

# THÈSE

Présentée à

**L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE-SUD**

U.F.R Sciences et Sciences de l'ingénieur

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE-SUD**

Mention : Chimie

par

**Nadia BOUTALEB**

Laboratoire des Polymères, Propriétés aux Interfaces et Composites

---

## Etude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable

---

Thèse soutenue le 3 Décembre 2007, devant la commission d'examen composée de :

Dimiter HADJIEV	Professeur, Université de Bretagne-Sud, France	Examinateur
Hassan LATRACHE	Professeur, Université Moulay Soulayman, Maroc	Codirecteur de thèse
Olivier SIRE	Professeur, Université de Bretagne-Sud, France	Codirecteur de thèse
Maria Luisa GONZÁLEZ- MARTIN	Professeur, Université d'Extremadura, Espagne	Rapporteur
Jean LÉDION	Professeur, ENSAM, Paris	Rapporteur
Frédéric TRICHET	Docteur. Ingénieur, SAUR OUEST	Examinateur

*A mes parents ;  
A ma grand- mère qui restera à tout  
jamais dans mon coeur*

## Remerciements

Je voudrais exprimer mes remerciements,

**A Monsieur le Professeur Olivier SIRE.**

Qui m'a donné la possibilité d'effectuer ce travail de thèse. Je le remercie vivement pour m'avoir apporté un appui constant, pour son soutien et sa disponibilité. Nulle expression ne va pouvoir traduire les sentiments de considération que j'éprouve envers lui.

**A Monsieur le Professeur Hassan LATRACHE.**

Qui m'a bien soutenu et prodigué les meilleurs conseils au cours de ces 3 ans, mes sincères remerciements du profond du cœur.

**A Monsieur le Professeur Dimitar HADJIEV.**

Qui me fait l'honneur d'examiner ce travail. Mes sincères reconnaissances.

**A Madame Maria Luisa GONZÁLEZ-MARTIN.**

D'avoir accepté de juger ce travail, je suis très honorée qu'elle fasse partie de ce jury.

**A Monsieur le Professeur Jean LÉDION.**

D'avoir accepté de juger ce travail, qu'il en soit vivement remercié

**A Monsieur Frédéric TRICHET.**

Qui a trouvé le temps de s'intéresser à mon travail et accepté de l'examiner, qu'il veuille bien accepter ma respectueuse reconnaissance.

**Au Centre National de Recherche Scientifique et Technique du Maroc (CNRST).**

Pour m'avoir accordé une bourse de recherche.

**A Monsieur Nour-Eddine SABIRI.**

D'avoir collaboré à la réalisation d'une partie de ce travail, j'aimerais lui témoigner ma profonde reconnaissance.

**A Véronique LE TILLY et Elodie LAHAYE.**

Qui ont contribué à la réalisation de ce travail, par leur collaboration, leurs conseils et leurs amitiés. Je suis très heureuse de trouver ici l'occasion de leur exprimer ma profonde reconnaissance.

**A Hervé GUEZENOC, Abdelqader OUTZHOURLIT et Nicolas MONTRELAY, Christelle MARTY, Claudie EVANNO, Christine MEHRING, Véronique VELLETT, et l'équipe technique du site de Vannes.**

Merci de m'avoir assisté et apporté de l'aide technique nécessaire à la réalisation de ce travail.

**A Monsieur MABROUKI, Madame ZAHIR, Monsieur ELOUALI, Monsieur QOUIDER, Monsieur BENGOURAME, Monsieur ELGHMARI.**

De leur contribution et échanges qui étaient souvent profitables, je les remercie tous.

**A Bouchra MALLOUKI, Fatima HAMADI, Samira BENABDALLAH et Ismaïl ELKHAMMARI.**

Merci pour leur aide et générosité permanente en cas de besoin.

**A Philippe DOUZENEL, Adélaïde LEGRAND, Benoît SERIVE, Alla SILKINA, Diane DEFER, Patrick VINCENT, Alexandra BAZES, Jaouad ABAOUI, Zineb DROUSSI, Abdelfattah JABRANE, Mustapha MLIJI, Noura FAHIMI, Younes JEDDAR, Fathallah ABDELLAOUI, Hafida RACHIDI.**

La réalisation de ce travail était agréable avec leur présence, conseils et collaborations, mes remerciements et reconnaissances les plus considérables.

**A Fadwa BADRANA, Rajae BIDDIA, Soumaya RBIHA, Manal ECHAFII, Asmae ALINSAFI, Dounia SGUIOIR, Zaara BARHOUMI, Fatima Zahra ROUFID, Rhimou BOUHLAL.**

Merci car vous êtes mes meilleures amies.

**A Mes parents, Ma famille, et spécialement Aziza, Faty et Brahim.**

Sans leur soutien, ce travail n'aurait jamais été possible.

**A Kamal ELKHAMMARI**

Pour m'avoir soutenue moralement, pour ses conseils, et son aide dans la rédaction des textes en arabe.

Merci à ceux que j'ai manqué de citer.

## Résumé

Les biofilms se développant dans les canalisations d'eau potable posent un réel problème de santé publique en sus des phénomènes de corrosion ou de pertes de charges qu'ils occasionnent. Comprendre plus finement les mécanismes qui sous-tendent l'adhésion bactérienne à un support abiotique permet de développer de nouvelles stratégies de lutte contre les biofilms.

Notre travail constitue une contribution à la compréhension des mécanismes impliqués dans le processus de bioadhésion aux canalisations d'eau potable à travers une évaluation des propriétés physico-chimiques (hydrophobicité, caractère acide-base et charge de surface) et structurales de la membrane bactérienne ainsi que des tests d'adhésion.

L'impact de facteurs environnementaux tels que le pH, la force ionique ou la présence de chlore est étudié, et des modifications physico-chimiques des propriétés de surface des bactéries sont donc détectées et ont permis de mieux comprendre le rôle respectif joué par les interactions physico-chimiques non-spécifiques dans le phénomène d'adhésion. Ces résultats sont complétés par une analyse structurale par la spectroscopie infrarouge qui a révélée l'implication des constituants membranaire (essentiellement polysaccharidique) dans l'adaptation bactérienne aux changements des conditions physico-chimiques du milieu.

L'approche théorique XDLVO est comparée aux résultats des tests d'adhésion sur différents supports de canalisations d'eau potable. Ceci a permis de préciser sa fiabilité à prédire la bioadhésion et les types d'interactions susceptibles d'intervenir lors de ce processus.

Finalement, l'adaptation structurale, l'organisation et l'architecture du biofilm développé sous différentes conditions physicochimiques et hydrodynamiques ont été évaluées en mode « dynamique » grâce à la spectroscopie infrarouge et la microscopie confocale; des différences sont révélées. Un marqueur précoce de la colonisation est proposé.

**MOTS-CLÉS :** Biofilms, eau potable, bioadhésion, polysaccharides membranaires, conditions environnementales, physico-chimie de surface, canalisation.

## Summary

The biofilms developed in drinking water pipelines pose a real problem of public health in addition of other corrosion phenomena or pressure losses. Improving our understanding of the mechanisms which are involved in bacterial adhesion to abiotic supports, must allow developing new strategies of fight against the biofilms.

Our work constitutes a contribution to the comprehension of the mechanisms implied in the process of bioadhesion to the drinking water pipelines through the evaluation of the physicochemical surfaces properties (hydrophobicity, acid-base character and surface charges) and structural characterisation of the bacterial membrane as well as tests of adhesion.

The impact of environmental factors such as the pH, the ionic force or the presence of chlorine is investigated on surface physicochemical properties of bacteria to allow a better understanding of the respective role played by the non-specific interactions in the adhesion phenomena. These results are completed by a structural analysis by infrared spectroscopy which reveals which membrane components are primarily implicated in the bacterial adaptation to the physicochemical changes of the medium.

Attempts to correlate the theoretical approach "XDLVO" to the results of adhesion tests on various supports of drinking water pipelines are performed. This allows evaluating its efficacy to predict the bioadhesion and the types of interactions implicated during this process.

Finally, the structural adaptation, the organization and the architecture of the biofilm developed under various physico-chemical and hydrodynamic conditions are evaluated in "dynamic mode" by infrared spectroscopy and confocal microscopy. This dynamic study allows proposing an early marker of colonisation which could help in the water networks monitoring.

**KEYWORDS:** Biofilms, drinking water, bioadhesion, membrane polysaccharides, environmental conditions, surface physico-chemistry, pipes.

# عنوان الأطروحة: دراسة تكوين الغشاء البكتيري على أسطح المواد المستعملة عادة في قنوات الماء الصالح للشرب

## ملخص

يعد تطور الأشربة البكتيرية في أنابيب الماء الصالح للشرب خطرا حقيقيا على صحة الإنسان، فهي تساهم في ظاهرة تآكل القنوات، كما أنها تعد أحد أهم أسباب فقدان قوة صبيب المياه. إن المعرفة الدقيقة لآلية هذا التلاحم البكتيري فوق دعامات لاهية، سيمكننا من تطوير نظريات جديدة ستساعد لمعالجة على محاربة تشكل هذه الأشربة البكتيرية.

حاولنا من خلال دراستنا هاته المساهمة على فهم آلية سير هذا التلاحم البكتيري في قنوات الماء الصالح للشرب، وذلك من خلال تقييم الخصائص الفزيوكيميائية (التنافر المائي؛ الخصائص الحمضية-القاعدية؛ والحمولة البكتيرية للأسطح) ودراسة بنية هذا الغشاء البكتيري وإجراء اختبارات حول هذا التلاحم، كما أننا قمنا بدراسة تأثير العديد من العوامل البيئية على سبيل المثال، حمضية الوسط و القوة الأيونية، حيث تم دراسة تأثير تركيز الكلور... الشيء الذي مكن من تسجيل تغيرات فزيوكيميائية هامة على خصائص المظهر الخارجي للبكتريا، مما ساعدنا على فهم أحسن للدور الذي تلعبه التأثيرات البيئية الفزيوكيميائية الغير محددة في ظاهرة التلاحم.

لإتمام هذه الدراسة تم الاعتماد على تحليلات بنوية وذلك بواسطة الأشعة تحت الحمراء، التي بينت دور المركبات الغشائية (خاصة المركبات المتعددة السكريات) في تأقلم البكتريا مع تغير الظروف الفزيوكيميائية للوسط. عمدنا بعد ذلك إلى مقارنة نتائج اختبارات الالتحام البكتيري على مختلف أنواع أنابيب الماء الصالح للشرب مع المقاربة النظرية OVLDX الشيء الذي أتاح لنا توضيح أهمية التوقعات الخاصة بالتلاحم البكتيري من جهة ونوع التأثيرات البيئية الكفيلة بالتدخل في هذا الموضوع.

في الختام تم القيام بنفس الدراسات السابقة ولكن في ظروف حركية مشابهة لتلك الموجودة في الوقع (أي المشابهة لصبيب المياه في قنوات الماء الصالح للشرب)، وذلك بالاعتماد على الأشعة تحت الحمراء والمجهر الأيوني ثلاثي الأبعاد الشيء الذي كشف العديد من الاختلافات و قد تم كذلك عرض وسيلة لتعليم الظروف الايجابية لتكون الشريط البكتيري.

**المفتاح:** الأشربة البكتيرية، الماء الصالح للشرب، الالتحام البكتيري، الأغشية المتعددة السكريات، الظروف البيئية، فزيوكيميائية الأسطح، الأنابيب.

# Sommaire

<b>Sommaire</b>	<b>I</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>III</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>IV</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>VII</b>
<b>Chapitre I</b>	<b>1</b>
<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
<b>I. Les biofilms</b>	<b>1</b>
I.1. Biofilms et eau potable	1
I.2. Etapes de formation de biofilm	3
<b>II. Composition et architecture de la paroi bactérienne et structure du biofilm</b>	<b>6</b>
II.1. GRAM positif (GRAM+)	7
II.2. GRAM négatif (GRAM-)	9
II.3. Propriétés fonctionnelles des polysaccharides	13
<b>III. Interactions physico-chimiques responsables de l'adhésion microbienne</b>	<b>14</b>
III.1. Les interactions de van der Waals	14
III.2. Les interactions électrostatiques	16
III.3. Les interactions polaires	19
<b>IV. Modèles théoriques prédictifs de l'adhésion</b>	<b>20</b>
IV.1. Approche de l'adhésion par la théorie classique DLVO	20
IV.2. Théorie de DLVO développée par van Oss (XDLVO)	23
<b>V. Facteurs influençant l'adhésion microbienne dans les réseaux d'eau potable</b>	<b>26</b>
V.1. Facteurs liés aux microorganismes	26
V.2. Facteurs liés aux propriétés et structure du réseau	27
V.3. Facteurs liés aux propriétés physico-chimiques du milieu	30
V.4. Nutriments	31
V.5. Désinfection	33
<b>Objectif et contexte du travail</b>	<b>39</b>
<b>Chapitre II</b>	<b>42</b>
<b>Matériels et méthodes</b>	<b>42</b>
<b>I. Modèles biologiques</b>	<b>42</b>
I.1. Principales caractéristiques des modèles biologiques	42
I.2. Choix des modèles biologiques	45
I.2. Préparation des suspensions bactériennes	46
<b>II. Supports de canalisations</b>	<b>48</b>
II.1. Choix des supports	48
II.2. Procédure de nettoyage et de désinfection	48
<b>III. Physico-chimie du milieu de suspension</b>	<b>49</b>
III.1. pH	49
III.2. La force ionique	50
III.3. Chlore actif	51
III.4. La température	51
III.5. Débit	52
<b>IV. Caractérisation physico-chimique des cellules bactériennes et des matériaux</b>	<b>52</b>
IV.1. Détermination de l'hydrophobicité et du caractère acide-base	52
IV.2. Caractérisation structurale par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	54

<b>V. Tests d'adhésion</b>	<b>61</b>
<b>VI. Mesure des densités cellulaires adhérees</b>	<b>62</b>
VI.1 Préparation d'échantillon pour les observation en MEB	62
VI.2. Numération des bactéries par microscopie à épifluorescence	62
<b>VII. Etude en « dynamique » de la formation des biofilms</b>	<b>63</b>
VII.1. Description de l'installation pilote	63
VII.2. Marquage du biofilm au Dead/Live et au DAPI	65
VII.3. Analyse en infrarouge	65
<b>Chapitre III</b>	<b>65</b>
<b><i>Approche prédictive de l'adhésion dans les réseaux d'eau potable</i></b>	<b>65</b>
<b>II.1. Matériels et méthodes</b>	<b>65</b>
<b>II.2. Résultats et discussions</b>	<b>66</b>
II.2.1. Caractérisation des supports d'adhésion	66
II.2.2. Caractérisation des souches bactériennes	69
II.2.3. Mesure de l'énergie d'adhésion	70
II.2.4. Tests d'adhésion	72
II.2.5. Discussions	75
<b>II.3. Conclusions</b>	<b>79</b>
<b>Chapitre IV</b>	<b>81</b>
<b><i>Effet de facteurs environnementaux sur les propriétés physico-chimiques de la surface cellulaire</i></b>	<b>81</b>
<b>III.1. Matériels et méthodes</b>	<b>82</b>
<b>III.2. Résultats et discussions</b>	<b>83</b>
III.2.1. Caractère hydrophobe/hydrophile	83
III.2.2. Caractère donneur d'électrons	88
III.2.3. Caractère accepteur d'électrons	92
III.2.4. Polysaccharides membranaires	94
<b>III.3. Problématique de la détermination du caractère hydrophobe</b>	<b>101</b>
<b>III.4 Conclusions</b>	<b>105</b>
<b>Chapitre V</b>	<b>106</b>
<b><i>Etude en « dynamique » de la formation des biofilms dans les réseaux d'eau potable</i></b>	<b>106</b>
<b>V.1. Matériels et méthodes</b>	<b>106</b>
<b>V.2. Résultats et discussions</b>	<b>107</b>
V.2.1. Architecture et organisation du biofilm de <i>P. aeruginosa</i> sous différentes conditions environnementales	107
V.2.2. Analyse spectrale du biofilm de <i>P. aeruginosa</i> sous différentes conditions environnementales	128
<b>V.3. Conclusions</b>	<b>143</b>
<b><i>Discussion et conclusions générales</i></b>	<b>146</b>
<b><i>Références bibliographiques</i></b>	<b>153</b>



## Liste des abréviations

ACP :	Analyse en Composantes Principales
ATR :	Réflexion Totale Atténuée
CPS :	Polysaccharides capsulaires
COA :	Carbone organique assimilable
COD :	Carbone organique dissout
CODB :	Carbone organique dissous biodégradable
C1 :	280 l/h ; 37°C ; 50 mM ; pH 7,5
C2 :	140 l/h ; 37°C ; 50 mM ; pH 7,5
C3 :	70 l/h ; 37°C ; 50 mM ; pH 7,5
C4 :	70 l/h ; 27°C ; 50 mM ; pH 7,5
C5 :	70 l/h ; 17°C ; 50 mM ; pH 7,5
C6 :	70 l/h ; 37°C ; 5 mM ; pH 7,5
C7 :	70 l/h ; 27°C ; 5 mM ; pH 7,5
C8 :	70 l/h ; 17°C ; 5 mM ; pH 7,5
C9 :	70 l/h ; 37°C ; 5 mM ; pH 6,5
C10 :	70 l/h ; 37°C ; 5 mM ; pH 9,5
DAPI :	di Aminido Phenyl Indol
DM :	Diiodométhane
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EPS :	Exopolysaccharides
FA :	Formamide
FTIR :	Infrarouge à Transformée de Fourier
IR :	Infrarouge
$\bar{l}$ :	longueur moyenne
LB :	Luria Bertani
LPS :	Lipopolysaccharides
MEB :	Microscope Electronique à Balayage
MATH :	Adhésion microbienne aux hydrocarbures, « <i>Microbial adhesion to hydrocarbons</i> »
MATS :	Adhésion microbienne aux solvants, « <i>Microbial Adhesion To Solvents</i> »
<i>P. aeruginosa</i> :	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PEHD :	Polyéthylène haute densité
PEX :	Polyéthylène réticulé
PPR :	polypropylène
PVC :	Polychlorure de vinyle
<i>spp.</i> :	Espèces
W :	Eau « <i>Water</i> »
XPS :	X-Ray Photoelectron Spectroscopy
$\nu$ <sub>s</sub> ou as :	Vibration de valence Symétrique ou asymétrique
$\delta$ <sub>s</sub> ou as :	Vibration de déformation Symétrique ou asymétrique

## Liste des figures

Figure 1 ....	Etapes de la formation d'un biofilm.	.....	4
Figure 2 ....	Gradient de vitesse dans un écoulement dans une conduite de canalisation.	.....	4
Figure 3 ....	Représentation du peptidoglycane	.....	7
Figure 4 ....	Représentation schématique d'une paroi des bactéries gram négatif et positif.	.....	8
Figure 5 ....	Les 3 types d'interactions de van der Waals.	.....	14
Figure 6 ....	Représentation de la double couche électrique. (Van Loosdrecht, 1987).	.....	16
Figure 7 ....	Schéma de la variation du potentiel avec la distance de la surface.	.....	17
Figure 8 ....	Energie d'interaction totale d'après DLVO selon la concentration du milieu en électrolytes.	.....	21
Figure 9 ....	Profil d'une goutte déposée sur un substrat d'après YOUNG .	.....	24
Figure 10...	Approche thermodynamique d'adhésion a) adhésion défavorable b) adhésion favorable.	.....	26
Figure 11...	Echantillons d'eau prélevés sur des réseaux de distribution présentant des phénomènes d'eaux « rouges » ou d'eaux « noires ».	.....	29
Figure 12 ...	Adhésion de <i>P. aeruginosa</i> sur des surfaces de canalisation d'eau potable en polyéthylène observée en MEB.	.....	43
Figure 13...	Adhésion d' <i>E. coli</i> sur des surfaces de canalisation d'eau potable en polyéthylène observée en MEB.	.....	43
Figure 14...	Etapes de préparation de la suspension à partir d'une culture bactérienne	.....	46
Figure 15...	Potentiel anharmonique et niveaux d'énergie vibrationnelle (courbe de Morse).	.....	55
Figure 16...	Principe de la réflexion totale atténuée.	.....	57
Figure 17...	Structure des données intervenant dans l'analyse en composantes principales.	.....	60
Figure 18...	Pilote pour l'étude en dynamique de la formation des biofilms dans les canalisations d'eau potable.	.....	63
Figure 19...	Spectres FTIR-ATR des surfaces internes des canalisations utilisées.	.....	67
Figure 20...	Tests d'adhésion d' <i>E. coli</i> et <i>P. aeruginosa</i> aux différents supports testés après 2 h de contact.	.....	72
Figure 21...	Photos MEB de la colonisation de <i>P. aeruginosa</i> .	.....	73
Figure 22...	Photos microscopie à épifluorescence de la colonisation d' <i>E. coli</i> à 50mM.	.....	74
Figure 23...	Photos MEB de la colonisation d' <i>E. coli</i> .	.....	75
Figure 24...	Corrélations entre la variation de l'énergie libre totale d'adhésion et densités cellulaires observées pour <i>E. coli</i> et <i>P. aeruginosa</i> à deux forces ioniques distinctes.	.....	77
Figure 25...	Effet de la concentration saline sur l'hydrophobicité bactérienne.	.....	83
Figure 26...	Effet du pH sur l'hydrophobicité bactérienne.	.....	85
Figure 27...	Allure générale de l'évolution de mobilité électrophorétique en fonction du pH pour les cas discuté dans le texte.	.....	87
Figure 28...	Effet du chlore sur l'hydrophobicité bactérienne.	.....	88

Figure 29...	Effet de la force ionique, du pH et du chlore sur le caractère donneur d'électrons.	.....	89
Figure 30...	Effet de la force ionique, du pH et du chlore sur le caractère accepteur d'électrons.	.....	92
Figure 31...	Effet de la force ionique et du pH sur le caractère donneur d'électrons d' <i>E.coli</i> .	.....	93
Figure 32...	Spectres infrarouge moyens de <i>E. coli</i> et <i>P. aeruginosa</i> collectés dans différentes conditions de pH et de forces ioniques et après différents temps d'incubation.	.....	95
Figure 33...	Variabilité spectrale dans l'infrarouge d' <i>E. coli</i> cultivée dans des milieux de pH et de forces ioniques distinctes.	.....	98
Figure 34...	Variabilité spectrale dans l'infrarouge de <i>P. aeruginosa</i> cultivée dans des milieux de pH et de forces ioniques distinctes.	.....	99
Figure 35...	Analyse en composante principale de <i>P. aeruginosa</i> dans le domaine spectral des polysaccharides membranaires.	.....	100
Figure 36...	Analyse en composante principale de <i>E. coli</i> dans le domaine spectral des polysaccharides membranaires.	.....	101
Figure 37...	Corrélations entre le pourcentage d'adhésion (MATH) et, d'une part, la mobilité électrophorétique (en haut, à gauche), d'autre part, l'angle de contact (en haut, à droite), représentation 3D (en bas).	.....	104
Figure 38...	Schéma du cisaillement tangentiel dans un tube circulaire horizontal avec des conditions d'écoulement permanent.	.....	108
Figure 39...	Observation par MEB de la surface interne des canalisations en PEHD.	.....	111
Figure 40...	C1 (280 l/h ; 37°C ; 50 mM ; pH 7,5) Observations en épifluorescence et par microscopie confocale des surfaces de PEHD colonisées par <i>P. aeruginosa</i> .	.....	113
Figure 41...	C2 (140 l/h ; 37°C ; 50 mM ; pH 7,5) Observations en épifluorescence et par microscopie confocale des surfaces de PEHD colonisées par <i>P. aeruginosa</i> .	.....	114
Figure 42...	C3 (70 l/h ; 37°C ; 50 mM ; pH 7,5) Observations en épifluorescence et par microscopie confocale des surfaces de PEHD colonisées par <i>P. aeruginosa</i> .	.....	115
Figure 43...	Evolution du nombre de Reynolds et de la vitesse locale en fonction de la distance à la paroi pour les trois régimes hydrodynamiques testés.	.....	117
Figure 44...	C9 (70 l/h ; 37°C ; 5 mM ; pH 6,5) Observations en épifluorescence et par microscopie confocale des surfaces de PEHD colonisées par <i>P. aeruginosa</i> .	.....	119
Figure 45...	C6 (70 l/h ; 37°C ; 5 mM ; pH 7,5) Observations en épifluorescence et par microscopie confocale des surfaces de PEHD colonisées par <i>P. aeruginosa</i> .	.....	120
Figure 46...	C10 (70 l/h ; 37°C ; 5 mM ; pH 9,5) Observations en épifluorescence et par microscopie confocale des surfaces de PEHD colonisées par <i>P. aeruginosa</i> .	.....	121
Figure 47...	C4 (70 l/h ; 27°C ; 50 mM ; pH 7,5) Observations en épifluorescence et par microscopie confocale des surfaces de PEHD colonisées par <i>P. aeruginosa</i> .	.....	123
Figure 48...	C5 (70 l/h ; 17°C ; 50 mM ; pH 7,5) Observations en	.....	124

	épifluorescence et par microscopie confocale des surfaces de PEHD colonisées par <i>P. aeruginosa</i> .		
Figure 49...	C7 (70 l/h; 27°C; 5 mM; pH 7,5) Observations en épifluorescence et par microscopie confocale des surfaces de PEHD colonisées par <i>P. aeruginosa</i> .	.....	125
Figure 50...	C8 (70 l/h; 17°C; 5 mM; pH 7,5) Observations en épifluorescence et par microscopie confocale des surfaces de PEHD colonisées par <i>P. aeruginosa</i> .	.....	126
Figure 51...	Structure d'un alginat.	.....	128
Figure 52...	Variabilité spectrale des biofilms à <i>P. aeruginosa</i> cultivés dans des conditions expérimentales variées.	.....	131
Figure 53...	Trois premières composantes principales de l'ACP.	.....	132
Figure 54...	Représentation 3D des spectres C1 à C10.	.....	132
Figure 55...	Colonisation et survie à 37°C.	.....	133
Figure 56...	Colonisation et survie à pH 7,5.	.....	133
Figure 57...	Analyse R-PLS1 des spectres C3 à C10.	.....	134
Figure 58...	Décomposition spectrale des spectres C4 et C6 dans le domaine d'absorption des bandes amide I et II. Et structures des lipopolysaccharides (LPS).	.....	136
Figure 59...	Carte de corrélation 2D asynchrone des spectres correspondant à C3 et C10.	.....	138
Figure 60...	Décomposition spectrale des spectres C1 à C3 dans le domaine d'absorption des polysaccharides.	.....	140
Figure 61...	Carte de corrélation 2D asynchrone des spectres correspondant à C2 et C3 en mode dynamique.	.....	142
Figure 62...	Carte de corrélation 2D asynchrone des spectres correspondant à C2 et C4 en mode statique.	.....	144

## Liste des tableaux

Tableau 1 ....	Sites d'action des désinfectant.	...	38
Tableau 2 ....	Caractéristiques énergétiques des solvants utilisés dans la méthode MATS.	...	52
Tableau 3 ....	Caractéristiques énergétiques des solvants utilisés pour les mesures de l'angle de contact.	...	53
Tableau 4 ....	Angle de contact en degré ( $\pm 2^\circ$ ) et composantes énergétiques de surface de différents matériaux utilisés pour la fabrication des conduits d'adduction d'eau potable, du verre ainsi que ceux de l'eau.	...	66
Tableau 5 ....	Attribution des bandes d'absorption correspondant aux spectres des plastiques utilisés.	...	68
Tableau 6 ....	Effet de la concentration saline sur la tension de surface de l'eau.	...	68
Tableau 7 ....	Caractérisation microbiologique de <i>P. aeruginosa</i> et <i>E. coli</i> . Milieu LB à 37°C.	...	69
Tableau 8 ....	Effet de la force ionique sur l'angle de contact ( $\pm 4^\circ$ ) et les composantes énergétiques de surface de <i>P. aeruginosa</i> et <i>E. coli</i> mises en suspension durant 1,5 h dans la solution.	...	70
Tableau 9 ....	Energie totale d'adhésion $\Delta G_{\text{Total}}$ d' <i>E. coli</i> et <i>P. aeruginosa</i> aux différents matériaux testés et ses composantes Lifshitz - van der Waals $\Delta G_{\text{LW}}$ et acide-base $\Delta G_{\text{AB}}$ .	...	71
Tableau 10...	Récapitulatif des différentes conditions environnementales étudiées.	...	83
Tableau 11...	Comparaison du % d'adhésion et des valeurs de l'angle de contact pour <i>E. coli</i> et <i>P. aeruginosa</i> à différentes forces ioniques.	...	102
Tableau 12...	Résumé des différentes conditions environnementales réalisées pour étudier la formation en « dynamique » du biofilm de <i>P. aeruginosa</i> sur le PEHD.	...	107
Tableau 13...	Paramètres hydrodynamiques dans les canalisations de PEHD.	...	110
Tableau 14...	Détail de la colonisation en fonction du taux de cisaillement.	...	112
Tableau 15...	Détail de la colonisation en fonction du pH.	...	118
Tableau 16...	Détail de la colonisation en fonction de la température à deux forces ioniques distinctes.	...	122
Tableau 17...	Attribution des bandes IR couramment observées dans les biofilms.	...	129
Tableau 18...	Résultats de la décomposition spectrale du domaine 1200-900 $\text{cm}^{-1}$ des polysaccharides produits sous contraintes de cisaillement variables.	...	141
Tableau 19...	Tableau récapitulatif des interactions <i>P. aeruginosa</i> – PEHD aux trois stades de formation du biofilm.	...	151

---

# **Chapitre I**

## **Introduction générale**

---

# Chapitre I

## Introduction générale

### I. Les biofilms

Environ 40 ans après leur découverte vers les années 30, le terme « biofilm » est proposé pour la première fois en 1978 par John William Costerton *et al.* Ces derniers les avaient définis comme étant des populations de bactéries, adhérents les unes aux autres et/ou à des surfaces ou interfaces et englobées dans une matrice. Cette définition inclut les agrégats et floculats bactériens ainsi que les bactéries fixées dans les interstices de milieux poreux. La notion de biofilm n'a cessé d'évoluer depuis, en fonction des avancements des travaux visant la compréhension profonde de ce phénomène. Characklis (1989) l'avait définie comme étant une association de microorganismes inclus dans une matrice d'exopolymères qui sont généralement attachés à la surface de toutes sortes de matériaux, tels que les métaux, les plastiques, les particules des sols, tissus,... Bourion (1995) le définissait comme étant une communauté microbienne enfouie dans une matrice fibreuse de polymère extracellulaire et immobilisée sur une surface. Selon Bosgiraud *et al.* (2003) le biofilm est une structure très organisée avec de nombreuses communications intercellulaires pour assurer un équilibre et un mode de vie coopératif. Les biofilms aujourd'hui sont vus comme un ensemble de microcolonies, entouré d'une matrice hautement hydratée, anionique et constituée d'exopolysaccharides (EPS) (Lahaye, 2006).

#### I.1. Biofilms et eau potable

La formation d'un biofilm, sauf exceptions, est un phénomène commun à la majorité des matériaux en présence d'humidité et qui sont contaminés par des microorganismes. Leur présence dans divers domaines (industriel, médical, environnemental) entraîne souvent des conséquences néfastes et de plus en plus souvent identifiées comme la source récurrente de problèmes souvent lourds de conséquences et parfois dramatiques. Les réseaux de distribution d'eau potable sont, comme ces environnements aqueux, colonisables par les biofilms du fait de la simple adhésion initiale de microorganismes, ce qui constitue pour eux une forme de résistance contre les agressions physiques (forces de cisaillements dues aux grandes vitesses d'écoulements, absence de lumière) ou chimiques (présence d'un agent biocide circulant, faible concentration en éléments nutritifs ...). Ces biofilms consistent le plus souvent en une association de plusieurs espèces: bactéries, champignons, algues, protozoaires, contenues au sein de dépôts de débris particulaires et de produits de corrosion. L'origine de ces

microorganismes est souvent mal cernée. Ils peuvent à la fois être d'origine interne (microorganismes qui ont pu échapper au traitement de désinfection d'eau) ou d'origine externe (par retour d'eau lors de travaux et intervention sur le réseau, à travers des fissurations dues au vieillissement des conduites, à travers des orifices mal protégés). Parmi ces microorganismes, les bactéries semblent être mieux adaptées au milieu aqueux et aux conditions oligotrophes (van der Kooij and Hijnen, 1988 ; Gauthier, 2002), parmi ces bactéries on peut citer (Bornert, 1989):

- ❖ Les bactéries hétérotrophes qui se servent de molécules organiques comme source d'énergie et de carbone (ex. : *Actinomycète*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *E. coli*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*)
- ❖ Les bactéries autotrophes qui utilisent le carbone minéral et tirent leur énergie de réactions d'oxydo-réduction (ex. : *Nitrobacter*, *Thiobacillus*)
- ❖ Les Ferrobactéries regroupant les microorganismes métabolisant le fer, qui sont responsables de la corrosion biologique (ex. : *Gallionella*)

Dans le secteur de l'eau potable, différents problèmes peuvent être reliés à la formation et au développement d'un biofilm sur les parois des canalisations d'adduction d'eau potable. En effet, des phénomènes d'arrachage depuis le biofilm développé sur les parois internes des canalisations, peuvent alors avoir lieu et être l'origine d'une remise en solution de microorganismes, et donc d'une contamination microbiologique du réseau qui peut atteindre le consommateur, ce qui constitue un réel problème de santé publique, à côté de beaucoup d'autres problèmes économiques (Gilbert *et al.*, 2003 ; Woo Byun *et al.*, 2007).

Sur le plan économique, les conséquences sont multiples et concernent aussi bien l'image de l'entreprise vis-à-vis du respect des normes (augmentation du nombre de non-conformités, modification des propriétés organoleptiques, favorisation du développement d'autres microorganismes) que les caractéristiques physiques du réseau (corrosion, diminution de capacité de distribution...).

Du point de vue de la santé publique, la formation d'un biofilm dans le réseau d'eau potable est problématique : en effet, l'arrachage partiel d'un biofilm développé sur les parois internes des canalisations peut être l'origine d'une remise en solution de microorganismes potentiellement pathogènes, ce qui constitue un risque sanitaire pour les consommateurs, notamment par l'augmentation de la fréquence des symptômes gastro-entériques (diarrhées, vomissement).



## I.2. Etapes de formation de biofilm

La formation d'un biofilm sur une surface, est le résultat d'un ensemble de processus physique, chimique et biologique, et comprend quatre étapes successives (Busscher, 1995)

### I.2.1. Transport

Toute adsorption de microorganismes à une surface suppose le rapprochement de ceux-ci du support. Le transport des microorganismes vers la surface peut être correctement décrit en terme de diffusion pour les particules de petites tailles (0,01 à 0,1  $\mu\text{m}$ ) (Dickinson, 1982 ; Macguire & Krisdhasirna, 1992). Pour des particules de grandes tailles (0,5 à 10  $\mu\text{m}$ ), comme pour la plupart des microorganismes le transport dépend des conditions hydrodynamiques.

Lorsque les forces de cisaillement sont nulles ou faibles (en conditions statiques ou en écoulement laminaire) les particules peuvent s'approcher de la surface par différents mécanismes (Characklis, 1983 ; Marshall, 1986 ; Characklis *et al.*, 1990) :

**Sédimentation** : Ce phénomène est dû aux forces de gravité et devient prépondérant en cas d'agrégation ou de floculation des particules. (Dickson & Daniels, 1991 ; Banks & Bryers, 1992)

**Mouvement brownien** : Chaque molécule ou chaque particule immergée dans un milieu liquide présente une énergie de Brown (Van Oss, 1996).

$$E = \frac{3}{2} K_B T$$

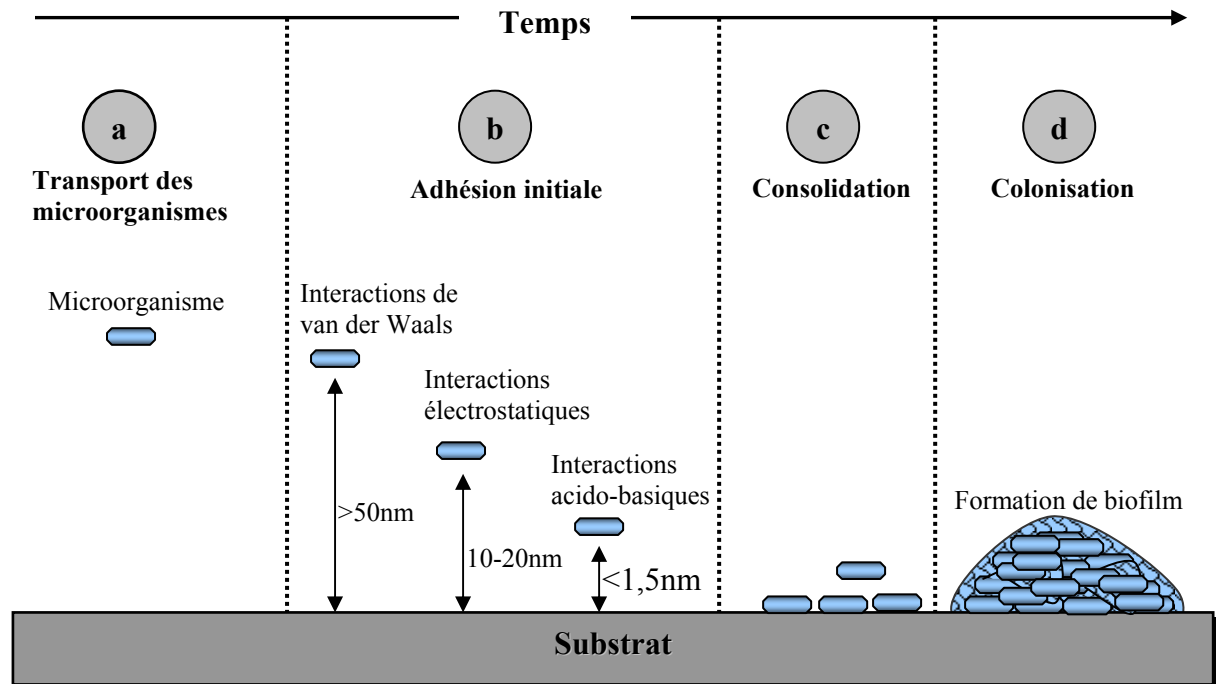
$K_B$  : constante de Boltzmann  
 $T$  : température en Kelvin.

Ce mouvement brownien peut à lui seul provoquer la désorption spontanée de particules adsorbées à une surface si les forces d'adhésion sont par ailleurs suffisamment faibles. Ces forces sont négligeables dans le cas de particules de dimension supérieur à 1  $\mu\text{m}$ .

**Chimiotaxie** : Ce mécanisme apparaît lorsque les microorganismes mobiles flagellés sont capables de se déplacer vers des substances nutritives telles que les acides aminés ou les sources du carbone (sucres) grâce aux signaux détectés par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques.

Par ailleurs, lorsque les forces de cisaillement sont importantes (écoulement turbulent), le transport des microorganismes vers la surface est régi par des forces impliquées dans la dynamique des fluides. Dans ce cas, on distingue deux types de phénomènes :

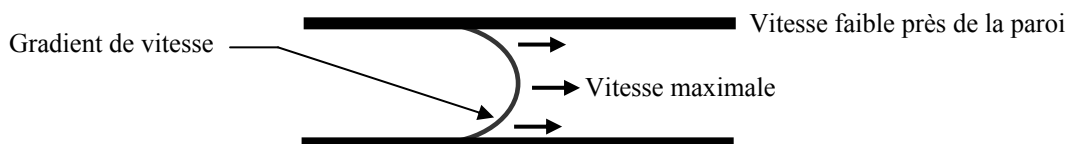
**Les phénomènes qui se produisent dans la masse liquide :** Dans ce cas les particules sont dispersées et entrent en contact avec la surface des conduites de manière aléatoire (mouvements favorisés par les coudes des canalisations) du fait des mouvements de convection qui maintiennent l'uniformité de la concentration (Banks & Bryers, 1992).



**Figure 1: Etapes de la formation d'un biofilm** a) Le transport des microorganismes, b) L'attachement des microorganismes à la surface des conduites du réseau, c) La consolidation d) La colonisation du support.

**Les phénomènes qui apparaissent dans la couche laminaire:**

Dans ce cas les particules peuvent être dirigées vers la surface solide par mouvement descendant turbulent du réseau ce qui amène les microorganismes jusqu'au support, par gravité, sédimentation, mouvement brownien ou chimiotaxie. Leur transport est freiné par les forces de frottement et de drainage (Characklis, 1983 ; Characklis *et al.*, 1990)



**Figure 2 : Gradient de vitesse dans un écoulement dans une conduite de canalisation.**

### **I.2.2. Attachement**

L'attachement des bactéries à la surface des canalisations s'effectue plus favorablement au niveau de dépôts minéraux et organiques, ou à la surface de tubercules de corrosion. Cette étape peut être considérée comme étape-clé de la formation des biofilms, vu qu'elle traduit l'affinité des microorganismes pour un substrat. Plus cette affinité est grande, plus la formation des biofilms est favorable. Elle peut être divisée en deux étapes principales :

- **L'adhérence**, qui correspond à une adsorption réversible des cellules: une fraction des bactéries planctoniques transportées par l'eau se dépose au niveau de la surface des canalisations. Cette étape ne fait intervenir que des processus physiques (interactions électrostatiques, électrodynamiques), et dépend de la nature du support et de son conditionnement préalable (présence de tubercules de corrosion, par exemple). Les bactéries ne sont fixées que de manière réversible au support; elles se détachent facilement sous l'action de contraintes hydrodynamiques imposées par le milieu. Cette phase est en général aspécifique et de courte durée (5 à 10 heures) (Gauthier *et al.*, 1989).
- **L'adhésion ou fixation irréversible des bactéries**: cette étape est plus lente que la précédente, l'irréversibilité de l'adhésion faisant appel au métabolisme bactérien. En effet, la sécrétion d'exopolymères par les microorganismes leur permet de consolider leur adhésion au support, formant autour de la bactérie une enveloppe, appelée glycocalix.

### **I.2.3. Consolidation**

La consolidation de l'adhésion est réalisée par la synthèse de composés extracellulaires.

Plusieurs études ont indiqué que l'attachement aux surfaces commence par un changement phénotypique de la cellule bactérienne qui favorise l'attachement et entraîne l'initiation des microcolonies (Caldwell *et al.*, 1983, Caldwell & Lawrence, 1986) et par conséquent la formation de biofilm.

### **I.2.4. Colonisation**

Dans des conditions favorables, lorsque les bactéries sont fixées de manière irréversible au support, les cellules peuvent se multiplier (en quelques heures ou quelques mois selon la quantité de matière organique biodégradable disponible et le taux d'oxydant résiduel). Il y a alors accroissement de la biomasse et production de métabolites sécrétés par les bactéries.

Les bactéries incluses dans un biofilm peuvent présenter des caractéristiques microbiologiques très différentes de leurs homologues planctoniques. Il a été montré sur plusieurs bactéries que le simple fait d'adhérer à une surface modifie l'expression de gènes (Belas *et al.*, 1986 ; Davies , 1993). 40% des gènes sont modifiés pour *E. coli* (Prigent-Combaret et LeJeune, 1999) contre seulement 4% des gènes de *P. aeruginosa* (Chicurel, 2000).

Cette étape de croissance est caractérisée par trois phases :

- **Une phase dynamique de croissance,**
- **Une phase linéaire de croissance,** traduisant une évolution à taux constant et maximale du biofilm,
- **Une phase de ralentissement,** qui correspond à un début d'équilibre du biofilm entre le taux de multiplication et d'accumulation des microorganismes et le taux de détachement de matière. Ceci met en évidence l'influence des facteurs hydrodynamiques sur le développement du biofilm.

En plus de la multiplication des cellules constitutives du biofilm, la croissance de ce dernier peut également être attribuée à des cellules planctoniques venant se greffer à sa surface.

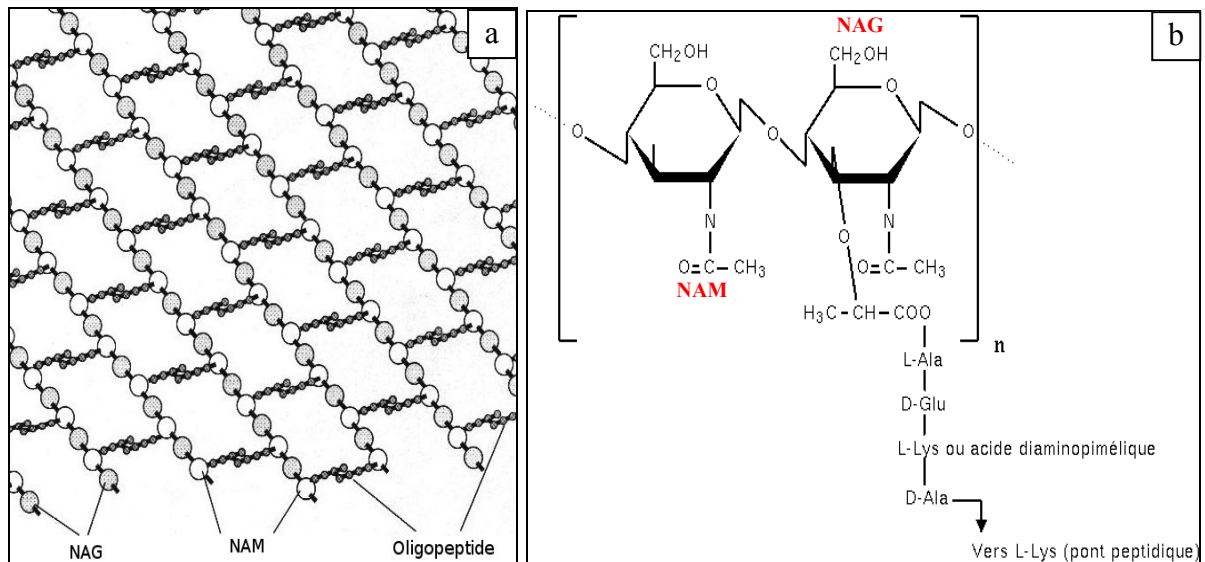
## **II. Composition et architecture de la paroi bactérienne et structure du biofilm**

Il est nécessaire d'étudier la structure de la paroi des cellules bactériennes pour comprendre les mécanismes d'adhésion. La paroi cellulaire constitue la structure vitale de la bactérie, elle peut contenir des constituants qui contribuent au pouvoir pathogène, elle assure la rigidité et donc détermine la forme bactérienne (Excepté les mycoplasmes et quelques archaebactéries) et joue un rôle protecteur contre les attaques. Quant à son rôle au niveau de l'adhésion, les interactions physico-chimiques entre un support donné et une bactérie font intervenir les fonctions chimiques exposées à leur surface qui détermineront leur caractère extérieur apparent (acide ou basique, hydrophobe ou hydrophile...). Dans le milieu aquatique, pour une même souche bactérienne, ces caractères sont modifiés en fonction des propriétés physico-chimiques du milieu (Madigan *et al.*, 2000 ; Rubio, 2002 ; Hamadi *et al.*, 2005). La structure de la paroi et son organisation diffèrent selon le type de GRAM mis en évidence par le médecin Danois en 1884 (Bosgiraud-AEMIP, 2003).

## II.1. GRAM positif (GRAM+)

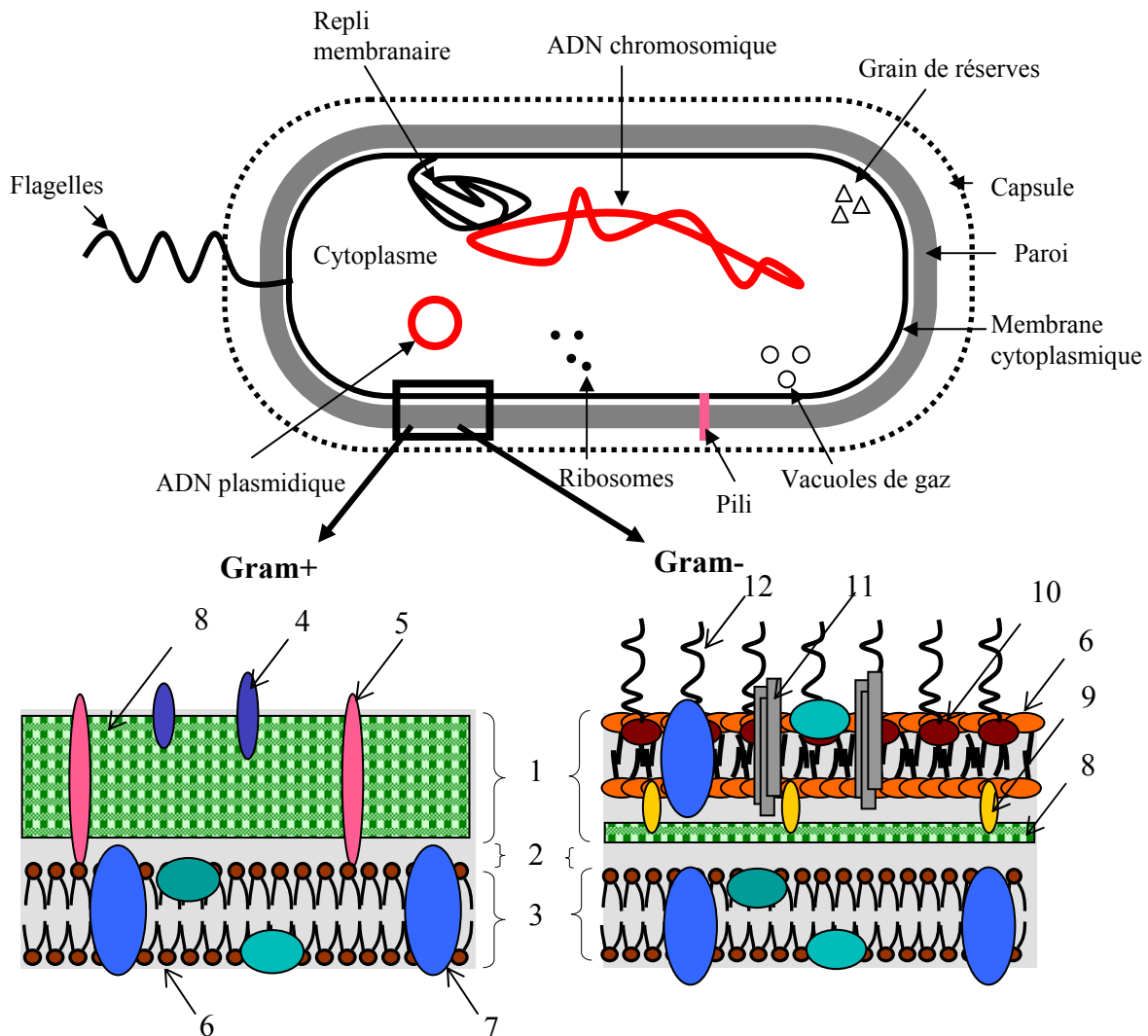
La paroi des bactéries à GRAM+ est constituée seulement d'une couche homogène de peptidoglycane (muréine ou mucopeptide) de 20 à 80 nm d'épaisseur située à l'extérieur de la membrane cytoplasmique. Différentes structures se greffent sur le peptidoglycane (30 à 50%) telles que les acides teichoïques, les polysides ou des protéines.

### II.1.1. Peptidoglycane:



**Figure 3 : a. Représentation schématique du peptidoglycane b. Structure moléculaire du peptidoglycane.** Tiré de <http://www.wikipedia.org>

Le peptidoglycane est un constituant particulier des bactéries, c'est un réseau maillé tridimensionnel rigide, mais cependant poreux, au travers duquel les substances vont pouvoir diffuser. Sa structure de base est constituée de chaînes glycaniques linéaires parallèles constituées d'une succession de résidus N-acétylglucosamine (NAG) liés en  $\beta$  1-4 à l'acide N-acétylmuramique (NAM). De courtes chaînes peptidiques sont greffées au niveau COOH des unités NAM par une liaison amide. Chaque peptide se caractérise par la succession d'acides aminés L et D (L-D-L-D). En fonction des espèces et du caractère GRAM, les tetrapeptides sont légèrement différents. Les ponts interpeptidiques relient les chaînes tetrapeptidiques appartenant à des chaînes glycaniques adjacentes et assurent la rigidité du peptidoglycane.



**Figure 4 : Représentation schématique d'une paroi des bactéries gram négatif et positif.**  
 1.paroï 2.espace périplasmique 3.membrane plasmique 4.acide teichoïque 5.acide lipoteichoïque 6.phospholipide 7.protéine intrinsèque 8.peptidoglycane 9.lipoprotéines de Braun 10.lipopolysaccharides 11.porine 12.chaînes latérales antigéniques O. Tiré de <http://www.univ-ubs.fr/ecologie/cellbacter.html>

### **II.1.2. Acides teichoïques et lipoteichoïques (GRAM+)**

Ce sont les deuxièmes composés majeurs de la paroi des bactéries GRAM positif. Leur charge négative est essentielle pour maintenir et réguler près de la paroi une concentration en cations favorable. Ils ont un rôle majeur dans l'adhésion et présentent un rôle antigénique important.

Les acides teichoïques sont des polymères de polyols : unité de glycérophosphates liés en 1-3 ou en 1-2 ou de ribitolphosphates liés en 1-5. Sur ce squelette de base peuvent se fixer des monosaccharides (liaison glycosidique) et ou des acides aminés (surtout D-Ala) par une liaison ester. Les acides teichoïques sont liés par un pont phosphodiester à la fonction OH primaire en C6 de certains résidus de NAM du peptidoglycane. Ces chaînes traversent le peptidoglycane et forment des structures chargées négativement à la surface bactérienne.

Les acides lipoteichoïques correspondent à des glycosides reliés aux chaînes d'acides teichoïques. Les chaînes d'acides gras à l'extrémité de la molécule permettent l'ancrage du polymère au niveau du feuillet externe de la membrane cytoplasmique. La chaîne osidique traverse le peptidoglycane et peut faire saillie à l'extérieur de la paroi.

## **II.2. GRAM négatif (GRAM-)**

La paroi des bactéries à GRAM- est plus complexe et constituée d'une couche de faible épaisseur de peptidoglycane de 3 nm d'épaisseur entourée d'une membrane externe de 7 à 8 nm d'épaisseur, cette dernière structure est généralement asymétrique ayant un rôle important pour limiter l'entrée et la sortie des constituants. Comme toute membrane, elle est formée d'une double couche de phospholipides dans laquelle sont enchâssées des protéines. Le feuillet externe contient un lipide caractéristique, le lipopolysaccharide ou LPS.

### **II.2.1. Protéines majeures ( $10^5$ /cellule)**

#### ***Lipoprotéine de Braun***

La partie lipidique de ces protéines est enchâssée dans la face interne de la membrane externe par des liaisons hydrophobes avec les phospholipides. La partie protéique est liée de façon covalente au peptidoglycane (1/3 molécules) entre les  $\text{NH}_2$  de la lysine et les  $\text{COOH}$  de l'acide amino-pimélique. Elle assure la liaison membrane externe-peptidoglycane et la cohésion structurale des enveloppes.

#### ***Protéine OmpA (Outer membrane Protein)***

Elle a un rôle essentiel pour la structuration de la membrane externe. Elle ne participerait pas à la diffusion mais est nécessaire pour l'entrée de l'ADN par conjugaison. Des mutants OmpA

et lipoprotéines de Braun adoptent une forme sphérique et ne peuvent croître qu'en présence d'une forte concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ .

### ***Porines***

Les porines forment des canaux hydrophiles qui traversent la membrane externe et forment des pores permettant aux molécules hydrophiles de petite tailles (<600 Da) de traverser la membrane externe. Elles sont associées au peptidoglycane. Elles sont constituées par l'assemblage de protéines, sous forme de feuillet  $\beta$ , formant une structure en tonneau avec en son centre un canal hydrophile. Ces structures peuvent s'associer en trimère.

### ***Récepteurs protéiques membranaires du fer (Iron regulated outer membrane proteins)***

Pour capter le fer ( $\text{Fe}^{3+}$ ) complexé aux protéines telles la transferrine et la lactoferrine, les bactéries doivent posséder un système adapté. Il est composé de 2 constituants : le sidérophore, petite molécule sécrétée à forte affinité pour le fer et le récepteur protéique membranaire qui permet l'internalisation du complexe sidérophore- $\text{Fe}^{3+}$ . Ces systèmes s'expriment quand le milieu est carencé en fer.

### **II.2.2. Protéines mineures (100/cellule)**

Les protéines mineures sont très variées (50 à 10 espèces) mais s'expriment en quantité beaucoup moins importantes que les protéines majeures (OMP) qui sont limitées en nombre et s'expriment en quantité très importantes. Elles sont responsables du transport spécifique de petites molécules

### **II.2.3. Lipopolysaccharides LPS**

Le LPS ou endotoxine (car lié à la cellule bactérienne par opposition aux exotoxines sécrétées) est un constituant particulier, retrouvé uniquement dans la couche externe de la membrane externe des bactéries à GRAM négatif. Il est constitué de trois parties : le lipide A situé du côté externe de la bicouche membranaire, le polysaccharide central et la chaîne antigénique O exposé à la surface de la bactérie

### ***Lipide A***

Il est responsable des propriétés toxiques du LPS. Sa structure est pratiquement identique pour la majorité des bactéries à GRAM négatif. C'est la partie lipophile du LPS. Il est



composé de deux glucosamines phosphorylées et acétylées sur tous les OH et NH<sub>2</sub> par des chaînes d'acides gras saturés, ce qui conduit à une très faible fluidité du LPS.

### ***Polysaccharide central (core)***

C'est un oligosaccharide constitué par un noyau interne lié au lipide A et un noyau externe lié aux chaînes O spécifiques.

### ***Chaînes O***

Elles ont un rôle antigénique très important. Ces chaînes externes hydrophiles sont constituées d'un motif élémentaire de plusieurs sucres (4 en moyenne) pouvant se répéter plus de 20 fois. En fonction des espèces et des souches, leur composition varie. On retrouve des hexoses, des 6-désoxy-hexoses (fucose, rhamnose), des 3-6-didésoxy-hexoses. Les souches qui possèdent ces chaînes O complètes sont dites S pour « Smooth » (colonies lisses) ; en revanche, à la suite de mutation ces chaînes peuvent être tronquées. Il s'agit de mutants R pour « Rough » (colonies rugueuses).

## **II.2.4. Capsule et *slime***

De nombreuses bactéries à GRAM positif ou négatif possèdent une couche de polysaccharides (PS) plus ou moins épaisse et visqueuse recouvrant la face extérieure de la paroi mais en contact avec l'intérieur. On parle de capsule lorsque ces PS sont compacts et attachés à la paroi par des liaisons covalentes ou des interactions fortes et de couches mucoïdes ou *slime* lorsque les PS forment une couche diffuse facilement détachable de la surface. Le terme plus général de glycocalyx désigne toute couche d'exopolymères : PS et protéines, recouvrant une bactérie, et inclut à la fois la capsule et le slime. Les bactéries capsulées produisent des colonies lisses et muqueuses dites S (pour Smooth ou lisse) alors que les bactéries non capsulées produisent des colonies d'aspect rugueux dites R (pour Rough ou rugueux).

Le glycocalyx peut être synthétisé dans la cellule puis exporté ou synthétisé extracellulairement. Il est de nature soit homopolysaccharidique (répétition d'un seul résidu sucré) soit hétéropolysaccharidique (répétition de plus d'un résidu sucré). Les liaisons osidiques entre les résidus peuvent, elle aussi, être de un ou plusieurs types. Les oses les plus souvent rencontrés dans la composition de la capsule et du slime bactérien sont le fucose, rhamnose, glucose, galactose et leurs formes aminées ainsi que les acides uronique et sialique.

La composition de la capsule varie d'une espèce bactérienne à l'autre, mais de plus tous les représentants d'une même espèce bactérienne n'ont pas forcément une capsule de constitution identique.

Le glycocalyx confère aux bactéries une résistance à l'attaque phagique ou à la phagocytose lors d'une infection bactérienne, une protection vis-à-vis de la déshydratation et une réserve en nutriments, en effet, les bactéries contenues au sein d'un biofilm produisent des exopolysaccharides et le plus souvent des protéines, qui stabiliseront la structure. Cette production massive inhibe la synthèse de nombreuses protéines comme la flagelline, et la division cellulaire devient rare dans cet état physiologique. En cas de carence, l'hydrolyse des EPS fournit des nutriments et permet la libération de bactéries pour rechercher un environnement plus favorable. Le glycocalyx limite également les effets des agents chimiques ou physiques, comme la dessiccation, les chocs thermiques, les variations de pH et autres sources de stress. Les exopolysaccharides moins organisés, en particulier sous forme de slime, sont des facteurs d'adhésion des bactéries aux surfaces impliquées dans la formation du biofilm.

#### **II.2.5. Couche S**

Elle est constituée de protéines, glycosylées ou non, généralement d'un poids moléculaire élevé (40 à 200 KDa) disposées régulièrement sous forme d'un assemblage paracristallin organisé selon un système géométrique carré, hexagonal. Pour les bactéries à Gram +, la couche S est située à la périphérie du peptidoglycane et pour les bactéries à Gram - elle est étroitement associée à la membrane externe. Ainsi d'après Sleytr & Messner (1988) plusieurs bactéries gram négatives produisent des protéines S.

On connaît peu de choses sur les fonctions de la couche S, mais on peut la considérer comme un barrage filtrant permettant la concentration dans un environnement proche des molécules excrétées par la bactérie. Elle retient ainsi un certain nombre d'exoenzymes qui vont pouvoir agir à la surface de la bactérie par exemple pour le métabolisme des exopolysaccharides de surface. La couche S joue aussi un rôle protecteur contre les bactériophages, la phagocytose et la fixation du complément. C'est aussi un facteur d'adhésion aux surfaces inertes et aux cellules.

## II.2.6. Appendices

Parmi les appendices cellulaires on distingue les flagelles et les *pilis* ou les *fimbriaes*. Les flagelles sont des structures fines (environ 10 à 20 nm de diamètre), de nature protéique et ils confèrent à la bactérie sa mobilité.

Les *pilis* ou les *fimbriaes* sont différents des flagelles et ne sont pas impliqués dans la mobilité. Il existe une certaine confusion dans la nomenclature de ces appendices, au point que l'on parle de pili pour désigner les appendices qui jouent un rôle dans la conjugaison et de *fimbriaes* pour désigner les appendices impliqués dans des phénomènes d'adhésion. Les *fimbriaes* peuvent avoir deux aspects : soit de bâtonnets rigides de 5 à 7 nm de diamètre, soit de filaments flexibles de 2 à 3 nm de diamètre. Ces *fimbriaes* semblent être présents chez de nombreuses bactéries gram négatif et ils semblent plus rares chez les bactéries gram positif.

Finalement les différents appendices cellulaires de surface peuvent en pénétrant la paroi cellulaire perturber son organisation et être à l'origine de surfaces exposées plus hydrophobes (Hancock, 1991 ; Latrache *et al.*, 2002).

## II.3. Propriétés fonctionnelles des polysaccharides

Les polysaccharides de la matrice extracellulaire peuvent avoir deux origines : soit ils sont sécrétés par la bactérie dans le milieu extérieur, soit ils proviennent de la rupture des CPS, rupture pouvant être due soit au vieillissement cellulaire, soit aux forces de frictions.

Ces polysaccharides regroupent comme cités auparavant, les polymères qui restent en contact de la bactérie formant une capsule autour d'elle (CPS) mais également ceux sécrétés dans la matrice extracellulaire (EPS). Pourtant, la distinction entre les deux formes reste floue. Les EPS seraient dans certains cas des CPS sécrétés dans le milieu extracellulaire, dû à un vieillissement bactérien ou des forces de frictions trop importantes (Lahaye, 2006). On les retrouve souvent associées à d'autres macromolécules, comme des protéines, des acides nucléiques ou des substances humiques (Christensen, 1989 ; Cooksey, 1992). Certains de ces polysaccharides sont neutres ou polyanioniques comme c'est le cas pour les bactéries gram négatif. Dans le cas des gram positifs, la composition chimique des EPS comme les Staphylocoques par exemple est cationique.

Les EPS sont très hydratés car ils peuvent fixer une grande quantité d'eau *via* des liaisons hydrogène. Sutherland (2001) a noté deux propriétés importantes qui peuvent avoir un effet sur le biofilm. Leur composition et leur structure déterminent la conformation du biofilm; ils jouent un rôle protecteur en recouvrant les cellules microbiennes formant ainsi le biofilm ; ils

peuvent en outre présenter des variations temporelles en réponse à des stress environnementaux (Mao *et al.*, 2001 ; Chen *et al.*, 2004).

