aux antibiotiques sélectionnés

Les antibiogrammes réalisés sur les souches D01 et D41 mettent en évidence les différences entre ces deux souches.

On peut distinguer trois groupes d'antibiotiques : le premier regroupe ceux auxquels les deux souches sont sensibles comme le chloramphénicol, la néomycine, la kanamycine, la céfotaxime, l'érythromycine ainsi que la rifampicine (rouge). Le deuxième groupe comprend les antibiotiques vis-à-vis desquels les deux souches sont résistantes à savoir la vancomycine et la tétracycline (bleu). Le troisième rassemble une série d'antibiotiques vis-à-vis desquels les souches réagissent de façon différente (noir).

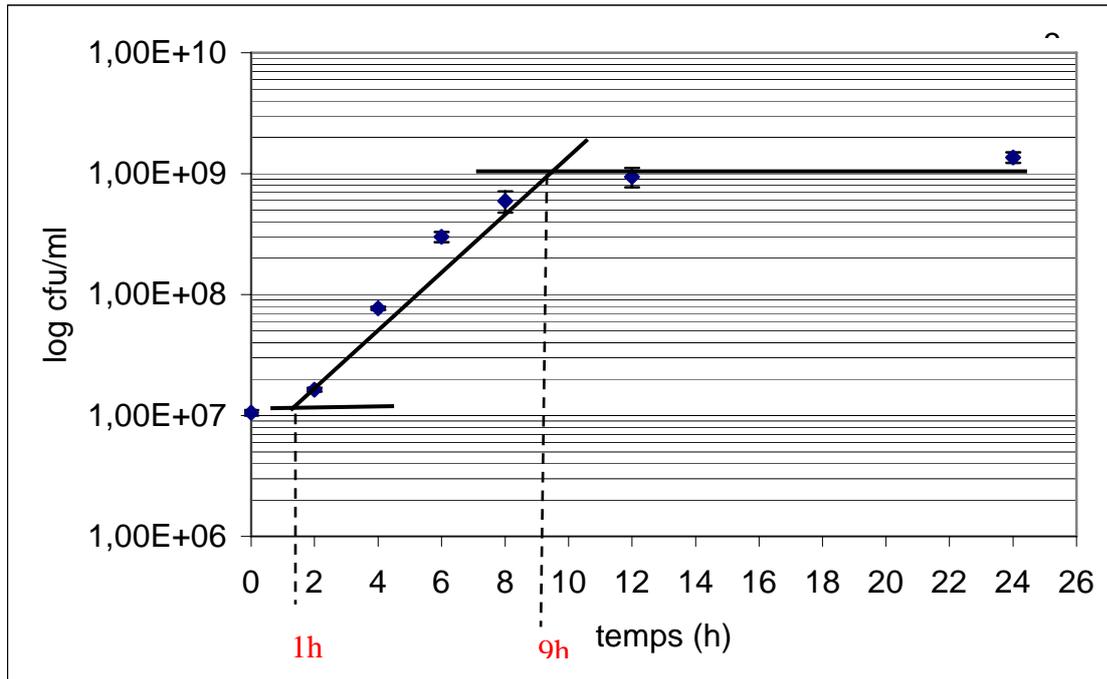


Figure 34 : Représentation semi-logarithmique de la cinétique de prolifération de D01 en marine broth, à 20°C.

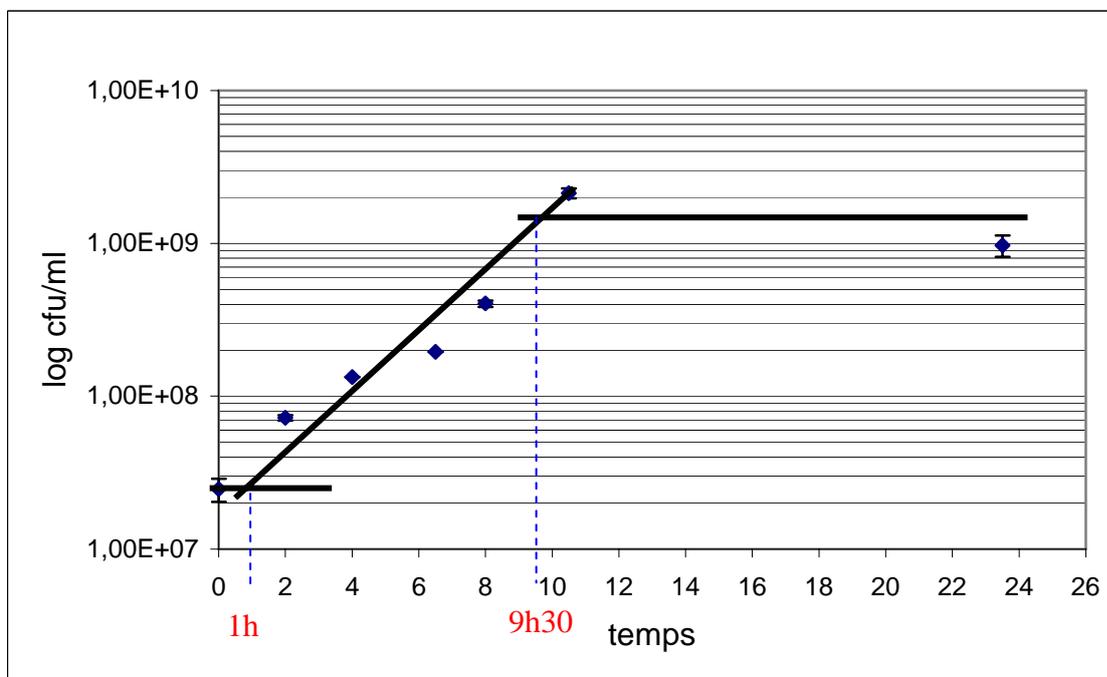


Figure 35 : Représentation semi-logarithmique de la cinétique de prolifération de D41 en marine broth, à 20°C.

1.2. Etude de la cinétique de prolifération des bactéries D01 et D41 en milieu riche

Plusieurs expériences de croissance bactérienne sont réalisées afin de déterminer les différents paramètres de prolifération des bactéries, en particulier le temps de latence, le temps de doublement, le nombre de bactéries au plateau cinétique. Ces paramètres caractéristiques de la souche, peuvent varier en fonction des conditions de l'expérience.

L'étude de la prolifération des deux souches est réalisée à 20°C, dans un milieu riche, le Marine Broth (MB), optimum pour la culture de bactéries marines.

Les résultats sont présentés sur la figure 34 pour D01 et la figure 35 pour D41.

Ces courbes de prolifération mettent en évidence, trois étapes distinctes.

- Premièrement, une période dite de latence, qui représente le temps nécessaire aux bactéries pour s'adapter aux conditions de culture. Cette période est caractérisée par un temps de latence T_l et un nombre de bactéries équivalent à celui de l'inoculum.
- Deuxièmement, une phase de croissance exponentielle pendant laquelle les bactéries se divisent de manière intensive. Cette phase est caractérisée par un temps de doublement T_d constant.
- Troisièmement, une phase dite de plateau, avec une croissance très ralentie et caractérisée par un nombre de bactéries maximal et constant. Le temps T_p pour arriver au plateau dépend des conditions de culture.

La représentation semi-logarithmique des proliférations bactérienne met en évidence ces trois étapes et permet de déterminer les caractéristiques de ces deux souches. (Figure 36).

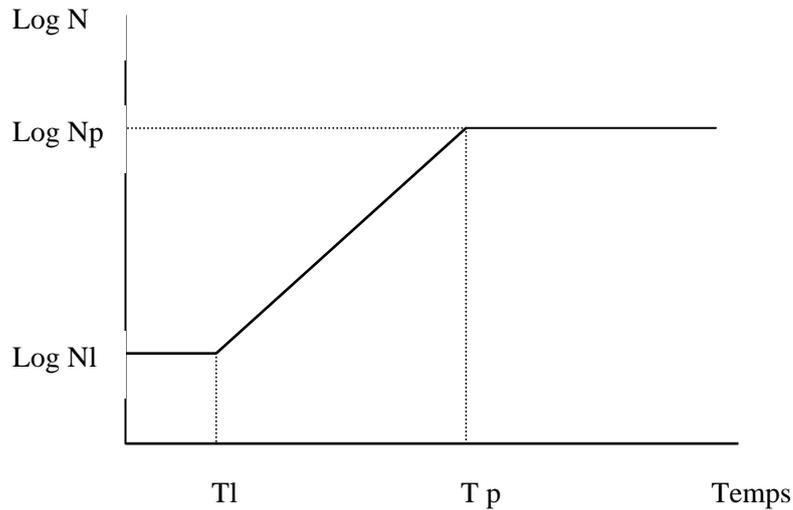


Figure 36 : Représentation semi-logarithmique classique d'une prolifération bactérienne

Dans la phase de croissance exponentielle, la variation du nombre de bactéries en fonction du temps obéit à une cinétique du 1^{er} ordre qui peut s'exprimer par la relation :

$$dN/dt = aN$$

Le temps de doublement, T_d , nécessaire à une population bactérienne pour doubler son effectif est donc tel que :

$$\log(2N/2) = a T_d$$

Le temps de doublement T_d est donc défini par la relation :

$$\text{Soit } T_d = (\log 2/a)t$$

Les valeurs des paramètres de prolifération bactérienne calculées à partir des courbes de prolifération en coordonnées semi-logarithmiques sont déterminées pour les souches D01 et D41, dans une culture en suspension (Tableau 21).

	Temps de latence (h)	Temps de doublement (h)	Durée de la phase exponentielle (h)	ufc en phase stationnaire (ufc/ml)
D01	1	1h10	8	1.10^9
D41	1	1h20	8h30	1.10^9

Tableau 21 : Paramètres de prolifération des bactéries D01 et D41 en culture en suspension dans le Marine Broth à 20°C.

Les résultats observés montrent que ces deux souches prolifèrent, en effet la quantité de bactéries de départ (inoculum) de 10^7 passe à 10^9 en l'espace de 8 heures.

Les paramètres de prolifération pour les deux souches sont sensiblement comparables. On observe, notamment, un temps de latence similaire de 1h et un nombre d'unités formant des colonies (ufc) en phase stationnaire équivalent à 1.10^9 . On observe également pour D01, un temps de doublement de 70 min correspondant à un temps de génération de $0,86 \text{ h}^{-1}$ et pour D41 un temps de doublement de 80 min correspondant à un temps de génération de $0,75 \text{ h}^{-1}$. Nous n'observons pas de différences significatives en ce qui concerne les paramètres de prolifération de ces deux souches.

Des études de prolifération cinétique ont été réalisées sur ces mêmes souches dans le Service Structures et Matériaux de l'IFREMER de Brest. Il apparaît que les résultats obtenus montrent des différences notamment en ce qui concerne les temps de génération qui sont de 0,26 pour D01 et 1,24 pour D41. Ces différences sont vraisemblablement dues au mode expérimental différent de celui utilisé dans notre laboratoire, en particulier aux quantités de milieu utilisé et à la température d'incubation.

1.3. Discussion et conclusion

Cette étude utilise des bactéries clonées et pour montrer que les caractéristiques de ces bactéries sont constantes, deux caractères de contrôle sont choisis : La sensibilité aux antibiotiques et le profil cinétique de prolifération.

Il apparaît que ces bactéries ont une sensibilité similaire à certains antibiotiques connus comme le chloramphénicol ou l'érythromycine et une sensibilité qui peut varier d'une souche à l'autre pour la pénicilline ou la streptomycine. Ces résultats permettent au cours de l'étude, de vérifier l'intégrité de chacune des souches.

L'autre caractère étudié est l'ensemble des paramètres de prolifération des bactéries. Les résultats montrent des profils cinétiques de prolifération qui ne varient pas de façon significative d'une souche à une autre. Ainsi, nous observons une phase de latence relativement courte d'1h, une phase exponentielle de 8h et un état de confluence qui est caractérisé par un plateau cinétique. Le phénotype bactérien varie selon qu'on est en phase de latence, exponentielle ou stationnaire. Ce phénomène peut avoir une influence sur l'adhésion des bactéries sur les matériaux. Par conséquent, l'étude de l'influence de la variation de l'état physiologique sur l'adhésion bactérienne sera étudiée plus loin dans le manuscrit.

II. Etude de la prolifération de D01 et D41 dans différentes conditions

L'étude des paramètres de la prolifération des deux souches est réalisée dans différents milieux : le bouillon marin (MB), l'eau de mer naturelle (EM), l'eau de mer artificielle (ASW), une solution de NaCl et à plusieurs températures (12°C, 20°C et 35°C). Ces températures, choisies de façon arbitraire, permettent de déterminer la température optimale de chacune des souches.

L'étude cinétique est réalisée pour chacune des souches dans un volume de 1ml. Les bactéries D01 et D41 sontensemencées avec un inoculum de 10^7 et les ufc (ou cfu) sont déterminées toutes les deux heures.

II.1. Influence de la température sur la prolifération bactérienne

La prolifération des deux souches est étudiée à 35°C et 12°C. Les résultats de l'étude réalisée à 20°C ont déjà été discutés dans le paragraphe I. 2.

II.1.1. Etude de la prolifération à 35°C

La température de 35°C est choisie car elle se rapproche de la température optimale de croissance des bactéries commensales de l'homme. Il est intéressant de comparer le comportement des bactéries marines dans ces conditions. Les résultats des études réalisées sur les deux souches en bouillon marin montre que pour D01, la température de 35°C est létale dès deux heures d'incubation. Cette souche ne tolère pas une température élevée (35°C) contrairement aux bactéries commensales de l'homme. En ce qui concerne la souche D41, cette température ne provoque pas de mort cellulaire et la prolifération est semblable à celle observée à 20°C.

II.1.2. Etude à 12°C

La température de 12°C correspond à la température « hivernale », rencontrée par les bactéries en milieu naturel, il est donc important de connaître le comportement des ces deux bactéries à une température aussi basse.

Les résultats de ces études réalisées sur les deux souches en Marine Broth sont présentés dans le tableau 22.

	Temps de latence (h)	Temps de doublement (h)	Durée de la phase exponentielle (h)	ufc en phase stationnaire (ufc/ml)
D01	6	5	12	4.10^8
D41	5	5h30	11	5.10^8

Tableau 22 : Paramètres de prolifération des bactéries D01 et D41 en culture en suspension dans le Marine Broth à 12°C.

Les deux souches se comportent globalement de la même manière. En effet, pour les deux souches une augmentation du temps de latence est observée, elle passe de 1 heure à 20°C à 5-6 heures, une augmentation du temps de doublement qui passe respectivement pour D01 et D41 de 1h10 et 1h20 à 12 et 11 heures. La durée de la phase exponentielle s'allonge également puisqu'elle passe de 8 heures à 12 heures pour D01 et de 8h30 à 11 heures pour D41. En ce qui concerne le nombre de cfu au plateau cinétique, il est 5 fois plus faible que celui observé à 20°C.

Ces études réalisées à différentes températures montrent que la température a une grande influence sur la prolifération de D01 et D41. En effet, une température trop élevée peut tuer les bactéries alors qu'une température trop basse ralentit considérablement la croissance bactérienne.

Afin de pouvoir travailler dans les conditions optimales nous avons choisi de réaliser toutes nos expériences à 20°C, et ceci pour les deux souches.

II.2. Cinétique de prolifération de D01 et D41 en eau de mer

Le bouillon marin est un milieu riche et optimal pour la culture des bactéries marines, cependant afin de déterminer si les bactéries peuvent se développer dans d'autres conditions, nous avons réalisé des cinétiques de prolifération en eau de mer naturelle.

L'eau de mer utilisée est une eau naturelle envoyée par le laboratoire Matériaux et Structures (IFREMER). Cette eau est stérilisée par microfiltration, conservée à -20°C sous forme d'aliquotes. La composition de cette eau varie au fil des saisons et afin de garantir la reproductibilité des résultats, nous avons utilisé un stock d'eau de mer ayant la même origine.

Les cinétiques de prolifération des deux souches sont réalisées dans ce milieu à 20°C.

Les paramètres des cinétiques de prolifération des souches D01 et D41 en eau de mer naturelle sont regroupés dans le tableau 23.

	Temps de latence (h)	Temps de doublement (h)	Durée de la phase exponentielle (h)	ufc en phase stationnaire (ufc/ml)
D01	1	3	4h30	1.10^8
D41	1	2h45	4h	1.10^8

Tableau 23 : Paramètres de prolifération des bactéries D01 et D41 en culture en suspension dans l'eau de mer naturelle à 20°C.

Comparativement au bouillon marin, un temps de doublement plus élevé et un nombre de cfu au plateau plus faible sont observés. Ces résultats sont compatibles avec le fait que l'eau de mer ne soit pas un milieu aussi riche que le bouillon marin. En effet, les résultats obtenus avec le bouillon marin montrent un nombre d'ufc en phase stationnaire de 10^9 alors qu'il n'est plus que de 10^8 avec l'eau de mer naturelle. De plus, la phase exponentielle est beaucoup plus courte que celle observée en bouillon marin. La carence en matières organiques du milieu est donc un facteur limitant de la croissance bactérienne.

II.3. Influence du milieu dépourvu en matières organiques sur la prolifération bactérienne

Les résultats précédents montrent que les bactéries prolifèrent lorsqu'elles sont placées dans un milieu riche. Cependant, pour les expériences d'incorporation de thymidine et d'adhérence il est nécessaire d'utiliser un milieu où les bactéries ne prolifèrent pas. Pour la suite de l'étude nous utiliserons le terme de tampon pour désigner ce milieu dépourvu de matières organiques.

Selon la souche, plusieurs types de tampon ont été testés, une solution saline de chlorure de sodium (NaCl), de l'eau de mer artificielle (ASW) et du PBS (Phosphate Buffer Saline). Nous étudions dans un premier temps, la prolifération de la souche D01 en NaCl, puis la souche D41 avec différents milieux appauvris.

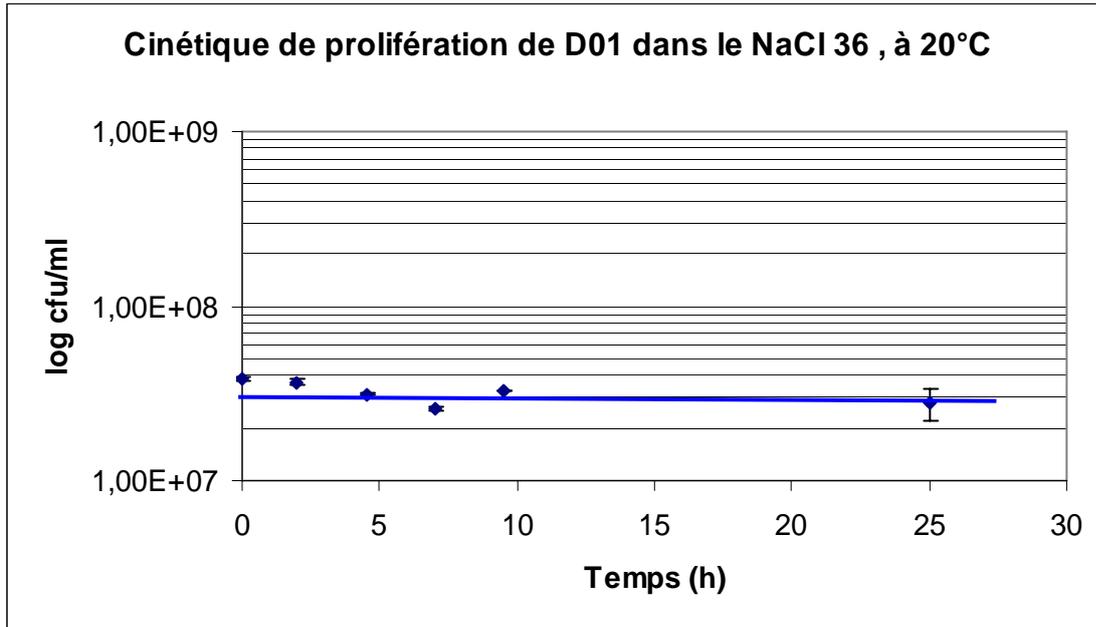


Figure 37 : Représentation semi-logarithmique de la cinétique de prolifération de D41 en NaCl 36 ‰ , à 20°C.

II.3.1. La souche D01

Des cinétiques de prolifération sont réalisées dans une solution saline de chlorure de sodium à 36 ‰, à 20°C et dans de l'eau de mer artificielle à 36 ‰, à 20°C.

Les résultats sont présentés sur les figures 37 et 38.

Ils montrent que pendant 24 heures les quantités de bactéries vivantes se maintiennent au même niveau que l'inoculum de départ, à savoir $3 \cdot 10^7$ cfu/ml. L'observation des résultats obtenus avec l'ASW, montre que les bactéries prolifèrent, avec un nombre de cfu/ml qui passe de $3 \cdot 10^7$ à $1,5 \cdot 10^8$ en l'espace de 4 heures.

La solution aqueuse de NaCl 36‰ semble être le tampon le plus approprié puisqu'il permet de maintenir les bactéries vivantes dans un état de latence.

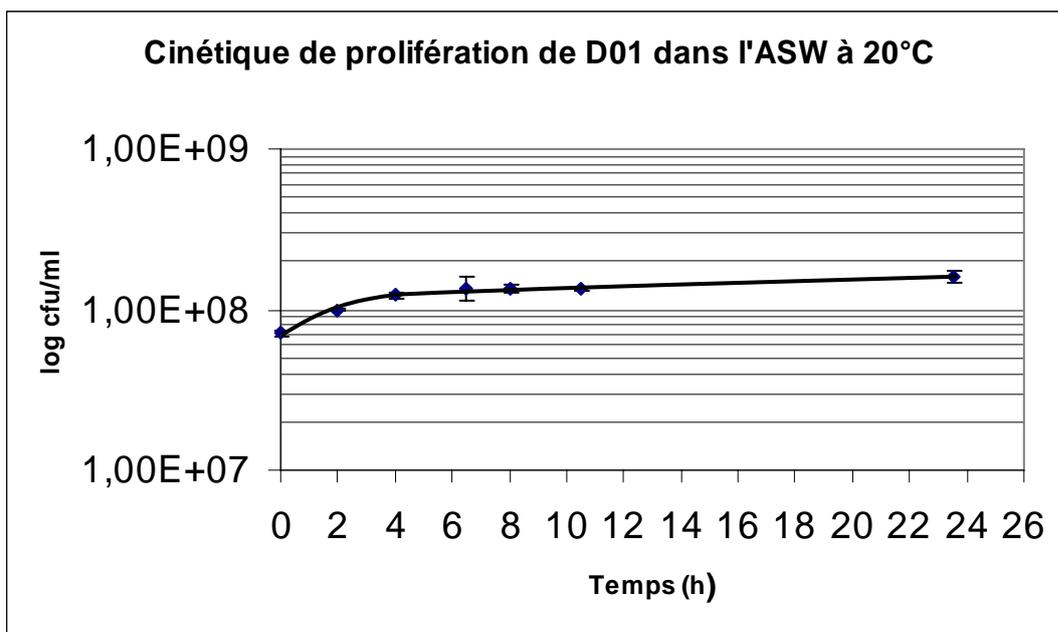


Figure 38 : Représentation semi-logarithmique de la cinétique de prolifération de D01 en ASW 36 ‰, à 20°C.

II.3.2. La souche D41

Les cinétiques de prolifération sont réalisées à 20°C dans une solution saline de chlorure de sodium à 36 ‰, dans de l'eau de mer artificielle à 36 ‰, ainsi que dans l'eau de mer artificielle à 26‰.

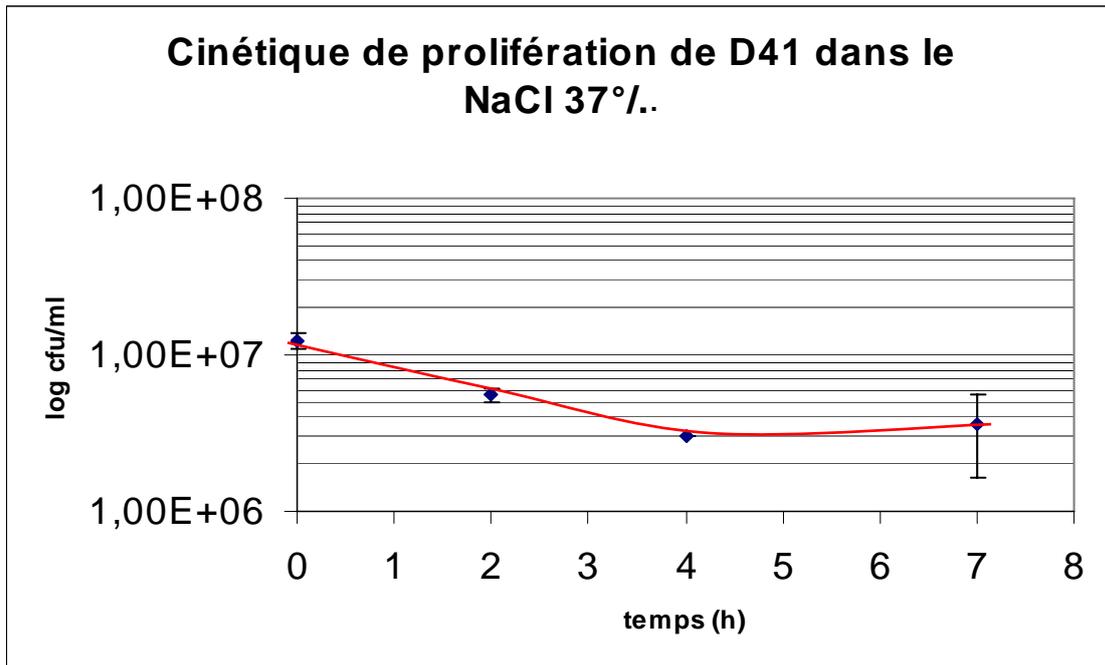


Figure 39 : Représentation semi-logarithmique de la cinétique de prolifération de D41 en NaCl 36 ‰ , à 20°C.

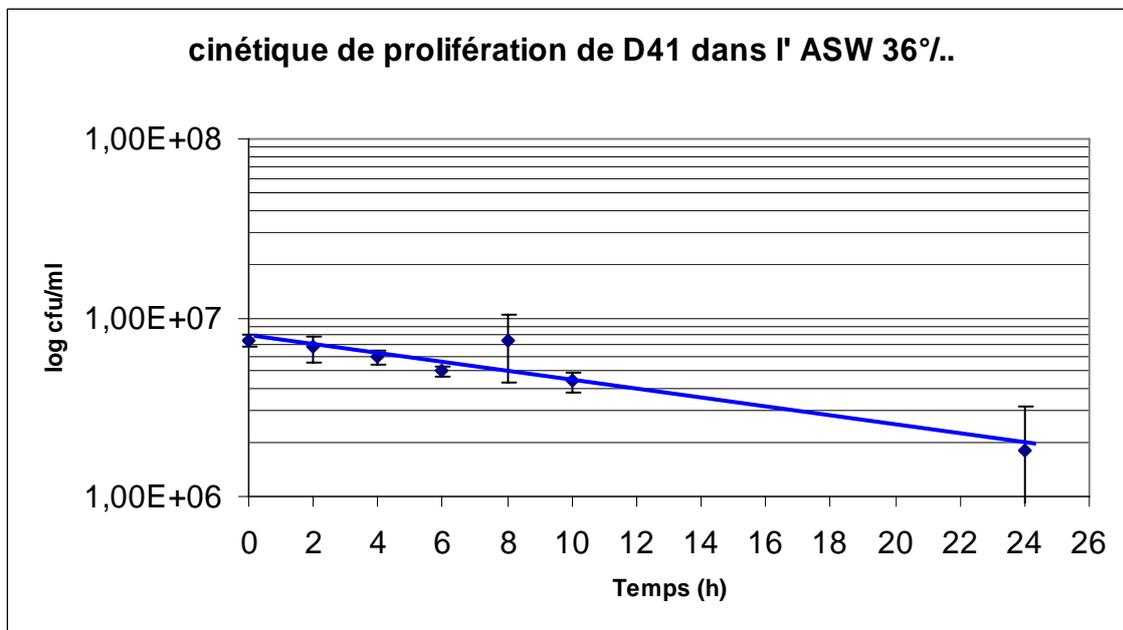


Figure 40 : Représentation semi-logarithmique de la cinétique de prolifération de D41 en ASW 36‰, à 20°C.

Les résultats sont présentés sur les figures 39 ,40 et 41.

La figure 39, montre que l'incubation des bactéries en NaCl 36‰ conduit à une mortalité bactérienne qui peut atteindre une réduction de moitié de la population bactérienne de départ. Contrairement à ce qui est observé pour D01, le NaCl 36‰ est un milieu inapproprié au maintien des bactéries D41.

Les expériences réalisées dans l'ASW 36 ‰ (figure 40), montrent qu'une mortalité bactérienne très importante, puisque le nombre de cfu/ml passe de 8.10^6 à 2.10^6 , soit une perte de 75% de la population bactérienne. Dans ces conditions, il est impossible d'utiliser ni le NaCl 36‰, ni l'ASW 36‰ comme tampon pour D41.

Conformément à Oswald et *al* (1985), qui préconisait l'utilisation d'eau de mer hypohyaline, nous avons testé de l'eau de mer artificielle à 26‰.

Les résultats (figure 41) montrent clairement que le milieu ASW 26‰ permet de maintenir la population bactérienne au moins pendant 9h d'incubation et n'altère pas la viabilité des bactéries étudiées.

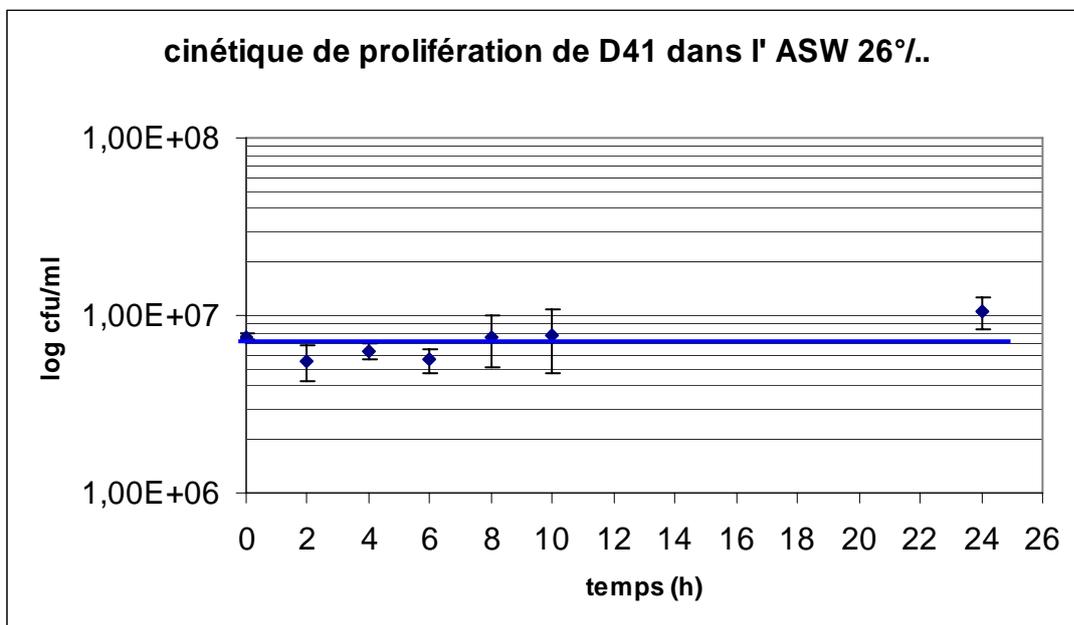


Figure 41 : Représentation semi-logarithmique de la cinétique de prolifération de D41 en ASW 26‰, à 20°C.

II.3.3. Conclusion

En conséquence, les tampons sélectionnés pour D01 et D41 sont respectivement le NaCl 36‰ et l'ASW 26‰.

Les résultats montrent que les deux souches ont un comportement différent vis-à-vis des milieux très appauvris. En effet, il semble que la souche D01 soit plus tolérante vis-à-vis des carences en matières organiques que la souche D41.

II.4. Discussion et conclusion

La *taille de l'inoculum*, c'est à dire la population bactérienne de départ, est un paramètre délicat à reproduire de façon exacte. L'autorégulation naturelle permet toutefois d'obtenir des cultures bactériennes de taille comparable d'une fois sur l'autre, ce qui permet une bonne souplesse d'utilisation des souches D01 et D41, avec une fourchette d'utilisation comprise entre les limites de 10^6 cfu/ml à 10^7 cfu/ml à l'inoculation. En effet, le profil cinétique reste le même, tous les autres paramètres restant égaux.

La *température d'incubation* est un paramètre qu'il faut contrôler. Pour cela, les expériences sont réalisées dans une enceinte à climatisation constante i) pour homogénéiser la température au cours d'une même cinétique de prolifération, ii) pour étudier et comparer le comportement de nos souches à des températures très différentes.

La souche D01 ne tolère pas la chaleur (35°C) contrairement aux pathogènes humains, mais survit à l'état ralenti à une température de 12°C. La température de 20°C, température maximale de la mer, en plein été, à Brest, représente un compromis entre les conditions optimales de croissance et la température de 12°C. Nous l'avons donc choisi ces conditions pour la suite de notre travail.

Les mesures du contenu de l'eau de mer en matière organique variant au cours des saisons de manière substantielle, l'adsorption sur les matériaux varie aussi (Rubio, 2002), et aussi probablement la prolifération des microorganismes hétérotrophes.

Les expériences réalisées en présence de l'eau de mer montrent que les bactéries atteignent un plateau cinétique avec une quantité de cfu moindre par rapport aux expériences réalisées dans le bouillon marin.

L'étude de la cinétique de prolifération en milieu NaCl 36 ‰ est réalisée dans le but de trouver un milieu (tampon) dans lequel les bactéries peuvent rester vivantes sans proliférer. Cette étude montre que pendant 24h les quantités de bactéries vivantes de la souche D01 se maintiennent au même niveau que l'inoculum de départ (autour de 10^7 cfu/ml). Ceci nous indique que le NaCl 36 ‰ est un tampon de non-prolifération que nous pourrions utiliser pour la suite des expériences (incorporation de thymidine, adhésion...) d'interaction bactéries-surfaces.

En ce qui concerne la souche D41, la solution NaCl à 36‰ ne peut être utilisée comme tampon. Les expériences réalisées avec plusieurs milieux permettent de mettre en évidence que les bactéries peuvent être maintenues en quantités suffisantes pendant un temps correct (d'au moins 24h) dans une solution d'eau de mer artificielle à 26‰ et c'est ce milieu qui a été sélectionné pour la suite de l'étude de cette souche.

III. Etude du marquage métabolique des souches par la thymidine tritiée

III.1. Objectifs et choix du marqueur

Le marquage métabolique des bactéries par la thymidine tritiée permet une quantification indirecte des bactéries. La thymidine tritiée est un nucléotide directement incorporable dans le chromosome ou les plasmides des bactéries qui assure un marquage stable. La détection de la radioactivité β , déterminée en coups par minute (cpm) permet une estimation reproductible des populations adhérentes, après lavage et élimination des cellules non-adhérentes.

Le protocole expérimental utilisé a été adapté de celui décrit par Vaudaux *et al* (1992), il est décrit dans la partie "matériels et méthodes". En se basant sur ces

données, des expériences d'adhésion sont réalisées en utilisant des bactéries issues de deux types de cultures : exponentielle ou stationnaire. Au préalable, le radiomarquage à la H^3 thymidine des deux types de cultures a été optimisé afin de déterminer les conditions dans lesquelles la radioactivité des bactéries est maximale. Le protocole de marquage radioactif permet de choisir un temps optimal d'incubation avec le radiomarqueur, c'est à dire un niveau d'incorporation convenable en phase de prolifération exponentielle et en phase stationnaire, tout en nous assurant que la thymidine tritiée n'affecte pas la prolifération des souches bactériennes

Afin de garantir une homogénéité et une reproductibilité des inocula bactériens utilisés aussi bien dans le marquage radioactif que dans l'évaluation de l'adhérence, une courbe étalon reliant les quantités de bactéries (cfu/ml) et la densité optique (lue à une longueur d'onde de 595 nm) est réalisée pour chacune des souches.

III.2. Incorporation de la thymidine par D01 et D41

Une étude cinétique de radiomarquage de D01 et D41 par la thymidine, est effectuée dans le bouillon marin à 20°C. A différents intervalles de temps, la radioactivité incorporée par les bactéries est déterminée après plusieurs lavages par comptage à l'aide du compteur β .

Afin de vérifier l'efficacité des lavages, les liquides de lavage sont récupérés et mis à compter au compteur β . Les résultats montrent que trois lavages sont nécessaires pour éliminer la radioactivité résiduelle.

En outre, le nombre de bactéries exprimé en ufc (unités formant une colonie) contenu dans la suspension bactérienne radiomarkuée est déterminé par dilutions successives et numérations sur gélose.

Ainsi, pour chaque période de temps, un rapport R (correspondant au rapport entre le nombre de cpm et le nombre de ufc) caractéristique du marquage est obtenu. Les conditions optimales du marquage de bactéries sont celles, pour lesquelles le rapport $R = \text{cpm}/\text{cfu}$ est maximal. En effet, dans ces conditions, pour un nombre de bactéries donné, la radioactivité est maximale. Plus R est élevé, plus le marquage est efficace.

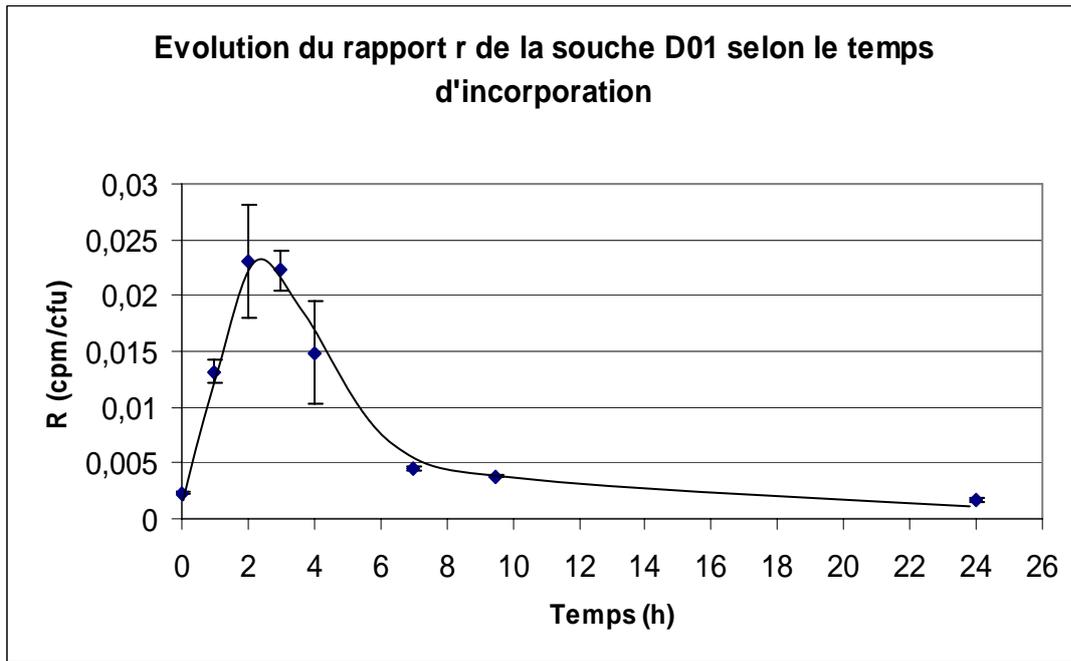


Figure 42 : Cinétique de radiomarquage de D01 à la thymidine tritiée (n=9)

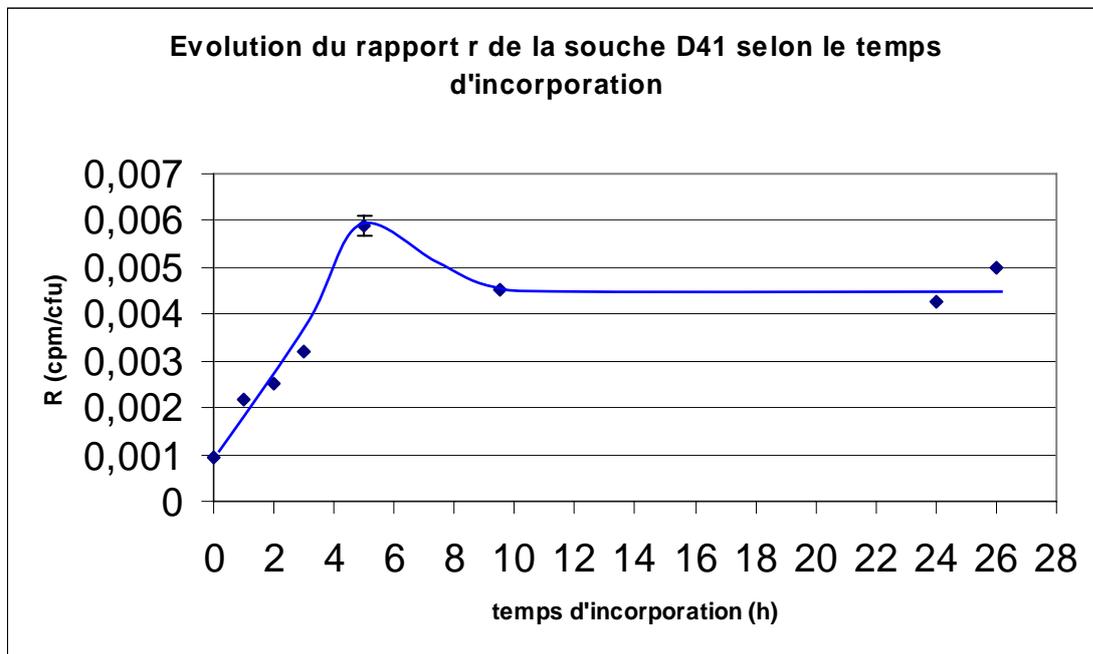


Figure 43 : Cinétique de radiomarquage de D41 à la thymidine tritiée (n=9)

Les variations du rapport R pour D01 et D41 sont respectivement représentées sur les figures 42 et 43.

D01 incorpore le maximum de thymidine en fin de phase de latence et en tout début de phase exponentielle. Le rapport R atteint un pic à 0,02 cpm/cfu, pour chuter à une valeur de 0,005 après 7 ou 8 heures.

Les résultats obtenus pour D41 montrent que la cinétique d'incorporation de la thymidine atteint un plateau après 8 heures avec un rapport R de 0,0045 en phase exponentielle et de 0,005 en phase stationnaire de prolifération.

III.3. Discussion et conclusion

Les profils des variations du rapport R sont différents d'une souche à l'autre. En effet, en ce qui concerne D41, le maximum de thymidine incorporé atteint un plateau à partir du milieu de la phase exponentielle. Pour la souche D01, un pic d'incorporation apparaît à la fin de la phase de latence et au début de la phase exponentielle de prolifération.

Ensuite, quelle que soit la quantité de thymidine dans le milieu, les bactéries ne l'incorporent plus et semblent utiliser des réserves prises en phase de latence, ce qui explique la chute du rapport R en phase exponentielle et stationnaire.

La deuxième observation concerne les valeurs du rapport : D01 incorpore en phase exponentielle cinq fois plus de thymidine (0,02 cpm/cfu) que D41 (0,0045 cpm/cfu). Cependant, le rapport en phase stationnaire de prolifération, de 0,005 cpm/cfu est identique pour les deux souches. Ceci montre que la capacité maximale d'incorporation des deux bactéries est la même, mais que le mode d'incorporation diffère d'une souche à l'autre.

Les paramètres de marquages retenus pour les souches D01 et D41 sont reportés dans le tableau 24.

	Phase exponentielle		Phase stationnaire	
	Temps choisi	Rapport R	Temps choisi	Rapport R
D01	3h	0,02	19h	0,005
D41	3h	0,004	19h	0,005

Tableau 24 : Rapport cpm/cfu caractéristiques du marquage de D01 et D41 et temps optimal choisi, en phase exponentielle et stationnaire de prolifération.

Il est possible de réduire le temps d'incubation des bactéries avec le marqueur, en effet des expériences réalisées avec D01 ont permis de montrer qu'en doublant la quantité de thymidine introduite, il est possible de réduire le temps d'incubation à 2h. Cependant, afin d'utiliser des bactéries en phase exponentielle de prolifération, nous avons choisi d'incuber les bactéries pendant 3h.

Nous pouvons conclure d'une part, que le radiomarquage à la thymidine tritiée est efficace aussi bien pour D01 que pour D41. D'autre part, ces expériences d'incorporation soulignent à nouveau les différences métaboliques des deux souches.

Pour les expériences en phase stationnaire de prolifération, un temps d'incubation de 19h a été retenu. Ce temps permet d'obtenir des bactéries en phase stationnaire marquées à 0,005 cpm/cfu.

Le temps d'incubation de 3h est retenu pour les expériences réalisées avec les bactéries en milieu de phase exponentielle de prolifération et un temps de 19h pour les expériences réalisées en phase stationnaire de prolifération.

CHAPITRE 3 : Etude des interactions des bactéries avec les matériaux

Introduction

L'adhérence bactérienne sur une surface est le résultat de processus complexes où interviennent trois facteurs.

Les bactéries : Les propriétés de surface de la paroi extérieure des bactéries sont telles que l'hydrophobicité, la charge ou la structure même des bactéries jouent un rôle important dans l'adhérence. L'état physiologique de la bactérie peut aussi être déterminant, en effet en fonction de la phase de prolifération les bactéries peuvent plus ou moins exprimer certains récepteurs. L'existence de la capsule ou d'autres structures sur la surface bactérienne peut être importante dans les mécanismes d'adhérence.

Les matériaux : La nature et la composition des différents matériaux influencent leurs propriétés de surface spécifiques. Ces caractéristiques de surface déterminent les interactions entre bactéries et matériaux.

L'environnement : L'adhérence des bactéries sur les matériaux peut être influencée par la présence d'éléments contenus dans le milieu. L'existence de molécules organiques et parfois inorganiques peut moduler les mécanismes d'adhérence. Les éléments organiques et inorganiques s'adsorbent sur les matériaux et changent ainsi leurs propriétés de surfaces.

Ces trois facteurs intervenant dans les mécanismes d'adhérence des bactéries sur les matériaux étant importants, il est donc indispensable de d'étudier leur influence. Ainsi plusieurs matériaux ont été sélectionnés selon leur nature et leur composition.

Les bactéries peuvent adhérer sur des surfaces selon deux modes :

- un mode direct impliquant des interactions entre les bactéries et la surface du matériau.
- un mode indirect résultant d'interactions entre les bactéries et des composés adsorbés, servant de médiateur avec la surface du matériau.

Différentes conditions sont utilisées pour étudier l'adhérence de D01 et D41 sur les matériaux : l'adhérence directe (une pré-incubation du polymère avec une solution de NaCl 36‰ ou d'ASW 26‰) et l'adhérence indirecte sur les polymères, préalablement adsorbés avec des matières organiques contenues dans le bouillon marin (MB) ou dans l'eau de mer naturelle (EM) ou encore du plasma humain.

L'état physiologique des bactéries est un paramètre important dans l'adhérence, en effet, il a été montré que l'adhérence de bactéries en phase stationnaire pouvait être différente de celle en phase exponentielle (Fadli, 2000).

Ainsi, pour démontrer que l'état physiologique de la bactérie peut modifier l'adhérence, des expériences avec des bactéries en phase exponentielle de prolifération ainsi que des bactéries en phase stationnaire de prolifération ont été réalisées.

Ainsi dans la première partie nous verrons les études préliminaires réalisées afin :

- D'établir les isothermes d'adhésion et le calcul du taux d'adhésion,
- D'étudier les cinétiques d'adsorption des matières organiques sur les matériaux via l'adhésion bactérienne,
- D'étudier les cinétiques d'adhésion des bactéries sur les matériaux,
- D'étudier l'adhésion des bactéries selon leur état physiologique (bactéries en phase exponentielle et en phase stationnaire de prolifération).

Dans la deuxième partie, nous aborderons l'adhésion des deux souches sur des matériaux de caractéristiques différentes :

- Des matériaux hydrophobes,
- Des matériaux hydrophiles,
- Des copolymères statistiques.

I. Etude des paramètres de l'adhésion

Les expériences d'interactions entre les matériaux et les bactéries sont réalisées dans des conditions dynamiques. Des quantités ou surfaces déterminées de matériaux sont incubées pendant un temps fixe avec différentes concentrations de suspensions de bactéries radiomarquées. Une fois l'incubation achevée, les matériaux sont lavés avec la solution "tampon" adéquate (NaCl 36‰ pour D01 et ASW 26 ‰ pour D41), afin d'éliminer toutes les bactéries non adhérentes sur le matériau. La radioactivité émise par les bactéries adhérentes sur les matériaux est mesurée à l'aide d'un compteur de radiation β .

La radioactivité fixée (cpm fixés) sur le polymère, qui est directement proportionnelle au nombre de bactéries adhérentes, est reportée en fonction de la radioactivité introduite (cpm introduits).

Les études sont réalisées respectivement avec D01 et D41 sur différents matériaux à température constante de 20°C. Pour chacune des souches, plusieurs concentrations cellulaires sont utilisées pour chacun des matériaux, avec un temps d'adhésion déterminé.

1.1. Isothermes d'adhésion de D01 et D41 sur le PSSO₃Na

Les expériences sont effectuées pour chacune des souches dans le milieu tampon adéquat, soit dans une solution de NaCl à 36‰ pour D01 et dans l'eau de mer artificielle à 26‰ pour D41.

Les isothermes d'adsorption sont obtenues à partir de la quantité de bactéries adhérentes, en fonction de la quantité de bactéries libres. Elles sont réalisées pour chaque matériau. Nous développerons ici à titre d'exemple, le cas du polystyrène sulfonate de sodium substitué à 82% (PSSO₃Na₈₂) avec les deux souches.

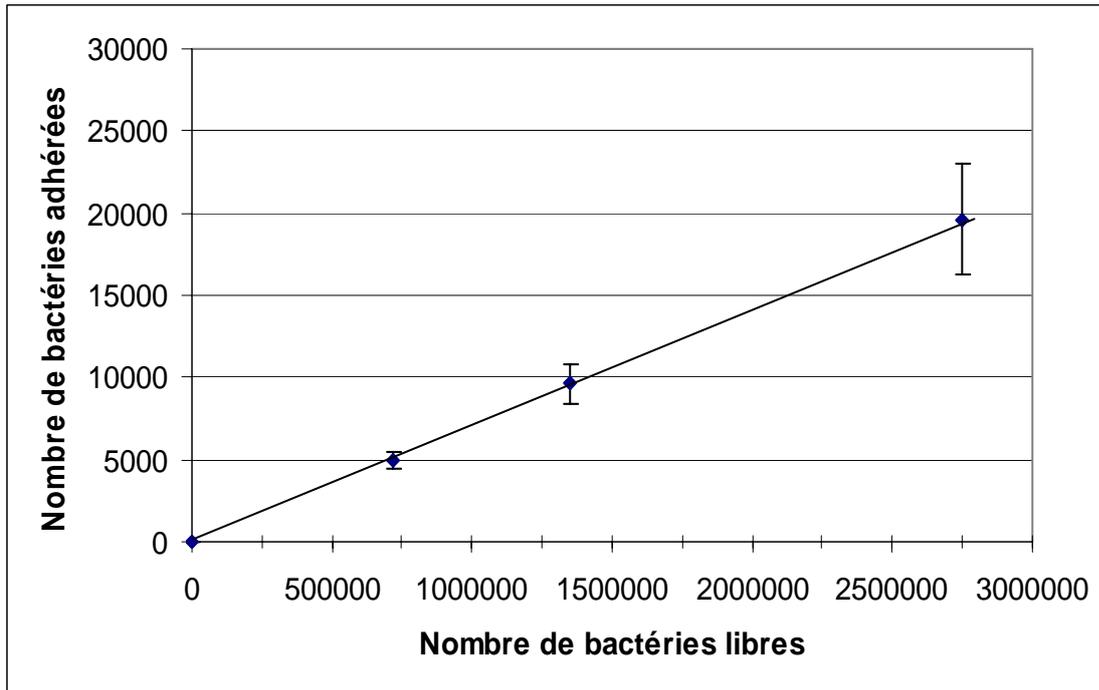


Figure 234 : Isotherme d'adhésion de D01 sur le PSSO₃Na (n=6)

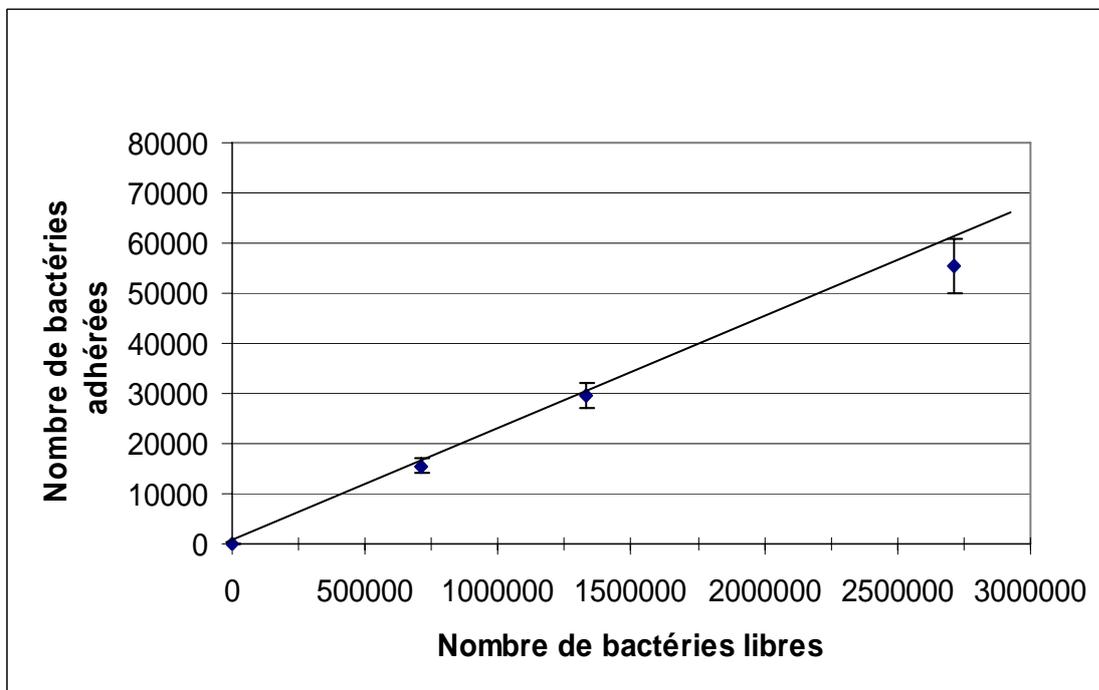


Figure 45 : Isotherme d'adhésion de D41 sur le PSSO₃Na (n=6)

I. 1. 1. Résultats

Les figures 44 et 45 représentent respectivement l'isotherme d'adhésion de D01 et de D41 sur le PSSO_3Na . Pour ces deux souches, les résultats montrent une droite passant par l'origine et dont la pente α est de $0,1 \pm 0,002$ %/mg pour D01 et de $0,2 \pm 0,009$ %/mg pour D41.

Les résultats des expériences réalisées sur d'autres matériaux pour chacune des souches montrent un tracé semblable avec une pente α qui varie d'un matériau à l'autre.

I. 1. 2. Discussion et conclusion

L'établissement d'une pseudo-isotherme d'adhésion (sur le modèle de Langmuir) permet de déterminer l'affinité du système surface-bactérie.

Les bactéries sont en suspension et l'interaction est réalisée en conditions dynamiques, on peut considérer que les bactéries sont mobiles. Si on pose l'hypothèse suivante : les bactéries adhérentes s'échangent avec celles présentes dans le milieu. Si tel est bien le cas, l'adhésion des bactéries serait réversible et les valeurs d'adhésion mesurées au plateau cinétique seraient proches de la situation d'équilibre d'échange entre les bactéries adhérentes et celles qui sont présentes en suspension. Dans ces conditions, les isothermes d'adhésion établies seraient des isothermes d'équilibre d'échange des bactéries adhérentes avec celles présentes en solution.

Si en outre, nous supposons que l'adhésion des bactéries à l'équilibre d'échange obéit à une loi de Langmuir, alors le tracé linéaire obtenu représente la tangente à l'origine de l'isotherme d'équilibre.

La revue des données publiées lors de la description du modèle de Langmuir, montre que la pente de cette tangente à l'origine α est égale, sous la réserve que nos hypothèses soient exactes, au produit de la constante d'affinité et de la capacité maximale d'adhésion ($\alpha = K_a \cdot B_{\text{max}}$).

Il est à noter que le tracé linéaire observé signifie que dans nos conditions expérimentales, nous sommes très loin de la formation d'une monocouche de bactéries adhérentes, la saturation des sites d'adhésion des bactéries sur le matériau ne pouvant être obtenue que lorsque le matériau est en présence de densité de population bactérienne inaccessible à l'expérience.

De plus, si nous pouvons supposer que la capacité maximale d'adhésion B_{max} correspond à la formation d'une monocouche de bactéries adhérentes, les valeurs de B_{max} doivent être peu différentes puisqu'elles ne varient qu'avec la taille des bactéries, laquelle varie peu.

Si toutes les hypothèses précédentes sont vraies, la variation de la pente α représente une variation de la constante d'affinité, une augmentation de α traduit une augmentation de l'affinité des bactéries pour le matériau.

Il en résulte que plus α est élevé, plus la probabilité que l'adhésion soit spécifique augmente. En effet, plus l'affinité est élevée plus le site d'adhésion est complexe et plus grande est la probabilité qu'il soit spécifique.

Dans la suite de l'étude, nous nous sommes intéressés essentiellement aux valeurs de la pente α des tracés linéaires que nous avons obtenus pour les isothermes d'adhésion puisque c'est le paramètre qui caractérise l'adhésion des bactéries sur les matériaux.

1. 2. Etudes cinétiques de l'adsorption des matières organiques sur les matériaux via l'adhésion des bactéries

Les bactéries peuvent adhérer sur les surfaces selon deux modes : le premier, un mode direct résultant d'interactions entre les bactéries et la surface du polymère et le deuxième, un mode indirect résultant d'interactions entre les bactéries et des composés adsorbés à la surface du matériau.

Différentes conditions sont utilisées pour étudier l'adhérence de D01 et D41 sur les matériaux : l'adhérence directe (une pré-incubation du polymère avec une solution de NaCl 36‰ pour D01 ou ASW 26‰ pour D41) et l'adhérence indirecte sur les matériaux préalablement adsorbés par des matières organiques contenues dans le bouillon marin (MB), l'eau de mer naturelle (EM) ou le plasma humain (PH).

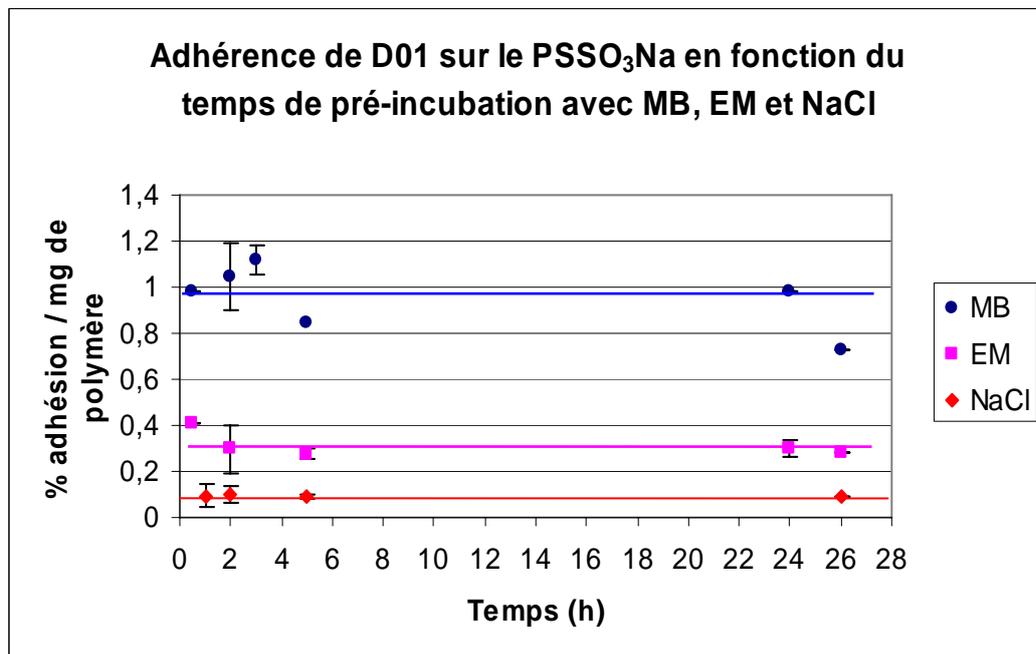


Figure 46 : Adhérence de D01 sur le PSSO₃Na pré-adsorbé par les matières organiques contenues dans le marine broth ,l'eau de mer naturelle et le NaCl 36‰. (n=3)

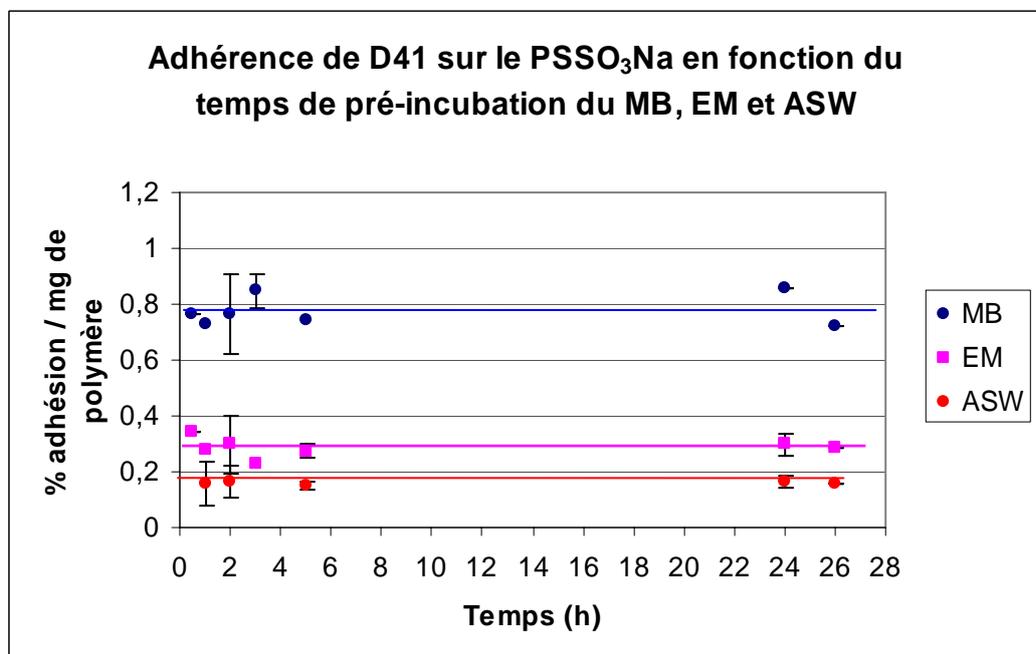


Figure 47 : Adhérence de D41 sur le PSSO₃Na pré-adsorbé par les matières organiques contenues dans le marine broth et l'eau de mer naturelle. (n=3)

Avant de réaliser les expériences d'adhésion sur différents matériaux, il est nécessaire de déterminer le temps optimum d'incubation préalable des matières organiques avec les matériaux.

Pour cela, une série d'expériences est réalisée avec un temps **d'incubation des matériaux avec les bactéries** à 2h en faisant varier le temps **d'incubation des matériaux avec les milieux**.

Ainsi, nous déterminons une cinétique d'adsorption des matières contenues dans les milieux *via* l'adhésion des bactéries

Pour chaque souche, une suspension bactérienne radiomarquée (de l'ordre de 10^6 cfu/ml) est incubée pendant 2h avec du PSSO_3Na pré-adsorbé à plusieurs intervalles de temps avec du bouillon marin, de l'eau de mer naturelle ou de la solution tampon. Pour chaque temps d'incubation des milieux, un pourcentage d'adhésion par milligramme de polymère est déterminé.

I. 2. 1. Résultats

Les figures 46 et 47 présentent les résultats obtenus respectivement pour D01 et D41 en phase exponentielle de croissance. L'examen de ces résultats montre que quelque soit la souche, l'adhésion est maximale dès 30 min d'incubation du matériau avec chacun des milieux. Les pourcentages d'adhésion α pour chacune des souches et pour chaque milieu sont reportés dans le tableau 25.

	D01 (α en %/mg)	D41 (α en %/mg)
NaCl 36‰ ou ASW 26‰	0,1 $\pm 0,001$	0,15 $\pm 0,01$
EM	0,32 $\pm 0,02$	0,3 $\pm 0,001$
MB	0,94 $\pm 0,06$	0,79 $\pm 0,01$

Tableau 25 : Adhésion de D01 et D41 sur le PSSO_3Na incubé dans les différents milieux.

La comparaison des valeurs α montre une adhésion des bactéries qui varie d'un milieu à l'autre. En effet, l'adhésion des bactéries dans les milieux contenant des matières organiques (EM et MB) est augmentée par rapport à celle avec le tampon. Cette variation est retrouvée pour les deux souches avec des valeurs α similaires.

I. 2. 2. Discussion et conclusion

Nous pouvons conclure que les deux souches ont le même comportement vis-à-vis du PSSO_3Na et que l'adhésion en milieu dépourvu de matières organiques (NaCl ou ASW) est la même pour les deux souches, ainsi que l'adhésion en eau de mer et en bouillon marin. Nous mettons ainsi en évidence l'existence d'une adhésion médiée par un ou plusieurs médiateurs contenus dans l'eau de mer et le bouillon marin. Enfin, quelque soit le milieu d'incubation, le plateau cinétique est atteint à partir de 30 min.

En conséquence, nous avons choisi d'utiliser un temps d'incubation des matériaux avec les milieux, d'au moins 30 min.

I. 3. Etude cinétique de l'adhésion bactérienne sur les matériaux

Afin de déterminer le temps d'adhésion optimal pour l'établissement d'une interaction entre les bactéries et les matériaux, une quantité fixe de bactéries D01 et D41 radiomarquées en phase exponentielle de croissance, est incubée avec le matériau. L'étude cinétique d'adhésion bactérienne est réalisée sur les différents matériaux suivants :

Le polystyrène sulfonate de sodium (PSSO_3Na)

Le polystyrène sulfamide d'éthanolamine (PSSO_2Eth)

Le poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA)

Le polystyrène (PS)

L'acétate de cellulose (AC)

Le verre

La cellulose

Le poly(hydroxyéthylméthacrylate) (PHEMA)

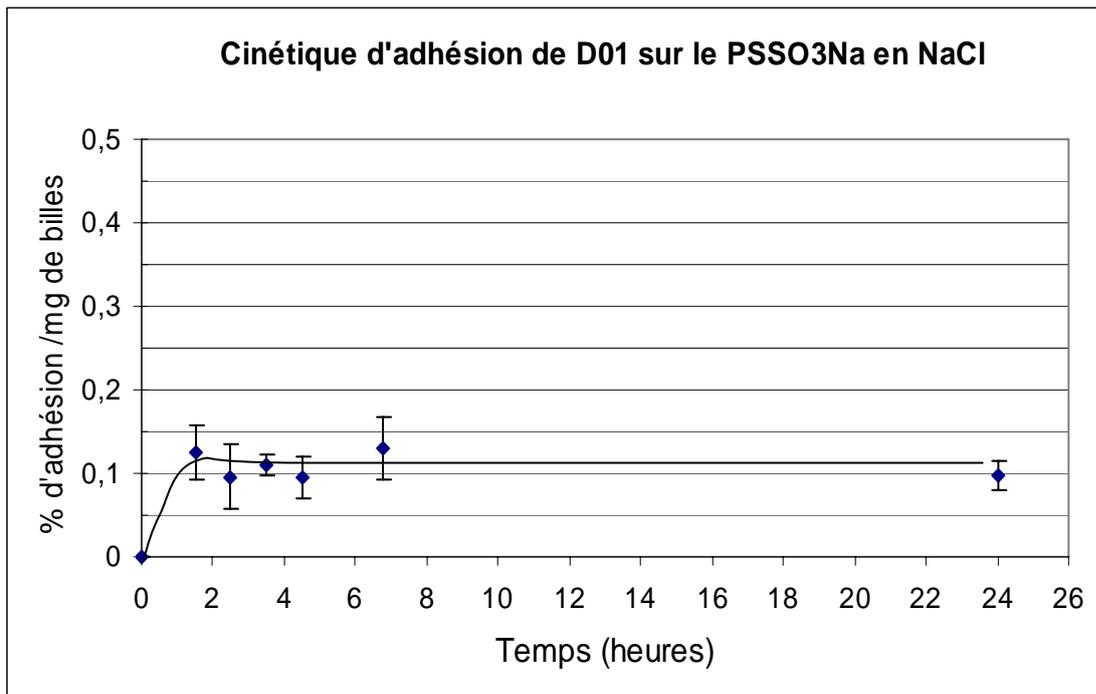


Figure 48 : Cinétique d'adhésion de D01 sur le PSSO₃Na en NaCl 36‰ (n=4)

Nous ne développerons ici que les cas du PSSO_3Na et PMMA, sachant que les résultats obtenus pour les autres matériaux sont similaires.

Pour chaque temps d'incubation, un pourcentage d'adhérence par milligramme ou cm^2 de polymère est déterminé.

I. 3. 1. Cinétiques d'adhésion sur le PSSO_3Na

Les expériences sont réalisées avec 20 mg de $\text{PSSO}_3\text{Na}_{82}$ dans une solution de NaCl à 36‰ pour D01 (figure 48) et une solution d'ASW à 26‰ pour D41 (figure 49).