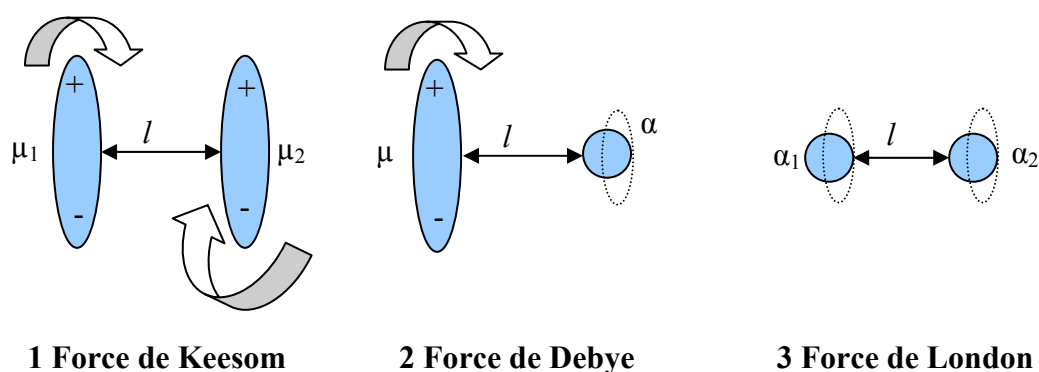
La composition et la quantité d'EPS formés par les microorganismes dépendent fortement du type de microorganisme, de l'âge du biofilm et aussi des facteurs environnementaux, comme la présence des nutriments ou l'excès de carbone.

### III. Interactions physico-chimiques responsables de l'adhésion microbienne

Une fois les microorganismes arrivés à proximité des surfaces par les mécanismes de transport cités auparavant, les microorganismes adhèrent initialement par l'intermédiaire des interactions physico-chimiques. Ces interactions comprennent essentiellement (Van Oss, 1996) les interactions de van der Waals, les interactions électrostatiques et les interactions acido-basiques (donneur - accepteur d'électrons au sens de Lewis).

#### III.1. Les interactions de van der Waals

Les forces de van der Waals ont été ainsi nommées en l'honneur du physicien hollandais Johannes Diderik van der Waals (1873-1923), prix Nobel de physique 1910, qui fut le premier à introduire leurs effets dans les équations d'état des gaz en 1873. Ces forces impliquent l'existence d'une interaction d'attraction entre deux atomes neutres. Il a été démontré que les forces de van der Waals comprennent trois types de forces :



**Figure 5 : Les 3 types d'interactions de van der Waals.** 1. Force de Keesom 2. Force de Debye 3. Force de London

##### III.1.1. Force de Keesom (Forces d'orientation)

Ces forces, décrites par Willem Hendrik Keesom en 1912, caractérisent les interactions intermoléculaires entre deux dipôles permanents (orientation).

L'énergie  $U$  produite par les forces de Keesom entre deux molécules 1 et 2 séparées par une distance  $l$  est (Gerschel, 1995) :

$$U_{Keesom} = - \frac{2\mu_1^2 \mu_2^2}{3(4\pi\epsilon\epsilon_0)^2 K_B T l^6}$$

$\mu$  : Moment dipolaire

$K_B$  : Constante de Boltzmann ( $1,381.10^{-23} \text{JK}^{-1}$ )

$T$  : Température absolue

$\epsilon_0$  : Permittivité du vide

$\epsilon$  : Permittivité du milieu dans lequel les molécules évoluent

### III.1.2. Forces de Debye (Forces d'induction)

Décrites par Debye en 1920, elles impliquent les interactions entre un dipôle permanent et un dipôle induit. Un dipôle induit résulte de l'interaction entre un atome ou une molécule initialement non polarisée avec un champ électrique externe. En effet, tout atome ou molécule est plus ou moins polarisable en fonction de la capacité qu'ont les nuages électroniques à se déformer. Le champ externe responsable de l'induction peut provenir d'un rayonnement électromagnétique ou d'une molécule dipolaire.

L'énergie produite par les forces de Debye entre deux molécules séparées avec une distance  $l$  est :

$$U_{Debye} = - \frac{4\alpha\mu^2}{(4\pi\epsilon\epsilon_0)^2 l^6} \quad \begin{array}{l} \alpha: \text{Polarisabilité} \\ \mu: \text{Moment dipolaire} \end{array}$$

### III.1.3. Forces de London

Les forces de London, tirent leur nom du physicien germano-américain Fritz London qui formula mathématiquement en 1937 ces forces pour deux molécules identiques.

Ce sont des forces intermoléculaires faibles qui proviennent des forces attractives entre deux molécules non polaires. Les forces de London peuvent s'exercer entre deux molécules non polaires car les électrons se déplacent autour de la molécule. Il y a une forte probabilité que la densité d'électrons ne sera pas distribuée uniformément autour de la molécule ; lorsqu'une distribution non uniforme apparaît, un dipôle est créé. Ce dipôle peut alors interagir avec d'autres dipôles d'où une mise en phase globale entre nuages électroniques oscillants.

L'énergie produite par les forces de London pour deux molécules (1) et (2) séparées avec une distance  $l$  est :

$$U_{London} = -\frac{3\alpha_1\alpha_2 h\nu}{4(4\pi\epsilon\epsilon_0)^2 l^6}$$

$h$  : constante de Planck  
 $\alpha$  : Polarisabilité  
 $\nu$  : Fréquence de dispersion.

Au niveau macroscopique les trois forces interfaciales de van der Waals sont regroupées sous le terme d'interactions de Van der Waals (lifshitz, 1955). Ainsi elles peuvent agir à des distances supérieures à 50 nm et décroissent à une distance inférieure à 10 nm

### III.2. Les interactions électrostatiques

Une particule, bactérie ou surface plane immergée dans un fluide, acquiert une charge de surface par le fait de l'adsorption ou l'ionisation des groupements présents à sa surface (James, 1991). Cette adsorption et cette ionisation dépendent du pH du milieu. Pour un pH neutre, la plupart des corps solides (microorganismes) portent une charge négative.

L'immersion dans un milieu aqueux facilite la redistribution des ions. Les ions de même signe (co-ions) seront repoussés de la surface tandis que les ions chargés positivement (contre-ions) seront attirés. Cet effet crée deux couches électriques de part et d'autre d'un plan nommé « plan d'Helmoltz ».

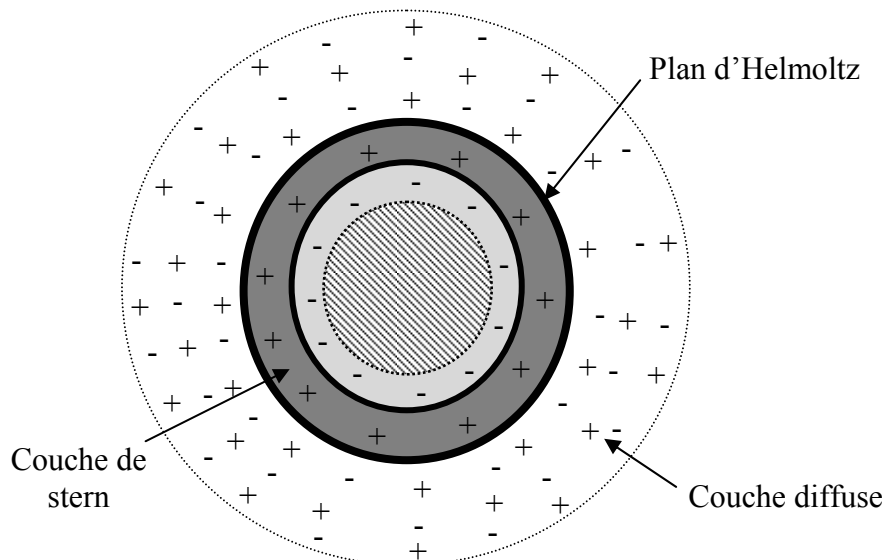
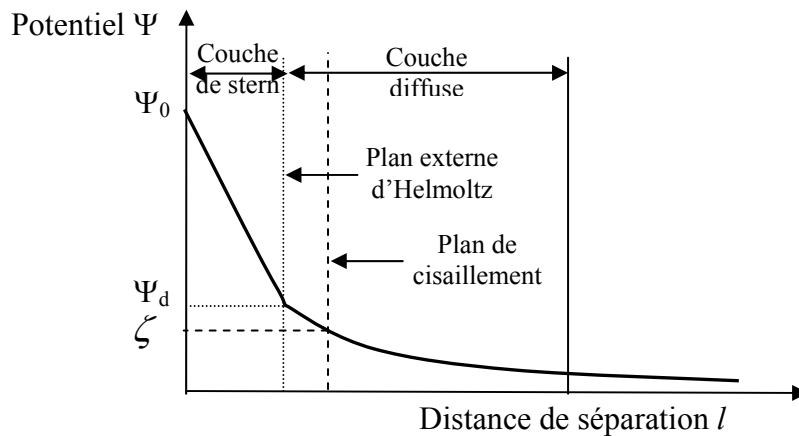


Figure 6 : Représentation de la double couche électrique. (Van Loosdrecht, 1987).

La première couche compacte appelé couche de stern est constituée de contre-ions fortement adsorbés à la surface, dans cette région le potentiel  $\Psi$  diminue linéairement avec la distance de séparation entre la surface et la couche :



**Figure 7 : Schéma de la variation du potentiel avec la distance à la surface** (d'après James, 1991).

La seconde couche est une couche diffuse s'étendant jusqu'au sein de la solution dans laquelle l'agitation thermique permet le mouvement continu des ions. Dans cette couche, l'excès de contre-ions diminue quand la distance augmente à partir de la surface chargée, jusqu'à ce que l'équilibre ionique de la phase aqueuse soit atteint. Dans la couche diffuse, le potentiel  $\Psi$  diminue d'une manière exponentielle avec la distance.

$$\psi = \psi_d \exp^{-\kappa l}$$

$\psi_d$  est le potentiel au plan externe d'Helmoltz et  $\kappa$ , l'inverse de l'épaisseur de la double couche ionique ; c'est une fonction croissante de la force ionique donnée par l'expression suivante :

$$\kappa^2 = \frac{e^2}{\epsilon\epsilon_0 K_B T} \sum_i Z_i^2 C_i$$

$\epsilon$  : constante diélectrique du milieu

$\epsilon_0$  : permittivité du vide

$e$  : charge de l'électron

$K_B$  : constante de Boltzmann

$T$  : température absolue

$Z$  : valence des espèces ioniques

$C$  : concentration des différentes espèces ioniques (i) présentes dans la solution

Pour de fortes concentrations en électrolytes, l'épaisseur de la double couche est faible et les interactions électrostatiques liées au recouvrement de cette double couche seront faibles. L'effet des charges de surface est masqué. Le phénomène inverse est observé dans des solutions faiblement chargées. Le pH du milieu, par son influence sur le nombre de groupements associés présents sur les surfaces, intervient également dans la valeur des interactions électrostatiques.

Le potentiel zêta ( $\zeta$ ) est le potentiel mesuré au plan de cisaillement, situé dans la couche diffuse et au voisinage de la couche stern. La localisation exacte de ce plan a fait l'objet de nombreuses discussions et est encore inconnue. Généralement on considère que ce plan se situe au-delà du plan externe d'Helmoltz et que  $\zeta$  est inférieur à  $\psi_d$ . Le potentiel zêta ne peut être mesuré directement, il est déterminé à partir de mesures électrocinétiques.

L'énergie d'interaction électrostatique ( $G_E$ ) est exprimée en fonction de la distance ( $l$ ) séparant le substrat (S) de la bactérie (B) (supposée sphérique et de rayon  $a$ ) par la relation suivante (Visser, 1976) :

$$G_E = \pi \epsilon \epsilon_0 a (\psi_B^2 + \psi_S^2) \left( \frac{2\psi_B \psi_S}{\psi_B^2 + \psi_S^2} \operatorname{Ln} \left[ \frac{1 + \exp^{-\kappa l}}{1 - \exp^{-\kappa l}} \right] \right) + \operatorname{Ln} [1 + \exp^{-2\kappa l}]$$

Cette équation prévoit :

Si  $\psi_B$  et  $\psi_S$  sont de même signe,  $G_E$  est positive, il y a alors répulsion entre les deux corps.

Si  $\psi_B$  et  $\psi_S$  sont de signe opposé,  $G_E$  est négatif et il y a attraction entre la bactérie et le substrat.

Les interactions électrostatiques qui apparaissent entre la surface des microorganismes et la surface réceptrice sont dues au recouvrement des couches associées aux groupes chargés présents à la surface de la cellule microbienne et à ceux de la surface réceptrice (Rutter, 1980). Cette interaction est répulsive lorsque les deux corps portent des groupes chargés de même signe et attractive dans le cas contraire.



### III.3. Les interactions polaires

Ces interactions restent les plus mal comprises d'un point de vue théorique ; ce sont les interactions que l'on trouve en milieu aqueux, et qui décroissent de façon exponentielle en fonction de la distance. Elles concernent principalement l'interaction entre donneur et accepteur d'électrons (ou entre donneur et accepteur d'hydrogène selon Bronsted) (van Oss, 1996 ; Hamadi, 2005).

#### III.3.1. Liaisons hydrogène

La liaison hydrogène est une interaction de nature électrique entre atomes électronégatifs (O, Cl, F, N...) et atomes d'hydrogène liés à un atome électronégatif. Un composé donné peut être hydrophile, c'est-à-dire capable d'intervenir avec des liaisons hydrogène. Il existe différents degrés dans ce caractère, ce qui se traduit par l'existence d'interactions hydrophiles et hydrophobes plus ou moins importantes (Vergnault, 2004).

#### III.3.2. Répulsion hydrophile et interactions hydrophobes

Les interactions hydrophiles et hydrophobes sont toutes les deux dues à une restructuration des molécules d'eau au voisinage des surfaces respectivement hydrophiles ou hydrophobes. Cependant aucune approche théorique satisfaisante expliquant l'origine de ces deux forces n'est disponible dans la littérature (Israelachvili, 1991 ; Vergnault, 2004 ; Vivares, 2003)

Les surfaces hydrophiles représentent celles ayant plus d'affinité pour l'eau qu'entre elles, ce qui se traduit par l'existence d'une couche d'eau liée à la surface et organisée en réseau (Vivares, 2003; Vergnault, 2004).

Quand les deux surfaces hydratées s'approchent l'une de l'autre, la présence de cette eau liée induit une énergie de répulsion hydrophile (nommées également forces de solvation ou d'hydratation),  $\Delta G^{AB}$ , positive. Cette répulsion hydrophile est fonction de la nature des particules et de leur distance de séparation  $d$ . Elle varie avec  $d$  selon une loi exponentielle et est effective à des distances de l'ordre de 3 à 5 nm.

Les surfaces ayant peu d'affinité pour l'eau sont dites hydrophobes, Autour de ces surfaces, l'eau va s'organiser d'une façon défavorable d'un point de vue entropique (plus ordonnée que dans la masse de la phase aqueuse). Elle va donc tendre à se dissocier de ce type de surface, ce qui se traduit par une énergie d'attraction hydrophobe (due aux interactions de van der Waals de type dipôle induit/dipôle induit : forces de London),  $\Delta G^{AB}$ , négative. Cette attraction hydrophobe est également fonction de la nature des colloïdes et de leur distance de séparation

$d$  et elle varie avec  $d$  selon une loi exponentielle. Mais cette interaction est effective à des distances de l'ordre de 10 nm et plus (Vergnault, 2004).

Selon la théorie développée par van Oss (1996), dans le cas de particules hydrophiles, il est possible de distinguer celles qui ont des propriétés de surface acide ou basique au sens de Lewis, c'est-à-dire respectivement accepteur ou donneur d'électrons.

## IV. Modèles théoriques prédictifs de l'adhésion

### IV.1. Approche de l'adhésion par la théorie classique DLVO

Ce premier modèle fut développé par Derjaguin & Landau (1941) et par Verwey & Overbeek (1948). C'est la première théorie de la stabilité de l'état colloïdal.

L'adhésion microbienne était décrite comme un équilibre entre les interactions attractives de Lifshitz-van der Waals et les interactions électrostatiques répulsives ou attractives. Selon cette théorie, l'énergie libre d'interaction totale  $G_T$  entre deux corps séparés par la distance  $d$  est la somme de l'énergie d'attraction due aux forces de London –Van der Waals  $G_V$  et de l'énergie de répulsion  $G_E$ :

$$G_T = G_V + G_E$$

L'énergie d'interaction dépend de la géométrie des entités qui interagissent entre elles. Si l'on considère une particule sphérique de rayon  $a$  située à une distance  $l$  du substrat, le potentiel de van der Waals s'écrit alors :

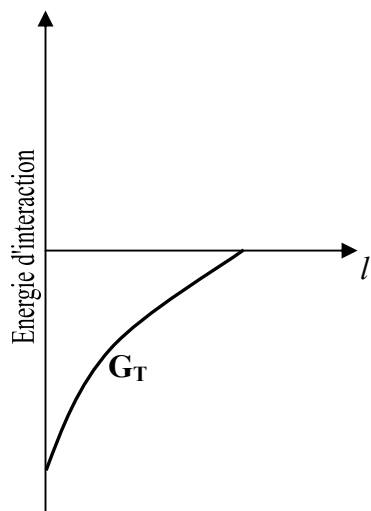
$$G_V = -\frac{A}{6} \left[ \frac{a}{l+2a} + \frac{a}{l} + \ln\left(\frac{l}{l+2a}\right) \right]$$

$A$  est la constante d'Hamaker, elle est fonction des constantes diélectriques et des indices de réfraction du milieu et de la particule.

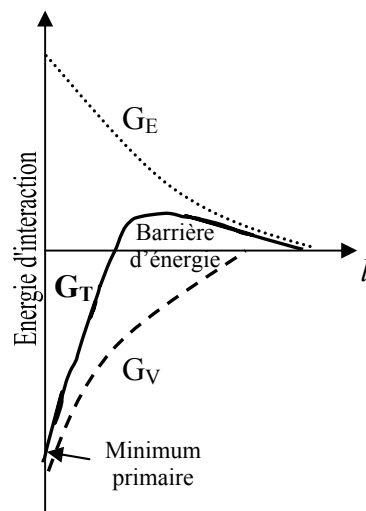
Cette équation peut être simplifiée pour une faible distance de séparation ( $l \ll a$ ) :

$$G_v = -\frac{Aa}{6l}$$

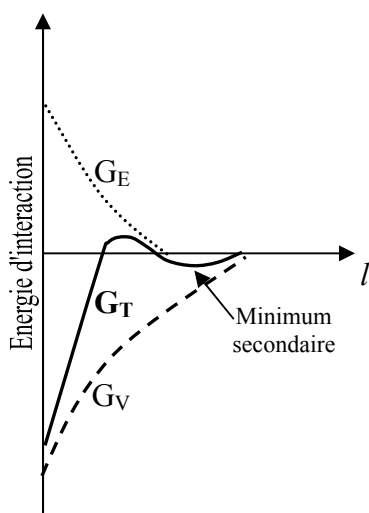
L'énergie d'attraction de van der Waals n'est pas influencée par la force ionique, par contre les interactions électrostatiques diminuent avec l'augmentation de la force ionique (Bos *et al.*, 1999). Par conséquent l'énergie d'interaction totale est influencée par la force ionique (Figure 8).



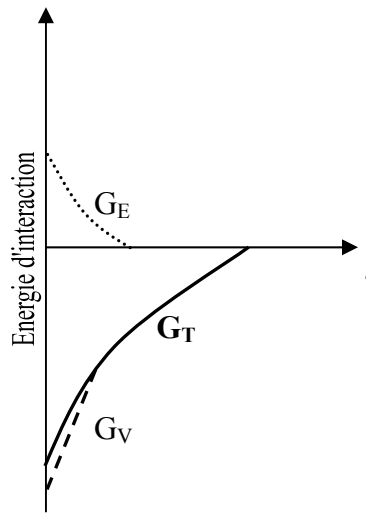
**a) Particule et surface portent des charges opposées**



**b) Particule et surface sont de mêmes signes et Concentration en électrolyte faible**



**c) Particule et surface sont de mêmes signes et Concentration en électrolyte moyenne**



**d) Particule et surface sont de mêmes signes et Concentration en électrolyte élevée**

**Figure 8 : Energie d'interaction totale d'après DLVO selon la concentration du milieu en électrolytes.**

Lorsque les deux surfaces portent des charges de signes contraires, il y a toujours attraction, quelque soit la distance  $l$ ,  $G_T$  étant négatif (Figure 8-a). Alors que lorsque les deux surfaces portent des charges de même signe, plusieurs cas se présentent :

- Pour des concentrations en électrolyte faibles (inférieures à  $10^{-4}$  mol/l) l'épaisseur de la double couche ionique  $\kappa^{-1}$  est importante et il existe une barrière d'énergie de répulsion, la

particule est donc repoussée et ne peut se stabiliser aux abords de la surface réceptrice. L'énergie exigée par la cellule pour traverser cette barrière et s'approcher de la surface est forte (Figure 8-b).

- Pour des concentrations intermédiaires en électrolytes ( $10^{-4}$  à  $10^{-1}$  mol/l),  $G_T$  est inférieure à 0 pour des distances importantes ( $\geq 6$ nm), l'énergie d'interaction électrostatique  $G_E$  étant nulle, les forces d'interactions sont essentiellement de type van der Waals, ce qui permet à la bactérie de s'immobiliser temporairement aux abords de la surface dans une zone appelée minimum secondaire. La barrière d'interaction subsiste mais, étant condensée (Figure 8-c), une certaine fraction des collisions particule – surface permet aux particules de franchir la barrière et donc de s'immobiliser dans cette zone. L'adhésion demeure réversible, et  $G_T$  devient positive pour des distances plus faibles, la bactérie ne pouvant pas entrer en contact intime avec la surface. Une adhésion irréversible peut néanmoins se produire grâce aux *pilis* ou par la sécrétion de molécules de petite taille pouvant franchir cette barrière de répulsion.

- Pour une concentration ionique élevée, l'épaisseur de la double couche est faible,  $G_E$  est nulle au delà de 2 nm et il n'y a plus de barrière énergétique d'interaction (Figure 8-d). Toutes les collisions particule/surface conduisent à l'établissement d'un contact permanent irréversible. Ceci permet aux particules de s'immobiliser dans la zone nommée minimum primaire.

Généralement les microorganismes et les surfaces solides immergées sont chargés négativement (Van Loosdrecht *et al.*, 1987c ; Busscher *et al.*, 1990). Dans ce cas, quelque soit la concentration en électrolyte du milieu de suspension, les microorganismes ayant une taille importante rencontrent une barrière d'énergie répulsive élevée à faible (5nm) distance de la surface qui les empêchera d'adhérer dans le minimum primaire situé à moins de 3 nm de la surface, mais ils peuvent se positionner dans la zone de minimum secondaire. Lorsque les cellules ont adhéré réversiblement, elles peuvent encore être affectées par le mouvement brownien (Marshall *et al.*, 1971). Par contre l'adhésion irréversible diminue ce mouvement et les cellules paraissent immobiles. L'énergie qui pousse les microorganismes du minimum secondaire au minimum primaire peut être fournie par le mouvement brownien ou bien les cellules peuvent posséder une énergie thermique suffisante pour traverser la barrière (Marshall *et al.*, 1971 ; Van Loosdrecht *et al.*, 1989).

La théorie DLVO prend en considération les interactions à longue distance et met en évidence le rôle des interactions électrostatiques, mais néglige les interactions à courte distance (forces de Keesom et Debye et les interactions acide base) qui sont généralement prédominantes dans les milieux aqueux et jouent un rôle très important dans l'adhésion microbienne. Cette théorie permet de décrire qualitativement l'adhésion des microorganismes mais ne peut pas donner des renseignements quantitatifs sur ce phénomène.

## IV.2. Théorie de DLVO développée par van Oss (XDLVO)

La théorie DLVO propose une base théorique pour la compréhension de l'adhésion microbienne mais présente plusieurs limitations du fait qu'elle ne prend en considération que les interactions liées aux forces de Lifshitz van der Waals et les interactions électrostatiques. Cette théorie a été étendue par van Oss *et al.* (1986) afin de prendre en compte l'ensemble des interactions, notamment les interactions polaires et leur décroissance avec la distance de séparation.

La variation de l'énergie libre d'interaction totale  $\Delta G^T$  entre deux particules colloïdales est alors la somme des énergies libres liées aux forces électrostatiques  $\Delta G^{El}$  et non électrostatiques  $\Delta G^{nonEl}$ , ces dernières comprenant une composante polaire  $\Delta G^{AB}$  et une composante apolaire  $\Delta G^{LW}$  (interaction de Lifshitz van der Waals). Elle sera fonction des propriétés de surface des colloïdes (charge, caractère hydrophobe/hydrophile) et de leur géométrie ainsi que des propriétés du milieu (pH, force ionique).

$$\Delta G^T = \Delta G^{El} + \Delta G^{nonEl} = \Delta G^{El} + \Delta G^{LW} + \Delta G^{AB}$$

Le second principe de la thermodynamique prévoit que l'adhésion aura lieu si la variation d'énergie libre  $\Delta G$  du système est négative.

D'après l'équation de Dupré (Dupré, 1869), l'énergie libre d'interaction entre deux matériaux  $i$  et  $j$  est fonction des énergies interfaciales entre  $i$  et  $j$  ( $\gamma_{ij}$ ), et des tensions de surface de  $i$  et de  $j$  ( $\gamma_i$  et  $\gamma_j$ ) par l'équation :

$$\Delta G_{ij} = \gamma_{ij} - \gamma_i - \gamma_j$$

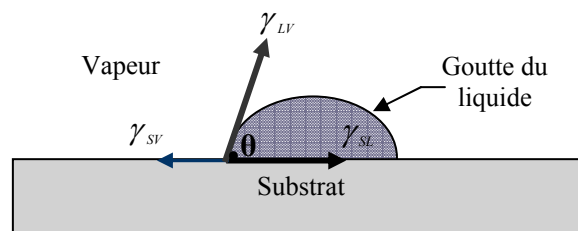
Cette équation signifie que l'énergie libre (ou travail) nécessaire pour mettre en contact deux surfaces  $i$  et  $j$  est équivalente à l'énergie associée à la création d'une interface moins l'énergie nécessaire à la création de deux surfaces  $i$  et  $j$ .

D'après van Oss (1996), l'énergie interfaciale non électrostatique est la somme des énergies interfaciales liées aux forces de Lifshitz-van der Waals et des énergies interfaciales polaires (acide/base de Lewis), ces dernières pouvant être décomposées en 2 termes non additifs : une composante donneur d'électrons et une composante accepteur d'électrons. Ainsi l'énergie libre non électrostatique s'écrit :

$$\Delta G_{ij}^{AB} = -2(\sqrt{\gamma_i^+ \cdot \gamma_j^-} + \sqrt{\gamma_i^- \cdot \gamma_j^+}) \text{ avec } \Delta G_{ij}^{nonEl} = \Delta G_{ij}^{LW} + \Delta G_{ij}^{AB}$$

$$\text{et } \begin{cases} \Delta G_{ij}^{AB} = -2(\sqrt{\gamma_i^+ \cdot \gamma_j^-} + \sqrt{\gamma_i^- \cdot \gamma_j^+}) \\ \Delta G_{ij}^{LW} = (\sqrt{\gamma_i^{LW}} - \sqrt{\gamma_j^{LW}})^2 \end{cases}$$

L'énergie libre de surface d'un liquide correspond à sa tension de vapeur superficielle et est facilement mesurable (Bellon-Fontaine & Vernhet, 1999), contrairement à celle des solides et des microorganismes. Des méthodes de mesure d'angle de contact ( $\theta$ ) formé par une goutte de liquide (L) de tension superficielle connue, déposée sur une surface solide (S) ou un tapis de microorganismes (M), permettent de l'approcher (Busscher *et al.*, 1990 ; van Oss, 1996 ; Bellon-Fontaine & Vernhet, 1999 ; Bos *et al.*, 1999) grâce à l'équation de Young (Young, 1805).



**Figure 9 : Profil d'une goutte déposée sur un substrat d'après YOUNG.** La goutte en état d'équilibre avec sa vapeur saturante sur une surface lisse, va prendre spontanément la forme d'une calotte sphérique et formera un angle  $\theta$  avec ce substrat

$\gamma_{sv}$  : La tension superficielle du solide en présence de la vapeur du liquide, peut être réduite à l'énergie de surface du solide  $\gamma_s$  dans le vide (ou l'air) suite à l'adsorption de vapeur du liquide selon van Oss

$\gamma_{sl}$  : L'énergie libre interfaciale entre le solide et le liquide

$\gamma_{lv}$  : La tension superficielle du liquide en présence de sa vapeur, elle peut être réduite à  $\gamma_L$

$\theta$  : L'angle de contact

L'équation de Young permet de relier l'angle de contact  $\theta$  avec les différentes composantes :

$$\gamma_{SL} = \gamma_S - \gamma_L \cos \theta \quad (1)$$

Le travail d'adhésion réversible entre le solide et le liquide correspond au travail qu'il faut fournir pour séparer une unité d'aire de l'interface solide/liquide en interface solide vapeur et liquide/vapeur. Cette valeur est donnée par la relation de Dupré :

$$W_{SL} = \gamma_S + \gamma_L - \gamma_{SL} \quad (2)$$

En combinant les équations (1) et (2), l'équation de Young-Dupré est obtenue (3), qui permet de déterminer les propriétés de surface d'un solide (ou d'un microorganisme) ( $\gamma_s^+$ ,  $\gamma_s^-$  et  $\gamma_s^{LW}$ ), à partir de la mesure d'angles de contact de 3 liquides dont on connaît les caractéristiques polaire ( $\gamma_l^+$  et  $\gamma_l^-$ ), et apolaire ( $\gamma_l^{LW}$ ) avec ce solide :

$$W_{SL} = \gamma_L (1 + \cos \theta) = 2 \cdot (\sqrt{\gamma_S^{LW} \cdot \gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_S^+ \cdot \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_S^- \cdot \gamma_L^+}) \quad (3)$$

Dans le cas d'un microorganisme (M) en présence d'une surface (S) dans un liquide (L),

l'équation de Dupré devient :  $\Delta G_{MLS} = \gamma_{MS} - \gamma_{ML} - \gamma_{SL}$

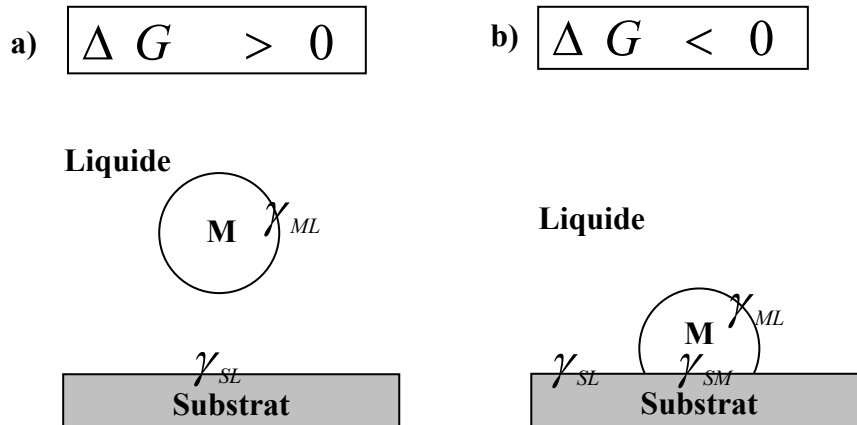
Il est alors possible d'exprimer l'interaction entre le microorganisme et la surface solide immergée dans un liquide, en tenant compte des interactions de Lifshitz-van der Waals et des interactions polaires :

$$\Delta G_{MSL}^{nonEl} = \Delta G_{MSL}^{LW} + \Delta G_{MSL}^{AB}$$

$$\text{Où : } \Delta G_{MSL}^{AB} = 2[\sqrt{\gamma_L^+}(\sqrt{\gamma_M^-} + \sqrt{\gamma_S^-} - \sqrt{\gamma_L^-}) + \sqrt{\gamma_L^-}(\sqrt{\gamma_M^+} + \sqrt{\gamma_S^+} - \sqrt{\gamma_L^+}) - \sqrt{\gamma_1^+ \gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^- \gamma_2^+}]$$

$$\text{et } \Delta G_{MSL}^{LW} = 2(\sqrt{\gamma_L^{LW}} - \sqrt{\gamma_M^{LW}})(\sqrt{\gamma_S^{LW}} - \sqrt{\gamma_L^{LW}})$$

Selon la composante de l'énergie totale considérée, le second principe de la thermodynamique prévoit que l'adhésion sera favorisée dans le cas où elle est négative et défavorisée dans le cas contraire.



**Figure 10 : Approche thermodynamique d'adhésion.** a) adhésion défavorable b) adhésion favorable.

L'approche thermodynamique selon le modèle de van Oss, qui appréhende le processus d'adhésion sous un angle strictement thermodynamique (Absolom *et al.*, 1983 ; Busscher *et al.*, 1984a ; Weerkamp *et al.*, 1985 ; van Oss, 1996) a pu être corrélée avec des résultats expérimentaux (Asther *et al.*, 1990 ; Vernhet, 1992 ; Busscher *et al.*, 1990 ; Boulangé-Petermann *et al.*, 1993 ; Gallardo-Moreno *et al.*, 2002; Bayouhd *et al.*, 2006). Mais dans certains cas elle ne permet pas d'expliquer les résultats d'adhésion (Sjollema *et al.*, 1990 ; McEldowney *et al.*, 1986).

## V. Facteurs influençant l'adhésion microbienne dans les réseaux d'eau potable

Etant donné l'importance du processus d'adhésion dans la formation du biofilm, il est nécessaire de connaître les paramètres qui l'influencent, afin de pouvoir chercher les mesures préventives à leur formation.

Ces paramètres peuvent se résumer en facteurs liés aux microorganismes, d'autres liés aux propriétés physico-chimiques (pH, température...) de l'eau potable, d'autres structuraux (nature du matériau de canalisation...) et hydrodynamiques (débits, régimes,...), d'autres qui se traduisent par la disponibilité en nutriments, et finalement, des facteurs liés à la présence de certains produits toxiques pour les bactéries, tels que les désinfectants. Dans ce chapitre, nous nous focaliserons sur les paramètres les plus fréquemment étudiés.

### V.1. Facteurs liés aux microorganismes

Selon qu'ils sont dotés ou non d'une mobilité grâce à des flagelles par exemple, l'adhésion des microorganismes aux supports inertes (comme expliqué dans I.1.2.) est favorisée ou non.



L'adaptabilité et la capacité des microorganismes à produire des EPS est également un facteur qui favorise leur adhésion aux supports, surtout durant les phases post-adhésion initiale gérées essentiellement par les interactions spécifiques (biologiques). La formation de ces EPS est généralement maximale pendant les périodes de stress (Bourion, 1995).

Les propriétés physico-chimiques de la paroi cellulaire (charge, caractère hydrophobe/hydrophile, acide ou basique) dépendent de la composition de la paroi cellulaire (Latrache *et al.*, 1993) et de leur métabolisme, celles-ci changeant en fonction des conditions de culture (température, composition du milieu nutritif...), le type de gram (+ ou -) de l'espèce bactérienne, et donc influencent l'adhésion bactérienne aux supports (Bellon-Fontaine & Cerf, 1991).

L'âge de la culture joue également un rôle important puisque Stanley (1983) a montré, en effet, que l'attachement de *P. aeruginosa* est meilleure en phase exponentielle de croissance par rapport à la phase stationnaire. Pareillement, Little *et al.* (1986) ont montré que *P. marina* est plus hydrophobe en phase stationnaire et adhère mieux durant cette phase par rapport à la phase exponentielle, le même résultat ayant été observé par Van Loosdrecht *et al.* (1987 et 1990) sur de nombreuses espèces bactériennes.

## **V.2. Facteurs liés aux propriétés et structure du réseau**

### ***V.2.1. Nature des matériaux***

On peut distinguer trois grands types classés selon la nature du matériau de fabrication de base: les matériaux ferreux (essentiellement fonte grise, fonte ductile et acier), plus propices à la corrosion, les bétons et ciments ainsi que les matériaux organiques (plastiques). Les canalisations en plomb et cuivre sont de moins en moins utilisées, et leur présence est actuellement restreinte aux anciens branchements entre les conduites principales du réseau public et les réseaux intérieurs aux immeubles. La réglementation de certains pays interdit même actuellement leur utilisation (Besner, 1999).

Les matériaux organiques (PVC, polyéthylène...) deviennent de plus en plus utilisés pour la fabrication de nouveaux réseaux ou la rénovation et le remplacement d'un ancien réseau (conduites métalliques, béton...) en raison des avantages que présentent leur facilité d'installation et de manipulation, leur durabilité (résistance à la corrosion) et leur faible coût. De tels matériaux sont utilisés depuis les années 1960, ce qui témoigne que leur durée de vie peut dépasser 40 ans (Besner, 1999). Cependant, certains matériaux organiques sont perméables à des molécules organiques telles que des solvants, des hydrocarbures, des phénols, ou des produits phytosanitaires, ce qui entraîne une contamination de l'eau et

constituent éventuellement (selon leur biodégradabilité) un apport de nutriments pour la flore bactérienne planctonique ou sessile. Des nutriments peuvent également provenir du relargage de composés de base existant dans la structure même du matériau, (adjuvants, impuretés présentes (Sadiki *et al.*, 1996).

L'adhésion bactérienne aux supports est fonction des propriétés physico-chimiques de ce dernier ; Kuhn *et al.* (2002) ont montré que l'adhésion de *C. albicans* était souvent importante sur des supports plastiques à caractère hydrophobe. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Gallardo Moreno *et al.* (2002) pour *Enterococcus faecalis* avec une adhésion plus importante sur le silicone comparé au verre. Quant à Reynolds & Fink (2001), ils avaient observé pour des supports hydrophobes, que les levures de boulangerie sont capables d'adhérer au polystyrène, au polypropylène et dans une moindre mesure au PVC. Chandra *et al.* (2001) ont même montré que la nature du support pouvait affecter la structure et l'organisation du biofilm formé. Lethola *et al.* (2004, 2005) ont montré que le biofilm formé sur des conduites de polyéthylène est plus important que le biofilm formé sur des conduites de cuivre.

### ***V.2.2. Diamètre des conduites***

Le diamètre d'une conduite peut affecter la formation des biofilms dans les conduites d'adduction d'eau potable en modifiant indirectement, pour un certain débit, la vitesse linéaire d'écoulement et donc les forces de cisaillement.

### ***V.2.3. Rugosité et stabilité du matériau***

La rugosité est un paramètre qui traduit l'importance de la surface de contact avec l'eau. Une forte rugosité augmente donc significativement les sites de fixation (microcrevasses) pour les microorganismes favorisant ainsi leur adhésion aux parois de conduites et les protégeant des phénomènes de cisaillement hydrodynamiques (van Loostrecht *et al.*, 1990 ; Bellon-Fontaine & Cerf, 1988,1991). Pour un matériau peu stable, les tubercules de corrosion (Figure 11) par exemple, peuvent constituer des sites préférentiellement colonisés par les bactéries. L'état de surface des conduites est fonction de leur âge. Le nombre de fuites et de bris dans un réseau augmente en général avec l'âge, ce qui constitue une source de contamination externe de microorganismes.



**Figure 11 : Echantillons d'eau prélevés sur des réseaux de distribution présentant des phénomènes d'eaux « rouges » ou d'eaux « noires » (Photo Houillon, 1995)**

#### ***V.2.4. Temps de séjour et vitesse d'écoulement***

La conservation de la qualité de l'eau est d'autant plus aisée que le temps de séjour dans le réseau est court. Le temps de séjour moyen dans le réseau peut être de l'ordre de quelques jours, mais certains volumes d'eau peuvent stagner plus d'une dizaine de jours dans des zones du réseau où l'écoulement est faible ou bien quand la demande en eau est quasiment nulle (en périodes de vacances par exemple). Une brusque augmentation de la vitesse d'écoulement peut entraîner l'arrachage du biofilm et par conséquent une détérioration transitoire mais importante de la qualité de l'eau dans les réseaux (Besner, 1999).

Des études ont montré que la stagnation ou les faibles vitesses d'écoulement favorisent la corrosion et les dépôts de biofilms ou d'un film conditionnant par adsorption de macromolécules ce qui peut conduire à la modification des propriétés de surface du support, et, par conséquent, favoriser la bioadhésion sur les surfaces des conduites. Tricard *et al.* (1995) ont montré que ces dépôts apparaissent dès que le débit de l'eau est inférieur à  $0,01 \text{ m.s}^{-1}$  et disparaissent au-delà de  $0,1 \text{ m.s}^{-1}$ . Toutefois, pour un biofilm formé, un écoulement turbulent est également bénéfique en favorisant le transport des éléments nutritifs et des microorganismes (Characklis, 1984). Ceci permet le renouvellement du milieu et l'amélioration de la stabilité du biofilm (Carpentier & Cerf, 1993).

### V.3. Facteurs liés aux propriétés physico-chimiques du milieu

#### V.3.1. pH

Dans un réseau, le pH peut varier au cours de la distribution du fait d'une évolution de la concentration du CO<sub>2</sub> dissous (augmentation par aération dans le réservoir par exemple). L'adhésion bactérienne au support est fortement influencée par le pH (Gordon *et al.*, 1981). Plusieurs essais en laboratoire ont prouvé que la majorité des bactéries se développent mieux à pH neutre ou légèrement alcalin (Bornet, 1989). Balebona *et al.* (1995) avaient également observé que *Sparus aurata* adhérait mieux au verre à des pH basiques (pH d'eau de mer 8,2-8,5) qu'aux pH acides. Stanley (1983) avait montré que la fixation des bactéries peut varier selon le pH et qu'elle est généralement maximale à l'optimum métabolique. Le pH du milieu environnant modifie la charge de surface des microorganismes ainsi que celle des supports solides suite au déplacement des équilibres d'ionisation (protonation/déprotonation) des groupements fonctionnels exposés selon leur pKa (Wu *et al.*, 1994, Hamadi *et al.*, 2004, Gaboriaud *et al.*, 2006) ce qui peut avoir comme conséquence une réduction ou une augmentation des interactions électrostatiques répulsives défavorables à l'adhésion.

#### V.3.2. Espèces ioniques dissoutes

De nombreux auteurs ont montré que les espèces ioniques dissoutes, de par leur nature ainsi que par leur concentration, affectent considérablement la bioadhésion des microorganismes aux supports (Busalmen & Sanchez, 2001 ; Hamadi *et al.*, 2004 ; Bayouhd *et al.*, 2006 ; Gaboriaud *et al.*, 2006) puisqu'ils jouent un rôle important aussi bien sur leur croissance, en leur offrant les éléments indispensables à leur métabolisme (sodium, potassium, magnésium, chlore...), que sur les propriétés de surface : en effet, la présence d'espèces ioniques peut modifier les propriétés de surface, que se soit celle des microorganismes ou des support solides. A titre d'exemple, Mozes *et al.* (1987) rapportent que l'adhésion de *S. cerevisiae* sur le verre et sur des surfaces en plastique (polypropylène, polystyrène, PVC et PMMA) est augmentée en présence d'ions ferriques, ce qui a été expliqué par le masquage des charges négatives exposées sur les surfaces et ayant comme conséquence la réduction des interactions électrostatiques répulsives. Bellon-Fontaine & Cerf (1991) ont montré également que l'adhésion est favorisée en présence de cations mono, di ou trivalents tels que Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> ou Al<sup>3+</sup>.

### ***V.3.3. Température***

Les variations saisonnières de température affectent la formation des biofilms dans les réseaux de distribution, surtout quand l'eau est d'origine superficielle, puisque pour des températures éloignées de l'optimum, la vitesse de multiplication des microorganismes est ralentie (Guillemot, 2006). Sur certains réseaux, en climat tempéré, le nombre de coliformes, par exemple, varie de façon saisonnière dans des réseaux de distribution: l'activité bactérienne s'accroît nettement lorsque la température dépasse 15°C, les plus hauts niveaux étant observés durant les mois d'été (Besner, 1999). La température est importante non seulement parce qu'elle affecte l'activité métabolique et enzymatique des bactéries, mais aussi parce qu'elle influence certains paramètres physico-chimiques (pH, activité ionique, agitation thermique et solubilité des gaz) (Marsh & Martin, 1992 ; Briandet *et al.*, 1999 ; Gallardo-Moreno *et al.*, 2002 ; Cappello *et al.*, 2006) ainsi que les propriétés de surface des microorganismes. Cappello *et al.* (2006) ont observé par exemple qu'une élévation de la température de culture provoque une augmentation de la capacité d'adhésion de *P. aeruginosa* au polystyrène de par l'augmentation de l'hydrophobicité de sa surface.

### **V.4. Nutriments**

La biodisponibilité des nutriments est un des facteurs clés qui détermine la reviviscence des bactéries susceptibles de former un biofilm dans les réseaux de distribution d'eau potable.

Il est démontré théoriquement que la formule chimique d'une bactérie est approximativement égale à  $C_5H_7NO_2P_{0,03}$  (Van Der Kooij *et al.*, 1982) ; il en découle que pour qu'une bactérie puisse se développer, elle doit trouver chacun des constituants de sa formule chimique dans le réseau avec un rapport théorique voisin de 100C/10N/1P (Van Der Kooij *et al.*, 1982). L'adsorption de nutriments sur les parois de canalisations peut constituer un film organique primaire qui modifie les propriétés de surface du support et favorise la croissance des microorganismes (Rubio, 2002 ; McFeters *et al.*, 1984). C'est notamment le cas des surfaces plastiques et d'élastomères tels que le polyéthylène, l'éthylène-propylène ou le latex (Rogers *et al.*, 1991). Chamberlain (1992) avait montré que des surfaces de propriétés physico-chimiques initialement différentes deviennent similaires après adsorption de matières organiques.

#### ***V.4.1. Sources de carbone organique***

Les sources de carbone organique sont essentielles pour la prolifération bactérienne (Little *et al.*, 1986); c'est un facteur primordial dans la maîtrise de la qualité microbiologique de l'eau

dans le réseau, puisque la consommation de matière organique est généralement suivie d'un accroissement de la densité bactérienne présente au sein du biofilm (population sessile), tout comme dans l'eau circulante (population planctonique).

La matière organique présente dans l'eau potable est constituée d'une fraction particulaire et d'une fraction dissoute. Cette dernière est composée des molécules organiques provenant de la décomposition d'organismes morts et/ou de végétaux, et de microorganismes, comme les bactéries.

Le terme de biodégradabilité définit les propriétés de certaines molécules à être dégradées (métabolisées) en éléments plus simples, notamment par les microorganismes. Les mesures de carbone organique dissous biodégradable (CODB) et de carbone organique assimilable (COA) permettent de savoir si une eau va favoriser ou non le développement de microorganismes (Sibille, 1998) :

- Le carbone organique dissout biodégradable (CODB) représente la fraction de carbone organique dissous (COD) qui est à la fois minéralisée et assimilée par les bactéries hétérotrophes. Il est déterminé par différence entre la concentration initiale en COD et la concentration minimale en COD observée pendant une période d'incubation de 28 jours (Joret *et al.*, 1986 ; Servais *et al.*, 1987). Le CODB représente de 10 à 30% du COD contenu dans l'eau potable (Joret *et al.*, 1991). La stabilité biologique est associée à une non-consommation du CODB au cours de la distribution.
- Le COA représente la fraction de carbone organique total (0,1 à 0,9%) facilement assimilable par les bactéries et convertie en biomasse cellulaire (Van der Kooij, 1990). La méthode de mesure du COA utilise *Pseudomonas fluorescens* et *Spirillum*, bactéries indigènes des réseaux de distribution. La concentration en COA est calculée par comparaison du nombre de cellules incubées dans un milieu contenant des composés organiques à des concentrations standard (acétate) et le nombre de cellules incubées dans les échantillons d'eau potable (Van der Kooij, 1982; Kaplan *et al.*, 1993).

Le taux moyen de CODB et de COA, dans l'eau potable, dépend de la source d'alimentation. Ainsi, l'eau potable provenant d'eaux de surface présente un taux de CODB et COA plus important que l'eau provenant d'une source souterraine.

#### ***V.4.2. Sources d'azote***

L'azote est utilisable par les microorganismes sous ses formes ammoniacale et organique. L'azote ammoniacal n'est pas détecté dans l'eau d'alimentation traitée au point critique par le chlore afin d'éliminer toute trace d'ammoniac. L'azote organique y est détecté à des concentrations allant de 0,1 à 0,2 mg/l (Donlan & Pipes, 1988 ; Haudidier *et al.*, 1988). Les sources d'azote organique sont les acides aminés (10%), les protéines (10%), les chlorophylles (1%), et les substances humiques (40%) (Lecloirec *et al.*, 1983). Les bactéries hétérotrophes incorporent principalement les groupements aminés de ces composés organiques (R-NH<sub>2</sub>) sous forme ammoniacale après désamination (Leclerc, 1975).

#### ***V.4.3. Sources de phosphore***

Le phosphore est incorporé dans les cellules bactériennes sous forme de phosphate inorganique (Leclerc, 1975). Le phosphate est présent dans l'eau sous forme insoluble et/ou organique. Les microorganismes (*Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus*) solubilisent les phosphates en sécrétant toutes sortes d'acides organiques ou produisent (*Bacillus*) des phosphatases pour libérer les phosphates inorganiques (Florentz *et al.*, 1987). La concentration en P-phosphates varie dans les réseaux de 0,01 à 0,5 mg/l (van der Kooij *et al.*, 1982 ; Donlan & Pipes, 1986 ; Haudidier *et al.*, 1988). L'addition de phosphore à l'eau potable augmente fortement la croissance des bactéries hétérotrophes pour les eaux produites à partir d'eaux superficielles ou souterraines (Chandy *et al.*, 2001).

### **V.5. Désinfection**

#### ***V.5.1. Définition***

La NF T 72.101 (AFNOR 1981) définit la désinfection en tant qu'opération, au résultat momentané, permettant d'éliminer ou de tuer les microorganismes et/ou d'inactiver les virus indésirables portés par des milieux inertes contaminés, en fonction des objectifs fixés. Le résultat de cette opération est limité aux microorganismes présents au moment de l'opération.

Le traitement de l'eau par un désinfectant a pour but de la rendre potable du point de vue bactériologique, il n'a jamais pour but de détruire tout les organismes vivants dans l'eau, mais plutôt de garantir l'absence de tout germe infectieux et de mettre hors risque de contamination un point d'eau ou un système de distribution ayant subi une pollution. Théoriquement, la gamme des moyens techniques pour réaliser cette opération est relativement étendue ; elle va des techniques chimiques utilisant des réactifs oxydants (chlore, brome, ozone) ou la

floculation à pH élevé (eaux usées) aux moyens physiques (rayonnement UV...). Pratiquement, ce sont les procédés chimiques et plus particulièrement le chlore qui sont les plus utilisés car ce sont eux qui associent une sécurité satisfaisante et une plus grande efficacité de mise en œuvre (Rodier *et al.*, 1996).

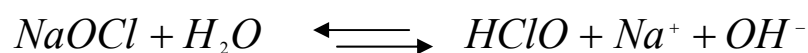
Le groupe des dérivés chlorés (Bornert, 1989 ; Bourion, 1995) se présente sous des formes très variées ; ce sont les désinfectants les plus communément utilisés dans les industries agro-alimentaires, car ils présentent beaucoup d'avantages :

- ❖ Spectre d'activité étendu (bactéries Gram+ et Gram-, spores, nématodes, protozoaires, algues, virus et dans une moindre mesure levures et moisissures)
- ❖ Faible coût
- ❖ Efficacité accrue avec la température et efficacité à froid
- ❖ Bonne rinçabilité (peu moussant)

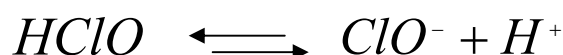
Les composés chlorés les plus connus sont :

- ❖ L'hypochlorite de sodium (eau de Javel)
- ❖ L'hypochlorite de calcium
- ❖ Les chloramines
- ❖ Les désinfectants chlorés granulaires et notamment les acides chlorocyanuriques
- ❖ Le dioxyde de chlore.

- Les solutions concentrées d'hypochlorite sont inefficaces aux pH auxquels elles sont stockées (au dessus de pH 10). C'est par dissolution dans l'eau que se produit une chute de pH et la libération d'acide hypochloreux (le principe actif) selon la formule suivante :



La réaction peut se poursuivre en milieu alcalin pour la libération des ions hypochlorites (ClO<sup>-</sup>) :

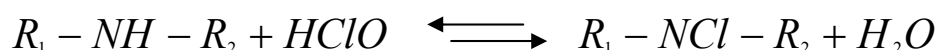


En fonction du pH on retrouve donc ces trois espèces.

La dissociation de l'acide hypochloreux est minimale et l'activité antibactérienne maximale, pour un pH voisin de 5. Cependant ces produits s'emploient en milieu alcalin (pH supérieur à 8) de manière à limiter les risques de corrosion.

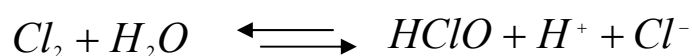


L'acide hypochloreux atteint de multiples cibles : après rupture de la paroi cellulaire, il pénètre dans les cellules où il agit par oxydation irréversible du matériel cellulaire et notamment des groupements thiols libres des enzymes (d'où blocage des réactions métaboliques). D'autres part, il se produit une chloration des groupements aminés des protéines qui aboutit à la formation de chloramines, selon la réaction suivante :



- Les chloramines (chloramine T, B et dichloramine T) sont des composés organiques qui libèrent, par hydrolyse, de l'acide hypochloreux en milieu légèrement acide. Ils sont beaucoup plus stables que les hypochlorites en présence de matière organique, sont moins irritants et toxiques, mais leur prix est élevé. De plus ce sont des bactéricides peu puissants en dépit d'une disponibilité en chlore de 25 à 30%, à l'exception des fortes valeurs de pH (>10) où ils sont plus actifs que les hypochlorites. Cependant, des travaux ont montré que sur des biofilms, les chloramines ont une efficacité bien plus grande que l'acide hypochloreux (Lechevallier *et al.* 1988b). Les chloramines libèrent lentement le chlore et sont souvent utilisées pour des trempages prolongés des petits matériels et ustensiles puisqu'elles ne sont que faiblement corrosives. Elles sont souvent mélangées à des détergents alcalins pour former des produits combinés (détergents-désinfectants).

- Les désinfectants chlorés granulaires sont formulés comme des sels organiques de chlore contenant des agents tampons et capables de relarguer des ions chlore pour former de l'acide hypochloreux en solution :



Les acides di- et tri-chloroisocyanuriques sous forme de sels de sodium sont un exemple de « porteurs » de chlore, stables et rapidement solubilisables. Comme les chloramines, ces composés sont coûteux, stables durant leur stockage (en ambiance sèche), non irritants et libèrent lentement le chlore. Contrairement aux chloramines, ils conservent leur activité dans une large gamme de pH (6 à 10). Ils sont aussi associés à des détergents alcalins.

- Le dioxyde de chlore (chlore gazeux) n'a qu'une utilisation limitée à la désinfection de l'eau et au traitement des eaux usées.

Il doit être généré « sur site » et n'a encore qu'une reconnaissance limitée dans le domaine alimentaire. Cependant son usage devient plus fréquent, il est utilisé en quatrième gamme (Gras, 1993). En effet, il a été montré que son pouvoir oxydant est 2,5 fois plus élevé que celui du chlore libre et qu'il peut être utilisé à des concentrations très inférieures aux autres désinfectants. De plus, il est encore efficace en présence de quantités importantes de matières organiques.

Les inconvénients de l'utilisation des dérivés chlorés en tant que désinfectants résident dans le fait que leur efficacité, qui reste fortement dépendante du pH, peut être atténuée par les souillures organiques. Ils sont très corrosifs et irritants, notamment aux pH inférieurs à 8,5, et présentent une mauvaise stabilité à chaud, à l'état dilué ou à la lumière dans le cas de l'hypochlorite). Ils peuvent en outre affecter les propriétés organoleptiques de l'eau.

La désinfection des eaux comporte deux critères importants, correspondant à deux effets différents d'un désinfectant donné :

- ❖ un effet bactéricide, qui correspond à la capacité à détruire les germes en une étape donnée du traitement,
- ❖ un effet rémanent, qui correspond au maintien du désinfectant dans le réseau de distribution. La rémanence d'un oxydant au sein du système de distribution permet de garantir la qualité bactériologique de l'eau au cours de la distribution. Il s'agit à la fois d'un effet bactériostatique contre les reviviscences bactériennes en réseau et d'un effet bactéricide contre des pollutions faibles et ponctuelles survenant dans le réseau.

Ces deux effets doivent être pris en compte pour assurer la stabilité biologique le long du réseau. L'effet rémanent de l'oxydant sélectionne les désinfectants pouvant être utilisés en désinfection finale. Seuls le chlore, le dioxyde de chlore et les monochloramines présentent un effet rémanent et permettent ainsi d'assurer un résiduel de désinfectant en réseau, le traitement par l'ozone et l'irradiation UV ne présentant qu'un effet bactéricide.

Rizet *et al.* (1984) ainsi que Maul *et al.* (1985) ont montré que la présence du chlore libre résiduel dans l'eau des réseaux de distribution diminue le nombre de bactéries libres cultivables. Cependant il existe des facteurs limitant l'action bactéricide du chlore :

- ❖ La tolérance de certaines bactéries au chlore : Ridgway & Olson (1982) ont montré que les bactéries isolées des réseaux chlorés sont plus résistantes que les bactéries isolées des réseaux non chlorés. Cette adaptation est cependant limitée, car à des doses supérieures à 10 mg/l, seuls 0,5% des bactéries survivent et ceci quelque soit leur provenance. Lechevallier *et al.* (1988) montrent qu'une souche de *Klebsiella pneumoniae* cultivée dans un milieu oligotrophe (1mg/l de glucose) est trois fois plus résistante au chlore libre que la même souche cultivée dans un milieu riche (10mg/l de glucose)
- ❖ Le genre ou l'espèce bactérienne: certaines bactéries présentent une ultime résistance à la désinfection, ainsi les *Actinomycètes* et les *Bacillus* présentent une résistance à des doses pouvant aller jusqu'à 10mg/l de chlore libre pendant deux minutes (Ridgway & Olson, 1982). Des résultats similaires ont été obtenus pour certaines bactéries à Gram-comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium*, et *Klebsiella*.
- ❖ La fixation des bactéries sur des particules en suspension ou sur les parois de canalisations : ainsi, Lechevallier *et al.* (1984) montrent que les bactéries fixées sur des particules de charbon actif (provenant de l'usine d'eau d'alimentation) sont plus résistantes que les mêmes bactéries libres lorsqu'elles sont exposées pendant une heure à 2mg/l de chlore libre. Herson *et al.* (1987) ont également montré que *Enterobacter cloacae* fixée sur le fer résiste à 0,8 mg/l de chlore libre pendant 1h. Par ailleurs, il a été également démontré que les bactéries fixées sur les parois des canalisations résistent à la désinfection par le chlore et que son action sur un biofilm déjà constitué est extrêmement faible, la matière organique sécrétée par ce biofilm pouvant empêcher son action bactéricide (Parent *et al.*, 1996).

### ***V.5.2. Mode d'action des désinfectants***

Contrairement aux antibiotiques, le mode d'action des désinfectants se caractérise par une absence de spécificité, et demeure partiellement compris (voir tableau 1).

Trois phases d'actions possibles sont (Bourion, 1995):

- ❖ La fixation sur la paroi bactérienne, conditionnée par une concentration en désinfectant et le mouvement brownien des bactéries. Le phénomène est de nature chimique ou électrique.
- ❖ La pénétration à travers la paroi puis la membrane, conditionnée par la solubilité, l'ionisation et l'encombrement stérique.
- ❖ L'action proprement dite, qui peut toucher différentes cibles et notamment :

- la membrane cytoplasmique, dont l'altération provoque la perturbation des échanges membranaires spécifiques et donc la désorganisation du métabolisme.
- Les constituants cytoplasmiques, c'est-à-dire les acides nucléiques, les ribosomes, les protéines structurales, mais surtout les protéines enzymatiques dont l'oxydation et la dénaturation perturbent gravement le métabolisme cellulaire.

**Tableau 1 : Sites d'action des désinfectant.** (Russel *et al.*, 2004)

	<b>Cible microbienne et type d'interaction</b>	<b>Effet sur la cellule</b>
<b>Aldéhydes</b>	Alkylation des groupes NH <sub>2</sub> des protéines et acides nucléiques	Inhibition fonctions enzymatique et nucléique
<b>Dérivés phénoliques, Alcools</b>	Dénaturation des protéines cytoplasmiques et membranaires	Inhibition enzymatique, altération membrane, coagulation cytoplasmique
<b>Chlore, Iode, Peroxyde d'hydrogène</b>	Oxydation des groupes -SH des protéines	Inhibition enzymatique, modification de protéines structurelles
<b>Chlore, Iode</b>	Halogénéation des acides aminés aromatiques des protéines	Inhibition enzymatique, modification de protéines structurelles
<b>Chlorhexidine, Ammoniums quaternaires</b>	Liaison aux groupes phosphates et chaînes d'acides gras des lipides de la membrane cellulaire	Altération membranaire, fuite de constituants cellulaires, coagulation cytoplasmique

## Objectif et contexte du travail

*« Nous buvons 90% de nos maladies. Une catastrophe...*

*Désormais, c'est l'eau elle-même qu'il va falloir laver »*

*Louis Pasteur (fin du XIX<sup>e</sup> siècle)*

Etant donné que l'adhésion constitue la première étape du processus de formation d'un biofilm, deux stratégies sont envisageables pour lutter contre l'installation de ces nuisances:

- Une stratégie curative qui consiste à les éradiquer après leur installation, ce qui est généralement très coûteux,
- ou bien une stratégie préventive, qui vise à empêcher leur installation par la mise en œuvre de techniques dites « anti-adhésion ».

Une grande attention doit donc être portée à ce second type de stratégie puisqu'il constitue un moyen préventif pour optimiser l'hygiène des surfaces dans le domaine de la distribution d'eau potable, dans le respect de la réglementation internationale. Cet objectif ne peut être atteint sans mettre en place un système d'assurance et de sécurité alimentaire à mesures préventives fiables. L'aboutissement de cette prévention dépend très étroitement du degré de compréhension des mécanismes qui interviennent lors des étapes précoces de la formation du biofilm.

Cette étude vise à atteindre une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le processus de bioadhésion aux canalisations d'eau potable à travers l'évaluation des propriétés physico-chimiques des bactéries ainsi que celles des supports colonisés ou colonisables. Ces propriétés seront examinées au regard des comportements et propriétés bactériens et des conditions physico-chimiques et hydrodynamiques des eaux qui constituent leur milieu de vie. Ceci doit permettre d'identifier les conditions favorables ou défavorables à la formation de biofilms sur les parois de canalisations d'eau potable et de préciser, au cas par cas, le type d'interactions qui prédominent dans le phénomène d'adhésion initiale conduisant plus tard à la formation d'un biofilm mature.

Des études ont montré que les microorganismes, une fois arrivés à proximité des surfaces, adhèrent initialement par l'intermédiaire d'interactions physico-chimiques dites « non-spécifiques », qui comprennent essentiellement les interactions de van der Waals, électrostatiques et acide-bases (donneur - accepteur d'électrons au sens de Lewis). Disposer

d'un outil d'aide à la décision fiable, qui permettrait d'optimiser un choix de matériau au regard des propriétés de l'eau qui y circulera et d'un type bactérien prédominant où à forte pathogénicité, constituerait indéniablement un atout majeur pour traiter ce type de risque sanitaire.

Des travaux préalables très importants sur le comportement de particules colloïdales ont été entrepris et sont largement cités dans notre introduction. Nous avons donc dans un premier temps voulu déterminer jusqu'à quel point ce formalisme, essentiellement basé sur la thermodynamique à l'équilibre et sur des énergies d'adhésion, pouvait s'appliquer au phénomène d'adhésion dans le cas d'un réseau d'eau potable. Si la validité des modèles prédictifs qui découlent de cette approche était avérée, nous aurions alors la possibilité de simuler le comportement bactérien pour une espèce biologique donnée et un matériau particulier. Cette question pose de manière très directe la question du rôle des interactions spécifiques (c.a.d. biologiques) dans le phénomène d'adhésion, en se souvenant qu'une bactérie ne présente pas, en terme de dimension, rigidité, et homogénéité, les caractéristiques d'une particule colloïdale modèle et que, *last but not the least*, une cellule vivante n'est *jamais* à l'équilibre. Il est donc logique que les facteurs de forme des bactéries, leur mobilité, leur capacité à s'adapter métaboliquement et structurellement aux variations environnementales, pour ne citer que quelques points, induisent des écarts notables en terme de comportement global par rapport à des particules inertes (au sens du mouvement), homogènes, sphériques et par définition démunies de toute capacité adaptative.