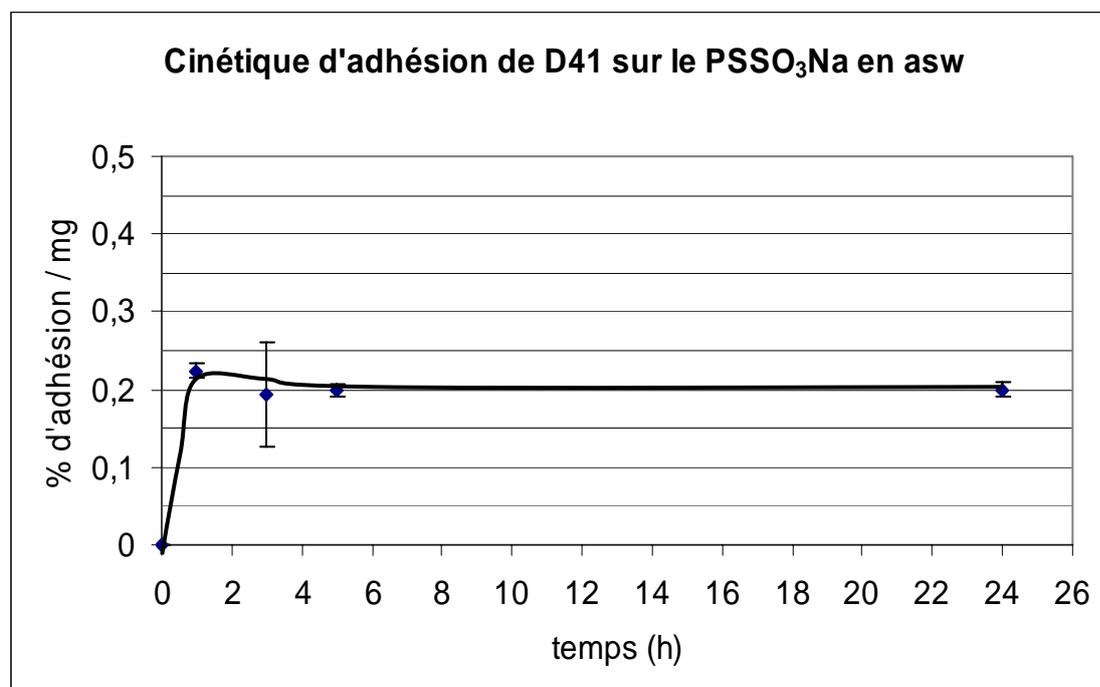


Figure 49 : Cinétique d'adhésion de D41 sur le PSSO_3Na en ASW 26‰ (n=4)

Les résultats montrent que l'adhésion des bactéries D01 sur le polymère augmente avec le temps pour atteindre une valeur maximale de $0,13 \pm 0,02$ %/mg après 1 heure d'incubation des bactéries avec le polymère. En ce qui concerne D41, le profil cinétique est le même avec une valeur α maximum de $0,2 \pm 0,02$ %/mg atteinte après 1 heure d'incubation.

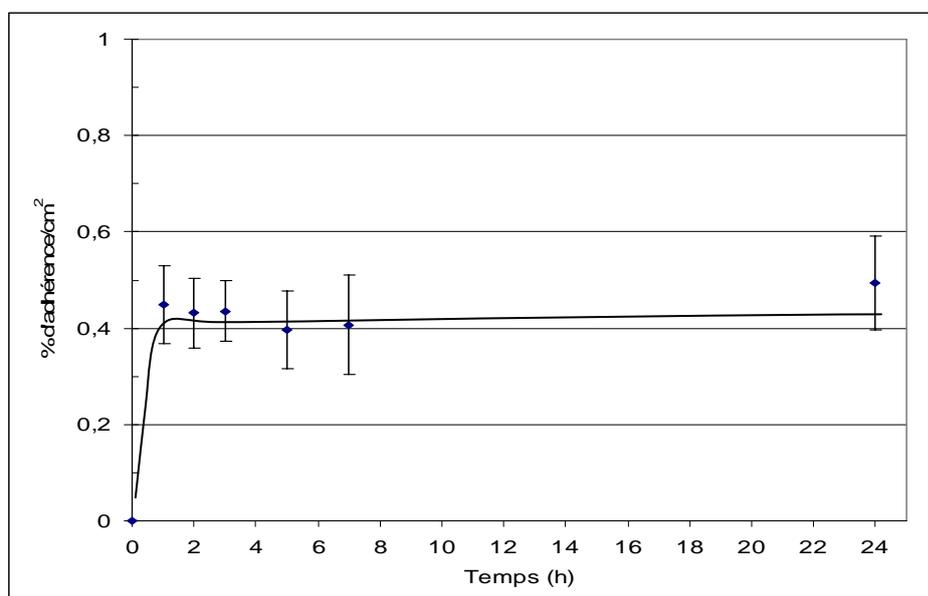


Figure 50 : Cinétique d'adhésion de D01 sur le PMMA en NaCl (n=6)

Les expériences réalisées en eau de mer et bouillon marin montrent un profil cinétique similaire avec un plateau atteint également au bout d'1h mais avec des valeurs α plus importantes.

I. 3. 2. Cinétiques d'adhésion sur le PMMA

Les expériences sont réalisées avec des lamelles de 1 cm^2 de PMMA incubées avec une solution de NaCl à 36‰ pour D01 (figure 50) et une solution d'ASW à 26‰ pour D41 (figure 51).

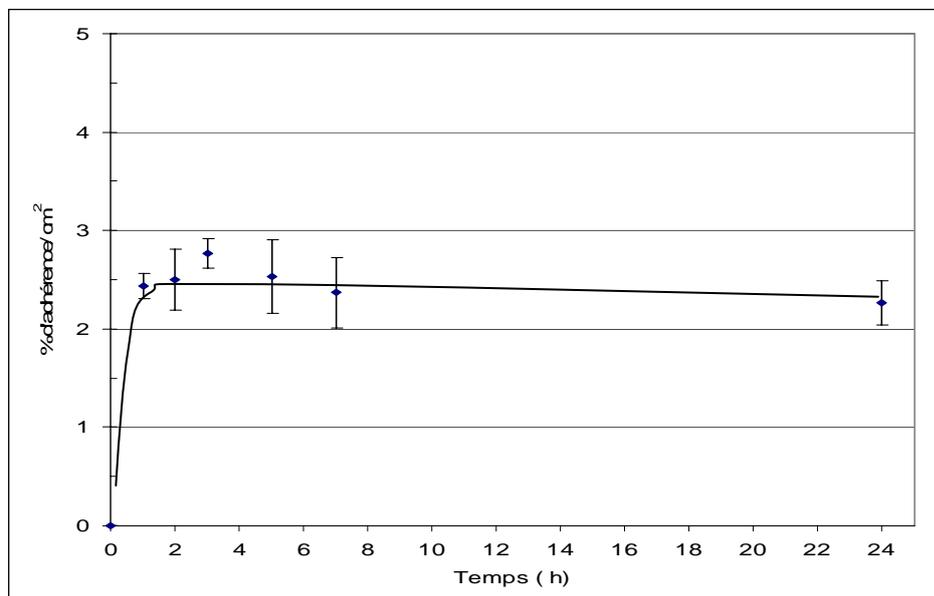


Figure 51 : Cinétique d'adhésion de D41 sur le PMMA en ASW (n=6)

Le taux d'adhésion de D01 augmente avec le temps puis atteint un plateau au bout d'1h pour atteindre une valeur de $0,4 \pm 0,08 \text{ %/cm}^2$ de polymère.

Pour D41, le plateau cinétique est atteint au bout d'1h avec un taux d'adhésion de $2,5 \pm 0,2 \text{ %/cm}^2$ de polymère.

I. 3. 3. Discussion et conclusion

Dans le cas du PSSO₃Na, nous n'observons pas de différences significatives d'adhésion des deux souches. Le plateau cinétique est atteint au bout de 1h, avec un taux d'adhérence de 0,13 %/mg pour D01 et 0,02 %/mg pour D41.

Dans le cas du PMMA, même si la vitesse d'adhésion pour les deux souches est la même, les taux d'adhésion diffèrent d'une souche à une autre. En effet, la souche D41 adhère plus de 6 fois plus que la souche D01.

Le tableau 26 récapitule les résultats obtenus en ce qui concerne les cinétiques d'adhésion sur le PSSO₃Na et le PMMA avec D01 et D41.

Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus sur les deux matériaux, il est nécessaire de convertir le taux d'adhésion sur le PSSO₃Na exprimé en mg, en cm².

La surface spécifique développée par le PSSO₃Na est de 1,78 cm² / mg (Cf Partie III Chap 1). Toutes nos expériences sont réalisées avec 20 mg de polymère soit 35,6 cm².

	Plateau cinétique		Taux d'adhésion %/cm ²	
	PSSO ₃ Na	PMMA	PSSO ₃ Na	PMMA
D01	1h	1h	0,003 ± 0,001	0,433 ± 0,08
D41	1h	1h	0,005 ± 0,001	2,490 ± 0,15

Tableau 26 : Résultats des cinétiques d'adhésion de D01 et D41 sur le PSSO₃Na et le PMMA.

Le temps pour atteindre le plateau cinétique est de 1h quelque soit le type de matériaux et ceci pour les deux souches. En ce qui concerne la vitesse d'adhésion des bactéries sur les matériaux, aucune différence n'est observée entre les deux souches. Notons ici que ces expériences sont réalisées dans des conditions d'adhésion directe, puisque les milieux sont dépourvus de matières organiques.

	Plateau cinétique		Taux d'adhésion %/cm ²	
	PSSO ₃ Na	PMMA	PSSO ₃ Na	PMMA
D01	1h	1h	0,15 ± 0,010	0,37 ± 0,05
D41	1h	1h	0,17 ± 0,011	2,5 ± 0,09

Tableau 27 : Résultats des cinétiques d'adhésion de D01 et D41 sur le PSSO₃Na et le PMMA incubés dans l'eau de mer.

	Plateau cinétique		Taux d'adhésion %/cm ²	
	PSSO ₃ Na	PMMA	PSSO ₃ Na	PMMA
D01	1h	1h	0,54 ± 0,12	0,35 ± 0,1
D41	1h	1h	0,55 ± 0,19	1,9 ± 0,4

Tableau 28 : Résultats des cinétiques d'adhésion de D01 et D41 sur le PSSO₃Na et le PMMA incubés dans le bouillon marin.

Cependant, les expériences réalisées avec les milieux plus riches, eau de mer (tableau 27) et bouillon marin (tableau 28). On observe une adhésion plus élevée dans le cas du PSSO_3Na par rapport au NaCl alors que pour le PMMA l'adhésion est semblable à celle du NaCl . En revanche, la vitesse d'adhésion des bactéries sur les matériaux reste de 1h.

La vitesse d'adhésion des bactéries ne dépend donc ni de la nature du matériau ni de la nature du milieu de pré-adsorption.

Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus à Brest sur ces mêmes souches (Rubio, 2002). En effet, dans les conditions expérimentales choisies le plateau cinétique est atteint également au bout d'une heure sur des supports de nature différente, comme l'acier, le Téflon et l'acier inoxydable.

Ce temps de 1h est relativement court comparé à celui obtenu dans les études antérieures sur la souche expérimentale, *Streptococcus pyogenes* dans les mêmes conditions (Fadli, 2000).

Cependant, le taux d'adhésion au plateau cinétique varie d'une souche à l'autre et il varie également d'un matériau à l'autre.

Lorsque nous comparons les deux souches, on note que globalement le taux d'adhésion de la souche D41 est plus élevé que celui de la souche D01, il est 2 fois plus élevé pour le PSSO_3Na et 6 fois plus élevé pour le PMMA.

Les expériences réalisées par MATS (Microbial Adhesion To Solvant), une technique qui permet d'évaluer l'hydrophobicité à la surface des bactéries, montrent que D41 est plus hydrophobe que D01 (Rubio, 2002). Ces observations peuvent peut-être expliquer les différences de taux d'adhésion, notamment sur le PMMA qui est un polymère très hydrophobe.

Dans des conditions, impliquant une interaction directe observée, c'est-à-dire sans médiateur, les interactions observées ne sont pas spécifiques et dépendent beaucoup des charges de surfaces.

Ainsi, il a été mis en évidence que la vitesse d'adhésion des bactéries sur les surfaces ne varie ni selon le matériau étudié, ni selon la nature du milieu d'incubation, ni selon la souche étudiée. Le plateau cinétique est atteint au bout d'une heure. Les expériences d'adhésion doivent être réalisées au plateau cinétique,

aussi pour la suite de l'étude, nous avons choisi d'incuber les bactéries avec les matériaux pendant une durée supérieure à 1h.

I. 4. Influence de l'état physiologique des bactéries sur l'adhésion bactérienne

La culture bactérienne passe par deux états : L'état de phase de croissance exponentielle et l'état de phase stationnaire. La phase exponentielle se traduit par une forte activité cellulaire alors que la phase stationnaire au contraire présente un ralentissement de cette activité, entraînant des modifications chimiques à la surface des cellules.

Ainsi, l'interaction bactérienne avec les matériaux est étudiée en utilisant des bactéries en phase exponentielle et en phase stationnaire de croissance. Les matériaux mis en contact avec les bactéries sont le PMMA et le PSSO₃Na.

Pour chacune des souches, nous avons réalisé des expériences d'adhésion dans plusieurs milieux avec des bactéries dans les deux états de développement.

I.4.1. Adhésion de D01 en phase exponentielle et en phase stationnaire de prolifération sur le PSSO₃Na et le PMMA

Le PSSO₃Na, sous forme de microsphères et le PMMA sous forme de lamelle de 1cm² sont conditionnés avec une solution de NaCl à 36‰, de l'eau de mer naturelle et du bouillon marin. Les bactéries marquées en phase exponentielle de prolifération ou en phase stationnaire de prolifération sont incubées avec les matériaux. Les résultats sous forme d'histogramme, sont exprimés en pourcentage d'adhésion par milligramme de polymère ou par cm².

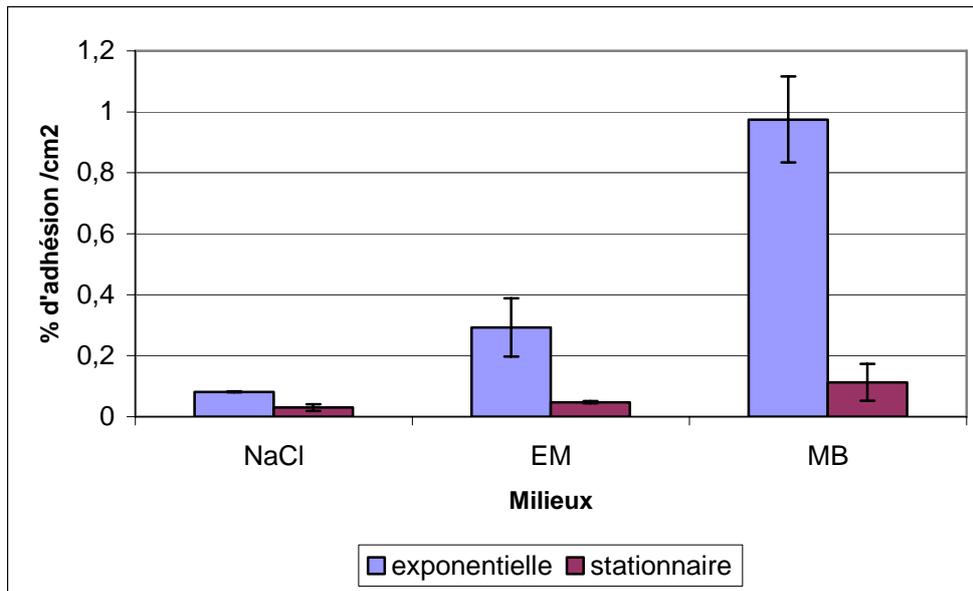


Figure 52 : Adhésion de D01 en phase exponentielle et stationnaire sur le PSSO₃Na pré-incubé avec le NaCl, l'EM et le MB. (n=9)

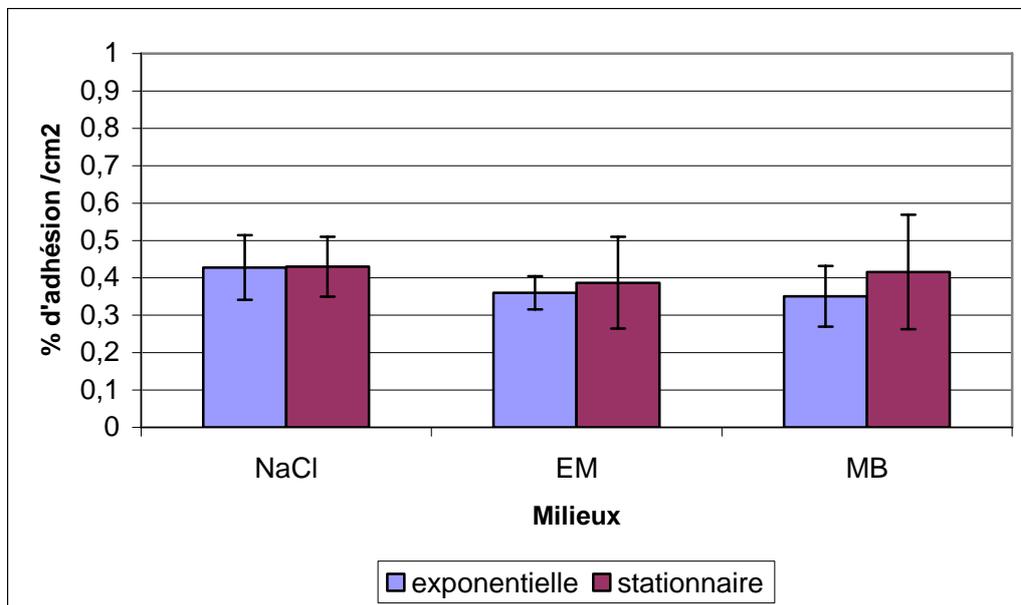


Figure 53 : Adhésion de D01 en phase exponentielle et stationnaire sur le PMMA pré-incubé avec le NaCl, l'EM et le MB. (n=9)

I. 4. 1. 1. Adhésion de D01 sur le PSSO₃Na

La figure 52 représente le pourcentage d'adhésion de D01 par mg de billes de PSSO₃Na en fonction du type de pré-conditionnement et du type de phénotype bactérien.

Pour la phase exponentielle, les résultats montrent que l'adhésion avec le MB (0,97 %/ mg) est plus importante qu'avec l'EM (0,29 %/mg), elle-même plus importante qu'avec le NaCl (0,09 %/mg). Le même phénomène est mis en évidence en phase stationnaire, avec un taux d'adhésion qui varie selon le type de conditionnement, néanmoins avec des taux d'adhésion plus faibles, de 0,1 %/mg pour le bouillon marin, 0,04%/mg pour l'eau de mer naturelle et 0,03 %/mg pour le NaCl.

Il existe une adhésion bactérienne médiée par les matières organiques présentes dans l'EM et MB.

I. 4. 1. 2. Adhésion de D01 sur le PMMA

La figure 53 montre le pourcentage d'adhésion de D01 par cm² sur le PMMA en fonction du type de pré-conditionnement et du type de phénotype bactérien.

Les résultats aussi bien en phase exponentielle qu'en phase stationnaire montrent une adhésion de 0,4 %/cm² quelque soit le milieu utilisé.

Pour le PMMA, il n'existe pas d'adhésion bactérienne médiée par les matières organiques présentes dans l'EM et MB que ce soit en phase exponentielle ou stationnaire.

I. 4. 2. Adhésion de D41 en phase exponentielle et stationnaire de prolifération sur le PSSO₃Na et le PMMA

Comme pour D01, nous avons préincubé le PSSO₃Na et le PMMA avec une solution d'ASW à 26‰, de l'eau de mer naturelle et du bouillon marin. Les bactéries marquées en phase exponentielle de prolifération ou en phase stationnaire de prolifération sont incubées avec les matériaux. Les résultats sous forme

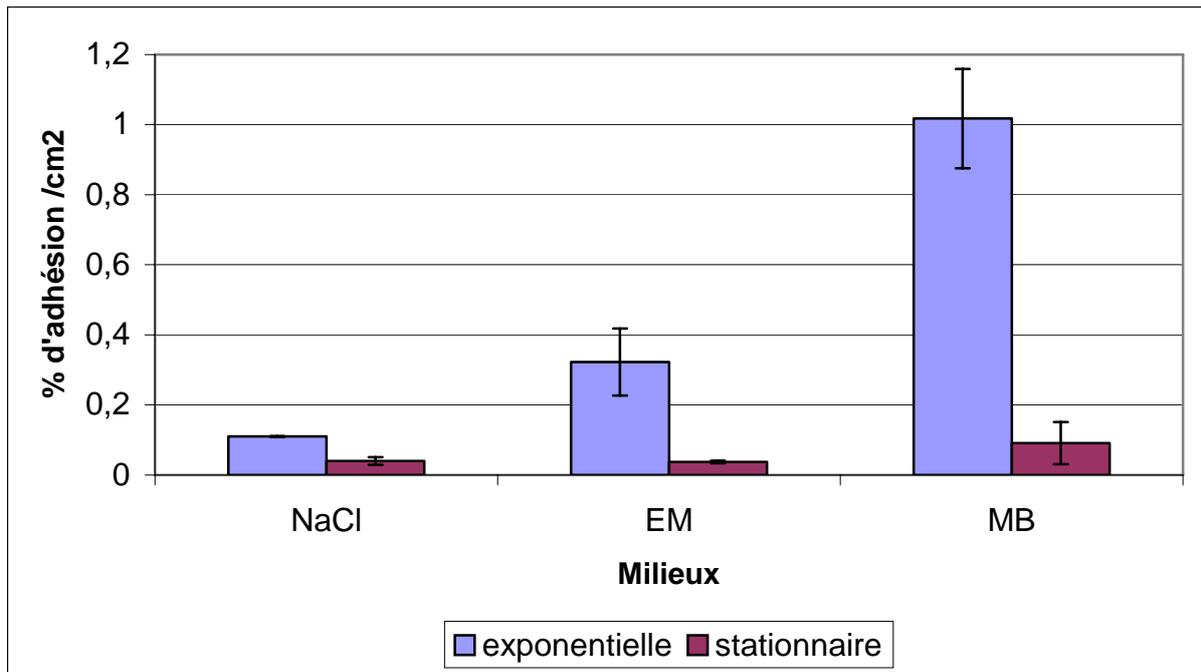


Figure 54 : Adhésion de D41 en phase exponentielle et stationnaire sur le PSSO₃Na pré-incubé avec l'ASW, l'EM et le MB. (n=9)

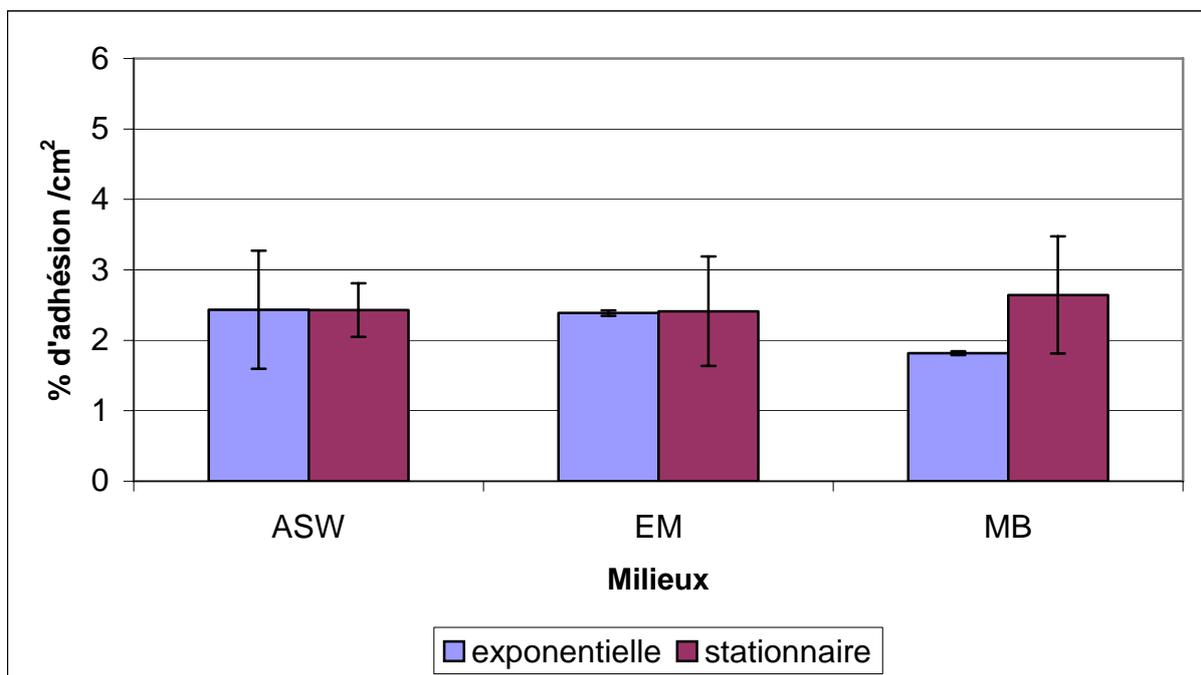


Figure 55 : Adhésion de D41 en phase exponentielle et stationnaire sur le PMMA pré-incubé avec l'ASW, l'EM et le MB. (n=9)

d'histogrammes, sont exprimés en pourcentage d'adhésion par milligramme de polymère ou par cm^2 .

I. 4. 2. 1. Adhésion de D41 sur le PSSO₃Na

La figure 54 présente le pourcentage d'adhésion de D41 par mg de billes de PSSO₃Na en fonction du type de pré-conditionnement et du type de phénotype bactérien.

Pour la phase exponentielle les résultats montrent que l'adhésion avec le MB environ de 1 %/mg est plus importante qu'avec l'EM (0,3 %/mg), elle-même plus importante qu'avec le NaCl (0,1 %/mg). Le même phénomène est mis en évidence avec les résultats en phase stationnaire, avec un taux de d'adhésion qui varie selon le type de conditionnement, néanmoins avec des taux d'adhésion plus faibles, de 0,1 %/mg pour le bouillon marin, 0,03%/mg pour l'eau de mer naturelle et 0,04 %/mg pour le NaCl.

Tout comme pour D01, une médiation par les milieux a été mise en évidence. Une médiation qui est plus visible en phase exponentielle qu'en phase stationnaire.

En outre, les taux d'adhésion de D41 ne sont pas significativement différents de ceux de D01.

I. 4. 2. 2. Adhésion de D41 sur le PMMA

La figure 55 montre le pourcentage d'adhésion de D41 par cm^2 sur le PMMA en fonction du type de pré-conditionnement et du type de phénotype bactérien.

Les résultats montrent que l'adhésion est sensiblement la même en phase exponentielle et en phase stationnaire, elle est de l'ordre de 2,5 %/ cm^2 . Elle ne varie pas non plus en fonction du milieu utilisé et de ce fait nous n'avons pas pu mettre en évidence l'existence d'une médiation.

La comparaison de ces résultats à ceux obtenus pour D01 montre que pour les deux souches qu'il n'y a pas de médiation mais que les pourcentages d'adhésion de D41 sont plus élevés que ceux de D01.

I. 4. 3. Discussion et conclusion

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 29.

Pourcentage d'adhésion en <u>%/mg</u>	PSSO₃Na					
	D01			D41		
	NaCl	EM	MB	ASW	EM	MB
Phase exponentielle	0,09±0,01	0,29±0,05	0,97±0,07	0,1±0,01	0,32±0,1	0,1±0,1
Phase stationnaire	0,03±0,002	0,04±0,005	0,09±0,01	0,04±0,002	0,04±0,002	0,1±0,05
Pourcentage d'adhésion en <u>%/cm²</u>	PMMA					
	D01			D41		
	NaCl	EM	MB	ASW	EM	MB
Phase exponentielle	0,42±0,11	0,35±0,05	0,35±0,1	2,5±0,7	2,4±0,02	1,9±0,06
Phase stationnaire	0,42±0,10	0,39±0,13	0,41±0,17	2,5±0,4	2,5±0,6	2,6±0,9

Tableau 29 : Adhésions de D01 et D41 sur le PSSO₃Na et le PMMA conditionnés par plusieurs types de milieux

Les résultats de l'adhésion directe de D01 et de D41 sur le PSSO₃Na montrent que l'état physiologique de ces bactéries influence de façon significative leur capacité d'adhésion sur le PSSO₃Na.

En effet, le taux d'adhésion en phase stationnaire est plus faible qu'en phase exponentielle. Les différences phénotypiques entre les deux états des souches D01 et D41 se manifestent également au niveau de leur capacité d'adhésion, en particulier en présence de substances médiatrices pré-adsorbées. Le taux d'adhésion en phase stationnaire sur le polymère pré-incubé avec du bouillon marin est sensiblement identique à celui trouvé en phase exponentielle sur le polymère pré-incubé avec le tampon.

Cette observation nous permet d'émettre l'hypothèse suivante : l'adhésion réalisée avec les bactéries en phase exponentielle sur le polymère conditionné avec le bouillon marin est une adhésion indirecte, médiée par les matières organiques contenues dans le milieu.

En revanche, les résultats obtenus pour les deux souches sur le PMMA sont différents de ceux obtenus sur le PSSO_3Na . En effet, les taux d'adhésion sur le PMMA varient d'une souche à une autre (0,4 %/cm² pour D01 et 2,5 %/cm² pour D41) mais ne varient pas selon leur état physiologique et ce, quelque soit le type de conditionnement du polymère. En se basant sur l'hypothèse décrite plus haut, il est vraisemblable que l'adhésion de ces bactéries sur le PMMA conditionné avec les différents milieux est une adhésion directe, c'est-à-dire non médiée.

Des études réalisées sur des souches de bactéries commensales de l'homme ont également montré que l'état physiologique des bactéries *Streptococcus pyogenes* influence de façon significative leur capacité d'adhésion sur des supports. En effet, il a été montré que sur le PMMA, ces souches bactériennes adhèrent quantitativement plus en phase stationnaire qu'en phase exponentielle (Fadli 2000).

Compte tenu du fait que l'adhésion sur le PSSO_3Na en phase stationnaire de prolifération est très faible par rapport à l'adhésion en phase exponentielle et afin de pouvoir utiliser des bactéries facilement détectables nous avons choisi pour la suite de l'étude, d'utiliser des cultures en phase exponentielle de prolifération.

1. 5. Conclusion

Dans cette première partie, nous avons réalisé la mise au point et l'optimisation des méthodes d'étude de l'adhésion bactérienne sur les matériaux. Une méthode de marquage radioactif utilisant la thymidine tritiée a été optimisée. Les résultats permettent de conclure que le marquage est suffisant pour la détection des bactéries puisqu'il est de l'ordre de 0,02 cpm/cfu. Ces mêmes expériences permettent aussi de

déterminer un temps optimal d'incubation des bactéries de 3 heures avec le traceur radioactif.

Les isothermes d'adhésion réalisées sur chacune des souches ont permis de mettre en évidence un moyen de quantifier l'adhésion bactérienne sur les surfaces, sachant que la pente de l'isotherme d'adhésion représente le taux d'adhésion bactérienne.

Les différentes cinétiques d'adhésion, conduisent à déterminer pour chaque souche un temps optimal de pré-incubation des matières organiques contenues dans les différents milieux, ainsi qu'un temps optimal d'incubation des bactéries avec les matériaux.

Enfin, les expériences réalisées selon l'état physiologique des bactéries mettent en évidence des différences significatives dans les taux d'adhésion selon l'état de la bactérie, le type de matériau choisi ainsi que la nature du conditionnement de ces matériaux.

Les différents paramètres de l'adhésion retenus pour chacune des souches sont résumés dans le tableau 30.

	<i>D01</i>	<i>D41</i>
Temps d'incubation avec le thymidine tritiée en phase exponentielle	3h	3h
Rapport R (cpm/cfu) en phase exponentielle	0,02	0,0035
Temps de conditionnement des matériaux avec les milieux	2h	2h
Temps d'incubation des bactéries avec les matériaux	2h	2h

Tableau 30 : Paramètres d'adhésion retenus pour chacune des souches

II Etude de l'adhésion des bactéries sur les matériaux

Introduction

Nous avons vu au préalable (Chap. 3) que l'adhésion pouvait varier selon le type de bactéries concernées et aussi selon le type de matériau ou encore le type de conditionnement de ce matériau.

Le but de notre travail maintenant est d'étudier l'adhésion des bactéries marines impliquées dans la formation des biosalissures sur différents matériaux, notamment sur des copolymères statistiques afin de sélectionner un matériau capable d'inhiber l'adhésion de ces bactéries. Pour cela, nous avons choisi d'étudier trois types de matériaux :

- Des matériaux plutôt hydrophobes, comme le poly(métacrylate de méthyle) (PMMA), le poly chlorure de vinyle (PVC), le polystyrène (PS) et l'acétate de cellulose (AC).
- Des matériaux hydrophiles comme le verre, la cellulose, le poly(hydroxyéthyl méthacrylate) (PHEMA).
- Des copolymères statistiques synthétisés au laboratoire (Voir chapitre 1). Ces polymères sont plus ou moins hydrophobes selon leur composition et la nature des substituants.

II. 1. Etude de l'adhésion des deux souches bactériennes sur les matériaux hydrophobes

L'étude de l'adhérence des deux souches D01 et D41 sur différents polymères a été réalisée de façon quantitative afin de mettre en évidence l'influence de la composition chimique des matériaux sur les capacités d'adhérence des deux souches.

Les matériaux utilisés, le PMMA, le PVC, le PS et l'AC sont sous forme de film de 1cm².

Plusieurs types d'expériences sont réalisées pour chaque matériau et ce, pour chaque souche. Dans un premier temps, nous avons effectué des expériences d'interactions directes, les matériaux sont pré-incubés dans le milieu tampon (solution de NaCl 36‰ pour D01 ou solution d'ASW 26‰ pour D41) qui ne contient aucune matière organique. Des expériences d'interactions indirectes sont aussi entreprises, en pré-incubant les matériaux avec des milieux contenant des matières organiques. Les différents milieux utilisés sont le bouillon marin (MB), l'eau de mer naturelle (EM) ainsi que le plasma humain.

Nous rappelons rapidement le protocole expérimental utilisé : les matériaux sont stérilisés puis incubés 2h avec le milieu choisi et enfin incubés 2h avec les bactéries radiomarquées. Les isothermes d'adhésion de D01 et D41 sur tous les matériaux témoins sont établies et permettent de déterminer à chaque fois la pente α qui correspond au taux d'adhésion.

II. 1. 1. Etude de l'adhésion de D01 et D41 sur le PMMA

L'étude est réalisée sur des lamelles de PMMA de 1 cm². La structure du PMMA est présentée figure 56.