L'hydrophobicité est pour certains auteurs le paramètre-clé qui gouverne l'adhésion bactérienne aux supports inertes (Jana *et al.*, 2000 ; An & Friedman, 2000 ; Majtán & Majtánová, 2000 ; Pereira *et al.*, 2000 ; Cappello *et al.*, 2006). Plusieurs méthodes permettent son évaluation comme, par exemple, la MATS, l'agrégation avec les sels, la chromatographie hydrophobe, l'adhésion au latex et au polystyrène, etc... (Hsu & Huang, 2002). Généralement ces techniques ont prouvé leur efficacité et ont pu être corrélées et rendre compte des résultats expérimentaux, bien que certains travaux aient mis en évidence dans certains cas des contradictions sur l'évaluation de l'hydrophobicité d'une souche bactérienne.

Dans le cadre de notre étude, l'hydrophobicité des cellules bactériennes est estimée par différentes techniques notamment la MATS et l'angle de contact, leur évolution en fonction des variations de conditions environnementales étant également abordée. Les résultats issus

de chaque technique sont comparés et discutés. Toute différence relevée est discutée afin de mieux cerner la spécificité de l'information apportée par chacune des techniques utilisées.

Le rôle du cisaillement hydrodynamique sur la dynamique de croissance des biofilms étant avéré, nous avons abordé le rôle de ce paramètre pour un modèle biologique, *Pseudomonas aeruginosa*, et dans différentes conditions environnementales. Ceci a nécessité la conception et réalisation d'un bioréacteur permettant de moduler, en conditions stériles, les facteurs physico-chimiques susceptibles d'affecter la formation des biofilms dans les réseaux de distribution. Ce système doit nous permettre de valider les essais en statique et d'étudier l'architecture et l'organisation du biofilm en fonction des conditions environnementales. Il est nécessaire de les examiner afin d'évaluer le potentiel adaptatif de notre souche modèle. Une analyse structurale des composants membranaires, essentiellement les exoproduits de type exopolysaccharides, est menée pour permettre de rechercher les bases moléculaires de l'adaptation des bactéries en terme de charges exposées à la surface de la paroi.

La maîtrise de la qualité microbiologique de l'eau potable aura nécessairement des retombées socio-économiques positives, que ce soit au niveau de la mise en conformité vis-à-vis de la réglementation ou de la protection de la santé publique. Elle doit tendre également à réduire les coûts d'investissement et d'exploitation, notamment en prévenant (ou réduisant) les phénomènes de corrosion qui entraînent, on le sait, des surcoûts très significatifs estimés à environ 4% du PNB des pays industrialisés : 28 milliards d'euros pour la France, 10% de ce coût étant dus à la bio-corrosion.

Nous espérons enfin que les résultats issus de ce travail de thèse pourront être d'utilité dans d'autres secteurs concernés par les phénomènes de bioadhésion (IAA, domaine maritime...) et pour la recherche de solutions adaptées, y compris dans des domaines où les propriétés de biofilms positifs sont recherchées, comme le vaste domaine des bio-procédés fermentaires (alimentation, traitement des effluents,...).

*« L'eau est un des médicaments naturels qui profite à l'ensemble de l'organisme. On peut l'employer de façons très différentes, sans subir d'effets secondaires, pour combattre et guérir des affections aiguës, ainsi que des problèmes de santé chronique. On peut aussi l'utiliser pour prévenir la maladie et conserver une bonne santé »*

*Dr Dian Dincin Buchman, Guérir par l'eau*

---

# **Chapitre II**

## **Matériels et méthodes**

---



## Chapitre II

### Matériels et méthodes

## I. Modèles biologiques

les souches bactériennes *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 et *Escherichia coli* ATCC25922 sont utilisées en tant que modèle biologique pour la réalisation de cette étude.

### I.1. Principales caractéristiques des modèles biologiques

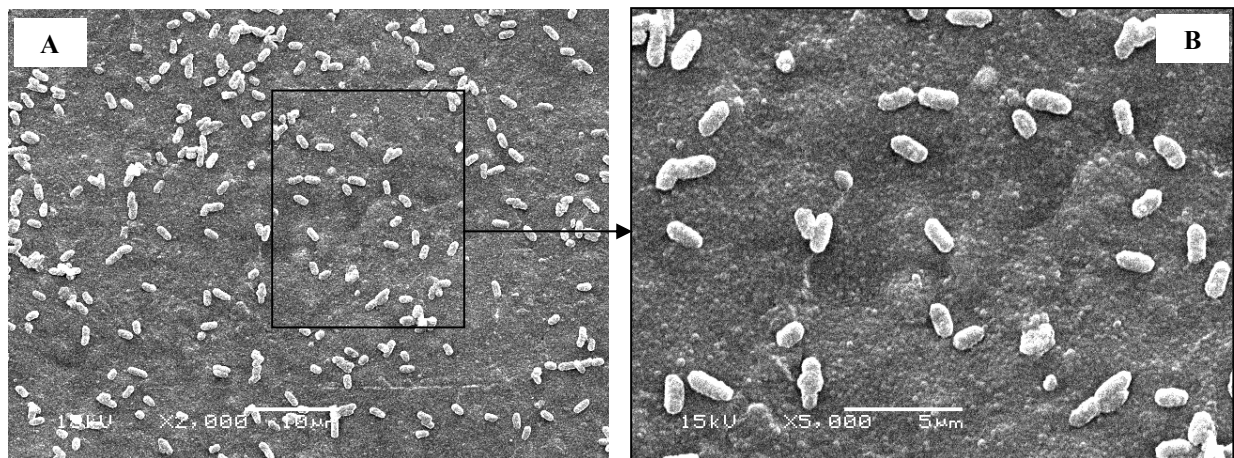
#### I.1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Connue également sous le nom de **bacille pyocyanique** (bacilles fins et droits), *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie aérobie stricte, gram négative du genre *Pseudomonas*, très mobile grâce à un flagelle polaire : ciliature monotriche, dépourvue de spore et de capsule. Ils apparaissent la plupart du temps isolés ou en diplobacilles. Cette bactérie aquaphile peut être véhiculée par les eaux de toutes provenances : eaux de rivière, égouts, piscine, mer, eau potable, eaux minérales ou thermales, eaux déminéralisées ..., Mais également, par les aérosols ou par des surfaces contaminées (fomites). Il s'agit d'un pathogène opportuniste capable d'infecter une multitude d'hôtes (Rahme *et al.*, 2000).

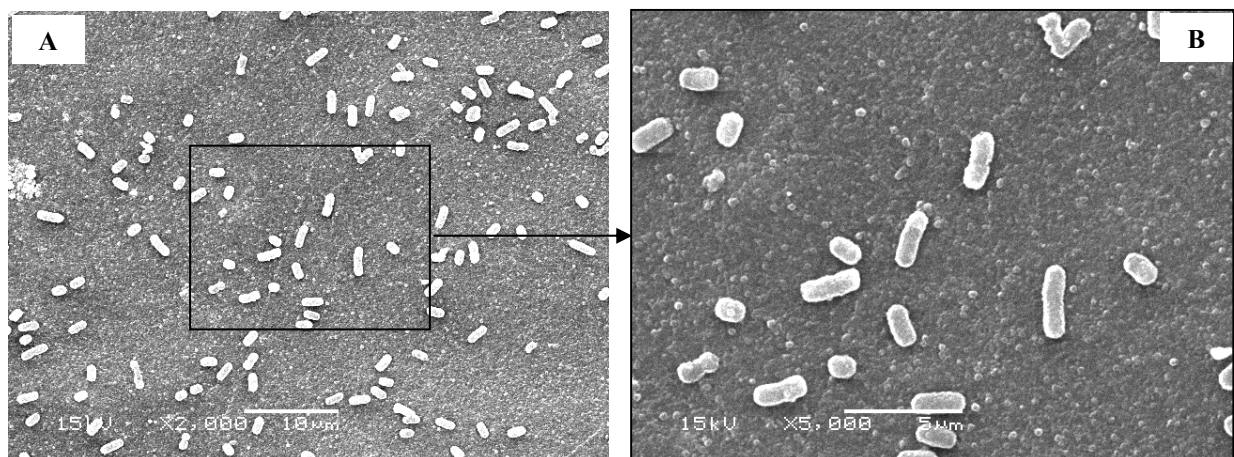
Chez les plantes, *P. aeruginosa* induit des symptômes de pourriture molle (soft rot) chez *Arabidopsis thaliana* et la laitue (*Letuca sativa*). C'est un agent pathogène puissant chez *Arabidopsis* (Walker *et al.*, 2004) et chez certains animaux comme *Caenorhabditis elegans* (Mahajan-Miklos *et al.*, 1999 ; Martinez *et al.*, 2004) *Drosophila* et *Galleria mellonella* (Miyata *et al.*, 2003). Les associations de facteurs de virulence sont les mêmes pour les infections végétales et animales (Rahme *et al.*, 2000). Quant à l'Homme, *P. aeruginosa* est la cause majeure d'infections nosocomiales chez les patients immunodéprimés. Parmi les affections les plus courantes, on peut citer les infections locales de l'œil ou de l'oreille, les infections de plaies et de brûlures, les infections urinaires et les septicémies. De plus *P. aeruginosa* est directement responsable du taux de mortalité élevé et précoce chez les patients atteints de mucoviscidose (Costerton *et al.*, 1999). *P. aeruginosa* est une bactérie très robuste, naturellement très résistante aux antibiotiques et s'adaptant rapidement aux attaques médicamenteuses, elle utilise des flagelles pour sa mobilité, des systèmes introduisant des protéines effecteurs dans les cellules hôtes, et un lipopolysaccharide qui supprime les

réponses immunitaires des hôtes en plus d'intervenir directement dans l'établissement d'infections persistantes (Cryz *et al.*, 1984).

Parmi les sécrétions de *P. aeruginosa* on trouve donc des protéines (élastase et protéase) qui détruisent l'intégrité des tissus de l'hôte en dégradant leurs protéines telles que l'élastine, le collagène et les transférines (Aumercier *et al.*, 1990; Kawaharajo *et al.*, 1975). On trouve aussi des toxines de poids moléculaire faible comme la pyocyanine, affectant différents types de sites dans la cellule hôte (Lau *et al.*, 2004). Et comme d'autres *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* est productrice d'un certain nombre de pigments hydrosolubles comme la pyocyanine (bleu-vert), la fluorescéine (jaune-vert fluorescent) et la pyorubine (brun-rouge).



**Figure 12 : Adhésion de *P. aeruginosa* sur des surfaces de canalisation d'eau potable en polyéthylène observée en MEB. A) Grossissement 2K ; B) grossissement 5K.**



**Figure 13 : Adhésion d'*E. coli* sur des surfaces de canalisation d'eau potable en polyéthylène observée en MEB. A) Grossissement 2K ; B) grossissement 5K.**

### **I.1.2. *Escherichia coli***

*E. coli* est un bacille gram négatif de la famille des entérobactéries, aérobie, anaérobie facultative, mobile grâce à des flagelles (péritriche), non sporulée et en forme de bâtonnet, découverte la première fois par Thomas Escherich en 1855. Sa température optimale de croissance est de 37° C. *E. coli* est un germe habituel de la flore intestinale de l'Homme et des animaux à sang chaud (mammifères et oiseaux). Son établissement dans le tractus digestif s'effectue durant les premières heures ou journées qui suivent l'accouchement. *E. coli* constitue alors tout au long de la vie de l'hôte l'espèce bactérienne dominante de la microflore anaérobie facultative de l'intestin. Le germe se retrouve donc dans les matières fécales. Il existe dans la nature : sol et eau. De plus ce microorganisme peut être présent dans certains aliments. *E. coli* peut conduire à des infections urinaires, biliaires et génitales et est aussi responsable de toxi-infections alimentaires humaines parfois accompagnées d'atteintes rénales graves pouvant entraîner la mort.

## **I.2. Choix des modèles biologiques**

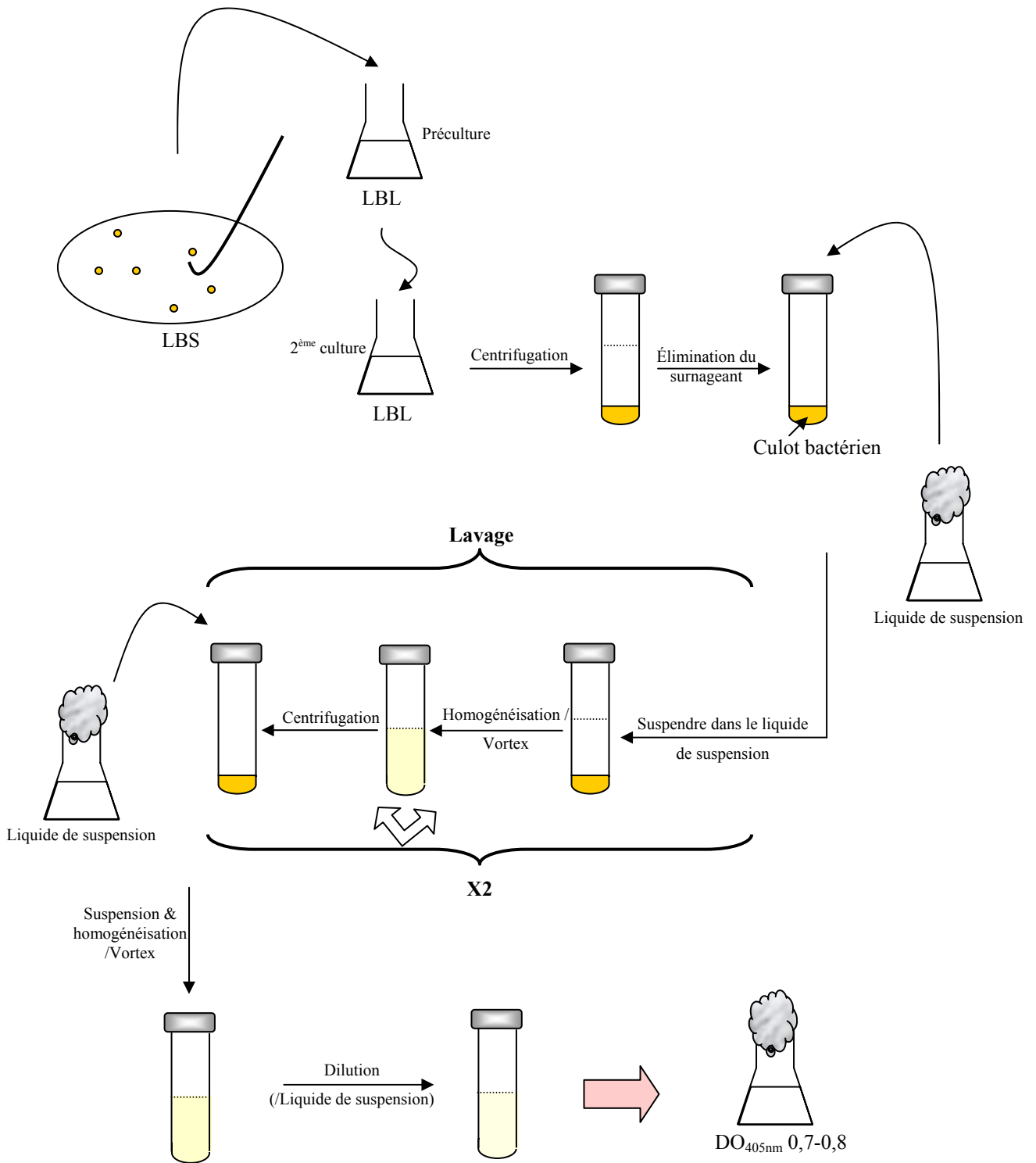
De nombreuses bactéries ont fait l'objet d'études en raison de leur capacité à former des biofilms. Parmi celles-ci, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* ont été, pour plusieurs raisons, choisies pour mener cette étude. En effet, ces deux bactéries occupent une place importante dans le domaine du contrôle de la qualité microbiologique de l'eau. Dès le début du 19<sup>ème</sup> siècle, il a été reconnu que *E. coli* constituait un bon indicateur de contamination fécale. Quant à *Pseudomonas aeruginosa*, elle a été également considérée comme un indicateur valide de l'efficacité du traitement des eaux surtout pour évaluer l'efficacité des traitements de désinfection. Le décret de 7 Avril 1981, recommande cette bactérie comme indicateur de traitement pour vérifier à la fois l'efficacité du traitement et celle de l'action désinfectante résiduelle (Rodier *et al.*, 1996). De plus, ces deux souches sont choisies parce qu'elles sont également des pathogènes d'eau potable capables de former un biofilm. *P. aeruginosa*, bactérie ubiquitaire dont les exigences nutritionnelles sont très réduites (Carson *et al.*, 1972), naturellement présente dans l'environnement, notamment dans la flore bactérienne de l'eau potable, «pathogène opportuniste». Sécrète comme certaines autres bactéries gram négatives, une matrice extracellulaire de composition essentiellement polysaccharidique qui constitue ainsi une barrière physique contre l'entrée de produits utilisés lors de procédures de désinfection. Les EPS de *P. aeruginosa* sont essentiellement des alginates qui ont été identifiés comme le facteur essentiel de la formation des biofilms pour cette bactérie. Ils sont

généralement synthétisés lorsque la bactérie est soumise à des conditions environnementales défavorables (Allison & Sutherland, 1987 ; Mai *et al.*, 1993). Il est également à souligner que ces bactéries deviennent métaboliquement moins actives au sein d'un biofilm et donc moins sensibles aux agents antimicrobiens et aux stress environnementaux (Drenkard, 2003 ; Hentzer *et al.*, 2003, 2004 ; Wu *et al.*, 2004).

Plusieurs souches d'*E. coli* sont également capables de former un biofilm en faisant intervenir leurs appendices extracellulaires comme les *fimbriae* ou les « curli » pour adhérer aux surfaces (Pratt *et al.*, 1998 ; Prigent-Combert *et al.*, 2001). De surcroît, ces deux souches ont fait l'objet de nombreuses études, *E. coli* étant sans doute l'organisme vivant le plus étudié à ce jour : en effet, l'ancienneté de sa découverte et sa culture aisée (division cellulaire toutes les 20 minutes à 37 °C dans un milieu riche) font d'elle un modèle biologique aisé à manipuler. La profusion de publications scientifiques qui la mentionnent en témoigne, et elle joue le rôle de « cheval de labour » dans tous les laboratoires de microbiologie. *P. aeruginosa* a également largement fait l'objet d'études assez complètes et informatives sur les mécanismes moléculaires qui interviennent lors du développement d'un biofilm.

## **I.2. Préparation des suspensions bactériennes**

Pour chaque culture bactérienne, une préculture a été préparée par ensemencement bactérien suivi d'une incubation durant une nuit à 37°C dans le milieu Luria Bertani liquide (LBL). Puisqu'il est toujours intéressant d'exécuter les tests avec des bactéries dans leur phase exponentielle de croissance, une seconde culture est ensuite préparée à partir de cette première culture en rajoutant du milieu de culture LBL stérile dans un rapport 1/1, (v/v), cette dernière étant incubée 90 minutes à 37°C (temps choisi de manière à se placer en phase de croissance, voir le tableau 6). Les cellules bactériennes sont ensuite récupérées par centrifugation à 8 400g pendant 15 min, et lavées 2 fois avec la solution correspondant aux conditions physico-chimiques recherchées (pH, force ionique,...), et finalement diluée avec ce même milieu pour obtenir une suspension bactérienne à une densité optique à 405 nm comprise entre 0,7 et 0,8.



**Figure 14 : Etapes de préparation de la suspension à partir d'une culture bactérienne.**

## **II. Supports de canalisations**

### **II.1. Choix des supports**

Historiquement de nombreux matériaux ont été utilisés dans les canalisations pour transporter l'eau de l'usine de distribution d'eau potable vers le consommateur. Mais ceux-ci sont de plus en plus souvent remplacés aujourd'hui par des canalisations en plastique. Ces derniers, n'ayant pas cessé de gagner en popularité, sont devenus aujourd'hui les matériaux de prédilection dans de nombreux pays.

Au cours de cette étude, 4 matériaux de canalisations en plastique, obtenus directement du fournisseur et utilisés pour l'adduction d'eau potable ont été testés : Le poly éthylène réticulé (PEX), le polypropylène (PP), le poly chlorure de vinyle (PVC) et le poly éthylène haute densité (PEHD). Des lames de microscope en verre, matériau connu par son caractère hydrophile (76mm×26 mm, Knittel Glaser, Allemagne) sont utilisées en tant que référence.

### **II.2. Procédure de nettoyage et de désinfection**

Dans le but d'éliminer les impuretés minérales et organiques des surfaces solides, et pouvoir les désinfecter, les traitements suivants ont été appliqués :

- ❖ Trempage 3h dans un détergent (Ferry® 3-4% dilution avec une eau désionisée)
- ❖ Lavage 4 fois dans l'eau désionisée stérile
- ❖ Trempage 2 fois 15 min dans une solution chlorée à 150mg/l de chlore dans l'eau désionisée stérile
- ❖ Lavage 4 fois dans de l'eau désionisée stérile
- ❖ Séchage au four 50°C pendant une nuit, en gardant toujours les surfaces dans une boîte de pétri en conditions propres

Pour les surfaces en verre, il a été procédé comme suit :

- ❖ Trempage 15min dans l'eau désionisée stérile
- ❖ Trempage 15min dans l'éthanol absolu
- ❖ Rinçage 6 fois dans l'eau désionisée stérile
- ❖ Stérilisation par autoclavage
- ❖ Séchage au four 50°C pendant une nuit, en gardant toujours les surfaces dans une boîte de pétri en conditions stériles

### III. Physico-chimie du milieu de suspension

Des études ont montré que les propriétés de surface des cellules microbiennes varient en fonction des conditions environnementales dans lesquelles elles se trouvent (van Oss *et al.*, 1986 ; Bellon-Fontaine *et al.*, 1990 ; Bos *et al.*, 1999 ; Gallardo Moreno *et al.*, 2002 ; Hamadi *et al.*, 2004 ; Bayouhd *et al.*, 2006). Dans le *paragraphe V* du *chapitre I*, nous avons présenté quelques facteurs affectant la formation des biofilms dans les réseaux d'eau potable. Une partie de cette étude est consacrée à l'évaluation de l'effet de certains de ces paramètres sur le caractère physico-chimique des cellules microbiennes (caractère acide / base, hydrophobe,...) et/ou sur la composition structurale de la paroi des cellules bactériennes, et par conséquent sur la formation des biofilms, puisque ces propriétés sont déterminantes pour l'affinité des bactéries vis-à-vis d'un support donné. Pour les tests en « statique », les paramètres retenus sont le pH, la force ionique et la teneur en chlore actif. Nous avons donc fait varier ces paramètres dans la limite des normes de potabilité d'eau, tout en explorant l'effet des valeurs extrêmes autorisées par ces mêmes normes. Pour les tests en « dynamique » l'effet du pH, de la force ionique, de la température et des contraintes de cisaillement a été recherché.

La technique d'adhésion microbienne aux solvants (MATS) a permis d'étudier l'évolution du caractère hydrophobe et acide-base des bactéries en fonction des différents paramètres physico-chimiques du milieu extérieur. La spectroscopie infrarouge a été utilisée pour rechercher et caractériser des variations qualitatives des constituants membranaires qui devraient être corrélées aux modifications physico-chimiques des surfaces cellulaires évoquées ci-dessus.

#### III.1. pH

Le pH d'une eau caractérise sa teneur en protons et donc son acidité ou son alcalinité ; à pH 7 une eau est dite neutre, à pH inférieur à 7 acide et à un pH supérieur à 7, basique ou alcaline. C'est un élément important pour définir le caractère agressif ou incrustant d'une eau. Il intervient dans ces phénomènes complexes avec d'autres paramètres comme la dureté, la teneur en dioxyde de carbone et la température. Un pH inférieur à 7 peut conduire à la corrosion du ciment ou des métaux de canalisation avec l'entraînement du plomb par exemple (phénomène à l'origine du saturnisme). Un pH élevé peut conduire à des dépôts incrustants dans les circuits de distribution. De plus, au dessus de pH 8, il y a une diminution progressive de l'efficacité de la décontamination microbienne par le chlore. Par ailleurs, la chloration diminue le pH.

Pour l'eau destinée à la consommation humaine, l'OMS ne fixe pas de valeur mais précise qu'un faible pH peut poser des problèmes de corrosion et un pH élevé peut entraîner des problèmes de goût et de consommation accrue de savon ; elle recommande un pH inférieur à 8 pour une bonne désinfection par le chlore. Les directives du *Conseil des Communautés Européennes* précisent que l'eau ne doit pas être agressive et indiquent comme niveau guide :  $6,5 \leq \text{pH} \leq 8,5$  avec une valeur maximale admissible de 9,5 ; elles rappellent que les valeurs du pH ne s'appliquent pas aux eaux conditionnées. La réglementation française précise que le pH de l'eau potable doit être supérieur ou égal à 6,5 et inférieur ou égal à 9 ; cette obligation ne s'applique pas aux eaux conditionnées non minérales (Rodier *et al.*, 1996). Selon les normes marocaines, le potentiel d'hydrogène doit être compris dans l'intervalle 6,5 à 8,5, valeurs fixées sur le critère d'efficacité du traitement de désinfection par le chlore (Norme marocaine homologuée NM 03.7.001, SNIMA)

Au cours de cette étude, nous avons évalué l'effet de 3 valeurs de pH : un pH acide minimal selon les normes de 6,5 ; un pH moyen de 7,5 et un pH basique qui représente la valeur maximale admissible selon la globalité des normes, soit 9,5.

### **III.2. La force ionique**

Le chlorure de sodium (NaCl) a été choisi comme unique espèce ionique pour représenter l'ensemble des espèces ioniques dans ce présent travail afin de moduler la force ionique dans les expérimentations. Le sel alimentaire ou chlorure de sodium présente une grande valeur alimentaire et industrielle. Il peut être soit d'origine marine (obtenu par évaporation progressive des marais salants), soit extrait à partir du sous-sol où il existe sous forme de sel gemme.

Pour cette étude, la gamme de variation des concentrations salines à explorer a été choisie en fonction des normes en cours. L'OMS recommande une valeur limite de 200 mg/l pour les ions sodium, ce maximum répondant à un critère gustatif de l'eau potable. Dans l'état actuel des choses, il n'existe pas d'argument suffisant pour justifier la fixation d'une valeur indicative pour le sodium dans l'eau sur la base d'un risque sanitaire (Rodier *et al.*, 1996). Les directives du *Conseil des Communautés Européennes* préconisent comme niveau guide la valeur de 20 mg/L de sodium et comme concentration maximale admissible 150 mg/L avec un percentile de 80. La réglementation française retient cette même valeur de 150 mg/L avec un percentile de 80. En ce qui concerne la norme marocaine, il n'y a pas d'indication



particulière concernant les ions sodium tant que sa concentration reste en deçà des limites de toxicité (Norme marocaine homologuée NM 03.7.001, SNIMA)

La présente étude a donc été effectuée à différentes concentrations de chlorure de sodium. Une concentration de *référence* de 5 mM de NaCl ( $[Na^+] = 117 \text{ mg/l}$ ) a été retenue car elle respecte la réglementation de l'OMS et la norme française. Les concentrations de 50 et 75 mM sont également étudiées dans le but de répondre à un objectif spécifique rencontré durant cette étude, qui est de pouvoir masquer les interactions électrostatiques répulsives exposées en surface et donc de rechercher son influence sur l'adhésion bactérienne aux support testés. Ceci permet d'évaluer l'importance de ces interactions par rapport aux interactions acido-basique ou de van der Waals.

### **III.3. Chlore actif**

Pour une eau destinée à l'alimentation humaine, l'OMS recommande pour le chlore une valeur guide de 5 mg/l en précisant que pour une désinfection effective, la teneur en chlore résiduel actif doit être supérieure ou égale à 0,5mg/l après au moins 30 min de contact à pH inférieur à 8. Toutefois elle signale que des problèmes de goût et d'odeur peuvent se poser pour les consommateurs à des concentrations de 0,6 à 1 mg/l. la réglementation française prévoit des contrôles complémentaires dans le cas où la teneur en chlore résiduel est supérieure à 0,1 mg/L. Durant cette étude, nous avons testé l'effet de 2 valeurs de concentrations en chlore actif : 0,3 et 5 mg/l

### **III.4. La température**

La température d'une eau potable est en principe inférieure en été et supérieure en hiver à la température de l'air. Les directives du *Conseil des Communautés Européennes* fixent à 12°C le niveau guide de la température de l'eau destinée à la consommation humaine, et à 25°C, la température maximale à ne pas dépasser.

La réglementation française retient cette même valeur de 25°C sauf en cas de traitement thermique pour la production d'eau chaude. L'OMS ne recommande aucune valeur. Pratiquement, la température de l'eau n'a pas d'incidence directe sur la santé de l'homme. Cependant, une température supérieure à 15°C favorise le développement des microorganismes dans les canalisations en même temps qu'elle peut exalter les odeurs et les saveurs. Par contre, une température inférieure à 10°C ralentit les réactions chimiques dans les différents traitements des eaux. En ce qui concerne la norme marocaine, il n'y a pas de

spécification concernant ce paramètre puisqu'il subit une grande variation saisonnière et régionale. Pour cette étude 3 valeurs de température ont été étudiées : 17°C, 27°C et 37°C

### **III.5. Débit**

La majorité des réseaux de distribution d'eau potable sont conçus pour supporter des vitesses d'écoulement d'eau potable allant de 0,2 jusqu'à 0,5 m/s (Manuel *et al.*, 2007). Pour les débits importants, les forces de cisaillement entre le liquide et le support colonisé deviennent importantes et ont pour effet d'arracher les cellules fixées (Characklis, 1981 ; Bryers & Characklis, 1982). Cet arrachage continu limite l'accumulation de la biomasse fixée (Bryers & Characklis, 1982).

Des études ont montré que les problèmes de stagnation favorisant corrosion et dépôts apparaissent dès que la vitesse de l'eau est inférieure à 0,01 m/s et disparaissent au-delà de 0,1 m/s (Tricard & Buffaut, 1995). Il est alors conseillé des valeurs guides d'écoulement entre 0,5 et 1,5 m/s (FNDAE, 2003).

## **IV. Caractérisation physico-chimique des cellules bactériennes et des matériaux**

### **IV.1. Détermination de l'hydrophobicité et du caractère acide-base**

#### **IV.1.1. Technique d'adhésion microbienne aux solvants (MATS)**

L'adhésion microbienne aux solvants, communément appelé MATS, pour *Microbial Adhesion To Solvents*, est une technique inspirée de la méthode d'adhésion aux hydrocarbures (MATH pour *Microbial Adhesion To Hydrocarbon*) (Rosenberg, 1980), et couramment employée pour déterminer l'hydrophobicité relative des cellules microbiennes, ainsi que leur caractère acide-base au sens de Lewis (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996).

Pratiquement, 2,4 ml d'une suspension bactérienne de densité optique comprise entre 0,7 et 0,8 mesurée à 405 nm ( $A_0$ ) sont mélangés à 0,4 ml de solvant organique et vortexés pendant 90 s. Le mélange est laissé à décanter 15 minutes pour avoir une séparation complète entre les phases organique et aqueuse. Ensuite la densité optique A de la phase aqueuse est mesurée à 405 nm. Le pourcentage de cellules ayant *adhéré* au solvant (% d'adhérence) est donné par la formule suivante:

$$\%adhésion = \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) * 100$$

Quatre solvants doivent être employés : deux solvants polaires et deux solvants apolaires de manière à avoir deux couples de solvants « polaire-apolaire ». Les solvants polaires peuvent être accepteurs d'électrons (acide au sens de Lewis) ou donateurs d'électrons (basique au sens de Lewis), mais les couples solvants « polaire-apolaire » doivent avoir la même énergie libre de surface liée au caractère de Lifshitz - van der Waals. Les solvants chloroforme, hexadécane, diéthyle éther et hexane ont été utilisés durant cette étude.

**Tableau 2 : Caractéristiques énergétiques des solvants utilisés dans la méthode MATS (Van oss & Good, 1989 ; Van Oss et al., 1989).  $\gamma^{Lw}$  : Composante de van der Waals de l'énergie libre de surface des solvants ;  $\gamma^+$  : Composante d'accepteur d'électrons de l'énergie libre de surface des solvants ;  $\gamma^-$  : Composante de donneur d'électrons de l'énergie libre de surface des solvants**

Solvant	Formule	$\gamma^{Lw}$ (mJ/ m <sup>2</sup> )	$\gamma^+$ (mJ/ m <sup>2</sup> )	$\gamma^-$ (mJ/ m <sup>2</sup> )
Chloroforme	CHCl <sub>3</sub>	27,2	3,8	0
Hexadécane	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>	27,2	0	0
Diéthyle éther	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	16,7	0	16,4
Hexane	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	18,4	0	0

### ***Évaluation du caractère hydrophobe des cellules microbiennes***

L'hydrophobicité se traduit par le pourcentage de cellules ayant adhéré aux solvants apolaires hexadécane et hexane. La surface des cellules est considérée hydrophobe lorsque ce pourcentage est supérieur à 50% et relativement hydrophile dans le cas contraire.

### ***Évaluation du caractère acide-base des cellules microbiennes***

La détermination du caractère donneur/accepteur des électrons est basée sur la comparaison de l'affinité des cellules pour les solvants polaire et apolaire qui constituent chaque couple de solvants (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996).

- ❖ La différence entre le pourcentage d'adhésion au chloroforme (acide, accepteur d'électrons) et celui de l'hexadécane (apolaire) permet d'évaluer le caractère donneur d'électrons des cellules microbiennes ; si cette différence est positive, le caractère des souches étudiées est jugé basique.
- ❖ La différence entre le pourcentage d'adhésion au diéthyle éther (basique, donneur d'électrons) et celui d'hexane (apolaire) permet d'évaluer le caractère accepteur d'électrons des cellules microbiennes ; si cette différence est positive, le caractère des souches étudiées est jugé acide.

#### **IV.1.2. Angle de contact**

La mesure de l'angle de contact rend compte de l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface en fonction de sa mouillabilité. Le principe de cette méthode consiste à mesurer

l'angle  $\theta$  de la tangente avec la surface étudiée du profil d'une goutte de dimensions définie, d'un liquide sonde déposé sur le substrat à analyser. L'utilisation de l'eau en tant que liquide de pose de la goutte permet d'évaluer le caractère hydrophile/hydrophobe de la surface. En utilisant différents liquides de référence, il est possible de déterminer l'énergie libre totale de surface ainsi que ses composantes et sur la base de l'équation de Young-Dupré présenté dans le paragraphe IV.2. du *Chapitre I*, il devient possible de déterminer les composantes énergétiques caractérisant thermodynamiquement le substrat analysé.

Durant cette étude, 3 liquides purs de référence ont été utilisés : l'eau distillée, le diiodométhane (Aldrich, 99%) et le formamide (Sigma, ~100%); leurs propriétés énergétiques sont données dans le tableau ci-dessous :

**Table 3 : Caractéristiques énergétiques des solvants utilisés pour les mesures de l'angle de contact (van Oss & Good, 1989 ; van Oss et al., 1989).  $\gamma^{Lw}$  : Composante de van der Waals de l'énergie libre de surface des solvants ;  $\gamma^+$  : Composante d'accepteur d'électrons de l'énergie libre de surface des solvants ;  $\gamma^-$  : Composante de donneur d'électrons de l'énergie libre de surface des solvants**

Solvant	Formule	$\gamma$ (mJ/ m <sup>2</sup> )	$\gamma^{Lw}$ (mJ/ m <sup>2</sup> )	$\gamma^{ab}$ (mJ/ m <sup>2</sup> )	$\gamma^+$ (mJ/ m <sup>2</sup> )	$\gamma^-$ (mJ/ m <sup>2</sup> )
Eau	H <sub>2</sub> O	72,8	21,8	51,0	25,5	25,5
Diodomethane	CH <sub>2</sub> I <sub>2</sub>	50,8	50,8	~0	~0	~0
Formamide	CH <sub>3</sub> NO	58	39,0	19	2,3	39,6

Nous avons utilisé, l'appareil d'angle de contact *Digidrop (GBX, Romans)* avec une méthode simple basée sur la photographie d'une goutte de 2 $\mu$ l 20ms après son dépôt. Ce dépôt est réalisé de façon automatisée à l'aide d'une micropipette et l'image est capturée par une caméra vidéo.

En ce qui concerne l'étude des cellules microbiennes par l'angle de contact, une solution de 150 ml de suspension bactérienne est préparée selon le protocole décrit dans le paragraphe I.2 du *Chapitre II*, les cellules sont ensuite récupérées par filtration sur une membrane en nitrate de cellulose de 0,45 $\mu$ m de porosité. Après plusieurs lavages avec le milieu de suspension, on obtient une nappe bactérienne homogène et plate. Le dépôt des liquides sondes, utilisés pour les mesures de l'angle de contact sont effectués directement sur la surface de cette nappe.

## **IV.2. Caractérisation structurale par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)**

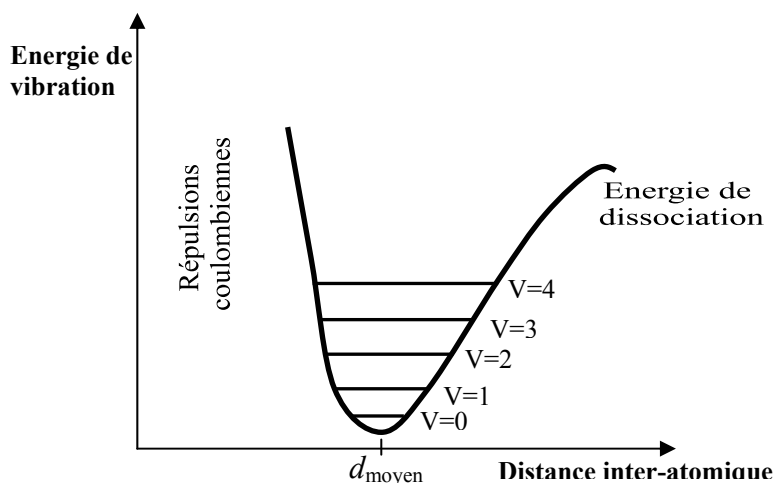
La spectroscopie infrarouge est une technique qui permet l'identification des groupements moléculaires selon leur nature et leur conformation. Elle est basée sur l'absorption d'une radiation électromagnétique à des fréquences correspondant à l'énergie de différents états

vibrationnels des molécules. C'est une technique qui permet de fournir des informations quant à l'identification, et le dosage de constituants et qui permet également d'étudier les interactions intra et inter moléculaires comme les liaisons H par exemple.

Le rayonnement infrarouge (IR) est une radiation de nature électromagnétique, correspondant à la partie du spectre comprise entre  $12\ 800\text{ cm}^{-1}$  et  $10\text{ cm}^{-1}$ . Cet intervalle peut être subdivisé en 3 domaines : le proche, le moyen et le lointain IR. Pour cette étude, nous nous intéressons plus particulièrement à la région du moyen infrarouge (MIR), qui s'étend de  $4000\text{ cm}^{-1}$  à  $400\text{ cm}^{-1}$  ( $2,5\ \mu\text{m}$  à  $25\ \mu\text{m}$ ). Sur le plan théorique, cette plage spectrale est particulièrement bien adaptée à l'identification des composés organiques et à l'étude de la conformation des molécules puisqu'elle contient la quasi-totalité des signatures spectrales des molécules du vivant : protéines, lipides, polysaccharides, acides nucléiques,.... Toutefois, dans cette région, l'absorption de l'eau est importante, ce qui peut poser des problèmes de conditionnement des échantillons. C'est une des raisons qui nous ont poussé à utiliser, comme technique d'acquisition la réflexion totale atténuée qui prévient la saturation du signal dans les bandes de l'absorption de l'eau du fait d'un trajet optique très faible, environ un à deux microns.

Comme toute spectroscopie d'absorption, la spectroscopie infrarouge repose sur la capacité d'une molécule à absorber partiellement et sélectivement un rayonnement lorsqu'elle est soumise à une radiation du fait que les liaisons chimiques qui la constituent se comportent comme des oscillateurs anharmoniques (une liaison n'est pas parfaitement élastique). Si la composante électrique de l'onde lumineuse oscille à la même fréquence, celle-ci pourra transmettre son énergie à la liaison. Plus précisément, un rayonnement de fréquence donnée pourra être absorbé ce qui portera la liaison à l'état excité, caractérisé par une amplitude de vibration plus élevée. De ce fait, l'intensité du rayonnement IR transmis se retrouve diminuée pour cette fréquence ; ceci conduit à l'apparition d'une bande d'absorption à cette fréquence. L'énergie absorbée ( $\nu_0$ ) dépend donc du groupe chimique considéré (Figure 15).

Dans le cas où il n'y a pas de dipôle permanent, c'est-à-dire si les charges électriques sont parfaitement symétriques, il n'y aura pas de couplage possible avec l'onde électromagnétique. Il n'y aura donc aucune absorption d'énergie. Les molécules non polaires sont «transparentes» dans l'IR, on parle de vibration inactive. Une vibration active en IR possède donc nécessairement un dipôle dont le module fluctue avec la distance inter-atomique.



**Figure 15: Potentiel anharmonique et niveaux d'énergie vibrationnelle (courbe de Morse).**

Le spectre IR est ainsi constitué de nombreuses bandes d'absorption. En transmission, il représente pour chaque longueur d'onde  $\lambda$ , le rapport T des intensités transmises appelé transmittance:

$$\text{Transmittance} \longrightarrow T = \frac{I_{\text{éch}}}{I_0}$$

Intensité transmise en présence d'échantillon

Intensité transmise sans échantillon

En absorption, mode utilisé largement en biologie du fait de l'additivité de l'absorbance, le signal sera présenté sous la forme suivante :

$$\text{Absorbance} \longrightarrow A = \text{Log}\left(\frac{1}{T}\right)$$

Transmittance

Sur le spectre infrarouge, on préfère exprimer la longueur d'onde par le nombre d'onde  $\bar{\nu}$  (inverse de la longueur d'onde exprimé en  $\text{cm}^{-1}$ ), car celui-ci est directement proportionnel à l'énergie d'après la relation:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} = hc\bar{\nu}$$

Avec :

- $h$ : constante de Planck,  $6,62 \cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$
- $c$ : vitesse de la lumière,  $3 \cdot 10^8 \text{ m/s}$
- $\nu$ : fréquence de la radiation en Hz
- $\bar{\nu}$ : nombre d'onde en  $\text{cm}^{-1}$

La position d'une bande dépend à la fois de la nature du vibreur mais aussi de son environnement. Les liaisons entre atomes légers vibrent à plus haute fréquence que les liaisons entre atomes plus lourds. Lorsque la masse réduite  $\mu$  augmente, la fréquence  $\nu$ , diminue, selon la loi de Hook :

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad \mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2}$$

Avec :  
 $\mu$  : Masse réduite  
 k : Constante de rappel de la liaison,  
 $m_1$  et  $m_2$  : masse des atomes liés.

L'intensité de la bande dépend de la concentration, mais aussi de la nature et de la polarité de la liaison. De même, de nombreux facteurs externes ou internes à la molécule ont une influence sur la fréquence de vibration : taille et électronégativité des atomes environnants, liaisons hydrogène, effet stérique, conformation... Ces effets doivent être considérés comme un avantage, car ils permettent une plus grande sélectivité et donc facilitent l'identification spectrale. Toutefois, ils contribuent à une relation moins univoque entre densité optique et concentration puisqu'ils affectent le coefficient d'extinction molaire du chromophore. C'est pour cette raison qu'en spectroscopie infrarouge on parle de *pseudo* loi de Beer-Lambert, les comparaisons d'intensité ne pouvant se faire qu'au sein d'échantillons similaires. D'une manière plus générale, on basera l'exploitation des résultats d'avantage sur des rapports d'intensité plutôt que sur des valeurs absolues.

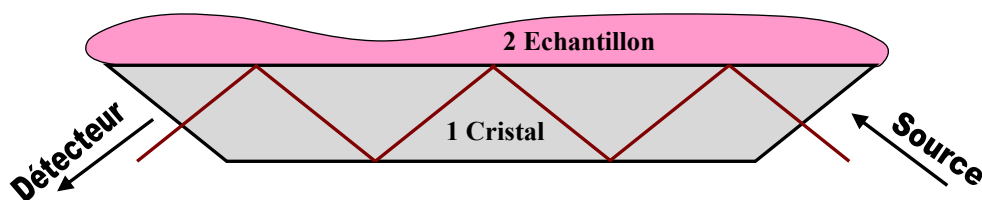
De ce fait, tout échantillon possèdera, en spectroscopie infrarouge, une signature qui lui est propre, et rien qu'en se basant sur son spectre il est possible de tirer des informations qualitatives en se referant à des tables IR permettent d'attribuer les absorptions aux différents groupes chimiques en présence et donc d'identifier la ou les molécules présentes, ainsi que des informations quantitatives quant à la concentration des groupements chimiques en se referant à la loi de Beer-Lambert.

### ***Mode de réflexion totale atténuée***

La réflexion totale atténuée, ou ATR, est essentiellement utilisée pour l'étude de produits liquides ou pulvérulents, ainsi que pour celle des produits dont la surface est aisément déformables. Elle est particulièrement bien adaptée aux échantillons opaques (liquides, cristaux liquides visqueux, fibres textiles...) ou à ceux qui se présentent sous la forme de films de faible épaisseur. L'échantillon doit présenter une bonne surface de contact avec le

cristal d'ATR. Cette méthode réalise en effet un « échantillonnage optique » et permet d'étudier sans préparation des produits très absorbants, telles que les solutions aqueuses.

Le principe de l'ATR est présenté dans la Figure 16. L'échantillon est placé à la surface d'un cristal à l'intérieur duquel le rayon lumineux subit de nombreuses réflexions selon le principe du guide d'onde. La réflexion totale atténuée repose sur l'existence d'une onde évanescente localisée sur la *peau* du cristal dont l'intensité maximale est à l'interface d'un prisme d'indice de réfraction élevé et d'un échantillon d'indice plus bas. Au dessus de l'interface une onde est produite, qui décroît exponentiellement quand la distance à l'interface augmente. Une telle onde, en interagissant avec l'échantillon absorbant, subit une *atténuation* de son intensité aux longueurs d'onde correspondant aux bandes d'absorption. Quand un échantillon est placé à la surface du prisme, une partie de la radiation est donc sélectivement absorbée. L'amplitude du champ électrique décroissant à l'intérieur de l'échantillon, ce mode d'acquisition ne permettra de détecter que les chromophores se trouvant dans les tous premiers microns de la surface. Le phénomène de réflexion totale atténuée permet donc uniquement d'examiner la surface de l'échantillon étudié. Pour des échantillons de taille supérieure à 4-5  $\mu\text{m}$ , le spectre devient indépendant de l'épaisseur de l'échantillon et n'est caractéristique que de la surface en contact avec le cristal ATR. De plus, puisqu'une seule interface est mise en jeu, il ne peut y avoir de création de franges d'interférence (comme c'est le cas de la transmission par exemple), ce qui facilite l'acquisition et l'analyse des spectres obtenus.



**Figure 16 : Principe de la réflexion totale atténuée.** 1. Cristal trapézoïdal disposé horizontalement, des miroirs sont placés de part et d'autre du cristal de manière à focaliser la lumière d'entrée et à collecter le rayon sortant du dispositif ; 2. Echantillon analysé

Ce dispositif est généralement commercialisé par de nombreux fabricants de spectromètre à transformée de Fourier. Deux éléments principaux interviennent dans le choix du cristal pour une application donnée (Coates, 1993):

- ❖ Nature du matériau qui compose le cristal (Sélénure de Zinc ZnSe, Germanium Ge) puisque de son indice de réfraction  $n$ , dépend la distance de pénétration du rayonnement infrarouge



- ❖ Nombre de réflexions internes de la lumière qui est fonction de l'agencement du système qui sera déterminant pour l'absorbance absolue : plus le nombre de réflexions est important, plus l'absorbance sera grande, toutes choses égales par ailleurs
- ❖ L'angle d'incidence  $\theta$  (typiquement 45 ou 60°) de l'entrée du rayonnement dans le cristal qui influencera la distance de pénétration du rayonnement dans l'échantillon.

### ***Méthode d'acquisition***

Durant cette étude, l'acquisition des spectres a été réalisée à l'aide d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier Protégé 460 (Thermo-Nicolet, USA), dans le domaine spectral du moyen infrarouge (MIR), qui s'étend de 4000  $\text{cm}^{-1}$  à 400  $\text{cm}^{-1}$  (2,5  $\mu\text{m}$  à 25  $\mu\text{m}$ ) avec le mode de réflexion totale atténuée ATR par l'utilisation de deux dispositifs:

- ❖ Microscopie ATR avec micro-cristal de Germanium (Ge). Nous avons utilisé le microscope Continuum (Thermo-Nicolet, USA) équipé d'un cristal de germanium (Ge). Ce cristal est à simple réflexion avec un angle d'incidence de 45° et convient donc mieux à l'étude d'échantillons très absorbants. Son indice de réfraction est de 4. Il convient pour des échantillons de petite taille car le diamètre de contact cristal/échantillon est de 50  $\mu\text{m}$ .
- ❖ ATR horizontal en Séléniure de Zinc (ZnSe). Nous avons utilisé un cristal parallélépipédique d'indice de réfraction 2,4, avec un angle d'incidence constant de 45°, le rayonnement IR pénètre d'environ une demi longueur d'onde dans l'échantillon à chaque réflexion. L'absorption résulte d'environ 10 réflexions. Il convient aux échantillons de la dimension du cristal de ZnSe (5 cm x 1 cm) pour obtenir un spectre présentant un bon rapport signal/bruit.

### ***Préparation des échantillons pour analyse en FTIR :***

Après avoir suspendu les cellules microbiennes dans le milieu d'adhésion présentant des propriétés physico-chimiques diverses (selon le protocole décrit dans le paragraphe 1.2. du chapitre II), la suspension microbienne est partagée dans plusieurs cuves stériles. Après un certain temps d'adaptation au nouvel environnement, les cellules microbiennes planctoniques (*i.e.* libres) sont récupérées par centrifugation, et déposées directement sur le cristal ATR horizontal pour l'analyse IR. Le nombre des cuves dépend des temps de contact qu'on désire étudier, puisque l'on ignore, *a priori*, le temps nécessaire pour l'adaptation bactérienne.

### *Traitement de données d'infrarouge: Analyse en composante principale*

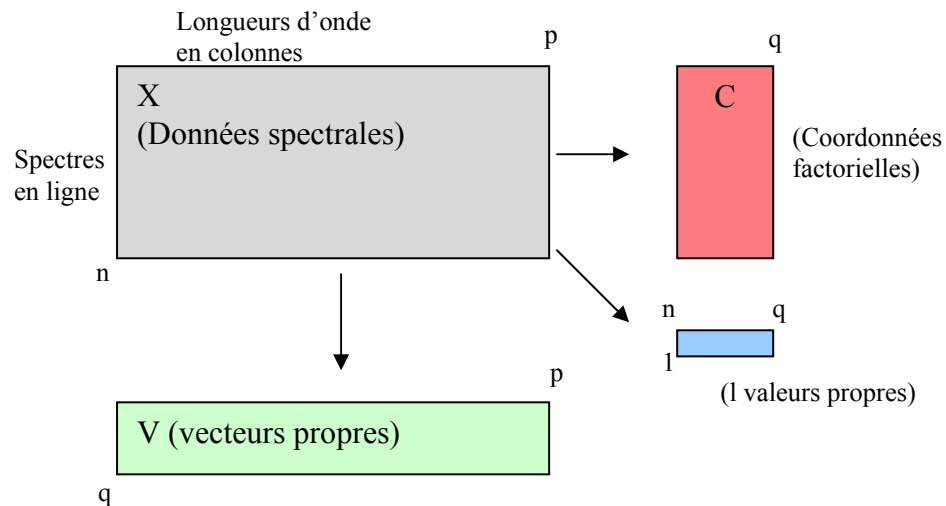
L'analyse en composante principale (ACP) (Figure 17) est particulièrement bien adaptée à l'étude exploratoire des données spectrales. Cette méthode donne une représentation synthétique et visuelle. Elle permet d'obtenir des cartes factorielles ou cartes de ressemblances dans lesquelles chaque spectre est représenté par un point sur un graphique à deux (voire trois) dimensions. Cette méthode permet d'apprécier les différences ou les ressemblances entre les spectres.

Cette technique analytique permet également d'établir un « model spectral linéaire » dans lequel chaque spectre est décrit comme étant une somme linéaire de spectres élémentaires sous-jacents, qui sont souvent interprétables. Elle permet aussi de remplacer les variables d'origine (absorbances), fortement redondantes, par des variables synthétiques, les composantes principales, qui contiennent la quasi-totalité de l'information, et qui ont l'avantage d'être non corrélées, ou orthogonales, entre elles. Elle permet aussi la condensation de la collection spectrale dans des proportions très importantes : trois à dix composantes sont en général largement suffisantes pour résumer l'information utile, et la taille de la matrice des données peut être réduite par un facteur compris entre 10 et 100. Les données condensées par l'ACP peuvent servir de variables de base à d'autres traitements statistiques supervisés ou non tels que la régression ou l'analyse discriminante. L'orthogonalité des variables rend les calculs numériques très simples et plus fiables (Bertrand & Dufour, 2000; Rouessac, 1998; Jackson & Mantsch, 1996; Naumann, 2000).

L'ACP procède en plusieurs étapes : il faut établir au début la matrice  $X$  qui représente les  $n$  spectres testés à  $p$  longueurs d'ondes. Dans cette matrice, le spectre moyen a été préalablement soustrait de chaque spectre de départ. Puis, on calcule le produit des matrices :  $X_t.X$ , où  $X_t$  représente la transposée de la matrice  $X$ . Le produit de ces matrices (matrice  $pp$ ), est ensuite diagonalisé. C'est ainsi que l'on obtient  $p$  valeurs propres associées à  $p$  vecteurs propres.

Les valeurs propres constituent une nouvelle représentation des spectres de départ, non plus dans une base en longueurs d'onde mais dans une base en vecteurs propres. Plus la valeur propre est grande, plus la contribution du vecteur propre qui lui est associé est importante. En fait, chaque spectre de départ est, une combinaison linéaire des vecteurs propres. Le principe de l'ACP consiste alors à représenter les coefficients sur un graphique où chacune des dimensions correspond à un vecteur propre. Généralement, on choisit deux vecteurs propres correspondant aux deux valeurs propres les plus élevées. Les spectres peuvent ainsi être

regroupés ou non (segmentation des données), logiquement, en fonction d'un ou des paramètre(s) qui les différencie (nt) ou les rapproche (nt). L'ACP établit donc un modèle linéaire de décomposition spectrale qui peut avoir un sens pour le spectroscopiste. Les vecteurs propres apparaissent, en effet, comme étant analogues à des spectres de produits purs. L'ACP permet ainsi une analyse rapide d'échantillons, sans avoir besoin d'attribuer les bandes d'absorption.



**Figure 17: Structure des données intervenant dans l'analyse en composantes principales.** La matrice X des données spectrales comporte en ligne les n spectres disponibles, et en colonne les mesures spectrales aux p longueurs d'onde de mesure. Par ACP on calcule des coordonnées factorielles, regroupées dans une matrice C comprenant n lignes et q colonnes, q étant normalement beaucoup plus petit que p. cette matrice condense la plus grande part de l'information initialement contenue dans la matrice X. une ligne i de C est donc un résumé de l'information du spectre i de la matrice X. Les composantes principales sont classées selon leur importance décroissante : la première colonne C véhicule, en principe, une information plus importante que la dernière. L'importance relative des composantes est quantifiée par les valeurs propres de l'ACP, regroupées dans un vecteur l. Enfin, l'ACP permet le calcul de vecteurs propres, regroupés dans une matrice v, comprenant p lignes et q colonnes.

## V. Tests d'adhésion

Les tests d'adhésion permettent d'évaluer et de comparer le pouvoir d'adhésion des bactéries sur différentes surfaces analysées. Ils sont effectués dans un premier temps à 37°C dans les conditions dites « statiques ». Un test d'adhésion consiste à découper les supports testés en

surfaces de dimensions identiques (0,25 cm<sup>2</sup>) et à mettre l'ensemble en contact horizontal avec la suspension bactérienne préparée selon le protocole décrit dans le paragraphe I.2. du chapitre II, tout en gardant le rapport surface volume identique.

Le contact dure environ 120 min, ensuite la suspension bactérienne est éliminée, la surface est agitée doucement dans le milieu de suspension afin d'éliminer toute les bactéries qui n'ont pas adhéré et qui sont susceptibles de fausser les mesures de densité cellulaire adhéree. Chaque surface est examinée par observation (moyenne de 4 comptages) en MEB (*JSM 6460LV, Jeol, USA*) et par une observation supplémentaire en microscopie à épifluorescence (*BX60, Olympus, France*).

## **VI. Mesure des densités cellulaires adhérees**

Comme cité auparavant, deux techniques d'observation microscopique sont utilisées pour l'analyse de la densité cellulaire adhéree sur chaque support. Généralement, l'utilisation d'une seule technique d'observation microscopique est intéressante puisque chacune présente des avantages particuliers par rapport à une autre. Dans notre cas, le MEB était avantageux pour faire les comptages pour les supports où l'adhésion était très importante, ou pour observer d'éventuelles sécrétions extracellulaires (*slime*). En ce qui concerne la microscopie à épifluorescence, elle permet une estimation rapide de la densité cellulaire adhéree dans le cas où celle-ci est faible vu son relativement large champ visuel (typiquement 700 x 400 µm) comparé au MEB (typiquement 100 x 100 µm).

### **VI.1 Préparation d'échantillon pour les observation en MEB**

Pour l'observation en MEB, les supports sont immergés, durant 1h, dans la glutaraldahyde (1%), 3 fois 3 minutes dans le PBS, successivement 15 min dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes 50,70, 90 et 100% et finalement gardés dans des boites de pétri stériles pour être ensuite observés en MEB.

### **VI.2. Numération des bactéries par microscopie à épifluorescence**

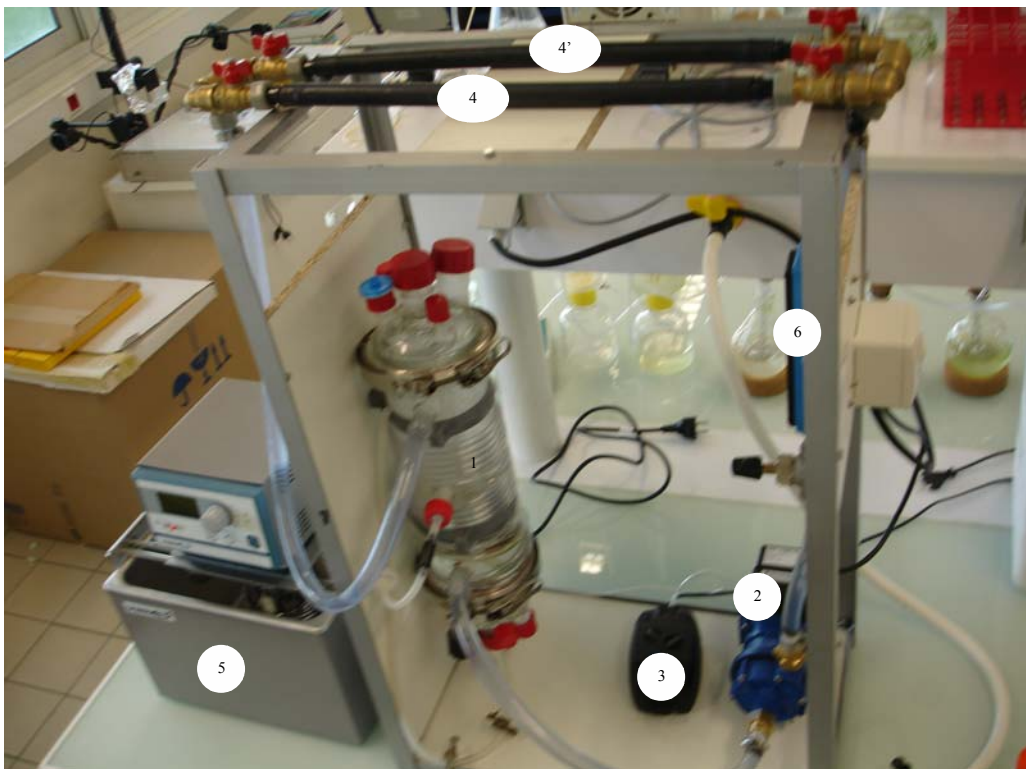
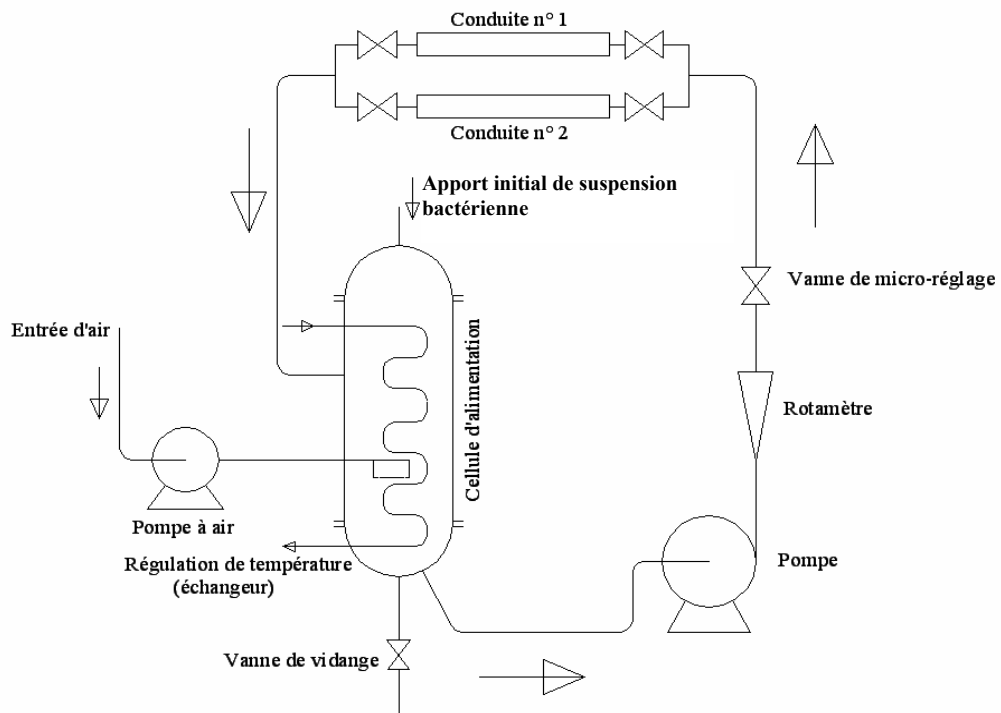
Avant d'être mises sous observation en microscopie à épifluorescence, la surface à observer doit être marquée par le DAPI. Le DAPI (di Aminido Phenyl Indol) est un intercalant de l'ADN qui permet de visualiser les bactéries par la microscopie à épifluorescence et donc de quantifier la densité cellulaire adhéree à la surface d'un support. Le microscope utilisé est un BX60 (*Olympus, France*) proche d'un microscope ordinaire mais munis d'un système de jeu de filtre qui consiste en un filtres dichroïque logé dans un cube contenant en outre deux filtres,

l'un à l'émission et l'autre à l'excitation. Ce filtre dichroïque réfléchit l'onde lumineuse d'excitation (courtes longueurs d'onde) et transmet les plus élevées correspondant à l'émission. Le filtre d'excitation associé au cube U-MWU (*Olympus, France*) sélectionne des longueurs d'onde d'excitation de 300 à 385 nm. Le DAPI possède un couple excitation/émission de 372/456 nm. La lumière émise par les molécules de DAPI excitées, traverse le miroir dichroïque vers l'oculaire. Un aliquote de 4  $\mu$ L de DAPI préalablement conservé à 4 degré est déposé sur la surface du support à observer, l'observation est effectuée après 5 min d'action du fluorophore avec un grossissement 100 et 400.