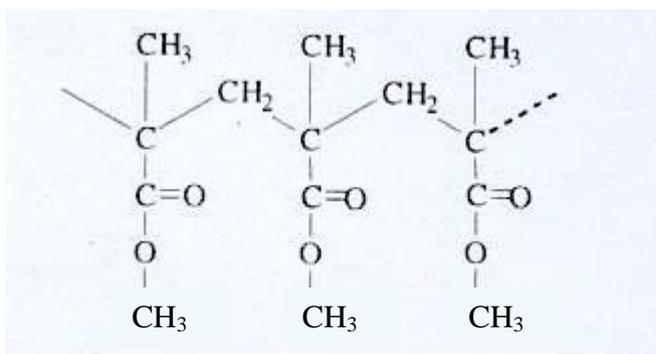


Figure 56 : Structure du poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA) (Hoffman A.S., 1982 ; Ratner B.D. *et al.*, 1996)

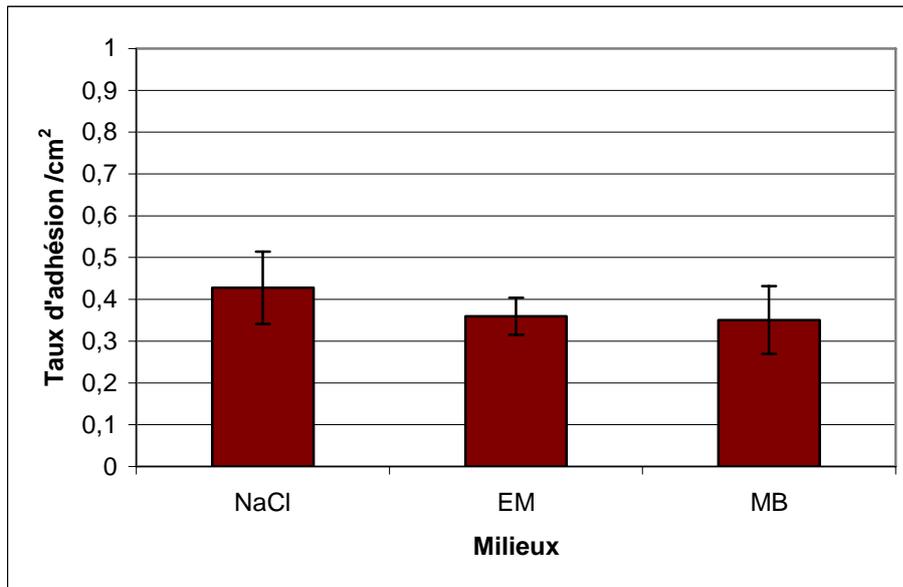


Figure 57 : Adhésion de D01 sur le PMMA incubé avec le NaCl, l'EM et le MB. (n=9)

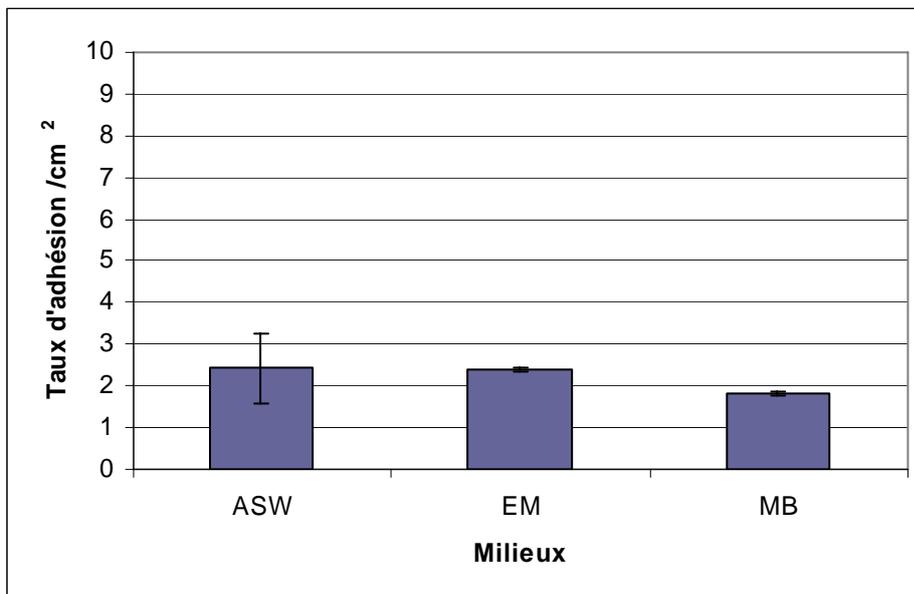


Figure 58 : Adhésion de D41 sur le PMMA incubé avec l'ASW, l'EM et le MB. (n=9)

Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes et la valeur des taux d'adhésion α en % / cm². Nous allons dans un premier temps étudier l'adhésion de D01 puis l'adhésion de D41

II.1.1.1. Etude de l'adhésion sur le PMMA pré-incubé avec la solution tampon, l'eau de mer ou le bouillon marin.

Les figures 57 et 58 présentent respectivement les résultats de l'adhésion de D01 et D41 sur le PMMA conditionné avec la solution tampon, l'eau de mer naturelle et le bouillon marin (37 g/L). Les histogrammes montrent :

Pour D01, un taux d'adhésion de $0,43 \pm 0,09$ %/cm² pour NaCl, $0,37 \pm 0,05$ %/cm² pour l'EM et $0,35 \pm 0,1$ %/cm²,

Pour D41, une valeur α de $2,5 \pm 0,9$ %/cm² pour l'ASW, de $2,5 \pm 0,01$ %/cm² pour l'EM et de $1,9 \pm 0,02$ %/cm² pour le MB.

D01 et D41 adhèrent sur le PMMA indépendamment de la nature du milieu de préadsorption du polymère avec une adhésion correspondant respectivement à $0,38 \pm 0,05$ %/cm² et $2,3 \pm 0,2$ %/cm².

L'analyse des résultats obtenus lors de l'étude de l'adhésion de chacune des souches sur le PMMA en fonction des trois milieux de pré-adsorption, montre qu'il n'y a pas de différences significatives selon les milieux. En effet, l'adhésion réalisée avec la solution tampon, qui est un milieu totalement dépourvu de matières organiques présente un taux sensiblement identique aux taux d'adhésion obtenus avec des milieux plus riches en matières organiques comme l'eau de mer ou le bouillon marin. D'après ces résultats, l'adhésion de ces deux souches sur le PMMA est directe, n'impliquant pas de médiateur.

Cependant, afin de pousser l'étude plus loin, une série d'expériences ont été réalisées en utilisant d'une part du plasma humain et en augmentons la concentration du bouillon marin qui passe de 39g/L à 200g/L, et d'autre part en effectuant un pré-coating du PMMA avec de la Sérum Albumine Bovine (BSA).

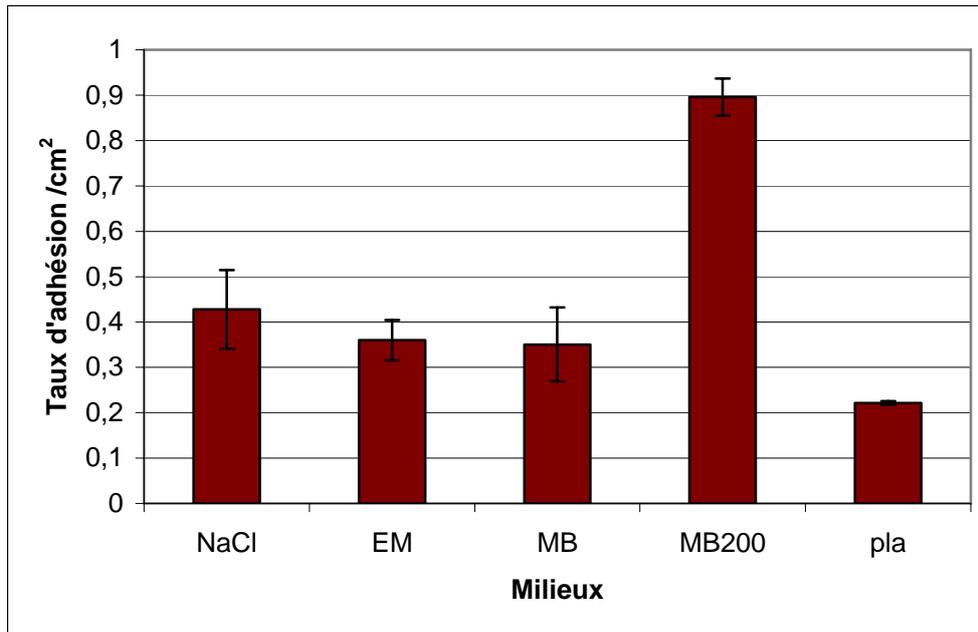


Figure 59 : Adhésion de D01 sur le PMMA incubé avec le NaCl, l'EM, le MB, le MB200 et le plasma. (n=9)

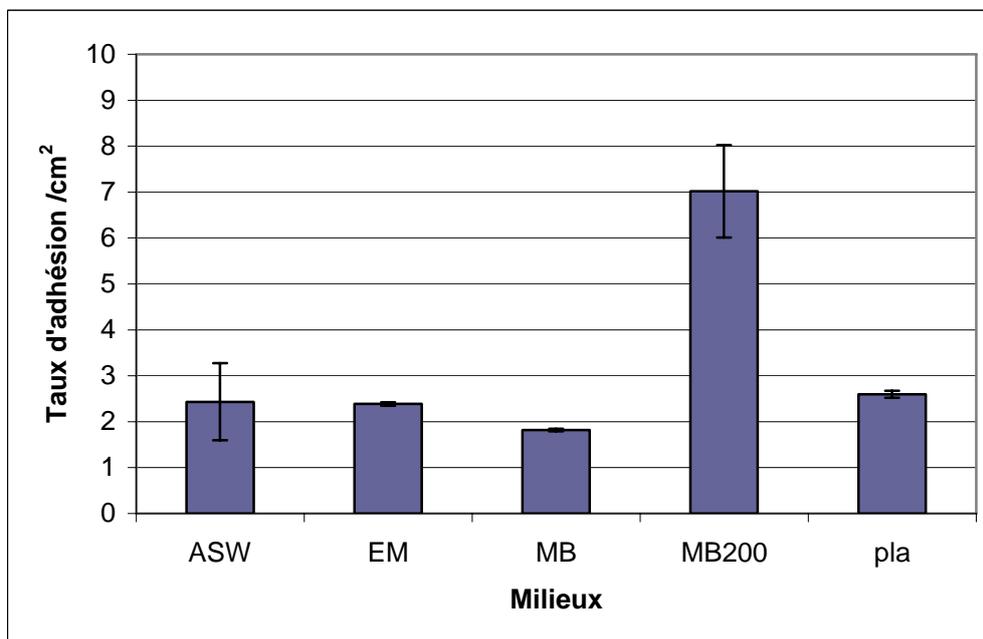


Figure 60 : Adhésion de D41 sur le PMMA incubé avec l'ASW, l'EM, le MB, le MB200 et le plasma. (n=9)

II.1.1.2. Etude de l'adhésion sur le PMMA pré-incubé avec le bouillon marin concentré et le plasma

Les figures 59 et 60 présentent respectivement les résultats de l'adhésion de D01 et D41 sur le PMMA conditionné avec du bouillon marin à 200 g/L (MB200) et du plasma humain (pla). Ces résultats ont été comparés dans le même graphe à ceux obtenus dans l'expérience précédente.

Les histogrammes montrent que le taux d'adhésion de D01 sur le PMMA conditionné avec le bouillon marin concentré 5 fois est de $0,9 \pm 0,05 \text{ \%/cm}^2$, c'est-à-dire un taux d'adhésion 2 fois plus élevé que pour les autres conditionnements. Quand au taux d'adhésion sur le PMMA conditionné avec du plasma humain, il est de $0,22 \pm 0,004 \text{ \%/cm}^2$.

En ce qui concerne la souche D41, le même phénomène est observé avec un taux d'adhésion de $7 \pm 1 \text{ \%/cm}^2$ avec le MB200, soit 3 fois plus élevé que pour les autres conditionnements, et un taux d'adhésion de $2,5 \pm 0,04 \text{ \%/cm}^2$ avec le plasma humain.

Ces expériences ont permis de mettre en évidence l'existence d'une médiation *via* un ou plusieurs médiateurs contenus dans le bouillon marin. En effet, il semblerait que la présence de ce ou ces médiateurs soit à l'origine de l'augmentation du taux d'adhésion des bactéries sur le PMMA pré-incubé par le MB200. Il semble aussi que ce ou ces médiateurs soient en concentration insuffisante dans le bouillon marin normal, ce qui explique le taux d'adhésion relativement faible, comparable à celui obtenu en absence de matière organique (NaCl ou ASW).

En ce qui concerne l'adhésion de D01 et D41 en présence de plasma, nous notons une faible adhésion, similaire à l'adhésion en milieu dépourvu de matières organiques (NaCl et ASW). Ce résultat montre que les protéines contenues dans le plasma ne stimule pas l'adhésion des bactéries marines contrairement à ce qui a été montré dans les études réalisées avec les bactéries commensales de l'homme (Fadli, 2000 ; Berlot, 1998).

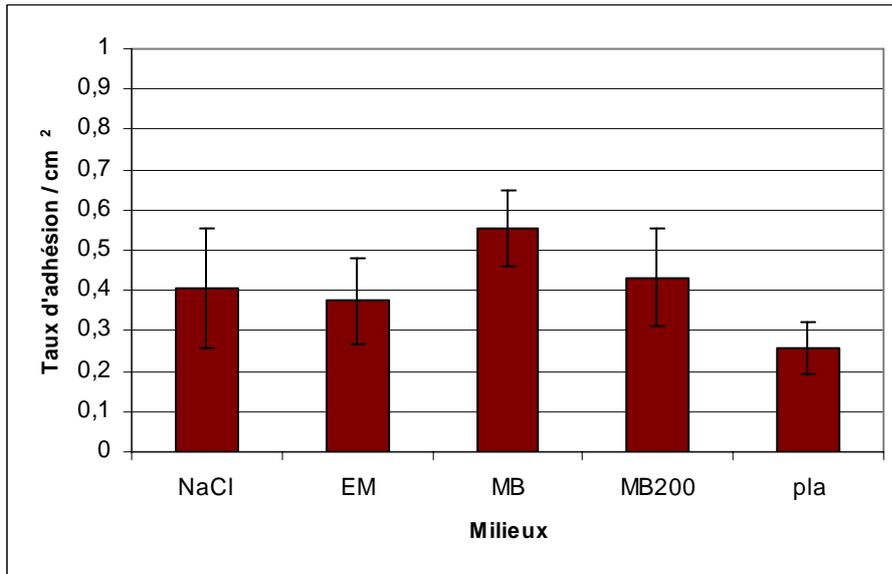


Figure 61 : Adhésion de D01 sur le PMMA conditionné avec la BSA puis avec le NaCl, l'EM, le MB, le MB200 et le plasma. (n=9)

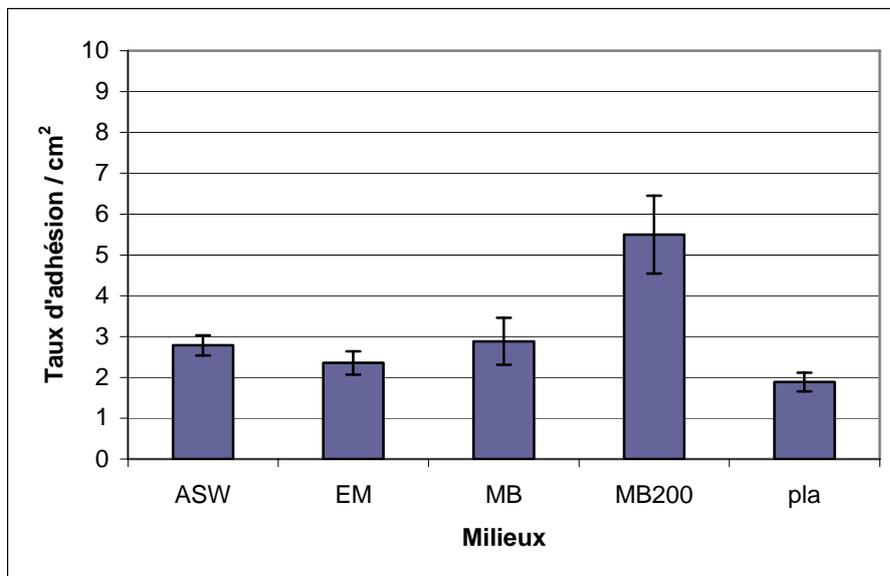


Figure 62 : Adhésion de D41 sur le PMMA conditionné avec la BSA puis avec l'ASW, l'EM, le MB, le MB200 et le plasma. (n=9)

II.1.1.3. Influence du "pré-coating" du PMMA par la serum bovine bovine

Les figures 61 et 62 présentent les résultats d'adhésion de D01 et D41 sur le PMMA pré-conditionné avec de l'albumine bovine (BSA) avant d'être incubé avec le tampon (NaCl), l'eau de mer naturelle (EM), le bouillon marin (BM), le bouillon marin à 200 g/L (MB200) et le plasma humain (pla).

Les histogrammes montrent pour D01, un taux d'adhésion de $0,45 \pm 0,1$ %/cm² pour le NaCl, l'EM, le MB et le MB200 et un taux d'adhésion de $0,2 \pm 0,1$ %/cm² pour le plasma.

Les taux d'adhésion observés pour D41 sont de $2,5 \pm 0,5$ pour l'ASW, l'EM, le MB, $5,4 \pm 1$ %/cm² pour le MB200 et un taux d'adhésion de $2,2 \pm 0,01$ %/cm² pour le plasma.

Nous observons ici une influence significative de la présence de l'albumine sur l'adhésion des bactéries D01. En effet, l'adhésion sur le PMMA pré-incubé par le MB 200 est effondrée en présence d'albumine et devient semblable à l'adhésion avec les autres milieux. En revanche, si on observe les écarts type, l'adhésion de D41 en présence de BSA n'est pas significativement différente de celle en absence de BSA.

II.1.1.4. Discussion

Les résultats de l'étude de l'adhésion des deux souches bactériennes sur le PMMA sont résumés dans le tableau 31.

	D01		D41	
	Sans BSA	Avec BSA	Sans BSA	Avec BSA
NaCl ou ASW	$0,43 \pm 0,09$	$0,41 \pm 0,15$	$2,5 \pm 0,9$	$2,8 \pm 0,2$
EM	$0,37 \pm 0,05$	$0,38 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,01$	$2,4 \pm 0,2$
MB	$0,35 \pm 0,1$	$0,55 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,02$	$2,9 \pm 0,5$
MB200	$0,90 \pm 0,05$	$0,42 \pm 0,12$	$7,0 \pm 1,0$	$5,4 \pm 1,0$
Plasma	$0,22 \pm 0,004$	$0,25 \pm 0,05$	$2,5 \pm 0,04$	$1,9 \pm 0,3$

Tableau 31 : Adhésion de D01 et D41 sur le PMMA conditionné par divers milieux.

La comparaison des résultats obtenus avec les deux souches sur le PMMA montre d'une part, une absence de médiation avec l'eau de mer, le bouillon marin et le plasma et d'autre part une adhésion plus importante avec le bouillon marin concentré.

De plus, l'adhésion avec le MB200 passe en présence d'albumine de 0,9 %/cm² à 0,42 %/cm² pour D01 et de 7 %/cm² à 5,4 %/cm² pour D41. La présence d'albumine déplace donc les valeurs d'adhésion qui deviennent semblables à celles observées en milieu dépourvu de matières organiques. Ces expériences, mettent en évidence la présence de médiateurs dans le bouillon marin, ce ou ces médiateurs ne déplacent pas l'albumine montrant ainsi que leur affinité pour le polymère reste faible.

Cette étude a démontré également que la souche D41 adhère près de 6 fois plus que la souche D01.

II. 1. 2. Etude de l'adhésion de D01 et D41 sur le PS

L'adhésion des deux souches est réalisée sur des lamelles de polystyrène de 1 cm².

La structure chimique du polystyrène est présentée figure 63.

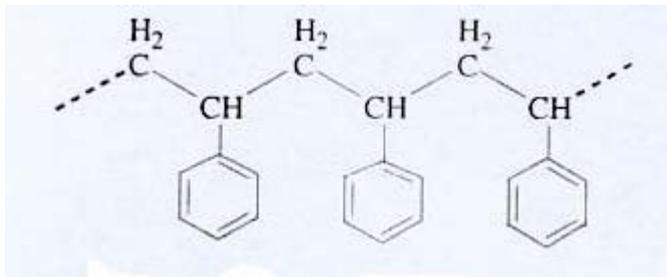


Figure 63 : Structure du poly(styrène), (PS). (Hoffman A.S., 1982 ; Ratner B.D. *et al.*, 1996)

Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes et la valeur des taux d'adhésion α en %/cm². Nous étudierons dans un premier temps l'adhésion des deux souches sur le polystyrène pré-incubé respectivement par le tampon, l'eau de mer, le bouillon marin, le bouillon concentré et la plasma et dans un deuxième temps l'adhésion sur ce même matériau pré-coaté par de la sérum albumine bovine.

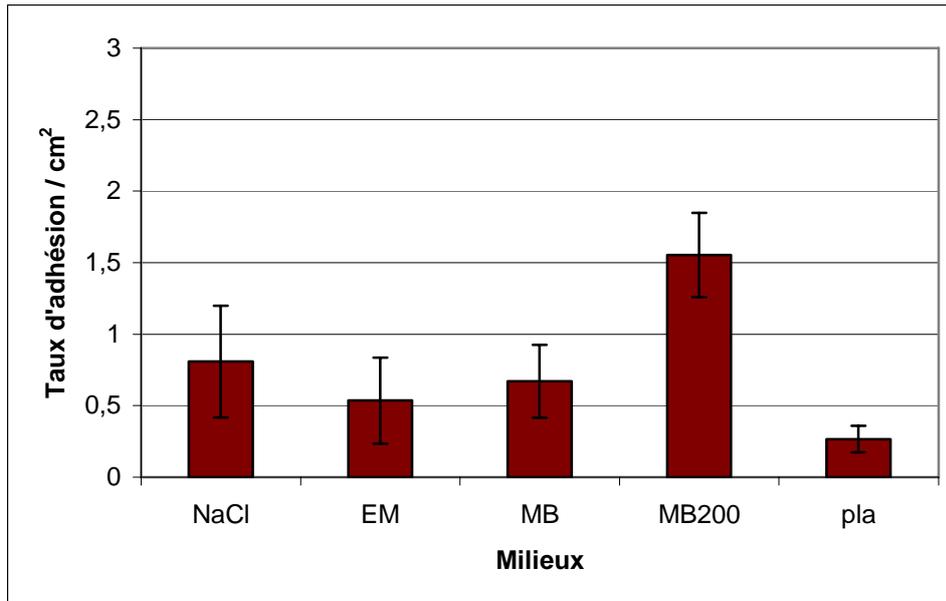


Figure 64 : Adhésion de D01 sur le PS incubé avec le NaCl, l'EM, le MB, le MB200 et le plasma (n=9)

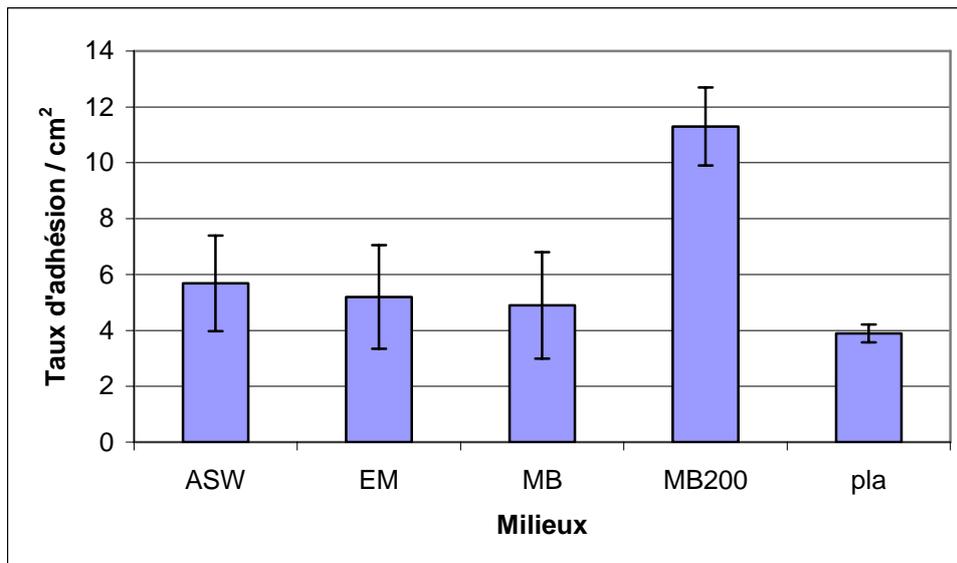


Figure 65 : Adhésion de D41 sur le PS incubé avec l'ASW, l'EM, le MB, le MB200 et le plasma. (n=9)

II.1.2.1. Etude de l'adhésion des deux souches sur le polystyrène pré-incubé dans divers milieux

Les figures 64 et 65 présentent respectivement les résultats de l'adhésion de D01 et D41 sur les lamelles de polystyrène conditionnées avec le NaCl ou l'ASW, l'eau de mer, le bouillon marin, le bouillon marin concentré à 200g/L et le plasma humain.

La souche D01 présente une adhésion de $0,6 \pm 0,1$ %/cm² pour le conditionnement avec le NaCl, l'eau de mer et le bouillon marin, une adhésion de $0,25 \pm 0,09$ %/cm² pour le conditionnement avec le plasma et un taux d'adhésion de $1,5 \pm 0,3$ %/cm² pour le conditionnement avec le bouillon marin concentré.

Pour la souche D41, la même tendance est observée, avec toutefois des taux d'adhésion plus élevés. Le taux d'adhésion est de $5,2 \pm 0,5$ %/cm² pour le conditionnement avec l'ASW, l'eau de mer et le bouillon marin, il est de $3,9 \pm 0,9$ %/cm² pour le plasma et passe à $11,3 \pm 0,9$ %/cm² pour le bouillon marin concentré.

II.1.2.2. Etude de l'adhésion des deux souches sur le polystyrène pré-coaté par l'albumine et incubé dans divers milieux

Les figures 66 et 67 présentent respectivement les résultats de l'adhésion de D01 et D41 sur les lamelles de polystyrène pré-coaté avec de l'albumine et conditionnées avec le NaCl ou l'ASW, l'eau de mer, le bouillon marin, le bouillon marin concentré à 200g/L et le plasma humain.

La souche D01 présente une adhésion de $0,5 \pm 0,3$ %/cm² pour le conditionnement avec le NaCl, l'eau de mer et le bouillon marin, une adhésion de $0,2 \pm 0,1$ %/cm² pour le conditionnement avec le plasma et un taux d'adhésion de $0,5 \pm 0,2$ %/cm² pour le conditionnement avec le bouillon marin concentré.

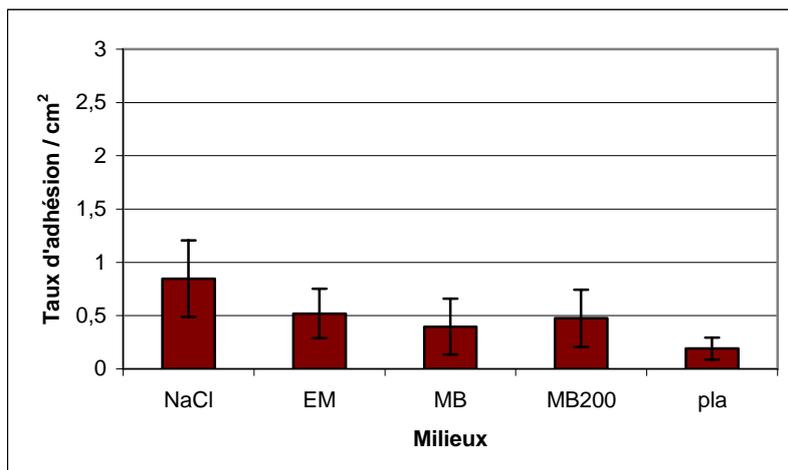


Figure 66 : Adhésion de D01 sur le PS conditionné avec la BSA puis avec le NaCl, l'EM, le MB, le MB200 et le plasma. (n=6)

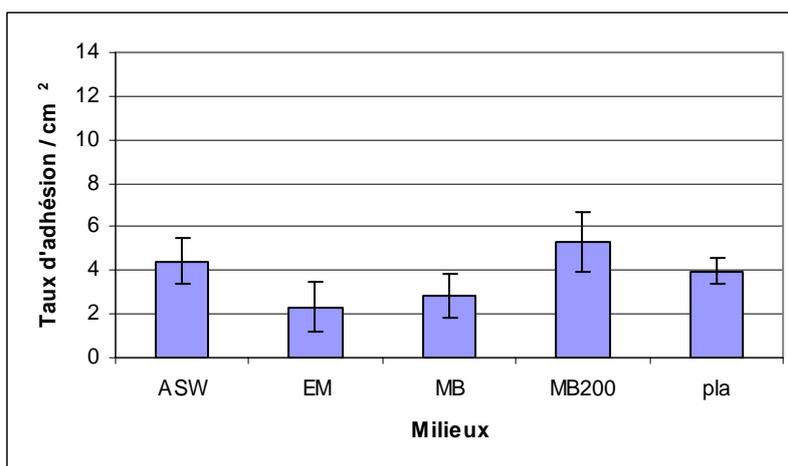


Figure 67 : Adhésion de D41 sur le PS conditionné avec la BSA puis avec l'ASW, l'EM, le MB, le MB200 et le plasma. (n=6)

Pour la souche D41, nous observons également la même tendance avec non seulement des taux d'adhésion plus élevés par rapport à D01 mais aussi un effondrement de l'adhésion avec le bouillon concentré pré-coaté avec l'albumine.

Le taux d'adhésion est de $3 \pm 0,9$ %/cm² pour le conditionnement avec l'ASW, l'eau de mer et le bouillon marin, il est de $4 \pm 0,5$ %/cm² pour le plasma et passe à 5 ± 1 %/cm² pour le bouillon marin concentré.

II.1.2.3. Discussion

Les résultats d'adhésion obtenus sur le polystyrène montrent une adhésion relativement élevée comparée à celle obtenue avec le PMMA puisqu'elle passe en moyenne (pour les milieux NaCl/ASW, EM et MB) de 0,4 %/cm² à 0,6 %/cm² pour D01 et de 2,5 %/cm² à 5,2 %/cm² pour D41. On observe également des taux d'adhésion avec les milieux contenant des matières organiques semblables à ceux obtenus avec le tampon, ainsi pour ces trois types de milieux aucune médiation n'a pu être mise en évidence, ce qui permet de conclure que l'adhésion sur le polystyrène se réalise selon un mode non médié.

De plus, l'adhésion réalisée avec le bouillon marin concentré montre un taux d'adhésion élevé de l'ordre de 1,5 %/cm² pour D01 et 11,3 %/cm² pour D41. Ce taux d'adhésion est, effondré lorsqu'un conditionnement avec l'albumine est réalisé au préalable. Le pré-conditionnement à l'albumine est souvent utilisé en vue de recouvrir les sites de liaison non spécifiques.

Ainsi, le phénomène observé pour le PMMA est également observé dans l'adhésion sur le PS, avec toutefois une adhésion plus élevée pour le PS et ce, pour les deux souches. Notons, également une adhésion qui est 6 fois plus élevée pour D41 par rapport à D01.

II. 1. 3. Etude de l'adhésion de D01 et D41 sur le Polychlorure de Vinyle pré-incubé dans divers milieux

Cette étude est réalisée dans les mêmes conditions que pour le PMMA et le PS.

L'étude est réalisée sur des lamelles de polychlorure de Vinyle (PVC) de 1 cm², dont la formule est présentée figure 68.

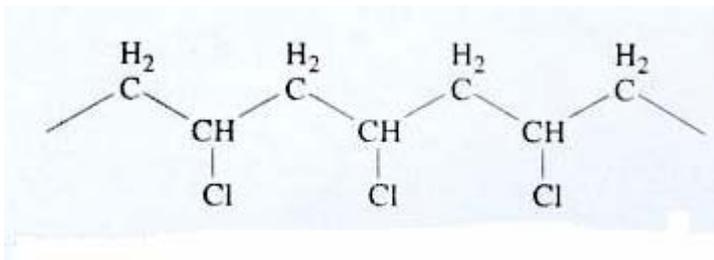


Figure 68 : Structure du poly(chlorure de vinyle), (PVC). (Hoffman A.S., 1982 ; Ratner B.D. *et al.*, 1996)

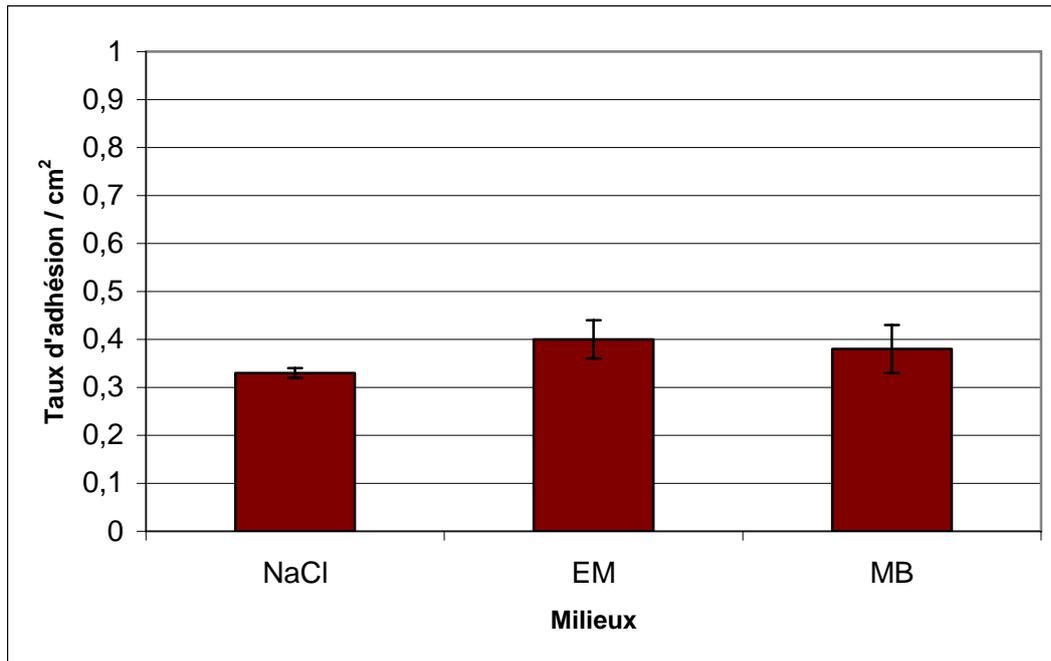


Figure 69 : Adhésion de D01 sur le PVC incubé avec le NaCl, l'EM et le MB. (n=6)

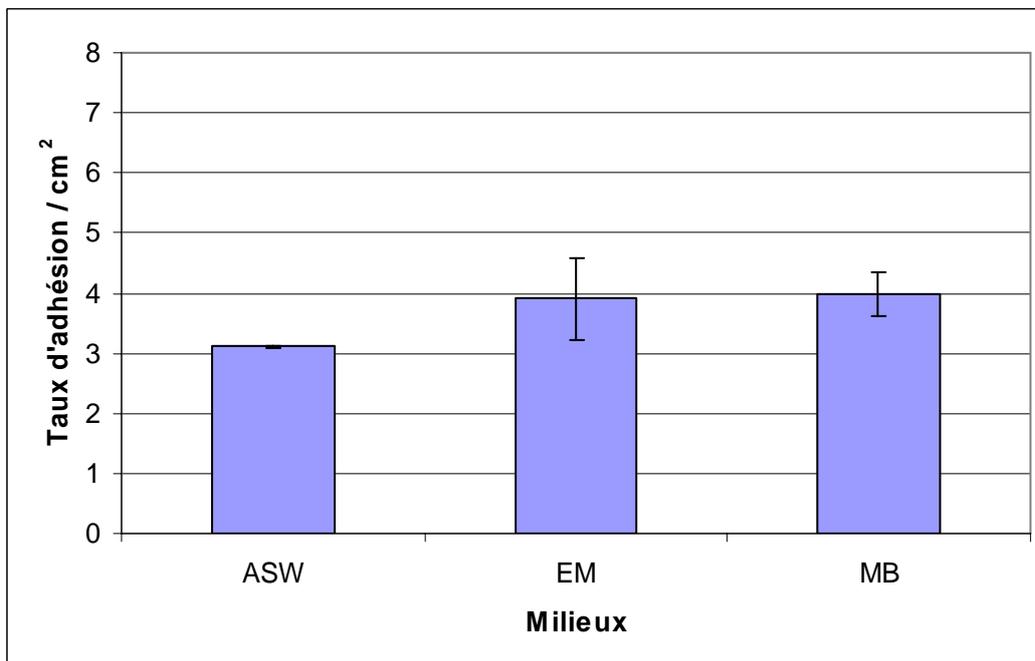


Figure 70 : Adhésion de D41 sur le PVC incubé avec l'ASW, l'EM et le MB. (n=6)

Nous étudierons successivement l'adhésion de D01 et de D41 sur le matériau conditionné dans le tampon, l'eau de mer et le bouillon marin.

II.1.3.1. Résultats

Les figures 69 et 70 présentent les résultats de l'adhésion de D01 sur le PVC conditionné avec la solution tampon, l'eau de mer naturelle et le bouillon marin (37 g/L). Le tableau 32 présente les différentes valeurs de α en $\%/cm^2$ pour chacune des souches.

	D01 ($\%/cm^2$)	D41 ($\%/cm^2$)
NaCl/ASW	0,33 \pm 0,03	3,1 \pm 0,01
EM	0,40 \pm 0,05	3,9 \pm 0,08
MB	0,38 \pm 0,07	4,0 \pm 0,04

Tableau 32 : Adhésion de D01 et D41 sur le PVC dans différents milieux

D01 et D41 adhèrent sur le PVC indépendamment de la nature du milieu de pré-adsorption du polymère avec une adhésion correspondant à une valeur de $0,37 \pm 0,03 \%/cm^2$ pour D01 et de $3,6 \pm 0,4 \%/cm^2$ pour D41, soit une différence d'adhésion d'un facteur 10 entre les deux souches.

II.1.3.2. Discussion

L'analyse des résultats obtenus lors de l'étude de l'adhésion des bactéries sur le PVC en fonction des trois milieux de pré-adsorption, montre, comme pour le PMMA et le PS, qu'il n'y a pas de différences significatives pour chacune des souches. En effet, l'adhésion réalisée avec la solution tampon, qui est un milieu totalement dépourvu de matière organique, présente un taux sensiblement identique aux taux d'adhésion obtenus avec des milieux plus ou moins riches en matières organiques comme l'eau de mer ou le bouillon marin. L'adhésion de ces deux souches sur ces matériaux semble donc être directe, n'impliquant pas de médiateur.

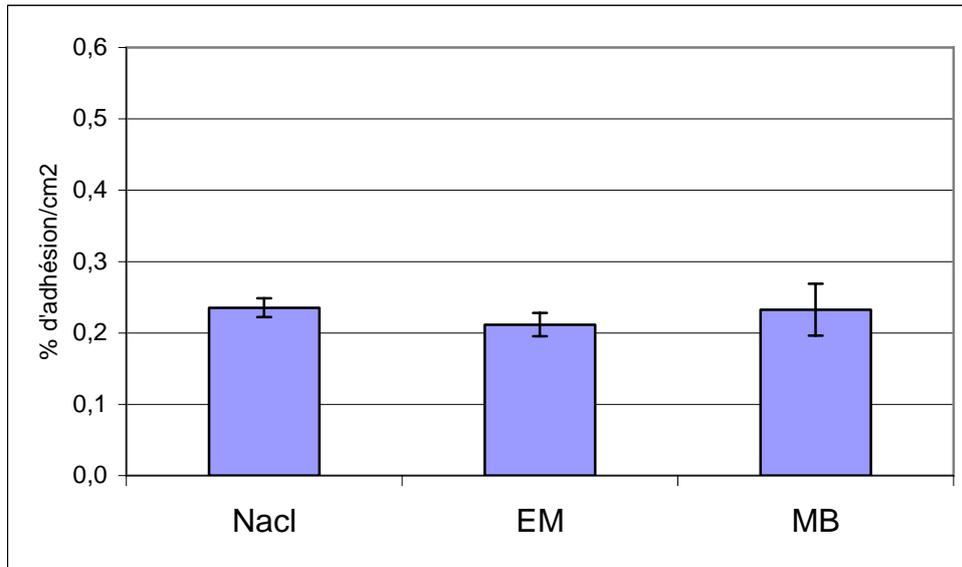


Figure 72: Adhésion de D01 sur l'acétate de cellulose conditionnée dans divers milieux (n=3).

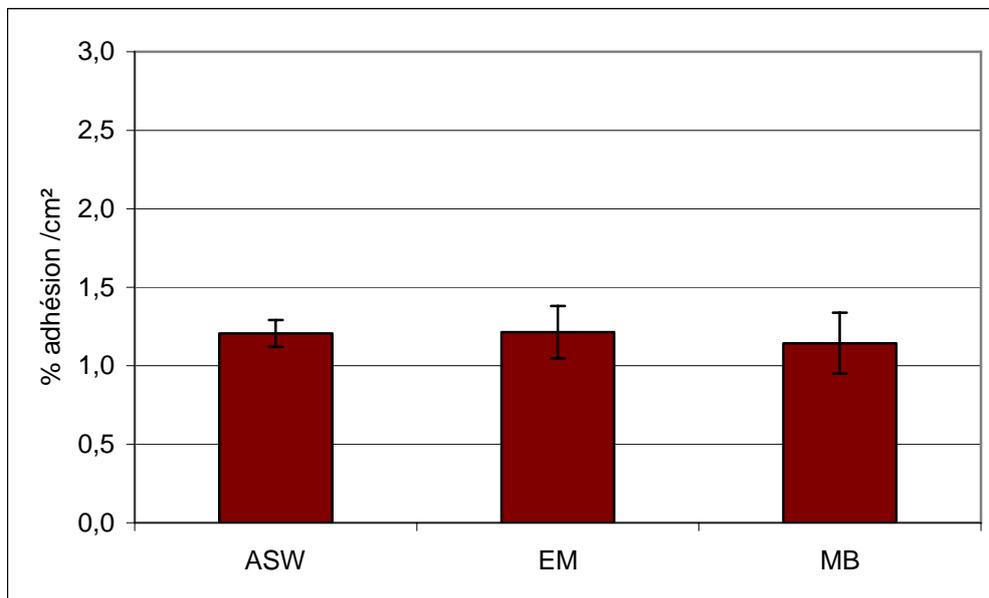


Figure 73: Adhésion de D41 sur l'acétate de cellulose conditionnée dans divers milieux (n=3).

II.1.4. Etude de l'adhésion de D01 et D41 sur l'acétate de cellulose pré-incubé dans divers milieux

L'étude est réalisée sur des lamelles de l'acétate de cellulose (AC) de 1 cm², dont la formule est présentée figure 71.

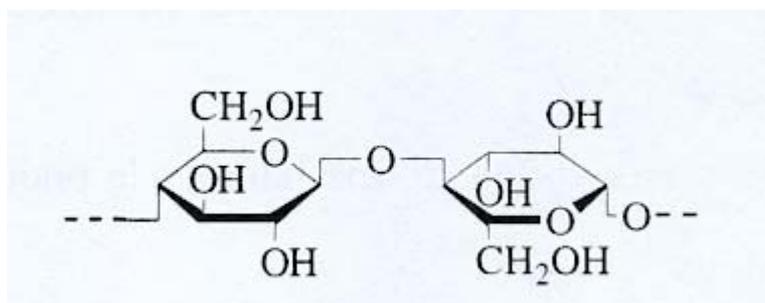


Figure 71 : Structure de l'acétate de cellulose, (AC). (Hoffman A.S., 1982 ; Ratner B.D. *et al.*, 1996)

Nous étudierons successivement l'adhésion de D01 et de D41 sur le matériau conditionné dans le tampon, l'eau de mer et le bouillon marin.

II.1.4.1. Résultats

Les figures 72 et 73 présentent les résultats de l'adhésion de D01 sur l'AC conditionné avec la solution tampon, l'eau de mer naturelle et le bouillon marin (37 g/L). Le tableau 33 présente les différentes valeurs de α en %/cm² pour chacune des souches.

	D01	D41
NaCl/ASW	0,23 ± 0,02	1,2 ± 0,19
EM	0,21 ± 0,03	1,21 ± 0,40
MB	0,23 ± 0,07	1,14 ± 0,50

Tableau 33 : Adhésion de D01 et D41 sur l'acétate de cellulose.

D01 et D41 adhèrent sur l'AC indépendamment de la nature du milieu de pré-adsorption du polymère avec une adhésion de base correspondant à une valeur de

$0,22 \pm 0,03 \text{ \%/cm}^2$ pour D01 et de $1,17 \pm 0,4 \text{ \%/cm}^2$ pour D41, soit une différence d'adhésion d'un facteur 5 entre les deux souches.

II.1.4.2. Discussion

A nouveau, nous observons une adhésion non spécifique, qui ne varie pas en fonction du milieu d'incubation. La différence entre les deux souches est retrouvée elle est cependant moindre. Les valeurs des taux d'adhésion sont également moindres puisqu'elles passent, par exemple de 0,4 % pour l'adhésion de D01 sur le PMMA à 0,22% pour l'acétate de cellulose. Cette différence peut être due à la nature même de l'acétate de cellulose qui est un peu moins hydrophobe que le PMMA ou le PS.

II. 1. 5. Conclusion

Les résultats de cette étude montrent que les adhésions des deux souches sur le PMMA, le PS, le PVC et l'AC sont comparables, avec cependant des taux d'adhésion de D41 plus élevés (environ 5 à 10 fois plus) que ceux de D01. Cette différence peut être due aux caractéristiques de surface des bactéries. Rubio (2002), a montré que les caractères physico-chimiques de surface des deux souches sont différents. La souche D01 présente des caractères électro-donneur et électro-accepteur marqués soit une surface bactérienne plutôt hydrophile alors que la souche D41 au contraire présente des caractères électro-donneur/accepteur faibles, rendant ainsi la surface bactérienne moins hydrophile.

La comparaison des résultats obtenus sur ces souches avec ceux des souches commensales de l'homme, montre que les taux d'adhésion de D41 sur le PMMA sont très élevés par rapport à ceux de *S. aureus* ou *S. pyogenes* dans les mêmes conditions (Berlot, 1998 et Fadli, 2000). En outre, à l'inverse des souches commensales, on observe, en milieu plasmatique, une absence totale de médiation pour les souches marines. Les bactéries marines adhèrent vraisemblablement selon un processus différent de celui des bactéries commensales de l'homme.

L'adhésion de D01 et D41 n'augmente pas sur les matériaux incubés en eau de mer et en bouillon marin par rapport au milieu tampon. Cependant, le taux d'adhésion

avec le bouillon marin concentré est deux fois plus élevé ce qui implique la présence d'un ou plusieurs médiateurs dans le bouillon marin. Les résultats obtenus sur le PMMA et le PS montrent que ce ou ces médiateurs contenus dans le MB augmentent l'adhésion des bactéries marines sur ces matériaux. Toujours selon ces résultats, ce ou ces médiateurs ne sont pas présents ou alors très faiblement concentrés dans l'eau de mer naturelle, expliquant ainsi l'adhésion semblable à celle retrouvée en milieu tampon.

Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle le PMMA et le polystyrène peuvent "recruter" des "éléments" qui stimulent l'adhésion bactérienne, à condition que ces éléments soient en concentration élevée, ce ou ces médiateurs possèdent une affinité plutôt faible pour les matériaux puisqu'ils sont facilement déplacés par l'albumine.

II. 2. Etude de l'adhésion des deux souches bactériennes sur les copolymères statistiques dérivés du polystyrène

Nous allons étudier maintenant l'adhésion de D01 et D41 sur plusieurs familles de copolymères statistiques synthétisés selon les protocoles décrits dans la partie "matériels et méthodes".

Les expériences sont réalisées selon le protocole identique à celui qui a été utilisé pour l'étude réalisée sur les matériaux hydrophobes. Toutes les isothermes d'adhésion ayant la même forme, comme décrit auparavant, c'est-à-dire se résument à la tangente à l'origine, la pente de la tangente a été déterminée dans les conditions définies, en mesurant l'adhésion sur un échantillon de copolymère statistique en équilibre d'échange d'adhésion avec une population bactérienne, chaque mesure ayant été répétée n fois (n= 3, 6 ou 9).

Trois familles constituées chacune de 8 polymères sont étudiées :

- Polystyrène sulfamide de phénylalanine (PSSO₂Phe)
- Polystyrène sulfamide d'acide aspartique (PSSO₂Asp)
- Polystyrène sulfamide d'ester méthylique d'acide aspartique (PSSO₂Asp-oMe)

Et sont comparées aux polymères dits, témoins :

- Polystyrène sulfonate de sodium (PSSO₃Na)
- Polystyrène sulfamide d'éthanolamine (PSSO₂Eth)

Dans l'exposé de cette étude, nous avons regroupé d'une part les résultats sur le polystyrène sulfonate sodium et le polystyrène sulfamide d'éthanolamine et d'autre part sur les trois familles de copolymères.

II.2.1. Etude de l'adhésion de D01 et D41 sur le PSSO₃Na et le PSSO₃eth

II.2.1.1. Introduction

Le polystyrène sulfonate de sodium et le polystyrène sulfamide d'éthanolamine utilisés sont constitués respectivement de 82 % de motifs sulfonate de sodium et 76 % de motifs sulfamide d'éthanolamine. L'éthanolamine confère au polymère une hydrophilie plus élevée que celle du polystyrène sulfonate de sodium. De plus, la détermination du taux de gonflement des polymères montre que le PSSO₃Na (dont le taux est de 144) gonfle 12 fois plus que le PSSO₂Eth. Ainsi, les surfaces spécifiques calculées (Cf. chapitre 1 de *Résultats et Discussion*) sont de 1,78 cm²/mg pour le PSSO₃Na et de 0,82 cm²/mg pour le PSSO₂Eth.

Chaque expérience est réalisée avec un échantillon de 20mg de polymère.

Les résultats sont présentés sous forme d'histogramme et la valeur des taux d'adhésion α est exprimée en %/mg. Nous étudierons successivement l'adhésion de D01 et de D41 sur les polymères conditionnés dans le tampon, l'eau de mer et le bouillon marin.

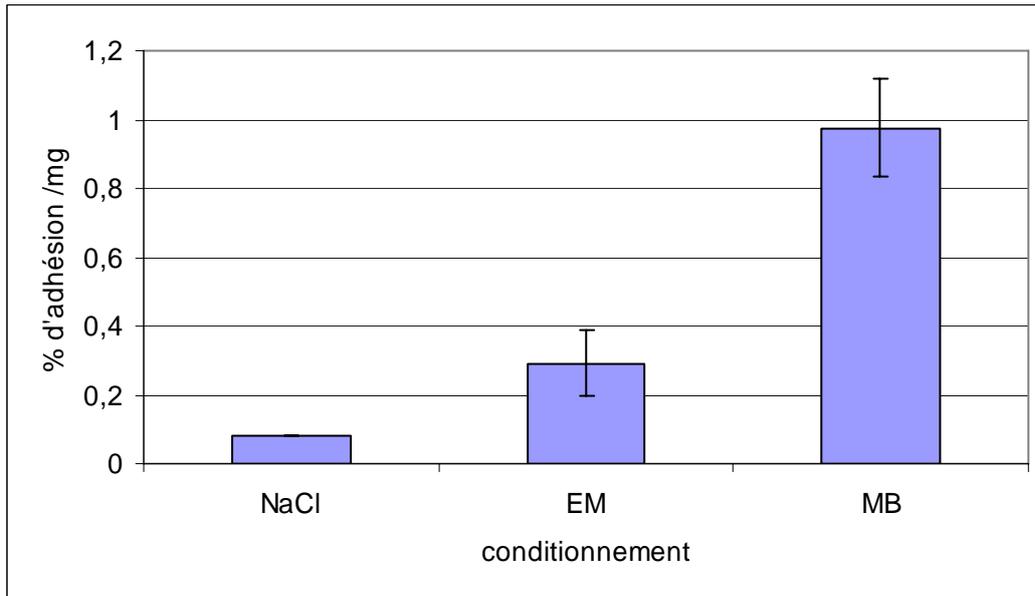


Figure 74 : Adhésion de D01 sur le PSSO₃Na conditionné avec le NaCl, l'EM et le MB, (n=9)

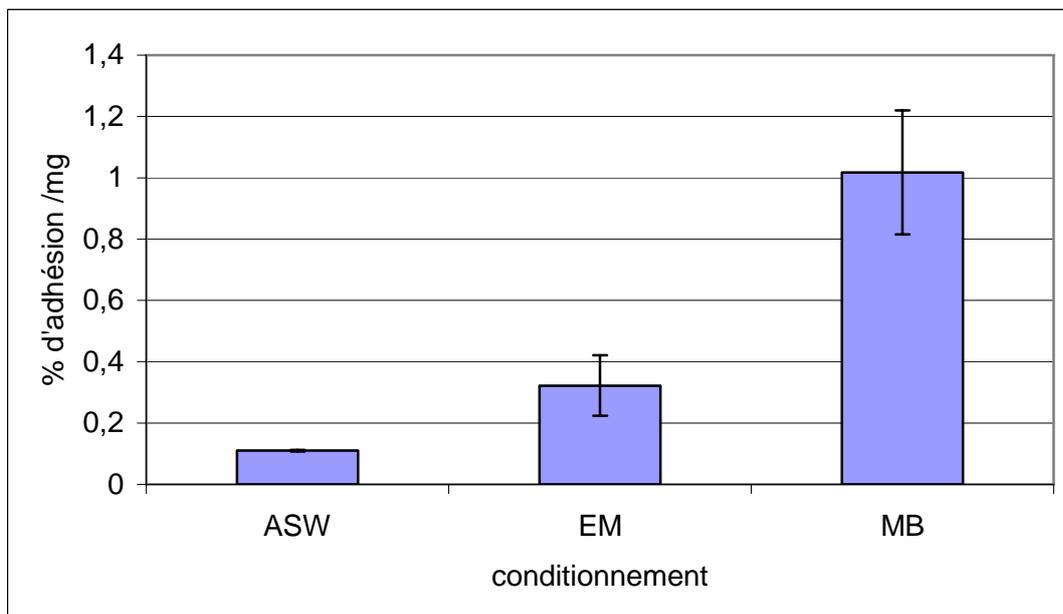


Figure 75 : Adhésion de D41 sur le PSSO₃Na conditionné avec le ASW, l'EM et le MB, (n=9)

II.2.1.2. Adhésion sur le PSSO₃Na

Les figures 74 et 75 présentent respectivement les résultats de l'adhésion de D01 et D41 sur le PSSO₃Na conditionné avec la solution de NaCl ou ASW, l'eau de mer naturelle et le bouillon marin (37 g/L). Le tableau 34 présente les valeurs d'adhésion α en %/mg des deux souches sur le PSSO₃Na.

	D01 (%/mg)	D41 (%/mg)
NaCl/ASW	0,081 ± 0,001	0,11 ± 0,002
EM	0,29 ± 0,09	0,32 ± 0,09
MB	0,97 ± 0,14	1,01 ± 0,20

Tableau 34: Valeurs des taux d'adhésion de D01 et D41 sur le PSSO₃Na

L'adhésion varie de façon significative avec le milieu de conditionnement. Les valeurs du taux d'adhésion sont multipliées par 10 pour le bouillon marin par rapport à la solution tampon. Ainsi, aussi bien pour D01 que pour D41, il est possible de mettre en évidence l'existence d'une médiation, les matières organiques présentes dans l'eau de mer ou le bouillon marin sont d'une part adsorbées sur le polymère et d'autre part, elles semblent stimuler l'adhésion des deux souches. En outre, les valeurs d'adhésion observées pour D41 sont comparables à celles de D01. Ainsi, les taux d'adhésion des deux souches sur ce polymère sont les mêmes, que se soit en conditions médiées (EM et MB) ou non médiées (solution tampon).

La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus sur les polymères hydrophobes montre pour la première fois, l'existence d'une médiation dans l'interaction des bactéries avec les matériaux avec l'eau de mer et le bouillon marin faiblement concentré. En outre, la différence de taux d'adhésion entre D01 et D41 relevés sur les polymères hydrophobes n'existe plus avec le PSSO₃Na, ce qui souligne la particularité de ce polymère. Ainsi, il existe une médiation avec le PSSO₃Na et nous pouvons émettre l'hypothèse que cette médiation annule les interactions de type non spécifiques qui existent avec les polymères hydrophobes.

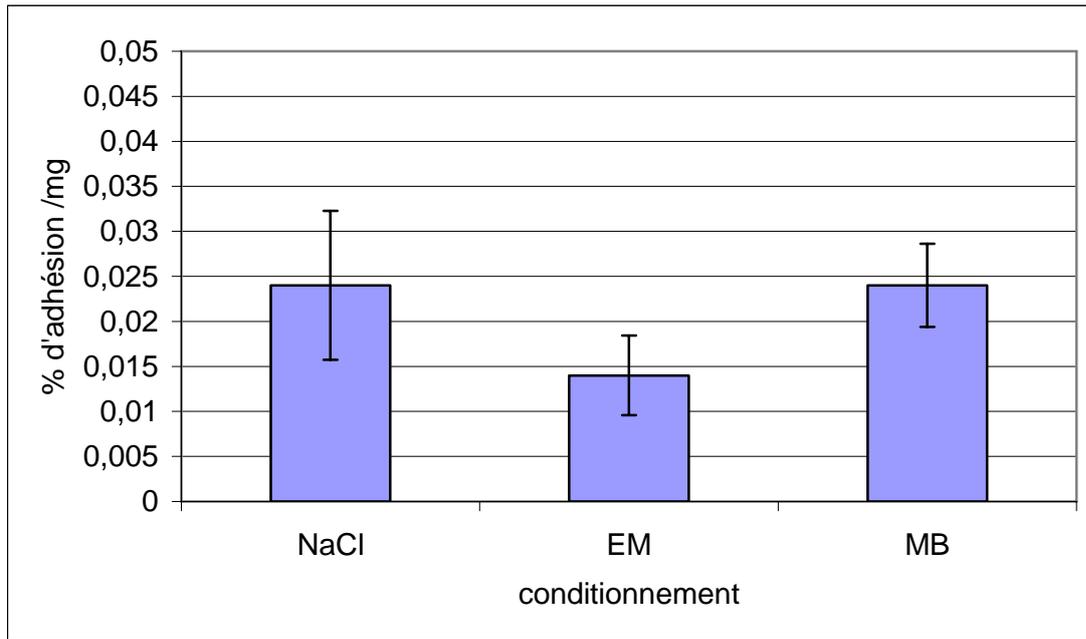


Figure 76: Adhésion de D01 sur le PSSO₂Eth conditionné avec le NaCl, l'EM et le MB, (n=9)

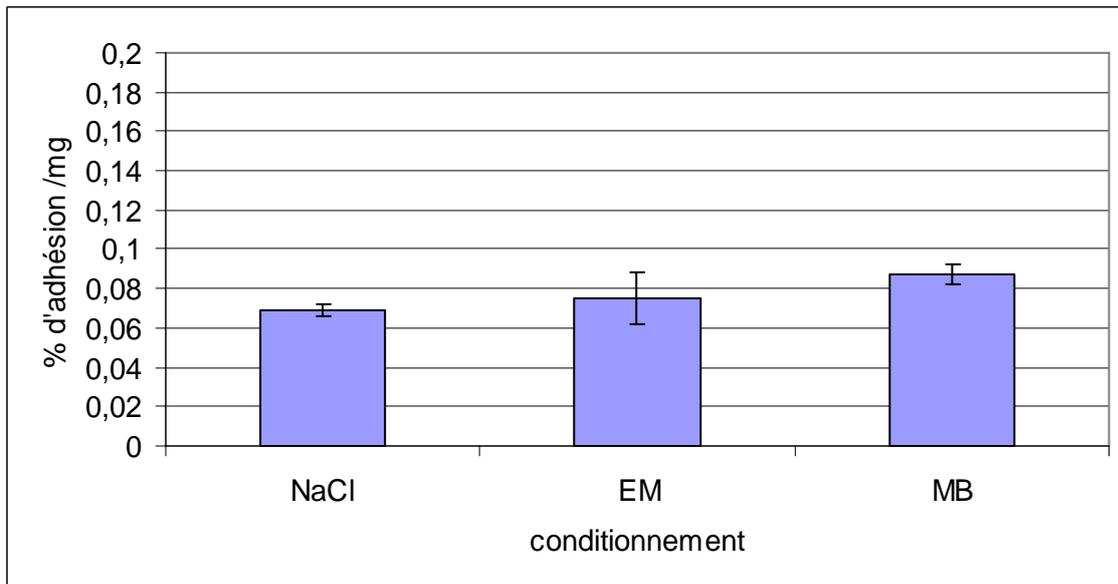


Figure 77 : Adhésion de D01 sur le PSSO₂Eth conditionné avec le ASW, l'EM et le MB, (n=9)

II.2.1.3. Adhésion sur le PSSO₂Eth

Les figures 76 et 77 présentent respectivement les résultats de l'adhésion de D01 et D41 sur le PSSO₂Eth conditionné respectivement avec la solution de NaCl ou ASW, l'eau de mer naturelle et le bouillon marin (37 g/L). Le tableau 35 présente les valeurs d'adhésion α en %/mg des deux souches sur le PSSO₃Eth.

	D01 (%/mg)	D41 (%/mg)
NaCl/ASW	0,024 \pm 0,008	0,069 \pm 0,002
EM	0,014 \pm 0,004	0,075 \pm 0,012
MB	0,024 \pm 0,004	0,087 \pm 0,005

Tableau 35 : Valeurs des taux d'adhésion de D01 et D41 sur le PSSO₂Eth

Les résultats montrent que l'adhésion ne varie pas de façon significative avec le milieu de conditionnement. Elle est en moyenne de $0,020 \pm 0,005$ %/mg pour D01 et de $0,077 \pm 0,008$ %/mg pour D41. Il semble que l'adhésion est non médiée. L'absence de médiation conduit de nouveau à une différence du taux d'adhésion, avec un facteur 4, entre D01 et D41. Ainsi, la comparaison de ces résultats avec ceux obtenus pour les polymères hydrophobes montre une absence de médiation avec toutefois des taux d'adhésion très faibles par rapport à ceux observés pour le PMMA, le PS ou le PVC.

II.2.1.4. Discussion

Les deux copolymères statistiques qui viennent d'être étudiés, sont substitués par deux fonctions différentes : le PSSO₃Na possède une proportion élevée de groupements sulfonate de sodium alors que le PSSO₂Eth contient une majorité de fonction alcool. Cette différence est sûrement à l'origine des différences observées lors de l'adhésion, la présence des fonctions alcools ou bien l'absence des fonctions sulfonates peut expliquer l'absence de médiation dans les interactions sur le PSSO₂Eth. Il semblerait que la médiation observée dans le cas du PSSO₃Na, permet de limiter la différence des taux d'adhésion entre D01 et D41, différence qui est

retrouvée dans le cas du PSSO₂Eth. De plus, comparés aux polymères hydrophobes étudiés, ces deux polymères sont plutôt hydrophiles, cette hydrophilie confère à ces polymères une capacité d'adhésion plus faible lors des interactions non médiée (le PSSO₂Eth dans toutes les conditions et le PSSO₃Na avec la solution tampon).

II. 2. 2. Etude de l'adhésion de D01 et D41 sur les familles PSSO₂Asp, PSSO₂Phe et PSSO₂Asp-O-Me

II.2.2.1. Introduction

Les familles des polystyrènes sulfamides d'acide aspartique, de phénylalanine et d'ester méthylique d'acide aspartique sont synthétisées selon le protocole décrit dans la partie *matériels et méthodes*. Pour chaque expérience, une quantité déterminée de 20 mg de polymère est utilisée. Pour chaque famille, l'évolution du pourcentage d'adhésion α en fonction du taux de substitution en acide aminé est observée. L'étude est réalisée en milieu dépourvu de matières organiques (solution de NaCl ou d'ASW), en milieu naturel contenant des matières organiques (l'eau de mer) et en milieu riche en matières organiques (le bouillon marin).

II.2.2.2. Adhésion de D41 et D01 sur la famille des polystyrènes sulfamide d'ester méthylique d'acide aspartique

Le copolymère statistique sulfamide d'ester méthylique d'acide aspartique que nous nommerons dans la suite de l'exposé : Asp-o-Me, possède des fonctions méthyle à sa surface, fonctions qui lui confèrent un caractère plutôt hydrophobe. De plus, la variation du taux de gonflement induit une variation de la surface spécifique qui passe de 1,04 cm²/mg pour le polymère le moins substitué à 1,17 cm²/mg pour le plus substitué.

L'adhésion de D01 et D41 sur chaque copolymère de la famille Asp-o-Me est étudié successivement.

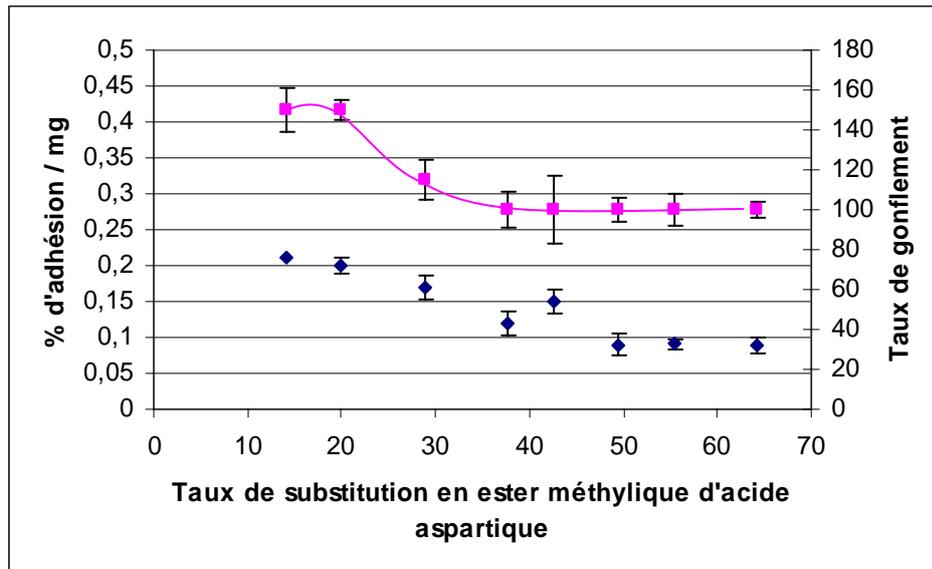


Figure 78 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D01 en NaCl (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en acide aspartique méthyle ester (n=6)

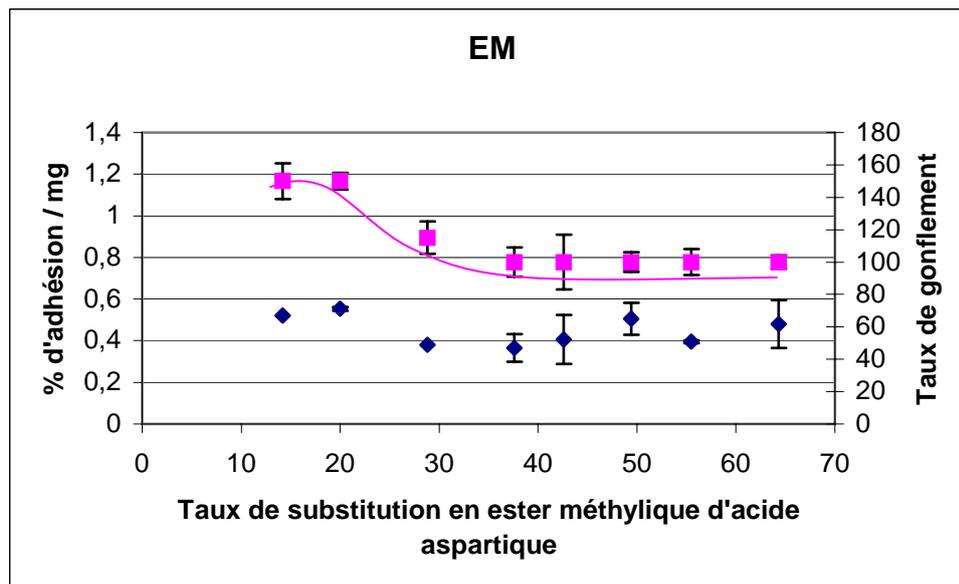


Figure 79 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D01 en EM (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en acide aspartique méthyle ester (n=6)

Adhésion de D01 :

Les figures 78, 79 et 80 présentent les résultats obtenus respectivement avec le NaCl à 36‰, l'eau de mer et le bouillon marin pour D01, en traçant le profil de l'évolution du taux de gonflement en fonction du taux de substitution en ester méthylique d'acide aspartique. Ainsi sur ce profil, nous observons deux zones : la première entre 0% et 30% de substitution avec un taux de gonflement élevé et une seconde zone entre 30% et 60% avec un taux de gonflement relativement faible et constant.

Les résultats obtenus avec le NaCl (figure 78), montrent que les pourcentages d'adhésion sont respectivement de 0,2 %/mg pour les compositions comprises entre 0% et 40% d'ester méthylique d'acide aspartique et de 0,1%/mg pour les compositions supérieures à 40% de substitution.

Pour l'étude réalisée avec l'eau de mer (figure 79) et le bouillon marin (figure 80) on remarque un profil légèrement différent, en effet, l'adhésion ne varie pas selon le taux de substitution et est de $0,4 \pm 0,08$ %/mg pour l'eau de mer et de $1 \pm 0,01$ %/mg pour le bouillon marin.

Ainsi, nous observons une adhésion 2 à 4 fois plus élevée pour l'eau mer et 5 à 10 fois plus élevée pour le bouillon marin par rapport au NaCl.

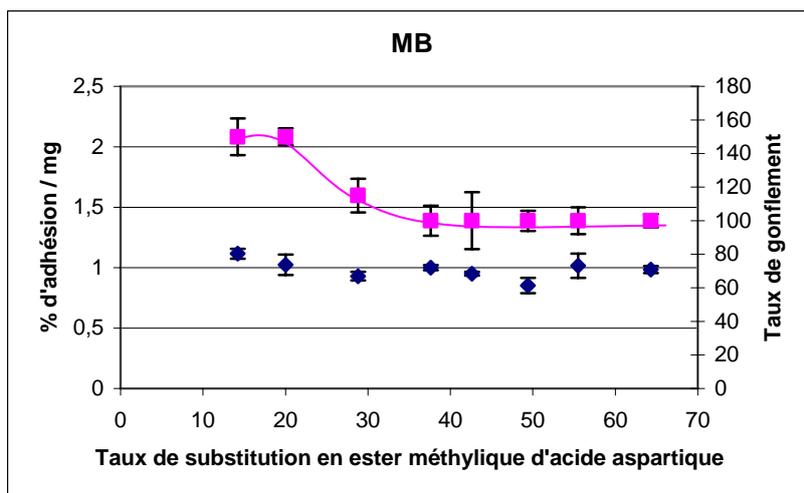


Figure 80 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D01 en MB (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en acide aspartique méthyle ester (n=6)

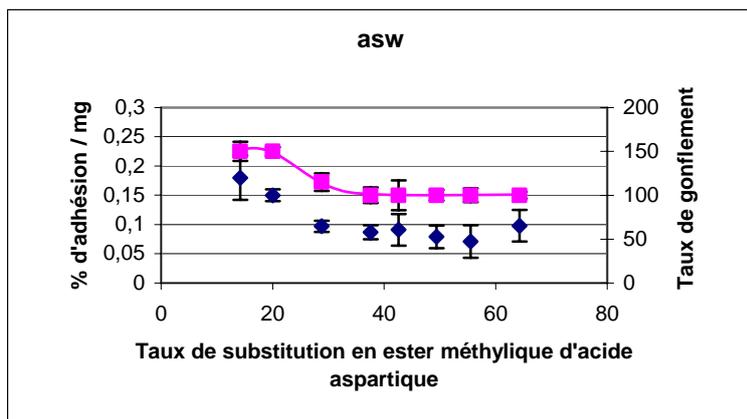


Figure 81 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D41 en ASW (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en acide aspartique méthyle ester (n=6)

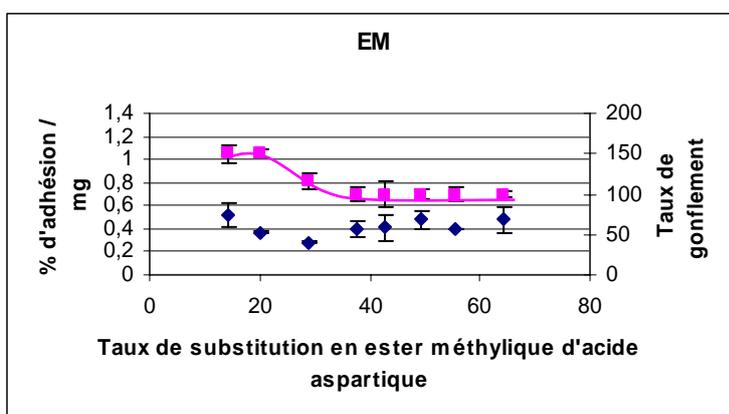


Figure 82 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D41 en EM (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en acide aspartique méthyle ester (n=6)

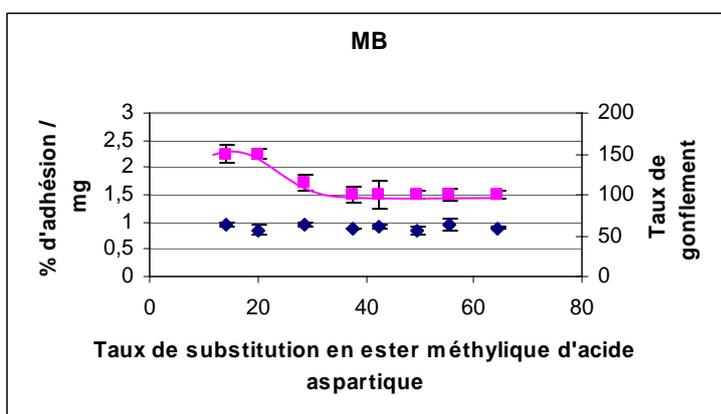


Figure 83 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D41 en MB (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en acide aspartique méthyle ester (n=6)

Adhésion de D41 :

Les figures 81, 82 et 83 présentent les résultats d'adhésion de D41 obtenus respectivement en milieu ASW à 26‰, eau de mer et bouillon marin.