## **VII. Etude en « dynamique » de la formation des biofilms**

### **VII.1. Description de l'installation pilote**

Pour l'étude en « dynamique » de la formation des biofilms, il a été nécessaire de concevoir un système qui permette de moduler les facteurs physico-chimiques susceptibles d'affecter la formation des biofilms dans les réseaux de distribution. Pour ce faire, un bioréacteur a été spécialement conçu par le département du Génie des Bioprocédés de l'IUT de Lorient, antenne de Pontivy (Figure 18). Ce système contient un réservoir de stockage de 3 litres utiles muni d'un robinet de soutirage pour effectuer des prélèvements en cours d'expérience et suivre ainsi d'éventuelles évolutions des propriétés physico-chimiques de la suspension bactérienne. Ce réservoir, permet de réguler la composition et les propriétés du mélange de départ, il est relié à sa base à une pompe hydraulique qui assure la circulation de la suspension bactérienne vers les canalisations d'eau potable testées (deux canalisations en PEHD montées en parallèles de 40 cm de long et de 14 mm de diamètre, limitées aux extrémités par des vannes d'isolation), en passant par un rotamètre qui assurera le réglage et le contrôle du débit, avant qu'elle fasse le retour au réservoir (circuit fermé). La régulation de la température se fait à l'aide d'un serpentín enroulé à l'extérieur du bioréacteur dans lequel circule une eau thermostatée par un système à bain (*1127P, VWR®, USA*). La température de ce bain est fixée grâce à un étalonnage préalable de manière à obtenir la température voulue dans le bioréacteur. L'aération et l'homogénéisation de la suspension bactérienne au sein du réservoir sont assurées par l'injection d'air filtré. La formation du biofilm au niveau des canalisations et dans les conditions physico-chimiques, microbiologiques et hydrauliques désirées dure une semaine avant de procéder à son analyse.



**Figure 18 : Pilote pour l'étude en dynamique de la formation des biofilms dans les canalisations d'eau potable.** 1. réservoir de stockage; 2. pompe hydraulique; 3. pompe pour injection d'air; 4 et 4'. Canalisation en PEHD; 5. système à bain.

## VII.2. Marquage du biofilm au Dead/Live et au DAPI

Afin de pouvoir examiner le biofilm formé à la surface des canalisations et évaluer son architecture et organisation, un mode d'observation tridimensionnel est nécessaire. Pour cela, un microscope confocal (*LSM 510 Zeiss, Allemagne*) équipé d'un laser argon monté sur un microscope inversé Zeiss Axiovert 200M (*Carl Zeiss, Allemagne*) a été utilisé. Une autre information primordiale pour cette étude est de pouvoir quantifier le taux de mortalité dans des conditions données. Pour cela, le support sur lequel le biofilm s'est développé au bout d'une semaine est marqué par le kit Dead/Live (*Molecular Probes Inc., USA*) qui consiste en un mélange 1/1 de deux fluorophores (Syto9 et iodure de propidium) se fixant sur l'ADN, ce marquage est basé sur l'intégrité physique des membranes, *i.e.* l'existence d'un potentiel transmembranaire, permettant de distinguer les bactéries vivantes des mortes par une coloration différente. Les bactéries vivantes apparaissent vertes suite à l'action du fluorophore Syto9 ( $\lambda_{exc}=458$  nm ;  $\lambda_{Emi}=475$  nm) et les mortes apparaissent rouges grâce à l'action de l'iodure de propidium ( $\lambda_{exc}=514$  nm ;  $\lambda_{Emi}=570$  nm). En effet l'iodure de propidium ne peut pénétrer que si le gradient transmembranaire est effondré. La fluorescence du Syto9 est alors totalement transférée vers l'iodure de propidium qui donne donc une fluorescence rouge.

Une observation supplémentaire en microscopie à épifluorescence est également effectuée après un marquage par le DAPI qui permet, comme précédemment noté de quantifier la densité de cellules adhérentes sur les supports testés.

## VII.3. Analyse en infrarouge

Le biofilm formé à l'intérieur des canalisations, en mode dynamique, est prélevé par écouvillonnage des surfaces, et déposé immédiatement sur le cristal ATR en ZnSe décrit précédemment pour être analysé en infrarouge.

---

# **Chapitre III**

## **Approche prédictive de l'adhésion dans les réseaux d'eau potable**

---



## **Chapitre III**

### **Approche prédictive de l'adhésion dans les réseaux d'eau potable**

Bien que les mécanismes fondamentaux qui régissent l'adhérence bactérienne soient encore mal compris et n'aient donc pas été complètement définis, il est admis que les propriétés physico-chimiques de la membrane bactérienne et celles des supports d'adhésion sont des facteurs déterminant de l'adhésion initiale (van Oss *et al.*, 1986 ; Bellon-Fontaine *et al.*, 1990 ; Bos *et al.*, 1999 ; Hamadi *et al.*, 2004 ; Gallardo Moreno *et al.*, 2002 ; Bayouhd *et al.*, 2006).

Plusieurs modèles théoriques ont été proposés pour prédire le phénomène d'adhésion de particules colloïdales aux surfaces, dont l'approche de DLVO développée par van Oss qui considère trois types d'interactions physico-chimiques responsables de l'adhésion initiale : van der Waals, acido-basiques et électrostatiques. Ce chapitre traite de la capacité de ce modèle à prédire l'adhésion bactérienne à différents supports utilisés pour l'adduction d'eau potable, en simulant la bactérie par une particule colloïdale. Ceci peut constituer un outil d'aide à la prise de décision pour la sélection de matériaux peu propices à la colonisation microbienne dans les réseaux d'eau potable. Ce chapitre constitue également une contribution à la compréhension des mécanismes impliqués dans le processus d'adhésion bactérienne aux supports, à travers l'évaluation du pouvoir d'adhésion de deux bactéries de propriétés physico-chimiques (charge de surface, hydrophobicité...) différentes à plusieurs supports différant par leur nature chimique. L'évaluation de l'adhésion dans deux milieux de force ionique différente permettra d'évaluer l'importance relative des différents types d'interactions, y compris la composante électrostatique durant les étapes de la bioadhésion.

## **II.1. Matériels et méthodes**

*P. aeruginosa* (ATCC27853) et *E. coli* (ATCC25922) sont les modèles biologiques utilisés pour la réalisation de l'objectif de ce chapitre; leur adhésion a été testée sur différents supports en plastique utilisés pour l'adduction d'eau potable au Maroc : Polychlorure de vinyle (PVC), polypropylène (PPR), poly éthylène haute densité (PEHD) et le poly éthylène réticulé (PEX) en utilisant deux méthodes :

- ❖ La mesure des énergies d'adhésion, qui nécessite la caractérisation physico-chimique des modèles biologiques et des supports testés par la technique d'angle de contact. La caractérisation des supports testés par cette technique a été réalisée après leur

nettoyage et désinfection (*vide supra*); pour les souches bactériennes, la préparation d'un tapis bactérien (par la filtration de la suspension bactérienne concentrée dans un milieu de propriétés physico-chimiques définies) est nécessaire.

- ❖ Les tests d'adhésion, qui consistent à immerger les différents supports testés (nettoyés et désinfectés) dans une suspension bactérienne durant un temps donné et à mesurer la densité de surface des cellules ayant adhéré au support grâce à des observations MEB et/ou par épifluorescence.

La suspension bactérienne a été préparée selon le protocole décrit précédemment en utilisant deux milieux de suspension différant par leur force ionique de part l'ajout de quantités croissantes de NaCl. Le pH est ajusté à 7,5 par ajout de NaOH ou de HCl. Les concentrations de chlorure de sodium testées sont 5 mM et 50 mM.

## II.2. Résultats et discussions

### II.2.1. Caractérisation des supports d'adhésion

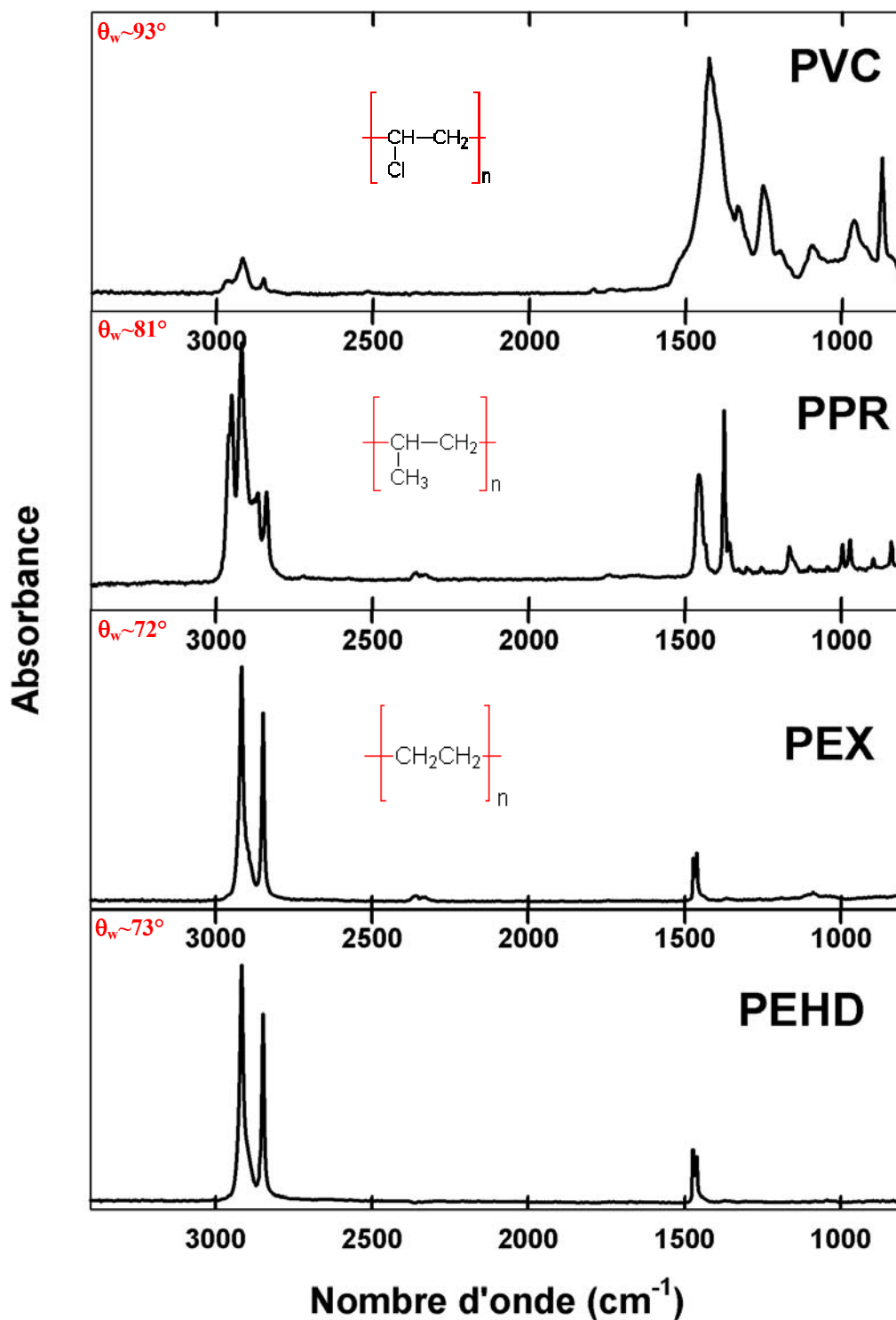
Considérant les angles de contact de l'eau avec les différents supports résumés dans le Tableau 4, en tant que moyen d'évaluer l'hydrophobicité, on constate que, contrairement au verre, tous les supports en plastique présentent un caractère hydrophobe d'après leur grand angle de contact avec l'eau.

Tous les supports présentent un caractère donneur d'électrons  $\gamma^-$  significatif, le caractère accepteur d'électrons  $\gamma^+$  étant négligeable devant ce dernier. Le caractère donneur d'électrons est faible pour le PVC, moyen pour le PPR, PEX et PEHD et important pour le verre.

**Tableau 4: Angle de contact en degré ( $\pm 2^\circ$ ) et composantes énergétiques ( $\pm 1 \text{mJ/m}^2$ ) de surface de différents matériaux utilisés pour la fabrication des conduits d'adduction d'eau potable, du verre ainsi que ceux de l'eau. DM : diiodométhane ; W : eau ; FA : formamide.**

Matériau	Angle de contact ( $^\circ$ )			Composantes énergétiques de surface ( $\text{mJ/m}^2$ )				
	DM	W	FA	$\gamma^{\text{total}}$	$\gamma^{\text{lw}}$	$\gamma^{\text{AB}}$	$\gamma^+$	$\gamma^-$
PPR	37,4	81,3	68,7	46,3	40,9	5,4	0,7	10,4
PEX	35,1	71,5	55,1	42,2	42	0,3	0	12,5
PEHD	43,1	73,3	66,9	44,5	38	6,4	0,6	18,7
PVC	38,6	92,5	76,4	45,1	40,3	4,8	1,3	4,6
Verre	41,3	39,7	53,3	49,2	39	10,3	0,4	58,6
Eau <sup>b</sup>	—	—	—	72,8	21,80	51,00	25,5	25,5

<sup>b</sup> d'après Van Oss *et al.* (1988)



**Figure 19 :** Spectres FTIR-ATR des surfaces internes des canalisations utilisées. Les spectres ont été collectés par microspectroscopie IR à l'aide d'un cristal de *Ge* simple réflexion. Dans ces conditions, la distance de pénétration du rayonnement vaut 0,8 μm à 2850 cm<sup>-1</sup> et 1,4 μm à 1000 cm<sup>-1</sup>. Les chiffres à gauche (θ<sub>w</sub>) représentent la valeur de l'angle de contact avec l'eau pour chaque matériau.

Le caractère fortement hydrophobe des matériaux utilisés est bien sûr en relation avec leur composition chimique. Pour tenir compte de la variabilité liée à la fabrication des plastiques, nous avons collecté les spectres IR en mode ATR des surfaces internes des canalisations. Compte tenu des caractéristiques du mode ATR, les spectres présentés Figure 19 reflètent les groupements exposés à la surface et présents sur une épaisseur d'environ 1  $\mu\text{m}$ . Le Tableau 5 récapitule les principaux modes vibrationnels présents dans les spectres de la Figure 19.

**Tableau 5 : Attribution des bandes d'absorption correspondant aux spectres des plastiques utilisés.**  
(Ramesh *et al.*, 2006 ; Deshmane *et al.*, 2007)

Modes vibrationnels	Positions ( $\text{cm}^{-1}$ )		
	PVC	PPR	PE
$\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$	2964	2960	
$\nu_{\text{s}}\text{CH}_3$	2916	2920	2916
$\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$		2867	
$\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$	2852		2848
$\delta_{\text{as}}\text{CH}_3$		2838	
$\delta_{\text{as}}\text{CH}_2$			1472
			1462
$\delta_{\text{as}}\text{CH}_3$		1456	
	1418 ?	1435	
$\delta_{\text{s}}\text{CH}_3$		1375	
$\delta_{\text{as}}\text{CH}_3$		1360	
$\delta_{\text{as}}\text{CH}_2$	1323		
CH balancement	1251		
<i>trans</i> CH hochement	960		
$\delta\text{C-Cl}$	873		

Il a également été nécessaire d'estimer l'effet des sels sur les propriétés énergétiques de l'eau pure puisqu'ils interviennent dans la mesure de l'énergie d'adhésion. Le Tableau 6 montre la tension de surface de l'eau pure et également de solutions de NaCl à 5 et 50 mM. On observe que, dans cette gamme de concentration, l'addition de sel a un effet mineur sur la tension de surface de l'eau pure. Par conséquent, afin de simplifier les calculs, l'effet du sel sur la tension superficielle de l'eau a été considéré comme négligeable dans la suite des résultats présentés.

**Tableau 6: Effet de la concentration saline sur la tension de surface de l'eau**

[NaCl] (mM)	$\gamma^{\text{total}}$ ( $\text{mJ}/\text{m}^2$ ) $\pm 0,03$
0	72,80 <sup>a</sup>
5	72,03 <sup>b</sup>
50	72,07 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> d'après van Oss *et al.* (1988); <sup>b</sup> nos essais

## II.2.2. Caractérisation des souches bactériennes

### *Caractérisation biologique*

Le Tableau 7 présente quelques caractéristiques biologiques des modèles biologiques utilisés. Visiblement, *P. aeruginosa* paraît mucoïde et produit beaucoup de polymères organiques constituant des filaments très denses et condensés dans un milieu LB, contrairement à *E. coli* qui paraît moins mucoïde. Cet aspect mucoïde et filamenteux disparaît avec le lavage des cellules lors de la préparation de la suspension bactérienne, ce qui démontre que la matrice organique secrétée par la bactérie est soluble dans le milieu aqueux. La durée de la phase exponentielle et le temps de génération sont déduits de la courbe de croissance établie en effectuant des mesures de densité optique de la culture bactérienne sur une durée de 10h.

Tableau 7: Caractérisation microbiologique de *P. aeruginosa* et *E. coli*. Milieu LB à 37°C

Caractéristique \ Bactérie	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
Gram	Négatif	Négatif
Mobilité	Flagelle	Flagelle
Mucoïde	oui <sup>a</sup>	non <sup>a</sup>
Type de respiration	aérobique stricte	aérobique, anaérobique facultative
Durée de la phase exponentielle	~8 h <sup>a</sup>	~4 h <sup>a</sup>
Temps de génération	~70 min <sup>a</sup>	~40 min <sup>a</sup>

<sup>a</sup> nos essais

### *Caractérisation physico-chimique*

Selon les résultats présentés dans le Tableau 8, on remarque que *E. coli* présente un caractère hydrophile quelque soit la force ionique, ce caractère semble diminué très légèrement avec l'augmentation de la force ionique. Au contraire, *P. aeruginosa* paraît relativement hydrophobe, son hydrophobicité diminue avec l'augmentation de la force ionique. Il est également à noter que quelque soit la force ionique, *E. coli* et *P. aeruginosa* présentent toutes deux un caractère donneur d'électrons puisque  $\gamma^-$  est toujours largement supérieur à  $\gamma^+$ .

**Tableau 8: Effet de la force ionique sur l'angle de contact ( $\pm 4^\circ$ ) et les composantes énergétiques ( $\pm 2\text{mJ}/\text{m}^2$ ) de surface de *P. aeruginosa* et *E. coli* mises en suspension durant 1,5 h dans la solution.**

	[NaCl]	Angle de contact ( $^\circ$ )			Composantes énergétiques de surface ( $\text{mJ}/\text{m}^2$ )				
		DM	W	FA	$\gamma^{\text{total}}$	$\gamma^{\text{lw}}$	$\gamma^{\text{AB}}$	$\gamma^+$	$\gamma^-$
<i>E. coli</i>	5mM	71,4	16,2	20	58,7	22,1	36,6	6,4	52,7
	50mM	75,2	20,6	27,2	56,6	20	36,6	6,3	53,3
<i>P. aeruginosa</i>	5mM	83,5	64,5	73,2	22,2	15,7	6,5	0,3	37,4
	50mM	76,5	34,5	43,2	46,3	19,3	26,9	3,5	52,1

Le caractère donneur d'électrons de *P. aeruginosa* augmente avec l'élévation de la force ionique, celui d'*E. coli* n'est pratiquement pas affecté par ce changement. La prééminence du caractère donneur d'électrons peut constituer une indication sur la nature des groupements chimiques exposés, puisque l'importance du caractère donneur d'électrons est attribué aux groupements chimiques généralement chargés négativement ou neutres, comme les groupements carboxylates ( $\text{COO}^-$ ), les groupements amine ( $\text{NH}_2$ ) et phosphate ( $\text{PO}_4^-$ ) des phospholipides, lipoprotéines et les lipopolysaccharides (Rijnaarts *et al.*, 1995 ; Fontaine *et al.*, 1996 ; Briandet *et al.*, 1999b ; Rubio, 2002 ; Hamadi *et al.*, 2004). Le caractère accepteur d'électrons est généralement attribué aux groupements acides comme  $\text{RNH}_3^+$  (Rubio, 2002). Ce raisonnement est valable également pour les surfaces ; en effet, on s'attend à ce que les interactions électrostatiques répulsives soient plus importantes avec le verre, vu que celui-ci présente l'écart le plus important entre sa composante basique et acide.

### II.2.3. Mesure de l'énergie d'adhésion

En utilisant l'approche de DLVO développée par van Oss (van Oss *et al.*, 1986, 1994 ; Bos *et al.*, 1999 ; Gallardo Moreno *et al.*, 2002 ; Hamadi, 2005 ; Bayouhd *et al.*, 2006; Hadjiev *et al.*, 2007) , l'énergie totale (non électrostatique) d'adhésion d'*E. coli* et *P. aeruginosa* sur les différents supports testés ainsi que ses composantes acide-base (AB) et Lifshitz -van der Waals (LW) a été calculée (Tableau 9) grâce aux équations issues du model de van Oss (van Oss, 1994 ; Hadjiev *et al.*, 2007 ; Bellon-Fontaine *et al.*, 1990 ; Bayouhd *et al.*, 2006):

$$\Delta G^{Total} = \Delta G^{LW} + \Delta G^{AB} \quad (1)$$

$$\text{où : } \Delta G^{LW} = 2(\sqrt{\gamma_L^{LW}} - \sqrt{\gamma_B^{LW}})(\sqrt{\gamma_S^{LW}} - \sqrt{\gamma_L^{LW}}) \quad (2)$$

$$\text{et } \Delta G^{AB} = 2[\sqrt{\gamma_L^+}(\sqrt{\gamma_B^-} + \sqrt{\gamma_S^-} - \sqrt{\gamma_L^-}) + \sqrt{\gamma_L^-}(\sqrt{\gamma_B^+} + \sqrt{\gamma_S^+} - \sqrt{\gamma_L^+}) - \sqrt{\gamma_B^+ \gamma_S^-} - \sqrt{\gamma_B^- \gamma_S^+}] \quad (3)$$

**Tableau 9: Energie totale d'adhésion  $\Delta G^{Total}$  d'*E. coli* et *P. aeruginosa* aux différents matériaux testés et ses composantes Lifshitz - van der Waals  $\Delta G^{LW}$  et acide-base  $\Delta G^{AB}$ .  $\Delta G$  en mJ/m<sup>2</sup> ( $\pm 0,7$ mJ/m<sup>2</sup>)**

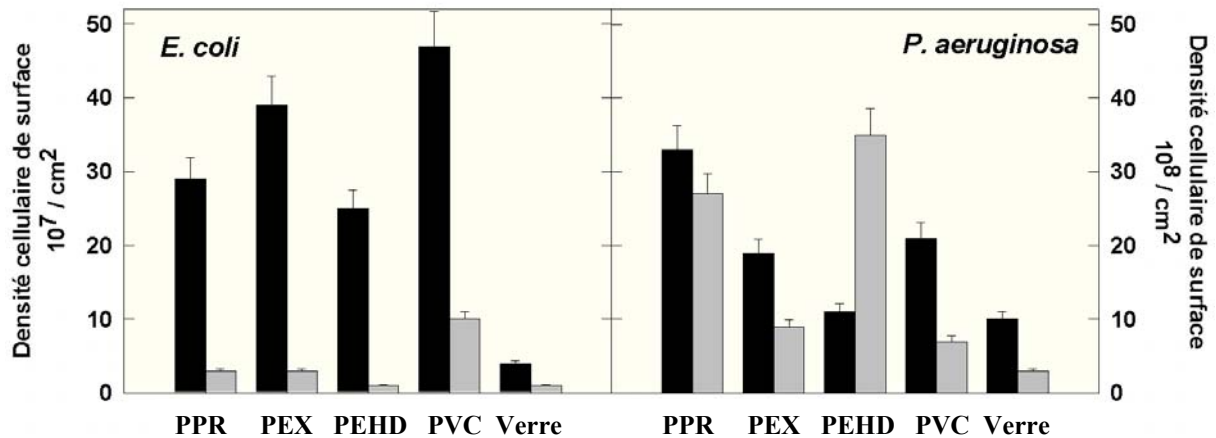
		5 mM NaCl			50 mM		
	Matériau	$\Delta G^{LW}$	$\Delta G^{AB}$	$\Delta G^{Total}$	$\Delta G^{LW}$	$\Delta G^{AB}$	$\Delta G^{Total}$
<i>E. coli</i>	PEHD	-0,1	15	15	0,7	16	16
	PPR		9	9		10	10
	PVC		3	3		3	4
	PEX		14	14		15	16
	Verre		33	33		33	34
	<i>E. coli</i>	0	22	22	-0,08	23	23
<i>P. aeruginosa</i>	PEHD	2,3	3	5	0,9	14	15
	PPR		-7	-5		7	8
	PVC		-18	-15		-2	-1
	PEX		-3	-0,3		12	13
	Verre		33	35		36	37
	<i>P. aeruginosa</i>	-1	19	18	-0,15	28	27

Il est à remarquer que la variabilité de l'énergie totale d'adhésion entre les différents supports est essentiellement due à sa composante acide-base (la variation de  $\Delta G^{LW}$  est négligeable). Par contre, la variation de la force ionique modifie principalement la composante liée aux interactions de van der Waals pour *E. coli*, alors que, c'est essentiellement la composante liée aux interactions acide-base qui subit un changement important pour *P. aeruginosa*.

Sachant que l'énergie d'adhésion est d'autant plus grande que l'adhésion devient défavorable, il devient possible de prévoir que l'adhésion sera maximale sur le PVC et minimale sur le PEHD. Ces prédictions sont à confronter aux résultats des tests d'adhésion. La plus ou moins bonne adéquation entre ces prédictions et les tests expérimentaux permettra de conclure sur la validité de l'approche de DLVO dans notre cas de figure.

## II.2.4. Tests d'adhésion

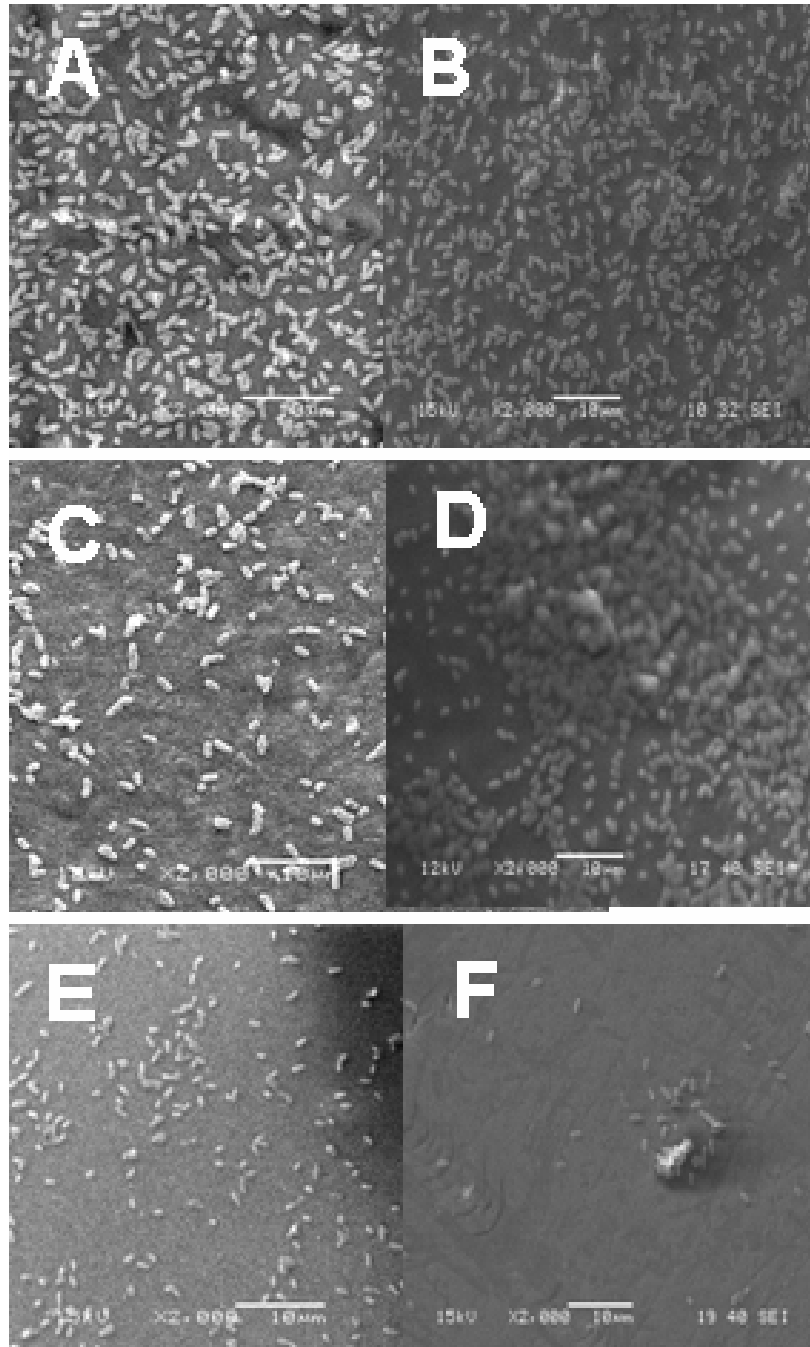
Des tests d'adhésion ont donc été réalisés dans ce sens. La densité bactérienne adhérente sur chaque support et dans chaque condition a donc été mesurée et corrélée ensuite aux énergies d'adhésion préalablement calculées.



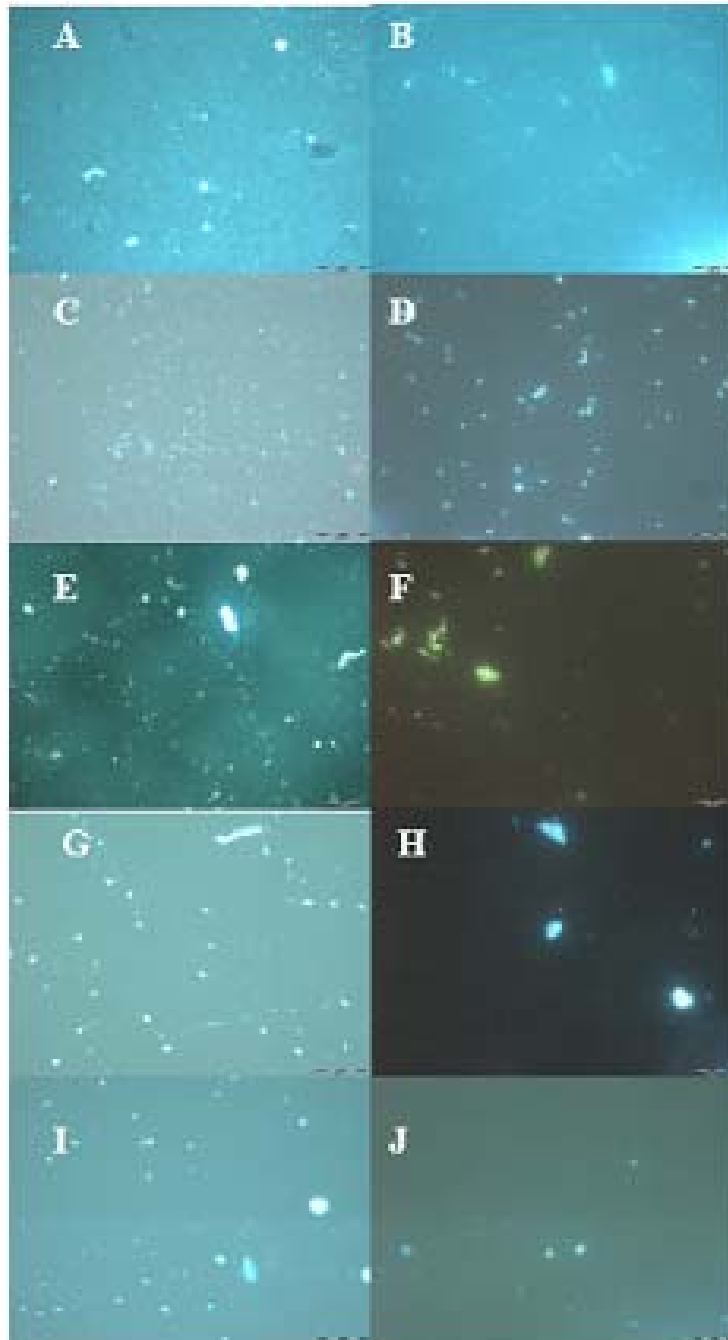
**Figure 20 : Tests d'adhésion d'*E. coli* et *P. aeruginosa* aux différents supports testés après 2 h de contact. ■ 5mM et ■ 50 mM de NaCl. Noter la différence d'échelle des ordonnées.**

Les résultats du test d'adhésion sont illustrés sur la Figure 20, les Figures 21, 22 et 23 montrent quelques photos prises pour la mesure des densités cellulaires adhérentes. On remarque que pour *E. coli*, quelque soit la force ionique, l'adhésion sur les différents supports testés décroît selon cet ordre : PVC>PEX>PPR>PEHD>Verre. L'adhésion de *P. aeruginosa* sur les différents supports est plus importante qu'*E. coli* d'un facteur 10 environ. De même, comme observé avec *E. coli*, l'adhésion sur les supports hydrophobes est largement plus importante que celle sur les supports hydrophiles, la densité cellulaire adhérente reste dépendante de la force ionique du milieu. A faible force ionique elle décroît selon cet ordre : PPR> PVC>PEX>PEHD> Verre et pour la force ionique élevée : PEHD>PPR>PEX> PVC>Verre.





**Figure 21: Photos MEB de la colonisation de *P. aeruginosa*; PPR à 5 mM (A) et 50 mM (B); PEHD à 5 mM (C) et 50 mM (D); Verre à 5 mM (E) et 50 mM (F).**



**Figure 22: Photos microscopie à épifluorescence de la colonisation d'E. coli à 50mM;** A: PVC 10X, B:40X ; C: PEX 10X, D: 40X; E: PPR 10X, F: 40X; G: PEHD 10X , H: 40X; I: Verre 10X ,J: 40X.

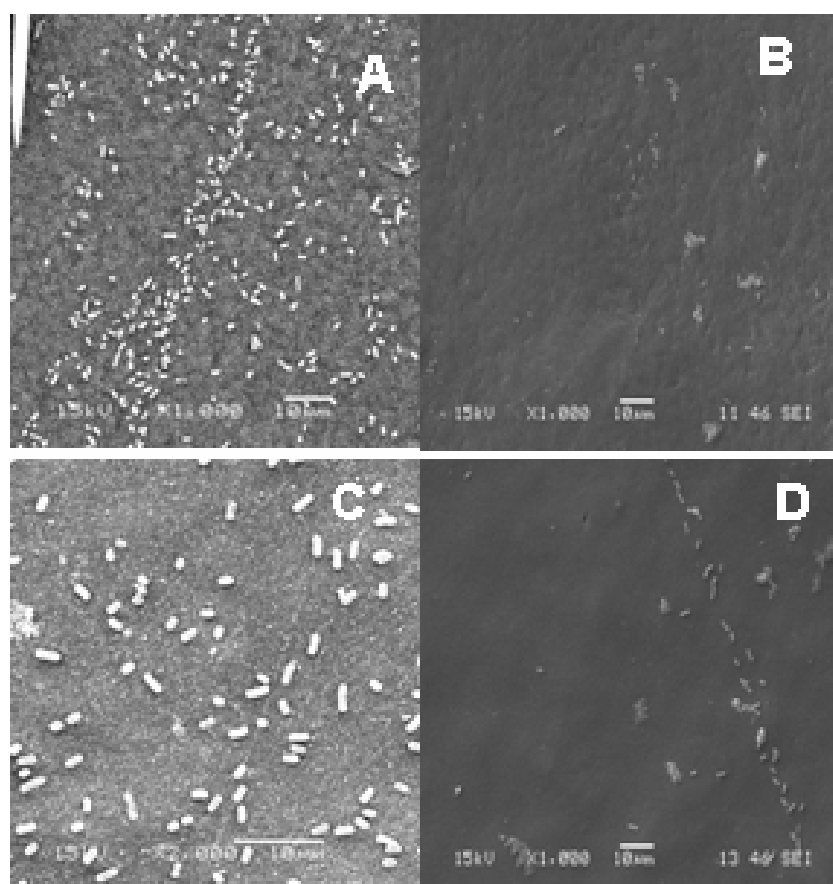


Figure 23: Photos MEB de la colonisation d'*E. coli*: PEHD à 5 mM (A) et 50 mM (B); PEX à 5 mM (C) et 50 mM (D). Barre = 10 µm

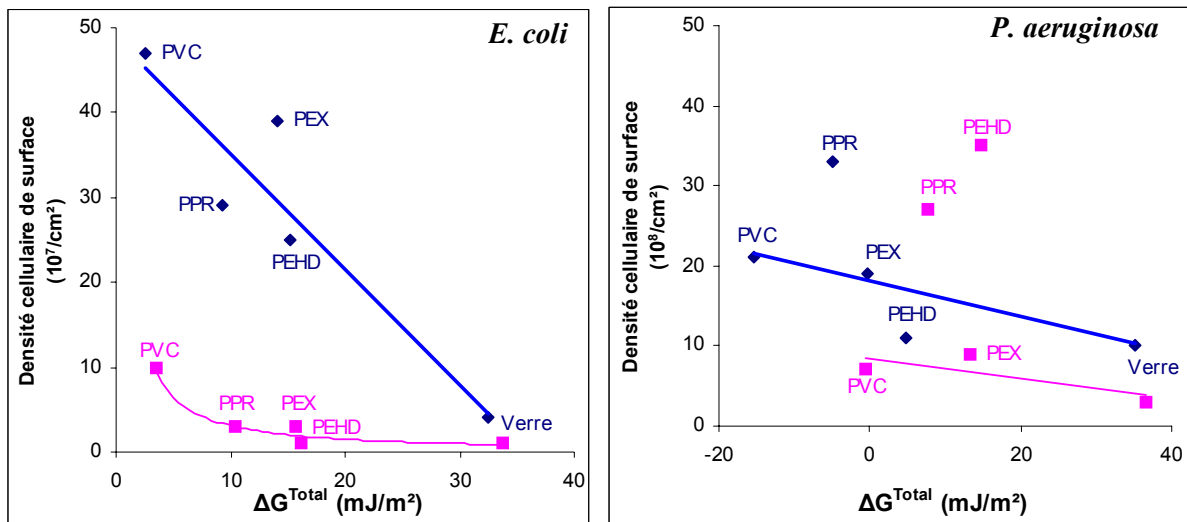
### II.2.5. Discussions

*Effet de l'hydrophobicité*; Certains auteurs considèrent que l'hydrophobicité de la surface bactérienne est le paramètre clé qui gouverne l'adhésion bactérienne aux supports inertes (Jana *et al.*, 2000 ; Cappello *et al.*, 2006). Nos résultats montrent que l'adhésion de *P. aeruginosa* est largement supérieure à celle d'*E. coli*, ce qui est en accord avec les travaux de plusieurs auteurs qui ont observé que l'adhésion des bactéries hydrophobes est généralement supérieure à celle des bactéries hydrophiles (Bruinsima *et al.*, 2001 ; Gallardo-Moreno *et al.*, 2002 ; Bayouhd *et al.*, 2006). Gallardo-Moreno *et al.* (2002) ont observé par exemple que pour deux souches de *Candida parapsilosis* isolées du sang, l'adhésion était proportionnelle au caractère hydrophobe de la souche et qu'un changement de température qui contribue à augmenter ce caractère hydrophobe favorise encore l'adhésion. Une autre étude du même auteur sur *Enterococcus faecalis* démontre que l'adhésion de cette bactérie est plus importante sur le silicone (hydrophobe) comparé au verre (hydrophile), cette adhésion étant potentialisée

par un changement de la composition du milieu de culture qui induisait une augmentation du caractère hydrophobe des souches bactériennes. Bruinsma *et al.* (2001) montrent également que sur deux types de lentilles de contact, l'une présentant un caractère hydrophobe et l'autre hydrophile, une souche hydrophobe (*P. aeruginosa*) adhère mieux qu'une souche hydrophile (*Staphylococcus aureus*). De même, Bayoudh *et al.* (2006) ont observé que *Pseudomonas stutzeri* (hydrophobe) adhère mieux que *Staphylococcus epidermis* (hydrophile) quelque soit l'hydrophobicité du support : hydrophobe (couche d'oxyde d'étain) ou hydrophile (verre). Nos résultats sont donc en accord avec ces données bibliographiques puisque l'adhésion de *P. aeruginosa* relativement hydrophobe est 4 à 100 fois plus importante qu'*E. coli* qui présente un caractère hydrophile. De même, l'adhésion aux substrats hydrophobes est 2 à 10 fois plus importante que le verre qui présente un caractère hydrophile. Il est important de signaler ici que même l'adhésion d'*E. coli* est plus importante sur les supports hydrophobes que sur le verre. Cependant, cette tendance doit être considérée avec circonspection puisque quelques auteurs ont observé dans certains cas que l'adhésion des bactéries hydrophobes est plus importante sur les supports hydrophobes et celle des bactéries hydrophiles est plus importante sur les supports hydrophiles (Bellon-Fontaine *et al.*, 1990). Ceci montre qu'il existe encore des controverses entre les différents auteurs à ce sujet. Ce type de contradictions existe jusqu'à l'heure actuelle dans ce domaine, car le phénomène d'adhésion ne peut pas être traité seulement en raisonnant par rapport à l'hydrophobicité, mais en prenant compte d'autres paramètres tels que les autres propriétés physico-chimiques des cellules bactériennes et des surfaces colonisables (caractère acide-base et charge globale des cellules bactérienne), qui constituent les principaux facteurs contrôlant l'adhérence initiale bactérienne. Il ne faut pas oublier en outre que ces propriétés sont elles-mêmes sensibles aux conditions physico-chimiques du milieu de suspension, au moins pour le partenaire bactérien (van Oss *et al.*, 1986 ; Bellon-Fontaine *et al.*, 1990 ; Bos *et al.*, 1999 ; Gallardo Moreno *et al.*, 2002 ; Hamadi *et al.*, 2004 ; Bayoudh *et al.*, 2006).

*Effet de la force ionique sur la bioadhésion d'E. coli*; L'augmentation de la concentration de NaCl par un facteur de 10 engendre une grande chute de la densité cellulaire adhérente quelque soit le matériau considéré. En revenant sur les valeurs de l'énergie libre d'adhésion ainsi que ses composantes (*cf* Tableau 9), on remarque que seul le terme  $\Delta G^{LW}$  varie lorsqu'on passe de 5 à 50 mM (elle devient positive), par contre la composante  $\Delta G^{AB}$  reste pratiquement inchangée et donc non déterminant dans l'effet de la force ionique. Il est également à remarquer que l'énergie totale d'adhésion entre les bactéries (*E. coli*- *E. coli*) diminue lorsque

la force ionique augmente, du fait de la diminution sa composante  $\Delta G^{LW}$  qui passe d'une valeur positive et faible à une valeur négative, tandis que  $\Delta G^{AB}$  reste pratiquement inchangée. A force ionique élevée, l'adhésion entre les bactéries serait donc favorisée au détriment des interactions bactérie-support. Cela peut favoriser la formation de flocs bactériens dont la cohésion peut être renforcée par la sécrétion d'une matrice exocellulaire. D'autre part, il est évident qu'une augmentation de la force ionique provoque une réduction des interactions électrostatiques répulsives par masquage des charges négatives prédominantes. Ceci doit donc naturellement favoriser l'adhésion, alors que c'est l'effet inverse qui est observé. On note cependant que la loi qui corrèle la densité cellulaire et le  $\Delta G^{Total}$  est significativement différente selon la force ionique : elle est hyperbolique à force ionique élevée et linéaire à force ionique faible. Cet effet doit certainement être du aux effets des interactions électrostatiques.



**Figure 24 : Corrélations entre la variation de l'énergie libre totale d'adhésion et densités cellulaires observées pour *E. coli* et *P. aeruginosa* à deux forces ioniques distinctes.**

◆5mM et ■50mM.

D'autre part, la force ionique (qui détermine l'importance des interactions électrostatiques) est intrinsèquement impliquée dans les interactions de van der Waals, puisque ces dernières mettent en jeu des dipôles issus de la polarisabilité moléculaire. Les forces résultantes sont par conséquent proportionnelles au module des dipôles  $\mu=q \cdot l$  et inversement proportionnelles à la constante diélectrique  $\epsilon$  du milieu environnant (Gerschel, 1995).

L'augmentation de la concentration saline induit une diminution du module des dipôles due à l'extinction des champs électriques engendrés par les charges dipolaires  $q$  et l'augmentation de la constante diélectrique  $\epsilon$  (la permittivité électrique augmente avec la force ionique). Il en

résulte une diminution des forces liées aux interactions de van der Waals ( $\Delta G^{LW}$  augmente). Pour récapituler, on peut considérer que dans le cas d'*E. coli*, la toute première étape de la bioadhésion, normalement régie par les interactions à longue distance,  $\Delta G^{LW}$  paraît décisive pour les étapes postérieures selon le test d'adhésion.  $\Delta G^{AB}$  intervenant à plus courte distance, et elle fera la différence de colonisation entre les différents supports testés. Par exemple, à 5mM, la valeur de  $\Delta G^{LW}$  reste pratiquement inchangé entre le verre et le PVC, alors que la valeur de  $\Delta G^{AB}$  pour le verre (=67,42 mJ/m<sup>2</sup>) est largement supérieure à celle du PVC (19,56 mJ/m<sup>2</sup>), ainsi, l'adhésion est plus importante sur le PVC. Ceci indique que le  $\Delta G^{Total}$  est un paramètre qui doit être considéré avec circonspection puisqu'il comporte plusieurs termes spécifiques d'une étape particulière de la bioadhésion qui, par définition se déroule de manière séquentielle et non synchrone. Par analogie avec le domaine de l'enzymologie, quelque soit les constantes de vitesse catalytique, aucune réaction ne peut se produire avant que les deux partenaires, enzyme et substrat, ne se soient rencontrés. Bien sur, dans ce dernier cas, c'est le coefficient de diffusion d'Einstein de chacun des partenaires qui gouverne la probabilité de rencontre et qui, très généralement, n'est pas limitant. Il en va évidemment tout autrement en ce qui concerne les différentes étapes conduisant à l'adhérence. En résumé, la capacité d'adhésion d'*E. coli* est étroitement liée à la composante énergétique LW, les interactions AB présentant seulement une variabilité significative liée aux propriétés physico-chimiques des supports d'adhésion lorsque les interactions de LW sont favorables à l'adhésion.

*Effet de la force ionique sur la bioadhésion de P. aeruginosa;* Cet effet est tout à fait distinct de celui observé pour *E. coli*. En effet, l'augmentation de la concentration en sel de 5 à 50 mM a pour conséquence une diminution significative d'adhésion mais à un moindre degré que celle observée pour *E. coli*. En outre, cette diminution s'accompagne d'une augmentation du  $\Delta G^{Total}$  qui est principalement due à l'augmentation de  $\Delta G^{AB}$  indiquant par là que les interactions acido-basiques deviennent défavorables à force ionique élevée ce qui permet de conclure que ces interactions sont déterminantes pour la bioadhésion de *P. aeruginosa*. Cependant ceci n'est pas observé dans le cas d'adhésion de cette bactérie au PEHD puisqu'une augmentation inattendue d'adhérence est observée avec l'augmentation de la force ionique. Ceci peut s'expliquer par l'intervention significative des interactions électrostatiques dans le cas du PEHD ; en effet, ce support présente le plus grand écart entre sa composante énergétique basique  $\gamma^-$  (18,7) et acide  $\gamma^+$  (0,6) (Tableau 4) ce qui indique que c'est le support le plus négativement chargé. Ces charges négatives sont susceptibles d'interagir avec celles

des alginates, composés majoritaires des EPS de *P. aeruginosa* constitué par des unités anioniques d'acides glucuroniques et mannuroniques (Evans, 1973 ; Boyd & Chakrabarty, 1994 ; Kives *et al.*, 2006). L'ajout des sels doit induire un masquage de ces charges négatives et donc une réduction des interactions électrostatiques répulsives entre le PEHD et les alginates ce qui conduit à l'augmentation de l'adhésion sur le PEHD observée à force ionique élevée.

*Approche prédictive d'adhésion;* D'après les données présentées sur la Figure 24, on constate que le modèle de van Oss s'applique correctement dans le cas d'*E. coli*, puisque la densité cellulaire adhérente augmente conjointement avec l'énergie totale d'adhésion, et ce, quelque soit la force ionique. Contrairement à *P. aeruginosa* où une corrélation acceptable n'est observée que pour le verre, le PEX et le PVC ; en effet on note un écart significatif pour le PEHD et le PPR par rapport aux autres matériaux.

Cet écart au modèle résulte probablement des interactions spécifiques nanométriques entre le substrat et les bactéries ou entre les bactéries (Busscher & Weerkamp, 1987 ; Vitte *et al.*, 2004). En effet, les bactéries n'interagissent pas seulement avec le milieu extérieur mais aussi entre-elles. Les interactions bactérie-bactérie s'établissent par l'intermédiaire des parties externes des cellules *via* des structures comme les adhésines, les pilis ou les protéines glycosylées de surface. De telles interactions spécifiques ont été rapportées par Bayouhd *et al.* (2006) avec la souche bactérienne *Staphylococcus epidermis* (hydrophile). On doit faire remarquer toutefois qu'aucune généralisation n'est possible pour ce type d'interactions qui sont, par définition, spécifiques d'une souche bactérienne donnée, du support d'adhésion ainsi que du milieu environnant.

## II.3. Conclusions

Cette étude vise à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le processus de bioadhésion aux canalisations d'eau potable à travers l'utilisation de deux modèles biologiques : *P. aeruginosa* (relativement hydrophobe) et *E. coli* (hydrophile). La bioadhésion a été étudiée sur quatre supports en plastique de nature chimique différente, utilisés pour l'adduction d'eau potable.

Nous avons noté durant cette étude que l'adhésion aux substrats hydrophobes (supports plastiques) était importante comparée au support hydrophile de référence (le verre) et également que l'adhésion d'une bactérie hydrophobe est plus importante qu'une bactérie hydrophile ce qui est en accord avec les résultats de travaux antérieurs. L'influence de la force

ionique sur la bioadhésion a également été mise en évidence, quoique cet effet soit mieux marqué pour la souche hydrophobe (*P. aeruginosa*) que pour la souche hydrophile (*E. coli*).

L'énergie totale d'adhésion des deux bactéries aux différents substrats testés est évaluée sur la base de l'approche prédictive *XDLVO* et des tentatives de corrélation avec les tests d'adhésion ont été effectuées ce qui doit permettre de mesurer à quel point cette approche est applicable au phénomène d'adhésion bactérienne dans les réseaux d'eau potable. Dans ce contexte, une bonne adéquation entre la théorie et l'expérience a été observée avec *E. coli*. Par contre, pour *P. aeruginosa* le modèle ne s'applique de manière satisfaisante que pour le verre, le PEX et le PPVC, l'adhésion au PPR et PEHD semble être principalement régie par des interactions spécifiques biologiques, non prises en compte dans le modèle thermodynamique utilisé.

Par ailleurs, la contribution des interactions électrostatiques a été évaluée en menant les expériences à deux forces ioniques distinctes de 5 et 50 mM de NaCl. Ceci a permis de conclure que l'adhésion d'*E. coli* est principalement régie par les interactions de van der Waals pendant les tous premiers stades, tandis que l'adhésion de *P. aeruginosa* dépend principalement des interactions acido-basiques. Le comportement exceptionnel du couple bactérie-PEHD à haute force ionique est très vraisemblablement lié aux fortes répulsions électrostatiques entre les alginates et le PEHD probablement le plus négativement chargé comme en témoigne le large écart entre les composantes donneur et accepteur d'électrons de ce matériau.

Par rapport à l'approche prédictive, on vient de voir qu'elle ne peut décrire parfaitement le processus complexe d'adhésion sans prise en compte de la contribution potentielle des interactions spécifiques vu que cette approche a été développée à l'origine pour étudier l'adhésion des particules colloïdales, sphériques, micrométriques, négativement chargées, homogènes et à l'équilibre. Or, les cellules bactériennes présentent des formes plus complexes et leur surface n'est généralement pas homogène ; de plus elles sont motiles et hors d'équilibre. Finalement, les bactéries sont capables de modifier leurs propriétés en fonction de leur environnement en adaptant leur métabolisme et leur composition membranaire, et par conséquent leurs propriétés physico-chimiques de surface prises en compte dans l'approche prédictive.



---

# **Chapitre IV**

**Effet de facteurs environnementaux  
sur les propriétés physico-chimiques  
de la surface cellulaire**

---

## Chapitre IV

### Effet de facteurs environnementaux sur les propriétés physico-chimiques de la surface cellulaire

« *Le microbe n'est rien, le terrain est tout* »

*Louis Pasteur*

On vient de confirmer dans le chapitre III qu'il est possible, dans certains cas, de prédire l'adhésion bactérienne initiale aux surfaces en se basant sur des modèles prédictifs qui prennent en compte les interactions physico-chimiques : van der Waals, électrostatiques et acide-base responsables de l'adhésion initiale des microorganismes aux surfaces. Il est donc intéressant d'identifier les paramètres susceptibles d'influencer ces propriétés physico-chimiques, et de voir comment ces dernières évoluent en fonction des variations des conditions environnementales. De ce type d'observations doit dépendre notre capacité à évaluer les processus adaptatifs des bactéries d'intérêt qu'elles soient à l'état planctonique ou sessile.

Ce chapitre présente l'influence de certains facteurs environnementaux notamment le pH, la force ionique et la présence du chlore actif sur le caractère apparent des cellules bactériennes libres (hydrophobicité, acide-base, charges) en utilisant la technique d'adhésion microbienne aux solvants (MATS).

Plusieurs études utilisant cette technique pour déterminer les propriétés physico-chimiques de la surface cellulaire ont expliqué toute modification par un changement structural au niveau de la surface cellulaire. Selon les résultats précédents, l'importance relative des interactions qui sous-tendent l'adhésion diffère d'une souche à une autre. L'adhésion de *E. coli* semble être principalement gouvernée par les interactions non spécifiques. Au contraire, dans le cas de *P. aeruginosa*, les écarts entre prédictions et tests d'adhésion indiquent l'intervention, dans certains cas, d'interactions spécifiques (biologiques). Nous avons donc eu recours à la spectroscopie infrarouge pour rechercher des modifications structurales au niveau de la surface de bactéries placées dans différentes conditions de pH et de force ionique. Cette spectroscopie se révèle particulièrement utile pour mettre en évidence des modifications au niveau membranaire (Gué *et al.*, 2001).

### III.1. Matériels et méthodes

La technique d'adhésion microbienne aux solvants (MATS) est utilisée pour suivre l'évolution de l'hydrophobicité et le caractère acide-base des modèles biologiques *E. coli* et *P. aeruginosa* en fonction du pH, de la force ionique et du chlore actif.

Trois valeurs de pH sont étudiées qui encadrent la variabilité admise par les normes dans les réseaux d'eau potable : pH 6,5 ; pH 7,5 et pH 9,5. Pareillement pour le chlore actif, 2 concentrations sont évaluées : 0,3 et 5 mg/l. En ce qui concerne la force ionique, la concentration de 5 mM qui prend en considération les normes de concentrations admises pour l'ion sodium est prise comme *référence*. Pour évaluer la contribution et donc l'importance relative des interactions électrostatiques répulsives dans le phénomène d'adhésion, les concentrations 50 et 75 mM sont également étudiées.

Afin de détecter d'éventuels changements structuraux au niveau de la surface cellulaire qui pourraient rendre compte des modifications des propriétés physico-chimiques de la surface cellulaire, une analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier a été réalisée sur les bactéries selon le protocole expérimental décrit plus haut. Ces mesures ont constitué à enregistrer les spectres infrarouge des bactéries en mode ATR après un séjour dans un milieu de conditions physico-chimiques définies (pH, force ionique, température...). Les cellules bactériennes se trouvant donc auparavant dans le milieu de culture (LB) sont lavées et récupérées selon le protocole expérimental présenté dans le paragraphe 1.2. du *chapitre 2*, puis laissées en suspension pendant des durées croissantes (de 1 à 4 heures), pour prendre en compte une éventuelle hystérèse dans le processus d'adaptation à de nouvelles conditions du milieu, avant qu'elles soient finalement récupérées par centrifugation et déposées sur le cristal ATR horizontal en ZnSe pour une analyse structurale en infrarouge. L'analyse en composante principale (ACP) a été utilisée pour le traitement des spectres. Dans le cadre de nos travaux, cette étude structurale concerne les effets croisés du pH et de la force ionique puisque 3 conditions de pH (6,5 ; 7,5 et 9,5) ont été étudiées à trois forces ioniques distinctes (5 ; 50 et 75 mM de NaCl) (Tableau 10). La cinétique de l'adaptation membranaire à une certaine condition, *i.e.* le temps de contact des bactéries avec un milieu de propriétés données, a été prise en compte par la collecte d'échantillons d'heure en heure jusqu'à une durée maximale de 4 heures.

**Tableau 10 : Récapitulatif des différentes conditions environnementales étudiées**

[NaCl] (mM) \ pH	6.5	7.5	9.5
	5	•	•
50	•	•	•
75	•	•	•

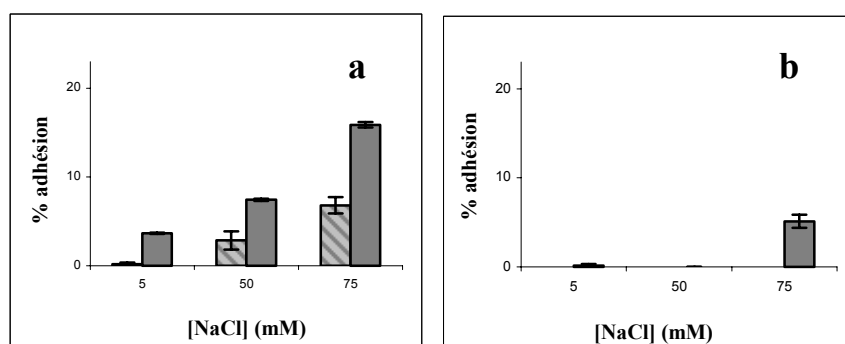
## III.2. Résultats et discussions

### III.2.1. Caractère hydrophobe/hydrophile

Certains auteurs considèrent que l'hydrophobicité de la surface bactérienne est le paramètre clé qui gouverne l'adhésion bactérienne aux supports inertes (Jana *et al.*, 2000 ; An & Friedman, 2000 ; Majtán & Majtánová, 2000 ; Pereira *et al.*, 2000 ; Cappello *et al.*, 2006). Selon ces auteurs, plus l'hydrophobicité des cellules bactériennes augmente, plus l'adhésion devient importante. Quant aux interactions électrostatiques, les charges négatives (généralement mieux exprimées à basse force ionique) provoquent une diminution de l'adhésion (Neu, 1996 ; Jana, 2000). Il existe plusieurs méthodes permettant l'évaluation de l'hydrophobicité bactérienne, parmi elles, la MATS, l'agrégation avec les sels, la chromatographie hydrophobe, l'adhésion au latex et polystyrène, etc. (Hsu & Huang, 2002). Dans le cadre de notre étude, l'hydrophobicité des cellules bactériennes a été estimée par la technique de MATS, largement utilisée dans le laboratoire marocain.

#### Effet de la force ionique

La Figure 25 présente l'évolution du caractère hydrophobe de *P. aeruginosa* et *E. coli* en fonction de la concentration saline.



**Figure 25 : Effet de la concentration saline sur l'hydrophobicité bactérienne. a : *P. aeruginosa* b : *E. coli* ▨ Hexadécane ▩ Hexane.**

*P. aeruginosa* présente un caractère hydrophile aux 3 forces ioniques testées (Figure 25a); ce caractère diminue considérablement lorsque la concentration saline augmente de 5 à 75 mM en NaCl. Quant à *E. coli* (Figure 25b), elle présente un caractère hydrophile encore plus marqué que *P. aeruginosa* et paraît être moins sensible à la variation de la force ionique.

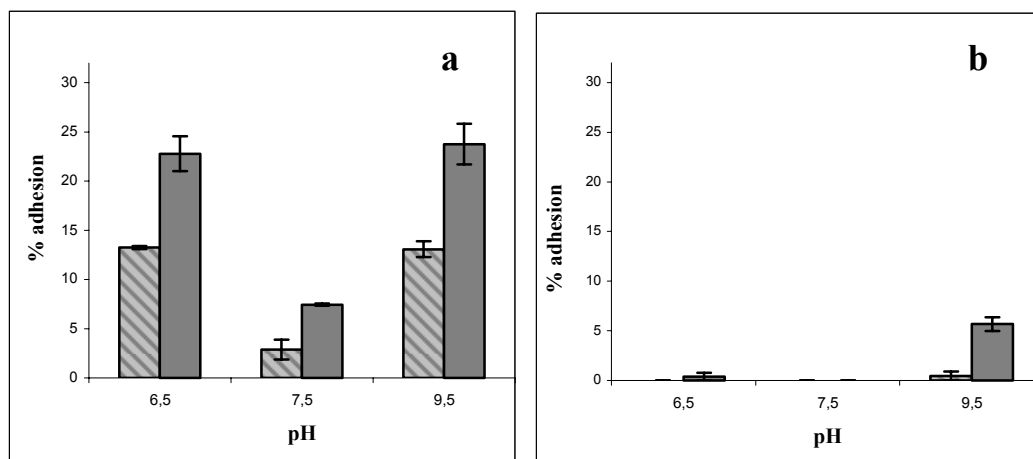
Il est connu qu'une bactérie en suspension aqueuse à un pH proche de la neutralité se trouve au dessus de son point isoélectrique ; elle porte donc dans ces conditions une charge globale négative (Virginia *et al.*, 1952 ; Pelletier *et al.*, 1997 ; Boonaert *et al.*, 2001). Il a été également prouvé que l'adhésion aux hydrocarbures (MATH) reflète de manière complexe les interactions électrostatiques et de van der Waals (van der Mei *et al.*, 1993). L'hydrocarbure en suspension présente un caractère hydrophobe et une charge négative (Geetsema *et al.*, 1993 ; van der Mei *et al.* 1993, 1998; Busscher *et al.*, 1995). Les interactions électrostatiques répulsives entre l'hydrocarbure et la bactérie peuvent donc empêcher l'adhésion aux solvants organiques hexane et hexadécane (Busscher *et al.*, 1995 ; Van der Mei *et al.*, 1995 ; Hsu & Huang, 2002 ; Gaboriaud *et al.*, 2006). Par conséquent, seules les souches présentant une charge négative faible développeront des interactions hydrophobes importantes avec les solvants organiques (Busscher *et al.*, 2000). L'augmentation de la force ionique induit une diminution de la charge électrostatique (van der Wal *et al.*, 1997 ; Hamadi *et al.*, 2004 ; Gaboriaud *et al.*, 2006). Cette diminution est attribuée à l'adsorption importante des cations, ce qui provoque la neutralisation des groupements chargés présents à la surface. Par conséquent, l'augmentation de la force ionique atténue les interactions électrostatiques répulsives, ce qui explique les effets observés. La réponse relativement faible d'*E. coli* vis-à-vis de la variation de la force ionique suggère que les interactions de van der Waals sont plus importantes que les interactions électrostatiques.

La différence d'hydrophobicité entre les deux bactéries peut être due à la différence de leur composition élémentaire (notamment les rapports N/C et O/C) ; en effet, plusieurs auteurs se basant sur la technique XPS (spectroscopie de photoélectrons X), ont montré que l'hydrophobicité par exemple peut augmenter avec le taux de protéines membranaires (déduit du rapport N/C) présentes à la surface de la bactérie, et diminuer par la présence de composés de nature polysaccharidique (représentés par le rapport O/C) (Mozes *et al.*, 1988; Rubio, 2002; Latrache *et al.*, 2004; Gómez-Suárez, *et al.*, 2002; Hamadi *et al.*, 2004). Ceci a été confirmé ensuite par Al-Quadiri *et al.* (2006) en utilisant la spectroscopie infrarouge. Ces auteurs ont observé des différences notables entre le spectre correspondant à *E. coli* et celui de *P. aeruginosa* en culture similaire à celui d'une eau potable. Des différences notables ont en effet été recensées, notamment dans les bandes d'amide I et II (1650 et 1540  $\text{cm}^{-1}$ ) qui

renseignent sur la composition en protéines au travers de leurs structures secondaires, dans les bandes correspondant aux acides nucléiques (ADN et ARN) visibles *via* les vibrations du groupement phosphodiester (1242 et 1080  $\text{cm}^{-1}$ ) et les bandes correspondant aux vibrations intra- et inter- cycliques des polysaccharides dans le domaine 1050-950  $\text{cm}^{-1}$ . Ceci vient confirmer que les constituants de leur membrane cellulaire ne sont pas structurellement identiques.