Les figures montrent que l'adhésion de D41 sur ces copolymères présente un profil comparable à celui obtenu pour l'adhésion de D01 sur ces mêmes polymères.

Les valeurs α des taux d'adhésion exprimé en %/mg peuvent varier en fonction du taux de substitution avec une adhésion de 0,17 %/mg pour les copolymères faiblement substitués et une adhésion de 0,08%/mg pour les copolymères substitués par plus de 40% de motifs sulfamide d'ester méthylique d'acide aspartique. (figure 81).

Comme pour D01, l'étude réalisée avec l'eau de mer (figure 82) montre un pourcentage d'adhésion de $0,4 \pm 0,1$ %/mg et celle réalisée avec le bouillon marin (figure 83) un pourcentage de $0,9 \pm 0,01$ %/mg.

Les résultats obtenus sont comparables pour les deux souches, avec un taux d'adhésion de 0,1 %/mg avec le tampon, 4 fois plus élevé pour l'eau de mer et de 10 fois plus élevé pour le bouillon.

II.2.2.3. Adhésion de D01 et D41 sur la famille des polystyrènes sulfamide d'acide aspartique

Les copolymères statistiques sulfamide d'acide aspartique que nous nommerons dans la suite de l'exposé : Asp, possèdent un taux de gonflement en milieu aqueux compris entre 160 à 260, ce qui conduit à une variation de la surface spécifique de 1,26 à 1,60 cm²/mg de microsphères.

L'adhésion de D01 et D41 sur chaque copolymère de la famille Asp est étudié successivement.

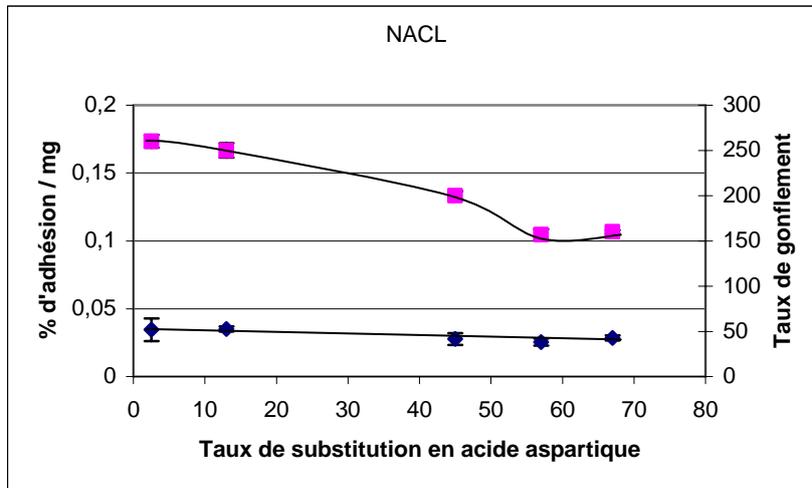


Figure 84 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D01 en NaCl (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en acide aspartique (n=6)

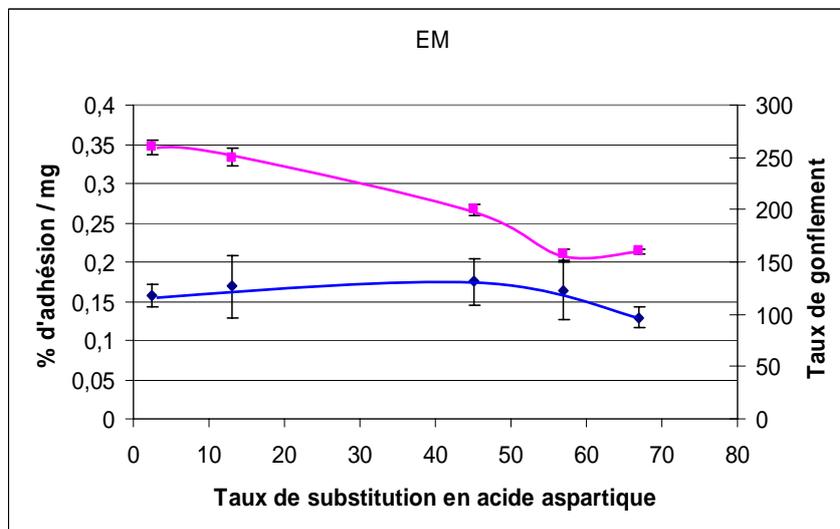


Figure 85 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D01 en EM (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en acide aspartique (n=6)

Adhésion de D01 :

Les figures 84, 85 et 86 présentent les résultats obtenus respectivement avec le NaCl à 36‰, l'eau de mer et le bouillon marin pour D01.

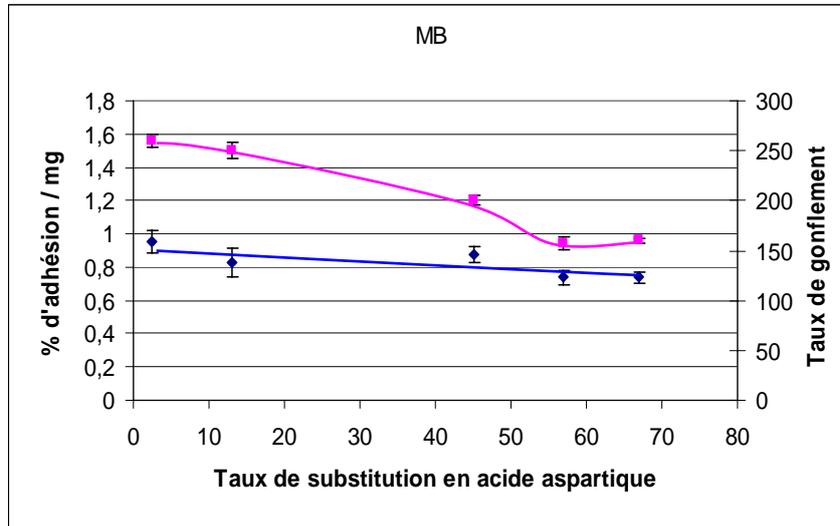


Figure 86 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D01 en MB (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux de substitution en acide aspartique (n=6)

Les résultats obtenus avec le NaCl (figure 84) montrent que les pourcentages d'adhésion sont de $0,03 \pm 0,01$ %/mg et ce quelque soit la composition du polymère. L'étude réalisée avec l'eau de mer (figure 85) et le bouillon marin (figure 86) montre également très peu de variations en fonction du taux de substitution, avec une adhésion de $0,15 \pm 0,02$ %/mg pour l'eau de mer et $0,9 \pm 0,1$ %/mg pour le bouillon marin.

Ainsi, l'adhésion de D01 sur la famille Asp est 3 fois plus faible sur les polymères conditionnés avec le NaCl (sans médiation) qu'avec l'eau de mer et 10 fois plus faible qu'avec le bouillon marin. Cette augmentation de l'adhésion étant sûrement due à la présence de médiateurs dans l'eau de mer et le bouillon marin.

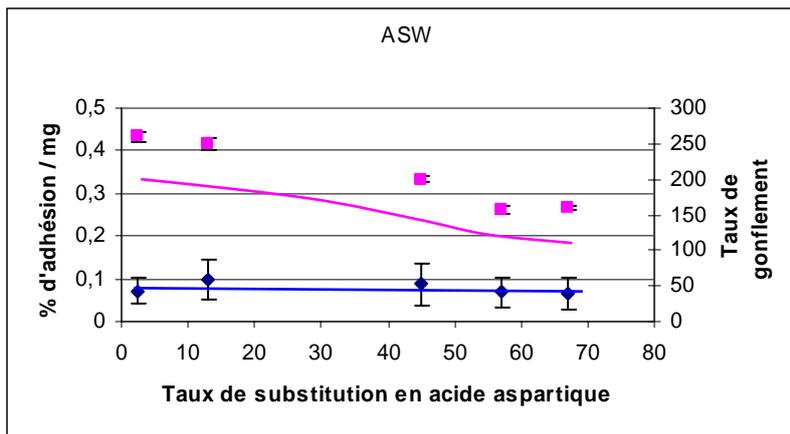


Figure 87 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D41 en ASW (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en acide aspartique (n=6)

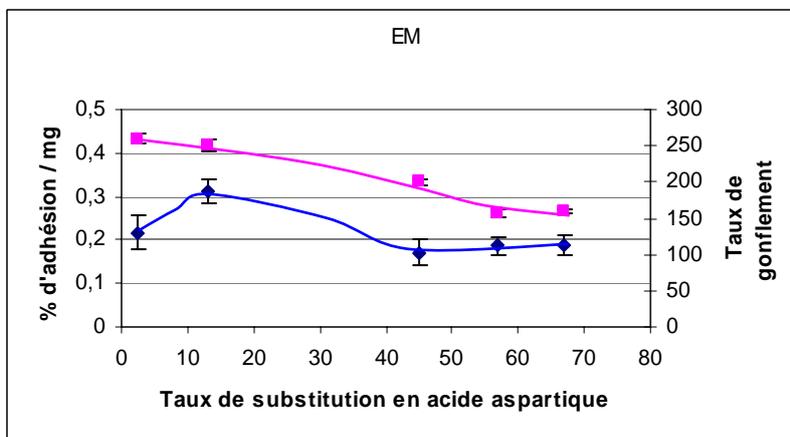


Figure 88 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D41 en EM (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en acide aspartique. (n=6)

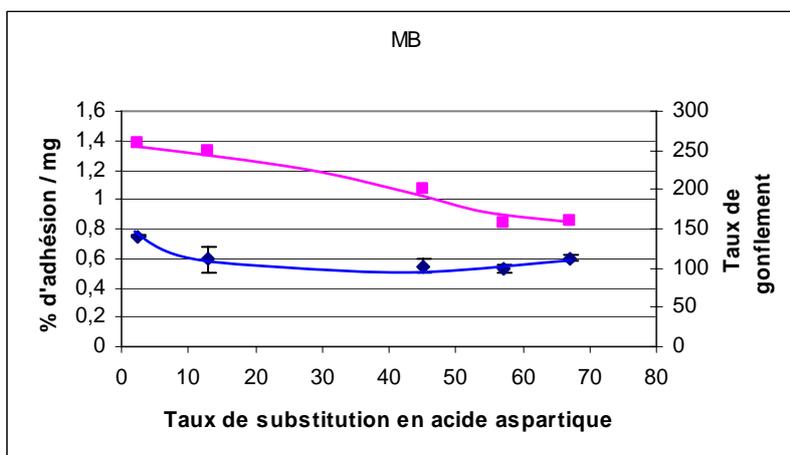


Figure 89 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D41 en MB (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en acide aspartique. (n=6)

Adhésion de D41 :

Les figures 87, 88 et 89 présentent les résultats obtenus respectivement avec l'ASW à 26‰, l'eau de mer et le bouillon marin pour D41.

Les résultats montrent un profil d'adhésion sensiblement identique à celui obtenu avec D01.

En effet, l'adhésion sur les polymères conditionnés avec l'ASW (figure 87) est de $0,05 \pm 0,02$ %/mg, elle est de $0,2 \pm 0,05$ %/mg avec l'eau de mer (figure 88) et de $0,6 \pm 0,1$ %/mg avec le bouillon marin (figure 89).

Nous observons toutefois que le taux d'adhésion de D41 sur les polymères conditionnés par le tampon est plus important que celui obtenu pour D01 dans les mêmes conditions.

II.2.2.4. Adhésion de D01 et D41 sur la famille des polystyrènes sulfamide de phénylalanine

Le copolymère statistique sulfamide de phénylalanine que nous nommerons pour la suite de l'exposé : Phe, possède des surfaces spécifiques qui varient avec l'évolution du taux de gonflement, de 1,17 à 1,41 cm²/mg de résine (Cf. Chap 1.).

L'adhésion de D01 et D41 sur chaque copolymère de la famille Phe est étudiée successivement.

Les figures 90, 91 et 92 présentent les résultats obtenus respectivement avec le NaCl à 36‰, l'eau de mer et le bouillon marin pour D01.

Les figures 93, 94 et 95 présentent les résultats obtenus respectivement avec l'ASW à 26‰, l'eau de mer et le bouillon marin pour D41.

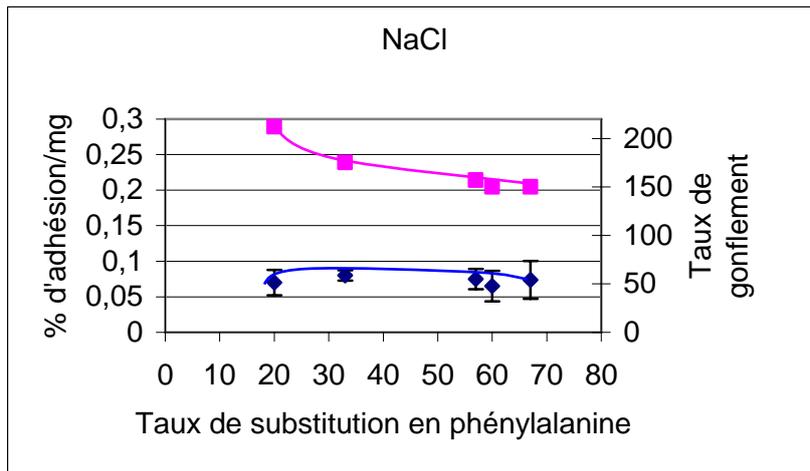


Figure 90 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D01 en NaCl (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en phénylalanine (n=6)

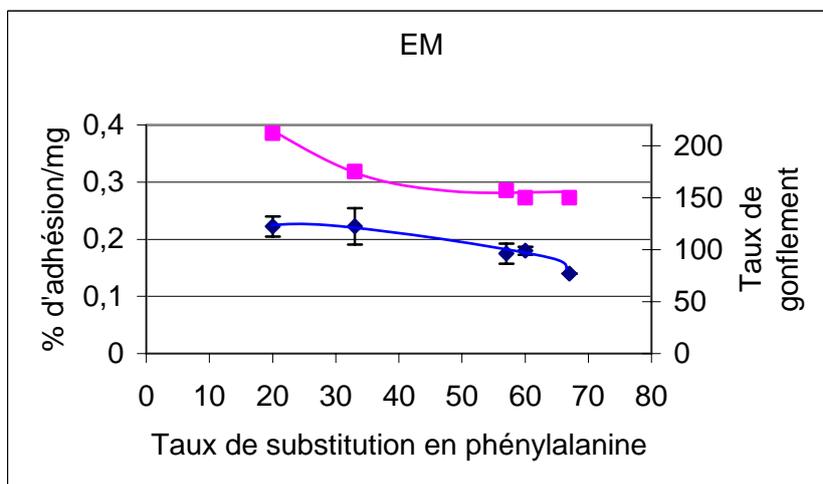


Figure 91 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D01 en EM (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en phénylalanine (n=6)

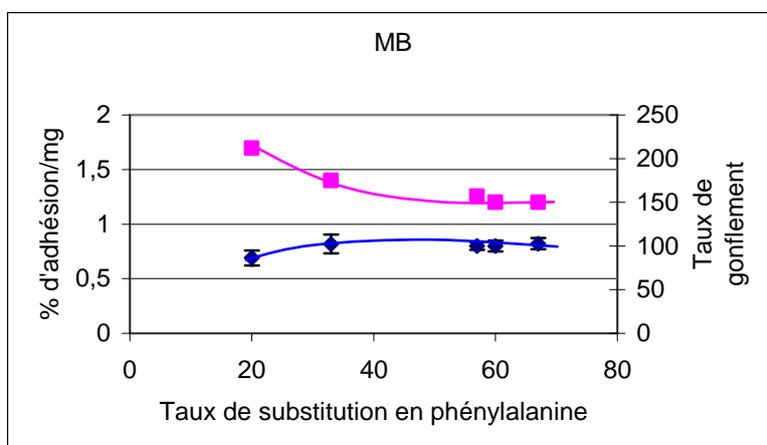


Figure 92 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D01 en MB (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en phénylalanine (n=6)

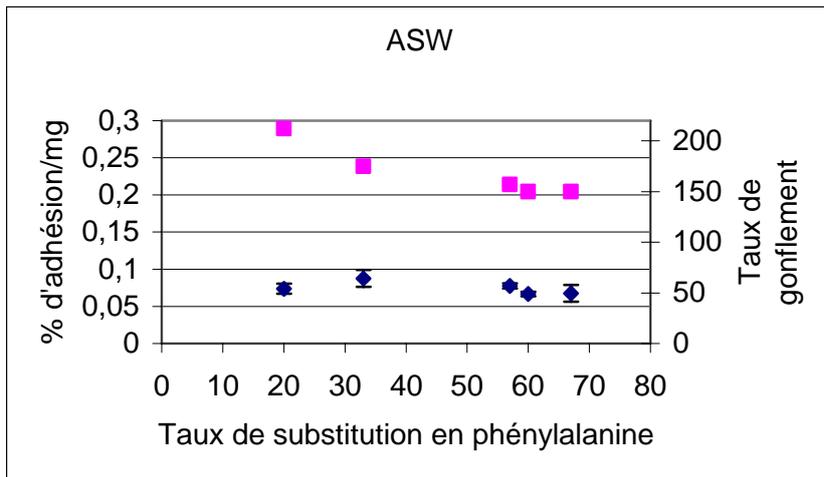


Figure 93 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D41 en ASW (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en phénylalanine (n=6)

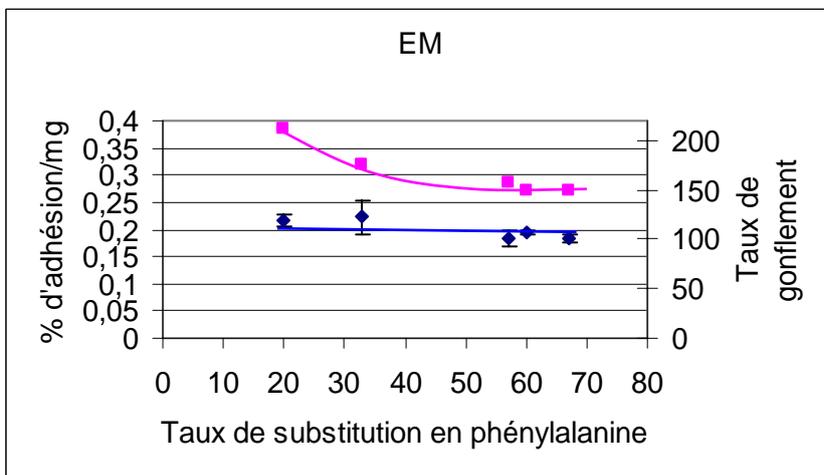


Figure 94 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D41 en EM (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en phénylalanine (n=6)

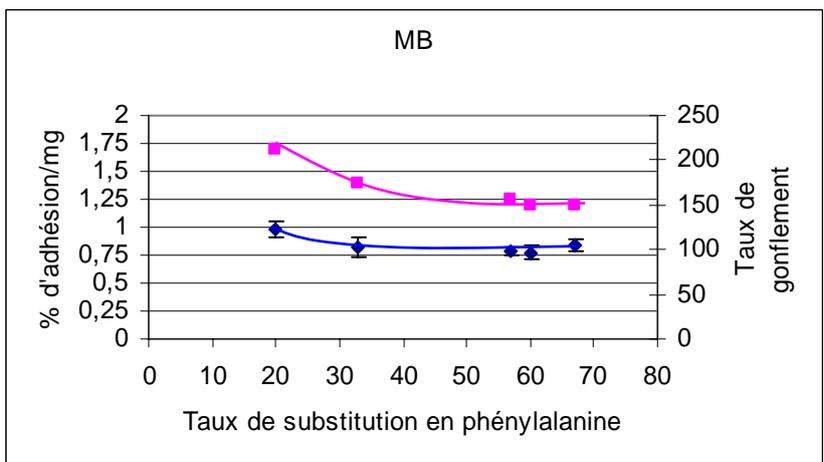


Figure 95 : Evolution du pourcentage d'adhésion de D41 en MB (losange) et du taux de gonflement (carré) en fonction du taux substitution en phénylalanine (n=6)

Pour chacune des courbes, nous avons tracé le profil de l'évolution du taux de gonflement en fonction du taux de substitution en ester méthylique d'acide aspartique. Ce profil montre une variation du taux de gonflement de 200 pour les polymères faiblement substitués à 150 pour les polymères fortement substitués.

Les valeurs α de l'adhésion en %/mg sont reportées dans le tableau 36.

	D01	D41
NaCl/ASW	0,07 \pm 0,01	0,07 \pm 0,02
EM	0,19 \pm 0,05	0,2 \pm 0,01
MB	0,77 \pm 0,1	0,85 \pm 0,2

Tableau 36 : Adhésion de D01 et D41 sur le PSSO₂Phe

Les résultats obtenus dans cette étude pour les deux souches montrent que les pourcentages d'adhésion ne varient pas en fonction du taux de substitution en phénylalanine. Nous retrouvons à nouveau ici, la variation d'adhésion selon le mode de conditionnement, avec une adhésion faible en absence de médiation (NaCl ou ASW) et une adhésion plus ou moins forte selon le milieu (EM ou MB) en présence de médiateurs.

II.2.3. Discussion et conclusion

Le tableau 35 regroupe les moyennes des valeurs d'adhésion des deux souches pour chaque famille et chaque conditionnement.

Cette partie consacrée à l'étude de l'adhésion des souches D01 et D41 sur les copolymères statistiques, montre que d'une part le comportement des deux souches vis-à-vis de ces polymères est similaire mais que d'autre part que l'adhésion sur le polystyrène sulfamide d'éthanolamine est différente. En effet, sur ce polymère nous n'observons pas de médiation avec l'eau de mer et le bouillon contrairement aux autres copolymères et l'adhésion est très faible.

	D01			D41		
	NaCl	EM	MB	ASW	EM	MB
PSSO ₃ Na	0,081 ± 0,001	0,29 ± 0,09	0,97 ± 0,14	0,11 ± 0,002	0,32 ± 0,09	1,01 ± 0,2
<i>PSSO₂Eth</i>	<i>0,024 ± 0,008</i>	<i>0,014 ± 0,004</i>	<i>0,024 ± 0,004</i>	<i>0,069 ± 0,002</i>	<i>0,075 ± 0,012</i>	<i>0,087 ± 0,005</i>
Asp-o-Me (moyenne)	0,15 ± 0,05	0,4 ± 0,08	1 ± 0,01	0,13 ± 0,04	0,4 ± 0,1	0,9 ± 0,01
Asp (moyenne)	0,03 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,9 ± 0,1	0,05 ± 0,02	0,2 ± 0,05	0,6 ± 0,1
Phe (moyenne)	0,07 ± 0,01	0,19 ± 0,05	0,77 ± 0,1	0,07 ± 0,02	0,2 ± 0,01	0,85 ± 0,2

Tableau 37 : Adhésion de D01 et D41 sur les copolymères statistiques

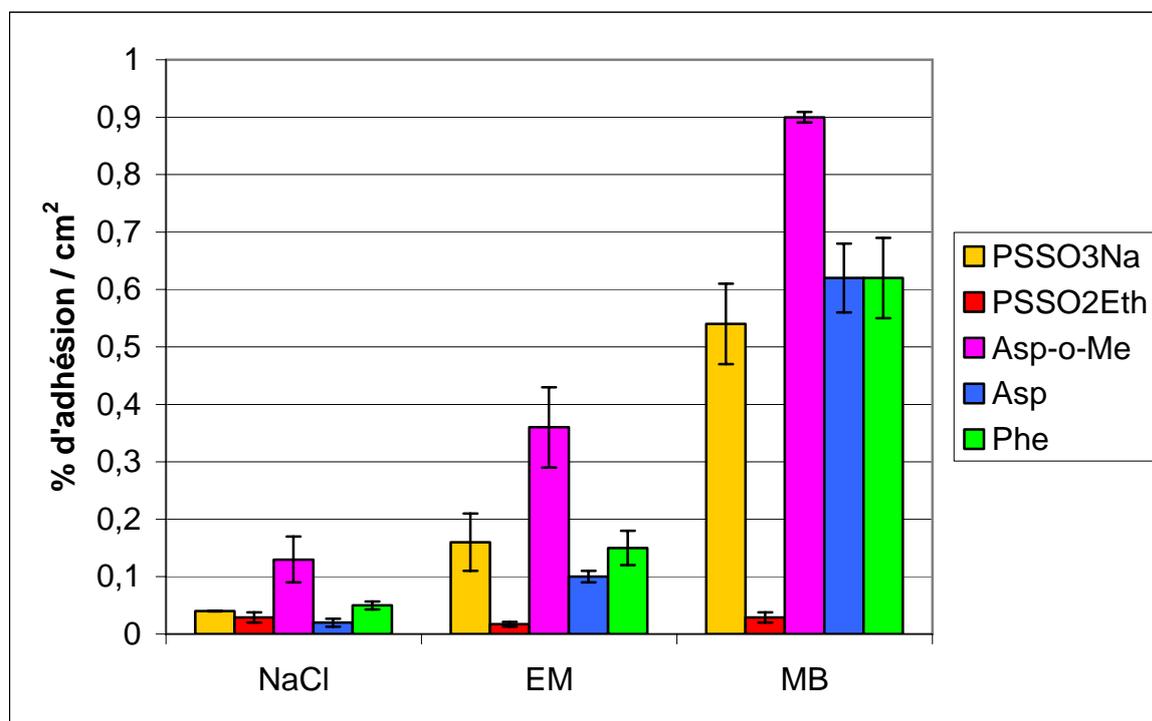


Figure 96 : Adhésion de D01 sur les copolymères statistiques en fonction du conditionnement

Afin de pouvoir comparer efficacement les polymères entre eux il est nécessaire de convertir les pourcentages d'adhésion en cm^2 . Cette opération permet de s'affranchir de la variation du taux de gonflement propre à chaque polymère. Ainsi pour chaque souche, les pourcentages d'adhésion $/\text{cm}^2$ des familles dans toutes les conditions sont comparées d'une part pour D01 (figure 96) et pour D41 d'autre part (figure 97).

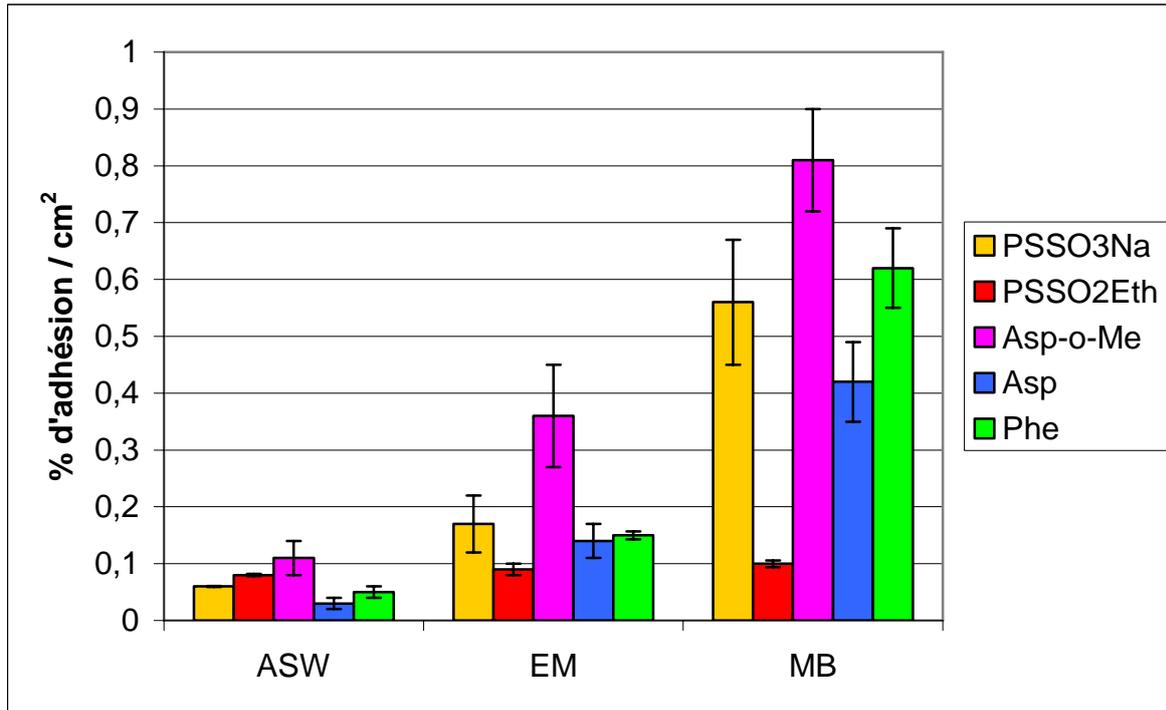


Figure 97 : Adhésion de D41 sur les copolymères statistiques en fonction du conditionnement

Les profils obtenus sont semblables pour les deux souches. Ainsi, pour chaque souche l'adhésion sur PSSO₂Na, Asp, et Phe est quasi identique alors que l'adhésion sur Asp-o-Me est légèrement plus élevée. Cette différence est sûrement due au caractère un peu plus hydrophobe de Asp-o-Me.

Il semble que les propriétés hydrophiles du PSSO₂Eth aient une action inhibitrice sur l'adhésion des bactéries marines ; en effet, alors que l'adhésion sur les autre famille atteint presque 1 cm^2 en bouillon marin, elle est inférieure à 0,1 cm^2 pour la PSSO₂Eth. Cette inhibition est probablement due soit à non-adsorption des matières organiques contenues dans les milieux soit à la fixation de ces médiateurs dans une conformation qui ne provoque pas l'adhésion bactérienne.

II. 3. Etude de l'adhésion des deux souches bactériennes sur les matériaux hydrophiles

II.3.1. Introduction

Cette dernière partie est consacrée à l'adhésion de D01 et D41 sur un troisième type de matériaux dits "hydrophiles".

Les expériences sont réalisées selon le même protocole que celui utilisé précédemment. Toutes les isothermes d'adhésion ayant la même forme, la pente de la tangente α est déterminée dans les conditions définies en mesurant l'adhésion sur un échantillon de matériau en équilibre d'échange d'adhésion pour une population bactérienne définie, chaque mesure est répétée n fois ($n= 3, 6$ ou 9).

Les trois types de matériaux étudiés sont les suivants :

- Le verre, sous forme de bille de $100 \mu\text{m}$ de diamètre
- La cellulose, sous forme de film de 2 cm^2
- Le poly(hydroxyethyl d'acide méthacrylique) (PHEMA), sous forme de film de $3,965 \text{ cm}^2$.

Nous allons étudier successivement l'adhésion des deux souches sur chacun de ces matériaux et conclure sur l'ensemble des résultats de cette étude.

II.3.2. Etude de l'adhésion de D01 et D41 sur le verre

Le verre est un matériau plus hydrophile que les polymères possédant à sa surface des groupements $-\text{OH}$.

L'adhésion de D01 et D41 sur les billes de verre conditionnées avec plusieurs milieux est étudiée successivement.

Les résultats sont présents sous forme d'histogrammes et les valeurs d'adhésion α sont exprimées en $\%/\text{cm}^2$.