### Effet du pH

La Figure 26 présente l'hydrophobicité de *P. aeruginosa* et de *E. coli* pour trois valeurs de pH à 50 mM en NaCl. On remarque que l'hydrophobicité de *P. aeruginosa* est maximale (~25%) à pH acide (6,5) et basique (9,5) et présente un minimum à pH neutre (~10%). Quelque soit le pH, *E. coli* présente toujours un caractère hydrophile très marqué. Ce caractère, à l'instar de l'effet des sels, varie faiblement avec le pH. Les mêmes observations peuvent être notées pour *P. aeruginosa*.

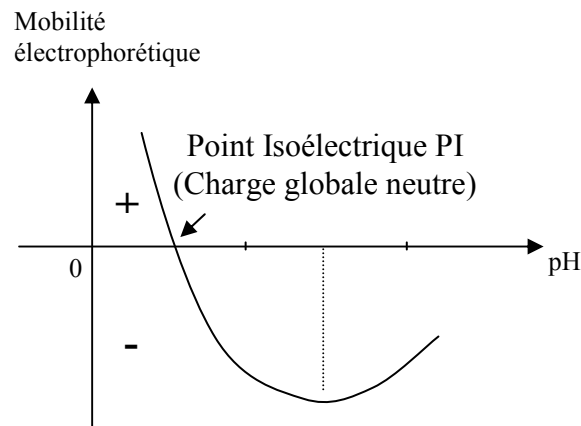


**Figure 26 : Effet du pH sur l'hydrophobicité bactérienne.** a : *P. aeruginosa* b : *E. coli*  
 ■ Hexadécane ■ Hexane.

Plus le pH est acide, plus la bactérie est chargée positivement. Ainsi, les charges négatives de surface apparaissant progressivement au fur et à mesure que le pH s'élève, ce qui rend les interactions électrostatiques répulsives entre la bactérie et l'hydrocarbure plus importantes. Ceci peut expliquer la diminution de l'hydrophobicité lors du passage du pH acide (6,5) au pH neutre (7,5). Les mêmes résultats ont été observés par Gaboriaud *et al.* (2006) avec la technique d'adhésion au polystyrène sur des bactéries Gram- comme *Shewanella putrefaciens* en passant d'un pH 4 à un pH 10 ; des effets similaires ont été observés par Hsu & Huang (2002) pour *Giardia cyst* et *Cryptosporidium oocysts* entre pH 2,4 et 11,1 par la technique

d'adhésion aux hydrocarbures modifiée par Lichtenberg *et al.* (1985) dont le principe est le même que l'adhésion microbienne à l'hexane et l'hexadécane.

La densité et la distribution des charges négatives ont une grande influence sur l'architecture et les propriétés physiques de la paroi bactérienne. Les interactions entre différents groupements fixés dépendent de leur localisation les uns par rapport aux autres (Boylan & Mandelson, 1969 ; Gaboriaud *et al.*, 2006). Ces interactions (attractions/répulsions) peuvent jouer un grand rôle dans le maintien de la conformation des composantes de la paroi et dépendent, bien évidemment, de la nature de la souche microbienne étudiée (Scott, 1989) et de la neutralisation des charges les unes par les autres. Sara & Sleytr (2000), par exemple, ont démontré l'importance des interactions entre les sous-unités des protéines de la couche S (*S-Layer Proteins*) dans le maintien de l'organisation en couche chez les bactéries Gram+. L'augmentation de l'hydrophobicité observée à pH basique (9,5), peut être due alors au changement de conformation et à la réorganisation spatiale de macromolécules membranaires (transitions conformationnelles). Ce changement peut provoquer un masquage des charges exposées à la surface cellulaire ce qui fait que l'hydrophilicité soit peu perceptible. En effet, l'allure de certaines courbes (Figure 27), concernant l'évolution de la mobilité électrophorétique de certaines bactéries en fonction du pH, montre qu'il est possible d'induire une réduction de la charge négative à partir d'une certaine valeur de pH bien que celle-ci demeure toujours négative après avoir atteint le point isoélectrique. Ces résultats ont été observés aussi bien pour des bactéries Gram+ que Gram-. On peut citer par exemple la courbe de mobilité électrophorétique en fonction du pH obtenue par Briandet *et al.*, (1999) pour *Listeria monocytogenes* Scott A (Gram+) mise en suspension en présence de NaCl et à différentes températures. Des résultats similaires ont été obtenus par Chavant *et al.* (2002) sur *Listeria monocytogenes* LO28 à différentes phases de croissance : une réduction de la charge négative est observée à partir de pH 5. Hamadi *et al.* (2005) ont observé ce même phénomène pour une souche de référence d'*Escherichia coli* HB101 (Gram-).



**Figure 27 : Allure générale de l'évolution de mobilité électrophorétique en fonction du pH pour les cas discuté dans le texte.**

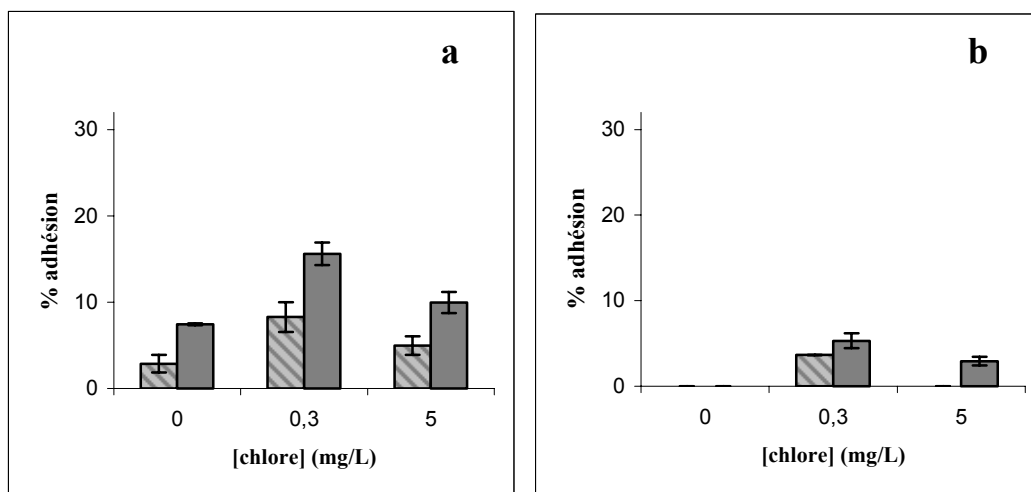
D'après Hancock (1991), les protéines, les lipides et même les polysaccharides sont capables de présenter des domaines hydrophobes en adoptant des conformations particulières. Selon cet auteur, les fibres de la cellulose adoptent une conformation stable où les groupements hydroxyle sont exposés sur une face alors que l'autre face est apolaire. Cette conformation amphiphile (présence simultanée et asymétrique de groupements polaires et apolaires) est généralement favorisée par la présence de sucres désoxylés (absence d'une fonction hydroxyle OH) et méthoxylés (dotés d'un groupement  $-OCH_3$ ). D'autres polysaccharides contiennent des méthylesters de l'acide uronique ou des chaînes aliphatiques leur conférant un caractère hydrophobe (Hancock, 1991).

L'augmentation de l'hydrophobicité peut être également due à la synthèse de macromolécules présentant des domaines hydrophobes. En effet, plusieurs études ont montré qu'une inhibition au niveau de la sécrétion des protéines, par exemple, a comme conséquence une perte d'hydrophobicité (Paul & Jeffrey 1985a et b ; McEldowney & Fletcher, 1986 ; Rosenberg & Kjelleberg, 1986 ; Hancock, 1991 ; Neu, 1996 ; Jana, 2000).

### **Effet du chlore actif**

La Figure 28 montre, avec les mêmes conventions que la Figure 26, l'effet du chlore (à pH 7,5 et 50 mM NaCl) sur l'hydrophobicité des deux souches modèles.



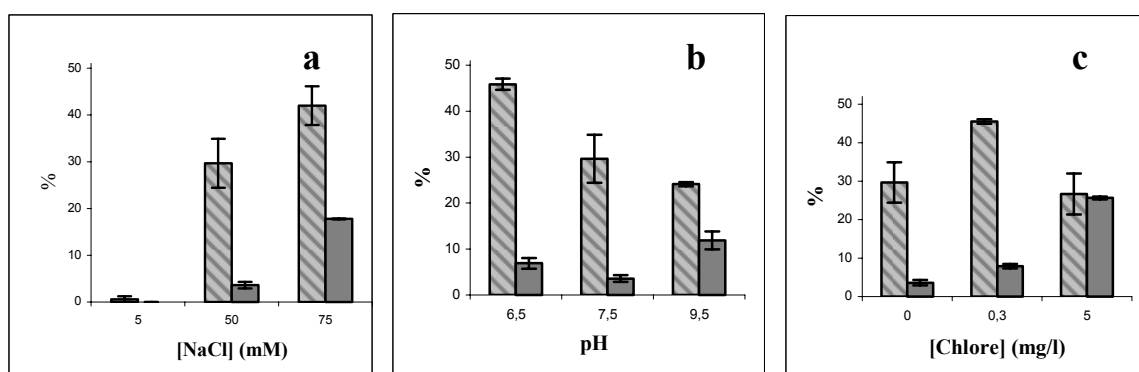


**Figure 28 : Effet du chlore sur l'hydrophobicité bactérienne.** a : *P. aeruginosa* b : *E. coli*  
 ▨ Hexadécane ▩ Hexane.

*P. aeruginosa* présente un caractère hydrophile aux 2 concentrations en chlore étudiées, ce caractère étant moins marqué à 0,3 mg/l. *E. coli* présente, comme vu précédemment, un caractère hydrophile plus marqué par rapport à *P. aeruginosa*, et qui répond à l'augmentation du taux de chlore de la même manière que *P. aeruginosa*. L'augmentation de la teneur en chlore augmente l'hydrophobicité par réaction avec les protéines notamment suite à l'oxydation de groupements thiol et amine (Russel *et al.*, 2004 ; Phatcharat *et al.*, 2006), ce qui peut expliquer l'augmentation de l'hydrophobicité à 0,3 mg/L. La diminution apparente de ce caractère à 5 mg/L provient sans doute du relargage de macromolécules faisant suite à la lyse cellulaire. En effet ces macromolécules vont rendre l'échantillon diffusant ce qui augmente son absorbance mesurée ( $A$  de l'équation p.52) et donc diminue le pourcentage d'adhésion calculé.

### III.2.2. Caractère donneur d'électrons

Le caractère donneur d'électrons est estimé par la différence entre le pourcentage d'adhésion au chloroforme et celui de l'hexadécane (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996). Son importance peut être attribuée à la présence de groupements basiques exposés à la surface cellulaire, comme les groupements carboxylate ( $COO^-$ ), phosphate ( $PO_4^-$ ) des phospholipides, lipoprotéines et lipopolysaccharides ou amine ( $NH_2$ ) (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996; Braindet *et al.*, 1999b, Hamadi *et al.*, 2004) ou les groupements soufrés  $SO_3^-$  (Pelletier *et al.*, 1997). Selon certains auteurs, les groupements carboxylate et phosphate jouent un rôle prédominant dans la détermination de la charge négative de la surface cellulaire (Latrache *et al.*, 1993 ; Pelletier *et al.*, 1997 ; Hamadi *et al.*, 2005).



**Figure 29 : Effet de la force ionique, du pH et du chlore sur le caractère donneur d'électrons.** ▨ *P. aeruginosa* ▩ *E. coli*.

### Effet de la force ionique

Les résultats montrent que le caractère donneur de *P. aeruginosa* comme celui d'*E. coli* augmente avec la force ionique (Figure 29, graphe de gauche). L'effet sur *P. aeruginosa* reste toujours plus important que sur *E. coli*. L'augmentation du caractère basique en fonction de la force ionique peut être expliquée par l'atténuation des interactions électrostatiques ce qui exalte les interactions basiques. Ces résultats sont en accord avec ceux de Harkes *et al.* (1992) qui ont observé une bonne corrélation à pH neutre entre la composante acide-base de l'énergie libre de surface et le potentiel zêta. Hamadi *et al.* (2004) ont également observé que le caractère donneur d'électrons de *S. aureus* est plus important à force ionique élevée. Bayouhd *et al.* (2006) ont, de même, montré par la technique de l'angle de contact que *Pseudomonas Stutzeri* et *Staphylococcus epidermis* présentent un caractère donneur plus important lorsqu'ils se développaient dans un tampon PBS (27 mM) comparé à l'eau distillée. Nos résultats sont donc en accord avec ces observations puisque la technique de l'angle de contact indique que *P. aeruginosa* présente un caractère donneur qui augmente avec la force ionique.

### Effet du pH

Pour *P. aeruginosa*, on remarque que le caractère donneur d'électrons diminue quand le pH augmente. Des modifications du caractère donneur d'électrons de la bactérie découlent nécessairement du déplacement des équilibres de protonation/déprotonation (en fonction de leur  $pK_a$ ) des différents groupements chimiques basiques responsables du caractère donneur d'électrons ; par exemple:

$R - COOH \Leftrightarrow RCOO^- + H^+$  ;  $4 \leq pK_a \leq 5,2$  (Rijnaarts *et al.*, 1995 ; Yee & Fein, 2001)

$R - NH_3^+ \Leftrightarrow R - NH_2 + H^+$  ;  $9 \leq pK_a \leq 9,8$  (Rijnaarts *et al.*, 1995)

$RH_2PO_4 \Leftrightarrow RHPO_4^- + H^+$  ;  $pK_a=2,15$  (Rijnaarts *et al.*, 1995)

$RHPO_4^- \Leftrightarrow RPO_4^{2-} + H^+$  ;  $pK_a=7,2$  (Rijnaarts *et al.*, 1995)

(R représente la bactérie)

Les valeurs de  $pK_a$  indiquées correspondent aux variations observées, essentiellement dues aux effets de l'environnement, plus précisément à la plus ou moins grande activité de l'eau au voisinage immédiat du groupement ionisable.

Le caractère donneur doit normalement être fort si les groupements sont déprotonés, du type  $COO^-$ , donc à pH neutre ou alcalin. On s'attend donc à observer une augmentation du caractère donneur quand le pH augmente.

Si l'on revient sur la technique d'adhésion microbienne aux solvants (MATS), le choix des solvants, chloroforme et hexadécane, pour l'évaluation du caractère basique a été établi, comme mentionné dans le paragraphe IV.1.1 du Chapitre I, en fonction de la capacité de chaque solvant à établir un ensemble d'interactions déterminées découlant de ses propriétés énergétiques (Tableau 2). Le chloroforme a la capacité d'établir des interactions de van der Waals, basique, et électrostatique ; pour l'hexadécane, c'est uniquement les interactions de van der Waals et électrostatiques. Le fait de retrancher les pourcentages d'adhésion entre les deux solvants permet d'évaluer le caractère basique de la bactérie surtout en absence d'interactions électrostatiques répulsives (à force ionique élevée).

L'explication de la diminution du caractère donneur en fonction de l'augmentation du pH, d'un point de vue purement physico-chimique, n'est possible que si l'on suppose qu'il existe un ordre d'importance au niveau de l'ensemble des types d'interactions avec lesquelles la bactérie interagit avec un support donné et que cet ordre change en fonction de la souche considérée. Ceci n'est pas nouveau par rapport à nos résultats, puisqu'on avait déjà conclu dans le chapitre précédent que ce sont les interactions acide-base et électrostatiques qui prédominent dans l'adhésion de *P. aeruginosa*.

L'apparition, avec l'augmentation du pH, des charges négatives qui interagissent d'une manière répulsive avec la surface, suggère qu'elles sont plus importantes que les interactions acide-base. C'est pourquoi il y a eu une diminution du caractère donneur « apparent » quand le pH augmente.

En ce qui concerne *E. coli*, le caractère donneur d'électrons est relativement faible (< 10%) à pH acide, et a tendance à diminuer lorsque le pH augmente. Son comportement vis-à-vis de la variation du pH est différent.

Nous avons pu constater dans « *l'effet de la force ionique sur l'hydrophobicité* » que les interactions de van der Waals sont plus importantes que les interactions électrostatiques répulsives (I-EI) vu que l'hydrophobicité de cette bactérie varie faiblement en fonction de la force ionique comparée à celle de *P. aeruginosa*. Nous avons également conclu dans le chapitre précédent que l'adhésion d'*E. coli* est principalement régie par les interactions de van der Waals (I-LW) qui étaient plus importantes que les interactions acide-base (I-AB). Et donc, pour cette bactérie l'ordre d'importance des interactions est comme suit : I-LW > I-AB > I-EI. Il est à remarquer ici que l'hydrophobicité (Figure 25 et 26) et le caractère basique (Figure 29) varient dans le même sens en fonction des facteurs environnementaux, ils sont donc positivement corrélés, ce qui est en accord avec les résultats des travaux de Sharma *et al.* (2001) pour plusieurs souches de *Paenibacillus polymyxa*, adaptées ou non aux minéraux chalcopyrites, en réponse à un changement environnemental ; ils ont observé en effet une corrélation positive entre la composante énergétique liée au caractère donneur d'électrons et l'hydrophobicité traduite par l'angle de contact avec l'eau. Mais ceci est en désaccord avec les résultats de certains auteurs, notamment ceux de Wu *et al.* (1994) qui ont observé une corrélation négative entre le caractère donneur d'électrons et l'hydrophobicité évaluée par la technique de l'angle de contact. En effet ils ont montré que certaines particules minérales (smectiques) voyaient conjointement leur caractère hydrophobe augmenter et leur composante énergétique liée au caractère donneur d'électrons diminuer. Un résultat similaire est rapporté par Bayouhd *et al.* (2006), pour la souche *Pseudomonas stutzeri* cultivée dans deux milieux différents, l'eau et le tampon PBS : la composante énergétique liée au caractère donneur d'électrons, évaluée par l'angle de contact, est plus importante pour les cellules les plus hydrophiles cultivées dans le tampon PBS, mais finalement cette corrélation n'est pas admise par tous les auteurs. Hamadi (2005) par exemple a trouvé que pour une souche de *S. aureus* la corrélation n'est pas satisfaisante dans tous les cas et elle est au moins pH-dépendante.

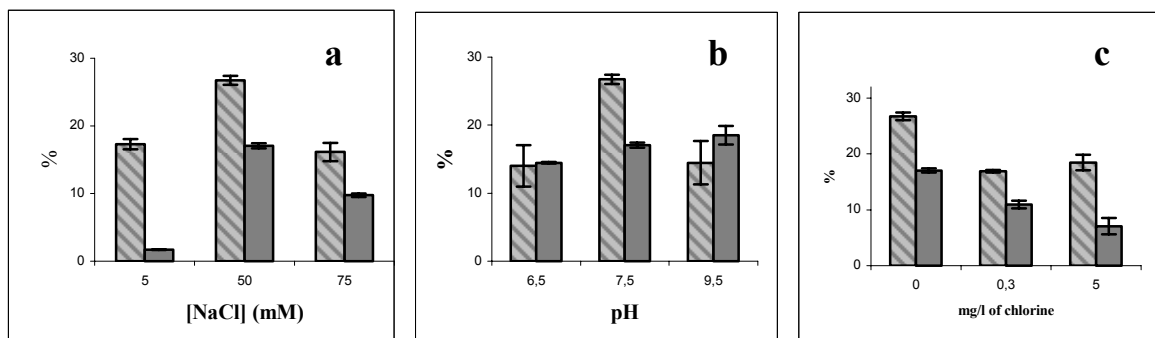
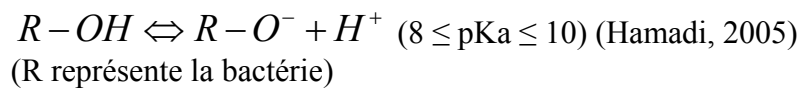
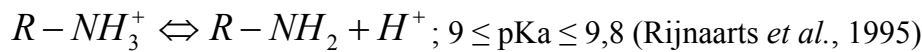
### **Effet du chlore actif**

L'effet de l'augmentation du caractère donneur liée à l'effet du chlore peut être expliqué par l'halogénéation des groupements thiols et amines au niveau de la membrane cellulaire (Russel *et al.*, 2004) générant des groupements donneurs d'électrons ou accepteurs d'hydrogène. La diminution de ce caractère à 5 mg/l en chlore actif provient très vraisemblablement de

l'interférence des produits de lyse cellulaire dans les mesures des densités optiques, comme mentionné auparavant (Figure 29, graphe de droite).

### III.2.3. Caractère accepteur d'électrons

Le caractère accepteur d'électrons est estimé par la différence entre le pourcentage d'adhésion du diéthyle éther et celui de l'hexane (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996). Son importance peut être attribuée à la présence de groupements acides exposés à la surface cellulaire, comme  $R-NH_3^+$  ou R-OH (Rubio, 2002).



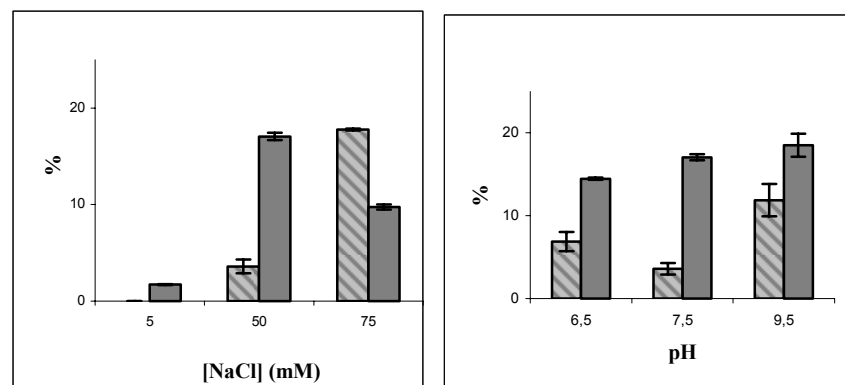
**Figure 30 :** Effet de la force ionique, du pH et du chlore sur le caractère accepteur d'électrons. ▨ *P. aeruginosa* ; ▤ *E. coli*.

Les résultats montrent que pour les deux souches *P. aeruginosa* ou *E. coli*, le caractère accepteur d'électrons est important quelque soit les conditions, sauf à 5 mM dans le cas d'*E. coli* (il ne dépasse pas 3%). Les optima pour *P. aeruginosa* sont observés à force ionique moyenne (50 mM) et pH neutre (7,5), tandis qu'ils sont observés à force ionique moyenne (50 mM) et pH basique (9,5) pour *E. coli*. On note que la présence de chlore tend à faire diminuer ce caractère de façon significative quelque soit la souche considérée (Figure 30).

Comme indiqué auparavant, les caractères acide et basique sont généralement plus importants à force ionique élevée, où les interactions électrostatiques sont masquées. Ceci permet d'expliquer l'augmentation du caractère acide lorsqu'on passe de 5mM à 50mM en NaCl. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Hamadi *et al.* (2004) où le caractère acide de *E. coli* est augmenté quand la salinité augmente d'un facteur 100 (1 mM à 0,1 M de nitrate de potassium). Nous n'avons néanmoins aucune explication à fournir pour rendre compte de la

diminution observée à 75 mM. On sait que tout caractère reste dépendant de la souche bactérienne considérée et qu'il est extrêmement hasardeux de spéculer sur les importances relatives des caractères les uns par rapport aux autres ; on soupçonne simplement que cet effet pourrait découler d'une certaine réactivité des groupements acides présents à la surface cellulaire avec ceux basiques du fait de la nette prépondérance du caractère donneur d'électrons sur celui d'accepteur.

Certaines études (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996; Pelletier *et al.*, 1997; Braindet *et al.*, 1999a, 1999b ; Hamadi *et al.*, 2004, Bayouhd *et al.*, 2006), concernant l'estimation du caractère acide-base de la surface de cellules microbiennes à pH neutre, ont montré que la surface des cellules présentent un caractère fortement donneur et faiblement accepteur d'électrons, ceci étant particulièrement net pour la souche *P. aeruginosa*. Le caractère accepteur d'électrons pour *E. coli* est aussi considérable, et il semble être généralement plus important que le caractère donneur d'électrons excepté à la force ionique la plus élevée (Figure 31). Donc cette hypothèse n'est pas valable dans tous les cas. Ceci a été aussi remarqué dans les travaux de Sharma & Rao (2002) qui ont appliqué le modèle de van Oss pour mesurer les propriétés de surface d'une centaine de souches. Les souches de *Lactobacillus casei subsp.*, *Rhamnosus 81* et *streptococci oralis HI* par exemple présentent un caractère accepteur d'électrons plus important que le caractère donneur d'électrons.



**Figure 31 : Effet de la force ionique et du pH sur le caractère donneur d'électrons d'*E.coli*.** ▨ donneur ; ■ accepteur.

### III.2.4. Polysaccharides membranaires

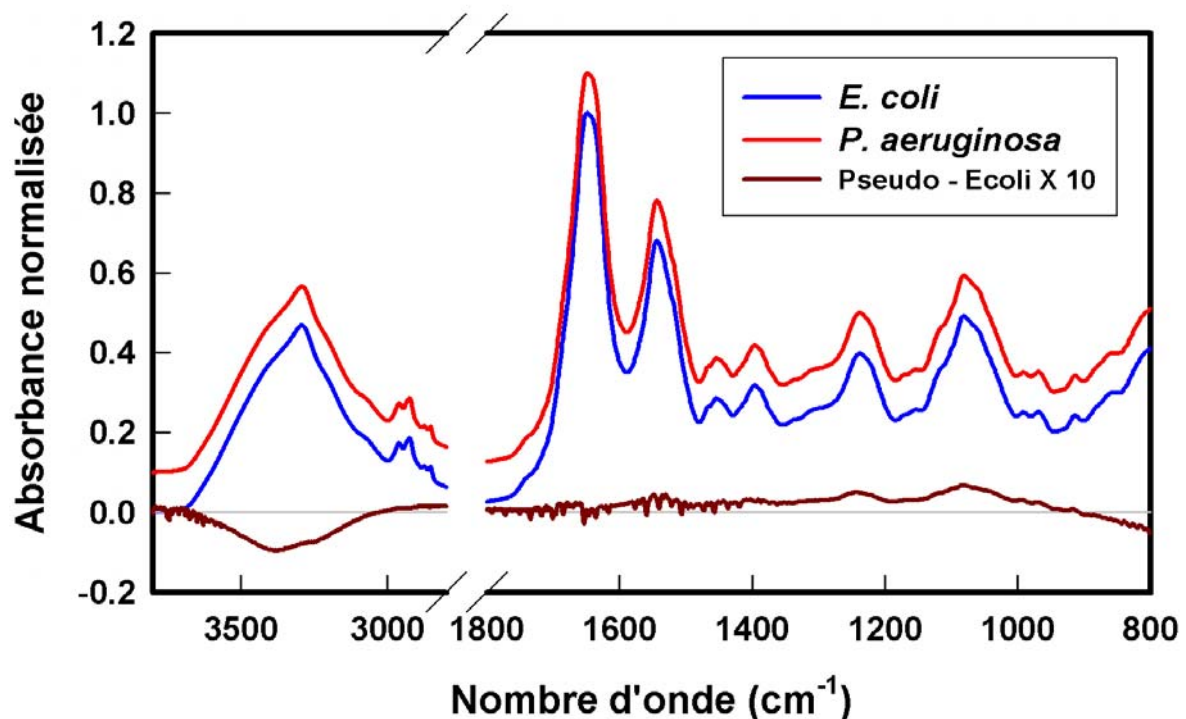
Généralement, les changements des propriétés bioadhésives des bactéries aux supports sont attribués non seulement aux changements de leurs caractères physico-chimiques suite à la réactivité des fonctions se trouvant à leur surface, mais il se peut aussi que la composition moléculaire de leur paroi soit modifiée pour s'adapter à une variation environnementale. Ceci est vrai pour les constituants lipidiques –on peut mentionner ici la régulation homéovisqueuse- les lipopolysaccharides (LPS) et les exopolysaccharides (EPS). Il a par exemple été montré qu'il suffisait de perturber l'écoulement du milieu pendant plus de vingt minutes pour que la modification de la contrainte de cisaillement induise une variation de la synthèse d'EPS dont la nouvelle viscosité sera mieux adaptée à la préservation du biofilm (Shaw *et al.*, 2004). La synthèse de ces constituants structuraux, tout comme le métabolisme cellulaire dans son ensemble, dépend donc étroitement de la bactérie elle-même bien sûr mais aussi de son environnement (Jana *et al.*, 2000 ; Cappello *et al.*, 2006). D'une manière très générale, les membranes cellulaires sont très largement impliquées dans les processus adaptatifs qui répondent aux variations du milieu extérieur et permettent donc le maintien du métabolisme cellulaire dans des milieux très différents.

Les spectres IR de *P. aeruginosa* et *E. coli* à 3 pH et 3 forces ioniques aux quatre temps étudiés, montrent que l'adaptation aux conditions physico-chimiques du milieu de suspension est détectable au bout de 2 heures.

La Figure 32 présente les spectres IR moyens collectés entre 3800 à 800  $\text{cm}^{-1}$  de *E. coli* et *P. aeruginosa* ainsi que le spectre de différence (*P. aeruginosa* – *E. coli*) magnifié 10 fois pour plus de lisibilité. Les spectres moyens sont calculés à partir de matrices de taille 2076 X 36 correspondant aux 9 conditions expérimentales et 4 temps d'incubation. A l'observation de cette figure, on peut constater qu'il est possible de distinguer 4 régions spectrales principales :

- (I) La région entre 4000 et 3000  $\text{cm}^{-1}$ , correspondant aux vibrations d'élongation de type X-H, ce domaine étant largement dominé par la vibration  $\nu_{\text{OH}}$  des molécules d'eau et, dans une moindre mesure des  $\nu_{\text{NH}}$  des protéines.
- (II) le domaine d'absorption des lipides entre 3000 et 2800  $\text{cm}^{-1}$ , les pics d'absorption vers 3000  $\text{cm}^{-1}$  ( $\sim 2960$ ,  $\sim 2929$ ,  $\sim 2870$ ,  $\sim 2850$   $\text{cm}^{-1}$ ) étant principalement dus aux modes vibrationnels  $\nu_{\text{sym}}$  et  $\nu_{\text{as}}$  des groupes méthyles et méthylènes des chaînes d'acides gras des phospholipides membranaires.

- (III) Le domaine des protéines qui s'étend sur la gamme spectrale 1800 -1400  $\text{cm}^{-1}$ ; le pic à 1650  $\text{cm}^{-1}$  correspond à la vibration d'élongation amide I  $\nu_{\text{C=O}}$  peptidique ; les pics à 1540 et 1580  $\text{cm}^{-1}$  correspondent à la vibration de courbure amide II  $\delta_{\text{N-H}}$  peptidique ; d'autres modes comme  $\delta_{as}$  et  $\delta_s$  des  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}_3$  des protéines (1455 et 1398  $\text{cm}^{-1}$ ) sont également visibles mais difficiles à analyser du fait d'un fort recouvrement spectral ; enfin le pic à 1740  $\text{cm}^{-1}$  correspond à la vibration  $\nu_{\text{C=O}}$  des esters de lipides.
- (IV) Le domaine entre 1300 et 900  $\text{cm}^{-1}$ , qui comporte des pics à 1242 et 1080  $\text{cm}^{-1}$  respectivement  $\nu_{as}$  et  $\delta_s$  de P=O du squelette phosphodiester des acides nucléiques des ADN et ARN ; le domaine entre 1200 à 900  $\text{cm}^{-1}$  correspond aux vibrations intra- et inter-cycles  $\delta_{\text{C-O-C}}$  des polysaccharides.



**Figure 32 : Spectres infrarouge moyens de *E. coli* et *P. aeruginosa* collectés dans différentes conditions de pH et de forces ioniques et après différents temps d'incubation.**

Le spectre de *P. aeruginosa* a été décalé vers le haut pour plus de lisibilité ; dans le même but, le spectre de différence est amplifié 10 fois. Le bruit haute fréquence observé au-delà de 3600  $\text{cm}^{-1}$  et entre 1800 et 1400  $\text{cm}^{-1}$  est dû à la présence de vapeur d'eau.



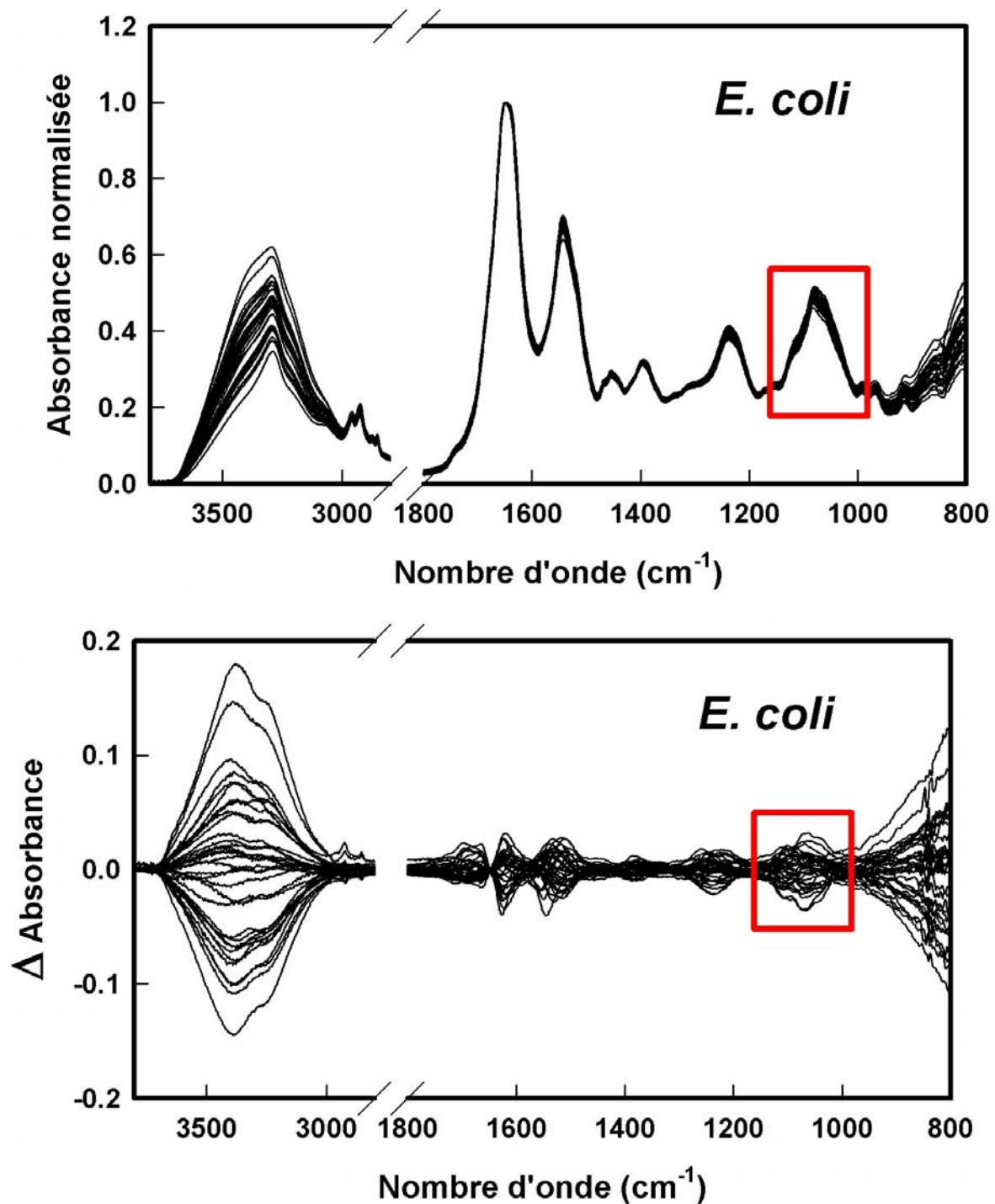
Comme remarqué sur cette Figure, il existe une différence entre les spectres qui correspondent à *E. coli* et *P. aeruginosa* dans la région associée aux bandes amide I et amide II des protéines (1650 et 1550  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\delta_{as}$  et  $\delta_s$  des  $\text{CH}_3$  et  $\text{CH}_2$  des protéines (1455 et 1398  $\text{cm}^{-1}$ ), et vibrations des polysaccharides de type capsulaire (CPS) ou lipopolysaccharides (LPS) dans le domaine entre 1200 et 900  $\text{cm}^{-1}$ . De plus, des variations significatives sont visibles dans le domaine des polysaccharides en fonction des conditions physico-chimiques du milieu de culture. Ces variations sont à interpréter en termes de modifications structurales et/ou de variations relatives des constituants polysaccharidiques. Ce type de comparaison est à la base des développements du « diagnostic précoce » pour le typage bactérien basé sur la spectroscopie IR (Naumann, 2000). Ces développements ont permis, à l'instar des technologies haut débit comme la protéomique, de définir l'état physiologique instantané d'un organisme. En effet, un spectre IR, à travers la signature spectrale des molécules organiques majeures constitutives d'un organisme, permet d'identifier (ou de reconnaître) un organisme ou un échantillon de manière univoque. Cette particularité, largement exploitée par la chimiométrie, permet l'analyse non-supervisée pour la classification ou la quantification.

Les Figures 33 et 34 montrent pour chacune des deux souches étudiées la variabilité spectrale liée aux différentes conditions de pH et de forces ioniques testées (panneau du haut), cette variabilité étant mieux perçue quand on soustrait le spectre moyen de chaque spectre individuel (panneau du bas). Les plus larges variations, observées au-delà de 3000  $\text{cm}^{-1}$  et en deçà de 900  $\text{cm}^{-1}$  sont essentiellement dues à des taux d'hydratation variables d'un échantillon à l'autre : dans le premier cas, c'est la vibration  $\nu_{\text{OH}}$  de l'eau qui est concernée, dans le second cas, la variabilité est due au pied de bande de la vibration de libration  $\delta_{\text{L}}$  de l'eau qui présente un maximum à 620  $\text{cm}^{-1}$  (Haxaire *et al.*, 2003a,b) hors du domaine spectral collecté pour des raisons de transparence du cristal ATR. Bien qu'importante quantitativement, cette variance élevée ne porte aucune information relative à la composition moléculaire des bactéries. Un autre domaine à être affecté par le pH ou la force ionique est celui correspondant aux modes amide I et II des protéines mentionnés plus haut. Dans le cas de *P. aeruginosa*, on détecte même un déplacement de la bande amide I ( $\approx 1650 \text{ cm}^{-1}$ ) qui pourrait refléter une modification des structures secondaires hélice  $\alpha$  / pelote statistique). Bien que difficile à analyser, cette variabilité est nécessairement due à des différences dans la composition et/ou la structure secondaire des protéines constitutives. En se souvenant que la signature spectrale observée provient de la contribution de milliers de protéines, il est délicat, là encore, de

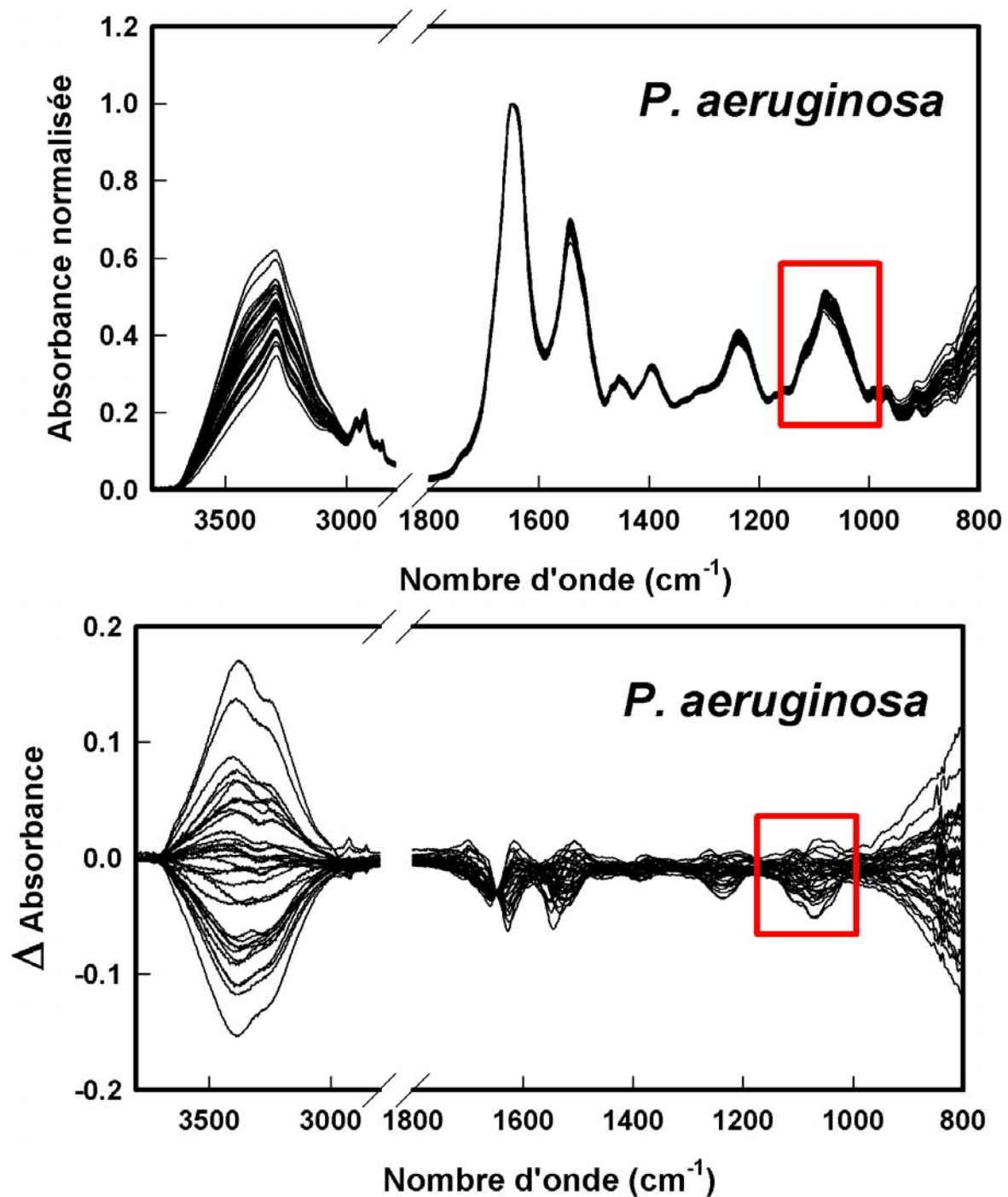
dégager une interprétation précise des modifications observées. On peut tout de même noter que, dans le cas de bactéries intactes, l'essentiel des chromophores observés sont localisés dans la membrane (Gué *et al.*, 2001). Il est donc probable que les protéines membranaires contribuent effectivement à la variabilité des propriétés physico-chimiques de surface des bactéries.

*Last but not the least*, une variabilité significative est observée dans le domaine spectral représentatif des polysaccharides (*cf* encadrés rouges dans les Figures 29 et 30). Les spectres provenant de culots bactériens, les polysaccharides observés sont principalement des CPS ou des LPS car on peut considérer que la contamination par les EPS est mineure dans ces conditions opératoires. Il est donc indéniable que *P. aeruginosa*, comme *E. coli*, adapte sa composition en polysaccharides membranaires ou que ces composés adoptent des conformations distinctes en fonction du pH et de la force ionique du milieu extérieur.

Comme mentionné plus haut, ce domaine reflète les vibrations complexes des cycles osidiques ainsi que les liaisons inter-cycles. Ce premier niveau d'investigation permet donc de mettre en évidence une variabilité structurale des polysaccharides membranaires en réponse à une variation du milieu extérieur.

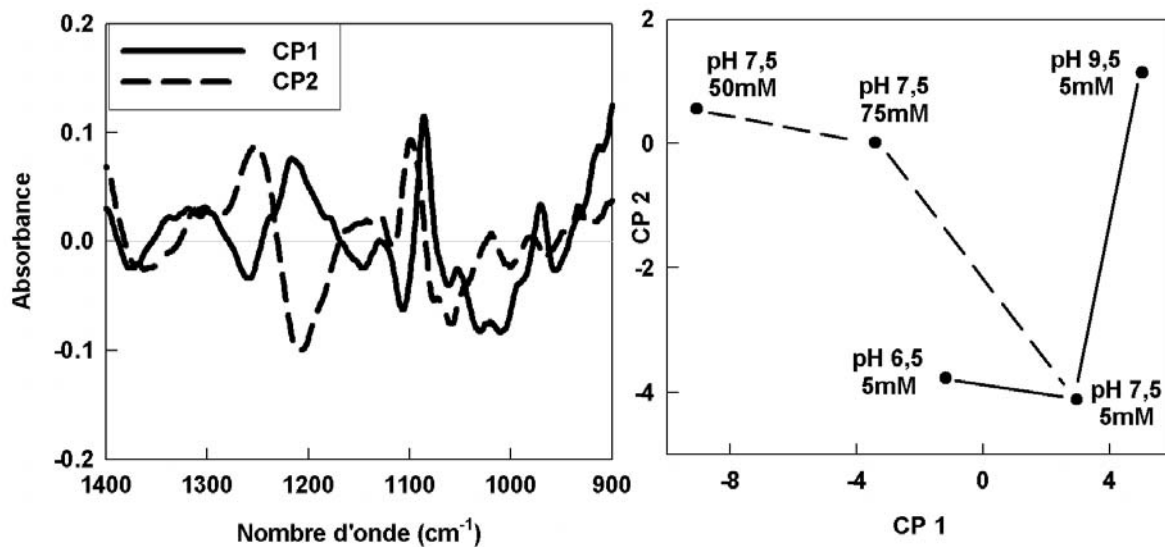


**Figure 33 : Variabilité spectrale dans l'infrarouge d'*E. coli* cultivée dans des milieux de pH et de forces ioniques distinctes.** Le panneau du haut présente l'ensemble des spectres collectés de 3800 à 800 cm<sup>-1</sup>. Le panneau du bas présente les mêmes spectres soustraits du spectre moyen calculé à partir des 36 spectres bruts. L'encadré rouge correspond au domaine d'absorption des polysaccharides (voir texte).

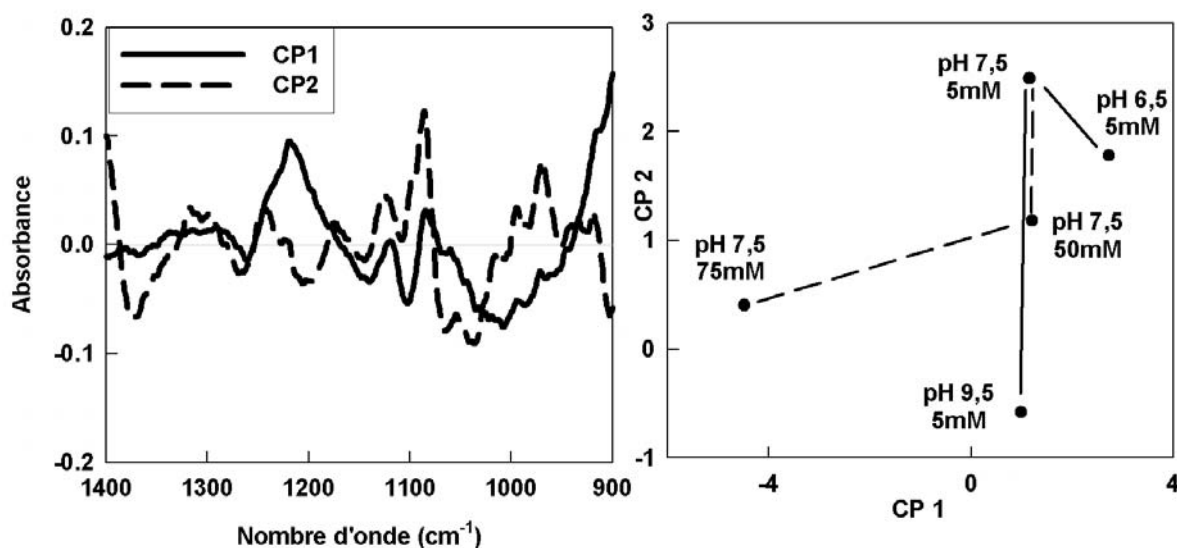


**Figure 34 : Variabilité spectrale dans l'infrarouge de *P. aeruginosa* cultivée dans des milieux de pH et de forces ioniques distinctes.** Le panneau du haut présente l'ensemble des spectres collectés de 3800 à 800 cm<sup>-1</sup>. Le panneau du bas présente les mêmes spectres soustraits du spectre moyen calculé à partir des 36 spectres bruts. L'encadré rouge correspond au domaine d'absorption des polysaccharides (voir texte).

Afin de mieux caractériser les modifications spectrales observées en fonction du pH et de la force ionique, une analyse en composante principale (ACP) a été effectuée en utilisant comme fréquences discriminantes le domaine spectral allant de 900 à 1300  $\text{cm}^{-1}$ . Ceci focalise l'attention sur les polysaccharides bactériens et évite les interférences liées à la teneur en eau des échantillons. Avant de procéder à l'ACP, les spectres sont corrigés pour leur variabilité *physique* (liée à l'acquisition) par un algorithme anti-éparpillement (MSC dans la terminologie anglo-saxonne) (Martens *et al.*, 2003). Ce traitement permet d'éliminer toute variabilité liée soit à des écarts de ligne de base soit à des quantités (et donc des DO) variables d'échantillons. Le résultat est un regroupement des spectres dont les écarts à la moyenne sont alors uniquement dus à la variabilité *chimique* recherchée. L'ACP est ensuite réalisée à l'aide du logiciel *The Unscrambler*® (Camo Process AS, Norvège).



**Figure 35 : Analyse en composante principale de *P. aeruginosa* dans le domaine spectral des polysaccharides membranaires.** Sont présentées (à gauche) les deux premières composantes principales, CP1 et CP2 représentant respectivement 82% et 9% de la variabilité spectrale ainsi que la carte ACP qui est la projection des spectres dans l'espace complexe des vecteurs propres (à droite).



**Figure 36 : Analyse en composante principale de *E. coli* dans le domaine spectral des polysaccharides membranaires.** Sont présentées (à gauche) les deux premières composantes principales, CP1 et CP2 représentant respectivement 69% et 22% de la variabilité spectrale ainsi que la carte ACP qui est la projection des spectres dans l'espace complexe des vecteurs propres (à droite).

Les composantes principales CP1 et CP2 (Figure 35, 36 gauche) montrent des différences notables aux fréquences correspondant aux vibrations intra-cycles ( $1080\text{ cm}^{-1}$ ) et inter-cycles ( $1140\text{ cm}^{-1}$ ) des polysaccharides ainsi que dans le domaine moins spécifique allant de  $1180$  à  $1300\text{ cm}^{-1}$ . La dispersion des spectres dans l'espace de ces deux composantes (Figure 35, 36 droite) permet de mettre en évidence l'effet du pH (traits continus) et de la force ionique à pH 7,5 (tirets). Cette dispersion indique que les constituants membranaires de la bactérie sont impliqués dans l'adaptation au milieu environnant avec des conséquences attendues pour l'adhésion.

### III.3. Problématique de la détermination du caractère hydrophobe

Alors que certains auteurs la considèrent comme le paramètre clé du processus d'adhésion bactérienne aux supports (Jana *et al.*, 2000 ; Cappello *et al.*, 2006;), d'autres se sont posés la question sur l'origine de l'hydrophobicité mesurée par les différentes techniques proposées pour son évaluation.

Selon les résultats de la MATS, on remarque que *E. coli* et *P. aeruginosa* présentent un caractère très hydrophile quelque soit la force ionique; ce caractère restant presque inchangé lorsqu'on passe de 5 à 50 mM de NaCl sauf dans le cas de *P. aeruginosa* où on note une très légère augmentation de 4% de ce caractère.

**Tableau 11 : Comparaison du % d'adhésion et des valeurs de l'angle de contact pour *E. coli* et *P. aeruginosa* à différentes forces ioniques.**

	[NaCl] (mM)	Adhésion aux hydrocarbures (%)	Angle de contact ( $\pm 4^\circ$ )
<i>E. coli</i>	5	0,08	16,2
	50	0	20,6
<i>P. aeruginosa</i>	5	1,93	64,5
	50	5,15	34,5

D'après les résultats d'angle de contact, on remarque qu'*E.coli* présente un caractère très hydrophile puisque les valeurs des angles ne dépassent pas  $20^\circ$  quelque soit la force ionique. Ce caractère paraît très peu influencé par la force ionique vu que sa variation est négligeable compte tenu de la précision de la mesure qui est, dans ce cas, de  $\pm 4^\circ$ . Par contre pour *P. aeruginosa*, l'angle de contact diminue considérablement (d'un facteur  $\approx 2$ ) quand la force ionique est élevée. Ceci est le signe, en toute logique, d'une forte augmentation de l'hydrophobicité de la souche, ce qui est démenti par l'augmentation, dans une même proportion ( $\approx 2$ ) du % d'adhésion aux hydrocarbures. Ces résultats présentent donc une contradiction interne puisque les deux techniques, MATS et angle de contact, sont toutes deux sensées refléter le même caractère, *i.e* l'hydrophobicité de la souche. Ce paradoxe nous amène à nous interroger sur la nature et l'origine de l'hydrophobicité mesurée par chacune de ces techniques (Tableau 11).

A ce sujet, Vanhaecke *et al.* (1990) ont entrepris une étude qui avait comme but, d'une part de confirmer, ou infirmer, que l'hydrophobicité constitue bien *le* facteur clé de l'adhésion bactérienne aux supports, et, d'autre part, de vérifier que les contradictions relevées dans la littérature quant à cette hypothèse découlaient simplement de la technique mise en œuvre pour déterminer cette hydrophobicité. Ces auteurs ont donc mesuré l'hydrophobicité de 15 isolats de *P. aeruginosa* suspendus dans du PBS (10 mM) à pH neutre (7,5) par 4 techniques indépendantes: l'agrégation aux sels de sulfates d'ammonium (SAT et ISAT), l'angle de contact, la MATH et la cinétique d'adhésion sur acier 304 et 316.

Ces auteurs ont pu effectivement observer que l'adhésion sur les supports testés était bien corrélée avec l'hydrophobicité mesurée par l'angle de contact qui, à son tour, était corrélé au

pourcentage d'adhésion aux solvants organiques par une fonction hyperbolique. Mais, ces deux techniques évaluent l'hydrophobicité microbienne, et l'hydrophobicité doit normalement augmenter avec l'augmentation de l'angle de contact.

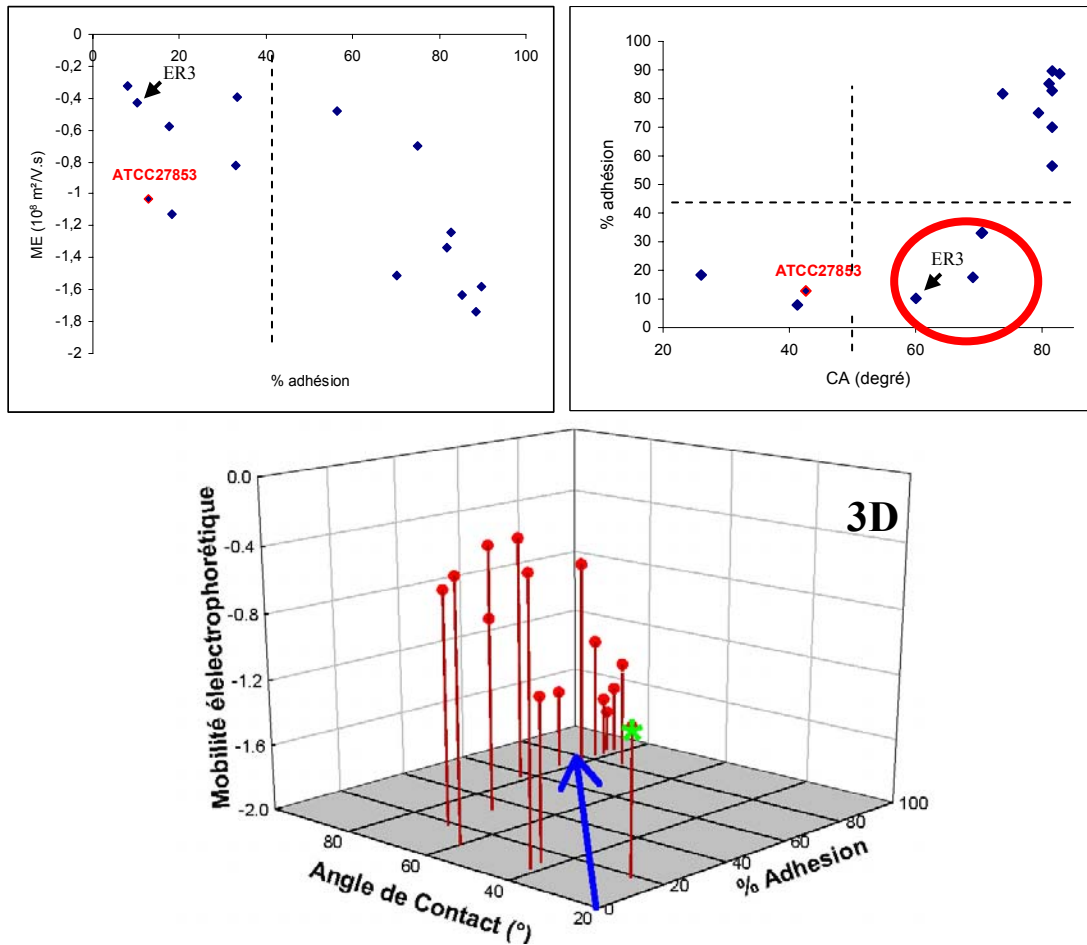
De plus certains isolats, généralement considérés comme hydrophiles par la technique de MATH, présentaient un caractère hydrophobe par la mesure de l'angle de contact (Vanhaecke *et al.*, 1990). De même, certains isolats de *P. aeruginosa* caractérisés comme hydrophobes par la MATH comme 220-R2, 220, PAO-1 et 821/21, sont considérés comme hydrophiles par la technique d'agrégation aux sulfates d'ammonium, et d'autres isolats hydrophiles par la technique de MATH comme 9027, U856/3 et 8111/87 sont extrêmement hydrophobes par la technique de SAT et ISAT.

En ce qui concerne l'isolat de référence de *P. aeruginosa* ATCC 27853 que nous avons retenu comme modèle biologique pour notre étude, cette souche présente un caractère nettement hydrophile selon différentes techniques : pourcentage d'adhésion de 13%, angle de contact de 43° et également hydrophile selon la technique de SAT et ISAT, la souche ER3 qui présente un pourcentage d'adhésion à l'hexadécane, légèrement inférieure à celui de notre modèle biologique (~11%) possède un angle de contact de 60° (tendance hydrophobe), cette même souche est jugée plus hydrophile par rapport à notre modèle selon les techniques SAT et ISAT (Figure 37).

Si on revient sur nos résultats présentés dans le Tableau 11, une corrélation assez satisfaisante est vérifiée dans le cas d'*E. coli* concernant l'évaluation de son hydrophobicité mesurée par les deux techniques MATS et angle de contact, ce qui n'est pas vérifiée dans le cas de *P. aeruginosa*, puisque en augmentant la force ionique du milieu, l'hydrophobicité mesurée par la MATS a augmenté tandis que celle mesurée par l'angle de contact a diminué.

Cette contradiction peut être attribuée aux caractéristiques de chaque méthode. Pour l'angle de contact, la mesure de l'hydrophobicité est réalisée sur des cellules bactériennes semi hydratées, et l'interaction évaluée dans cette méthode est uniquement entre les molécules d'eau et les cellules bactériennes. Pour l'adhésion microbienne à l'hexadécane, la mesure de l'hydrophobicité est réalisée sur des cellules totalement hydratées d'une part et, d'autre part, deux types d'interactions sont prises en compte dans cette méthode, une interaction entre les cellules bactériennes et l'hexadécane et l'autre entre les cellules bactériennes et l'eau.





**Figure 37 : Corrélations entre le pourcentage d'adhésion (MATH) et, d'une part, la mobilité électrophorétique (en haut, à gauche), d'autre part, l'angle de contact (en haut, à droite), représentation 3D (en bas) (Vanhaecke *et al.*, 1990) (Les résultats de l'auteur sont repris et représentés graphiquement). Notre souche modèle *P. aeruginosa* ATCC 27853, est représenté par une astérisque verte. La flèche bleu pointe vers les hydrophobicités croissantes.**

De plus, des études ont montré que les éléments qui interviennent dans la détermination de l'hydrophobicité mesurée par la MATH semblent être à l'opposé des éléments qui déterminent l'hydrophobicité mesurée par l'angle de contact. On cite à titre d'exemple les travaux de Hamadi (2005) qui a constaté qu'un rapport O/C faible et un rapport N/C élevé sont associés avec une hydrophobicité importante mesurée par l'angle de contact et une hydrophilicité importante mesurée par MATH. Une présence importante des polysaccharides membranaires se traduit par un rapport O/C élevé, en revanche un rapport N/C élevé traduit une présence importante de protéines. Ces résultats ont également été confirmés par d'autres auteurs : Mozes *et al.*, 1988, 1989 ; Cowan *et al.*, 1992 ; Cuperus *et al.*, 1993 ; Latrache *et al.*, 1994 ; Dufrière *et al.*, 1997 ; Dengis & Rouxhet 1997 ; Van der Mei & Busscher, 1997 ; Boonaert & Rouxhet, 2000 ; Latrache *et al.*, 2002).

Ceci suggère que l'augmentation de la force ionique pourrait avoir comme conséquence un accroissement de la quantité de polysaccharides secrétés probablement en raison d'un taux de viabilité bactérienne important; ceci peut être étroitement lié à l'augmentation observée du pourcentage d'adhésion aux hydrocarbures utilisés dans la technique de MATS, et la diminution de l'angle de contact avec l'eau dans la technique d'angle de contact.

### III.4 Conclusions

Les résultats présentés au début de ce chapitre montrent l'influence du pH, de la force ionique et du chlore sur les propriétés physico-chimiques (hydrophobicité, caractère donneur d'électrons et accepteur d'électrons) de la surface cellulaire d'*E. coli* et de *P. aeruginosa* par la techniques d'adhésion microbienne aux solvants.

On sait d'avance qu'essayer d'expliquer toute modification d'un certain caractère de la membrane bactérienne d'une manière systématique, n'est pas possible et reste fonction de la souche bactérienne considérée et qu'il est très difficile de trouver une explication systématique pour les variations détectées lors de la variation d'un certain paramètre. Nous avons pourtant essayé de proposer des explications logiques pour rendre compte des variations observées et de les comparer avec la littérature.

La technique d'adhésion microbienne aux solvants a permis de compléter les informations déduites des mesures d'angle de contact quant à l'importance relative des interactions les unes par rapport aux autres ; ceci éclaire la complémentarité de ces deux techniques.

Comme le montre les résultats obtenus par spectroscopie infrarouge, la capacité d'adaptation des bactéries planctoniques, perceptible au niveau membranaire, est élevée. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués est donc indispensable pour la définition de nouvelles stratégies de lutte contre les biofilms. L'analyse par la spectroscopie infrarouge a permis de mettre en évidence l'effet du pH et de la force ionique sur le phénomène d'adhésion. Cette dispersion indique que les constituants membranaires de la bactérie, essentiellement polysaccharidiques, sont impliqués dans l'adaptation au milieu environnant avec des conséquences attendues pour l'adhésion.

Dans certains cas la corrélation entre différentes techniques de caractérisation physico-chimiques dans le domaine de l'adhésion bactérienne n'est pas observée, surtout pour les souches de type mucoïdes comme *P. aeruginosa* utilisé en tant que modèle biologique dans notre étude. Ceci est certainement du à la sensibilité de chaque technique utilisée.

---

# **Chapitre V**

**Etude en « dynamique » de la  
formation des biofilms dans les  
réseaux d'eau potable**

---

## Chapitre V

### Etude en « dynamique » de la formation des biofilms dans les réseaux d'eau potable

Ce chapitre a comme objectif d'évaluer en mode « dynamique » l'adaptation structurale, l'organisation et l'architecture du biofilm à *Pseudomonas aeruginosa* formé dans différentes conditions environnementales.

L'étude de l'adaptation structurale du biofilm a été réalisée grâce à la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en mode Réflexion Totale Atténuée (FTIR/ATR). L'architecture du biofilm, qui correspond bien entendu à l'organisation tridimensionnelle des bactéries et des composés exocellulaires (Stoodely *et al.*, 1997), peut être observée par différentes techniques de microscopie. Dans le présent chapitre, la microscopie confocale et la microscopie à épifluorescence ont été utilisées pour atteindre cet objectif. Les techniques utilisées dans cette partie sont des techniques non destructives et qui fournissent des informations complémentaires concernant la colonisation de *P. aeruginosa* sous différentes conditions environnementales ainsi que le rôle des polymères extracellulaires synthétisés au cours de la colonisation et de la formation des biofilms.

#### V.1. Matériels et méthodes

L'étude en dynamique de la formation du biofilm a été réalisée grâce au bioréacteur décrit précédemment (Paragraphe VII du Chapitre II) qui permet de réguler, en conditions stériles, la composition et les propriétés physico-chimiques et biologiques du milieu initial. Cette étude dynamique est focalisée sur le comportement de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* car elle présente une forte capacité d'adaptation aux modifications du milieu. De même, le PEHD a été retenu comme matériau à tester du fait que c'est celui qui met le mieux en évidence l'impact que peuvent avoir les interactions spécifiques dans le phénomène de bioadhésion (*cf.* Figure 20). Le biofilm est prélevé et caractérisé après sept jours de culture dans des conditions variées comme détaillées ci-dessous. Au bout de ce terme, le biofilm formé est prélevé par écouvillonnage et, déposé directement sur le cristal de séléniure de zinc pour une analyse structurale dans le moyen infrarouge (FTIR/ATR). Afin d'étudier la formation du biofilm du point de vue quantitatif (étendue de la surface colonisée) et qualitatif (organisation, architecture, exoproduits), des observations en microscopie confocale (après marquage par le kit Dead/live) et en épifluorescence (après marquage par le DAPI) ont été réalisées. Les

paramètres que nous avons imposés sont la force ionique, le pH, la température et les forces de cisaillement. Le tableau suivant résume les différentes conditions testées :

**Tableau 12 : Résumé des différentes conditions environnementales réalisées pour étudier la formation en « dynamique » du biofilm de *P. aeruginosa* sur le PEHD.**

Conditions	Débit (l/h)	T (°C)	[NaCl] (mM)	pH
<b>C1</b>	280	37	50	7,5
<b>C2</b>	140	37	50	7,5
<b>C3</b>	70	37	50	7,5
<b>C4</b>	70	27	50	7,5
<b>C5</b>	70	17	50	7,5
<b>C6</b>	70	37	5	7,5
<b>C7</b>	70	27	5	7,5
<b>C8</b>	70	17	5	7,5
<b>C9</b>	70	37	5	6,5
<b>C10</b>	70	37	5	9,5

3 forces de cisaillement sont donc testées qui correspondent aux débits : 280 ; 140 et 70 l/h ;

L'effet de la température a été réalisé à haute et basse force ionique ce qui doit permettre également d'étudier l'effet de la force ionique 5 et 50 mM, les températures 37, 27 et 17°C sont étudiées; l'effet de 3 pH (6,5 ; 7,5 et 9,5) sur la formation du biofilm est également testé (Tableau 12).

## V.2. Résultats et discussions

### V.2.1. Architecture et organisation du biofilm de *P. aeruginosa* sous différentes conditions environnementales

Manuel *et al.* (2007) ont montré, en utilisant 3 réacteurs conçus de manières différentes, que l'adhésion et la formation du biofilm formé en dynamique pendant une semaine, ne dépendent pas de la manière dont le bioréacteur est conçu ni de sa géométrie, mais plutôt des conditions physico-chimiques et hydrodynamiques fixées par l'opérateur.

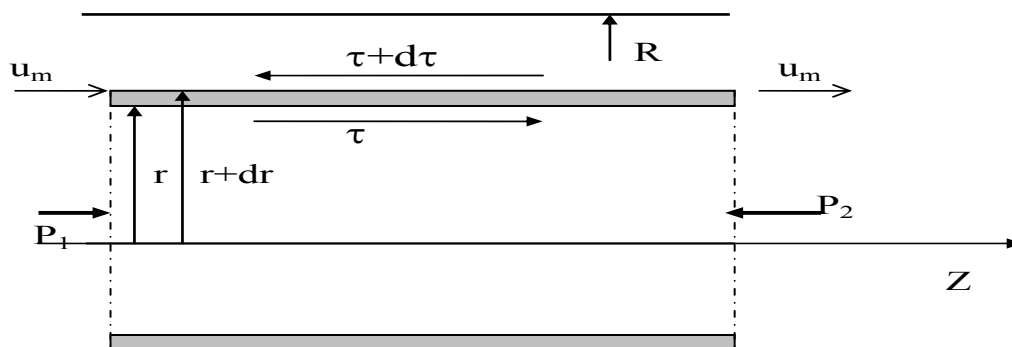
Dans un premier temps, nous présenterons séparément l'effet des variables testées avant d'envisager une approche plus globale. Pour chaque condition environnementale sont présentés :

- Le taux de colonisation exprimé par le pourcentage de la surface recouvert par les bactéries et/ou le *slime* de polysaccharides (observations en épifluorescence après marquage au DAPI)
- Le taux de survivants au sein du biofilm (comptages de cellules en microscopie confocale après marquage au DEAD/LIVE)
- Le niveau qualitatif de sécrétion d'exopolysaccharides (épifluorescence)
- La description succincte de l'aspect des bactéries adhérees (épifluorescence et microscopie confocale).

### V.2.1.1. Effet du cisaillement

#### *Nature des forces de cisaillement*

L'action d'un écoulement sur une paroi se caractérise par la contrainte de cisaillement à la paroi  $\tau_w$ . Elle exprime la force de frottement agissant tangentiellement sur la paroi, par unité de surface. La méthode d'évaluation du taux de cisaillement est basée sur l'hypothèse d'un écoulement permanent uniforme.



**Figure 38 : Schéma du cisaillement tangentiel dans un tube circulaire horizontal avec des conditions d'écoulement permanent.**

Soit une conduite horizontale de section cylindrique circulaire, de diamètre  $D$ , et qui est le siège d'un écoulement permanent établi, c'est-à-dire dont le profil des vitesses ne se modifie pas si on se déplace axialement le long de la conduite, la résultante des forces « extérieures » agissant dans la direction  $Z$  est nulle (Figure 38). Cette résultante est composée :

- des forces de frottement visqueux dues au transfert radial de quantité de mouvement à l'échelle moléculaire,
- des forces de pression s'exerçant aux extrémités.

L'application de la loi fondamentale de la dynamique (les quantités d'accélération étant nulles) au fluide contenu dans un tronçon de longueur  $L$  conduit à écrire l'égalité entre la différence des forces de pression aux extrémités  $\Delta P \frac{\pi D^2}{4}$  et la résultante des forces de frottement à la paroi  $\tau_w \pi D L$ .

En exprimant  $\Delta P$  en fonction du coefficient de perte de charge unitaire  $\lambda$  et en désignant par

$u_m = \frac{Q_v}{\pi D^2 / 4}$  la vitesse moyenne de débit dans la conduite, on obtient :

$$\Delta P = \lambda \frac{L}{D} \rho \frac{u_m^2}{2} = \tau_w \pi D L \quad (1)$$

ce qui donne, après simplification :  $\lambda = \frac{8\tau_w}{\rho u_m^2} = 4f$  (2)

et, en faisant apparaître la vitesse de frottement à la paroi :  $u_f = \sqrt{\frac{\tau_w}{\rho}}$ , (3)

$$\sqrt{\frac{8}{\lambda}} = \frac{u_m}{u_f} \quad (4)$$

Le coefficient de frottement  $\lambda$  est fonction du nombre de Reynolds  $Re$ , de la hauteur des aspérités  $\varepsilon$  (rugosité) et du diamètre hydraulique  $D_h$ . Le nombre de Reynolds est défini par :

$$Re = \frac{\rho u_m D_h}{\mu}$$

avec  $\rho$  ( $kg.m^{-3}$ ), la masse volumique du fluide ;  $\mu$  ( $Pa.s$ ), la viscosité dynamique du fluide ;  $D_h$  ( $m$ ) : le diamètre hydraulique de la conduite (Diamètre géométrique pour une canalisation cylindrique).

Dans le cas d'une couche laminaire développée, c'est le nombre de Reynolds qui détermine le coefficient de frottement. Dans le cas où la couche laminaire disparaît, c'est la rugosité qui devient le paramètre déterminant pour le frottement (*cf.* Tableau 13).

**Tableau 13 : Paramètres hydrodynamiques dans les canalisations de PEHD.** Dans ces calculs, la masse volumique  $\rho$  de l'eau est supposée égale à  $10^3 \text{ kg/m}^3$ , et la viscosité dynamique  $\mu$  de l'eau est égale à  $10^{-3} \text{ Pa.s}$ .

Débit volumique $Q_v (l/h)$	Vitesse moyenne $u_m (m/s)$	Coefficient $\lambda$	Nombre de Reynolds $Re$	Taux de cisaillement à la paroi $\tau_w$	Vitesse de frottement $u_f (m/s)$	$u/u_f$
280	0,506	0,0345 eq. (8)	7077	1,101 eq. (2) et (8)	0,033	15,24
140	0,253	0,0410 eq. (8)	3539	0,327 eq. (2) & (8)	0,018	13,97
70	0,126	0,0362 eq. (7)	1769	0,072 eq. (2) & (7)	0,008	14,87

### Régime laminaire :

Dans ce régime, toujours obtenu pour  $Re < 2000$ , lors de l'écoulement d'un fluide newtonien à travers une conduite de section circulaire de longueur  $L$ , et de diamètre  $D$ , la formule de Poiseuille permet de relier la vitesse moyenne d'écoulement  $u_m$  à la chute de pression  $\Delta P$  de la manière suivante :

$$u_m = \frac{Q_v}{\pi R^2} = \frac{\text{débit volumique (m}^3/\text{s)}}{\text{section de passage du fluide (m}^2\text{)}} = \frac{1}{8\mu} \frac{\Delta P}{L} R^2 \quad (5)$$

D'où, en éliminant  $\frac{\Delta P}{L}$ , on obtient : 
$$\tau_w = \frac{8\mu u_m}{D} \quad (6)$$

Le coefficient de frottement à la paroi est donc : 
$$f = \frac{\tau_w}{\rho u_m^2 / 2} = \frac{16}{\rho u_m D / \mu} = \frac{16}{Re} \quad (7)$$

et le coefficient de perte de charge unitaire : 
$$\lambda = 4f = \frac{64}{Re}$$

Pour le débit de 70 l/h, choisi comme référence ici, on a :  $Re < 2000$ , le régime est donc considéré comme laminaire et le taux de cisaillement est calculé en utilisant les relations (2) et (7) valables en régime laminaire. Nous avons fixé comme valeur critique du nombre de Reynolds  $Re_c=3000$ . Pour  $2000 \leq Re \leq 3000$ , la littérature considère que l'on est en régime intermédiaire.



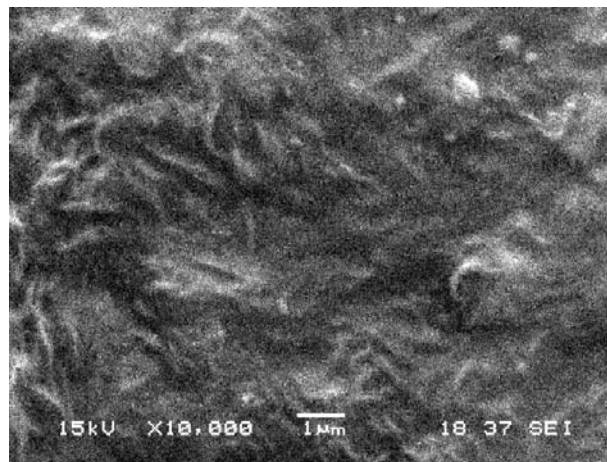
### Régime turbulent lisse :

Pour les deux autres valeurs de débits testés (140 et 280 l/h), (cf. Tableau 13) la valeur du nombre de Reynolds dépasse la valeur critique  $Re_c=3000$ . L'évaluation du taux de cisaillement a donc été basée sur la relation de Blasius :

$$\lambda = 0,316 Re^{-0,25} \quad (8)$$

Cette relation est valable en régime turbulent lisse dans un domaine de nombre de Reynolds allant jusqu'à  $10^5$ . Nous rappelons que, dans ce régime, l'écoulement est turbulent à l'intérieur de la conduite, mais il existe, le long de la paroi, une sous-couche limite visqueuse qui recouvre les aspérités. On dit encore que la paroi est « hydrauliquement lisse ».

Avec une rugosité du matériau PEHD estimée à  $\varepsilon \approx 5 \mu\text{m}$ , nous avons obtenu à l'aide de l'abaque donnant le coefficient de perte de charge en régime turbulent (formule de Colebrook), pour les nombres de Reynolds atteints expérimentalement, pratiquement la même valeur de  $\lambda$  que celle calculée avec la relation de Blasius. D'autre part, la rugosité du PEHD ne devant pas excéder la valeur de  $5 \mu\text{m}$  d'après nos observations au MEB (Figure 39), l'hypothèse de l'existence d'un régime hydraulique lisse dans ces conditions est hautement probable.



**Figure 39. Observation par MEB de la surface interne des canalisations en PEHD.** Ce type de cliché a servi de base pour estimer la rugosité du matériau.

La majorité des réseaux de distribution d'eau potable sont conçus pour supporter des vitesses d'écoulement d'eau potable allant de 0,2 jusqu'à 0,5 m/s (Manuel *et al.*, 2007). Selon certains auteurs, les débits les plus élevés et stables sont avantageux dans la limitation de la croissance des biofilms, grâce aux phénomènes d'arrachage (Peyton & Characklis, 1993; Melo & Vieira, 1999; Cloete *et al.*, 2003 ; Manuel *et al.*, 2007). Ces phénomènes sont généralement observés

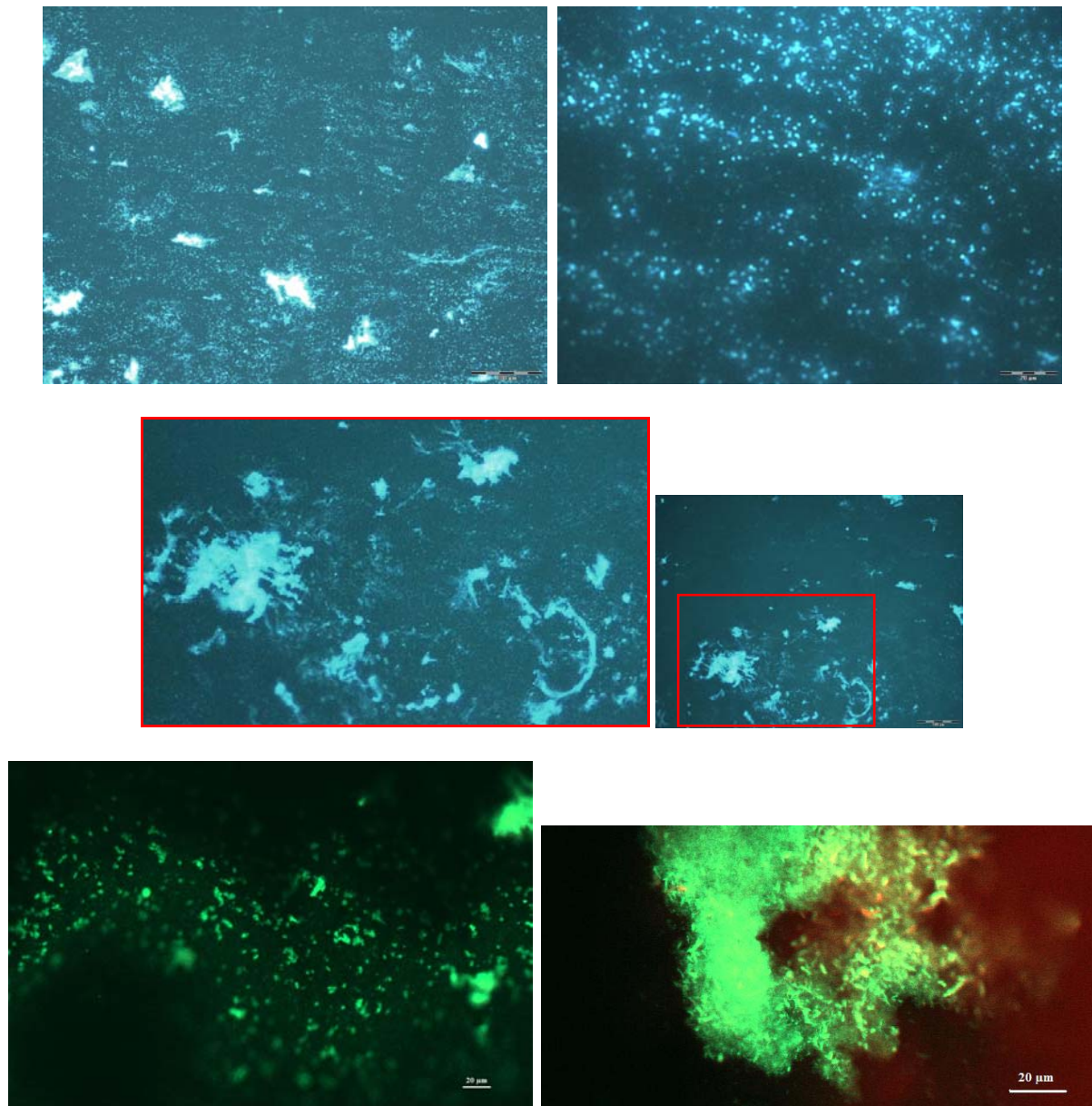
lorsque le régime est turbulent. Cependant, les conditions d'écoulement ne sont pas faciles à maîtriser dans les réseaux d'eau potable puisqu'elles dépendent très largement des consommations instantanées, elles-mêmes étant hétérogènes au sein du réseau. Il y a donc passage fréquent du régime laminaire au régime turbulent et vice-versa sans compter qu'il existe également des endroits « sans écoulement » car la consommation de l'eau y est faible ou nulle, et ce, aussi bien dans les réservoirs que dans les bâtiments.

**Tableau 14 : Détail de la colonisation en fonction du taux de cisaillement.**

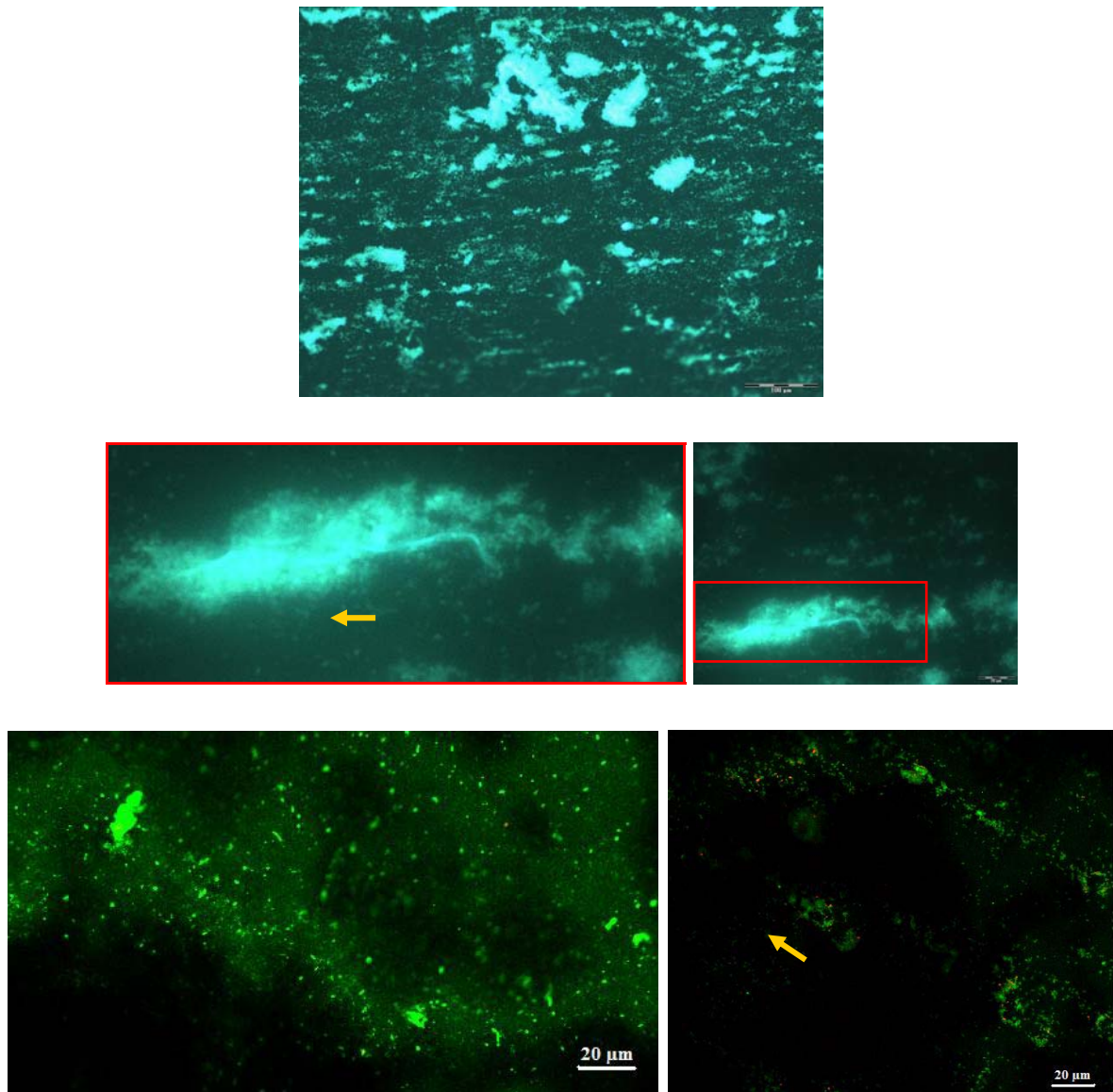
$\bar{l}$  = longueur moyenne

Débit (l/h)	%Colonisation	%Vivant	EPS	Organisation et architecture du biofilm
<b>280 (C1)</b>	76 ± 13	92 ± 9	++	Présence importante d'amas à directions aléatoires (20x20µm)
<b>140 (C2)</b>	75 ± 19	85 ± 15	++	Présence importante d'amas alignés sur la surface selon la direction de l'écoulement (70x20µm)
<b>70 (C3)</b>	8 ± 4	53 ± 14	-	Les cellules s'organisent en filaments ( $\bar{l}$ ~11µm) dispersés d'une manière aléatoire sur toute la surface.

Selon le Tableau 14 et contrairement à ce qu'on pouvait attendre, on remarque qu'aux forts débits (280 l/h soit 0,5 m/s et 140 l/h soit 0,25 m/s), la formation du biofilm est importante ainsi que les taux de survie puisqu'ils avoisinent les 75%. On note la présence de nombreux amas bactériens et d'une matrice exocellulaire bien visible au microscope adoptant des orientations isotropes. Lorsque le débit diminue (140 l/h), ces amas deviennent de plus en plus orientés dans la direction de l'écoulement. A faible débit (70 l/h soit 0,13 m/s), on observe une chute drastique de la colonisation (8% de la surface) qui s'accompagne d'une survie plus réduite d'environ 50% des bactéries. La distribution des cellules est organisée en longs filaments et on note l'absence de slime visible. Dans les conditions de pH, température et salinité de ces trois expériences (C1 à C3), il est donc clair que le régime turbulent lisse favorise particulièrement la colonisation. Cela pourrait être du à l'effet conjoint de deux causes à savoir : *i*) un échange des bactéries avec la surface favorisé du fait d'une grande vitesse d'écoulement qui irait de pair avec l'apport de nutriments et *ii*) l'existence d'une sous-couche limite visqueuse qui préviendrait les phénomènes d'arrachage observés dans les régimes turbulents.



**Figure 40: C1 (280 l/h ; 37°C ; 50 mM ; pH 7,5) Observations en épifluorescence et par microscopie confocale des surfaces de PEHD colonisées par *P. aeruginosa*.** Les photos colorées en bleu concernent les observations en épifluorescence après marquage au DAPI. Le champs est d'environ 700x400 µm. Les photos colorés en vert (cellules vivantes) et rouge (cellules mortes) sont obtenues par microscopie confocale après marquage au kit DEAD/LIVE. Les barres blanches (20 µm) donnent l'échelle des prises de vues. Les régions d'intérêt sont agrandies tel que défini par les encarts en rouge sur la photo à large champ



**Figure 41: C2 (140 l/h ; 37°C ; 50 mM ; pH 7,5) Observations en épifluorescence et par microscopie confocale des surfaces de PEHD colonisées par *P. aeruginosa*. Les flèches jaunes montrent le sens d'écoulement selon lequel les amas sont orientés.**

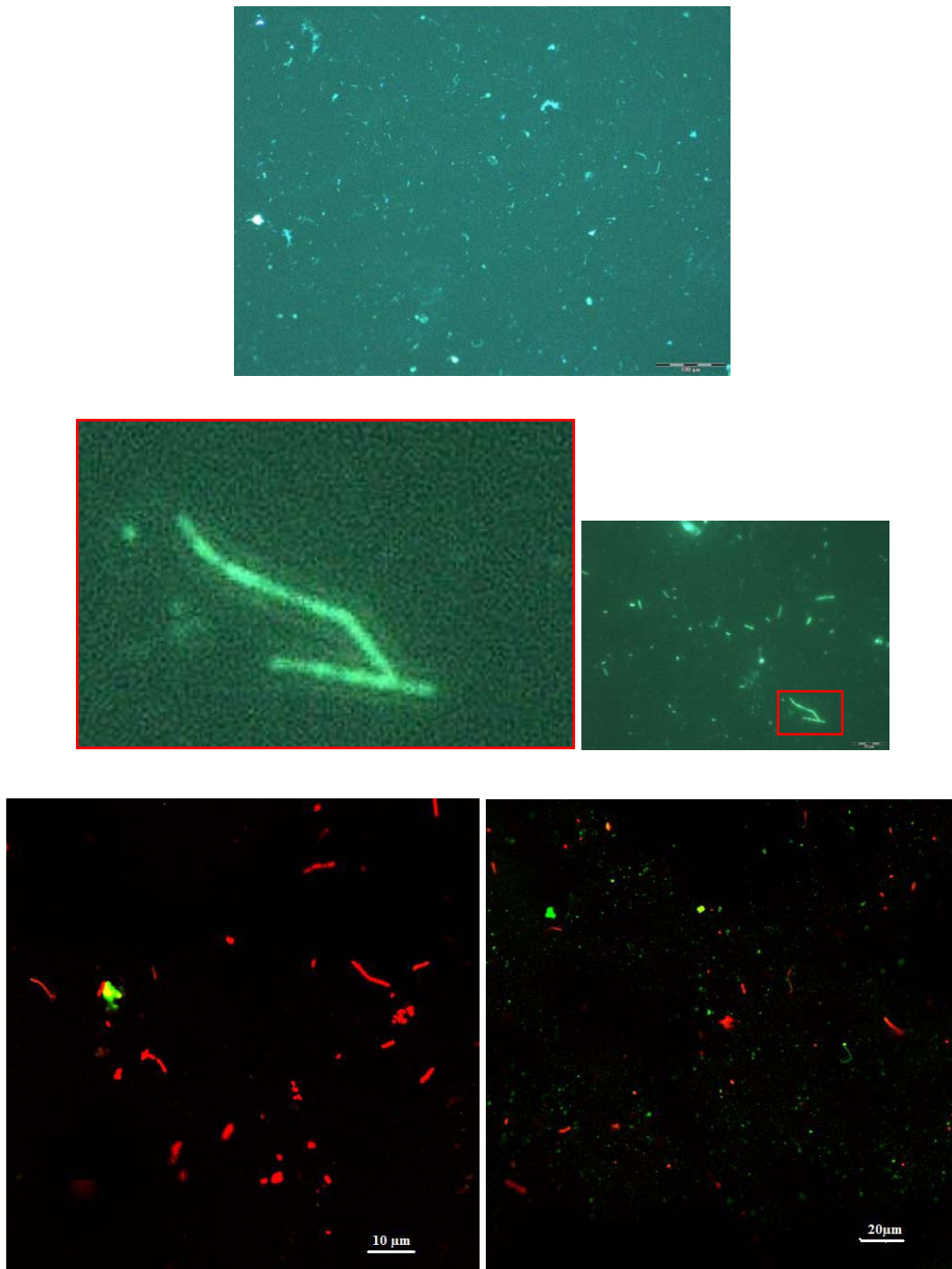


Figure 42: C3 (70 l/h ; 37°C ; 50 mM ; pH 7,5) Observations en épifluorescence et par microscopie confocale des surfaces de PEHD colonisées par *P. aeruginosa*.

Pour estimer l'épaisseur de cette sous-couche et donc les contraintes réelles exercées au voisinage immédiat des parois, nous avons calculé la variation de la vitesse locale en fonction de la distance à la paroi. L'équation donnant la distribution de vitesse en régime laminaire est la suivante :

$$v(r) = \frac{\Delta P}{4\eta L} * (R^2 - r^2)$$

avec :  $\eta$ , viscosité ;  $R$ , rayon de la canalisation ;  $r$ , distance à la paroi ;  $L$ , longueur de la canalisation.

- La vitesse moyenne est : 
$$v_m = \frac{\Delta P R^2}{8\eta L}$$
- Et la vitesse locale : 
$$v(r) = 2 * v_m \left[ 1 - \left( \frac{r}{R} \right)^2 \right] \quad (I)$$

• D'autre part, pour un écoulement turbulent dans les conduites cylindriques, on admet l'existence d'une sous-couche laminaire. La vitesse  $u$  étant nulle à la paroi, la contrainte tangentielle de frottement à la paroi est :

$$\tau_p = \eta \left( \frac{d\bar{u}}{dr} \right)_{r=0}, \quad \bar{u} = \text{vitesse moyenne}$$

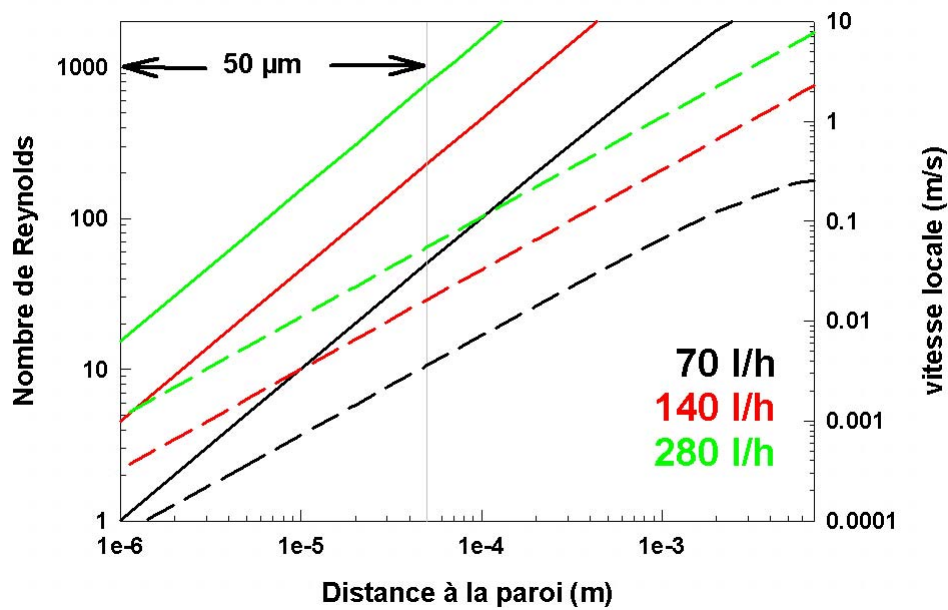
- sachant que  $u = \text{vitesse locale} = \text{vitesse moyenne} + \text{vitesse de fluctuation}$

$$u = \bar{u} + u'$$

- Dans la sous-couche laminaire le profil de vitesse est linéaire :

$$\frac{\bar{u}}{r} = \frac{\tau_p}{\eta} = \rho \frac{(u^*)^2}{\eta}, \quad (II)$$

$$u^* = \text{vitesse de frottement}$$



**Figure 43 : Evolution du nombre de Reynolds et de la vitesse locale en fonction de la distance à la paroi pour les trois régimes hydrodynamiques testés.** Le trait de référence à 50  $\mu\text{m}$  symbolise l'épaisseur maximale que pourrait atteindre un biofilm dans nos conditions. Traits pleins : nombre de Reynolds ; Tirets : vitesses locales.

La Figure 43 montre donc comment évoluent la vitesse locale et le nombre de Reynolds au voisinage de la paroi. Si l'on prend 50  $\mu\text{m}$  comme valeur maximale estimée de l'épaisseur du biofilm, on constate que, quelque soit le débit, le régime y est toujours laminaire puisque le nombre de Reynolds est significativement inférieur à 2000. Avec un débit de 280 l/h, il faut en effet se placer à 100  $\mu\text{m}$  de la paroi pour atteindre cette valeur. On peut donc en déduire qu'aux forts débits les phénomènes d'arrachage doivent être extrêmement restreints, voire absents. Ceci nous pousse à proposer que la forte colonisation observée aux débits importants est due à un échange très efficace entre les bactéries et la surface comme mentionné ci-dessus.

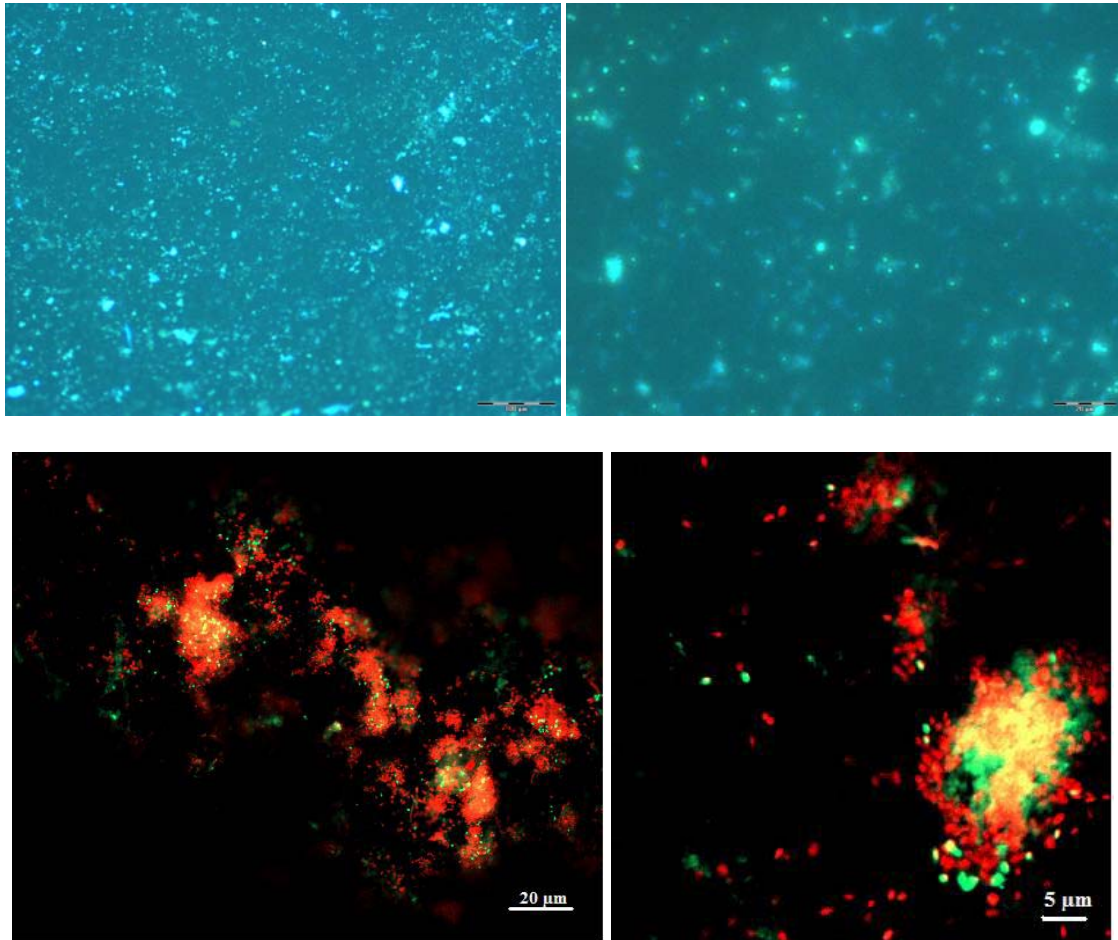
### V.2.1.2. Effet du pH :

Tableau 15 : Détail de la colonisation en fonction du pH.  $\bar{l}$  = longueur moyenne.

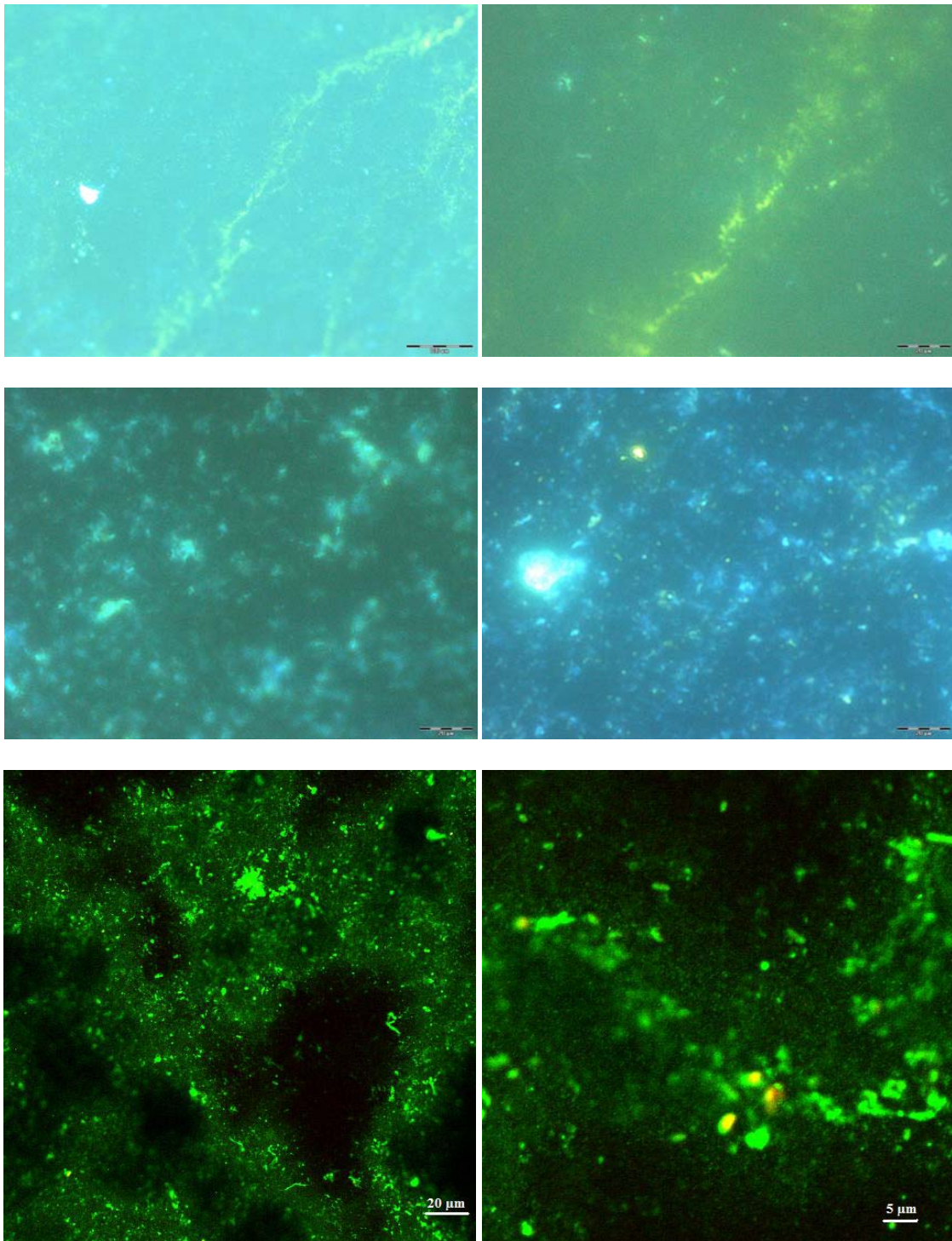
pH	%Colonisation	%Vivant	EPS	Organisation et architecture du biofilm
6,5 (C9)	16 ± 19	52 ± 28	+	Les cellules s'organisent en filaments serrés ( $\bar{l} \sim 6 \mu\text{m}$ ). Elles sont enrobées d'une matrice extracellulaire dense visible au microscope.
7,5 (C6)	83 ± 10	95 ± 5	++	Les cellules s'organisent en filaments denses ( $\bar{l} \sim 6 \mu\text{m}$ ) et sont enrobées, très localement, dans une matrice extracellulaire dense visible au microscope
9,5 (C10)	89 ± 8	77 ± 15	+++	Nombreux amas couverts d'une matrice extracellulaire et orientés de façon isotrope (20x20 $\mu\text{m}$ )

Plusieurs études ont montré que l'adhésion bactérienne est pH dépendante (Jana *et al.*, 2000, Hamadi *et al.*, 2005). Dans notre étude, l'effet du pH sur la bioadhésion a été recherché en travaillant à un débit de 70 l/h, 37°C et 5mM NaCl (Tableau 15). Un taux de colonisation faible (16%) et une mortalité significative (48%) sont observés à pH acide (6,5) alors que des valeurs élevées de colonisation et de survie sont observées à pH neutre et alcalin.

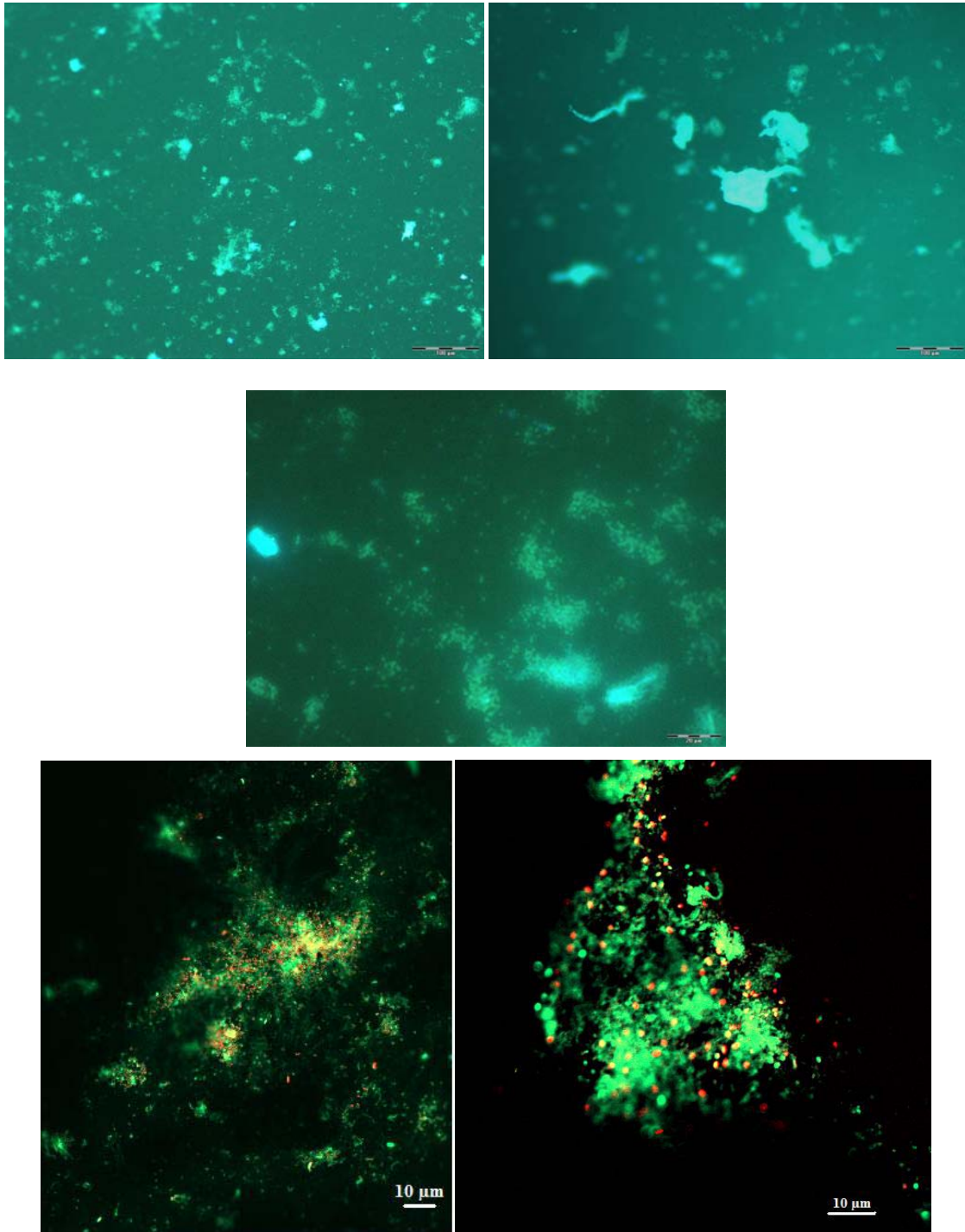




**Figure 44: C9 (70 l/h ; 37°C ; 5 mM ; pH 6,5) Observations en épifluorescence et par microscopie confocale des surfaces de PEHD colonisées par *P. aeruginosa*.**



**Figure 45: C6 (70 l/h ; 37°C ; 5 mM ; pH 7,5) Observations en épifluorescence et par microscopie confocale des surfaces de PEHD colonisées par *P. aeruginosa*.**



**Figure 46: C10 (70 l/h ; 37°C ; 5 mM ; pH 9,5) Observations en épifluorescence et par microscopie confocale des surfaces de PEHD colonisées par *P. aeruginosa*.**

### V.2.1.3. Effet de la température et de la force ionique:

Tableau 16 : Détail de la colonisation en fonction de la température à deux forces ioniques distinctes.

$\bar{l}$  = longueur moyenne.

T (°C)	%Colonisation	%Vivant	EPS	Organisation et architecture du biofilm
<b>Force ionique faible (5mM)</b>				
<b>37 (C6)</b>	83 ± 10	95 ± 5	++	Les cellules s'organisent en filaments serrés ( $\bar{l}$ ~6 μm). Elles sont enrobées d'une matrice extracellulaire dense visible au microscope
<b>27 (C7)</b>	10 ± 9	26 ± 10	++	Nombreuses cellules regroupées en amas de petite taille, présence d'une matrice extracellulaire dans quelques endroits de la surface.
<b>17 (C8)</b>	4 ± 3	55 ± 16	+	Adhésion faible absence de matrice.
<b>Force ionique élevée (50 mM)</b>				
<b>37 (C3)</b>	8 ± 4	53 ± 14	-	Les cellules s'organisent en filaments ( $\bar{l}$ ~11 μm) dispersés d'une manière aléatoire sur toute la surface.
<b>27 (C4)</b>	71 ± 12	20 ± 14	+++	Nombreuses cellules regroupées en amas de petite taille mais présentant une matrice extracellulaire dense.
<b>17 (C5)</b>	4 ± 2	53 ± 17	+	Adhésion faible absence de matrice.

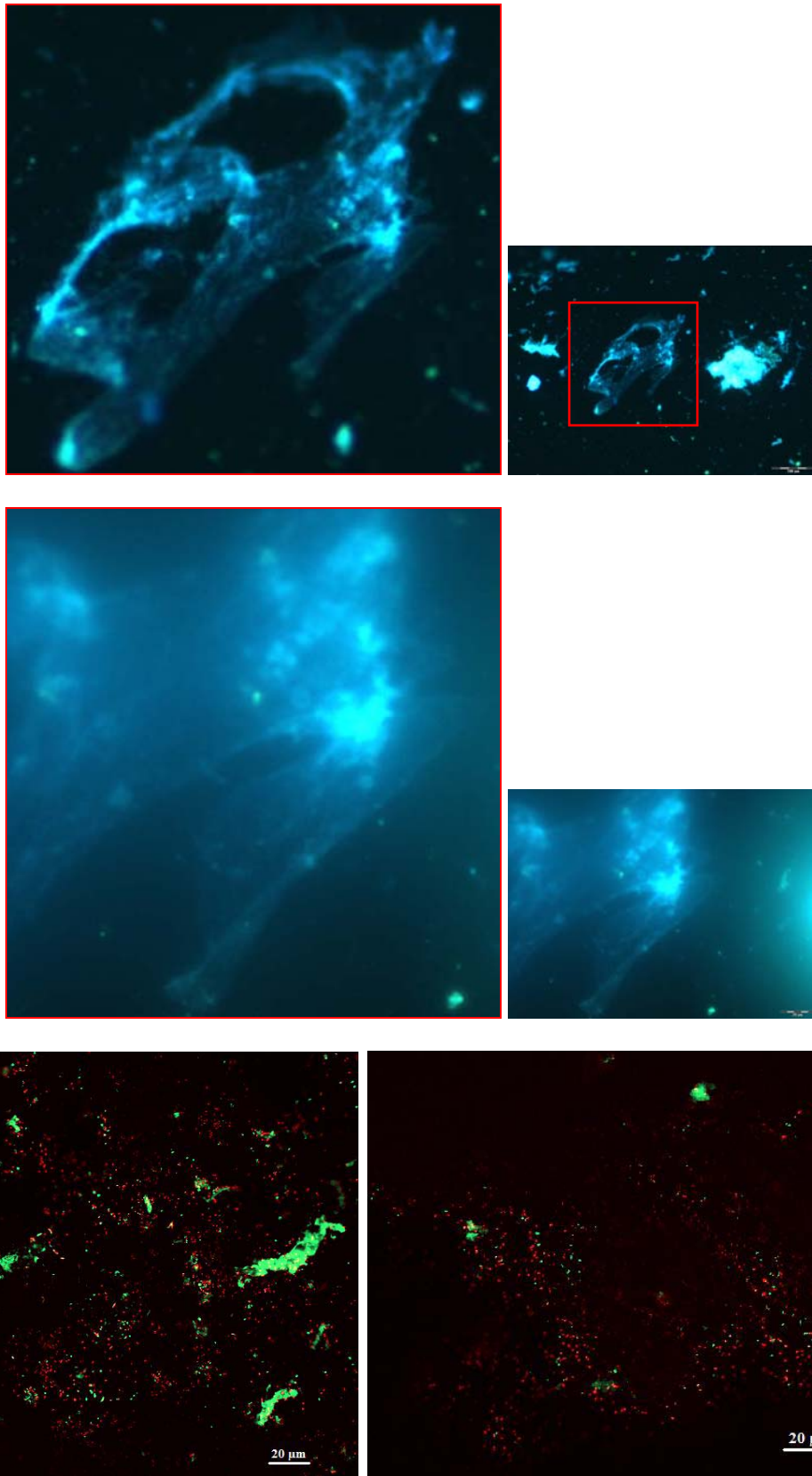
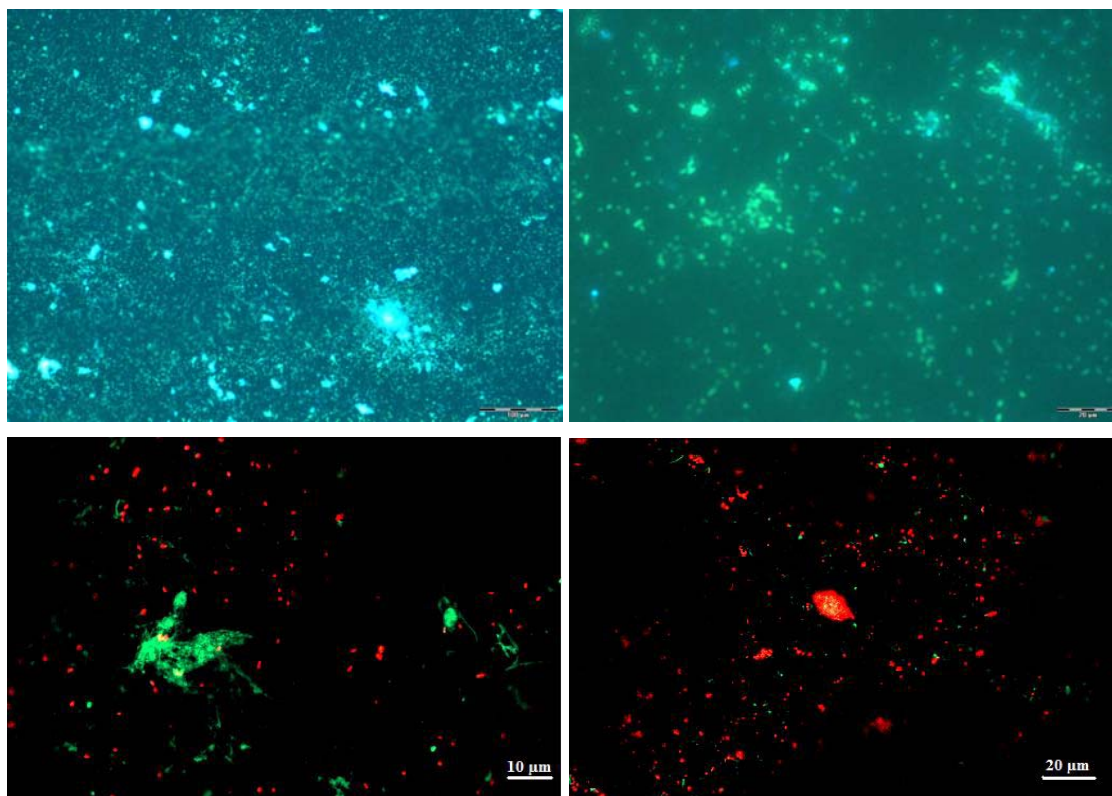
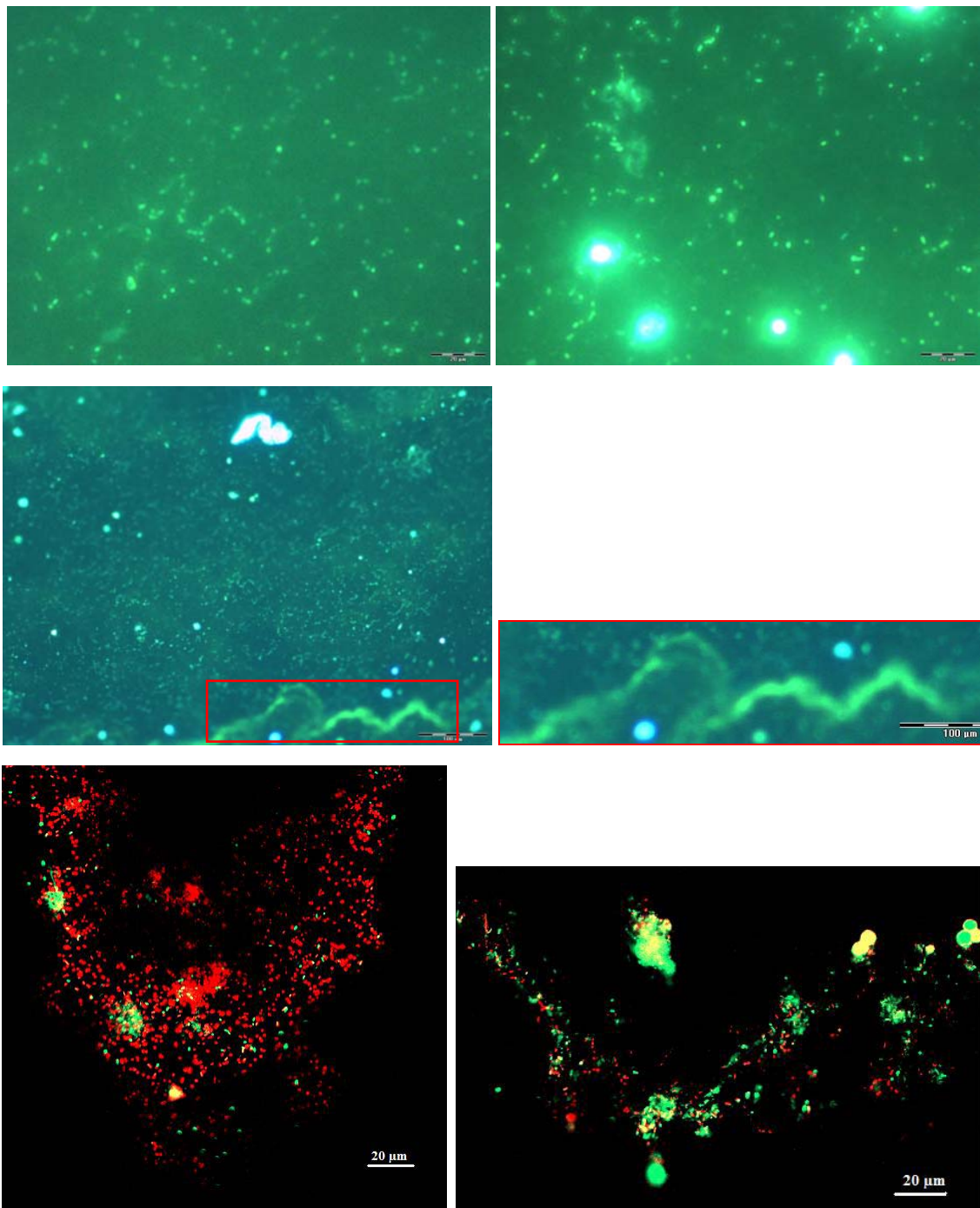


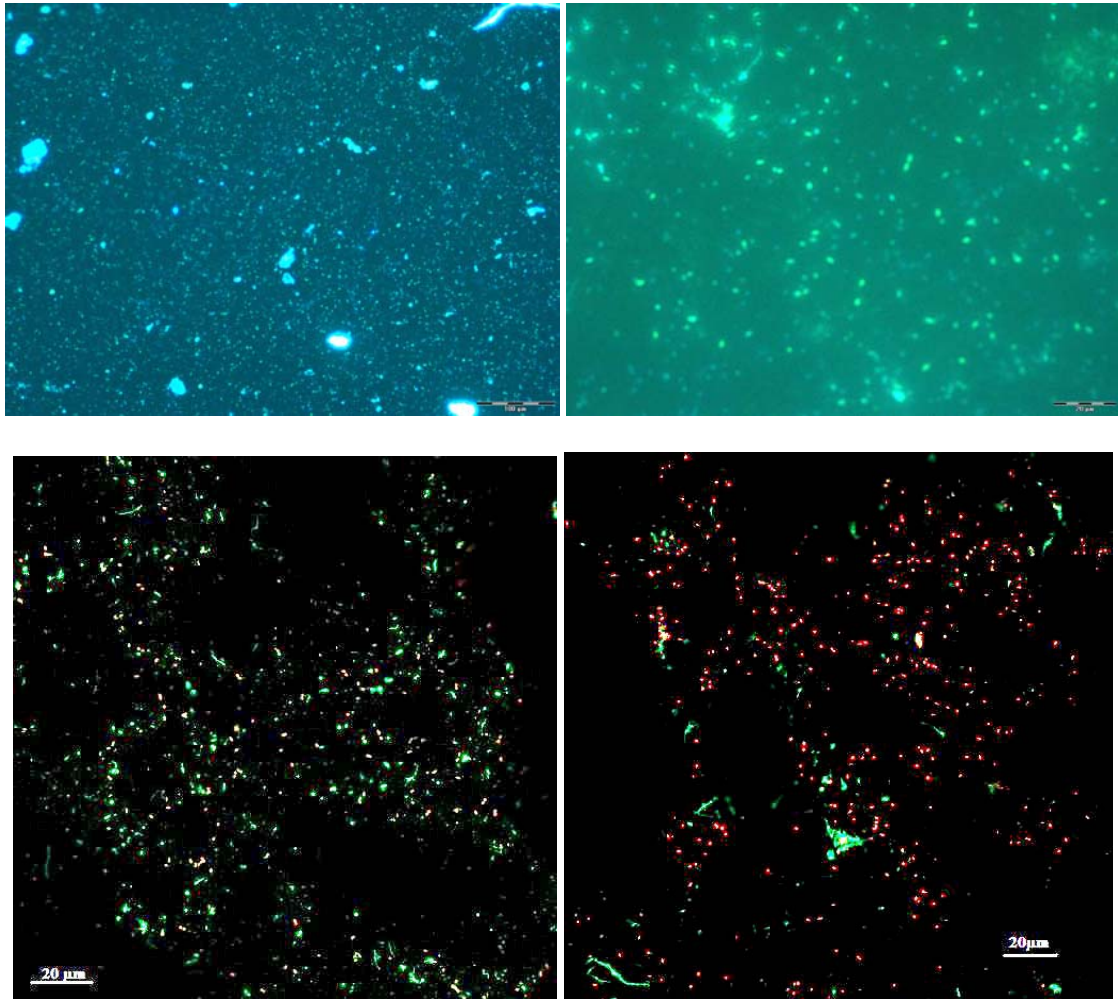
Figure 47: C4 (70 l/h ; 27°C ; 50 mM ; pH 7,5) Observations en épifluorescence et par microscopie confocale des surfaces de PEHD colonisées par *P. aeruginosa*.



**Figure 48: C5 (70 l/h ; 17°C ; 50 mM ; pH 7,5) Observations en épifluorescence et par microscopie confocale des surfaces de PEHD colonisées par *P. aeruginosa*.**



**Figure 49: C7 (70 l/h ; 27°C ; 5 mM ; pH 7,5) Observations en épifluorescence et par microscopie confocale des surfaces de PEHD colonisées par *P. aeruginosa*.**



**Figure 50: C8 (70 l/h ; 17°C ; 5 mM ; pH 7,5) Observations en épifluorescence et par microscopie confocale des surfaces de PEHD colonisées par *P. aeruginosa*.** Les photos en microscopie confocale montrent deux domaines distincts présentant des taux de survie très différents comme en atteste le marquage au kit DEAD/LIVE.



L'effet de la température sur l'adhésion paraît dépendre de la force ionique (*cf.* Tableau 16); en effet, à force ionique faible, l'élévation de la température paraît favorable à l'adhésion ainsi qu'à l'agglutination cellulaire. Ceci n'est pas nouveau, il est reconnu que la température joue un rôle très important dans le transport des particules colloïdales vers un support donné par agitation thermique. La communication et rencontre des cellules bactériennes que ça soit entre elles ou avec le support d'adhésion deviennent plus probables. De plus, plusieurs études ont montré à ce sujet qu'une augmentation de la température affecte les composantes énergétiques de surface bactérienne, et provoque une augmentation de l'hydrophobicité des cellules microbiennes (Briandet *et al.*, 1999b ; Jana *et al.*, 2000 ; Cappello *et al.*, 2006 ), ce qui favorise les interactions hydrophobes entre cellules bactériennes et donc au final la colonisation de surfaces. Gallardo-Moreno *et al.* (2002) par contre ont observé que sur deux souches de *Candida parapsilosis* (294 et 289) une élévation de la température (de 22°C à 37°C) provoque l'augmentation de l'hydrophobicité pour la souche 294 et par conséquent l'adhésion était favorable, en revanche elle a provoqué sa réduction pour la souche 289. L'effet reste alors dépendant à la souche.

L'action conjointe des différents paramètres contrôlant l'adhésion est plus difficile à appréhender à haute force ionique. A basse température (17°C), l'effet de la force ionique est négligeable, et l'adhésion cellulaire très faible ; dans ces conditions, il est certain que c'est la température (avec ses conséquences multiples sur le métabolisme cellulaire et les interactions bactérie-matériau) qui constitue le facteur limitant à toute colonisation significative. De plus, la baisse de température augmente la viscosité, ce qui fait que les vitesses vont diminuer (puisque elles sont inversement proportionnelles) et on se rapproche donc du régime laminaire (70 l/h).