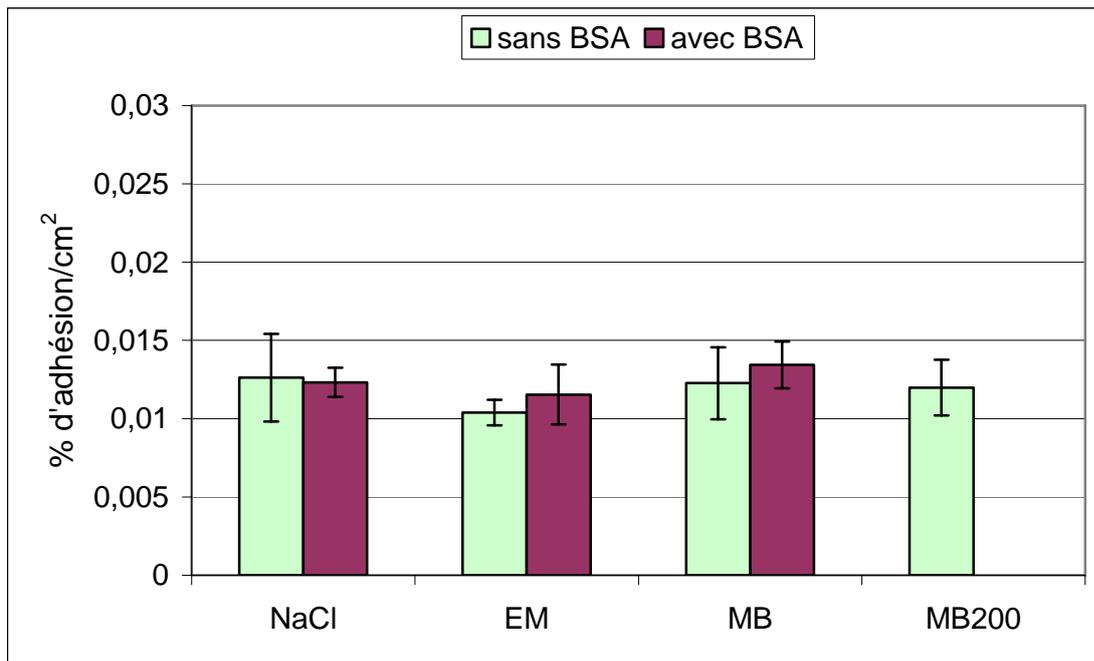


Figure 98: Adhésion de D01 sur le verre conditionné avec différents milieux (n=9)

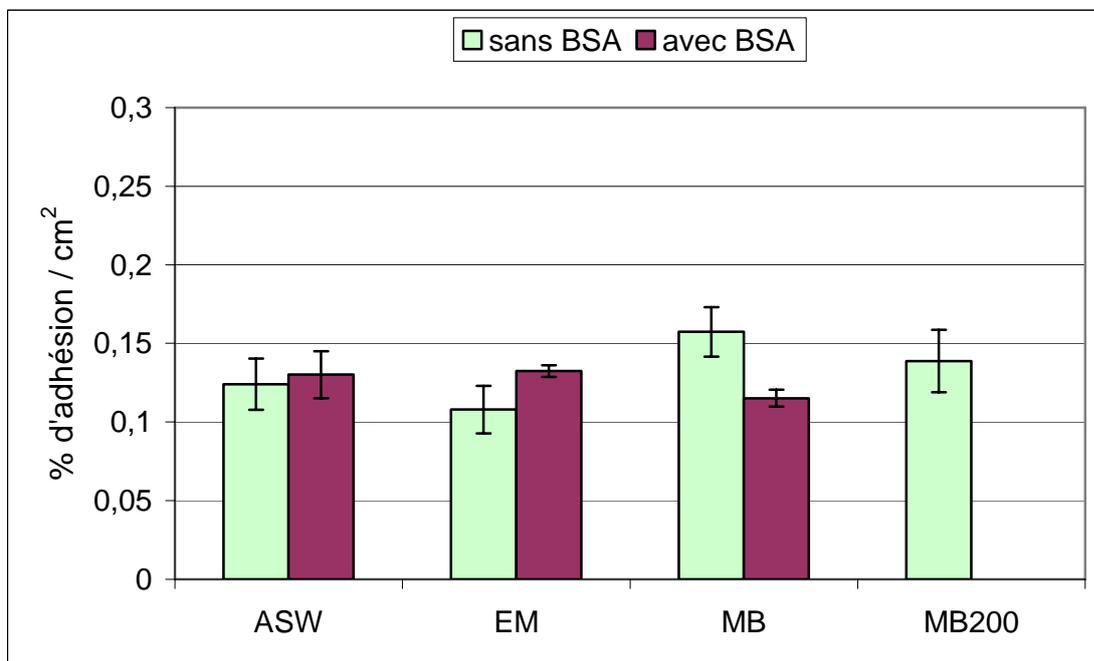


Figure 99 : Adhésion de D41 sur le verre conditionné avec différents milieux (n=6)

Pour D01 :

La figure 98 présente les résultats de l'adhésion de D01 sur les microsphères de verre conditionnées dans le NaCl 36‰, l'eau de mer, le bouillon marin et le bouillon marin concentré d'une part et l'adhésion sur le verre dans **ces mêmes conditions avec au préalable une incubation de sérum albumine bovine (BSA)** d'autre part.

L'adhésion de D01 dans ces conditions ne varie pas de façon significative avec le milieu de pré-incubation. En effet, les valeurs d'adhésion sur le verre sont en moyenne de $0,012 \pm 0,002 \text{ \%/cm}^2$ quelque soit le milieu de conditionnement. Nous remarquons notamment une faible adhésion avec le bouillon marin concentré (MB200) comparable à l'adhésion en NaCl, par rapport à l'adhésion observée dans les mêmes conditions pour le PMMA. De plus, les expériences réalisées avec le pré-coating de BSA montrent une valeur d'adhésion identique quelque soit le milieu d'incubation. Le pré-coating à la BSA n'influence pas l'adhésion de D01 sur le verre.

Pour D41 :

La figure 99 présente les résultats de l'adhésion de D41 sur le verre conditionné dans l'ASW 26‰, l'eau de mer, le bouillon marin et le bouillon marin concentré d'une part et l'adhésion dans ces mêmes conditions avec un pré-coating à l'albumine bovine (BSA) au préalable d'autre part.

La souche D41 présente un comportement similaire à celui de D01. En effet, cette souche adhère sur le verre indépendamment de la nature du milieu de pré-adsorption, avec une adhésion correspondant à une valeur de $0,12 \pm 0,02 \text{ \%/cm}^2$. Tout comme D01, l'adhésion ne varie pas avec l'augmentation de la concentration du bouillon marin ou le pré-coating à la BSA. Nous notons cependant, une valeur d'adhésion 10 fois plus élevée que celle observée pour D01.

Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par Rubio (2002) sur ces mêmes souches par. En effet, les taux d'adhésion observée sur les surface de verre nu (Rubio, 2002) avec les bactéries en phase stationnaire sont similaires a ceux que nous avons obtenus sur les billes de verre dans les mêmes conditions.

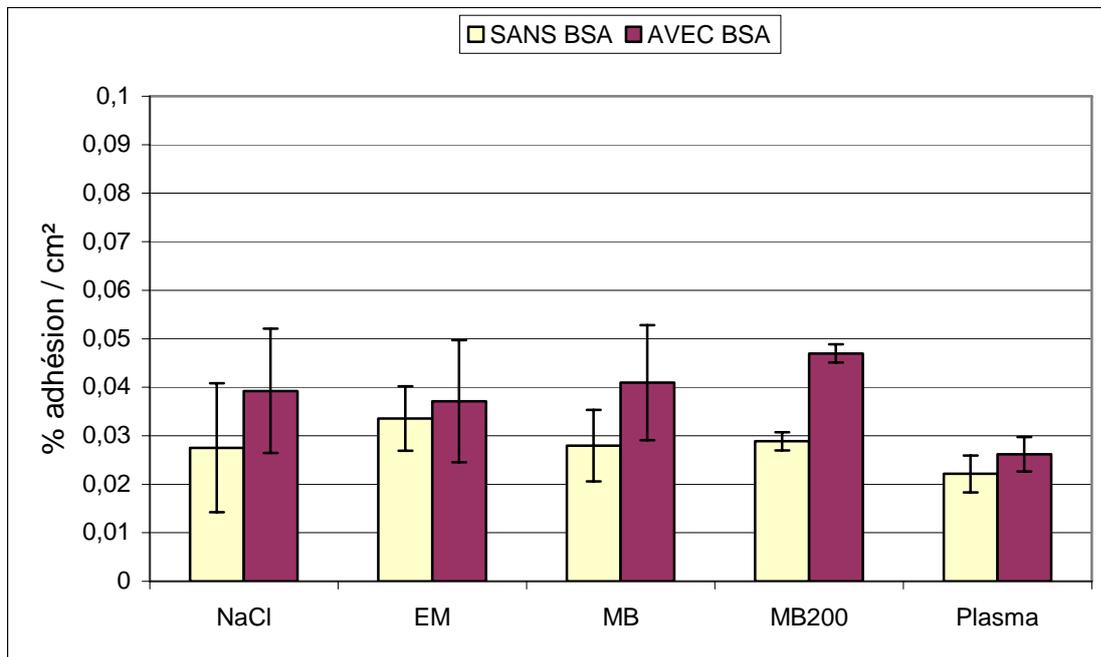


Figure 101 : Adhésion de DO1 sur le PHEMA conditionné avec différents milieux (n=9)

II.3.3. Etude de l'adhésion de D01 et D41 sur le PHEMA

La figure 100 présente la structure chimique du PHEMA.

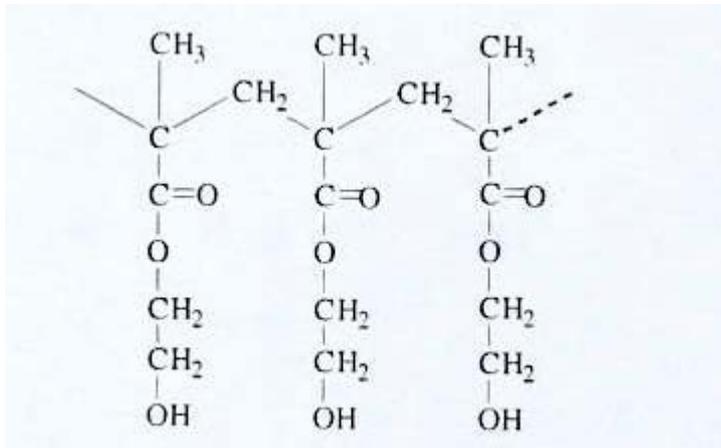


Figure 24 : Schéma de la structure chimique du poly(hydroxyéthylméthacrylate) (PHEMA). (Hoffman A.S., 1982 ; Ratner B.D. *et al.*, 1996)

Nous étudierons l'adhésion de D01 et D41 sur des lamelles de PHEMA conditionnées avec plusieurs milieux.

Nous avons représenté les résultats sous forme d'histogrammes et les valeurs d'adhésion α sont exprimées en $\%/cm^2$.

Pour D01 :

La figure 101 présente les résultats de l'adhésion de D01 sur le PHEMA conditionné dans le NaCl 36%, l'eau de mer, le bouillon marin, le bouillon marin concentré et le plasma humain d'une part et l'adhésion sur le PHEMA dans ces mêmes conditions avec une pré-incubation d'albumine bovine (BSA) au préalable d'autre part.

L'adhésion de D01 dans ces conditions ne varie pas de façon significative avec le milieu de pré-incubation. En effet, les valeurs d'adhésion sur le PHEMA sont en moyenne de $0,031 \pm 0,01 \%/cm^2$ quelque soit le milieu de conditionnement. Nous remarquons notamment une faible adhésion avec le bouillon marin concentré (MB200) comparable à l'adhésion en NaCl, par rapport à l'adhésion observée dans les mêmes conditions pour le PMMA.

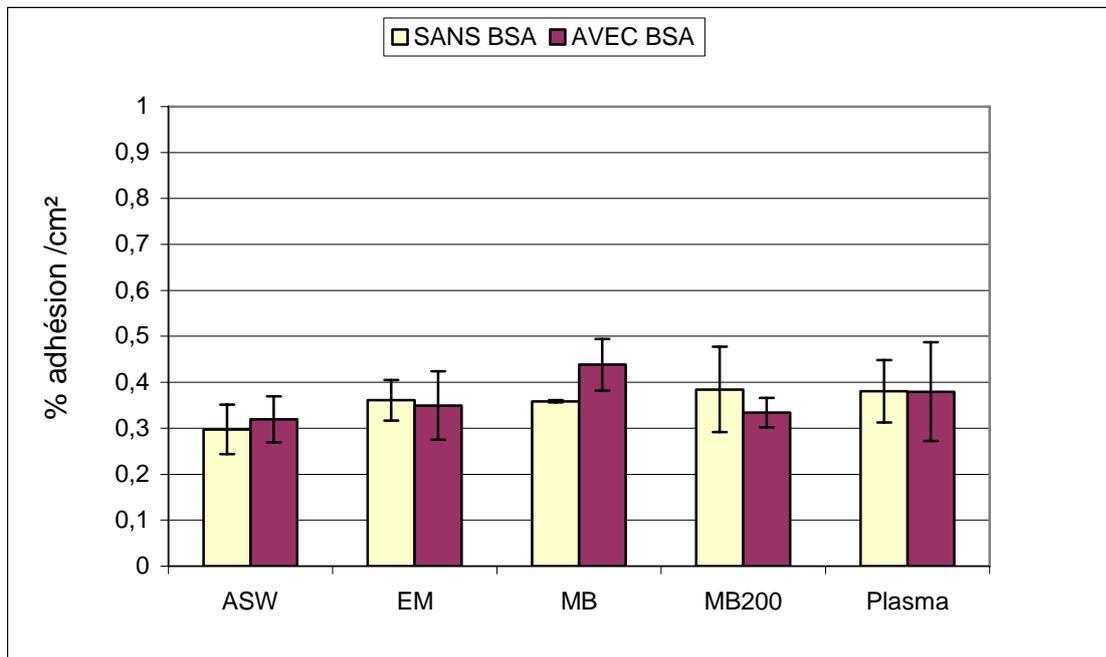


Figure 102 : Adhésion de D41 sur le PHEMA conditionné avec différents milieux (n=9)

Notons également la faible adhésion mise en évidence dans le cas du conditionnement avec le plasma qui est de $0,025 \pm 0,005 \text{ \%/cm}^2$.

Les expériences réalisées avec le pré-coating de BSA montrent une valeur d'adhésion similaire quelque soit le milieu d'incubation.

Pour D41 :

La figure 102 présente les résultats de l'adhésion de D41 sur le PHEMA dans l'ASW 26‰, l'eau de mer, le bouillon marin, le bouillon marin concentré et le plasma humain d'une part et l'adhésion dans ces mêmes conditions avec un pré-coating à l'albumine bovine (BSA) au préalable d'autre part.

Comme pour le verre, la souche D41 présente un comportement similaire à celui de D01. En effet, cette souche adhère sur le PHEMA indépendamment de la nature du milieu de pré-adsorption, avec une adhésion correspondant à une valeur de $0,36 \pm 0,05 \text{ \%/cm}^2$. Tout comme D01, l'adhésion ne varie pas avec l'augmentation de la concentration du bouillon marin ou le pré-coating à la BSA. Nous notons à nouveau, une valeur d'adhésion 10 fois plus élevée que celle de D01 ($0,031 \text{ \%/cm}^2$).

II. 3. 4. Etude de l'adhésion de D01 et D41 sur la cellulose

La figure 103 représente la cellulose, qui est un polymère possédant des groupements $-\text{OH}$, rendant ainsi sa surface plutôt hydrophile.

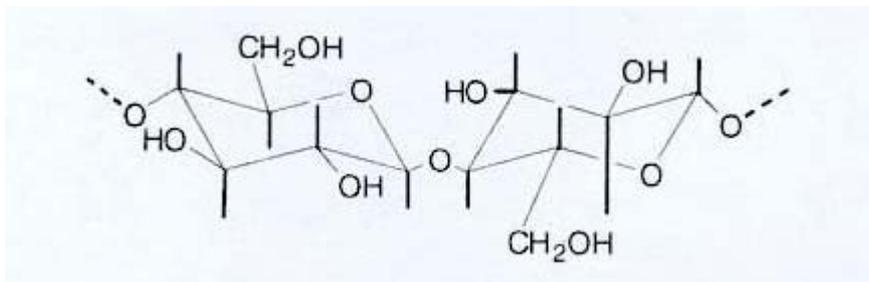


Figure 103 : Schéma de la structure chimique de la cellulose. (Hoffman A.S., 1982 ; Ratner B.D. *et al.*, 1996)

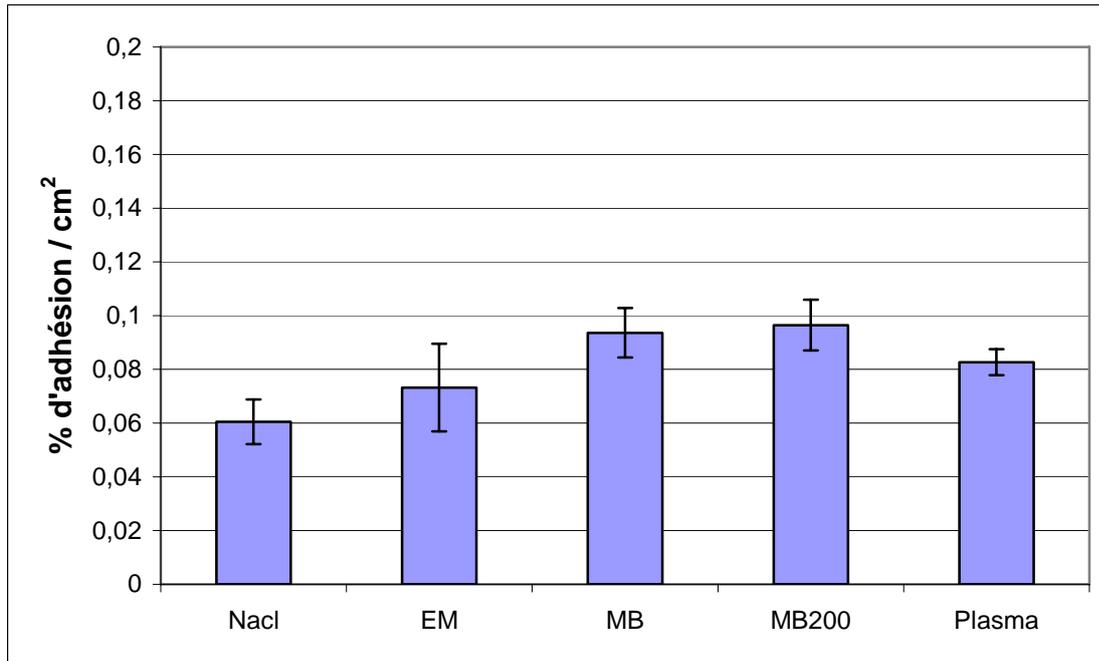


Figure 104 : Adhésion de DO1 sur la cellulose conditionnée avec différents milieux (n=9)

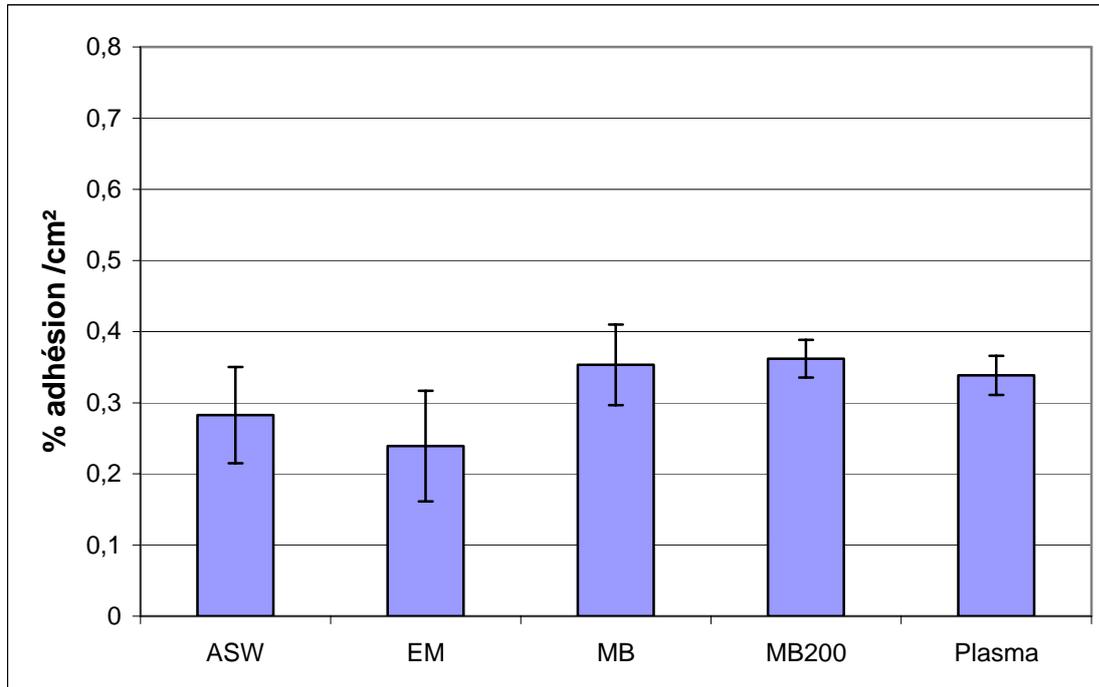


Figure 105: Adhésion de D41 sur la cellulose conditionnée avec différents milieux (n=9)

Nous étudierons l'adhésion de D01 et D41 sur des lamelles de cellulose conditionnées avec plusieurs milieux.

Nous avons représenté les résultats sous forme d'histogrammes et les valeurs d'adhésion α sont exprimées en $\%/cm^2$.

Pour D01 :

La figure 104 présente les résultats de l'adhésion de D01 sur la cellulose conditionnée dans le NaCl 36‰, l'eau de mer, le bouillon marin, le bouillon marin concentré et le plasma humain.

Nous observons à nouveau que l'adhésion de D01 dans ces conditions ne varie pas de façon significative avec le milieu de pré-incubation. En effet, les valeurs d'adhésion sur la cellulose sont en moyenne de $0,078 \pm 0,01 \%/cm^2$ quelque soit le milieu de conditionnement. Nous remarquons avec le bouillon marin et le bouillon marin concentré (MB200) une adhésion plus élevée ($0,09 \pm 0,005 \%/cm^2$) mais non significative compte tenu des écarts types.

Pour D41 :

La figure 105 présente les résultats de l'adhésion de D41 sur la cellulose dans l'ASW 26‰, l'eau de mer, le bouillon marin, le bouillon marin concentré et le plasma humain.

Comme pour le verre et le PHEMA, la souche D41 présente un comportement similaire à celui de D01. En effet, cette souche adhère sur la cellulose indépendamment de la nature du milieu de pré-adsorption, avec une adhésion correspondant à une valeur de $0,31 \pm 0,05 \%/cm^2$. Tout comme D01, l'adhésion ne varie pas de façon significative avec l'augmentation de la concentration du bouillon marin ou le plasma.

En ce qui concerne les valeurs d'adhésion de D41 comparée à celle de D01, on remarque que l'adhésion de D41 n'est que de 4 fois supérieure à celle de D01.

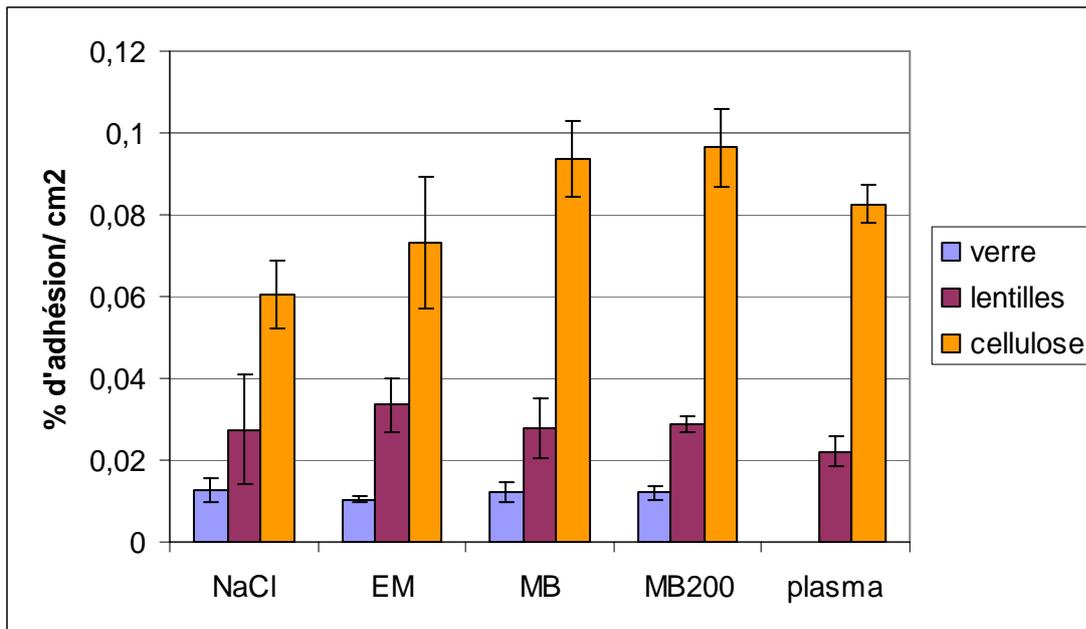


Figure 106: Adhésion de D01 sur les matériaux hydrophiles dans divers milieux

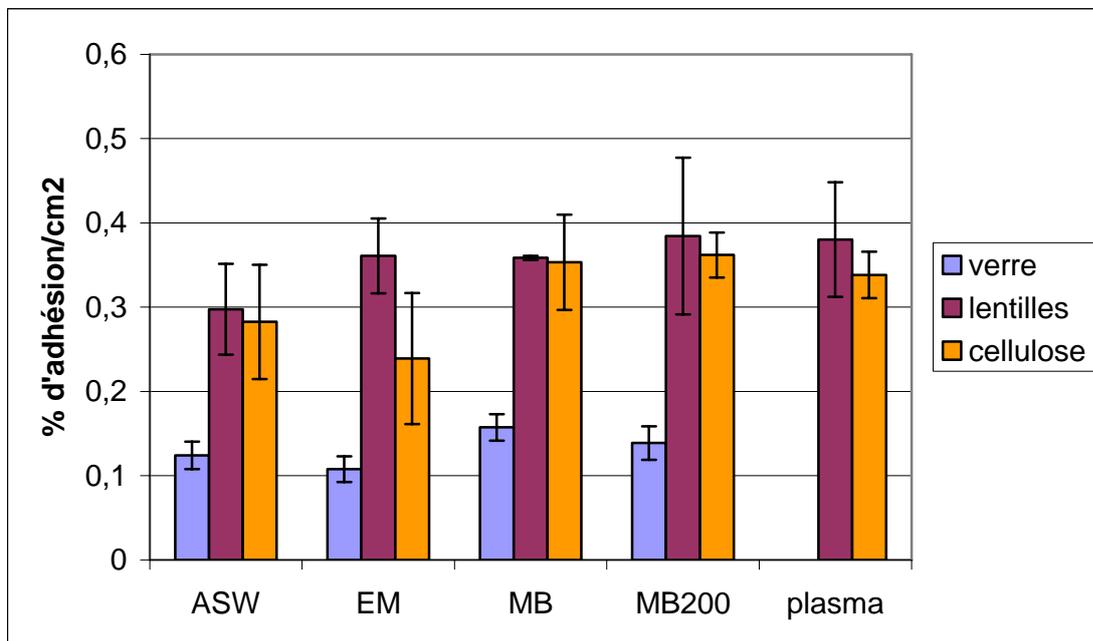


Figure 107 : Adhésion de D41 sur les matériaux hydrophiles dans divers milieux

II.3.5. Discussion et conclusion

L'étude de l'adhésion des bactéries marines sur le verre, le PHEMA et la cellulose montre l'influence du caractère hydrophile de ces matériaux. La valeur du taux d'adhésion observé est faible et ne varie pas de façon significative selon le type de milieu de pré-incubation. Ce qui est une indication importante, compte tenu de la différence de nature de ces milieux, du fait qu'aucun médiateur spécifique n'a été pré-adsorbé sur les matériaux.

Cette conclusion est confirmée par le fait que l'adhésion, sur les matériaux conditionnés avec le tampon (NaCl ou ASW), n'est pas significativement différente de celle observée avec les autres milieux. En effet, le tampon ne contient aucun constituant organique pouvant s'adsorber sur le matériau, ce qui suggère ainsi une adhésion d'ordre directe. Les résultats des expériences réalisées avec les milieux contenant des matières organiques, montre une valeur d'adhésion de l'ordre de celle observée en adhésion directe.

En outre, les caractéristiques hydrophiles des matériaux n'ont, semble-t-il aucune influence sur les différences observées entre les deux souches. En effet, tout comme dans le cas des polymères hydrophobes (PMMA, PS, PVC) la souche D41 adhère jusqu'à 10 fois plus que la souche D01, alors qu'il a été montré que les copolymères statistiques annulent cette différence. Pour expliquer cela, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle les interactions entre les bactéries D01 et D41 et les copolymères statistiques sont spécifiques.

Afin de pouvoir comparer les valeurs de l'adhésion de ces trois matériaux nous avons reporté les résultats sur un même graphe pour chacune des souches.

Les figures 106 et 107 présentent respectivement l'adhésion de D01 et D41 sur les matériaux hydrophiles (Sur les figures : lentilles = PHEMA).

La comparaison des trois matériaux montre que globalement l'adhésion sur le PHEMA et la cellulose est plus importante que sur le verre. Le fait que le verre présente une hydrophilie plus importante que les deux autres matériaux, peut expliquer cette diminution du taux d'adhésion. Nous avons montré que l'adhésion de ces bactéries sur des surfaces hydrophobes (PMMA, PS...) est plus élevée que l'adhésion sur les surfaces plus hydrophiles comme le verre. Nous observons, lors de

la comparaison de l'adhésion sur le verre, la cellulose et le PHEMA, des taux plus faible pour le verre par rapport à la cellulose et au PHEMA. Cette différence est peut être due a une hydrophilie plus importante du verre.

DISCUSSION GENERALE

L'immersion d'un matériau en milieu marin entraîne rapidement des conséquences, tant pour le matériau que pour le milieu marin. Un des principaux problèmes liés au contact matériau-milieu marin est la formation des biosalissures résultant principalement de l'adhésion et la prolifération de bactéries marines sur les surfaces des matériaux.

Des travaux de recherche, menés par le groupe BASIS (Cnrs, Ensc Paris, Inra, Université Catholique de Louvain, etc) coordonnés par IFREMER, ont permis de préciser les mécanismes de fixation des biofilms sur les matériaux immergés. Ces mécanismes, semblent impliquer en premier lieu les bactéries marines qui en se fixant sur les surfaces déclenchent la formation des biosalissures marines. L'inhibition de l'adhésion et de la prolifération des bactéries sur un matériau immergé semble constituer un moyen intéressant pouvant être utilisé pour la prévention des biosalissures marines.

En outre, à ce jour dans le domaine des biomatériaux le rôle modulateur de copolymères statistiques biospécifiques à base de poly(méthacrylate de méthyle), de poly(chlorure de vinyle) ou dérivés de dextrans sur l'adhésion des bactéries commensales de l'homme telles que *S. aureus*, *S. epidermidis* et *P. aeruginosa* a été observé. En effet, ces polymères dits biospécifiques possèdent des groupements chimiques appropriés leur permettant de développer des interactions spécifiques avec des protéines médiatrices de l'adhésion de bactéries commensale de l'homme. Notre travail de recherche, s'inscrit dans le cadre des études menées dans le but de prévenir de la formation des biosalissures marines. Notre objectif a été d'étudier les interactions que peuvent développer les copolymères statistiques avec les bactéries marines et d'identifier des copolymères biospécifiques susceptibles de contrôler l'adhésion et la prolifération de telles bactéries.

Afin d'atteindre ces objectifs, nous avons étudié l'adhésion de deux souches bactériennes *Vibrio splendidus* (D01) et D41 (caractérisation en cours d'étude), fortement impliquées dans la formation des biosalissures, sur des copolymères statistiques que nous avons synthétisés. Parallèlement, l'adhésion bactérienne a également été étudiée sur d'autres matériaux dits "hydrophobes" comme le poly (méthacrylate de méthyle) (PMMA), le polystyrène (PS), le poly chlorure de vinyle

(PVC) et l'acétate de cellulose (AC) d'une part et des matériaux dits "hydrophiles" comme le verre, la cellulose, le poly(hydroxyéthyl méthacrylate) (PHEMA).

Concernant les copolymères biospécifiques utilisés comme support de l'adhésion bactérienne, une « bibliothèque » de copolymères statistiques à base de polystyrène réticulé à 3% de divinyl benzène a été synthétisée. La synthèse de ces copolymères a été effectuée conformément à la méthode mise au point au LRM et qui consiste à réaliser d'abord une chlorosulfonation du polystyrène de base suivie d'une substitution par un acide aminé ou dérivé d'acide aminé donné. Les acides aminés utilisés sont : l'acide aspartique, la phénylalanine, l'alanine, le tryptophane et la serine, ainsi que leurs dérivés méthylés.

Notre bibliothèque comporte donc une série de copolymères substitués avec différents acides aminés ou dérivés choisis selon la nature des fonctions chimiques qu'ils présentent.

Ces copolymères statistiques synthétisés ont été caractérisés :

- Par analyse élémentaire qui permet de déterminer la composition chimique de chacun d'entre eux.
- Par la détermination du taux de gonflement qui permet de montrer la variation de taille des microsphères lorsqu'elles sont placées dans un milieu aqueux.

Ainsi, l'analyse élémentaire des différentes familles nous a permis de déterminer pour chacune d'elle, le taux de substitution par acide aminé. L'étude comparative des résultats obtenus avec les différents acides aminés montre qu'il est possible d'obtenir des taux de substitution avec une large variation de composition. Il faut toutefois noter que la composition des polymères est très largement influencée par les protocoles expérimentaux choisis ; de ce fait, il est délicat d'établir une relation entre les rendements obtenus et la valeur des taux de substitution des résidus d'acides aminés utilisés. Cependant, les caractérisations des polymères mettent bien en évidence, la forte variation de structures de polymères obtenues. Cette large variation de composition implique une grande diversité des sites fonctionnels dans la structure des matériaux, ce qui doit permettre l'étude des interactions avec les bactéries en suspension.

L'observation de la variation du gonflement des résines avec le taux de substitution des dérivés d'acide aminés montre que la nature de ces composés influence en particulier le gonflement des résines. Il semble que le paramètre le plus important soit la diminution globale du caractère hydrophile des polymères substitués. Il est

cependant nécessaire de tenir compte de ce comportement car le gonflement des résines modifie de façon importante la surface accessible aux interactions avec les bactéries.

A partir du taux de gonflement, il est possible d'évaluer les surfaces spécifiques accessibles aux bactéries pour chaque type de polymères substitués. L'analyse des résultats obtenus montre que la substitution par des acides aminés ou dérivés diminue le caractère hydrophile du polymère sulfonate de sodium de départ, ce qui entraîne une plus faible valeur de la surface spécifique. Cet effet est particulièrement observé dans la comparaison des valeurs de surfaces spécifiques de deux familles de polymères substitués par l'acide aspartique d'une part et l'acide aspartique méthyle ester d'autre part. Il faut cependant remarquer, que le polymère obtenu par substitution avec l'éthanolamine démontre toujours un taux de gonflement faible et donc une surface spécifique limitée. Ce comportement singulier ne semble pas pouvoir être relié comme auparavant au caractère hydrophile de l'éthanolamine.

Nous disposons, donc d'une gamme de polymères substitués par plusieurs acides aminés de différentes natures, avec différents taux de substitution, ce qui représente une grande variation de compositions permettant d'étudier l'interaction de ces matériaux avec les bactéries.

Les deux souches bactériennes utilisées comme modèle d'études sont *Vibrio splendidus* (D01) et D41 (en cours de caractérisation). Ces deux souches ont été isolées par l'IFREMER de Brest et font partie des principales souches impliquées dans la formation des biosalissures marines. Nous avons étudié trois paramètres caractéristiques pour chacune de ces souches :

- leur sensibilité aux antibiotiques,
- leur prolifération en suspension (l'influence de la température et de la nature des milieux sur cette prolifération),
- leur prolifération en présence d'un métabolite radioactif : le thymidine tritiée.

Pour l'étude de la sensibilité de ces bactéries aux antibiotiques, un antibiogramme a été réalisé en utilisant plusieurs familles d'antibiotiques agissant à différents niveaux. Nous avons pu montrer que les deux souches ont une sensibilité différente vis à vis des antibiotiques, dépendante de la nature de l'antibiotique utilisé. Ainsi, D01 possède une résistance à la vancomycine et à la tétracycline alors que D41 possède

DISCUSSION GENERALE

une résistance à la pénicilline, à la streptomycine, à la fosmomycine, à la vancomycine, à la tétracycline et aux sulfamides.