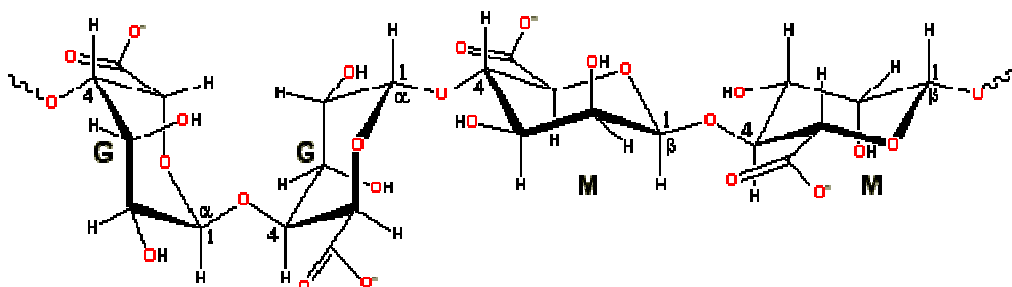
A 37°C (C3 et C6), l'augmentation de la force ionique conduit à une chute spectaculaire du taux de colonisation puisque celui-ci passe de 83% (à 5 mM) à 8% (à 50 mM). Ceci qui est en accord avec les résultats de nos mesures en mode statique, où nous avons montré que, pour *P. aeruginosa*, les interactions acide-base sont plus importantes à force ionique faible.

Le comportement à température intermédiaire (27°C) est plus complexe à étudier car le fort taux de colonisation (71%) observé à force ionique élevée (C4) pourrait refléter un optimum d'adhésion de *P. aeruginosa*. Ainsi des conditions initiales défavorables dues à la force ionique élevée pourraient, au bout d'une semaine, être fortement contrebalancées par un métabolisme bactérien optimal pour l'adhésion. L'analyse spectrale en infrarouge est nécessaire dans ce cas là pour connaître les éléments qui ont intervenu.

## V.2.2. Analyse spectrale du biofilm de *P. aeruginosa* sous différentes conditions environnementales

Plusieurs études ont utilisé la spectroscopie infrarouge pour analyser les composantes de la surface aussi bien des cellules bactériennes isolées que leur organisation en biofilms (Martin *et al.*, 1993 ; Nivens *et al.*, 1993 ; Schmitt & Flemming, 1995 ; Beech *et al.*, 1999 ; David *et al.*, 2001 ; Marcotte *et al.*, 2007). Dans ce cas là, des régions spectrales spécifiques demeurent plus intéressantes que d'autres (*cf.* Tableau 17). Notamment, la région spectrale spécifique aux protéines qui correspond aux vibrations des bandes amide vers  $1650\text{ cm}^{-1}$  (amide I),  $1550\text{ cm}^{-1}$  (amide II) et de  $1300$  à  $1240\text{ cm}^{-1}$  (amide III). Les sucres absorbent le rayonnement électromagnétique dans la région spectrale entre  $1200$  à  $1000\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu\text{C-OH}$  et  $\nu\text{C-O-C}$ ). Les carboxylates possèdent la liaison  $\text{C=O}$  absorbant de  $1780$  à  $1730\text{ cm}^{-1}$  et la liaison  $\nu\text{C-O}$  vers  $1400\text{ cm}^{-1}$ . La liaison  $\text{P=O}$  des acides nucléiques et des phospholipides membranaires, absorbe vers  $1250\text{ cm}^{-1}$  et recouvre donc la région de la bande amide III. Les phosphates possédant également un mode de vibration de la liaison  $\text{P-O}$  (élongation) vers  $1080\text{ cm}^{-1}$  chevauche le domaine des  $\nu\text{COOH}$ . Le  $\delta\text{C-H}$  (courbure) des groupes  $\text{CH}_3$  et  $\text{CH}_2$  absorbe à environ  $1460\text{ cm}^{-1}$ . Ces bandes sont typiquement retrouvées dans toutes les cellules, et sont également observables dans les biofilms de *P. aeruginosa* (Beech *et al.*, 1999 ; David *et al.*, 2001 ; Filip & Hermann, 2001).

Il existe des bandes d'absorption spécifiques à *P. aeruginosa*, liées à la capacité de cette bactérie à synthétiser des alginates (*cf.* Figure 51) ; ce sont les pics qui correspondent aux modes vibrationnels des groupes carboxyles présents dans ce polymère :  $1615\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{as}}$ ),  $1410\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{sym}}$ , élongation symétrique), et  $1060\text{ cm}^{-1}$   $\nu\text{C-OH}$  (élongation). La forme acétylée des alginates conduit à l'apparition de bandes vers  $1730\text{ cm}^{-1}$  et  $1250\text{ cm}^{-1}$  qui correspondent aux fonctions  $\nu\text{C=O}$  et  $\nu\text{C-O-C}$  des esters des résidus de mannuronate (David *et al.*, 2001).



**Figure 51 : Structure d'un alginate.** G, ac. Glucuronique ; M, ac. Mannuronique.

**Tableau 17 : Attribution des bandes IR couramment observées dans les biofilms.** Les bandes correspondant aux carboxyle sont caractéristiques des EPS anioniques comme les alginate. Les attributions proviennent des sources suivantes : Bellamy (1975); Parker (1971); Brandenburg & Seydel (1996); Filip & Hermann (2001) ; Nivens *et al.* (2001).

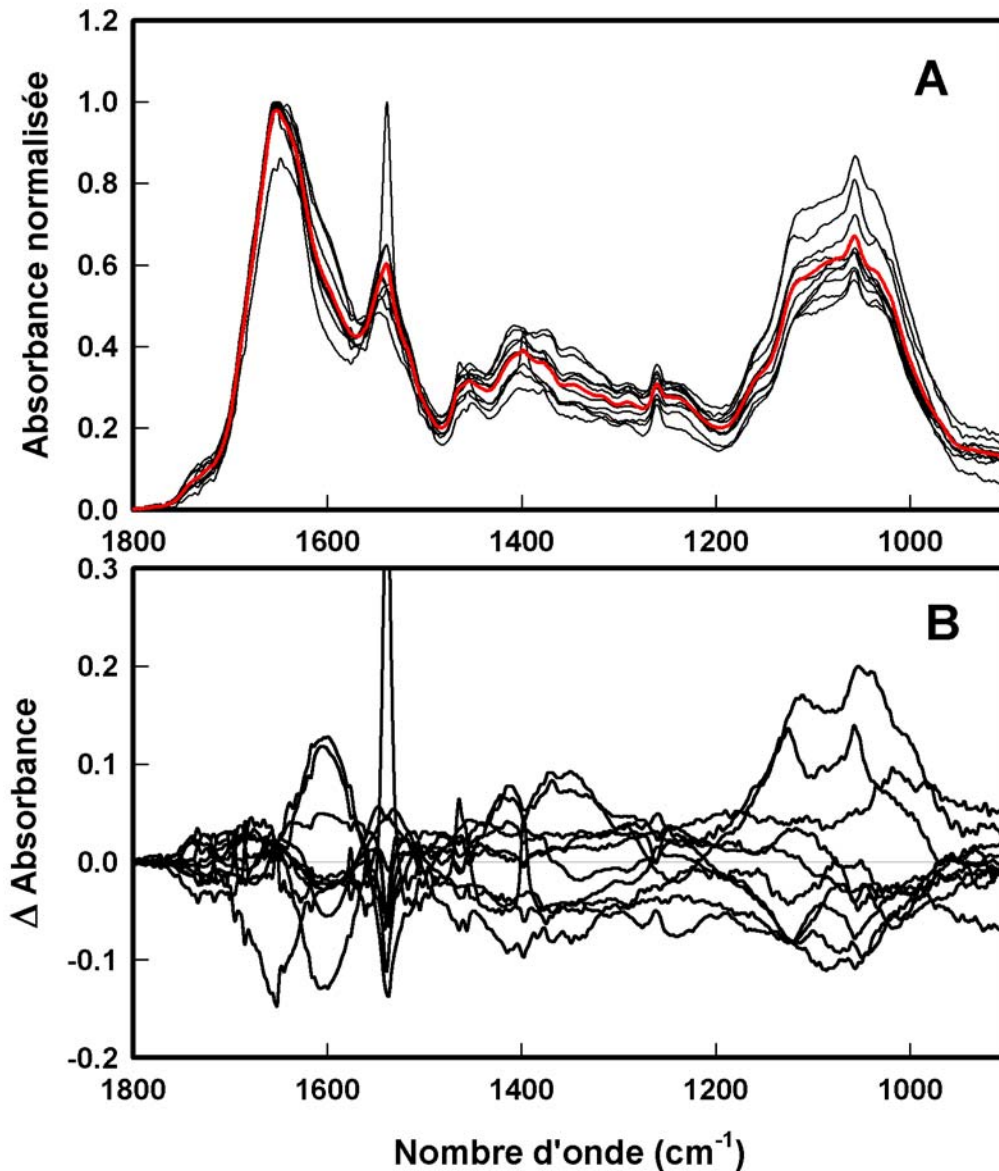
v, vibration d'élongation ;  $\delta$ , vibration de déformation ou courbure ; s, symétrique ; as, asymétrique.

Bande (cm <sup>-1</sup> )	Attributions spectrales
≈ 3300	$\nu$ O-H et $\nu$ N-H groupes avec liaison H, (eau, protéines, adenine, guanine, cytosine)
2960	$\nu_{as}$ CH <sub>3</sub> (lipides)
2870	$\nu_s$ CH <sub>3</sub> (lipides)
2926	$\nu_{as}$ CH <sub>2</sub> (lipides)
2850	$\nu_s$ CH <sub>2</sub> (lipides)
2960–2850	$\nu$ C-H aliphatiques (acides gras), élongation
1730	$\nu$ C=O esters carbonyle (lipides, O-acetyl et COOH LPS)
1650–1535	$\nu$ C=O, + $\delta$ C=N (amide I and II), recouvrement avec $\delta$ O-H (eau) à 1640cm <sup>-1</sup> .
1620-1614	$\nu_{as}$ COO <sup>-</sup> (LPS)
1485	$\delta_{as}$ (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> N <sup>+</sup>
1467–1455	$\delta_{as}$ C-H dans CH <sub>2</sub> ou CH <sub>3</sub> groups (aliphatiques)
1410	$\nu_s$ COO <sup>-</sup>
1407	$\delta_s$ (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> N
1396–1389	$\delta$ C-H, $\nu$ -CH <sub>3</sub> (acides gras)
1260-1220	$\nu_{as}$ PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (phosphodiester des phospholipides)
1250	$\nu$ C-O (O-acétyl alginate)
1240–1235	$\nu$ C-N (amide III)
1163	$\nu$ C=O
1150–1000	$\nu$ C-O, $\nu$ PO <sup>2-</sup> (modes complexes sucres).
1060	$\nu$ C-OH (alginate)
965–760	$\nu$ P-O-C, $\nu$ P-O-P (phospholipides, chaînes ribosephosphate et pyrophosphate)
< 900	Région « fingerprint »

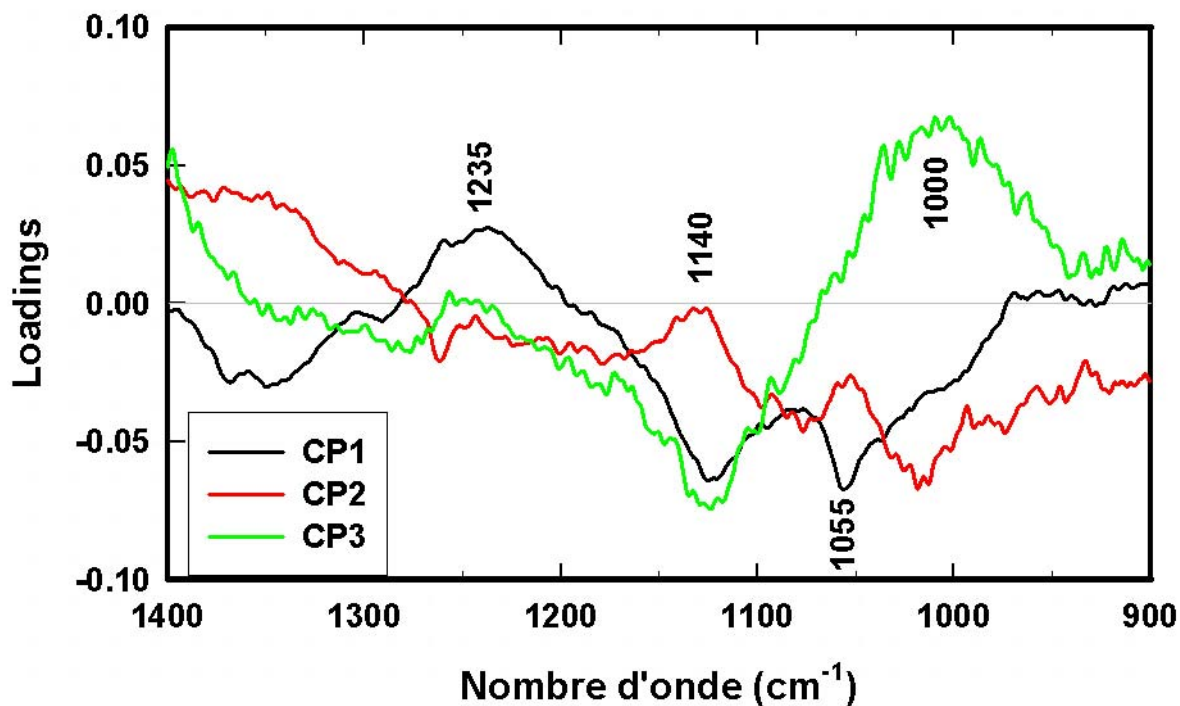
Quant au rôle de ces alginates dans la formation des biofilms, ce sont des composés qui permettent la formation de colonies tridimensionnelles abondantes et bien dispersées sur la surface colonisée. En constituant une matrice extracellulaire qui lie et protège les cellules, ils ont donc un rôle primordial dans la détermination de l'architecture du biofilm (David *et al.*, 2001 ; Ramsey & Wozniak, 2005).

#### **V.2.2.1. Analyse en composante principale.**

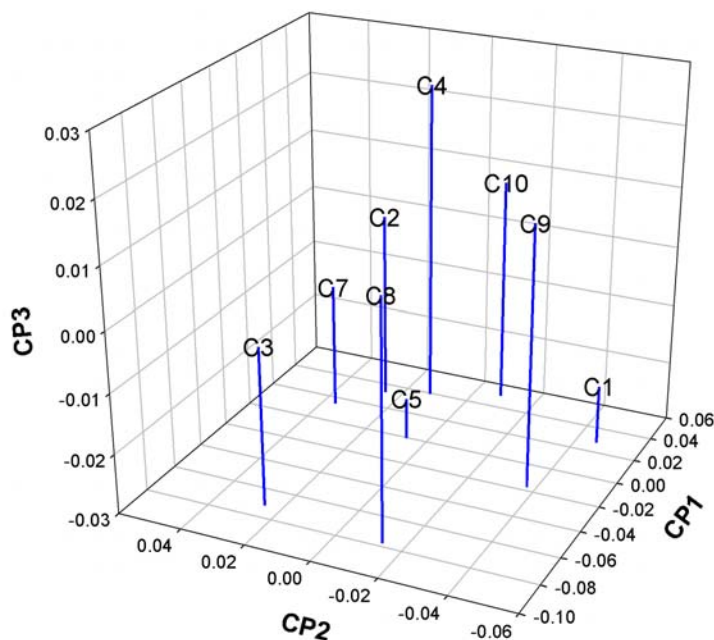
Nous avons cherché à caractériser les différents spectres IR obtenus dans le but de rechercher des regroupements qui, à leur tour, permettraient de dégager des tendances générales pouvant être ultérieurement reliées aux caractéristiques des biofilms formés. Afin de n'être pas ou peu gêné dans l'analyse par la contribution de l'eau qui introduit une variabilité peu informative, l'analyse en composante principale (ACP) a été restreinte à un domaine « basses fréquences » allant de 1800 à 900  $\text{cm}^{-1}$ .



**Figure 52: Variabilité spectrale des biofilms à *P. aeruginosa* cultivés dans des conditions expérimentales variées.** A. Spectres correspondant aux conditions C1 à C10 ; le spectre rouge est la moyenne des 10 spectres collectés. B, Mise en évidence des domaines de forte variabilité par soustraction du spectre moyen des 10 spectres expérimentaux. A noter que le spectre C6 présente un pic étroit particulièrement important vers  $1540 \text{ cm}^{-1}$ .



**Figure 53:** Trois premières composantes principales de l'ACP. Le spectre C6 a été exclu de l'analyse.

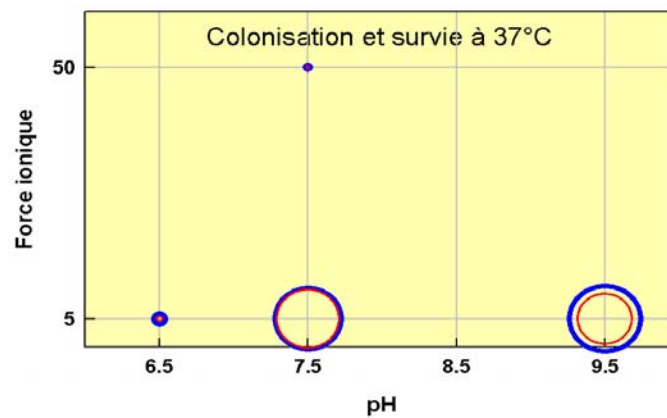


**Figure 54:** Représentation 3D des spectres C1 à C10. Noter que le spectre C6 a été exclu de l'analyse.

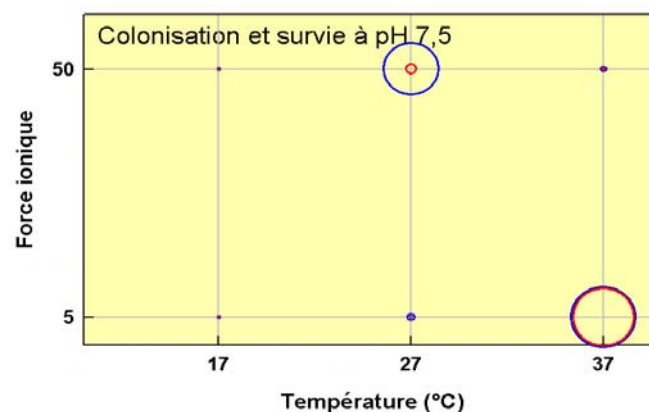
Les figures 48A,B et 49 indiquent clairement que le domaine d'absorption des polysaccharides est l'objet d'une forte variabilité lorsque les conditions expérimentales

changent. Ceci est le signe d'une forte capacité de la bactérie à s'adapter avec les conséquences que l'on a vu plus haut sur sa capacité à coloniser une surface et à survivre. Le pattern des composantes principales est particulièrement intéressant car il indique les « invariants » de la série spectrale et donc les bandes d'absorption qui sont à l'origine de la variabilité observée. Cette analyse globale de la série spectrale (cf. Figure 54) n'apporte pourtant que des informations qualitatives car il n'est pas possible ainsi de distinguer des groupes d'individus (segmentation de données).

Dans un second temps, nous avons cherché à savoir si des caractéristiques spectrales particulières pouvaient permettre de distinguer les individus (les spectres) en fonction du taux de colonisation observé. Pour éviter toute complication inutile, cette analyse n'a pris en compte que les expériences menées à faible débit (70 l/h). Le problème du cisaillement sera traité à part, compte tenu de son importance.

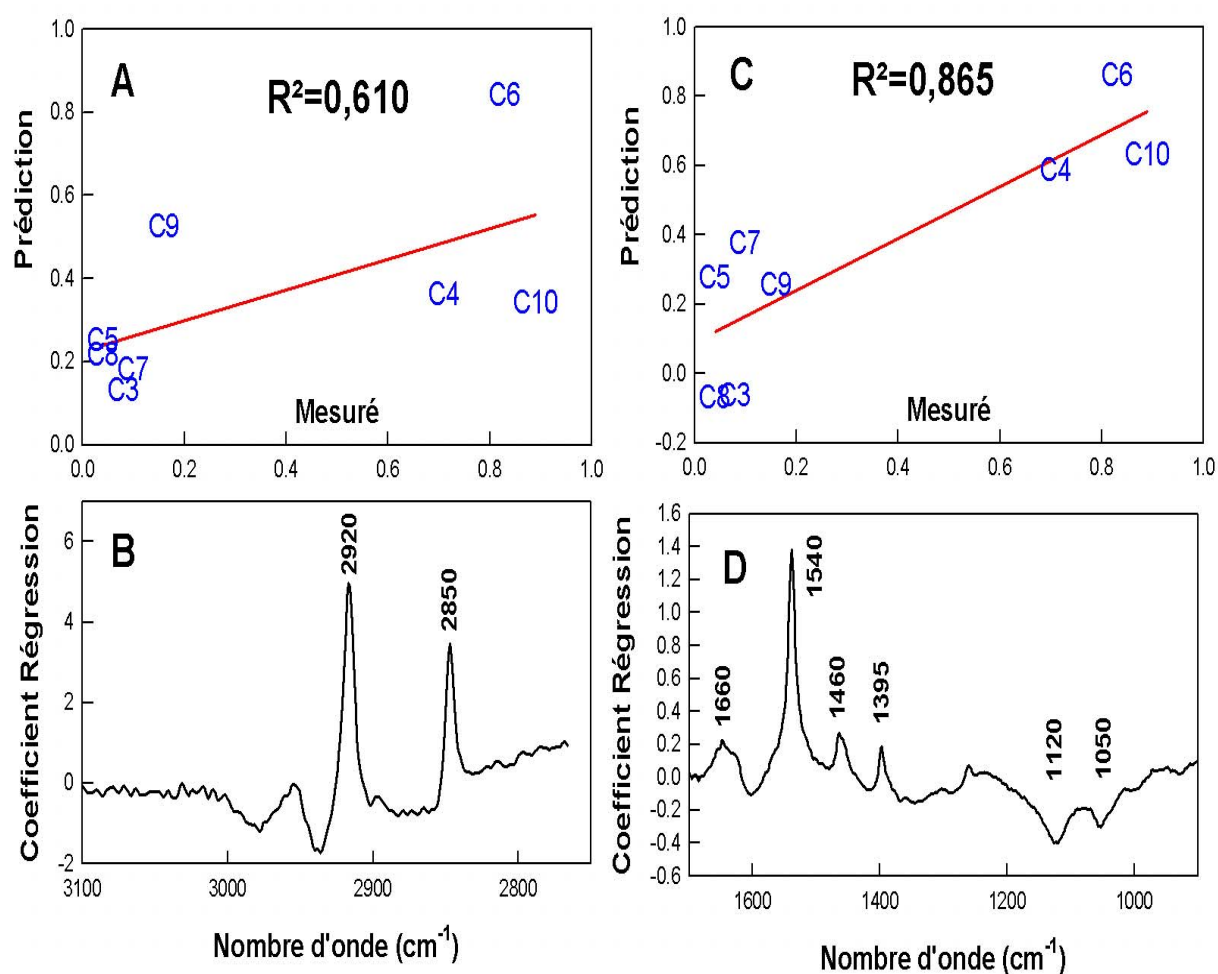


**Figure 55: Colonisation et survie à 37°C.** L'aire délimitée par les cercles bleus est proportionnelle à la surface colonisée par les bactéries. Celle correspondant aux cercles rouges est en rapport avec celle des cercles bleus égal au taux de survie des bactéries.



**Figure 56: Colonisation et survie à pH 7,5.** Avec la même symbolique que la figure précédente.

Les figures 51 et 52 montrent qu'il n'existe en fait que trois conditions, C4, C6 et C10, pour lesquelles la colonisation du PEHD est significative. Un modèle de régression de type PLS1 (pour *Partial Least Squares*) a donc été utilisé pour classer les spectres en fonction du taux de colonisation observé pour chacun d'eux. La régression a porté, outre le domaine basse fréquence évoqué plus haut pour l'ACP, sur le domaine d'absorption des groupes méthylène et méthyle des lipides membranaires. En effet, une variabilité importante en intensité est observée sur les spectres originaux. Il faut comprendre que ces deux domaines ont été testés de manière séparée. La régression PLS1 ne prend en compte, ici, qu'un seul des deux domaines à la fois.



**Figure 57: Analyse R-PLS1 des spectres C3 à C10.** Cette régression est basée sur le taux de colonisation de chacun des spectres. A et C montrent la droite de régression obtenues pour les domaines spectraux figurés en B et D respectivement. B et D présentent les coefficients de régression pour chacun des modèles.

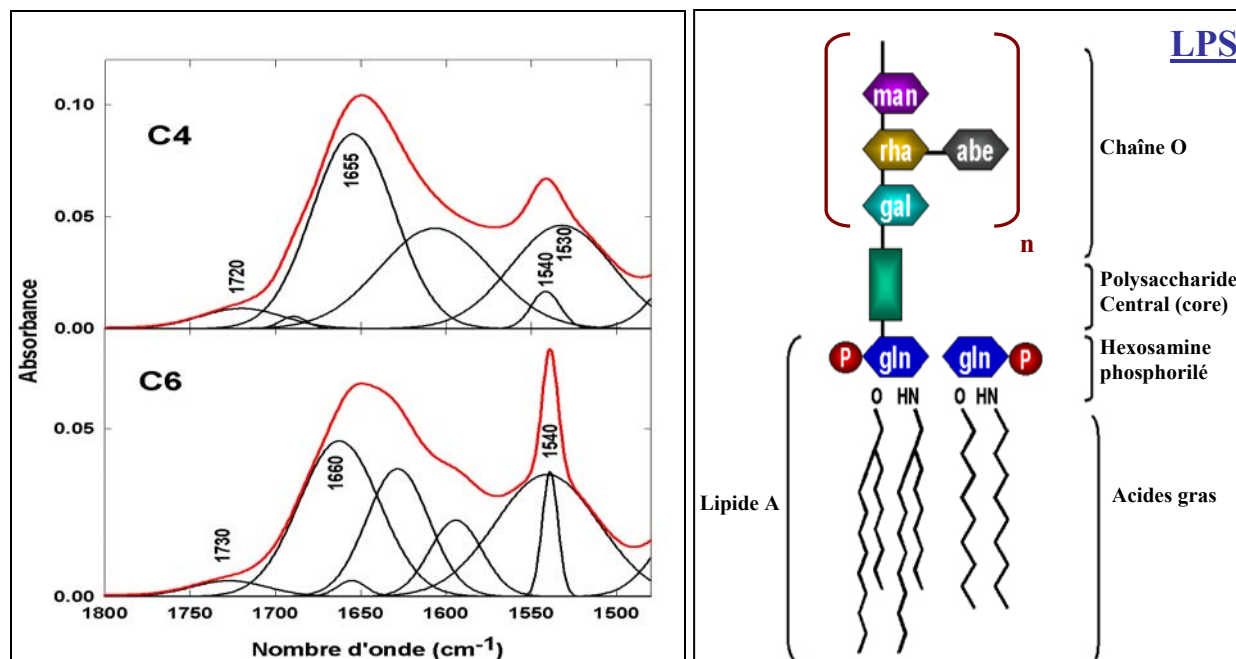
La Figure 57 présente le résultat des deux modèles testés séparément pour les deux fenêtres spectrales mentionnées. Le premier modèle (Figure 57A,B) prenant en compte la variabilité



d'intensité des bandes  $\nu_s\text{CH}_2$  et  $\nu_{as}\text{CH}_2$  (respectivement à 2850 et 2920  $\text{cm}^{-1}$ ) montre clairement que les forts taux de colonisation sont associés à de fortes intensités de ces bandes. Cela indique que pour les spectres correspondant à C4, C6 et C10, les teneurs relatives en lipides soit significativement plus importantes par rapport aux autres conditions pour lesquelles le taux de colonisation est négligeable. On note que le coefficient de corrélation  $r^2$  est peu élevé. Si l'on base maintenant la régression PLS1 sur le domaine « basse fréquence » (Figure 57C,D) qui prend en compte un beaucoup plus grand nombre de transitions d'absorption, on observe une corrélation plus prononcée caractérisée par une valeur de  $r^2$  de 0,865. L'allure des coefficients de corrélation en fonction de la longueur d'onde met en évidence un fort pic positif à 1540  $\text{cm}^{-1}$  et deux pics négatifs à 1120 et 1050  $\text{cm}^{-1}$ . Le premier correspond au domaine d'absorption des protéines (amide II), tandis que les deux derniers correspondent au domaine d'absorption des polysaccharides. Il semble donc, en première analyse, qu'une faible teneur en polysaccharides et une forte teneur en protéines soient caractéristiques de la formation du biofilm.

Les choses ne sont pourtant pas si simples. Reprenant le domaine des lipides (premier modèle PLS1, Figure 57A,B), on conçoit mal que la teneur en phospholipides membranaires puisse varier, même de 20%. On sait en effet (Gué *et al.*, 2001) que le signal collecté dans cette gamme pour des bactéries vivantes correspond quasi uniquement aux chaînes d'acides gras des phospholipides membranaires. Concernant le pic à 1540  $\text{cm}^{-1}$  (deuxième modèle, Figure 57C,D), s'il devait refléter uniquement une variation de la teneur en protéines des échantillons, nous devrions observer conjointement une variation de même sens, de la bande amide I toute proche (1600-1650  $\text{cm}^{-1}$ ). Ce n'est pas le cas. Ceci pourrait résulter du fort chevauchement entre la bande amide I des protéines et la vibration de courbure  $\delta\text{O-H}$  de l'eau (1640  $\text{cm}^{-1}$ ): une variation du taux d'hydratation résiduelle pouvant significativement affecter, à la hausse ou à la baisse, l'intensité du massif 1700-1600  $\text{cm}^{-1}$ : toute variabilité de la teneur en eau a affecter ce domaine. L'attribution du pic à 1540  $\text{cm}^{-1}$  reste donc à élucider.

Compte tenu du caractère discriminant de ce pic à 1540  $\text{cm}^{-1}$ , nous avons effectué une décomposition spectrale correspondant aux bandes amide I et II pour deux conditions, C4 et C6, présentant des taux de colonisation voisins mais dont l'intensité à 1540  $\text{cm}^{-1}$  est très différente. Cette décomposition vise à caractériser la bande porteuse d'information sur les biofilms fortement développés.

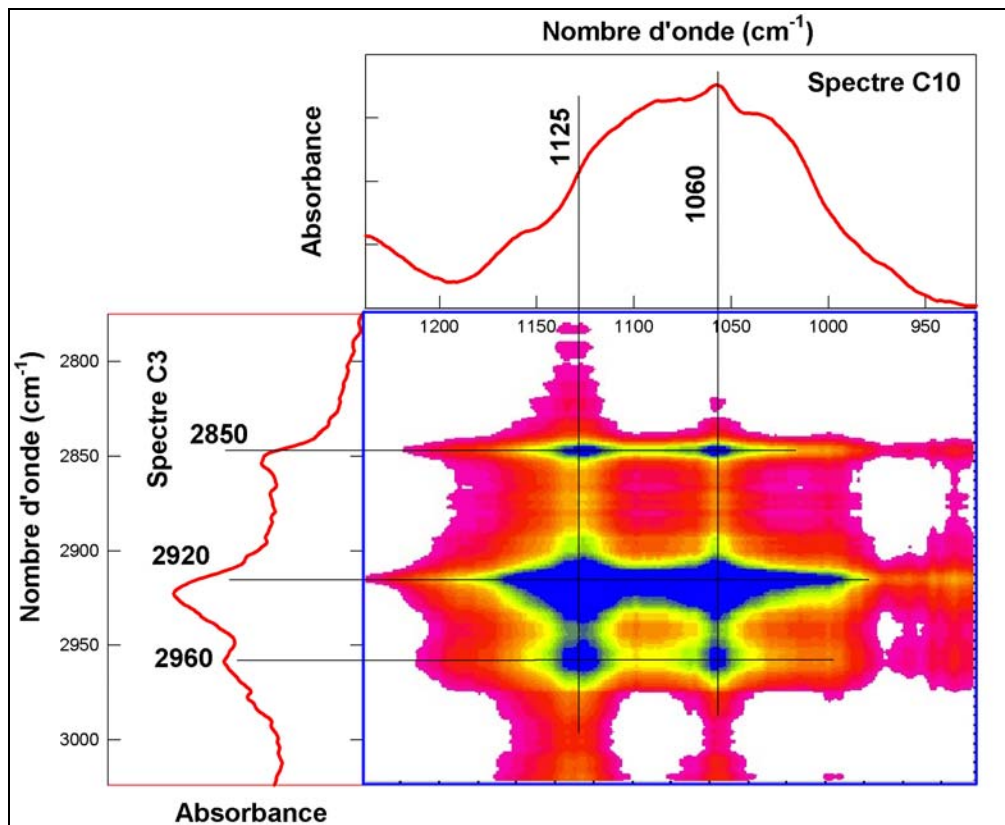


**Figure 58 : a. Décomposition spectrale des spectres C4 et C6 dans le domaine d'absorption des bandes amide I et II.** Les composantes sont présentées en noir et le spectre calculé, correspondant à la somme de ces dernières, en rouge **b. Structure moléculaire des lipopolysaccharides (LPS).**

Afin d'éviter les effets de bords, la décomposition spectrale a porté sur un domaine plus large que celui d'intérêt. Si des différences notables sont visibles sur la Figure 58 dans le domaine amide I, nous rappelons que le chevauchement avec le mode  $\delta\text{O-H}$  à  $1640\text{ cm}^{-1}$  rend très hasardeux toute interprétation des variations spectrales dans ce domaine. On constate donc que le pic étroit révélé par la régression PLS1 (*cf.* Figure 57D) ne correspond pas, malgré la concordance de position, au mode amide II centré à  $1530\text{ cm}^{-1}$  pour C4 et à  $1540\text{ cm}^{-1}$  pour C6. Ici la différence spectrale la plus nette porte sur la largeur à mi-hauteur puisque le mode amide II usuel a une largeur à mi-hauteur  $\Delta\nu_{1/2}$  de  $71\text{ cm}^{-1}$  alors que le pic d'intérêt a un  $\Delta\nu_{1/2}$  de  $\approx 15\text{ cm}^{-1}$ . Il est utile de rappeler qu'en milieu hydraté, les largeurs de bandes sont rarement inférieures à  $30\text{-}40\text{ cm}^{-1}$  compte tenu de l'hétérogénéité des vibrateurs. Un  $\Delta\nu_{1/2}$  de  $15\text{ cm}^{-1}$  témoigne donc d'une très forte homogénéité des environnements de ce vibrateur. Le pic étroit à  $1540\text{ cm}^{-1}$  est donc attribuable à un mode amide libre très contraint dans son environnement et ne peut, de toute évidence, provenir d'une contribution moyennée des modes amide II des protéines de l'échantillon. Il est intéressant de rappeler que le lipide A des LPS de *P. aeruginosa* possède des liaisons amide qui pourraient être à l'origine de cette bande. Ces liaisons relient les esters acides gras aux deux hexosamines constitutifs du lipide A. Une telle bande a déjà été identifiée dans le spectre IR d'un extrait des LPS de *Proteus mirabilis* (Gué

*et al.*, 2001). Cette attribution serait alors cohérente avec les pics discriminants observés à 2850 et 2920  $\text{cm}^{-1}$  dans le premier modèle de régression PLS1 puisque une teneur élevée en LPS devrait avoir comme conséquence une augmentation de ces deux bandes. De plus, certains auteurs (Pier *et al.*, 2001 et références citées) ont montré qu'il existait une relation inverse entre production d'alginate et synthèse de LPS. Dans ce cas, les coefficients de régression positifs à 1540  $\text{cm}^{-1}$  (Figure 57B) et négatifs à 1120 et 1050  $\text{cm}^{-1}$  (Figure 57D) pourraient refléter une forte teneur en LPS et une production réduite d'alginate. En effet la bande localisée à 1050-1060 est attribuée généralement aux groupes carboxyle des alginate (Nivens *et al.*, 2001). L'observation en épifluorescence des biofilms C4 (Figure 47) et C6 (Fig. 41) renforce cette hypothèse puisque la présence d'une matrice extracellulaire étendue est nettement visible pour C4 et beaucoup plus réduite à la périphérie des cellules pour C6. Ainsi donc, le marqueur à 1540  $\text{cm}^{-1}$  et ceux identifiés à 2850, 2920, 1120 et 1050  $\text{cm}^{-1}$  reflètent vraisemblablement la balance permettant de discriminer entre bactéries très mucoïdes produisant peu de LPS et bactéries faiblement mucoïdes et fortement productrices de LPS. Si cette hypothèse s'avère correcte, cela signifie, et c'est fondamental, que la capacité à sécréter exclusivement, ou presque, alginate ou LPS (Pier *et al.*, 2001) dépend non seulement du fond génétique de la bactérie mais aussi, dans une large mesure, des conditions physico-chimiques de croissance des bactéries.

Afin d'affermir notre hypothèse nous avons cherché à mettre en évidence cette corrélation négative entre signatures spectrales des lipides et des LPS pour deux conditions où le taux de colonisation varie très significativement : C3 (8 %) et C10 (89 %). On observe donc, conjointement, une élévation des lipides (bandes à 2850 et 2920  $\text{cm}^{-1}$ ) et une baisse des polysaccharides (bandes à 1120 et 1050  $\text{cm}^{-1}$ ). La spectroscopie IR étant basée sur l'absorption, les chromophores de l'échantillon contribueront au signal en proportionnalité de leur concentration locale. Ainsi, c'est encore plus vrai en mode ATR, un chromophore présent localement (ici 1 à 2  $\mu\text{m}$ ) en grande quantité pourra masquer d'autres chromophores. Ainsi il est tentant d'interpréter nos résultats de la manière suivante : en l'absence d'une production marquée d'exopolysaccharides (les alginate), les LPS membranaires contribuent significativement au signal collecté par le cristal ATR ; dans le cas contraire, ceux-ci seraient masqués et donc verraient leur intensité diminuer. Un moyen simple pour vérifier cette hypothèse est de dresser une carte de corrélation 2D de type asynchrone (Ozaki *et al.*, 1997) puisque ce mode de représentation permet de mettre en évidence les domaines spectraux qui sont anti-corrélés.



**Figure 59: Carte de corrélation 2D asynchrone des spectres correspondant à C3 et C10**

La carte asynchrone présentée montre clairement l'évolution inverse de deux transitions d'absorption des polysaccharides (1125 et 1055  $\text{cm}^{-1}$ ) par rapport aux deux transitions attribuées aux groupes  $\text{CH}_2$  des lipides membranaires (2850 et 2920  $\text{cm}^{-1}$ ). La bande à 1055  $\text{cm}^{-1}$  a été attribuée aux alginates, tandis que la bande à 1125  $\text{cm}^{-1}$  correspond aux vibrations inter-cycles des polysaccharides.

En conclusion de ces analyses, il est donc possible d'avancer que, dans nos conditions de culture, les bactéries qui ont le mieux adhéré ne sont pas celles qui ont sécrété des quantités importantes d'EPS mais au contraire synthétisé des LPS. Cette caractéristique est donc fonction, outre du fond génétique de la bactérie, des conditions environnementales dans lesquelles se développe le biofilm. Pourtant, il est indéniable que les alginates participent activement à la structuration spatiale du biofilm. Ce paradoxe apparent pourrait simplement provenir de l'âge relativement jeune des biofilms qui se sont formés. En régime dynamique, la croissance des biofilms et leur maturation, surtout si l'on est en milieu pauvre, s'étale sur plusieurs semaines ou mois. Il reste néanmoins vrai que l'état des lieux, fait ici au bout de sept jours, témoigne du terrain sur lequel d'autres bactéries pourront venir se fixer. Ce « conditionnement » de la surface des canalisations est donc déterminant pour le devenir du

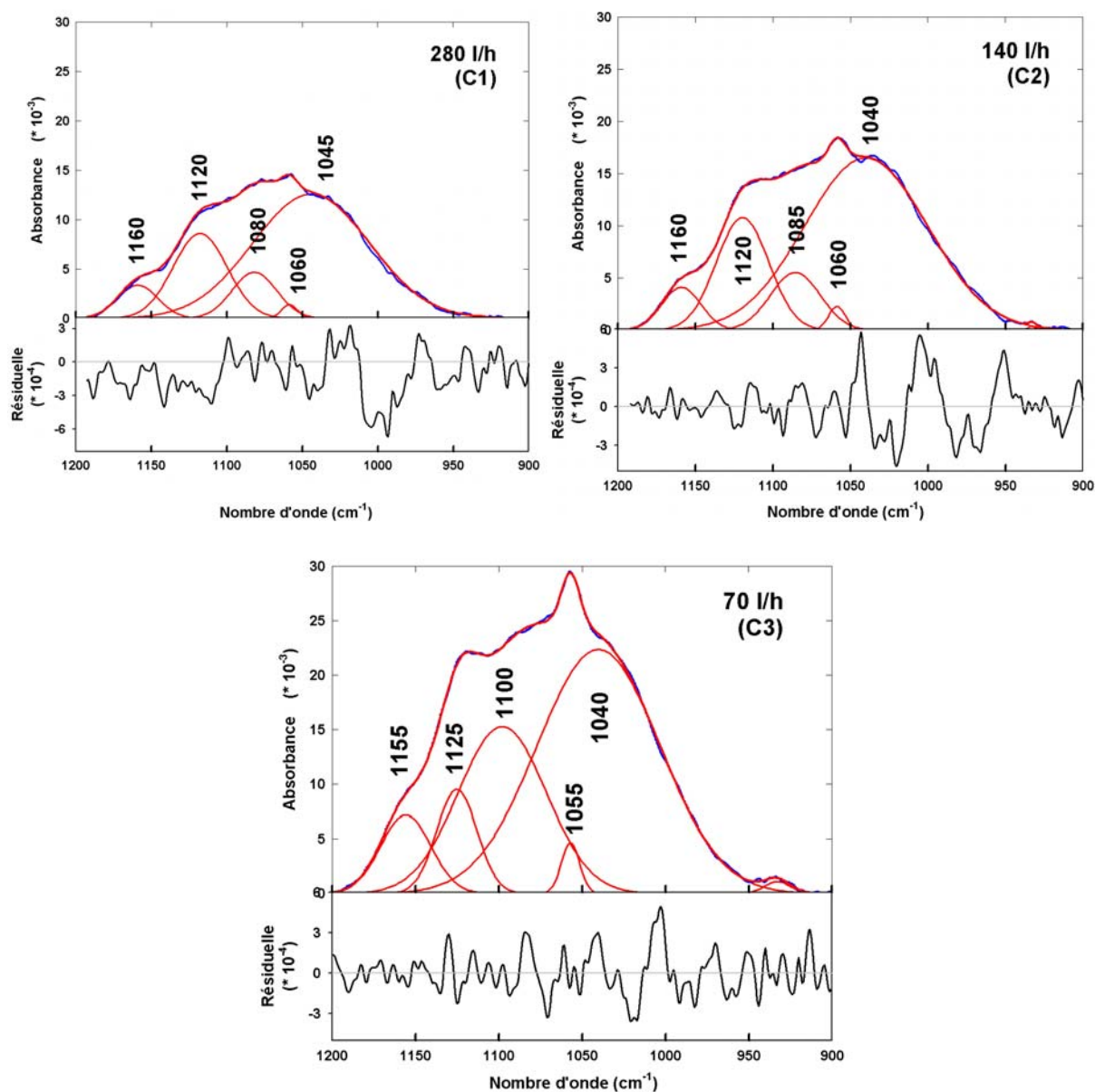
biofilm. En cela, notre étude prolonge la durée d'observation totale de l'installation d'un biofilm en dépassant nettement les conséquences quasi immédiates de l'adhésion pour embrasser également la consolidation (phase d'attachement *irréversible* observée par les tests d'adhésion) et la colonisation au bout de 7 jours (en conditions dynamiques).

#### V.2.2.2. Effet du cisaillement sur les EPS bactériens

La colonisation pérenne de conduites d'eau par des microorganismes nécessite que ceux-ci puissent s'adapter en permanence aux stress mécaniques induits par l'écoulement du fluide. De manière très générale, il a été observé que les biofilms présentaient un comportement viscoélastique (Shaw *et al.*, 2004 ; Lahaye *et al.*, 2007a,b) que l'on peut attribuer avec confiance aux propriétés mécaniques des EPS produits. De plus, Shaw et collaborateurs (2004) ont montré pour plusieurs souches qu'une variation du régime hydrodynamique de plus de 20 min était suffisante pour induire la synthèse *de novo* de polysaccharides dont les propriétés viscoélastiques permettaient l'adaptation aux nouvelles forces de cisaillements que subissait le biofilm. Ces auteurs notent que ce délai de 20 min est celui généralement observé pour qu'une bactérie soumise à un changement environnemental développe une réponse cellulaire, on parle ici d'adaptations métaboliques et structurales.

Nous avons donc cherché à savoir dans quelle mesure de tels phénomènes adaptatifs pouvaient entrer en jeu dans des conditions expérimentales proches de celles régnant dans les canalisations d'eau potable pour une souche dont l'intérêt en tant que modèle biologique a déjà été souligné.

Trois débits ont donc été testés (280, 140 et 70 l/h) et, comme mentionné plus haut, nous avons pu déduire du calcul que les biofilms formés dans ces conditions étaient tous exposés à un régime d'écoulement laminaire (*cf.* Figure 43). Par ailleurs, le Tableau 18 a montré que le taux de cisaillement  $\tau_w$  à la paroi évoluait progressivement en fonction du débit : 0,07 (70 l/h), 0,33 (140 l/h) et 1,10 (280 l/h). Nous avons donc eu recours à la spectroscopie infrarouge pour rechercher des variations structurales des polysaccharides sécrétés dans ces conditions (C1 à C3). La Figure 60 présente les spectres infrarouges correspondants dans le domaine d'absorption des polysaccharides c.a.d. de 1200 à 900  $\text{cm}^{-1}$ . Ce domaine spectral a été décomposé en 5 bandes principales selon un modèle gaussien. L'absence de structure dans la résiduelle ainsi que son bruit haute fréquence atteste de la validité du modèle utilisé pour la décomposition de ce massif spectral.



**Figure 60 : Décomposition spectrale des spectres C1 à C3 dans le domaine d'absorption des polysaccharides.** Chaque figure présente : le spectre brut en bleu, les 5 composantes gaussiennes et l'enveloppe calculée en rouge et la résiduelle ( $A_{Obs}-A_{Calc}$ ). Les positions des bandes sont arrondies à  $5\text{ cm}^{-1}$  près.

Ce massif est dominé par une bande à  $1040\text{ cm}^{-1}$  attribuée aux vibrations des cycles osidiques. Une bande mineure apparaît à  $1060\text{ cm}^{-1}$  qui a été attribuée à la vibration  $\nu\text{C-OH}$  des alginate (Nivens *et al.*, 2001). Ces auteurs déduisent de l'intensité de l'absorption à  $1060\text{ cm}^{-1}$  la production d'alginate. La décomposition effectuée ici (et non réalisée par ces auteurs) montre clairement que cette absorbance est très largement due à la bande située à  $1040\text{ cm}^{-1}$ . Il est donc plus raisonnable de dire que l'absorbance à  $1060\text{ cm}^{-1}$  (ou  $1040\text{ cm}^{-1}$ ) reflète globalement la production de polysaccharides. La bande localisée à  $\approx 1085\text{ cm}^{-1}$  reflète les

vibrations complexes des cycles osidiques, celle à 1120 cm<sup>-1</sup> les vibrations  $\nu_{as}C-O-C$  des liaisons inter-osidiques et celle à 1160 cm<sup>-1</sup>, la vibration  $\nu C=O$  pour les polysaccharides anioniques.

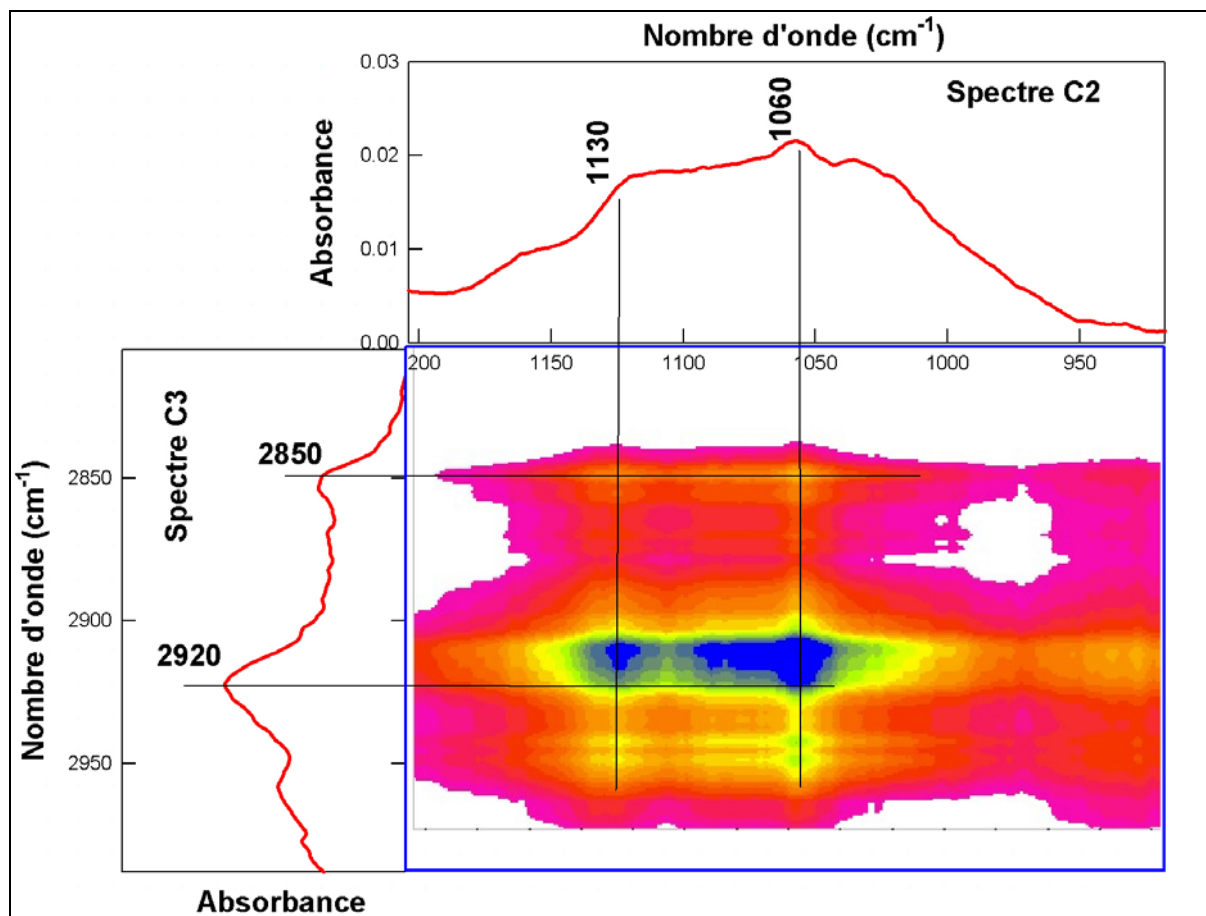
**Tableau 18 : Résultats de la décomposition spectrale du domaine 1200-900 cm<sup>-1</sup> des polysaccharides produits sous contraintes de cisaillement variables.** Le modèle utilisé est un modèle gaussien. Les valeurs présentées ici sont les valeurs optimisées non-arrondies. Les valeurs représentées en rouge concernent les modifications significatives.

Paramètre spectral	Débit (l/h)	Bande 1040	Bande 1060	Bande 1085	Bande 1120	Bande 1160
Position $\nu_0$ (cm <sup>-1</sup> )	280	1044	1058	1081	1117	1158
	140	1040	1058	1085	1119	1159
	70	1040	1057	1098	1125	1156
Largeur à mi-hauteur $\Delta\nu_{1/2}$ (cm <sup>-1</sup> )	280	91	12	35	42	31
	140	93	13	38	40	30
	70	87	13	63	28	36
Aire relative A (%)	280	64	1	9	20	6
	140	66	1	9	19	5
	70	56	2	27	8	7

L'ensemble de ce massif et plus particulièrement ses composantes élémentaires constituent donc une empreinte spectrale qui reflète la structure des polysaccharides synthétisés par *P. aeruginosa* sous différentes contraintes de cisaillement. Comme le montre le tableau récapitulatif 18, les positions et aires relatives des bandes observées aux forts débits (280 et 140 l/h) ne sont pas significativement différentes. Des modifications spectrales très significatives apparaissent par contre quand le débit décroît à 70 l/h ce qui correspond à une chute du taux de cisaillement à la paroi de 80% par rapport au débit de 140 l/h. Les composantes qui sont affectées sont : *i*) la bande à 1085 cm<sup>-1</sup> qui subit un décalage vers les hautes fréquences de 13 cm<sup>-1</sup> avec un accroissement de son aire d'un facteur trois et *ii*) la bande à 1120 cm<sup>-1</sup> qui se décale de 6 cm<sup>-1</sup> et décroît de 30% en intensité. On note que ces deux bandes reflètent la composition en monomères et les liaisons inter-osidiques des polysaccharides. Aucune modification des bandes reflétant les groupes carboxyle des

alginates n'est observée. Ces observations nous permettent donc d'affirmer qu'au-delà d'un certain taux de cisaillement (entre 0,07 et 0,33 soit des débits supérieurs à  $\approx 100$  l/h), *P. aeruginosa* adapte sa synthèse de polysaccharides vraisemblablement afin de conférer à la matrice extracellulaire des propriétés rhéologiques particulières qui lui permettent de faire face au stress mécanique accru.

Afin de confirmer que, là aussi, l'adhésion et la croissance du biofilm dépend étroitement du ratio LPS/EPS, une carte 2D de corrélation asynchrone (Fig. 56) a été établie de part et d'autre du seuil de colonisation entre les conditions C2 (140 l/h) et C3 (70 l/h).



**Figure 61 : Carte de corrélation 2D asynchrone des spectres correspondant à C2 et C3 en mode dynamique.**

La Figure 61 montre bien que, dans le cas de contraintes de cisaillement, la colonisation est liée à un taux élevé de production de LPS et une production d'alginate réduite.



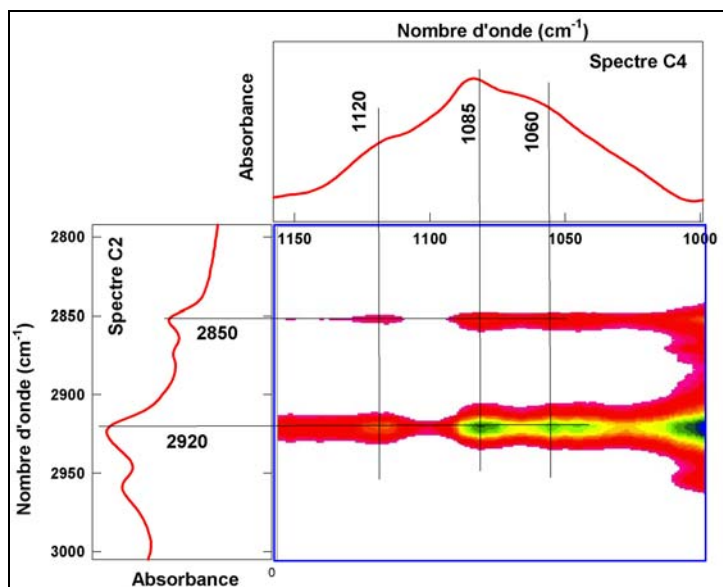
### V.3. Conclusions

La première partie de notre étude a porté sur l'impact des propriétés de surface des bactéries planctoniques sur leur capacité à interagir avec un matériau donné. Cela a permis d'évaluer l'importance du milieu environnant sur ces propriétés et celle de la capacité des microorganismes à s'adapter. Il est ainsi possible de dégager, avec précaution, certaines règles en faisant la part entre interactions spécifiques et non spécifiques. Il nous a semblé essentiel d'étendre cette étude au début de la formation d'un biofilm sachant que la capacité d'adaptation des bactéries inclut bien entendu les profondes et progressives modifications métaboliques qui existent entre populations planctoniques et sessiles. Ceci justifie à nos yeux le protocole d'étude en dynamique présenté dans ce chapitre. Observer un biofilm au bout de sept jours dans nos conditions de culture permet l'investigation du début de formation (phase de colonisation) avant d'atteindre la maturité. Cela doit permettre d'établir un lien avec les mécanismes précoces de la bioadhésion. Nous avons d'ailleurs dans certains cas montré que l'état du biofilm à sept jours ne découle pas systématiquement du taux d'adhésion initial. Ce point sera discuté dans la conclusion générale.

Le protocole choisi pour cette étude relève d'un parti pris qui est de toujours se rapprocher au mieux des conditions réelles qui règnent dans les canalisations d'eau potable. Ayant montré l'importance du couple bactérie / matériau pour la bioadhésion nous avons choisi d'étudier la formation du biofilm sur un matériau d'intérêt. Ce choix interdit de suivre en continu la croissance du biofilm comme l'on fait de nombreuses études où les bactéries adhèrent sur un cristal ATR dont les propriétés de surface sont très différentes de celles des matériaux utilisés pour les canalisations d'eau potable. L'avantage que nous pouvons par contre tirer de ce choix est que les propriétés du biofilm formé sont plus proches de celles des biofilms ainsi formés naturellement dans ces conditions.

Un fait marquant ressortant de cette étude est la très grande variabilité qu'introduisent les paramètres physico-chimiques dans l'adhésion. Seules trois conditions expérimentales (sur les dix étudiées) ont débouché sur une colonisation significative à sept jours. Dans tous les cas de colonisation importante des surfaces, nous avons constaté que la synthèse de LPS était privilégiée sur celle des alginates. C'est ce que nous apprend l'étude spectrale détaillée des biofilms. Que ce fait essentiel soit une cause ou un effet est encore difficile à établir. Comme mentionné dans d'autres travaux du laboratoire (Lahaye *et al.*, 2007b) le rôle des polysaccharides, notamment les EPS, sont très différents selon qu'une population

planctonique ou sessile est considérée. Il est toutefois possible de rechercher, chez les bactéries planctoniques, si un faible rapport EPS/LPS est un facteur conditionnant la colonisation à long terme. Notre analyse de corrélation asynchrone 2D en dynamique (*cf.* Fig. 59) a porté sur les conditions C3 (pH7,5, 50 mM, faible colonisation) et C10 (pH9,5, 5 mM, forte colonisation) ; il est possible de rechercher une anti-corrélation de même type sur les bactéries planctoniques acclimatées aux mêmes conditions en mode statique soit C2 (pH7,5 et 50 mM) et C4 (pH9,5 et 5 mM) en conditions statiques.



**Figure 62 : Carte de corrélation 2D asynchrone des spectres correspondant à C2 et C4 en mode statique.**

La comparaison des figures 59 et 62 suggère qu'il existe *déjà* au stade planctonique une orientation métabolique, fonction du milieu environnant, qui prédispose la bactérie à la colonisation de surfaces abiotiques. On note toutefois que si les baisses d'intensité du massif 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$  sont toujours corrélées à des hausses d'intensité du massif reflétant les polysaccharides, les transitions des lipides concernées varient quelque peu. L'importance de ce fait et son exploitation possible comme marqueur du potentiel bactérien à coloniser des surfaces seront discutés plus loin.

Nous attendons de la microscopie confocale des informations sur la structure tridimensionnelle des biofilms. L'observation montre que seules des structures 2D ont pu être identifiées du fait de la « jeunesse » du biofilm. Par contre, ces mesures faites *in situ* immédiatement après l'arrêt de la culture sont extrêmement représentatives du biofilm formé. De plus l'évaluation de la mortalité cellulaire s'est avérée essentielle compte tenu du fait que, dans certains cas, le simple dénombrement cellulaire au DAPI aurait conduit à une

surévaluation de la population fixée. Il faut toutefois rappeler que, mêmes mortes, des cellules adhérees participent au conditionnement de la surface et peuvent faciliter des colonisations ultérieures. Le rôle fonctionnel de couches de cellules mortes dans des colonies d'*E. coli* a en effet déjà été évoqué (Characklis, 1988 ; Haudidier *et al.*, 1988; van der Wende *et al.*, 1989 ; Camper *et al.*, 1996) ou des biofilms à *P. aeruginosa* (Webb *et al.*, 2003).

---

# **Discussion et conclusions générales**

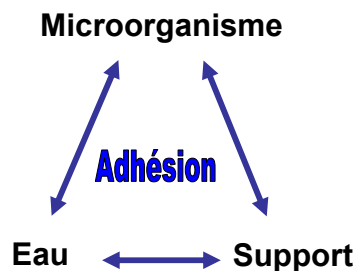
---

## Discussion et conclusions générales

« *Mieux vaut prévenir que guérir* »

*Principe de base de la médecine traditionnelle chinoise*

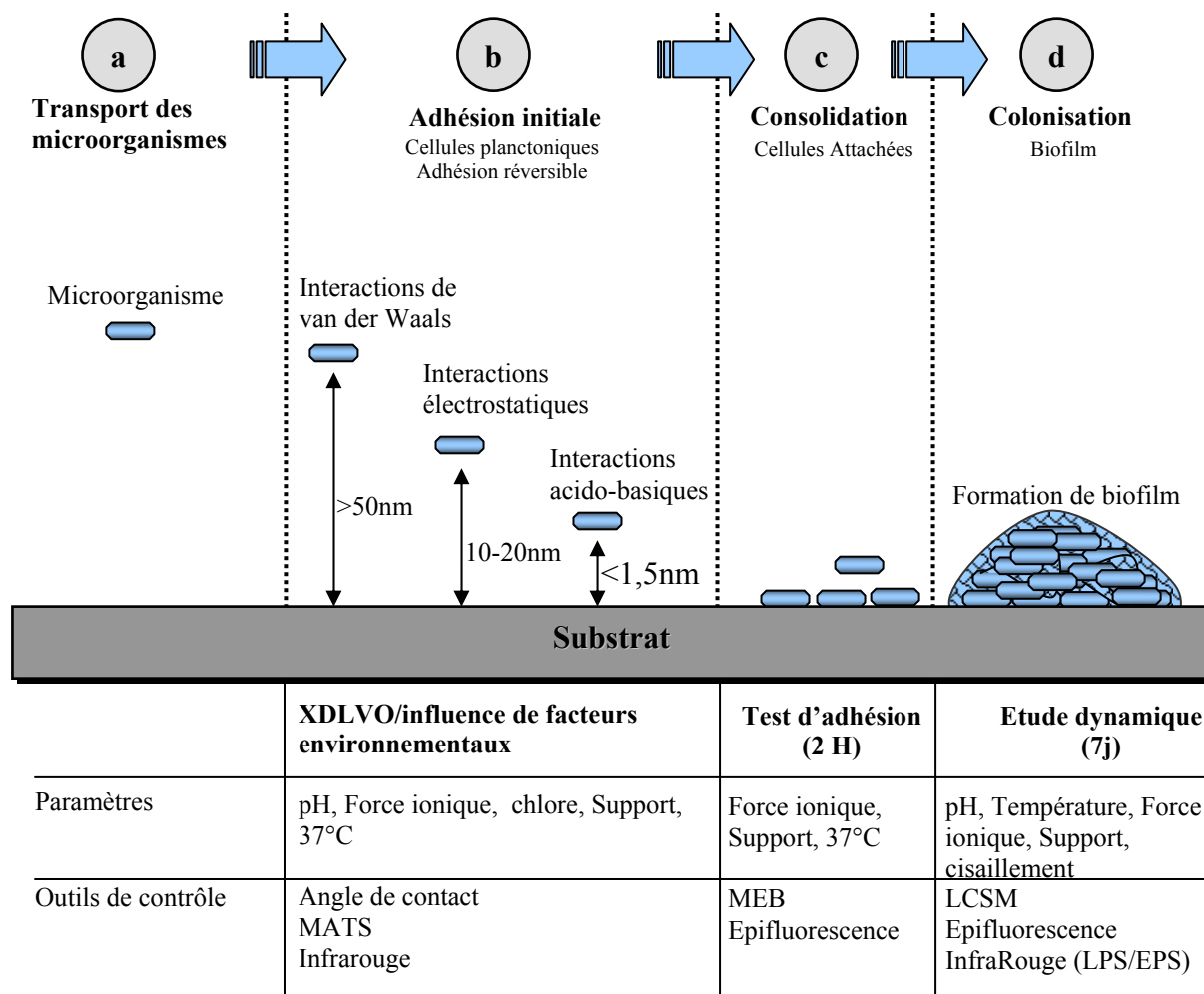
La formation de biofilms est un phénomène commun à la majorité des matériaux exposés à une certaine humidité et contaminés par des microorganismes. Leur formation passe généralement par trois phases qui sont l'adhésion, la consolidation et la colonisation. Il est clair qu'agir durant les phases précoces de leur formation constitue une stratégie idéale pour lutter contre ces nuisances. Ceci nécessite toutefois une bonne compréhension des mécanismes impliqués dans l'adhésion.



L'adhésion bactérienne est un phénomène aux interfaces, qui résulte d'interactions entre 3 partenaires : le support d'adhésion, le ou les microorganismes présents et le milieu environnant. Les propriétés de surface de ces trois entités sont étroitement interdépendantes comme le rappelle le schéma ci-dessus. L'adhésion met donc en jeu les propriétés de surface des microorganismes et celles des supports, propriétés qui sont elles-mêmes fonction du milieu auquel elles sont exposées. Ces interactions physico-chimiques sont de nature hydrophobe, acide-base, électrostatique et brownienne ; ces dernières sont habituellement négligées pour des particules de dimension de l'ordre de celle des bactéries. Si ces interactions semblent essentielles pour caractériser l'adhésion, leur rôle n'est pas toujours clairement identifié.

Notre étude a donc eu pour but, dans le cas précis de la bioadhésion aux canalisations d'eau potable, de contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans ce processus étant donné qu'il constitue une étape-clé pour l'élaboration de stratégies de lutte contre les biofilms. Nous l'avons mené en utilisant deux souches modèles (*P. aeruginosa* et *E. coli*) importantes pour le contrôle de la qualité de l'eau et dans des conditions physico-

chimiques très proches de celles qui caractérisent les eaux potables. L'interdépendance soulignée plus haut exige en effet de se rapprocher au mieux des conditions (matériaux, souches, milieu) qui prévalent dans un réseau de distribution, faute de quoi nos résultats seraient de peu de portée.



**Figure 1 développée : Diagramme d'étude des trois phases de la formation d'un biofilm**

Notre étude est donc partie de l'idée que la formation d'un biofilm pouvait et devait être empêchée en agissant au niveau de l'adhésion initiale sachant que celle-ci est essentiellement gérée par les interactions physico-chimiques préalablement citées. Autrement dit, la formation à terme d'un biofilm est conditionnée par la capacité d'une population bactérienne donnée à interagir avec un matériau donné dans des conditions environnementales également définies. La théorie prédictive d'adhésion XDLVO, basée sur la physico-chimie des interfaces doit donc pouvoir prédire l'adhésion bactérienne aux canalisations d'eau potable et la formation de biofilms qui s'ensuit. Si cette assertion est fondée, nous avons là un indicateur pertinent qui permettra aux opérateurs des réseaux industriels de faire *a priori* un choix de matériau en

fonction des flores locales et des caractéristiques propres à l'eau potable distribuée dans ce réseau. Cette aide à la décision ne nécessite que la caractérisation physico-chimique préalable des bactéries et des supports d'adhésion dans les conditions d'exploitation du réseau d'eau potable.

Quatre matériaux utilisés pour l'adduction d'eau potable au Maroc différant par leur nature chimique et propriétés physico-chimiques de surface (PVC, PEX, PEHD et PPR) ont été testés comme supports d'adhésion. Le pouvoir d'adhésion de bactéries modèles a été évalué, et ce, à deux forces ioniques distinctes (5 et 50 mM) afin d'évaluer le rôle joué par les interactions électrostatiques qui, on le sait, peuvent être décisifs dans certains cas. Nous avons ensuite cherché à corrélérer les potentiels d'interactions calculés d'après la théorie XDLVO et les taux d'adhésion observés après deux heures de mise en contact. Ceci nous renseigne sur la validité de cet indicateur pour prédire la colonisation dans un réseau et proposer un outil pour l'aide à la décision concernant le choix d'un matériau peu propice à la colonisation bactérienne.

Une bonne adéquation entre la théorie (approche prédictive) et l'expérience (tests d'adhésion) a été observée pour *E. coli*. Par contre, pour *P. aeruginosa* le modèle théorique ne s'applique pas de manière satisfaisante pour tous les supports, et l'adhésion sur le PEHD semble être régie par des mécanismes non pris en compte dans le modèle thermodynamique utilisé. Nous montrons également que *P. aeruginosa* présente une plus grande variabilité que *E. coli* vis-à-vis de variations environnementales. Nous parlons ici des propriétés de surface des bactéries. Qui dit donc variabilité dit modifications phénotypiques, induites par le milieu, des constituants membranaires protéiques, lipidiques ou saccharidiques. Tous ces constituants interviennent dans l'adhésion avec des importances variables. Il est donc peu surprenant, c'est le contraire qui le serait, que d'une souche à l'autre, l'importance de tel ou tel type d'interaction soit exalté : LW pour *E. coli*, AB pour *P. aeruginosa*.

La portée des approches théoriques prédictives dans le domaine de l'adduction d'eau potable dépend donc, on le voit ici, du potentiel que possède la bactérie d'intérêt à s'adapter aux variations environnementales qui existent dans le réseau. Si cette variabilité est faible, l'indicateur sera valide ; dans le cas contraire d'autres indicateurs devront être recherchés, et ce d'autant plus que cette capacité d'adaptation est susceptible de rendre la souche plus résistante aux traitements de désinfection ou aux stress environnementaux et donc d'accroître le risque sanitaire. On constate donc que l'adaptabilité constitue un facteur majeur pour la question qui nous occupe. Jusqu'ici la variabilité dont il était question était principalement

due, ou induite, par des modifications environnementales. Il ne faut pas pour autant négliger l'évolution phénotypique de la bactérie au cours des stades qui mènent jusqu'au biofilm mature. En effet, le calcul du potentiel d'adhésion est basé sur les propriétés physico-chimiques de *cellules planctoniques* adaptées au milieu. Les tests d'adhésion, quant à eux, décrivent le comportement de *cellules attachées*. On tente donc de corréler des comportements à deux stades distincts. Si les modifications phénotypiques, c.a.d. la différenciation cellulaire du planctonique au sessile, sont de peu de portée, la consolidation sera corrélée à, et donc déductible de l'adhésion. Dans le cas contraire, la prédiction sera erronée.

Afin d'identifier les paramètres susceptibles d'affecter les propriétés de surface des bactéries, et donc de modifier leur comportement vis-à-vis d'un support donné, une deuxième partie de ce travail visait à évaluer l'influence de certains facteurs environnementaux essentiels comme le pH, la force ionique et la présence du chlore actif sur les propriétés physico-chimiques de surface des cellules bactériennes libres (hydrophobicité, acide-base, charges électriques) en utilisant la technique d'adhésion microbienne aux solvants (MATS). Nous montrons classiquement que tous ces facteurs influencent les propriétés physico-chimiques des souches étudiées, mais aussi que l'ampleur de cet effet varie, comme souligné ci-dessus, avec la souche considérée ce qui reflète sa faculté d'adaptation à un stress environnemental. La complexité biochimique des parois et membranes bactériennes rend incertaine toute interprétation systématique des modifications physico-chimiques observées. Notre apport ici a donc été de proposer des interprétations basées sur les comportements observés au regard de la littérature sur le sujet. Il faut ici souligner que parmi les nombreuses études portant sur l'adhésion, bien peu ont été menées dans les conditions environnementales proches de celles prévalant dans les réseaux d'eau potable (utilisation de milieux tamponnés par exemple) et avec les matériaux *ad hoc*.

La technique d'adhésion microbienne aux solvants (MATS) a permis de compléter les informations déduites des mesures d'angle de contact quant à l'importance relative des interactions les unes par rapport aux autres, y compris les interactions électrostatiques; ceci confirme la complémentarité de ces deux techniques. Une étude structurale par spectroscopie infrarouge, nous a éclairé sur l'origine des constatations précédentes en mettant en évidence l'implication des constituants membranaires de la bactérie, essentiellement les polysaccharides, dans l'adaptation au milieu environnant avec des conséquences attendues pour l'adhésion.



Dans le domaine de l'eau potable, la présence de souches à grande adaptabilité augmente le risque sanitaire, ce risque pouvant même être accru après traitement par le chlore en raison de la modification des propriétés de surface de bactéries résistantes, qui pourrait favoriser la fixation de nouvelles cellules bactériennes.

Cette partie de notre étude a également mis en évidence la problématique posée par la détermination du caractère hydrophobe des bactéries qui peut parfois donner des résultats contradictoires selon la technique d'analyse utilisée. C'est surtout vrai pour les souches mucoïdes comme *P. aeruginosa*. Ce point a été discuté en fonction des spécificités propres à chaque technique et des espèces biochimiques membranaires contribuant à ce caractère.

Enfin, grâce à des techniques non destructives, nous avons évalué, sous cisaillement, l'adaptation structurale, l'organisation et l'architecture du biofilm de *P. aeruginosa* après 7 jours de formation dans un bioréacteur spécialement conçu pour mieux se rapprocher des conditions réelles régnant dans les canalisations d'eau potable. Nous complétons ainsi notre travail par l'étude de la troisième phase de développement que constitue la colonisation. Ce bioréacteur nous a permis d'imposer les paramètres biologiques et physico-chimiques en jouant notamment sur la température et le cisaillement, deux paramètres présentant de grandes variations dans les réseaux.

Les choix de *P. aeruginosa* en tant que souche modèle et du PEHD en tant que support d'adhésion pour réaliser cette étude en dynamique à l'aide d'une culture mono-microbienne, sont basés sur nos observations qui ont révélé le grand écart observé par rapport aux prédictions pour le PEHD et la grande adaptabilité de cette bactérie aux variations environnementales.

Nous avons voulu d'abord vérifier si la consolidation (évaluée par le test d'adhésion) est corrélée à la colonisation et la formation du biofilm (évaluée à 7 jours). Le tableau ci-dessous rappelle les résultats du taux d'occupation (prédit ou observé) de la surface du PEHD par *P. aeruginosa* aux différentes étapes qui conduisent à la formation du biofilm.

**Tableau 19: Tableau récapitulatif des interactions *P. aeruginosa* – PEHD aux trois stades de formation du biofilm.** pH 7,5 ; 37°C. L'effet de la force ionique a été retenu car de la concentration saline dépend la surface colonisée à moyen terme (7J).

<b>Stade</b>	<b>Cellules planctoniques (Adhésion)</b>	<b>Cellules attachées (Consolidation)</b>	<b>Biofilm (Colonisation)</b>
<b>[NaCl]</b>	$\Delta G^{TOTAL}$	<b>Densité cellulaire</b>	<b>Surface colonisée</b>
<b>5mM</b>	11,5 mJ / m <sup>2</sup>	1 10 <sup>9</sup> / cm <sup>2</sup>	83 %
<b>50mM</b>	31,7 mJ / m <sup>2</sup>	3,5 10 <sup>9</sup> / cm <sup>2</sup>	8 %

Les mesures des énergies d'adhésion, selon l'approche prédictive XDLVO, prévoit un taux de colonisation du PEHD plus important à force ionique faible, alors que selon les tests d'adhésion (à 2 H), il s'avère que ce taux pour le PEHD est plus important à force ionique élevée. Selon les observations effectuées en microscopie à épifluorescence et confocale (à 7 J), nous constatons que le taux de colonisation du biofilm à force ionique faible est dix fois supérieur. Ce cas illustre le fait qu'il est hasardeux de déduire le potentiel de colonisation de la bactérie sur un support particulier de son pouvoir d'adhésion sur ce même matériau. Il est très vraisemblable, et cela est renforcé par nos travaux, que les forces de cisaillement vont induire une réponse cellulaire pour s'adapter aux contraintes hydrodynamiques imposées. Cette nouvelle adaptation peut avoir des conséquences notables sur le développement du biofilm.

Notre étude par spectroscopie infrarouge a démontré, en considérant des conditions extrêmes de colonisation (pH 9,5 ; 5mM pour une colonisation optimale et pH 7,5 ; 50 mM pour une colonisation faible) que dans le cas d'une colonisation importante, la synthèse de LPS était privilégiée sur celle des alginates. Le rapport LPS/EPS pourrait donc constituer un marqueur du potentiel de colonisation d'une bactérie pour un milieu donné. Nous avons posé la question de savoir s'il s'agissait d'une cause ou d'un effet de la formation du biofilm, *i.e.*, est-ce que la production de LPS au détriment des EPS est caractéristique de l'adaptation des cellules planctoniques à un environnement donné ou bien ce rapport (LPS/EPS) participe-t-il des phénomènes qui accompagnent plus tardivement la maturation du biofilm ?

Afin de chercher à répondre à cette question, l'analyse infrarouge a été effectuée sur des cellules planctoniques adaptées aux mêmes conditions que celles jugées extrêmes en mode

dynamique. L'analyse par spectroscopie infrarouge 2D suggère fortement que ce marqueur est déjà détectable sur les cellules acclimatées au milieu. Nous proposons donc que le milieu environnant prédispose la bactérie à l'adhésion si la réponse cellulaire à ce milieu favorise la production de LPS au détriment des LPS (alginates). Nos résultats impliquent de plus que le potentiel mucoïde de la souche ne dépend pas uniquement de son fond génétique comme cela a été montré à plusieurs reprises, mais est *aussi* modulable par l'environnement.

Si la validité de ce marqueur pour les souches mucoïdes du type *P. aeruginosa* devait se confirmer, les opérateurs de réseau disposeraient enfin d'un indicateur performant pour anticiper, dans le cadre d'un réseau donné, les conséquences néfastes du biofouling. En effet, la détermination de ce rapport, par spectroscopie IR ou par dosage des polysaccharides associés aux deux fractions LPS et EPS pour une bactérie donnée en fonction de conditions physico-chimiques susceptibles de se produire dans le réseau d'intérêt, suffirait dans le cadre d'un plan d'expérience, à identifier les circonstances dans lesquelles le potentiel de colonisation de la dite souche serait élevé. La surveillance quotidienne de la qualité de l'eau, en fournissant les données de base, permettrait d'alerter les responsables quand une configuration (*e.g.* eau chaude, alcaline et de salinité faible) est atteinte. Un des avantages non négligeable de cette veille « biologique » serait de pouvoir adapter la fréquence et l'intensité des traitements de désinfection sans nécessiter la mise en œuvre de protocoles expérimentaux difficiles à conduire en routine.

Prévenir c'est évaluer le risque. Si ce risque peut être évalué de façon précoce, la gestion du réseau ne peut être que mieux sécurisée. S'ils sont relayés, nous espérons que nos travaux contribueront à l'amélioration continue de la qualité des réseaux d'eau potable afin que les populations, quel que soient les climats sous lesquels elles vivent, puissent bénéficier au quotidien de conditions sanitaires satisfaisantes et ne paient plus le lourd tribut sanitaire que nous connaissons.

---

# **Références bibliographiques**

---

## Références bibliographiques

- Absolom, D. R., F. V. Lambert. 1983. Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46:2765-2770.
- Allen, M. J., R. H. Taylor, et E. E. Geldreich. 1980. The occurrence of microorganisms in water mains encrustations. *Journal of American Water Works Association.* 72:614-625.
- Allison, D. G., et I. W. Sutherland, J. General Microbiology. 1987. The role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria. 133:1319-1327.
- Al-Qadiri H. M., M. Lin, A. G. Cavinato and B. A. Rasco. 2006. Fourier transform infrared spectroscopy, detection and identification of *Escherichia coli* O157:H7 and *Alicyclobacillus* strains in apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 73-80.
- An, Y. H., and R. J. Friedman. 2000. Handbook of bacterial adhesion. Principles, methods and applications. Humana Press Inc., Totowa, N.J.
- Asther, M., M. N. Bellon-Fontaine, C. Capdevilla, G. Corrieu. 1990. A thermodynamic model to predict *Phamerochaete chrysosporium* INA- 12 adhesion to various solid caffiers in relation to lignin peroxidase production. *Biotechnol. Bioeng.* 35:477-490.
- Aumercier, M., D. M. Murray, and J. L. Rosner, 1990, Potentiation of susceptibility to aminoglycosides by salicylates in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23:835-845.
- Balebona, M. C., M. A. Moriñigo, A. Faris, K. Krovacek, I. Mansson, M. A. Bordas, J. J. Borrego. 1995. Influence of salinity and pH on the adhesion of pathogenic *Vibrio* strains to *Sparus aurata* skin mucus. *Aquaculture* 132:113–120.
- Banks, M. K , et J. D. Bryers. 1992. Deposition of bacterial cells into glass and biofilm surfaces. *Biofouling.* 6:81-86.
- Bayoudh, S., A. Othmane, F. Bettaieb, A. Bakhrouf, H. Ben Ouada, et L. Ponsonnet. 2006. Quantification of the adhesion free energy between bacteria and hydrophobic and hydrophilic substrata. *Materials Science and Engineering*, 26:300-305.
- Beech, I.B., 1999. La corrosion microbienne. *Biofuture* 186:36–41.
- Belas, R., M. Simon, M. Silverman. 1986. Regulation of lateral flagella gene transcription in *vibrio parahaemolyticus*. *J. bacterial.*, 167:210-218.

- Bellamy, L. J., 1975. Infrared spectra of complex molecules. London, Parker F.S., Infrared spectroscopy in biochemistry, biology and medicine, Chapman and Hall.
- Bellon-Fontaine, M. N., 1986. Caractérisation physico-chimique des surfaces solides et adhésion des bactéries aux surfaces. Thèse de l'université Pierre et Marie-Curie.
- Bellon-Fontaine, M. N., et A. Vernhet. 1999. Chap. 2: Adhésion de particules et de micro-organismes aux surfaces solides. In: "Nettoyage, Désinfection et Hygiène dans les Bio-industries», Leveau J. et Bouix M. (eds), Technique & Documentation LAVOISIER, Paris, 25-40.
- Bellon-Fontaine, M. N., J. Rault, C. J. van Oss. 1996. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 7:47-53.
- Bellon-Fontaine, M. N., N. Mozes, H. C. Van der Mei, J. Sjollema, O. Cerf, P. G. Rouxhet, et H. J. Busscher. 1990. A comparison of thermodynamic approaches to predict the adhesion of dairy microorganisms to solid substrata. *Cell Biophysics*, 17:93-106.
- Bellon-Fontaine, M. N., O. Cerf. 1991. Mechanisms of microorganism adhesion to surfaces: factors influencing the adhesion. *J. Industries alimentaires et agricoles*. 108:13-17.
- Bertrand, D., et D. Dufour. 2000. La spectroscopie et ses applications analytiques, Ed. Tec et Doc, Paris:31-74.
- Besner, M. C., B. Barbeau, V. Gauthier, M. Prévost, R. Chapleau, M. Trépanier, M. Aubé, C. Soly. 1999. Mise au point d'un outil de gestion intégrée d'un réseau de distribution d'eau potable: application à un secteur pilote de la ville de Montréal. *Américana*.
- Besner, M. C., 1999. Influence des paramètres structurels et opérationnels sur la qualité de l'eau dans un réseau de distribution. Thèse de l'Université de Montréal.
- Boonaert, C. J. P., Y. F. Dufrêne, S. R. Derclaye et P. G. Rouxhet. 2001. Adhesion of *Lactococcus lactis* to model substrata: direct study of the interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 22:171-182.
- Boonaert, C. J., P. G. Rouxhet. 2000. Surface of lactic acid bacteria: Relationship between chemical composition and physicochemical properties. *App. Environ. Microbiol.* 66: 2548-2554.

- Bornert, H., 1989. Contribution à l'étude des biofilms dans réseaux de distribution d'eau d'alimentation. Thèse de doctorat de l'Université de Nancy.
- Bos, R., H. C. van der Mei, et H. J. Busscher. 1999. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions - its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews*, 23:179-230.
- Bosgiraud, C., microbiologie générale et santé. Edition ESKA. 2003.
- Boulangé-Petermann, L., B. Baroux, M. N. Bellon-Fontaine. 1993. The influence of metallic wettability on bacterial adhesion. *J. Adhesion. Scien. Technol.*, 7:221-230.
- Bourion, F., 1995. Etude de la formation et de la désinfection de biofilms mono- et bi-microbiens de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Listeria innocua*, thèse de doctorat de l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaire, Massy, France.
- Boyd, A., and A. M. Chakrabarty. 1994. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology*, 60:2355-2359.
- Boylan, R. J., et N. H. Mendelson, 1969. Initial Characterization of a Temperature-Sensitive Rod- Mutant of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 1969 December; 100:1316-1321.
- Brandenburg, K., U. Seydel. 1996. Fourier transform infrared spectroscopy of cell surface polysaccharides" in *Infrared spectroscopy of biomolecules*. H. H. Mantsch & D. Chapman (EDs). Wiley-Liss, New York.
- Briandet, R., T. Meylheuc, C. Maher, M.N. Bellon-Fontaine. 1999b. . *Listeria monocytogenes* Scott A: Cell Surface Charge, Hydrophobicity, and Electron Donor and Acceptor Characteristics under Different Environmental Growth Conditions. *J. Appl. Environ. Microbiol* 65:5328-5333.
- Bruinsma, G. M., H. C. van der Mei, et H. J. Busscher. 2001. Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses. *Biomaterials*. 22:3217-3224.
- Bryers, J. D., et Characklis W. G., 1982. Processes governing primary biofilm formation. *Biotech. Bioing.*, 24, 2451-2476.
- Busalmen, J. P., et S. R. de Sánchez. 2001. Adhesion of *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 17552) to Nonpolarized and Polarized Thin Films of Gold. 67:3188-3194.

- Busscher, H. J., A. H. Weerkamp, H. C. van der Mei, A. W. J. van Pelt, H. P. de Jong, J. Arends. 1984. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* 84:980-983.
- Busscher, H. J., M. N. Bellon-Fontaine, N. Mozes, H. C. van der Mei, J. Sjollema, A.J. Leonard, P.G. Rouxhet and O. Cerf. 1990. An interlaboratory comparison of physico-chemical methods for studying the surface properties of microorganisms – application to *Streptococcus thermophilus* and *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Microbiol.Methods.* 12:101-115.
- Busscher, H. J., P. S. Handley et H. C. Van Der Mei. 2000. In: A. Baszkin and W. Norde, Editors, *Physico-chemistry of Biological Interfaces*, Marcel-Dekker, New York, 431–458.
- Busscher, H. J., R. Bos, H. C. Van der Mei. 1995. Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. *FEMS Microbiol Lett* 128:229-234.
- Busscher, H.J., et A. H. Weerkamp. 1987. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. *FEMS Microbiol. Rev.*, 46:165-173.
- Caldwell, D. E., 1983. Derivation of Growth Rate Equation Describing Microbiological Surface Colonization. *Microbial Ecology.* 9:1-6.
- Caldwell, D. E., et J. R. Lawrence. 1986. Bacterial growth kinetics in the hydrodynamic boundary layer of solid-liquid interfaces. *Microb. Ecol.* 12:299–312.
- Camper, A. K., J. L.Warren, et J. T. Hayes. 1996. Effect of Growth Conditions and Substratum Composition on the Persistence of Coliforms in Mixed-Population Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology.* 62:4014–4018.
- Cappello, S., P. P. Guglielmino. 2006. Effects of growth temperature on polystyrene adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853. *Brazilian Journal of Microbiology.* 37:205-207.
- Carpentier, B., and O. Cerf. 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J. Appl. Bacteriol.* 75:499–511.
- Carson, L. A., M. S. Favero, W. W. Bond, et N. J. Petersen. 1972. Factors Affecting Comparative Resistance of Naturally Occurring and Subcultured *Pseudomonas aeruginosa* to Disinfectants. *Appl. Microbiol.* 23:863-869.
- Chamberlain, N. R., 1992. Another Easy Method of Extruding Polyacrylamide Gels from Isoelectric Focusing Tubes of 1.5-mm Inside Diameter. *BioTechniques.* 13:532.



- Chandra, J., D. M. Kuhn, P. K. Mukherjee, L. L. Hoyer, T. McCormick, et M. A. Ghannoum. 2001. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol.* 183:5385-5394.
- Chandy, J. P., et M. L. Angles. 2001. Determination of nutrients limiting biofilm formation and the subsequent impact on disinfectant decay. *Water Res.* 25:2677-2682.
- Chantereau, J., 1980. Corrosion bactérienne - bactéries de la corrosion. 2ème édition. Paris : Techniques et documentation Lavoisier. 262p.
- Characklis, W. G. 1989. Biofilms. Edited by W. G. Characklis & K. C. Marshall. New York: Wiley. 55-89.
- Characklis, W. G., 1981. Fouling biofilm development: a process analysis, *Biotech. Bioeng.*, 23, 1923-1960.
- Characklis, W. G., 1983. Process analysis in microbial systems : biofilms as a case study in mathematics in microbiology. Bazin M. Academic Press London. 171-234.
- Characklis, W. G., 1984. biofilm development : a process analysis in “microbial adhesion and aggregation” (Dahlem Konfèrenze), Springer Verlag., Berlin, 137-157.
- Characklis, W. G., 1988. Bacterial regrowth in distribution systems. American Water Works Association Research Foundation, Denver, Colo.
- Characklis, W. G., Mcfeters G.A., et K.C. Marshall. 1990. physiological ecology in biofilm systems. In *Biofilm*. Characklis W.G., Marshall K.C. (eds). John, wiely et sons News York, 265-340.
- Chavant, P., B. Martinie, , T. Meylheuc, M.-N Bellon-Fontaine, et M. Hébraud. 2002. *Appl. Environ. Microbiol.*68:728-737.
- Chen, H., M. Fujita, Q. Feng, J. Clardy, et G. R. Fink. 2004. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 5048–5052.
- Chicurel, M., 2000. Bacterial biofilms and infections. Slimebusters. *Nature.* 408:284-286.
- Christensen, B. E., 1989. The role of extracellular polysaccharide biofilms. *J. Biotechnol.* 10: 181-202.
- Cloete, T. E., D. Westaard, et S. J. van Vuuren. 2003. Dynamic response of biofilm to pipe surface and fluid velocity. *Water Science & Technology.* 47(5): 57–59.

- Coates, J.P., 1993. New analyzer technology to monitor refinery unit production efficiency, Hydrocarbon Technology International Review, Sterling Publications PLC, UK:193-197.
- Cooksey, K. E., 1992. Extracellular polymers in biofilms. In: Melo, L.F., Fletcher, M.M. and Bott, T.R. (eds.): Biofilms: Science and Technology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London; 137-147.
- Costerton J. W., G. G. Geesey, et K. J. Cheng, 1978, How bacteria Stick. Scientific American 238:86-95.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart et E. P. Greenberg. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 284, 1318-1322.
- Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, et H. M. Ippin-Scott. 1995a. Microbial biofilms. Annu. Rev. Microbiol. 49:711-745.
- Coucke, D., L. Lessirard, B. Pollet, et P. Solkatchoff, 1997. Incidence des matériaux sur la qualité de l'eau : cas des canalisations à base de liants hydrauliques". Tech. Sci. Méthodes.
- Cowan, M. N., H. C. Van der Mei, P. G. Rouxhet, et H. J. Busscher. 1992. Physico-chemical and structural properties of the surfaces of *Peptostreptococcus micros* and *Streptococcus mitis* as compared to those of mutants streptococci, *streptococcus sanguis* and *streptococcus salivarius*. J Gen. Microbiol., 138: 2707-2714.
- Cryz, S. J., Jr., T. L. Pitt, E. Furer, et R. Germanier, 1984, Role of lipopolysaccharide in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 44:508-513.
- Cuperus, P. L., H. C. Van der Mei, G. Reid, A. W. Bruce, A. H. Khoury, P. G. Rouxhet, et H. J. Busscher. 1993. Physicochemical surfaces characteristics of urogenital and poultry *lactobacilli*. J Colloid. Interf. Sci., 156: 319-324.
- Davies D. G., A. M. Chakrabarty, et G. G. Geesy. 1993. Exopolysaccharide production in biofilms: Substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. App. Environ. Microbiol.. 59 :1181-1186.
- Dengis, P. B., et P. G. Rouxhet. 1997. Surface properties of top- and Bottom – fermenting yeast. Yeast., 13: 931-943.
- Deshmane, C., Q. Yuan, R. S. Perkins, et R. D. K. Misra. 2007. On striking variation in impact toughness of polyethylene-clay and polypropylene-clay nanocomposite systems : The effect of clay-polymer interaction. Materials science & engineering A. 458:150-157.

- Dickinson, E., et G. Stainsby. 1982. Colloids in food. Applied science publishers. Londers-New York.
- Dickson J. S., et E. K. Daniels. 1991. Attachement of *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* to glass as affected by surface film thickness. Cell density and bacterial motility. *J. Industrial Microbiol.* 8:281-283.
- Donlan, R. M., & W. O. Pipes. 1988. Selected drinking water characteristics and microbial population density. *J Am Water Works Assoc.* 80:70–76.
- Douglas, B. D., D. T. Merrill, et J. O. Catlin. 1996. Water quality deterioration from corrosion of cement-mortar linings. *Journal of American Water Works Association.* 88:99-107.
- Drenkard, E., 2003, Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microb. Infect.* 5:1213-1219.
- Dufrêne, Y., Van der wal, W. Norde, P. G. Rouxhet. 1997. X ray photoelectron spectroscopy analysis of whole cells and isolated cell walls of gram positive bacteria. Comparison with biochemical analysis. *J. Bacteriol.*, 179: 1023-1028
- Dupré, A. 1869. Théorie Mécanique de la chaleur. Gauthier-Villars (Ed.), Paris, 367-370.
- Evans, L. R., et A. Linker. 1973. Production and Characterization of the Slime Polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 116:915-924.
- Filip, Z., et S. Hermann. 2001. An attempt to differentiate *Pseudomonas* spp. and other soil bacteria by FT-IR spectroscopy, *Eur. J. Soil Biol.* 37:137–143.
- Florentz, M., P. Hartemann, J. T'Seyen. 1987. Métabolisme du phosphore dans la cellule bactérienne. In point sur l'épuration et le traitement des effluents, technique et documentation Paris. 3:223-241.
- FNDAE. La dégradation de l'eau potable dans les réseaux. Ministère de l'agriculture et de la pêche. HS n°12.
- Gaboriaud, F., E. Dague, S. Bailet, F. Jorand, J. Duval, et F. Thomas. 2006. Multiscale dynamics of the cell envelope of *Shewanella putrefaciens* as response to pH change, *Colloids and surfaces B.* 52:108-116.
- Gallardo-Moreno, A. M., M. L. Gonzalez-Martin, C. Pérez-Giraldo, E. Garduno, J. M. Bruque, et A. C. Gomez-Garcia. 2002. Thermodynamic Analysis of Growth Temperature Dependence in the Adhesion of *Candida parapsilosis* to Polystyrene. *Applied and Environmental microbiology.* 68:2610-2613.

Gallardo-Moreno, M., M. L. Gonzalez-Martin, C. Pérez-Giraldo, E. Garduno, J. M. Bruque, et A. A. C. Gomez-Garcia. 2002. Serum as a Factor Influencing Adhesion of *Enterococcus faecalis* to Glass and Silicone. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:5784-5787.

Gauthier F. 2002. Biofilms et qualité biologique de l'eau Potable au cours de sa distribution. Mémoire DESS Université de Picardie – Amiens.

Gauthier, Y., et P. Isoard. 1989. L'adhésion des bactéries sur les surfaces. *Industries alimentaires et agricoles*. 106:31-33.

Geertsema-Doornbusch, G. I., H. C. van der Mei and H. J. Busscher. Microbial cell surface hydrophobicity The involvement of electrostatic interactions in microbial adhesion to hydrocarbons (MATH). *Journal of Microbiological Methods*, 18:61-68.

Gerschel, A., 1995. Liaisons intermoléculaires, les forces en jeu dans la matière condensée, CNRST éditions.

Gilbert, P., A. J. McBain, et A.H. Rickard. . 2003. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. *Int. Biodeterioration & Biodegradation*. 51:245-248.

Gómez-Suárez, C., M. G. Bruinsma, G. Rakhorst, H. C. van der Mei and H. J. Busscher. Hydrophobicity of Peritoneal Tissues in the Rat. *Journal of Colloid and Interface Science*. 253:470-471.

Gordon, A. S., S. M. Gerchakov, et L. R. Udey. 1981. The effect of polarisation on the attachment of marine bacteria to copper and platinum surfaces. *Can. J. Microbiol.*, 27:698-703.

Gras, M. H. 1993. Etude de l'influence des traitements technologiques sur la microflore bactérienne de *Cichorium endivia*. Application aux produits de 4<sup>ème</sup> gamme. Doctorat ENSIA.

Gué, M., V. Dupont, A. Dufour, et O. Sire. 2001. Bacterial Swarming: A Biochemical Time-Resolved FTIR-ATR Study of *Proteus mirabilis* Swarm-Cell Differentiation. *Biochemistry*. 40:11938-11945.

Guillemot, G., 2006. Compréhension des mécanismes à l'origine de l'adhésion de *Saccharomyces cerevisiae* sur acier inoxydable - Implications pour l'hygiène des surfaces en industrie agroalimentaire. Thèse de l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.

- Hadjiev, D., D. Dimitrov, M. Martinov, et O. Sire. 2007. Enhancement of the biofilm formation on polymeric supports by surface conditioning. *Enz. Mic. Tech.*, 40:840-848.
- Hamadi, F., 2005. Effet des conditions environnementales sur les propriétés physico-chimiques de la surface des bactéries et sur leur adhésion au verre. Rôle des différentes propriétés physico-chimiques dans le phénomène d'adhésion. Thèse de l'université Cadi Ayyad.
- Hamadi, F., H. Latrache, A. El Ghmari, H. Zahir, M. Mabrouki, et A. Elbouadili. 2005. Determination of *Escherichia coli* Negative Charge Concentration From XPS Data and Its Variation with pH. *Journal of surface analysis*, 12:293.
- Hamadi, F., H. Latrache, A. El Ghmari, M. Ellouali, M. Mabrouki, et N. Kouider. 2004. Effect of pH and ionic strength on hydrophobicity and electron donor and electron acceptor characteristics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *An. microbiol.*, 54 :213-225.
- Hamadi, F., H. Latrache, M. Mabrouki, A. Elghmari, A. Outzourhit, M. Ellouali, et A. Chtaini. 2005. Effect of pH on distribution and adhesion of *Staphylococcus aureus* to glass. *J. adhesion science and technology*, 19:73-85.
- Hancock, R. E. W., 1991. Bacterial outer membranes: Evolving Concepts. *ASM News* 57:175-182.
- Harden, V. P., & J. O. Harris. 1953. The Isoelectric Point of Bacterial Cells. *Journal of Bacteriology*, 65:198-202.
- Harkes, G., H. C. Van der Mei, P. G. Rouxhet, J. Dankert, H. J. Busscher, J. Feijen. 1992. Physicochemical characterisation of *Escherichia coli*. A comparison with gram-positive bacteria. *Cell Biophys.*, 20: 17-32.
- Hasley C., & H. Leclerc. *Microbiologie des eaux d'alimentation*. Paris: Tech doc, Lavoisier; 495p.
- Haudidier, K., J. L. Paquin, T. Francais, P. Hartemann, G. Grapin, F. Colin, M.J. Jourdain, J.C. Block, J. Cheron, O. Pascal, Y. Levi et J. Miazga. 1988. Biofilm growth in a drinking water network: a preliminary industrial pilot-plant experiment. *Wat. Sci. Tech.*, 20:109-115.
- Haxaire, K., Y. Marechal, M. Milas, et M. Rinaudo. 2003. Hydration of polysaccharide hyaluronan observed by IR spectrometry. I. Preliminary experiments and band assignments. *Biopolymers*. 72:10-20.

- Haxaire, K., Y. Marechal, M. Milas, et M. Rinaudo. 2003. Hydration of hyaluronan polysaccharide observed by IR spectrometry. II. Definition and quantitative analysis of elementary hydration spectra and water uptake. *Biopolymers*. 72:149-161.
- Hentzer, M., H. Wu, J. B. Andersen, K. Riedel, T. B. Rasmussen, N. Bagge, N. Kumar, M. A. Schembri, Z. Song, P. Kristoffersen, M. Manefield, J. W. Costerton, S. Molin, L. Eberl, P. Holsen, T. M., J. Kwang Park, D. Jenkins, et R. E. Selleck. 1991. Contamination of potable water by permeation of plastic pipe. *Journal of American Water Works Association*. 83:53-56.
- Hentzer, M., L. Eberl, J. Nielsen, et M. Givskov. 2003. Quorum sensing: a novel target for the treatment of biofilm infections. *BioDrugs* 17:241-250.
- Hentzer, M., M. Givskov, et L. Eberl. 2004. Quorum sensing in biofilms: gossip in slime city. *Microb. Biofilms* 1:118-140.
- Herson, D. S., & B. Mcgonigle, M. A. Payer, K. H. Baker. 1987. Attachment as a factor in the protection of *Enterobacter cloacae* from chlorination, *Applied and environmental microbiology*. 53:1178-1180.
- Houillon, D., 1995. Caractérisation de la qualité du service des réseaux anciens d'eau potable en vue de leur renouvellement. Université de Strasbourg 1, Strasbourg, France.
- Hsu, B. M., & C. Huang. 2002. Influence of ionic strength and pH on hydrophobicity and zeta potential of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Colloid Surf. A* 201:201–206.
- Israelachvili, J., 1991. Intermolecular and surface forces, 2nd edition. Academic Press Limited (Ed), Londres.
- Jackson, M., & H. H. Mantsch. 1996. Infrared Spectroscopy of Biomolecules. Mantch H.H., D. Chapman eds., New York, Wiley-Liss:311-340.
- James, A. M. 1991. In *Microbial Cell Surface Analyses. Structural and physico-chemical Methods*, ed by N. Mozes, P. S. Handley, H. J. Busscher and P. G. Rouxhet, p223, VCH Publishers, New York.
- Jana, T. K., A. K. Srivastava, K. Csery, et D. K. Arora. 2000. Influence of growth and environmental conditions on cell surface hydrophobicity of *Pseudomonas fluorescens* in non-specific adhesion. *Can. J. Microbiol.* 46:28–37
- Joret, J. C. et Y. Levi, 1986, Méthode rapide d'évaluation du carbone éliminable des eaux par voie biologique, *Trib. CEBEDEAU*, 39:3-9.

- Joret, J. C., Y. Levi et C. Volk. 1991. Biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) content of drinking water and potential regrowth of bacteria, *Water Sci. Technol.*, **2**:95–101.
- Kaplan, L. A, et T. Bott. 1993. Evaluation and simplification of the assimilable organic carbon nutrient bioassay for bacterial growth in drinking water, *Applied and Environmental Microbiology*. **59**:1532–1539.
- Kawaharajo, K., J. Y. Homma, Y. Aoyama, K. Okada, K. Morihara, 1975, Effects of protease and elastase from *Pseudomonas aeruginosa* on skin. *Jpn. J. Exp. Med.* **45**:79-88.
- Kiené, L., W. Lu, et Y. Lévi. 1998. Relative importance of the phenomena responsible for chlorine decay in drinking water distribution systems. *Water Science and Technology*. **38** :219-227.
- Kives, J., B. Orgaz, et C. SanJosé. 2006. Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, **52**:123-127.
- Kuhn, D. M., J. Chandra, P. K. Mukherjee, et M. A. Ghannoum. 2002. Comparison of Biofilms Formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on Bioprosthetic Surfaces. *Infection and Immunity*. **70**:878-888.
- Lahaye, E., 2006. Rôle structurant des exopolysaccharides dans un biofilm bactérien. Thèse de l'Université de Bretagne-Sud.
- Lahaye, E., T. Aubry, N. Kervarec, P. Douzenel et O. Sire. 2007a. Does water activity rule *P. mirabilis* periodic swarming? I. Biochemical and functional properties of the extra cellular matrix». *Biomacromolecules*. **8**:1218-1227.
- Lahaye, E., T. Aubry, V. Fleury et O. Sire. 2007b. Does water activity rule *P. mirabilis* periodic swarming? II. Viscoelasticity and water balance during colony's swarming». *Biomacromolecules*. **8**:1228-1235.
- Latrache, H., 1993. Les propriétés de la surface d'*Escherichia coli* uropathogènes et leur variation après culture en presence de concentration subinhibitrice de nitroxoline. Thèse de l'Université Paris Sud.
- Latrache, H., A. El Ghmari, M. Karroua, A. Hakkou, H. Ait Mousse, A. El Bouadili, P. Bourlioux. 2002. Relations between Hydrophobicity tested by three methods and surface chemical composition of *Escherichia coli*. *Microbiologica*. **25**:75-82.

- Latrache, H., N. Moses, C. Pelletier, P. Bourlioux. 1994. Chemical and physicochemical properties on *Escherichia coli*: Variations among three strains and influence of culture conditions. *Colloid Surf B*. 2:47-56.
- Latrache, H., P. Bouriloux, M. Karroua, H. Zahir, A. Hakkou. 2002. Effects of sunhibitory concentration of Nitroxoline on the surface properties of *Escherichia coli*. *Folia Microbiol.* 45:485-490.
- Lau, G. W., H. Ran, F. Kong, D. J. Hassett, and D. Mavrodi, 2004, *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infect. Immun.* 72:4275-4278.
- LE Cloirec, C., P. LE Cloirec, M. ELMghari, J. Morvan, G. Martin. 1983. Concentration and analysis of numerous nitrogenous organic substances in natural waters.14:127-145.
- Le Cloirec, C., P. Le Cloirec, M. Elmghari, J. Morvan, G. Martin. 1983. Concentration and analysis of numerous nitrogenous organic substances in natural waters. *Int. j. environ. anal. Chem.* 14:127-145.
- Lechevalier, M. P., and H. A. Lechevalier. 1984. Taxonomy of Frankia, p. 575–582. In L. Ortiz-Ortiz, L. F. Bojalil, and V. Yakoleff (ed.), *Biological, biochemical, and biomedical aspects of actinomycetes*. Academic Press, Inc., New York.
- LeChevallier, M. W., 1990. Coliform regrowth in drinking water : A review. *Journal of American Water Works Association.* 82:74-86.
- Lechevallier, M. W., C. D. Cawthon, R. G. Lee. 1988b. Inactivation of biofilm bacteria. *Applied and Environmental Microbiology.* 54:2492-2499.
- LeChevallier, M. W., C. D. Lowry, et R. G. Lee. 1990. Disinfecting biofilms in a model distribution system. *Journal of American Water Works Association.* 82:87-99.
- LeChevallier, M. W., C. D. Lowry, R. G. Lee, et D. L. Gibbon. 1993. Examining the relationship between iron corrosion and the disinfection of biofilm bacteria. *Journal of American Water Works Association.* 85:111-123.
- LeChevallier, M. W., T. M. Babcock, et R. G. Lee. 1987. Examination and characterization of distribution system biofilms. *Applied and Environmental Microbiology.* 53:2714-2724.
- Leclerc, H., 1975. *Microbiologie générale*. Doin ed. Paris. 279p.



- Lethola, M. J., I. T. Miettinen, M. M. Keina~nen, T. Kekki, O. Laine, A. Hirvonen, T. Vartiainen, P. Martikainen, 2004. Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes. *Water Res.* 38:3769–3779.
- Lethola, M. J., I.T. Miettinen, T. Lampola, A. Hirvonen, T. Vartiainen, P.J. Martikainen, 2005. Pipeline materials modify the effectiveness of disinfectants in drinking water distribution systems. *Water Res.* 39:1962–1971.
- Lichtenberg, D., M. Rosenberg, N. Sharfman, et I. Ofek. A kinetic approach to bacterial adherence to hydrocarbon *Journal of Microbiological Methods.* 4:141-146.
- Little, B. J., P. Wagner, J. S. Maki, M. Walch, R. Mitchell. 1986. Factors influencing the adhesion of microorganisms to surfaces. *The Journal of adhesion.* 20:187-210
- Macguire, J., V. Krisdhasirna. 1992. Surface thermodynamics, protein adsorption and biofilm development In *Physical Chemistry of Food.* Schartzberg H. G., wartel R. W. (eds). Marcel Dekker, New York.
- Madigan, M., J. Martinko, et J. Parker, *Biology of microorganisms.* ninth ed. 2000: Prentice hall Inc
- Mahajan-Miklos, S., M. W. Tan, L. G. Rahme, and F. M. Ausubel. 1999. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa-Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* 96:47-56
- Mai, G. T., W. K. Seow, G. B. Pier, J. G. McCormack, et Y. H. Thong. 1993. Suppression of lymphocyte and neutrophil functions by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide (alginate): reversal by physicochemical, alginase, and specific monoclonal antibody treatments. *Infect Immun.* 61:559-564.
- Majtán, V., et L. Majtánová. 2000. Effect of quaternary ammonium salts and amine oxides on the surface hydrophobicity of *Enterobacter cloacae*. *Chem. Pap.* 54:49-52.
- Manuel, C. M., O. C. Nunes, L.F. Melo. 2007. Dynamics of drinking water biofilm in flow/non-flow conditions. *Water research* 41:551-562.
- Mao, Y., M. P. Doyle, et J. Chen. 2001. Insertion mutagenesis of wca reduces acid and heat tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Bacteriol.* 183:3811-3815.

- Marcotte, L., G. Kegelaer, C. Sandt, J. Barbeau et M. Lafleur. An alternative infrared spectroscopy assay for the quantification of polysaccharides in bacterial samples *Analytical Biochemistry*. 361:7-14.
- Marsh, P. D., Martin M. V., 1992. Dental plaque. In: *Oral microbiology*. 3rd edn. London: Chapman and Hall, 98-132.
- Marshall, K. C., 1986. Adsorption and adhesion processes in microbial growth at interfaces. *Adv. Colloid. Interface. Eci.*, 25:59-86.
- Marshall, K. C., R. Stout, R. Mitchell. 1971. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *T. Gen. Microbiol.*, 68:337-348.
- Martens, H., J. Pram Nielsen, et S. Balling Engelsen. 2003. Light Scattering and Light Absorbance Separated by Extended Multiplicative Signal Correction. Application to Near-Infrared Transmission Analysis of Powder Mixtures' *Anal. Chem.* 75:394-404
- Martin, I., M. C. Dubois, T. Saermark, R. M. Epand, J. M. Ruyschaert. 1993. Lysophosphatidylcholine mediates the mode of insertion of the NH<sub>2</sub>-terminal SIV fusion peptide into the lipid bilayer. *FEBS Lett.* 333:325-30.
- Martinez, C., E. Pons, G. Prats, and J. Leon. 2004. Salicylic acid regulates flowering time and links defense responses and reproductive development. *Plant J.* 37:209-217
- Maul, A., A. H. El-Shaarawi, et J. C. Block. 1985. Heterotrophic bacteria in water distribution systems. I. Spatial and temporal variation. *Sci. Total Environ.* 44:01-214.
- McEldowney, S., M. Fletcher. 1986. Variability of the Influence of Physicochemical Factors Affecting Bacterial Adhesion to Polystyrene Substrata. *App. And Environ. Microbiol.* 52:460-465.
- McFeters, G. A., 1984. Biofilm development and its consequences. In: Marshall KC, editor. *Microbial adhesion and aggregation*. Berlin:Springer. 109–124.
- Melo, L. F., et M. J. Vieira, 1999. Physical stability and biological activity of biofilms formed under turbulent flow and low substrate concentration. *Bioproc. Eng.*, 20:363–368.
- Miyata, S., M. Casey, D. W. Frank, F. M. Ausubel, E. Drenkard. 2003. Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis". *Infect. Immun.* 71: 2404-13.

- Mozes, N., A. J. Léonard and P. G. Rouxhet. 1988. On the relations between the elemental surface composition of yeasts and bacteria and their charge and hydrophobicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Volume 945, Issue 2, 22 November, Pages 324-33.
- Mozes, N., A. J. Léonard, P. G. Rouxhet. 1988. On the relations between the elemental surface composition of yeasts and bacteria and their charge and hydrophobicity. *Biochim. Biophys. Acta*. 945: 324-334.
- Mozes, N., D. E. Amory, A. J. Leonard, P.G. Rouxhet. 1989. Surface properties of microbial cells and their role in adhesion and flocculation. *Colloid Surf.*, 42:313 –329.
- Mozes, N., F. Marchal, H. P. Hermesse, J. L. Van Haecht, L. Reuliaux, A. J. Leonard, et al. 1987. Immobilization of microorganisms by adhesion: interplay of electrostatic and non-electrostatic interactions. *Biotechnol Bioeng*. 30:433- 450.
- Mozes, N., S. Lortal. 1995. X-ray photoelectron spectroscopy and biochemical analysis of the surface of *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046. *Microbiology* 141:11-19.
- Naumann, D., 2000. Infrared Spectroscopy in Microbiology (*Encyclopedia of analytical Chemistry*) R. A. Meyers (Ed.), Chichester, Wiley & Sons Ltd.:102-131.
- Neu, T. R. 1996. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol. Rev.* 60:151–166.
- Nivens, D. E., J. Schmit, J. Snidateki, T. Anderson, J. Q. Chambers, and D. C. White. 1993. Multi-channel AFT/FT-IR spectrometer for on-line examination of microbial biofilms. *Applied Spectroscopy* 47:668-671.
- Nivens, D. E., M. J. Franklin, J. Williams, and D. E. Ohman. 2001. Role of alginate and alginate O-acetylation in the formation of *Pseudomonas aeruginosa* micro-colonies and biofilms. *Journal of Bacteriology*. 183:1047-57.
- Ozaki, Y., Y. Liu. I. Noda. 1997. two-dimensional infrared and near-infrared correlation spectroscopy : applications to studies of temperature-dependent spectral variations of self-associated molecules, *Appl. spectrosc.* 51:526-535.
- Parent, A., 1996. Control of Coliform Growth in Drinking Water Distribution Systems. *Journal . Chart. Inst. Water Environ. Manag.* 10:442.
- Parker, F. S., 1971. Applications of infrared spectroscopy in biochemistry, biology and medicine. Plenum Press, New York.

- Paul, J. H., et W. H. Jeffrey, 1985b. Effect of surfactants on the attachment of estuarine and marine bacteria to surfaces. *Can. J. Microbiol.* 31:224–228.
- Paul, J. H., et W. H. Jeffrey. 1985a. Evidence for separate adhesion mechanisms for hydrophilic and hydrophobic surfaces in *Vibrio proteolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:431–437.
- Pelletier, C., C. Bouley, C. Cayuela, S. Bouttier, P. Bourlioux, M. N. Bellon-Fontaine. 1997. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei subsp. casei*, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1725–1731.
- Pereira, M. A., M. M. Alves, J. Azeredo, M. Mota, et R. Oliveira. 2000. Influence of physico-chemical properties of porous microcarriers on the adhesion of an anaerobic consortium. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 24:181-186.
- Peyton, B. M., et W. G. Characklis. 1993. A statistical analysis of the effect of substrate utilization and shear stress on the kinetics of biofilm detachment. *Biotechnol. Bioeng.* 41:728-735.
- Pier, G. B., F. Coleman, M. Grot, M. Franklin, D. E. Ohman. 2001. Role of alginate O acetylation of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to opsonic phagocytosis. *Infect. Immun.* 69:1895-1901.
- Pratt, L. A., R. Kolter. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation – role of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* 30:285-293.
- Pratt, L. A., et R. Kolter. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.*, 30:285-293.
- Prigent-Combaret, C., E. Brombacher, O. Vidal, A. Ambert, P. Lejeune, P. Landini, C. Dorel. 2001. Complex Regulatory Network Controls Initial Adhesion and Biofilm Formation in *Escherichia coli* via Regulation of the *csgD* Gene. *J. Bacteriol.*, 183:7213-7223.
- Prigent-Combaret, C., P. Lejeune. 1999. Monitoring gene expression in biofilms. *Methods in enzymology.* 310:56-79.
- Rahme, L. G., F. M. Ausubel, H. Cao, E. Drenkard, B. C. Goumnerov, G. W. Lau, S. Mahajan-Miklos, J. Plotnikova, M.-W. Tan, J. Tsongalis, C. L. Walendziewicz, R. G. Tompkins. 2000. Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 8815-8821.

- Ramesh, S., K. H. Leen, K. Kumutha, A. K. Arof. 2006. FTIR studies of PVC/PMMA blend based polymer electrolytes. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 66:1237-1242.
- Ramsey, D. M., et D. J. Wozniak. 2005. Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Mol. Microbiol.* 56:309-322.
- Reynolds, T., et G. R. Fink. 2001. Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science.* 291:878-881.
- Ridgway, H. F., et B. H. Olson. 1982. Chlorine Resistance Patterns of Bacteria from Two Drinking Water Distribution Systems. *Applied And Environmental Microbiology.* 44:972-987.
- Rigal, S., et J. L. Godet. 1997. Évaluation de l'inertie des matériaux organiques. Étude de leur comportement vis-à-vis de l'eau potable". *Tech Sci. Méthodes. Génie urbain - Génie rural.* 5:31-37.
- Rijnaarts, H. H. M., W. Norde, J. Lyklema et A. J. B. Zehnder. The isoelectric point of bacteria as an indicator for the presence of cell surface polymers that inhibit adhesion *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Volume 4, Issue 4, 30 May 1995, Pages 191-197.
- Rizet, M., J. Blanc, M. Cognet, M. Derons, N. Dorizon, and G. Filippi. 1984. Qualité de l'eau dans les réseaux de distribution, son évolution biologique et chimique. *J. Fr. Hydrol.* 15:207-221.
- Rodier, J., In Dunod Paris, L'analyse de l'eau, 8<sup>e</sup> Edition, 1996.
- Rogers, J., A. B. Dowsett, J. V. Lee, C. W. Keevil. 1991. Chemostat studies of biofilm development on plumbing materials and the incorporation of *Legionella pneumophila*. *Biofilms and biodeterioration and biodegradation.* Elsevier: 458-460.
- Rosenberg, M. K. 1986. Hydrophobic interactions: role in bacterial adhesion. *Adv. Microbiol. Ecol.*, 9: 353-393.
- Rosenberg, M., D. Gutnick et E. Rosenberg. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 9 :29-33.
- Rouessac, F., et A. Rouessac. 1998. Analyse chimique : méthodes et techniques instrumentales modernes. Dunod, 4<sup>ème</sup> Edition:147-171.

- Rubio, C., 2002. Conception des mécanismes d'adhésion des biofilms en milieu marin en vue de la conception de nouveaux moyens de prévention. Thèse de l'Université Paris VI.
- Russell, Hugo et Ayliffe's. 2004. Principles and practice of disinfection preservation & sterilization. Blackwell, 4<sup>ème</sup>, édition.
- Rutter, P. R., et B. Vincent. 1980. The adhesion of microorganisms to surface: physico-chemical aspects. In Microbial adhesion to surface, Berkeley, RC, Lynch, JM, Melling, J, Rutter, PR and B Vincent, eds 79-92, Ellis Horwood Limited Chichester.
- Sadiki, A. I., D. T. Williams, R. Carrier, et B. Thomas. 1996. Pilot study on the contamination of drinking water by organotin compounds from PVC materials. Chemosphere. 32:2389-2398.
- Sander, A., B. Berghult, E. Ahlberg, A. Elfstrom Broo, E. Lind Johansson, et T. Hedberg. 1997. Iron corrosion in drinking water distribution systems - Surface complexation aspects. Corrosion Science. 39:77-93.
- Sara, M., Sleytr, U. B. (2000): S-Layer Proteins. J. Bacteriol., 182:859-868.
- Schmitt, J., H. C. Flemming. 1998. FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. Int Biodeterior Biodeg 41:1-11.
- Scott, J.E., 1989. Secondary structures in hyaluronan solutions: chemical and biological Implications. In Laurent,T.C. (ed.), The Biology of Hyaluronan. Ciba Foundation Symposium 143, Chichester, UK:6-20.
- Servais, P., G. Billen et M. C. Hascoet. 1987. Determination of the biodegradable fraction of dissolved organic matter in waters. Water Research. 21:445-450
- Servais, P., P. Laurent, G. Randon. 1995. Comparison of the bacterial dynamics in various French distribution systems. Journal Water SRT-Aqua. 44:10-17
- Sharma, P. K., K. Hanumantha Rao, K. S. E. Forssberg, et K. A. Natarajan. 2001. Surface chemical characterisation of *Peanibacillus polymyxa* before and after adaptation to sulphide minerals. International journal of mineral processing. 62:3-25.
- Sharma, P. K., K. Hanumantha Rao. 2002. Analysis of different approaches for evaluation of surface energy of microbial cells by contact angle goniometry. Advances in Colloid and Interface Science. 98:341-463.
- Shaw, T., M. Winston, C. J. Rupp, I. Klapper, et P. Stoodley. 2004. Commonality of Elastic Relaxation Times in Biofilms. Physical Review Letters. 93:981021-981024

- Sibille, I., 1998. Stabilité biologique des réseaux de distribution d'eau potable, *Année biologique*. 78:117-161.
- Sjollema, J., H. C. van der Mei, H. M. Wugen, H. J. Busscher. 1990. The influence of collector and bacterial cell surface properties on the deposition of oral *streptococci* in a parallel plate flow cell. *J. Adhesion Scien. Technol.* 4:765-777.
- Sleytr, U. B., et P. Messner. 1988. Crystalline surface layers in procaryotes. *J. Bacteriol.* 170:2891–2897.
- Sleytr, U. B., M. Sàra, et D. Pum. 2000. in *Supramolecular Polymers*, ed. Ciferri, A. Dekker, New York:177–213.
- SNIMA. Norme Marocaine Homologuée. NM 03.7.001,
- Stanley, P. M., 1983. Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. *Can. Journal of microbiology*. 29:1493-1499.
- Steinberg, S. Kjelleberg, N. Hoiby, et M. Givskov, 2003, Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J.* 22:3803-3815
- Stoodley, P., Boyle, Derdds JDI, Lappin – Scott HM.1997. Consensus model of biofilm structure. In *biofilms community and cntrol*. Wimpenny J, Handley P, Gilbert P, Lappin – Scott HM, Jones M, (eds) Bioline UK.
- Sutherland, I. W., 2001. Biofilm exopolysayccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*. 147:3-9.
- Tricard, D., et P. Buffaut. 1995. Interprétation et communication des résultats au regard des normes microbiologiques relatives aux eaux destinées à la consommation humaine. *TSM*, N° 3:196-199.
- Tuovinen, O. H., K. S. Button, A. Vuorinen, L. Carlson, D. M. Mair, et L. A. Yut. 1980. Bacterial, chemical and mineralogical characteristics of tubercles in distribution pipelines. *Journal of American Water Works Association*. 72:626- 635.
- van der Kooij, D., 1982. Assimilable organic carbon as an indicator of bacterial regrowth, *J. Am. Water Works Assoc.* 84:57–65.
- van der Kooij, D., 1982. Determining the concentration of easily assimilable organic carbon in drinking water, *J. Am. Water Works Assoc.* 74:540–545.

van der Kooij, D., 1990. Assimilable organic carbon (AOC) in drinking water in Gordon A. McFeters ed Drinking Water Microbiology. New York.

van der Kooij, D., et W. A. M. Hijnen. 1988. Nutritional versatility and growth kinetics of an *Aeromonas hydrophila* strain isolated from drinking water. Applied and Environmental Microbiology, 54:2842–2851.

van der Mei, H. C., A. H. Weerkamp, et H. J. Busscher. 1987. A comparison of various methods to determine hydrophobic properties of *streptococcal* cell surfaces. J. Microbiol. Methods, 6:277-287.

van der Mei, H. C., B. Van de belt-Gritter, G. Reid, H. Bialkowska-Hobrzanska, H. J. Busscher. 1997. Adhesion of coagulase-negative *staphylococci* grouped according to physico-chemical surface properties. Microbiology. 143:3861-3870.

van der Mei, H. C., D. Naumann and H. J. Busscher. 1993. Grouping of *oral streptococcal* species using fourier-transform infrared spectroscopy in comparison with classical microbiological identification. Archives of Oral Biology. 38:1013-1019.

van der Mei, H. C., S. Meijer and H. J. Busscher. Electrophoretic Mobilities of Protein-Coated Hexadecane Droplets at Different pH. Journal of Colloid and Interface Science, 205:185-190.

van der Wal, A., M. Minor, W. Norde, J. Lyklema and A. J. B. Zehnder, 1997. Langmuir **13**:165–171.

van der Wende, E., W. G. Characklis, et D. B. Smith. 1989. Biofilms and bacterial drinking water quality. Water Res. 23:1313–1322.

van Loosdrecht, M. C. M., J. Lyklema, W. Norde, A. J. B. Zehnder. 1989. Bacterial adhesion : A physicochemical approach. Microb. Ecol. 17:1-15.

van Loosdrecht, M. C. M., J. Lyklema, W. Norde, G. Schraa, and A. J. B. Zehnder. 1987. Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion. Appl. Environ. Microbiol. 53:1898-1901.

van Loosdrecht, M. C. M., W. Norde, and A. J. B. Zehnder. 1987. Influence of cell surface characteristics on bacterial adhesion to solid supports, p. 575-580. In O. M. Neijssel, R. R. van der Meer, and K. C. A. M. Luyben (ed.), Proceedings of the European Congress on Biotechnology, vol. 4. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.



- van Loosdrecht, M. C., J. Lyklema, W. Norde, et A. J. Zehnder. 1990. Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol Rev* 54 :75 – 87.
- van Oss, C. J., 1994. *Interfacial forces in aqueous media* in Marcel Dekker.
- van Oss, C. J., 1995 *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Hydrophobicity of biosurfaces-Origin, quantitative determination and interaction energies. 5:91-110.
- van Oss, C. J., 1996. *Forces interfaciales en milieux aqueux*. Masson, Paris.
- van Oss, C. J., R. J. Good, et M. K. Chaudhury. 1986. The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in hydrophobic interactions between biopolymers and low energy surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*. 11:378-390.
- van Oss, C. J., R. J. Good, et M. K. Chaudhury. 1988. Additive and Nonadditive Surface Tension Components and the Interpretation of Contact Angles. *Langmuir*, 4:884-891.
- Vanhaecke E, Remon JP, Moors M, Raes F, De rubber D, Van Peteghem A. 1990. Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316L stainless steel: role of cell surface hydrophobicity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 788-795.
- Vergnault, H., 2004. *Etude et amélioration de la chromatographie en lit expansé*. Thèse de l'Université Paul Sabatier.
- Vernhet, A., 1992. *Etude de l'adhésion de Saccharomyces à des surfaces modèles : application à la vinification champenoise*. Thèse de l'Université de technologie de compiègne.
- Visser, J., 1976. Adhesion of colloidal particles. *Surf. Coll. Sci*. 8:3-84.
- Vitte, J., A. M. Benoliel, A. Pierres, et P. Bongrand. 2004. Is there a predictable relationship between surface physical-chemical properties and cell behaviour at the interface? *European Cells and Materials*, 7:52-63.
- Vivares, D., 2003. *Interactions en solution et cristallisation de l'urate oxydase*. Thèse de l'Université Paris VI.
- Walker, T. S., H. P. Bais, E. Deziel, H. P. Schweizer, L. G. Rahme, R. Fall, J. M. Vivanco. 2004. *Pseudomonas aeruginosa*-Plant Root Interactions. Pathogenicity, Biofilm Formation, and Root Exudation. *Plant Physiol*. 134: 320-331.
- Wang, J., N. Huang, C. J. Pan, S. C. H. Kwok, P. Yang, Y. X. Leng, J. Y. Chen, H. Sun, G. J. Wan, Z. Liu, P. K. Chu. 2004. Bacterial repellence from polyethylene terephthalate surface

modified by acetylene plasma immersion ion implantation–deposition. *Surface and Coatings Technology*, 186:299-304.

Webb, J.S., Thompson, L. S., James, S., Charlton, T., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., Givskov, M. et Kjelleberg, S. 2003. Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J. Bact.* 185: 4585-4592.

Weerkamp, A. H., H. C. van der Mei, H. J. Busscher. 1985. The surface free energy of *oral streptococci* after coating with saliva and its relation to adhesion in the mouth. *J. Dental Research*. 64:1204-1210.

Woo Byun, M., J. Ho Kim, D. Ho Kim, et H. Ju Kim. 2007. Effects of irradiation and sodium hypochlorite on the micro-organisms attached to a commercial food container. *Food Microbiology*. 24:544-548.

Wu, H., Z. Song, M. Hentzer, J. B. Andersen, S. Molin, M. Givskov, et N. Hoiby. 2004. Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *J. Antimicrob. Chemother.* 53:1054-1061.

Wu, W., R. F. Giese, C. J. van Oss. 1994. Linkage between  $\zeta$ -potential and electron donicity of charged polar surfaces. I: Implications for the mechanism of flocculation of particle suspensions with plurivalent counterions. *Colloids surf., A Physicochem. eng. Asp.* 89:241-252.

Young, T., 1805. An assay on the cohesion of fluids. *Philos. Trans. R. Soc., Londres.* 95:65-87.