L'étude de la prolifération, a été réalisée avec différents milieux sélectionnés : le bouillon marin (milieu riche), l'eau de mer naturelle, l'eau de mer artificielle et une solution de chlorure de sodium. Les résultats montrent que la cinétique de prolifération varie selon le milieu de culture. Elle peut être ralentie dans un milieu pauvre en matières organiques comme l'eau de mer naturelle comparé au bouillon marin et elle peut même être arrêtée dans un milieu ne contenant pas de matières organiques comme une solution aqueuse de NaCl ou l'eau de mer artificielle. Nous avons donc mis au point une technique de culture des bactéries marine permettant d'obtenir des populations bactériennes homogènes et en quantités importantes. Il a été également nécessaire de déterminer, pour chacune des souches, un milieu appauvri en matières organiques qui permet de maintenir les bactéries au stade de latence. Ce maintien est nécessaire pour l'étude de l'adhésion bactérienne. En effet, dans le but de déterminer le nombre de bactéries adhérentes, il est nécessaire que les bactéries ne prolifèrent pas. Par conséquent, les milieux de latence pour lesquels les populations bactériennes restent constantes, au moins pour une durée expérimentalement utile ont été définis pour chaque souche : NaCl à 36‰ pour D01, et l'eau de mer artificielle à 26‰ pour D41. Un milieu riche, bouillon marin a été choisi pour faire les cultures de maintien de ces deux souches. Les deux souches étudiées présentent des différences puisqu'elles appartiennent à deux genres différents (*Vibrio* et *Pseudomonas*) ; Cependant elles présentent aussi beaucoup de similitudes, notamment en ce qui concerne les paramètres de prolifération.

Par ailleurs, la prolifération bactérienne a également été étudiée en présence d'un métabolite radioactif : la thymidine tritiée. En effet, le protocole d'étude de l'adhésion bactérienne mis au point par Vaudaux et al (1984, 1992) et utilisé au laboratoire repose sur le marquage radioactif des bactéries. Il était donc nécessaire d'étudier la prolifération bactérienne en présence de la thymidine tritiée afin de déterminer les conditions optimales permettant d'obtenir des populations bactériennes convenablement radiomarquées susceptibles d'être utilisées pour les études d'adhésion sur les différents matériaux.

DISCUSSION GENERALE

Ainsi, il est apparu que le profil d'incorporation de la thymidine tritiée varie selon les souches. En effet, les résultats ont montré que la souche D01 incorpore ce nucléotide en phase de latence, alors que la souche D41 l'incorpore en phase exponentielle de croissance. En cela, D41, du genre *Pseudomonas*, a un comportement similaire aux autres *Pseudomonas* étudiées au laboratoire (Information interne au laboratoire)

La deuxième observation concerne les valeurs du rapport d'incorporation de la thymidine (nombre de cpm (coups par minute) par CFU) : La souche D01 incorpore en phase exponentielle cinq fois plus de thymidine que la souche D41. Cependant, le rapport en phase stationnaire de prolifération est similaire pour les deux souches. Ceci montre que la capacité maximale d'incorporation de la thymidine tritiée par les deux bactéries est la même, mais que le mode d'incorporation diffère.

Nous avons donc réussi à adapter aux bactéries marines, un protocole défini précédemment pour les bactéries commensales. Cette méthode de détection repose sur le radiomarquage métabolique des bactéries et démontre une sensibilité suffisante pour mesurer la quantité de bactéries adhérentes sur les matériaux.

La définition des conditions de culture de ces bactéries est indispensable pour l'étude des interactions des bactéries avec les surfaces. Cependant, il est évident que des études complémentaires en milieu naturel sont nécessaires pour préciser la nature réelle des mécanismes d'adhésion des bactéries sur les matériaux immergés.

L'étude de l'adhésion bactérienne sur les différents matériaux sélectionnés se base sur l'incubation de différentes suspensions bactériennes radiomarquées à la thymidine tritiée dont la concentration varie entre 10^6 et 10^7 CFU/mL avec les divers matériaux étudiés. Après un temps optimal d'adhésion, les matériaux sont lavés afin d'éliminer les bactéries non adhérentes. La radioactivité fixée sur les matériaux correspondant au nombre de bactéries adhérentes est déterminée à l'aide d'un compteur de radioactivité β . Pour chaque matériau utilisé comme substrat et pour chaque souche bactérienne, une isotherme d'adhésion a été établie en reliant le nombre de bactéries incubées avec le substrat exprimé en CFU/mL, au nombre de bactéries fixées sur le substrat, exprimé en CFU/mg dans le cas des copolymères statistiques et en CFU/cm² pour les matériaux sous forme de film.

DISCUSSION GENERALE

Le pourcentage d'adhésion est déterminé à partir de la pente de la droite correspondant au début de l'isotherme.

L'adhésion des deux souches bactériennes D01 et D41 a été étudiée en fonction de trois paramètres :

- la nature des polymères, avec des matériaux plutôt hydrophobes (PMMA, PVC, PS, AC) d'une part, des matériaux plutôt hydrophiles (verre, cellulose, PHEMA) et des copolymères statistiques d'autre part.
- les conditions de pré-traitements des matériaux utilisés. En effet, deux types d'adhésion ont été étudiées:
 - l'adhésion dite « directe », réalisée en incubant directement les bactéries radiomarquées avec les matériaux.
 - L'adhésion indirecte en pré-incubant les substrats avec différents milieux (le bouillon marin, l'eau mer naturelle, l'albumine ou le plasma humain), avant de les mettre en présence de suspensions de bactéries radiomarquées.
- l'état physiologique des bactéries. Il a été montré que l'état physiologique des bactéries peut avoir une influence sur l'adhésion (Fadli, 2000). Nous avons donc étudié l'adhésion sur les divers matériaux des deux souches D01 et D41 en phase stationnaire et en phase exponentielle de prolifération.

L'ensemble des résultats obtenus nous a permis de montrer que l'état physiologique des bactéries a une influence importante sur les propriétés d'adhésion. Cette influence dépend, d'une part de la nature du matériau utilisé comme support de l'adhésion bactérienne et d'autre part, des conditions de pré-incubation des matériaux (adhésion directe et indirecte).

Les études d'adhésion des bactéries sur le PSSO_3Na permettent de montrer que l'état physiologique des bactéries joue un rôle essentiel dans l'adhésion de D01 et D41. D'autre part, l'influence de cet état physiologique est étroitement lié aux conditions de pré-adsorption du polymère. Ainsi, la phase exponentielle de prolifération représente l'état le plus approprié à l'adhésion directe des bactéries aussi bien en absence de matière organique, que dans le cas des polymères pré-adsorbés par le bouillon marin. L'adhésion bactérienne est quantitativement plus importante en phase exponentielle qu'en phase stationnaire de prolifération. Il existe

une adhésion « médiée » par les matières organiques contenue dans le bouillon marin et l'eau de mer, elle est plus importante qu'une adhésion « non-médiée ». Il est important de noter ici que ce phénomène a déjà été mis en évidence avec les bactéries pathogènes de l'homme. Des études précédentes ont montré que des souches de *Streptococcus* et *Staphylococcus* adhèrent sur les copolymères statistiques de façon spécifique via la fibronectine (Berlot, 1998 et Fadli, 2000). Nos études confirment que ce phénomène peut également être observé dans le cas des bactéries marines, cependant dans ce cas précis les médiateurs ne sont pas connus).

En revanche, les études réalisées sur le PMMA présentent des résultats qui diffèrent de ceux obtenus dans les études antérieures. En effet, aucune variation de l'adhésion n'a pu être observée selon l'état physiologique des bactéries et ceci quelque soit le milieu de pre-adsorption utilisé.

L'adhésion sur le PSSO_3Na semble être spécifique, elle dépend du milieu de pré-adsorption du polymère et de l'état physiologique de bactéries avec une adhésion élevée en présence de bouillon marin et des bactéries en phase exponentielle de prolifération. Cependant, l'adhésion de D01 et D41 sur le PMMA aux conditions étudiées semble être une adhésion non spécifique. Ces études, montrent que les bactéries adhèrent différemment selon le matériau, le conditionnement du matériau et selon la phase de prolifération. L'adhésion des bactéries dépend donc de facteurs internes mais aussi de facteurs externes à la souche.

Compte tenu du fait que l'adhésion sur le PSSO_3Na en phase stationnaire de prolifération est très faible par rapport à l'adhésion en phase exponentielle et afin de pouvoir utiliser des bactéries facilement détectables nous avons choisi d'utiliser pour les études d'adhésion, des cultures bactériennes en phase exponentielle de prolifération.

L'étude de l'adhésion de D01 et D41 sur le PMMA et le PSSO_3Na a permis de définir les paramètres essentiels de l'expérimentation, qui sont ensuite utilisés lors des études consacrées aux autres matériaux. Ces paramètres sont :

- Le choix de la phase de prolifération : compte tenu de l'importance de la phase exponentielle dans la stimulation de l'adhésion de D01 et D41 sur le PSSO_3Na , les expériences d'adhésion sur les copolymères statistiques et sur

DISCUSSION GENERALE

les autres matériaux hydrophobes et hydrophiles ont été réalisées avec des bactéries en phase logarithmique de prolifération.

- La méthode de mesure de l'adhésion bactérienne mise au point sur les deux polymères témoins a été utilisée pour quantifier l'adhésion des bactéries sur les autres matériaux. Ainsi, les pourcentages d'adhésion obtenus sur ces matériaux peuvent être comparés les uns aux autres, afin de déterminer l'effet de la nature (hydrophile ou hydrophobe) et de la composition chimique (pour les copolymères statistiques) des matériaux sur la capacité d'adhésion des bactéries marines.

La comparaison des taux d'adhésion de la bactérie D01 sur les différents matériaux montre que ce taux d'adhésion est largement dépendant de la nature des matériaux choisis.

L'adhésion de cette souche sur les différents matériaux de caractères majoritairement hydrophobes (PMMA, PVC, PS et AC) est similaire quels que soient la nature des milieux d'incubation. Ce résultat semble indiquer qu'une interaction directe est réalisée entre les bactéries et la surface du matériau. Il faut cependant remarquer que lorsque l'interaction est réalisée en présence de bouillon marin concentré, une adhésion médiée plus importante est observée ; ceci pourrait s'expliquer dans ces conditions par la présence d'un ou plusieurs médiateurs susceptibles d'accroître les interactions avec la surface du matériau.

Lorsque l'interaction est réalisée en présence d'albumine, les valeurs d'adhésion deviennent semblables à celles observées en milieu dépourvu de matières organiques. Ces expériences, qui mettent en évidence la présence de médiateurs dans le bouillon marin, montrent également que ce ou ces médiateurs sont déplacés par l'albumine, semblant indiquer ainsi que leur affinité pour le polymère reste modérée. En outre, ces médiateurs ne sont pas présents ou seulement en très faibles concentrations dans l'eau de mer naturelle, expliquant ainsi l'adhésion semblable à celle retrouvée en milieu tampon (NaCl ou ASW).

La comparaison des résultats obtenus sur cette souche (D01), avec les résultats obtenus sur des souches commensales de l'homme, montre que les taux d'adhésion sur le PMMA sont très élevés par rapport à ceux de *S. aureus* ou *S. pyogenes* dans les mêmes conditions. En outre, à l'inverse des souches commensales, en milieu plasmatique, une absence totale de médiation pour les souches marines est

observée. Les bactéries marines semblent donc adhérer vraisemblablement selon un processus différent de celui des bactéries commensales de l'homme.

L'adhésion de ces deux souches sur ces matériaux à caractères hydrophobes semble être directe, n'impliquant pas de médiateur. En conséquence, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle les matériaux à caractère plutôt hydrophobe peuvent "recruter" des "éléments" qui stimulent l'adhésion bactérienne, à condition que ces éléments soient en concentration élevée. Ce ou ces médiateurs (différents de ceux rencontrés dans le plasma humain) possèdent une affinité plutôt faible pour ces matériaux puisqu'ils sont facilement déplacés par l'albumine.

Dans le cas de l'adhésion sur les matériaux de caractère plutôt hydrophile, l'adhésion des bactéries observée est toujours faible et indépendante des conditions d'incubation, même en présence de bouillon marin concentré. Cette interaction faible est vraisemblablement directe et semble liée au caractère globalement hydrophobe de la souche bactérienne. Cette conclusion est confirmée par le fait que l'adhésion, sur les matériaux conditionnés avec la solution saline (NaCl ou ASW), n'est pas significativement différente de celle observée avec les autres milieux. En effet, la solution saline ne contient aucun constituant organique pouvant s'adsorber sur le matériau, ce qui suggère ainsi une adhésion d'ordre directe entre les bactéries et les matériaux.

En revanche, l'adhésion sur les polymères statistiques comme par exemple le polystyrène sulfonate de sodium, le polystyrène sulfamide d'éthanolamine, le polystyrène sulfamide d'acide aspartique ou de phénylalanine, est largement dépendante de la nature du milieu d'incubation. Contrairement aux résultats précédemment décrits dans les études antérieures au laboratoire, les copolymères statistiques substitués avec le sodium ou les acides aminés stimulent l'adhésion des bactéries marines lorsqu'ils sont préalablement incubés avec des matières organiques. Les résultats obtenus avec les copolymères substitués par la phénylalanine, l'acide aspartique et son ester méthylique mettent en évidence une adhésion spécifique en présence de l'eau de mer et du bouillon marin. Cette observation permet d'émettre l'hypothèse de l'existence de un ou plusieurs médiateurs dans le bouillon marin ou l'eau de mer naturelle, susceptibles d'interagir avec les sites d'adhésion spécifiques présents à la surface des polymères, facilitant

ainsi l'adhésion des bactéries. Cet effet est observé pour tous les copolymères statistiques.

Cependant, il faut signaler, que l'adhésion de la souche D01 sur le polystyrène substitué par l'éthanolamine est faible et indépendante des conditions d'incubation. Il semble que les propriétés hydrophiles du PSSO₂Eth ont une action inhibitrice sur l'adhésion des bactéries marines. En effet, alors que l'adhésion sur les autres familles de polymères atteint presque 1 %/cm² en bouillon marin, elle est inférieure à 0,1 %/cm² dans le cas du PSSO₂Eth. Cet effet inattendu, est peut être lié au très faible gonflement de ce copolymère dans le milieu aqueux.

Concernant la souche D41, nous retrouvons des résultats comparables à ceux de D01 pour les matériaux hydrophobes et hydrophiles ainsi que pour le polystyrène sulfamide d'éthanolamine, avec toutefois un taux d'adhésion de 6 à 10 fois plus élevé que pour D01. Cette différence peut être due aux caractéristiques de surface des bactéries. Il a été montré par une technique permettant d'évaluer l'hydrophobicité à la surface des bactéries, que D41 possède une caractéristique plus hydrophobe que D01 (Rubio, 2002). Ces observations peuvent expliquer les différences de taux d'adhésion obtenus, notamment sur le PMMA. Dans des conditions impliquant une interaction directe, c'est-à-dire en absence de médiateur, les interactions observées ne sont pas spécifiques et dépendent beaucoup des charges de surfaces. Cette différence d'hydrophilie de surface de ces deux bactéries peut expliquer les adhésions plus importantes sur les polymères hydrophobes de la souche D41 par rapport à ceux observés avec la souche D01.

De plus, des caractéristiques hydrophiles ne semblent pas influencer sur les différences observées entre les deux souches. En effet, tout comme dans le cas des polymères hydrophobes (PMMA, PS, PVC), la souche D41 adhère jusqu'à 10 fois plus que la souche D01 sur les matériaux plutôt hydrophiles (verre, cellulose, PHEMA).

Il faut noter cependant, que dans le cas des copolymères statistiques, cette différence du taux d'adhésion entre les deux souches est inexistante. Ceci confirme l'hypothèse selon laquelle l'adhésion des ces bactéries marines sur les polymères biospécifiques est médiée par un ou plusieurs médiateurs.

DISCUSSION GENERALE

La comparaison des taux d'adhésion directe des bactéries sur les divers matériaux montre que plus les matériaux sont hydrophiles plus le taux d'adhésion est faible. Cependant, ceci ne nous permet pas d'émettre des conclusions définitives sur la force et la nature des interactions mise en jeu.

La comparaison des résultats obtenus avec les deux souches bactériennes renforce cette observation.

En effet, il a été montré que la souche D41 a une surface plus hydrophobe que celle de la souche D01, et une adhésion plus importante a été observée pour les bactéries D41 ; ce qui semble démontrer que la composante hydrophobe est importante pour l'adhésion des bactéries marines sur les surfaces étudiées.

Nous avons travaillé en conditions définies, avec des milieux choisis et connus comme le bouillon marin, le plasma ou l'eau de mer naturelle débarrassée des autres micro-organismes. Il serait intéressant de comprendre quels types d'interactions sont mis en jeux, notamment en milieu naturel et en présence de plusieurs types de bactéries, par exemple. Une étude similaire en milieu naturel a été réalisée à IFREMER de Brest et semble démontrer que les interactions mise en jeu entre les bactéries marines et les matériaux sont beaucoup plus complexes. Il serait donc intéressant d'élargir l'étude et de réaliser ces mêmes types d'expériences avec d'autres souches bactériennes sur des surfaces plutôt hydrophiles.

En résumé les matériaux à caractère plutôt hydrophobes présentent des adhésions de "type" non spécifiques avec un taux d'adhésion élevé. Les matériaux au comportement plutôt hydrophile, présentent également des adhésions de types non spécifiques mais avec un taux d'adhésion très faible. Le cas des copolymères statistiques semble plus complexe, puisque ces polymères présentent à la fois des caractéristiques hydrophobes et hydrophiles. D'autre part ils présentent des caractéristiques spécifiques du fait de la présence d'arrangements statistiques des fonctions chimique le long de la chaîne macromoléculaire.

L'étude réalisée sur les bactéries marines et les copolymères statistiques est un très bon exemple du principe J et J. D'une part, parce que nous avons montré que l'adhésion des bactéries marines varie selon la nature du conditionnement et d'autre part, l'adhésion différentielle qui existait entre les deux souches sur les autres matériaux est inexistante sur les copolymères statistiques.

DISCUSSION GENERALE

Le but du travail proposé était de mettre en évidence les caractéristiques d'un matériau capable d'inhiber l'adhésion des bactéries marines. Nos recherches nous ont permis de montrer que les matériaux "hydrophiles" ont une capacité de limiter l'adhésion de bactéries marines. Cependant, il est important de préciser que cette étude a été réalisée sur un nombre limité de souches bactériennes et que chacune des expériences a été réalisée sur un clone bactérien. Il serait opportun de continuer cette étude par des études complémentaires en utilisant d'autres souches bactériennes ou en réalisant des expériences de co-cultures avec diverses souches pour se rapprocher du milieu naturel.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif de mon travail était d'observer et de préciser la nature des mécanismes d'interaction mis en jeu dans l'adhésion des bactéries sur divers matériaux. Il a été nécessaire de sélectionner au préalable des souches bactériennes pertinentes, de déterminer les conditions de culture et les paramètres de leur cycle cellulaire. Notre étude a porté sur des matériaux susceptibles de développer des interactions de natures diverses et pour cela nous avons synthétisé des copolymères statistiques aux caractéristiques de surface variables

Nous avons ainsi pu montrer que pour les deux souches bactériennes sélectionnées, la nature des matériaux est essentielle dans le mécanisme de l'adhésion. Il a été montré également que la nature du milieu utilisé influence de manière importante les mécanismes d'adhésion des bactéries sur les surfaces avec lesquelles elles sont en contact.

L'étude de ces interactions nous a permis de montrer que, de manière générale, les matériaux présentant des surfaces de caractère préférentiellement hydrophile génèrent des taux d'adhésion plus faibles, en mettant en oeuvre des interactions vraisemblablement directes entre la surface des matériaux et les bactéries.

En revanche, l'utilisation des copolymères statistiques induit un taux d'adhésion des bactéries en général plus élevé. Il a été démontré que cette interaction pouvait, en présence de certains milieux d'incubation, impliquer l'utilisation de médiateurs susceptibles de modifier l'adhésion bactérienne. Cette observation contredit l'hypothèse de départ de notre travail, qui visait à obtenir des copolymères statistiques biospécifiques susceptibles de limiter l'adhésion des bactéries marines.

En revanche, notre étude montre que la limitation de l'adhésion bactérienne peut être obtenue par l'augmentation du caractère hydrophile des surfaces.

Cette observation devrait être confirmée par des études complémentaires permettant de déterminer la nature réelle des interactions mises en jeu entre les bactéries marines et les matériaux immergés. En outre, une étude plus complète devrait être aussi réalisée avec des matériaux hydrophiles en milieu naturel en présence de

CONCLUSION GENERALE

l'ensemble des bactéries marines, pour mettre en évidence d'éventuels effet de compétition.

A la question posée au début de l'étude : Les copolymères statistiques biospécifiques peuvent-ils, à l'instar des bactéries commensales de l'homme, inhiber l'adhésion des bactéries marine, la réponse est non. En effet, les résultats ont montré que de tels polymères stimulent l'adhésion des bactéries marines en présence de matières organiques (contenues dans les milieux naturels ou synthétiques). En revanche, lors de cette étude, les expériences réalisées sur les matériaux à caractère hydrophile ouvrent une voie prometteuse quant à l'utilisation de surfaces plus hydrophiles pour inhiber l'adhésion des bactéries marines et ainsi limiter la formation des biosalissures.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aissaoui Z. : Synthèse et caractérisation de matériaux copolymères fonctionnels pour implants intraoculaires, Thèse de l'Université Pierre et Marie-Curie Paris VI, **1997**

Alzieu C., Thibaud Y., Heral M., Boutier B., Evaluation des risques dus à l'emploi des peintures anti-salissures dans les zones conchycoles. *Rev. Trav. Inst. Pêches. Marit.* **1982**, 44, 305-348.

Andrade J. D., Principales of protein adsorption, dans *Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers*, Andrade J. D. Ed., Plenum Press, New York, **1985**, vol. 2, pp 1-80.

Avramoglou T and Jozefonvicz J., Derivatized dextran inhibition of smooth muscle cell proliferation. *J. Biomater. Sci.*, **1991**, 3, 149-154

Bagge D., Hjelm M., Johansen M., Huber C and Gram L., *Shewanella putrefaciens* adhesion and biofilm formation on food processing surfaces.

Bagheri-Yarmand R., Bittoun P., Champion J., Letourner D., Jozefonvicz J., Femandjian S and Crepin M., Letter to the editor, Carboxymethyl Benzylamide Dextrans inhibit Breast cell growth In vitro. *Cell.Dev.Biol*, **1994**, 30, 822-824

Baty A.M., Eastburn, Z., Diwu, Techkarnjanaruk S., Goodman, Geesey G.G., Differentiation of chitinase-active and non-chitinase-active subpopulations of marine bacterium during chitin degradation, *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, 66, 8, 3566-3573.

Beech I. and Flemming H. C., Simple methods for the investigation of the role biofilms in corrosion. *Meeting of task 5 Biocorrosion 00-01.* **2000**, 3-10.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Berger M.C. : Etude des interactions entre des copolymères statistiques dérivés du polystyrène et des immunoglobulines antivirales. Thèse de l'université Paris-Nord, **2001**

Berlot S., Synthesis, characterization and biological properties of biospecific copolymers inhibitors of *Staphylococcus aureus*. **1998**, Thèse de l'Université Paris-Nord, Villetaneuse, France.

Berlot S, Aissaoui Z, Pavon-Djavid G, Belleney J, Jozefowicz M, Hilary G, Migonney V, Biomimetic poly(methyl methacrylate)-based terpolymers : modulation of bacterial adhesion effect. *Biomacromolecules*, **2002**, 3(1), 63-68.

Brash J.L and Horbett T.A., Proteins at interfaces physicochemical and biochemical studies. ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, DC **1987**

Brash J.L., Protein adsorption at solid-solution interface in relation to blood – material interaction. In proteins at interfaces physicochemical and biochemical studies. Brash J.L. and Horbett T.A. **1987**, 30, 491-506.

Brisou J. F., Microbiologie du milieu marin. *Edition Médicale Flammarion*, **1995**.

Bryers J.D., Biologically active surfaces: processes governing the formation and persistence of biofilms. *Biotech.Prog*, **1987**, 3, 57-68

Characklis W. G., Bioengineering report. Fouling biofilm development : a process analysis. *Biotechnology and bioengineering*. **1981**, 23, 1923-1960.

Characklis W. G., Cooksey K. E., Biofilms and microbial fouling. *Advances in Applied Microbiology*. **1983**, 29, 93-133.

Compère C., Biofilms en milieu marin. *Congrès Journée Information Eaux 98*. **1998**, Poitiers.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Compère C., Caractérisation des microflores bactériennes associées à des surfaces (verre, téflon et inox) immergées en eau de mer circulaire, *Communication interne*, **1999**

Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R, Lappin-Scott H.M., Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol*, **1995**, 49, 711-745

Crepinior J. : Etude des interactions entre des copolymères statistiques dérivés u polystyrène et des particules virales. Thèse de l'université Paris-Nord, **2000**

Crépinior J., Pavon-Djavid G., Migonney V., Jozefowicz M., Interactions entre copolymères spécifiques, protéines d'adhésion et cellules. *Innov. Techn. Biol. Med.*, **1996**, 17 (6), 461-470.

Cunliffe D., Smart C.A., Alexander C and Vulfson E.N., Bacterial adhesion at synthetic surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1999**, 4995-5002

Curtis A.S., Forrester J.V., McInnes C and Lawrie F., Adhesion of cells to polystyrene surfaces. *J. Cell. Biol.*, **1983**, 97, 1500-1506

Dirckx P., Biofilm, The center for biofilm engineering at Montana State University-Bozeman, *A National Science Foundation Engineering Research Center*, **1995**.

Dupey E. and Mohho-Sabatier P. , Physiologie de l'hémostase primaire. In L'hématologie de Bernard Drefus. Broton-Gorius J., Reyes F., Rosa J. and Vernaut j.P. Paris. 78-82. **1992**.

EI Khadali F. : Etude des interactions de copolymères à base de poly(méthacrylate de méthyle) avec des cellules fibroblastiques humaines. Thèse de l'Université paris Nord, **2002**

EI Khadali F., Helary G., Pavon-Djavid G and Migonney V., Modulating fibroblast cell proliferation with functionalized poly(methyl methacrylate) based copolymers :

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

chemical composition and monomer distribution effect. *Biomacromolecules*, **2002**, 3, 51-56

Fadli Z., Adhérence et prolifération de *Streptococcus pyogenes* sur des copolymères biospécifiques. Etude de la sensibilité à la pénicilline G des bactéries proliférant sur ces polymères. **2000**, *Thèse de l'Université Paris-Nord*, Villetaneuse, France.

Féron D. Thierry D., Corrosion bactérienne des métaux, dans Biodégradation des matériaux. Lemaitre C., Pébère N., Festy D. (eds) , (ADP Science), **1998**, Chap. 7, 89-102.

Flemming H.C. Biodétérioration des polymères, dans Biodégradation des matériaux. Lemaitre C., Pébère N et Festy N (eds) :. (EDP Sciences), **1998**,Chap. 6, 71-88

Fougnot C., Jozefowicz M., Bara L. and Samama M., Interactions of anticoagulant insoluble modified polystyrene resins with plasmatic proteins. *Thrombosis research*, **1982**, 28, 37-46

Fougnot C., Jozefowicz M., Samama M., Bara L., New heparin-like insoluble materials. *Ann. Biomed. Eng.* **1979**, 7, 441-450.

Geesey G. and Phinney M., Corrosion, The center for biofilm engineering at Montana State University-Bozeman, *A National Science Foundation Engineering Research Center*, **1997**.

Geesey G.G and White D.C., Determination of bacterial growth and activity at solid-liquid interfaces. *Annu Rev Microbiol.* **1990**;44:579-602.

Goncalves E. Etude des interactions entre une bactérie marine bio salissante et les copolymères statistiques, **2000**, DEA Université Paris-Nord, Villetaneuse.

Guezennec J., Prévention de la corrosion induite par les micro-organismes et moyen de lutte. *Océanis*, **1993**, 19, 3, 33-36.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Hellio C., De La Broise D., Duffosé L., Le Gal Y and Bourgougnon N., Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae : potential use for environmentally friendly antifouling paints. *Mar. Environ. Res*, **2001**, 52, 231-247

Hilaire D., Biodétérioration des polymères, dans Lemaitre C., Pébère N et Festy N (eds) : Biodétérioration des matériaux. (EDP Sciences), **1998**, Chapitre 7, 103-113

Hoffman A.S. : Synthetic polymer biomaterials in medicine, a review. In IUPAC. Macromolecules : Benoît H. Et Rempp P. (Eds), Pergamon Press, 1982.

Imbert E. Interactions de dérivés de polystyrène avec les facteurs de transcription de l'ARN polymérase II. Thèse de l'université Paris-Nord, **1995**

Imbert E., Letourneur D, Jozefowicz M. Randomly phosphorylated polystyrene derivatives interact with RNA polymerase II transcription factors : part I. *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, 34(4), 417-425.

Imbert E., Letourneur D, Jozefowicz M. Fractionation of RNA polymerase II transcription factors from Hela cell nuclear extracts by affinity chromatography on « DNA-like » phosphorylated polystyrene. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1997**, 698(1-2), 59-68.

Imbert-Laurenceau E., Crépinior J, Crance J-M, Jouan A, Migonney V, Polystyrene derivatives substituted with arginine interact with Babanki (Togaviridea) and Kedougou (Flaviridea) viruses. *J. Med. Virol.*, **2003**, 69(4), 503-509.

Jozefonvicz J and **Jozefowicz M.**, Interactions of biospecific functional polymers with blood proteins and cells. *J. Biomater Sci Polymer Edn*, **1990**, 1, 147-165

Jozefowicz M., Jozefonvicz J., Random copolymers are capable of biospecific molecular recognition in living systems. *Biomaterials*, **1997**, 18, 1-12.

La Barre S., Hamadouche N, El Khadali Z, Gottini Y, Muller D, Erard-Le Denn and Jozefowicz M. Selective surface adhesion of the toxic microalga *Alexandrium*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

minutum induced by contact with substituted polystyrene derivatives. *J. Biotechnol.* **2002**, 93(1), 59-71.

Langmuir, I., The constitution and fundamental properties of solids and liquids, *J. Am. Chem. Soc.*, **1916**, 38, 2221-2295.

Lawrence J.R and Cadwell D.E., Behaviour of bacterial steam populations within the hydrodynamic boundary layers of surface microenvironments. *Micro.Ecol*, **1987**, 14, 15-27

Letourneur D. and Jozefowicz M., Insoluble DNA-like phosphorylated polystyrene : Specific interactions with anti-DNA antibodies from systemic lupus erythematosus patients, *Biomaterials*, **1992**, 13 (1), 59-63

Lewandowski, Z. Structure and function of biofilms. *Biofilms : Recent advances in their Study and control*, L. V. Evans (ed), **2000** Harwood Academic Publishers., 1-17.

Logeart D., Avramoglou T and Jozefowicz J., Inhibitory effect of functional dextrans on rat arterial smooth muscle cell growth in vitro. *Colloids and surfaces: Biointerfaces*, **1994**, 2, 315-322

Magot M., Introduction à la microbiologie des bactéries, dans Lemaitre C., Pébère N et Festy N (eds) : Biodétérioration des matériaux. (EDP Sciences), **1998**, Chapitre 2, 27-46

Marshall K. C., Stout R, Mitchell R., Mechanism of initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *Journal of General Microbiology* **1971**, 68, 337-348.

Mausac M and Jozefowicz J., Anticoagulant activity of dextran derivatives. Part I : Synthesis and characterization, *Biomater*, **1984**, 5, 301-304

Migonney V, Souirti A, Pavon-Djavid G, Ravion O, Pfluger F, Jozefowicz M. Biospecific polymers : recognition of phosphorylated polystyrene derivatives by anti-DNA antibodies. *J. Biomater. Sci. Polym Ed.* **1997**, 8(7), 533-544.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Mittelman M.W., Nivens D.E., Low C and White D.C., Differential adhesion activity and carbohydrate protein ratios of *Pseudomonas atlantica* monocultures attaching to stainless steel in a linear shear gradient. *Microb.Ecol*, **1990**, 19, 269-278

Najab-Benhayoun M., Serne H., Jozefowicz M., Fischer A.M., Brisson C and Sultan H., Human umbilical vein endothelial cell culture on heparin-like microcarriers. *J. of Biomed. Mat. Res.*, **1993**, 27, 511-520

Neidhardt F. C., Ingraham J. L., Schaechter M., Physiology of the bacterial cell, a molecular approach. Edition Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. **1990**.

Palmer R.J and White D.C., Developmental biology of biofilms : implications for treatment and control. *Trends Microbiol*, **1997**, 5, 435-440

Polenius C., Compère C and Bertrand P., Time-of-flight secondary ion mass spectrometry : characterization of stainless steel surfaces immersed in natural seawater. *J. Microbiol. Methods*, **2002**, 48, 195-205

Power K., Marshall K. C., Cellular growth and reproduction of marine bacteria on surface-bound substrate, *Biofouling*, **1988**, 1, 163-174.

Pradier C.M., Costa D., Rubio C., Compère C and Marcus P., Role of salts on BSA adsorption on stainless steel in aqueous solutions.I. FT-IRRAS and XPS characterization. *Surf.Interface Anal*, **2002**, 34, 50-54

Prescott., Harl., Klein., *Microbiology*. Second eds, Brown Publishers, USA, W. C., **1993**.

Prigent-Combaret C., Lejeune P., La génétique de la formation et du développement des biofilms. *Bulletin de la Société Française de Microbiologie*, **1999**, 14, 2, 121-126.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ratner B.D. and Hoffman A.S. : Thin film, Grafits and coating, chapitre n°29 dans Ratner B.D., Hoffman A.S., Schoen F.J. and Lemons J.E. (Eds), Biomaterials Science : An introduction too materials in medecine, Academic Press, 105-118, 1996.

Regulation of the European parliament and the Council on the prohibition of organotin compounds on ships, The European Parliament, 2002/0149 (COD),Brussels, **2003**

Rubio C. : Compréhension des mécanismes d'adhésion des biofilms en milieu marin en vue de la conception d nouveaux moyens de prévention. Thèse de l'université Paris VI, **2002**

Soderquist M.E and Walton A.G., Structural changes in proteins adsorbed on polymers. *J. Colloid. Interface Sci*, **1980**, 75, 386-39

Souirti A. : Interactions des facteurs vitamine K-dépendants avec les dérivés phosphorylés du polystyrène. Thèse de l'université Paris-Nord, **1994**

Stanislawski L., Serne H., Stanislawski M., Jozefowicz M., Conformational changes of fibronectin induced by polystyrene derivatives with a heparin –function. *J. Biomed. Mat. Res*, **1993**, 27, 619-626

Thompson M.S., Adhesion of Pseudomonas aeruginosa to Surface Modified and Unmodified Polystyrene with and without a conditioning layer. Thesis on Chemical Engineering, Montana State University, **1999**

Van Schie P.M and Fletcher M., Adhesion of biodegradative anaerobic bacteria to solid surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1999**, 65, 5082-5088

Vaudaux .P. Avramoglou T., Letourneur D., Lew D.D., Jozefonvicz J., Inhibition by heparin and derivatuzed dextran of Staphylococcus aureus adhesion to fibronectin-coated biomaterials. *J. Biomater. Sci. Polymer*, **1992**, 4, 89-97.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Vaudaux P., waldvogel F.A., Morgenthaler J.J and Bydegger U.E., Adsorption of fibronectin onto polymethyl methacrylate and promotion of staphylococcus aureus adherence. *Infect.Immun*, **1984**, 45, 768-774

Vroman L. and Adams A. L., Adsorption of proteins out of plasma and solution in narrow spaces, *J. Colloid Interface Sci.*, **1986**, 111, 391.

Walls A.G. A study of initial procceding Euromat'98, **1998**

Williams D.F., Black J., Doherty P.J., Second consensus conference on definitions, in Biomaterial –tissue interfaces. Doherty P.J., Williaams R.L., Williams D.F., Lee A.J.C (Eds). Liverpool : Elsevier, **1992**, 99-103

Yu C., Lee A. M., Bassler B. L. and Roseman S. Chitin utilisation by marine bacteria. A physiological function for bacterial adhesion to immobilized carbohydrates. *J. of Biol. Chem.* **1991**, 266, 36, 24260-24267.